3 Spektroskopische Untersuchungen

3 Spektroskopische Untersuchungen

3.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

Die diastereomeren *meso-* und *d,l-*konfigurierten 1,2-Diamino-1,2-diarylethane bzw. Disalicylidenaldimin-Liganden weisen naturgemäß keine Unterschiede in ihren CHN-Analysen und nur geringe Unterschiede in ihren IR-Spektren auf. Daher wurde die ¹H-NMR-Spektroskopie insbesondere für die konfigurative Zuordnung der Stereoisomere der Synthesevorstufen genutzt.

Durch Rotationen um die C–C-Einfachbindung ist bei den 1,2-Diamino-1,2-diarylethanen das Auftreten verschiedener Konformere möglich. In Lösungen sind hauptsächlich die in Abbildung 3.1 dargestellten synklinalen und antiperiplanaren Konformationen denkbar.

meso-konfigurierte 1,2-Diamino-1,2-diarylethane



d,I-konfigurierte 1,2-Diamino-1,2-diarylethane





Molecular Modelling Untersuchungen symmetrisch substituierter Diaminodiarylethane zeigten, dass bei den meso-1,2-Diamino-1,2-diarylethanen alle drei Konformationen energetisch nahezu gleich günstig sind, wobei die antiperiplanare Konformation (a in Abbildung 3.1) den niedrigsten Energieinhalt aufweist. Das Energieprofil der Rotation der d,l-konfigurierten Verbindungen um ihre C-C-Bindungsachse wies im Gegensatz zu ihren meso-konfigurierten Diastereomeren wesentlich stärkere Unterschiede der Energieinhalte der lokalen Minima auf. Die energetisch günstigste Konformation der d,I-konfigurierten Diamine stellt die synklinale Anordnung I der Aromaten dar (e in Abbildung 3.1).^[47] Für unsymmetrisch substituierte Ethylendiamine konnte mit Hilfe von Konformationsanalysen anhand der Kopplungskonstanten der benzylischen Protonen in ¹H-NMR-Spektren ebenso die bevorzugte Einnahme der antiperiplanaren Konformation durch die meso-konfigurierten Diamine und die bevorzugte Einnahme der synklinalen Konformation I für die d, I-konfigurierte Diaminodiarylethane gefunden werden.^[46] In Abbildung 3.2 ist die Raumstruktur des *meso*-konfigurierten 1,2-Diamino-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethans (32) (links) und des d,l-konfigurierten Diaminoethans (58) (rechts) im jeweiligen Energieminimum dargestellt.



Abbildung 3.2: Raumstruktur des *meso*-konfigurierten 1,2-Diamino-1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethans (32) (links) und des *d*,*l*-konfigurierten Diaminoethans (58) (rechts) im Energieminimum

Die freie Rotierbarkeit der 1,2-Diarylethanstruktur wird auch bei den tetraarylsubstituierten doppelten Aldiminen beibehalten, so dass auch hier verschiedene Konformere denkbar sind.



Abbildung 3.3: Unterschiedliche Resonanzfrequenzen der Azomethinprotonen der *meso-* und *d,l-*konfigurierten Disalicylidenaldiminliganden in den ¹H-NMR-Spektren (400 MHz, [D₆]-DMSO) von <u>links: meso-3,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (11)</u> und <u>rechts: *d,l-*3,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (66)</u>

Für die *meso*-konfigurierten Disalicylidenaldimine ist ebenfalls diejenige Konfiguration die energetisch günstigste, bei der die Arylsubstituenten einen größtmöglichen Abstand zueinander haben. Dadurch kommen die Azomethinprotonen der *meso*-Form im Gegensatz zu der *d*,*l*-Form über der Ebene der Phenylkerne zu liegen. Die Resonanzfrequenz der Azomethin-Protonen der Diimine variiert deutlich mit der Substitution des Arylrestes. Generell ist sie aber bei den *meso*-konfigurierten Diiminen bei höheren Feldstärken zu finden als bei ihren *d*,*l*-konfigurierten Analoga (siehe Abbildung 3.3; *meso*-Diiminligand (**11**) δ = 8.42; *d*,*l*-Diiminligand (**66**) δ = 8.52).^[42]

Die benzylischen Protonen der *meso*-Diamine weisen durch die stärkere Entschirmung der benachbarten Arylringe im Vergleich zu ihren analogen *d*,*l*-Verbindungen eine Tieffeldverschiebung auf (siehe Abbildung 3.4; *meso*-1,2-Diamino-1,2-bis(4-fluor-phenyl)ethan **(35)** δ = 3.92; *d*,*l*-1,2-Diamino-1,2-bis(4-fluorphenyl)ethan **(61)** δ = 3.78). Im Gegensatz dazu zeigen die benzylischen Protonen der *meso*-Diiminverbindungen im Vergleich zu ihren *d*,*l*-Analoga eine Hochfeldverschiebung.

