

Neue Entwicklungen
zur Durchführung automatisierter
NMR-kontrollierter Titrations von
Phosphon- und Phosphinsäuren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Diplom-Chemiker Sven Thomas Augner
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Professor Dr. G. Hägele

Korreferent: Professor Dr. W. Frank

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Mai 2002

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1999 bis März 2002 am Lehrstuhl 1 für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von

Herrn Professor Dr. G. Hägele

erstellt.

Meinem Doktorvater gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft sowie seine motivierende Unterstützung.

Weiterhin bedanke ich mich bei

Herrn Professor Dr. W. Frank

für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Professor Dr. Breuer (The Hebrew University of Jerusalem) Herrn Professor Dr. Failla (Università di Catania), Herrn Dr. Klose (Hoechst AG), Herrn Dr. Palladini (Bozetto) und Herrn Dr. Blum (Henkel KGaA) für die Bereitstellung der Modellsubstanzen.

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Vorträge:

S. Augner, G. Hägele, "Fluorierte Aminophosphonsäuren - NMR-kontrollierte Titratio-
nen", 9. Deutscher Fluortag (2000) in Schmitten / Taunus, Germany

C. Uhlemann, S. Augner, G. Hägele, "NMR-kontrollierte Titrationen - Innovation oder alt-
bekannte Meßmethode?", GDCh-Fachgruppentagung "Praktische Probleme der Kernreso-
nanzspektroskopie" am 15. / 16. Januar 2001 in Bochum, Germany

G. Hägele, "NMR controlled Titrations", ANZMAG 2002, 11. bis 17. Februar 2002 in
Taupo, New Zealand

Inhalt

1	Einleitung	14
1.1	Allgemein.....	14
1.2	Aufgabenstellung.....	15
1.2.1	Aufbau der Anlage für NMR-kontrollierte Titrationsen am 200 MHz und 500 MHz Spektrometer.....	15
1.2.2	Untersuchte Verbindungen	16
1.2.3	Komplexbildung des ^{113}Cd	19
1.2.4	Synthesewege der untersuchten phosphororganischen Verbindungen	20
1.3	Übersicht über die durchgeführten Messungen	22
2	Theorie und Grundlagen.....	23
2.1	Theorie und Grundlagen der chemischen Verschiebung und der ionenspezifischen Parameter.....	23
2.1.1	Protolysegleichgewichte	24
2.1.2	Komplexbildungsgleichgewichte.....	26
2.1.3	Zusammenhang zwischen chemischer Verschiebung und Molenbruch	28
2.1.4	Titrationmethoden	29
2.1.5	Darstellungsformen für NMR-kontrollierte Titrationsen	30
2.1.6	Reduzierte chemische Verschiebung	30
2.1.7	Ermittlung der ionenspezifischen chemischen Verschiebung aus NMR- kontrollierten Titrationsen	31
2.2	Potentiometrische Titrationsen.....	33
2.2.1	Potentiometrische Messung	33
2.2.1.1	Blanktitration	33
2.2.1.2	Auswertung der Blanktitration.....	34
2.2.1.3	Auswertung der potentiometrischen Titrationsen	35
2.2.1.4	Makroskopische Dissoziationskonstanten	35
3	Beschreibung der Messanlage und Messdurchführung.....	37
3.1	Konzeption der Anlage für NMR-kontrollierte Titrationsen	37
3.2	Experimentelle Durchführung der Messung.....	39

3.2.1	Einbau des Probenkopfs	39
3.2.2	Locken, Shimmen und Justieren des Felds.....	39
3.2.3	Blanktitration.....	39
3.2.4	Titrationssystem, Homogenisierung der Lösung und Vorspektren	39
3.2.5	Kalibrierung der Glaselektrode	40
3.2.6	Eingabe der experimentellen Parameter	40
3.2.7	Starten der Messung	41
3.2.8	Messfolge.....	41
3.3	Auswertung.....	43
3.3.1	Prozessierung des FID mit <i>WINNMR</i>	43
3.3.2	Verwendung von Voreinstellungen zur Prozessierung der Spektren	44
3.3.3	Güte der <i>WIN-DAISY</i> Simulation	44
3.4	Entwicklung der automatisierten NMR-kontrollierten Titrations.....	45
3.4.1	Entwicklungen unter Verwendung eines 200 MHz Spektrometers.....	45
3.4.2	Entwicklungen unter Verwendung eines 500 MHz Spektrometers.....	47
3.5	Versuchsaufbau zur Durchführung potentiometrischer Titrations.....	49
4	Reproduzierbarkeit der Messung	50
4.1	Vergleich der 200 MHz und der 500 MHz Anlage	50
4.2	Theoretische Überlegungen zur NMR-kontrollierten Titration unter Verwendung des Bruker Avance DRX 500 Spektrometers	51
4.2.1	Homogenisierung der Probe	51
4.2.1.1	Theoretische Berechnungen zur Homogenisierungszeit	51
4.3	Feldstabilität des DRX 500 bei Messungen bei ungelocktem Feld.....	55
4.3.1	Messung unter Verwendung des TBI-Probenkopfs.....	55
4.3.2	Messung unter Verwendung des LC-TXO-Probenkopfs	56
4.4	Berücksichtigung der Verdünnung.....	58
4.5	Streufeld des Magneten vom DRX 500.....	61
4.6	Temperatureffekte	62
4.7	Staudruck.....	63
5	Praktischer Teil	65
5.1	Durchführung der potentiometrischen Titrations.....	65

5.1.1	Herstellung der Lösungen und verwendete Lösungen.....	65
5.1.1.1	Säuren und Basen:	65
5.1.1.2	Ionenpufferlösung.....	65
5.1.1.3	Faktorbestimmungen	65
5.1.1.4	Elektrodenkalibration / Blanktitrationen	66
5.1.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	66
5.1.2.1	Bestimmung der Dissoziations- und Stabilitätskonstanten.....	66
5.1.2.2	Bestimmung der Stabilitätskonstanten von Metallkomplexen	66
5.2	Reinheitsbestimmungen mittels NMR.....	66
5.3	Referenzierung der NMR-kontrollierten Titrationsen.....	67
5.4	Verwendete Software.....	68
6	Durchgeführte NMR-kontrollierte Titrationsen.....	69
6.1	1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure <u>1</u>	70
6.1.1	NMR-kontrollierte Titration von HEDP <u>1</u> unter Verwendung des DRX 200	73
	81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von HEDP <u>1</u>	74
6.1.2	NMR-kontrollierte Titration von HEDP <u>1</u> unter Verwendung des DRX 500	77
6.1.2.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von HEDP <u>1</u>	78
6.1.3	Vergleich der 81,01 MHz- und der 202,46 MHz-NMR-kontrollierten Titration von HEDP	82
6.2	1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphonsäure <u>2</u>	84
6.2.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 1- Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphonsäure <u>2</u>	87
6.3	1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure <u>3</u>	92
6.3.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 1-Hydroxy-3- (P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure <u>3</u>	96
6.3.2	202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration von 1-Hydroxy-3-(P- methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure	105

6.3.3	500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure	107
6.4	Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) <u>4</u>	109
6.4.1	Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) <u>4</u> vs. 0,1 M TMAOH.....	115
6.4.1.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von EDTMP <u>4</u>	116
6.4.2	NMR-kontrollierte Titration von EDTMP <u>4</u> vs. 1 M TMAOH.....	119
6.4.2.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von EDTMP <u>4</u>	120
6.4.2.2	202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration von EDTMP <u>4</u>	123
6.4.2.3	500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von EDTMP.....	125
6.4.2.4	Vergleich der NMR-kontrollierten Titrationen von EDTMP <u>4</u>	128
6.5	1:1 Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex.....	130
6.5.1	1:1 Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex gegen 0,1 M TMAOH.....	134
6.5.1.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex	135
6.5.2	1:1 Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex gegen 1,0 M TMAOH.....	139
6.5.2.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex	140
6.5.2.2	202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex	143
6.5.2.3	500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex	143
6.5.3	44,39 MHz ^{113}Cd -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex	144
6.5.3.1	44,39 MHz ^{113}Cd -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex	146
6.5.4	Vergleich der Messungen von EDTMP zum 1:1 Cd-EDTMP-Komplex....	149
6.6	3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u>	153

6.6.1	NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxy-phenylphosphonsäure <u>5</u> unter Verwendung des 200 MHz Spektrometers	157
6.6.1.1	81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u>	158
6.6.2	NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxy-phenylphosphonsäure <u>5</u> unter Verwendung des 500 MHz Spektrometers	160
6.6.2.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u>	162
6.6.2.2	202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u>	165
6.6.2.3	500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u>	167
6.6.2.4	500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration mit Wasserunterdrückung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure	169
6.6.3	Vergleich der 81,01 MHz und 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u>	169
6.7	2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure <u>6</u>	170
6.7.1	NMR-kontrollierte Titration von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure <u>6</u>	173
6.7.1.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure <u>6</u>	174
6.7.1.2	202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure	178
6.7.1.3	500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure <u>6</u>	179
6.8	3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon <u>7</u>	182
6.8.1	NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon <u>7</u> vs. TMAOH	193

6.8.1.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon.....	194
6.8.1.2	202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxy-phosphono)isobenzofuranon.....	199
6.8.1.3	500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon	200
6.8.2	NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)iso-benzofuranon vs. HCl	205
6.8.2.1	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon vs. HCl.....	206
6.8.2.2	500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon vs. HCl	208
6.8.3	Vergleich zwischen Hin- und Rücktitration	209
7	Zusammenfassung.....	213
8	Anhang und Verzeichnisse.....	216
8.1	Literatur	216

Abkürzungen

bi.-dest.	bidestilliert
D ₂ O	Deuteriumoxid
EDTMP	Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)
FID	free induction decay = freier Induktionsabfall
FSS	Final sum of squares (Erläuterung siehe Kapitel 3.3.3)
HCl	Salzsäure
HEDP	1-Hydroxyethandiphosphonsäure
Iso	Kern
J	Kopplungskonstante in Hz
k. A.	keine Angabe
KIso	Art der Kopplung
KTyp	Zuordnung der Kopplung zum Spinsystem
NaOH	Natronlauge
NSP	Number of spectral points (Erläuterung siehe Kapitel 3.3.3)
R%	R-Faktor in Prozent (Erläuterung siehe Kapitel 3.3.3)
TMAOH	Tetramethylammoniumhydroxid
TMACl	Tetramethylammoniumchlorid
SDM	Standard deviation of measurements (Erläuterung siehe Kapitel 3.3.3)
SNr	Signalnummer
Stabw.	Standardabweichung

1 Einleitung

1.1 Allgemein

Es ist seit längerem bekannt, dass in der NMR-Spektroskopie bei Austauschreaktionen in Protolyse- und Komplexbildungsgleichgewichten von Säuren, Basen, Akzeptor- und Donatorzentren die chemische Verschiebung, Kopplungskonstanten und Halbwertsbreiten beeinflusst werden. Bereits Anfang der sechziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde bekannt, dass NMR-Spektren titrationsgrad- und pH-abhängig sein können [1] [2].

NMR-kontrollierte Titrationsen werden überwiegend in Serien von Einzelproben von genau definierten Einzelproben vermessen. Diese Methode ist zeitaufwendig und arbeitsintensiv und mit einer Vielzahl von Fehlermöglichkeiten behaftet (wie zum Beispiel Einwaage und Konzentration). Um diese Fehlerquellen zu minimieren, wird eine Titrationsreihe mehrfach wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können. Ziel war und ist es daher, nach effizienten, zeitsparenden und automatisierten Verfahren der NMR-kontrollierten Titration zu forschen.

Eine gute Übersicht über die Entwicklung der automatisierten NMR-kontrollierten Titration geben Reviews von Hägele [1] [2]. Seit Beginn der achtziger Jahre wurden Flow-Methoden zur NMR-Probenvermessung [3] [4] [5] [6] [7] entwickelt. Den Anfang für Arbeiten auf dem Gebiet der automatisierten NMR-kontrollierten Titration im Arbeitskreis von Prof. Hägele macht die Entwicklung von Neudert [8] bei der BASF AG, welcher eine stopped-flow Apparatur mit einem speziell angefertigten Glaseinsatz, im Hochfrequenzspulenbereich einem 10 mm NMR-Röhrchen entsprechend, verwendet hat. Diese Anlage diente der Reaktionskontrolle von Wittig-Horner Reaktionen anhand $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ - und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR unter stopped-flow Bedingungen.

Auf dieser Entwicklung aufbauend, beschäftigte sich der Arbeitskreis von Prof. Hägele ab Mitte der achtziger Jahre mit der computergesteuerten Aufnahme von titrationsgradabhängigen NMR-Spektren [9].

Aufbauend auf der Anlagenkonzeption und mit der Software aus dem Arbeitskreis von Prof. Hägele bauten Peters und Kaden [10] [11] eine Anlage unter Verwendung eines 300 MHz-Spektrometers auf und führten Messungen an Cyclamen durch.

Phosphinsäuren, Phosphonsäuren, Phosphonocarbonsäuren und Aminophosphonsäuren zählen zu biorelevanten Verbindungen, die in der Natur die Grundlage zahlreicher ablaufender Vorgänge bilden. Diese Verbindungen können als potentielle Liganden an Komplexbildungs- und Protonierungs- / Deprotonierungsgleichgewichten teilnehmen.

Da in biologischen Medien (wässrigen Lösungen mit definiertem pH-Wert) häufig sowohl bioaktive Liganden als auch Metallionen enthalten sind, wird vermutet, dass Metall-Ligand-Wechselwirkungen auftreten können. Somit stellt die genaue Kenntnis von Komplexstabilitätskonstanten eine wichtige Grundlage zur Ein- und Abschätzung der biochemischen Aktivität von solchen Liganden und Metallionen und ihrer Wirkung in biologischen Systemen dar.

1.2 Aufgabenstellung

1.2.1 Aufbau der Anlage für NMR-kontrollierte Titrations am 200 MHz und 500 MHz Spektrometer

Seit Veröffentlichung der ersten automatisierten NMR-kontrollierten Titration ist das Verbundverfahren NMR-kontrollierte Titration auf ein breites Echo gestoßen [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18]. Ein Nachteil bei der bisherigen Anlagenkonzeption zur Durchführung NMR-kontrollierter Titrations ist der durch das Startvolumen bedingte hohe Substanzbedarf. Ziel ist es daher, die Anlage so zu konzipieren, so dass über das Startvolumen der Substanzbedarf für eine Messung verringert werden kann.

Aufbauend auf der Entwicklung früherer Arbeiten [9] [19] [20] [21] soll die Technologie der automatisierten NMR-kontrollierten Titrations auf einem Bruker Avance DRX 500 NMR-Spektrometer zu einem Routinemessverfahren weiterentwickelt werden. Der bis zum Beginn dieser Arbeit vorliegende Stand der Anlage führte zwar zu einer $^3\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration [2] [21], doch war die Konzeption der Anlage nicht dazu geeignet, operatorunabhängig zu arbeiten. Durch das verwendete Schlauch-Anschlusssystem bedurfte es Geschick, um den Schlauch dicht an die Pumpe anzuschließen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist nur eingeschränkt möglich.

Ein weiteres Ziel ist es, ^1H -NMR-kontrollierte Titrations durchzuführen, da das höhere Magnetfeld gerade dazu geeignet ist, kompliziertere Spinsysteme zu untersuchen.

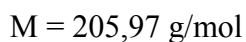
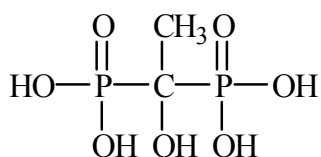
Die Anlage zur Durchführung von NMR-kontrollierten Titrationsen für ein Bruker Avance DRX 200 NMR-Spektrometer soll konzeptionell verbessert werden, um die Handhabung zu vereinfachen und die Störanfälligkeit zu beseitigen.

Der von Grzonka [9] entwickelte Insert zur Durchführung NMR-kontrollierter Titrationsen soll erstmals auf dem Bruker Avance DRX 200 zur Messung von ^{113}Cd -NMR-kontrollierten Titrationsen eingesetzt werden, um die Komplexbildung durch einen Metallkern NMR-spektroskopisch zu beobachten.

1.2.2 Untersuchte Verbindungen

Um die Funktionsweise der aufgebauten Apparaturen zu demonstrieren, werden exemplarisch Substanzen ausgewählt, so dass aus den ermittelten NMR-kontrollierten Titrationsdaten ionenspezifischen Parameter und Dissoziationskonstanten zu ermitteln sind. Zunächst wird mit HEDP, dessen Strukturformel unten gezeigt ist, eine Substanz vermessen, von der bereits NMR-kontrollierte Titrationsen durchgeführt worden sind [9] [20] [72] und die somit die Genauigkeit der Messungen mit den aufgebauten Apparaturen zeigen kann.

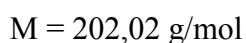
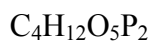
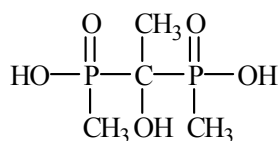
1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1



Quelle: Henkel KGaA

Bei den weiteren Substanzen handelt es sich um Vertreter biorelevanter Bisphosphinsäuren und Aminophosphonsäuren sowie um Phosphinophosphonsäuren und phenolische Phosphonocarbonsäuren, deren Strukturformel im Folgenden gezeigt werden:

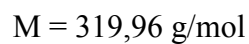
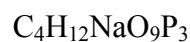
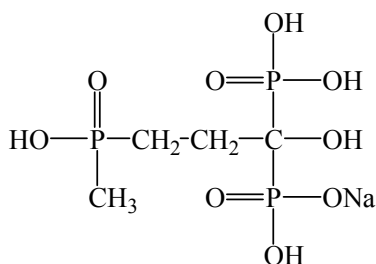
1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2



Quelle: Henkel KGaA

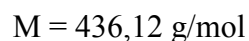
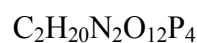
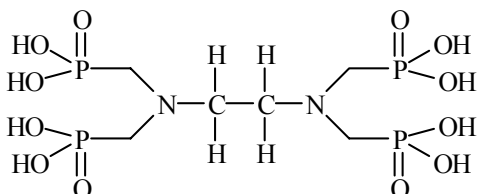
1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure Mononatriumsalz 3

(wird im Folgenden als 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 bezeichnet)



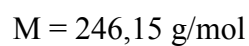
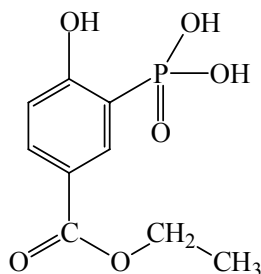
Quelle: Hoechst AG

Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) [EDTMP] 4



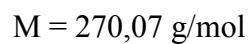
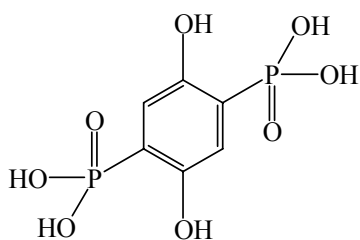
Quelle: Bozetto

3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5



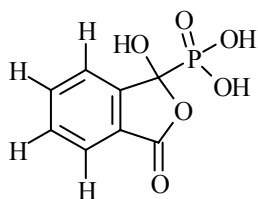
Quelle: Prof. S. Failla

2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6



Quelle: Prof. S. Failla

3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7



$$M = 448,40 \text{ g/mol}$$

Quelle: Prof. E. Breuer

Diese gezeigten biorelevanten Substanzen zeigen neben den vom pH-Wert abhängigen Protonierungs- sowie Deprotonierungsgleichgewichten des Liganden, bei denen man vermutet, dass sie mit deren pharmazeutischer Wirksamkeit in Zusammenhang stehen können, auch Metallkomplexbildungsgleichgewichte von großem pharmazeutischem Interesse [22]. Gerade in der Röntgendiagnostik finden zahlreiche dieser Metall-Bisphosphonsäurekomplexe (zum Beispiel Tc-99-HEDP [23], Tc-99- π -Alkylphosphino-1,1-hydroxyalkan-1,1-diphosphonate [24]) Verwendung zur Knochenszintigraphie.

Die Phosphonocarbonsäuren haben sich im klinischen Einsatz gegen eine Vielzahl von Herpesviren als Virustatika wirksame erwiesen [25] [26]. Beispielhaft seien hierfür das Herpes Simplex Virus (HSV), das Herpes Kretis Virus, welches Augen schädigt, sowie Herpesviren, die direkt oder indirekt mit der Entstehung von Krebs in Zusammenhang gebracht werden, erwähnt. Auch zahlreiche Krankheiten wie zum Beispiel Mareks Krankheit und Burkitts Krankheit [25] können durch Herpesviren ausgelöst werden.

Klinische Tests zeigen, dass Phosphonocarbonsäuren auch im Einsatz gegen das HIV-Virus erfolgversprechend Anwendung finden [27].

Erikssons [28] hat an 29 Phosphonocarbon- und Bisphosphonsäuren inhibitorische Eigenschaften auf isolierte HSV-1 DANN-Polymerase gezeigt. Neben der Phosphonoessigsäure und der Phosphonoameisensäure, die eine gleich hohe Aktivität [28] besitzen, verfügen die Carbonsäure- und Phosphonsäureester ebenfalls über eine antivirale Eigenschaft.

Bisphosphonsäuren, wie zum Beispiel die Nitrilotris(methylenphosphonsäure) (NTMP) oder die Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) (EDTMP) haben in Medizin und Industrie bereits Anwendung gefunden. Bisphosphonate vermögen die Auflösung des mineralischen Knochenhauptbestandteils Hydroxyapatit zu hemmen und werden zur Osteoporose-Behandlung eingesetzt [29] [30] [31]. Sie werden in der Medizin auch zur Krebsvorsorge und -behandlung [29] genutzt. In der Industrie finden sie als Korrosionsinhibito-

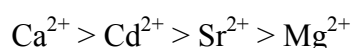
ren [33] und als Kesselsteininhibitoren [34] Verwendung. Durch dieses breite Anwendungsfeld sind diese Substanzen Gegenstand der aktuellen Forschung.

Phenolische Phosphonsäuren [35] [36] haben Einsatz in der Produktion von Epoxid-Harzen zur Steigerung der Flammresistenz gefunden und eröffnen so neue großtechnische Anwendungsgebiete [37].

1.2.3 Komplexbildung des ^{113}Cd

Die vermessenen phosphororganischen Verbindungen haben aufgrund ihrer Struktur komplexbildene Eigenschaften. In der Medizin wird diese Eigenschaft ausgenutzt, um bei der Osteoporosetherapie das Auswaschen des Calciums aus den Knochen zu verhindern. Calcium ist nicht nur bei der Knochenbildung, sondern auch als Botenstoff (Messenger) für hormonelle Wirkungen, bei der Auslösung von Kontraktion der Herz-, Gefäß- und Skelettmuskulatur (unter dem Einfluss des calciumregulierenden Enzyms Calmodulin) [38] [39] [40] und der Auslösung von Nervensignalen, bei der Blutgerinnung und der Stabilisierung von Proteinstrukturen wirksam. Mit Peptiden, Aminocarbonsäuren und Phosphonsäuren bildet Calcium lösliche Komplexe. Die reversible Bindung an Proteine und Phospholipide in Membranen gestattet die Steuerung von Zellfunktionen.

Ein Muskelprotein hat für die Bindung von Ca^{2+} eine Bildungskonstante von $5 \cdot 10^4$. Betrachtet man andere Metallionen, ergibt sich folgende Reihenfolge der Bildungskonstanten [41]:



Eine Erklärung für diese Reihenfolge liegt in der Annahme begründet, dass ein hartes, zur Chelatbildung befähigtes, Zentrum existiert, welches genau auf die Größe von Ca^{2+} abgestimmt ist.

Zur Strukturaufklärung und zur Erforschung von Strukturbeziehungen ist die Kernresonanzspektroskopie ein geeignetes Verfahren. Aufgrund der geringen Sensitivität des Calciums ist Calcium-NMR aber nur in so hohen Konzentrationen messbar, dass es sich zu kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen der Komplexbildungseigenschaften vieler Phosphonsäuren nicht einsetzen lässt, da dann meist eine Niederschlagsbildung auftritt. Um dennoch Aussagen über die Komplexbildungseigenschaften mit Hilfe der NMR-Spektroskopie treffen zu können, werden stattdessen spinaktive Elemente mit ähnlicher Biorelevanz, deren Häufigkeit und Sensitivität größer als die des Calciums sind, betrachtet.

So wird oftmals als Ersatz für Calcium bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen Cadmium verwendet.

	Calcium ($^{43}\text{Ca}^{2+}$)	Cadmium ($^{111}\text{Cd}^{2+}$)	Cadmium ($^{113}\text{Cd}^{2+}$)	Lanthan ($^{139}\text{La}^{3+}$)
Ionenradius [pm]	100	95	95	103,2
Spin	7/2	1/2	1/2	7/2
natürliche Häufigkeit [%]	0,145	12,75	12,26	99,91
relative Empfindlichkeit	$6,40 \times 10^{-3}$	$9,54 \times 10^{-3}$	$1,09 \times 10^{-2}$	$5,92 \times 10^{-2}$
absolute Empfindlichkeit	$9,28 \times 10^{-6}$	$1,21 \times 10^{-3}$	$1,33 \times 10^{-3}$	$5,91 \times 10^{-2}$
Messfrequenz (MHz) bei 11,7440 T	33,641	106,027	110,914	70,631

Tabelle 1: Vergleich von Ionenradius, Spin, Häufigkeit und Empfindlichkeit bei Calcium, Cadmium und Lanthan [42] [43]

In zahlreiche ^{113}Cd -NMR-Studien an Proteinen und biologischen Prozessen wurden die Möglichkeiten untersucht, Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} und Cu^{2+} durch Cd^{2+} zu ersetzen [44]. Da Cd^{2+} einen ähnlichen Ionenradius wie Zn^{2+} beziehungsweise Ca^{2+} besitzt, ist die Koordinationsgeometrie entsprechend. Die chemischen Verschiebungen des Cadmiums sind sehr empfindlich in Bezug auf die Natur, Anzahl und geometrische Anordnung der Liganden. Diese Empfindlichkeit spiegelt sich wieder in einem Koordinationsshift von bis zu 850 ppm bei Cd-substituierten Metalloproteinen [44]. So wurde an dem Beispiel das calciumregulierende Enzym Calmodulin Untersuchungen durch den Ersatz von Calcium durch Cadmium durchgeführt [44] [45].

Cadmium hat sich zur Simulation von Komplexbildungsreaktionen des Calciums als geeignet erwiesen. Die direkte Vergleichbarkeit lässt sich anhand der Biorelevanz des Cadmiums bei der Einlagerung in Knochen anstelle von Calcium aufzeigen.

1.2.4 Synthesewege der untersuchten phosphororganischen Verbindungen

Von der Synthese der 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1 (Trivialname: Etidronat) wird erstmals 1897 berichtet [46]. Durch den Umsatz von Acetylierungsmitteln (z. B. Acetylchlorid) mit Phosphorigersäure und Wasser bilden sich Zwischenprodukte,

aus denen sich nach einer Wasserdampfbehandlung 1-Hydroxyalkan-1,1-diphosphonsäuren gewinnen lassen [47].

1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 kann durch die Umsetzung von Methylchlorphosphin, Eisessig und Wasser gewonnen werden [48]. Aufgrund der flammenhemmenden Wirkung werden 1-Hydroxyalkan-1,1-bis-alkylphosphinsäuren in der Form der Alkalisalze zur Imprägnierung von Papier und Karton verwendet [49] [50] [51] [52] [53].

Eine Methode 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 zu synthetisieren, ist die Umsetzung von 2-Methyl-2,5-dioxo-1,2-oxaphospholan mit Phosphoriger Säure in der Schmelze mit anschließender hydrolytischer Aufarbeitung des gebildeten Produktes [54]. Verwendungsmöglichkeiten für diese Verbindung bestehen im Einsatz als Sequestriermittel in der Wasserbehandlung oder als Zusatz zu Zahnpflegemitteln zur Verhinderung der Zahnsteinbildung (sogenannte "Antitartarmittel") [54]. Die durch die Umsetzung dieser Verbindungsklasse mit Technetium erhaltenen Tc-99- α -Alkylphosphinico-1,1-hydroxy-alkan-1,1-diphosphate werden zur Knochenszintigraphie eingesetzt [24].

Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) [EDTMP] 4 lässt sich durch zwei Methoden synthetisieren: zum einen durch das Verfahren von Irani und Moedritzer [55] (Mannich-Typ-Reaktion) und zum anderen aus Ethylendiamin und Chlormethylphosphonsäure [56].

3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 und 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bis(phosphonsäure) 6 wurden von Professor Failla von der Università di Catania synthetisiert. Im Arbeitskreis von Prof. Hägele wurden durch Reimann [57] die Dissoziationskonstanten von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 und 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bis(phosphonsäure) 6, sowie deren Komplexbildungskonstanten mit Calcium und Zink untersucht. In dieser Arbeit sollen die ionenspezifischen Parameter ermittelt werden.

Über die Synthese der Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 wird in einer gemeinsamen Publikation der Gruppen Failla/Hägele berichtet werden.

2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 wird aus Hydrochinon und Diethylphosphit mit Triethylamin zum Tetraethyl-1,4-phenylbisphosphat umgesetzt. Nach der Veresterung mit Diisopropylamin zum Tetraethyl-(2,5-dihydroxy-1,4-phenyl)bisphosphonat wird anschließend im stark alkalischen die Esterfunktion hydrolysiert [36].

Die Darstellung des 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 erfolgt über eine Arbuzov-Reaktion aus Phthaloyldichlorid mit Trimethylphosphit [58]. Das dabei entstehende 3-Chloro-3-dimethylphosphonoisobenzofuranon wird mit Natriumiodid in Acetonitril zum 3-Chloro-3-methylphosphonoisobenzofuranon umgesetzt. Bei der anschließenden Refluxion findet gleichzeitig eine Demethylierung und eine Hydrolyse zum 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 statt.

1.3 Übersicht über die durchgeführten Messungen

Die nachfolgende Tabelle zeigt eine Aufstellung, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NMR-kontrollierten Titrations:

Substanz	81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR	500,13 MHz ^1H -NMR	202,46 MHz ^{31}P -NMR	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR	44,39 MHz ^{113}Cd -NMR
1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure <u>1</u>	✓			✓	
1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure <u>2</u>				✓	
1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure <u>3</u>		✓	✓	✓	
Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) <u>4</u>		✓	✓	✓	
Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex		✓	✓	✓	✓
3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u>	✓	✓	✓	✓	
2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bis(phosphonsäure) <u>6</u>		✓	✓	✓	
3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon <u>7</u>		✓	✓	✓	

Tabelle 2: Aufstellung der durchgeführten NMR-spektroskopischen Charakterisierungen an den untersuchten Verbindungen

Desweiteren wurden NMR-kontrollierte Titrations für den Arbeitskreis von Prof. Hägele durchgeführt [59] [60] [61].

2 Theorie und Grundlagen

2.1 Theorie und Grundlagen der chemischen Verschiebung und der ionenspezifischen Parameter

Die allgemeine Beschreibung eines Protolyten, welcher a Säurezentren und b Basezentren besitzt, lautet:



Die Gesamtanzahl an Säure- und Basezentren wird durch n beschrieben:

$$n = a + b \quad [\text{Gl. 2-1-2}]$$

Für den aktuellen Protonierungsgrad i gilt:

$$i = 0 \dots n \quad [\text{Gl. 2-1-3}]$$

Folglich ist die acideste Spezies: H_nL^{+b}

Für die basischeste Spezies gilt: L^{-a}

Die Ladung q_i der i -ten Spezies H_iL^{i-a} wird bestimmt durch:

$$q_i = i - a \quad [\text{Gl. 2-1-4}]$$

Salze von Liganden, wie zum Beispiel die aus einer Titration mit Natronlauge resultierenden Natriumkomplexe oder die Hydrochloride einer Aminosäure, werden in allgemeiner Schreibweise definiert:



mit den Nebenbedingungen: für $l = 0$: $0 \leq m \leq a$ und

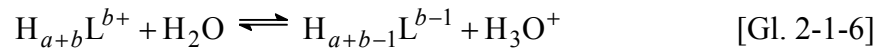
für $m = 0$: $0 \leq l \leq b$

Dabei stellt m die Anzahl einwertige Kationen M^+ und l einwertige Anionen X^- dar.

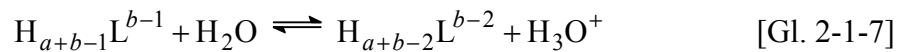
2.1.1 Protolysegleichgewichte

Die Dissoziation des in Gleichung 2-1-5 definierten Protolyten lässt sich wie folgt definieren:

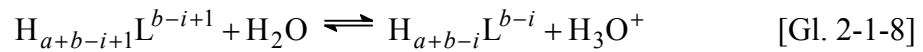
1. Dissoziationsstufe:



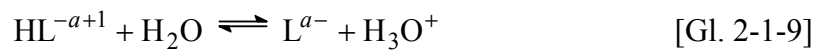
2. Dissoziationsstufe:



i . Dissoziationsstufe mit $1 \leq i \leq a+b$:



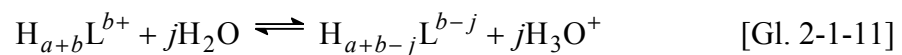
$a+b$. Dissoziationsstufe:



Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes lassen sich für die $a+b$ diskreten Dissoziations-schritte beziehungsweise Protolysegleichgewichte die individuellen Dissoziationskonstanten K_i formulieren:

$$K_i = \frac{c_{\text{H}_{a+b-i}\text{L}^{b-i}} \cdot c_{\text{H}_3\text{O}^+}}{c_{\text{H}_{a+b-i+1}\text{L}^{b-i+1}}} \quad [\text{Gl. 2-1-10}]$$

Wird die Gesamtreaktion der Protolyse betrachtet, so ergibt sich aus den einzelnen individuellen Dissoziationskonstanten K_i die Bruttodissoziationskonstante $\overline{K}_j$. Für die Brutto-reaktion für alle Dissoziationsstufen



gilt:

$$\overline{K}_j = \frac{c_{\text{H}_{a+b-j}\text{L}^{b-j}} \cdot c_{\text{H}_3\text{O}^+}^j}{c_{\text{H}_{a+b}\text{L}^{b+}}} \quad [\text{Gl. 2-1-12}]$$

$$\overline{K}_j = K_1 \cdot K_2 \cdot \dots \cdot K_{j-2} \cdot K_{j-1} \cdot K_j = \prod_{i=1}^j K_i \quad [\text{Gl. 2-1-13}]$$

$$\overline{K}_j = K_1 \cdot K_2 \cdot \dots \cdot K_{j-2} \cdot K_{j-1} \cdot K_j = \prod_{i=1}^j K_i \quad [\text{Gl. 2-1-14}]$$

In logarithmischer Schreibweise wird Gleichung 2-1-14 zu:

$$p\overline{K}_j = pK_1 + pK_2 + \dots + pK_{j-2} + pK_{j-1} + pK_j = \sum_{i=1}^j pK_i \quad [\text{Gl. 2-1-15}]$$

Mit Hilfe von Gleichung 2-1-12 lässt sich die aktuelle Konzentration der Dissoziationsprodukte berechnen:

$$c_{\text{H}_{a+b-j}\text{L}^{b-j}} = c_{\text{H}_{a+b}\text{L}^{b+}} \cdot \frac{\overline{K}_j}{c_{\text{H}_3\text{O}^+}^j} \quad [\text{Gl. 2-1-16}]$$

Die Totalkonzentration des Liganden ergibt sich zu:

$$c_{\text{L}}^{\text{t}} = \sum_{j=0}^{a+b} c_{\text{H}_{a+b-j}\text{L}^{b-j}} \quad [\text{Gl. 2-1-17}]$$

Durch Einsetzen von Gleichung 2-1-16 in 2-1-17 erhält man unter Beachtung von den Nebenbedingungen ($K_0 = 1$ und $\overline{K}_0 = 1$ ($p\overline{K}_0 = 0$)) für die Totalkonzentration des Liganden:

$$c_{\text{H}_{a+b-j}\text{L}^{b-j}} = c_{\text{H}_{a+b}\text{L}^{b+}} \cdot \sum_{j=0}^{a+b} \frac{\overline{K}_j}{c_{\text{H}_3\text{O}^+}^j} \quad [\text{Gl. 2-1-18}]$$

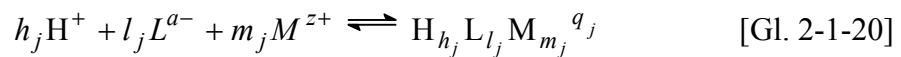
Der Molenbruch $\chi_{\text{H}_{a+b-j}\text{L}^{b-j}}$ ist gegeben durch:

$$\chi_{\text{H}_{a+b-j}\text{L}^{b-j}} = \frac{c_{\text{H}_{a+b-j}\text{L}^{b-j}}}{c_{\text{L}}^{\text{t}}} = \frac{\frac{\overline{K}_j}{c_{\text{H}_3\text{O}^+}^j}}{\sum_{i=0}^{a+b} \frac{\overline{K}_i}{c_{\text{H}_3\text{O}^+}^i}} \quad [\text{Gl. 2-1-19}]$$

2.1.2 Komplexbildungsgleichgewichte

Zahlreiche Methoden und Programme wurden entwickelt, um Titrationskurven für Komplexbildungsgleichgewichte zu simulieren und iterieren [62] [63] [64]. Die aktuellsten Entwicklungen aus dem Arbeitskreis von Prof. Hägele sind die Programme WINPROT und WINSORE [57].

Die Komplexbildung durch die drei Komponenten L^{a-} , H^+ und M^{z+} lässt sich verallgemeinert ausdrücken als:



Daraus ergibt sich die Bruttostabilitätskonstante β_j :

$$\beta_j = \frac{c_{H_{h_j} L_{l_j} M_{m_j}^{q_j}}}{c_{H^+}^{h_j} \cdot c_{L^{a-}}^{l_j} \cdot c_{M^{z+}}^{m_j}} \quad [\text{Gl. 2-1-21}]$$

Die Ladung q einer j -ten Spezies berechnet sich zu:

$$q_j = h_j - a \cdot l_j + z \cdot m_j \quad [\text{Gl. 2-1-22}]$$

Durch die Kenntnis der Totalkonzentration an Ligand während einer Titration lassen sich die Konzentrationsbilanzen berechnen. Diese Kenntnis kann erlangt werden durch die Verwendung von Stammlösungen (aus dem Volumen der vorgelegten Ligandlösung V_L und der Ligandkonzentration in dieser Lösung im Verhältnis zum vorgelegten Gesamtvolumen V_t) beziehungsweise durch die Einwaage der Substanz (aus der Masse m_L des eingewogenen Liganden im Verhältnis zum Produkt aus Molmasse M_L und Gesamtvolumen der Vorlage V_t).

$$c_L^t = \frac{m_L}{M_L \cdot V_t} = \frac{V_L \cdot c_L}{V_t} \quad [\text{Gl. 2-1-23}]$$

Die Ligand-Totalkonzentration in einer Lösung von freiem Ligand und j protonierten oder unprotonierten Metall-Ligand-Spezies ist gegeben zu:

$$c_L^t = c_{L^{a-}} + \sum_j l_j \cdot c_{H_{h_j} L_{l_j} M_{m_j}^{q_j}} \quad [\text{Gl. 2-1-24}]$$

Durch Einsetzen von Gleichung 2-1-21 in Gleichung 2-1-24 lassen sich Ligand-, Metall- und Wasserstoffionen-Totalkonzentration berechnen:

$$c_H^t = c_{H^+} + \sum_j \beta_j h_j \cdot c_{H^+}^{h_j} \cdot c_{L^{a-}}^{l_j} \cdot c_{M^{z+}}^{m_j} \quad [\text{Gl. 2-1-25}]$$

$$c_M^t = c_{M^{z+}} + \sum_j \beta_j \cdot m_j \cdot c_{H^+}^{h_j} \cdot c_{L^{a-}}^{l_j} \cdot c_{M^{z+}}^{m_j} \quad [\text{Gl. 2-1-26}]$$

$$c_L^t = c_{L^{a-}} + \sum_j \beta_j \cdot l_j \cdot c_{H^+}^{h_j} \cdot c_{L^{a-}}^{l_j} \cdot c_{M^{z+}}^{m_j} \quad [\text{Gl. 2-1-27}]$$

Jede Komponente und alle Spezies $H_{h_j} L_{l_j} M_{m_j}^{q_j}$ geben im Gleichgewicht ionenspezifische NMR-Parameter wieder. Wenn die Austauschreaktionen auf der NMR-Zeitskala schnell sind, kann nur ein charakteristisches Resonanzsignal für jeden beobachteten Kern beobachtet werden (unter Vernachlässigung von Kopplungen, ein Singulett). So wird im $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum im Titrationsverlauf die chemische Verschiebung der Phosphorkomponente betrachtet.

