

IRIDIUMKOMPLEXE ALS LUMINESZENZSONDEN FÜR DIE DETEKTION VON BIOMOLEKÜLEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin
Susanne Ramona Kohlmajer
aus Salzgitter

Heidelberg 2011

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt die Synthese und Charakterisierung neuartiger cyclo-metallierter Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe und deren Anwendung als Lumineszenz-sonden für die Detektion hoch negativ geladener Glykosaminoglykane und sulfatierter Poly-saccharide.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung der neuen Farbstoffe an die Analyten primär auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht. Die gewonnenen Erkenntnisse wurden genutzt, um selektive und sensitive Nachweisverfahren für diverse Glykosaminoglykane in unterschiedlichen Medien zu entwickeln. Besonders interessant im Hinblick auf die klinische Diagnostik ist der Nachweis des Antikoagulationsmittels Heparin in Proben, die Blutserum oder -plasma enthalten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, auf Basis der neuen Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe Heparin in serum-, plasma- oder urinhaltigen Proben quantitativ nachzuweisen. Der Quantifizierungsbereich korreliert gut mit dem klinisch relevanten Konzentrationsbereich. Weiterhin konnten bereits geringe Verunreinigungen durch das stark sulfatierte, semisynthetische, schwere Nebenwirkungen hervorrufende Glykosaminoglykan OSCS in Heparinproben detektiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass vor allem Iridium(III)-Komplexe mit einer hohen positiven Gesamtladung in der Lage sind, als Heparinantagonisten die antikoagulatorische Aktivität von sowohl unfraktioniertem als auch niedermolekularem Heparin zu neutralisieren. Die Verbindungen weisen eine vergleichbar starke Bindung an Heparin auf wie das standardmäßig eingesetzte Heparinantidot Protamin.

Abstract

This thesis covers the synthesis and characterization of a series of new cyclometalated iridium(III) poly(pyridyl) complexes and their use as luminescent probes for the detection of highly negatively charged glycosaminoglycans and sulfated polysaccharides.

Systematic analyses revealed that electrostatic interactions between the iridium probes and the target molecules are the main contributing factor to binding stoichiometry and affinity. Based on these results, selective and sensitive methods for the detection of different glycosaminoglycans in various media have been developed. Especially important for clinical diagnostics is the detection of the antithrombotic drug heparin in blood serum or plasma samples. Applying the newly developed iridium probes, heparin could be quantified in serum and plasma as well as in urine media. The quantification range of heparin corresponds well with clinically relevant dosing levels. Furthermore, side-effect provoking contamination of heparin samples with the semi-synthetic oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) could be detected. Additionally, the synthesized iridium(III) complexes, especially those with a high positive overall charge, have proven effective neutralization agents for the anticoagulant activity of both unfractionated and low molecular weight heparin. The effect was found to be comparable with that of the commonly used heparin antidote protamine.

IRIDIUMKOMPLEXE ALS LUMINESZENZSONDEN FÜR DIE DETEKTION VON BIOMOLEKÜLEN

Gutachter: Prof. Dr. Roland Krämer
Prof. Dr. Peter Comba

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2011

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Mai 2008 bis August 2011 unter der wissenschaftlichen Anleitung und Betreuung von Prof. Dr. Roland Krämer am Anorganisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Roland Krämer für die interessante Themenstellung, die angenehmen Arbeitsbedingungen, seine Anregungen und Diskussionen sowie die materielle Unterstützung. All dies hat wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Dem Land Baden-Württemberg danke ich für ein Stipendium der Landesgraduiertenförderung in der Zeit vom 01.01.2009 bis zum 31.12.2011.

Meiner Familie

*Man merkt nie, was schon getan wurde,
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.*

(Marie Curie)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe	2
1.1.1 Photophysikalische Eigenschaften von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen	2
1.1.2 Anwendung von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen	5
1.2 Heparin und polysulfatierte Glykosaminoglykane	8
1.2.1 Physiologische Bedeutung von Glykosaminoglykanen	11
1.2.2 Detektion von Heparin und Heparinverunreinigungen	13
2 ZIELSETZUNG	17
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	19
3.1 Entwicklung neuer Fluoreszenzsonden auf der Basis von Poly(pyridyl)-iridium(III)-Komplexen	19
3.1.1 Darstellung und Charakterisierung der aminofunktionalisierten Bipyridinliganden	19
3.1.2 Darstellung der Iridium(III)-Komplexe	24
3.1.3 Charakterisierung der neuen Farbstoffe hinsichtlich ihrer photophysikalischen Eigenschaften	27
3.1.4 Strukturelle Charakterisierung von Komplex 8*	36
3.2 Wechselwirkung der Komplexe mit Glykosaminoglykanen und anderen sulfatierten Polysacchariden	37
3.2.1 Abhängigkeit der Wechselwirkung von Struktur und Ladung der Iridium(III)-Komplexe	38
3.2.2 Abhängigkeit der Wechselwirkung von Struktur und Ladung des Analyten	45
3.2.3 Heparinneutralisation	54
3.2.4 Untersuchungen in biologischen Medien	57
3.2.5 Detektion von Heparinverunreinigungen	66
4 ZUSAMMENFASSUNG	69

5	EXPERIMENTELLER TEIL	73
5.1	Chemikalien und Geräte	73
5.2	Synthesen	76
5.2.1	Darstellung der Bipyridinliganden	77
5.2.2	Synthese der Iridiumkomplexe	83
5.3	Allgemeine Arbeitstechniken und Analysemethoden	105
5.3.1	Herstellung der Stammlösungen	105
5.3.2	Aufnahme von Anregungs- und Emissionsspektren	107
5.3.3	Bestimmung der Emissionsquantenausbeuten	107
5.3.4	Untersuchung der pH-Abhängigkeit von Absorption und Emission	108
5.3.5	Untersuchung der Wechselwirkung mit Glykosaminoglykanen und anderen sulfatierten Polysacchariden	108
5.3.6	Heptest Assay ^[89]	109
5.3.7	Chromogener Faktor-Xa Assay ^[89]	110
6	LITERATURVERZEICHNIS	111
ANHANG		117
	Übersicht der synthetisierten Verbindungen	119
	Anregungs- und Emissionsspektren	124
	¹ H-NMR-Spektren ausgewählter Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe	125
	HPLC-Elutionsprofile ausgewählter Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe	129
	Röntgenographischer Anhang	131
	Sonstige Spektren und Titrationskurven	133
	Danksagung	139
	Erklärung gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der drei möglichen Isomere von $[\text{Ir}(\text{ppy})_2\text{Cl}]_2$	2
Abbildung 1.2:	Absorptions- und Emissionsspektrum von $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{bpy})]\text{PF}_6$ (links) und $[\text{Ir}(\text{piq})_2(\text{bpy})]\text{PF}_6$ (rechts)	3
Abbildung 1.3:	Vereinfachtes Molekülorbitalschema zur Veranschaulichung der elektronischen Übergänge bei Absorption (links) bzw. Emission (rechts) in Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen der Form $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$	4
Abbildung 1.4:	Chemische Strukturen ausgewählter Beispiele für Sonden auf Basis von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen	7
Abbildung 1.5:	Die Familie der Glykosaminoglykane	9
Abbildung 1.6:	Chemische Struktur des synthetischen Pentasaccharids Fondaparinux	11
Abbildung 3.1:	Syntheschemata zur Darstellung verschieden funktionalisierter 2,2'-Bipyridinderivate ausgehend von a) 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin und b) 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd	20
Abbildung 3.2:	Chemische Struktur der Bipyridinderivate 4*, 5 und 6*	21
Abbildung 3.3:	Absorptionsspektren der Bipyridinliganden 4*, 5 und 6*	22
Abbildung 3.4:	pH-Abhängigkeit der Absorption von 4*	23
Abbildung 3.5:	Allgemeines Syntheschema für die Darstellung verschieden substituierter Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe	25
Abbildung 3.6:	Chemische Struktur der Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe 20a und 20b	26
Abbildung 3.7:	Allgemeines Syntheschema für die Darstellung von sperminfunktionalisierten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen	27
Abbildung 3.8:	Absorptionsspektren ausgewählter Verbindungen	29
Abbildung 3.9:	Emissionsspektren von 9, 13 und 18 in H_2O bzw. MeCN	31
Abbildung 3.10:	pH-Abhängigkeit der Emission von 11	34
Abbildung 3.11:	ORTEP Darstellung des Komplexkations von 8*	36
Abbildung 3.12:	Änderung der Emission von 10 (links) und 22 (rechts) bei Zugabe von UFH	38
Abbildung 3.13:	Änderung der Intensität am jeweiligen Emissionsmaximum bei Zugabe von UFH für 9–11, 21a und 21b	39
Abbildung 3.14:	Bestimmung der HDSC für die Bindung von 9–11, 21a und 21b an UFH	41
Abbildung 3.15:	Änderung der Emissionsintensität am Maximum von 14 (links) und 22 (rechts) bei Zugabe von UFH	43
Abbildung 3.16:	Änderung der Emissionsintensität am Maximum von 23 bei Zugabe von UFH	45
Abbildung 3.17:	Änderung der Emission von 14 bei Zugabe versch. Heparinoligosaccharide	46
Abbildung 3.18:	Schematische Darstellung der postulierten Wechselwirkung von 14 mit kurzkettigen Heparinoligosacchariden	47
Abbildung 3.19:	Auftragung der HDSC gegen die Kettenlänge für die Wechselwirkung von 14 mit verschiedenen Heparinoligosacchariden	47

Abbildung 3.20: Links: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von 14 bei Zugabe von LMWH und Arixtra®. Rechts: HDSC für die Wechselwirkung von 14 mit Heparinen unterschiedlicher Kettenlänge	49
Abbildung 3.21: HDSC für die Wechselwirkung von 10 mit Heparinen unterschiedlicher Kettenlänge	50
Abbildung 3.22: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von 10 (links) und 22 (rechts) bei Zugabe verschiedener GAG	52
Abbildung 3.23: Auftragung der HDSC in Abhängigkeit vom Analyten für 10 und 22	53
Abbildung 3.24: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von 21a bei Zugabe von HS, DS, CS und UFH	54
Abbildung 3.25: Auftragung der Gerinnungszeit (links) und der Anti-Xa-Aktivität (rechts) in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration für die Wechselwirkung der ppy-Komplexe 9–11, 21a und 21b mit UFH	55
Abbildung 3.26: Auftragung der Gerinnungszeit (links) und der Anti-Xa-Aktivität (rechts) in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration für die Wechselwirkung von 14, 22 und 23 mit UFH	56
Abbildung 3.27: Auftragung der Gerinnungszeit (links) und der Anti-Xa-Aktivität (rechts) in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration für die Wechselwirkung von 10 mit UFH, Dalteparin-Natrium und Fondaparinux-Natrium sowie Heparinneutralisation durch Protamin	56
Abbildung 3.28: Emission von 10 (links) und 22 (rechts) in Abhängigkeit vom Medium	58
Abbildung 3.29: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von 10 (links) und 22 (rechts) in serumhaltigen Proben bei Zugabe von UFH	59
Abbildung 3.30: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von 10 in biologischen Medien bei Zugabe von UFH (links) und LMWH (rechts)	61
Abbildung 3.31: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von 22 in biologischen Medien bei Zugabe von UFH (links) und LMWH (rechts)	61
Abbildung 3.32: Änderung der Emissionsintensität am jew. Maximum von 10 (oben) und 22 (unten) in biol. Medien bei Zugabe von UFH (links) und LMWH (rechts)	63
Abbildung 3.33: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von 10 (links) und 22 (rechts) in serumhaltiger Pufferlösung bei Zugabe von Dextransulfat	64
Abbildung 3.34: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von 10 (links) und 22 (rechts) in biologischen Medien bei Zugabe von Dextransulfat	64
Abbildung 3.35: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von 10 (links) und 22 (rechts) in biologischen Medien bei Zugabe von Dextransulfat	65
Abbildung 3.36: Links: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von 10 bei Zugabe von OSCS in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an UFH. Rechts: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von 10 bei Zugabe von OSCS in Gegenwart von 0,96 mg/mL UFH mit Ausgleichskurve	67
Abbildung 3.37: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von 21a bei Zugabe von UFH in Gegenwart von HS und DS	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Durchschnittliches Verhältnis der Anzahl der Sulfat- zu Carboxylatgruppen und mittlere negative Gesamtladung pro Disaccharid für die in dieser Arbeit verwendeten Glykosaminoglykane	10
Tabelle 3.1:	Experimentell ermittelte pK_S -Werte für die Liganden 4*, 5 und 6*	24
Tabelle 3.2:	Übersicht über die synthetisierten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe 7–20	26
Tabelle 3.3:	Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der Verbindungen 7–23	28
Tabelle 3.4:	Emissionsmaxima und Emissionsquantenausbeuten Φ (H_2O) der Verbindungen 7–23	33
Tabelle 3.5:	Exp. ermittelte pK_S -Werte für die Komplexe 9–11, 13–15, 18 und 20–23	35
Tabelle 3.6:	Ausgewählte Bindungslängen und -winkel für Komplex 8*	37
Tabelle 3.7:	Bindungsstöchiometrie sowie Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt bei Zugabe von UFH zu den ppy-Komplexen 9–11, 21a und 21b	40
Tabelle 3.8:	Ermittelte HDSC für die Bindung von 9–11, 21a und 21b (gruppiert nach amin- und amidfunktionalisierten Komplexen) an UFH	41
Tabelle 3.9:	Hypsochrome Verschiebung bei Zugabe von UFH sowie ermittelte HDSC für die Bindung von 10, 14, 21a und 22 an UFH	44
Tabelle 3.10:	Anfangssteigung bei Zugabe von UFH sowie ermittelte HDSC für die Bindung von 21a, 22 und 23 an UFH	45
Tabelle 3.11:	Bindungsstöchiometrie und Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt für die Wechselwirkung von 14 mit Heparinoligosacchariden	48
Tabelle 3.12:	Maximaler Intensitätsanstieg bzw. maximale Löschung, Bindungsstöchiometrie und Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt für die Wechselwirkung von 10 und 22 mit verschiedenen Analyten	52
Tabelle 3.13:	Sättigungspunkt sowie Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt für die Wechselwirkung von 10 und 22 mit UFH in Abhängigkeit vom Medium	60
Tabelle 5.1:	Auflistung der Elementaranalysenergebnisse für die nach Literaturvorschrift synthetisierten Verbindungen I sowie III–VII	76
Tabelle 5.2:	Molmassen der am häufigsten auftretenden Disaccharideinheiten der verwendeten Glykosaminoglykane und sulfatierten Polysaccharide sowie klinische Aktivität der eingesetzten Heparine	106
Tabelle 5.3:	Molmassen der verwendeten Heparinoligosaccharide def. Kettenlänge	107

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl-
ACT	aktivierte Gerinnungszeit (<i>activated clotting time</i>)
anr.	Anregung
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit (<i>activated partial thromboplastin time</i>)
Äq.	Äquivalente
AT-III	Antithrombin III
a. u.	willkürliche numerische Einheit (<i>arbitrary unit</i>)
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl-
bpy	2,2'-Bipyridin
bs	breites Singulett
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzq	Benzo[<i>H</i>]chinolin
C [^] N	cyclometallisierender Ligand
C _q	quartäres Kohlenstoffatom
CS	Chondroitinsulfat
CTAC	Cetyltrimethylammoniumchlorid
δ	chemische Verschiebung
Δ	unter Rückfluss erhitzen
d	Dublett/Tag
dd	Dublett eines Dubletts
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
demin.	demineralisiert
DexS	Dextransulfat
DFT	Dichtefunktionaltheorie (<i>density functional theory</i>)
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNS	Desoxyribonukleinsäure
DS	Dermatansulfat
DSSC	Farbstoffsolarzelle (<i>dye-sensitized solar cell</i>)
dt	Dublett eines Triplets
ε	Extinktionskoeffizient
EDG	elektronendonierende Gruppe (<i>electron donating group</i>)
em.	Emission
ESI	Elektronensprayionisation (<i>electron spray ionisation</i>)
Et	Ethyl-
EtOAc	Ethylacetat
EWG	elektronenziehende Gruppe (<i>electron withdrawing group</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>foetal calf serum</i>)
FXa	Faktor Xa
GAG	Glykosaminoglykan
gef.	gefunden
GZ	Grundzustand
h	Stunde(n)
H	Heparin
HA	Hyaluronsäure (<i>hyaluronic acid</i>)
HC-II	Heparinkofaktor II
HDSC	Salzkonzentration, die 50% aller gebundenen Farbstoffmoleküle verdrängt (<i>half-displacing salt concentration</i>)
HMWH	hochmolekulares Heparin (<i>high molecular weight heparin</i>)
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HO-x	Heparinoligosaccharid mit der Kettenlänge x
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HR	Hochauflösung (<i>high resolution</i>)
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
Hz	Hertz

IE	Internationale Einheit
ISC	Spin-Bahn-Kopplung (<i>intersystem crossing</i>)
<i>J</i>	Kopplungskonstante
λ	Wellenlänge
L	Ligand
LC	ligandzentriert
LDA	lineare Diskriminanzanalyse
LEC	lichtemittierende elektrochemische Zelle (<i>light-emitting electrochemical cell</i>)
LLCT	Ligand-Ligand-Ladungstransfer (<i>ligand to ligand charge transfer</i>)
LM	Lösungsmittel
LMWH	niedermolekulares Heparin (<i>low molecular weight heparin</i>)
LSC	limitierende Salzkonzentration (<i>limiting salt concentration</i>)
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>)
m	Multipllett
M	molar
max.	Maximum, maximal
MC	metallzentriert
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute(n); Minimum, minimal
MLCT	Metall-Ligand-Ladungstransfer (<i>metal to ligand charge transfer</i>)
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
<i>m/z</i>	Masse pro Teilchenladung
NapTS	Natrium- <i>p</i> -toluolsulfonsäure
neg.	negativ
NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
N ^N	Diiminligand
OLED	organische lichtemittierende Diode (<i>organic light-emitting diode</i>)

OSCS	übersulfatiertes Chondroitinsulfat (<i>oversulfated chondroitin sulfate</i>)
OTf	Triflat
PET	lichtinduzierter Elektronentransfer (<i>photo-induced electron transfer</i>)
pH	pondus Hydrogenii (lat.)
piq	2-Phenylisochinolin
pos.	positiv
ppm	<i>parts per million</i> (millionstel)
ppy	2-Phenylpyridin
q	Quartett
®	urheberrechtlich geschütztes/r Produkt/Name
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
S	Sensitivität
Spermin	1,12-Diamino-4,9-diazadodekan
t	Triplett
TBAC	Triethylbenzylammoniumchlorid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tri-boc-spermin	N ¹ ,N ⁴ ,N ⁹ -Tri(<i>tert</i> -butoxycarbonyl)-1,12-diamino-4,9-diazadodekan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U _D	Detektorspannung
ÜM	Übergangsmetall
UFH	unfraktioniertes Heparin
UV/Vis	ultravioletter/sichtbarer Wellenlängenbereich (<i>ultraviolet/visible</i>)

1 EINLEITUNG

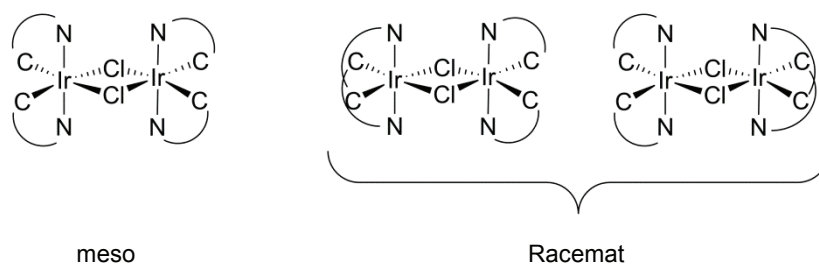
Die Suche nach neuartigen niedermolekularen Verbindungen, die mit Biomakromolekülen selektiv wechselwirken, spielt in der bioanalytischen Forschung eine wichtige Rolle. Diese Wechselwirkungen können genutzt werden, um Biomakromoleküle selektiv und sensitiv zu detektieren. Analytisch verwendet werden insbesondere photophysikalische Effekte, wie beispielsweise Emissionseigenschaften. Die Nutzung dieser Effekte bietet den Vorteil, dass diese mit modernen Geräten leicht und exakt unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gemessen werden können. Der Nachweis chemischer und biochemischer Analyten auf der Grundlage von fluoreszierenden Sensoren ist jedoch nicht nur in der (bio)chemischen Analytik von großer Bedeutung, sondern auch im Bereich der Umweltanalytik und der Forensik.

Bei klassischen Fluoreszenzsensoren handelt es sich meist um kleine organische Fluorophore oder fluoreszierende Proteine, die ihre Fähigkeit zur spontanen Emission von Licht dem Vorhandensein eines ausgeprägten aromatischen Systems verdanken. Häufig eingesetzt werden z. B. Fluorescein- oder Rhodaminderivate. Organische Fluorophore haben jedoch den Nachteil, dass sie häufig schlecht wasserlöslich sind und dem Prozess des Photobleichens unterliegen, vor allem bei hoher Strahlungsintensität. Die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen ist zudem präparativ sehr aufwendig.^[1] Mehr Möglichkeiten bieten halbleitende Nanopartikel, so genannte Quantendots, auf Basis von Cadmiumselenid oder anderen anorganischen Verbindungen, denen seit ihrer erstmaligen Erwähnung in den 1980er Jahren zunehmend mehr Forschungsinteresse zuteil wird.^[2] Diese konnten sich bislang jedoch nicht auf breiter Front durchsetzen.

Eine interessante Alternative zu den genannten Sensoren bieten lumineszierende Übergangsmetallkomplexe (ÜM-Komplexe). Die in der Regel chemisch und photochemisch sehr stabilen Verbindungen zeichnen sich durch relativ lange Lebensdauern der angeregten Zustände und große STOKES-Verschiebungen von bis zu 250 nm aus, wodurch eine störende Überlagerung von Absorptions- und Emissionsmaxima verhindert wird. Daneben eröffnet das einzigartige modulare Strukturdesign von ÜM-Komplexen die Möglichkeit einer einfachen, gezielten Einflussnahme auf die photophysikalischen Eigenschaften durch eine entsprechende Auswahl der Liganden sowie unterschiedliche Funktionalisierung derselben.^[3] Besonders geeignete ÜM-Komplexe sind cyclometallierte Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe, da ihre Emissionseigenschaften sehr sensibel auf Änderungen der Komplexumgebung reagieren.^[4]

1.1 Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe

Iridium liegt im Allgemeinen in den Oxidationsstufen –I bis VI vor, wobei jedoch die Oxidationsstufe III mit Abstand am häufigsten auftritt. Bei Beteiligung von π -Akzeptorliganden in Koordinationsverbindungen ist auch die Oxidationsstufe I bekannt. In der Oxidationsstufe III bildet Iridium diamagnetische, oktaedrische low-spin-Komplexe, welche sich durch eine hohe Ligandenfeldstabilisierungsenergie auszeichnen und daher kinetisch sehr stabil sind.^[5] Cyclometallierte Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe der allgemeinen Form $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]\text{X}$ ($\text{C}^{\wedge}\text{N}$ = cyclometallisierender Ligand, z. B. 2-Phenylpyridin, $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ = Diiminligand, z. B. 2,2'-Bipyridin und X = Gegenion, meist Chlorid oder Hexafluorophosphat) lassen sich bei erhöhter Temperatur in einer zweistufigen Reaktion ausgehend von Iridiumtrichlorid synthetisieren. Dabei wird zunächst ein chloroverbrücktes Dimer der Form $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2\text{Cl}]_2$ gebildet, welches bei der anschließenden Umsetzung mit dem Diiminliganden gespalten wird. Mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Verbindung $[\text{Ir}(\text{ppy})_2\text{Cl}]_2$ (ppy = 2-Phenylpyridin) konnte gezeigt werden, dass das Dimer eine symmetrische, unflexible Struktur aufweist. Bedingt durch den ausgeprägten *trans*-Effekt der M–C-Bindungen befinden sich diese *trans* zu den M–Cl-Bindungen, wobei aus sterischen Gründen die Bildung des Racemats gegenüber der *meso*-Form begünstigt ist (vgl. Abbildung 1.1).^[6]



meso

Racemat

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der drei möglichen Isomere von $[\text{Ir}(\text{ppy})_2\text{Cl}]_2$. (Abbildung in Anlehnung an [6]).

Durch Variation der Liganden ergeben sich vielfältige Möglichkeiten, auf die photophysikalischen Eigenschaften der resultierenden Komplexe Einfluss zu nehmen, welche im Folgenden diskutiert werden sollen.

1.1.1 Photophysikalische Eigenschaften von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen

Einer der strukturell einfachsten und bestuntersuchteten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe ist das Bis(2-phenylpyridin-C,N)(2,2'-bipyridin)iridium(III)-Kation (im Weiteren als $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{bpy})]^+$ bezeichnet). Dieses unterscheidet sich in seinen photophysikalischen Eigenschaften deutlich von dem strukturellen Homologen Tris(2,2'-bipyridin)iridium(III),^[7] sowie von klassischen anorganischen Komplexen, wie beispielsweise $[\text{Ir}(\text{CN})_6]^{3-}$. Das Absorptionsspektrum zeigt

intensive Banden bei 260 nm und 300 nm, welche ligandenzentrierten Elektronenübergängen (LC, $\pi_L \rightarrow \pi_L^*$) zuzuordnen sind (siehe Abbildung 1.2 links). Die weniger intensiven Schultern im Bereich 340–450 nm werden durch spin-erlaubte Metall-Ligand-Ladungsübergänge (MLCT, $\pi_M \rightarrow \pi_L^*$) verursacht. Metallzentrierte (MC) Übergänge, wie sie beispielsweise bei der strukturell ähnlichen Verbindung $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ beobachtet werden,^[8] treten nicht auf. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass durch die Koordination des Starkfeld-Liganden 2-Phenylpyridin die metallzentrierten angeregten Zustände zu höherer Energie hin destabilisiert werden und somit weniger leicht populiert werden können. Gleichzeitig bewirkt die starke σ -Donorfähigkeit dieses Liganden eine Stabilisierung der Metall-Ligand-Ladungsübergänge.^[3,9]

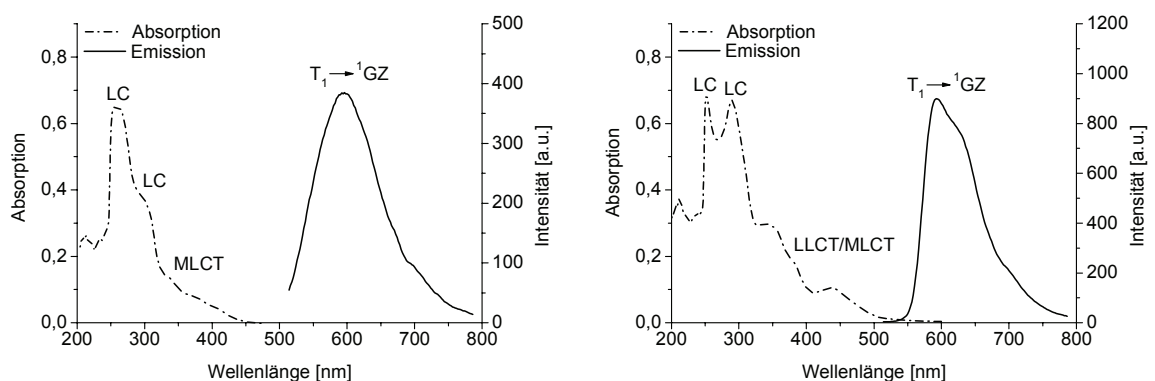


Abbildung 1.2: Absorptions- (·-·) und Emissionsspektrum (—) von $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{bpy})]\text{PF}_6$ (links) und $[\text{Ir}(\text{piq})_2(\text{bpy})]\text{PF}_6$ (rechts) (20 μM (Absorption) bzw. 5 μM (Emission), H_2O , $T = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{anr.}} = 310 \text{ nm}$ ($[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{bpy})]\text{PF}_6$) bzw. 335 nm ($[\text{Ir}(\text{piq})_2(\text{bpy})]\text{PF}_6$), $U_D = 800 \text{ V}$ ($[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{bpy})]\text{PF}_6$) bzw. 730 V ($[\text{Ir}(\text{piq})_2(\text{bpy})]\text{PF}_6$)).

Bei Anregung mit einer Wellenlänge um 310 nm wird ein Elektron vom Grundzustand (${}^1\text{GZ}$) in einen elektronisch angeregten Zustand angehoben, welcher entweder ${}^1\text{MLCT}$ - oder ${}^1\text{LC}$ -Charakter aufweisen kann. Der LC-Übergang ist dabei häufig mit dem cyclometallisierenden Liganden assoziiert, während der MLCT-Übergang mit dem Diiminliganden verknüpft ist. Bedingt durch die starke Spin-Bahn-Kopplung, welche durch das Iridium(III)-Zentrum verursacht wird, ist der formal spinverbotene Übergang zu energetisch naheliegenden Triplettzuständen erleichtert (engl. *Intersystem Crossing*, ISC), so dass es zu einer schnellen Spinumkehr kommt. Besagte Spin-Bahn-Kopplung führt außerdem dazu, dass durch Mischung der beiden möglichen angeregten Zustände ${}^3\text{MLCT}$ und ${}^3\text{LC}$ ein angeregter Zustand T_1 gebildet wird. Dieser ist relativ langlebig (typischerweise ca. 10 ns–10 μs)^[1] und als energetisch am niedrigsten liegender angeregter Zustand ausschlaggebend für die nachfolgende Emission (vgl. das Emissionsspektrum in Abbildung 1.2 links).^[10] Die beschriebenen Übergänge sind in Abbildung 1.3 in einem vereinfachten Molekülorbitalschema dargestellt.

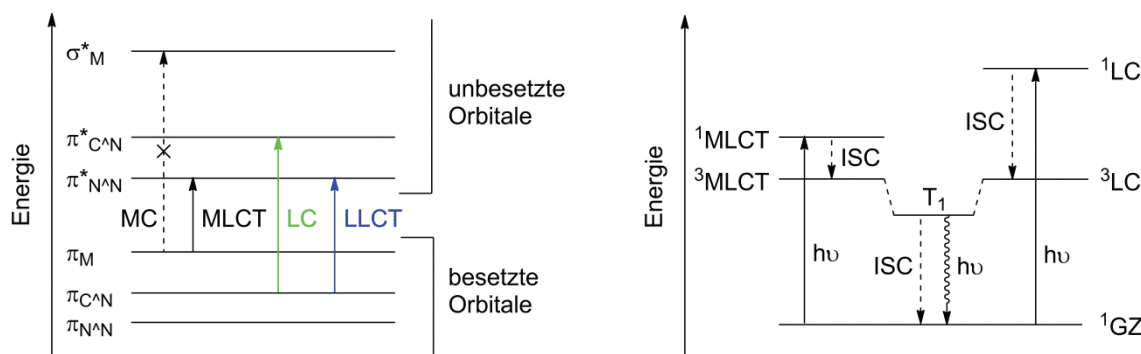


Abbildung 1.3: Vereinfachtes Molekülorbitalschema zur Veranschaulichung der elektronischen Übergänge bei Absorption (links) bzw. Emission (rechts) in Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen der Form $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$ mit $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ = cyclometallisierender Ligand und $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ = Diiminligand (Abbildung rechts in Anlehnung an [10]).

Vergleicht man das Absorptionsspektrum von $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{bpy})]^+$ mit dem des entsprechenden 2-Phenylisochinolinderivates $[\text{Ir}(\text{piq})_2(\text{bpy})]^+$ (piq = 2-Phenylisochinolin) (Abbildung 1.2 rechts), so fällt auf, dass die charakteristischen LC-Banden stärker ausgeprägt und die CT-Übergänge bathochrom verschoben und somit energieärmer sind. Dabei tragen sowohl Metall-Ligand- als auch Ligand-Ligand-Ladungsübergänge zu dem Erscheinungsbild des Spektrums bei.^[11] Auch das Emissionsspektrum (Abbildung 1.2 rechts) unterscheidet sich deutlich von dem der 2-Phenylpyridinverbindung. Im Gegensatz zu dieser, die ein eher breites Emissionsprofil aufweist, wird bei $[\text{Ir}(\text{piq})_2(\text{bpy})]^+$ ein strukturierteres, rotverschobenes Emissionsspektrum erhalten. Das Auftreten dieses strukturierten Emissionsprofils ist ein Hinweis darauf, dass der emittierende T_1 -Zustand in $[\text{Ir}(\text{piq})_2(\text{bpy})]^+$ einen höheren ^3LC -Beitrag enthält als es bei $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{bpy})]^+$ der Fall ist. Zudem bewirkt der Austausch von 2-Phenylpyridin durch 2-Phenylisochinolin, welches ein ausgedehnteres π -System besitzt, eine Stabilisierung des niedrigsten unbesetzten Molekülorbitals (engl. *lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO), so dass die Emission bei niedrigerer Energie erfolgt. Auf diese Weise lassen sich durch Vergleich der jeweiligen Emissionsprofile relativ einfach Rückschlüsse auf die Art des angeregten Zustandes schließen.

Die Kenntnis der erläuterten Zusammenhänge ermöglicht jedoch auch eine gezielte Einflussnahme auf die photophysikalischen Eigenschaften der entsprechenden Komplexe. Dabei bieten sich dem synthetischen Chemiker im Allgemeinen zwei Herangehensweisen an: Zum Einen die Variation der zu Grunde liegenden Ligandstruktur, zum Anderen die Einführung diverser Substituenten in die Ligandperipherie. So führt eine Vergrößerung der π -Konjugation gemeinhin zu einer Stabilisierung der am angeregten Zustand beteiligten Orbitale, so dass eine bathochrome Verschiebung der Emissionsmaxima beobachtet wird, wie das obige Beispiel sehr anschaulich zeigt. Den umgekehrten Effekt können sterisch anspruchsvolle Substituenten bewirken, wenn durch die Substitution die planare Struktur des Liganden verzerrt und die Aromatizität gestört wird. Generell hat nicht nur die Art der funktionellen Gruppen Einfluss auf die Lage des elektronisch angeregten Zustandes, sondern auch die Position derselben. So resultiert aus der Substitution mit elektronenreichen Gruppen (engl. *electron donating groups*, EDG) häufig eine Destabilisierung des höchsten besetzten

Molekülorbitals (engl. *highest occupied orbital*, HOMO) und somit eine Rotverschiebung der Emissionsmaxima. Befinden sich die EDG jedoch in *ortho*- oder *para*-Position zur M–C-Bindung, so wird die d-Orbitalaufspaltung erhöht, was in einer hypsochromen Verschiebung resultiert. Letztere tritt meist auch dann ein, wenn sich in der *meta*-Position zur M–C-Bindung elektronenarme Gruppen (engl. *electron withdrawing groups*, EWG) befinden.^[10] In der Literatur gibt es neben den bereits erwähnten viele weitere Beispiele für Untersuchungen der photophysikalischen und elektrochemischen Eigenschaften von Poly(pyridyl)iridium(III)-Verbindungen durch systematische Variation der Komplexbestandteile. Häufig werden diese unterstützt von theoretischen Betrachtungen auf Basis der Dichtefunktionaltheorie (DFT).^[12-16] Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass eine sichere Vorhersage der entsprechenden Eigenschaften aufgrund der Vielzahl an Variablen nach wie vor schwierig ist.

1.1.2 Anwendung von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen

Aufgrund ihrer einzigartigen photophysikalischen und elektrochemischen Eigenschaften und nicht zuletzt dank der in Kapitel 1.1.1 diskutierten Möglichkeiten der direkten Einflussnahme auf eben diese, finden Poly(pyridyl)iridium(III)-Verbindungen vielseitige Anwendungsgebiete. Besonders vielsprechend erscheint die Nutzung derartiger Komplexe als lumineszierende Chromophore in optoelektronischen Anwendungen wie organischen lichtemittierenden Dioden (engl. *organic light-emitting diodes*, OLED) oder lichtemittierenden elektrochemischen Zellen (engl. *light-emitting electrochemical cells*, LEC).^[17,18] Die maximal erreichbare Quanteneffizienz einer Diode, welche auf rein organischen Fluorophoren basiert, beträgt aus statistischen Gründen lediglich 25 %, da in diesem Fall die Emission lediglich aus angeregten Singulettzuständen erfolgen kann.^[17] Demgegenüber bieten lumineszierende ÜM-Komplexe den Vorteil, dass durch die starke Spin-Bahn-Kopplung eine Emission aus gemischten Singulett-Triplett-Zuständen möglich wird (vgl. hierzu die Erläuterungen in Kapitel 1.1.1). Dadurch kann die Quanteneffizienz drastisch erhöht werden und theoretisch bis zu 100 % erreichen. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für neutrale,^[18-21] aber auch anionische^[22] oder kationische Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe,^[14,23,24] die für die Anwendung in OLED oder LEC geeignet sind. Auch bei der Entwicklung von Farbstoff-Solarzellen (engl. *dye-sensitized solar cells*, DSSC) sind Iridium(III)-Komplexe von Interesse. Zwar überwiegen in den meisten Anwendungen nach wie vor Ruthenium-basierte Farbstoffe, jedoch stellen Poly(pyridyl)iridium(III)-Verbindungen aufgrund ihrer bereits ausführlich diskutierten photophysikalischen Eigenschaften eine mögliche Alternative dar. Besonders ihre höhere Stabilität und die Tatsache, dass metallzentrierte elektronische Übergänge bei Iridium(III)-Komplexen sehr selten sind, können von Vorteil sein. Bisher weisen Iridium(III)-basierte DSSC allerdings nur eine niedrige Effizienz auf.^[25]

Ein sehr weites Forschungsgebiet stellt die Suche nach molekularen Sonden für die spezifische Markierung und/oder Quantifizierung einer Vielzahl von Analyten dar. Bei der Erforschung werden unterschiedliche Strategien verfolgt: Die Detektion kann über die direkte kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkung eines passend funktionalisierten Liganden mit dem Analyt erfolgen. Eine andere Möglichkeit ist die Nutzung der Wechselwirkung eines biologischen Substrates, welches mit einem der Liganden verknüpft ist, mit dem jeweiligen passenden Gegenstück, z. B. einem Protein. In jedem Fall resultiert aus der Wechselwirkung mit dem Analyt eine Veränderung der elektronischen Struktur des Komplexes, sei es durch Änderungen in der elektronischen Struktur der Liganden oder durch Umgebungseinflüsse. Diese Änderungen können in der Regel als Veränderung des Emissionsverhaltens beobachtet werden. Dies kann eine Intensitätssteigerung oder -abnahme beinhalten und/oder eine Verschiebung des Emissionsmaximums.^[4,10]

Lo *et al.* haben in der vergangenen Dekade eine Reihe von Dipyridochinoxalin- und Dipyridophenaziniridium(III)-Komplexen vorgestellt (vgl. Abbildung 1.4 a), welche in wässriger Lösung nahezu keine Lumineszenz zeigen, nach Zugabe von Doppelstrang-DNS jedoch eine Verstärkung der Emissionsintensität um das bis zu 40-fache der Ausgangsintensität aufweisen.^[30] Dieser Anstieg wurde mit der Interkalation der Diiminliganden in die Basenpaare der DNS erklärt, wie es auch bei strukturell sehr ähnlichen Rutheniumkomplexen zu beobachten ist.^[26] Dadurch befindet sich der entsprechende Iridiumkomplex in einer hydrophoben Umgebung, in der die Wechselwirkung mit den umgebenden Wassermolekülen vermindert wird. Gleichzeitig wird durch die Interkalation die strahlungslose Deaktivierung reduziert. Die gleiche Gruppe berichtete auch von diversen proteinbindenden Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen, wobei sowohl kovalente Wechselwirkungen als auch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit den Proteinen erfolgreich realisiert wurden. Abbildung 1.4 b zeigt ein Beispiel für eine aldehydfunktionalisierte Sonde, welche sowohl mit der Aminosäure Alanin als auch mit Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) lumineszierende Konjugate bildet.^[31] Die Konjugatbildung resultiert aus der Reaktivität der Aldehydgruppe gegenüber freien Aminogruppen (z. B. von Lysinresten). In dieser Hinsicht ähnlich erfolgversprechend ist die Reaktivität von Aldehyd- oder Iodacetamidgruppen gegenüber freien Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten.^[27,28] Eine andere Herangehensweise verfolgten WONG *et al.*, die eine überaus sensitive und selektive Sonde für histidinreiche Proteine wie BSA entwickelt haben (Abbildung 1.4 c).^[32] Dieser beinhaltet neben dem cyclometallisierenden Liganden 2-Phenylpyridin zwei labil gebundene Lösungsmittelmoleküle in der Koordinationssphäre, welche leicht durch die Imidazolgruppe von Histidin substituiert werden können. Durch die Koordination zweier Histidinreste ist ein drastischer Anstieg in der Emissionsintensität zu beobachten. Die selektive Markierung von Proteinen auf Basis nicht-kovalenter Wechselwirkungen nutzt die hohe Affinität von Proteinen zum jeweiligen Substrat. So konnte durch die Modifizierung eines Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexes mit dem Steroid Estradiol ein sensitiver Nachweis für Estrogenrezeptorproteine entwickelt werden (Abbildung 1.4 d).^[33] Auf ähnliche Weise konnten Avidin durch Funktionalisierung eines Liganden

mit Biotin und Indol-bindende Proteine durch Einführung einer Indolgruppe in die Ligandperipherie detektiert werden.^[29]

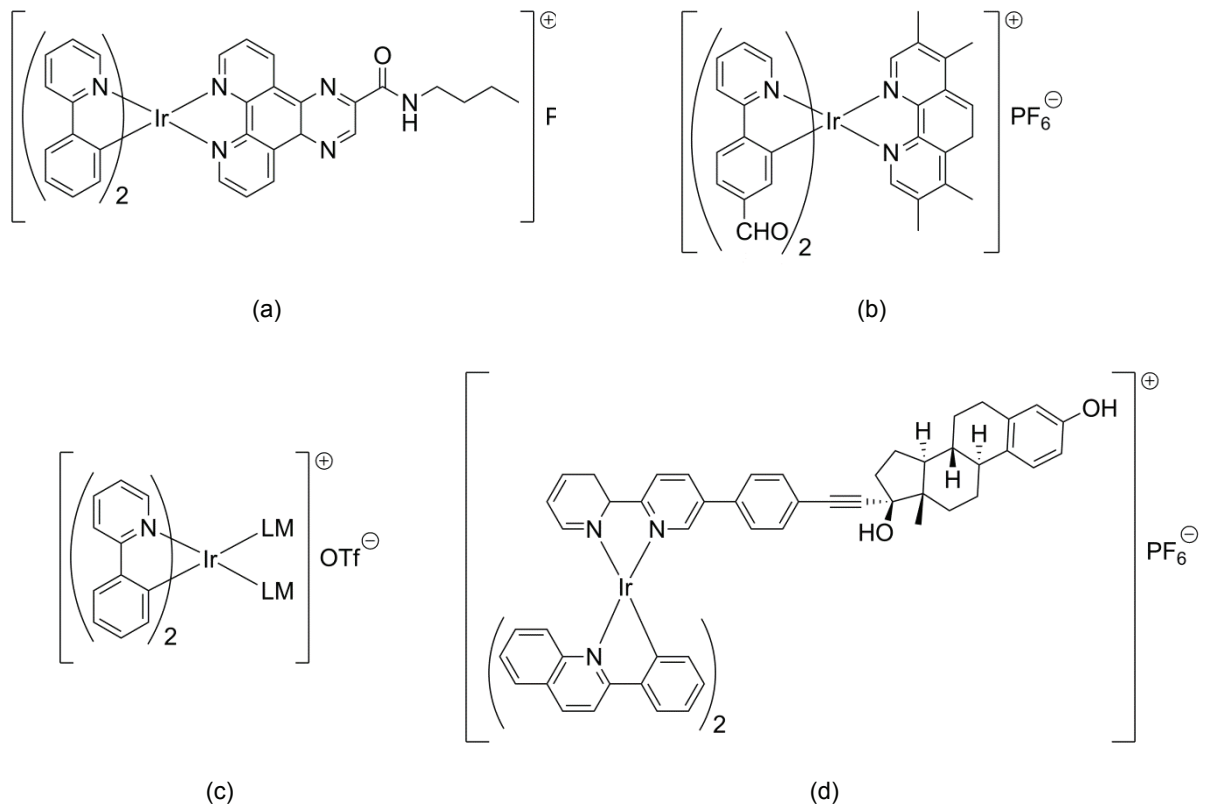


Abbildung 1.4: Chemische Strukturen ausgewählter Beispiele für Sonden auf Basis von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen. (a) DNS-Sonde,^[30] (b) Proteinsonde,^[31] (c) Histidinsonde (OTf = Triflatanion, LM = Lösungsmittel, H₂O oder MeCN)^[32] und (d) Sonde zur sensitiven Markierung von Estrogenrezeptorproteinen.^[33]

Neben den beschriebenen Sonden für biologische Makromoleküle wurden auch diverse Iridiumkomplexe für die Detektion von Kleinmolekülen, wie beispielsweise Sauerstoff, sowie für eine Vielzahl von ionischen Analyten publiziert. Kationensonden lassen sich erhalten, indem Kationenrezeptoren, z. B. LEWIS-Basen oder Kronenether, in die Ligandperipherie integriert werden. Auf diese Weise wurden bereits erfolgreich Sonden für Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Na⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺ und Ag⁺ hergestellt.^[4] Der Nachweis von Fluorid beruht meist auf der Wechselwirkung des Halogenids mit einer in die Ligandstruktur integrierten Borylgruppe.^[34,35] Auch von Sonden für andere Halogenide oder Pseudohalogenide sowie kleine organische Anionen, wie beispielsweise Acetat oder Benzoat, wurde berichtet.^[4] Werden die Liganden mit sauren oder basischen Gruppen funktionalisiert, erhält man häufig Poly(pyridyl)iridium(III)-Verbindungen, deren Lumineszenz eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit zeigt. So wurden von WILLIAMS *et al.* verschiedene Iridium(III)bis(terpyridin)-Komplexe publiziert, welche je nach Protonierungsgrad der Liganden eine unterschiedliche Emissionsintensität aufweisen.^[36] Eine deutliche Abnahme der Intensität verbunden mit einer bemerkenswerten Rotverschiebung des Emissionsmaximum mit steigendem pH-Wert wurde bei dem aminosubstituierten Tris(2-phenylpyridin)iridium(III)-Komplex beobachtet, der von den Forschungsgruppen AOKI und KITAMURA vorgestellt wurde.^[37]

Da der emittierende Zustand von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen in der Regel ein Triplettzustand ist, wird die Lumineszenz dieser Verbindungen in Anwesenheit von Molekülen mit einem Triplettgrundzustand effektiv gelöscht. Diese Tatsache ist grundlegend für die Fähigkeit vieler Iridiumkomplexe zur Detektion von Sauerstoff. Häufig werden die entsprechenden Komplexe in eine organische Matrix eingebettet und auf ein festes Trägermaterial aufgebracht, um leicht handhabbare Sauerstoffsensoren zu erhalten.^[4] Die Gruppen um HOLDER und SCHÄFERLING haben neben einer rot emittierenden, iridiumbasierten Sauerstoffsonde auch eine grün emittierende Temperatursonde entwickelt, welche mit steigender Temperatur eine Abnahme der Emissionslebensdauer aufweist. Durch Kombination beider Sonden in einer einzigen Messanordnung konnte eine duale Druck/Temperatursonde erhalten werden, welche eine gleichzeitige Bestimmung beider Parameter mit einer hohen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit ermöglicht.^[38]

Viele der beschriebenen Sonden wurden auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Zellpermeation und selektiven Anfärbung von Zellkompartimenten untersucht.^[4,39] Dabei hat sich gezeigt, dass die Komplexe je nach Art der Substituenten in unterschiedlichen Regionen innerhalb der Zellen akkumuliert werden, beispielsweise im Cytoplasma^[40,41] oder in der perinuklearen Region.^[42] Die Cytotoxizität der Iridiumverbindungen lag in vielen Fällen deutlich unter der von *cis*-Platin, das meist als Referenzsubstanz herangezogen wurde.

Trotz der Vielzahl an beschriebenen Sonden für die unterschiedlichsten Analyten findet sich in der Literatur bisher kein Beispiel für eine Untersuchung von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen hinsichtlich der Detektion von sulfatierten Glykosaminoglykanen. Die Entwicklung eines solchen Komplexes als molekulare Sonde für diese Gruppe von physiologisch bedeutsamen Biomolekülen, zu denen auch das weltweit eingesetzte Antikoagulationsmittel Heparin gehört, stellt somit eine Herausforderung dar. Die Nutzung solcher Sonden ist vor allem im Bereich der medizinischen Diagnostik interessant.

1.2 Heparin und polysulfatierte Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane (GAG) bestehen aus natürlich vorkommenden sulfatierten Polysacchariden. Ihnen kommt bei vielen physiologischen Prozessen eine Schlüsselrolle zu. So sind sie beispielsweise bei Prozessen wie der Blutgerinnung, der Zellproliferation und -differenzierung, bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen sowie bei Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen von entscheidender Bedeutung.^[43] Einer der wichtigsten Vertreter der GAG ist Heparin, welches bereits 1916 von MCLEAN entdeckt wurde,^[44] dessen Struktur jedoch erst 1968 von PERLIN *et al.* mit Hilfe der NMR-Spektroskopie vollständig aufgeklärt werden konnte.^[45] Es wurde gezeigt, dass es sich bei Heparin um ein lineares, polydisperses, sulfatiertes Polysaccharid handelt, das aus einer sich wiederholenden

Disaccharideinheit aufgebaut ist, welche sich wiederum aus (1→4)-verknüpften Iduronsäure- und Glukosamineinheiten zusammensetzt.

Dieser allgemeine Aufbau aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten ist allen GAG gemeinsam, trotz ihrer ansonsten starken strukturbedingten Heterogenität hinsichtlich molekularer Masse, Ladungsdichte und physikalisch-chemischer Eigenschaften. Anhand der jeweils vorherrschenden Disaccharideinheiten lassen sich sechs verschiedene GAG-Typen unterscheiden: Hyaluronsäure (HA), Keratansulfat, Chondroitinsulfat-A/-C (CS), Dermatan-sulfat (auch Chondroitinsulfat-B, DS), Heparansulfat (HS) sowie Heparin (H). Im Fall von Heparin wird zusätzlich zwischen niedermolekularem Heparin (engl. *low molecular weight heparin*, LMWH) mit einem Molekulargewicht von < 8 kDa und unfractioniertem, hochmolekularem Heparin (UFH) mit einem Molekulargewicht von 5–30 kDa unterschieden.^[46,47] Mit Ausnahme von Keratansulfat fanden alle genannten GAG in der vorliegenden Arbeit Verwendung. Außerdem wurden das semisynthetische GAG Oversulfated Chondroitinsulfat (OSCS) sowie Dextransulfat (DexS), welches aufgrund fehlender Aminfunktionalitäten streng genommen kein GAG ist, als maximal sulfatierte Polysaccharide eingesetzt. Abbildung 1.5 zeigt einen Überblick über die chemischen Strukturen der am häufigsten auftretenden Disaccharideinheiten aller verwendeten Polysaccharide.

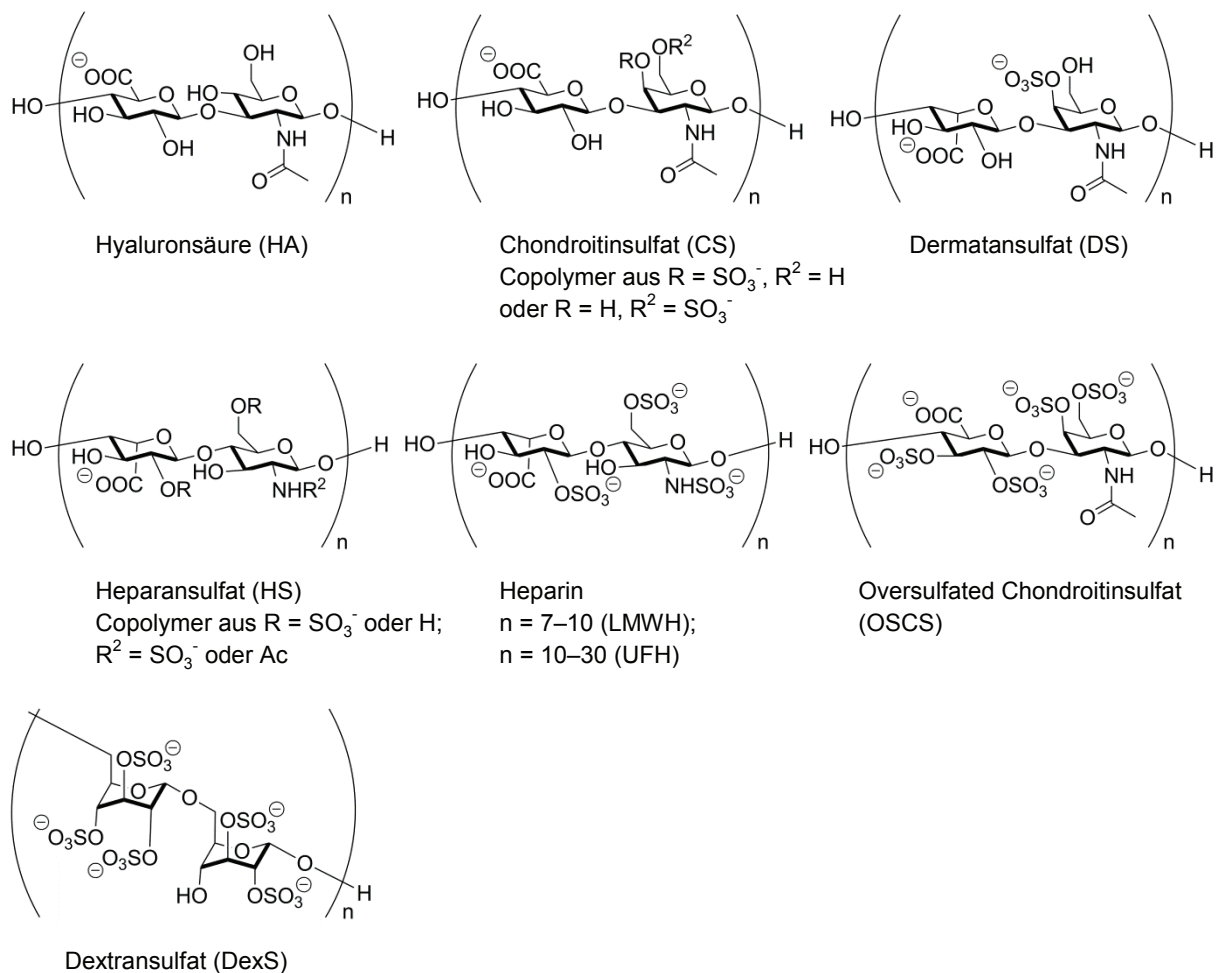


Abbildung 1.5: Die Familie der Glykosaminoglykane. Gezeigt ist jeweils die chemische Struktur der am häufigsten auftretenden Disaccharideinheit.

Vergleicht man die einzelnen GAG miteinander, so fällt auf, dass die strukturellen Unterschiede aus dem exakten Aufbau der Monosaccharidbausteine, der Anzahl und Position der Sulfatgruppen und Acetylierungen des Aminozuckers sowie der Konfiguration der glykosidischen Bindung resultieren. Folgende allgemeine Aussagen lassen sich jedoch machen: i) CS und DS weisen im Gegensatz zu den übrigen GAG als Aminozucker (1→3)- α -D-Galaktosamin auf, ii) in HS, CS, DS und H liegt der Aminozucker in der α -, statt in der sonst üblichen β -Konfiguration vor, iii) in DS und H überwiegt L-Iduronsäure gegenüber D-Glucuronsäure und iv) HA ist das einzige GAG, welches keinerlei Sulfatgruppen aufweist.^[46] HS zeigt außerdem die Besonderheit einer domänenartig aufgebauten Struktur, d. h. das Polysaccharid weist Bereiche mit *N*-sulfatierten Aminozuckern, mit *N*-acetylierten Aminozuckern und solche mit gemischt *N*-sulfatierten und *N*-acetylierten Aminozuckern auf.^[48]

Bedingt durch die hohe Anzahl an bei physiologischem pH negativ geladenen Sulfat- und Carboxylatgruppen sind alle GAG stark negativ geladen und liegen daher üblicherweise als Salz - meist als Natrium- oder Kaliumsalz - vor (vgl. Abbildung 1.5). Von den natürlich vorkommenden GAG ist Heparin dasjenige mit der höchsten negativen Ladungsdichte. Gleichzeitig weist dieses Polysaccharid die höchste negative Ladungsdichte von allen bekannten biologischen Makromolekülen auf. Tabelle 1.1 fasst die Verhältnisse der Sulfat- zu Carboxylatgruppen sowie die daraus resultierenden negativen Gesamtladungen pro Disaccharideinheit für die in dieser Arbeit verwendeten GAG zusammen.

Tabelle 1.1: Durchschnittliches Verhältnis der Anzahl der Sulfat- zu Carboxylatgruppen und mittlere negative Gesamtladung pro Disaccharid für die in dieser Arbeit verwendeten Glykosaminoglykane. # Keine Untersuchungen hierzu bekannt.

Glykosaminoglykan	Sulfat-/Carboxylatgruppen	negative Ladung/Disaccharid
Hyaluronsäure (HA) ^[49]	0	-1,0
Heparansulfat (HS) ^[50]	0,93	-1,9
Dermatansulfat (DS) ^[51]	1,09	-2,1
Chondroitinsulfat (CS) ^[51]	0,97	-2,0
Heparin (LMWH und UFH) ^[51]	2,37	-3,4
Oversulfated Chondroitinsulfat (OSCS) ^[52]	- #	-4,0
Dextransulfat (DexS) ^[53]	- #	-4,6

Die beschriebene Polydispersität und Heterogenität in der Mikrostruktur der einzelnen Glykosaminoglykane resultiert aus der Biosynthese der Polysaccharide. Während andere biologische Makromoleküle wie DNS oder Proteine als homologe Kopien von Templaten ubiquitär synthetisiert werden, verläuft die Synthese der GAG nach einem weitaus komplexeren Mechanismus im Golgi-Apparat vorwiegend von Mastzellen.^[46,54] Synthesebedingt sind die meisten der im Organismus befindlichen GAG kovalent an Proteine gebunden und bilden so

genannte Proteoglykane, welche teilweise auch im Rahmen therapeutischer Anwendungen verwendet werden.^[55]

1.2.1 Physiologische Bedeutung von Glykosaminoglykanen

Die in Kapitel 1.2 beschriebene strukturelle Diversität der GAG führt zu ganz unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften der einzelnen Moleküle. Die wichtigsten biologischen Funktionen der in dieser Arbeit verwendeten GAG sollen im Folgenden erläutert werden.