Die Aromatensignale der *d,I*-konfigurierten Schiffschen Basen erfahren eine stärkere Abschirmung und damit eine diamagnetische Verschiebung im Vergleich zu ihren *meso*-Diastereomeren.



Durch Koordinierung der Liganden an ein elektronenziehendes Zentrum entsteht eine völlig neue elektromagnetische Umgebung der einzelnen Protonen, so dass durch die Komplexierung signifikante Verschiebungen der Kernresonanzsignale im ¹H-NMR-Spektrum im Vergleich zu den entsprechenden Liganden beobachtet werden sollten. Durch die Koodinierung von Fe²⁺ bzw. Fe³⁺ an die vierzähnigen Liganden entstehen allerdings paramagnetische *high-spin* Komplexe^[48-55], so dass sich bei den NMR-Untersuchungen die Proben nicht "einlocken" lassen und die Signale im NMR-Spektrum nicht sichtbar werden. Beispielhaft ist in Abbildung 3.5 das ¹H-NMR-Spektrum von [1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien]eisen(III)-chlorid ([Fe^{III}salen]CI **(85)**) dargestellt.



Abbildung 3.5: ¹H-NMR-Spektrum des Eisen(III)-Komplexes [1,6-Bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien]eisen(III)-chlorid ([Fe^{III}salen]Cl (85)) in [D₆]-DMSO

3.2 IR-Spektroskopie

Anhand der IR-Spektroskopie lässt sich die Komplexierung der Liganden sehr gut verfolgen. Die IR-Spektren der Komplexe weisen im Vergleich zu den entsprechenden Liganden charakteristische Veränderungen auf, die in Abbildung 3.6 hervorgehoben werden. Bezeichnend für die Liganden-IR-Spektren ist das Auftreten stark verbreiterter O–H-Valenzschwingungsbanden im Absorptionsbereich zwischen 3300 und 2500 cm⁻¹, die auf eine starke Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen sind.^[56-58] Schwache Banden um 2570 cm⁻¹ beschreiben die O–H-Valenzschwingung nach Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zum Azomethinstickstoff. Nach Komplexierung der Liganden durch Fe²⁺ bzw. Fe³⁺ verschwinden diese Banden aus dem IR-Spektrum des Komplexes vollständig.^[59]

Wie für Arylidenimine erwartet, liegt die C=N-Valenzschwingungs-Bande um 1630 cm⁻¹.^[42, 57, 40, 60] Aufgrund der durch die Komplexierung abnehmenden Elektronendichte am Stickstoffatom und daraus resultierender verringerter Bindungsstärke der C=N-Bindung verschiebt sich diese Bande durch Koordinierung an Fe²⁺ bzw. Fe³⁺ zu um ca. 20 cm⁻¹ niedrigeren Wellenzahlen (z.B. von 1627 cm⁻¹ zu 1610 cm⁻¹ bei m[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (104m)).^[40, 58-64]



Abbildung 3.6: Charakteristische Änderungen im IR-Spektrum durch Komplexierung <u>oben:</u> Ligand: *meso*-3,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (11)

<u>unten:</u> Eisen(III)-Komplex: [*meso*-3,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien]eisen(III)-chlorid [Fe^{III}4'OCH₃]Cl (104m)

Die C–O-Valenzschwingung der phenolischen Hydroxylgruppe findet man im Spektrum der Schiffschen Basen bei Wellenzahlen um 1280 cm⁻¹. Diese Bande wird durch die Komplexierung um ca. 20 cm⁻¹ zu höheren Wellenzahlen verschoben (z.B. von 1277 cm⁻¹ zu 1294 cm⁻¹ bei m[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (**104m**).^[57, 58, 60, 65]

Die C–N-Valenzschwingungsbande zeigt eine starke Abhängigkeit vom Substitutionsmuster der Liganden und liegt bei ca. 1350 bis 1416 cm⁻¹, häufig um 1390 cm⁻¹. Diese Bande verschiebt sich um 10 bis 20 cm⁻¹ zu geringeren Wellenzahlen.^[59, 61] Charakteristische Banden der Metallkomplexe sind die Fe–O-Deformationsschwingungen, die bei Wellenzahlen unter 700 cm⁻¹ zu finden sind. Diese für die Komplexe typischen Banden sind bei den entsprechenden Liganden nicht aufzufinden.^[40, 59, 61, 64, 66-68] In Tabelle 3.1 sind die charakteristischen Veränderungen der IR-Spektren durch die Koordinierung an ein Eisenzentralatom zusammengefasst.