Die mittlere chemische Verschiebung $\langle \delta_L \rangle$ eines Ligand L ergibt sich zu:

$$\langle \delta_L \rangle = \sum_j \chi_j \cdot l_j \cdot c_{H_{h_j} L_{l_j} M_{m_j}^{q_j}} + \chi_L \delta_L \quad [\text{Gl. 2-1-28}]$$

Analog ergibt sich bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung des Metalls M (in diamagnetischen Komplexen) die mittlere chemische Verschiebung $\langle \delta_M \rangle$ zu:

$$\langle \delta_M \rangle = \sum_j \chi_j \cdot m_j \cdot c_{H_{h_j} L_{l_j} M_{m_j}^{q_j}} + \chi_M \delta_M \quad [\text{Gl. 2-1-29}]$$

Die dynamische chemische Verschiebung, sowie Resonanzfrequenzen und Kopplungskonstanten (in bestimmten Spinsystemen) hängen von dem aktuellen pH-Wert der Lösung ab. Für gegebene Systemparameter (Dissoziationskonstanten, Stabilitätskonstanten, Volumen und Konzentrationen der Lösungen) ist der pH-Wert eine Funktion des Titrationsgrades. Der Titrationsgrad τ berechnet sich aus den Stoffmengen n_{Titrand} , n_{Titrator} und der Stoffmenge n_L^t der zu untersuchenden Substanz bzw. des Liganden:

$$\tau = \frac{(V_{\text{Base}} \cdot c_{\text{Base}} - V_{\text{Säure}} \cdot c_{\text{Säure}})_{\text{Titrand}} + V_{\text{x}} (c_{\text{Base}} - c_{\text{Säure}})_{\text{Titrator}}}{V_{\text{L}} \cdot c_{\text{L}}} \quad [\text{Gl. 2-1-30}]$$

In der Variablen V_{x} werden das Gesamtvolumen des Titrators unter Berücksichtigung der Konzentrationen zusammengefasst. Anionische Spezies erhalten positive und kationische Spezies negative Titrationsgrade.

2.1.3 Zusammenhang zwischen chemischer Verschiebung und Molenbruch

Jede Spezies H_iL^{i-a} besitzt eine eigene chemische Verschiebung $\delta_{\text{H}_i\text{L}^{i-a}}$, welche auch als ionenspezifischer Parameter bezeichnet wird. Da Protolyseprozesse, beziehungsweise Komplexbildungsprozesse, schnell in Bezug zur NMR-Zeit-Skala verlaufen, beobachtet man keine separierten individuellen Resonanzsignale der einzelnen Spezies, sondern ermittelt dynamisch gemittelte NMR-Parameter. Somit gilt für die mittlere chemische Verschiebung $\langle \delta \rangle$:

$$\langle \delta \rangle = \sum_{i=0}^n \chi_i \delta_{\text{H}_i\text{L}^{i-a}} \quad [\text{Gl. 2-1-31}]$$

Es ist nützlich und sinnvoll den Begriff des Titrationsshifts $\Delta\delta$ einzuführen:

$$\Delta\delta_i = \delta_i - \delta_{i+1} \quad [\text{Gl. 2-1-32}]$$

Hierbei steht i für einen Punkt der Titration (wie zum Beispiel Protonierung, Deprotonierung). In dieser Arbeit wird ebenfalls der Begriff des Deprotonierungsgradienten Δ_i [ppm] verwendet:

$$\Delta_i = \delta_{\text{H}_i\text{L}} - \delta_{\text{H}_{i-1}\text{L}} \quad [\text{Gl. 2-1-33}]$$

Dieser Gradient definiert die Änderung der chemischen Verschiebung pro abstrahiertem Proton. Durch das Vorzeichen des Gradienten und dessen Größe können häufig die Protonierungs- und Deprotonierungswege von mehrzähligen Liganden erklärt werden.

2.1.4 Titrationsmethoden

Zwei verschiedene Titrationsmethoden werden zur Durchführung potentiometrischer Titrationen angewendet:

Methode 1: Titration in äquidistanten Inkrementen ΔV für den Titrator:

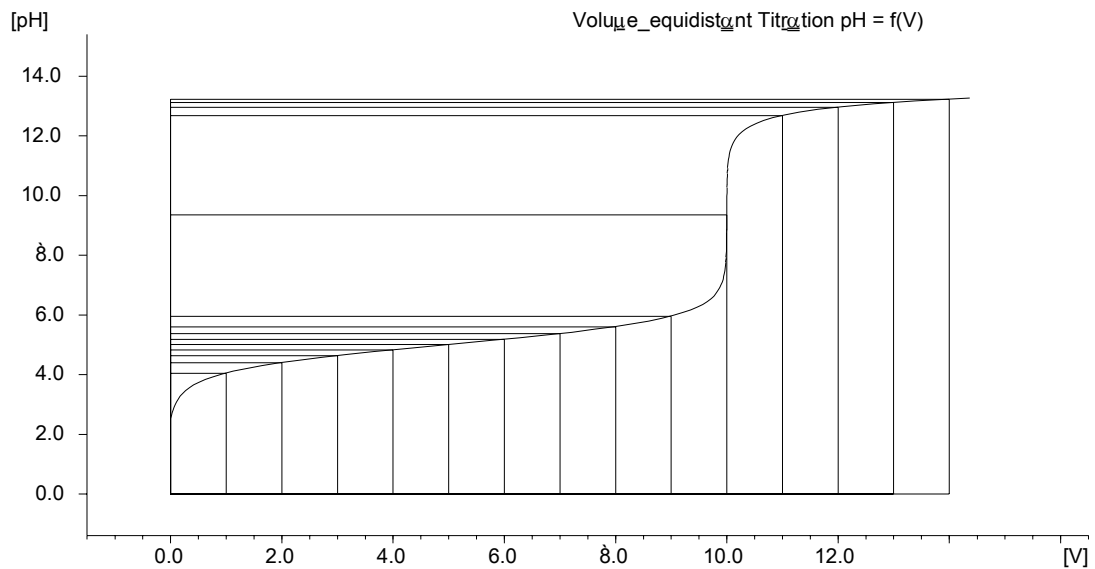


Abbildung 1: Methode 1: Titration mit äquidistanten Inkrementen ΔV für den Titrator (Beispiel: CH_3COOH vs. NaOH) [65].

Methode 2: Titration in äquidistanten Inkrementen pH:

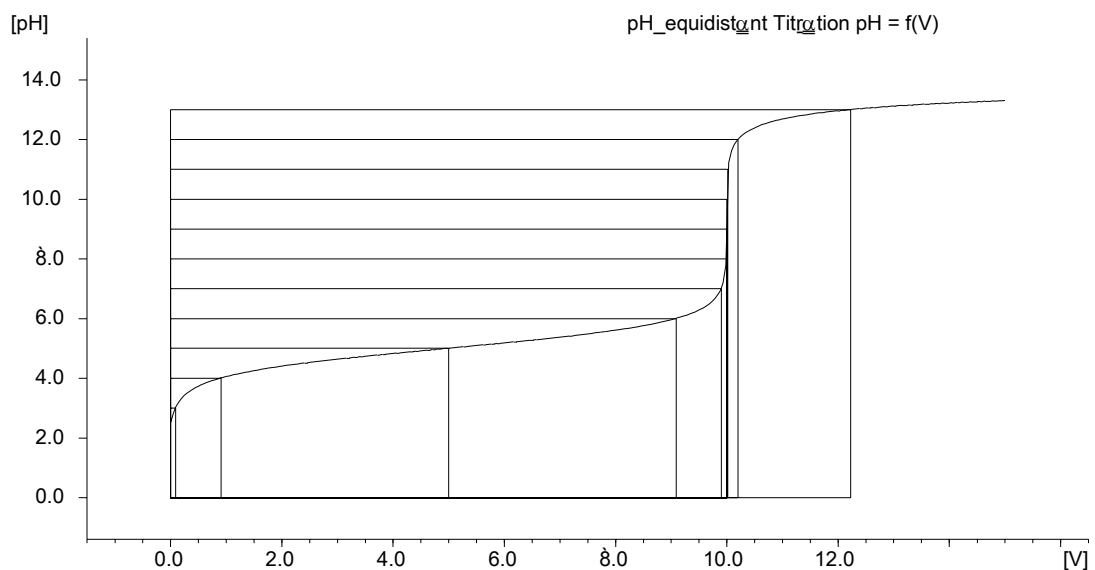


Abbildung 2: Methode 2: Titration mit äquidistanten Inkrementen pH (Beispiel: CH_3COOH vs. NaOH) [65].

Bei Methode 1 handelt es sich um eine Standardmethode bei Verwendung von automatischen Motorkolben-Büretten. Diese Methode wird auch als "lineare Titration" beziehungsweise "äquidistante Titration" bezeichnet. Im Bereich der geringen Steigung führt dies zur Aufnahme vieler Messpunkte. Dieses Dosierverfahren wird zur Bestimmung von Dissoziations- und Stabilitätskonstanten eingesetzt.

Methode 2 auch "dynamische Titration" genannt, wird hingegen zur exakten Bestimmung des Äquivalenzpunktes (zum Beispiel zur Faktorbestimmung von Maßlösungen) eingesetzt. Die dynamische Zugabe führt zu einer geringen Anzahl von Messpunkten im Bereich der geringen Steigung; Aber im Bereich der hohen Steigung am Äquivalenzpunkt wird die Kurve durch eine große Zahl von Messpunkten beschrieben. Für diese Methode wird spezielle Software benötigt, die eine dem Kurvenverlauf folgende Vorausberechnung des Dosiervolumens ermöglicht. Nachteil bei dieser Methode im Vergleich zur "linearen Titration" ist der höhere Zeitbedarf.

2.1.5 Darstellungsformen für NMR-kontrollierte Titrationsen

Die Darstellung NMR-kontrollierter Titrationsen erfolgt üblicherweise in zwei Formen: dem τ, δ -Plot und dem pH, δ -Plot. Beide Darstellungsformen sind vergleichbar mit 2D-COSY-Spektren. Für sogenannte first-order-Säuren, bei denen $\text{pK}_{i+1} - \text{pK}_i > 3$ ist, gilt eine einfache Beziehung:

$$\frac{d\langle \delta \rangle}{d\text{pH}} \text{ zeigt Extrema (Minima oder Maxima), während die zweite Ableitung } \frac{d^2\langle \delta \rangle}{d\text{pH}^2}$$

für den Fall $\text{pH} = \text{pK}_i$ null wird. In diesen Fällen sind leicht pK_i und $\log \beta_i$ aus den pH, δ -Plots zu entnehmen.

Second-order-Fälle mit $\text{pK}_{i+1} - \text{pK}_i < 3$ sind sehr komplex und benötigen eine iterative Berechnung der Titrationsdaten mit geeigneten Methoden und Programmen [66] [67].

2.1.6 Reduzierte chemische Verschiebung

Eine sehr gute Möglichkeit, die chemischen Verschiebungen zwischen verschiedenen Kernen zu vergleichen, besteht mit der Einführung der reduzierten chemischen Verschiebung $\langle \delta_r \rangle$. Dieser Term ist wie folgt definiert:

$$\langle \delta_r \rangle = \frac{\langle \delta \rangle - \delta_{\min}}{\delta_{\max} - \delta_{\min}} \quad [\text{Gl. 2-1-34}]$$

Hierbei handelt es sich bei δ_{min} um den Minimalwert und bei δ_{max} um den Maximalwert aller ionenspezifischen chemischen Verschiebungen δ_i in der Messung. Die reduzierte chemische Verschiebung $\langle \delta_r \rangle$ nimmt hierbei Werte zwischen null und eins an.

Analog zu der reduzierten chemischen Verschiebung lässt sich man auch eine reduzierte Halbwertsbreite definieren.

$$HWB_r = \frac{HWB - HWB_{min}}{HWB_{max} - HWB_{min}} \quad [\text{Gl. 2-1-35}]$$

2.1.7 Ermittlung der ionenspezifischen chemischen Verschiebung aus NMR-kontrollierten Titrations

Die dynamische chemische Verschiebung $\langle \delta_j \rangle$ ist für jeden pH_j gegeben durch:

$$\langle \delta_j \rangle = \frac{\sum_{i=0}^n \delta_{H_i L^{i-a}} \cdot 10^{(\lg \beta_i - i \cdot \text{pH}_j)}}{\sum_{k=0}^n 10^{(\lg \beta_k - k \cdot \text{pH}_j)}} \quad [\text{Gl. 2-1-36}]$$

Bei gegebenen $\lg \beta_i$ -Werten (pK_i -Werten) können durch Regressions-Analysen die ionenspezifischen Parameter $\delta_{H_i L^{i-a}}$ ermittelt werden.

Durch Anwendung eines RMS-Wertes (root of mean squares) kann die beste Anpassung ermittelt werden:

$$rms = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n_{exp}} (\langle \delta_j(\text{calc}) \rangle - \langle \delta_j(\text{exp}) \rangle)^2}{(n_{exp} - n_{par})}} \quad [\text{Gl. 2-1-37}]$$

Um genaue Ergebnisse zu erzielen, ist es erforderlich, dass die analytischen Parameter sowohl für die $\lg \beta_i$ -Wert-Bestimmung als auch für die NMR-kontrollierte Titration vergleichbar gewählt werden.

Um die ionenspezifischen chemischen Verschiebungen zu berechnen, gibt es verschiedene Methoden:

- 1) Gauß Elimination
- 2) Multivariate lineare Regression
- 3) Gewichtete multivariate lineare Regression

4) Implizit Methode

Bei der Berechnung der ionenspezifischen chemischen Verschiebungen mit Hilfe der Gauß-Elimination können keine Fehler für die Parameter bestimmt werden.

Durch die Anwendung der multivarianten linearen Regression wird dem Umstand Rechnung getragen, dass bei der Ermittlung der Parameter die Genauigkeit der Berechnung von Interesse ist. Bei dieser Methode wird davon ausgegangen, dass jeder beobachtete $\langle \delta \rangle$ -Wert mit gleicher Wichtung in die Summe der Fehlerquadrate einfließt. Diese Methode wird in *AMPLSQ9* [19] zur Berechnung von ionenspezifischen chemischen Verschiebungen verwendet.

Weitergehende Betrachtungen [61] in der gewichteten multivarianten linearen Regression berücksichtigen, dass sich die individuellen Ungenauigkeiten (Standardabweichung) der beobachteten chemischen Verschiebung während der Titration stark verändern. Diese Standardabweichung kann als spektrale Halbwertsbreite, welche in ppm angegeben wird, definiert werden:

$$\sigma(\langle \delta \rangle) = \frac{\Delta \nu_{1/2}}{\nu_{\text{Spektrometer}}} \quad [\text{Gl. 2-1-38}]$$

Für jeden experimentellen Punkt j kann nun ein Wichtungsfaktor eingeführt werden,

$$w_j = \frac{1}{\sigma^2(\langle \delta_j \rangle)} \quad [\text{Gl. 2-1-39}]$$

der dann in die gewichtete Fehlerfunktion eingeht. Diese Methode wird bei *MultiNMRpK* [61] angewandt

Neueste Entwicklungen mittels Implizit Regression berücksichtigen, dass auch die Molenbrüche spezifische Fehler enthalten. Hierdurch entstehen größere Fehler für die individuellen Parameter. Die genaue Funktionsweise dieser Bestimmungsmethode wird in [61] diskutiert.

Bei allen Methoden gilt folgende Regel: Genauere Werte für die ionenspezifischen Parameter werden bei Spezies erzielt, die eine größere Häufigkeit besitzen. Dies wird verständlich, da die Fehler bei Spezies mit einer geringeren Häufigkeit stärker gewichtet werden.

2.2 Potentiometrische Titrationen

Wie bereits erläutert sind potentiometrische Titrationen Bestandteil einer NMR-kontrollierten Titration. Desweiteren wurden potentiometrische Titrationen zur Bestimmung der Dissoziations- und Stabilitätskonstanten durchgeführt. Im Folgenden werden die wichtigsten Grundlagen kurz skizziert:

2.2.1 Potentiometrische Messung

Mit zunehmender Verbreitung von Personal Computern seit Mitte der achtziger Jahre wurde der PC für potentiometrische Messungen ein bedeutendes Hilfsmittel. Im Düsseldorfer Arbeitskreis von Prof. Hägele wurde diese Entwicklung erkannt und durch Programmierung von entsprechender Software Rechnung getragen [57] [68] [69] [70]. So entstand unter anderem das hier verwendete Titrationssystem MINI_T ALPHA (SCHOTT-Geräte) [69] [70]. Dieses registriert im Verlauf der Titration die Parameter (wie zum Beispiel das Elektrodenpotential in mV, das Zugabevolumen in ml und die Temperatur).

Mit dem Iterations- und Simulationsprogramm *WINSORE* [57], welches zur Simulation und Auswertung von Titrationen verwendet werden kann, werden aus den potentiometrischen Daten die $\log\beta$ -Werte und die Molenbruchverteilung der einzelnen Spezies berechnet.

2.2.1.1 Blanktitration

Eine Blanktitration ist die Titration einer starken einwertigen Säure gegen eine starke einwertige Base (zum Beispiel HCl gegen NaOH) unter isothermen Bedingungen ($T = 25\text{ °C}$). Die Blanktitration dient zur Bestimmung der Elektrodenparameter, wie des Asymmetriepotentials E_{AS} , der Elektrodensteigung G , sowie der Korrekturglieder für den Säure- und Alkalifehler j_{H^+} und j_{OH^-} .

Die Volumenzugabe erfolgt äquidistant, wobei die Zugabevolumina und Potentiale der Einstabmesskette aufgezeichnet werden. Aufgrund der vollständigen Dissoziation starker Säuren und Basen lassen sich bei Kenntnis der Säure- und Basevolumina aus Vorlage und Titration die pH-Werte der Lösung für jeden Volumenschritt berechnen und den gemessenen Potentialdifferenzen ΔE zuordnen. Somit lassen sich konzentrationsbezogene pH-Werte ($pH = pcH$) bestimmen. Durch Zusatz eines Ionenpuffers, der zur Einhaltung einer

konstanten Ionenstärke dient, kann dann der Aktivitätskoeffizient als nahezu konstant angenommen und als additiver Faktor in die Elektrodenparameter integriert werden.

$$pH = pcH + pf \quad [\text{Gl. 2-2-1}]$$

$$\Delta E = E_{\text{real}} - G \cdot pf - G \cdot pcH + j_{\text{H}^+} \cdot 10^{-pf} \cdot 10^{-pcH} + j_{\text{OH}^-} \cdot 10^{-pf} \cdot 10^{pcH - pK_W} \quad [\text{Gl. 2-2-2}]$$

mit:

- pH : aktivitätsabhängiger pH-Wert
- pcH : konzentrationsabhängiger pH-Wert
- E_{real} : realer Elektrodennullpunkt
- G : Elektrodensteigung (bzw. Nernst-Faktor)
- j_{H^+} : Säurefehler
- j_{OH^-} : Alkalifehler
- pK_W : konzentrationsbezogene Autoprotolysekonstante des Wassers

Es gibt folgenden Unterschied zwischen einer Blanktitration und einer Pufferkalibration:

- Blanktitrationen liefern konzentrationsbezogene pH-Werte
- Pufferkalibrationen liefern aktivitätsbezogene pH-Werte

Daraus folgt, dass bei Blanktitrationen konzentrationsbezogene Dissoziationskonstanten K^c und Stabilitätskonstanten $\log \beta^c$ bestimmt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich Säure- bzw. Alkalifehler leichter bestimmen lassen.

2.2.1.2 Auswertung der Blanktitration

Die Auswertung der Blanktitration erfolgt mit dem Programm AUTOBLANK [71]. Nach der Eingabe und Kontrolle der Titrationsparameter (Ionenstärke, Temperatur, etc.) wird die Optimierung der Parameter gestartet. Man erhält somit die elektrodenspezifischen Parameter für die verwendete Einstabmesskette.

Für die Autoprotolysekonstante des Wassers für $I = 0,1 \text{ mol/l}$ (NaCl) und $T = 25,0 \text{ °C}$ beträgt der $pK_W^c = 13,78$. Bei einer Ionenstärke von $I = 1,0 \text{ mol/l}$ (NaCl) und $T = 25,0 \text{ °C}$ beträgt der $pK_W^c = 13,9295$.

2.2.1.3 Auswertung der potentiometrischen Titrationsen

Die Auswertung der Titrationsen erfolgt mit dem Programm *WINSORE* [57]. Diese Software beruht auf der Simulation einer Titrationskurve aus Startwerten und der iterativen Näherung der simulierten Kurve an die experimentelle Kurve durch Minimierung des sogenannten *RMS*-Werts (root of mean squares = der Wurzel der kleinsten Fehlerquadrate) gemäß der Gleichung:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum W_i (x_{i, \text{ber}} - x_{i, \text{exp}})^2}{NDP - NP}} \quad [\text{Gl. 2-2-3}]$$

mit: W_i : Wichtungsfaktor für den i -ten Messwert

x_i : i -ter Messwert

NDP : Anzahl Datenpunkte

NP : Anzahl zur Optimierung freigegebener Parameter

Die aus der Blanktitration ermittelten Elektrodenparameter werden in *WINSORE* [57] eingegeben und zusammen mit den Titrationsdaten als Startparameter zur Simulation der theoretischen Kurve verwendet. Zunächst wird eine Simulation der Titration mit eingeschalteter Datenwichtung durchgeführt. Anschließend wird die Gesamtkonzentration des Liganden so angepasst, dass die experimentelle und simulierte Kurve gleiche Abstände der Äquivalenzpunkte aufweisen. Danach werden, bei ausgeschalteter Datenwichtung, erst die Protonenkonzentration c_{H^+} und dann die Ligandkonzentration c_{L^-} , anschließend beide Konzentrationen zusammen iteriert. Bleibt der *RMS*-Wert konstant, werden nun die $\log\beta$ -Werte erst einzeln, dann zusammen iteriert, bis ein konstanter *RMS*-Wert resultiert. Anschließend erfolgt die Iteration der $\log\beta$ -Werte mit Datenwichtung und abschließend eine Iteration der Elektrodenparameter E_{real} , G, j_{H^+} und j_{OH^-} unter Wichtung der Daten.

2.2.1.4 Makroskopische Dissoziationskonstanten

Aus den potentiometrischen Daten werden mit Hilfe von *WINSORE* [57] die $\log\beta$ -Werte und die Molenbruchverteilungsdiagramme berechnet. Die Titrationsdaten können mit diesem Programm direkt eingelesen werden, ohne dass diese wie bei früheren Iterationsprogrammen erst noch aufbereitet werden müssen. Nach Eingabe der Einwaagemenge an Probesubstanz, Volumen der Probelösung, Konzentration der Maßlösung, Gehalt der Probelö-

sung an einzelnen Komponenten und Vorgabe der auftretenden Spezies ist WINSORE in der Lage, die Titrationskurven zu simulieren und durch den Vergleich mit den experimentellen Daten die Konzentrationen, die Stabilitätskonstanten und die Elektrodenparameter iterativ zu bestimmen.

3 Beschreibung der Messanlage und Messdurchführung

3.1 Konzeption der Anlage für NMR-kontrollierte Titrationsen

Die Konzeption der Anlage zur Durchführung von NMR-kontrollierten Titrationsen wurde seit der Entwicklung von Grzonka [9] ständig modifiziert und verbessert. Die Anlage besteht aus vier Gruppen:

- 1) der NMR-Spektrometer-Einheit (LC-Probenkopf, Spektrometer)
- 2) einem Personalcomputer zur Steuerung und Koordination
- 3) der Pumpe
- 4) der Titrationsanlage

Nr.	200 MHz - Anlage	500 MHz - Anlage
①	Bruker Avance DRX 200 (BRUKER Analytik GmbH, Rheinstetten)	Bruker Avance DRX 500 (BRUKER Analytik GmbH, Rheinstetten)
②	IBM-kompatibler Personalcomputer (486er Prozessor, 24 MB RAM)	IBM-kompatibler Personalcomputer (486er Prozessor, 24 MB RAM)
③	Motorkolbenbürette T200 (Schott-Geräte GmbH, Mainz)	Motorkolbenbürette T200 (Schott-Geräte GmbH, Mainz)
④	pH-Meter CG 841 mit pH-Elektrode "Blueline 11" und Temperaturfühler PT1000 (Schott-Geräte GmbH)	pH-Meter CG 841 mit pH-Elektrode "Blueline 11" und Temperaturfühler PT1000 (Schott-Geräte GmbH)
⑤	Titrationssgefäß (Eigenentwurf [19])	Titrationssgefäß (Schott-Geräte GmbH)
⑥	Magnetrührer (Schott-Geräte GmbH)	Magnetrührer (Schott-Geräte GmbH)
⑦	Peristal-Pumpe (Reichert Chemie Technik, Nr. 90513)	Flüssigkeitsmembranpumpe FM 1.30 (Firma KNF FLODOS AG, CH-Sursee)
⑧	LC-Probenkopf (umgebauter 5 mm QNP-Kopf) (Bruker) oder Inlet und 10 mm VSP-Probenkopf (Bruker)	TXO LC-Probenkopf (anwendungsbezogener Umbau Mai 2000) (BRUKER)

Tabelle 3: Komponenten der 200 MHz - und der 500 MHz - Anlage zur Durchführung NMR-kontrollierter Titrationsen

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen das Hardware-Setup:

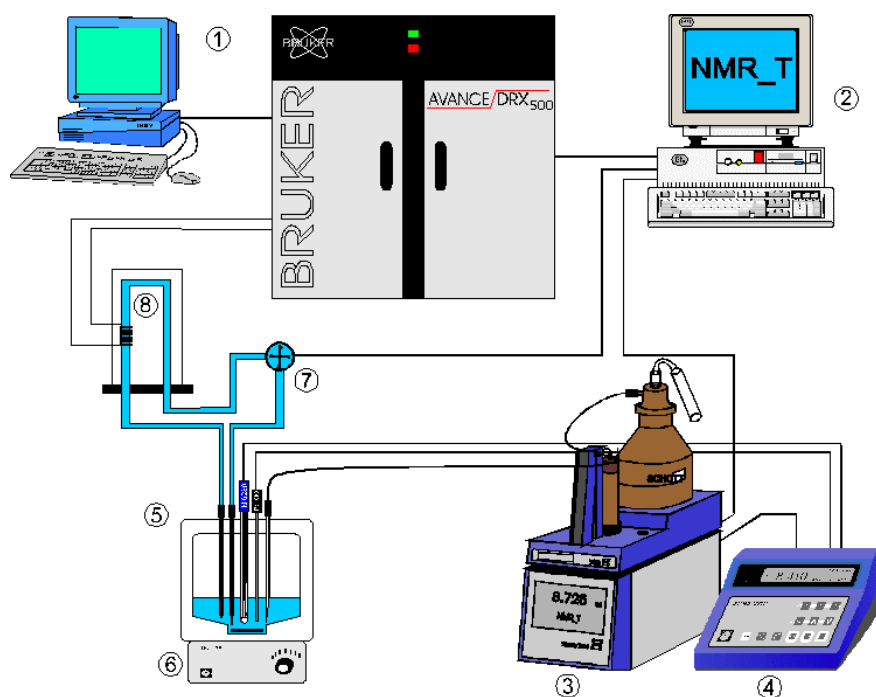


Abbildung 3: Hardware-Setup für NMR-kontrollierte Titrationsen: (1) NMR-Spektrometer; (2) Steuer-PC; (3) Dosiervorrichtung für Zugabe; (4) Sensorelektrode und Potentiometer; (5) Titrationsgefäß mit Vorlage; (6) Magnetrührer; (7) Pumpe; (8) LC-TXO-NMR-Probenkopf

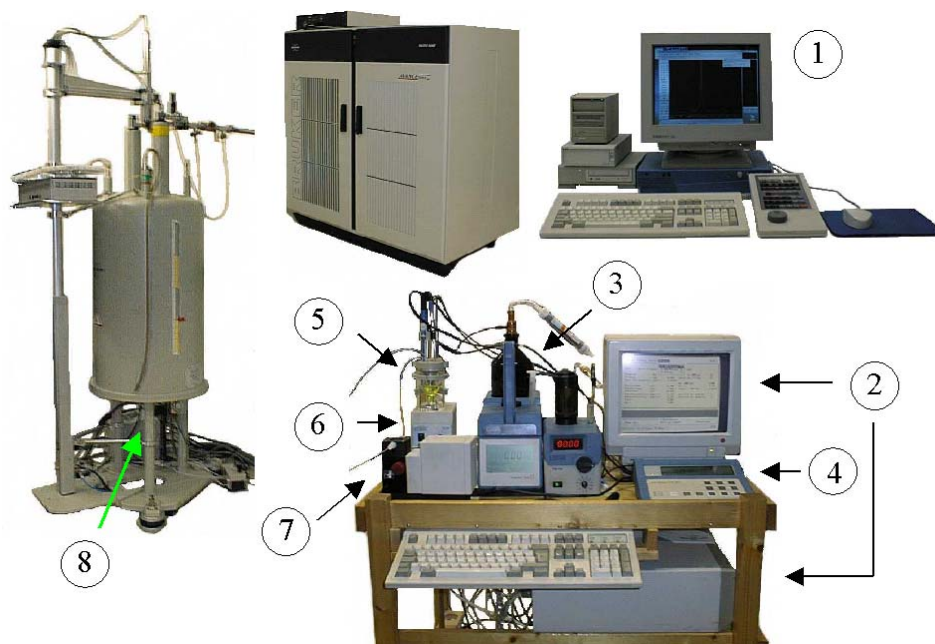


Abbildung 4: Anlage zur Durchführung NMR-kontrollierter Titrationsen am DRX 500: (1) NMR-Spektrometer; (2) Steuer-PC; (3) Dosiervorrichtung für Zugabe; (4) Sensorelektrode und Potentiometer; (5) Titrationsgefäß mit Vorlage; (6) Magnetrührer; (7) Pumpe; (8) LC-TXO-NMR-Probenkopf

3.2 Experimentelle Durchführung der Messung

Für die Durchführung einer NMR-kontrollierten Titration müssen sieben Teilarbeitsschritte ausgeführt werden. Diese Arbeitsschritte sind an den Anlagen für das Bruker Avance DRX 500 und für das Bruker Avance DRX 200 (mit Ausnahme der ^{113}Cd -NMR Messung) analog. Diese Teilarbeitsschritte werden im Folgenden beschrieben. Zur Durchführung ^{113}Cd NMR-kontrollierter Titrationsen mit dem 10 mm Insert sei auf Grzonka [9] verwiesen.

3.2.1 Einbau des Probenkopfs

Nach dem Einbau des LC-Probenkopfs muss eine Zeitspanne (am DRX 200 ca. eine Stunde; am DRX 500 ca. acht Stunden) für die Anpassung der Temperatur des Probenkopfs im Magneten abgewartet werden.

3.2.2 Locken, Shimmen und Justieren des Felds

Mittels einer Spritze wird D_2O in die Messzelle des Probenkopfs gefüllt. Nach einer Wartezeit von 30 Minuten wird auf das HDO-Resonanzsignal gelockt und geshimmt. Die Wartezeit dient dazu, Schwingungen durch Berührung des Magneten beziehungsweise durch das Befüllen der Messzelle im Probenkopf mit dem Solvens abklingen zu lassen. Die Qualität des Shims wird durch die Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren überprüft. Sobald der Habitus des Resonanzsignals geeignet ist, werden die ermittelten Parameter abgespeichert (mit dem Befehl "wsh Shimkürzel") und der Lock ausgeschaltet. Anschließend werden die Lockphase und das Feld optimiert. Nach der Entfernung des D_2O aus dem Probenkopf wird dieser mit Stickstoffgas (DRX 500) beziehungsweise Druckluft (DRX 200) getrocknet.

3.2.3 Blanktitration

Zur Ermittlung der Elektrodenparameter wird vor und nach der NMR-kontrollierten Titration im NMR-Raum mit Hilfe des Programms *MINI_T* [69] [70] eine Blanktitration durchgeführt.

3.2.4 Titrationsapparatur, Homogenisierung der Lösung und Vorspektren

In der zusammengebauten Titrationsapparatur wird die vorher berechnete Menge des Titrandsystems vorgelegt. Durch das Programm *NMR_T* [72] [21] wird die Pumpe eingeschaltet und nach der Homogenisierung des Systems wieder abgeschaltet.

Es wird je ein Probespektrum mit den, für das jeweilige NMR-Experiment benötigten, Spektren-Parametern aufgenommen. Die optimierten Spektren-Parameter werden unter einem jeweiligen Parameter-Satz ("wpar *fluxpara* all" für das erste NMR-Experiment und "wpar *fluxparX* all" [mit $X = 0$ fortlaufend bis 9] für die weiteren NMR-Experimente) abgespeichert. Die Messung wird unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre durchgeführt.

3.2.5 Kalibrierung der Glaselektrode

Um eine Glaselektrode zu kalibrieren gibt es zwei Methoden: Erstens durch eine Mehrpunktkalibration. Im Programm *NMR_T* ist die Glaselektrode eine Zweipunktkalibrierung mit Puffern $\text{pH} = 4,01$ und $\text{pH} = 6,07$ vorgesehen. Man erhält hierbei aktivitätsbezogene pH-Werte. Die zweite Methode ist die Bestimmung der Elektrodenparameter durch eine Blanktitration (vgl. Kapitel 2.2.1.1). Hierbei werden konzentrationsbezogene pH-Werte bestimmt. Bei den hier durchgeführten NMR-kontrollierten Titrationsen werden jeweils mindestens eine Blanktitration vor und eine nach der Messung durchgeführt. Die gemittelten Parameter werden dann für die weitere Auswertung verwendet.

3.2.6 Eingabe der experimentellen Parameter

In *NMR_T* werden unter dem Menüpunkt "Daten" → "Daten edieren" die substanzspezifischen Parameter eingegeben:

- Substanzbezeichnung
- Einwaage
- Gehalt
- Molgewicht der Substanz
- Vorlagevolumen
- Konzentrationen der verwendeten Lösungen
- Anzahl der NMR-Experimente
- Anzahl der potentiometrischen Messungen zwischen zwei NMR-Experimenten
- Speicherkürzel (höchstens acht Zeichen)

Unter dem Menüpunkt "Eichung" → "Messparameter" sind generelle Parameter der Messungen:

- Mischwartezeit (Umpumpzeit der Lösung durch die Anlage)
- Messwartezeit (Wartezeit zwischen der Messung von zwei pH-Werten)

- Vergleichswerte (Anzahl der zu messenden pH-Werte pro Titrationsschritt, zur Überprüfung ob der pH-Wert konstant bleibt) einzugeben.

3.2.7 Starten der Messung

In dem Spektrometerprogramm *XWIN-NMR* wird der Befehl "xau sfnmrm" [21] eingegeben und die dort abgefragten Parameter eingetragen:

- Anzahl der verschiedenen NMR-Experimente
- Nummer der ersten Messung
- Inkrementnummer zwischen zwei Messungen
- Name der Spektrenparametersätze

3.2.8 Messfolge

Nach dem Start der Messung (über den Menüpunkt: "Messung" → "SF-NMR-Messung") wird durch *NMR_T* der aktuelle pH-Wert gemessen und abgespeichert. Danach wird an das Spektrometer das Kommando zur Aufnahme des ersten Spektrums gesendet. Nach erfolgreicher Aufnahme des letzten FID (free induction decay = freier Induktionsabfall) eines Titrationsschrittes wird ein Steuersignal an das Programm *NMR_T* gesendet und auf ein erneutes Startsignal von *NMR_T* zur Aufnahme eines Spektrums (Ausnahme: letztes Spektrum) gewartet. Während der Weiterführung der analytischen Messungen wird der FID prozessiert und abgespeichert.

Das folgende Flussdiagramm (Abbildung 5) gibt das Software-Setup für NMR-kontrollierte Titrations unter Verwendung von Bruker AVANCE DRX Spektrometern wieder (erstellt mit [74]).

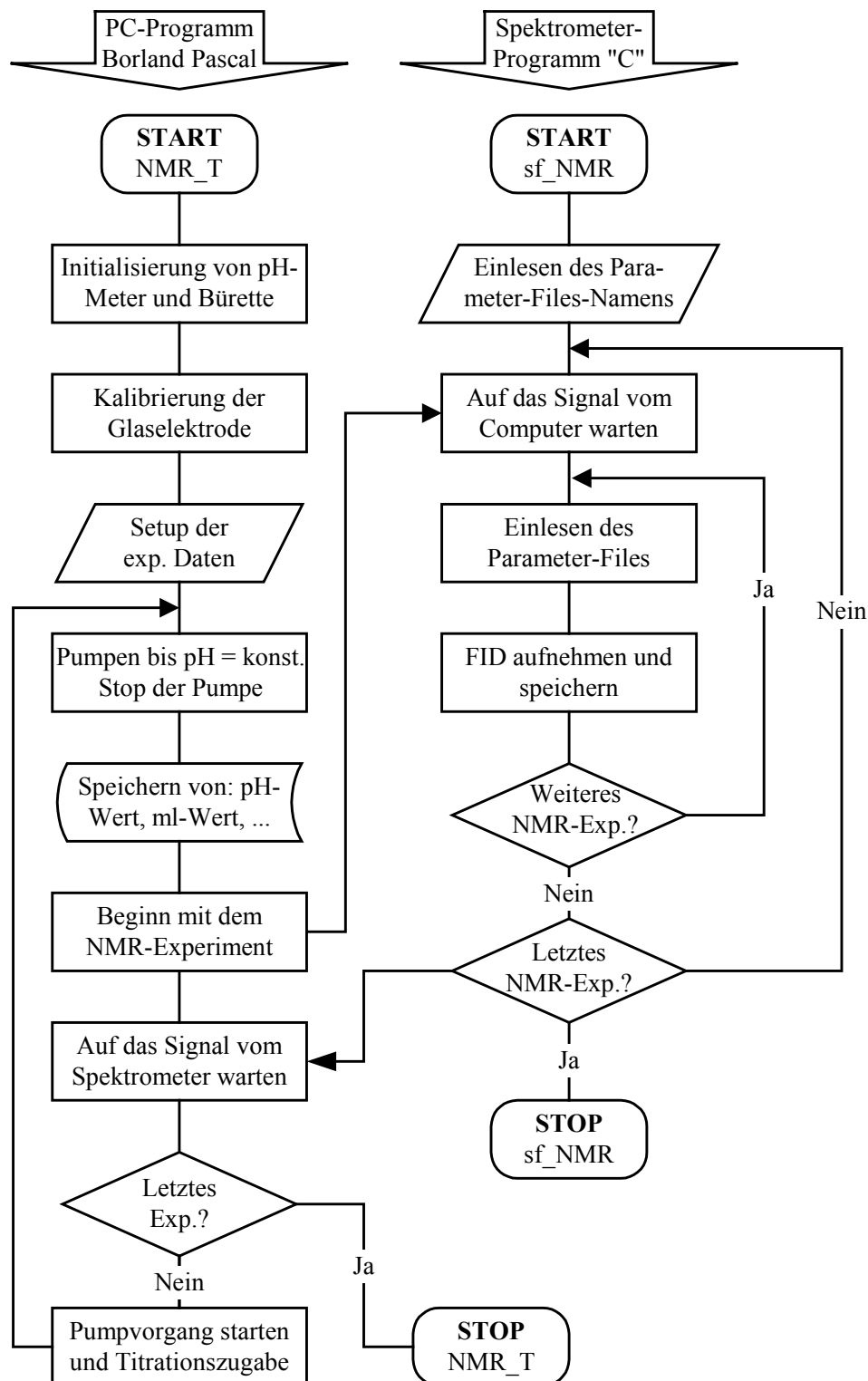


Abbildung 5: Software-Setup für NMR-kontrollierte Titrationsen; Programmsystem NMR_T (Modell 2001 für Bruker AVANCE DRX Spektrometer)

3.3 Auswertung

Die Auswertung NMR-kontrollierter Titrationsen teilt sich in zwei Gruppen:

1. der grafischen Darstellung als Stack-Plot beziehungsweise Kontur-Plot mit *Multiple-NMR-Graphics* [59].
2. der Auswertung der spektroskopischen Daten mit *MultiNMRpK* [61] beziehungsweise *canpod* [21].

Für die grafischen Auswertungen können die Spektren im *XWIN-NMR*-Format [75] oder im *WINNMR*-Format [76] vorliegen. Für die im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Methoden zur Auswertung der spektroskopischen Daten müssen die Spektren im *WINNMR*-Format bereitgestellt werden.

3.3.1 Prozessierung des FID mit *WINNMR*

Die Prozessierung, dass heißt die Umwandlung des FID in ein Spektrum, umfasst verschiedene Arbeitsschritte [77] [78] [79]. Die Vorgehensweise für die Prozessierung von Kernresonanzspektren mit dem Programm *WINNMR* [80] beschreibt Bigler [81].