Das bekannteste GAG ist Heparin, welches das wichtigste in der Medizin eingesetzte blutgerinnungshemmende Medikament ist. Es kommt vor allem bei der Prophylaxe und Therapie von tiefen venösen Thrombosen sowie bei vielen chirurgischen Verfahren und den meisten Extrakorporalverfahren (Dialyse, Bypass-Operationen) zum Einsatz. Seine anti-koagulatorische Wirkung beruht in erster Linie auf der Aktivierung des körpereigenen Glykoproteins Antithrombin III (AT-III), welches wichtige Gerinnungsfaktoren wie die Serin-Proteasen Thrombin und Faktor Xa (FXa) inhibiert und somit die Blutgerinnungskaskade unterdrückt. Durch die zunächst schwache Anlagerung des Polyanions Heparin an die positiv geladenen Lysingruppen des AT-III kommt es zu einer Konformationsänderung desselben, infolgedessen die Bindung von Heparin verstärkt wird und das reaktive Zentrum des Proteins vollständig freigelegt wird. Dies bedingt eine verbesserte Bindung von Thrombin und FXa an AT-III und bewirkt somit eine bis zu 2000-fach beschleunigte Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren.^[54,56]

Wesentlich für die antithrombotische Wirksamkeit ist das Vorliegen einer spezifischen Pentasaccharidsequenz innerhalb des Heparinstrangs, welche als high-affinity-Region bezeichnet wird und unter dem Wirkstoffnamen Fondaparinux mittlerweile kommerziell erhältlich ist (vgl. Abbildung 1.6).

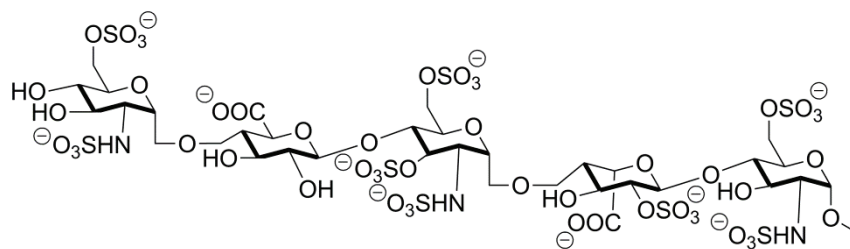


Abbildung 1.6: Chemische Struktur des synthetischen Pentasaccharids Fondaparinux.

Während für die Inaktivierung von FXa die Anbindung an AT-III über die high-affinity-Region ausreichend ist, wird für die effektive Inaktivierung von Thrombin die Bildung eines ternären Komplexes aus Heparin, AT-III und Thrombin benötigt. Dies erfordert aus sterischen Gründen eine Kettenlänge von mindestens 18 Monosacchariden, so dass niedermolekulare Heparine zwar eine starke Anti-Xa-Aktivität, aber nur eine schwache Anti-Thrombin-Aktivität besitzen.^[57,58] Zusätzlich zu seiner antikoagulatorischen Wirkung hat Heparin Einfluss auf

zahlreiche andere Stoffwechselforgänge wie beispielsweise die Regulierung weiterer Proteasen und Esterasen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen.^[54]

Heutzutage werden im klinischen Gebrauch niedermolekulare Heparine gegenüber UFH bevorzugt, da sie eine höhere Bioverfügbarkeit besitzen und weniger unerwünschte Nebenwirkungen wie Blutungen, Osteoporose oder heparininduzierte Thrombozytopenie hervorrufen. Zudem bieten LMWH den Vorteil, dass eine kontinuierliche Überwachung des Dosislevels nur in Ausnahmefällen nötig ist. Die medikamentöse Dosis an Heparin wird gebräuchlicherweise nicht in gravimetrischen Mengen, sondern in "internationalen Einheiten" (IE) angegeben. Eine IE ist definiert als die Menge Heparin, welche die Gerinnung von 1 mL Schafsblut bei 37 °C über eine Stunde unterdrückt.^[59] Im Rahmen dieser Arbeit werden Konzentrationen dennoch zumeist in $\mu\text{mol/L}$ (μM) Disaccharid angegeben, um den Einfluss verschiedener GAG auf die Sensoreigenschaften besser vergleichen zu können.

Heparansulfat (HS) ist Heparin in seiner Wirkungsweise bei der Hämostase sehr ähnlich. Obwohl sich Heparin durch eine stärkere antikoagulatorische Wirkung auszeichnet, übernimmt *in vivo* nicht Heparin, sondern HS die Funktion als physiologisches Antithrombotikum.^[46] Weitaus größere Bedeutung hat HS allerdings in Form seiner membranengebundenen Proteoglykane (HSPG), die in transmembrangebundene Syndecane und Glykosphosphatidylinositol-gebundene Glypicane unterschieden werden. Diese ubiquitären Proteine sind entscheidend an der Regulierung von lebenswichtigen Prozessen wie der Morphogenese, der Wundheilung sowie der Entstehung von Entzündungen beteiligt.^[60] Auch HSPG-abhängige Transportprozesse für die zelluläre Aufnahme verschiedener Kleinmoleküle sind bekannt.^[61,62] Daneben wurde in den letzten Jahren erkannt, dass viele mikrobielle und virale Krankheitserreger, wie beispielsweise der HIV-1 Virus oder der Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, HSPG zur Erkennung von und Bindung an Wirtszellen nutzen. Dadurch werden verschiedene Heparin-bindende Proteine in Oberflächennähe gebracht, ohne dass die Erreger der Notwendigkeit unterliegen, spezifische Rezeptoren für die individuellen Proteine bereitstellen zu müssen.^[54]

Die nicht sulfatierte Hyaluronsäure (HA) bildet in Lösung aufgrund der guten Hydratisierbarkeit der Carboxylgruppen eine gelartige, viskoelastische Substanz, welche als biologisches Schmiermittel dient und in vielen Bindegeweben sowie im Glaskörper des Auges vorkommt. Dank ihrer guten Biokompatibilität erfreut sich HA hoher Beliebtheit in der Behandlung von Gelenkbeschwerden, der Augenchirurgie sowie der Kosmetik.^[46,47]

Die Gruppe der Chondroitinsulfate (CS) stellt rein quantitativ gesehen neben HA die bedeutendste unter allen GAG im Organismus der Wirbeltiere dar. CS-A und -C kommen hauptsächlich in den Knorpelbindegeweben und in den Knochen vor und übernehmen dort neben strukturgebenden Aufgaben vor allem die Funktion, Druckbelastungen auszugleichen.^[63,64] Dagegen findet sich CS-B (meist als Dermatansulfat (DS) bezeichnet) vorwiegend im Binde-

gewebe der Haut, wo es dank seiner flexiblen Struktur für die notwendige Gewebeelastizität sorgt.^[46] Neuere Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass CS von großer Bedeutung für die Ausbildung des zentralen Nervensystems sind.^[65]

Das semisynthetische Oversulfated Chondroitinsulfat (OSCS) wurde erstmals im Jahr 1998 von den Gruppen um LINHARDT und TOIDA durch Sulfatierung von CS synthetisiert und hinsichtlich seiner antikoagulatorischen Wirkung untersucht.^[66] Damals wurde vermutet, dass der beobachtete Anstieg der anti-Thrombin-Aktivität bei nur schwacher anti-Xa-Aktivität auf einem Heparin-Cofaktor-II-gestützten (HC-II) Wirkmechanismus beruht. Diese Hypothese wurde einige Jahre später von denselben Arbeitsgruppen durch genauere Untersuchungen der Wechselwirkung von OSCS mit Heparin-bindenden Proteinen bestätigt.^[52] Auf der Grundlage dieser Ergebnisse ist es schließlich gelungen, die schweren Nebenwirkungen mit Todesfolge in mehr als 200 Fällen nach Verabreichung von kontaminiertem Heparin Anfang 2008 (Heparinkrise) biologisch und pharmakologisch zu erklären.^[67] Zuvor war es einer großen Gruppe kooperierender Wissenschaftler gelungen, OSCS als Hauptverunreinigung in den betroffenen Injektionslösungen zu identifizieren.^[68] Man geht heute davon aus, dass das günstigere hochsulfatierte GAG absichtlich den Heparinprodukten beigemischt wurde.

Auch das stark sulfatierte Dextransulfat (DexS) ist schon lange dafür bekannt, dass es *in vivo* eine anaphylaktische Immunreaktion hervorrufen kann.^[69]

1.2.2 Detektion von Heparin und Heparinverunreinigungen

Für die klinische Überwachung der Heparinkonzentration werden in der Regel Gerinnungstests wie der Heptest, die Messung der aktivierten Gerinnungszeit (engl. *activated clotting time*, ACT) oder der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (engl. *activated partial thromboplastin time*, aPTT) sowie chromogene FXa Tests (vgl. Kapitel 5.3.7) angewandt. Diese klassischen Methoden haben jedoch den Nachteil, dass die Konzentrationsbestimmung indirekt über eine zuvor erstellte Kalibrierungskurve erfolgt und keine Unterscheidung von Mischungen polysulfatierter GAG möglich ist.^[70] Letzteres ist aber insbesondere seit der Heparinkrise wünschenswert.

In den letzten Jahren ist daher ein verstärktes Forschungsinteresse hinsichtlich der Entwicklung neuer sensitiver Nachweisverfahren für die Qualitätskontrolle bei der Heparinherstellung zu verzeichnen. Die Detektion - meist in gepufferten Medien - wird hierbei in der Regel durch elektrostatische Wechselwirkungen der häufig mit Ammoniumgruppen funktionalisierten Sonde mit dem Polyanion Heparin und/oder Wechselwirkung des Zielmoleküls mit einer Borsäurefunktionalität der Sonde ermöglicht. Eine der ersten Fluoreszenzsonden zum direkten Nachweis von Heparin haben ANSLYN *et al.* beschrieben. Diese Sonde emittiert im UV-Bereich (357 nm).^[71] Durch die starke Eigenfluoreszenz des biologischen Materials in diesem Wellenlängenbereich wurde in serumhaltigen Proben nur ein schlechtes Signal-zu-

Hintergrund Verhältnis erreicht. Die Calix[8]aren-basierte Sonde von CUNSOLO *et al.*, welcher auf der Verdrängung des Fluorophors Eosin Y durch Heparin beruht, zeigt selbst in Blutproben eine hohe Selektivität für und Affinität zum Zielmolekül. Allerdings beruht der Nachweis in Blut auf der Messung der aPTT und somit einer klassischen Nachweismethode.^[72] Auf Basis einer Bibliothek unterschiedlich substituierter Benzimidazoliumsalze ist es CHANG *et al.* gelungen, die zwei Heparinsonden Heparin Orange und Heparin Blue zu isolieren, welche sowohl LMWH als auch UFH in plasmahaltigen Proben nachweisen können.^[73] Eine ganze Reihe unterschiedlich funktionalisierter Perylendiimide für den Heparinnachweis wurde von KRÄMER *et al.* vorgestellt.^[74] Diese Farbstoffe zeichnen sich durch eine intensive Emission bei 560–620 nm aus, welche bei Zugabe von Heparin gelöscht wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlich hohe positive Ladung der Farbstoffe entscheidenden Einfluss auf die Affinität zum Zielmolekül und die Bindungsstöchiometrie hat. SCHRADER *et al.* haben als Erste ein fluoreszierendes Polymer auf Basis von Methacrylamid vorgestellt, welches dank gleichzeitiger Funktionalisierung mit Borsäurederivaten und Alkylammoniumgruppen eine hohe Sensitivität für Heparin zeigt.^[75] Im Verlauf der weiteren Forschung auf diesem Gebiet ist es der Gruppe schließlich gelungen, einen komfortablen Microplate Assay für die Detektion und Quantifizierung von Heparin und anderen GAG zu entwickeln (Polymer-H Assay).^[76] Andere Forschungsgruppen nutzen modifizierte Pyrenfarbstoffe,^[77] Polymethiniumsalze,^[78] Polythiophene^[79] oder Goldnanopartikel^[80] zur Detektion von Heparin.

Für die Detektion von Verunreinigungen in Heparinkonserven, allen voran das für die tödlichen Nebenwirkungen verantwortliche OSCS, werden derzeit offiziell NMR-Spektroskopie, Kapillarelektrophorese und chromatographische Verfahren zu Rate gezogen.^[81] Da diese Verfahren jedoch einen hohen apparativen Aufwand und geschultes Personal erfordern, besteht in der internationalen Forschungsgemeinschaft weiterhin das Bestreben, einfachere Methoden zu entwickeln. BAIRSTOW *et al.* haben vorgeschlagen, ein kommerziell erhältliches Heparin-Immunoassay-Kit zu nutzen und gezeigt, dass auf diese Weise 0,01–0,1 % OSCS in Heparinproben nachgewiesen werden kann.^[82] Eine gänzlich andere Herangehensweise verfolgten NITZ *et al.*: Auf Basis von selbstorganisierenden fluoreszenten Heparinrezeptoren ist es ihnen mit Hilfe der linearen Diskriminanzanalyse (LDA) gelungen, hochselektiv einzelne GAG in Mischungen zu detektieren.^[83] Auch in der Arbeitsgruppe KRÄMER wurde die LDA erfolgreich für die Detektion verschiedener GAG in Mischungen angewendet.^[84] Als Rezeptoren dienten in diesem Fall einzelne Mitglieder einer Bibliothek von Eisen-Poly(pyridyl)komplexen. Andere Arbeiten der Arbeitsgruppe KRÄMER haben zu der Entwicklung eines einfachen Spot-Tests auf Basis der bereits zuvor erwähnten Perylenfarbstoffe geführt, mit dem bereits sehr geringe Mengen (0,02 %) OSCS einfach und schnell nachgewiesen werden können.^[85] Der bereits oben erwähnte Polymer-H Assay wurde von LÜHN *et al.* ebenfalls weiterentwickelt, so dass nun auch OSCS in geringen Mengen (< 1 %) in UFH und LMWH nachgewiesen werden kann.^[86] Allerdings ist die modifizierte Methode etwas aufwendiger und erfordert eine 100-minütige Inkubation mit einem heparindegradierenden Enzym vor dem eigentlichen Nachweis von OSCS über die Messung der Fluoreszenz. Erst

kürzlich wurde von einem sehr sensitiven potentiometrischen Streifentest berichtet, welcher ähnlich wie die schon lange etablierten Glukoseteststreifen innerhalb kürzester Zeit (2 min) minimalste Menge von OSCS (0,005 %) nachweisen kann.^[87]

Die beschriebenen Sonden basieren fast ausschließlich auf organischen Fluorophoren. Bisher finden sich in der Literatur nur wenige Beispiele für GAG-Sonden auf Basis von Übergangsmetallkomplexen (ÜM-Komplexen),^[88,89] obwohl diese viele Vorteile bieten (vgl. Kapitel 1.1). Insbesondere die häufig beobachtete Intensitätssteigerung bei Bindung an einen Analyten ist günstig, da auf diese Weise so genannte *turn-on* Sonden entwickelt werden können im Gegensatz zu den *turn-off* Sonden auf Basis organischer Fluorophore. Ein Beispiel für einen Ruthenium-basierten Nachweis von Heparin wurde von KRÄMER *et al* publiziert.^[88] Die Detektion beruht auf der Anlagerung zweier Ruthenium-Poly(pyridyl)-komplexe an den Polysaccharidstrang. Durch die räumliche Nähe der beiden Komplexe kommt es zu einem Energie- oder Elektronentransfer von der einen Komponente zu der anderen, was als Fluoreszenzlöschung beobachtet werden kann. Die Effizienz bezogen auf die Neutralisierung von Heparin ist vergleichbar mit Protamin, einem gängigen Heparin-Antidot. In der vorliegenden Arbeit sollte das Potenzial von strukturell ähnlichen Iridium-Poly(pyridyl)komplexen für den selektiven Nachweis unterschiedlicher GAG einzeln und in Mischungen analysiert werden.

2 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, neue molekulare Sonden zur Detektion von Biomolekülen zu entwickeln. Dafür sollten neuartige Poly(pyridyl)iridium(III)-Farbstoffe synthetisiert und hinsichtlich ihrer photophysikalischen Eigenschaften charakterisiert werden.

Durch Variationen in der Ligandstruktur sollten die photophysikalischen Eigenschaften der Iridiumkomplexe derart beeinflusst werden, dass eine möglichst langwellige, umgebungsabhängige Emission erhalten wird. Zusätzlich sollte die Funktionalisierung der Liganden mit passenden Substituenten eine hohe Affinität zum jeweiligen Analyten ermöglichen. Beide Kriterien sind für einen Nachweis in biologischen Medien von entscheidender Bedeutung.

Als Analyten sollten primär verschieden stark sulfatierte Glykosaminoglykane dienen. Von besonderem Interesse ist hier die selektive Detektion eines Glykosaminoglykans in Gegenwart eines anderen. Außerdem stand der sensitive, quantitative Nachweis von Glykosaminoglykanen in Proben, welche biologische Medien wie Blutserum, -plasma oder Urin enthalten, im Fokus dieser Arbeit.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Entwicklung neuer Fluoreszenzsonden auf der Basis von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen

Bei der Entwicklung neuartiger Poly(pyridyl)iridium(III)-Farbstoffe wurden im Wesentlichen zwei Strategien verfolgt: Zum Einen wurde das Grundgerüst der cyclometallisierenden Liganden variiert, um so eine Modulation der Absorptions- und Emissionseigenschaften zu erreichen, analog den in Kapitel 1.1.1 diskutierten Beispielen. Zum Anderen wurden verschieden derivatisierte Diiminliganden synthetisiert, welche durch die zu erwartende Wechselwirkung der funktionellen Gruppen mit den Analyten ausschlaggebend für die Affinität der Sonden zu den Zielmolekülen sind. Da vor allem die mehrfach negativ geladenen Glykosaminoglykane als Analyten zum Einsatz kommen sollten, lag es nahe, die positive Gesamtladung der Komplexe zu erhöhen. Dies sollte dann in einer verbesserten elektrostatischen Wechselwirkung mit den polyanionischen Zielmolekülen und somit einer erhöhten Affinität zu eben diesen resultieren. Auch mögliche hydrophobe Wechselwirkungen sollten optimiert werden, indem die Kettenlänge der aliphatischen Substituenten variiert wurde. Durch Kombination der unterschiedlichen cyclometallisierenden Liganden mit den hergestellten Diiminliganden gelang es so, mit relativ wenig Aufwand eine Vielzahl an neuen Farbstoffen mit variablen Eigenschaften darzustellen.

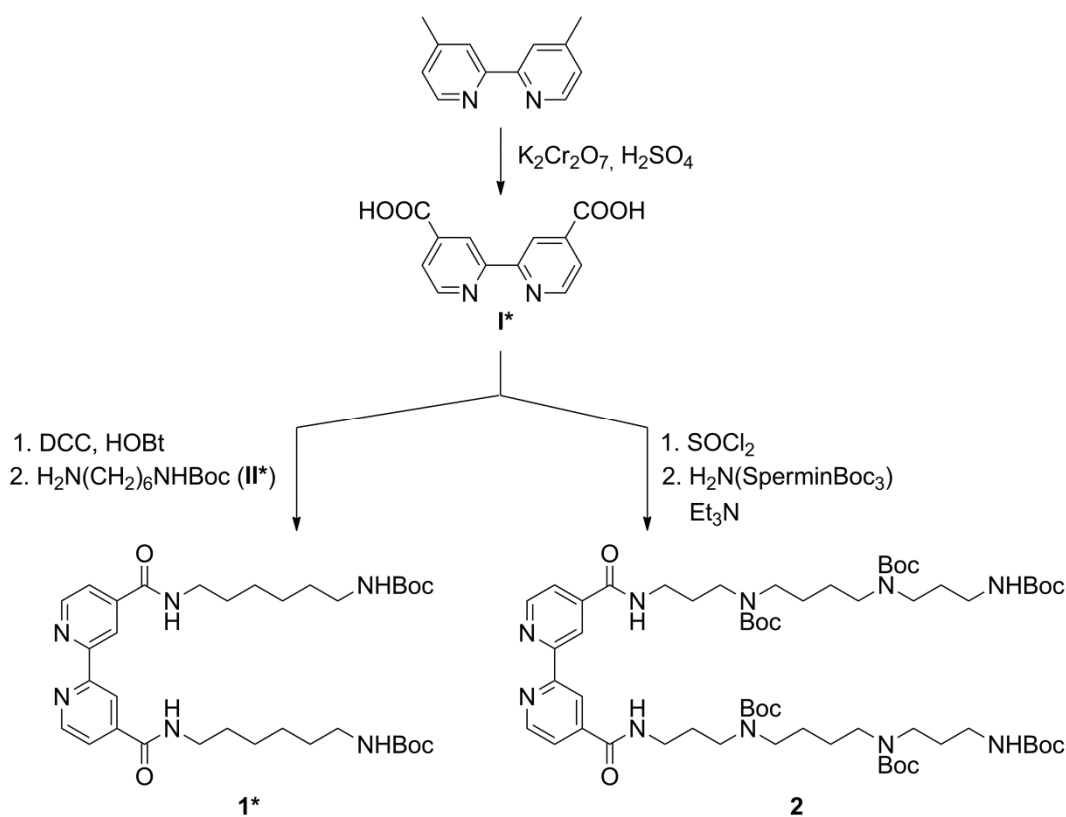
3.1.1 Darstellung und Charakterisierung der aminofunktionalisierten Bipyridinliganden

Im Rahmen dieser Arbeit fanden ausschließlich Diiminliganden auf Basis von 2,2'-Bipyridin (bpy) Verwendung. Bpy-Liganden bieten den Vorteil einer leichten Derivatisierung ausgehend vom kommerziell erhältlichen 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin oder 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd. Ersteres kann in einer einstufigen Reaktion zur Dicarboxylverbindung oxidiert werden, welche sich anschließend durch relativ einfache literaturbekannte chemische Synthesen weiter funktionalisieren lässt. Als funktionelle Gruppen wurden aliphatische Amine gewählt, welche unter den geplanten experimentellen Bedingungen für die Nachweisreaktionen (wässrige Lösung bei pH 7) protoniert vorliegen (pK_s (primäres Amin) $\approx 10-11$).^[90] Dadurch ist die erwünschte Erhöhung der positiven Gesamtladung der Iridiumkomplexe gewährleistet. Abbildung 3.1 zeigt eine Übersicht über die gewählten Syntheserouten und die dargestellten Verbindungen. Literaturbekannte Verbindungen sind hierbei mit einem * gekennzeichnet.

Zunächst wurde 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin nach einer Literaturvorschrift^[91] unter relativ aggressiven Bedingungen mit Kaliumdichromat in kochender Schwefelsäure zur 2,2'-Bi-

pyridin-4,4'-dicarbonsäure **I*** oxidiert. Diese wurde anschließend mit gängigen Aktivierungsreagenzien wie beispielsweise Thionylchlorid oder *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in reaktivere Zwischenprodukte überführt, die dann *in situ* mit unterschiedlichen Aminen umgesetzt wurden. Als Amine wurden in dieser Arbeit zum Einen Diaminohexan, zum Anderen 1,12-Diamino-4,9-diazadodekan (Spermin) verwendet. Spermin ist dafür bekannt, dass es mit hoher Affinität an Glykosaminoglykane bindet,^[92] sodass eine starke Wechselwirkung der resultierenden Komplexe mit den Zielmolekülen zu erwarten ist. Um Mehrfachkopplungen zu vermeiden, wurde zuerst selektiv eine Aminofunktion des Diaminohexans durch Einführen einer *tert*-Butoxycarbonylgruppe (Boc) geschützt, so dass das Amin **II*** erhalten wurde.^[93] *N*¹,*N*⁴,*N*⁹-Tri(*tert*-butoxycarbonyl)-1,12-diamino-4,9-diazadodekan (Tri-boc-spermin) wurde von Herrn Volker Seifried zur Verfügung gestellt.

a)



b)

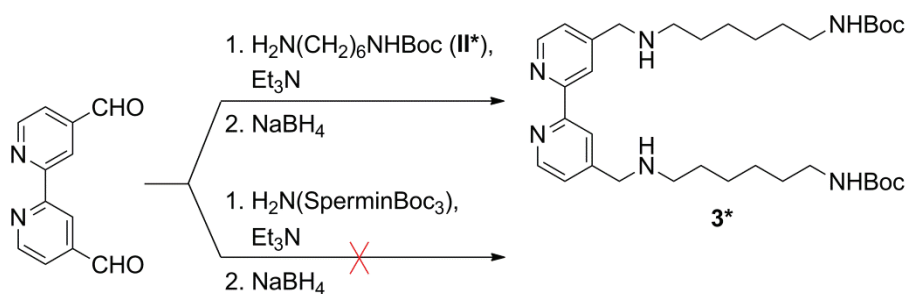


Abbildung 3.1: Syntheschemata zur Darstellung verschieden funktionalisierter 2,2'-Bipyridinderivate ausgehend von a) 4,4'-Dimethyl-2,2'-bipyridin und b) 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd. Boc = *tert*-Butoxycarbonylgruppe, H₂N(SperminBoc₃) = *N*¹,*N*⁴,*N*⁹-Tri(*tert*-butoxycarbonyl)-1,12-diamino-4,9-diazadodekan.

Für die Umsetzung von **I*** mit **II*** wurde DCC in Kombination mit *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt) zur Aktivierung der Carbonsäuregruppen eingesetzt. Das gebildete Acylharnstoffderivat wurde direkt mit dem Amin **II*** zu Ligand **1*** umgesetzt, welcher in guter Ausbeute erhalten werden konnte. Die Charakterisierung der Verbindung **1*** erwies sich allerdings als schwierig, da dieser Boc-geschützte Bipyridinabkömmling praktisch unlöslich in allen gängigen Lösungsmitteln war. Die Reinheit der Verbindung wurde jedoch elementaranalytisch bestätigt. Durch Aktivierung der Carbonsäure mit Thionylchlorid zum Biscarbonsäurechlorid^[94] und anschließende Umsetzung mit Tri-boc-spermin gelang die Synthese des neuen Liganden **2**, ebenfalls in guter Ausbeute und Reinheit.

Die Funktionalisierung von 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd erfolgte mit Hilfe einer reduktiven Aminierung nach einer allgemeinen Literaturvorschrift.^[95] Bei dieser Vorgehensweise ist zu beachten, dass es sich bei der Bildung der Schiffschen Base im ersten Reaktionsschritt um eine Gleichgewichtsreaktion handelt. Im Verlauf dieser Reaktion kann ein Gemisch von einfach, zweifach und nicht funktionalisiertem 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd vorliegen. Aus diesem Grund gelang die Synthese von Ligand **3***^[84] erst nach einiger Optimierung der Reaktionsbedingungen, vor allem von Reaktionszeit und zugegebener Menge an Base. Die Darstellung des analogen bis(spermin)-funktionalisierten Bipyridinliganden ist trotz zahlreicher Optimierungsversuche jedoch nicht gelungen. Im Fall dieses Liganden wurde für die Synthese entsprechend substituierter Iridiumkomplexe daher eine andere Synthesestrategie verfolgt, welche in Kapitel 3.1.2 erläutert wird.

Um die photophysikalischen Eigenschaften von koordinierten und freien Liganden vergleichen zu können, wurden die Boc-Schutzgruppen von den Liganden **1***, **2** und **3*** entfernt. Dies geschah entsprechend einer allgemeinen Literaturvorschrift^[96] durch mehrstündiges Rühren der jeweiligen Verbindung in einem Gemisch aus Methanol und konzentrierter Salzsäure. Die entsprechenden Bipyridinderivate **4***, **5** und **6*** wurden synthesebedingt als Hydrochloridsalze isoliert (siehe Abbildung 3.2).

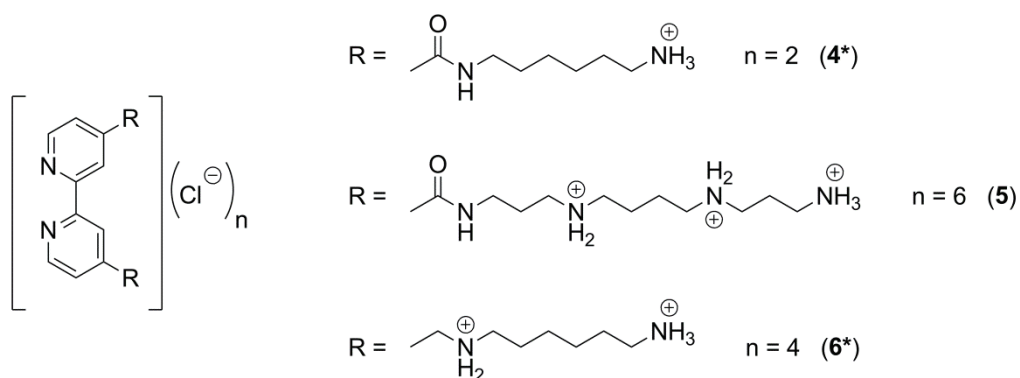


Abbildung 3.2: Chemische Struktur der Bipyridinderivate **4***, **5** und **6***.

Untersuchung der Absorptionseigenschaften von **4***, **5** und **6***

Die drei Liganden **4***, **5** und **6*** wurden hinsichtlich ihres Absorptionsverhaltens in wässriger Lösung untersucht (vgl. Abbildung 3.3). Die beobachteten Absorptionsbanden resultieren aus intensiven symmetrie- und spinerlaubten $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergängen vom Grundzustand in verschiedene Niveaus des angeregten Zustandes.^[97] Auffällig ist die hypsochrome Verschiebung der langwelligsten Absorptionsbande bei Funktionalisierung des Liganden mit Spermin (**5**). Dagegen scheint die unterschiedliche Anknüpfung des Hexaminsubstituenten über eine Amid- (**4***) bzw. Aminbindung (**6***) keinen Einfluss auf die energetische Lage der Molekülorbitale zu haben.

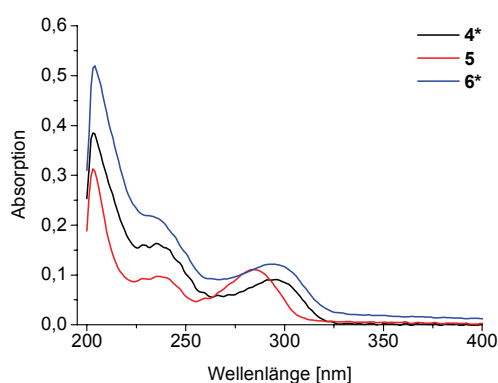


Abbildung 3.3: Absorptionsspektren der Bipyridinliganden **4***, **5** und **6*** (10 μ M, H₂O, T = 25 °C).

Die synthetisierten Bipyridinliganden sollten in wässriger Lösung bei pH 7 aufgrund der zu erwartenden Protonierung der Aminogruppen als mehrfach positiv geladene Spezies vorliegen. Eine Protonierung der am aromatischen System beteiligten Pyridinstickstoffatome sollte allerdings erst im leicht sauren pH-Bereich erfolgen (vgl. $pK_s(\text{Pyridin}) = 5,2$).^[98] Bei der Untersuchung der Absorptionseigenschaften in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung tritt bei allen drei Liganden ein deutlicher Anstieg der Bande bei ca. 200 nm mit zunehmendem pH-Wert auf. Gleichzeitig nimmt die Absorption der langwelligsten Bande ab, während eine neue Absorptionsbande bei etwas kürzerer Wellenlänge (ca. 18–26 nm energiereicher) beobachtet werden kann. Es ist jeweils ein isobestischer Punkt bei 302 nm (**4*** und **6***) bzw. 294 nm (**5**) vorhanden. Abbildung 3.4 zeigt links die beschriebenen Änderungen anhand von Verbindung **4***. Wird die Änderung der Absorption bei 203 nm gegen den pH-Wert aufgetragen, wird die schwarze, in Abbildung 3.4 rechts gezeigte Kurve erhalten. Im pH-Bereich 3–9 ist die Absorption nahezu konstant, wohingegen bei $\text{pH} < 3$ eine leichte Abnahme und bei $\text{pH} > 9$ eine starke Zunahme der Absorption auftritt. Es liegt ein Wendepunkt bei $\text{pH} \approx 10,7$ vor. Eine Auftragung des Verhältnisses der Absorption bei 294 nm und 316 nm gegen den pH-Wert ergibt die rote, in Abbildung 3.4 rechts gezeigte Kurve. In diesem Fall ist eine starke Abnahme der Bande bei 294 nm bei $\text{pH} < 4$ zu beobachten. Ab einem pH von 4 ändert sich das Verhältnis der Absorption bei 294 nm und 316 nm kaum noch. Der Wendepunkt liegt bei $\text{pH} \approx 3,0$.

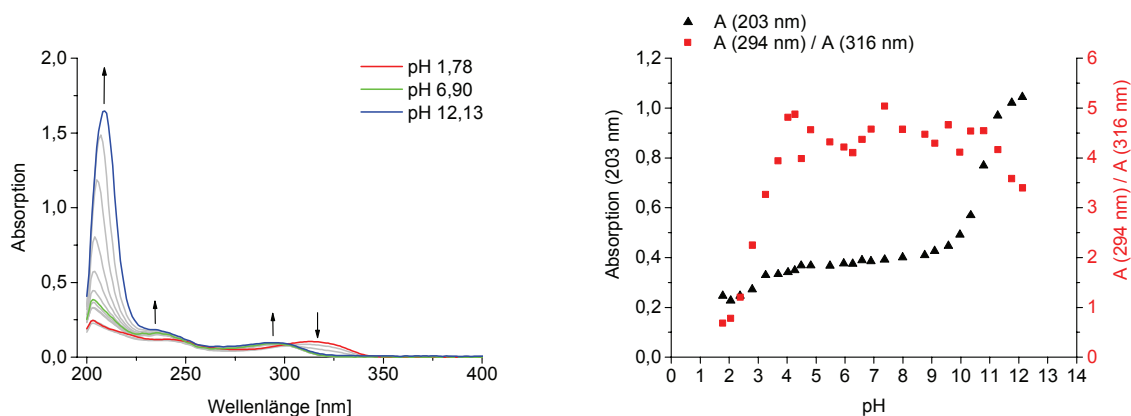


Abbildung 3.4: pH-Abhängigkeit der Absorption von **4***. Links: Absorptionsspektren für pH-Werte im Bereich von 1,78–12,13; rechts: Änderung der Absorption bei 203 nm (schwarz) bzw. des Verhältnisses der Absorption bei 294 nm und 316 nm (rot) in Abhängigkeit vom pH-Wert (10 μ M **4***, 100 mM NaCl, H₂O, T = 25 °C). Die pH-Werte wurden durch Zugabe von verdünnter Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt

Unter stark basischen Bedingungen liegen alle funktionellen Gruppen des Liganden **4*** deprotoniert vor. Mit sinkendem pH-Wert werden zunächst die beiden primären Aminogruppen protoniert. Der aus dem Wendepunkt der schwarzen Kurve experimentell bestimmte pK_S -Wert von ca. 10,7 stimmt gut mit dem in der Literatur angegebenen theoretischen Wert von 10,59^[99] für die strukturell sehr ähnliche Verbindung *N*-(aminohexyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridin-4-carboxamid sowie allgemeinen Literaturwerten für primäre Amine überein.^[90] Da im relevanten pH-Bereich nur ein Wendepunkt detektiert wird, ist davon auszugehen, dass die beiden pK_S -Werte der primären Aminogruppen sehr ähnlich sind. Aus einer Untersuchung von unsubstituiertem 2,2'-Bipyridin unter analogen Messbedingungen kann man außerdem schlussfolgern, dass die Verschiebung des Absorptionsmaximums bei ca. 300 nm auf die Protonierung der Pyridinstickstoffatome zurückzuführen ist. Mit Hilfe einer Auftragung des Verhältnisses der Absorption bei 281 nm und 302 nm konnte für 2,2'-Bipyridin ein pK_S -Wert von ca. 5,5 bestimmt werden (vgl. Anhang). Dieser Wert korreliert gut mit dem oben angegebenen Literaturwert für Pyridin. Allerdings liegt dieser Wert über dem experimentell bestimmten Wert von etwa 3,0 für Ligand **4***, die Funktionalisierung mit einem Amidsubstituenten bewirkt also eine signifikante Abnahme der Basizität der Ringstickstoffatome in Bipyridinderivaten. Eine Übersicht aller ermittelten pK_S -Werte ist in Tabelle 3.1 zusammengestellt.

Analoge Messungen ergaben für die Liganden **5** und **6*** qualitativ ähnliche Spektren wie die für Verbindung **4*** ausführlich diskutierten. Aus den Wendepunkten lassen sich für Verbindung **5** insgesamt drei pK_S -Werte bestimmen, welche den einzelnen Protonierungsstufen der primären und sekundären Aminogruppen zugeordnet werden können. Die ermittelten Werte (vgl. Tabelle 3.1) stimmen in der Tendenz gut mit Literaturwerten für Spermin^[100] bzw. *N*¹-Acetylspermin^[101] überein. Die experimentellen Werte für pK_{S2} und pK_{S3} sind allerdings deutlich kleiner als die vergleichbaren Literaturwerte. Der pK_S -Wert für die Protonierung der Pyridinstickstoffatome (pK_{S4}) liegt im gleichen Bereich wie derjenige von Ligand **4***. Bei Verbindung **6*** konnte nur ein pK_S -Wert eindeutig dem aliphatischen Substituenten zugeordnet werden, obwohl theoretisch mindestens zwei Protonierungsstufen für die primären und

sekundären Aminogruppen erwartet werden. Der ermittelte Wert (vgl. Tabelle 3.1) stimmt auch hier gut mit den theoretischen Werten für strukturell ähnliche Verbindungen überein.^[99] Der pK_S -Wert für die Protonierung der Ringstickstoffatome (pK_{S3}) ist vergleichbar mit den entsprechenden Werten für die Liganden **4*** und **5**.

Tabelle 3.1: Experimentell ermittelte pK_S -Werte für die Liganden **4***, **5** und **6***.

Verbindung	pK_{S1}	pK_{S2}	pK_{S3}	pK_{S4}
4*	10,7	3,0		
5	10,8	7,8	6,0	2,8
6*	10,5	#	3,1	

Wert konnte nicht bestimmt werden

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die synthetisierten Bipyridinliganden **4***, **5** und **6*** im für die anstehenden Nachweisreaktionen interessanten pH-Bereich (6–8) als mehrfach protonierte Spezies vorliegen. Die Protonierung findet zunächst an den primären und sekundären Aminogruppen statt, eine Protonierung der Amidgruppen oder der Ringstickstoffatome ist bei pH 7 nicht zu erwarten. Aufgrund dieser Beobachtungen ist davon auszugehen, dass die auf Verbindung **4***, **5** und **6*** basierenden Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe in wässriger Lösung bei neutralem pH-Wert ebenfalls mehrfach positiv geladen vorliegen. Damit ist eine grundlegende Bedingung für die Applikation der neuen Farbstoffe als molekulare Sonden für negativ geladene Analyten erfüllt.

3.1.2 Darstellung der Iridium(III)-Komplexe

Die Synthese der Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe erfolgte unter Nutzung eines Baukastenprinzips ausgehend von Iridiumtrichlorid, drei verschiedenen cyclometallisierenden Liganden und fünf Diiminliganden. Als Diiminliganden fanden neben den drei Bipyridinderivaten **1***, **2** und **3*** auch das unsubstituierte 2,2'-Bipyridin sowie 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd Verwendung. Letzteres sollte die Synthese von sperminfunktionalisierten Komplexen mit Hilfe einer reduktiven Kopplung des Amins mit dem bereits komplexierten Liganden ermöglichen. Die Einführung des gänzlich unfunktionalisierten Diiminliganden diente der Synthese von Referenzverbindungen mit schlechter Affinität zu den negativ geladenen Analyten. Als cyclometallisierende Liganden wurden 2-Phenylpyridin (ppy), 2-Phenylisochinolin (piq) sowie Benzo[*h*]chinolin (bzq) ausgewählt, wobei die Anzahl konjugierter π -Elektronen von ppy zu piq und bzq hin zunimmt. Dies sollte die photophysikalischen Eigenschaften der resultierenden Iridiumkomplexe derart beeinflussen, dass die Absorptions- und Emissionsmaxima von

piq- und bzq-Komplexen gegenüber analogen ppy-Komplexen zu größeren Wellenlängen verschoben sind (vgl. hierzu die Erläuterungen in Kapitel 1.1.1).

Für die Darstellung der Komplexe wurde entsprechend einer etablierten Syntheseroute^[10,27] (siehe Abbildung 3.5) zunächst der jeweilige cyclometallierende Ligand C^N mit Iridiumtrichlorid bei hoher Temperatur umgesetzt. Auf diese Weise konnten die literaturbekannten, chlorüberbrückten Dimere IV*, V* und VI* elementaranalysenrein und in guter Ausbeute erhalten werden. 2-Phenylisochinolin (III*) wurde zuvor nach Literaturvorschrift^[20] in einer SUZUKI-Kupplungsreaktion aus 1-Chlorisochinolin und Phenylborsäure hergestellt.

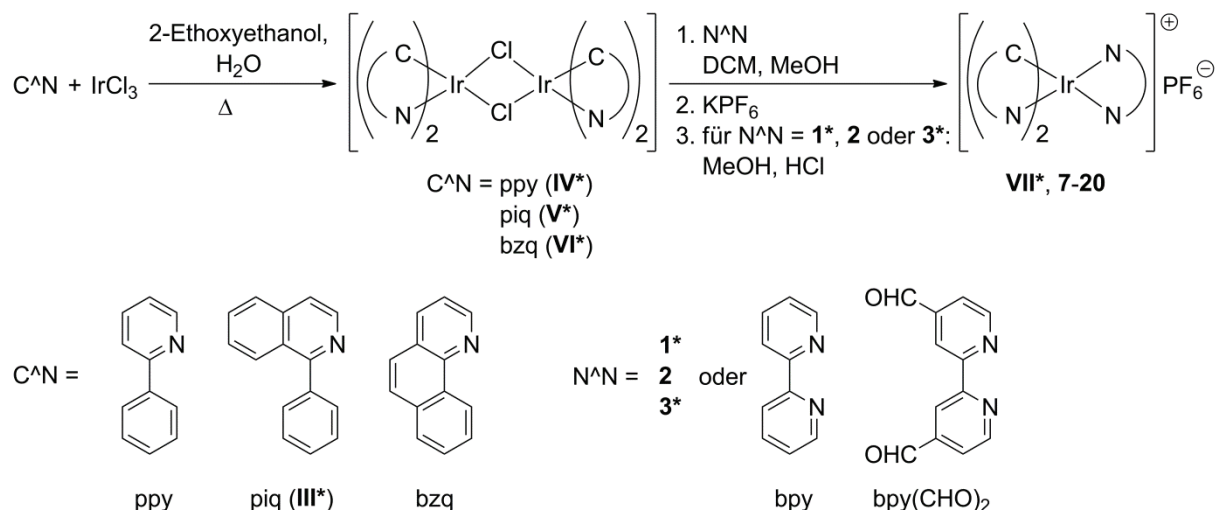
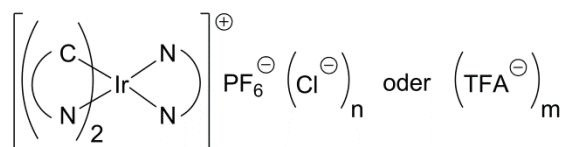


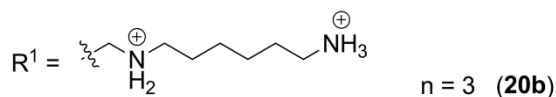
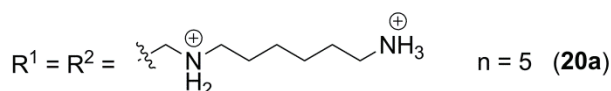
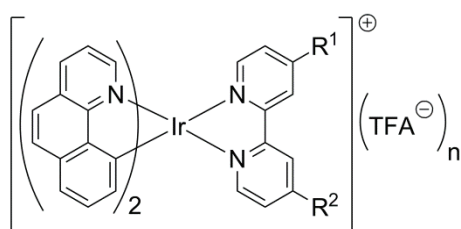
Abbildung 3.5: Allgemeines Syntheschema für die Darstellung verschieden substituierter Poly(pyridyl)-iridium(III)-Komplexe. C^N = cyclometallierender Ligand, N^N = Diiminligand.

Die Verbindungen IV*, V* und VI* wurden anschließend durch Reaktion mit den unterschiedlichen Diiminliganden N^N unter milden Bedingungen gespalten. Alle Produkte wurden säulenchromatographisch gereinigt und konnten zumeist in guter, teilweise sogar sehr guter Ausbeute und in hoher Reinheit isoliert werden. Lediglich diejenigen Komplexe, welche als Diiminliganden das Bipyridinderivat 2 enthalten, sowie solche die aus der Reaktion von V* und VI* mit Ligand 3* hervorgingen, wurden nach einer etwas aufwändigeren Reinigung nur in geringen Ausbeuten erhalten. Die gegebenenfalls vorhandenen Boc-Schutzgruppen wurden erst nach der Aufreinigung in methanolischer, salzsaurer Lösung entfernt, sodass die gewünschten aminofunktionalisierten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe schließlich in Form der Hydrochloridsalze vorlagen. Tabelle 3.2 zeigt eine Übersicht über die auf diese Weise synthetisierten Verbindungen 7–20, wobei Verbindung VII* nach einer Literaturvorschrift^[11] hergestellt wurde. Bei den Verbindungen 20a und 20b handelt es sich um zweifach (20a) bzw. einfach (20b) aminofunktionalisierte Iridium(III)-Komplexe (vgl. Abbildung 3.6). Komplex 20b konnte als Nebenprodukt der Reaktion von VI* mit 3* nach Reinigung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) allerdings nur in geringer Ausbeute isoliert werden.

Tabelle 3.2: Übersicht über die synthetisierten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe **7–20**.

$$n = 2-6, m = 3-7$$

N [^] N	C [^] N		
	ppy	piq	bzq
bpy	7*	VII*	16*
bpy(CHO) ₂	8*	12	17
4*	9	13	18
5	10	14	19
6*	11	15	20a, 20b

**Abbildung 3.6:** Chemische Struktur der Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe **20a** und **20b**.

Da die Darstellung eines sperminfunktionalisierten Bipyridinliganden, in welchem der Aminsubstituent über eine Aminbindung an das Bipyridin gekoppelt ist, nicht gelungen ist (vgl. Kapitel 3.1.1), wurde für die Synthese von entsprechend funktionalisierten Iridium(III)-Komplexen eine andere Syntheseroute gewählt. In Anlehnung an eine in der Literatur beschriebene Synthese^[102] wurden die zuvor hergestellten Komplexe **8***, **12** und **17** bei milden Bedingungen mit Tri-boc-spermin umgesetzt (siehe Abbildung 3.7). Das durch die Reaktion mit den vorhandenen Aldehydgruppen entstandene Imin wurde *in situ* mit Natriumborhydrid zum entsprechenden Amin reduziert. Die erhaltenen Rohprodukte wurden aufwändig säulenchromatographisch gereinigt, bevor die Schutzgruppen in methanolischer Salzsäure entfernt wurden. Anschließend war in allen drei Fällen eine zusätzliche Reinigung der Komplexe mittels HPLC notwendig. Bedingt durch die zahlreichen Aufreinigungsschritte konnten die gewünschten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe **21**, **22** und **23** nur in geringer Ausbeute in hoher Reinheit isoliert werden. Bei der Reaktion von Verbindung **8*** mit dem Amin wurde neben dem zweifach funktionalisierten Komplex **21a** auch die entsprechende einfach funktionalisierte Verbindung **21b** erhalten (vgl. Abbildung 3.7).

Mit Hilfe der beschriebenen Synthesestrategien ist es gelungen, eine kleine Bibliothek unterschiedlich substituierter Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe zu synthetisieren. Die hohe Reinheit der Verbindungen wurde mittels NMR-Spektroskopie, HPLC und teilweise elementaranalytisch bestätigt. Durch die unterschiedliche Kombination der einzelnen Bausteine wurde eine Vielzahl potentieller Sondenmoleküle mit variablen photophysikalischen Eigenschaften erhalten. Letztere sollen im folgenden Kapitel ausführlicher diskutiert werden.

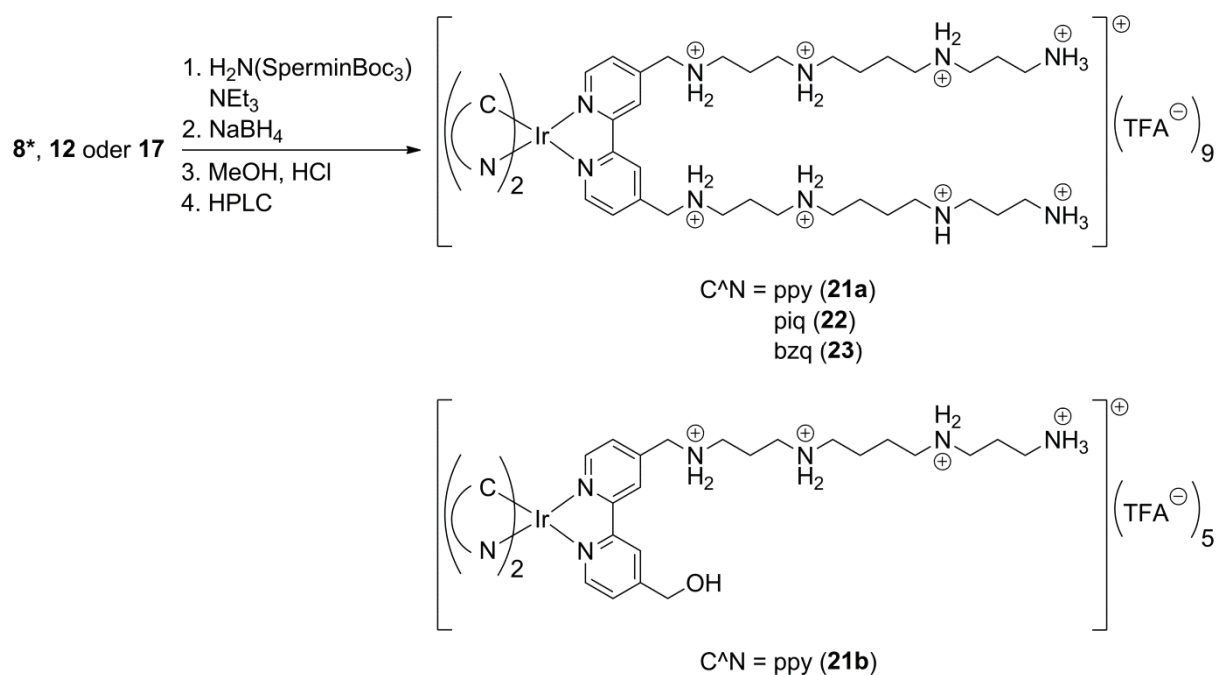


Abbildung 3.7: Allgemeines Syntheschema für die Darstellung von sperminfunktionalisierten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen. $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ = cyclometallierender Ligand, $\text{H}_2\text{N}(\text{SperminBoc}_3) = \text{N}^1, \text{N}^4, \text{N}^9$ -Tri(*tert*-butoxycarbonyl)-1,12-diamino-4,9-diazadodekan.

3.1.3 Charakterisierung der neuen Farbstoffe hinsichtlich ihrer photo-physikalischen Eigenschaften

Die Verbindungen **7–23** wurden vorrangig bezüglich ihrer Absorptions- und Emissions-eigenschaften in wässriger Lösung untersucht. Des Weiteren wurden analog zu den Verbindungen **4–6** die pK_s -Werte für die einzelnen Protonierungsstufen ermittelt, um Hinweise auf die positive Gesamtladung der Komplexe bei pH 7 zu erhalten. Hierzu wurde neben der Absorption vor allem die Emission in Abhängigkeit vom pH-Wert analysiert. Die Untersuchung der Emission in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration ermöglichte außerdem Rückschlüsse auf das Aggregationsverhalten der neuen Verbindungen in wässriger Lösung.

Absorptionseigenschaften

Alle synthetisierten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe weisen in wässriger Lösung die für solche Komplexe charakteristischen, intensiven ligandzentrierten (LC) Übergänge bei 250–320 nm auf. Weitere schwächere Absorptionsbanden im Bereich 320–480 nm resultieren aus spinerlaubten Metall-Ligand-Ladungsübergängen ($^1\text{MLCT}$). Im Fall der Komplexe **12–15** sowie **22** können diese Banden auch Beiträge von Ligand-Ligand-Ladungsübergängen (LLCT) enthalten (vgl. Kapitel 1.1.1).^[11] Die erwähnten CT-Banden sind für die typische orange Farbe der Verbindungen verantwortlich. Einige Farbstoffe weisen zusätzlich eine sehr schwache

Absorption im Bereich 480–550 nm auf, welche spinverbotenen Metall-Ligand-Ladungsübergängen ($^3\text{MLCT}$) zugeordnet werden kann. Diese resultieren aus der starken Spin-Bahn-Kopplung, welche durch das Metall verursacht wird.^[27] Die Wellenlängen der wichtigsten Absorptionsmaxima sowie die jeweiligen Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Eine vollständige Auflistung aller bestimmten Werte findet sich bei der Beschreibung der einzelnen Synthesen in Kapitel 5.2.2.

Tabelle 3.3: Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten der Verbindungen **7–23** (20 μM , H_2O , $T = 25^\circ\text{C}$).

Verbindung	Absorption [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$])			
	LC		MLCT	
7*	262 (31500)	300 (19500)	375 (5400)	
8*	256 (48900)	306 (21200)	377 (17300)	
9	262 (47000)	286 (40400)	368 (10400)	
10	255 (47500)	289 (29600)	369 (8300)	
11	255 (37200)	306 (11700)	378 (3450)	
12	253 (15800)	291 (18100)	382 (5900)	436 (3600)
13	252 (42000)	288 (44900)	378 (12800)	430 (1650)
14	252 (54500)	288 (52000)	378 (14000)	431 (7500)
15	250 (15200)	291 (14800)	380 (3600)	438 (2300)
16	254 (74100)	312 (21000)	350 (14500)	419 (6100)
17	257 (35300)	284 (19900)	414 (4300)	
18	254 (36600)	285 (21100)	354 (8400)	398 (4500)
19	255 (50200)	286 (30500)	355 (12500)	401 (7500)
20a	252 (53800)	285 (30300)	340 (15500)	404 (5000)
20b	252 (40300)	284 (23400)	354 (10000)	412 (4300)
21a	255 (34500)	305 (17000)	376 (5300)	
21b	255 (38500)	305 (19200)	376 (5900)	
22	236 (50900)	290 (37000)	378 (10700)	433 (5600)
23	250 (59500)	310 (26800)	348 (15000)	408 (5500)

Die erhaltenen Werte für die literaturbekannte Verbindung **7*** stimmen gut mit den beschriebenen Werten überein.^[9] Für Verbindung **8*** wurden die Absorptionsmaxima im gleichen Wellenlängenbereich wie in der Literatur angegeben beobachtet. Jedoch liegen die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Extinktionskoeffizienten deutlich unter den Literaturwerten.^[84]

Die dargestellten Iridium(III)-Komplexe lassen sich je nach Liganden in verschiedene Gruppen einteilen. Aufgrund der sehr ähnlichen Absorptionseigenschaften der entsprechen-

den Komplexe erscheint es sinnvoll, eine Unterscheidung anhand des koordinierten cyclo-metallisierenden Liganden vorzunehmen. Abbildung 3.8 zeigt links beispielhaft die Absorptionsspektren der ppy-Komplexe **8***, **9**, **10**, **11** und **21a**. Beim Vergleich dieser Spektren mit dem analogen Spektrum der gänzlich unsubstituierten Verbindung **7*** (vgl. Abbildung 1.2 links) fällt auf, dass aus der Funktionalisierung des Diiminliganden mit Amidgruppen (**9** und **10**) eine Verschiebung der MLCT-Bande um ca. 7 nm in den energiereicheren Wellenlängenbereich resultiert. Dagegen hat die Substitution mit Aldehyd- (**8***) oder Amingruppen (**11** und **21a**) keinen Einfluss auf die Lage der entsprechenden Bande. Auch die Lage der LC-Banden wird durch die Bipyridinsubstituenten beeinflusst. Mit Ausnahme von Verbindung **9** weisen alle ppy-Komplexe eine hypsochrome Verschiebung der intensivsten LC-Bande um ca. 7 nm gegenüber der Referenzverbindung **7*** auf. Die Lage der etwas energieärmeren LC-Bande bei etwa 300 nm wird ähnlich beeinflusst wie die der MLCT-Bande. Bei Funktionalisierung mit Amidgruppen ist diese Bande um ca. 12 nm energiereicher, wohingegen Aldehyd- und Amingruppen eine Verschiebung um ca. 6 nm in den energieärmeren Bereich bewirken.

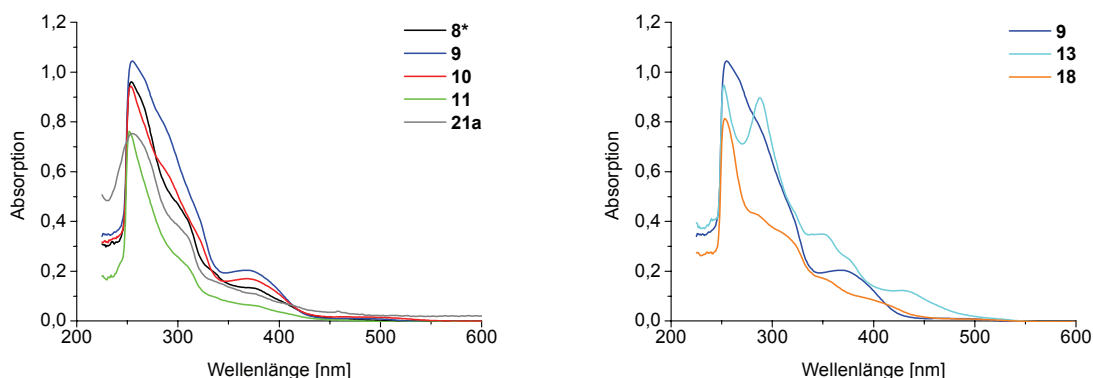


Abbildung 3.8: Absorptionsspektren ausgewählter Verbindungen (20 μ M, H₂O, T = 25 °C). Links: **8***, **9**, **10**, **11** und **21a**; rechts: **9**, **13** und **18**.

Eine ähnlich starke Beeinflussung der Absorption durch Funktionalisierung des Bipyridinliganden tritt bei den bzq-Komplexen auf. Die Einführung von Aminosubstituenten bewirkt eine Verschiebung sowohl der LC- (ca. 5 nm) als auch der CT-Banden (10–15 nm) in den energiereicheren Wellenlängenbereich. Amidsubstituenten dagegen haben keinen Einfluss auf die Lage der LC-Banden, die langwelligste MLCT-Bande jedoch ist in diesem Fall um ca. 20 nm energieärmer. Bei dem aldehydfunktionalisierten Komplex **17** sind verglichen mit der Referenzverbindung **16*** die geringsten Veränderungen im Absorptionsverhalten zu beobachten. Die intensive LC-Bande ist nur geringfügig energieärmer (3 nm) und die MLCT-Bande um 5 nm energiereicher als die analogen Absorptionsmaxima von **16***.