turia alta ID Davadara	
typische IR-Banden	verschiedung durch Komplexierung
<i>v</i> о–н (ca. 2570 cm ⁻¹)	fehlt bei den koordinierten Verbindungen
<i>v</i> _{C=N} (ca. 1630 cm ⁻¹)	zu niedrigeren Wellenzahlen
<i>v</i> _{C−N} (ca. 1390 cm ⁻¹)	zu niedrigeren Wellenzahlen
<i>v</i> _{C−O} (ca. 1280 cm ⁻¹)	zu höheren Wellenzahlen
$\delta_{\rm Fe-O}$ (bei < 700 cm ⁻¹)	nur bei den koordinierten Verbindungen

Tabelle 3.1:	Charakteristische	Veränderungen	in	den	IR-Spektren	durch		
	Komplexierung an ein Eisenzentralatom							

3.3 Massenspektroskopie

Da die ¹H-NMR-Spektren der synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe ungenügend auswertbar waren, erfolgte die Identitätskontrolle der Komplexe zum einen über die IR-Analytik, zum anderen über die Massenspektrometrie. Dabei wurde auf die *Fast-Atom-Bombardment*-Analytik (FAB) zurückgegriffen, die sich besonders für thermisch labile und polare Moleküle und damit insbesondere auch für metallorganische Verbindungen eignet. Im Unterschied zur EI-MS wird in der in der FAB-Analytik eine Lösung der Probe in einer weniger flüchtigen Matrix in der Ionen-Quelle mit schnellen, schweren, neutralen Edelgasatomen (z.B. Argon) beschossen. Die infolge des Beschusses aus der Probelösung austretenden Sekundärionen werden in das Massenspektrometer geleitet und analysiert.^[69]

Durch die Ionisierung aus flüssiger Matrix wird bei den Eisen(III)-Komplexen die Bildung radikalischer Molekülionen [M]⁺⁺ in nur geringem Ausmaß beobachtet. Geringe Verunreinigungen durch Alkaliionen führen häufig zur Erzeugung eines signifikanten [M+Na]⁺-Molekülionensignals. Besonders charakteristisch für FAB-Spektren ist das Auftreten von Untergrund-Peaks, die durch Matrixreaktionen entstehen.^[70] Wie bei MS-Spektren üblich sind neben den Molekülionen auch struktursignifikante Fragmentierungen zu beobachten. Als Beispiel für ein typisches FAB-Spektrum der Eisen(diarylsalen)-Komplexe ist in Abbildung 3.7 das Spektrum von *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl (**104m**) dargestellt. In den FAB-Spektren der Eisen(III)-Komplexe ist der Molpeak in nur sehr geringer Intensität zu finden. Mit einer wesentlich stärkeren Intensität kann man dagegen den durch Dechlorierung erhaltenen [M-CI]⁺-Peak (**A** in Abbildung 3.7) erkennen. Die Fragmentierung beginnt vermutlich mit der Spaltung der Bindungen zwischen dem Zentralatom und einem Stickstoff- bzw. Sauerstoffatom, gefolgt von der Spaltung der N–C-Bindung, so dass Fragment **B** erhalten wird. Unter Spaltung der C– C-Bindung werden anschließend die Fragmente **C** und **D** gebildet, während nach Abspaltung des Eisenzentralatoms schließlich die Entstehung des Fragments **E** beobachtet werden kann.^[55]



Abbildung 3.7: FAB-Spektrum von *m*[Fe^{III}4'OCH₃]Cl **(104m)** als typisches Beispiel der Massenspektren der Eisen(diarylsalen)-Komplexe

3.4 UV/Vis-Spektroskopie

Die Liganden der Eisenkomplexe zeigen im UV/Vis-Spektrum zwei ausgeprägte Absorptionsmaxima, die bei dem 4'-methoxysubstituierten Liganden **(11)** bei $\lambda_1 = 268$ nm und bei $\lambda_2 = 320$ nm zu finden sind (siehe Abbildung 3.8). Das ersten Absorptionsmaximum kennzeichnet den $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang des substituierten Benzolrings, während es sich bei dem zweiten Hauptpeak um den $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Azomethingruppe handelt. Durch Komplexierung verschieben sich beide Maxima nicht. Es kommt jedoch zu einem ausgeprägten hyperchromen Effekt.