Die Umwandlung des zeitabhängigen FID in ein frequenzabhängiges Spektrum beschreibt kurz das folgende Schema:

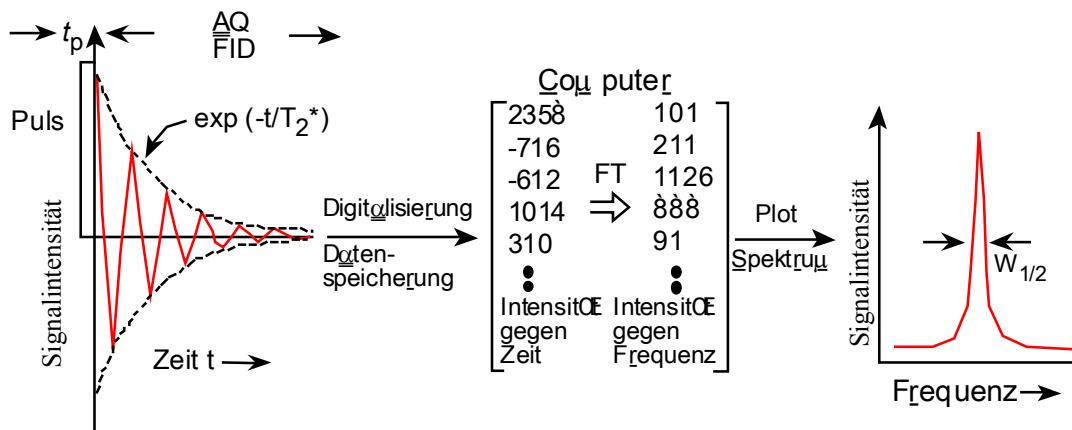


Abbildung 6: Schema der NMR-Spektrenbearbeitung nach [82]

mit: t_p : Pulsdauer

AQ: Akquisitionszeit

$W_{1/2}$: Halbwertsbreite

FT: Fourier-Transformation

T_2^* : Zeitkonstante

FID: free induction decay

Die digitale Auflösung lässt sich durch eine mathematische Funktion, das sogenannte zero filling, rechnerisch erhöhen.

Vor der Fourier-Transformation lässt sich das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern, indem eine künstliche Linienverbreiterung vorgenommen wird. Dazu wird die Abklingkurve des FID mit einer Exponentialfunktion multipliziert. Hierbei besteht der Nachteil, dass bei einer zu großen Linienverbreiterung Informationen wie Signalaufspaltungen durch kleine Kopplungskonstanten verloren gehen. Daher muss entschieden werden, mit welchem Linienverbreiterungsfaktor (LB) die Spektren prozessiert werden.

Die mathematische Umrechnung des zeitabhängigen FID in das frequenzabhängige Spektrum erfolgt mittels Fourier-Transformation. Nach der Umwandlung in das frequenzabhängige Spektrum erfolgt eine Phasenkorrektur mit anschließender Basislinienkorrektur.

3.3.2 Verwendung von Voreinstellungen zur Prozessierung der Spektren

Mit Hilfe der „Serial Processing“-Funktion im Programm *WINNMR* wird eine Reihe von Spektren unter gleichen Bedingungen automatisch prozessiert. Es besteht die Möglichkeit selber einen Prozessierungsvorgang („job“) zu definieren, mit dessen Hilfe Spektren einheitlich bearbeitet werden können. Über die „Serial Processing“-Funktion ist es möglich, eine Deconvolution (Anfittung eines simulierten Resonanzsignals) der Spektren durchzuführen. In eine Text-Datei werden dann automatisch die Parameter (chemische Verschiebung, Halbwertsbreite, usw.) der Deconvolution abgespeichert und stehen somit für die weitere Verwendung zur Verfügung.

Mit Hilfe des Programms "SF-Simulation" [73] werden die benötigten Parameter aus den Text-Dateien ausgelesen und in einer Tabelle systematisch sortiert.

3.3.3 Güte der *WIN-DAISY* Simulation

In der Literatur finden sich mehrere Hinweise für die Beurteilung der Güte von *WIN-DAISY* Simulationen [83] [84] [85]. Fünf Parameter geben, neben der optischen Kontrollmöglichkeit, Auskunft über die Güte der Simulation, wobei alle Parameter zusammen betrachtet werden müssen:

1. FINAL SUM OF SQUARES [FSS]:

Die Summe der Fehlerquadrate des Lösungsparametersatzes berücksichtigt Rauschen, Basislinienfehler und Linienformfehler (Abweichung von der Lorentzkurve).

Nach Spiske [83] soll dieser Wert 1% der NUMBER OF SPECTRAL POINTS nicht überschreiten, um eine geeignete Güte gewährleisten zu können.

2. NUMBER OF SPECTRAL POINTS [NSP]:

Die NSP ist die Anzahl der in die Berechnung einbezogenen Datenpunkte des Spektrums.

Je mehr Datenpunkte berücksichtigt werden, desto besser kann die *FINAL SUM OF SQUARES* beurteilt werden, weil die Signale genauer beschrieben werden.

3. DEGREES OF FREEDOM:

Die Zahl der überschüssigen Messungen, also die Differenz zwischen verwendeten Datenpunkten und der Zahl der iterierten Parameter.

Auch hier gilt, daß es besser ist, wenn mehr Freiheitsgrade zur Verfügung stehen.

4. STANDARD DEVIATION OF MEASUREMENTS [SDM]:

Die Fehlerquadratsumme, gewichtet mit der Anzahl der Freiheitsgrade.

Dieser Wert sollte klein sein. Bei einer guten Simulation kann ein Faktor von 10^{-2} erreicht werden.

5. R-FACTOR (PER CENT) [R%]:

Die Abweichung zwischen experimentellem und simuliertem Spektrum.

$$R = \left(\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \left(I_i^{\text{exp}} - I_i^{\text{calc}} \right)^2 \right) \cdot 100 \quad [\text{Gl. 3-3-1}]$$

In der Literatur [84] [85] wird davon gesprochen, dass bei einem R-Faktor unter 3% von einer guten Simulation ausgegangen werden kann.

Während der Iteration kann anhand des RMS-Werts (root of mean squares) der Fortgang der Iteration beobachtet werden.

3.4 Entwicklung der automatisierten NMR-kontrollierten Titrationsen

3.4.1 Entwicklungen unter Verwendung eines 200 MHz Spektrometers

Bei der ersten Apparatur von Grzonka [9] wurde ein Glaseinsatz in einen 10 mm Probenkopf eingesetzt. Die Messzelle wurde aus einem 10 mm NMR-Röhrchen, in welches ein 5 mm Zuleitungsröhrchen führt, aufgebaut. Die Zu- und Ableitung befinden sich in einem Glasmantel und können außerhalb des Magneten über Oliven an den Schlauch angeschlossen

sen werden. Der Durchmesser der Schläuche zur Pumpe beträgt 3 mm. Das aktuelle Probenvolumen beträgt im aktuellen Aufbau dieser Anlage 140 ml. Es können maximal 55 ml Lösung zudosiert werden.



Abbildung 7: Einsatz mit Spinner für einen 10 mm Probenkopf zur Durchführung NMR-kontrollierter Titrations

Ollig [19] setzte erstmals den Vorläufer moderner LC-Probenköpfe erfolgreich ein. Im Bereich der Spulen des Probenkopfs befindet sich eine Messzelle, durch die die Lösung gepumpt wird. An dem Probenkopf befinden sich Anschlussstücke für das Schlauchsystem zur Pumpe. Nach der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Neukonzeption des Schlauchsystems wird nun ein Probenvolumen von 80 ml benötigt. Es können maximal 40 ml Lösung zudosiert werden. Der Innendurchmesser des PTFE-Schlauchs beträgt 3 mm (DN 3/5). Der Anschluss des PTFE-Schlauchs an die Pumpe erfolgt über Aufschraubverschraubungen mit G-Innengewinde der Serie 2M und an den Probenkopf über ein Stück PE-Schlauch mit Einschraubtüllen mit G-Außengewinde (EM-Technik).

In Tabelle 4 sind die möglichen NMR-Messungen unter Verwendung des 200 MHz Spektrometers aufgelistet.

LC-Probenkopf (umgebauter 5 mm QNP-Kopf)	Inlet für 10 mm Probenköpfe
^1H -, ^{13}C -, ^{19}F - und ^{31}P -NMR	VSP-Probenkopf: ^1H -, ^{13}C -, ^{31}P - und ^{113}Cd -NMR (weitere Kerne durch Einstellungsänderungen am Probenkopf möglich)

Tabelle 4: Mögliche NMR-kontrollierte Titrations am 200 MHz Spektrometer

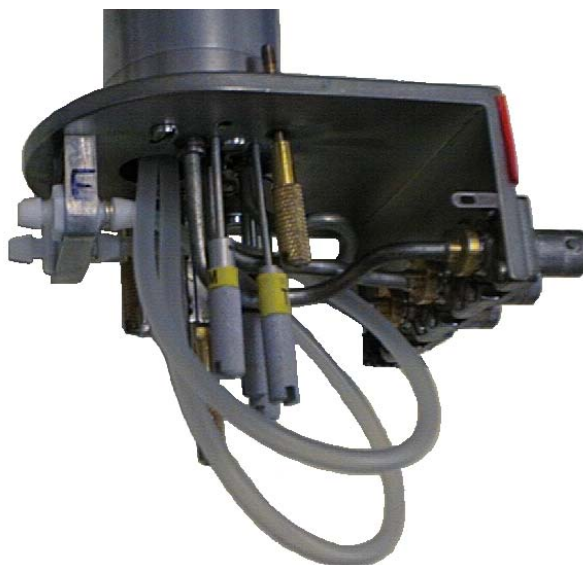


Abbildung 8: LC-Probenkopf für ein Bruker 200 MHz-Spektrometer

3.4.2 Entwicklungen unter Verwendung eines 500 MHz Spektrometers

Der Anschluss der Schläuche an die Pumpe (KNF FLODOS) FM 1.30 bzw. den Probenkopf erfolgt über UNF-Anschlüsse (Valco Europe; UNF ¼'-28), die für einen sicheren Anschluss bei hohen Drücken geeignet sind. Die Schläuche haben einen Durchmesser von 0,8 mm. Das Probenvolumen beträgt beim Start 25 ml (kann bei Bedarf und Wahl einer geeigneten Elektrode auf 20 ml verringert werden). Maximal können 50 ml Lösung zudosiert werden.

Das Volumen der Anlage außerhalb des Titrationsgefäßes setzt sich zusammen aus:

- 340 µl in der Messzelle
- 60 µl im Bereich der Spulen
- 80 µl außerhalb der Spulen
- 200 µl in Schläuche zwischen Probenkopf, Titrationsgefäß und Pumpe.

Die Kapillaren in der Zelle haben einen Durchmesser von 0,5 mm, die Schläuche zwischen den Kapillaren und Inlet- / Outlet-Fitting (Werkstoff: Edelstahl, Fa. BRUKER) 1,0 mm, und die Schläuche von der Pumpe zum Probenkopf und zum Titrationsgefäß 0.8 mm.

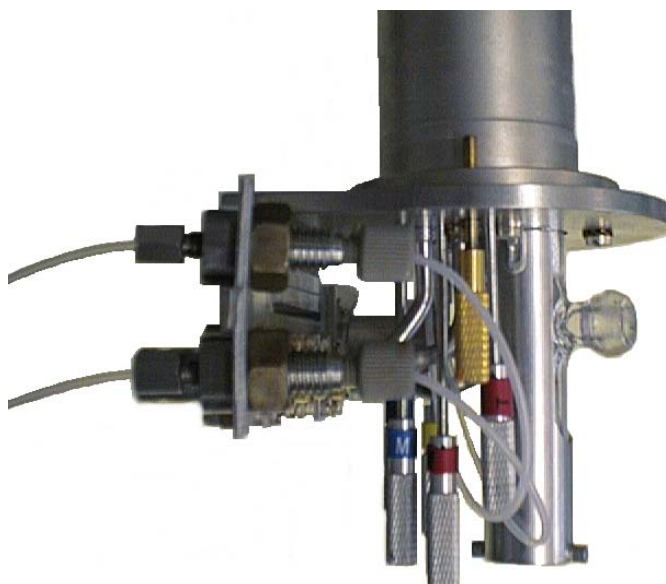


Abbildung 9: LC-TXO-Probenkopf für ein Bruker 500 MHz-Spektrometer

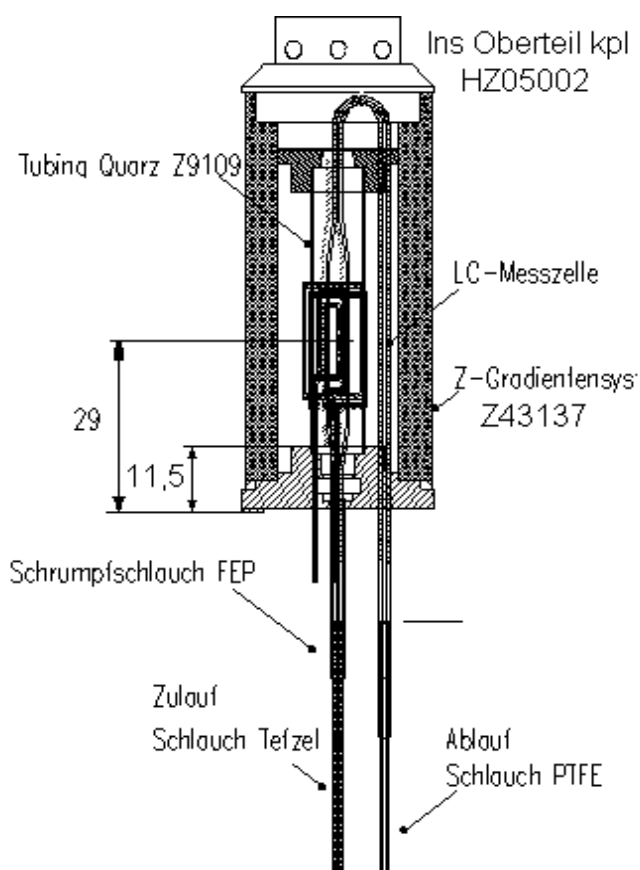


Abbildung 10: Schemazeichnung eines LC-Probenkopfes (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Bruker)

In Tabelle 5 sind die möglichen NMR-Messungen unter Verwendung des 500 MHz Spektrometers aufgelistet.

LC-TXO-Probenkopf	LC- $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -Probenkopf
^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR für Gradientenspektroskopie geeignet	^1H - und ^{19}F -NMR

Tabelle 5: Mögliche NMR-kontrollierte Titrationsen am 500 MHz Spektrometer

3.5 Versuchsaufbau zur Durchführung potentiometrischer Titrationsen

Die Titrationsapparatur besteht aus einem thermostatisierbaren Gefäß, einem Thermostat (Lauda Ma6), T-200 (automatische Bürette, SCHOTT-Geräte) mit einem 20 ml Bürettenaufsatz, einer Einstabmesskette (BlueLine pH 11, SCHOTT-Geräte), einem Widerstandsthermometer (W2130 Pt 100, SCHOTT-Geräte) und einem Personal Computer, der die gesamte Anlage steuert. Bei jeder Titration wurden 400 Messpunkte aufgezeichnet. Die gesamten potentiometrischen Titrationsen wurden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

4 Reproduzierbarkeit der Messung

4.1 Vergleich der 200 MHz und der 500 MHz Anlage

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Vergleich zwischen den beiden vorhandenen Anlagen zur Durchführung NMR-kontrollierter Titrationsen gezogen. Als Testsubstanz für diese Untersuchung wurde die 1-Hydroxyethandiphosphonsäure (HEDP) gewählt, weil sie in der Literatur [9] [19] [20] vielfach beschrieben ist.

Die nachfolgende Tabelle 6 fasst die wichtigsten Unterschiede bei den beiden Anlagen zusammen.

	System DRX 200	System DRX 500
Titrationvolumen	80 ml	25 ml
Substanzbedarf bei einer Messung von 1-Hydroxyethandiphosphonsäure	84,3 mg	33,3 mg
Messzeit	8 h	16 h
Umpumpzeit	15 s	300 s
Wartezeit vor der Aufnahme eines Spektrums	ca. 13 s	480 s
Aufbau der Anlage	4 h	16 h
Schlauchdurchmesser Zu- und Ableitung	3 mm	0,8 mm

Tabelle 6: Vergleich der 200 MHz und der 500 MHz Anlage für eine $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration

Aufgrund des geringeren Titrationsvolumens wird bei gleicher Konzentration entsprechend 1/3 Probensubstanz benötigt. Das geringere Titrationsvolumen ist in erster Linie auf das verwendete Schlauchsystem zurückzuführen.

Die Verdopplung der Messzeit hängt direkt mit zwei Faktoren zusammen. Zunächst kann mit der Pumpe für die 500er Anlage nur eine maximale Durchflussmenge von 15 ml pro Minute erreicht werden (im Gegensatz zur Pumpe der 200er Anlage mit einem Durchfluss von 200 ml pro Minute). Desweiteren gerät der Probenkopf bzw. die Messzelle bedingt durch den hohen Staudruck (bei der gewählten Getriebeeinstellung bis zu 5 bar) in Schwingung, so dass sich eine zusätzliche Wartezeit ergibt.

4.2 Theoretische Überlegungen zur NMR-kontrollierten Titration unter Verwendung des Bruker Avance DRX 500 Spektrometers

Für eine NMR-kontrollierte Titration müssen drei Punkte berücksichtigt werden, die für die Reproduzierbarkeit der Messung unabdingbar sind.

- 1) Homogenisierung der Probe
- 2) Feldstabilität
- 3) Stabilität der zu untersuchenden Substanz

4.2.1 Homogenisierung der Probe

Bei einer NMR-kontrollierten Titration muss bei der Zugabe eines Dosiermittels nicht nur dafür gesorgt werden, dass in dem Titrationsgefäß durch Rühren eine Homogenisierung erfolgt, sondern es muss auch berücksichtigt werden, dass diese Homogenisierung das gesamte Titrationssystem erfasst. So wird bei der Zugabe des Dosiermittels die Konzentration im Vorlagevolumen schnell geändert, aber im Schlauchsystem und der Messzelle im Probenkopf befindet sich immer noch eine Flüssigkeitsmenge mit der Ausgangskonzentration. Diese beiden unterschiedlichen Konzentrationen werden durch Umpumpen angeglichen.

4.2.1.1 Theoretische Berechnungen zur Homogenisierungszeit

Grzonka [9] hat erste theoretische Berechnungen für seine Anlage durchgeführt. Ollig [19] hat dieses Modell adaptiert und auf sein Messsystem übertragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Berechnungen für die DRX 500 Anlage übertragen. Die nachfolgende Abbildung soll die theoretischen Überlegungen zu dem Versuch verdeutlichen. Bei den Berechnungen wird davon ausgegangen, dass die Pumpe 15,0 ml pro Minute umpumpen kann.

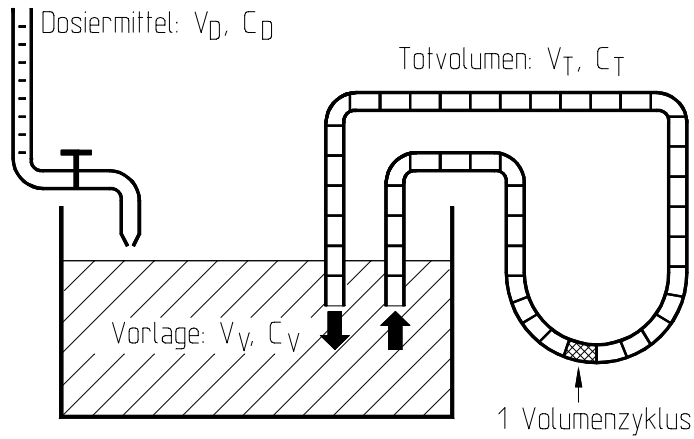


Abbildung 11: Modell für die Simulation der Durchmischung. Zeichnung nach einer Vorlage von Grzonka [9].

Die Variablen bedeuten im einzelnen:

V_V :	Volumen der Vorlage	V_V^* :	Startvolumen der Vorlage
V_D :	Volumen des Dosiermittels	C_D :	Konzentration des Dosiermittels
$C_{V(n)}$:	Vorlagekonzentration zum Zeitpunkt n	C_T :	Konzentration des Totvolumens
V_T :	Volumen von Schlauch, Messzelle und Pumpe (= Totvolumen)		

Folgende Gleichungen werden zur Berechnung der Durchmischungszeit verwendet:

Die Konzentration nach Zugabe des Dosiermittels ergibt sich zu:

$$C_{V(0)} = \frac{(V_V^* \cdot C_V) + (V_D \cdot C_D)}{(V_V^* + V_D)} \quad [\text{Gl. 4-2-1}]$$

Nach n Umpumpschritten ergibt sich die aktuelle Konzentration zu:

$$C_{V(n)} = \frac{(C_{V(n-1)} \cdot (V_V - V_T)) + (C_{T(n-V_T)} \cdot V_T)}{V_V} \quad [\text{Gl. 4-2-2}]$$

Berücksichtigt man, dass die Konzentration im Totvolumen der Konzentration entspricht, die vor dem entsprechenden Umpumpzyklus im Titrationsgefäß vorlag, ergibt sich mit:

$$C_{T(n)} = C_{V(n)} \quad [\text{Gl. 4-2-3}]$$

$$C_{V(n)} = \frac{(C_{V(n-1)} \cdot (V_V - V_T)) + (C_{V(n-V_T)} \cdot V_T)}{V_V} \quad [\text{Gl. 4-2-4}]$$

Für alle $(n - V_T) < 0$ gilt: $C_T = C_{V(0)}$

Für die Berechnungen, die zu Abbildung 12 und Abbildung 13 führen, werden folgende Parameter gewählt:

V_V^* :	18 ml	$C_{V(0)}$:	0,025 mol/l
V_D :	0,15 ml	C_D :	0,0 mol/l
V_T :	7 ml	C_T :	0,025 mol/l

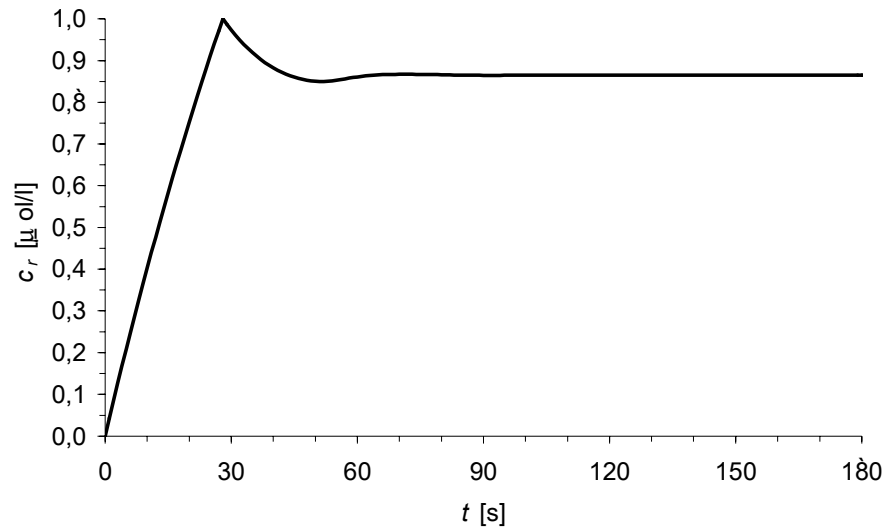


Abbildung 12: Auftragung der reduzierten Konzentration c_r vs. Zeit t (Durchmischung des Startvolumens)

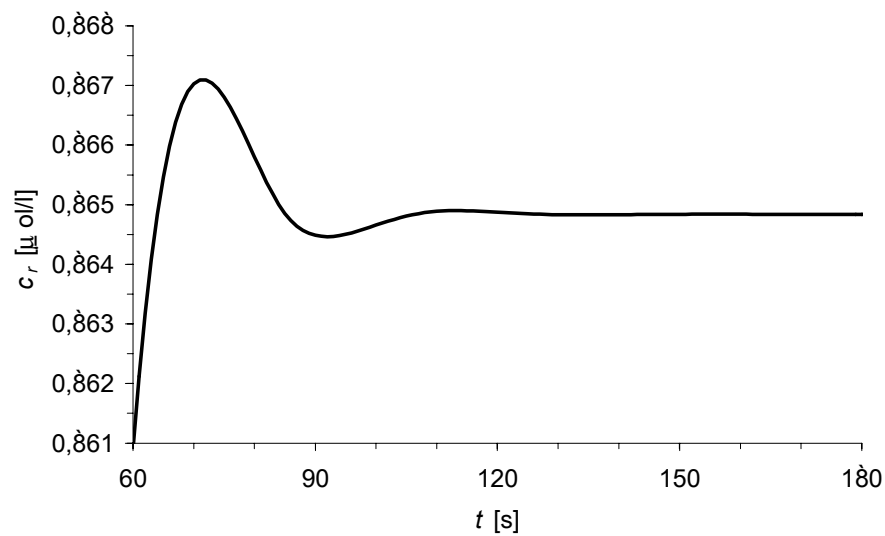


Abbildung 13: Ausschnitt aus der Abbildung 12 (Auftragung der reduzierten Konzentration c_r vs. Zeit t (Durchmischung des Startvolumens))

Mit einem gewählten Vorlagevolumen von 28 ml stellen Abbildung 14 und Abbildung 15 die Berechnungen für das Ende der NMR-kontrollierten Titration dar. Hierfür wurden folgende Parameter gewählt:

V_V^* :	28 ml	$C_{V(0)}$:	0,025 mol/l
V_D :	0,15 ml	C_D :	0,0 mol/l
V_T :	7 ml	C_T :	0,025 mol/l

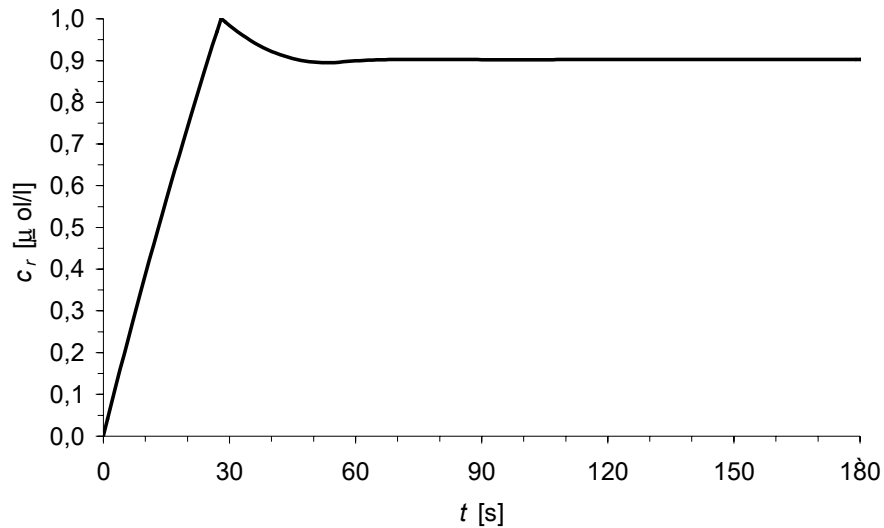


Abbildung 14: Auftragung der reduzierten Konzentration c_r vs. Zeit t (Durchmischung des Endvolumens)

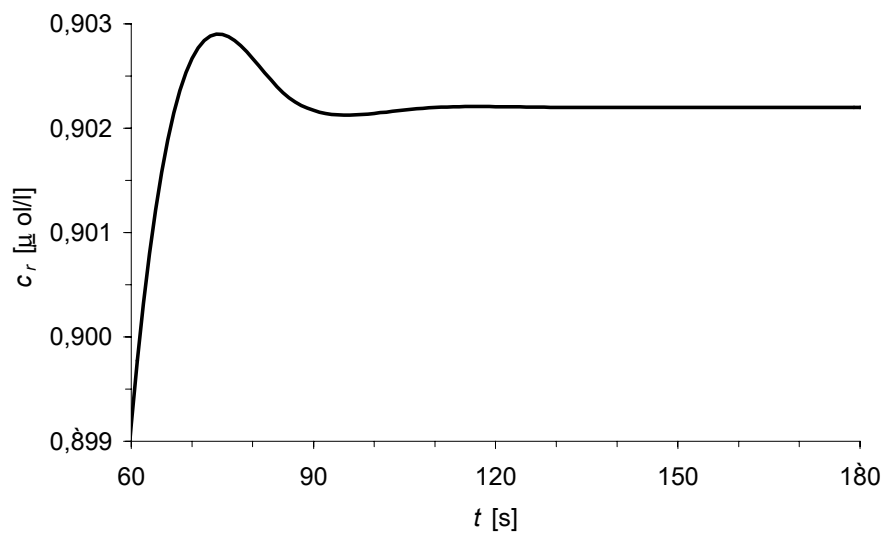


Abbildung 15: Ausschnitt aus der Abbildung 14 (Auftragung der reduzierten Konzentration c_r vs. Zeit t (Durchmischung des Endvolumens))

Weil in diesem Modell nicht die Veränderung der Viskosität der Lösung berücksichtigt werden kann, wird bei der Durchführung von NMR-kontrollierten Titrations am DRX 500 eine Durchmischungszeit von 300 s (bei einem Startvolumen von 25 ml) gewählt. Zeigt sich zu Beginn der Messung durch eine optische Kontrolle, dass der Durchfluss geringer ist, wird die Durchmischungszeit auf 480 s heraufgesetzt.

4.3 Feldstabilität des DRX 500 bei Messungen bei ungelocktem Feld

Da Interesse an Messungen in Wasser besteht, muss vorher auf D₂O gelockt und geshimmt werden. Probenköpfe mit einer internen Zelle für ein deuteriertes Lösungsmittel wurden erstmals auf der Bruker-Benutzertagung 2000 [86] vorgestellt, stehen aber im Institut nicht zur Verfügung. Nachdem der Shimvorgang beendet ist, wird der Lockvorgang abgebrochen. Dies bedeutet, dass von nun an alle Feldparameter konstant gehalten werden und die Messungen bei ungelocktem Feld stattfinden. Jede Veränderung beziehungsweise Störung in der Homogenität des Magnetfeldes und der Magnetfeldstärke hat über die effektive Feldstärke Einfluss auf die gemessene chemische Verschiebung.

4.3.1 Messung unter Verwendung des TBI-Probenkopfs

Die Messvorbereitung wird analog zu der einer stopped-flow Messung durchgeführt. Dies bedeutet, dass zunächst auf ein NMR-Röhrchen mit D₂O gelockt und geshimmt wird. Danach wird der Lock herausgenommen und ein zweites NMR-Röhrchen mit HEDP (c = 0,162 mmol/l) in H₂O in das Gerät eingesetzt und über 24 Stunden alle 20 Minuten ein ³¹P{¹H}-NMR-Spektrum aufgenommen.

Parameter	³¹ P{ ¹ H}-NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46 MHz
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	4096
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	2048
Zahl der Scans (NS)	256
Spektrale Breite (SW) [Hz]	2022,654
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	3644,21

Tabelle 7: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die Feldstabilitätsmessung mit dem TBI-Probenkopf am DRX 500 (Testsubstanz: HEDP in H₂O)

Wie aus der nachfolgenden Abbildung 16 zu entnehmen ist, verändert sich die Resonanzlage des ^{31}P -NMR-Signals um $\pm 0,01$ ppm. Dieser Wert ist um den Faktor 2 besser als der Wert von Ollig [19] und sogar um den Faktor 3 besser als der Wert von Grzonka [9].

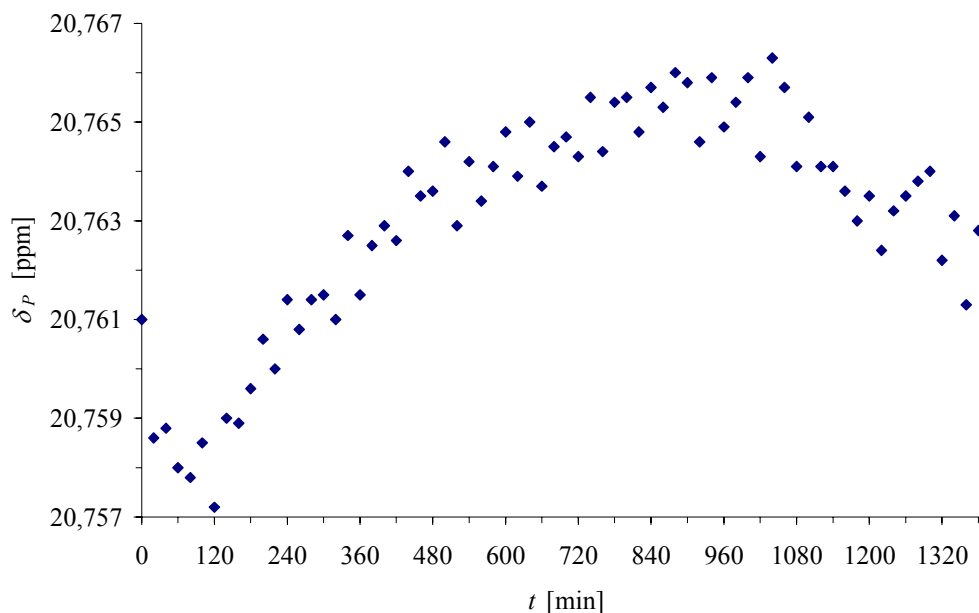


Abbildung 16: Signallage bei einer 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung unter Verwendung des TBI-Probenkopfs gegen die Zeit (Testsubstanz: HEDP in H_2O ($c = 0,162$ mmol/l)).

4.3.2 Messung unter Verwendung des LC-TXO-Probenkopfs

Im Unterschied zu dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Experiment wurde die Testsubstanz HEDP ($c = 0,332$ mmol/l) in D_2O gelöst.

Parameter	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR	^1H -NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46	500,13
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	8192	32768
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	8192	32768
Zahl der Scans (NS)	16	8
Spektrale Breite (SW) [Hz]	5081,301	10330,579
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	3441,75	3088,51

Tabelle 8: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die Feldstabilitätsmessung mit dem LC-TXO-Probenkopf am DRX 500 (Testsubstanz: HEDP in D_2O)

Damit entfällt das Befüllen der Messzelle mit D₂O, Entfernen derselben Lösung und anschließender Befüllung mit der Testsubstanz. Die Messungen erfolgen ohne Lock. Pro Messschritt wird ein ³¹P{¹H}- und ein ¹H-NMR-Experiment durchgeführt. Die Aufnahme-Parameter werden dabei so gewählt, dass alle 10 Minuten eine neue Messreihe gestartet wird.

Die nachfolgende Abbildung 17 ist eine Auftragung der Änderung der Signallage des ³¹P-Resonanzsignals von HEDP und der ¹H-Resonanzsignale von HEDP und von HDO gegen die Zeit.

Die Signallage variiert im Verlauf der Messung maximal um $\pm 0,012$ ppm.

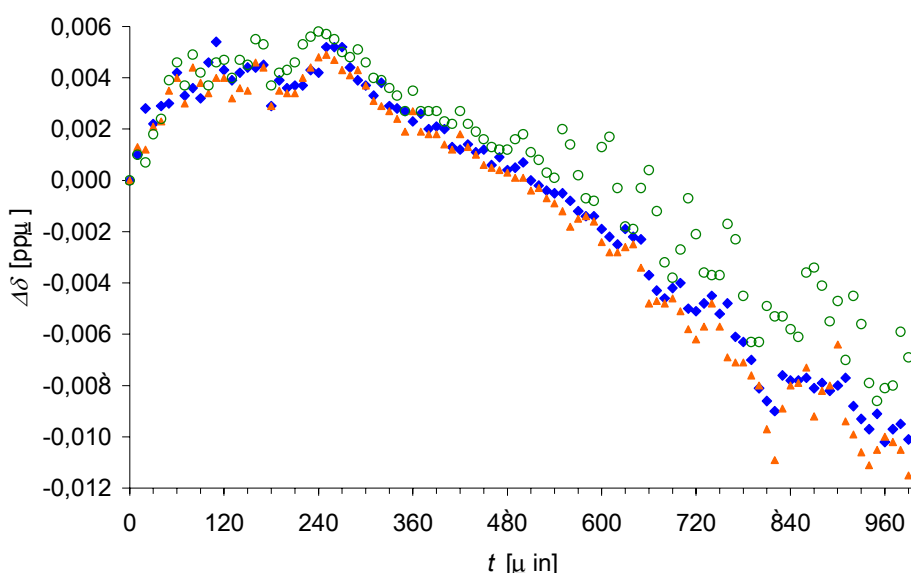


Abbildung 17: Auftragung von $\Delta\delta$ einer 202,46 MHz ³¹P{¹H}-NMR-Messung und einer 500,13 MHz ¹H-NMR-Messung vs. t ; $\circ$ $\Delta\delta$ im ¹H-NMR beim HDO-Signal; $\diamond$ Abweichung im ³¹P-NMR bei HEDP; $\triangle$ $\Delta\delta$ im ¹H-NMR beim HEDP-Signal

Bei der Auftragung des ³¹P-Resonanzsignals von HEDP gegen das ¹H-Resonanzsignal des HEDP (Abbildung 18) ergibt sich eine Gerade mit einer Steigung, die nahe eins ist. Dies bedeutet, dass der Frequenzshift bei ³¹P- und ¹H-NMR-Messungen ohne Lock (beim Vergleich von Resonanzsignalen desselben Moleküls) fast gleich ist.

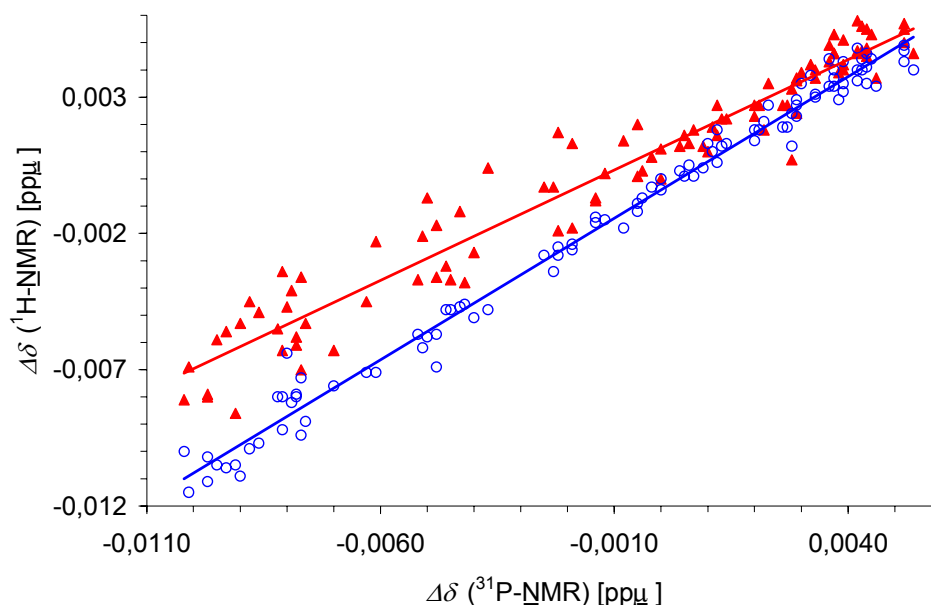


Abbildung 18: $\Delta\delta$ einer 500,13 MHz ^1H -NMR-Messung in Bezug zu einer 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung; $\circ$ $\Delta\delta$ vom ^{31}P -NMR-Resonanzsignal von HEDP in Bezug zum $\Delta\delta$ ^1H -NMR-Resonanzsignal vom D_2O ; $\blacktriangle$ $\Delta\delta$ vom ^{31}P -NMR-Resonanzsignal von HEDP in Bezug zum $\Delta\delta$ ^1H -NMR-Resonanzsignal von HEDP

Bei der Auftragung "Abweichung der Signallage vom ^{31}P -NMR-Resonanzsignal von HEDP in Bezug zum ^1H -NMR-Resonanzsignal vom D_2O " fällt eine größere Streuung der Messwerte auf. Eine Ursache liegt in der unterschiedlichen Anregung der beiden Moleküle (D_2O und HEDP) durch den Frequenzpuls.

4.4 Berücksichtigung der Verdünnung

Als weitere Untersuchung zu den Beeinflussungen der Signallage wurde eine Verdünnungsmessung durchgeführt. Als Testsubstanz wurde 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)propan-1,1-diphosphonsäure gewählt. Im Vergleich zur chemischen Verschiebung der Phosphinsäuregruppe ist die chemische Verschiebung der Phosphonsäuregruppen bei Deprotonierung gering, so dass der Einfluss durch die Verdünnung sehr gut beobachtet werden kann.

Das Startvolumen beträgt 25 ml und es werden 20 ml H_2O bi.-dest. äquidistant zutitriert. Die Startkonzentration der Messung wird entsprechend einer normalen NMR-kontrollierten Titration gewählt.

Substanz	1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure <u>3</u>
Molmasse [g/mol]	326,05
Vorlagevolumen [ml]	25,0
m (Substanz) [mg]:	61,0
m (Wirkstoff) [mg]:	59,6
n (Wirkstoff) [mmol]:	0,183
c (Wirkstoff in Vorlage) [mol/l]:	0,0073
Titratort	H ₂ O
Titratorkonzentration [mol/l]	0,10032
Zugabe Titratort [ml]	20

Tabelle 9: Experimentelle Parameter der Verdünnungsmessung am DRX 500 von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure

Parameter	³¹ P{ ¹ H}-NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	16384
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	16384
Zahl der Scans (NS)	128
Spektrale Breite (SW) [Hz]	10775,862
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	7895,79

Tabelle 10: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die Verdünnungsmessung am DRX 500 von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

Anhand des Stack-Plots in Abbildung 19 sowie der Abbildung 20 lässt sich entnehmen, dass sich im Verlauf der Volumenzugabe ein maximales $\Delta\delta$ von 0,04 ppm ergibt. Dieser Wert entspricht dem von Grzonka [9] unter Verwendung der Ethylenbismethylphosphinsäure ermittelten Wert. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass Grzonka das Volumen lediglich um 13,6% (von 120,0 auf 136,4 ml) erhöht hat. Bei der hier vorgestellten Messung wurde das Volumen um 80 % erhöht. Somit kann ein höheres Volumen wäh-

rend der Messung zutitriert werden, ohne dass eine Veränderung der chemischen Verschiebung durch Verdünnungseffekte berücksichtigt werden muss.