Die Gruppe der piq-Komplexe zeigt ein anderes Verhalten. In diesem Fall hat die unterschiedliche Funktionalisierung des Diiminliganden lediglich bei Verbindung **22** einen Einfluss auf die Lage der LC-Banden. Im Vergleich zur Referenzverbindung **VII*** ist der energiereichste LC-Übergang in **22** um 17 nm hypsochrom verschoben. Die MLCT-Banden werden derart beeinflusst, dass sie bei Substitution mit Amid- oder Amingruppen um ca. 5 nm

energiereicher sind. Die Einführung von Aldehydgruppen bewirkt keine Änderungen im Absorptionsspektrum bezüglich **VII***.

Abbildung 3.8 veranschaulicht rechts das charakteristische Absorptionsverhalten der synthetisierten Iridium(III)-Komplexe in Abhängigkeit vom cyclometallisierenden Liganden am Beispiel der Komplexe **9**, **13** und **18**. Besonders offensichtlich ist der Unterschied im Bereich der LC-Banden. So weist der piq-Komplex **13** zwei LC-Übergänge mit beinahe identischer Intensität auf, wohingegen sowohl beim ppy-Komplex **9** als auch beim bzq-Komplex **18** nur eine deutlich ausgeprägte LC-Bande mit einer weniger intensiven energieärmeren Schulter zu beobachten ist. Die energetische Lage der CT-Übergänge zeichnet die verschiedenen Komplexgruppen aus. So weist Verbindung **9** im Wesentlichen einen MLCT-Übergang bei etwa 370 nm auf. Energetisch ähnlich gelegen sind die zwei MLCT-Übergänge, welche bei Verbindung **18** auftreten. Am ausgeprägtesten sind die CT-Banden bei dem piq-Komplex **13**. Dieser weist mehrere CT-Übergänge im Bereich 350–450 nm auf, welche, wie oben erwähnt, sowohl MLCT- als auch LLCT-Charakter haben können. Das langwellige Absorptionsmaximum bei 430 nm ermöglicht bei diesem Komplex eine Anregung im sichtbaren Wellenlängenbereich, welche bei den beiden anderen Verbindungen nicht möglich ist. Dies ist im Hinblick auf die geplanten Untersuchungen in biologischen Medien vorteilhaft, da hierdurch die störende Hintergrundfluoreszenz des biologischen Materials verringert werden kann. Ein analoger Vergleich der anderen hergestellten Iridium(III)-Komplexe führt zu qualitativ ähnlichen Ergebnissen wie der hier beschriebene.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Koordination von π -elektronenreichen Liganden wie piq oder bzq die Absorptionsmaxima in den längerwelligen, energieärmeren Bereich verschoben werden. Gleichzeitig sind die CT-Übergänge stärker ausgeprägt als bei analogen ppy-Komplexen.

Lumineszenzeigenschaften

Bei Anregung mit der Wellenlänge der energieärmeren LC-Bande (ca. 300 nm) zeigen in wässriger Lösung alle hergestellten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe eine intensive Emission im Bereich 590–700 nm. Bei der Gruppe der ppy-Komplexe findet diese aus einem angeregten Zustand heraus statt, welcher vorwiegend $^3\text{MLCT}$ -Charakter ($d\pi(\text{Ir}) \rightarrow \pi^*(\text{N}^{\wedge}\text{N})$) hat, so dass ein relativ breites Emissionsprofil erhalten wird (siehe Erläuterungen in Kapitel 1.1.1). Im Vergleich zur Referenzverbindung **7*** weisen alle ppy-Komplexe eine energieärmere Emission auf, wobei die beobachtete bathochrome Verschiebung bei den amidfunktionalisierten Komplexen **9** und **10** am stärksten ausgeprägt ist (ca. 65 nm). Ursache hierfür ist der elektronenziehende Charakter der Amidgruppe. Durch diesen wird das $\pi^*(\text{N}^{\wedge}\text{N})$ -Orbital stabilisiert und die Energie des angeregten $^3\text{MLCT}$ -Zustandes verringert. Analoge Beobachtungen wurden für strukturell ähnliche Rutheniumkomplexe beschrieben.^[103] Einhergehend mit der zunehmend energieärmeren Emission bei Funktionalisierung des Diiminliganden mit Aldehyd- (12 nm), Amin- (5–20 nm) oder Amidgruppen nimmt die Emissionsquanten-

ausbeute der ppy-Komplexe in der gleichen Reihenfolge ab. Dies ist eine Konsequenz aus dem so genannten Energielückengesetz (engl. *energy gap law*), welches besagt, dass der Anteil an strahlungsloser Deaktivierung des angeregten Zustandes umso höher ist, je energieärmer der strahlende Übergang ist.^[1] Durch die Nähe des angeregten Zustandes zum Grundzustand werden in diesem Fall strahlungslose Deaktivierungsprozesse begünstigt.^[14] Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Emissionsquantenausbeuten in wässriger Lösung (siehe Tabelle 3.4) für die ppy-Komplexe **7–11** sowie **21a** liegen in der gleichen Größenordnung wie die für strukturell verwandte Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe berichteten Werte.^[28,102,104]

Weiterhin zeigen alle ppy-Komplexe eine ausgeprägte Solvatochromie. Im Vergleich zu wässrigen Lösungen tritt die Emission der Verbindungen in Acetonitril bei niedrigerer Wellenlänge (5–25 nm) mit deutlich höherer Intensität auf. Dabei weisen die Komplexe in Acetonitril ein leicht strukturiertes Emissionsprofil auf (vgl. Abbildung 3.9). Die Intensitätsunterschiede lassen sich abermals mit Hilfe des Energielückengesetzes erklären. Durch den energiereicheren Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand ist in Acetonitril der Anteil strahlungsloser Deaktivierungsprozesse geringer, so dass die Emission mit höherer Intensität erfolgt. Das Auftreten eines strukturierteren Emissionsprofils in Acetonitril deutet darauf hin, dass neben allgemeinen Lösungsmittelleffekten auch spezifische Wechselwirkungen der Komplexe mit dem Lösungsmittel vorliegen. Sehr wahrscheinlich ist die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in wässriger Lösung, welche im aprotischen Lösungsmittel Acetonitril nicht möglich ist. Bei Vorliegen derartiger intermolekularer Wechselwirkungen wird häufig ein verhältnismäßig breites Emissionsprofil bei niedrigerer Energie beobachtet.^[1]

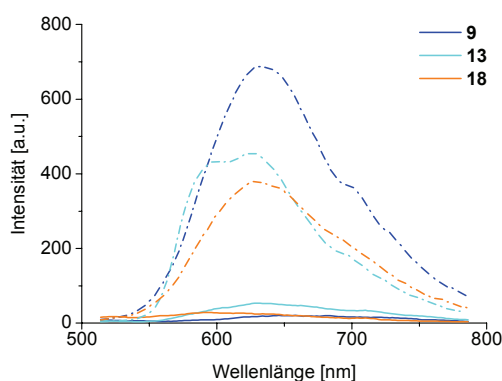


Abbildung 3.9: Emissionsspektren von **9**, **13** und **18** in H₂O (–) bzw. MeCN (· · ·) (5 μM, T = 25 °C, λ_{anr.} = 310 nm, U_D = 800 V).

Die piq-Komplexe **12–15** sowie **22** weisen sowohl in Wasser als auch in Acetonitril im Gegensatz zu den ppy-Komplexen ein deutlich strukturierteres Emissionsprofil auf. Zudem ist die Emissionsquantenausbeute für wässrige Lösungen bei Komplexen mit identischen Diiminliganden im Fall der piq-Verbindungen deutlich höher als bei den analogen ppy- und bzq-Komplexen (vgl. Tabelle 3.4). Beide Beobachtungen sind ein Hinweis darauf, dass der emittierende angeregte Zustand der piq-Komplexe einen sehr ausgeprägten ³LC-Charakter

($\pi \rightarrow \pi^*(C^{\wedge}N)$) aufweist. Dabei kann eine Beimischung von Zuständen mit 3MLCT -Charakter ($d\pi(Ir) \rightarrow \pi^*(C^{\wedge}N)$) zum angeregten Zustand nicht ausgeschlossen werden. Ähnliches wurde bereits mehrfach in der Literatur für strukturell vergleichbare Iridium(III)-Komplexe beschrieben.^[11,27,104] Aus der schwächeren vibronischen Kopplung des angeregten Zustandes mit dem Grundzustand resultiert insgesamt eine effizientere Emission. Auch die Tatsache, dass beim Wechsel des Lösungsmittels von Wasser zu Acetonitril keine Änderungen in der Emissionsenergie auftreten, deutet auf einen ausgeprägten 3LC -Charakter hin.^[11] Eine Ausnahme in dieser Hinsicht stellen die amidfunktionalisierten Komplexe **13** und **14** dar. Beide Verbindungen weisen in Wasser nur eine geringe Emission mit einem breiten, unstrukturierten Profil auf (vgl. Abbildung 3.9), welche deutlich energieärmer ist als die Emission der unsubstituierten Referenzverbindung **VII***. In Acetonitril dagegen wird ein ähnlich strukturiertes Emissionsprofil erhalten wie für die übrigen πq -Komplexe, wobei die Emission um etwa 30 nm energiereicher ist als in Wasser. Diese Befunde sind ein Hinweis darauf, dass im Fall von **13** und **14** mehrere Faktoren die Emissionseigenschaften in wässriger Lösung beeinflussen. Am wahrscheinlichsten ist erneut das Vorhandensein bzw. Fehlen von Wasserstoffbrückenbindungen, da Amidgruppen sowohl Akzeptoren als auch Donoren für derartige Wechselwirkungen sein können.

Bei Koordination von bzq als cyclometallisierenden Liganden werden Farbstoffe mit sehr ähnlichen Emissionseigenschaften erhalten wie für die korrespondierenden ppy -Komplexe beschrieben. Auch die Verbindungen **17–20** und **23** weisen eine um 10–80 nm energieärmere Emission in Wasser auf als die entsprechende Referenzverbindung **16*** mit einer maximalen bathochromen Verschiebung bei den Komplexen **17** und **19**. Die Quantenausbeuten für wässrige Komplexlösungen liegen in der gleichen Größenordnung wie diejenigen der synthetisierten ppy -Verbindungen sowie die Werte literaturbekannter Verbindungen mit ähnlicher Struktur (vgl. Tabelle 3.4).^[33,104] Das breite, strukturlose Emissionsprofil lässt darauf schließen, dass der angeregte Zustand der bzq -Komplexe vorwiegend 3MLCT -Charakter ($d\pi(Ir) \rightarrow \pi^*(N^{\wedge}N)$) aufweist. In Acetonitril tritt bei der aldehydfunktionalisierten Verbindung **17** eine hypsochrome Verschiebung um 20 nm auf, während die Komplexe mit Amin- oder Amidsubstituenten eine energieärmere Emission (5–30 nm) aufweisen als in Wasser. Ähnlich wie bei den ppy -Komplexen wird auch bei den bzq -Komplexen ein leicht strukturiertes Emissionsprofil in Acetonitril beobachtet (vgl. Abbildung 3.9).

Tabelle 3.4: Emissionsmaxima und Emissionsquantenausbeuten Φ (H₂O) der Verbindungen **7–23** (5 μ M, H₂O bzw. MeCN, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 290–350 nm, U_D = 730 V)

Verbindung	Emissionsmaximum [nm]		Φ (H ₂ O)
	H ₂ O	MeCN	
7*	598	590	0,118
8*	610	592	0,034
9	660	634	0,006
10	665	645	0,008
11	620	616	0,052
12	594, 624	594, 630	0,249
13	644	600, 622	0,020
14	648	620, 656	0,027
15	594, 625	592, 628	0,097
16	595	596	0,068
17	620	598	0,020
18	604	632	0,012
19	673	#	0,005
20a	605	610	0,077
20b	605	602	0,063
21a	602	602	0,129
21b	602	602	0,115
22	594, 624	591, 624	0,417
23	606	614	0,118

Emission wurde nicht gemessen.

Durch Vergleich der Emissionseigenschaften der hergestellten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe hat sich gezeigt, dass diese sowohl von der Natur des cyclometallisierenden Liganden C^N als auch von den Substituenten des Diiminliganden N^N beeinflusst werden. Tabelle 3.4 führt alle relevanten Emissionsmaxima in Wasser und in Acetonitril sowie die ermittelten Emissionsquantenausbeuten für wässrige Farbstofflösungen auf. Die Anregungs- und Emissionsspektren der Verbindungen **9–11**, **13–15** sowie **18–23** in wässriger Lösung und in Acetonitril sind im Anhang dargestellt.

Bestimmung der pK_s -Werte mittels pH-Titration

Analog zu den Bipyridinliganden **4–6** sollten auch die synthetisierten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe **9–11**, **13–15** und **18–23** in wässriger Lösung als mehrfach positiv geladene Spezies vorliegen. Dabei sind je nach Substituenten und Protonierungsgrad bei pH 7 Ladungen im Bereich von +1 bis +9 möglich. Um diesbezüglich nähere Informationen zu erhalten, wurden die Emissionseigenschaften der Komplexe in Abhängigkeit vom pH-Wert analysiert. Lediglich für Verbindung **19** wurden aufgrund von Substanzmangel keine pH-abhängigen Untersuchungen durchgeführt.

Alle Komplexe weisen eine ausgeprägte Intensitätszunahme der Emission mit steigendem pH-Wert auf, wobei diese bei den aminfunktionalisierten Verbindungen **11**, **20–21** sowie **23** zusätzlich bei um 20–35 nm höherer Energie erfolgt. Abbildung 3.10 veranschaulicht dies links am Beispiel von Komplex **11**. Durch Auftragung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum gegen den pH-Wert wurden charakteristische Titrationskurven erhalten, wie sie in Abbildung 3.10 rechts für **11** gezeigt ist. Es liegen jeweils mehrere Wendepunkte entsprechend der Anzahl vorhandener Aminogruppen vor, so dass es möglich war, die pK_s -Werte der einzelnen Protonierungsstufen abzuschätzen. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Ebenfalls in Abbildung 3.10 rechts gezeigt ist eine Auftragung der Wellenlänge des jeweiligen Emissionsmaximums gegen den pH-Wert für Verbindung **11**. Es ergibt sich eine zur Titrationskurve gegenläufige Kurve mit einem Wendepunkt, welcher etwa im gleichen pH-Bereich auftritt wie der erste Wendepunkt der Titrationskurve. Somit lässt sich die pH-Abhängigkeit der Emission der aminfunktionalisierten Komplexe nicht nur über die Änderungen der Intensität verfolgen, sondern auch über die Änderungen der Wellenlänge des Emissionsmaximums. Es ist davon auszugehen, dass auch die Lebensdauer des angeregten Zustandes vom pH-Wert der Lösung beeinflusst wird. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine Untersuchungen durchgeführt.

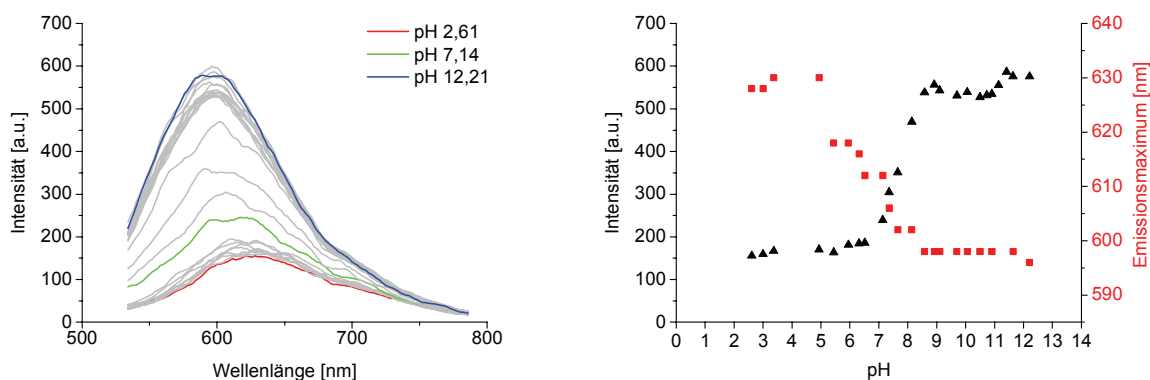


Abbildung 3.10: pH-Abhängigkeit der Emission von **11**. Links: Emissionsspektren für pH-Werte im Bereich 2,61–12,21; rechts: Auftragung von Wellenlänge (rot) und Intensität (schwarz) des Emissionsmaximums gegen den pH-Wert. Die pH-Werte wurden durch Zugabe von verdünnter Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt (10 μ M **11**, 100 mM NaCl, H₂O, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 305 nm, U_D = 900 V).

In der Literatur finden sich nur wenige Beispiele einer systematischen Analyse der photo-physikalischen Eigenschaften von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen in Abhängigkeit vom pH-Wert.^[36,37] Allerdings wurden bereits mehrere strukturell ähnliche Ruthenium(II)-Komplexe in dieser Hinsicht untersucht.^[95,105–109] LAKOWICZ *et al.* haben ein ähnliches pH-abhängiges Lumineszenzverhalten beschrieben wie es im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde.^[106] Die starke Abnahme der Emissionsintensität bei sinkendem pH-Wert wurde mit einer Protonierung der Aminogruppen erklärt, welche eine Erhöhung der π -Akzeptorfähigkeit des Diiminliganden bedingt. Dies wiederum bewirkt eine Stabilisierung des emittierenden ³MLCT-Zustandes, sodass die Emission gemäß dem Energielückengesetz bei niedrigerer Energie und mit geringerer Intensität erfolgt. BEER *et al.*^[95] sowie GRIGG *et al.*^[105] sind in Bezug auf die von ihnen synthetisierten Ruthenium(II)-Komplexe zudem der Ansicht, dass durch die enge räumliche Nachbarschaft der protonierten Aminogruppen zum ebenfalls positiv geladenen π -Zentrum im angeregten Zustand eine reversible Spaltung einer der vorhandenen π -N-Bindungen induziert werden kann. Dies wäre auch bei den im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Iridium(III)-Komplexen möglich und würde ebenfalls in einer Löschung der Emission im sauren pH-Bereich resultieren.

Tabelle 3.5: Experimentell ermittelte pK_S -Werte für die Komplexe **9–11**, **13–15**, **18** und **20–23**.

Verbindung	pK_{S1}	pK_{S2}	pK_{S3}	pK_{S4}
9	9,0			
10	11,5	10,3	8,2	
11	11,2	7,6		
13	10,2			
14	11,8	9,6	7,5	
15	11,0	7,1		
18	9,7			
20a	11,1	8,2		
20b	11,5	7,9		
21a	11,4	9,8	7,8	6,0
21b	11,6	9,0	8,0	6,3
22	11,9	7,8	7,0	5,6
23	11,5	8,6	7,2	6,1

Aus den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen lässt sich zusammenfassend schließen, dass alle hergestellten Komplexe in wässriger Lösung mehrfach protoniert vorliegen. Anhand der ermittelten pK_S -Werte ist für die Komplexe **9**, **13**, **18** und **20b** eine Ladung von +3 bei pH 7 anzunehmen. Der unsymmetrisch substituierte Komplex **21b** weist eine Ladung von +4 bei neutralem pH auf, während die Komplexe **11**, **15** und **20a** mit einer

Gesamtladung von +5 vorliegen sollten. Die sperminfunktionalisierten Verbindungen **10**, **14**, **21a** und **23** haben die höchste positive Ladung von +7 bei pH 7. Bei Komplex **22** kann nicht sicher ermittelt werden, welche Gesamtladung bei neutralem pH vorliegt, da die entscheidende Protonierungsstufe einen pK_s -Wert nahe 7 aufweist. Somit kann **22** entweder fünf-, sechs- oder siebenfach positiv geladen sein.

3.1.4 Strukturelle Charakterisierung von Komplex **8***

Kristallisation bei Raumtemperatur aus Dichlormethan mit eindiffundierendem Diethylether lieferte im Fall von Komplex **8*** innerhalb weniger Tage dunkelrote, nadelförmige Kristalle mit ausreichender Qualität für eine Röntgenstrukturanalyse. Abbildung 3.11 zeigt die Molekülstruktur des Komplexkations. Die Verbindung **8*** kristallisiert in der orthorhombischen Raumgruppe Pbcn. Da es sich um eine chirale Verbindung handelt, liegt neben dem in Abbildung 3.11 gezeigten Enantiomer im Kristall auch die entsprechende spiegelbildliche Form vor, das Verhältnis beider Enantiomere zueinander beträgt 1:1 (Racemat).

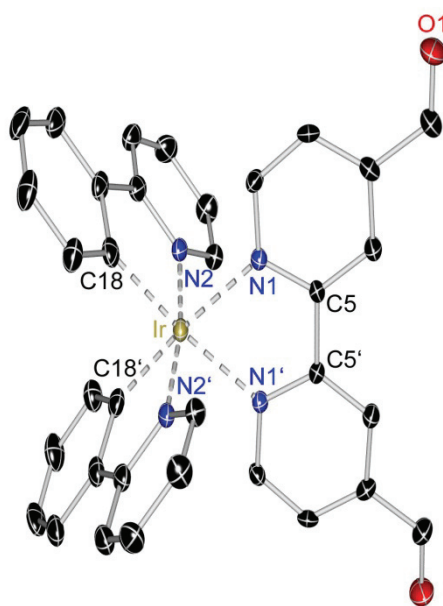


Abbildung 3.11: ORTEP Darstellung des Komplexkations von **8***. Die Ellipsoide geben eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 50 % wieder. Wasserstoffatome sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Das Iridiumatom wird durch die drei Liganden in einer verzerrt oktaedrischen Anordnung koordiniert. Die *trans*-Winkel betragen $171,2(2)$ – $173,73(17)^\circ$. Die cyclometallisierenden Kohlenstoffatome der 2-Phenylpyridinliganden liegen in *cis*-Orientierung zueinander vor. Die beobachtete Verlängerung der Ir–N-Bindungen zum Diiminliganden gegenüber den Ir–N-Bindungen zu den cyclometallisierenden Liganden ($2,141(4)$ Å gegenüber $2,044(4)$ Å) ist ein starkes Indiz für einen vorliegenden *trans*-Effekt der Kohlenstoffdonoratome der C^N-Liganden. Auffällig ist weiterhin der größere Bisswinkel für die cyclometallisierenden Liganden im Vergleich zu den Diiminliganden ($80,47(17)^\circ$ für 2-Phenylpyridin und $76,55(19)^\circ$ für 2,2'-Bi-

pyridin). Tabelle 3.6 listet ausgewählte Bindungslängen und -winkel auf. Die experimentell gefundenen Werte stimmen gut mit Literaturwerten strukturell ähnlicher Verbindungen überein.^[27,31,110]

Tabelle 3.6: Ausgewählte Bindungslängen und -winkel für Komplex **8***.

Bindung	Länge [Å]	Bindung	Winkel [°]
Ir–C18	2,012(5)	C18–Ir–C18'	89,1(3)
Ir–N1	2,141(4)	C18–Ir–N1	97,2(2)
Ir–N2	2,044(4)	C18–Ir–N1'	173,7(2)
		C18–Ir–N2	80,5(2)
		C18–Ir–N2'	93,2(2)
		N1–Ir–N1'	76,6(2)
		N1–Ir–N2	87,5(1)
		N1–Ir–N2'	99,4(1)
		N2–Ir–N2'	171,2(2)

Die Funktionalisierung des Bipyridinliganden mit Aldehydgruppen in 4,4'-Position bedingt eine hohe Molekülsymmetrie. Wie anhand von Abbildung 3.11 ersichtlich wird, weist die Komplexkation eine C_2 -Punktsymmetrie auf. Die C_2 -Achse verläuft senkrecht zur C5–C5'-Bindung und durch das Iridiumatom und bildet jeweils die beiden Pyridinringe des Bipyridinliganden sowie die cyclometallisierenden Liganden aufeinander ab.

3.2 Wechselwirkung der Komplexe mit Glykosaminoglykanen und anderen sulfatierten Polysacchariden

Die Eigenschaften der synthetisierten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe gegenüber der Detektion von Glykosaminoglykanen (GAG) und anderen hochsulfatierten Polysacchariden wurden analysiert. Durch Variation der eingesetzten Iridium(III)-Komplexe bei gleichbleibendem Analyt einerseits und die Verwendung unterschiedlicher Analyte andererseits konnten allgemeine Struktur-Bindungs-Beziehungen ermittelt werden. Diese Erkenntnisse wurden anschließend genutzt, um einen optimierten Nachweis einzelner GAG in biologischen Medien sowie verschiedener GAG nebeneinander zu entwickeln.

3.2.1 Abhängigkeit der Wechselwirkung von Struktur und Ladung der Iridium(III)-Komplexe

Um einen ersten Überblick über das Potential der neuen Farbstoffe als Sensoren für GAG zu erhalten, wurden zunächst alle Komplexe hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit unfraktioniertem Heparin (UFH) in wässriger Lösung bei pH 7 untersucht. Dazu wurden die jeweiligen Farbstoffe vorgelegt und UFH schrittweise in kleinen Mengen zugegeben. Zu Beginn sowie nach jeder Zugabe wurde ein Emissionsspektrum aufgenommen und die Änderung der Emissionseigenschaften verfolgt. Es wurde solange UFH zugegeben, bis keine signifikanten Änderungen der Emission mehr zu beobachten waren.

Es hat sich gezeigt, dass die Lumineszenzeigenschaften aller Iridium(III)-Komplexe durch UFH beeinflusst werden. In Abbildung 3.12 sind beispielhaft die Änderungen der Emission von **10** und **22** bei Heparinzugabe gezeigt. Im Fall der ppy- und bzq-Komplexe wurde im Allgemeinen ein Anstieg der Emissionsintensität, häufig begleitet von einer hypsochromen Verschiebung des Emissionsmaximums, beobachtet (vgl. Abbildung 3.12 links). Die Referenzverbindungen **7*** und **16*** sowie die aldehydfunktionalisierten Verbindungen **8*** und **17** wiesen erwartungsgemäß nur geringe Änderungen auf. Dagegen trat bei den piq-Komplexen mit Ausnahme der Komplexe **13** und **14** eine Lumineszenzlöschung auf (vgl. Abbildung 3.12 rechts). Diese Unterschiede deuten bereits darauf hin, dass mehrere Faktoren Einfluss auf das Lumineszenzverhalten der Komplexe in Anwesenheit des Analyten haben. Um diesbezüglich mit möglichst geringem Aufwand aussagekräftige Erkenntnisse zu gewinnen, wurden im Folgenden einige ausgewählte Iridium(III)-Komplexe näher untersucht. Im Einzelnen waren dies die ppy-Komplexe **9–11** sowie **21a** und **21b**, die piq-Komplexe **14** und **22** sowie der bzq-Komplex **23**. Diese Auswahl erlaubt die Untersuchung einer Vielzahl von Parametern, die in den folgenden Abschnitten ausführlicher diskutiert werden.

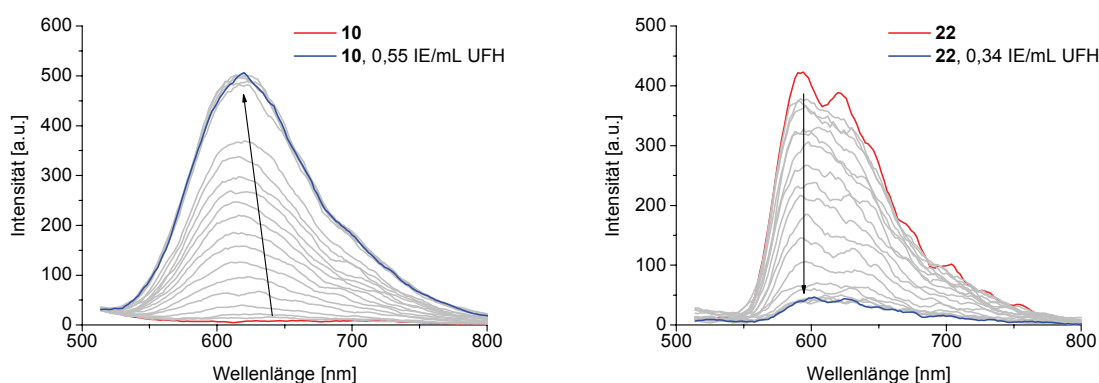


Abbildung 3.12: Änderung der Emission von **10** (links) und **22** (rechts) bei Zugabe von UFH (1 μM Farbstoff, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–55 IE/mL (**10**) bzw. 0–34 IE/mL (**22**) UFH, $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{anr.}} = 305\text{ nm}$, $U_{\text{D}} = 870\text{ V}$ (**10**) bzw. 800 V (**22**)).

Einfluss der Komplexladung auf die Bindungsaffinität und -stöchiometrie

Die Gruppe der ppy-Komplexe umfasst Verbindungen, welche bei pH 7 eine Ladung von +3 (**9**), +4 (**21b**), +5 (**11**) bzw. +7 (**10**, **21a**) aufweisen (vgl. Kapitel 3.1.3). Sie eignet sich daher besonders gut für eine Untersuchung der Wechselwirkungen der Komplexe mit UFH in Abhängigkeit von der positiven Gesamtladung der Sonden. Zunächst wurden die genannten ppy-Komplexe mit Heparin titriert, indem wie oben beschrieben schrittweise UFH zu der jeweiligen Komplexlösung zugegeben und die Änderung der Emission verfolgt wurde. Bei Zugabe von UFH ist bei allen Verbindungen ein deutlicher Anstieg der Intensität sowie eine Verschiebung des Emissionsmaximums zu niedrigeren Wellenlängen (15–45 nm) zu beobachten (vgl. Abbildung 3.12 links). Eine Auftragung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum gegen die Konzentration an UFH liefert die in Abbildung 3.13 dargestellten Titrationskurven. Die Konzentration von UFH wird hierbei statt in internationalen Einheiten (IE/mL) in Einheiten von μM Disaccharid ($\mu\text{M ds}$) angegeben, um einzelne Messungen besser miteinander vergleichen zu können. Als Molmasse für UFH wurden $665 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pro Disaccharideinheit^[83] zugrunde gelegt (vgl. Tabelle 5.2).

Wie anhand der in Abbildung 3.13 gezeigten Kurven ersichtlich wird, tritt in allen Fällen ein deutlicher Anstieg der Emissionsintensität bei Zugabe von UFH auf. Nach dieser anfänglichen Intensitätszunahme wird ab einer bestimmten UFH-Konzentration eine Sättigung erreicht, d. h. es treten keine weiteren Änderungen der Emissionsintensität bei Heparinzugabe auf. Die maximale Intensitätszunahme (vgl. Tabelle 3.7) ist von Komplex zu Komplex unterschiedlich.

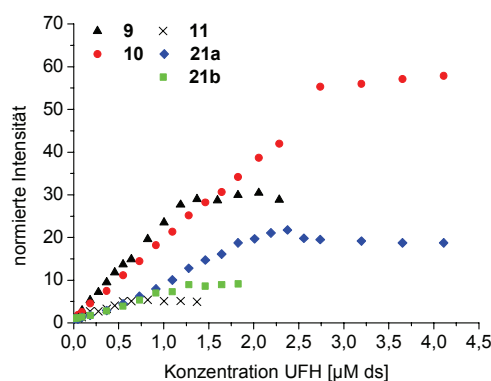


Abbildung 3.13: Änderung der Intensität am jeweiligen Emissionsmaximum bei Zugabe von UFH für **9–11**, **21a** und **21b** (1 μM Farbstoff, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–4,1 $\mu\text{M ds}$ UFH, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{anr.}} = 305 \text{ nm}$, $U_D = 960 \text{ V}$ (**9**, **11**), 870 V (**10**) bzw. 750 V (**21a**, **21b**)). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde jeweils auf 1 normiert.

Aus der Lage der Sättigungspunkte lässt sich die Bindungsstöchiometrie, also die Anzahl der pro Iridium(III)-Komplex gebundenen Zuckereinheiten, bestimmen (vgl. Tabelle 3.7). Die Zahl gebundener Zuckermoleküle sollte mit steigender Komplexladung zunehmen, sofern elektrostatische Wechselwirkungen einen großen Einfluss auf die Bindung der Farbstoffe an UFH haben.^[74b] Weiterhin erlaubt die Kenntnis der jeweiligen positiven Ladungen der Komplexe sowie der bekannten negativen Ladung von $-3,4$ pro Disaccharid UFH (vgl. Tabelle 1.1) die

Bestimmung des Verhältnisses von positiver und negativer Ladung am Sättigungspunkt (siehe Tabelle 3.7). Im Fall, dass vorwiegend elektrostatische Wechselwirkungen die Bindung der Sonde an das Analytmolekül bewirken, sollte am Sättigungspunkt eine Ladungskompensation vorliegen und für dieses Verhältnis ein Wert von etwa 1 erhalten werden.

Tabelle 3.7: Bindungsstöchiometrie sowie Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt bei Zugabe von UFH zu den ppy-Komplexen **9–11**, **21a** und **21b**.

Verbindung	Komplexladung	Bindungsstöchiometrie Zucker/Farbstoffmolekül (Sättigungspunkt)	Verhältnis pos./neg. Ladung (Sättigungspunkt)
9	+3	2,44	0,72
10	+7	5,92	0,70
21b	+4	2,58	0,91
11	+5	1,20	2,45
21a	+7	4,62	0,89

Die in Tabelle 3.7 aufgelisteten Werte zeigen, dass umso mehr Zuckermoleküle pro Farbstoffmolekül gebunden werden, je höher die positive Gesamtladung des jeweiligen Komplexes ist. Daraus resultierend werden mit Ausnahme von Komplex **11** für das Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt Werte nahe 1 erhalten. Die deutliche Abweichung im Fall von Verbindung **11** deutet darauf hin, dass dieser Iridium(III)-Komplex möglicherweise eine niedrigere positive Gesamtladung aufweist als aufgrund der pK_S -Werte (vgl. Tabelle 3.5) erwartet.

Ein Maß für die Bindungsaffinität ist die so genannte limitierende Salzkonzentration (engl. *limiting salt concentration*, LSC). Dieser Begriff wurde unter anderem von POWER *et al.* im Zusammenhang mit Heparin geprägt.^[111] Die LSC ist definiert als die Menge an Natriumchlorid, die benötigt wird, um die Bindung von Heparin an ATIII, Protamin oder Poly(L-lysin) vollständig zu lösen. In Anlehnung an diese allgemeine Definition wurde im Rahmen dieser Arbeit für einen qualitativen Vergleich der Bindungsaffinitäten die Menge an Natriumchlorid bestimmt, welche 50 % der gebundenen Komplexmoleküle aus der Bindung an den Analyten verdrängt. Diese Konzentration ließ sich besser experimentell bestimmen und wird im Folgenden mit HDSC (engl. *half-displacing salt concentration*) bezeichnet. Zur Bestimmung der HDSC wurde ein Gemisch aus dem jeweiligen Farbstoff mit der entsprechenden Menge an UFH, die zur Sättigung benötigt wird, vorgelegt und schrittweise Natriumchlorid zugegeben. Zu Beginn sowie nach jeder Zugabe wurde ein Emissionsspektrum aufgenommen. Um Verdünnungseffekte sowie eine eventuelle Beeinflussung der Farbstoffemission durch die zugegebenen Chloridionen zu berücksichtigen, wurden auch jeweils die entsprechenden Volumenäquivalente an Natriumchloridlösung zu einer weiteren Komplexlösung ohne Heparin gegeben und die Emission bei Zugabe verfolgt. Die gemessenen Werte wurden als Referenzwerte von den jeweiligen Spektren der Farbstoff-Heparin-Mischungen subtrahiert.

Es hat sich gezeigt, dass die bei Zugabe von UFH auftretende Intensitätssteigerung reversibel ist. Abbildung 3.14 veranschaulicht dies links am Beispiel von Komplex **21b**. Aus den erhaltenen Emissionsspektren wurde der Anteil an gebundenem Komplex berechnet. Hierzu wurde die jeweilige Intensität am Emissionsmaximum bestimmt und die prozentuale Abnahme relativ zur Intensität vor Natriumchloridzugabe ermittelt. Dabei wurde die Annahme gemacht, dass am Sättigungspunkt 100 % aller Farbstoffmoleküle an das Zielmolekül gebunden sind. Die Abnahme der korrigierten Intensität hängt linear mit der Zahl freigesetzter Farbstoffmoleküle zusammen. Das Verhältnis der Intensität ($I_{\text{korr.}}$) zur Anfangsintensität vor Zugabe ($I_{0,\text{korr.}}$) gibt daher direkt die Menge an gebundenem Komplex wieder. Die so erhaltenen Werte wurden logarithmisch gegen die Natriumchloridkonzentration aufgetragen, sodass die in Abbildung 3.14 rechts gezeigten Kurven erhalten wurden. Die aus den Graphen abgelesenen HDSC sind in Tabelle 3.8 aufgelistet.

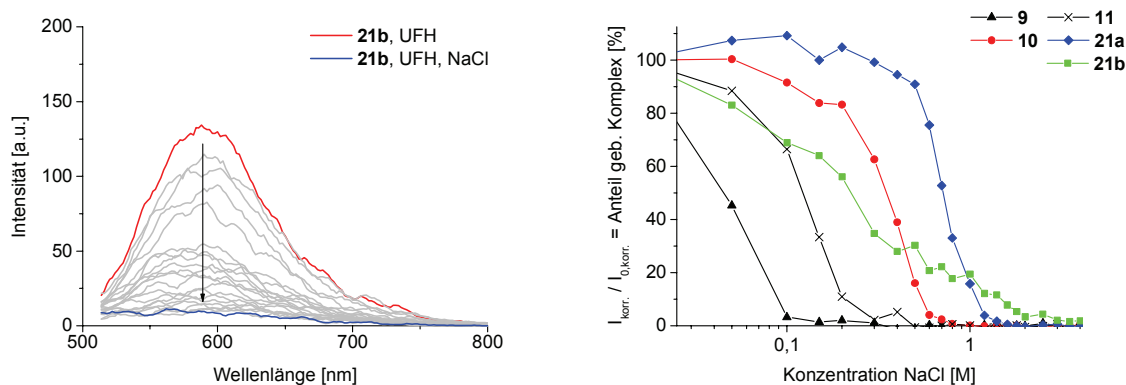


Abbildung 3.14: Bestimmung der HDSC für die Bindung von **9–11**, **21a** und **21b** an UFH. Links: Änderung der Emission von **21b** in Gegenwart von UFH bei Zugabe von NaCl; rechts: Anteil an gebundenem Komplex bei Zugabe von NaCl (1 μM Farbstoff, 1,2 μM ds (**9**), 2,9 μM ds (**10**), 0,6 μM ds (**11**), 2,3 μM ds (**21a**) bzw. 1,3 μM ds (**21b**) UFH, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–4 M NaCl, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 305 nm, U_{D} = 960 V (**9**, **11**), 870 V (**10**) bzw. 750 V (**21a**, **21b**)).

Tabelle 3.8: Ermittelte HDSC für die Bindung von **9–11**, **21a** und **21b** (gruppiert nach amin- und amidfunktionalisierten Komplexen) an UFH.

Verbindung	Komplexladung	HDSC [M]
9	+3	0,052
10	+7	0,326
21b	+4	0,228
11	+5	0,122
21a	+7	0,704

Beim Vergleich der erhaltenen HDSC wird deutlich, dass die Affinität zum Analyten mit steigender Komplexladung zunimmt. Lediglich Komplex **11** fällt etwas aus dieser Reihe heraus,

was jedoch, wie bereits erwähnt, auf eine niedrigere positive Gesamtladung als angenommen hindeutet.

Eine quantitative Bestimmung der Bindungsaffinität wird durch die Komplexität der Bindung (mehrere Farbstoffmoleküle binden an ein Analytmolekül) sowie die strukturelle Heterogenität des Analyten erschwert. Die Stärke der Bindung der Iridium(III)-Komplexe an Heparin kann jedoch durch Ermittlung der HDSC qualitativ gut abgeschätzt werden. Dabei sollte beachtet werden, dass die in dieser Arbeit angegebenen Werte für die HDSC nicht als Absolutwerte zu verstehen sind, sondern ein Instrument für den qualitativen Vergleich der Wechselwirkungen verschiedener Farbstoffe mit unterschiedlichen Analyten darstellen. Wie aus Abbildung 3.14 rechts hervorgeht, war die in der oben diskutierten Messreihe zugegebene Menge an Natriumchlorid so gewählt, dass bereits nach der ersten Zugabe eine deutliche Veränderung der Emission zu beobachten war. Im Rahmen nachfolgender Experimente (vgl. die folgenden Abschnitte) wurde daher die Zugabemenge teils dahingehend verändert, dass mit einer niedrigeren Salzkonzentration gestartet wurde. Die Werte für die Wechselwirkung mit UFH (s. Tabelle 3.8, Tabelle 3.9 und Tabelle 3.10) wurden mit diesen modifizierten Bedingungen mehrfach bestimmt. Dabei hat sich gezeigt, dass die ermittelten HDSC-Werte eine Abweichung von bis zu 20 % voneinander aufweisen. Dies kann mehrere Gründe haben. Da bei einer Erhöhung der Titrationsschritte bei gleichbleibender Endkonzentration an Natriumchlorid mehr Zeit benötigt wird, um die Messreihe durchzuführen, können langsame Umwandlungsprozesse eine Rolle spielen. Auch eine Adsorption von Farbstoffmolekülen bzw. Farbstoff-Analyt-Komplexen an die Küvettenoberfläche ist bei längerer Messdauer denkbar. Die anhand der ermittelten HDSC-Werte abgeleiteten allgemeinen Trends sind jedoch von den gewählten Messbedingungen unabhängig, weshalb die HDSC gemeinsam mit der Anfangssteigung als qualitatives Maß für die Bindungsaffinität herangezogen werden kann. Dabei muss jedoch darauf geachtet werden, dass diejenigen Werte, die für einen direkten Vergleich genutzt werden, unter identischen Bedingungen bestimmt werden.

Einfluss der Ligandstruktur auf die Wechselwirkung mit Analyten

Zusätzlich zur elektrostatischen Wechselwirkung (vgl. vorheriger Abschnitt) können auch strukturelle Unterschiede der Liganden die Affinität der synthetisierten Iridium(III)-Komplexe zu den Analyten beeinflussen. Daher wurden im Weiteren die Wechselwirkungen der Komplexe mit UFH in Abhängigkeit der Substituenten des Diiminliganden untersucht. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die unterschiedliche Art der Anknüpfung an das Bipyridingrundgerüst gelegt (Amin- oder Amidbindung). Die erhaltenen Titrationskurven für die ppy-Komplexe wurden bereits in Abbildung 3.13 gezeigt und diskutiert. Abbildung 3.15 stellt die entsprechenden Titrationskurven für den aminfunktionalisierten piq-Komplex **22** (links) und den analogen amidfunktionalisierten Komplex **14** (rechts) dar.

Trotz ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit weisen diese beiden Iridium(III)-Komplexe ein gänzlich unterschiedliches Verhalten bei Zugabe von Heparin auf. Bei Verbindung **14** ist analog zu den bereits besprochenen ppy-Komplexen bei UFH-Zugabe ein signifikanter Anstieg der Emissionsintensität verbunden mit einer charakteristischen hypsochromen Verschiebung des Emissionsmaximums zu beobachten (vgl. Abbildung 3.15 links). Dagegen wird die Emission von **22** bei Zugabe des Analyten fast vollständig gelöscht (vgl. Abbildung 3.15 rechts). In beiden Fällen wird ein Sättigungspunkt erreicht, an welchem nahezu eine Ladungskompensation erreicht ist (Verhältnis positiver zu negativer Ladung = 0,79 (**14**) bzw. 0,93 (**22**)).

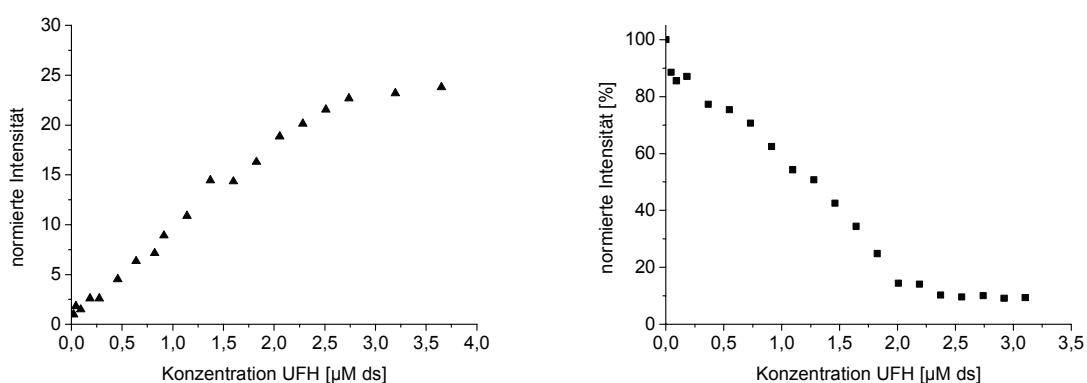


Abbildung 3.15: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von **14** (links) und **22** (rechts) bei Zugabe von UFH (1 μM Farbstoff, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–4 $\mu\text{M ds}$ UFH, $T = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{anr.}} = 310\text{ nm}$ (**14**) bzw. 305 nm (**22**), $U_D = 850\text{ V}$ (**14**) bzw. 800 V (**22**)). Die Intensität vor Zugabe von UFH wurde auf 1 (**14**) bzw. 100% (**22**) normiert.

Die relativen Affinitäten der Komplexe **14** und **22** zu dem Analyten UFH wurden untersucht, indem analog zu den ppy-Komplexen die HDSC bestimmt wurde. Aus der jeweiligen Auftragung des Anteils an gebundenem Komplex gegen die Natriumchloridkonzentration (siehe Anhang) wurden die in Tabelle 3.9 angegebenen Werte erhalten. Ein Vergleich der jeweiligen HDSC der Verbindungen **10**, **14**, **21a** und **22** zeigt, dass bei gleichbleibender positiver Gesamtladung der Komplexe im Fall der ppy-Komplexe eine höhere Affinität zum Zielmolekül vorliegt, wenn der jeweilige Substituent (Spermin) über eine Amingruppe an den Diiminliganden gekoppelt ist. Bei den piq-Komplexen verhält es sich umgekehrt. Auffällig ist außerdem die größere hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums bei Vorliegen einer Amidgruppe (vgl. Tabelle 3.9).

Die beobachteten Änderungen der Emissionseigenschaften der Iridium(III)-Komplexe bei Zugabe von UFH resultieren aus einer Änderung der lokalen Umgebung der Farbstoffmoleküle. Die Bindung an UFH reduziert die Wechselwirkung mit Lösungsmittelmolekülen, was in einer intensiveren energiereicheren Lumineszenz resultiert (vgl. hierzu auch die Erläuterungen in Kapitel 3.1.3).^[29] Die Beobachtung, dass die amidfunktionalisierten Iridium(III)-Komplexe **10** und **14** sensitiver auf Veränderungen der lokalen Umgebung reagieren als die analogen aminfunktionalisierten Verbindungen **21a** und **22** lässt sich auf den elektronenziehenden Charakter der Amidgruppe zurückführen (vgl. Kapitel 3.1.3). Zusätzlich besteht die

Möglichkeit, dass bei Bindung an das Analytmolekül der Anteil strahlungsloser Deaktivierungsprozesse abnimmt.^[33,112]

Tabelle 3.9: Hypsochrome Verschiebung bei Zugabe von UFH sowie ermittelte HDSC für die Bindung von **10**, **14**, **21a** und **22** an UFH.

	Substituent	Verbindung	Verschiebung $\Delta\lambda_{em}$ [nm]	HDSC [M]
ppy	Amid	10	46	0,326
	Amin	21a	28	0,704
piq	Amid	14	48	0,844
	Amin	22	-	0,368

Theoretische Berechnungen für die Wechselwirkung von strukturell ähnlichen Poly(pyridyl)-iridium(III)-Komplexen mit Biomolekülen haben außerdem gezeigt, dass bei Bindung an das Zielmolekül die energetische Reihenfolge der angeregten Zustände verändert werden kann.^[28] Infolgedessen kann die Emission z. B. aus einem Zustand erfolgen, welcher sensitiver auf Änderungen der lokalen Umgebung reagiert.^[29] Vermutlich beruht das gegensätzliche Verhalten der Komplexe **14** und **22** bei Bindung an UFH auf einer Kombination mehrerer dieser Faktoren. Die genauen Ursachen für die signifikant unterschiedlichen Emissionseigenschaften dieser beiden Verbindungen in Gegenwart eines Analyten konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geklärt werden.

Um den Einfluss des cyclometallisierenden Liganden auf die Wechselwirkung mit Heparin zu analysieren, wurde der bzq-Komplex **23** analog zu den Verbindungen **21a** und **22** mit UFH titriert. Die erhaltene Titrationskurve zeigt Abbildung 3.16. Auffällig ist der deutlich geringere Intensitätsanstieg verglichen mit **21a** (vgl. Abbildung 3.13). Das Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt (0,76) weist wieder auf eine Ladungskompensation hin. Durch Zugabe von Natriumchlorid zu einer Lösung von **23** und UFH wurde auch für diese Wechselwirkung die HDSC bestimmt (vgl. Anhang). Ein Vergleich der HDSC von **21a**, **22** und **23** (siehe Tabelle 3.10) zeigt, dass in dieser Reihe der ppy-Komplex **21a** die höchste Bindungsaffinität zu UFH aufweist, gefolgt von der bzq-Verbindung **23**. Der piq-Komplex **22** weist ein gänzlich anderes Emissionsverhalten bei Heparinzugabe auf als die strukturell vergleichbaren Verbindungen **21a** und **23**.

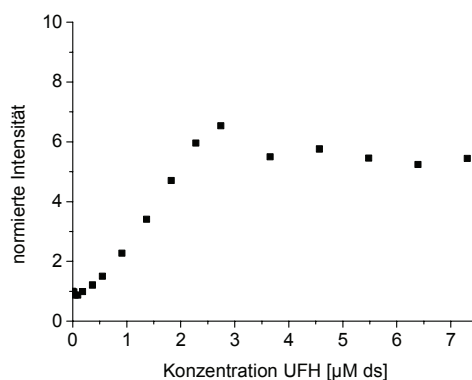


Abbildung 3.16: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von **23** bei Zugabe von UFH (1 µM **23**, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–7,3 µM ds UFH, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 310 nm, U_D = 750 V). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 normiert.

Tabelle 3.10: Anfangssteigung bei Zugabe von UFH sowie ermittelte HDSC für die Bindung von **21a**, **22** und **23** an UFH.

Verbindung	HDSC [M]
21a (ppy)	0,704
22 (piq)	0,368
23 (bzq)	0,650

Aus diesen experimentellen Befunden lässt sich zusammenfassend schlussfolgern, dass die Affinität der synthetisierten Iridium(III)-Komplexe zu UFH sowohl von der Struktur des cyclometallisierenden Liganden als auch von der Art der Substituenten und der positiven Gesamtladung der Sonden beeinflusst wird. Insbesondere die stark positiv geladenen Komplexe **10**, **14**, **21a** und **22** weisen eine hohe Bindungsaffinität zu UFH sowie große Änderungen ihrer Emissionseigenschaften in Anwesenheit des Analyten auf. Bei der bzq-Verbindung **23** dagegen wird nur eine geringere Änderung der Emission bei Zugabe des Analyten beobachtet.

3.2.2 Abhängigkeit der Wechselwirkung von Struktur und Ladung des Analyten

In Kapitel 1.2 wurde auf die große Heterogenität der Glykosaminoglykane hinsichtlich molekularer Masse, Sulfatierungsgrad und daraus resultierender negativer Ladungsdichte hingewiesen. Aufgrund dieser Unterschiede ist davon auszugehen, dass die Wechselwirkung der synthetisierten Iridium(III)-Komplexe mit dieser Gruppe von Biomolekülen nicht nur durch die Eigenschaften der Sonden beeinflusst wird. Auch die Struktur und Ladung der Analyten kann entscheidenden Einfluss auf die Bindungsaffinität nehmen. Daher wurden zusätzlich zu

den in Kapitel 3.2.1 diskutierten Untersuchungen weitere Experimente durchgeführt, in deren Verlauf die eingesetzten Analyten variiert wurden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden vor allem Iridium(III)-Komplexe mit hoher positiver Ladung verwendet, da diese – wie in Kapitel 3.2.1 gezeigt – eine hohe Affinität zu Heparin aufweisen.

Einfluss der Kettenlänge auf die Bindungsaffinität

Ein wesentlicher struktureller Unterschied verschiedener GAG ist die variable Kettenlänge der Polysaccharidmoleküle. Um den Einfluss dieses Parameters auf die Wechselwirkung mit den iridiumbasierten Sonden zu analysieren, wurden die Änderungen der Lumineszenzeigenschaften der Komplexe **10**, **14**, **21a** und **22** in Gegenwart verschiedener Heparin-oligosaccharide unterschiedlicher Kettenlänge (HO-x mit x = Kettenlänge) verfolgt. Die Untersuchungen sollen an dieser Stelle beispielhaft anhand von Verbindung **14** diskutiert werden.

Bei Zugabe des jeweiligen HO-x (x = 6, 8, 10, 12, 14, 20 und 26) zu einer wässrigen Lösung von **14** ist in allen Fällen ein Anstieg der Emissionsintensität sowie eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums zu beobachten (vgl. Abbildung 3.17 links). Die erhaltenen Titrationskurven bei Auftragung der Intensität am jeweiligen Maximum gegen die Konzentration an HO-x sind in Abbildung 3.17 rechts dargestellt. Im Fall der längeren Polysaccharide (x ≥ 10) wird ähnlich wie bei der Zugabe von UFH (vgl. Kapitel 3.2.1) eine Sättigung mit konstanter Emissionsintensität beobachtet.

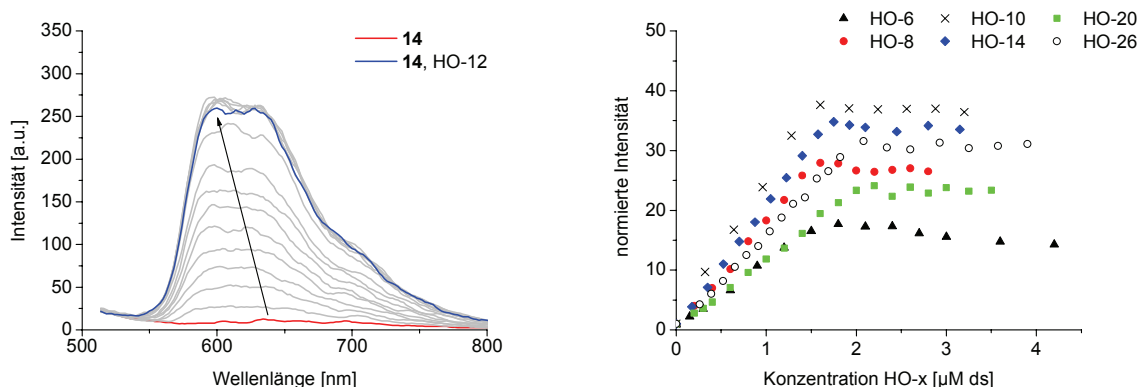


Abbildung 3.17: Änderung der Emission von **14** bei Zugabe verschiedener Heparin-oligosaccharide (1 µM **14**, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–4,2 µM ds HO-x, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 310 nm, U_D = 850 V). Links: Änderung der Emission bei Zugabe von HO-12. Rechts: Änderung der Emissionsintensität am Maximum bei Zugabe von HO-x (x = 6, 8, 10, 14, 20, 26). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde jeweils auf 1 normiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Änderungen bei Zugabe von HO-12 nicht dargestellt.

Dagegen nimmt die Intensität bei Zugabe des Hexasaccharids HO-6 und des Oktasaccharids HO-8 oberhalb des Sättigungspunktes wieder leicht ab (vgl. Abbildung 3.17 rechts). Diese Beobachtung gibt einen Hinweis darauf, dass zusätzlich zu den in Kapitel 3.2.1 erläuterten Umgebungseffekten auch kooperative Wechselwirkungen der Iridium(III)-Komplexe untereinander für den Intensitätsanstieg bei Zugabe eines Analyten verantwortlich sind. Die zunächst nur sehr schwach fluoreszierenden Iridium(III)-Komplexe erfahren eine

Verstärkung der Emissionsintensität bei Bindung an einen Analyten aufgrund der bereits diskutierten Gegebenheiten. Durch die räumliche Nähe einzelner Farbstoffmoleküle bei Bindung an denselben Polysaccharidstrang könnten intermolekulare Wechselwirkungen begünstigt werden, welche einen zusätzlichen Anstieg der Lumineszenzintensität bedingen. Die experimentellen Befunde legen den Schluss nahe, dass bei Zugabe langkettiger HO-x stabile Farbstoff-Analyt-Komplexe mit konstanter Emission gebildet werden, die auch mit einem Überschuss an Analyt stabil bleiben. Für kurze Ketten nimmt allerdings die Emissionsintensität bei Zugabe von weiterem Analyt ab. Dies deutet darauf hin, dass die Anlagerung mehrerer Komplexe an einen Heparinstrang zu Gunsten der Bildung vieler Systeme mit je einem Komplexmolekül pro Strang aufgegeben wird. Die Bindung eines Komplexes an einen freien Analyten scheint also günstiger zu sein, als die an einen bereits teilbelegten. Da auf diese Weise die kooperativen Wechselwirkungen aufgehoben werden, nimmt die zuvor gesteigerte Emissionsintensität der Sonden wieder ab. Abbildung 3.18 veranschaulicht dies anhand eines vereinfachten Schemas.

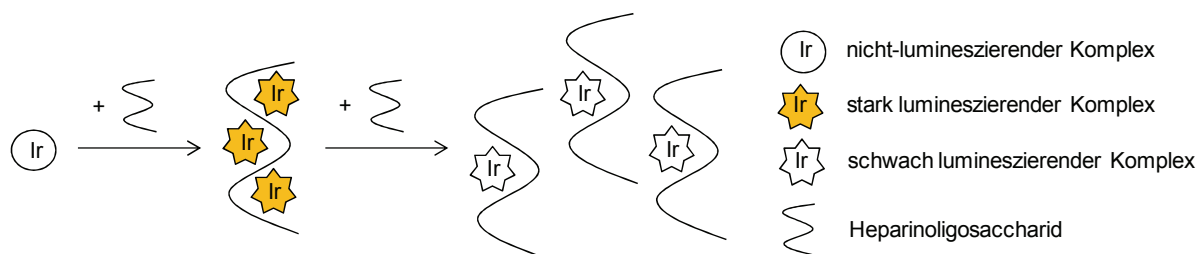


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung der postulierten Wechselwirkung von **14** mit kurz-kettigen Heparin-oligosacchariden.