Bezeichnend für die stark rot gefärbten Eisenkomplexe ist das Auftreten einer Absorption im sichtbaren Bereich des UV/Vis-Spektrums zwischen 410 nm und 500 nm, die im Spektrum der schwach gelb gefärbten Liganden nicht zu finden ist. Diese breite Bande kennzeichnet den *Ligand-Metall-Charge-Transfer*-Übergang (LMCT-Bande) von den π -Orbitalen des Liganden zu den d-Orbitalen des Metallions.^{[40, ^{57, 59, 66, 71]} In diesen sichtbaren Bereich fällt gleichzeitig der für Übergangsmetallkomplexe typische d \rightarrow d-Übergang, der jedoch durch die intensive LMCT-Bande überdeckt wird.^[49, 57, 72, 73] Für einen [Fe^{III}salen]⁺-Komplex wurden in der Literatur bereits vergleichbare Maxima bei 316 nm und 485 nm beschrieben.^[74, 75]}



Abbildung 3.8: UV/Vis-Spektrum des Eisen(diarylsalen)-Komplexes *m*[Fe^{III}4'OCH₃]CI (104m) und dessen Ligand *meso*-3,4-Bis(4-methoxyphenyl)-1,6-bis(2-hydroxyphenyl)-2,5-diazahexa-1,5-dien (11) in DMF; Konzentration 50 μM; 20 °C

3.5 Atomabsorptionsspektroskopie

Mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) können mehr als 60 Elemente hochspezifisch qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Die Nachweisgrenzen liegen dabei in der Regel unter 1 ppm, in manchen Fällen bei 0.005 ppm. Aufgrund der geringen Nachweisgrenzen und der hohen Genauigkeit – die Fehlergrenzen bewegen sich nur in einem Bereich weniger Prozent – eignet sich die AAS für die Bestimmung der Aufnahmen der synthetisierten Eisen(diarylsalen)-Komplexe in die Tumorzellen besonders gut (siehe Kapitel 5).^[76, 77]

Generell wird bei der AAS eine Lösung von Metallsalzen in einer Flamme verdampft und die entstehenden Atome durch Einstrahlung von Licht angeregt. Zur quantitativen Bestimmung wird die Menge der absorbierten Lichtintensität gemessen. Dabei ist es gleichgültig, in welcher chemischen Form (kovalent oder ionisch gebunden) das zu bestimmende Element vorliegt. Für die eigentliche Messung dürfen die Metallatome allerdings nicht über chemische Bindungen zu anderen Atomen verfügen, da sich dadurch die Anregungsenergie der Elektronen verändern würde. Aus diesem Grund werden in einem Atomisierungsschritt durch hohe Energiezufuhr aus den zu untersuchenden Verbindungen Atome erzeugt. Die Bindungen werden dabei homolytisch gespalten und die Metallatome so in einen atomaren, gasförmigen Zustand gebracht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Graphitrohrtechnik angewendet, bei der die zu untersuchende Substanz in einem Graphitrohr verbrannt wird. Die Graphitrohrtechnik stellt neben der Flammen-AAS eine der am meisten verbreiteten Atomisierungstechniken dar.

Der besondere Vorteil der AAS für die Zellaufnahmestudien liegt darin, dass Einzelkomponenten ohne vorherige Abtrennung aus einem Probengemisch vermessen werden können. Atomspektren sind Linienspektren mit sehr scharfen Absorptionslinien. Zur Anregung der Atome verwendet man eine Emissionslinie desselben Elements, das analysiert werden soll (Resonanzanregung). Daher können mit Hilfe der AAS auch aus komplexen Probengemischen Metalle und Metallverbindungen ohne Störungen mit hoher Genauigkeit quantitativ bestimmt werden.^[76, 77]

In Abbildung 3.9 sind die einzelnen Phasen der AAS graphisch dargestellt. Zunächst werden die Proben durch Trocknen und Mineralisieren thermisch vorbehandelt. Beide Phasen dienen u.a. der Entfernung des Lösungsmittels. In der anschließenden Pyrolysephase werden die organischen Probenbestandteile vollständig verbrannt. An die Pyrolysephase schließt sich die Atomisierung und damit die eigentliche Messphase an, in der die Absorption vermessen wird.



Abbildung 3.9: Graphische Darstellung des Ofenprogramms für die GF-AAS

Direkt vor der Messung wird die Untergrundabsorption mit einer Deuteriumlampe bestimmt. Dadurch können sämtliche Absorptionen, die nicht von den Eisenatomen herrühren, erfasst und vom eigentlichen Messwert abgezogen werden. In einem letzten Schritt, dem Ausheizen, wird das Graphitrohr von Analytenrückständen gereinigt. Das verwendete Temperaturprogramm wurde aus der Literatur entnommen und ist in Kapitel 11.3.3.3 aufgeführt.^[31, 32]