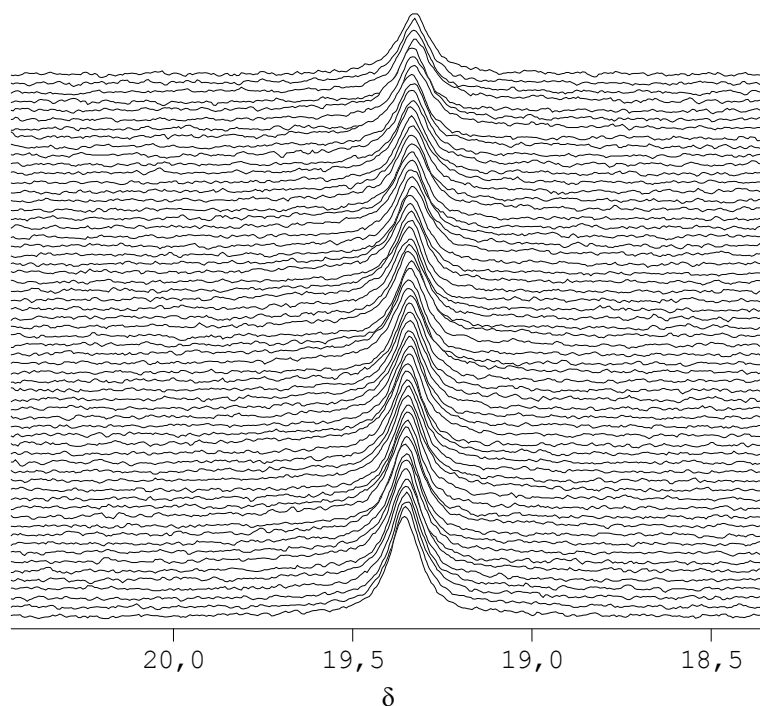


Abbildung 19: Stack-Plot einer 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure in H_2O .

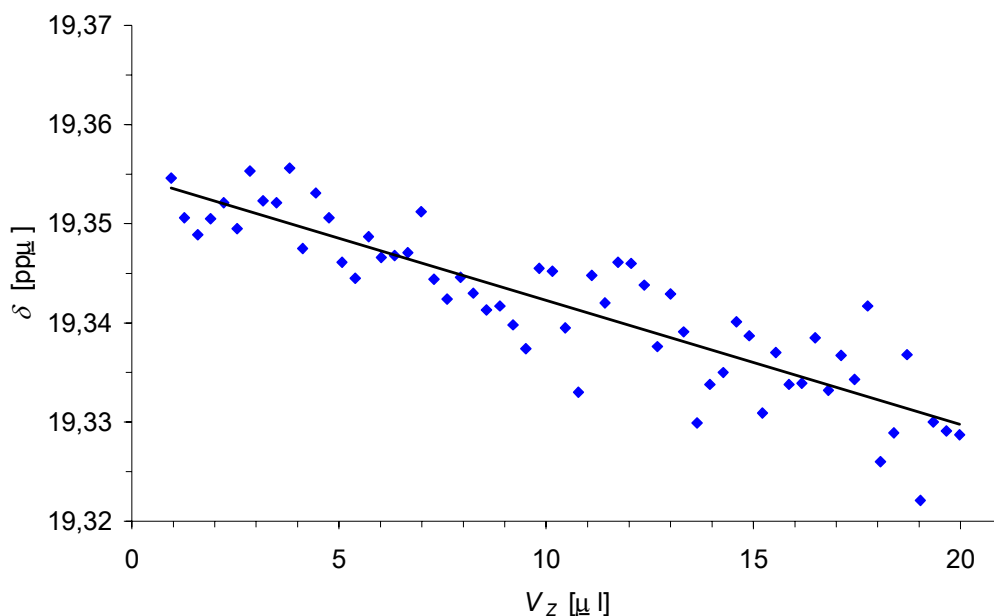


Abbildung 20: Veränderung der Signallage bei einer 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 1-Hydroxy-3-methylhydroxyphosphorylpropan-1,1-diphosphonsäure durch Verdünnung

Bei diesen Ergebnissen muss zusätzlich die Veränderung der Signallage mit der Zeit berücksichtigt werden. Wie aus Abbildung 17 zu erkennen ist, tritt eine Abweichung der Signallage über 16 Stunden von 0,012 ppm auf. Dies bedeutet, dass der Effekt durch die Verdünnung noch geringer ausfällt.

4.5 Streufeld des Magneten vom DRX 500

Bei der Positionierung der Titrationsapparatur im Messraum muss das Streufeld des Magneten berücksichtigt werden, da es die Steuerung der Titrationsapparatur beeinflusst. Um dies zu vermeiden, muss ein Abstand von mindestens 2,5 m (DRX 500) bzw. 1 m (DRX 200) zu dem Magneten eingehalten werden. Diese Abstandsabschätzung kann aufgrund der nachfolgenden Abbildung 21 getroffen werden, die die magnetische Flussdichte im Verhältnis zum Radius wiedergibt:

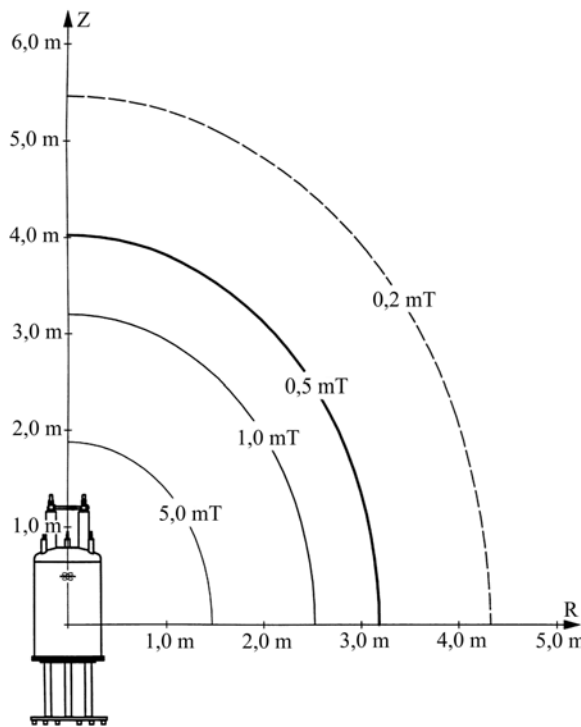


Abbildung 21: Streufeld des DRX 500. Abbildung nach einer Vorlage aus dem entsprechenden Magnethandbuch [87]

4.6 Temperatureffekte

Die Temperatur in der Messzelle wurde bei dem LC-TXO Probenkopf mit 99,8 % deuteriertem Methanol (ohne Zusatz von HCl) untersucht [88].

Aus der Differenz der Resonanzfrequenzen für das verbliebene HO- und das CHD₂-Proton

$$\Delta = \nu_{\text{H(OH)}} - \nu_{\text{H(CHD}_2\text{)}} \quad [\text{Gl. 4-6-1}]$$

wird die Temperatur nach folgender Gleichung [88] berechnet:

$$T = 398,7 - 0,1347 \cdot \Delta - 0,0006109 \cdot \Delta^2 \quad [\text{Gl. 4-6-2}]$$

Für den LC-TXO Probenkopf beträgt die Temperatur in der Messzelle 307,84 K, das entspricht 34,69°C, wenn keine Pulssequenz einwirkt. Die Genauigkeit dieser Methode, um die Temperatur zu bestimmen, wird von Hansen [88] mit 0,69 K angegeben. Durch ein ³¹P-NMR (NS = 256 Scans) steigt die Temperatur um 0,10 K auf 307,94 K (34,69 °C). Ein ¹H-NMR (NS = 256 Scans) bewirkt eine Temperaturveränderung um 0,15 K auf 307,99 K (34,84 °C). Somit liegt die Temperaturveränderung durch die ³¹P- bzw. die ¹H-Pulssequenz innerhalb der für das Messverfahren angegebenen Messungenauigkeit. Bei der Aufnahme von ³¹P{¹H}-NMR-Spektren (NS = 192 Scans) bewirkt die Protonenentkopplung eine Temperaturerhöhung um 0,73 K auf 308,57 K (35,42 °C).

Uhlemann [89] untersucht die Temperaturveränderung bei Verwendung eines LC-¹H/¹⁹F- und eines QNP-Probenkopfs. Ein Unterschied zu den hier angegebenen Ergebnissen besteht darin, dass das ¹⁹F{¹H}-NMR-Pulsprogramm einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Temperatur in der Messzelle hat. Tabelle 11 gibt die Temperaturveränderung in der Messzelle durch Standard-Pulssequenzen wieder.

	Start	³¹ P-NMR NS = 256 Scans	¹ H-NMR NS = 256 Scans	³¹ P{ ¹ H}-NMR NS = 192 Scans	Nach 10 min ohne Pulse
T [K]	307,84	307,94	307,99	308,57	308,15
t [°C]	34,69	34,79	34,84	35,42	35,00
ΔT		0,10	0,15	0,73	0,42

Tabelle 11: Temperaturveränderung in der Messzelle durch Standard-Pulssequenzen

4.7 Staudruck

Im Gegensatz zur "normalen" LC-NMR wo nur kleine Volumina pro Zeit gepumpt werden müssen, kommt es bei einer NMR-kontrollierten Titration unter anderem darauf an, eine möglichst hohe Förderleistung pro Zeit zu erreichen, damit die Umpumpzeit kurz gehalten werden kann.

Bedingt durch die kleinen Querschnitte in den Schläuchen und den Kapillaren zu der Messzelle, treten bei der stopped-flow-Anlage für das DRX 500 hohe Staudrücke auf. Dies beeinflusst die Wahl einer geeigneten Pumpe.

Die von Hermens [21] eingesetzte Pumpe (HPLH 200, Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen) erreicht maximal eine Förderleistung von 5 ml pro Minute. Dies bedeutet, dass nach 5 Minuten das Startvolumen einer Titration vollständig umgepumpt ist. Da es notwendig ist, dass Startvolumen mindestens dreimal umzupumpen, würde dies pro Titrationsschritt 15 min dauern.

Die von Peters verwendete [11] Pumpe NF 10 (KNF FLODOS AG) erreicht im Testbetrieb eine Förderleistung von 20 ml pro Minute. Im Dauerbetrieb lösten sich nach wenigen Minuten die Schläuche bauartbedingt von den Oliven an der Pumpe ab. Für das nächstgrößere Modell der Firma KNF FLODOS AG, der NF 30, kann ein UNF-Gewindesystem beschafft werden. Doch bei Testmessungen mit der NF30-Pumpe und einem Durchflussprobenkopf stellte sich heraus, dass der gebildete Staudruck zu groß für die NF30-Pumpe ist und die Pumpe ausfällt. Desweiteren war die Membran im Pumpenkopf bereits nach wenigen Minuten eingerissen. Die auftretenden Probleme sind verständlich, da die Pumpen eigentlich für einen Druck von einem bar konzipiert sind.

Durch unsere Applikationstests bei der Firma KNF FLODOS AG mit verschiedenen Pumpen und einem Durchflussprobenkopf wurde schließlich die in dieser Arbeit eingesetzte Membranpumpe FM 1.30 KT als geeignetes Modell gefunden. Die FM 1.30 KT ist für einen Druck von bis zu sechs bar konzipiert und kann über ein Getriebe stufenlos geregelt werden. Im Hause KNF wurden Tests zur Ermittlung der optimalen Getriebeeinstellung durchgeführt. Die Firma Bruker garantiert, dass LC-Probenköpfe bis zu einem maximalen Druck von fünf bar geeignet sind. Die Option, eine Getriebeeinstellung wählen zu können, gewährleistet, dass auf der einen Seite ein maximaler Durchfluss erzielt werden kann, und

auf der anderen Seite der Staudruck nicht zu groß wird. Somit können Beschädigungen an dem Probenkopf ausgeschlossen werden.

Die folgende Tabelle 12 listet die bei den Getriebeeinstellungen maximalen Förderleistungen und herrschenden Staudrücke auf.

Getriebeeinstellung [%]	Förderleistung [ml/min]	Staudruck [bar]
45	12	4,3
50	15	4,9

Tabelle 12: Auflistung der bei den Getriebeeinstellungen vorkommenden Förderleistungen und herrschenden Staudrücke.

Abbildung 22 zeigt den auftretenden Staudruck bei einer Getriebeeinstellung von 50 %.

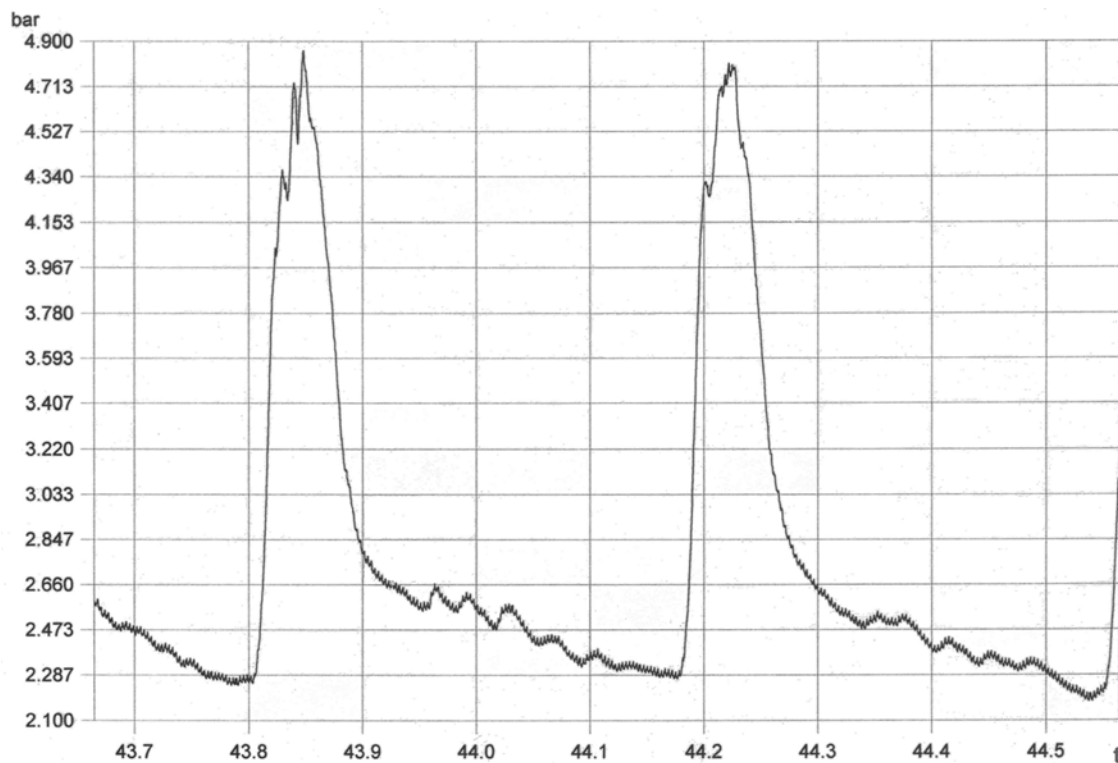


Abbildung 22: Aufzeichnung über die Höhe des Staudrucks bei einer Getriebeeinstellung von 50 % gegen die Zeit t [s].

Zur Ermittlung des Staudruckes wurde bi.-dest. Wasser verwendet. Da sich der Staudruck aufgrund unterschiedlicher Viskositäten erhöhen kann, wird keine größere Getriebeeinstellung gewählt, auch wenn das Beispiel bi.-dest. Wasser zeigt, dass man einen noch höheren Durchfluss erreichen könnte.

5 Praktischer Teil

5.1 Durchführung der potentiometrischen Titrationen

5.1.1 Herstellung der Lösungen und verwendete Lösungen

Für alle Messlösungen wurde ein über Filterkartuschen gereinigtes destilliertes Wasser (im weiteren als bi.-dest. Wasser bezeichnet) verwendet.

5.1.1.1 Säuren und Basen:

0,1 M Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung wurde aus der entsprechenden Ampulle „Fixanal“[®] (Riedel de-Haën) und bi.-dest. Wasser hergestellt.

0,1 M und 1,0 M Salzsäure, 0,1 M und 1,0 Natronlauge, sowie 1,0 Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung wurden als fertige Lösungen von Aldrich bezogen.

Vor Verwendung der Lösungen wurden zur Ermittlung der exakten Konzentrationen sogenannte Faktorbestimmungen durchgeführt.

5.1.1.2 Ionenpufferlösung

Für Messungen mit 0,1 molaren Lösungen wurden die Ionenpuffersubstanzen Natriumchlorid (Merck) und Tetramethylammoniumchlorid (Fluka) als Lösung so angesetzt, dass die Zugabe von 5,0 ml (Titrationsvolumen = 25 ml) beziehungsweise die Zugabe von 10,0 ml (Titrationsvolumen = 80 ml) der Ionenstärken $I = 0,1$ entsprach.

Für Messungen mit 1,0 molaren Lösungen wurde die entsprechende Menge (2,74 g) an festem Tetramethylammoniumchlorid eingewogen und zugesetzt.

5.1.1.3 Faktorbestimmungen

Die entsprechende Ursubstanz werden in 50,00 ml bi.-dest. Wasser vorgelegt und mit der zu bestimmenden Lösung mit äquidistanter pH-Schrittweite titriert. Für die Faktorbestimmung der Salzsäure werden Dinatriumcarbonat (Merck) und für Natronlauge und Tetramethylammoniumhydroxid werden Kaliumhydrogenphthalat (Merck) als Ursubstanz gewählt. Der Faktor jeder Lösung wird aus 3-5 Einzelmessungen gemittelt.

5.1.1.4 Elektrodenkalibration / Blanktitrationen

Die Elektrodenkalibration erfolgt durch mindestens eine Blanktitration vor und nach jeder Messreihe. Dazu werden 5,00 ml 0,1 N Säure, 5,00 ml 0,5 M Ionenpuffer und 15,00 ml (pK_S-Wertbestimmungen, 500 MHz Anlage für NMR-kontrollierte Titrationsen) bzw. 65,00 ml (200 MHz Anlage für NMR-kontrollierte Titrationsen) bi.-dest. Wasser vorgelegt und mit Base bei äquidistanter Zugabe ($\Delta V_z=0,05$ ml) titriert. Das Gesamtzugabevolumen beträgt 10,00 ml, womit jeweils 200 Meßpunkte registriert wurden.

5.1.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

5.1.2.1 Bestimmung der Dissoziations- und Stabilitätskonstanten

In der Vorlage befinden sich 0,100 mmol der Substanz, 0,100 mmol 0,1 N Säure (HCl), 5,00 ml 0,5 M Ionenpuffer. Mit bi.-dest. Wasser wird das Titrationsvolumen auf 25,00 ml aufgefüllt. Die Titration erfolgt durch äquidistante Zugabe von 0,1 M Base. Pro Titration werden 400 Meßpunkte registriert. Mit jeder der Substanzen werden mindestens drei Titrationsen durchgeführt und deren Ergebnisse gemittelt.

5.1.2.2 Bestimmung der Stabilitätskonstanten von Metallkomplexen

In der Vorlage befinden sich 0,100 mmol der Substanz, 0,100 mmol Komplexbildner, 0,100 mmol 0,1 N Säure (HCl), 5,00 ml 0,5 M Ionenpuffer. Mit bi.-dest. Wasser wird das Titrationsvolumen auf 25,00 ml aufgefüllt. Die Titration erfolgt durch äquidistante Zugabe von 0,1 M Base. Pro Titration werden 400 Messpunkte registriert. Die Messungen werden pro Substanz dreimal durchgeführt und aus den Ergebnissen der Mittelwert gebildet.

5.2 Reinheitsbestimmungen mittels NMR

Bei der Reinheitsbestimmung der Substanzen mittels der NMR-Spektroskopie wurde auf die Erkenntnisse und Anleitungen aus [91] und der Ringversuche zum Thema "Quantitative NMR-Spektroskopie" der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung [92] [93] zurückgegriffen.

Bei jedem Spektrum ist nach der Fourier-Transformation jeweils manuell eine sorgfältige Korrektur der Phase und der Grundlinie über den gesamten zu integrierenden Spektralbereich durchgeführt worden. Zur Festlegung der Integralgrenzen ist für jedes zu integrieren-

de Signal die Resonanzfrequenz und die Halbwertsbreite $\nu_{1/2}$ (Linienbreite in halber Höhe) bestimmt worden. Die Multiplikation der entsprechenden Halbwertsbreite mit dem Faktor 32 ($32 \cdot \nu_{1/2}$) [91] [93] ergibt für das jeweilige Signal den zu integrierenden Bereich nach beiden Seiten. Es folgt eine sorgfältige Korrektur der Integralphasen.

Substanz	^{31}P -Anteil [%]	SB-Titration [%]
1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure <u>1</u> (Henkel KGaA, Dr. Blum)	> 99,9	99,9 [20]
1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure <u>2</u> (Henkel KGaA, Dr. Kranz)	99,7	99,8 [97]
1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure <u>3</u> (Hoechst AG, Dr. Klose)	99,7	97,7 [100]
Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) <u>4</u> (Bozetto, Dr. Palladini)	96,9	96,5 [101]
3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u> (Prof. Dr. Failla, Università di Catania)	99,7	99,6 [57]
2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bis(phosphonsäure) <u>6</u> (Prof. Dr. Failla, Università di Catania)	99,6	99,6 [57]
3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon <u>7</u> (Prof. Dr. Breuer und Dr. Kehler, Hebrew University of Jerusalem)	99,3	99,4

Tabelle 13: Reinheiten und Herkunft der untersuchten Verbindungen

5.3 Referenzierung der NMR-kontrollierten Titrationsen

Alle ^{31}P -Kernresonanzspektren wurden gegen 85 %-ige Phosphorsäure virtuell extern referenziert. Dazu wurde frische 85 %-ige Phosphorsäure NMR-spektroskopisch vermessen. In einem Innenröhrchen befand sich D_2O , so dass die Phosphorsäure zum einen im gelockten Zustand gemessen werden konnte und zum anderen die Konzentration der Phosphorsäure sich nicht durch Verdünnung verändert hat. Die so ermittelte Resonanzfrequenz im ^{31}P -

beziehungsweise $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR wird per Definition gleich 0 ppm gesetzt. Die gemessenen ^{31}P -NMR-Spektren werden nun gegen die gemessene Phosphor-Frequenz referenziert.

Die ^1H -NMR-Spektren werden auf das HDO-Resonanzsignal referenziert. Zu Beginn jeder NMR-kontrollierten Titration wird (wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben) auf D_2O gelockt. Da die anschließende Messung im ungelockten Zustand durchgeführt wird, muss die Resonanzlage des HDO-Signals als konstant angesehen werden. Eine Änderung in Abhängigkeit von Konzentration beziehungsweise pH-Wert kann nicht beobachtet werden.

Die Präzisions- ^1H -NMR-Spektren werden gegen das Natriumsalz der 3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonsäure referenziert.

Die ^{113}Cd -NMR-Spektren werden extern gegen 0,1 M $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ referenziert.

5.4 Verwendete Software

Die Bearbeitung der NMR-Spektren erfolgt mit *WINNMR* (Version 6.0) und die Iteration der Spektren wird mit *WIN-DAISY* (Version 4.03) der Fa. Bruker-Franzen Analytik GmbH durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgt mit *X-WIN-NMR* (Version 2.6) der Fa. Bruker Analytische Meßtechnik GmbH auf einer SGI INDY unter dem Betriebssystem *IRIX 6.2*.

Die Berechnungen und die Erstellung der Diagramme wird mit Microsoft *EXCEL 97* durchgeführt.

Die Bestimmung der Dissoziations- und Stabilitätskonstanten, sowie die Auswertung der NMR-kontrollierten Titrations erfolgt mit *WINSORE* von I. Reimann [57].

Die Blanktitrationen werden mit dem Programm *Autoblack* von C. Tillmann [71] ausgewertet.

Stack- und Kontur-Plots werden mit *Multiple-NMR-Graphics* vom C. Pfaff [59] erstellt.

Die ionenspezifische chemische Verschiebungen für die Ligand-Titrations werden mit *MultiNMRpK* von Z. Szakács [61] ermittelt.

Für die Komplextitrations werden die ionenspezifischen chemischen Verschiebungen durch Verwendung von *canpod* von S. Hermens [21] bestimmt.

Alle Arbeiten mit Programmen, welche das Microsoft-*WINDOWS*-Betriebssystem benötigen, werden auf einem IBM-kompaktiblen PC mit INTEL Celeron 366 MHz-Prozessor und 128 MB RAM durchgeführt.

6 Durchgeführte NMR-kontrollierte Titrationsen

Seit Mitte der achtziger Jahre beschäftigt sich der Arbeitskreis von Prof. Hägele mit automatisierten NMR-kontrollierten Titrationsen [9]. Durch konsequente technische Weiterentwicklungen [19] [72] [20] [21] ist es gelungen, dieses Verbundverfahren unter Verwendung eines 500 MHz-Spektrometers als Routinemessverfahren einzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit werden von zwei Substanzen (1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1 und 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5) $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titrationsen sowohl unter Verwendung des DRX 200, als auch des DRX 500 durchgeführt. Somit kann ein Vergleich zwischen beiden Anlagen gezogen werden.

Durch die gleichzeitige Modifizierung der Steuerungssoftware NMR-T und SFNMR können in der nun eingesetzten Version [21] bis zu zehn verschiedene NMR-Experimente hintereinander ausgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es pro NMR-kontrollierter Titration bis zu vier verschiedene NMR-Experimente (^{31}P -, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -, ^1H -, und $^1\text{H}(\text{water})$ -NMR) durchzuführen. Neben der bereits von Hermens [21] erstmals durchgeführten $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von HEDP unter Verwendung des Bruker Avance DRX 500 Spektrometers, werden im Rahmen dieser Arbeit die ersten ^{31}P - und ^1H -NMR-kontrollierten Titrationsen gezeigt. Erstmals sind bei einer NMR-kontrollierten Titration, sogenannte ^1H -NMR-Spektren, mit Wasserunterdrückung aufgenommen worden.

Im Rahmen dieser Arbeit werden NMR-kontrollierte Titrationsen von 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1, 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphonsäure 2, 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3, Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) 4, 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5, 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bis(phosphonsäure) 6, 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 und dem 1:1-Komplex Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) unter Verwendung des Bruker Avance DRX 500 Spektrometers gezeigt. Ferner kann mit der 44,39 MHz ^{113}Cd -NMR-kontrollierten Titration vom Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex die erste Metall-NMR-kontrollierte Titration unter Verwendung des Bruker Avance DRX 200 Spektrometers präsentiert werden.

6.1 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1

Bereits 1895 wird über die Synthese der 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1 berichtet [46]. Zahlreiche Veröffentlichungen beschäftigen sich seitdem mit Synthese und Einsatzmöglichkeiten [23] [24] [47]. In der Literatur sind die Dissoziationskonstanten für die 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1 wiederholt untersucht und dokumentiert worden.

Tabelle 14 gibt einen Überblick über die zugänglichen Dissoziationskonstanten.

	Hermens [20]	Claessens [94]	Dietsch [95]	Kabachnik [96]
pK_{S1}	1,34	k. A.	< 2	1,70
pK_{S2}	2,57	2,77	2,50	2,47
pK_{S3}	6,82	6,99	6,89	7,28
pK_{S4}	10,57	11,23	10,60	10,29
pK_{S5}	n. b.	n. b.	n. b.	11,13
Titратор	NaOH	TMAOH	KOH	KOH
c [mol/l]	0,0034	0,0025	0,001	k. A.
I	0,1 (NaCl)	0,1 (TMA NO_3)	0,1 (KCl)	0,1 (KCl)
T [°C]	25	25	25	25

Tabelle 14: Aufstellung der Dissoziationskonstanten von HEDP 1

Zur Ermittlung der ionenspezifischen Parameter werden die von Hermens [20] ermittelten Werte verwendet, da dort zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten gleiche analytische Parameter (0,1 molare NaOH als Titrator und NaCl als Ionenpuffer) wie hier zur Durchführung der NMR-kontrollierten Titration gewählt worden sind.

Bei der Betrachtung im Rahmen dieser Arbeit wird die 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure als vierbasige Säure H_4L behandelt.

In Abbildung 23 und Abbildung 24 sind die Molenbruchverteilungsdiagramme dargestellt.

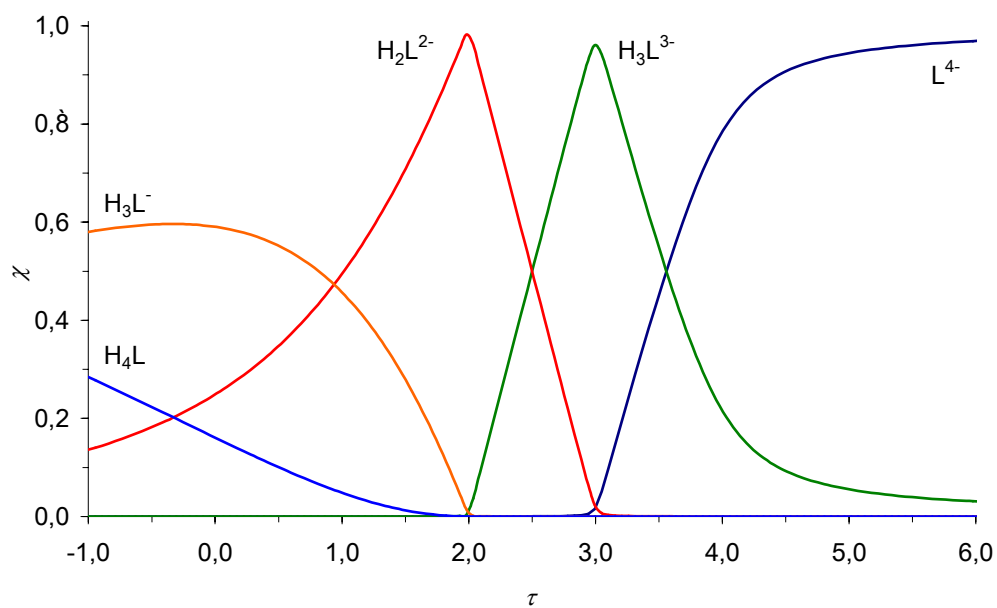


Abbildung 23: Molenbruchverteilungsdiagramm gegen τ von HEDP 1 (Exp. Parameter: siehe Tabelle 22)

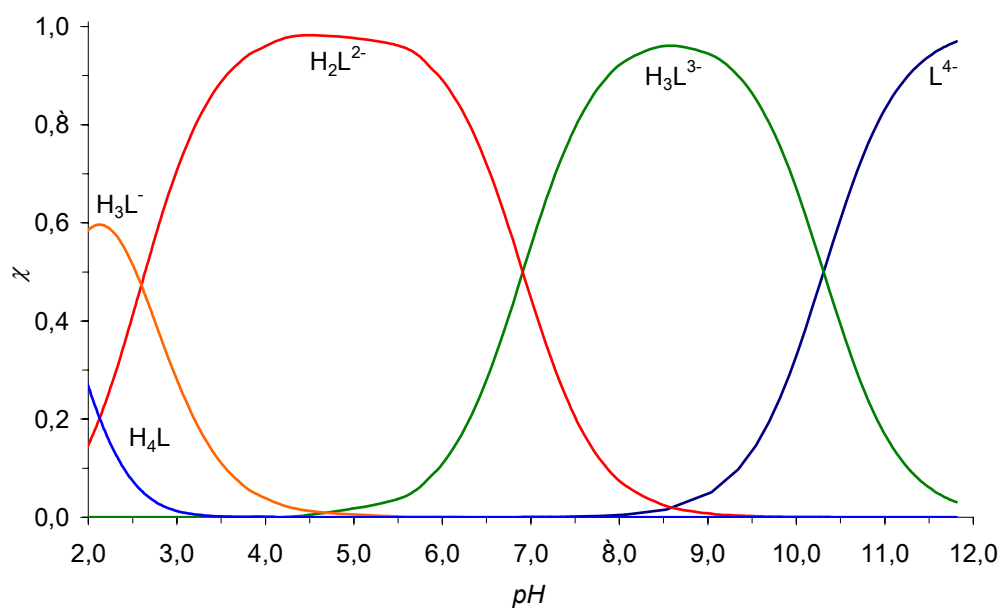


Abbildung 24: Molenbruchverteilungsdiagramm gegen pH von HEDP 1 (Exp. Parameter: siehe Tabelle 22)

Abbildung 25 gibt das Dissoziationsschema der 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure wieder.

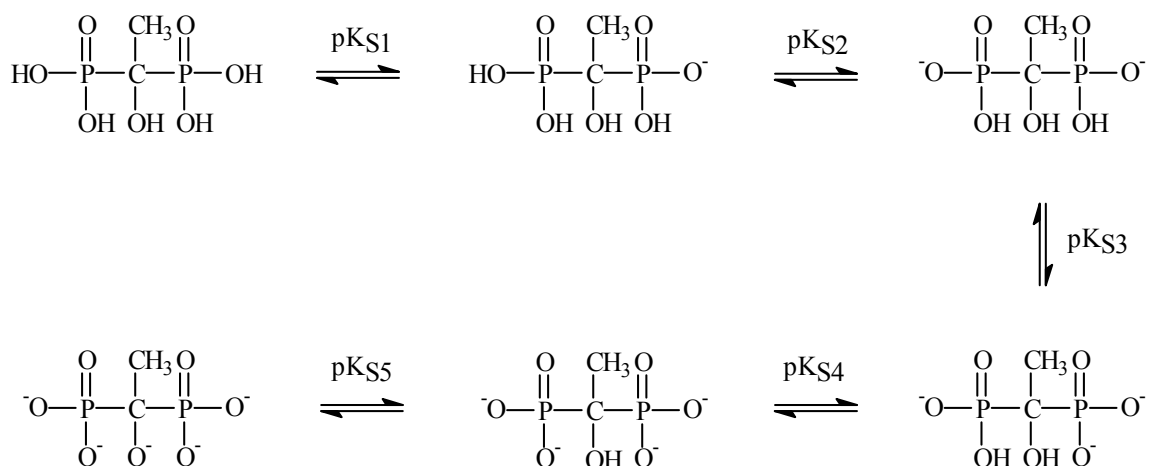


Abbildung 25. Dissoziationsschema von 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1

Die ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektren der 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1 lassen sich als A_3X_2 -Spinsystem beschreiben (siehe Abbildung 26).

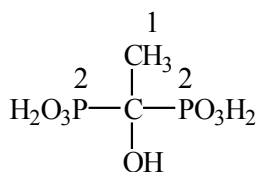


Abbildung 26: Strukturformel vom 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1 mit Zuordnung der Protonen

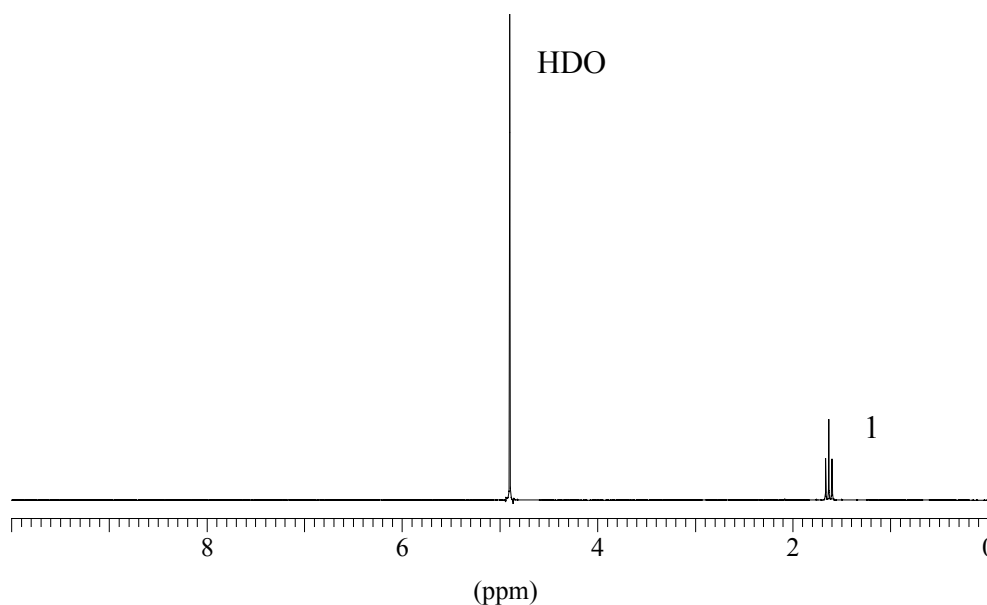


Abbildung 27: 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektrum von HEDP 1 ($c = 0,235 \text{ mol/l}$ in D_2O)

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse für die Resonanzfrequenzen aus der Iteration für die Protonen zu entnehmen.

SNr	Iso	Typ	δ [ppm]	ν [Hz]	Stabw [Hz]
1	^1H	A	1,6321	816,2372	$\pm 0,0001$
2	^{31}P	X	20,641	4178,935	-

Tabelle 15: Iterierte chemische Verschiebungen des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums sowie die chemische Verschiebung des 200,46 MHz- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrums von HEDP 1 ($c = 0,235 \text{ mol/l}$ in D_2O)

In Tabelle 16 ist die aus der Iteration des ^1H -NMR von HEDP 1 erhaltene Kopplungskonstante aufgelistet.

SNr	SNr	KIso	KTyp	J [Hz]	Stabw [Hz]
1	4	$^3\text{J}_{\text{PH}}$	J_{AX}	16,1900	$\pm 0,0002$

Tabelle 16: Iterierte Kopplungskonstante des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums von HEDP 1 ($c = 0,235 \text{ mol/l}$ in D_2O)

Tabelle 17 gibt die statistischen Gütekriterien für die Iteration wieder.

Statistical Information	A_3X_2 -Spinsystem
FSS	54,4723
NSP	12883
SDM	0,0650
R%	0,2296

Tabelle 17: Statistische Gütekriterien der Iterationen aus Tabelle 15 und Tabelle 16.

6.1.1 NMR-kontrollierte Titration von HEDP 1 unter Verwendung des DRX 200

Für die NMR-kontrollierte Titration der HEDP 1 unter Verwendung des 200 MHz Spektrometers wurden der Arbeit von Hermens [20] analoge analytische Parameter gewählt:

Substanz: 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure <u>1</u>

Molmasse [g/mol]:	205,97	Vorlagevolumen [ml]:	90,00
m (Substanz) [mg]:	84,3		
m (Wirkstoff) [mg]:	84,3	n (Wirkstoff) [mmol]:	0,409
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0046
I (Ionenpuffer: NaCl) [mol/l]:	0,1	c (NaCl) [mol/l]:	0,9000
		V _Z (NaCl) [ml]:	10,00
c (Titrator: NaOH) [mol/l]:	0,0990		

Tabelle 18: Experimentelle Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 200 von HEDP 1 vs. NaOH

Für die NMR-Spektren wurden folgende Parameter gewählt.

Parameter	³¹ P{ ¹ H}-NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	81,01
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	2048
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	2048
Zahl der Scans (NS)	256
Spektrale Breite (SW) [Hz]	1132,25
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	1377,24
Mischzeit (MT) [s]	15
Wartezeit vor Spektrenaufnahme (WT) [s]	10

Tabelle 19: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 200 von HEDP 1

6.1.1.1 81,01 MHz ³¹P{¹H}-NMR-kontrollierte Titration von HEDP 1

Abbildung 28 zeigt den Stack- und den Kontur-Plot der 81,01 MHz ³¹P{¹H}-NMR-kontrollierte Titration von HEDP 1.