Als qualitatives Maß für die Stärke der Bindung von **14** an die verschiedenen HO-x wurde abermals die HDSC bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.1). Aus einer Auftragung der ermittelten Werte gegen die Anzahl an Monosaccharidbausteinen des jeweiligen HO-x (siehe Abbildung 3.19) wird ersichtlich, dass mit zunehmender Kettenlänge die HDSC zunimmt. Dies bestätigt die oben geäußerte Vermutung, dass Komplex **14** stabile Bindungen zu länger-kettigen HO-x eingeht, während bei sehr kurzen Heparin-oligosacchariden eine Vereinzelung bei Zugabe von weiterem Analyt stattfinden kann.

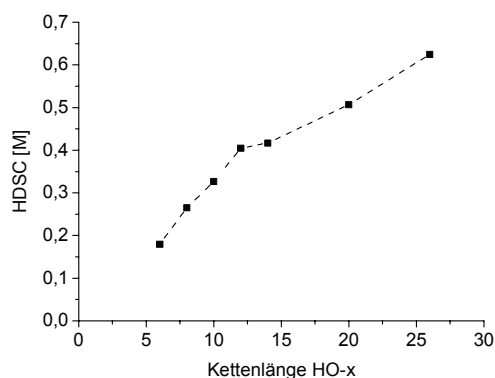


Abbildung 3.19: Auftragung der HDSC gegen die Kettenlänge für die Wechselwirkung von **14** mit verschiedenen Heparin-oligosacchariden.

Ähnlich wie bei den in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Untersuchungen zur Wechselwirkung der hergestellten Iridium(III)-Komplexe mit UFH kann auch im Fall der verschiedenen Heparin-oligosaccharide die Bindungsstöchiometrie sowie das Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt bestimmt werden. Ein Vergleich der erhaltenen Werte (siehe Tabelle 3.11) zeigt, dass im Mittel etwa 3,3 Zuckermoleküle pro Farbstoffmolekül gebunden sind. Dies entspricht recht genau einer Kompensation der negativen Ladung des Oligosaccharids durch die positive Ladung des Iridium(III)-Komplexes **14**. Für die verschiedenen HO-x wurde hierbei eine Ladung von -1,7 pro Monosaccharid angenommen, analog der in der Literatur angegebenen Werte für Heparin (vgl. Tabelle 1.1).^[51] Die entsprechenden Werte für die Verbindungen **10**, **21a** und **22** sind im Anhang tabelliert.

Tabelle 3.11: Bindungsstöchiometrie und Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt für die Wechselwirkung von **14** mit Heparinoligosacchariden.

Heparinoligosaccharid	Bindungsstöchiometrie Zucker/Farbstoffmolekül (Sättigungspunkt)	Verhältnis pos./neg. Ladung (Sättigungspunkt)
HO-6	3,48	1,18
HO-8	3,06	1,35
HO-10	2,34	1,11
HO-12	3,52	1,17
HO-14	3,34	1,23
HO-20	4,06	1,01
HO-26	3,94	1,05

Im klinischen Bereich werden heutzutage meist niedermolekulare Heparine (LMWH) gegenüber unfraktioniertem Heparin bevorzugt. Häufig eingesetzte Präparate sind z. B. Fragmin[®] und Clexane[®], welche sich hinsichtlich der enthaltenen Wirkstoffe und gerinnungshemmenden Wirkung unterscheiden. Wirksamer Bestandteil von Fragmin[®] ist das Polysaccharid Dalteparin-Natrium, das mit Hilfe kontrollierter chemischer Depolymerisation aus UFH gewonnen wird.^[113] Dalteparin-Natrium hat eine mittlere Molmasse von ca. 6000 g·mol⁻¹. Im Gegensatz dazu wird Enoxaparin, der wirksame Bestandteil von Clexane[®], durch enzymatische Spaltung von UFH gewonnen. Das resultierende niedermolekulare Polysaccharid hat eine mittlere Molmasse von 4500 g·mol⁻¹.^[113] Ebenfalls eingesetzt wird das synthetische Pentasaccharid Fondaparinux-Natrium, welches der wirksame Bestandteil des Medikamentes Arixtra[®] ist. Fondaparinux-Natrium hat eine definierte Molmasse von 1728 g·mol⁻¹.

Entsprechend den Erkenntnissen bezüglich der Wechselwirkung von **14** mit Heparinoligosacchariden unterschiedlicher Kettenlänge sollte die Bindungsaffinität dieses Farbstoffes zu den beiden LMWH und Fondaparinux-Natrium niedriger sein als zu UFH. Bei Titration von **14** mit Dalteparin-Natrium, Enoxaparin und Fondaparinux-Natrium ist eine ähnliche Intensitäts-

steigerung und Verschiebung des Emissionsmaximums zu beobachten wie bei Zugabe der HO-x (vgl. Abbildung 3.20 links). Auffällig ist die starke Abnahme der Intensität nach Überschreiten der Sättigungskonzentration bei Zugabe von Fondaparinux-Natrium. Nach Zugabe eines etwa vierfachen Überschusses ist die Lumineszenzintensität beinahe bis auf den Wert der Anfangsintensität vor Zugabe des Analyten gesunken. Folgt man dem in Abbildung 3.18 skizzierten Bild, scheint auch bei Zugabe von Fondaparinux-Natrium die Bindung der Farbstoffmoleküle an freie Analyten gegenüber teilbelegten Analytmolekülen begünstigt zu sein. Auch in diesem Fall erfolgt also eine Vereinzelung der Iridium(III)-Komplexe bei weiterer Zugabe des Analyten.

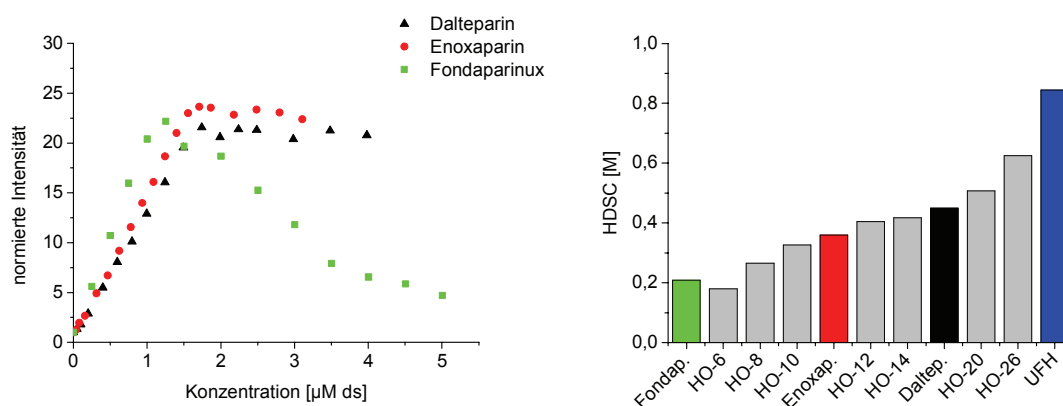


Abbildung 3.20: Links: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von **14** bei Zugabe von LMWH und Arixtra® (1 µM **14**, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–4 µM ds LMWH, 0–5 µM ds Fondaparinux-Natrium, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}} = 310 \text{ nm}$, $U_D = 850 \text{ V}$). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde jeweils auf 1 normiert. Die Berechnung der LMWH-Konzentration basiert auf einer Molmasse von $665 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pro Disaccharid.^[83] Rechts: HDSC für die Wechselwirkung von **14** mit Heparinen unterschiedlicher Kettenlänge.

Durch Zugabe von Natriumchlorid zu Lösungen von **14** und den beiden LMWH bzw. Fondaparinux-Natrium in der jeweiligen Sättigungskonzentration wurden die HDSC ermittelt. Eine vergleichende Auftragung der erhaltenen Werte sowie der entsprechenden Werte für die HO-x und UFH (siehe Abbildung 3.20 rechts) zeigt, dass der Iridium(III)-Komplex **14** bei dieser Analytauswahl die höchste Bindungsaffinität zu UFH aufweist. Dies entspricht der Erwartung, da UFH mit einer mittleren Molmasse von $10\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ deutlich längere Polysaccharidketten aufweist als das längste untersuchte Heparinoligosaccharid definierter Kettenlänge. Die Bindungsaffinität von **14** zu den beiden LMWH Dalteparin-Natrium und Enoxaparin liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie diejenigen der HO-x mittlerer Kettenlänge, was aufgrund der oben angegebenen mittleren Molmassen der LMWH ebenfalls zu erwarten war. Das synthetische Pentasaccharid Fondaparinux-Natrium nimmt eine Sonderstellung ein. Obwohl es weniger Monosaccharidbausteine aufweist als das kürzeste Heparinoligosaccharid, bindet es ebenso stark oder sogar etwas stärker an den Iridium(III)-Komplex **14**. Gleichzeitig ist die Bindungsaffinität von **14** zu Fondaparinux-Natrium deutlich niedriger als zu den beiden LMWH. Die vergleichsweise hohe Affinität von Verbindung **14** zu Fondaparinux-Natrium im Vergleich zu den kurzkettigen Heparinoligosacchariden basiert möglicherweise auf der hohen negativen Ladungsdichte des Pentasaccharids. Dieses weist aufgrund seiner molekularen Struktur eine negative Gesamtladung von -10 auf, was einer

mittleren Ladung von -4 pro Disaccharideinheit entspricht. Somit ist die negative Ladung pro gebundener Zuckereinheit von Fondaparinux-Natrium höher als die entsprechende negative Ladung pro Disaccharideinheit der Heparine $(-3,4)$.^[51] Der Einfluss der negativen Ladungsdichte auf die Wechselwirkung mit den dargestellten Iridium(III)-Komplexen wurde gesondert untersucht und wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

Analoge Untersuchungen der Komplexe **21a** und **22** haben qualitativ vergleichbare Ergebnisse hervorgebracht. Die entsprechenden Auftragungen der HDSC gegen die Kettenlänge der HO-x sind im Anhang dargestellt. Verbindung **10** weist im Gegensatz zu **14**, **21a** und **22** eine besonders hohe Bindungsaffinität zu Heparinen mittlerer Kettenlänge (12–14 Monosaccharideinheiten) auf. Abbildung 3.21 veranschaulicht dies anhand einer Auftragung der ermittelten HDSC für verschiedene Analyten. Der Wert für die Wechselwirkung mit HO-6 ist nicht gezeigt, da dieser sehr viel niedriger ist als die übrigen Werte. Im Unterschied zu HO-x ($x = 8, 10, 20, 26$) deuten die ermittelten Werte der HDSC für die Wechselwirkung von **10** mit den niedermolekularen Heparinen mittlerer Kettenlänge auf eine deutlich stärkere Wechselwirkung hin. Die Ursachen hierfür konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht im Detail ergründet werden. Anscheinend stellt jedoch die Bindung von drei Komplexmolekülen, was in etwa einer Kompensation der negativen Ladung des Dodeka- bzw. Tetradekasaccharids entspricht, an das Analytmolekül eine besonders stabile Anordnung dar.

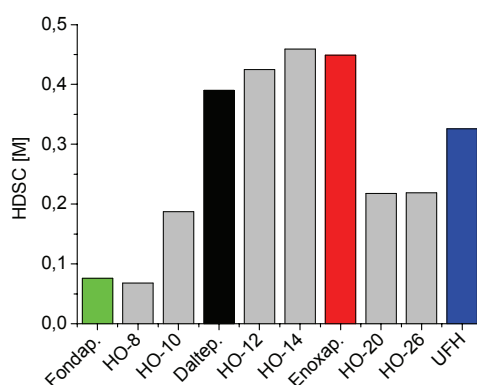


Abbildung 3.21: HDSC für die Wechselwirkung von **10** mit Heparinen unterschiedlicher Kettenlänge.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Variation des Analyten die Bindung an die synthetisierten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe im Allgemeinen umso stärker ist, je länger die Polysaccharidkette ist. Komplex **10** nimmt eine Sonderstellung ein und weist eine erhöhte Affinität zu Heparinen mittlerer Kettenlänge auf. Die Resultate der Experimente mit Fondaparinux-Natrium als Analyt legen außerdem den Schluss nahe, dass weitere Faktoren die Bindungsaffinität beeinflussen.

Einfluss der negativen Ladungsdichte des Analyten auf die Bindungsaffinität

In Kapitel 3.2.1 konnte bereits gezeigt werden, dass elektrostatische Wechselwirkungen von entscheidender Bedeutung für die Bindung der hergestellten Iridium(III)-Komplexe an Heparin sind. Zusätzlich zu der positiven Gesamtladung der Iridium(III)-Komplexe wurde daher auch die negative Ladungsdichte des Analyten variiert, indem neben den verschiedenen Heparinen (siehe vorheriger Abschnitt) die weniger stark sulfatierten Glykosaminoglykane Heparansulfat (HS), Dermatansulfat (DS) und Chondroitinsulfat C (CS) eingesetzt wurden. Weiterhin fanden die gänzlich unsulfatierte Hyaluronsäure (HA) sowie die stark sulfatierten semisynthetischen Polysaccharide Dextransulfat (DexS) und Oversulfated Chondroitin Sulfate (OSCS) Verwendung. Die durchgeführten Untersuchungen sollen im Folgenden anhand der Verbindungen **10** und **22** beispielhaft diskutiert werden. Die entsprechenden Ergebnisse für die Komplexe **14** und **21a** sind im Anhang tabellarisch zusammengefasst.

Beide Verbindungen wurden zunächst wie bereits beschrieben mit den jeweiligen Analyten titriert. Die erhaltenen Titrationskurven sind in Abbildung 3.22 dargestellt. Bei Komplex **10** (siehe Abbildung 3.22 links) tritt eine Verstärkung der Emissionsintensität sowie eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums bei Zugabe eines Analyten auf, welche je nach Analyt unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Dahingegen wird die Emission von **22** in Anwesenheit der Analyten deutlich gelöscht, in einigen Fällen nahezu vollständig. Trotz des unterschiedlichen Emissionsverhaltens ist das Ausmaß des Einflusses der jeweiligen Analyten in beiden Fällen ähnlich. So bewirkt die Zugabe der unsulfatierten, wenig negativ geladenen Hyaluronsäure bei beiden Komplexen nur eine geringfügige Veränderung der Emission. Dies lässt darauf schließen, dass die Wechselwirkungen der gebundenen Farbstoffmoleküle untereinander in diesem Fall nur sehr schwach sind. Möglicherweise beruht dies auf einer großen räumlichen Trennung der Iridium(III)-Komplexe infolge der niedrigen negativen Ladung des Analyten. Weiterhin wird aus Abbildung 3.22 ersichtlich, dass Dextransulfat als derjenige Analyt mit der höchsten negativen Ladungsdichte (-4,6 pro Disaccharid, vgl. Tabelle 1.1) die größten Änderungen der Lumineszenzintensität hervorruft. Die aus der Zugabe von CS, Heparin (sowohl LMWH als auch UFH) und Fondaparinux-Natrium resultierenden Änderungen sind zwischen diesen beiden Extremen einzuordnen. Ebenso verhält es sich mit den durch Zugabe von HS, DS, Enoxaparin und OSCS induzierten Änderungen, welche aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildung 3.22 nicht dargestellt sind.

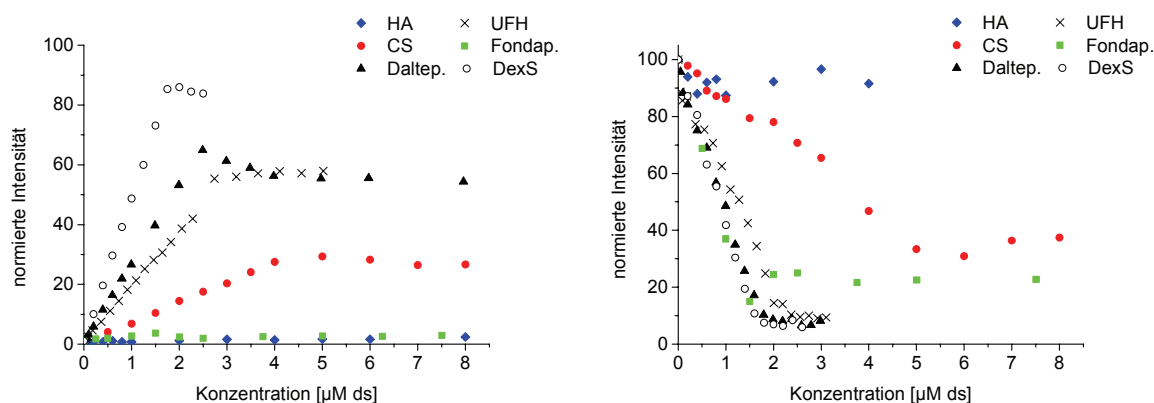


Abbildung 3.22: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von **10** (links) und **22** (rechts) bei Zugabe verschiedener GAG (1 μM Farbstoff, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–8 μM ds GAG, $T = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{anr.}} = 305 \text{ nm}$, $U_D = 870 \text{ V}$ (**10**) bzw. 800 V (**22**)). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 (**10**) bzw. 100 (**22**) normiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur eine Auswahl der erhaltenen Ergebnisse gezeigt.

In Tabelle 3.12 sind charakteristische Größen wie die maximale Änderung der Emissionsintensität bei Zugabe der Analyten, die Bindungsstöchiometrie sowie das Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt für die beiden Iridium(III)-Komplexe **10** und **22** aufgelistet.

Tabelle 3.12: Maximaler Intensitätsanstieg bzw. maximale Löschung, Bindungsstöchiometrie und Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt für die Wechselwirkung von **10** und **22** mit verschiedenen Analyten.

Analyt (Ladung/ds)	max. Anstieg/Löschung		Bindungsstöchiometrie Zucker/Farbstoffmolekül (Sättigungspunkt)		Verhältnis pos./neg. Ladung (Sättigungspunkt)	
	10	22	10	22	10	22
HS (-1,9)	53	34	8,7	9,8	0,85	0,75
CS (-2,0)	28	34	8,2	10,0	0,86	0,70
DS (-2,1)	40	28	8,1	9,9	0,82	0,68
Daleparin (-3,4)	65	7,0	4,9	3,7	0,84	1,13
Enoxaparin (-3,4)	36	8,5	3,8	3,3	1,07	1,26
UFH (-3,4)	57	9,7	5,9	4,4	0,70	0,93
Fondaparinux (-4,0)	4,1	23	2,8	2,5	1,24	1,39
OSCS (-4,0)	44	7,0	4,3	3,4	0,71	0,89
DexS (-4,6)	88	6,5	3,7	3,3	0,82	0,92

Anhand der ermittelten Werte lassen sich folgende Trends beobachten: i) Die detektierte Änderung der Emissionsintensität ist im Fall von Komplex **22** mit Ausnahme von Fondaparinux-Natrium umso größer, je höher die negative Ladungsdichte des Analyten ist, ii) die Anzahl gebundener Zuckermoleküle im Sättigungsbereich sinkt mit steigender negativer Ladung des Analyten und iii) das Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt deutet in allen Fällen auf eine Ladungskompensation bei Bindung der Sonden an den jeweiligen Analyten

hin. Die Sonderstellung von Fondaparinux-Natrium bezüglich der Intensitätsänderung bei Zugabe ist ein weiteres Indiz für die im vorigen Abschnitt diskutierten kooperativen Wechselwirkungen der Iridium(III)-Komplexe bei Bindung an ein Zielmolekül. Die nur geringe Beeinflussung der Intensität verglichen mit den ähnlich stark geladenen, länger-kettigen GAG Heparin und OSCS bei beiden untersuchten Komplexen legt die Vermutung nahe, dass ebensolche kooperativen Effekte stark zur Gesamtintensitätsänderung beitragen.

Um über diese Trends hinaus weitere Informationen bezüglich der Bindung von **10** und **22** an die ausgewählten Analyten zu erhalten, wurden analog der bereits beschriebenen Untersuchungen durch Zugabe von Natriumchlorid zu einer Mischung aus dem jeweiligen Farbstoff und einem Analyt die HDSC ermittelt. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Die Auftragung verdeutlicht, dass mit steigender negativer Ladungsdichte des Analyten die Bindungsaffinität der Iridium(III)-Komplexe zum Zielmolekül zunimmt. Im Fall von Komplex **10** nimmt das Pentasaccharid Fondaparinux-Natrium eine Sonderstellung ein und bindet trotz der hohen negativen Ladung nur schwach an die Sonde. Dies lässt sich vermutlich auf die kurze Kettenlänge zurückführen (vgl. den vorherigen Abschnitt). Im Gegensatz dazu bindet Verbindung **22** mit hoher Affinität an Fondaparinux-Natrium. Auffällig ist weiterhin die starke Bindung der beiden Farbstoffe an Heparin sowie stark sulfatierte Polysaccharide. Dies wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit für einen Nachweis dieser Analyten in biologischen Medien genutzt (vgl. Kapitel 3.2.4). Die Beobachtung, dass Komplex **10** mit weitaus größerer Affinität an OSCS bindet als an Heparin, lässt sich außerdem für einen selektiven Nachweis von OSCS in Heparinproben nutzen (vgl. Kapitel 3.2.5).

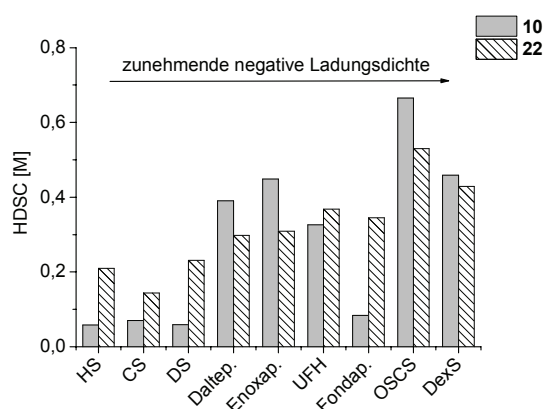


Abbildung 3.23: Auftragung der HDSC in Abhängigkeit vom Analyten für **10** und **22**.

Analoge Untersuchungen der Komplexe **14** und **21a** haben ähnliche Trends wie oben diskutiert erkennen lassen (vgl. Auftragung im Anhang). An dieser Stelle soll lediglich die Wechselwirkung von **21a** mit den niedrig geladenen GAG HS, DS und CS im Vergleich zu UFH hervorgehoben werden. Abbildung 3.24 stellt die erhaltenen Titrationskurven bei Zugabe des jeweiligen Analyten zu einer Farbstofflösung dar. Ähnlich wie im vorigen Abschnitt für die Wechselwirkung von **14** mit Arixtra beschrieben, ist bei Zugabe von HS, DS und CS nach Überschreiten des Sättigungspunktes eine deutliche Abnahme der Emissionsintensität zu beobachten. Dies tritt zwar auch bei Zugabe von UFH auf, jedoch ist die verbleibende Lumineszenz weitaus stärker als im Fall der weniger stark geladenen GAG. Die

ermittelten Werte für die HDSC (siehe Anhang) weisen außerdem auf eine niedrige Bindungsaffinität von **21a** zu HS, DS und CS hin. Diese experimentellen Befunde lassen sich für einen selektiven Nachweis von Heparinverunreinigungen in HS, DS oder CS nutzen. Dies wird in Kapitel 3.2.5 näher diskutiert.

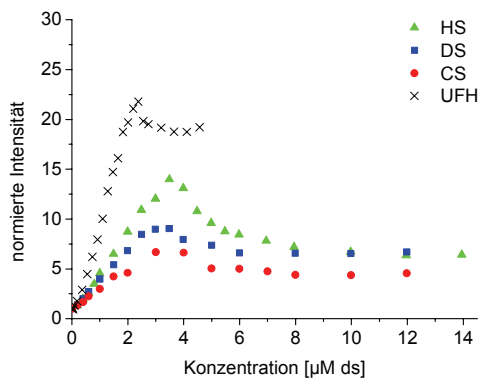


Abbildung 3.24: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von **21a** bei Zugabe von HS, DS, CS und UFH (1 µM **21a**, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–14 µM ds GAG, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 305 nm, U_D = 750 V). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 normiert.

3.2.3 Heparinneutralisation

Im klinischen Alltag ist das Auftreten von Blutungen infolge einer Heparinapplikation, z. B. während einer Operation, ein ernstzunehmendes Problem. Ein häufig eingesetztes Antidot, welches die Aktivität von UFH und teilweise auch LMWH neutralisiert, ist das polykationische Peptid Protamin.^[114] Dieses kann jedoch mitunter schwere Nebenwirkungen hervorrufen.^[115] Aus diesem Grund ist das Bestreben groß, ein alternatives Gegenmittel für Heparin zu finden. In dieser Hinsicht wurden den letzten Jahren unter anderem diverse Polypeptide,^[116–118] Foldamere^[119] und spezifische Antikörper^[120] untersucht. Auf dem Gebiet kleiner organischer Inhibitoren für Heparin wurde allerdings bislang wenig Forschung betrieben. Ein Beispiel für derartige Antidote sind die von CUNSOLO *et al.* vorgestellten Calix[8]arene.^[72,121] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher auch die Neutralisation von Heparin durch die dargestellten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe **9–11**, **14** sowie **21–23** untersucht.

Hierfür wurden zwei etablierte Methoden für die Quantifizierung der Aktivität von Heparin verwendet. Mit Hilfe des Heptest Assays (vgl. Kapitel 5.3.6) wird die Gerinnungszeit bestimmt. Ist Heparin an ein zugegebenes Antidot gebunden, kann die Blutgerinnung nicht mehr ausreichend gehemmt werden und die Gerinnungszeit sinkt. Im durchgeführten chromogenen Test (vgl. Kapitel 5.3.7) wird die Reaktion des Faktors Xa mit dem chromogenen Substrat S-2222 genutzt. Durch diese Reaktion entsteht im Fall, dass der Faktor Xa nicht ausreichend durch Heparin inhibiert wird, *p*-Nitroanilin, welches photometrisch detektiert werden kann. Die Konzentration an gebildetem *p*-Nitroanilin erlaubt Rückschlüsse auf die vorhandene Heparinaktivität.

Abbildung 3.25 zeigt links die gemessene Gerinnungszeit für die ppy-Komplexe **9–11**, **21a** und **21b** in Gegenwart von 1 IE/mL UFH. Aus der Auftragung wird deutlich, dass die Gerinnungszeit mit steigender Farbstoffkonzentration abnimmt. Im Fall von Verbindung **10** ist ab einer Konzentration von ca. 40 μM eine Sättigung von UFH erreicht. Dahingegen sind bei den übrigen ppy-Komplexen deutlich höhere Farbstoffkonzentrationen nötig, um Heparin zu inhibieren. Bei **9**, **21a** und **21b** wird eine vollständige Inhibierung im untersuchten Konzentrationsbereich nicht erreicht. Diese Beobachtungen bestätigen die in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2 diskutierte höhere Affinität von **10** zu Heparin im Vergleich zu den ppy-Komplexen mit niedrigerer positiver Gesamtladung.

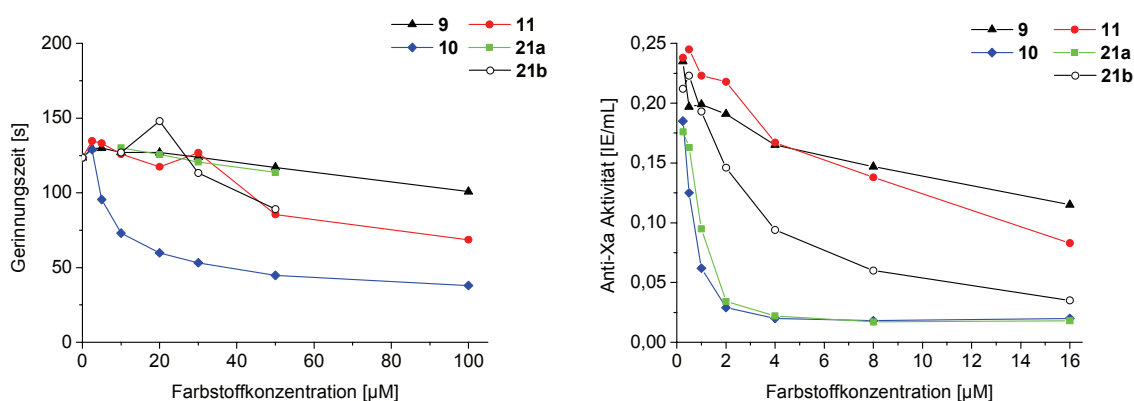


Abbildung 3.25: Auftragung der Gerinnungszeit (links) und der Anti-Xa-Aktivität (rechts) in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration für die Wechselwirkung der ppy-Komplexe **9–11**, **21a** und **21b** mit UFH (0–100 μM bzw. 0–16 μM Farbstoff, 1 IE/mL bzw. 0,25 IE/mL UFH).

Die im chromogenen Test ermittelte Anti-Xa Aktivität von 0,25 IE/mL UFH in Gegenwart der ppy-Verbindungen ist in Abbildung 3.25 rechts dargestellt. Die Aktivität sinkt mit steigender Farbstoffkonzentration. Die beiden hoch geladenen Komplexe **10** und **21a** sind in einer Konzentration von 4 μM in der Lage, die Aktivität der in der Probe vorhandenen Heparinmenge vollständig zu neutralisieren. Bei den niedriger geladenen Verbindungen **9** und **11** wird dies innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches nicht, im Fall von Komplex **21b** beinahe erreicht. Auch diese Befunde bestätigen die bereits diskutierten Zusammenhänge von Bindungsaffinität und Struktur und Ladung der Sonden. Die Ergebnisse verdeutlichen auch, dass der chromogene Test eine sehr viel sensitivere Bestimmung der Konzentration an aktivem Heparin ermöglicht. Die Tatsache, dass auf Basis des Heptest häufig niedrigere Heparinaktivitäten ermittelt werden, ist auch literaturbekannt.^[89]

Eine analoge Untersuchung der Verbindungen **14**, **22** und **23** zeigt, dass diese drei Iridium(III)-Komplexe ebenfalls bereits in niedriger Konzentration die Aktivität von UFH neutralisieren (vgl. Abbildung 3.26). Das Inhibierungspotential ist hierbei ähnlich hoch wie das der strukturell vergleichbaren Komplexe **10** und **21a**.

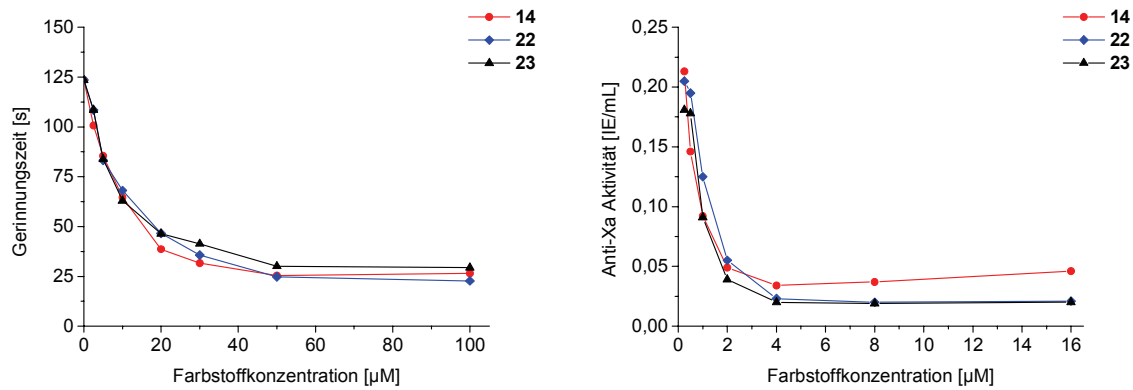


Abbildung 3.26: Auftragung der Gerinnungszeit (links) und der Anti-Xa-Aktivität (rechts) in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration für die Wechselwirkung von **14**, **22** und **23** mit UFH (0–100 µM bzw. 0–16 µM Farbstoff, 1 IE/mL bzw. 0,25 IE/mL UFH).

Weiterhin wurde die Neutralisation von Dalteparin-Natrium als Vertreter der niedermolekularen Heparine sowie Fondaparinux-Natrium durch die genannten Iridium(III)-Komplexe untersucht. Die gewonnenen Daten sind in Abbildung 3.27 beispielhaft für Verbindung **10** dargestellt. Für die Komplexe **9**, **11**, **14**, **21a**, **21b**, **22** und **23** wurden qualitativ ähnliche Ergebnisse erhalten (vgl. Abbildungen im Anhang). Aus Abbildung 3.27 wird ersichtlich, dass die Aktivität von Dalteparin-Natrium und Fondaparinux-Natrium durch **10** neutralisiert wird. Allerdings ist hierfür eine etwa doppelt so hohe Farbstoffkonzentration wie bei UFH notwendig. Ein Vergleich mit dem Antidot Protamin (vgl. Abbildung 3.27 rechts) zeigt außerdem, dass Komplex **10** beinahe ebenso gut an Heparin bindet wie dieses Polypeptid.

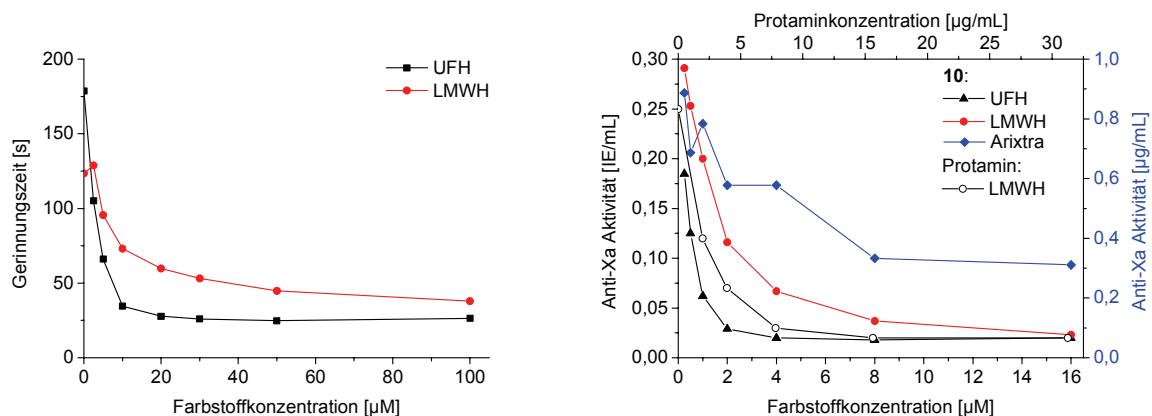


Abbildung 3.27: Auftragung der Gerinnungszeit (links) und der Anti-Xa-Aktivität (rechts) in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration für die Wechselwirkung von **10** mit UFH, Dalteparin-Natrium und Fondaparinux-Natrium sowie Heparinneutralisation durch Protamin (0–100 µM bzw. 0–16 µM Farbstoff, 0–31,25 µg/mL Protamin, 1 IE/mL bzw. 0,25 IE/mL UFH und Dalteparin-Natrium, 1 µg/mL Fondaparinux-Natrium).

Somit konnte gezeigt werden, dass vor allem Iridium(III)-Komplexe mit einer hohen positiven Gesamtladung in der Lage sind, als Heparinantagonisten die Aktivität sowohl von unfraktioniertem als auch von niedermolekularem Heparin zu neutralisieren. Auch das weitverbreitete Pentasaccharid Fondaparinux-Natrium kann erfolgreich durch diese Komplexe in seiner Wirkung inhibiert werden. Im Vergleich zu dem klinisch standardmäßig verwendeten Heparinantidot Protamin weisen die neuen Iridium(III)-Verbindungen eine ähnlich starke Bindung an Heparin auf.

3.2.4 Untersuchungen in biologischen Medien

Im Hinblick auf diagnostische Fragestellungen ist ein sensitiver und selektiver Nachweis von Glykosaminoglykanen, insbesondere von Heparin und stark sulfatierten Polysacchariden, in biologischen Medien von großem Interesse. Die Überwachung der Heparinkonzentration während einer antikoagulatorischen Behandlung wird routinemäßig anhand von Patientenproben, welche entweder Blutserum oder -plasma enthalten, durchgeführt. Alternativ ist auch der Nachweis in Urinproben denkbar. Dabei werden im klinischen Gebrauch jedoch nach wie vor die etablierten, in Kapitel 1.2.2 vorgestellten klassischen Methoden verwendet, welche Heparin anhand seiner biologischen Aktivität nachweisen, statt eine direkte Konzentrationsbestimmung vorzunehmen.

Bei der Entwicklung einer zuverlässigen Methode zum direkten Nachweis von GAG in biologischen Medien ist eine hohe Bindungsaffinität der Sonde zum Analyten unabdingbar. Vor allem in Plasmaproben muss von einer kompetitiven Bindung von Heparin an Plasma-proteine wie Fibrinogen ausgegangen werden,^[56] welche das Polysaccharid für die Sonde schwerer erreichbar macht. In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die Komplexe **10** und **22** eine hohe Affinität zu hochgeladenen GAG aufweisen und mit diesen stabile Farbstoff-Analyt-Komplexe bilden. Zudem weisen beide Komplexe eine Emission in einem Wellenlängenbereich auf, in dem die Eigenfluoreszenz des biologischen Materials gering ist. Daher wurden die nachfolgend diskutierten Untersuchungen zum Nachweis von GAG in biologischen Medien mit besonderem Fokus auf diesen beiden Farbstoffe durchgeführt.

Es ist davon auszugehen, dass die Lumineszenzeigenschaften der Iridium(III)-Komplexe durch einen Wechsel des Lösungsmittels von wässriger Pufferlösung zu einer Pufferlösung, die biologisches Medium enthält, beeinflusst werden. Daher wurde vorab die Emission von **10** und **22** in wässrigen Lösungen mit unterschiedlich hohem Anteil an fötalem Kälberserum (engl. *foetal calf serum*, FCS) untersucht. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 3.28 gezeigt. Bereits bei minimaler Zugabe von FCS (0,5 Vol.-%) tritt eine signifikante Änderung der Emissionseigenschaften auf. Im Fall von Komplex **10** (Abbildung 3.28 links) steigt die Emissionsintensität deutlich an, und das Emissionsmaximum verschiebt sich um ca. 40 nm in den höherenergetischen Wellenlängenbereich. Bei weiterer Erhöhung des FCS-Anteiles setzt sich dieser Trend zunächst fort. Die beschriebenen Änderungen beruhen vermutlich auf einer unspezifischen Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle mit Serumproteinen und sonstigen Bestandteilen des biologischen Mediums. Eine Titration von **10** mit Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA, siehe Anhang) hat gezeigt, dass durch Zugabe von BSA eine ähnlich starke Beeinflussung der Emission auftritt. Dieses Phänomen wurde auch von LO *et al.* für strukturell ähnliche Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe beschrieben.^[27,102] Ab einer Konzentration von 50 Vol.-% FCS wird die Emission von **10** durch die Eigenfluoreszenz des biologischen Mediums überdeckt.

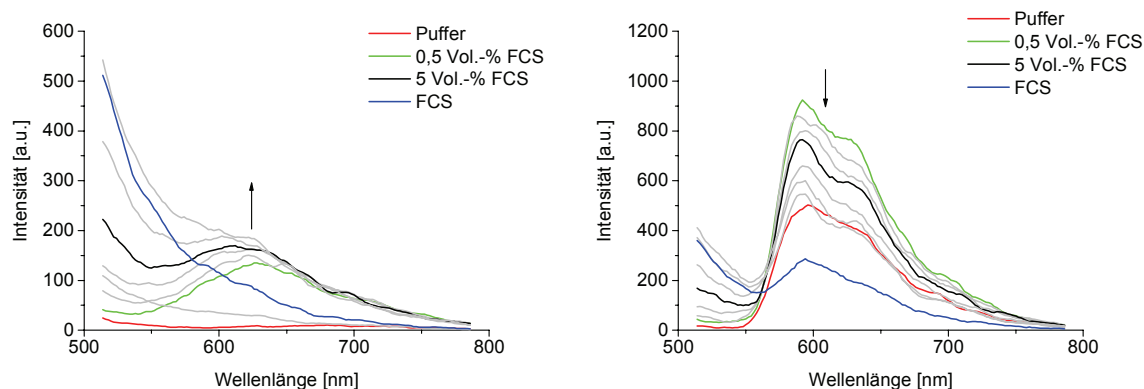


Abbildung 3.28: Emission von **10** (links) und **22** (rechts) in Abhängigkeit vom verwendeten Medium (1 μM Farbstoff, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–100 Vol.-% FCS, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{anr.}} = 305\text{ nm}$, $U_{\text{D}} = 870\text{ V}$ (**10**) bzw. 800 V (**22**)).

Die Emissionsintensität von Komplex **22** steigt bei der ersten Zugabe von FCS auf etwa den doppelten Wert an (vgl. Abbildung 3.28 rechts). Bei weiterer Erhöhung des FCS-Anteiles wird jedoch eine kontinuierliche Abnahme der Intensität bis auf den Wert in gepufferter wässriger Lösung ohne FCS beobachtet. Die Energie des emittierenden Zustandes bleibt unverändert. Im Gegensatz zu **10** kann selbst in 100% FCS die charakteristische Emission von **22** vor dem Hintergrund der biologischen Matrix detektiert werden. Der zunächst auftretende Anstieg der Lumineszenzintensität lässt sich analog zu **10** vermutlich ebenfalls auf unspezifische Wechselwirkungen der Sonde mit Serumproteinen zurückführen. Bei einer entsprechenden Titration von **22** mit BSA wurde ähnlich wie bei **10** ein Intensitätsanstieg beobachtet, der jedoch deutlich geringer ist (vgl. Anhang).

Die beschriebene Beeinflussung der Emissionseigenschaften der Komplexe **10** und **22** durch FCS erschwert einen Nachweis von GAG in Proben mit hohem Anteil an biologischem Medium. Vielversprechender erscheint ein Nachweis in verdünnten Proben, so dass der Anteil an biologischem Material gering ist. Dies erfordert jedoch eine hohe Sensitivität der Sonden gegenüber dem jeweiligen Analyten, da mit Verdünnung der Proben auch die Konzentration an Analyt abnimmt.

Nachweis von Heparin

Um den zu erwartenden störenden Einfluss von biologischen Medien auf den Nachweis von Heparin einschätzen zu können, wurden die beiden Komplexe **10** und **22** zunächst in einem Medium mit 1–10 Vol.-% FCS mit UFH titriert. Die erhaltenen Titrationskurven sind in Abbildung 3.29 dargestellt. Im Vergleich zu den analogen Messungen in wässriger gepufferter Lösung (vgl. Abbildung 3.13 und Abbildung 3.15 links) ist die zu beobachtende Emissionsänderung in Gegenwart von FCS deutlich weniger stark ausgeprägt. Mit steigendem FCS-Anteil sinkt die Intensitätszunahme (**10**) bzw. -löschung (**22**) bei Zugabe des Analyten. Die detektierbare Menge an UFH jedoch ist nahezu unabhängig vom verwendeten Medium und deutet auch in serumhaltigen Proben auf eine Ladungskompensation am Sättigungspunkt hin (vgl. Tabelle 3.13).

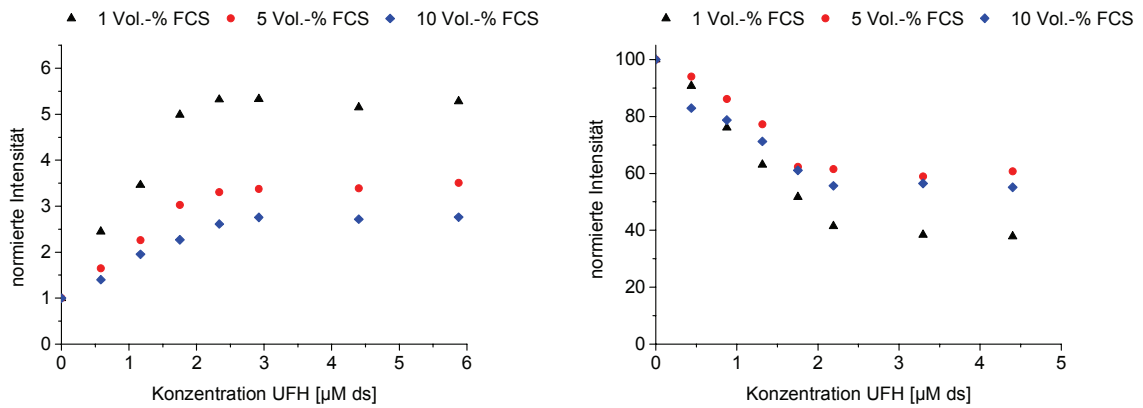


Abbildung 3.29: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von **10** (links) und **22** (rechts) in serumhaltigen Proben bei Zugabe von UFH (1 µM Farbstoff, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 1–10 Vol.-% FCS, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}} = 305 \text{ nm}$, $U_D = 870 \text{ V}$ (**10**) bzw. 800 V (**22**)). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 (**10**) bzw. 100 (**22**) normiert.

Der klinisch relevante Konzentrationsbereich, in welchem es Heparin in biologischem Medium zu quantifizieren gilt, umfasst etwa 2–8 IE/mL (18,3–73 µM ds UFH) für kardio-pulmonale Operationen bzw. 0,2–2 IE/mL (1,8–18,3 µM ds UFH) während einer post-operativen oder Langzeittherapie sowie bei der Thromboseprophylaxe.^[71b,c] Bei Verwendung von verdünnten Proben verringert sich der Quantifizierungsbereich um den Verdünnungsfaktor. Anhand der Sättigungspunkte lässt sich der Quantifizierungsbereich für die in Abbildung 3.29 gezeigten Messungen für reine Serumproben abschätzen. Mit Hilfe der in Tabelle 5.2 angegebenen klinischen Aktivität des verwendeten UFH sowie der Molmasse der häufigsten Disaccharideinheit ergibt sich für Komplex **10** ein Quantifizierungsbereich von ca. 2,7–22 IE/mL UFH (1 Vol.-% FCS), ca. 1–4,8 IE/mL UFH (5 Vol.-% FCS) bzw. ca. 0,75–2,8 IE/mL UFH (10 Vol.-% FCS) bezogen auf unverdünnte Serumproben. Entsprechend werden für Komplex **22** Quantifizierungsbereiche von ca. 6–24 IE/mL UFH (1 Vol.-% FCS), ca. 1,8–5 IE/mL UFH (5 Vol.-% FCS) bzw. ca. 0,75–2,1 IE/mL UFH (10 Vol.-% FCS) bezogen auf unverdünnte, reine Serumproben erreicht. Diese Werte machen deutlich, dass wenigstens 5 Vol.-% biologisches Medium in der jeweiligen Probe enthalten sein sollte, um mit den Sonden **10** und **22** Heparin im klinisch interessanten Konzentrationsbereich nachweisen und quantifizieren zu können. In Anbetracht der ausgeprägteren Änderung der Emissionseigenschaften in Proben mit geringerem Serumanteil wurden alle nachfolgenden Anstrengungen bezüglich einer Optimierung des Nachweissystems in wässrigen Pufferlösungen mit einem Anteil von 5 Vol.-% biologischem Medium durchgeführt.

Um den Nachweis von Heparin in biologischen Medien zu optimieren, wurden im Wesentlichen zwei Ziele verfolgt. Einerseits wurde versucht, störende Wechselwirkungen der Sonden oder des Analyten mit Proteinen oder anderen Bestandteilen des biologischen Mediums durch die Zugabe verschiedener Additive zum Probengemisch zu minimieren. Andererseits wurde die Farbstoffkonzentration variiert, um eine Verschiebung des Nachweisbereiches zu erreichen. Als Additive wurden verschiedene kationische und anionische Tenside sowie aromatische Substanzen getestet (vgl. Kapitel 5.3.5). Die Beeinflussung der Emissionseigenschaften durch

das jeweilige Additiv wurde sowohl in Abwesenheit eines Analyten als auch bei Zugabe desselben analysiert. Dabei hat sich gezeigt, dass für die beiden Komplexe **10** und **22** verschiedene Additive eine Verbesserung des Heparinnachweises herbeiführen.

Tabelle 3.13: Sättigungspunkt sowie Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt für die Wechselwirkung von **10** und **22** mit UFH in Abhängigkeit vom Medium.

Probenmedium	Sättigungspunkt [$\mu\text{M ds}$]		Verhältnis pos./neg. Ladung (Sättigungspunkt)	
	10	22	10	22
Puffer	2,98	2,22	0,70	0,93
1 Vol.-% FCS	2,01	2,28	1,02	0,90
5 Vol.-% FCS	2,17	2,09	0,95	0,99
10 Vol.-% FCS	2,51	1,95	0,82	1,06

Im Fall von Verbindung **10** wurden die besten Resultate erhalten, wenn Cetyltrimethylammoniumchlorid (CTAC) in geringer Menge zugegeben wurde. Als biologisches Medium wurden je 5 Vol.-% FCS, humanes Standardnormalplasma oder Eigenurin der gepufferten wässrigen Lösung zugesetzt. Die unter diesen optimierten Bedingungen erhaltenen Titrationskurven für UFH und LMWH (Dalteparin-Natrium) sind in Abbildung 3.30 dargestellt. Die angegebenen Konzentrationen in IE/mL beziehen sich dabei auf die Heparinmenge in unverdünnten Serum-, Plasma- oder Urinproben. Die tatsächlich vorliegenden Konzentrationen in der untersuchten Probe waren aufgrund der Verdünnung um den Faktor 20 geringer. Anhand der gezeigten Daten wird ersichtlich, dass ein Nachweis von Heparin unter Nutzung von Komplex **10** in Plasmaproben nicht möglich ist. Zwar wird im Fall von UFH ein leichter Anstieg der Emissionsintensität bei Zugabe des Analyten beobachtet (vgl. Abbildung 3.30 links), dieser ist jedoch so gering, dass eine quantitative Detektion des GAG unter diesen Bedingungen keine zuverlässigen Ergebnisse liefert. Im Fall von LMWH ist die auftretende Intensitätssteigerung sogar noch geringer (vgl. Abbildung 3.30 rechts). Dagegen können beide Heparine sowohl in Serum als auch in Urin mit guter Sensitivität in einem Quantifizierungsbereich von 0,65–2,5 $\mu\text{M ds}$ (ca. 0,07–0,25 IE/mL) nachgewiesen werden. Dieser experimentelle Befund deutet darauf hin, dass die in Plasma, nicht jedoch in Serum oder Urin, enthaltenen Gerinnungsfaktoren die Wechselwirkung der Sonde mit dem Analyten empfindlich stören. Allerdings kann eine Beeinflussung durch organismusspezifische Faktoren nicht ausgeschlossen werden, da es sich bei dem verwendeten Serum um Kälberserum, bei dem Plasma jedoch um humanes Material handelt. Der angegebene, quantifizierbare Konzentrationsbereich entspricht einer oberen Quantifizierungsgrenze von etwa 5 IE/mL Heparin bezogen auf die reinen Serum- oder Urinproben, wobei bereits Heparinkonzentrationen von 0,5–1 IE/mL ein deutliches Emissionssignal hervorrufen.

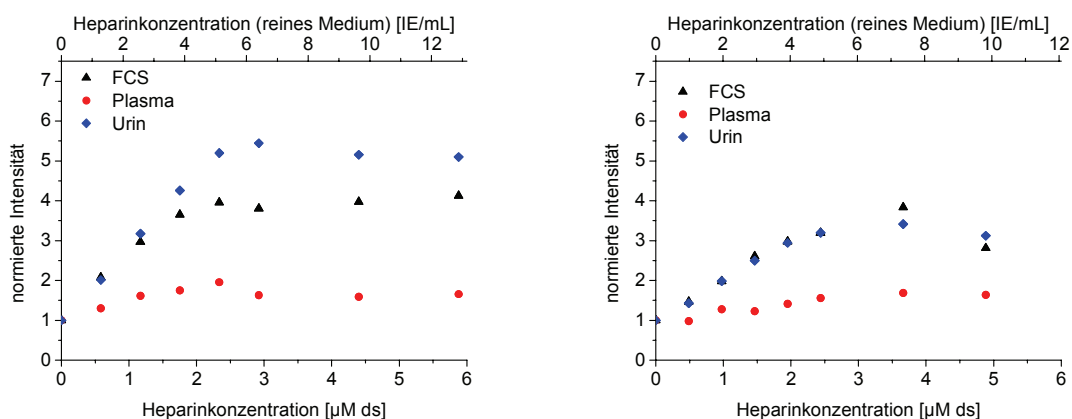


Abbildung 3.30: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von **10** in biologischen Medien bei Zugabe von UFH (links) und LMWH (rechts) (1 µM **10**, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 8 µM CTAC, 5 Vol.-% FCS, humanes Standardnormalplasma oder Urin, 0–0,65 IE/mL UFH bzw. 0–0,5 IE/mL LMWH, $\lambda_{\text{anr.}} = 305 \text{ nm}$, $U_D = 870 \text{ V}$). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 normiert. Die Angaben in IE/mL beziehen sich auf die entsprechende Aktivität in unverdünnten Serum-, Plasma- und Urinproben.

Die Wechselwirkung von Komplex **22** mit Heparin in Gegenwart von biologischen Medien konnte anders als bei **10** nicht durch Zugabe eines kationischen Tensids wie CTAC verstärkt werden. Es hat sich allerdings gezeigt, dass der Nachweis in serumhaltigen Proben durch die Zugabe von Katechol signifikant verbessert wird. In Plasma- oder Urinproben dagegen bewirkt die Anwesenheit der anionischen Natrium-*p*-toluolsulfonsäure (NapTS) eine höhere Bindungsaffinität zu den Analyten. Abbildung 3.31 zeigt die mit den optimierten Bedingungen erhaltenen Titrationskurven für UFH und LMWH.

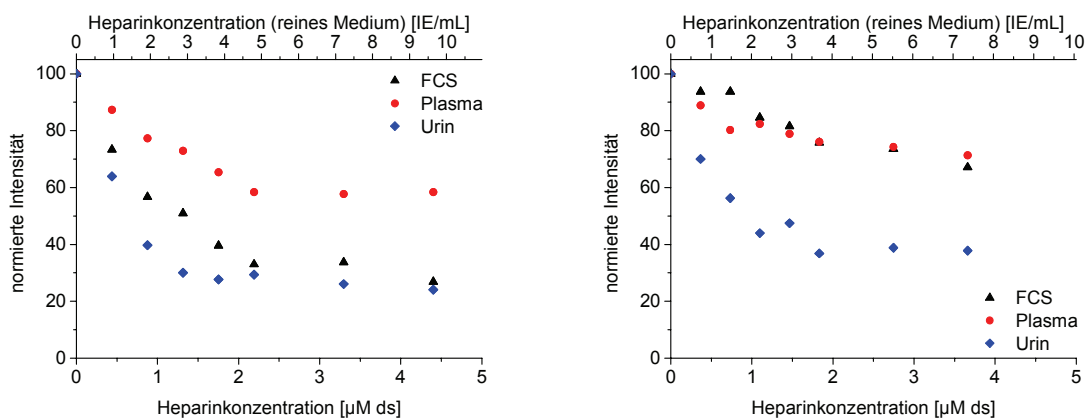


Abbildung 3.31: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von **22** in biologischen Medien bei Zugabe von UFH (links) und LMWH (rechts) (1 µM **22**, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 20 mM Katechol (FCS) bzw. 100 mM NapTS (Plasma, Urin), 5 Vol.-% FCS, humanes Standardnormalplasma oder Urin, 0–0,5 IE/mL UFH bzw. 0–0,4 IE/mL LMWH, $\lambda_{\text{anr.}} = 305 \text{ nm}$, $U_D = 800 \text{ V}$). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 100 normiert. Die Angaben in IE/mL beziehen sich auf die entsprechende Aktivität in unverdünnten Serum-, Plasma- und Urinproben.

Ähnlich wie bei Verbindung **10** ist auch bei **22** der negative Einfluss von Plasma im Vergleich zu Serum und Urin am größten. Zumindest UFH kann mit Komplex **22** aber dennoch auch in Plasmaproben detektiert werden (vgl. Abbildung 3.31 links). Der Nachweis von LMWH dagegen wird sowohl in Serum- als auch in Plasmaproben so stark gestört, dass keine zuverlässigen Werte erhalten werden (vgl. Abbildung 3.31 rechts). Urinproben eignen sich am besten, um beide Heparine mit hoher Sensitivität zu detektieren. Die obere Quantifizie-

rungsgrenze bezogen auf unverdünnte Urinproben liegt bei 3 IE/mL UFH bzw. LMWH. Bereits Konzentrationen von 0,5 IE/mL Heparin induzieren eine gut detektierbare Emissionsänderung. UFH kann auch in Serum- oder Plasmaproben im Konzentrationsbereich von etwa 0,5 IE/mL bis maximal 4,8 IE/mL quantitativ nachgewiesen werden.

Um die oben genannten oberen Quantifizierungsgrenzen zu niedrigeren Heparinkonzentrationen zu verschieben, wurde in einem nächsten Schritt die Farbstoffkonzentration reduziert. Die verschiedenen Additive wurden unter diesen veränderten Bedingungen abermals auf ihren Einfluss hin untersucht. Hierbei erwies sich im Fall von **10** erneut CTAC als am besten geeignet, während bei Komplex **22** die Zugabe von Katechol nur bei Serum- und Plasmaproben zu einer Verbesserung führt. Urinproben dagegen lassen sich am besten ohne Zusatz eines Additivs auf ihren Heparin Gehalt hin analysieren. Im Allgemeinen ist bei einer Halbierung der Farbstoffkonzentration die maximal erreichbare Intensitätssteigerung bzw. -löschung bei Zugabe des Analyten geringer (vgl. Abbildung 3.32). Zudem veranschaulicht Abbildung 3.32 unten, dass der quantitative Nachweis von Heparin mit Komplex **22** in geringer Konzentration keine verlässlichen Ergebnisse liefert. Vor allem im Fall von UFH ist keine einheitliche Beeinflussung der Emission durch den Analyten mehr festzustellen, die gemessenen Werte unterliegen großen Schwankungen (vgl. Abbildung 3.32 unten links). Zwar tritt nach wie vor eine Löschung der Emission von **22** durch Heparin auf, jedoch fehlt eine eindeutige Abhängigkeit von der Analytkonzentration, welche für eine verlässliche Quantifizierung erforderlich ist. Mit Komplex **10** dagegen lassen sich durch Halbierung der Sensorkonzentration noch geringere Mengen an Heparin als oben angegeben detektieren (vgl. Abbildung 3.32 oben). Der quantifizierbare Konzentrationsbereich umfasst mindestens 0,6–3,2 IE/mL UFH bzw. 0,7–1,8 IE/mL LMWH bezogen auf die Konzentration in der reinen Serumprobe.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe **10** und **22** für einen quantitativen Nachweis von sowohl UFH als auch LMWH in biologischen Medien geeignet sind. Die besten Ergebnisse wurden in verdünnten Urinproben erzielt, in denen bereits 0,6–1 IE/mL UFH und 0,7–1,5 IE/mL LMWH (Angaben bezogen auf die reinen Urinproben) quantitativ nachgewiesen werden konnten. Mit Komplex **10** gelang auch eine Detektion der genannten Heparinmengen in serumhaltigen Proben. Lediglich in Plasmaproben gestaltete sich der Nachweis dieses weit verbreiteten GAG schwierig. Die oben angegebenen Quantifizierungsbereiche korrelieren gut mit dem klinisch relevanten Konzentrationsbereich. Verglichen mit literaturbeschriebenen Nachweissystemen für Heparin in serum- oder plasmahaltigen Lösungen^[74a,79] ist der in der vorliegenden Arbeit entwickelte Nachweis ähnlich sensitiv oder sogar sensitiver und stellt somit eine interessante Alternative dar.