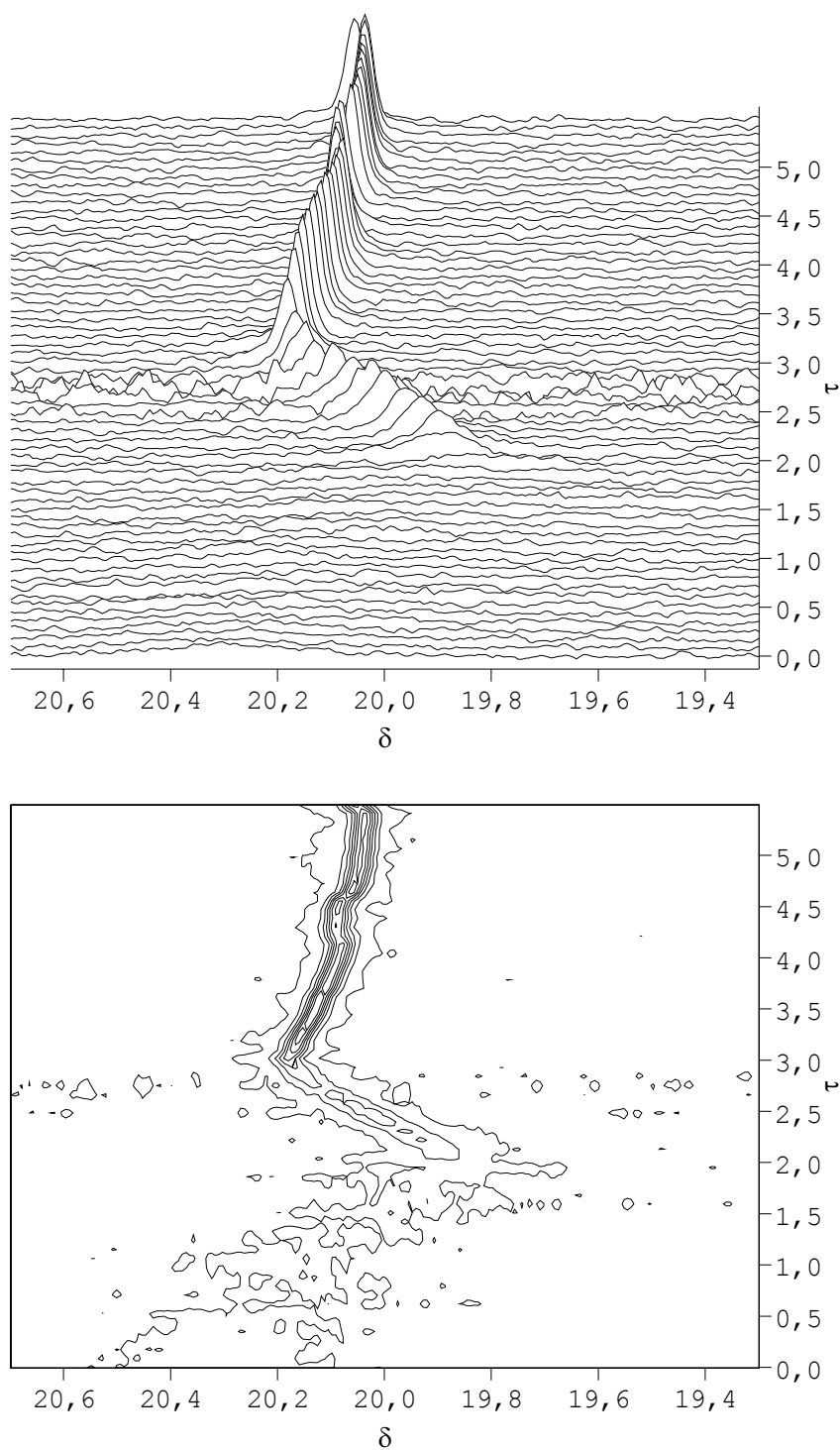


Abbildung 28: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von HEDP 1 (Exp. Parameter: siehe Tabelle 18)

Mit Hilfe des Kontur-Plots kann man den Verlauf der chemischen Verschiebung zwischen den Titrationsgraden null bis zwei besser verfolgen. Anhand von Abbildung 30 ist zu erkennen, dass bei den Titrationsgraden $0 < \tau < 2$ die Werte für die Halbwertsbreiten der Resonanzsignale zwischen 23,4 Hz bis 49,9 Hz differieren.

Bei den Titrationsgraden $3 < \tau < 5$ beträgt die Halbwertsbreite zwischen 2,4 Hz bis 3,0 Hz. Aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses können die Halbwertsbreiten bei den Titrationsgraden $0 < \tau < 2$ nur mit großen Schwankungen bestimmt werden.

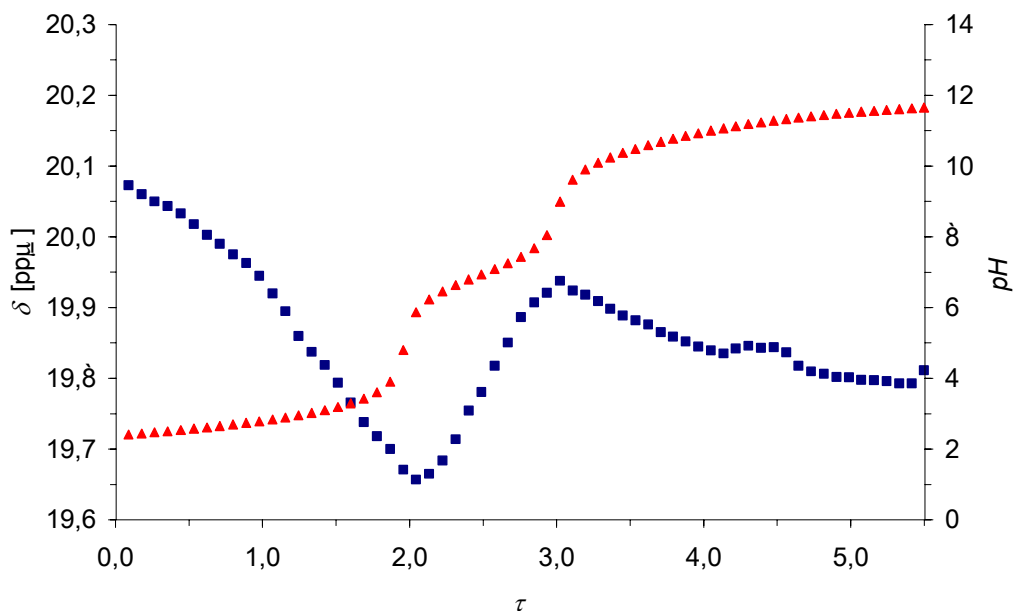


Abbildung 29: Auftragung der chem. Verschiebung δ_P (■) und des pH-Wertes (▲) vs. τ der 81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von HEDP 1 (Exp. Parameter: siehe Tabelle 18)

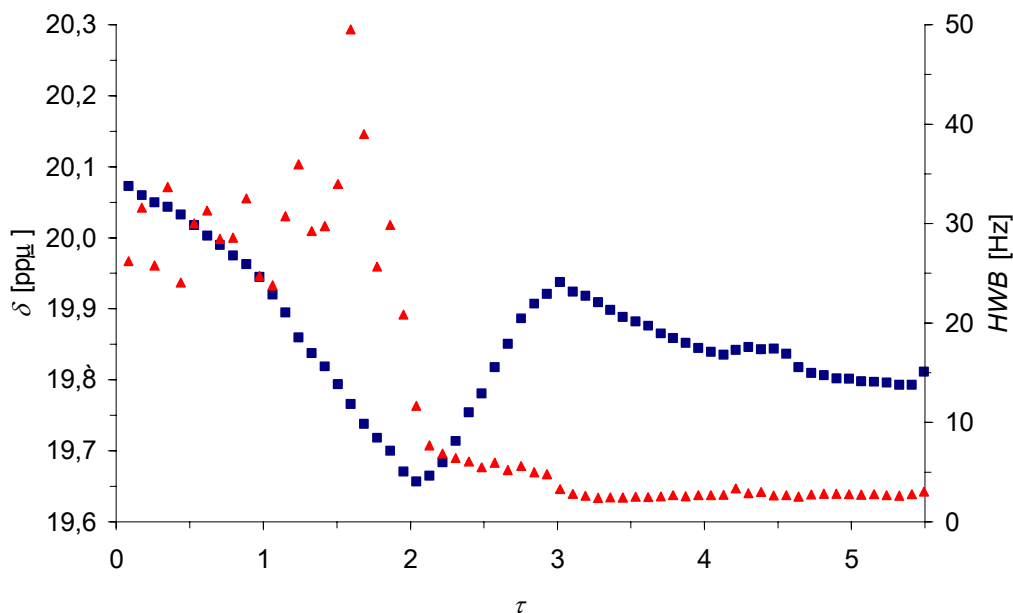


Abbildung 30: Auftragung der chem. Verschiebung δ_P (■) und der Halbwertsbreite (▲) vs. τ der 81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von HEDP 1 (Exp. Parameter: siehe Tabelle 18)

In Tabelle 20 werden die ermittelten ionenspezifischen Parameter wiedergegeben:

Spezies	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]
H₄L	18,520 ± 0,410	-1,989 ± 0,411
H₃L⁻	20,510 ± 0,030	0,885 ± 0,031
H₂L²⁻	19,624 ± 0,006	0,313 ± 0,008
HL³⁻	19,938 ± 0,005	0,139 ± 0,006
L⁴⁻	19,799 ± 0,004	

Tabelle 20: Ionenspezifischen Parameter von HEDP 1

Die hohe Standardabweichung für den ionenspezifischen Parameter der Spezies H₄L liegt darin begründet, dass diese Spezies bei der Anfangspunkt der Messung ($\tau = 0$) nur zu 15,9 Prozent vorliegt (siehe Abbildung 23).

Am Ende dieses Kapitels wird ein Vergleich zu der Messung unter Verwendung des 500 MHz-Spektrometers und weiteren in der Literatur dokumentierten Messungen durchgeführt.

6.1.2 NMR-kontrollierte Titration von HEDP 1 unter Verwendung des DRX 500

Auf der neu konzipierten Anlage wurde die 202,46 MHz ³¹P{¹H}-NMR-kontrollierte Titration von 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure ebenfalls durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit mit der 81,01 MHz ³¹P{¹H}-NMR-kontrollierten Titration gewährleisten zu können, wird bei dieser Messung die gleiche Konzentration gewählt.

Parameter	³¹ P{ ¹ H}-NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	4096
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	2048
Zahl der Scans (NS)	256
Spektrale Breite (SW) [Hz]	2022,654
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	3644,21

Tabelle 21: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 500 von HEDP 1

Wie Tabelle 21 entnommen werden kann, werden drei Parameter gegenüber der in Kapitel 6.1.1 vorgestellten Messung variiert. Durch die Erhöhung des Wertes für TD (Datenfläche des FIDs) kann eine bessere digitale Auflösung erreicht werden. In Kapitel 4.2.1 wird bereits erwähnt, dass aufgrund der geringen Förderleistung der Pumpe eine längere Mischzeit (hier: MT = 300 Sekunden) und eine längere Wartezeit vor Spektrenaufnahme (hier: WT = 480 Sekunden) eingehalten werden müssen.

Substanz: 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure <u>1</u>			
Molmasse [g/mol]:	205,97	Vorlagevolumen [ml]:	25,00
m (Substanz) [mg]:	33,0		
m (Wirkstoff) [mg]:	33,0	n (Wirkstoff) [mmol]:	0,1602
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0046
Zusatz HCl [mmol]:	0,1602	c (HCl) [mol/l]:	0,0980
I (Ionenpuffer: NaCl) [mol/l]:	0,1	c (NaCl) [mol/l]:	0,5000
		V _Z (NaCl) [ml]:	5,00
c (Titrator: NaOH) [mol/l]:	0,0990		

Tabelle 22: Exp. Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 500 von HEDP 1

6.1.2.1 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von HEDP 1

Aus Abbildung 31 wird der große Vorteil der neuen Anlage ersichtlich. Bei gleicher Scanzahl ist das Signal-Rausch-Verhältnis bei gleicher Konzentration um den Faktor 6,7, als wie bei der 81,01 MHz NMR-kontrollierten Titration.

Bei der 202,46 MHz NMR-kontrollierten Titration lässt sich eine sprunghafte Zunahme der Halbwertsbreite der Resonanzsignale bei $\tau = 3$ bereits aus dem Stack-Plot erkennen.

Unter Verwendung des Kontur-Plots lässt sich die chemische Verschiebung vom Beginn der Titration an sehr gut verfolgen.

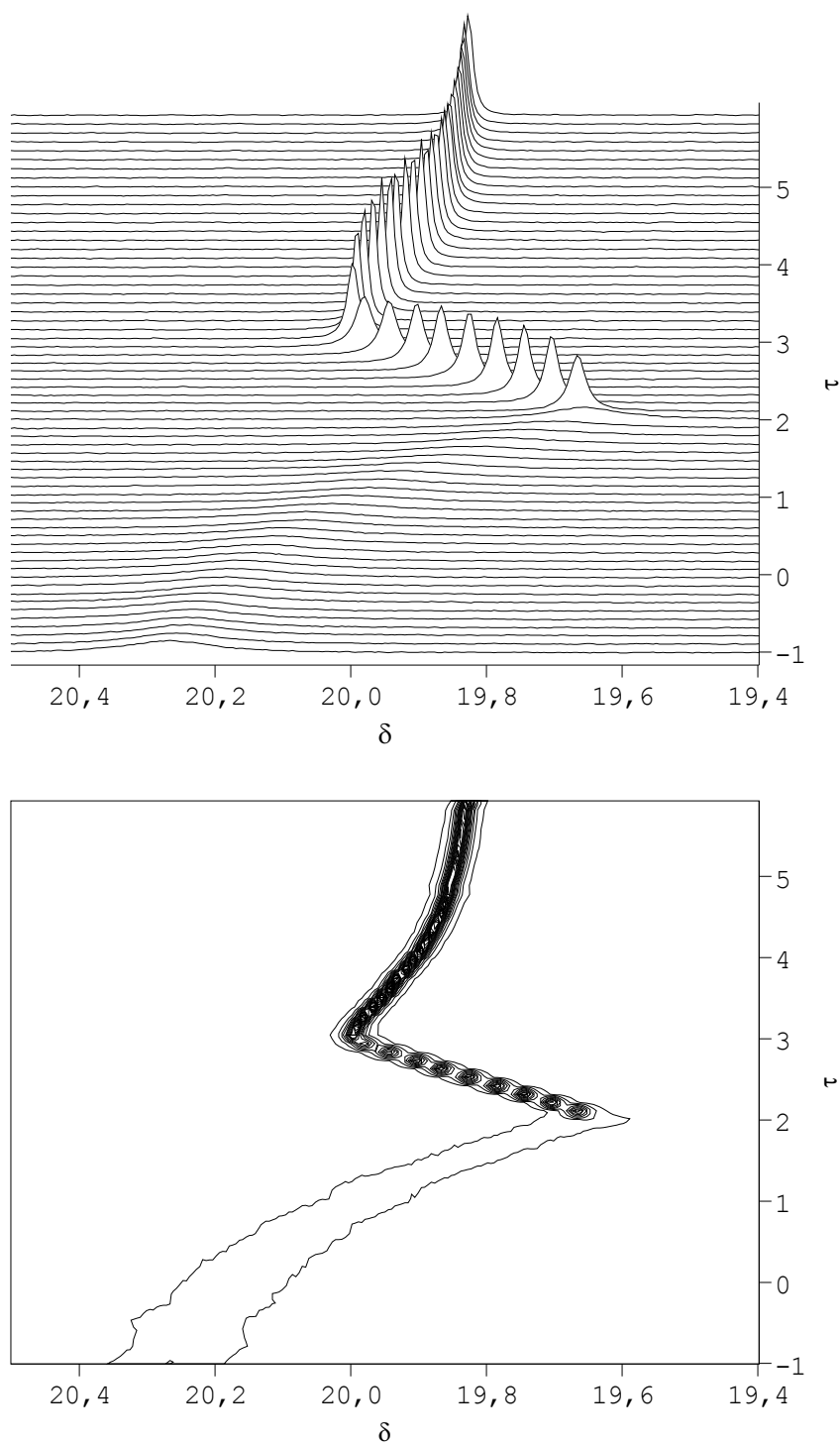


Abbildung 31: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von HEDP 1 (δ_p vs. τ) von HEDP 1 (Exp. Parameter: siehe Tabelle 22)

Aus Abbildung 33 wird ersichtlich, dass bei den beiden anhand der Titrationskurve ermittelbaren Äquivalenzpunkten ein lokales Minimum $\tau = 2$ und ein lokales Maximum $\tau = 3$ der chemischen Verschiebungen vorliegen.

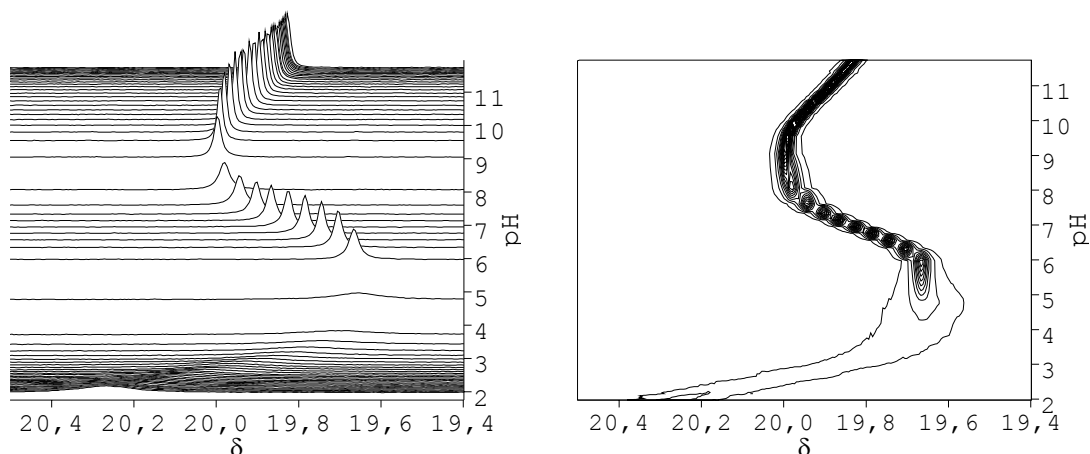


Abbildung 32: links: Stack-Plot - rechts: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung (δ_p vs. pH) von HEDP 1 (Exp. Parameter. siehe Tabelle 22)

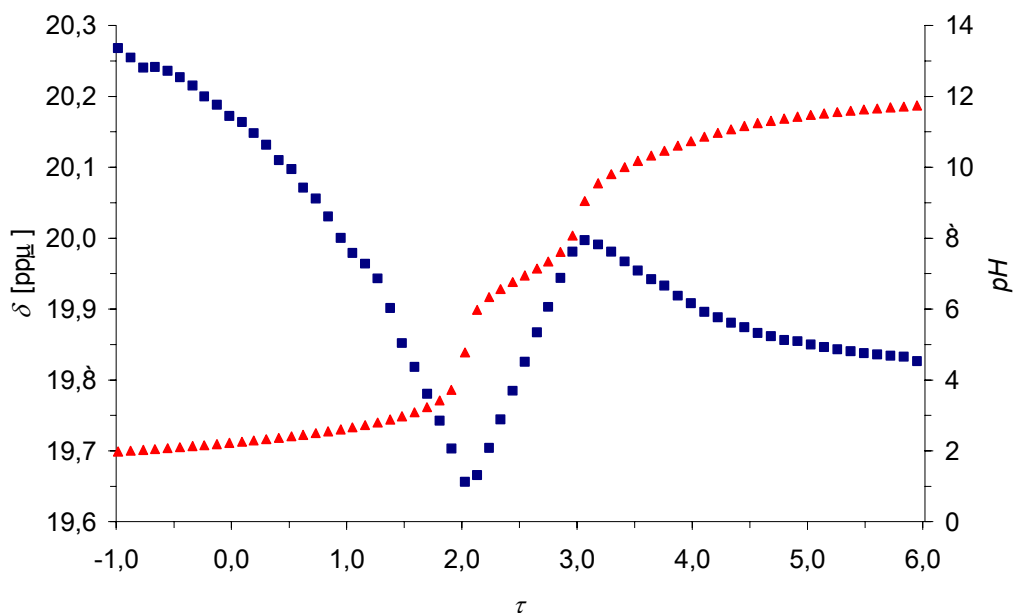


Abbildung 33: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_p (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von HEDP 1

Durch die 1. Ableitung $\frac{d\langle\delta\rangle}{dpH}$ können pK_S -Werte ermittelt werden (siehe Kapitel 2.1.5).

Aus Abbildung 34 kann durch die Auftragung der 1. Ableitung gegen den pH-Wert die Werte für pK_{S3} und pK_{S4} abgelesen werden.

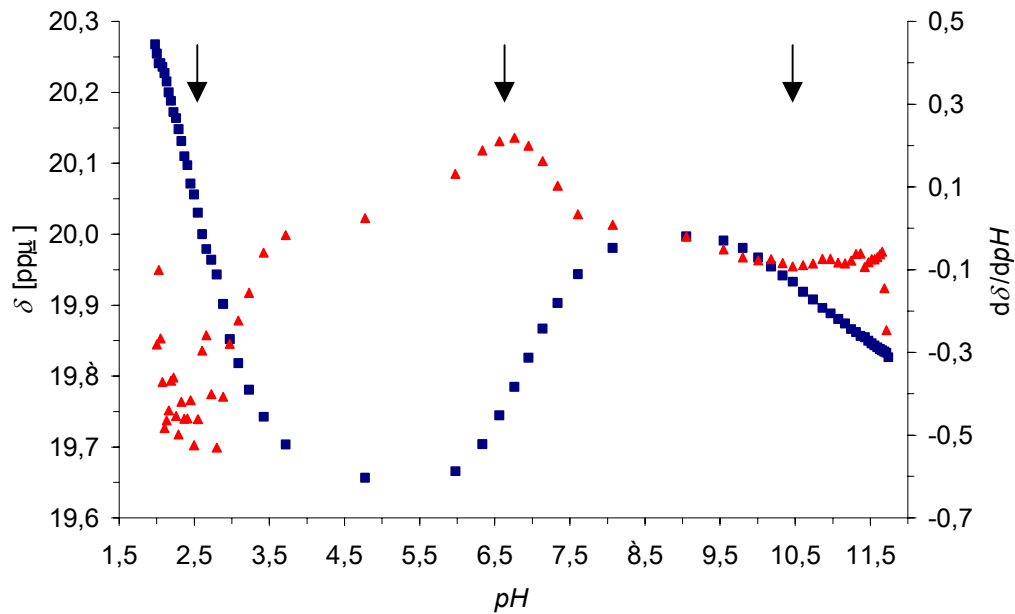


Abbildung 34: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und der 1. Ableitung $d\delta_P/dpH$ (▲) vs. pH-Wert der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}P\{^1H\}$ -NMR-Messung von HEDP 1. Die Lage der pK_S-Werte aus den analytischen Bestimmungen ist mit "↓" gekennzeichnet.

Abbildung 35 zeigt, dass im Intervall $-1 < \tau < 2$ die Halbwertsbreite von 31,2 Hz bis 44,6 Hz steigt und dann auf 4,6 Hz abfällt. Bei $\tau = 3$ gibt es kleines Zwischenmaximum zu 6 Hz bis letztlich die Halbwertsbreite bei 2,8 Hz ausklingt.

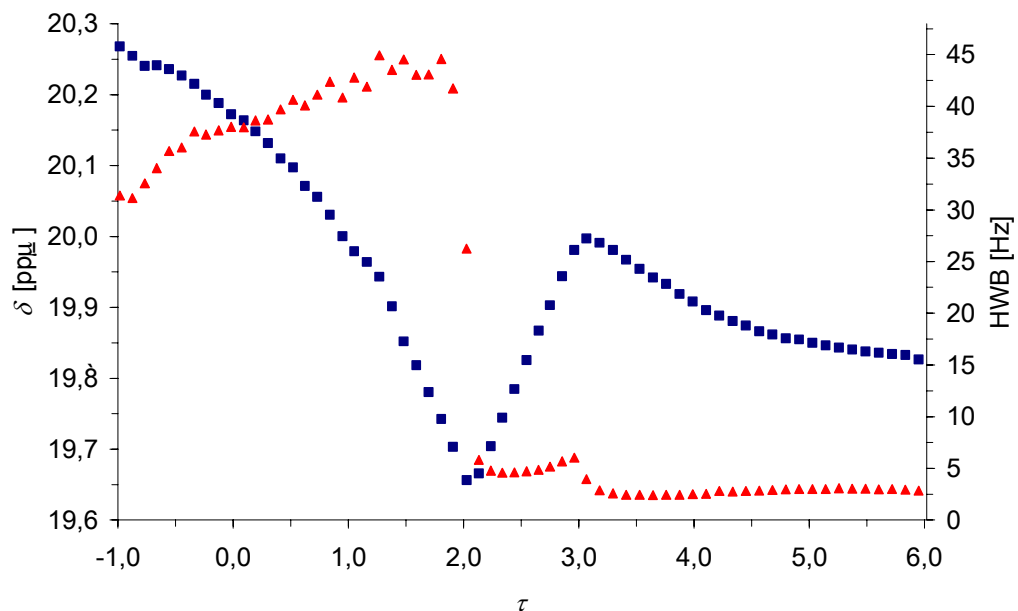


Abbildung 35: Auftragung der chem. Verschiebung δ_P (■) und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}P\{^1H\}$ -NMR-Messung von HEDP 1

In Tabelle 23 sind ionenspezifischen Parameter angegeben:

Spezies	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]
H_4L	$20,251 \pm 0,064$	$-0,176 \pm 0,065$
H_3L^-	$20,427 \pm 0,010$	$0,796 \pm 0,011$
H_2L^{2-}	$19,631 \pm 0,004$	$-0,368 \pm 0,005$
HL^{3-}	$19,999 \pm 0,003$	$0,172 \pm 0,004$
L^{4-}	$19,827 \pm 0,003$	

Tabelle 23: Ionenspezifischen Parameter von HEDP 1

6.1.3 Vergleich der 81,01 MHz- und der 202,46 MHz-NMR-kontrollierten Titration von HEDP

Bei beiden Messungen lässt sich der sogenannte "geminal effekt" [9] sehr gut beobachten. Zwischen $\tau = 2$ und $\tau = 3$ findet eine Tieffeld-Verschiebung statt, die auf die Bildung einer intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung im Diphosphonyl-Trianions zurückzuführen ist. Die nachfolgende Abbildung zeigt die vermutete Struktur des Trianions.

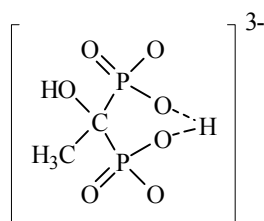


Abbildung 36: vermutete Struktur des Diphosphonyl-Trianions

Im Gegensatz zur 81,01 MHz $^{31}P\{^1H\}$ -NMR-kontrollierten Titration können bei der 202,46 MHz Messung durchgängig alle Halbwertsbreiten genau bestimmt werden. Dies ist auf das verbesserte Signal-Rausch-Verhältnis der 202,46 MHz Messung zurückzuführen.

Beim Vergleich mit den Literaturwerten fällt ein deutlicher Unterschied in den chemischen Verschiebungen auf. Zum einen kann dies mit den zur Bestimmung der ionenspezifischen Parametern verwendeten Dissoziationskonstanten und zum anderen auf eine fehlende beziehungsweise ungenaue Referenzierung der in der Literatur beschriebenen Spektren zurückgeführt werden.

Spezies	δ_P (81,01 MHz) [ppm]	δ_P (202,46 MHz) [ppm]	δ_P [9] (Gronzka) [ppm]	δ_P [20] (Hermens) [ppm]
H₄L	18,520 ± 0,410	20,251 ± 0,064	21,12	20,61
H₃L⁻	20,510 ± 0,030	20,427 ± 0,010	20,94	20,82
H₂L²⁻	19,624 ± 0,006	19,631 ± 0,004	20,42	20,09
HL³⁻	19,938 ± 0,005	19,999 ± 0,003	20,68	20,44
L⁴⁻	19,799 ± 0,004	19,827 ± 0,003	20,23	20,34
c [mol/l]	0,0046	0,0046	k. A.	0,0033
I	0,1 (NaCl)	0,1 (NaCl)	0,1 (TMACl)	0,1 (NaCl)
V [ml]	90,00	25,00	k. A.	60,00

Tabelle 24: Ionenspezifische Verschiebungen von HEDP 1

Gradient	Δ_P (81,01 MHz) [ppm]	Δ_P (202,46 MHz) [ppm]	Δ_P [9] (Gronzka) [ppm]	Δ_P [20] (Hermens) [ppm]
H₄L	1,989 ± 0,411	0,176 ± 0,065	-0,20	0,21
H₃L⁻	-0,885 ± 0,031	-0,796 ± 0,011	-0,80	-0,73
H₂L²⁻	0,313 ± 0,008	0,368 ± 0,005	0,26	0,35
HL³⁻	-0,139 ± 0,006	-0,172 ± 0,004	-0,45	-0,10

Tabelle 25: Gradienten der ionenspezifischen Verschiebungen von HEDP 1

Es muss hier erwähnt werden, dass die Messung von Grzonka [9] auf einem Bruker AM 200 Spektrometer durchgeführt worden ist, wohingegen Hermens [20] die NMR-kontrollierte Titration unter Verwendung des DRX 200 Spektrometers durchführte.

Die von Hermens auf dem DRX 500 durchgeführte $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von HEDP 1 [2] weist im Gegensatz zu der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration einen signifikanten Unterschied in der Entwicklung der Halbwertsbreitenänderung im Verlauf der Titration auf. Bis zum Titrationsgrad $\tau = 2$ beträgt bei Hermens die Halbwertsbreite 5 Hz. Abbildung 35 weist die für die hier vorgestellte Messung dagegen eine Halbwertsbreite von 30 bis 45 Hz aus. Die Ursache für den Unterschied liegt in der Ligandkonzentration begründet. Bei Hermens beträgt die Ligandkonzentration 0,01 mol/l, dagegen sind die beiden Messungen in dieser Arbeit mit einer Ligandkonzentration von 0,0046 mol/l durchgeführt worden.

6.2 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

In Tabelle 26 sind die aus Titrationen ermittelten Dissoziationskonstanten angegeben.

pK_{S1}	pK_{S2}
$1,73 \pm 0,01$	$3,59 \pm 0,02$

Tabelle 26: Dissoziationskonstanten [97] von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 ($n = 0,2494 \text{ mmol}$); NaOH ($c = 0,1014 \text{ mol/l}$), $I(\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$, $n(\text{HCl}) = 0,2494 \text{ mmol}$, $V = 50 \text{ ml}$, $T = 25^\circ\text{C}$

Das Dissoziationsschema in Abbildung 37 berücksichtigt nur die beiden Deprotonierungsschritte an den Phosphinyl-Gruppen.

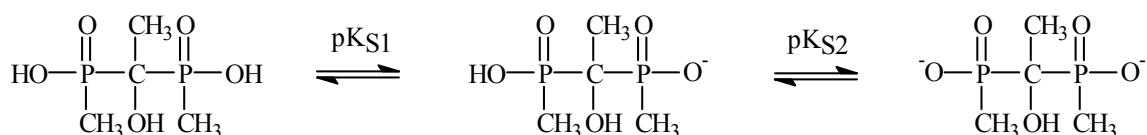


Abbildung 37: Dissoziationsschema von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

Die sich daraus ergebenden Molenbruchverteilungsdiagramme sind in Abbildung 38 und Abbildung 39 dargestellt.

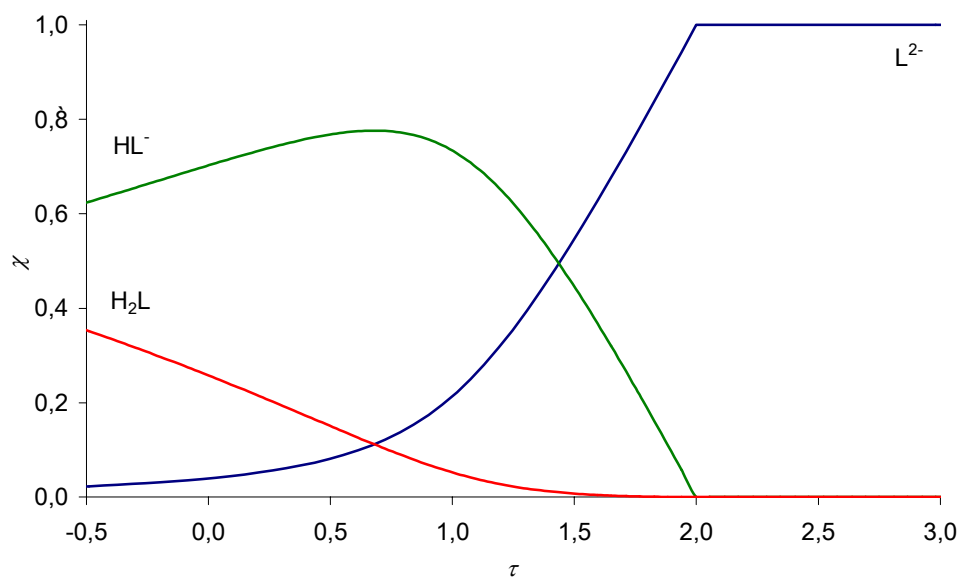


Abbildung 38: Molenbruchverteilungsdiagramm von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 vs. Titrationsgrad τ (Exp. Parameter: siehe Tabelle 30)

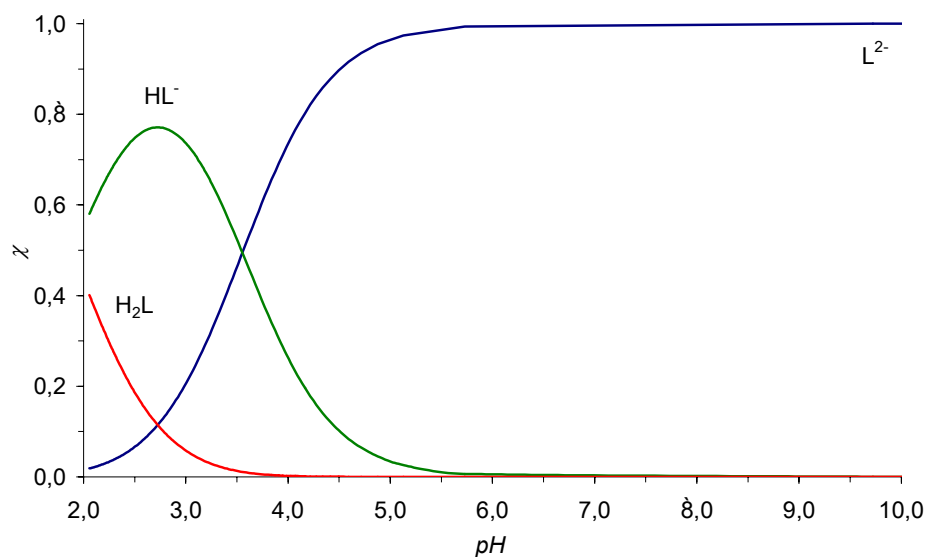


Abbildung 39: Molenbruchverteilungsdiagramm von 1-Hydroxyethan-*P,P'*-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 vs. pH (Exp. Parameter: siehe Tabelle 30)

Hägele beschreibt in [98] die Substanz 1-Hydroxyethan-*P,P'*-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 als $A_3[M_3X]_2$ -Spinsystem.

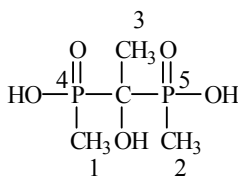


Abbildung 40: Strukturformel von 1-Hydroxyethan-*P,P'*-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

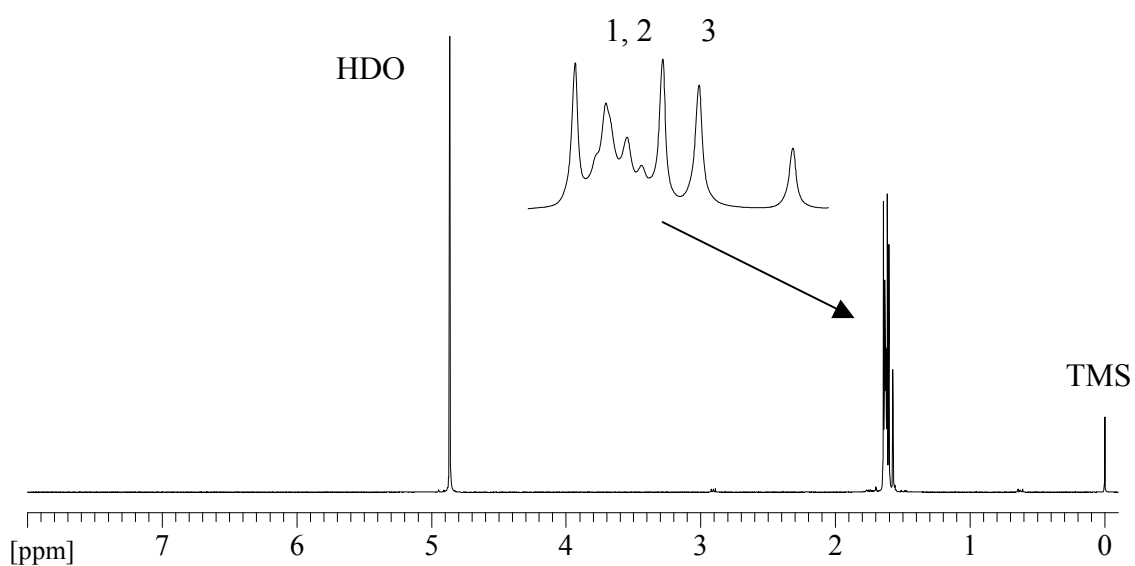


Abbildung 41: 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 1-Hydroxyethan-*P,P'*-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 ($c = 0,2441 \text{ mol/l}$ in D_2O)

Die Ergebnisse der Iteration für die Protonen-Resonanzfrequenzen stehen in Tabelle 27.

SNr	Iso	Typ	δ [ppm]	ν [Hz]	Stabw [Hz]
1, 2	^1H	M	1,6281	814,2677	$\pm 0,0018$
3	^1H	A	1,6021	801,2602	$\pm 0,0011$
4, 5	^{31}P	X	51,880	10503,6093	-

Tabelle 27: Iterierte chem. Verschiebungen des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums und die chem. Verschiebung des 202,46 MHz- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrums von 1-Hydroxyethan- P,P' -dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 ($c = 0,2441$ mol/l in D_2O)

Die iterativ ermittelten Kopplungskonstanten werden in Tabelle 28 angegeben.

SNr	SNr	Kiso	KTyp	J [Hz]	Stabw
1	4	$^2J_{\text{PH}}$	J_{MX}	-14,1945	$\pm 0,0014$
1	5	$^4J_{\text{PH}}$	$J_{\text{MX}'}$	-0,0288	$\pm 0,0014$
3	4	$^3J_{\text{PH}}$	J_{AX}	15,2063	$\pm 0,0007$
4	5	$^2J_{\text{PP}}$	$J_{\text{XX}'}$	33,7540	$\pm 0,0113$

Tabelle 28: Iterierte Kopplungskonstanten des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums von 1-Hydroxyethan- P,P' -dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 ($c = 0,2441$ mol/l in D_2O)

Tabelle 29 gibt die statistischen Gütekriterien für die Iteration wieder.

Statistical Information	$\text{A}_3[\text{M}_3\text{X}]_2$ -Spinsystem
FSS	110,6686
NSP	4089
SDM	0,1647
R%	0,6208

Tabelle 29: Statistische Gütekriterien der Iterationen aus Tabelle 27 und Tabelle 28.

In den nachfolgenden Tabellen sind die analytischen (Tabelle 30) und die NMR-Parameter (Tabelle 31) aufgeführt. Vor der Aufnahme des NMR-Spektrums zu jedem Titrationsgrad wird eine Mischzeit von $\text{MT} = 300$ s und eine Wartezeit von $\text{WT} = 480$ s eingehalten.

Substanz: 1-Hydroxyethan- P,P' -dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

Molmasse [g/mol]:	202,08	Vorlagevolumen [ml]:	25,00
m (Substanz) [mg]:	31,1		
m (Wirkstoff) [mg]:	31,0	n (Wirkstoff) [mmol]:	0,1534
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0061
Zusatz HCl [mmol]:	0,1227	c (HCl) [mol/l]:	0,0980
I (Ionenpuffer: NaCl) [mol/l]:	0,1	c (NaCl) [mol/l]:	0,5000
		V _Z (NaCl) [ml]:	5,00
c (Titrator: NaOH) [mol/l]:	0,1033		

Tabelle 30: Exp. Parameter der NMR-kontrollierten Titration der 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

Parameter	³¹ P{ ¹ H}-NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	16384
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	8196
Zahl der Scans (NS)	256
Spektrale Breite (SW) [Hz]	10162,602
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	7085,96

Tabelle 31: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration der 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

6.2.1 202,46 MHz ³¹P{¹H}-NMR-kontrollierte Titration von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

In Abbildung 42 sind der Stack- und der Kontur-Plot der 202,46 MHz ³¹P{¹H}-NMR-kontrollierten Titration von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 dargestellt.

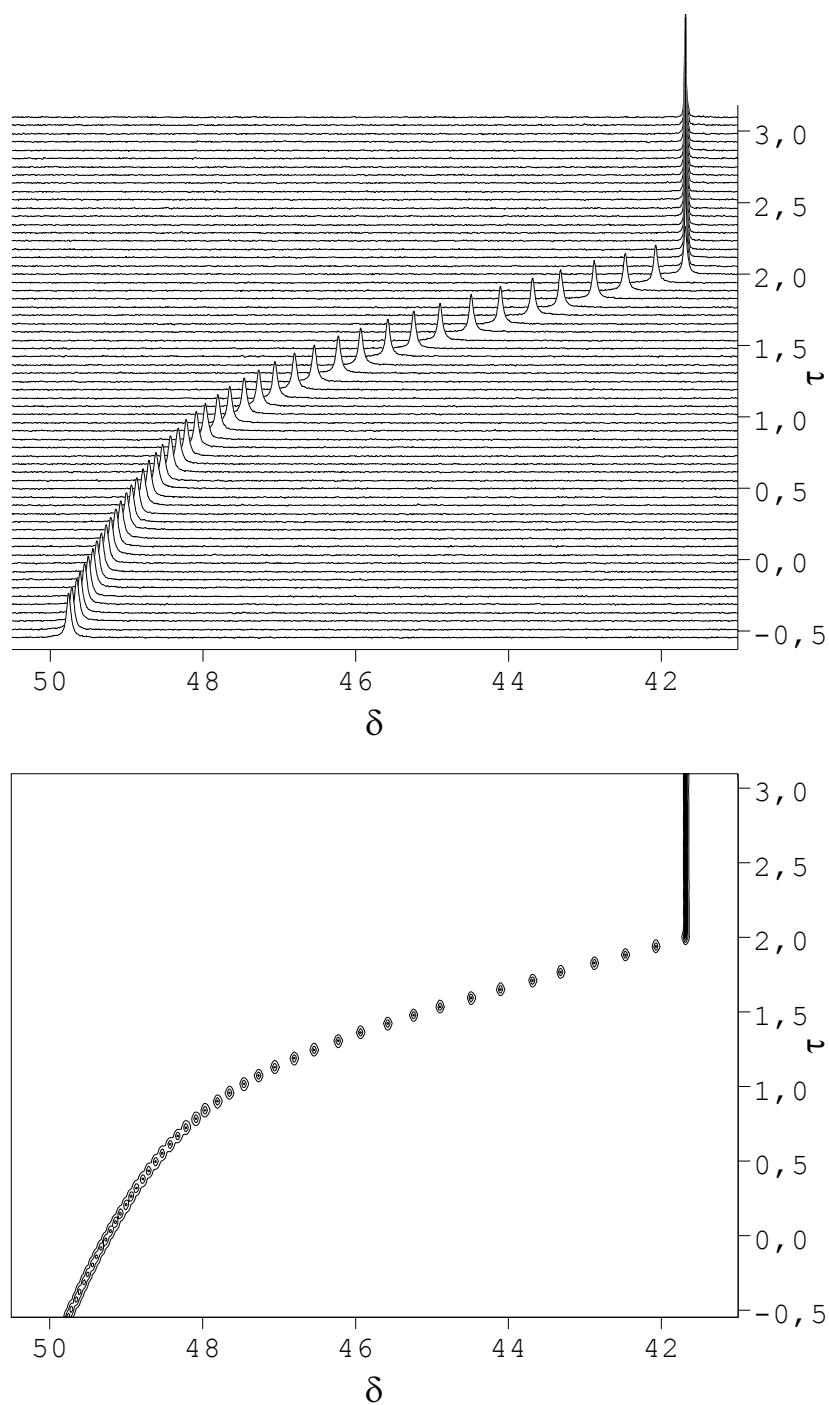


Abbildung 42: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 1-Hydroxyethan-*P,P'*-dimethyl-1,1-diphosphinsäure **2** (δ_{P} vs. τ) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 30)

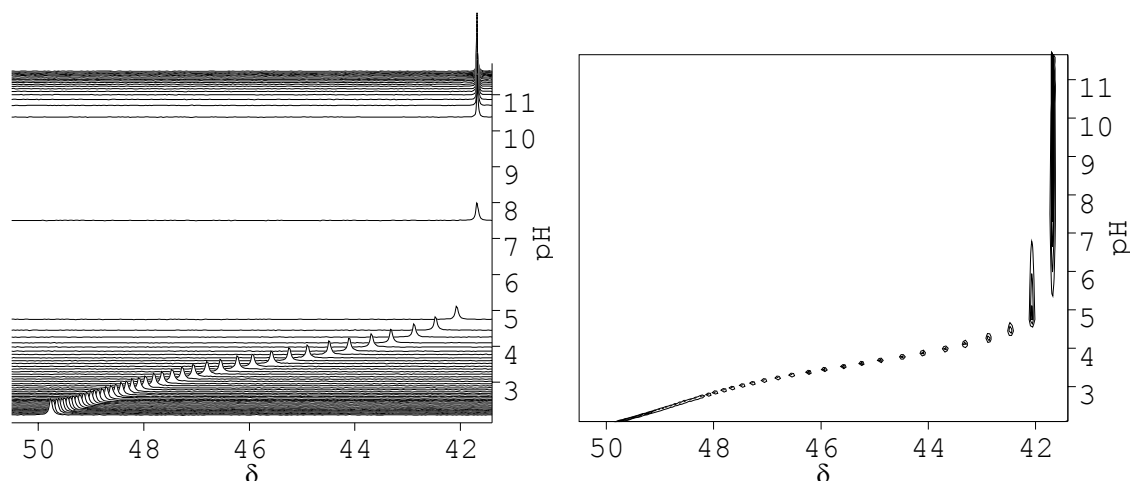


Abbildung 43: links: Stack-Plot - rechts: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 (δ_P vs. pH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 30)

Durch die Deprotonierung erfährt das Resonanzsignal für die beiden Phosphinyl-Gruppen eine Hochfeldverschiebung.

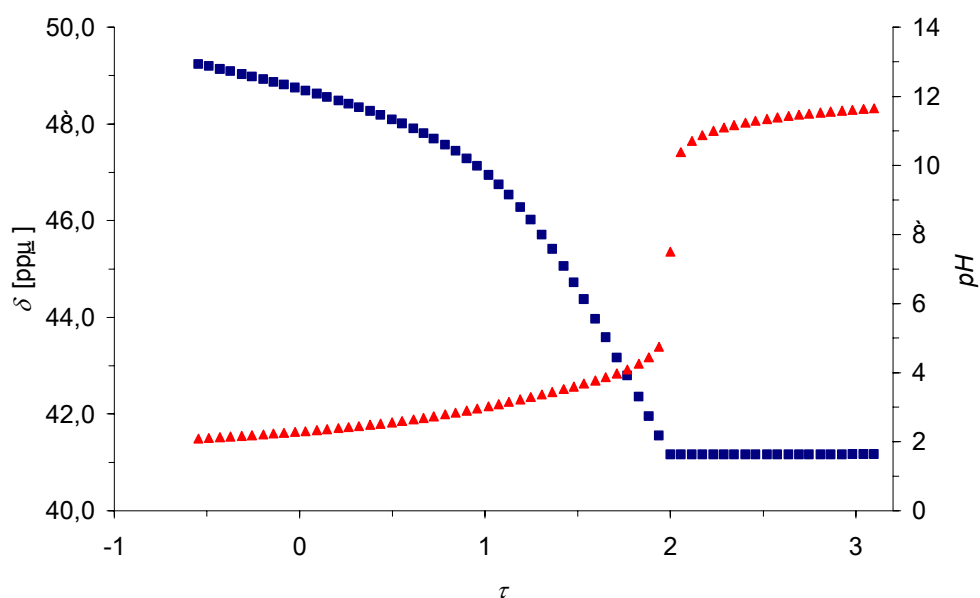


Abbildung 44: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

Aus der Abbildung 45, der Auftragung der Halbwertsbreite gegen den Titrationsgrad, ist zu entnehmen, dass bei dem Titrationsgrad $\tau = 2$ eine Veränderung der Halbwertsbreite auftritt. An dieser Stelle sinkt die Halbwertsbreite des Resonanzsignals von 13 Hz auf 4 Hz. Dies lässt den Schluss zu, dass, unter Berücksichtigung des Kurvenverlaufs für die Halb-

wertsbreite, bis zu diesem Punkt eine Linienverbreiterung durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen vorliegt.

Aufgrund des gewählten Konzentrationsbereichs sieht man in der Titrationskurve nur einen Äquivalenzpunkt.

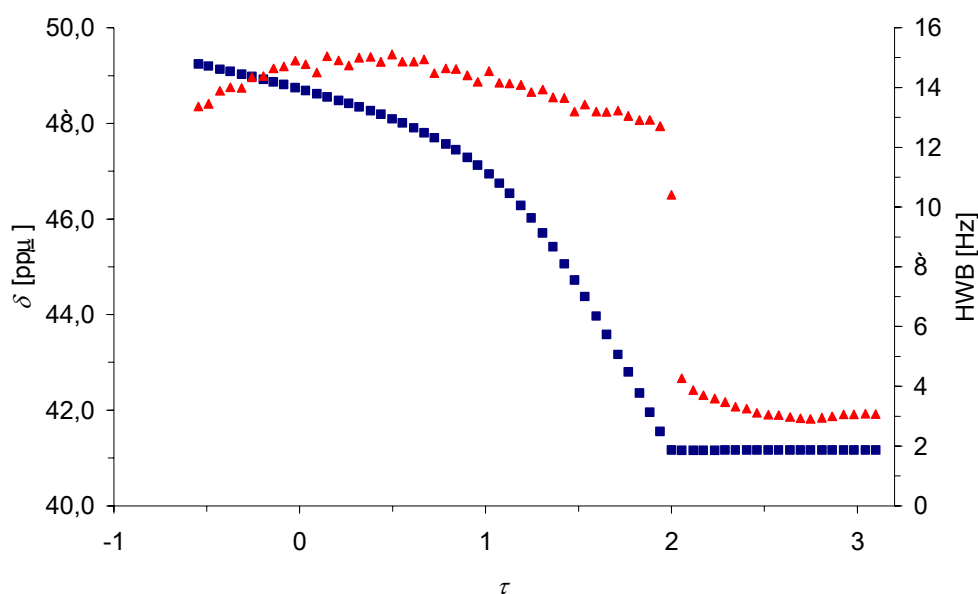


Abbildung 45: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

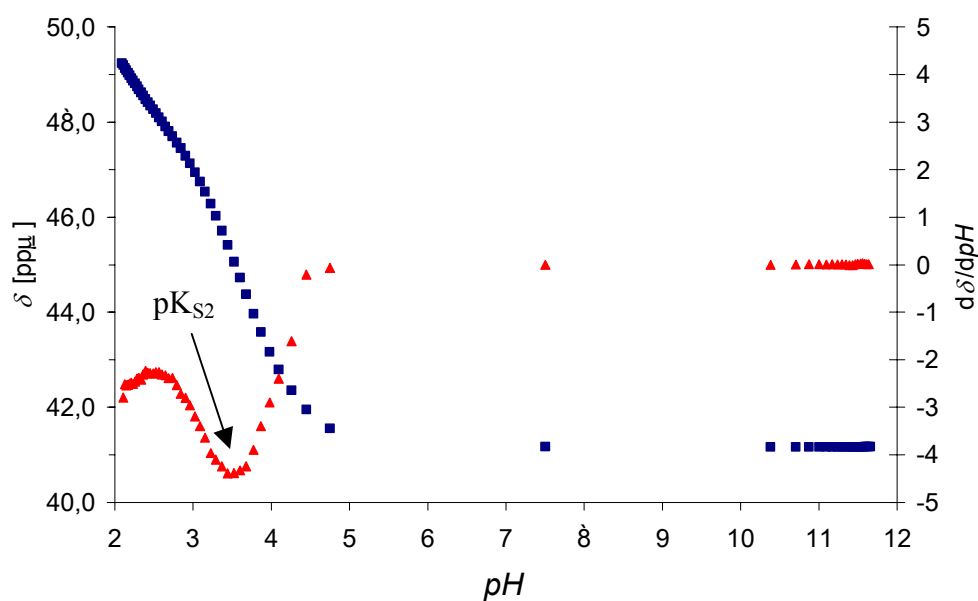


Abbildung 46: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und der 1. Ableitung $d\delta/dpH$ (▲) vs. pH-Wert der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

Unter Berücksichtigung der Theorie (vgl. Kapitel 2.1.5) wird aus der Abbildung 46 $pK_{S2} = 3,5$ erhalten.

In Tabelle 32 sind die ionenspezifischen Verschiebungen der 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 tabelliert.

	Gauß Elimination		Implizit Iteration	
Spezies	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]
H₂L	52,43 ± 0,022	4,41	52,31 ± 0,599	4,35
HL⁻	48,02 ± 0,005	6,85	47,96 ± 0,073	6,78
L²⁻	41,17 ± 0,003		41,18 ± 0,004	

Tabelle 32: Ionenspezifische Parameter von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der ionenspezifischen Parameter fällt die Übereinstimmung der Werte, auf die einmal mittels der Gauß-Elimination [59] und einmal mittels der Implizit-Iteration [61], ermittelt worden sind. Unterschiede in den Standardabweichungen der Ergebnisse treten durch die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden der Fehler auf.

6.3 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 werden jeweils drei Titrationsen durchgeführt.

Titration gegen 0,1 M TMAOH: Jeweils 0,16 mmol Ligand mit einer Zugabe von 0,48 mmol HCl ($c = 0,1001 \text{ mol/l}$) und 5,00 ml 0,5000 M TMACl ($I = 0,1$) werden mit bi.-dest. Wasser auf ein Volumen von 25,00 ml aufgefüllt. Die Titrationsen erfolgen unter Stickstoffatmosphäre gegen 0,1003 M TMAOH bei $25,0 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Titration gegen 1,0 M TMAOH: Jeweils 1,4 mmol Ligand mit einer Zugabe von 8,4 mmol HCl ($c = 0,9533 \text{ mol/l}$) und 2,74 g TMACl ($I = 1,0$) werden mit bi.-dest. Wasser auf ein Volumen von 25,00 ml aufgefüllt. Die Titrationsen erfolgen unter Stickstoffatmosphäre gegen TMAOH ($c = 1,0006 \text{ mol/l}$) bei $25,0 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

In Tabelle 33 sind die Werte der Dissoziationskonstanten, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt worden sind, und Werte aus Bestimmung gegen 0,1 M NaOH aufgelistet [100].

Titration	$\text{pK}_{\text{S}1}$	$\text{pK}_{\text{S}2}$	$\text{pK}_{\text{S}3}$	$\text{pK}_{\text{S}4}$	$\text{pK}_{\text{S}5}$	RMS
0,1 M TMAOH	0,70 $\pm 0,30$	2,16 $\pm 0,01$	3,35 $\pm 0,01$	6,94 $\pm 0,01$	11,57 $\pm 0,07$	0,243
1,0 M TMAOH	0,62 $\pm 0,24$	2,11 $\pm 0,02$	3,22 $\pm 0,05$	6,94 $\pm 0,01$	12,13 $\pm 0,10$	0,345
0,1 M NaOH [100]	1,42 $\pm 0,29$	2,19 $\pm 0,04$	3,39 $\pm 0,04$	6,87 $\pm 0,02$	11,55 $\pm 0,02$	-

Tabelle 33: Auflistung der Stabilitätskonstanten von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3; Exp. Bedingungen von [100] ($n = 0,250 \text{ mmol}$); NaOH ($c = 0,1002 \text{ mol/l}$), $I (\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$, $n (\text{HCl}) = 0,250 \text{ mmol}$, $V = 50 \text{ ml}$, $T = 25^{\circ}\text{C}$

Das Molenbruchverteilungsdiagramm von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 ist in Abbildung 47 gegen den Titrationsgrad und in Abbildung 48 gegen pH abgebildet.

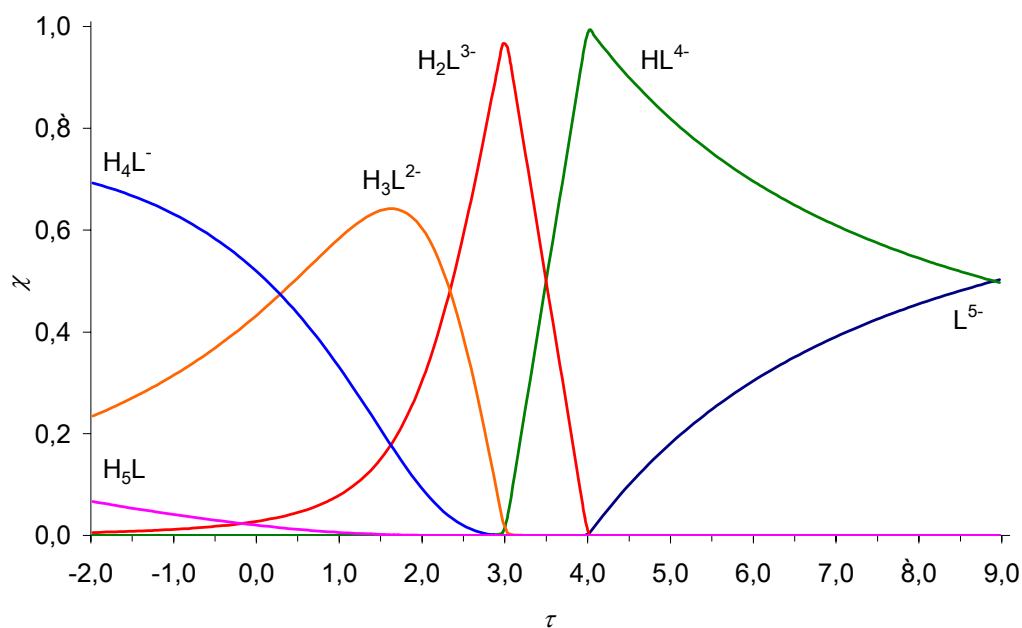


Abbildung 47: Molenbruchverteilungsdiagramm von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 vs. τ (Exp. Parameter: siehe Tabelle 35)

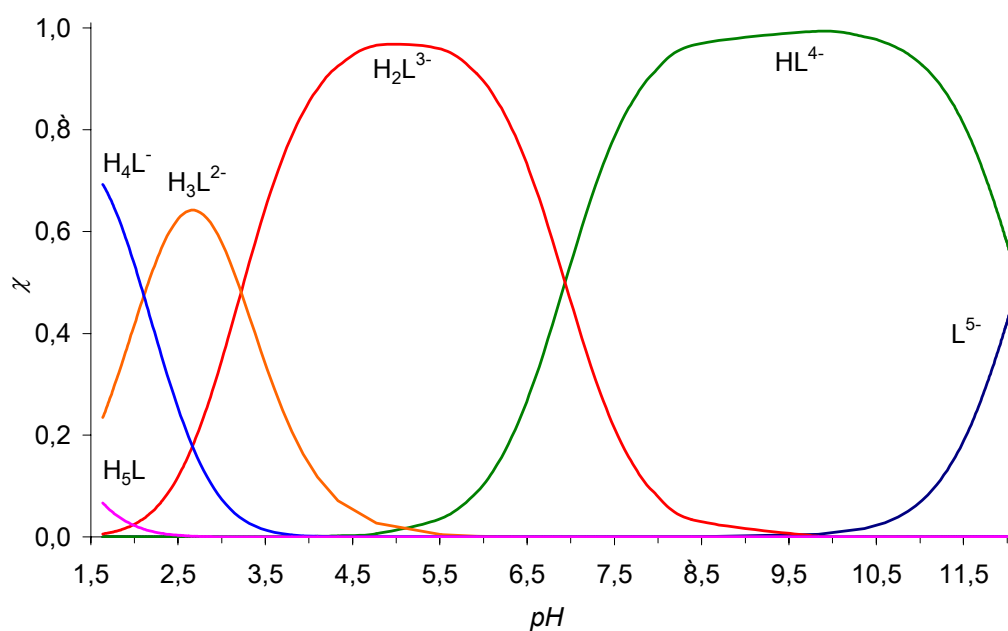


Abbildung 48: Molenbruchverteilungsdiagramm von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 vs. pH (Exp. Parameter: siehe Tabelle 35)

Die 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 lässt sich als $A_3[BCX]_2$ -Spinsystem und näherungsweise als $A_3[BC]_2X_2$ beschreiben.

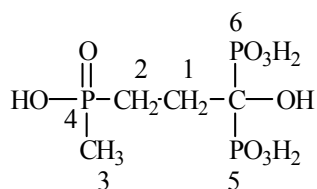


Abbildung 49: Strukturformel von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 mit Zuordnung der Kerne

Für die Ethylen-Gruppe resultiert ein ^1H -NMR-Spektrum mit starkem Second-Order-Charakter (vgl. Abbildung 50). Wegen des komplizierten Aufspaltungsmuster für die Ethylen-Gruppe wird im Rahmen dieser Arbeit ionenspezifische Verschiebung nur für die Methyl-Gruppe bestimmt. Für die Methyl-Gruppe tritt durch die Kopplung mit dem P-Atom der Phosphinyl-Gruppe im ^1H -NMR-Spektrum ein Dublett auf.

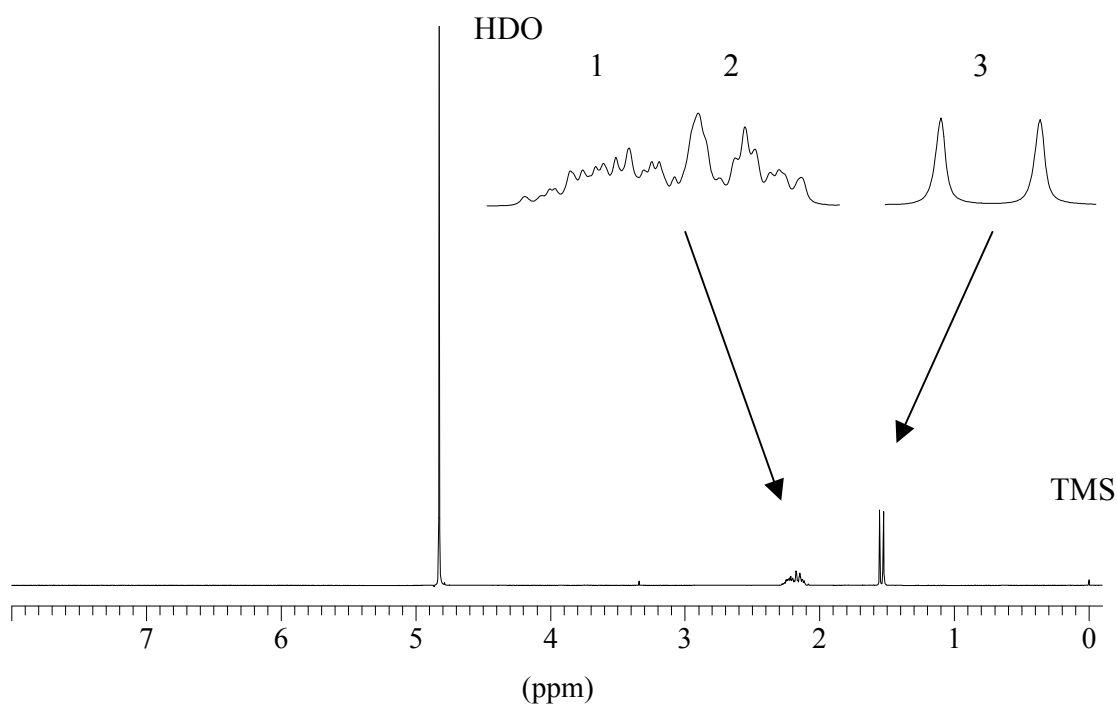


Abbildung 50: 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure Mononatriumsalz 3 ($c = 0,1244 \text{ mol/l}$ in D_2O)

Das Dissoziationsschema für die Substanz 3 ist in Abbildung 51 abgebildet.

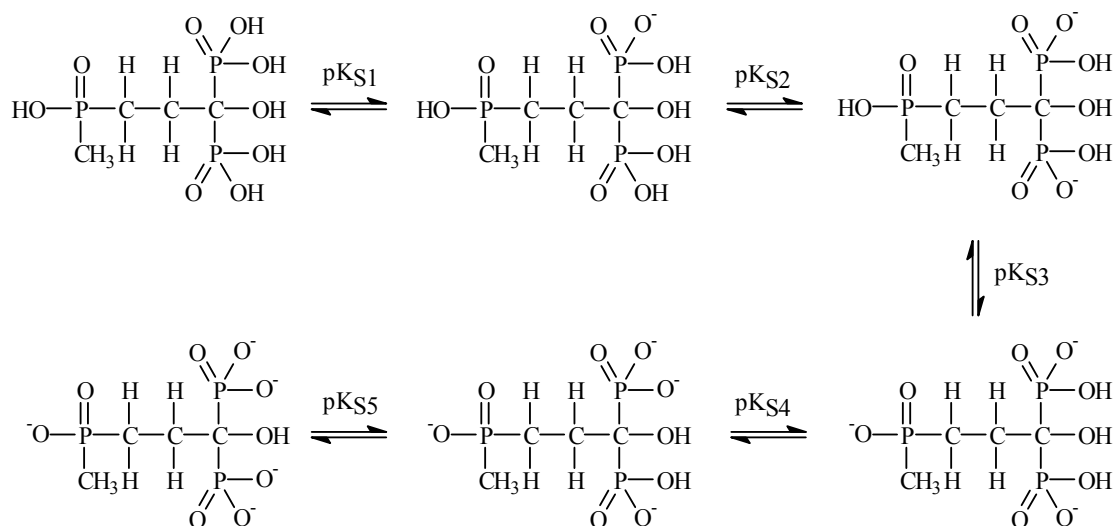


Abbildung 51: Dissoziationsschema von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

Tabelle 34 gibt die gewählten Parameter für die NMR-Experimente wieder. Vor der Aufnahme des ersten Spektrums eines bestimmten Titrationszustandes wurde eine Mischzeit von MT = 300 Sekunden und eine Wartezeit von WT = 420 Sekunden eingehalten.

Parameter	^{31}P -NMR	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR	^1H -NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46	202,46	500,13
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	16384	16384	20480
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	16384	16384	32768
Zahl der Scans (NS)	256	128	320
Spektrale Breite (SW) [Hz]	10775,862	10775,862	6009,615
Einstrahlungsfrequenz (O1) [Hz]	7895,79	7895,79	2750,72

Tabelle 34: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 500 von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

Die analytischen Parameter für die Titration werden in Tabelle 35 aufgelistet.

Substanz:			
1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure Mononatriumsalz <u>3</u>			
Molmasse [g/mol]:	326,05	Vorlagevolumen [ml]:	25,00
m (Substanz) [mg]:	59,6		
m (Wirkstoff) [mg]:	58,2	n (Wirkstoff) [mmol]:	0,1785
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0071
Zusatz HCl [mmol]:	0,5358	c (HCl) [mol/l]:	0,1001
I (Ionenpuffer: TMACl) [mol/l]:	0,1	c (TMACl) [mol/l]:	0,5000
		V _Z (TMACl) [ml]:	5,00
c (Titrator: TMAOH) [mol/l]:	0,1003		

Tabelle 35: Experimentelle Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 500 von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 vs. TMAOH

6.3.1 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

Eine Gesamtansicht mit beiden ^{31}P -Resonanzsignalen von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 wird in Abbildung 52 dargestellt.

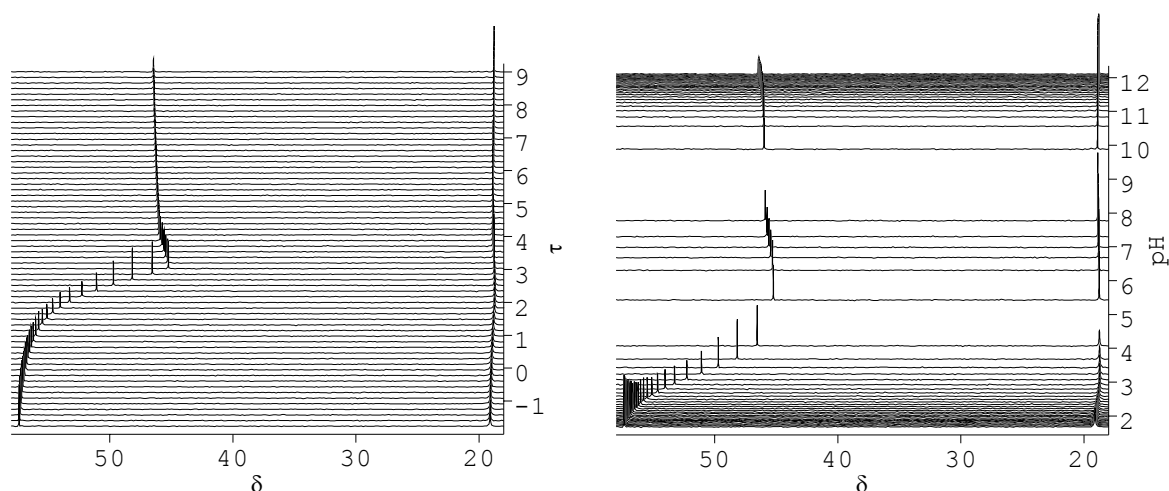


Abbildung 52: Stack-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 (links: δ_P vs. τ - rechts: δ_P vs. pH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 35)

Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die Spektren für die Phosphinyl-Gruppe.

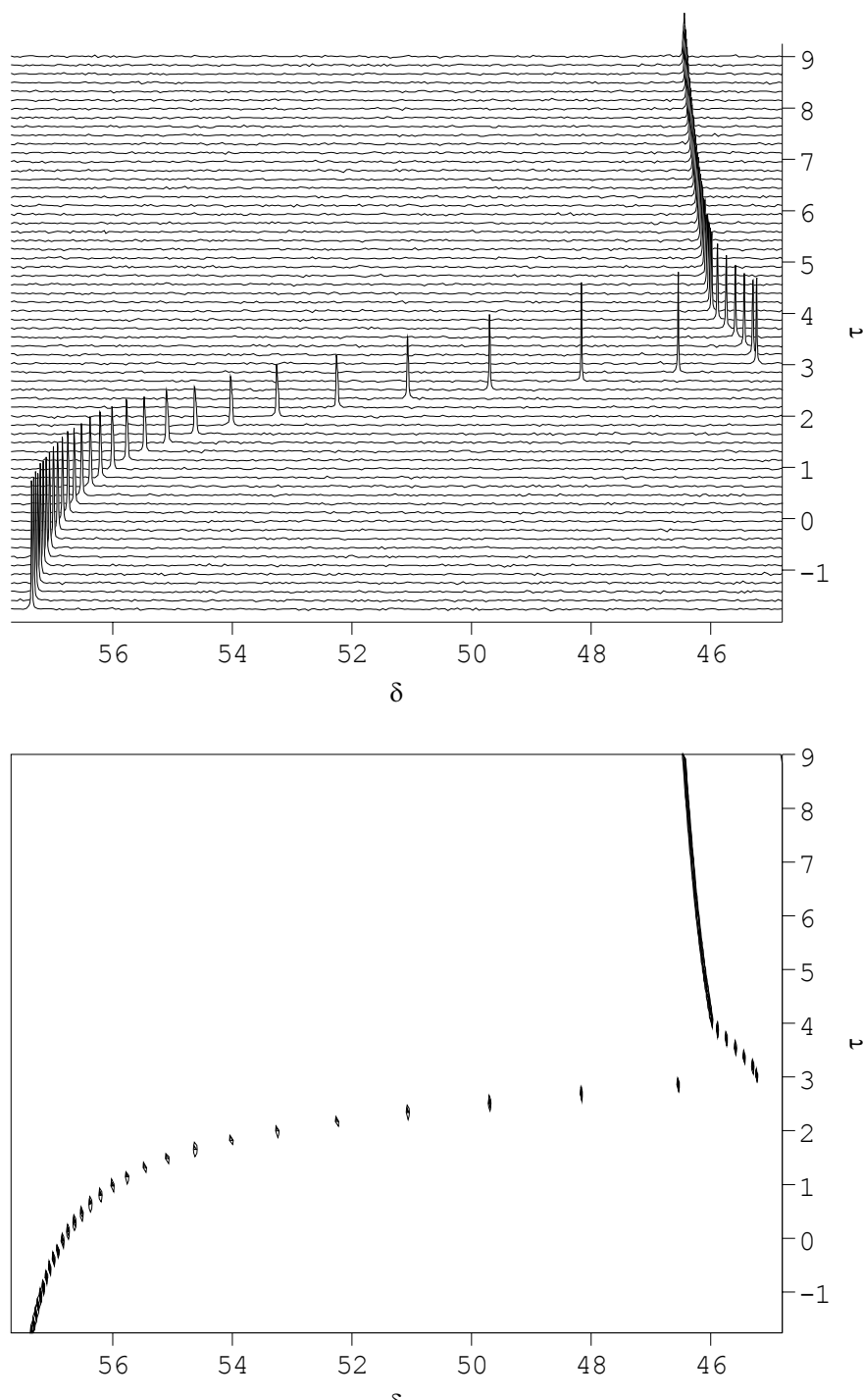


Abbildung 53: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz ^{31}P $\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure **3** (Phosphinyl-Gruppe) (δ_{P} vs. τ) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 35)

Die Spektren für die Phosphonyl-Gruppen sehen in der Spreizung wie folgt aus:

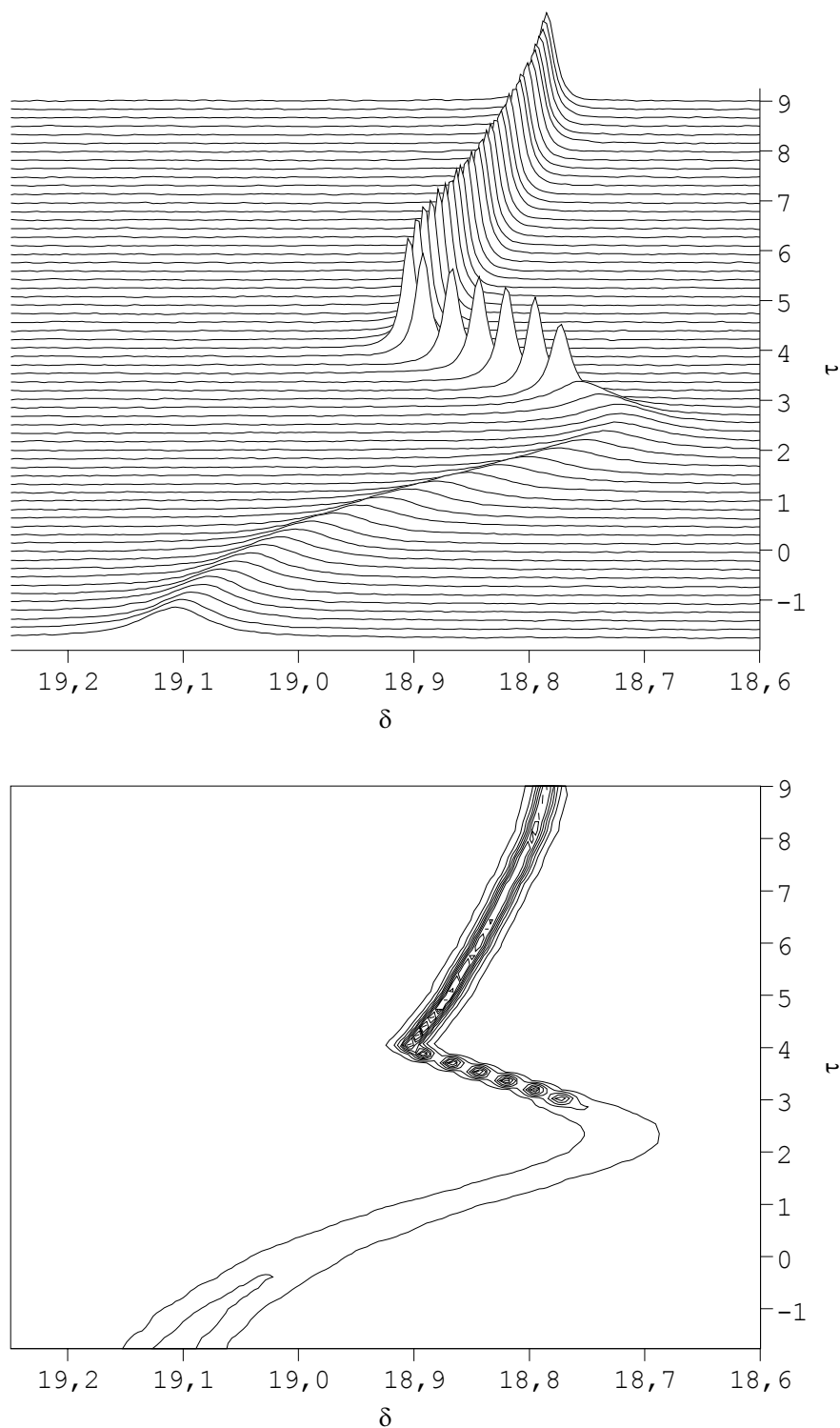


Abbildung 54: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure **3** (Phosphonyl-Gruppen) (δ_P vs. τ) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 35)

In Abbildung 55 sind der Stack- und der Kontur-Plot von δ_P gegen pH für die Phosphinyl-Gruppe und in Abbildung 56 für die Phosphonyl-Gruppen dargestellt.

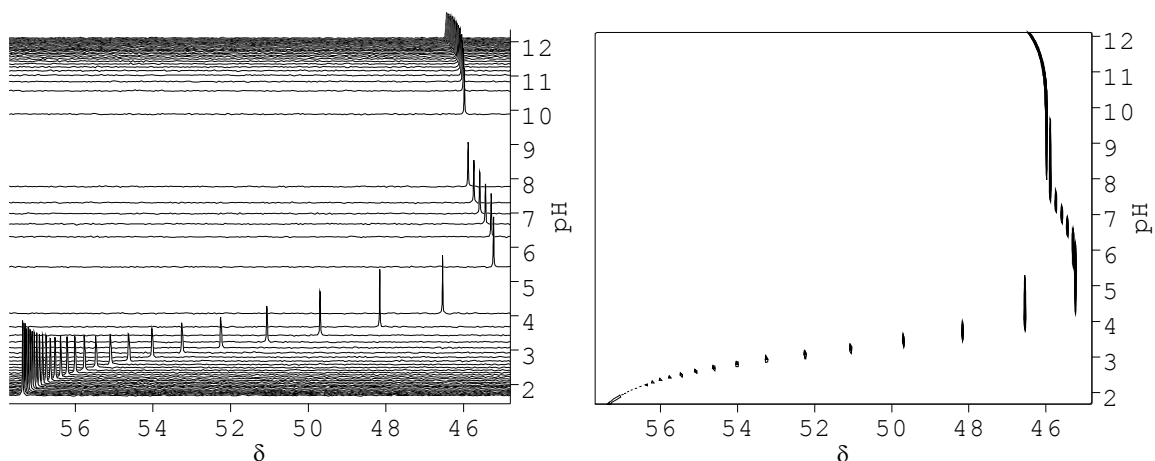


Abbildung 55: links: Stack-Plot - rechts: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure **3** (Phosphinyl-Gruppe) (δ_p vs. pH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 35)

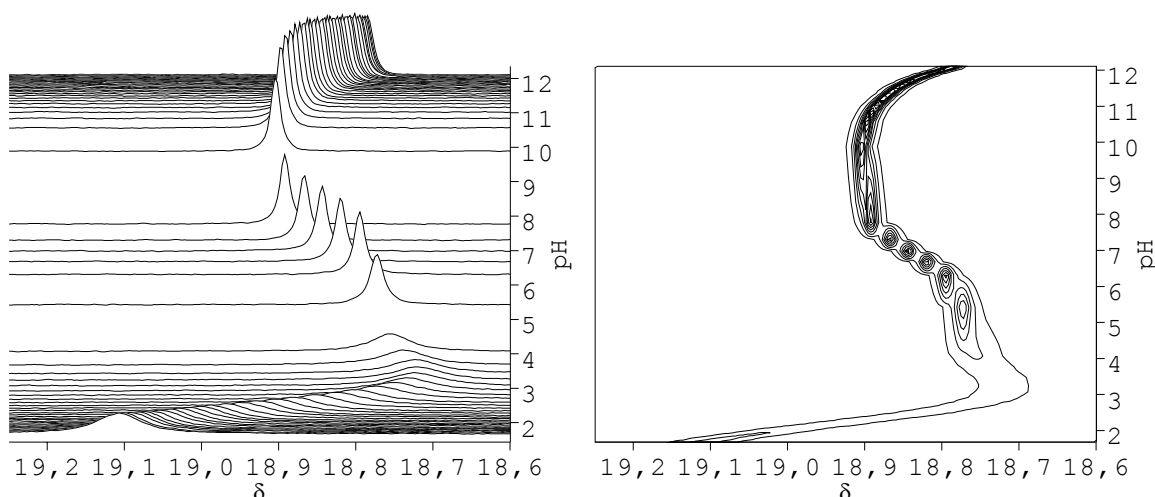


Abbildung 56: links: Stack-Plot - rechts: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure **3** (Phosphonyl-Gruppen) (δ_p vs. pH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 35)

Der Auftragung der chemischen Verschiebung δ_p der Phosphinyl-Gruppe gegen den Titrationsgrad (Abbildung 57) ist zu entnehmen, dass die Deprotonierung bis zum Titrationsgrad - $2 < \tau < 3$ eine Hochfeldverschiebung verursacht. Durch die Deprotonierung zur H_3L^{3-} -Spezies tritt ein Shift des Resonanzsignals von $\Delta_p = -12,5$ ppm. Die Deprotonierung von der H_3L^{3-} zu der H_2L^{4-} -Spezies wird im NMR-Spektrum durch eine Tieffeldverschiebung von 0,8 ppm sichtbar. Daraus folgt, dass PO_3H^- und PO_3^{2-} einen entgegengesetzten Substituenteneffekt auf δ_p ausüben. Der Kurvenverlauf der chemischen Verschiebungen ist

vergleichbar dem der von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 (Kapitel 6.2.1).

Die Auftragung der chemischen Verschiebung δ_P der Phosphonyl-Gruppen gegen den Titrationsgrad (Abbildung 58) zeigt, dass der Kurvenverlauf der chemischen Verschiebungen vergleichbar mit dem von HEDP 1 (Kapitel 6.1.2.1) ist. Im Bereich $-2 < \tau < 2,5$ ändert sich die Lage des Resonanzsignals durch die Deprotonierung zu höherem Feld. Die Änderung der chemischen Verschiebung kann mit dem "geminal effekt" [9] begründet werden. Durch die Bildung einer intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung im Diphosphonyl-Trianion im Bereich $2,5 < \tau < 4$ das Resonanzsignal zu tieferem Feld verschoben (siehe Abbildung 58). Ab einem Titrationsgrad von $\tau = 4$ wird für die Phosphonyl-Gruppen im Gegensatz zu der Phosphinyl-Gruppe eine Tieffeldverschiebung beobachtet.