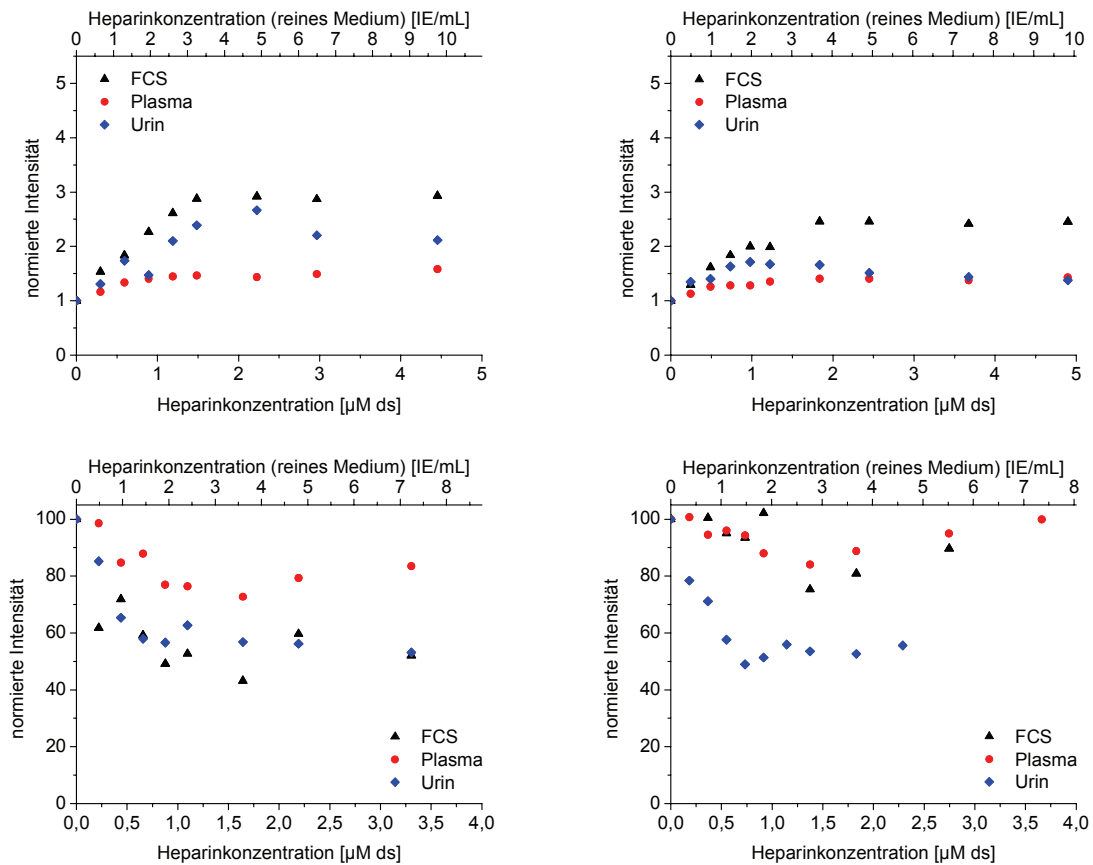


Abbildung 3.32: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von **10** (oben) und **22** (unten) in biologischen Medien bei Zugabe von UFH (links) und LMWH (rechts) (0,5 µM Farbstoff, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 3 µM CTAC (**10**) bzw. 12,5 mM Katechol (**22**, FCS, Plasma), 5 Vol.-% FCS, humanes Standardnormalplasma oder Urin, 0–0,5 IE/mL (**10**) bzw. 0–0,37 IE/mL (**22**) Heparin, $\lambda_{\text{anr.}} = 305 \text{ nm}$, $U_D = 870 \text{ V}$ (**10**) bzw. 800 V (**22**)). Bei der Untersuchung von **10** in Plasmaproben wurde kein Puffer zugesetzt. Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 (**10**) bzw. 100 (**22**) normiert. Die Angaben in IE/mL beziehen sich auf die entsprechende Aktivität in unverdünnten Serum-, Plasma- und Urinproben.

Nachweis von Dextransulfat

Der quantitative Nachweis von Dextransulfat (DexS) ist unter anderem für Hersteller von Produkten für die zellbiologische Forschung im Rahmen der Qualitätskontrolle von Bedeutung. Daher sind mittlerweile einige gebrauchsfertige Analysesets für die Quantifizierung von Dextransulfat beispielsweise in Pufferlösungen kommerziell erhältlich. Doch auch im Hinblick auf seine physiologische Bedeutung (vgl. Kapitel 1.2.1) ist der Nachweis des hoch sulfatierten Polysaccharids von Interesse. Aus diesem Grund wurden die Komplexe **10** und **22** zusätzlich hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit DexS in biologischen Medien untersucht.

Analog zu der im vorigen Abschnitt beschriebenen Vorgehensweise wurden zunächst beide Farbstoffe in serumhaltiger Pufferlösung mit DexS titriert. Dabei hat sich ähnlich wie bei der Untersuchung der Wechselwirkung mit Heparin gezeigt, dass in Anwesenheit von 5 Vol.-% FCS die detektierbare Intensitätsänderung deutlich schwächer ist als in reiner Pufferlösung (vgl. Abbildung 3.33). Daher wurde für die Detektion von DexS in biologischen Medien eben-

falls der Einfluss verschiedener Additive analysiert, um die Sensitivität des Nachweises gegebenenfalls zu optimieren.

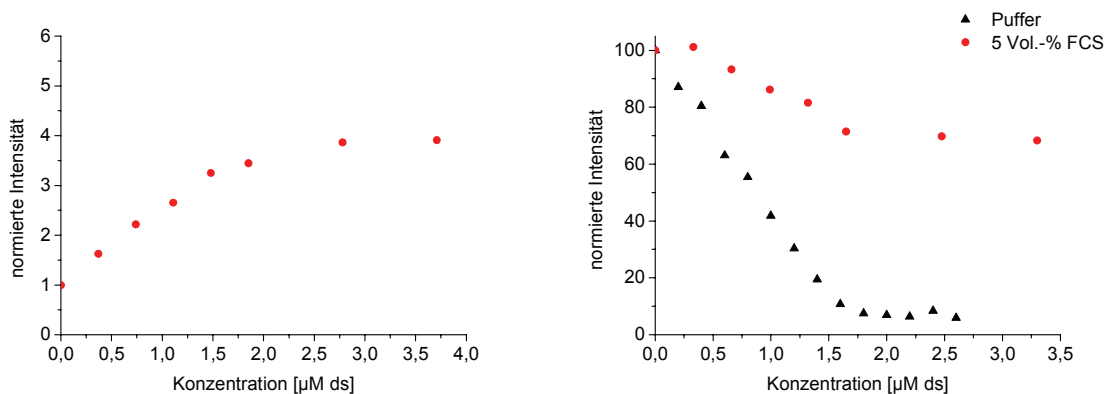


Abbildung 3.33: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von **10** (links) und **22** (rechts) in serumhaltiger Pufferlösung bei Zugabe von Dextransulfat (1 µM Farbstoff, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–4 µM ds DexS, 5 Vol.-% FCS, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 305 nm, U_D = 870 V (**10**) bzw. 800 V (**22**)). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 (**10**) bzw. 100 (**22**) normiert.

Die bereits im vorigen Abschnitt erwähnte Kombination aus CTAC und Verbindung **10** hat sich auch bezüglich des Analyten DexS als am besten geeignet erwiesen. Lediglich in verdünnten Urinproben konnte keine Verbesserung der Sensitivität durch Zusatz von Additiven erreicht werden. Die mit den optimierten Messbedingungen erhaltenen Titrationskurven sind in Abbildung 3.34 links dargestellt. Die Auftragungen machen deutlich, dass die größten Emissionsänderungen in urinhaltigem Medium auftreten. Gleichzeitig liegt die obere Quantifizierungsgrenze mit max. 30 µg/mL DexS in reinen Urinproben deutlich unter den entsprechenden Werten für Serum- (45 µg/mL) bzw. Plasmaproben (60 µg/mL).

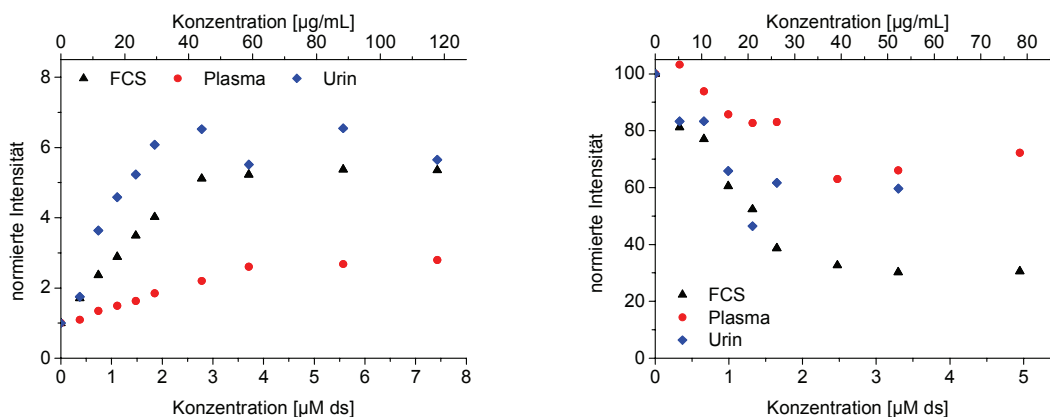


Abbildung 3.34: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von **10** (links) und **22** (rechts) in biologischen Medien bei Zugabe von Dextransulfat (1 µM Farbstoff, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–8 µM ds (**10**) bzw. 0–5 µM ds (**22**) DexS, 3 µM CTAC (**10**, FCS, Plasma), 50 mM NapTS (**22**, FCS, Plasma) bzw. 10 mM Phloroglucin (**22**, Urin), 5 Vol.-% FCS, humanes Standardnormalplasma oder Urin, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 305 nm, U_D = 870 V (**10**) bzw. 800 V (**22**)). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 (**10**) bzw. 100 (**22**) normiert. Die Angaben in µg/mL beziehen sich auf die entsprechende Konzentration in unverdünnten Serum-, Plasma- und Urinproben.

Bei Komplex **22** verhält es sich anders. Dieser eignet sich am besten für einen Nachweis in Serumproben, wobei erneut NapTS als Additiv verwendet wurde (vgl. Abbildung 3.34 rechts).

Unter diesen optimierten Bedingungen konnte DexS im Konzentrationsbereich 0–30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ quantitativ detektiert werden. Dagegen lieferte die entsprechende Titration in plasmahaltiger Lösung keine verlässlichen Daten. Auch in Urinproben wurden starke Schwankungen der erhaltenen Werte beobachtet, so dass auch dieses Medium nicht geeignet ist, um DexS zuverlässig nachzuweisen.

Im Gegensatz zum beschriebenen Heparinnachweis wurde im Fall des Analyten DexS keine Reduzierung der oberen Quantifizierungsgrenze durch eine Verringerung der Farbstoffkonzentration erreicht. Wie anhand der in Abbildung 3.35 gezeigten Auftragungen der Emissionsänderungen von **10** und **22** in Abhängigkeit von der DexS-Konzentration ersichtlich wird, umfasst der Quantifizierungsbereich für Komplex **10** nach wie vor 0–30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DexS (vgl. Abbildung 3.35 links). Dies ist ein Indiz dafür, dass unter diesen Bedingungen keine Ladungskompensation am Sättigungspunkt mehr vorliegt und die Bindung der Sonde an den Analyten nicht ausschließlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht. Im Fall von Komplex **22** ist bei niedrigerer Konzentration keine eindeutige Abhängigkeit der Emissionsintensität von der Analytkonzentration mehr vorhanden (vgl. Abbildung 3.35 rechts).

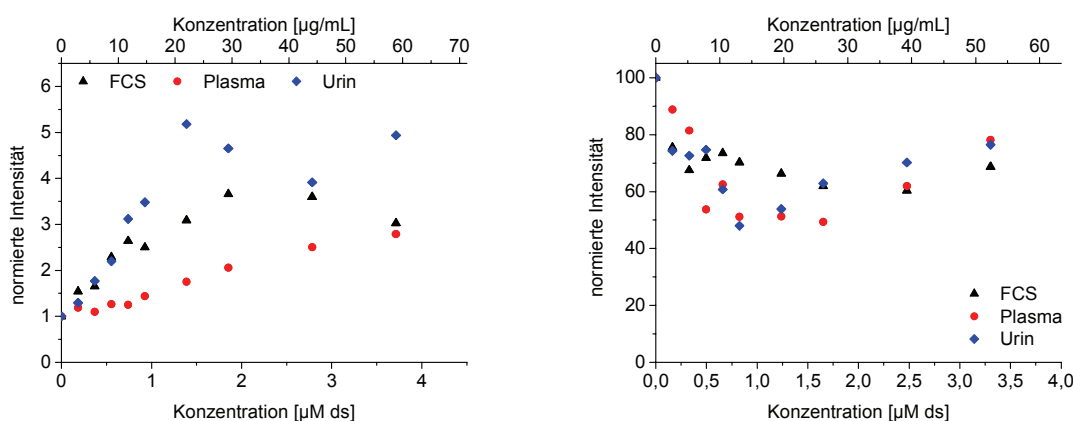


Abbildung 3.35: Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von **10** (links) und **22** (rechts) in biologischen Medien bei Zugabe von Dextransulfat (0,5 μM Farbstoff, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–4 μM ds (**10**) bzw. 0–3,5 μM ds (**22**) DexS, 5 μM CTAC (**10**, FCS, Urin), 10 mM NapTS (**22**), 5 Vol.-% FCS, humanes Standardnormalplasma oder Urin, $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{anr.}} = 305\text{ nm}$, $U_{\text{D}} = 870\text{ V}$ (**10**) bzw. 800 V (**22**)). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 (**10**) bzw. 100 (**22**) normiert. Die Angaben in $\mu\text{g}/\text{mL}$ beziehen sich auf die entsprechende Konzentration in unverdünnten Serum-, Plasma- und Urinproben.

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Iridium(III)-Komplexe **10** und **22** auch als Kleinmolekülsonden für den Nachweis des hoch sulfatierten Polysaccharids Dextransulfat in biologischen Medien geeignet sind. Analytkonzentrationen $> 5\text{ } \mu\text{g}/\text{mL}$ können in Urin- (**10**) bzw. Plasmaproben (**22**) eindeutig nachgewiesen werden. Hinsichtlich der eingangs angesprochenen Qualitätskontrolle im Bereich der zellbiologischen Forschung werden diese beiden Farbstoffe den Anforderungen an eine Sonde für DexS jedoch nicht gerecht. So ist mit den kommerziell erhältlichen Analysesets eine quantitative Detektion dieses Analyten teilweise schon im Nanogrammereich möglich.^[122]

3.2.5 Detektion von Heparinverunreinigungen

Kontamination von Heparin mit OSCS

Die Heparinkrise Anfang 2008 hat die dringende Notwendigkeit von selektiven und sensitiven Testverfahren für die Detektion von Heparinverunreinigungen, allen voran das semi-synthetische hoch sulfatierte GAG OSCS, offenbart. Die kontaminierten Heparinkonserven, deren Applikation schwere Nebenwirkungen bei den betroffenen Patienten hervorgerufen hat, waren im Fall von UFH mit bis zu 35 % OSCS verunreinigt. Präparate des niedermolekularen Heparins Enoxaparin wiesen mit bis zu 7 % OSCS-Anteil einen geringeren Kontaminationsgrad auf.^[86] Seit der Identifikation von OSCS als Hauptverursacher der allergischen Reaktionen besteht in der internationalen Forschergemeinschaft das Bestreben, eine verlässliche Methode für die Detektion schon geringer Mengen im Bereich von 0,6–1 % OSCS zu etablieren. In Kapitel 1.2.2 wurden diesbezüglich bereits einige der entwickelten Nachweisverfahren vorgestellt. Da die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, dass der Iridium(III)-Komplex **10** eine besonders hohe Bindungsaffinität zu stark sulfatierten Polysacchariden aufweist (vgl. Kapitel 3.2.2), wurde im Rahmen dieser Arbeit das Potential von **10** hinsichtlich einer selektiven Detektion von OSCS in Heparinproben analysiert.

Aus Abbildung 3.23 (vgl. Kapitel 3.2.2) geht hervor, dass bei einer Natriumchloridkonzentration von 500 mM nur wenig UFH an Komplex **10** gebunden ist, während für eine Dissoziation des Farbstoff-OSCS-Komplexes weit größere Salzmengen erforderlich sind. Aus diesem Grund wurde bei den Untersuchungen zur Quantifizierung von OSCS in Anwesenheit von Heparin diese Konzentration an Salz zu den jeweiligen Probenmischungen hinzugefügt. Unter diesen Bedingungen sollte eine Bindung von OSCS an **10** selbst bei großem Überschuss an Heparin bevorzugt sein. Um dies genauer zu analysieren, wurden Farbstofflösungen mit unterschiedlich hohem Heparin Gehalt hergestellt und die Emissionen dieser Lösungen gemessen. Anschließend wurde OSCS im Konzentrationsbereich 0–3,5 µg/mL hinzugegeben und nach jeder Zugabe die Änderung der Emission verfolgt. Für den Fall, dass der stark sulfatierte Analyt an die Sonde bindet, ist eine Zunahme der Intensität analog der in Kapitel 3.2.2 diskutierten Untersuchungen zu erwarten.

Die in Abbildung 3.36 links dargestellten Titrationskurven bestätigen diese Vermutung. Anhand der Auftragungen wird ersichtlich, dass bis zu einer Heparinkonzentration von 0,96 mg/mL eine signifikante Steigerung der Emissionsintensität bei Zugabe von OSCS auftritt. Selbst in Gegenwart einer noch höheren Konzentration von 1,92 mg/mL UFH ist noch eine Intensitätsverdopplung bei Zugabe von ca. 2 µg/mL OSCS zu beobachten. Für den Fall, dass die vorgelegte Heparinkonzentration 0,96 mg/mL nicht übersteigt, induziert bereits eine Konzentration von 0,5 µg/mL OSCS eine gut detektierbare Änderung der Emissionsintensität. Dies entspricht bezogen auf die vorliegende Heparinmenge einem OSCS-Gehalt von 0,05 Gew.-%. Unter diesen Bedingungen lässt sich OSCS in einem Konzentrationsbereich von ca. 0,05–0,15 Gew.-% (0,5–1,5 µg/mL) quantitativ gut nachweisen. Aufgrund der nur geringen Abweichungen der empirischen Werte von der in Abbildung 3.36 rechts gezeigten

Ausgleichskurve ist davon auszugehen, dass die Fehlerrate hierbei gering ist. Als Modell für die Regression wurde eine Hill-Funktion verwendet (für nähere Informationen hierzu siehe Anhang).

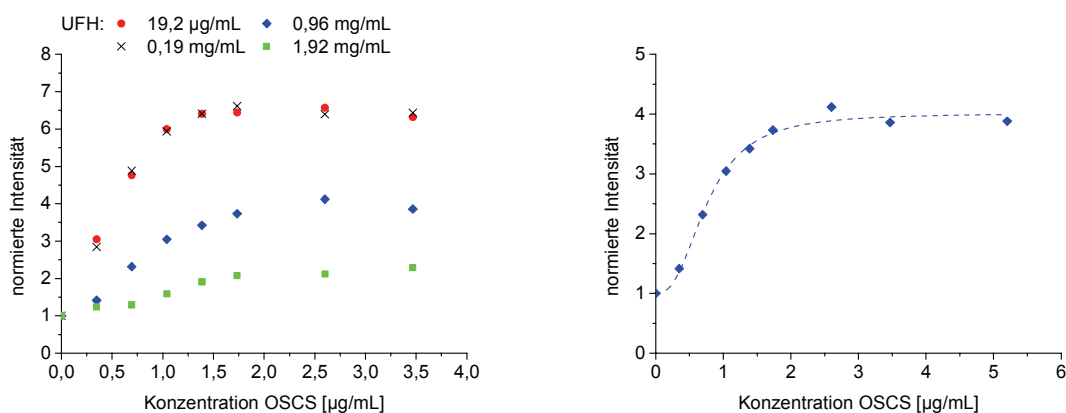


Abbildung 3.36: Links: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von **10** bei Zugabe von OCS in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an UFH (1 µM **10**, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 500 mM NaCl, 19,2 µg/mL, 0,19 mg/mL, 0,96 mg/mL bzw. 1,92 mg/mL UFH, 0–3,5 µg/mL OCS, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 305 nm, U_D = 870 V). Rechts: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von **10** bei Zugabe von OCS in Gegenwart von 0,96 mg/mL UFH mit Ausgleichskurve. Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 normiert. Die Angaben der OCS-Konzentration basieren auf einer mittleren Molmasse von 810 g·mol⁻¹ pro Disaccharideinheit.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplex **10** unter bestimmten experimentellen Bedingungen in der Lage ist, bereits geringe Mengen (> 0,05 Gew.-% bzgl. UFH) an OCS in Gegenwart von unfraktioniertem Heparin zu detektieren. Verglichen mit anderen in der Literatur beschriebenen Methoden^[82,86] stellt der entwickelte Nachweis unter Nutzung von Komplex **10** eine einfach handhabbare Alternative für die direkte Detektion von OCS dar.

Kontamination von Heparan-, Dermatan- und Chondroitinsulfat mit Heparin

Bedingt durch den gemeinsamen Biosyntheseweg und die Tatsache, dass die verschiedenen GAG-Typen in Geweben selten getrennt voneinander vorkommen, gestaltet sich die Isolierung reiner GAG-Fractionen mitunter schwierig.^[46] Aus diesem Grund sind vor allem strukturell eng verwandte GAG wie beispielsweise Heparin und Heparansulfat häufig mit den entsprechenden anderen GAG verunreinigt. Dies kann unter Umständen bei der therapeutischen Anwendung eine reduzierte Wirksamkeit des Präparates oder das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen hervorrufen.

In Kapitel 3.2.2 wurde gezeigt, dass der Iridium(III)-Komplex **21a** eine geringe Bindungsaffinität zu den niedrig geladenen GAG HS und DS aufweist, aber stabil an UFH bindet. Daher wurde dieser Farbstoff hinsichtlich einer selektiven Detektion von Heparin in Proben der weniger stark sulfatierten GAG untersucht. Um eine Bindung an letztere zu reduzieren ohne die Affinität zu Heparin allzu stark zu beeinträchtigen, wurde den analysierten Proben Natriumchlorid in einer Konzentration von 350 mM zugefügt (vgl. hierzu auch die Erläuterun-

gen im vorigen Abschnitt sowie die im Anhang aufgetragenen HDSC-Werte für die Wechselwirkung von **21a** mit verschiedenen GAG). Es hat sich gezeigt, dass Heparin in Gegenwart von 0,95 mg/mL HS in einem Konzentrationsbereich von ca. 0,6–3 $\mu\text{g/mL}$ (0,06–0,3 Gew.-% bzgl. HS) quantitativ nachgewiesen werden kann. Die entsprechende Titrationskurve ist in Abbildung 3.37 dargestellt.

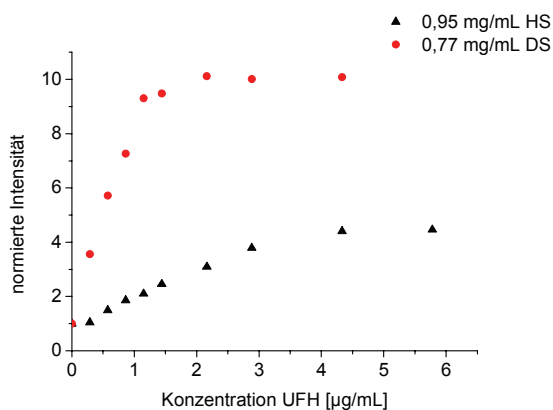


Abbildung 3.37: Änderung der Emissionsintensität am Maximum von **21a** bei Zugabe von UFH in Gegenwart von HS und DS (1 μM **21a**, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 350 mM NaCl, 0,95 mg/mL HS bzw. 0,77 mg/mL DS, 0–6 $\mu\text{g/mL}$ UFH, T = 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 305 nm, U_{D} = 750 V). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 normiert. Die Angaben der Heparinkonzentration basieren auf einer mittleren Molmasse von $665 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ pro Disaccharideinheit.

In Proben von DS konnten sogar noch geringere Mengen von UFH detektiert werden, wie anhand der in Abbildung 3.37 gezeigten Titrationskurve ersichtlich wird. Dies beruht zumindest teilweise darauf, dass die Intensitätssteigerung bei Zugabe von Heparin zu Proben von DS deutlich stärker ausgeprägt als im Fall von HS und somit schon geringe Zugabemengen große Änderungen der Emission induzieren. Der Quantifizierungsbereich umfasst etwa 0,08–1 $\mu\text{g/mL}$ (0,01–0,13 Gew.-% bzgl. DS) UFH in Gegenwart von DS.

Damit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass der Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplex **21a** gut geeignet ist, um bereits niedrige Konzentrationen von Heparin in Proben von HS oder DS zuverlässig zu detektieren.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Chemische Sensoren und Sonden sind vor allem im Bereich der Analytik aus dem modernen Alltag nicht mehr wegzudenken. Auf Basis selektiver kovalenter oder nicht-kovalenter Wechselwirkungen können mittlerweile viele chemische oder biochemische Analyten sensitiv nachgewiesen werden. In dieser Hinsicht besonders interessant sind Fluoreszenzfarbstoffe, da Änderungen im Emissionsverhalten mit modernen Geräten einfach, exakt und sensitiv unter verschiedenen experimentellen Bedingungen verfolgt werden können. Dank ihres modularen Strukturdesigns sowie vorteilhafter chemischer und photophysikalischer Eigenschaften stellen lumineszierende Übergangsmetallkomplexe eine vielversprechende Alternative zu klassischen organischen Fluorophoren dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher das Potential von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen als Fluoreszenzsonden für Biomakromoleküle evaluiert.

An dieser Stelle sollen die erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst werden.

Entwicklung neuer Farbstoffe auf Basis von Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen

Im Verlauf der Arbeiten ist es gelungen, mittels eines Baukastenprinzips eine kleine Bibliothek unterschiedlich funktionalisierter Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe aufzubauen und die einzelnen Komplexe hinsichtlich ihrer photophysikalischen Eigenschaften zu charakterisieren. Durch Kombination von drei cyclometallisierenden mit vier Diiminliganden sowie einer nach der Koordination erfolgten weiteren Funktionalisierung einiger Liganden konnten insgesamt 16 neue Farbstoffe erfolgreich isoliert werden. Ein weiterer literaturbekannter Iridium(III)-Komplex wurde zusätzlich strukturell charakterisiert.

Die neuen Farbstoffe zeichnen sich durch eine charakteristische, intensive Absorption im Bereich von 250–320 nm sowie weitere schwächere Absorptionsbanden im Bereich von 320–480 nm aus. In wässriger Lösung zeigen alle hergestellten Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe eine intensive Emission im Bereich von 590–700 nm. Durch pH-abhängige Messungen konnte gezeigt werden, dass die amin- und amidfunktionalisierten Komplexe bei pH 7 bedingt durch die Protonierung der funktionellen Gruppen unterschiedlich stark positiv geladen sind.

Wechselwirkung mit Glykosaminoglykanen

Es hat sich gezeigt, dass die Emissionseigenschaften der hergestellten Iridium(III)-Komplexe sehr sensibel auf Änderungen der Komplexumgebung reagieren. Dies wurde genutzt, um die Wechselwirkung der amin- und amidfunktionalisierten Komplexe mit unterschiedlichen Glykosaminoglykanen zu analysieren. In Gegenwart der Analyten weisen die meisten dieser

Komplexe eine deutlich energiereichere Emission auf, die linear mit der Analytkonzentration ansteigt. Lediglich die Emission der Komplexe **15** und **22** wird mit zunehmender Konzentration eines Glykosaminoglykans gelöscht. Im Rahmen der Untersuchungen wurden folgende allgemeine Struktur-Bindungs-Beziehungen gefunden:

- Je höher die positive Gesamtladung des Komplexes ist, desto höher ist die Bindungsaffinität des Farbstoffes zu einem gegebenen Analyten.
- Die Bindungsaffinität eines Farbstoffes zu einer Reihe strukturell ähnlicher Analyten steigt mit der Kettenlänge und der negativen Ladungsdichte des Glykosaminoglykans.

Die experimentellen Befunde führen zu der Schlussfolgerung, dass die Bindung der synthetisierten Iridium(III)-Komplexe an Glykosaminoglykane durch elektrostatische Wechselwirkungen dominiert wird. Diese These wird gestützt durch die Beobachtung, dass die Bindungsstöchiometrie der GAG-Komplex-Addukte am Sättigungspunkt durch Ladungskompensation bedingt ist. Weiterhin konnte mit Hilfe des Heptest Assays und eines chromogenen Faktor Xa Tests gezeigt werden, dass insbesondere diejenigen Iridium(III)-Komplexe mit einer hohen positiven Gesamtladung in der Lage sind, als Heparinantagonisten die Aktivität sowohl von unfraktioniertem als auch von niedermolekularem Heparin zu neutralisieren. Die neuen Iridium(III)-Verbindungen weisen eine beinahe ebenso starke Bindung an Heparin auf wie das standardmäßig verwendete Heparinantidot Protamin.

Entwicklung eines Nachweissystems für die Detektion von Heparin in biologischen Medien

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurde ein sensitiver Nachweis für die Quantifizierung von Heparin in Serum-, Plasma- und Urinproben basierend auf den beiden Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexen **10** und **22** entwickelt. Der quantifizierbare Konzentrationsbereich in Serumproben umfasst 0,6–3,2 IE/mL unfraktioniertes Heparin (UFH) bzw. 0,7–1,8 IE/mL niedermolekulares Heparin (LMWH) für Komplex **10** und 0,5–4,8 IE/mL UFH für Komplex **22**. In Plasmaproben konnten mit Komplex **22** ebenfalls 0,5–4,8 IE/mL UFH quantitativ detektiert werden. In Urinproben umfasst der Quantifizierungsbereich etwa 0,6–5 IE/mL UFH bzw. 1–5 IE/mL LMWH für Komplex **10** und 0,5–3 IE/mL UFH bzw. LMWH für Komplex **22**. Die genannten Quantifizierungsbereiche korrelieren gut mit dem klinisch relevanten Konzentrationsbereich bei einer Applikation von Heparin während einer postoperativen oder Langzeittherapie (0,2–2 IE/mL). Dank der schnellen, sensitiven und direkten Detektion stellt die vorgestellte Methode eine interessante Alternative zu den bestehenden, ähnlich sensitiven Nachweisverfahren für das medizinisch sehr wichtige Glykosaminoglykan Heparin dar.

Die Iridium(III)-Komplexe **10** und **22** eignen sich zusätzlich als Fluoreszenzsonden für den Nachweis des hoch sulfatierten Polysaccharids Dextransulfat in biologischen Medien. Analytkonzentrationen > 5 µg/mL können in Urin- (**10**) bzw. Plasmaproben (**22**) eindeutig nachgewiesen werden.

Detektion von OSCS-Verunreinigungen in Heparinproben

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexes **10** bereits geringe Mengen (> 0,05 Gew.-%) an OSCS in Gegenwart von unfraktioniertem Heparin durch Messung der Emission detektiert und im Bereich von 0,05–0,15 Gew.-% quantifiziert werden können. Verglichen mit anderen in der Literatur beschriebenen Methoden (z. B. enzymbasierten Verfahren) ist der vorgestellte Nachweis besonders einfach handhabbar und erlaubt eine direkte Detektion von OSCS.

Detektion von Heparinkontaminationen in Proben von Heparan- und Dermatansulfat

Unter Nutzung des Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexes **21a** ist es zudem gelungen, eine schnelle, direkte und einfach handhabbare Nachweismethode für Heparinverunreinigungen in Proben von Heparan- oder Dermatansulfat zu entwickeln. Der quantifizierbare Konzentrationsbereich umfasst in etwa 0,06–0,3 Gew.-% UFH in Heparansulfatproben und 0,01–0,13 Gew.-% UFH in Proben von Dermatansulfat.

Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, einige vielversprechende so genannte *turn-on* Sonden sowie eine *turn-off* Sonde für die Detektion verschiedener Glykosaminoglykane mittels Emissionsspektroskopie zu synthetisieren. Auf Basis der neuen Farbstoffe konnten neue sensitive Nachweismethoden für klinisch relevante Analyten, insbesondere das weit verbreitete Antikoagulant Heparin, entwickelt werden.

Weitere Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit nicht ausführlich diskutiert wurden, haben außerdem gezeigt, dass der Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplex **22** auch als Sonde für Oligonukleotide geeignet ist. Die Emission dieses Farbstoffes wird in Gegenwart von sowohl DNS als auch RNS sowie anorganischen Phosphaten gelöscht. Dies bietet Potential für weitergehende Forschungsarbeiten.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Chemikalien und Geräte

Die für die Synthesen und Experimente verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen ABCR (Karlsruhe, Deutschland), ACROS ORGANICS (Geel, Belgien), FLUKA (Basel, Schweiz), MERCK (Darmstadt, Deutschland), SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen, Deutschland), TCI DEUTSCHLAND (Eschborn, Deutschland) und dem Chemikalienlager des Theoretikums sowie der Chemikalienausgabe der Chemischen Institute der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Wasserfreie Lösungsmittel wurden unter Argonatmosphäre über Molekularsieb aufbewahrt. Zur Herstellung von Puffer- und Farbstofflösungen sowie für Fluoreszenz- und UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen wurde ausschließlich Wasser von HPLC-Qualität der Firma VWR INTERNATIONAL (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Beim Umgang mit Bipyridinderivaten wurden Plastikspatel der Firma SEMADENI (Ostermündingen, Schweiz) benutzt.

Die Analyten unfraktioniertes Heparin (UFH), Chondroitinsulfat A (CS), Chondroitinsulfat B/ Dermatansulfat (DS) und Dextransulfat (DexS) wurden von der Firma SIGMA-ALDRICH sowie Heparansulfat (HS) von der Firma CELSUS LABORATORIES (Cincinnati, OH, USA) bezogen. Hierbei handelte es sich jeweils um das durch Natrium stabilisierte Salz, welches aus der Darmschleimhaut von Schweinen extrahiert wurde (UFH, DS, HS) bzw. um ein Extrakt aus Rinderluftröhre (CS) oder *Leuconostoc spp.* (DexS). Hyaluronsäure (HA) wurde in Form des Kaliumsalzes als Extrakt aus menschlicher Nabelschnur ebenfalls von der Firma SIGMA-ALDRICH erworben. Die niedermolekularen Heparine Dalteparin-Natrium (Fragmin[®]) und Enoxaparin (Clexane[®]) wurden als gebrauchsfertige Injektionslösungen von den Firmen PFRIMMER KABI (Erlangen, Deutschland) bzw. AVENTIS PHARMA (Frankfurt a. M., Deutschland) bezogen, das synthetische Pentasaccharid Fondaparinux-Natrium (Arixtra[®]) von der Firma SANOFI-SYNTHELABO (Berlin, Deutschland), ebenfalls als Injektionslösung. Ferner wurden die verwendeten Heparinoligosaccharide definierter Kettenlänge (HO-x) als Extrakt aus Schweinen von der Firma IDURON (Manchester, UK) erworben. Oversulfated Chondroitinsulfat (OSCS) wurde freundlicherweise von GIANGIACOMO TORRI und ANNAMARIA NAGGI vom Ronzoni Institut für chemische und biochemische Forschung (Mailand, Italien) zur Verfügung gestellt.

Für die Fluoreszenzuntersuchungen zur Wechselwirkung der hergestellten Farbstoffe mit Biomolekülen (vgl. Kapitel 3.2 und 5.3.5) wurde den Probelösungen unter anderem fötales Kälberserum der Firma BIOCHROM (Berlin, Deutschland), humanes Standardnormalplasma der Firma PRECISION BIOLOGIC (Dartmouth, Nova Scotia, Kanada), sowie Eigenurin hinzugefügt.

N¹,N⁴,N⁹-Tri(*tert*-butoxycarbonyl)-1,12-diamino-4,9-diazadodecan wurde dankenswerterweise von Herrn Volker Seifried zur Verfügung gestellt.

Für *Dünnschichtchromatogramme* wurden Polygram® Polyester-Fertigfolien SIL G/UV₂₅₄ (0,2 mm Schichtdicke) der Firma MACHEREY-NAGEL (Düren, Deutschland) verwendet. Die Detektion von Substanzen erfolgte mit Licht der Wellenlänge 254 nm bzw. 365 nm oder durch Anfärben mit einem typischen Färbereagenz auf der Basis von Ninhydrin.

Als stationäre Phase für die *Säulenchromatographie* wurde Kieselgel (Korngröße 40–63 µm) der Firma FLUKA verwendet. Die mobile Phase ist bei den jeweiligen Synthesen in Kapitel 5.2 angegeben.

HPLC wurden bei 26 °C an einem Flüssigkeitschromatographen LC-10AT VP der Firma SHIMADZU CORPORATION (Kyoto, Japan) durchgeführt, welcher mit einem Systemcontroller SCL-10A VP, einem UV/Vis-Detektor SPD-10A VP und einem Säulenofen CTO-10AS VP ausgerüstet war. Für die analytischen Messungen wurde als Trennsäule eine EC 250 x 4,6 mm Nukleosil 100-10 C18 Säule der Firma MACHEREY-NAGEL mit einem Gradienten von Wasser (0,1% TFA, Lösungsmittel A) und Acetonitril (Lösungsmittel B) verwendet. Die Messungen wurden mit einem der folgenden Verfahren durchgeführt: a) Die ersten 5 min wurde mit reinem A getrennt. Dann wurde der Anteil an B innerhalb von 30 min auf 24 % erhöht und dieses Lösungsmittelverhältnis 5 min beibehalten. In den folgenden 20 min wurde die Konzentration von B auf 90 % gesteigert und für weitere 5 min beibehalten. Abschließend wurde 9 min mit reinem A nachgewaschen. (Verbindungen **7–11**, **13–16**, **18–23**), b) Die ersten 15 min wurde mit einem Anteil von 30 % B getrennt. Anschließend wurde innerhalb von 35 min der Anteil an B auf 100 % erhöht. Abschließend wurde 10 min lang mit reinem A nachgewaschen. (Verbindungen **12** und **17**). Die präparative Aufreinigung der Verbindungen **10**, **15**, **20a**, **20b**, **21a**, **21b**, **22** und **23** wurde mit Hilfe einer 250 x 10 mm Luna 5u C18(2) 100A-Trennsäule der Firma PHENOMENEX (Aschaffenburg, Deutschland) mit Gradient a) durchgeführt. Zur Auswertung diente die Software CLASS-VP (Version 6.12 SP 3) der Firma SHIMADZU.

NMR-Messungen wurden an einem Avance DRX 200, AVANCE II 400 oder AVANCE II 600 der Firma BRUKER (Ettlingen, Deutschland) durchgeführt. Die Zuordnung der Signale erfolgte auf Basis von 2D-Korrelationsspektren sowie DEPT135-Spektren. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma DEUTERO (Kastellaun, Deutschland) bezogen. Zur Standardisierung der chemischen Verschiebungen δ wurden die Restwasserstoffsignale der deuterierten Lösungsmittel als interner Standard verwendet. Spinmultiplizitäten wurden mit s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), dd (Dublett eines Dubletts), dt (Dublett eines Triplets), m (Multipllett) und br s (breites Singulett) abgekürzt.

ESI-Massenspektren wurden an einem Q-TOF Ultima API Massenspektrometer der Firma WATERS (Milford, Massachusetts, USA) oder einem Bruker ApexQe Hybrid 9.4 T FT-ICR der Firma BRUKER DALTONICS (Bremen, Deutschland) im ESI⁺-Modus aufgenommen. Die Proben wurden als 10⁻⁴ bis 10⁻⁵ molare Lösungen in Methanol/Wasser in die Probenkammer eingebracht.

Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Labor des Anorganisch-Chemischen Instituts der Universität Heidelberg an einem Vario EL der Firma ELEMENTAR (Hanau, Deutschland) durchgeführt.

Die *UV/Vis-Experimente* wurden an einem Varian Cary 100 Bio UV/VIS-Spektrophotometer mit temperierbarem 6-fach Küvettenwechsler der Firma VARIAN (Darmstadt, Deutschland), einem JASCO V-550 UV/VIS-Spektrophotometer mit temperierbarem Küvettenhalter der Firma JASCO (Great Dunmow, Großbritannien) sowie einem Perkin Elmer Lambda Bio der Firma PERKIN ELMER (Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden für die Experimente i. d. R. Kunststoff-UV-Küvetten mikro Plastikbrand (500 μ L) der Firma BRAND (Wertheim, Deutschland) bzw. (CE)Makro-Küvetten PMMA (4,5 mL) der Firma SEMADENI eingesetzt. Wenn dies aufgrund der verwendeten Wellenlänge nicht möglich war, wurden Quarz-Präzisionsküvetten (1400 μ L) der Firma HELIMA (Mülheim, Deutschland) verwendet. Die Schichtdicke betrug jeweils 1 cm.

Für *Fluoreszenzmessungen* wurden ein Varian Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer mit temperierbarem 4-fach Küvettenwechsler der Firma VARIAN und ein Fluo Log handheld Fluorimeter mit austauschbarem Anregungs-/Emissionsfilter der Firma ESE (Stockach, Deutschland) verwendet. Hierbei fanden (CE)Makro-Küvetten PMMA (4,5 mL) der Firma SEMADENI sowie Quarz-Küvetten der Firma HELIMA Verwendung. Die Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten wurde entsprechend der in Kapitel 5.3 angegebenen Methode durchgeführt. Hierbei wurde Chininsulfat als Standard verwendet.

Messungen des pH-Wertes wurden mit einer Mikro-pH-Einstabmesskette der Firma ORION (Cambridge, Massachusetts, USA) durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1.1, 3.1.3 und 5.3.4). Die Elektrode wurde vor jeder Messreihe mit von der Firma SIGMA-ALDRICH erworbenen pH-Stammlösungen (pH 4, pH 7 und pH 10) kalibriert.

Der *Heptest Assay* wurde am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg (Prof. HARENBERG) durchgeführt. Die Messungen erfolgten an einem KC10A Coagulometer der Firma AMELUNG (Lemgo, Deutschland). Die hierfür benötigten Reagenzien Rinder-Faktor Xa und Recalmix wurden von der Firma HAEMACHEM (St. Louis, MO, USA) bezogen.

Der *Faktor Xa Assay* wurde ebenfalls am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg (Prof. HARENBERG) durchgeführt. Die Messungen erfolgten an einem MR 7000 Spektrophotometer der Firma DYNATECH (Rückersdorf, Deutschland). Die Reagenzien Faktor Xa und die Proteinkomponente S-2222 wurden von der Firma CHROMOGENIX (Mailand, Italien), Antithrombin von der Firma DADEBEHRING DIAGNOSTICS (jetzt SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS, Deerfield, IL, USA) bezogen. Für die *Röntgenstrukturanalysen* gilt: Die Bestimmung der Elementarzelle und die Sammlung der Messdaten erfolgte an einem Bruker AXS SMART 1000 der Firma BRUKER (Karlsruhe, Deutschland) mit graphitmonochromatisierter Mo-K $_{\alpha}$ -Strahlung (0,71073 Å) bei 100 K. Die Messwerte wurden bezüglich LORENTZ-, Polarisations- und Absorptionseffekten semiempirisch korrigiert.^[123] Die Lösung

und Verfeinerung wurde mit den Programmen SIR2004^[124] bzw. DIRDIF-2008^[125] und SHELXL-97^[126] durchgeführt. Die in Kapitel 3.1.4 sowie im Anhang dargestellten Abbildungen wurden mit dem Programm ORTEP III^[127] erstellt. Bei den Kristalldaten sowie den Gitterkonstanten sind in Klammern hinter den jeweiligen Werten die Standardabweichungen in Einheiten der letzten Dezimale angegeben.

5.2 Synthesen

Folgende Verbindungen wurden entsprechend der jeweiligen Literaturvorschrift dargestellt: 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure (**I**),^[91] *N*¹-*tert*-Butoxycarbonyl-1,6-diaminohexan (**II**),^[93] 2-Phenylisochinolin (**III**),^[20] Tetrakis(2-phenylpyridin-C,N)(μ_2 -dichloro)diiridium(III) (**IV**),^[6] Tetrakis(2-phenylisochinolin-C,N)(μ_2 -dichloro)diiridium(III) (**V**),^[128] Tetrakis(benzo[*H*]chinolin-C,N)(μ_2 -dichloro)diiridium(III) (**VI**)^[6] und Bis(2-phenylisochinolin)(2,2'-bipyridin)iridium(III)-hexafluorophosphat (**VII**).^[11]

In der Regel wurden die Verbindungen ohne weitere Reaktionsoptimierung synthetisiert. Bei der Aufarbeitung von Verbindung **III** wurde jedoch entgegen der Literaturvorschrift das Rohprodukt mit Hexan extrahiert und bei der säulenchromatographischen Reinigung mit Hexan/Ethylacetat eluiert. Bei der Aufreinigung von Komplex **VII** wurde ebenfalls ein anderes Lösungsmittelgemisch (Dichlormethan/Methanol) als in der Literatur angegeben verwendet. Die erhaltenen Produkte wurden anhand ihrer ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren identifiziert und die Reinheit mit Hilfe von Elementaranalysen bestimmt (vgl. Tabelle 5.1). Lediglich Verbindung **II** konnte nicht elementaranalysenrein isoliert werden.

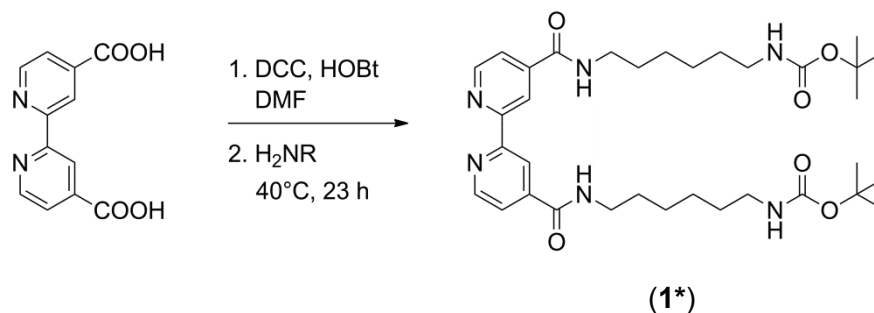
Tabelle 5.1: Auflistung der Elementaranalysenergebnisse für die nach Literaturvorschrift synthetisierten Verbindungen **I** sowie **III–VII**.

Verbindung	C _{gef}	C _{ber}	H _{gef}	H _{ber}	N _{gef}	N _{ber}
I	57,99	59,02	3,39	3,30	11,41	11,47
III	87,50	87,77	5,65	5,40	7,00	6,82
[IV ·H ₂ O]	48,35	48,48	3,20	3,14	5,06	5,14
[V ·CHCl ₃]	51,87	52,64	3,22	2,97	3,97	4,03
[VI ·H ₂ O]	52,51	52,65	3,02	2,89	4,71	4,72
[VII ·2,5 H ₂ O]	50,95	50,74	3,40	3,51	5,71	5,92

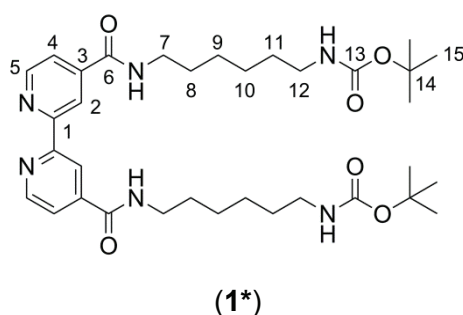
Weitere literaturbekannte Verbindungen, die abweichend von der in der Literatur angegebenen Syntheseroute hergestellt wurden, werden im Folgenden mit einem * gekennzeichnet.

5.2.1 Darstellung der Bipyridinliganden

Synthese von *N,N'*-Bis(6-*N*-tert-butoxycarbonyl-6-aminohexyl)-2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxamid (**1***)



Verbindung **1*** wurde in Anlehnung an eine literaturbekannte Synthese ausgehend von 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure (**I**) synthetisiert.^[84,129] Dazu wurden in einem ausgeheizten Schlenkcolben **I** (55 mg, 225 μmol), *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (139 mg, 676 μmol , 3,0 Äq.) und *N*-Hydroxybenzotriazol (15 mg, 113 μmol , 0,5 Äq.) in absolutem Dimethylformamid (3 mL) gelöst. Anschließend wurde *N'*-tert-Butoxycarbonyl-1,6-diaminohexan **II** (113 mg, 522 μmol , 2,3 Äq.), gelöst in absolutem Dimethylformamid (520 μL), zugetropft und das Reaktionsgemisch 23 h bei 40 °C unter Schutzgasatmosphäre gerührt. Dann wurde demin. Wasser (7 mL) zugegeben, filtriert und der Niederschlag mit demin. Wasser und kaltem Chloroform gewaschen. Das Rohprodukt wurde im evakuierten Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2 , Chloroform:Methanol 99:1 \rightarrow 93:7) konnte das gewünschte Produkt als weißer Feststoff isoliert werden (91 mg, 143 μmol , 63 %).



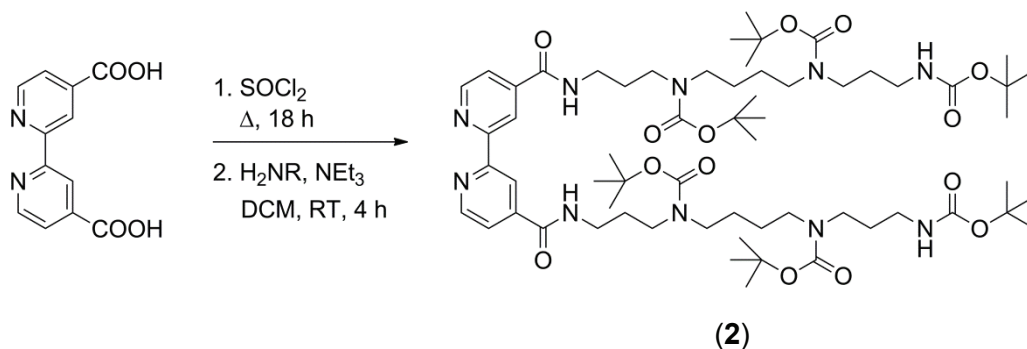
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,41–1,71 (m, 34 H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-15), 3,15 (m, 4 H, H-7), 3,54 (m, 4 H, H-12), 8,35 (m, 2 H, H-4), 8,88 (m, 2 H, H-5), 9,78 (bs, 2 H, H-2).

HR-ESI (MeOH): m/z = 641,40211 [**1***+H]⁺; ber.: 641,40266.

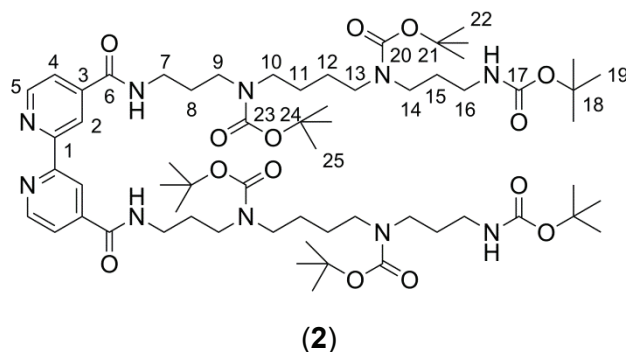
Elementaranalyse: [**1***·0,5 H₂O] (C₃₄H₅₃N₆O_{6,5}) [%]

C 62,81, H 8,02, N 12,76; ber.: C 62,84, H 8,22, N 12,93.

Synthese von $N^4, N^{4'}$ -Bis(N^4, N^9, N^{12} -tri(*tert*-butoxycarbonyl)-12-amino-4,9-diazadodecyl)-2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxamid (2)



Entsprechend einer allgemeinen Literaturvorschrift^[94] wurde in einem ausgeheizten Schlenk- kolben 4,4'-Dicarboxy-2,2'-bipyridin (**I**) (200 mg, 819 μmol) in Thionylchlorid (48 mL) gelöst und über Nacht unter Rückfluss und Schutzgasatmosphäre gerührt. Nach Abkühlen auf Raum- temperatur wurde überschüssiges Thionylchlorid unter vermindertem Druck entfernt. Das entstandene Säurechlorid wurde in absolutem Dichlormethan (12 mL) gelöst und N^1, N^4, N^9 -Tri- (*tert*-butoxycarbonyl)-1,12-diamino-4,9-diazadodecan (823 mg, 1,64 mmol, 2 Äq.) und Triethylamin (224 μL , 1,62 mmol, 2 Äq.), gelöst in absolutem Dichlormethan (10,4 mL), zuge- geben. Es wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von demin. Wasser (22 mL) wurde das Reaktionsgemisch weitere 30 min gerührt. Anschließend wurden die Phasen ge- trennt. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert (30 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit demin. Wasser (3 x 30 mL) und einer gesättig- ten Natriumchlorid-Lösung (30 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das gewünschte Produkt nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2 , Dichlormethan:Methanol 99:1 \rightarrow 24:1) als weißer Feststoff erhalten (717 mg, 591 μmol , 72 %).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,21–1,58 (m, 70 H, H-8, H-11, H-12, H-15, H-19, H-22, H-25), 2,89–3,25 (m, 24 H, H-7, H-9, H-10, H-13, H-14, H-16), 7,56 (m, 2 H, H-4), 8,46–8,66 (m, 4 H, H-2, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 25,32/25,80/27,29/28,86 (CH_2 , C-8, C-11, C-12, C-15), 28,22 (CH_3 , C-19, C-22, C-25), 36,08/37,43/43,32/43,64/44,18/46,65 (CH_2 , C-7, C-9,

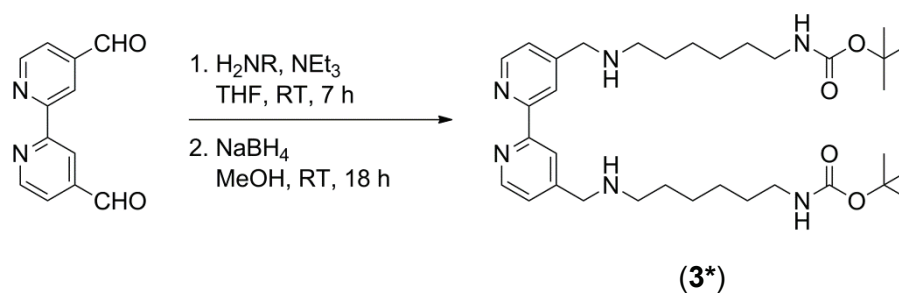
C-10, C-13, C-14, C-16), 78,61 (C_q, C-18), 79,31/79,95 (C_q, C-21, C-24), 118,43 (CH, C-2), 121,52 (CH, C-4), 142,79 (C_q, C-3), 149,75 (CH, C-5), 155,30/156,00/156,52 (C_q, C-17, C-20, C-23, C-3), 165,04 (C_q, C-6).

HR-ESI (MeOH): $m/z = 1213,78062 [2+H]^+$; ber.: 1213,78117.

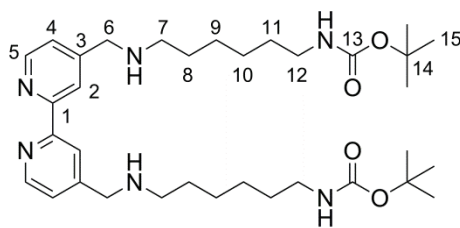
Elementaranalyse: [2·CH₂Cl₂] (C₆₃H₁₀₆Cl₂N₁₀O₁₄) [%]

C 58,79, H 8,27, N 11,15; ber.: C 58,27, H 8,23, N 10,79.

Synthese von 4,4'-Bis(8-N-tert-butoxycarbonyl-8-amino-2-aza-octyl)-2,2'-bipyridin (3*)



Für die Synthese der Verbindung **3** wurde in Analogie zu einer allgemeinen Literaturvorschrift^[95] 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd (50,9 mg, 0,24 mmol) in absolutem Tetrahydrofuran (8,3 mL) gelöst und *N*¹-tert-Butoxycarbonyl-1,6-diaminohexan **II** (110 mg, 0,50 mmol, 2,1 Äq.) sowie Triethylamin (70 µL, 0,50 mmol, 2,1 Äq.), gelöst in absolutem Tetrahydrofuran (5 mL), zugegeben. Es wurde 7 h bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre gerührt und anschließend das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der ölige Rückstand wurde in absolutem Methanol (10 mL) gelöst und unter Rühren Natriumborhydrid (200 mg, 5,29 mmol, 22 Äq.) portionsweise zugegeben. Das Gemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in wenig Ethylacetat aufgenommen und mit demin. Wasser (2 x 5 mL), gesättigter Ammoniumchloridlösung (5 mL) sowie nochmals mit demin. Wasser (5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt. Das gewünschte Produkt wurde als farbloses Öl erhalten (97,4 mg, 0,16 mmol, 66%).



(3*)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,29–1,32 (m, 8 H, H-9, H-10), 1,40–1,44 (m, 22 H, H-11, H-15), 1,48 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,0$ Hz, 4 H, H-8), 2,61 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,0$ Hz, 4 H, H-7), 3,07 (q, $^3J_{\text{H-H}} = 6,1$ Hz, 4 H, H-12), 3,86 (s, 4 H, H-6), 7,30 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 4,8$ Hz, 2 H, H-4), 8,30 (s, 2 H, H-2), 8,59 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 4,8$ Hz, 2 H, H-5).

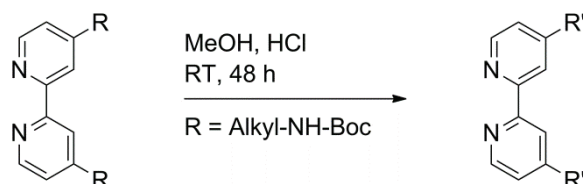
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 26,70/26,97 (CH_2 , C-10, C-11), 28,46 (CH_3 , C-17), 29,72/30,01 (CH_2 , C-9, C-12), 40,52 (CH_2 , C-13), 49,42 (CH_2 , C-8), 52,99 (CH_2 , C-6), 78,94 (C_q , C-16), 120,54 (CH, C-2), 123,12 (CH, C-4), 149,28 (CH, C-5), 150,63 (C_q , C-3), 155,94 (C_q , C-15), 156,11 (C_q , C-1).