Abbildung 60 zeigt den entgegengesetzten Einfluss auf die chemischen Verschiebungen der Phosphinyl-Gruppe und der Phosphonyl-Gruppen unter Verwendung der reduzierten chemischen Verschiebung.

Durch die Auftragung der Halbwertsbreite gegen den Titrationsgrad (Abbildung 60) ist zu erkennen, dass Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden.

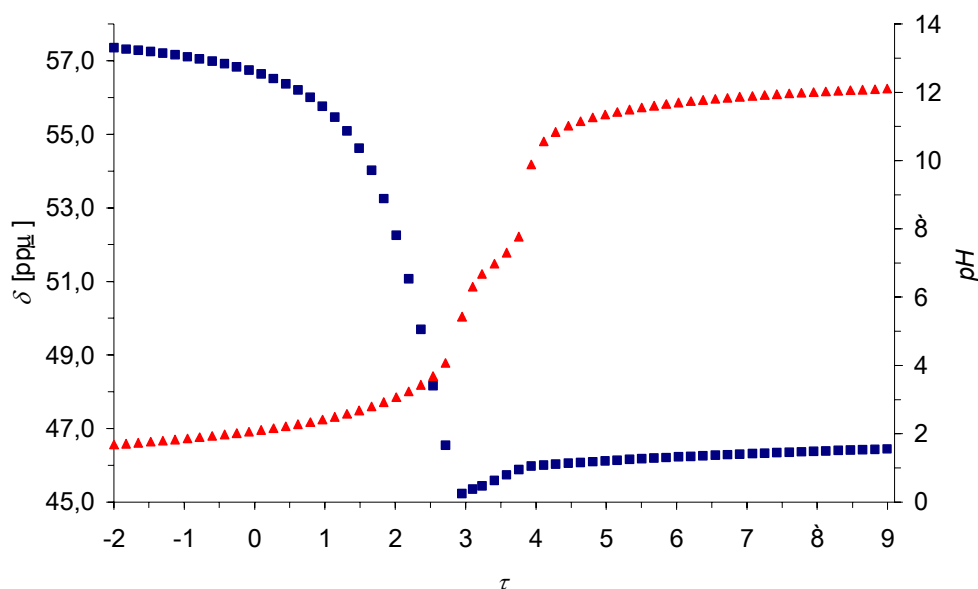


Abbildung 57: Auftragung der chem. Verschiebung δ_P (■) der Phosphinyl-Gruppe und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR-Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

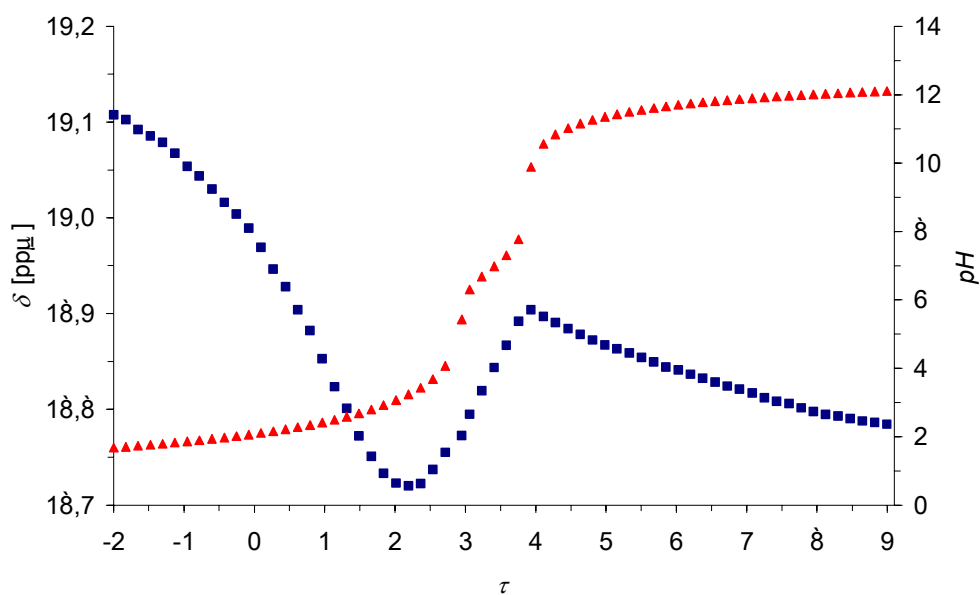


Abbildung 58: Auftragung der chem. Verschiebung δ_P (■) der Phosphonyl-Gruppen und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

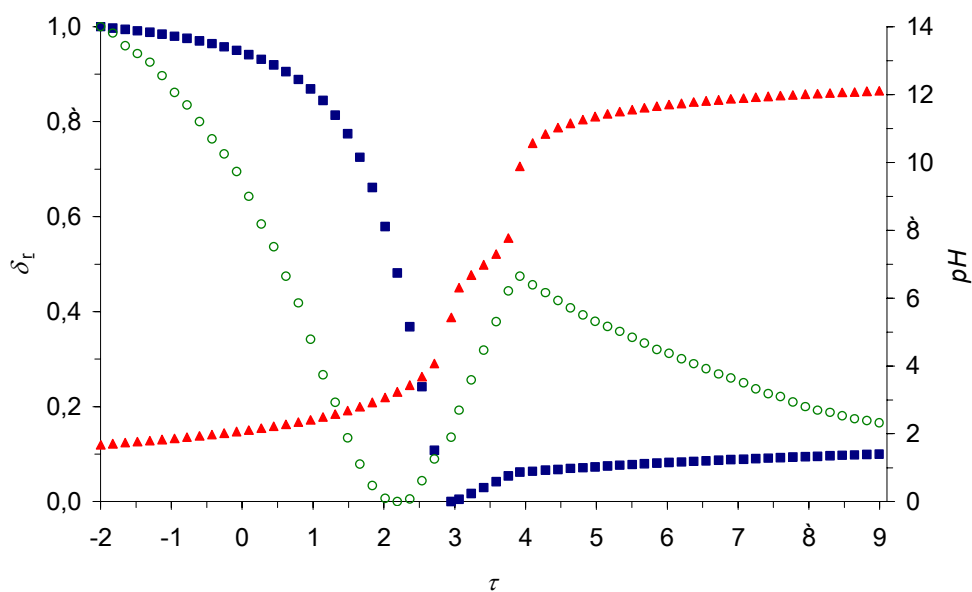


Abbildung 59: Auftragung der reduzierten chem. Verschiebung δ_P (■) der Phosphinyl-Gruppe, der reduzierten chem. Verschiebung δ_P (○) der Phosphonyl-Gruppen und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

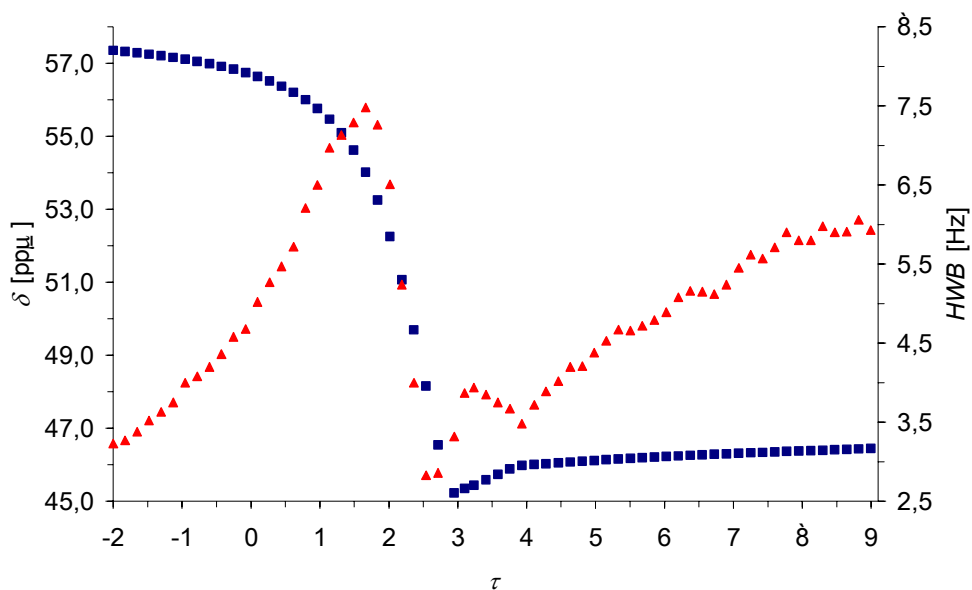


Abbildung 60: Auftragung der chem. Verschiebung δ_P (■) der Phosphinyl-Gruppe und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

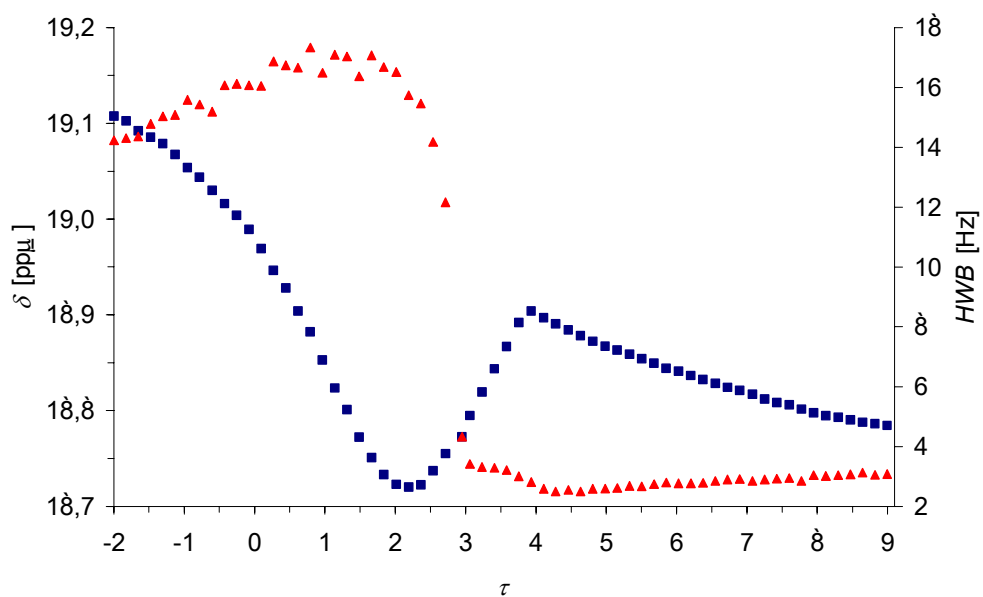


Abbildung 61: Auftragung der chem. Verschiebung δ_P (■) der Phosphonyl-Gruppen und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure

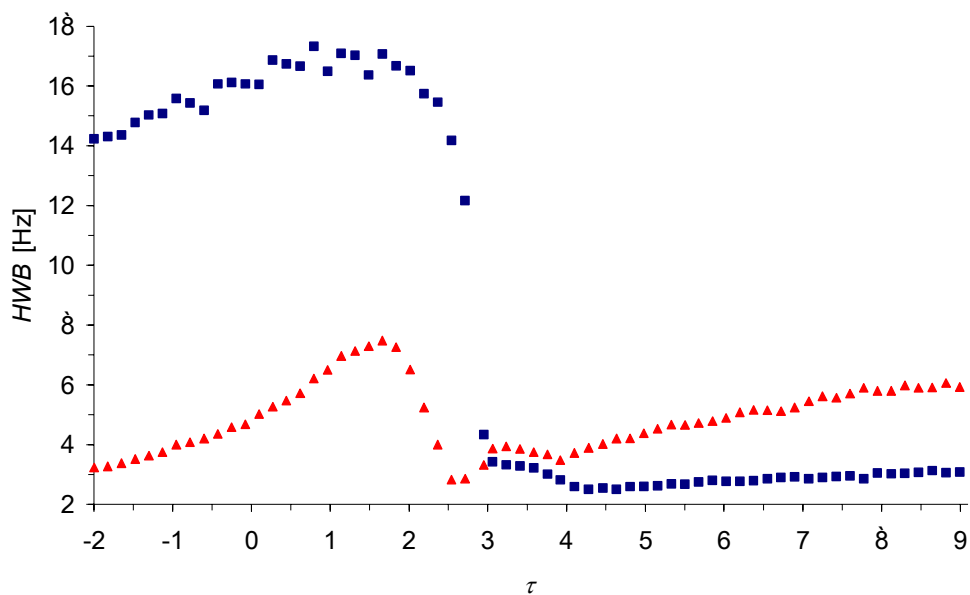


Abbildung 62: Auftragung der Halbwertsbreite HWB (Phosphonyl-Gruppen: ■; Phosphinyl-Gruppe: ▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

Durch die 1. Ableitung $\frac{d\langle\delta\rangle}{dpH}$ können pK_S -Werte ermittelt werden (siehe Kapitel 2.1.5).

Bei der Auftragung der 1. Abbildung für die Phosphinyl-Gruppe (Abbildung 63) kann $pK_{S3} = 3,33$ direkt aus dem Diagramm ermittelt werden. Im Diagramm für das Phosphonylsignal (Abbildung 64) ist dieser pK_{S3} -Wert nicht so signifikant ausgeprägt. Dies lässt den Schluss zu, dass die Deprotonierung an der Phosphinyl-Gruppe stattfindet. Abbildung 63 ist zu entnehmen, dass die größte Veränderung in der chemischen Verschiebung bis $pH = 4$ abgeschlossen ist, danach tritt noch einmal eine Tieffeldverschiebung des Resonanzsignals für die Phosphinyl-Gruppe von einem ppm ein.

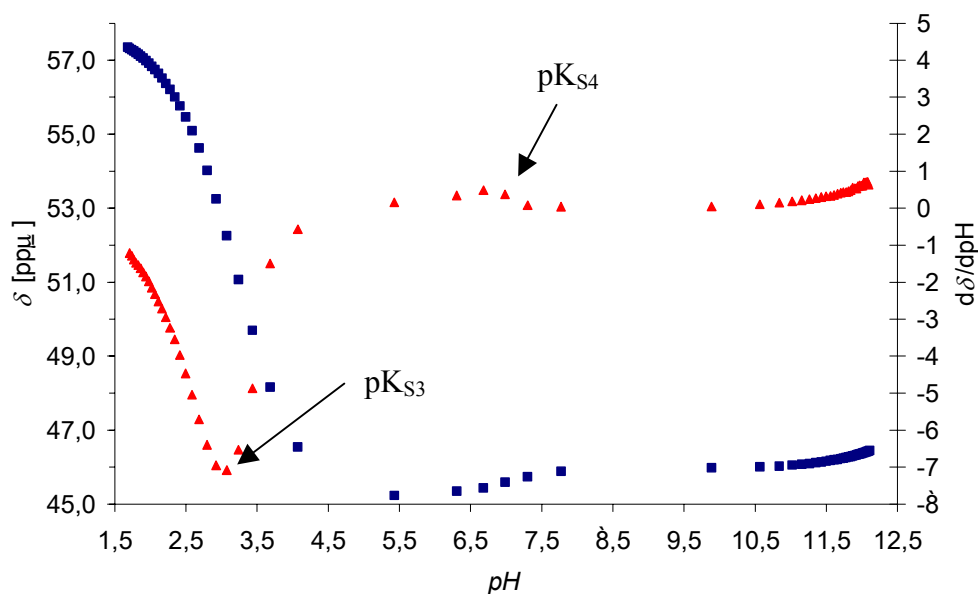


Abbildung 63: Auftragung der chem. Verschiebung δ_P (■) der Phosphinyl-Gruppe und der 1. Ableitung $d\delta_P/dpH$ (▲) vs. pH-Wert der 202,46 MHz $^{31}P\{^1H\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

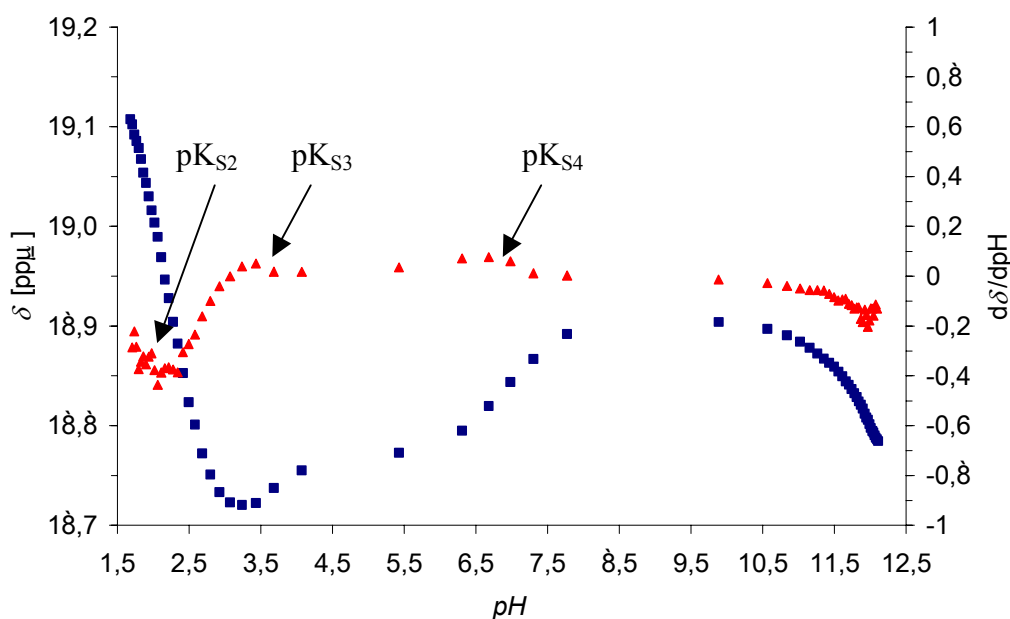


Abbildung 64: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) der Phosphonyl-Gruppen und der 1. Ableitung $d\delta_P/dpH$ (▲) vs. pH-Wert der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}P\{^1H\}$ -NMR-Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

In Tabelle 36 sind die ionenspezifischen Parameter für die Phosphinyl-Gruppe und die Phosphonyl-Gruppen von der 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 aufgeführt.

	Phosphinyl-Gruppe		Phosphonyl-Gruppen	
Spezies	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]
H₅L	50,525 ± 1,041	-8,202 ± 1,045	19,050 ± 1,041	-0,230 ± 1,045
H₄L⁻	58,727 ± 0,094	3,406 ± 0,104	19,278 ± 0,094	0,650 ± 0,104
H₃L²⁻	55,321 ± 0,044	10,323 ± 0,052	18,628 ± 0,044	-0,143 ± 0,052
H₂L³⁻	44,997 ± 0,027	-0,961 ± 0,034	18,771 ± 0,027	-0,148 ± 0,034
HL⁴⁻	45,958 ± 0,021	-0,538 ± 0,0281	18,919 ± 0,021	0,155 ± 0,028
L⁵⁻	46,496 ± 0,0191		18,764 ± 0,0191	

Tabelle 36: Ionenspezifische Parameter von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

Die hohen Standardabweichungen für die Spezies H₅L hängen direkt mit der prozentualen Häufigkeit bei den entsprechenden Titrationsgraden zusammen (vgl. Abbildung 47 auf Seite 93). Ein Vergleich mit den ionenspezifischen Parametern der ³¹P{¹H}-NMR-kontrollierten Titrations von HEDP 1 (Kapitel 6.1.2.1) und von 1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphinsäure 2 (Kapitel 6.2.1) zeigt, dass eine vergleichbare chemische Verschiebung bei der Deprotonierung der entsprechenden funktionellen Gruppen auftritt.

6.3.2 202,46 MHz ³¹P-NMR-kontrollierte Titration von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure

Weil die Resonanzsignale für die Phosphinyl-Gruppe die breit und wenig hochaufgelöst sind, liefern die Spektren keine weiteren Informationen, die nicht schon aus den ³¹P{¹H}-Spektren gezogen werden konnten. In Tabelle 37 werden für bestimmte Titrationsgrade die Kopplungskonstanten N_{PH}/2 angegeben ($N_{PH} = {}^4J_{PH} + {}^3J_{PH}$).

	$\tau = -2$	$\tau = 0$	$\tau = 2$	$\tau = 3$	$\tau = 4$	$\tau = 5$	$\tau = 6$	$\tau = 7$	$\tau = 8$
N _{PH} /2 [Hz]	11,84	10,54	13,16	13,48	12,50	12,50	12,50	12,50	12,83

Tabelle 37: ³J_{PH}-Kopplungskonstanten der Phosphonyl-Gruppen

Ein Temperatureffekt bei der chemischen Verschiebung durch das Pulsprogramm kann nicht beobachtet werden.

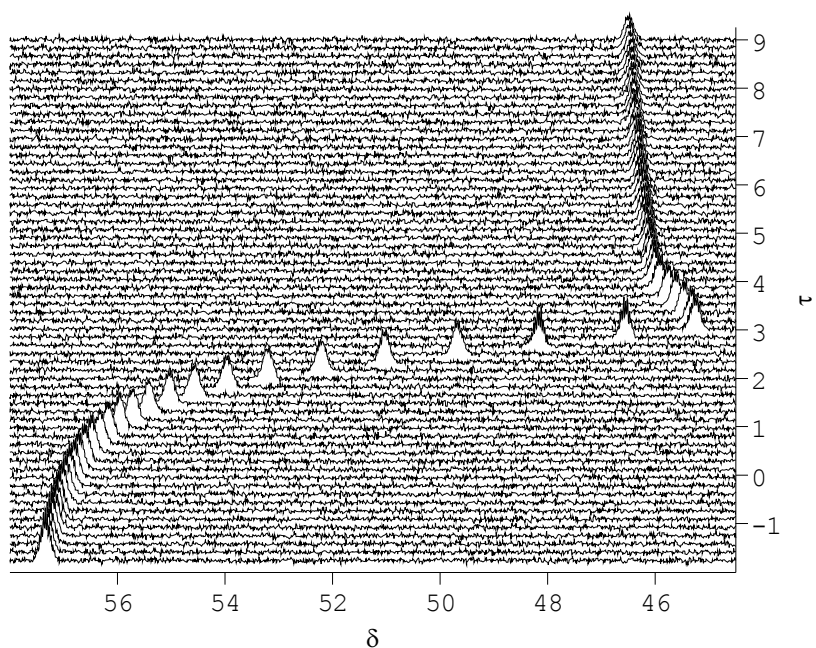


Abbildung 65: Stack-Plot der 202,46 MHz ^{31}P -NMR Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 (Phosphinyl-Gruppe) (δ_{P} vs. τ) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 35)

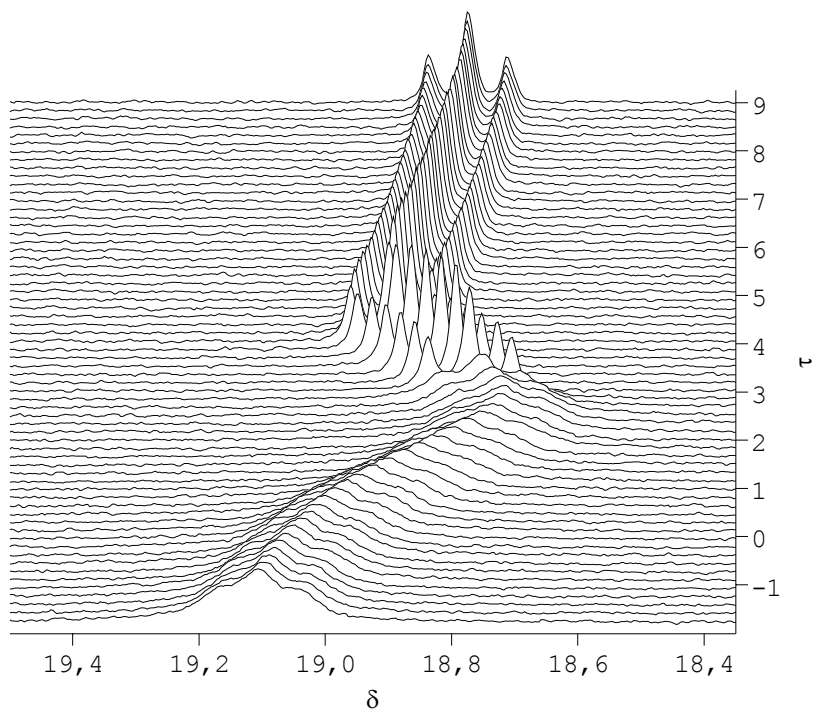


Abbildung 66: Stack-Plot der 202,46 MHz ^{31}P -NMR Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3 (Phosphonyl-Gruppen) (δ_{P} vs. τ) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 35)

6.3.3 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure

Anhand von Abbildung 67 ist zu erkennen, dass es nicht optimal gelungen ist, die Phasen und die Basislinie zu korrigieren. Der Grund hierfür ist (vgl. Tabelle 34, Seite 95), dass 20000 Datenpunkte für die Aufnahme gewählt worden sind. Im Weiteren stellte sich heraus, dass die Phasenkorrektur erschwert wird, wenn nicht ein 2^n -faches für die Zahl der Datenpunkte gewählt wird. In Kombination mit Signal-Rausch-Verhältnis (konzentrationsbedingt) gelingt es nicht, mit WINNMR bei den Spektren eine gute Phasen- und Basislinienkorrektur durchzuführen.

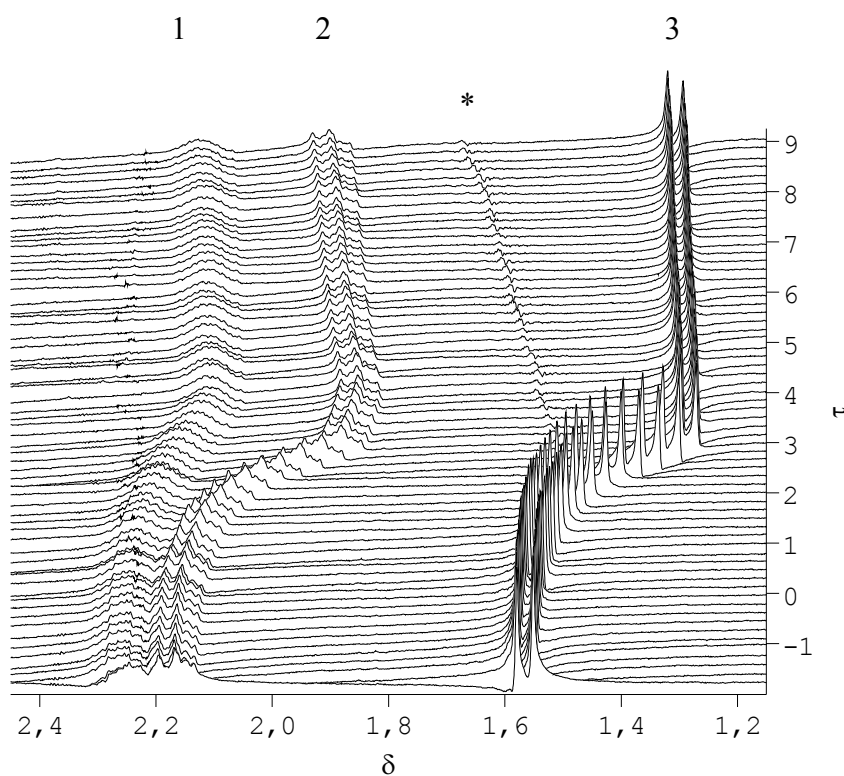


Abbildung 67: Stack-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR Messung von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure (δ_{H} vs. τ) - Zuordnung der Kerne: siehe Seite 94 (Exp. Parameter: siehe Tabelle 35) (* = Störsignal im Spektrum)

Die ersten Deprotonierungen an den Phosphonyl-Gruppen und die Deprotonierung der Phosphinyl-Gruppe verschieben die Resonanzsignale zu höherem Feld. Dabei wird das Resonanzsignal δ_{H_2} der Ethylen-Gruppe stärker beeinflusst als im Vergleich zum Resonanzsignal δ_{H_1} . Dies kann auf die H_2 benachbarte Phosphinyl-Gruppe zurückgeführt werden.

Mittels automatischer Deconvolution gelingt es, die Resonanzlagen für die Methyl-Gruppe zu bestimmen und somit anschließend die ionenspezifische Verschiebung der Methyl-Gruppe zu berechnen. Abbildung 68 zeigt die Auftragung der mittleren chemischen Verschiebung der Methyl-Gruppe gegen den Titrationsgrad.

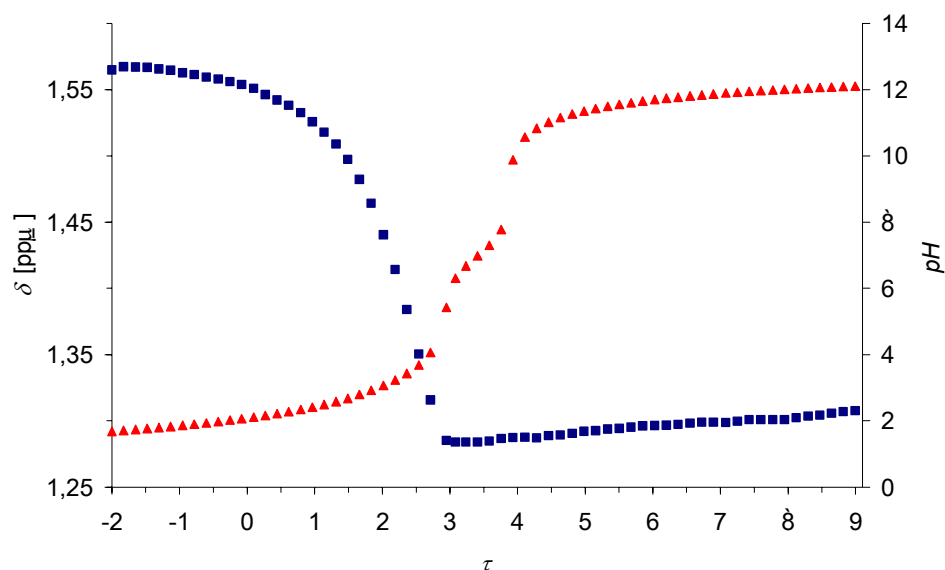


Abbildung 68: Auftragung der chem. Verschiebung δ_H (■) der Methyl-Gruppe und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierten Titration von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

Die ionenspezifischen Parameter für die Methyl-Gruppe sind in Tabelle 38 aufgelistet.

Spezies	δ_H [ppm]	Δ_H [ppm]
H_5L	$1,288 \pm 0,041$	$-0,329 \pm 0,041$
H_4L^-	$1,617 \pm 0,004$	$0,113 \pm 0,004$
H_3L^{2-}	$1,505 \pm 0,002$	$0,223 \pm 0,0021$
H_2L^{3-}	$1,281 \pm 0,001$	$-0,003 \pm 0,001$
HL^{4-}	$1,284 \pm 0,001$	$-0,024 \pm 0,001$
L^{5-}	$1,308 \pm 0,001$	

Tabelle 38: Ionenspezifischen Parameter für Protonen der Methyl-Gruppe von 1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure 3

Aus Abbildung 68 ist zu erkennen, dass die chemische Verschiebung für die Spezies H_5L , wie der berechnete Wert anzeigt (Tabelle 38), zu höherem Feld verschoben sein wird.

6.4 Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) 4

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) 4 werden jeweils drei Titrations durchgeföhrt. Bei der Durchföhrtung der Titrations wird folgenderweise vorgegangen:

Titration gegen 0,1 M TMAOH: Jeweils 0,15 mmol Ligand mit einer Zugabe von 0,30 mmol HCl ($c = 0,1001 \text{ mol/l}$) und 5,00 ml 0,5000 M TMACl ($I = 0,1$) werden mit bi.-dest. Wasser auf ein Volumen von 25,00 ml aufgefüllt. Die Titrations erfolgen unter Stickstoffatmosphäre gegen 0,1003 M TMAOH bei $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Titration gegen 1,0 M TMAOH: Jeweils 1,20 mmol Ligand mit einer Zugabe von 2,40 mmol HCl ($c = 0,9533 \text{ mol/l}$) und 2,74 g TMACl ($I = 1,0$) werden mit bi.-dest. Wasser auf ein Volumen von 25,00 ml aufgefüllt. Unter Stickstoffatmosphäre erfolgen die Titrations gegen 1,0220 M TMAOH bei $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Aus den experimentell ermittelten Daten und der aus der Literatur erhaltenen Deprotonierungsreihenfolge [105] [106] [107] [108] [109] ergibt sich folgendes Dissoziationsschema.

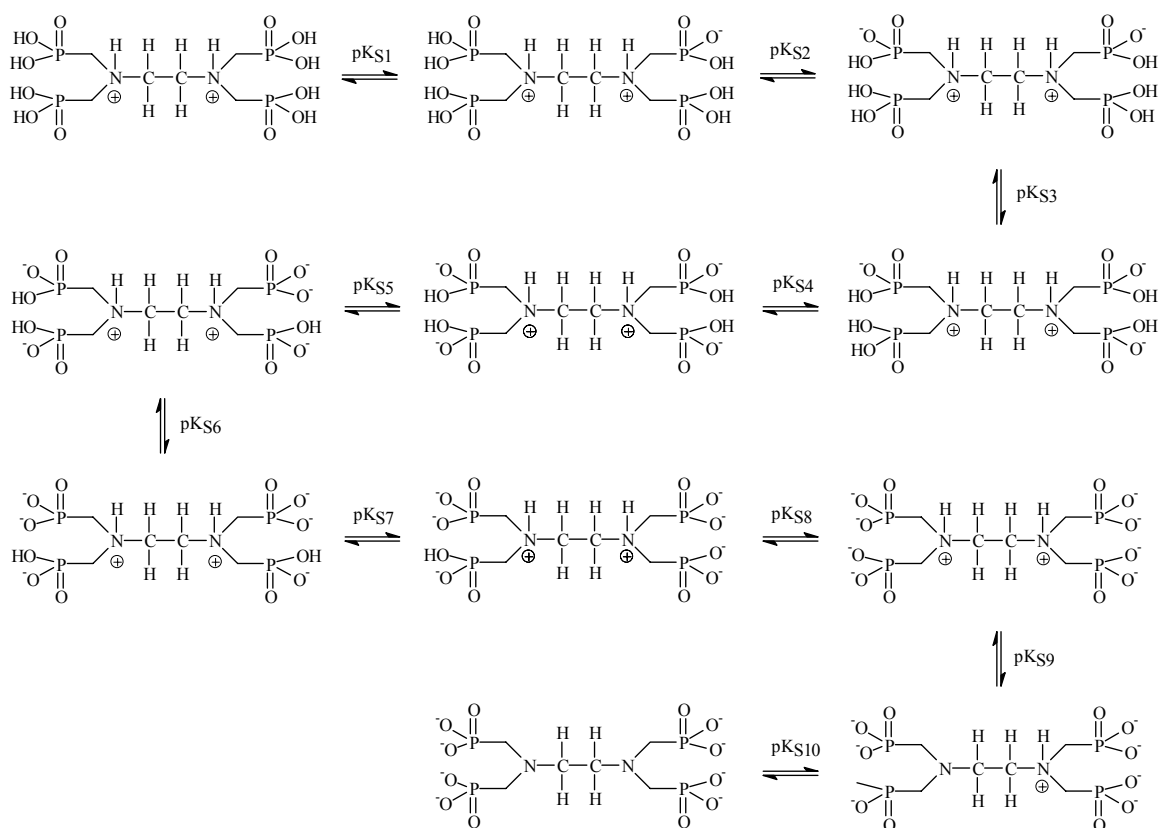


Abbildung 69: Dissoziationsschema von EDTMP 4 (EDTMP als $H_{10}L$ berechnet)

In Tabelle 39 sind die Werte der Dissoziationskonstanten, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt worden sind, tabelliert. Bei diesen Berechnungen der Dissoziationskonstanten wurde EDTMP 4 als H_8L betrachtet.

	TMAOH (0,1 M)	TMAOH (1,0 M)		TMAOH (0,1 M)	TMAOH (1,0 M)
logβ_8	$13,28 \pm 0,02$	$13,52 \pm 0,21$	pKs_1	$1,29 \pm 0,06$	$0,75 \pm 0,42$
logβ_7	$23,67 \pm 0,01$	$23,84 \pm 0,12$	pKs_2	$1,56 \pm 0,03$	$1,52 \pm 0,01$
logβ_6	$31,79 \pm 0,02$	$31,96 \pm 0,12$	pKs_3	$3,02 \pm 0,02$	$3,01 \pm 0,15$
logβ_5	$38,48 \pm 0,02$	$39,10 \pm 0,59$	pKs_4	$5,32 \pm 0,01$	$5,03 \pm 0,72$
logβ_4	$43,80 \pm 0,01$	$44,13 \pm 0,13$	pKs_5	$6,69 \pm 0,01$	$7,14 \pm 0,71$
logβ_3	$46,82 \pm 0,01$	$47,14 \pm 0,28$	pKs_6	$8,12 \pm 0,01$	$8,12 \pm 0,01$
logβ_2	$48,37 \pm 0,02$	$48,66 \pm 0,28$	pKs_7	$10,40 \pm 0,02$	$10,33 \pm 0,09$
logβ_1	$49,66 \pm 0,05$	$49,41 \pm 0,14$	pKs_8	$13,28 \pm 0,02$	$13,52 \pm 0,21$
RMS	0,154	0,254	RMS	0,154	0,254

Tabelle 39: log β - und pK s -Werte der EDTMP 4 aus eigenen Messungen (EDTMP als H_8L berechnet)

In Tabelle 40 werden die aus der Literatur ermittelten Dissoziationskonstanten tabelliert.

Untersuchungen [101] haben gezeigt, dass die log β -Werte bei dem Wechsel vom Titrand NaOH über TMAOH, LiOH bis zum KOH stetig ansteigen. Das Studium der Literaturwerte zeigt, dass die Dissoziationskonstanten der EDTMP 4 stark schwanken [105] [106] [107] [108] [109]. Die Schwankungen liegen im Bereich von ein (vgl. Tabelle 40 pK s_3) bis zwei pK-Einheiten (vgl. Tabelle 40 pK s_{10}).

Um Komplexbildungsgleichgewichte mit den Alkalimetallen aus den Alkalilaugen ausschließen zu können, werden die pK s -Wert-Titrationen und die NMR-kontrollierten Titrationen im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung von TMAOH durchgeführt.

Da größere Fehler bei pK s_1 , pK s_2 , pK s_3 (Messwerte kleiner 1) bei Bestimmungen mit 0,1 M Titrand-Lösungen auftreten, beziehungsweise die Werte nicht bestimmt werden können, werden im Rahmen dieser Arbeit auch Titrationen gegen 1,0 M Lösungen durchgeführt.

	[101]	[105]	[106]	[107]	[108]	[109]	[110]
pK_{s3}	1,09	1,46	-	-	2,43	-	-
pK_{s4}	1,32	2,72	-	1,33	2,73	-	-
pK_{s5}	2,88	5,05	3,00	3,02	3,80	2,96	-
pK_{s6}	5,21	6,18	5,23	5,17	5,63	5,12	-
pK_{s7}	6,60	6,63	6,54	6,42	7,39	6,40	-
pK_{s8}	7,99	7,43	8,08	7,94	9,27	7,87	-
pK_{s9}	10,22	9,22	10,18	9,78	10,48	9,85	-
pK_{s10}	12,72	10,60	12,10	12,99	10,60	13,07	13,8
Titration	TMAOH	k. A.	KOH	KOH	NaOH	KOH	TMAOH
c [mol/l]	0,005	0,02 - 0,04	k. A.	0,100	0,001	0,005	0,006
I	0,1 (TMACl)	0,1 (KCl)	0,1 (KCl)	0,1 (KCl)	0,1 (NaNO ₃)	0,1 (KCl)	3,45 (TMACl)
T [°C]	25	25	25	25	25	25	25

Tabelle 40: Literaturwerte für die pK_s-Werte der EDTMP 4 (Verwey: [101]; Westerback: [105]; Kabachnik: [106]; Motekaitis: [107]; Rizkalla: [108]; Sawada: [109]; Popov: [110]) (EDTMP als H₁₀L berechnet)

Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) [102] ist von besonderem Interesse, da sie wie die strukturverwandte Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in der Lage ist, als stabiler Chelat-Bildner zu fungieren.

Abbildung 70 und Abbildung 71 stellen die Molenbruchverteilungsdiagramme der neun Spezies H₈L, H₇L⁻, H₆L²⁻, H₅L³⁻, H₄L⁴⁻, H₃L⁵⁻, H₂L⁶⁻, HL⁷⁻, L⁸⁻ für die pK_s-Wertbestimmung unter Verwendung 0,1 molarer Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung dar.