HR-ESI (MeOH): $m/z = 613,44414$ [$3^* + \text{H}$] $^+$; ber.: 613,44358.

Elementaranalyse: [$3^* \cdot \text{EtOAc}$] ($\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{N}_6\text{O}_6$) [%]

C 65,82, H 9,11, N 11,75; ber.: C 65,11, H 9,20, N 11,99.

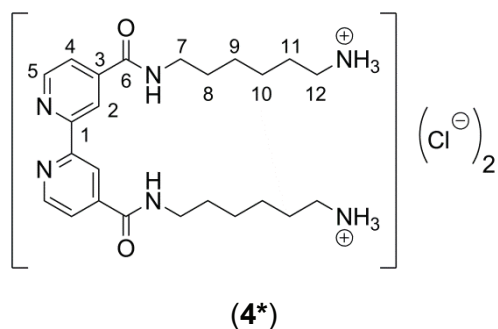
Allgemeine Synthesevorschrift für die Bipyridinderivate 4–6^[96]



Die Bipyridinderivate **4–6** wurden durch Entfernen der *tert*-Butoxycarbonyl-Schutzgruppen aus den Liganden **1–3** erhalten. Hierzu wurde der jeweilige Ligand in einem 1:1-Gemisch aus Methanol und konzentrierter Salzsäure (2 mL, im Weiteren als methanolische Salzsäure bezeichnet) gelöst und 48 h Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Trocknen im Vakuum wurden die gewünschten Produkte in Form der Hydrochloridsalze (nicht elementaranalytisch bestätigt) als farblose Feststoffe erhalten.

Synthese von ($N^4, N^{4'}$ -Bis(6-ammoniumhexyl)-2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxamid)-dichlorid (**4***)

Die Synthese von **4*** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **1*** (12,0 mg, 18,7 μmol). Es wurde ein farbloser Feststoff erhalten (5,4 mg, 10,5 μmol , 56%).



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,34 (m, 8 H, H-9, H-10), 1,58 (m, 8 H, H-8, H-11), 2,90 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 4 H, H-12), 3,64 (t, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, 4 H, H-7), 7,91 (dd, ³J_{H-H} = 5,5 Hz, ⁴J_{H-H} = 1,2 Hz, 2 H, H-4), 8,52 (s, 2 H, H-2), 8,82 (d, ³J_{H-H} = 5,5 Hz, 2 H, H-5).

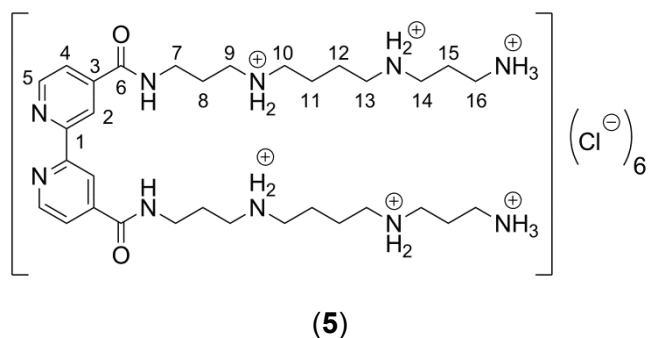
¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 25,22/25,57 (CH₂, C-9, C-10), 26,61/27,98 (CH₂, C-8, C-11), 39,39 (CH₂, C-12), 40,10 (CH₂, C-7), 121,03 (CH, C-2), 123,66 (CH, C-4), 146,05 (C_q, C-3), 148,29 (CH, C-5), 150,87 (C_q, C-1), 166,91 (C_q, C-6).

HR-ESI (MeOH): m/z = 441,29713 [**4***-2Cl-H]⁺; ber.: 441,29713.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 219 (13800), 236 (12700), 295 (8300).

Synthese von (*N*⁴,*N*⁴-Bis(12-ammonium-4,9-diazanium-dodecyl)-2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxamid)-hexachlorid (**5**)

Die Synthese von **5** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **2** (16,0 mg, 13,2 μmol). Es wurde ein farbloser, leicht öliges Feststoff erhalten (7,3 mg, 8,8 μmol , 67 %).



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,78 (m, 8 H, H-11, H-12), 2,06 (m, 8 H, H-8, H-15), 3,12 (m, 20 H, H-9, H-10, H-13, H-14, H-16), 3,56 (t, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, 4 H, H-7), 8,06 (dd, ³J_{H-H} = 5,4 Hz, ⁴J_{H-H} = 1,2 Hz, 2 H, H-4), 8,70 (s, 2 H, H-2), 8,95 (d, ³J_{H-H} = 5,4 Hz, 2 H, H-5).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 22,77/22,81 (CH₂, C-11, C-12), 23,72 (CH₂, C-8), 25,50 (CH₂, C-15), 36,50 (CH₂, C-16), 37,08 (CH₂, C-7), 44,52/45,27 (CH₂, C-10, C-13),

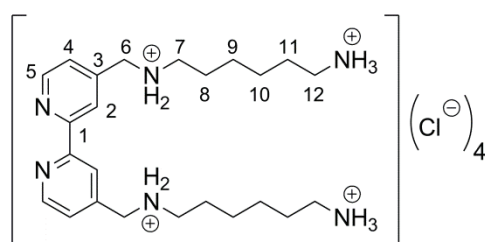
46,98/47,00 (CH₂, C-9, C-14), 121,28 (CH, C-2), 123,93 (CH, C-4), 145,82 (C_q, C-3), 148,20 (CH, C-5), 150,52 (C_q, C-1), 167,21 (C_q, C-6).

HR-ESI (MeOH): $m/z = 613,46636$ [5-6Cl-5H]⁺; ber.: 613,46605.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 219 (19800), 236 (19000), 295 (12300).

Synthese von (4,4'-Bis(8-ammonium-2-azanium-octyl)-2,2'-bipyridin)-tetrachlorid (6*)

Die Synthese von **6*** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **3*** (10,0 mg, 16,3 μmol). Es wurde ein farbloses Öl erhalten (7,8 mg, 16,0 μmol , 98 %).



(6*)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,43 (m, (8 H, H-9, H-10), 1,66 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 4 H, H-8), 1,77 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 4 H, H-11), 2,97 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 4 H, H-7), 3,20 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 4 H, H-12), 4,53 (s, 4 H, H-6), 7,90 (d, ³J_{H-H} = 5,5 Hz, 2 H, H-4), 8,48 (s, 2 H, H-2), 8,89 (d, ³J_{H-H} = 5,5 Hz, 2 H, H-5).

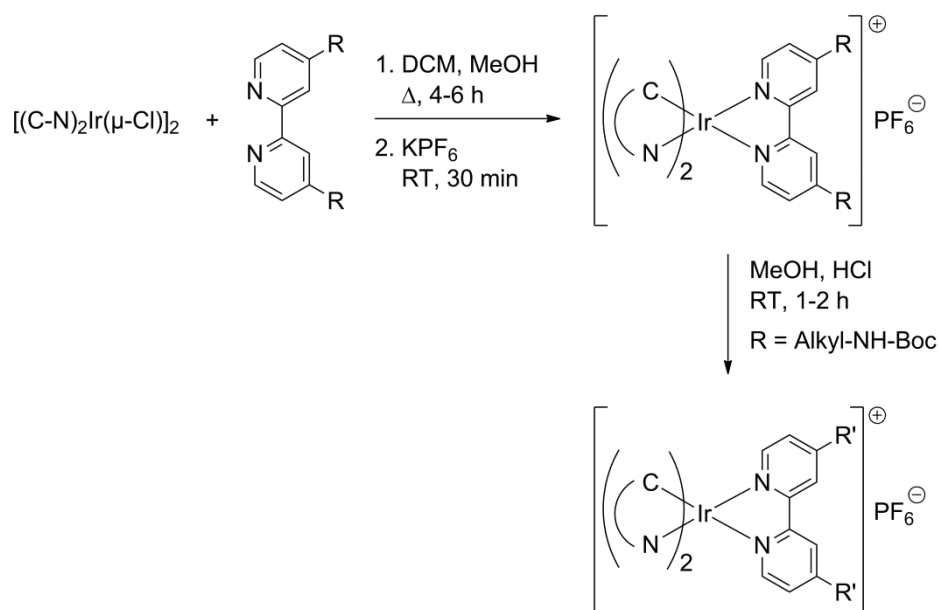
¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 25,13 (CH₂, C-11), 25,24/25,32 (CH₂, C-9, C-10), 26,48 (CH₂, C-8), 39,29 (CH₂, C-7), 48,03 (CH₂, C-12), 49,40 (CH₂, C-6), 123,87 (CH, C-2), 126,58 (CH, C-4), 146,14 (C_q, C-3), 147,76 (CH, C-5), 149,80 (C_q, C-1).

HR-ESI (MeOH): $m/z = 413,33871$ [6*-4Cl-3H]⁺; ber.: 413,33872.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 237 (16500), 285 (18800).

5.2.2 Synthese der Iridiumkomplexe

Allgemeine Synthesevorschrift für die Komplexe 7–20^[27]

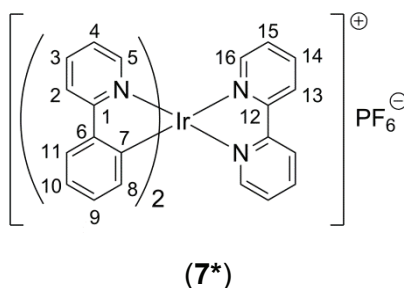


Der entsprechende Diiridiumkomplex Tetrakis(2-phenylpyridin-C,N)(μ_2 -dichloro)diiridium(III) (**IV***), Tetrakis(2-phenylisochinolin-C,N)(μ_2 -dichloro)diiridium(III) (**V***) oder Tetrakis(benzo[*H*]-chinolin-C,N)(μ_2 -dichloro)diiridium(III) (**VI***) (1 Äq.) wurde zusammen mit dem jeweiligen Bipyridinligand **1***, **2** oder **3*** bzw. dem kommerziell erhältlichen 2,2'-Bipyridin oder 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd (2,5 Äq.) in einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde 4–7 h unter Rückfluss und Schutzgasatmosphäre gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Kaliumhexafluorophosphat im Überschuss zugegeben und weitere 30 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , Dichlormethan/Methanol). Die gewünschten Produkte wurden in der Regel als orange bis rötlich gefärbte Feststoffe erhalten.

Bei den aminofunktionalisierten Komplexen **9–11**, **13–15**, **18**, **19**, **20a** und **20b** wurden anschließend die Schutzgruppen durch mehrstündiges Rühren in methanolischer Salzsäure bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss entfernt. In einigen Fällen war eine zusätzliche Reinigung der Komplexe durch Fällung mit Diethylether oder präparative HPLC notwendig. Die Endprodukte wurden meist mit leicht hellerer Färbung als Feststoffe erhalten.

Synthese von *[Bis(2-phenylpyridin-C,N)(2,2'-bipyridin-N,N')iridium(III)]-hexafluorophosphat (7*)*

Die Synthese von **7*** erfolgte in Abwandlung einer Literaturvorschrift^[9,130] gemäß der oben angegebenen Vorgehensweise aus **IV*** (19,0 mg, 17,7 μmol) und 2,2'-Bipyridin (7,1 mg, 45,5 μmol , 2,6 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (3:1, 4 mL). Es wurde 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2 , Dichlormethan:Methanol 199:1 \rightarrow 99:1) wurde ein gelber Feststoff erhalten (28,4 mg, 35,4 μmol , 100%).



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 6,20 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7,5$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 0,9$ Hz, 2 H, H-8), 6,91 (dt, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1,2$ Hz, 2 H, H-9), 7,03 (dt, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 0,9$ Hz, 2 H, H-10), 7,17 (dt, $^3J_{\text{H-H}} = 7,3$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 1,2$ Hz, 2 H, H-3), 7,63 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 5,8$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 0,7$ Hz, 2 H, H-2), 7,71 (m, 2 H, H-14), 7,88 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 5,4$ Hz, $^4J_{\text{H-H}} = 0,9$ Hz, 2 H, H-15), 7,94 (m, 4 H, H-4, H-11), 8,28 (m, 4 H, H-5, H-16), 8,89 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8,2$ Hz, 2 H, H-13).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 120,05 (CH, C-5), 122,28 (CH, C-10), 123,94 (CH, C-3), 125,01/125,08 (CH, C-4, C-13), 128,69 (CH, C-14), 130,25 (CH, C-9), 131,05 (CH, C-8), 138,78 (CH, C-11), 139,67 (CH, C-16), 143,78 (C_q, C-6), 148,88 (CH, C-2), 149,82 (CH, C-15), 150,45 (C_q, C-7), 155,35 (C_q, C-1), 166,79 (C_q, C-12).

HR-ESI (MeOH): $m/z = 657,1663$ [**7***-PF₆]⁺; ber.: 657,1630.

Elementaranalyse: [**7***·2 H₂O] (C₃₂H₂₈F₆N₄O₂P) [%]

C 46,08, H 3,39, N 6,33; ber.: C 45,88, H 3,37, N 6,69.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 262 (31500), 300 (19500), 338 (7900), 375 (5400), 412 (3000), 466 (550).

Emission (H₂O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 310; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 598.

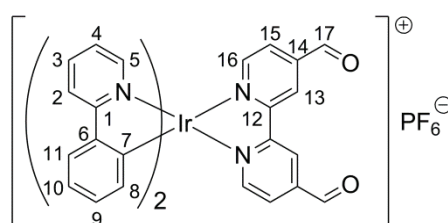
Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 300; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 590.

Quantenausbeute (H₂O): 0,118.

Synthese von [Bis(2-phenylpyridin-C,N)(2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd-N,N')iridium(III)]-hexafluorophosphat (8*)

Die Synthese von **8** erfolgte in Abwandlung einer bereits beschriebenen Synthese^[84] gemäß der oben angegebenen Vorgehensweise aus **IV*** (300 mg, 0,28 mmol) und 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd (148 mg, 0,70 mmol, 2,5 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (1:1, 50 mL). Es wurde 6 h unter Rückfluss gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO₂, Dichlormethan/Methanol 99:1 → 19:1) wurde ein dunkelroter Feststoff erhalten (326 mg, 0,38 mmol, 68 %).

Kristallisation aus Dichlormethan/Diethylether lieferte dunkelrote, nadelförmige Kristalle, die für eine Röntgenstrukturanalyse geeignet waren.



(8*)

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 6,30 (d, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-8), 6,98 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-9), 7,02 (d, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, 2 H, H-3), 7,11 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-10), 7,48 (d, ³J_{H-H} = 5,6 Hz, 2 H, H-2), 7,76 (d, ³J_{H-H} = 7,8 Hz, 2 H, H-11), 7,81 (t, ³J_{H-H} = 8,1 Hz, 2 H, H-4), 7,87 (d, ³J_{H-H} = 5,5 Hz, 2 H, H-15), 7,98 (d, ³J_{H-H} = 8,1 Hz, 2 H, H-5), 8,27 (d, ³J_{H-H} = 5,5 Hz, 2 H, H-16), 9,09 (s, 2 H, H-13), 10,25 (s, 2 H, H-17).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₂Cl₂): δ [ppm] = 120,10 (CH, C-5), 123,24 (CH, C-10), 123,70 (CH, C-3), 124,50 (CH, C-13), 125,04 (CH, C-11), 126,57 (CH, C-15), 130,93 (CH, C-9), 131,56 (CH, C-8), 138,61 (CH, C-4), 143,41/143,51 (C_q, C-6, C-12/14), 148,70 (CH, C-2), 148,78 (C_q, C-7), 152,25 (CH, C-16), 156,91 (C_q, C-12/14), 167,39 (C_q, C-1), 189,44 (CHO, C-17).

HR-ESI (MeOH): m/z = 777,2054 [**8***-PF₆+2 MeOH]⁺; ber.: 777,2053.

Elementaranalyse: [**8***] (C₃₄H₂₄F₆N₄O₂P) [%]

C 47,41, H 3,11, N 6,43; ber.: C 47,61, H 2,82, N 6,53.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} . [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 256 (48900), 306 (21200), 334 (10600), 377 (17300), 411 (3700).

Emission (H₂O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 305; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 610.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 300; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 592.

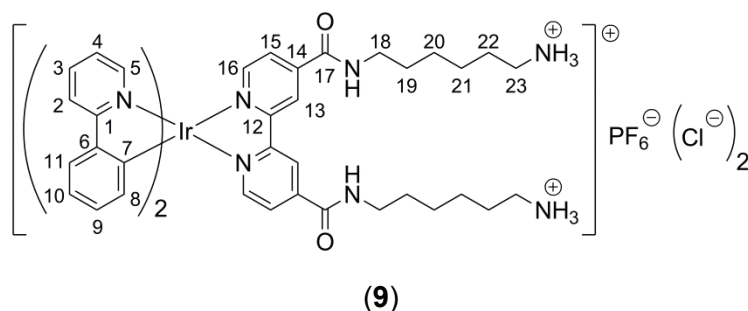
Quantenausbeute (H₂O): 0,034.

Retentionszeit (analytische HPLC): 50,24 min.

Synthese von [Bis(2-phenylpyridin-C,N)(N⁴,N⁴'-bis(6-ammoniumhexyl)-2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxamid-N,N')iridium(III)]-hexafluorophosphat-dichlorid (9)

Die Synthese von **9** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **IV*** (35 mg, 32,6 µmol) und **1*** (44 mg, 69,1 µmol, 2,1 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (3:2, 10 mL). Es wurde 7 h unter Rückfluss gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO₂, Dichlormethan → Dichlormethan/Methanol 97:3) wurde das *tert*-butoxycarbonylgeschützte Zwischenprodukt als roter Feststoff erhalten (82 mg, 63,7 µmol, 98 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (19,4 mg, 15,1 µmol) in methanolischer Salzsäure (4 mL) für 18 h. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das gewünschte Produkt in Form des Hydrochloridsalzes als orangeroter Feststoff erhalten (15,5 mg, 13,4 µmol, 89 %).



¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,39 (m, 8 H, H-20, H-21), 1,63 (m, 8 H, H-19, H-22), 2,96 (t, ³J_{H-H} = 7,4 Hz, 4 H, H-23), 3,39 (t, ³J_{H-H} = 7,4 Hz, 4 H, H-18), 6,26 (d, ³J_{H-H} = 6,9 Hz, 2 H, H-8), 6,95 (t, ³J_{H-H} = 6,9 Hz, 2 H, H-9), 7,01 (t, ³J_{H-H} = 6,9 Hz, 4 H, H-3), 7,10 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-10), 7,63 (d, ³J_{H-H} = 6,0 Hz, 2 H, H-2), 7,70 (d, ³J_{H-H} = 5,7 Hz, 2 H, H-15), 7,86 (m, 4 H, H-4, H-11), 8,09 (d, ³J_{H-H} = 7,6 Hz, 2 H, H-5), 8,19 (d, ³J_{H-H} = 5,7 Hz, 2 H, H-16), 8,86 (s, 2 H, H-13).

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ [ppm] = 25,2/25,6 (CH₂, C-20, C-21), 26,6/28,0 (CH₂, C-19, C-22), 39,4 (CH₂, C-23), 40,2 (CH₂, C-18), 119,8 (CH, C-5), 122,3 (CH, C-13), 123,0/123,4 (CH, C-3, C-10), 124,8 (CH, C-11), 125,5 (CH, C-15), 130,3 (CH, C-9), 131,4 (CH, C-8), 138,6 (CH, C-4), 148,9 (CH, C-2), 151,4 (CH, C-16). C-1, C-6, C-7, C-12 und C-17 konnten nicht beobachtet werden.

HR-ESI (MeOH): *m/z* = 471,19649 [9-PF₆-2Cl-H]²⁺; ber.: 471,19563.

314,46656 [9-PF₆-2Cl]³⁺; ber.: 314,46618.

Elementaranalyse: [9·6 H₂O] (C₄₆H₆₆Cl₂F₆N₈O₈P) [%]

C 43,78, H 5,07, N 8,81; ber.: C 43,60, H 5,25, N 8,84.

UV/Vis (H₂O): λ_{max.} [nm] (ε [M⁻¹·cm⁻¹]) = 262 (47000), 286 (40400), 320 (21800), 368 (10400).

Emission (H₂O): λ_{anr.} [nm] = 310; λ_{em.} [nm] = 660.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 295; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 634.

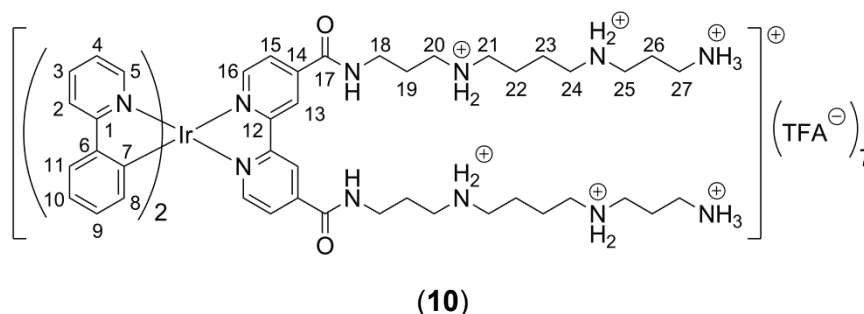
Quantenausbeute (H₂O): 0,006.

Retentionszeit (analytische HPLC): 46,96 min.

Synthese von [Bis(2-phenylpyridin-C,N)(N⁴,N^{4'}-Bis(12-ammonium-4,9-diazanium-dodecyl)-2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxamid-N,N')iridium(III)]-heptakis(trifluoracetat) (10)

Die Synthese von **10** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **IV*** (17,7 mg, 16,5 μmol) und **2** (50,0 mg, 41,2 μmol , 2,5 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (2:1, 48 mL). Es wurde 6 h unter Rückfluss gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO₂, Dichlormethan/Methanol 199:1 \rightarrow 99:1) wurde das *tert*-butoxycarbonylgeschützte Zwischenprodukt als roter Feststoff isoliert (8,5 mg, 4,6 μmol , 14 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (11,2 mg, 6,0 μmol) in methanolischer Salzsäure (6 mL) für 20 h. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde ein roter Feststoff erhalten, welcher mittels präparativer HPLC nochmals gereinigt wurde. Das gewünschte Produkt wurde schließlich in Form des Trifluoracetatsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als roter Feststoff isoliert (3,8 mg, 2,0 μmol , 33 %).



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,70–1,82 (m, 8 H, H-22, H-23), 2,01–2,09 (m, 8 H, H-19, H-26), 3,08–3,13 (m, 20 H, H-20, H-21, H-24, H-25, H-27), 3,49–3,54 (m, 4 H, H-18), 6,35 (d, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-8), 6,93 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-9), 7,02 (t, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, 2 H, H-3), 7,09 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-10), 7,63 (d, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, 2 H, H-2), 7,70 (d, ³J_{H-H} = 5,7 Hz, 2 H, H-15), 7,84–7,87 (m, 4 H, H-4, H-11), 8,08 (d, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, 2 H, H-5), 8,18 (d, ³J_{H-H} = 5,7 Hz, 2 H, H-16), 8,93 (s, 2 H, H-13).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ [ppm] = 22,8/22,8 (CH₂, C-22, C-23), 23,7/25,4 (CH₂, C-19, C-26) 37,1 (CH₂, C-18), 36,5/44,5/45,3/46,9/47,0 (CH₂, C-20, C-21, C-24, C-25, C-27), 120,1 (CH, C-5), 122,6 (CH, C-13), 122,9 (C_q, C-1), 123,0 (CH, C-10), 123,6 (CH, C-3), 125,0 (CH, C-11), 125,3 (C_q, C-14), 125,6 (CH, C-15), 130,6 (CH, C-9), 131,6 (CH, C-8), 138,7 (CH,

C-4), 144,3 (C_q, C-6), 149,1 (CH, C-2), 149,3 (C_q, C-11), 151,8 (CH, C-16), 156,0 (C_q, C-12), 166,7 (C_q, C-17).

HR-ESI (MeOH): $m/z = 371,85576$ [**10**-7TFA-4H]³⁺; ber.: 371,85580.

UV/Vis (H₂O): $\lambda_{\text{max.}}$ [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 255 (47500), 289 (29600), 320 (16700), 369 (8300).

Emission (H₂O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 305; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 665, 705.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 295; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 645.

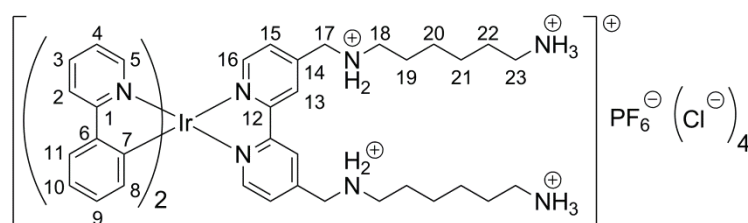
Quantenausbeute (H₂O): 0,008.

Retentionszeit (analytische HPLC): 44,10 min.

Synthese von [Bis(2-phenylpyridin-C,N)(4,4'-bis(8-ammonium-2-azanium-octyl)-2,2'-bipyridin-N,N')iridium(III)]-hexafluorophosphat-tetrachlorid (**11**)

Die Synthese von **11** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **IV*** (37,0 mg, 34,5 μmol) und **3*** (44,5 mg, 72,6 μmol , 2,1 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (1:1, 15 mL). Es wurde 5 h unter Rückfluss gerührt. Das Rohprodukt wurde zunächst in Dichlormethan aufgenommen und mit demin. Wasser (3 x 10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Dichlormethan → Dichlormethan/Methanol 39:1). Die Hauptfraktion lieferte das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt als orangenen Feststoff (85 mg, 67,5 μmol , 98 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch zweitägiges Rühren des Zwischenproduktes (12,0 mg, 9,5 μmol) in methanolischer Salzsäure (2 mL). Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das gewünschte Produkt in Form des Hydrochloridsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als orangegelber Feststoff erhalten (10,5 mg, 8,7 μmol , 92 %).



(**11**)

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,38 (m, 8 H, H-20, H-21), 1,63 (m, 4 H, H-19), 1,73 (m, 4 H, H-22), 2,96 (t, ³J_{H-H} = 7,8 Hz, 4 H, H-18), 3,14 (t, ³J_{H-H} = 7,8 Hz, 4 H, H-23), 4,43 (s, 4 H, H-17), 6,34 (d, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-8), 6,90 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-9), 7,00 (t, ³J_{H-H} = 7,0 Hz, 2 H, H-3), 7,06 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-10), 7,50 (dd, ³J_{H-H} = 5,8 Hz,

$^4J_{\text{H-H}} = 1,1$ Hz, 2 H, H-15), 7,64 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5,4$ Hz, 2 H, H-2), 7,84 (m, 4 H, H-4, H-11), 8,05 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,9$ Hz, 2 H, H-5), 8,10 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5,8$ Hz, 2 H, H-16), 8,66 (s, 2 H, H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): δ [ppm] = 25,09/25,18 (CH_2 , C-20, C-21), 25,26 (CH_2 , C-22), 26,43 (CH_2 , C-19), 39,27 (CH_2 , C-18), 46,23 (CH_2 , C-23), 47,92 (CH_2 , C-17), 118,04 (CH, C-5), 122,78 (CH, C-10), 122,91 (CH, C-3), 124,65 (CH, C-4/11), 124,80 (CH, C-13), 127,95 (CH, C-15), 130,37 (CH, C-9), 131,35 (CH, C-8), 138,45 (CH, C-4/11), 149,05 (CH, C-2), 151,40 (CH, C-16). C-1, C-6, C-7, C-12 und C-14 konnten nicht beobachtet werden.

HR-ESI (MeOH): $m/z = 913,42563$ [**11**- PF_6 -4Cl-4H] $^+$; ber.: 913,42545.

UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 255 (37200), 306 (11700), 337 (5000), 378 (3450), 415 (1640).

Emission (H_2O): λ_{anr} [nm] = 305; λ_{em} [nm] = 620.

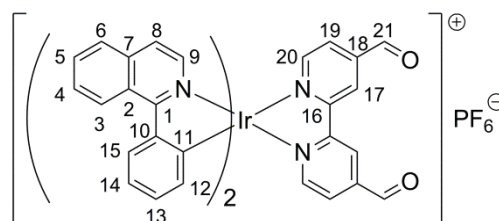
Emission (MeCN): λ_{anr} [nm] = 305; λ_{em} [nm] = 616.

Quantenausbeute (H_2O): 0,052.

Retentionszeit (analytische HPLC): 44,83 min.

Synthese von [Bis(2-phenylisochinolin-C,N)(2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd-N,N')-iridium(III)]-hexafluorophosphat (**12**)

Die Synthese von **12** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **V*** (60,5 mg, 47,6 μmol) und 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd (23,5 mg, 110,7 μmol , 2,3 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (2:1, 27 mL). Es wurde 4,5 h unter Rückfluss gerührt. Das gewünschte Produkt wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2 , Dichlormethan \rightarrow Dichlormethan/Methanol 99:1) als dunkelroter Feststoff erhalten (81,0 mg, 84,6 μmol , 89%).



(**12**)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6,26 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,3$ Hz, 2 H, H-12), 6,92 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,3$ Hz, 2 H, H-13), 7,13 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,3$ Hz, 2 H, H-14), 7,40–7,44 (m, 4 H, H-3, H-4), 7,70–7,76 (m, 6 H, H-5, H-8, H-19), 7,86–7,89 (m, 2 H, H-6), 7,97 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5,5$ Hz, 2 H, H-20), 8,28 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,3$ Hz, 2 H, H-15), 8,92 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,3$ Hz, 2 H, H-9), 9,24 (s, 2 H, H-17), 10,16 (s, 2 H, H-21).

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 122,46 (CH, C-3), 122,74 (CH, C-14), 125,51 (CH, C-19), 126,05 (CH, C-17), 126,24 (C_q , C-2), 126,77 (CH, C-9), 127,70 (CH, C-6, C-19), 128,74 (CH, C-8), 130,67 (CH, C-15), 130,99 (CH, C-13), 131,76 (CH, C-5), 132,11 (CH, C-12), 137,15 (C_q , C-7), 140,48 (CH, C-4), 143,34 (C_q , C-18), 145,35 (C_q , C-10), 151,38 (CH, C-20), 152,33 (C_q , C-11), 157,05 (C_q , C-16), 168,56 (C_q , C-1), 189,98 (CHO, C-21) ppm.

HR-ESI (MeOH): m/z = 877,23542 [$\mathbf{12}$ - PF_6 +2 MeOH] $^+$; ber.: 877,23542.

Elementaranalyse: [$\mathbf{12}$ ·2 H_2O] ($\text{C}_{42}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_4\text{P}$) [%]

C 50,48, H 3,29, N 5,27, ber.: C 50,75, H 3,25, N 5,64.

UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 253 (15800), 291 (18100), 334 (10400), 358 (8400), 382 (5900), 436 (3600).

Emission (H_2O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 350; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 594, 624, 699.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 340; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 594, 630, 698.

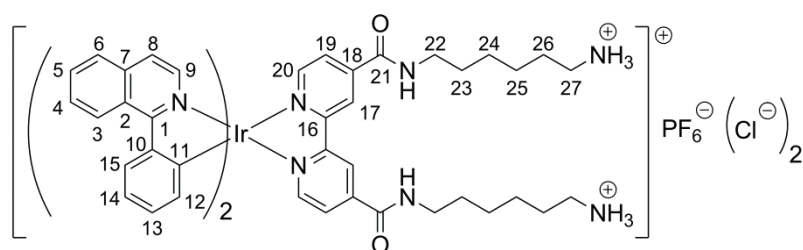
Quantenausbeute (H_2O): 0,249.

Retentionszeit (analytische HPLC): 32,68 min.

Synthese von [Bis(2-phenylisochinolin-C,N)(N^4 , N^4 -bis(6-ammoniumhexyl)-2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxamid-N,N')iridium(III)]-hexafluorophosphat-dichlorid (13**)**

Die Synthese von **13** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **V*** (19,9 mg, 15,6 μmol) und **1*** (25,0 mg, 39,0 μmol , 2,5 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (2:1, 25 mL). Es wurde 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2 , Dichlormethan \rightarrow Dichlormethan/Methanol 99:1) wurde das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt als roter Feststoff erhalten (24,7 mg, 17,8 μmol , 57 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (5,6 mg, 4,0 μmol) in methanolischer Salzsäure (4 mL) für 20 h. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das gewünschte Produkt in Form des Hydrochloridsalzes als roter Feststoff isoliert (4,9 mg, 3,9 μmol , 96 %).



(**13**)

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,33 (m, 8 H, H-24, H-25), 1,55 (m, 8 H, H-23, H-26), 2,89 (m, 4 H, H-27), 3,35 (m, 4 H, H-22), 6,18 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz, 2 H, H-12), 6,93 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz, 2 H, H-13), 7,15 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz, 2 H, H-14), 7,83 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5,7$ Hz, 2 H, H-19), 7,90 (m, 8 H, H-3, H-4, H-5, H-8), 8,03 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5,7$ Hz, 2 H, H-20), 8,10 (m, 2 H, H-6), 8,38 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz, 2 H, H-15), 9,01 (m, 2 H, H-9), 9,46 (bs, 2 H, H-17).

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 25,32/26,73 (CH₂, C-24, C-25), 25,76/28,48 (CH₂, C-23, C-26), 38,48 (CH₂, C-27), 39,22 (CH₂, C-22), 122,28 (CH, C-14), 122,55 (CH, C-17), 126,28 (CH, C-9), 126,29 (CH, C-19), 126,82 (CH, C-6), 127,57/129,25 (CH, C-3/C-4/C-5/C-8), 130,40 (CH, C-13), 130,48 (CH, C-15), 131,28 (CH, C-12), 131,93/131,95 (CH, C-3/C-4/C-5/C-8), 150,30 (CH, C-20). C-1, C-2, C-7, C-10, C-11, C-16, C-18, C-21 konnten nicht beobachtet werden.

HR-ESI (MeOH): $m/z = 1041,41602$ [**13**-PF₆-2Cl-2H]⁺; ber.: 1041,41537.

521,21142 [**13**-PF₆-2Cl-H]²⁺; ber.: 521,21132.

Elementaranalyse: [**13**·8 H₂O] (C₅₄H₇₄Cl₂F₆N₈O₁₀P) [%]

C 46,04, H 5,06, N 7,97; ber.: C 46,22, H 5,32, N 7,99.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 252 (42000), 288 (44900), 350 (17900), 378 (12800), 430 (6500).

Emission (H₂O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 295; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 644, 706.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 290; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 600, 622, 698.

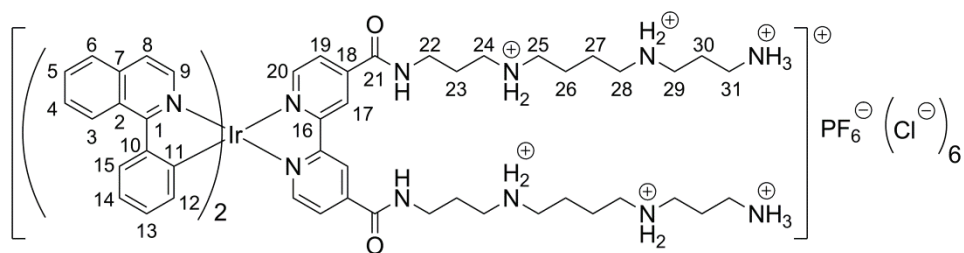
Quantenausbeute (H₂O): 0,020.

Retentionszeit (analytische HPLC): 49,43 min.

Synthese von [Bis(2-phenylisochinolin-C,N)(N⁴,N⁴-bis(12-ammonium-4,9-diazanium-dodecyl)-2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxamid-N,N')iridium(III)]-hexafluorophosphat-hexachlorid (14**)**

Die Synthese von **14** erfolgte in Abwandlung der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **V*** (21,0 mg, 16,5 μmol) und **2** (100,0 mg, 82,4 μmol , 5,0 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (2:1, 48 mL). Es wurde 24 h unter Rückfluss gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO₂, Dichlormethan \rightarrow Dichlormethan/Methanol 99:1) wurde das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt als orangeroter Feststoff isoliert (20,5 mg, 10,6 μmol , 32 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (13,7 mg, 7,6 μmol) in methanolischer Salzsäure (3 mL) für 20 h. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der erhaltene Feststoff mit Diethylether aus Methanol ausgefällt. Das gewünschte Produkt wurde schließlich in Form des Hydrochloridsalzes als roter Feststoff erhalten (6,7 mg, 5,5 μmol , 72 %).



(14)

¹H-NMR (600 MHz, MeOD): δ [ppm] = 1,88 (m, 8 H, H-26, H-27), 2,13 (m, 8 H, H-23, H-30), 3,09–3,16 (m, 20 H, H-24, H-25, H-28, H-29, H-31), 3,61 (m, 4 H, H-22), 6,32 (m, 2 H, H-12), 6,91 (m, 2 H, H-13), 7,16 (m, 2 H, H-14), 7,59 (m, 4 H, H-4, H-5), 7,86 (m, 4 H, H-8, H-19), 8,05 (m, 6 H, H-3, H-6, H-20), 8,40 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,0$ Hz, 2 H, H-15), 9,04 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,1$ Hz, 2 H, H-9), 9,58 (bs, 2 H, H-17).

¹³C-NMR (150 MHz, MeOD): δ [ppm] = 24,6 (CH₂, C-26, C-27), 25,5/26,5 (CH₂, C-23, C-30), 36,7 (CH₂, C-22), 37,7/38,2/44,8/45,1/47,2 (CH₂, C-24, C-25, C-28, C-29, C-31), 123,7 (CH, C-14), 126,5 (CH, C-9), 126,7/127,4 (C-3/C-6), 128,9 (CH, C-8/C-19), 130,4 (CH, C-13), 130,5 (CH, C-15), 131,8 (CH, C-8/C-19), 131,9 (CH, C-12), 151,0 (CH, C-20). C-1, C-2, C-7, C-10, C-11, C-16, C-18 und C-21 konnten nicht beobachtet werden.

HR-ESI (MeOH): $m/z = 405,20111$ [**14**-PF₆⁻-6Cl-4H]³⁺; ber.: 405,19961.

Elementaranalyse: [**14**] (C₆₂H₈₂Cl₆F₆N₁₂O₂P) [%]

C 47,30, H 5,68, N 10,63; ber.: C 47,21, H 5,24, N 10,66.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 252 (54500), 288 (52000), 348 (19700), 378 (14000), 431 (7500).

Emission (H₂O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 295; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 648, 700.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 290; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 620, 656, 696.

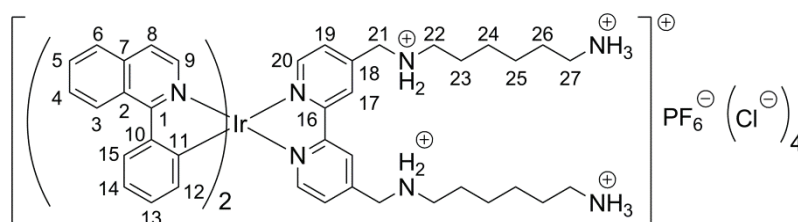
Quantenausbeute (H₂O): 0,027.

Retentionszeit (analytische HPLC): 46,18 min.

Synthese von [Bis(2-phenylisochinolin-C,N)(4,4'-bis(8-ammonium-2-azanium-octyl)-2,2'-bipyridin-N,N')iridium(III)]-hexafluorophosphat-tetrachlorid (15)

Die Synthese von **15** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **V*** (14,0 mg, 11,0 μmol) und **3*** (14,1 mg, 23,0 μmol , 2,1 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (2:1, 30 mL). Es wurde 5 h unter Rückfluss gerührt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Dichlormethan → Dichlormethan/Methanol 39:1). Die Hauptfraktion lieferte das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt als orangenen Feststoff (16,1 mg, 13,3 μmol , 60 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (16,0 mg, 13,2 μmol) in methanolischer Salzsäure (3 mL) für 20 h. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der erhaltene Feststoff zweimal mit Diethylether aus Methanol ausgefällt. Das gewünschte Produkt wurde schließlich in Form des Hydrochloridsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als oranger Feststoff erhalten (1,2 mg, 1,0 μmol , 8%).



(15)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD): δ [ppm] = 1,19 (m, 8 H, H-24, H-25), 1,47 (m, 4 H, H-23), 1,68 (m, 4 H, H-26), 2,93 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,5$ Hz, 4 H, H-22), 3,19 (m, 4 H, H-27), 4,49 (m, 4 H, H-21), 6,32 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,1$ Hz, 2 H, H-12), 6,91 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,9$ Hz, 2 H, H-13), 7,17 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6,9$ Hz, 2 H, H-14), 7,46 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,6$ Hz, 2 H, H-4), 7,54 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,2$ Hz, 2 H, H-3), 7,70 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5,6$ Hz, 2 H, H-8), 7,86 (m, 4 H, H-5, H-19), 7,99 (m, 4 H, H-6, H-20), 8,39 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,9$ Hz, 2 H, H-15), 9,04 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,7$ Hz, 2 H, H-9), 9,18 (s, 2 H, H-17).

HR-ESI (MeOH): $m/z = 1013,45799$ [**15**-PF₆-4Cl-4H]⁺; ber.: 1013,45684.

507,23226 [**15**-PF₆-4Cl-3H]²⁺; ber.: 507,23206.

338,49034 [**15**-PF₆-4Cl-2H]³⁺; ber.: 338,49047.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 250 (15200), 291 (14800), 340 (5800), 380 (3600), 438 (2300).

Emission (H₂O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 295; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 594, 625, 696.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 290; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 592, 628, 700.

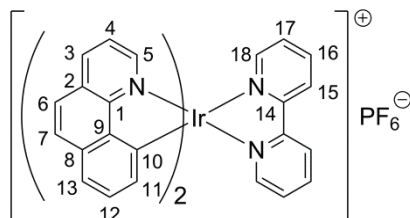
Quantenausbeute (H₂O): 0,097.

Retentionszeit (analytische HPLC): 47,18 min.

Synthese von [Bis(benzo[H]chinolin-C,N)(2,2'-bipyridin-N,N')iridium(III)]-hexafluorophosphat (**16***)

Die Synthese von **16*** erfolgte in Abwandlung einer literaturbekannten Synthese^[131] gemäß der oben genannten allgemeinen Synthesevorschrift aus **VI*** (32,8 mg, 28,1 μmol) und 2,2'-Bipyridin (9,8 mg, 62,7 μmol , 2,2 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (2:1, 15 mL). Es wurde 7 h unter Rückfluss gerührt, anschließend das Lösungsmittel entfernt und der gelbe Rückstand

in Dichlormethan aufgenommen und filtriert. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO₂, Dichlormethan → Dichlormethan:Methanol 199:1) konnte das gewünschte Produkt als gelber Feststoff isoliert werden (39,0 mg, 45,9 μmol, 82 %).



(16*)

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6,32 (d, ³J_{H-H} = 7,2 Hz, 2 H, H-11), 7,17 (t, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-12), 7,30 (t, ³J_{H-H} = 6,9 Hz, 2 H, H-17), 7,46 (m, 2 H, H-4), 7,48 (d, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-13), 7,68 (d, ³J_{H-H} = 8,8 Hz, 2 H, H-7), 7,86 (d, ³J_{H-H} = 8,8 Hz, 2 H, H-6), 7,90 (m, 4 H, H-3, H-18), 8,12 (t, ³J_{H-H} = 7,8 Hz, 2 H, H-16), 8,27 (d, ³J_{H-H} = 8,0 Hz, 2 H, H-5), 8,74 (d, ³J_{H-H} = 8,0 Hz, 2 H, H-15).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 120,5 (CH, C-13), 122,1 (CH, C-4), 123,6 (CH, C-7), 125,6 (CH, C-15), 127,9 (CH, C-17), 129,3 (CH, C-11), 130,0 (CH, C-12), 130,2 (CH, C-6), 137,0 (CH, C-5), 139,8 (CH, C-16), 147,6 (CH, C-3), 150,4 (CH, C-18). C-1, C-2, C-8, C-9, C-10 und C-14 konnten nicht beobachtet werden.

HR-ESI (MeOH): m/z = 705,16079 [**16***-PF₆]⁺; ber.: 705,16266.

Elementaranalyse: [**16***] (C₃₆H₂₄F₆N₄P) [%]

C 50,85, H 3,31, N 6,55; ber.: C 50,88, H 2,85, N 6,59.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 254 (74100), 312 (21000), 350 (14500), 419 (6100).

Emission (H₂O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 310; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 595.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 305; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 596.

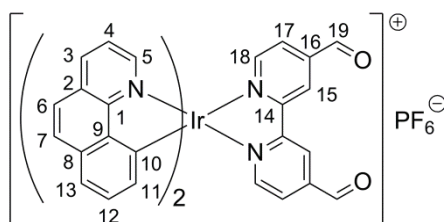
Quantenausbeute (H₂O): 0,068.

Retentionszeit (analytische HPLC): 43,74 min.

Synthese von [Bis(benzo[H]chinolin-C,N)(2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd-N,N')-iridium(III)]-hexafluorophosphat (17)

Die Synthese von **17** erfolgte gemäß der oben genannten allgemeinen Synthesevorschrift aus **VI*** (30,0 mg, 25,7 μmol) und 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd (13,6 mg, 64,2 μmol, 2,5 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (2:1, 15 mL). Nach säulenchromatographischer Reini-

gung (SiO₂, Dichlormethan:Methanol 199:1 → 24:1) wurde das gewünschte Produkt als roter Feststoff erhalten (46,5 mg, 51,3 μmol, 100%).



(17)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 6,18 (d, ³J_{H-H} = 7,3 Hz, 2 H, H-11), 7,20 (t, ³J_{H-H} = 7,3 Hz, 2 H, H-12), 7,56 (m, 4 H, H-4, H-13), 7,90 (m, 2 H, H-6), 7,98 (m, 4 H, H-7, H-17), 8,10 (d, ³J_{H-H} = 5,6 Hz, 2 H, H-18), 8,14 (d, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, 2 H, H-3), 8,59 (d, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, 2 H, H-5), 9,50 (s, 2 H, H-15), 10,18 (s, 2 H, H-19).

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 120,51/120,69 (CH, C-4, C-13), 124,08 (CH, C-6), 124,34 (CH, C-15), 127,54 (CH, C-7/C-17), 128,18 (CH, C-11), 129,37/129,63 (CH, C-12, C-7/C-17), 133,48 (C_q, C-8), 137,05 (C_q, C-2), 137,71 (CH, C-5), 139,74 (C_q, C-9), 143,16 (C_q, C-16), 146,43 (C_q, C-10), 148,92 (CH, C-3), 151,86 (CH, C-18), 155,83 (C_q, C-1), 156,73 (C_q, C-14), 191,07 (CHO, C-19).

HR-ESI (MeOH): *m/z* = 761,15204 [17-PF₆]⁺; ber.: 761,15250.

UV/Vis (H₂O): λ_{max}. [nm] (ε [M⁻¹·cm⁻¹]) = 257 (35300), 284 (19900), 312 (17700), 414 (4300).

Emission (H₂O): λ_{anr.} [nm] = 310; λ_{em.} [nm] = 620.

Emission (MeCN): λ_{anr.} [nm] = 308; λ_{em.} [nm] = 598.

Quantenausbeute (H₂O): 0,020.

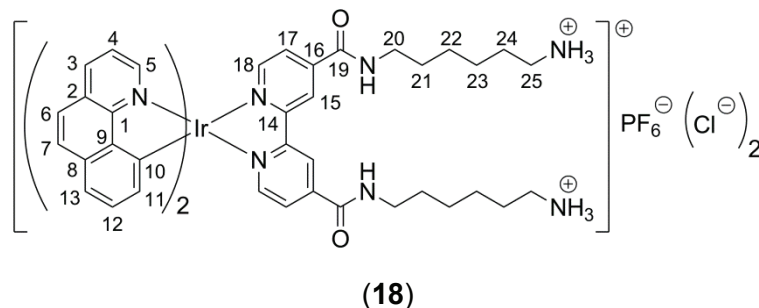
Retentionszeit (analytische HPLC): 51,58 min.

Synthese von [Bis(benzo[H]chinolin-C,N)(N⁴,N^{4'}-bis(6-ammoniumhexyl)-2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxamid-N,N')iridium(III)]-hexafluorophosphat-dichlorid (18)

Die Synthese von **18** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **VI*** (8,6 mg, 7,4 μmol) und **1*** (11,8 mg, 18,4 μmol, 2,5 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (2:1, 15 mL). Es wurde 5 h unter Rückfluss gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO₂, Dichlormethan/Methanol 99:1 → 9:1) wurde das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt als roter Feststoff isoliert (10,0 mg, 7,5 μmol, 51%).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (20,4 mg, 15,3 μmol) in methanolischer Salzsäure (9 mL) für 20 h.

Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das gewünschte Produkt in Form des Hydrochloridsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als roter Feststoff erhalten (16,6 mg, 13,8 μmol , 90 %).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 1,45 (m, 8 H, H-22, H-23), 1,69 (m, 8 H, H-21, H-24), 2,92 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,3$ Hz, 4 H, H-25), 3,46 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,0$ Hz, 4 H, H-20), 6,29 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz, 2 H, H-11), 7,17 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz, 2 H, H-12), 7,52 (m, 4 H, H-4, H-13), 7,80 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8,8$ Hz, 2 H, H-6), 7,85 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5,7$ Hz, 2 H, H-17), 7,93 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8,8$ Hz, 2 H, H-7), 8,09 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,6$ Hz, 2 H, H-3), 8,11 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5,7$ Hz, 2 H, H-18), 8,46 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,6$ Hz, 2 H, H-5), 9,41 (s, 2 H, H-15).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_2Cl_2): δ [ppm] = 26,91 (CH_2 , C-22, C-23), 27,33/28,38 (CH_2 , C-21, C-24), 40,56 (CH_2 , C-25), 41,06 (CH_2 , C-20), 121,83 (CH, C-13), 123,42 (CH, C-4), 123,99 (CH, C-15), 124,94 (CH, C-6), 127,50 (CH, C-17), 128,74 (C_q , C-2), 130,09 (CH, C-11), 130,95 (CH, C-12), 131,05 (CH, C-7), 135,81 (C_q , C-8), 138,68 (CH, C-5), 141,69 (C_q , C-9), 145,49 (C_q , C-16), 147,38 (C_q , C-10), 149,53 (CH, C-3), 152,80 (CH, C-18), 158,14 (C_q , C-14), 158,29 (C_q , C-1), 165,31 (C_q , C-19).

HR-ESI (MeOH): $m/z = 989,38488$ [$\mathbf{18}\text{-PF}_6\text{-2Cl-2H}$] $^+$; ber.: 989,38402.

UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 254 (36600), 285 (21100), 322 (15300), 354 (8400), 398 (4500).

Emission (H_2O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 300; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 604.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 315; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 632.

Quantenausbeute (H_2O): 0,012.

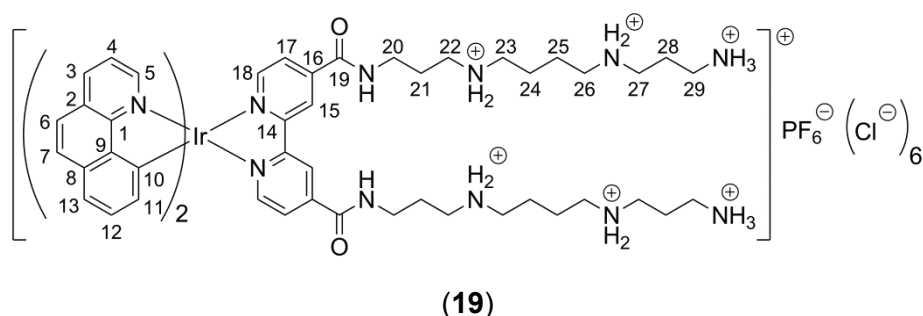
Retentionszeit (analytische HPLC): 48,23 min.

Synthese von [Bis(benzo[*H*]chinolin-*C,N*)(*N*⁴,*N*^{4'}-bis(12-ammonium-4,9-diazanium-dodecyl)-2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxamid-*N,N'*)iridium(III)]-hexafluorophosphat-hexachlorid (19)

Die Synthese von **19** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **VI*** (13,5 mg, 11,5 μmol) und **2** (35,0 mg, 28,8 μmol , 2,5 Äq.) in Dichlormethan/Methanol

(2:1, 36 mL). Es wurde 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2 , Dichlormethan/Methanol 99:1 \rightarrow 24:1) wurde das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt als roter Feststoff isoliert (25,7 mg, 13,5 μmol , 59 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (25,7 mg, 13,5 μmol) in methanolischer Salzsäure (4,5 mL) für 6 h. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das gewünschte Produkt in Form des Hydrochloridsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als roter Feststoff isoliert (15,9 mg, 10,4 μmol , 77 %).



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 1,75 (m, 8 H, H-24, H-25), 2,05 (m, 8 H, H-21, H-28), 3,10 (m, 20 H, H-22, H-23, H-26, H-27, H-29), 3,48 (m, 4 H, H-20), 6,08 (m, 2 H, H-11), 6,89 (m, 2 H, H-12), 7,05–7,52 (m, 6 H, H-4, H-6, H-13), 7,60–7,85 (m, 4 H, H-7, H-17), 7,87–8,15 (m, 4 H, H-3, H-18), 8,20–8,48 (m, 2 H, H-5), 9,00 (bs, 2 H, H-15).

HR-ESI (MeOH): m/z = 387,8523 [**19**- PF_6^- -6Cl-6H] $^+$; ber.: 387,85582.

UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 255 (50200), 286 (30500), 321 (23900), 355 (12500), 401 (7500).

Emission (H_2O): λ_{anr} [nm] = 310; λ_{em} [nm] = 673.

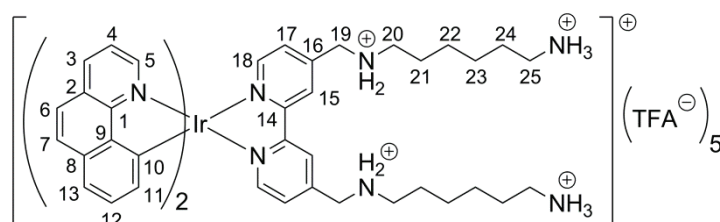
Quantenausbeute (H_2O): 0,005.

Retentionszeit (analytische HPLC): 45,30 min.

Synthese von [Bis(benzo[H]chinolin-C,N)(4,4'-bis(8-ammonium-2-azanium-octyl)-2,2'-bipyridin-N,N')iridium(III)]-pentakis(trifluoracetat) (20a)

Die Synthese von **20a** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **VI*** (24,3 mg, 20,8 μmol) und **3*** (27,0 mg, 44,1 μmol , 2,1 Äq.) in Dichlormethan/Methanol (2:1, 36 mL). Es wurde 3 h unter Rückfluss gerührt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2 , Dichlormethan \rightarrow Dichlormethan/Methanol 195:1) wurde das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt als orangeroter Feststoff isoliert (44,6 mg, 34,1 μmol , 82 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (10,2 mg, 7,8 μmol) in methanolischer Salzsäure (4 mL) für 20 h. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde ein oranger Feststoff erhalten, welcher mittels präparativer HPLC nochmals gereinigt wurde. Das gewünschte Produkt wurde schließlich in Form des Trifluoracetatsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als oranger Feststoff isoliert (1,92 mg, 1,3 μmol , 17 %).



(20a)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1,33 (m, 8 H, H-22, H-23), 1,61 (m, 8 H, H-21, H-24), 2,93 (m, 4 H, H-20), 3,04 (m, 4 H, H-25), 4,33 (m, 4 H, H-19), 6,31 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,2$ Hz, 2 H, H-11), 7,05 (m, 2 H, H-12), 7,28 (m, 2 H, H-17), 7,44 (m, 2 H, H-4), 7,50 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,4$ Hz, 2 H, H-13), 7,77 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz, 2 H, H-7), 7,87 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,4$ Hz, 2 H, H-6), 8,00 (m, 2 H, H-18), 8,02 (m, 2 H, H-3), 8,39 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,7$ Hz, 2 H, H-5), 8,60 (s, 2 H, H-15).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O): δ [ppm] = 25,0 (CH_2 , C-22, C-23), 25,3 (CH_2 , C-24), 26,4 (CH_2 , C-21), 39,2 (CH_2 , C-20), 47,9 (CH_2 , C-25), 49,2 (CH_2 , C-19), 120,6 (CH, C-13), 122,3 (CH, C-4), 124,3 (CH, C-7), 124,6 (CH, C-15), 127,8 (CH, C-17), 128,6 (CH, C-11), 129,3 (CH, C-6), 129,8 (CH, C-12), 137,3 (CH, C-5), 148,2 (CH, C-3), 151,8 (CH, C-18). C-1, C-2, C-8, C-9, C-10, C-14 und C-16 konnten nicht beobachtet werden.

HR-ESI (MeOH): $m/z = 961,42475$ [20a-5TFA-4H] $^+$; ber.: 961,42549.

UV/Vis (H_2O): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 220 (75500), 252 (53800), 285 (sh, 30300), 308 (24400), 340 (sh, 15500), 404 (5000), 458 (1300).

Emission (H_2O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 310; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 605.

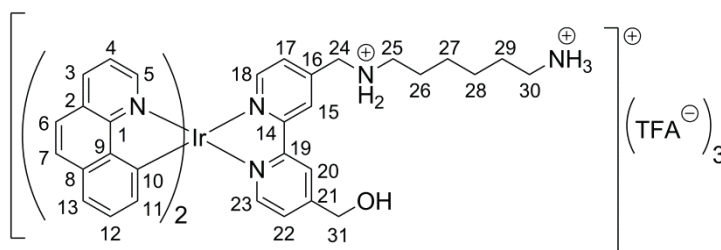
Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 308; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 610.

Quantenausbeute (H_2O): 0,077.

Retentionszeit (analytische HPLC): 46,02 min.

Synthese von [Bis(benzo[H]chinolin-C,N)(4-(8-ammonium-2-azanium-octyl)-4'-hydroxymethyl)-2,2'-bipyridin-N,N']iridium(III)]-tris(trifluoracetat) (20b)

Verbindung **20b** konnte als Nebenprodukt der Synthese von **20a** bei der Aufreinigung mittels präparativer HPLC in Form des Trifluoracetatsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als oranger Feststoff isoliert werden (0,34 mg, 0,28 μmol , 4 %).



(20b)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1,34 (m, 4 H, H-27, H-28), 1,61 (m, 2 H, H-26), 1,65 (m, 2 H, H-29), 2,93 (m, 2 H, H-25), 3,07 (m, 2 H, H-30), 4,35 (m, 2 H, H-24), 4,81 (m, 2 H, H-31), 6,35 (m, 2 H, H-11), 7,10 (m, 2 H, H-12), 7,19 (m, 1 H, H-17), 7,30 (m, 1 H, H-22), 7,43 (m, 4 H, H-4, H-13), 7,51 (m, 2 H, H-7), 7,80 (m, 2 H, H-6), 7,89 (m, 1 H, H-18), 8,02 (m, 1 H, H-23), 8,05 (m, 2 H, H-3), 8,41 (m, 2 H, H-5), 8,51 (m, 1 H, H-15), 8,63 (m, 1 H, H-20).

HR-ESI (MeOH): m/z = 863,30476 [**20b**-3TFA-2H] $^+$; ber.: 863,30464.

432,15609 [**20b**-3TFA-H] $^{2+}$; ber.: 432,15596.

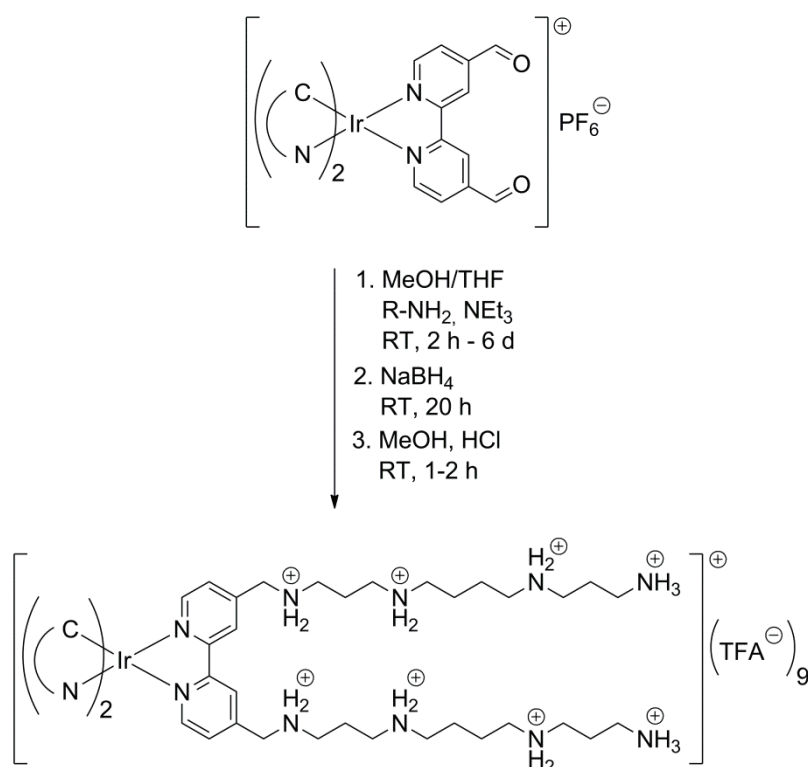
UV/Vis (H_2O): λ_{max} . [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 220 (58200), 252 (40300), 284 (sh, 23400), 310 (19500), 354 (sh, 10000), 412 (4300), 458 (2400).

Emission (H_2O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 310; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 605.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 310; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 602.

Quantenausbeute (H_2O): 0,063.

Retentionszeit (analytische HPLC): 47,90 min.

Allgemeine Synthesevorschrift für die Komplexe 21a, 21b, 22 und 23^[102]


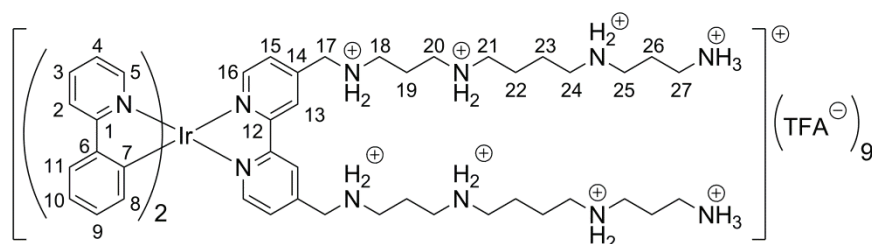
Die Komplexe **21a**, **21b**, **22** und **23** wurden durch reduktive Aminierung ausgehend von den zuvor synthetisierten Komplexen **8***, **12** und **17** hergestellt. Dazu wurde der entsprechende Carboxaldehyd-funktionalisierte Komplex **8***, **12** oder **17** (1 Äq.) in absolutem Methanol oder Tetrahydrofuran gelöst und unter Rühren *N*¹,*N*⁴,*N*⁹-Tri(*tert*-butoxycarbonyl)-1,12-diamino-4,9-diazadodecan (4 Äq.) sowie ein Überschuss Triethylamin, gelöst in absolutem Methanol oder Tetrahydrofuran, hinzugegeben. Es wurde 2 h bis 6 d unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde Natriumborhydrid im Überschuss zugegeben und weitere 20 h bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Dichlormethan/Methanol).

Anschließend wurden die Schutzgruppen durch mehrstündiges Rühren in methanolischer Salzsäure bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch präparative HPLC (vgl. Kapitel 5.1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Trocknen im Vakuum konnte das gewünschte Endprodukt in Form des Trifluoracetatsalzes als orangegelber Feststoff erhalten werden.

Synthese von [Bis(2-phenylpyridin-C,N)(4,4'-bis(14-ammonium-2,6,11-triazanium-tetradecyl)-2,2'-bipyridin-N,N')iridium(III)]-nonakis(trifluoracetat) (21a)

Die Synthese von **21a** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **8*** (12,7 mg, 14,8 μmol), N^1, N^4, N^9 -Tri(*tert*-butoxycarbonyl)-1,12-diamino-4,9-diazadodecan (30,6 mg, 60,9 μmol , 4,1 Äq.) und Triethylamin (53,8 μL , 386,0 μmol , 26,1 Äq.) in Methanol (9 mL). Es wurde 6 d bei Raumtemperatur gerührt, dann erfolgte die Zugabe von Natriumborhydrid (20,0 mg, 528,7 μmol , 35,7 Äq.). Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2 , Dichlormethan \rightarrow Dichlormethan/Methanol 4:1) wurde das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt als orangegelber Feststoff isoliert (26,0 mg, 14,3 μmol , 97 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (6,0 mg, 3,3 μmol) in methanolischer Salzsäure (0,5 mL) für 18 h. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Aufreinigen mittels präparativer HPLC wurde das gewünschte Produkt in Form des Trifluoracetatsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als gelber Feststoff isoliert (0,64 mg, 0,3 μmol , 2 %).



(21a)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1,73 (m, 8 H, H-22, H-23), 2,05 (m, 4 H, H-19), 2,10 (m, 4 H, H-26), 3,07 (m, 16 H, H-20, H-21, H-24, H-25), 3,12 (m, 8 H, H-18, H-27), 4,40 (m, 4 H, H-17), 6,37 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 7,5$ Hz, 2 H, H-8), 6,95 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,5$ Hz, 2 H, H-9), 7,00 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,0$ Hz, 2 H, H-3), 7,02 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7,5$ Hz, 2 H, H-10), 7,52 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5,1$ Hz, 2 H, H-15), 7,62 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,1$ Hz, 2 H, H-2), 7,85 (m, 4 H, H-4, H-11), 8,08 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 6,6$ Hz, 2 H, H-5), 8,11 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5,4$ Hz, 2 H, H-16), 8,57 (s, 2 H, H-13).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O): δ [ppm] = 22,7 (CH_2 , C-22, C-23), 23,1 (CH_2 , C-26), 23,8 (CH_2 , C-19), 36,4 (CH_2 , C-20), 44,5 (CH_2 , C-18), 44,9 (CH_2 , C-25), 46,6 (CH_2 , C-27), 46,9 (CH_2 , C-21, C-24), 49,8 (CH_2 , C-17), 120,0 (CH, C-5), 122,8 (CH, C-10), 123,7 (CH, C-3), 124,8 (CH, C-13), 125,0 (CH, C-4/C-11), 127,9 (CH, C-15), 130,6 (CH, C-9), 131,6 (CH, C-8), 138,8 (CH, C-4/C-11), 148,9 (CH, C-2), 151,3 (CH, C-16). C-1, C-6, C-7, C-12 und C-14 wurden nicht beobachtet.

ESI (MeOH): $m/z =$ 1085,4 [**21a**-9TFA-8H] $^+$
543,3 [**21a**-9TFA+7H] $^{2+}$
362,7 [**21a**-9TFA-6H] $^{3+}$.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} . [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 255 (34500), 305 (sh, 17000), 376 (5300), 412 (sh, 3000), 458 (1700).

Emission (H₂O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 300; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 602.

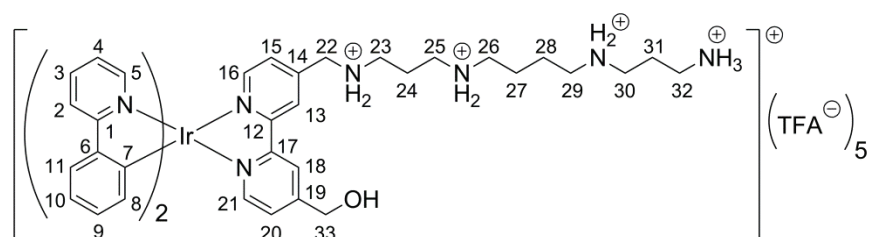
Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 302; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 602.

Quantenausbeute (H₂O): 0,129.

Retentionszeit (analytische HPLC): 43,72 min.

Synthese von [Bis(2-phenylpyridin-C,N)(4-(14-ammonium-2,6,11-triazanium-tetradecyl)-4'-hydroxymethyl-2,2'-bipyridin-N,N')iridium(III)]-pentakis(trifluoracetat) (21b)

Verbindung **21b** konnte als Nebenprodukt der Synthese von **21a** bei der Aufreinigung mittels präparativer HPLC in Form des Trifluoracetatsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als gelber Feststoff isoliert werden (0,66 mg, 0,45 μmol , 3 %).



(21b)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,74 (m, 4 H, H-27, H-28), 2,07 (m, 2 H, H-24), 2,10 (m, 2 H, H-31), 3,07 (m, 8 H, H-25, H-26, H-29, H-30), 3,12 (m, 4 H, H-23, H-32), 4,38 (m, 2 H, H-22), 4,85 (m, 2 H, H-33), 6,38 (m, 2 H, H-8), 6,95 (m, 2 H, H-9), 7,01 (m, 2 H, H-3), 7,10 (m, 2 H, H-10), 7,40 (m, 1 H, H-15), 7,46 (m, 1 H, H-20), 7,63 (m, 2 H, H-2), 7,85 (m, 4 H, H-4, H-11), 7,99 (m, 1 H, H-16), 8,09 (m, 3 H, H-5, H-21), 8,48 (m, 1 H, H-13), 8,59 (m, 1 H, H-18).

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ [ppm] = 22,7 (CH₂, C-27, C-28), 23,1 (CH₂, C-31), 23,7 (CH₂, C-24), 36,6 (CH₂, C-25), 44,7 (CH₂, C-23), 44,9 (CH₂, C-30), 46,8 (CH₂, C-32), 47,2 (CH₂, C-26, C-29), 49,8 (CH₂, C-22), 119,8 (CH, C-5), 121,4 (CH, C-13), 122,7 (CH, C-10), 123,5 (CH, C-3), 124,3 (CH, C-18), 125,1 (CH, C-4/C-11), 125,7 (CH, C-15), 127,8 (CH, C-20), 130,6 (CH, C-9), 131,7 (CH, C-8), 138,8 (CH, C-4/C-11), 149,1 (CH, C-2), 151,3 (CH, C-21). C-1, C-6, C-7, C-12, C-14, C-16, C-17 und C-19 wurden nicht beobachtet.

ESI (MeOH): m/z = 457,2 [21b-5TFA-3H]²⁺.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} . [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 255 (38500), 305 (sh, 19200), 376 (5900), 406 (sh, 3800), 458 (2100).

Emission (H₂O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 304; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 602.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 302; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 602.

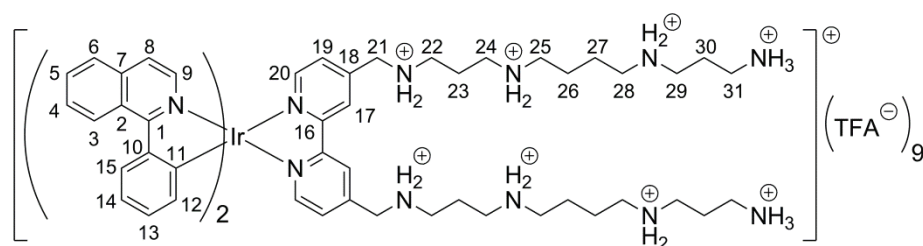
Quantenausbeute (H₂O): 0,115.

Retentionszeit (analytische HPLC): 45,72 min.

Synthese von [Bis(2-phenylisochinolin-C,N)(4,4'-bis(14-ammonium-2,6,11-triazanium-tetradecyl)-2,2'-bipyridin-N,N')iridium(III)]-nonakis(trifluoracetat) (22)

Die Synthese von **22** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **12** (30,0 mg, 31,3 μmol), *N*¹,*N*⁴,*N*⁹-Tri(*tert*-butoxycarbonyl)-1,12-diamino-4,9-diazadodecan (63,0 mg, 125,3 μmol , 4,0 Äq.) und Triethylamin (34,8 μL , 150,6 μmol , 8,0 Äq.) in absolutem Methanol (12 mL). Es wurde 2 d bei Raumtemperatur gerührt, dann erfolgte die Zugabe von Natriumborhydrid (20,0 mg, 528,7 μmol , 16,9 Äq.). Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO₂, Dichlormethan \rightarrow Dichlormethan/Methanol 9:1) wurde das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt als oranger Feststoff isoliert (25,0 mg, 12,9 μmol , 41 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (25,0 mg, 12,9 μmol) in methanolischer Salzsäure (3 mL) für 20 h. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Aufreinigen mittels präparativer HPLC wurde das gewünschte Produkt in Form des Trifluoracetatsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als orangegelber Feststoff isoliert (3,5 mg, 1,4 μmol , 11 %).



(22)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,78 (m, 8 H, H-26, H-27), 2,07 (t, ³*J*_{H-H} = 7,3 Hz, 4 H, H-23), 2,17 (t, ³*J*_{H-H} = 6,8 Hz, 4 H, H-30), 3,05 (m, 12 H, H-22, H-25, H-28), 3,13 (m, 8 H, H-24, H-29), 3,25 (t, ³*J*_{H-H} = 6,6 Hz, 4 H, H-31), 4,42 (s, 4 H, H-21), 6,30 (d, ³*J*_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-12), 6,90 (t, ³*J*_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-13), 7,16 (t, ³*J*_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-14), 7,42 (d, ³*J*_{H-H} = 6,4 Hz, 2 H, H-4), 7,50 (d, ³*J*_{H-H} = 6,4 Hz, 2 H, H-5), 7,64 (d, ³*J*_{H-H} = 5,6 Hz, 2 H, H-19), 7,86 (m, 4 H, H-3, H-8), 7,95 (d, ³*J*_{H-H} = 5,6 Hz, 2 H, H-20), 7,99 (dd, ³*J*_{H-H} = 7,5 Hz, ⁴*J*_{H-H} = 0,7 Hz, 2 H, H-6), 8,38 (d, ³*J*_{H-H} = 7,5 Hz, 2 H, H-15), 8,95 (s, 2 H, H-17), 9,04 (d, ³*J*_{H-H} = 7,0 Hz, 2 H, H-9).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, D_2O): δ [ppm] = 22,7 (CH_2 , C-26, C-27), 22,9 (CH_2 , C-30), 23,9 (CH_2 , C-23), 36,3 (CH_2 , C-22), 44,4 (CH_2 , C-24, C-29), 46,7 (CH_2 , C-25, C-28), 49,5 (CH_2 , C-21), 121,6 (CH, C-4), 122,1 (CH, C-14), 125,2 (CH, C-17), 126,5 (CH, C-9), 127,2 (CH, C-6), 128,4 (CH, C-19), 128,8 (CH, C-8), 130,4 (CH, C-13), 130,5 (CH, C-15), 131,7 (CH, C-12), 131,8 (CH, C-3), 140,0 (CH, C-5), 150,6 (CH, C-20). C-1, C-2, C-7, C-10, C-11, C-16 und C-18 wurden nicht beobachtet.

HR-ESI (MeOH): m/z = 1185,62864 [**22-9TFA-8H**] $^+$; ber.: 1185,62576.

UV/Vis (H_2O): λ_{max} . [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]) = 236 (50900), 290 (37000), 340 (15600), 355 (sh, 15100), 378 (sh, 10700), 433 (5600).

Emission (H_2O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 294; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 594, 624, 696.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 290; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 591, 624, 696.

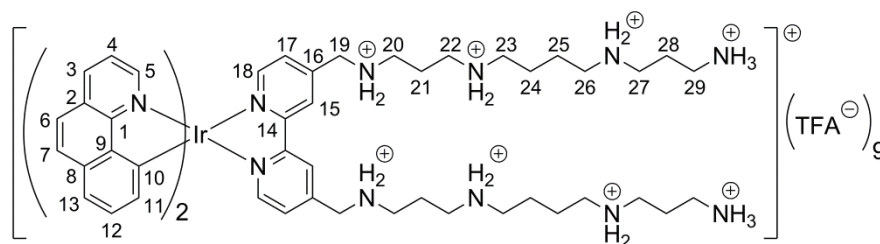
Quantenausbeute (H_2O): 0,417.

Retentionszeit (analytische HPLC): 46,26 min.

Synthese von [Bis(benzo[H]chinolin-C,N)(4,4'-bis(14-ammonium-2,6,11-triazanium-tetradecyl)-2,2'-bipyridin-N,N')iridium(III)]-nonakis(trifluoracetat) (23)

Die Synthese von **23** erfolgte gemäß der oben angegebenen allgemeinen Synthesevorschrift aus **17** (14,0 mg, 15,4 μmol), N^1, N^4, N^9 -Tri(*tert*-butoxycarbonyl)-1,12-diamino-4,9-diazadodecan (31,0 mg, 61,4 μmol , 4,0 Äq.) und Triethylamin (8,6 μL , 61,7 μmol , 4,0 Äq.) in absolutem Tetrahydrofuran (8 mL). Es wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend das Lösungsmittel entfernt, der gelbe Rückstand in absolutem Methanol (5 mL) aufgenommen und Natriumborhydrid (5,0 mg, 132,0 μmol , 8,6 Äq.) zugegeben. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2 , Dichlormethan \rightarrow Dichlormethan/Methanol 19:1) wurde das *tert*-butoxycarbonyl-geschützte Zwischenprodukt als oranger Feststoff isoliert (25,2 mg, 13,4 μmol , 87 %).

Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte gemäß obiger Synthesevorschrift durch Rühren des Zwischenproduktes (16,8 mg, 8,9 μmol) in methanolischer Salzsäure (4,5 mL) für 48 h. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Aufreinigen mittels präparativer HPLC wurde das gewünschte Produkt in Form des Trifluoracetatsalzes (nicht elementaranalytisch bestätigt) als orangegelber Feststoff isoliert (3,0 mg, 1,4 μmol , 16 %).



(23)

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] = 1,72 (m, 8 H, H-24, H-25), 2,10 (m, 8 H, H-21, H-28), 3,07 (m, 20 H, H-20, H-22, H-23, H-26, H-27), 3,20 (m, 4 H, H-29), 4,40 (m, 4 H, H-19), 6,26 (m, 2 H, H-11), 6,96 (m, 2 H, H-12), 7,32 (m, 2 H, H-17), 7,41 (m, 4 H, H-4, H-13), 7,72 (m, 2 H, H-7), 7,81 (m, 2 H, H-6), 7,99 (m, 4 H, H-3, H-18), 8,36 (m, 2 H, H-5), 8,60 (m, 2 H, H-15).

¹³C-NMR (150 MHz, D₂O): δ [ppm] = 22,60 (CH₂, C-24, C-25), 22,66 (CH₂, C-28), 23,68 (CH₂, C-21), 36,41 (CH₂, C-22), 44,25 (CH₂, C-27), 44,45 (CH₂, C-20), 44,85 (CH₂, C-29), 46,90/46,95 (CH₂, C-23, C-26), 49,38 (CH₂, C-19), 120,65 (CH, C-4), 122,38 (CH, C-13), 124,41 (CH, C-7), 124,87 (CH, C-15), 127,89 (CH, C-17), 128,68 (CH, C-11), 129,22 (CH, C-6), 129,71 (CH, C-12), 137,63 (CH, C-5), 148,55 (CH, C-3), 151,98 (CH, C-18).

HR-ESI (MeOH): m/z = 567,30097 [**23**-9TFA-7H]²⁺; ber.: 567,30083.

UV/Vis (H₂O): λ_{\max} . [nm] (ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]) = 221 (83800), 250 (59500), 285 (sh, 31800), 310 (26800), 348 (sh, 15000), 408 (5500), 458 (2400).

Emission (H₂O): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 310; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 606.

Emission (MeCN): $\lambda_{\text{anr.}}$ [nm] = 310; $\lambda_{\text{em.}}$ [nm] = 614.

Quantenausbeute (H₂O): 0,118.

Retentionszeit (analytische HPLC): 44,87 min.

5.3 Allgemeine Arbeitstechniken und Analysemethoden

5.3.1 Herstellung der Stammlösungen

Zur Herstellung der für die Untersuchungen verwendeten Stammlösungen wurden die Substanzen in Eppendorfgefäße eingewogen und in hochreinem Wasser mit HPLC-Qualität gelöst. Im Falle der Komplexe wurden vorhandene Gegenionen oder Kristallwasser bei der Berechnung der Konzentration entsprechend vorhandener Elementaranalysen berücksichtigt. Lag keine Elementaranalyse der Substanz vor, wurden lediglich die zu erwartenden

Gegenionen in die Berechnung mit einbezogen. In der Regel wurden Lösungen der Konzentrationen 10 mM und 1 mM hergestellt, für einzelne Experimente wurden diese unter Umständen weiter verdünnt. Aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit wurde für die Herstellung der Stammlösungen von Verbindung **VII***, **7***, **8***, **12**, **13**, **16***, **17** und **18** Dimethylsulfoxid statt Wasser verwendet.

Für die verschiedenen Glykosaminoglykane und sulfatierten Polysaccharide wurde die jeweilige Molmasse der am häufigsten auftretenden Disaccharideinheit der Berechnung der Konzentration zu Grunde gelegt (vgl. Tabelle 5.2 und Abbildung 1.5).^[53,132] Zusätzlich gelten für die klinische Aktivität der Heparine UFH, Dalteparin-Natrium (Fragmin[®]) und Enoxaparin (Clexane[®]) die in Tabelle 5.2 genannten Zusammenhänge, welche den Herstellerangaben entnommen sind. Die Molmasse des synthetischen Pentasaccharids Fondaparinux-Natrium (Arixtra[®]) ist ebenfalls in Tabelle 5.2 aufgeführt.

Tabelle 5.2: Molmassen der am häufigsten auftretenden Disaccharideinheiten der verwendeten Glykosaminoglykane und sulfatierten Polysaccharide sowie klinische Aktivität der eingesetzten Heparine

Glykosaminoglykan	Molmasse pro Disaccharid [g·mol ⁻¹]	Aktivität [IE/mg]
Hyaluronsäure (HA)	417	
Heparansulfat (HS)	532	
Dermatansulfat (DS)	503	
Chondroitinsulfat (CS)	503	
Oversulfated Chondroitinsulfat (OSCS)	810	
Dextransulfat	792	
Fondaparinux-Natrium (Arixtra [®])	691	
UFH	665	170
Dalteparin-Natrium (Fragmin [®])	665	156
Enoxaparin (Clexane [®])	665	100

Die Stammlösungen der verwendeten Heparinoligosaccharide wurden basierend auf den Herstellerangaben für die Molmassen hergestellt. Tabelle 5.3 enthält eine Übersicht über die entsprechenden Angaben.

Tabelle 5.3: Molmassen der verwendeten Heparinoligosaccharide definierter Kettenlänge.

Heparinoligosaccharid	Molmasse pro Oligosaccharid [g·mol ⁻¹]	Heparinoligosaccharid	Molmasse pro Oligosaccharid [g·mol ⁻¹]
HO-6	1800	HO-14	4100
HO-8	2400	HO-20	5750
HO-10	3000	HO-26	7400
HO-12	3550		

5.3.2 Aufnahme von Anregungs- und Emissionsspektren

Anregungs- und Emissionsspektren wurden an einem Varian Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer in PMMA-Einwegküvetten (Wasser) oder Präzisionsquarzküvetten (Acetonitril) mit einem Probevolumen von 1 mL in einer Konzentration von 5 µM aufgenommen. Es wurden ausschließlich hochreine Lösungsmittel mit HPLC-Qualität verwendet. Die Messungen erfolgten bei einer Detektorspannung U_D von 730 V sowie 800 V unter Verwendung einer automatischen Filterkorrektur und eines Glättungsfaktors von 15 nach Savitzky-Golay. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Als Anregungswellenlänge diente das jeweilige Absorptionsmaximum der Verbindung, welches in der Regel zwischen 250 nm und 320 nm lag.

5.3.3 Bestimmung der Emissionsquantenausbeuten

Die Emissionsquantenausbeuten der synthetisierten Iridiumkomplexe wurden als relative Emissionsquantenausbeuten nach der Methode der optisch verdünnten Lösungen bestimmt.^[133] Diese Methode basiert auf dem relativen Vergleich des Emissionsspektrums einer zu untersuchenden Substanz mit dem einer Referenzsubstanz bekannter absoluter Quantenausbeute. Zur Berechnung wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\Phi = \Phi_R \cdot \frac{I \cdot A_R \cdot n^2}{I_R \cdot A \cdot n_R^2}$$

Gleichung 5.1: Berechnung von relativen Emissionsquantenausbeuten. Φ_R = Quantenausbeute der Referenzsubstanz, I bzw. I_R = integrierte Emissionsintensität der Testsubstanz bzw. der Referenzsubstanz, A bzw. A_R = Absorption der Testsubstanz bzw. der Referenzsubstanz bei 310 nm, n bzw. n_R = Brechungsindex des Lösungsmittels der Probe bzw. der Referenzsubstanz, n (Wasser) = 1,35^[134] und n_R (1 M Schwefelsäure) = 1,38.^[135]

Um einen linearen Zusammenhang zwischen Absorption und Intensität der Emission der Testsubstanzen zu gewährleisten, wurden verdünnte wässrige Lösungen im Konzentrationsbereich 0-3 µM verwendet, sodass die Absorption den Wert 0,05 nicht überschritt. Als

Referenzsubstanz wurde Quininsulfat in 1 M Schwefelsäure im gleichen Konzentrationsbereich verwendet, dessen Quantenausbeute in der Literatur mit 0,564 angegeben ist.^[11]

Sowohl von der Referenzsubstanz als auch vom zu untersuchenden Komplex wurden Absorptionsspektren im Bereich 290–330 nm ($T = 25\text{ °C}$) sowie Emissionsspektren im Bereich 550–700 nm (Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{anr.}} = 310\text{ nm}$, Detektorspannung $U_D = 800\text{ V}$, $T = 25\text{ °C}$) aufgenommen. Anschließend wurde die integrierte Emissionsintensität gegen die Absorption bei 310 nm aufgetragen und über eine lineare Regression die jeweilige Steigung bestimmt. Diese entspricht dem Term $\frac{I}{A}$ bzw. $\frac{I_R}{A_R}$ in Gleichung 5.1.

5.3.4 Untersuchung der pH-Abhängigkeit von Absorption und Emission

Es wurden 10 μM Lösungen der Verbindungen **4–6**, **9–11**, **13–15**, **18** und **19** bzw. 5 μM Lösungen der Verbindungen **20a**, **20b**, **21a** und **21b** mit einer Natriumchloridkonzentration von 0,1 M in hochreinem Wasser mit HPLC-Qualität hergestellt. Die Lösungen wurden durch Zugabe von 1 M, 0,1 M und 0,01 M Salzsäure bzw. Natronlauge auf pH-Werte im Bereich 2–12 eingestellt, wobei der pH-Wert mit einer Mikro-pH-Einstabmesskette überprüft wurde. Nach Einstellen des pH-Wertes wurde ein Absorptionsspektrum (**4–6**) bzw. ein Emissionsspektrum (**7–23**) aufgenommen, wobei als Anregungswellenlänge das jeweilige Absorptionsmaximum der Verbindung im Bereich um 305 nm verwendet wurde. Alle Messungen wurden in PMMA-Einwegküvetten mit einem Probenvolumen von 1–2 mL bei 25 °C durchgeführt. Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte unter Verwendung einer automatischen Filterkorrektur und eines Glättungsfaktors von 15 nach Savitzky-Golay bei einer Detektorspannung U_D von 700–900 V. Für die Auswertungen wurde die Intensität von Absorption bzw. Emission am jeweiligen Maximum gegen den pH-Wert aufgetragen.

5.3.5 Untersuchung der Wechselwirkung mit Glykosaminoglykanen und anderen sulfatierten Polysacchariden

Alle Untersuchungen wurden in PMMA-Einwegküvetten mit einem Probenvolumen von 1 mL bei 25 °C durchgeführt. Als Lösungsmittel diente hochreines Wasser mit HPLC-Qualität, wobei der pH-Wert mit Hilfe eines MOPS-Puffers (10 mM) auf pH 7,0 eingestellt wurde. Die Konzentrationen der Reagenzien sowie die gewählte Detektorspannung U_D variierten je nach Messung und sind bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Graphen in der Beschriftung angegeben. Alle Spektren wurden unter Verwendung einer automatischen Filterkorrektur und eines Glättungsfaktors von 15 nach Savitzky-Golay aufgenommen.

Zur Untersuchung der Wechselwirkung der Iridiumkomplexe **9–11**, **13–15** und **18–23** mit Glykosaminoglykanen wurde zunächst der jeweilige Komplex vorgelegt und ein Emissions-

spektrum aufgenommen. Als Anregungswellenlänge diente hierbei das entsprechende Absorptionsmaximum im Bereich um 305 nm. Anschließend wurde schrittweise der jeweilige Analyt zugegeben und die Änderung der Emission verfolgt. Für die Auswertung wurde in der Regel die Intensitätsänderung am jeweiligen Emissionsmaximum gegen die Konzentration an Analyt aufgetragen, wobei die Anfangsintensität des reinen Farbstoffes auf 1 normiert wurde. Lediglich bei den Verbindungen **15** und **22** wurde die Anfangsintensität auf 100 normiert.

Zur Untersuchung der Stabilität der gebildeten Komplex-Analyt-Addukte wurde der jeweilige Komplex mit dem entsprechenden Analyten vorgelegt, schrittweise NaCl (0–4 M) zugegeben und die Änderung der Emission verfolgt. Um Verdünnungseffekte sowie eine eventuelle Beeinflussung der Farbstoffemission durch die zugegebenen Chloridionen zu berücksichtigen, wurden auch jeweils die entsprechenden Volumenäquivalente an Natriumchloridlösung zu einer weiteren Komplexlösung ohne Heparin gegeben und die Emission bei Zugabe verfolgt. Die gemessenen Werte wurden als Referenzwerte von den jeweiligen Spektren der Farbstoff-Heparin-Mischungen subtrahiert. Die korrigierte Anfangsintensität vor Zugabe von NaCl wurde jeweils auf 100 normiert.

Die Verbindungen **10** und **22** wurden zusätzlich hinsichtlich der Wechselwirkung mit Heparin und Dextransulfat in serum-, plasma- oder urinhaltigen Lösungen untersucht. Hierzu wurde einer gepufferten wässrigen Lösung fötales Kälberserum, humanes Standardnormalplasma oder Eigenurin, welcher zuvor zentrifugiert wurde, in unterschiedlicher Menge (0-100 Vol.-%) beigemischt, anschließend der jeweilige Komplex zugegeben und ein Emissionsspektrum aufgenommen. Die Zugabe von Analyt sowie die Auswertung der Messung erfolgten wie oben für gepufferte Lösungen beschrieben. Zur Optimierung der Nachweisempfindlichkeit wurde außerdem der Einfluss unterschiedlicher Mengen an Additiven analysiert. Diese waren im Einzelnen: Natrium-*p*-toluolsulfonsäure (NapTS), Cetyltrimethylammoniumchlorid (CTAC), Triethylbenzylammoniumchlorid (TBAC), Phenol, Katechol und Natriumacetat. Durchführung und Auswertung der Messungen erfolgte wie oben für gepufferte Lösungen beschrieben.

Untersuchungen zum Nachweis einzelner Analyten A in Gegenwart eines Überschusses an konkurrierendem Analyt B wurden wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde der jeweilige Komplex mit verschiedenen Mengen an entsprechendem Analyt A in unterschiedlichen Mengenverhältnissen gemischt und die Emissionsspektren aufgenommen. Anschließend wurde schrittweise Analyt B zugegeben und die Änderung der Emission verfolgt.

5.3.6 Heptest Assay^[88]

Der Testansatz wurde wie folgt hergestellt: 5 µL Heparin (1 IE/mL), 40 µL gepooltes Plasma, 5 µL der zu messenden Substanz in der jeweiligen Verdünnung und 50 µL Faktor Xa wurden

zusammenpipettiert und 2 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µL zuvor auf 37 °C erwärmtes Recalmix hinzugegeben und die Gerinnungszeit gemessen.

Es wurden Lösungen folgender Konzentrationen der Testsubstanzen verwendet: 100 µM, 50 µM, 30 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM und 2,5 µM. Getestet wurde der Einfluss auf die Gerinnungszeit in Anwesenheit von niedermolekularem Heparin (Dalteparin-Natrium) und hochmolekularem Heparin (UFH). Bei den aufgetragenen Werten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils zwei Messreihen.

5.3.7 Chromogener Faktor-Xa Assay^[88]

Für den Testansatz wurde das entsprechende Heparin mit 0,9%-iger NaCl-Lösung so verdünnt, dass in der zu messenden Probe Endkonzentrationen von 0,25 IE/mL, 0,125 IE/mL, 0,0625 IE/mL und 0,03125 IE/mL erhalten wurden. Ebenso wurde die zu messende Probe mit 0,9%-iger NaCl-Lösung so verdünnt, dass folgende Endkonzentrationen erhalten wurden: 16 µM, 8 µM, 4 µM, 2 µM, 2 µM, 1 µM, 0,5 µM und 0,25 µM. Der Testansatz wurde in Mikrotiterplatten gemessen und folgendermaßen hergestellt: 25 µL Standard (Probe + Heparin), 25 µL gepooltes Plasma (1:5 mit TRIS-Puffer verdünnt), 25 µL Antithrombin (0,1 IU/mL) und 25 µL Faktor Xa wurden zusammenpipettiert und 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µL S-2222 zugegeben und weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurden 50 µL 50%-ige Essigsäure hinzugegeben und die Konzentration an gebildetem *p*-Nitroanilin photometrisch bestimmt (405 nm). Als Blindprobe wurde eine Lösung ohne Heparin gemessen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer, New York 2006.
- [2] L. Baù, P. Tecilla, F. Mancin, *Nanoscale* 2011, 3, 121–133.
- [3] P.-T. Chou, Y. Chi, *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 380–395.
- [4] K. K.-W. Lo, S. P.-Y. Li, K. Y. Zhang, *New J. Chem.* 2011, 35, 265–287.
- [5] A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 102. überarb. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin 2007, S. 1704 ff.
- [6] S. Sprouse, K. A. King, P. J. Spellane, R. J. Watts, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 6647–6653.
- [7] R. J. Watts, J. S. Harrington, J. van Houten, *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 2179–2187.
- [8] A. Juris, V. Balzani, F. Barigelletti, S. Campagna, P. Belser, A. von Zelewsky, *Coord. Chem. Rev.* 1988, 84, 85–277.
- [9] Y. Ohsawa, S. Sprouse, K. A. King, M. K. DeArmond, K. W. Hanck, R. J. Watts, *J. Phys. Chem.* 1987, 91, 1047–1054.
- [10] M. S. Lowry, S. Bernhard, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 7970–7977.
- [11] Q. Zhao, S. Liu, M. Shi, C. Wang, M. Yu, L. Li, F. Li, T. Yi, C. Huang, *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, 6152–6160.
- [12] P. Coppo, E. A. Plummer, L. De Cola, *Chem. Commun.* **2004**, 1774–1775.
- [13] K. Dedeian, J. Shi, N. Shepherd, E. Forsythe, D. C. Morton, *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 4445–4447.
- [14] A. B. Tamayo, S. Garon, T. Sajoto, P. I. Djurovich, I. M. Tsyba, R. Bau, M. E. Thompson, *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 8723–8732.
- [15] R. Ragni, E. Orselli, G. S. Kottas, O. H. Omar, F. Babudri, A. Pedone, F. Naso, G. M. Farinola, L. De Cola, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 136–148.
- [16] X. Li, B. Minaev, H. Ågren, H. Tian, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 2517–2524.
- [17] R. C. Evans, P. Douglas, C. J. Winscom, *Coord. Chem. Rev.* **2006**, 250, 2093–2126.
- [18] W.-Y. Wong, C.-L. Ho, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 4457–4482.
- [19] V. V. Grushin, N. Herron, D. D. LeCloux, W. J. Marshall, V. A. Petrov, Y. Wang, *Chem. Commun.* **2001**, 1494–1495.
- [20] A. Tsuboyama, H. Iwawaki, M. Furugori, T. Mukaide, J. Kamatani, S. Igawa, T. Moriyama, S. Miura, T. Takiguchi, S. Okada, M. Hoshino, K. Ueno, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 12971–12979.
- [21] V. K. Rai, M. Nishiura, M. Takimoto, Z. Hou, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5726–5728.
- [22] Md. K. Nazeeruddin, R. Humphry-Baker, D. Berner, S. Rivier, L. Zuppiroli, M. Graetzel, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8790–8797.
- [23] H. J. Bolink, E. Coronado, R. D. Costa, N. Lardiés, E. Ortí, *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 9149–9151.

- [24] H.-C. Su, H.-F. Chen, F.-C. Fang, C.-C. Liu, C.-C. Wu, K.-T. Wong, Y.-H. Liu, S.-M. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3413–3419.
- [25] E. Baranoff, J.-H. Yum, M. Graetzel, Md. K. Nazeeruddin, *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 2661–2670.
- [26] M. H. Lim, H. Song, E. D. Olmon, E. E. Dervan, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 5392–5397.
- [27] K. K.-W. Lo, C.-K. Chung, T. K.-M. Lee, L.-H. Lui, K. H.-K. Tsang, N. Zhu, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6886–6897.
- [28] H. Chen, Q. Zhao, Y. Wu, F. Li, H. Yang, T. Yi, C. Huang, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 11075–11081.
- [29] K. K.-W. Lo, K. H.-K. Tsang, K.-S. Sze, C.-K. Chung, T. K.-M. Lee, K. Y. Zhang, W.-K. Hui, C.-K. Li, J. S.-Y. Lau, D. C.-M. Ng, N. Zhu, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 2292–2310.
- [30] K. K.-W. Lo, C.-K. Chung, N. Zhu, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1500–1512.
- [31] K. K.-W. Lo, C.-K. Chung, N. Zhu, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 475–483.
- [32] a) D.-L. Ma, W.-L. Wong, W.-H. Chung, F.-Y. Chan, P.-K. So, T.-S. Lai, Z.-Y. Zhou, Y.-C. Leung, K.-Y. Wong, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3795–3799; b) D.-L. Ma, W.-L. Wong, W.-H. Chung, F.-Y. Chan, P.-K. So, T.-S. Lai, Z.-Y. Zhou, Y.-C. Leung, K.-Y. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3735–3739.
- [33] K. K.-W. Lo, K. Y. Zhang, C.-K. Chung, K. Y. Kwok, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7110–7120.
- [34] Q. Zhao, F. Li, S. Liu, M. Yu, Z. Liu, T. Yi, C. Huang, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 9256–9264.
- [35] W.-J. Xu, S.-J. Liu, X.-Y. Zhao, S. Sun, S. Cheng, T.-C. Ma, H.-B. Sun, Q. Zhao, W. Huang, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7125–7133.
- [36] a) M. Licini, J. A. G. Williams, *Chem. Commun.* **1999**, 1943–1944; b) K. J. Arm, W. Leslie, J. A. G. Williams, *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 1222–1232.
- [37] S. Aoki, Y. Matsuo, S. Ogura, H. Ohwada, Y. Hisamatsu, S. Moromizato, M. Shiro, M. Kitamura, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 806–818.
- [38] L. H. Fischer, M. I. J. Stich, O. S. Wolfbeis, N. Tian, E. Holder, M. Schäferling, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10857–10863.
- [39] K. K.-W. Lo, M.-W. Louie, K. Y. Zhang, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2603–2622.
- [40] M. Yu, Q. Zhao, L. Shi, F. Li, Z. Zhou, H. Yang, T. Yi, C. Huang, *Chem. Commun.* **2008**, 2115–2117.
- [41] W. Jiang, Y. Gao, Y. Sun, F. Ding, Y. Xu, Z. Bian, F. Li, J. Bian, C. Huang, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 3252–3260.
- [42] J. S.-Y. Lau, P.-K. Lee, K. H.-K. Tsang, C. H.-C. Ng, Y.-W. Lam, S.-H. Cheng, K. K.-W. Lo, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 708–718.
- [43] R. J. Linhardt, T. Toida, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 431–438.
- [44] J. McLean, *Am. J. Physiol.* **1916**, *41*, 250–257.
- [45] A. S. Perlin, M. Mazurek, L. B. Jaques, L. W. Kavanagh, *Carbohydr. Res.* **1968**, *7*, 369–379.

- [46] R. Hänsel, O. Sticher (Hrsg.), *Pharmakognosie – Phytopharmazie*, 9. Aufl., Springer, Heidelberg, **2010**, S. 599 ff.
- [47] N. Volpi, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1799–1810.
- [48] D. L. Rabenstein, *Nat. Prod. Res.* **2002**, *19*, 312–331.
- [49] Q. Chen, X. L. Li, Q. Liu, Q. C. Jiao, W. G. Cao, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1513–1519.
- [50] J. T. Gallagher, A. Walker, *Biochem. J.* **1985**, *230*, 665–674.
- [51] N. Volpi, *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 263–278.
- [52] B. Li, J. Suwan, J. G. Martin, F. Zhang, Z. Zhang, D. Hoppensteadt, M. Clark, J. Fareed, R. J. Linhardt, *Biochem. Pharm.* **2009**, *78*, 292–300.
- [53] M. Megyesi, L. Biczók, H. Görner, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 556–561.
- [54] a) I. Capila, R. J. Linhardt, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 426–450; b) I. Capila, R. J. Linhardt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 390–412.
- [55] G. W. Yip, M. Smollich, M. Götte, *Mol. Cancer. Ther.* **2006**, *5*, 2139–2148.
- [56] S. Haas (Hrsg.), *Niedermolekulare Heparine*, Springer, Heidelberg **2006**.
- [57] S. Radoff, I. Danishefsky, *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *215*, 163–170.
- [58] a) M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3180–3196; b) M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3118–3133.
- [59] H. C. Hemker, S. Beguin, *Thromb. Haemost.* **1993**, *70*, 724–728.
- [60] J. R. Bishop, M. Schuksz, J. D. Esko, *Nature* **2007**, *446*, 1030–1037.
- [61] K. R. B. Melo, A. Gutierrez, F. D. Nascimento, M. K. F. S. Araújo, M. U. Sampaio, A. K. Carmona, Y. M. Coulson-Thomas, E. S. Trindade, H. B. Nader, I. L. S. Tersariol, G.-Motta, *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 145–155.
- [62] A. V. Dix, L. Fischer, S. Sarrazin, C. P. D. Redgate, J. D. Esko, Y. Tor, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2302–2310.
- [63] H. Watanabe, Y. Yamada, K. Kimata, *J. Biochem.* **1998**, *124*, 687–693.
- [64] a) M. T. Bayliss, *Biochem. Soc. Trans.* **1990**, *18*, 799–802; b) P. Roughley, D. Martens, J. Rantakokko, M. Alini, F. Mwale, J. Antoniou, *Eur. Cell. Mater.* **2006**, *11*, 1–7.
- [65] K. Sugahara, T. Mikami, T. Uyama, S. Mizuguchi, K. Nomura, H. Kitagawa, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 612–620.
- [66] T. Maruyama, T. Toida, T. Imanari, G. Yu, R. J. Linhardt, *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*, 35–43.
- [67] a) H. Liu, Z. Zhang, R. J. Linhardt, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 313–321; b) L. B. Schwartz, *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 2505 – 2509.
- [68] M. Guerrini, D. Beccati, Z. Shriver, A. Naggi, K. Viswanathan, A. Nisio, I. Capila, J. C. Lansing, S. Guglieri, B. Fraser, A. Al-Hakim, N. S. Gunay, Z. Zhang, L. Robinson, L. Buhse, M. Nasr, J. Woodcock, R. Langer, G. Venkataraman, R. J. Linhardt, B. Casu, G. Torri, R. Sasisekharan, *Nat. Biotechn.* **2008**, *26*, 669–675.
- [69] U. Hadding, M. Dietrich, W. König, M. Limbert, H. U. Schorlemmer, D. Bitter-Suermann, *Eur. J. Immunol.* **1973**, *3*, 527–529.
- [70] G. J. Despotis, G. Gravlee, K. Filos, J. Levy, *Anesthesiology* **1999**, *91*, 1122–1151.

- [71] a) Z. Zhong, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9014–9015; b) A. T. Wright, Z. Zhong, E. V. Anslyn, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5825–5828; c) A. T. Wright, Z. Zhong, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5679–5682.
- [72] T. Mecca, G. M. L. Consoli, C. Geraci, R. La Spina, F. Cunsolo, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3763–3768.
- [73] S. Wang, Y.-T. Chang, *Chem. Commun.* **2008**, 1173–1175.
- [74] a) H. Szelke, S. Schübel, J. Harenberg, R. Krämer, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1667–1669; b) H. Szelke, S. Schübel, J. Harenberg, R. Krämer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1445–1447.
- [75] W. Sun, H. Bandmann, T. Schrader, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7701–7707.
- [76] S. Lühn, T. Schrader, W. Sun, S. Alban, *J. Pharma. Biomed. Anal.* **2010**, *52*, 1–8.
- [77] a) L. Zeng, P. Wang, H. Zhang, X. Zhuang, Q. Dai, W. Liu, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4294–4297; b) Q. Dai, W. Liu, X. Zhuang, J. Wu, H. Zhang, P. Wang, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6559–6564.
- [78] T. Bříza, Z. Kejík, I. Císařová, J. Králová, P. Martásek, V. Král, *Chem. Commun.* **2008**, 1901–1903.
- [79] R. Zhan, Z. Fang, B. Liu, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1326–1333.
- [80] R. Cao, B. Li, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2865–2867.
- [81] S. Beni, J. F. K. Limtiaco, C. K. Larive, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 527–539.
- [82] S. Bairstow, J. McKee, M. Nordhaus, R. Johnson, *Anal. Biochem.* **2009**, *388*, 317–321.
- [83] a) R. B. C. Jagt, R. F. Gómez-Biagi, M. Nitz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2029–2031; b) R. B. C. Jagt, R. F. Gómez-Biagi, M. Nitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1995–1997.
- [84] P.-K. B. C. Müller-Graff, *Dissertation*, Heidelberg, **2010**.
- [85] H. Szelke, U. Warttinger, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [86] S. Lühn, S. Schiemann, S. Alban, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 673–680.
- [87] Y. Kang, K. Gwon, J. H. Shin, H. Nam, M. E. Meyerhoff, G. S. Cha, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3957–3962.
- [88] J. D. Gaffen, F. M. Price, M. T. Bayliss, R. M. Mason, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 124–130.
- [89] H. Szelke, J. Harenberg, R. Krämer, *Thromb. Haemost.* **2009**, *102*, 859–864.
- [90] A. Bencini, A. Bianchi, E. Garcia-España, M. Micheloni, J. A. Ramirez, *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *188*, 97–156.
- [91] A. R. Oki, R. J. Morgan, *Synth. Commun.*, **1995**, *25*, 4093–4097.
- [92] M. Belting, L.-Å. Fransson, *Glycoconj. J.* **1993**, *10*, 453–460.
- [93] S. Far, A. Kossanyi, C. Verchère-Béaur, N. Gresh, E. Taillandier, M. Perrée-Fauvet, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, *8*, 1781–1797.
- [94] M. Vickers, K. S. Martindale, P. D. Beer, *J. Mater. Chem.*, **2005**, *15*, 2784–2790.
- [95] P. D. Beer, J. Cadman, *New J. Chem.* **1999**, *23*, 347–349.
- [96] H. Szelke, H. Wadepohl, M. Abu-Youssef, R. Krämer, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, *2*, 251–260.

- [97] Y. Gondo, *J. Chem. Phys.* **1964**, *41*, 3928–3938.
- [98] H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, 18. überarb. Aufl., Hirzel, Stuttgart **1976**.
- [99] SciFinder®, Web Version, Chemical Abstracts Service, Columbus, OH, USA, **2011**, zu finden unter <https://scifinder.cas.org>. Die Berechnung des theoretischen Werts erfolgte mit dem Programm *Advanced Chemistry Development (ACD/Labs)*, v11.02.
- [100] D. M. Templeton, B. Sarkar, *Can. J. Chem.* **1985**, *63*, 3122–3128.
- [101] M. Henderson Pozzi, V. Gawandi, P. F. Fitzpatrick, *Biochemistry* **2009**, *48*, 1508–1516.
- [102] a) K. K.-W. Lo, K. Y. Zhang, S.-K. Leung, M.-C. Tang, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2245–2248; b) K. K.-W. Lo, K. Y. Zhang, S.-K. Leung, M.-C. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2213–2216.
- [103] Md. K. Nazeeruddin, S. M. Zakeeruddin, R. Humphry-Baker, M. Jirousek, P. Liska, N. Vlachopoulos, V. Shklover, C.-H. Fischer, M. Grätzel, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 6298–6305.
- [104] K. K.-W. Lo, J. S.-W. Chan, L.-H. Lui, C.-K. Chung, *Organometallics* **2004**, *23*, 3108–3116.
- [105] R. Grigg, W. D. J. A. Norbert, *Chem. Commun.* **1992**, 1300–1302.
- [106] Z. Murtaza, Q. Chang, G. Rao, H. Lin, J. R. Lakowicz, *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 216–222.
- [107] J. M. Price, W. Xu, J. N. Demas, B. A. DeGraff, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 265–270.
- [108] H. M. R. Gonçalves, C. D. Maule, P. A. S. Jorge, J. C. G. E. da Silva, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *626*, 62–70.
- [109] S. Dutta, S. Baitalik, M. Ghosh, U. Flörke, K. Nag, *Inorg. Chim. Acta* **2011**, *372*, 227–236.
- [110] K. K.-W. Lo, J. S.-W. Chan, C.-K. Chung, V. W.-H. Tsang, N. Zhu, *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 3109–3118
- [111] G. R. Jones, R. Hashim, D. M. Power, *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *883*, 69–76.
- [112] K. K.-W. Lo, C.-K. Li, J. S.-Y. Lau, *Organometallics* **2005**, *24*, 4594–4601.
- [113] Z. R. R. Davatz, *Open Drug Database*, **2011**, zu finden unter <http://ch.oddb.org/de/>.
- [114] M. Schroeder, J. Hogwood, E. Grey, B. Mulloy, A.-M. Hackett, K. B. Johansen, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 763–771.
- [115] M. S. Hulin, T. D. Wakefield, P. C. Andrews, S. K. Wroblewski, A. M. Kadell, L. J. Downing, J. Stanley, *Lab. Animal Sci.* **1997**, *47*, 153–160.
- [116] J. Wang, D. L. Rabenstein, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 1689–1697.
- [117] T. D. Wakefield, P. C. Andrews, S. K. Wroblewski, A. M. Kadell, S. Tejwani, M. S. Hulin, J. C. Stanley, *Curr. Surg. Res.* **1996**, *63*, 280–286.
- [118] S. Shenoy, M. Sobel, R. B. Harris, *Curr. Pharma. Des.* **1999**, *5*, 965–986.
- [119] a) S. Choi, D. J. Clements, V. Pophristic, I. Ivanov, S. Vemperala, J. S. Bennett, M. L. Klein, J. D. Winkler, W. F. DeGrado, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6843–6847; b) S. Choi, D. J. Clements, V. Pophristic, I. Ivanov, S. Vemperala, J. S. Bennett, M. L. Klein, J. D. Winkler, W. F. DeGrado, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6685–6689.

- [120] E. M. A. van de Westerlo, T. F. C. M. Smetsers, M. A. B. A. Dennissen, R. J. Linhardt, J. H. Veerkamp, G. N. P. van Muijen, T. H. van Kuppevelt, *Blood* **2002**, *99*, 2427–2433.
- [121] T. Mecca, F. Cunsolo, *Polym. Adv. Technol.* **2010**, *21*, 752–757.
- [122] Die Angaben beziehen sich auf die Herstellerangaben der Firma Lifespan Technologies, Salt Lake City, UT, USA, welche mehrere Analysesets für den quantitativen Nachweis von Dextransulfat vertreibt. Nähere Informationen hierzu können der Internetseite der Firma (<http://www.lifespantech.com>) entnommen werden.
- [123] R. H. Blessing, *Acta Cryst.* **1995**, *A51*, 33–38.
- [124] a) M. C. Burla, R. Caliendo, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Cascarano, L. De Caro, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna, *SIR2004*, CNR IC, Bari, Italien, **2004**; b) M. C. Burla, R. Caliendo, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Cascarano, L. De Caro, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. Spagna, *J. Appl. Cryst.* **2005**, *38*, 381–388.
- [125] a) P. T. Beurskens in: G. M. Sheldrick, C. Krüger, R. Goddard (Hrsg.), *Crystallographic Computing 3*, Clarendon, Oxford, UK, **1985**, S. 216; b) P. T. Beurskens, G. Beurskens, R. de Gelder, L. M. M. Smits, S. Garcia-Granda, R. O. Gould, *DIRDIF-2008*, Radboud Universität Nijmegen, Niederlande, **2008**.
- [126] a) G. M. Sheldrick, *SHELXL-97*, Universität Göttingen, **1997**; b) G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112–122.
- [127] M. N. Burnett, C. K. Johnson, *ORTEP III: Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations*, Oak Ridge National Laboratory Report ORNL-6895, Oak Ridge, **1996**.
- [128] B. Liang, C. Jiang, Z. Chen, X. Zhang, H. Shi, Y. Cao, *J. Mater. Chem.*, **2006**, *16*, 1281–1286.
- [129] a) R. Kikkeri, X. Liu, A. Adibekian, Y.-H. Tsai, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2197–2199; b) S. Rehm, V. Stepanenko, X. Zhang, T. H. Rehm, F. Würthner, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3372–3382.
- [130] J. I. Kim, I.-S. Shin, H. Kim, J.-K. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 1614–1615.
- [131] M. S. Lowry, W. R. Hudson, R. A. Pascal, Jr., S. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14129–14135.
- [132] Hyaluronsäure, Heparan-, Dermatan-, Chondroitin-, Oversulfated Chondroitinsulfat, Heparin: s. [83]; Dextransulfat: s. [53]; Arixtra: Herstellerangabe.
- [133] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991–1024.
- [134] G. M. Hale, M. R. Query, *Appl. Opt.* **1973**, *12*, 555–563.
- [135] K. F. Palmer, D. Williams, *Appl. Opt.* **1975**, *14*, 208–219.

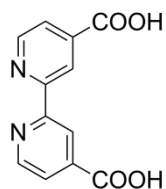
Anhang

Übersicht der synthetisierten Verbindungen	119
Anregungs- und Emissionsspektren	124
¹H-NMR-Spektren ausgewählter Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe	125
HPLC-Elusionsprofile ausgewählter Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe	129
Röntgenographischer Anhang	131
Sonstige Spektren und Titrationskurven	133
Danksagung	139
Erklärung gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung	141

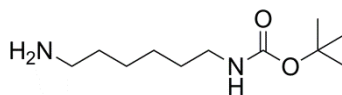
Übersicht der synthetisierten Verbindungen

Literaturbekannte Verbindungen sind mit einem * gekennzeichnet.

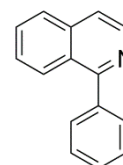
Liganden und Substituenten



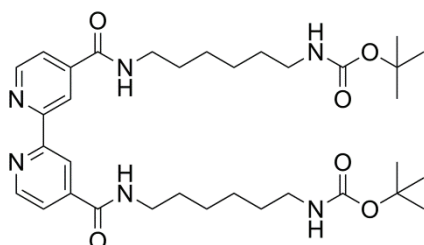
I*



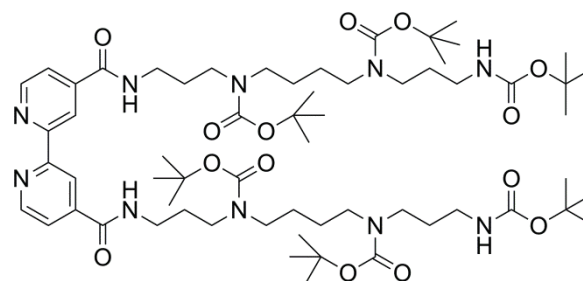
II*



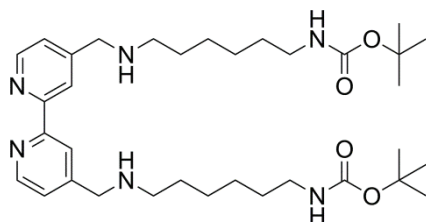
III*



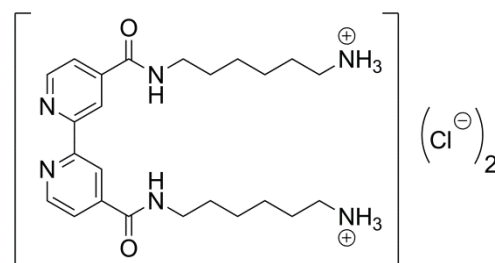
1*



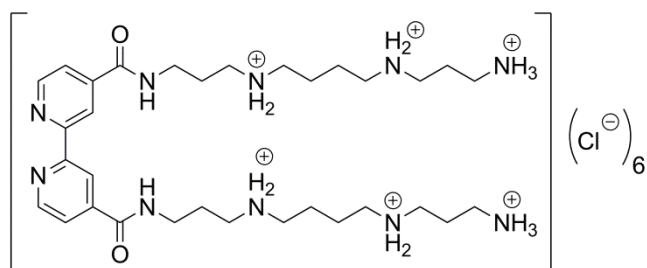
2



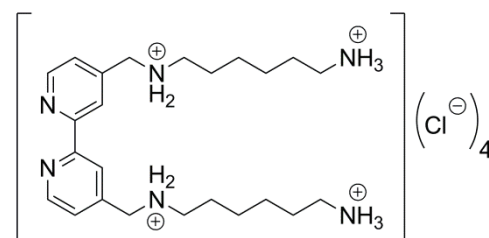
3*



4*

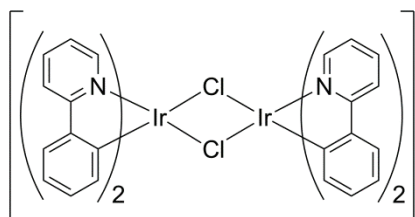


5

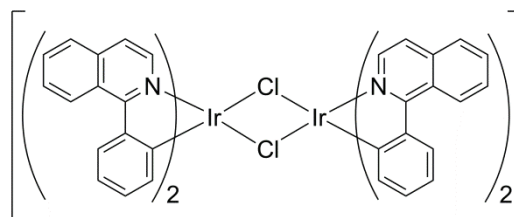


6*

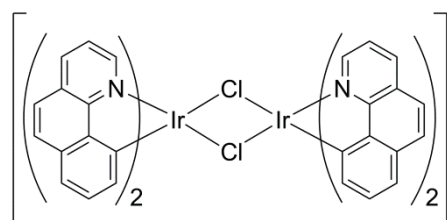
Iridiumkomplexe



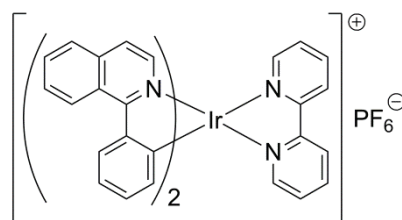
IV*



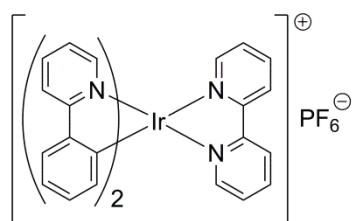
V*



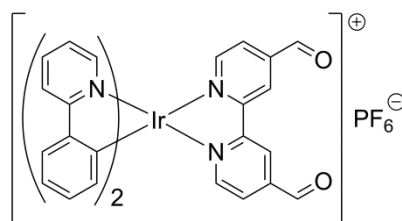
VI*



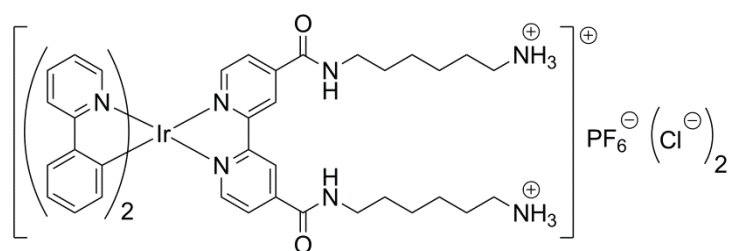
VII*



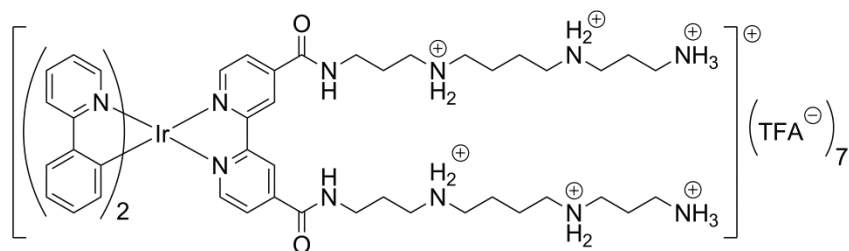
7*



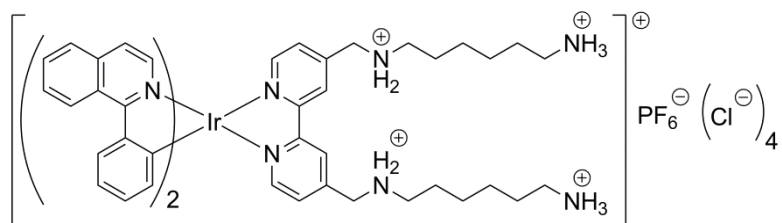
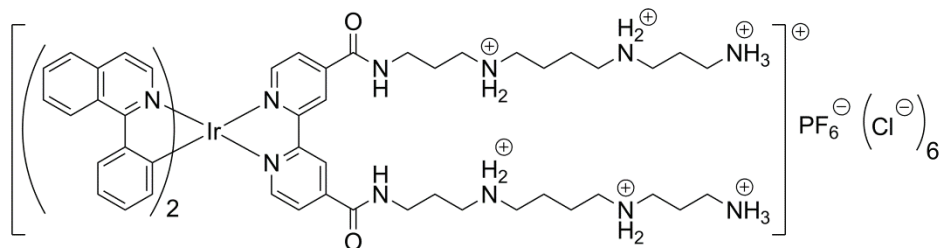
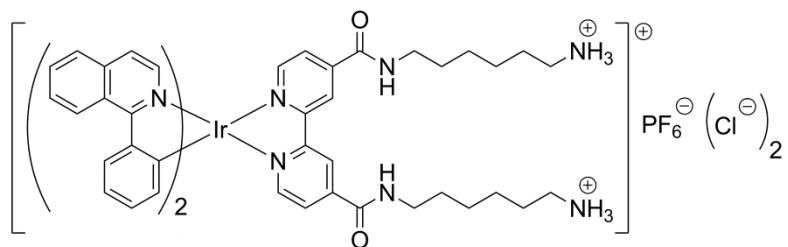
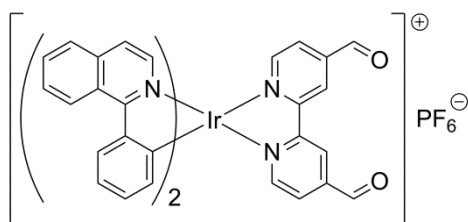
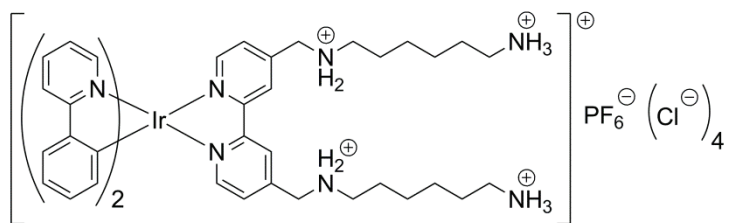
8*

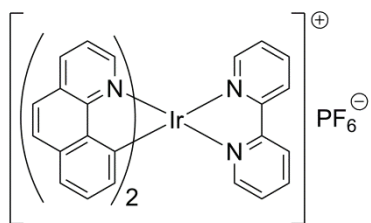
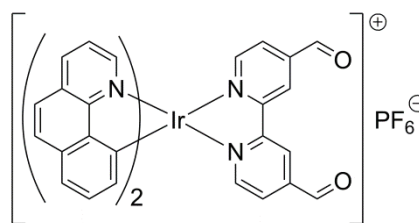
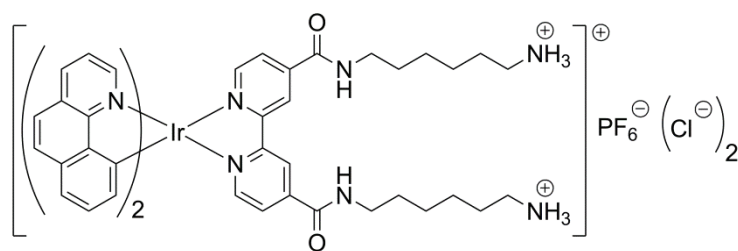
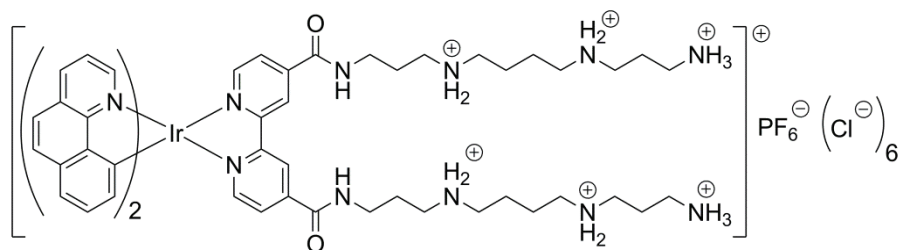
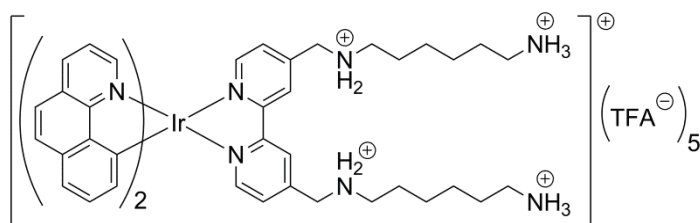
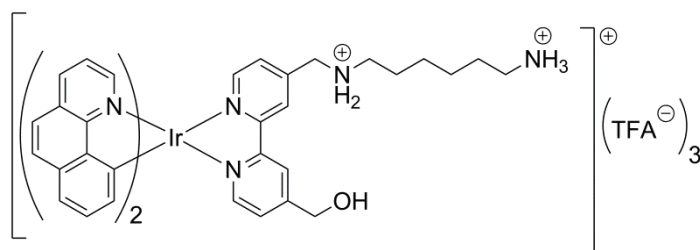


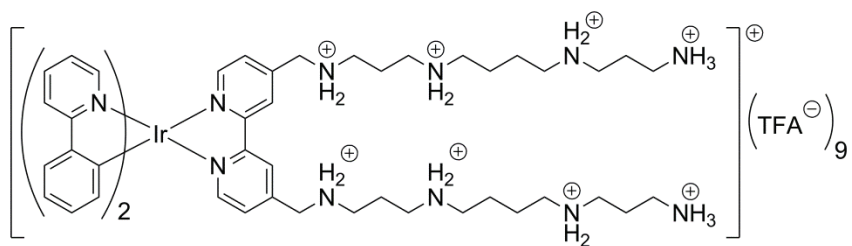
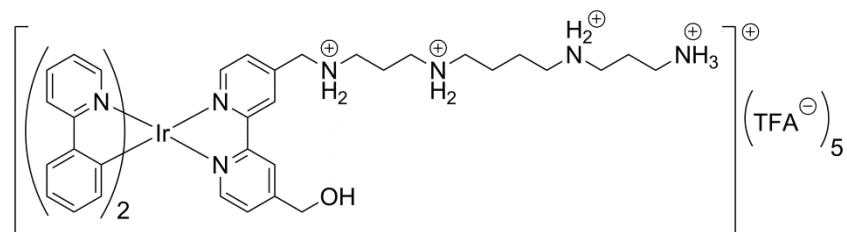
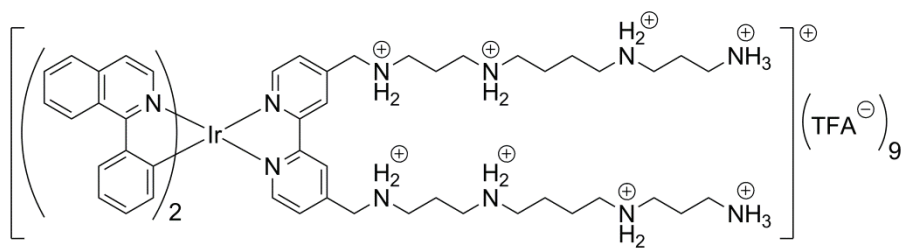
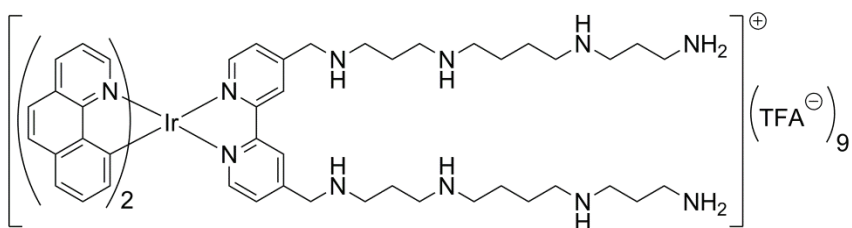
9



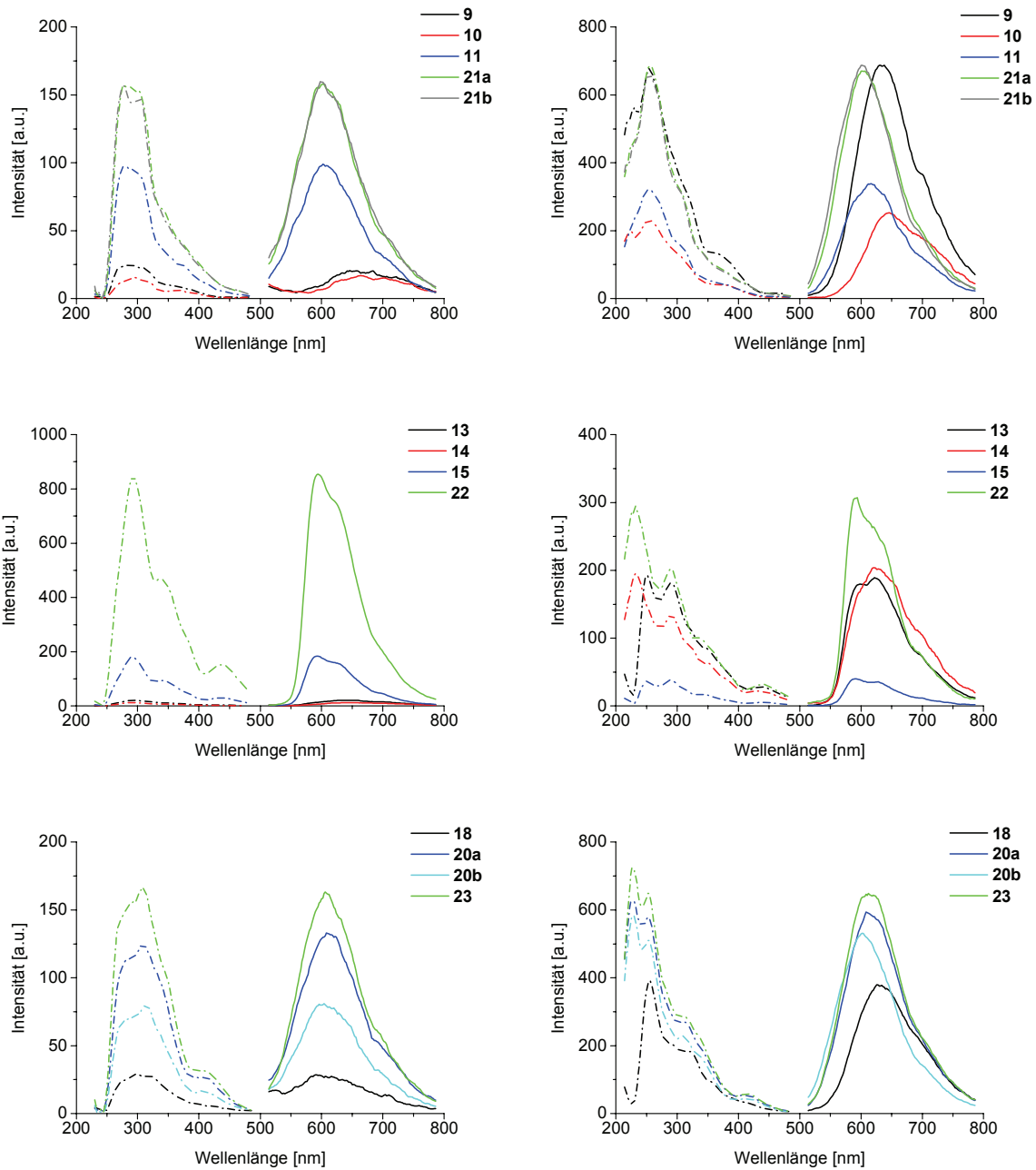
10



**16*****17****18****19****20a****20b**

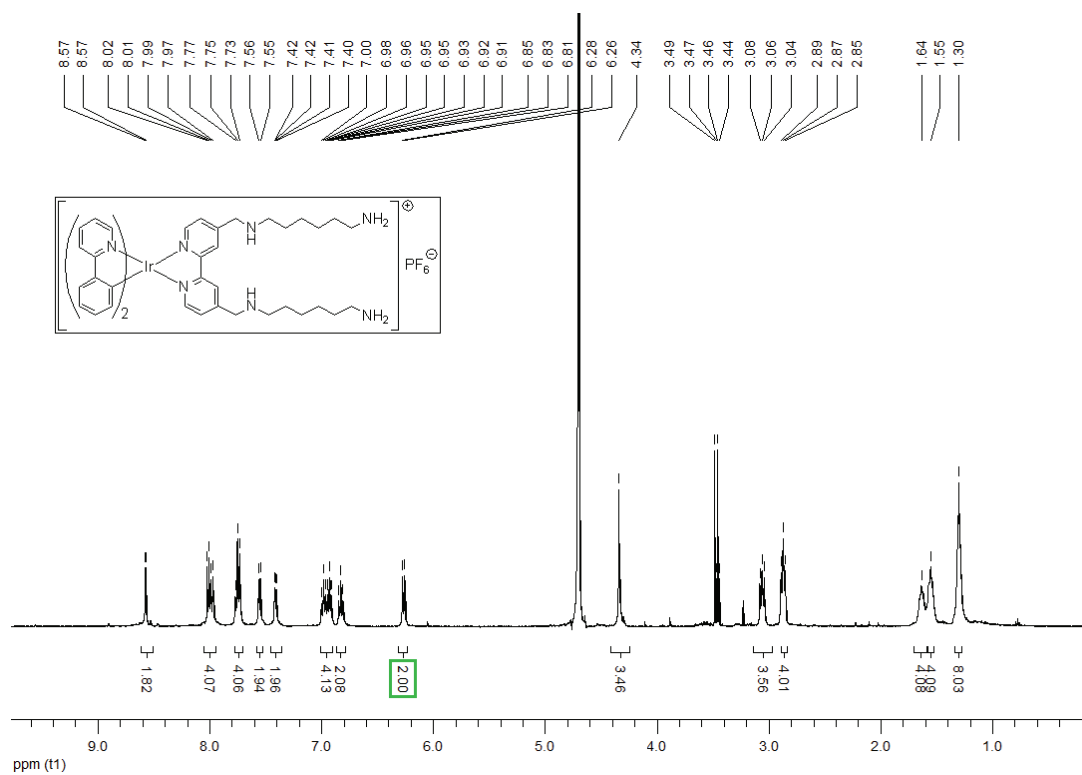
**21a****21b****22****23**

Anregungs- und Emissionsspektren

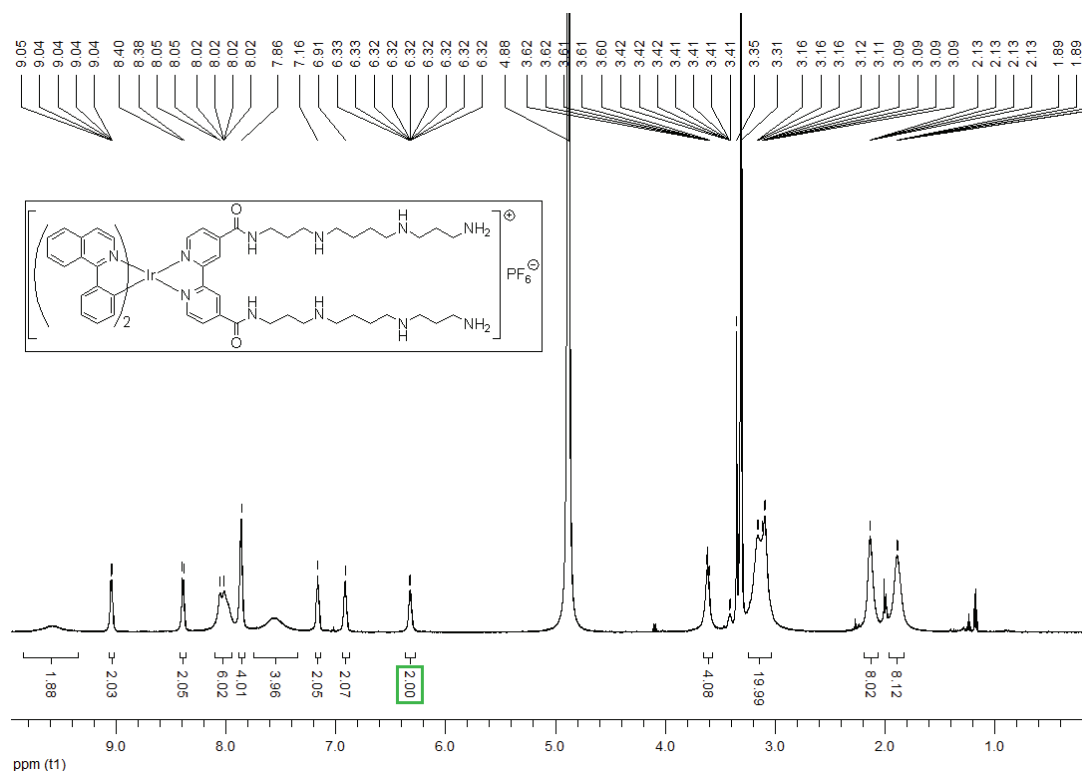


Anregungs- (---) und Emissionsspektren (—) von **9–11**, **21a** und **21b** (oben), **13–15** und **22** (Mitte) und **18**, **20a**, **20b** und **23** (unten) in H₂O (links) bzw. MeCN (rechts) (5 μ M, T = 25 $^{\circ}$ C, $\lambda_{\text{anr.}}$ = 310 nm, U_D = 730 V (**13–15**, **22**) bzw. 800 V (**9–11**, **18–21**, **23**).

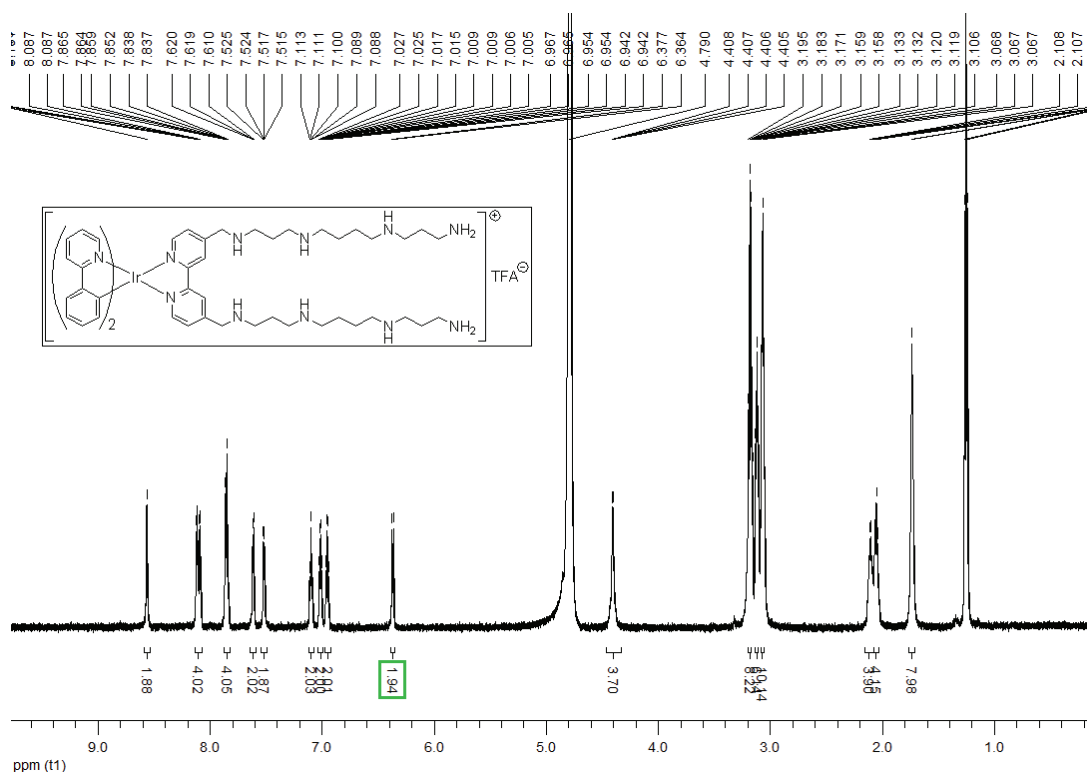
11



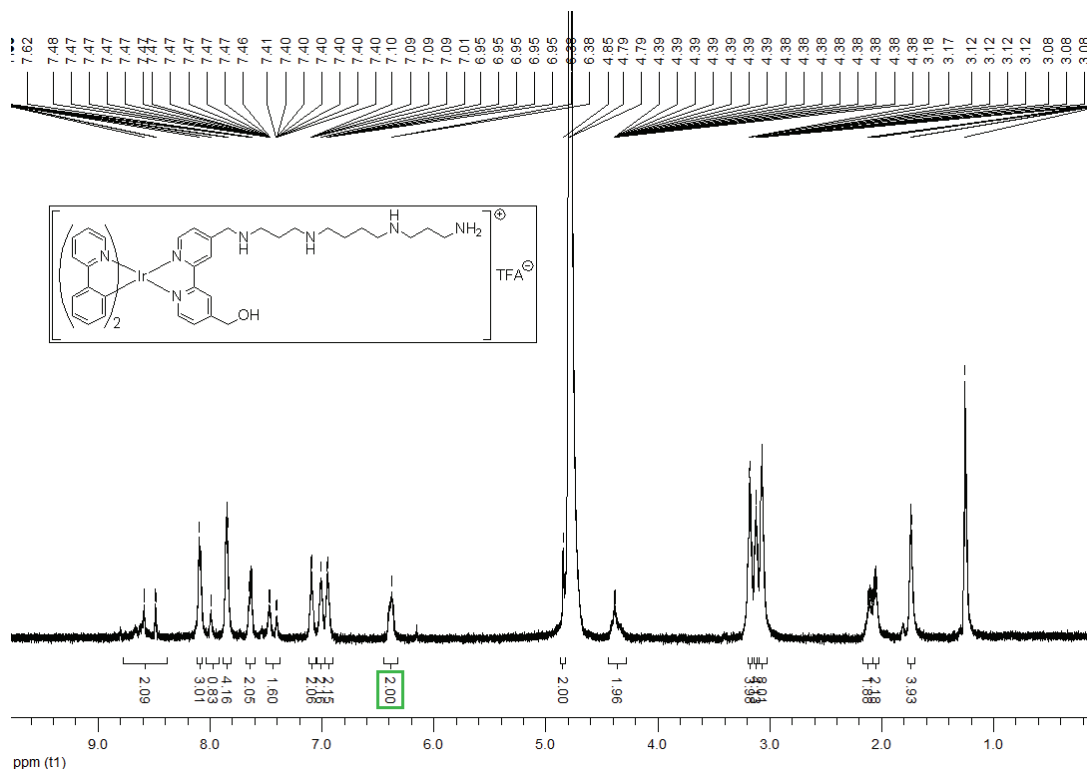
14

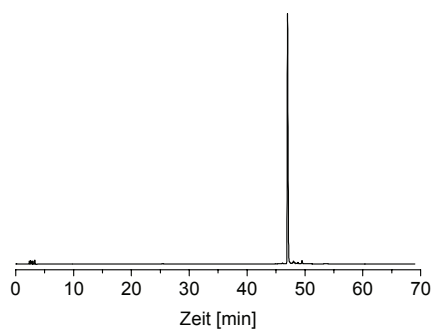
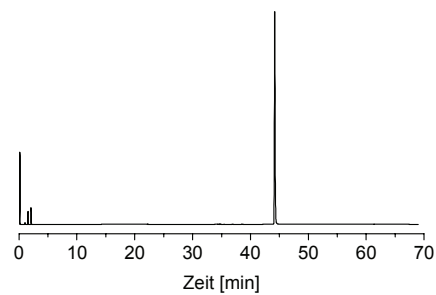
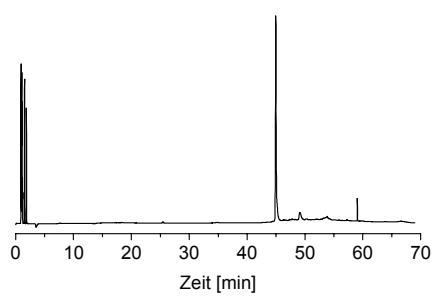
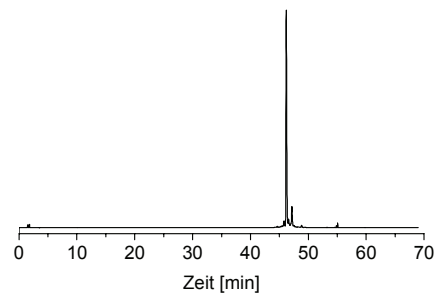
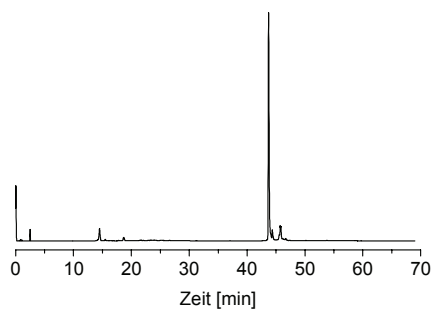
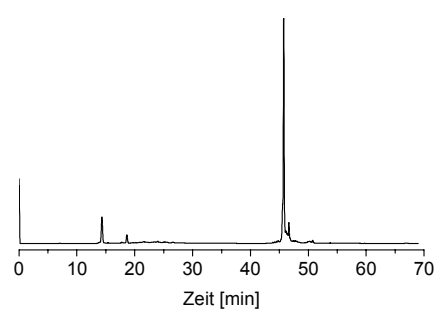


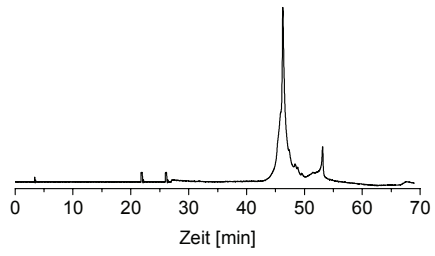
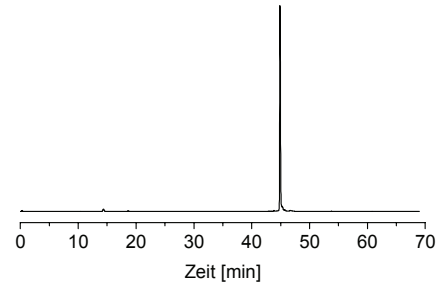
21a



21b

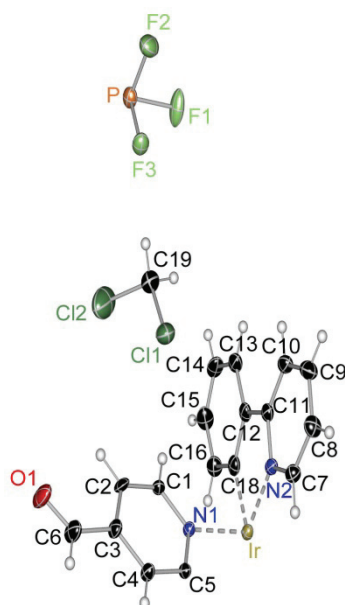


HPLC-Elutionsprofile ausgewählter Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe**9****10****11****14****21a****21b**

22**23**

Röntgenographischer Anhang

[Bis(2-phenylpyridin-C,N)(2,2'-bipyridin-4,4'-dicarboxaldehyd-N,N')iridium(III)]-hexafluorosphat (**8***)



ORTEP-Darstellung der asymmetrischen Einheit von **8*** ($C_{18}H_{14}Cl_2F_3Ir_{0,5}N_2OP_{0,5}$). Die Ellipsoide geben eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 50 % wieder.

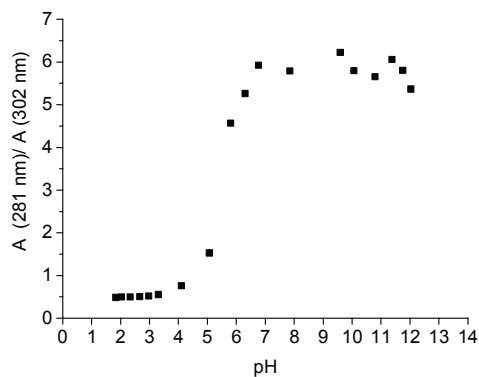
Verbindung **8*** kristallisiert in der orthorhombischen Raumgruppe Pbcn. Die asymmetrische Einheit enthält ein halbes Komplexkation, ein halbes Hexafluorosphat anion sowie ein Dichlormethanmolekül. Die Atome Ir und P befinden sich jeweils auf einer zweizähligen speziellen Lage (Ir $\langle 0;0,20;0,25 \rangle$; P $\langle 0,5;0,09;0,25 \rangle$). Kation und Anion werden komplettiert durch die Symmetrieoperationen der Raumgruppe. Die Elementarzelle enthält, generiert durch alle Symmetrieoperationen der Raumgruppe, insgesamt vier Kationen, vier Anionen sowie acht Lösungsmittelmoleküle, wobei beide möglichen Enantiomere im Verhältnis 1:1 vorliegen.

Kristalldaten und Strukturverfeinerung für die Verbindung **8***.

Verbindung	8*
Identifizierungscode	kr_sk1a
Empirische Formel	C ₃₆ H ₂₈ Cl ₄ F ₆ IrN ₄ O ₂ P
Formelgewicht [g·mol ⁻¹]	1027,59
Temperatur [K]	100(2)
Wellenlänge [Å]	0,71073
Kristallgröße [mm ³]	0,32 x 0,07 x 0,07
Kristallsystem	orthorhombisch
Raumgruppe	Pbcn
<i>a</i> [Å]	21,013(9)
<i>b</i> [Å]	20,645(9)
<i>c</i> [Å]	8,651(4)
$\alpha = \beta = \gamma$ [°]	90
Volumen [Å ³]	3753(3)
<i>Z</i>	4
ρ (berechnet) [Mg·m ⁻³]	1,819
Absorptionskoeffizient [mm ⁻¹]	3,955
<i>F</i> ₀₀₀	2008
θ Bereich [°]	1,97–32,12
<i>hkl</i> Bereich	0–31, 0–30, 0–12
gemessene Reflexe	93117
unabhängige Reflexe [<i>R</i> _{int}]	6408 [0,0904]
beobachtete Reflexe (<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	3972
Vollständigkeit	99,5% (bei $\theta = 31,00^\circ$)
maximale/minimale Transmission	0,7464, 0,6457
Absorptionskorrektur	semi-empirisch
Strukturlösung	heavy (DIRDIF) ^[125]
Strukturverfeinerung	FMLS (full-matrix least-squares) auf <i>F</i> ² (SHELXL-97) ^[126]
Datenpunkte/Restraints/Parameter	6408/0/245
Goof (goodness-of-fit) <i>F</i> ²	1,164
<i>R</i> (<i>F</i>), <i>wR</i> (<i>F</i> ²) (<i>F</i> _o > 4 σ (<i>F</i> _o))	0,0491; 0,0772
<i>R</i> (<i>F</i>), <i>wR</i> (<i>F</i> ²) (alle Datenpunkte)	0,0943; 0,0867
Restelektronendichte [e·Å ⁻³]: rms, max, min	0,162; 1,443; -1,211

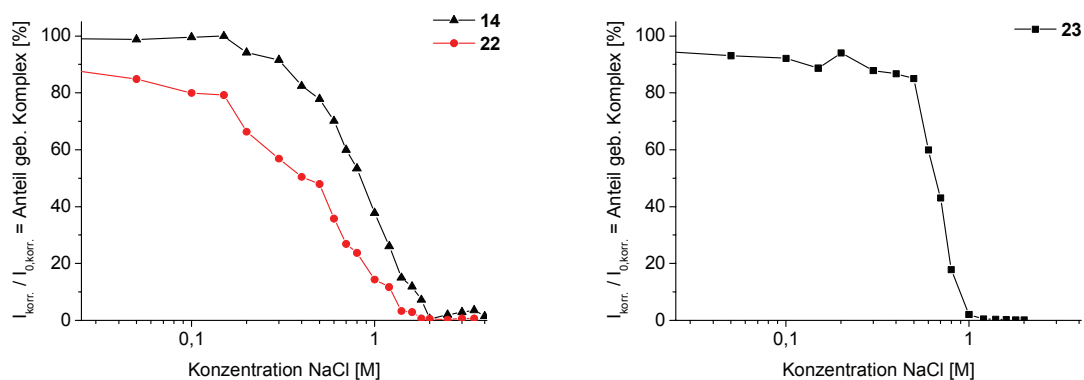
Sonstige Spektren und Titrationskurven

pH-Titration von 2,2'-Bipyridin



Änderung des Verhältnisses der Absorption von 2,2'-Bipyridin bei 281 nm und 302 nm in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die pH-Werte wurden durch Zugabe von verdünnter Salzsäure bzw. Natronlauge eingestellt (10 μM bpy, 100 mM NaCl, H_2O , $T = 25^\circ\text{C}$).

Wechselwirkung ausgewählter Poly(pyridyl)iridium(III)-Komplexe mit Glykosaminoglykanen



Bestimmung der HDSC für die Wechselwirkung von **14**, **22** und **23** mit UFH: Anteil an gebundenem Komplex bei Zugabe von NaCl für **14** und **22** (links) bzw. **23** (rechts) (1 μM Farbstoff, 2,6 μM ds (**14**), 2,2 μM ds (**22**) bzw. 2,7 μM ds UFH, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, 0–4 M NaCl, $T = 25^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{anr.}} = 310\text{ nm}$ (**14**, **23**) bzw. 305 nm (**22**), $U_D = 850\text{ V}$ (**14**), 800 V (**22**) bzw. 750 V (**23**)).

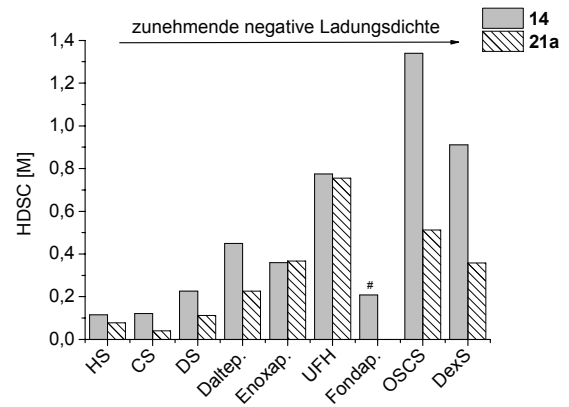
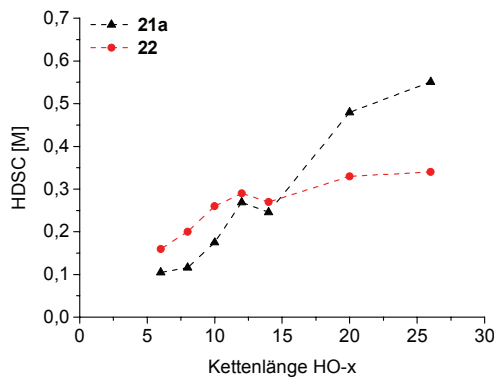
Bindungsstöchiometrien und Ladungsverhältnisse am Sättigungspunkt für die Wechselwirkung von **10**, **21a** und **22** mit Heparinoligosacchariden.

Heparinoligosaccharid	Bindungsstöchiometrie Zucker/Farbstoffmolekül (Sättigungspunkt)			Verhältnis pos./neg. Ladung (Sättigungspunkt)		
	10	21a	22	10	21a	22
HO-6	4,75	3,80	3,78	0,87	1,08	1,09
HO-8	4,04	3,38	3,64	1,02	1,22	1,13
HO-10	4,44	3,24	4,02	0,93	1,27	1,02
HO-12	4,30	3,12	3,16	0,96	1,32	1,30
HO-14	4,13	2,80	3,48	1,00	1,47	1,18
HO-20	5,72	4,00	4,04	0,72	1,03	1,02
HO-26	4,54	3,58	3,98	0,91	1,15	1,03
Mittelwert	4,66	3,42	3,73	0,91	1,22	1,11

Maximaler Intensitätsanstieg, Bindungsstöchiometrien und Ladungsverhältnis am Sättigungspunkt für die Wechselwirkung von **14** und **21a** mit verschiedenen GAG und sulfatierten Polysacchariden.

Analyt (Ladung/ds)	max. Intensitätsanstieg		Bindungsstöchiometrie Zucker/Farbstoffmolekül (Sättigungspunkt)		Verhältnis pos./neg. Ladung (Sättigungspunkt)	
	14	21a	14	21a	14	21a
HS (-1,9)	22	14	7,06	7,10	1,04	1,05
CS (-2,0)	17	7,6	8,00	6,68	0,87	1,05
DS (-2,1)	21	9,5	7,96	6,10	0,84	1,09
Dalteparin (-3,4)	21	32	3,30	3,04	1,25	1,35
Enoxaparin (-3,4)	23	27	3,18	2,62	1,30	1,57
UFH (-3,4)	23	21	5,26	4,48	0,78	0,92
Fondaparinux (-4,0)	22	- #	2,34	- #	1,50	- #
OSCS (-4,0)	16	13	2,72	2,38	1,12	1,28
DexS (-4,6)	21	18	3,50	2,42	0,87	1,26

Wert konnte nicht bestimmt werden.



Links: Auftragung der HDSC gegen die Kettenlänge für die Wechselwirkung von **21a** und **22** mit verschiedenen Heparinoligosacchariden; rechts: Auftragung der HDSC in Abhängigkeit vom Analyten für **14** und **21a**. # Wert konnte nicht bestimmt werden.

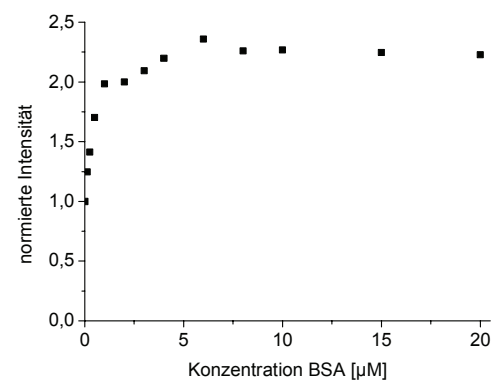
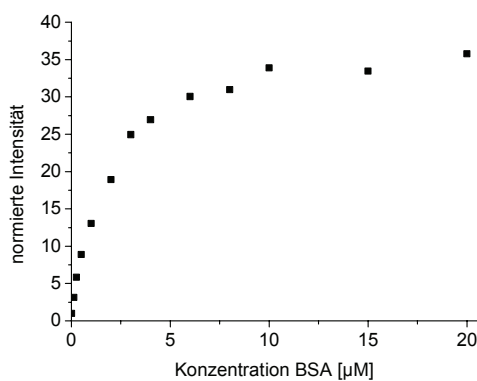
Regressionsparameter für die Anpassung der in Abbildung 3.36 rechts dargestellten Titrationskurve

Die Regression erfolgte nach dem Hill-Modell unter Nutzung folgender Gleichung:

$$y = 1 + \frac{(a - 1) \cdot x^n}{k^n \cdot x^n}$$

mit $a = 4,01514 \pm 0,08713$, $k = 0,76089 \pm 0,03908$ und $n = 2,54089 \pm 0,31332$. Der R^2 -Wert, welcher ein Maß für die Güte der Anpassung ist, beträgt 0,98924.

Titration der Komplexe 10 und 22 mit BSA

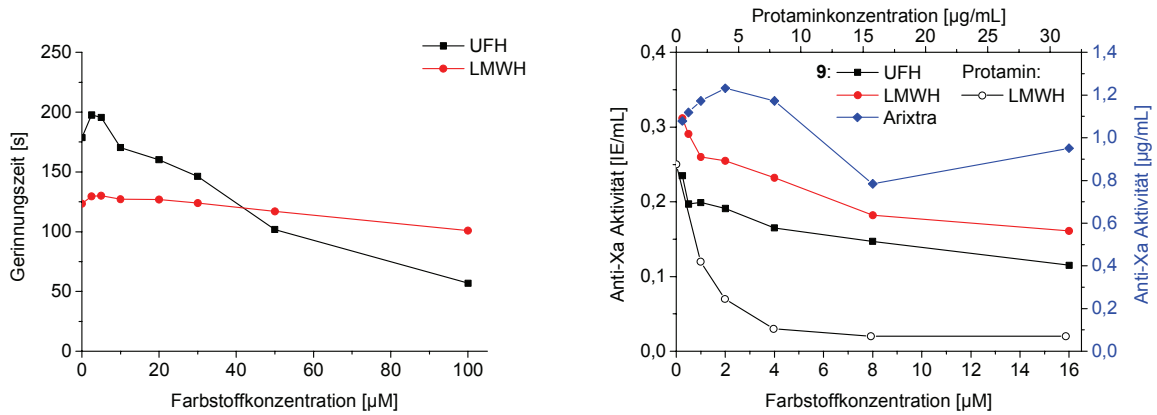


Änderung der Emissionsintensität am jeweiligen Maximum von **10** (links) und **22** (rechts) bei Zugabe von BSA (1 µM Farbstoff, 0–20 µM BSA, 10 mM MOPS-Puffer pH 7, T = 25 °C, $\lambda_{\text{anr.}} = 305 \text{ nm}$, $U_D = 870 \text{ V}$ (**10**) bzw. 800 V (**22**). Die Intensität der reinen Farbstofflösung wurde auf 1 normiert.

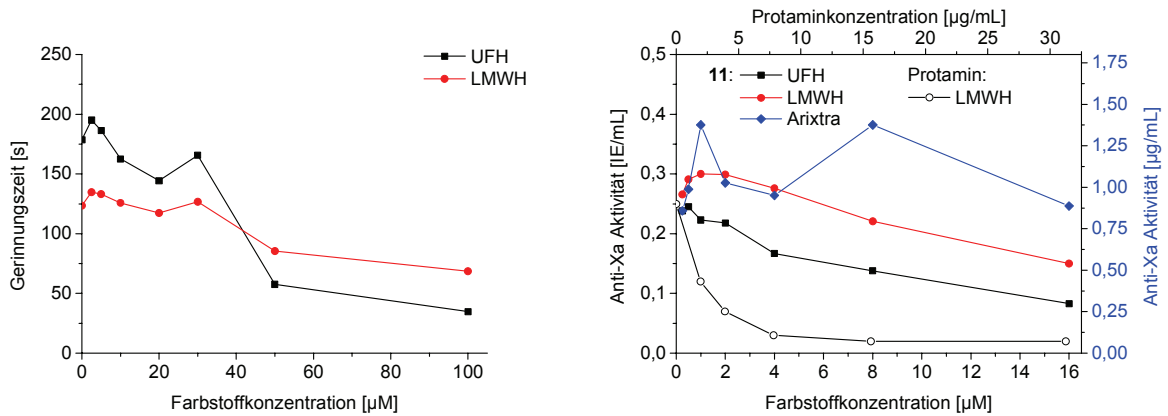
Heparinneutralisation

Auftragung der Gerinnungszeit (links) und der Anti-Xa-Aktivität (rechts) in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration für die Wechselwirkung von **9**, **11**, **14**, **21a**, **21b**, **22** und **23** mit UFH, Dalteparin-Natrium und Fondaparinux-Natrium sowie Heparinneutralisation durch Protamin (0–100 µM bzw. 0–16 µM Farbstoff, 0–31,25 µg/mL Protamin, 1 IE/mL bzw. 0,25 IE/mL UFH und Dalteparin-Natrium, 1 µg/mL Fondaparinux-Natrium).

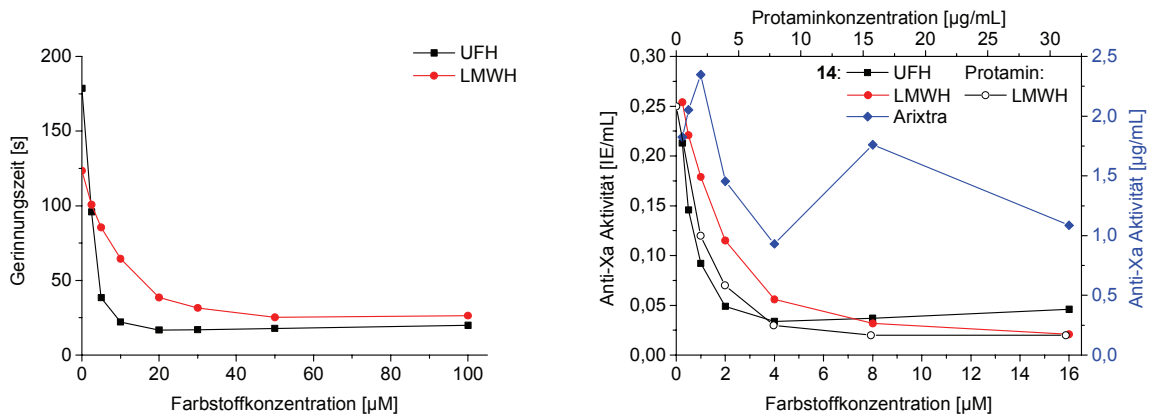
9



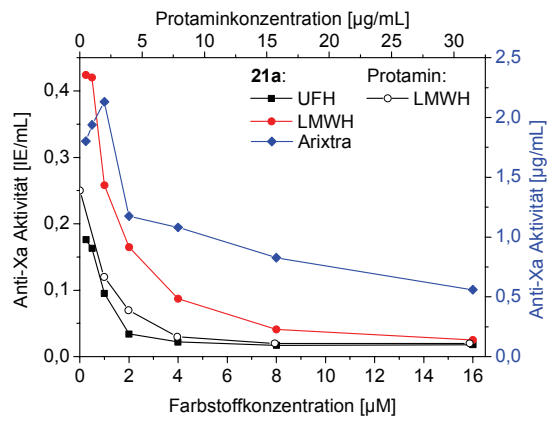
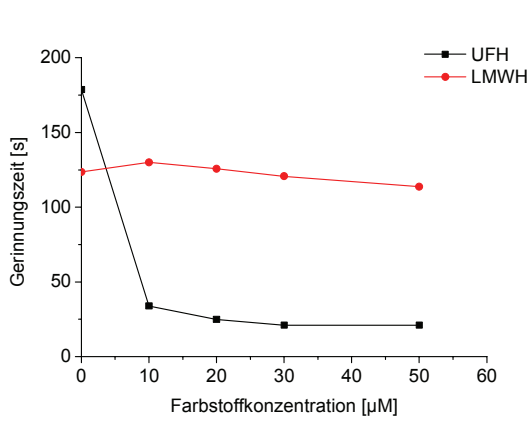
11



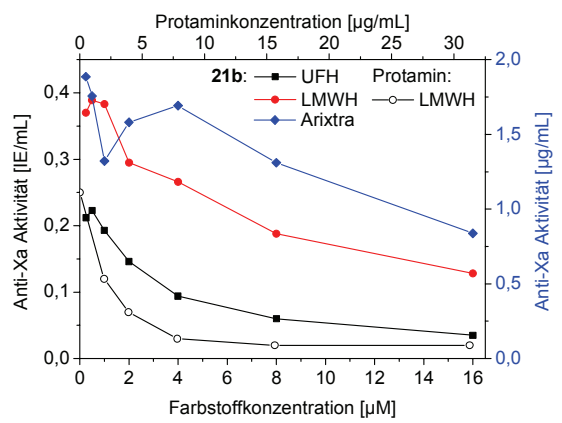
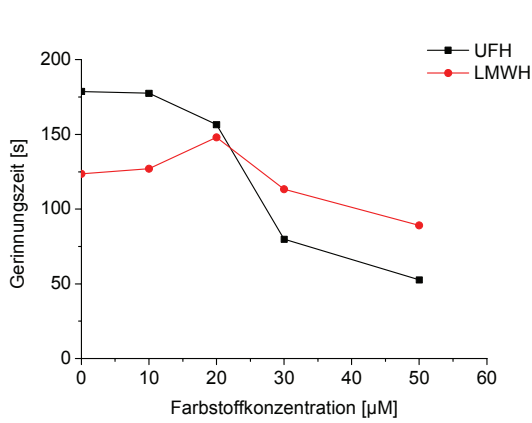
14



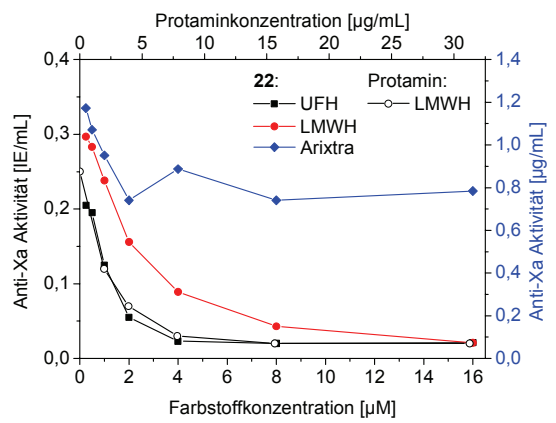
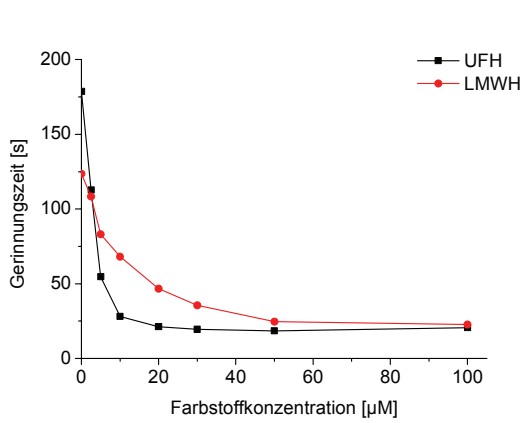
21a



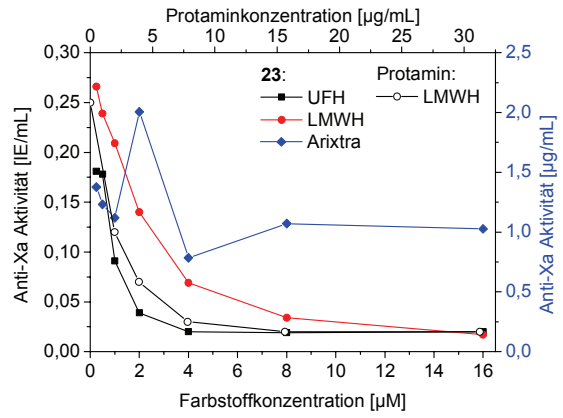
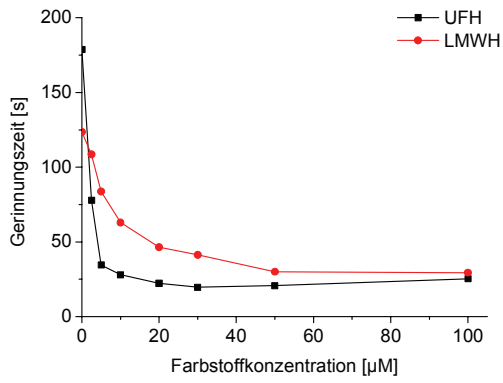
21b



22



23



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Professor Dr. Roland Krämer danke ich für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die Möglichkeit, unter hervorragenden Arbeitsbedingungen an einem interessanten und individuellen Thema zu forschen. Weiterhin danke ich ihm für die gewährten Freiheiten, welche selbstständiges und eigeninitiatives Arbeiten ermöglicht haben.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für ihre stete Diskussionsbereitschaft und die allzeit gute Stimmung – sei es nun im Labor, beim Grillen mit anschließendem Frisbeespiel oder während einer gemütlichen Runde im Kaffeezimmer, mit euch hat man immer jede Menge Spaß. Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. Ann-Kathrin Marguerre, Frau Dr. Helga Szelke, Herrn Gerrit Rebmann, Herrn Arnd Sprödefeld und vor allem meine Box- und Laborkollegin Frau Katharina Brühl. Wir haben uns gemeinsam über so manches geärgert, zusammen gelacht und manchmal auch geweint und so den Laboralltag gemeistert.

Großer Dank gebührt auch Frau Helen Hagen für die aufopferungsvolle Übernahme meines Assistentenjobs im MCII-Praktikum – damit hast Du mir in der Zeit der Prüfungsvorbereitung eine große Last von den Schultern genommen.

Bei Frau Dr. Annemarie Schwarz sowie dem gesamten Adminiteam bedanke ich mich für die gemeinsame Zeit als Administratoren und die damit verbundenen Lösungen unzähliger Computerprobleme. Meinen beiden Nachfolgern, den Herren Ulrich Warttinger und Gerrit Rebmann, danke ich für die frühzeitige Unterstützung bei der Bewältigung dieser Aufgabe.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Forschungspraktikanten Jenny Blechinger, Alina Misiewicz, Alexander Endres und Steffen Daum für die abwechslungsreiche Zeit und die präparative Unterstützung meiner Arbeit.

Frau Claudia Dienemann danke ich vielmals für zahlreiche ESI-Aufnahmen, die Durchführung präparativer HPLC-Trennungen, die Bereitstellung diverser Pufferlösungen sowie das stets vorzügliche Frühstück anlässlich ihrer Geburtstage. Für die Unterstützung bei fluoreszenzspektroskopischen Fragestellungen und der Herstellung meiner Stammlösungen (wie gut, dass es die Feinwaage gibt!) danke ich Herrn Ulrich Warttinger. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Heike Vongerichten für die gute Organisation des Laborbetriebes und bei Herrn Volker Seifried für seine kreativ gestaltete Geburtstagskarte und die interessanten Einblicke in nicht-chemische Themengebiete bedanken.

Für die Bereitstellung von Synthesestufen bedanke ich mich bei Frau Dr. Helga Szelke sowie den Herren Dr. Korbinian Müller-Graff und Volker Seifried.

Frau Beate Termin danke ich für die vielen NMR-Messungen an diversen Geräten und die Hilfsbereitschaft bei der Untersuchung verdünnter Proben. Mein Dank gebührt auch den Damen der ESI-Abteilung des organisch-chemischen Instituts für die schnellen, zuverlässigen HR-Messungen und die Unterstützung während der "Auszeit" unseres Massenspektrometers sowie den Damen und Herren des analytischen Labors. Für die Durchführung der Röntgenstrukturanalysen danke ich Herrn Prof. Dr. Hubert Wadepohl und Frau Heidrun Haungs.

Den Feinmechanikern, Schlossern, Glasbläsern und Elektrikern des chemischen Instituts danke ich recht herzlich für die stets unkomplizierte und schnelle Hilfe bei allerlei Problemen, und seien sie auch mal privater Natur.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die damit verbundenen fachlichen Anmerkungen danke ich Frau Dr. Helga Szelke sowie den Herren Gerrit Rebmann und Dr. Stephan Deuerlein ganz herzlich.

Besonderer Dank gilt allen meinen Freunden, die mich während des Studiums und darüber hinaus in vielfältiger Weise motiviert und unterstützt haben und immer dafür Sorge tragen, dass neben der Arbeit auch die Freizeit nicht zu kurz kommt. Eure Freundschaft bedeutet mir sehr viel und ich bin froh, dass es Euch gibt.

Meiner gesamten Familie danke ich aus ganzem Herzen für die anhaltende Unterstützung in allen Lebensfragen, den Rückhalt und den Glauben an mich während meiner Studien- und Promotionszeit. Es ist schön, jemanden zu haben, auf den man sich verlassen kann.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Stephan für seine Ausdauer, Geduld und Liebe sowie seinen Blick "hinter die Kulissen" bedanken. Ich bin unglaublich dankbar, dass der Zufall uns zusammengeführt hat – du gibst mir Halt bei allem, was ich tue. Danke dafür!

Erklärung gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung

- a) Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.
- b) Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsvorhaben beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 01.12.2011

(Susanne Ramona Kohlmajer)