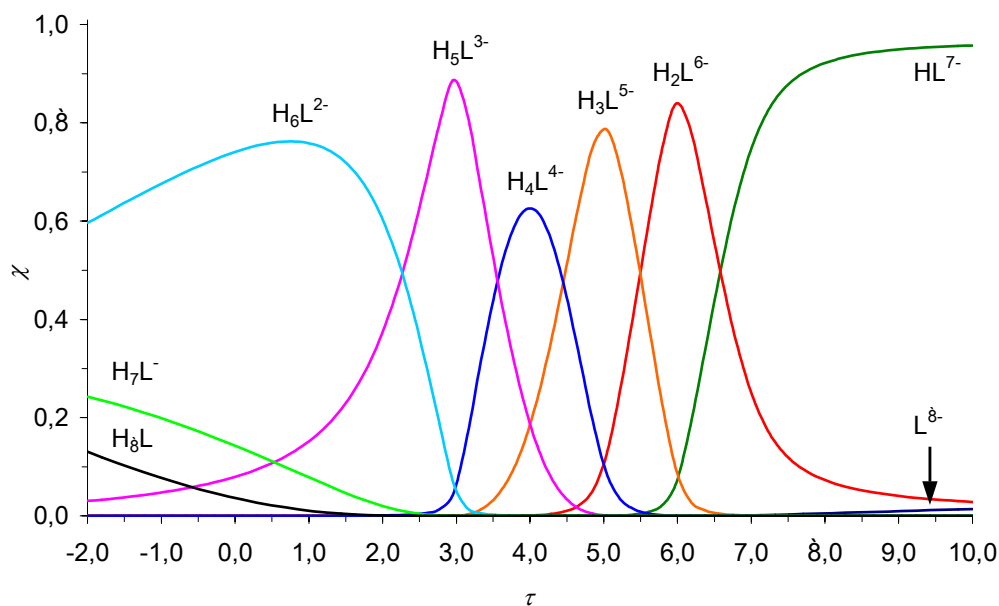


Abbildung 70: Molenbruchverteilungsdiagramm von EDTMP 4 vs. Titrationsgrad τ (vs. 0,1 M TMAOH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 44)

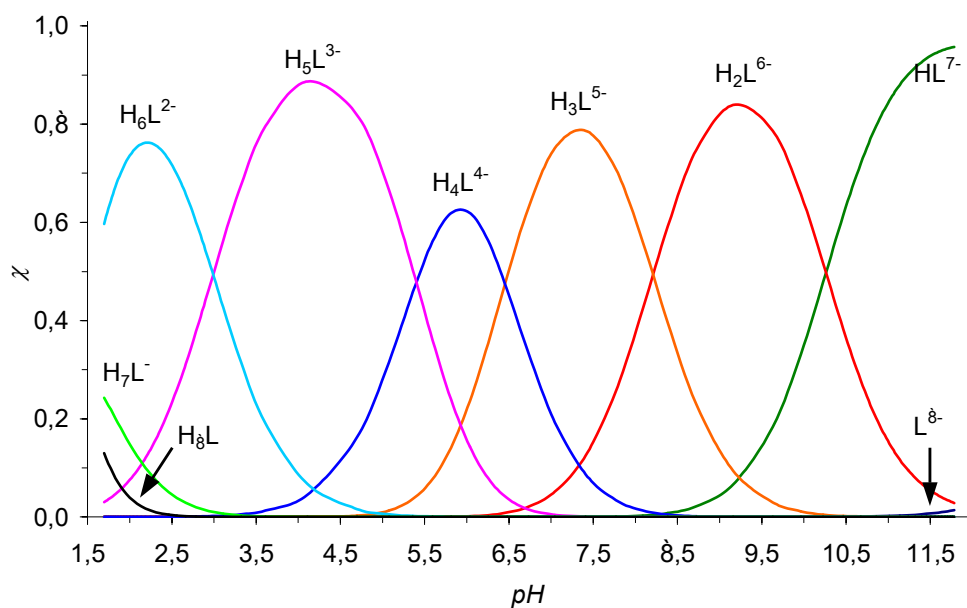


Abbildung 71: Molenbruchverteilungsdiagramm von EDTMP 4 vs. pH (vs. 0,1 M TMAOH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 44)

Abbildung 72 und Abbildung 73 stellen die Molenbruchverteilungsdiagramme der neun Spezies H_8L , H_7L^- , H_6L^{2-} , H_5L^{3-} , H_4L^{4-} , H_3L^{5-} , H_2L^{6-} , HL^{7-} , L^{8-} für die pK_s -Wertbestimmung unter Verwendung 1,0 molarer Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung dar.

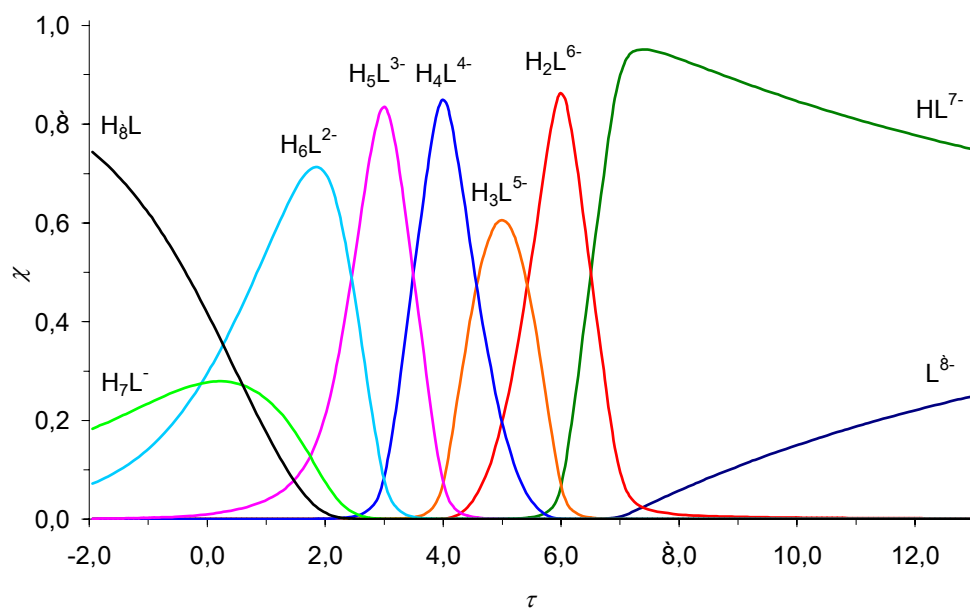


Abbildung 72: Molenbruchverteilungsdiagramm von EDTMP 4 vs. Titrationsgrad τ (vs. 1,0 M TMAOH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 48)

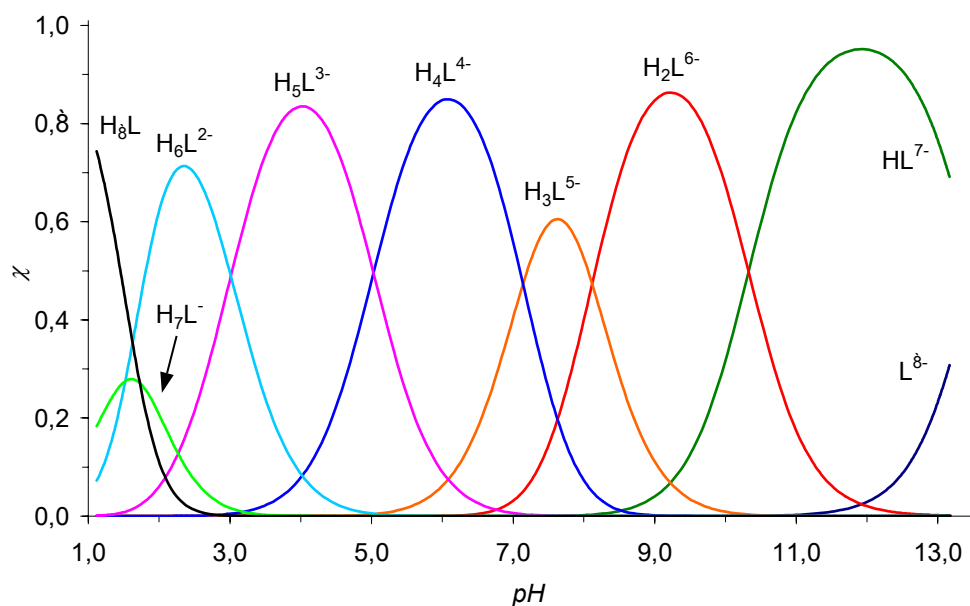


Abbildung 73: Molenbruchverteilungsdiagramm von EDTMP 4 vs. pH (vs. 1,0 M TMAOH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 48)

EDTMP 4 lässt sich als Superposition eines A_4 -Spinssystems und vier A_2X -Spinssysteme beschreiben.

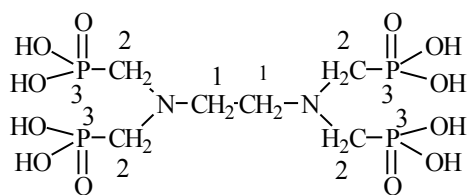


Abbildung 74: Strukturformel von EDTMP 4 mit Zuordnung der Atome

Abbildung 75 zeigt das 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektrum von EDTMP 4 in D_2O . Die aus der Iteration erhaltenen Parameter sind Tabelle 41 (Resonanzfrequenzen) und Tabelle 42 (Kopplungskonstante) zu entnehmen.

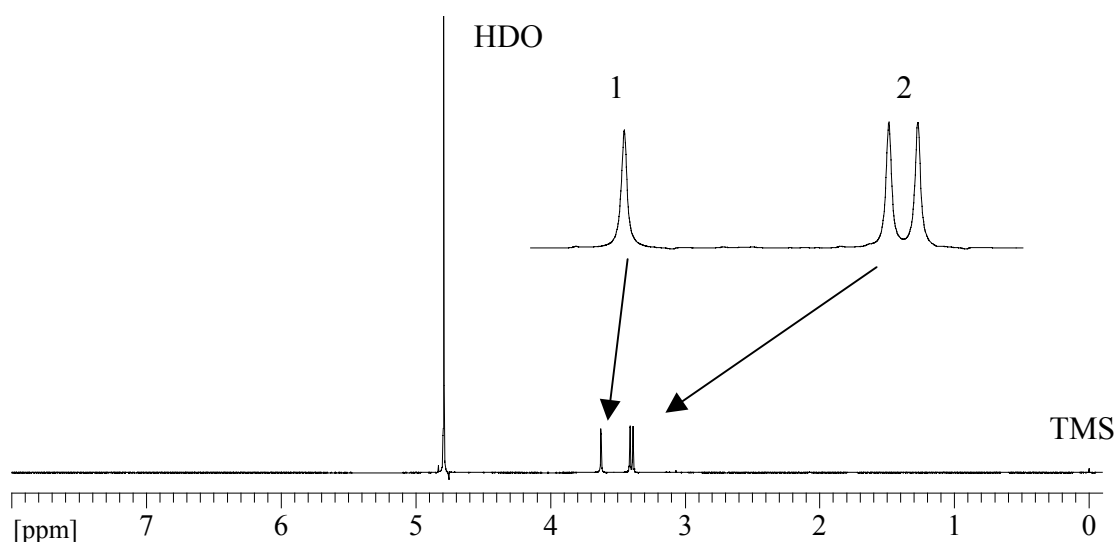


Abbildung 75: 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektrum von EDTMP 4 ($c = 0,0536 \text{ mol/l}$ in D_2O)

SNr	Iso	Typ	δ [ppm]	ν [Hz]	Stabw [Hz]
1	^1H	A (von A_4)	3,6243	1812,6371	$\pm 0,0012$
2	^1H	A (von A_2X)	3,3976	1699,2868	$\pm 0,0078$
3	^{31}P	X	12,360	2502,3127	-

Tabelle 41: Iterierte chem. Verschiebungen des 500,13 MHz- ^1H - sowie chem. Verschiebung des 200,46 MHz- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrums von EDTMP 4 ($c = 0,0536 \text{ mol/l}$ in D_2O)

SNr	SNr	KIso	KTyp	J [Hz]	Stabw [Hz]
1	3	$^2\text{J}_{\text{PH}}$	J_{AX} (von A_2X)	-11,7835	$\pm 0,0015$

Tabelle 42: Iterierte Kopplungskonstante des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums von EDTMP 4 ($c = 0,0536 \text{ mol/l}$ in D_2O)

Die statistischen Gütekriterien der Iteration werden in Tabelle 43 aufgelistet.

Statistical Information	A ₄ - und A ₂ X-Spinsystem
FSS	13,3141
NSP	7177
SDM	0,0431
R%	0.1277

Tabelle 43: Statistische Gütekriterien der Iterationen aus Tabelle 41 und Tabelle 42.

6.4.1 Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) 4 vs. 0,1 M TMAOH

Zur Durchführung der Titration werden folgenden Parameter gewählt:

Substanz: Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) <u>4</u>			
Molmasse [g/mol]:	436,12	Vorlagevolumen [ml]:	25,00
m (Substanz) [mg]:	65,4		
m (Wirkstoff) [mg]:	62,7	n (Wirkstoff) [mmol]:	0,1437
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0058
Zusatz HCl [mmol]:	0,2874	c (HCl) [mol/l]:	0,1000
I (Ionenpuffer: TMACl) [mol/l]:	0,1	c (TMACl) [mol/l]:	0,5000
		V _Z (TMACl) [ml]:	5,00
c (Titrator: TMAOH) [mol/l]:	0,1003		

Tabelle 44: Exp. Parameter der NMR-kontrollierten Titration von EDTMP 4

Parameter	³¹ P{ ¹ H}-NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	16384
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	16384
Zahl der Scans (NS)	192
Spektrale Breite (SW) [Hz]	10162,602
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	5061,40

Tabelle 45: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration von EDTMP 4

Tabelle 45 gibt die gewählten Parameter für die NMR-Experimente wieder. Vor der Aufnahme des ersten Spektrums eines bestimmten Titrationszustandes wurde eine Mischzeit von $MT = 300$ Sekunden und eine Wartezeit von $WT = 420$ Sekunden eingehalten.

6.4.1.1 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von EDTMP 4

Die nachfolgende Abbildung zeigt den Stack- und den Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von EDTMP 4 gegen 0,1 M TMAOH.

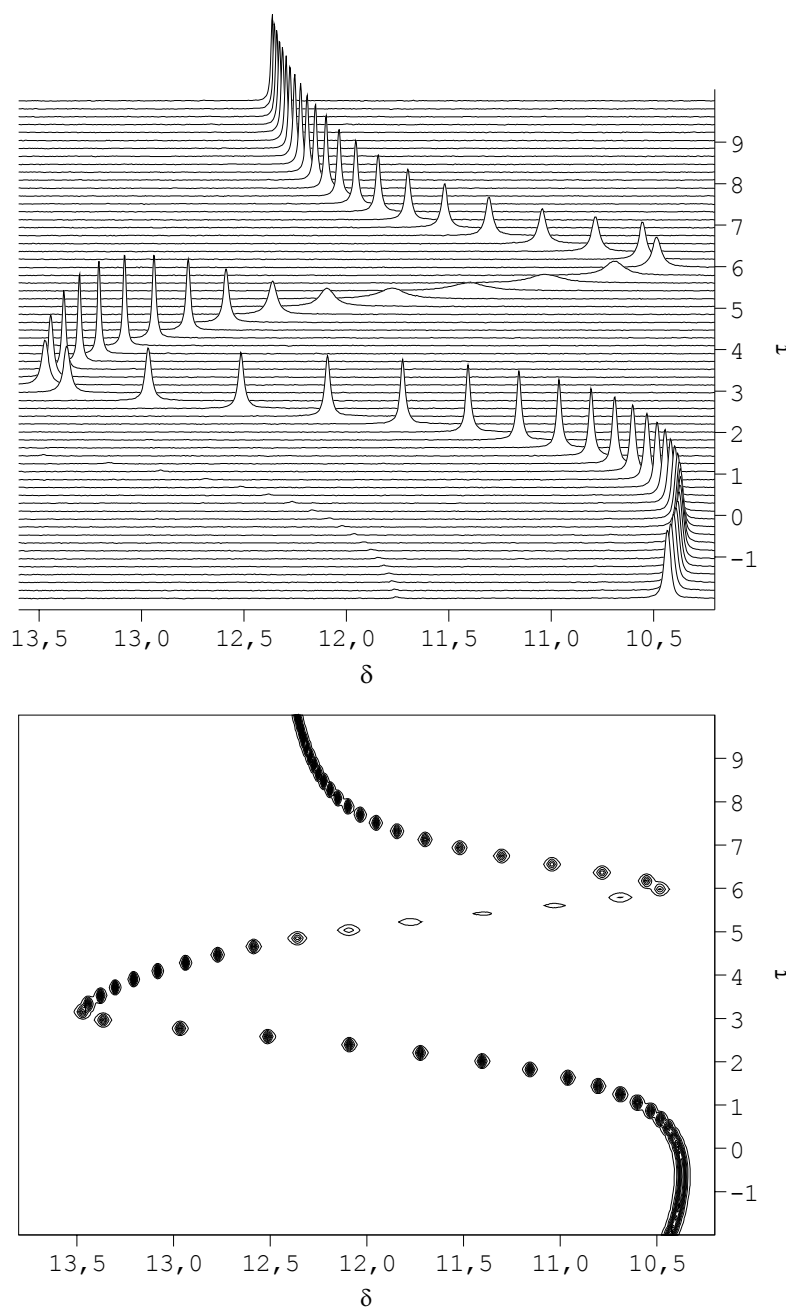


Abbildung 76: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von EDTMP 4 vs. 0,1 M TMAOH (δ_P vs. τ) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 44)

Aufgrund der gewählten Titrationsbedingungen werden bei dieser Messung die Spezies H_5L^{3-} , H_4L^{4-} , H_3L^{5-} , H_2L^{6-} , HL^{7-} auftreten.

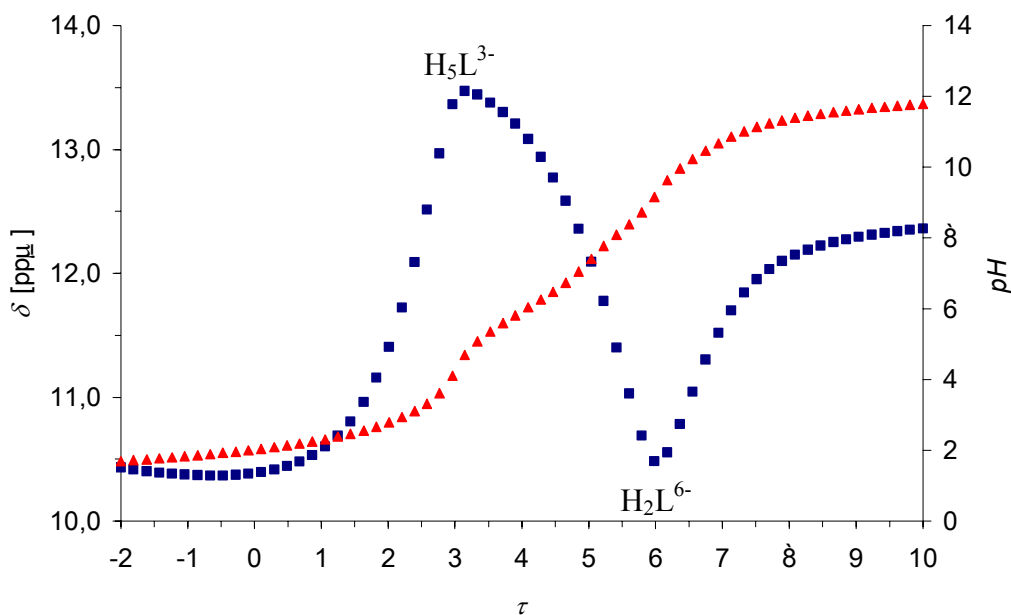


Abbildung 77: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_p (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von EDTMP 4 vs. 0,1 M TMAOH

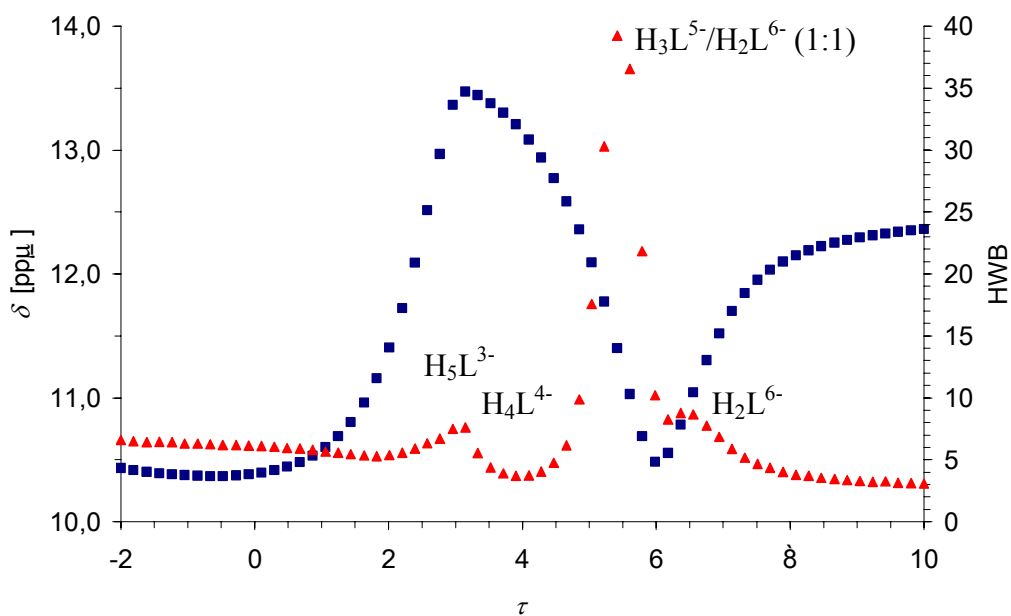


Abbildung 78: Auftragung der mittleren chemischen Verschiebung (■) und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von EDTMP 4 vs. 0,1 M TMAOH

Durch die Deprotonierung zu den Monoanionen im Intervall $-2 < \tau < 3$ erfährt das Resonanzsignal durch den elektronenziehenden Einfluss eine Tieffeldverschiebung. Die Bildung der Dianionen $3 < \tau < 6$ führt zu einer Hochfeldverschiebung des Resonanzsignals. Die anschließende charakteristische Tieffeldverschiebung hängt mit der Deprotonierung der ersten Aminogruppe zusammen.

Ein auffälliges Maximum in der Änderung der Halbwertsbreiten findet sich bei $\tau = 5,5$. An diesem Punkt liegen die zwei Spezies H_3L^{5-} und H_2L^{6-} im Verhältnis eins zu eins vor. Dies bedeutet, dass ein Proton im Mittelwert auf vier PO_3^{2-} -Gruppen kommt. Es ist nun denkbar, dass P-O-H-O-P-Brücken zur Linienverbreiterung beitragen. Ein ähnlicher Sachverhalt wird bei Ethantrisphosphonsäuren [111] beobachtet.

Anhand der ionenspezifischen Parameter (Tabelle 46) ist zu erkennen, dass die Standardabweichungen für die Spezies H_8L , H_7L^- und L^{8-} am größten sind und somit nur unter den üblichen Vorbehalten gelten. Aufgrund der bei dieser Titration gewählten analytischen Parameter treten diese Spezies zu geringen Prozentsätzen beziehungsweise gar nicht auf. Wie Abbildung 70 zeigt, liegen bei einem Titrationsgrad $\tau = -2$ die Spezies H_8L zu 13,0 Molprozent H_7L^- zu 24,2 Molprozent vor. Die Spezies L^{8-} liegt bei $\tau = 10$ nur zu 1,4 Molprozent vor.

Spezies	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]
H_8L	$16,291 \pm 0,441$	$7,234 \pm 0,479$
H_7L^-	$9,056 \pm 0,187$	$-1,926 \pm 0,204$
H_6L^{2-}	$10,982 \pm 0,082$	$-2,900 \pm 0,112$
H_5L^{3-}	$13,882 \pm 0,076$	$1,066 \pm 0,093$
H_4L^{4-}	$12,816 \pm 0,052$	$1,262 \pm 0,113$
H_3L^{5-}	$11,554 \pm 0,100$	$1,145 \pm 0,116$
H_2L^{6-}	$10,408 \pm 0,059$	$-1,918 \pm 0,069$
HL^{7-}	$12,326 \pm 0,035$	$-3,609 \pm 0,186$
L^{8-}	$15,935 \pm 0,183$	

Tabelle 46: Ionenspezifischen Parameter von EDTMP 4 vs. 0,1 M TMAOH

6.4.2 NMR-kontrollierte Titration von EDTMP 4 vs. 1 M TMAOH

Tabelle 47 gibt die gewählten Parameter für die NMR-Experimente wieder. Vor der Aufnahme des ersten Spektrums eines bestimmten Titrationszustandes wird eine Mischzeit von MT = 300 Sekunden und eine Wartezeit von WT = 420 Sekunden eingehalten.

Parameter	³¹ P-NMR	³¹ P{ ¹ H}-NMR	¹ H-NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46	202,46	500,13
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	16384	16384	32768
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrums (SI)	16384	16384	32768
Zahl der Scans (NS)	64	16	64
Spektrale Breite (SW) [Hz]	10162,602	10162,602	5296,610
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	5061,40	5061,40	2600,68

Tabelle 47: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 500 von EDTMP 4

In Tabelle 48 werden die analytischen Parameter der NMR-kontrollierten Titration von EDTMP 4 gegen 1,0 M TMAOH dargestellt.

Substanz: Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) <u>4</u>			
Molmasse [g/mol]:	436,12	Vorlagevolumen [ml]:	35,00
m (Substanz) [mg]:	531,0		
m (Wirkstoff) [mg]:	509,0	n (Wirkstoff) [mmol]:	1,1670
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0335
Zusatz HCl [mmol]:	2,3340	c (HCl) [mol/l]:	0,9530
I (Ionenpuffer: TMACl) [mol/l]:	1,0	m (TMACl) [g]:	2,74
c (Titrator: TMAOH) [mol/l]:	1,0220		

Tabelle 48: Exp. Parameter der NMR-kontrollierten Titration von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

6.4.2.1 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von EDTMP 4

Aufgrund der gewählten Titrationsbedingungen werden bei dieser Messung die Spezies H_5L^{3-} , H_4L^{4-} , H_3L^{5-} , H_2L^{6-} , HL^{7-} erwartet.

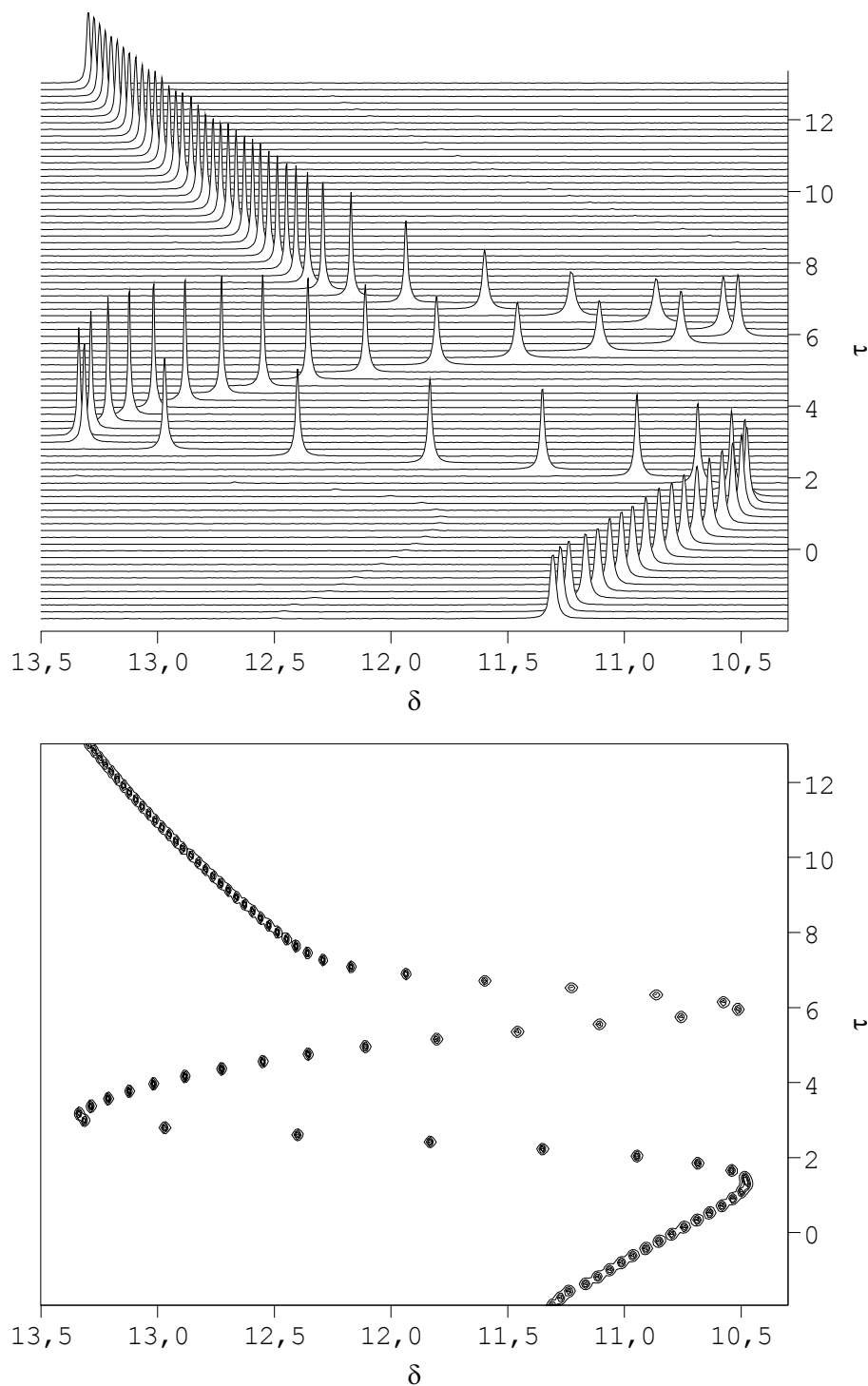


Abbildung 79: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH (δ_{P} vs. τ) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 48)

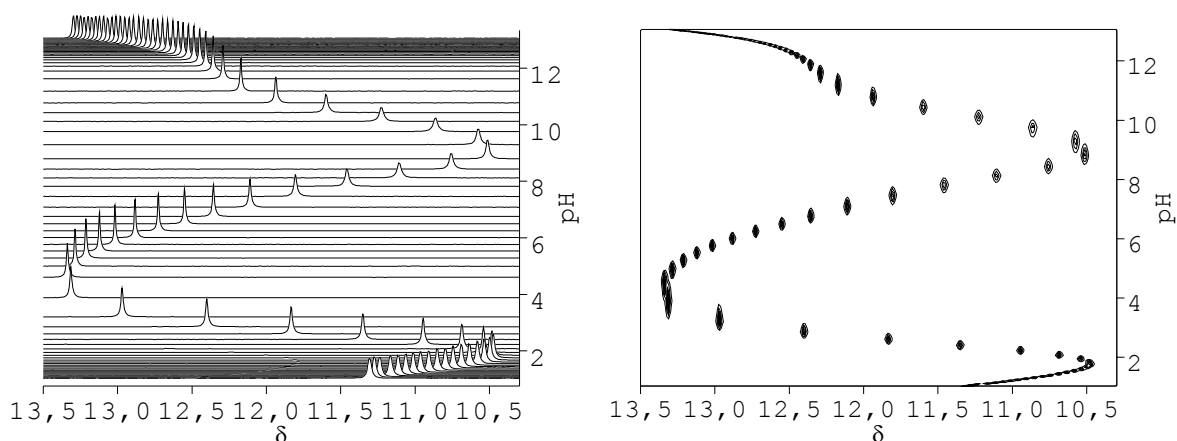


Abbildung 80: links: Stack-Plot - rechts: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von EDTMP 4 vs. 1 M TMAOH (δ_P vs. pH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 48)

Der Beginn der chemischen Verschiebung hängt mit dem bei dieser Messung vorliegenden Start-pH zusammen. Der Gang der chemischen Verschiebung wird bereits in Kapitel 6.4.1.1 gezeigt. Im Unterschied zu der NMR-kontrollierten Titration unter Verwendung der 0,1 M TMAOH-Lösung finden sich hier zwei Maxima (bei $\tau = 5,5$ und $\tau = 6,5$) in der Änderung der Halbwertsbreiten. An diesen Punkten liegen die Spezies H_3L^{5-} und H_2L^{6-} sowie es H_2L^{6-} und HL^{7-} jeweils im Verhältnis von eins zu eins vor. Dies bedeutet, dass ein Proton im Mittelwert auf vier PO_3^{2-} -Gruppen kommt. Es ist denkbar, dass sich P-O-H-O-P-Brücken ausbilden, die zur Linienverbreiterung beitragen.

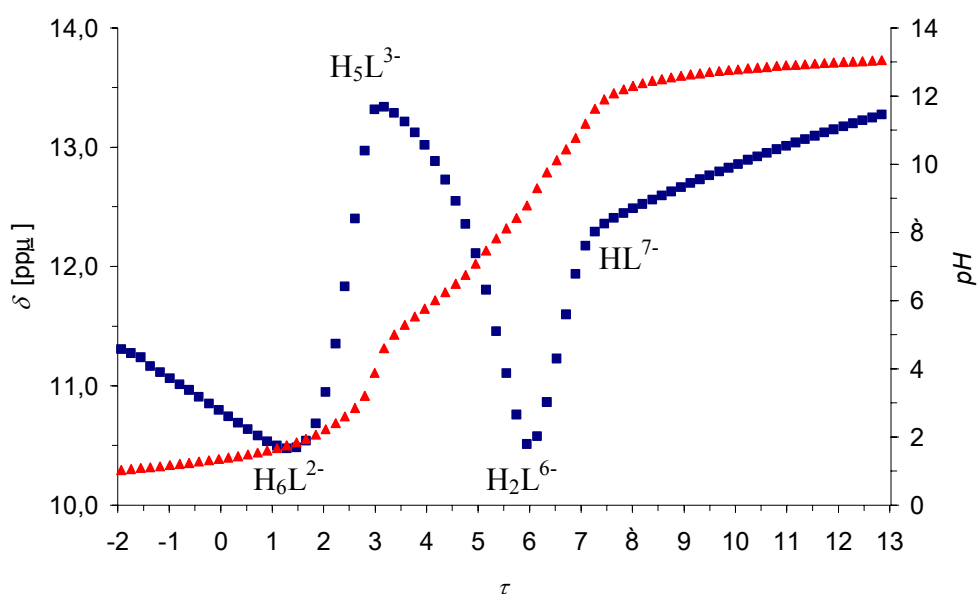


Abbildung 81: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

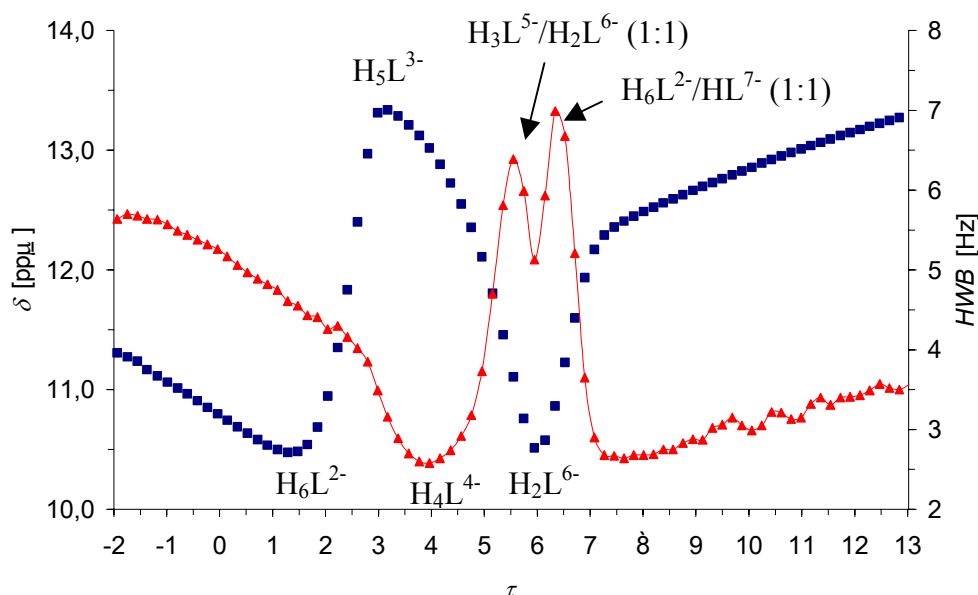


Abbildung 82: Auftragung der mittleren chemischen Verschiebung (■) und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

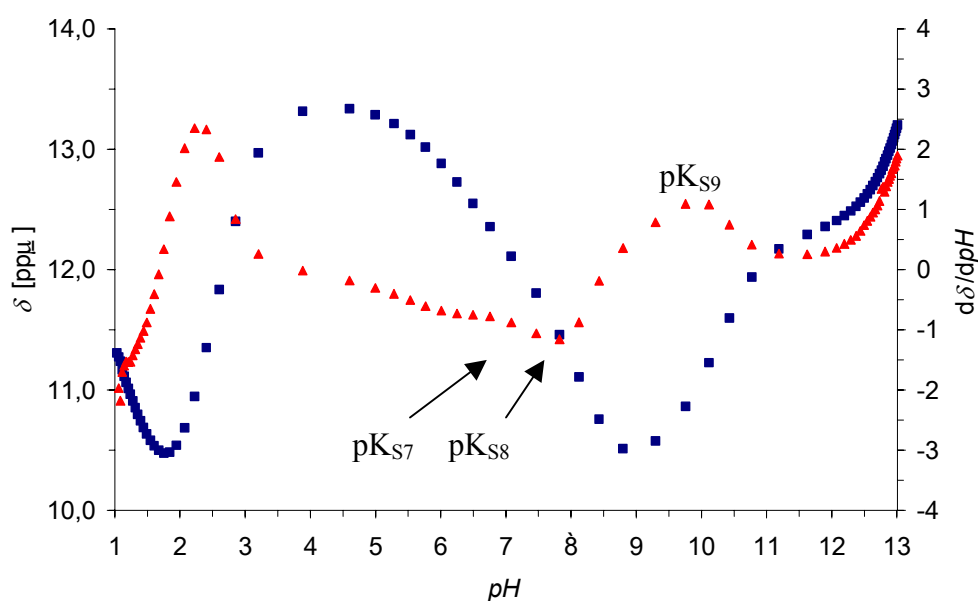


Abbildung 83: Auftragung der mittleren chemischen Verschiebung (■) und der 1. Ableitung $d\delta/dpH$ (▲) vs. pH-Wert der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

Anhand der ionenspezifischen Parameter (Tabelle 49) ist zu erkennen, dass die Standardabweichungen für die Spezies H_7L^- und L^{8-} bei Verwendung der 1,0 M TMAOH nicht mehr so hoch sind (vgl. Tabelle 46: Ionenspezifische Parameter ermittelt aus der NMR-kontrollierten Titration gegen 0,1 M TMAOH-Lösung). Ab $\tau = 7$ zeigt sich die beginnende

Deprotonierung der zweiten Aminogruppe auf die chemische Verschiebung auszuwirken. Diese Deprotonierung wird durch die Verwendung der 1,0 M TMAOH-Lösung erreicht.

Spezies	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]
H_8L	$13,175 \pm 0,436$	$3,629 \pm 0,470$
H_7L^-	$9,546 \pm 0,177$	$-0,615 \pm 0,180$
H_6L^{2-}	$10,161 \pm 0,029$	$-3,519 \pm 0,034$
H_5L^{3-}	$13,679 \pm 0,017$	$0,555 \pm 0,026$
H_4L^{4-}	$13,124 \pm 0,019$	$0,853 \pm 0,028$
H_3L^{5-}	$12,271 \pm 0,021$	$2,018 \pm 0,026$
H_2L^{6-}	$10,253 \pm 0,015$	$-1,950 \pm 0,022$
HL^{7-}	$12,203 \pm 0,016$	$-8,694 \pm 0,770$
L^{8-}	$20,897 \pm 0,770$	

Tabelle 49: Ionenspezifische Parameter von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

Bei der Messung unter Verwendung einer 1,0 M TMAOH-Lösung lässt sich die ionenspezifische Verschiebung für die Spezies H_8L zu einem Wert von 13,175 ppm ($\pm 0,436$ ppm) berechnen. Die Verwendung einer 0,1 M TMAOH-Lösung ergibt eine ionenspezifische Verschiebung von 16,921 ppm ($\pm 0,441$). DA bei beiden Messungen die Standardabweichung fast gleich ist, wird der tatsächliche Wert für die ionenspezifische Verschiebung zwischen diesen Werten liegen.

6.4.2.2 202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration von EDTMP 4

Abbildung 84 zeigt den Stack- und den Kontur-Plot der 202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration von EDTMP 4.

Neben den schon in Kapitel 6.4.2.1 vorgestellten Ergebnissen, können durch diese Messungen auch die Veränderungen der $^2J_{PH}$ -Kopplung verfolgt werden. Wie aus Abbildung 85 zu erkennen ist, nimmt die Kopplungskonstante im Bereich $-2 < \tau < 6$ kontinuierlich zu. Bei $\tau = 6$ findet sich ein Maximum der $^2J_{PH}$ -Kopplung. Anschließend ($6 < \tau < 13$) nimmt der Wert der Kopplungskonstante auf -11,1 Hz wieder ab.

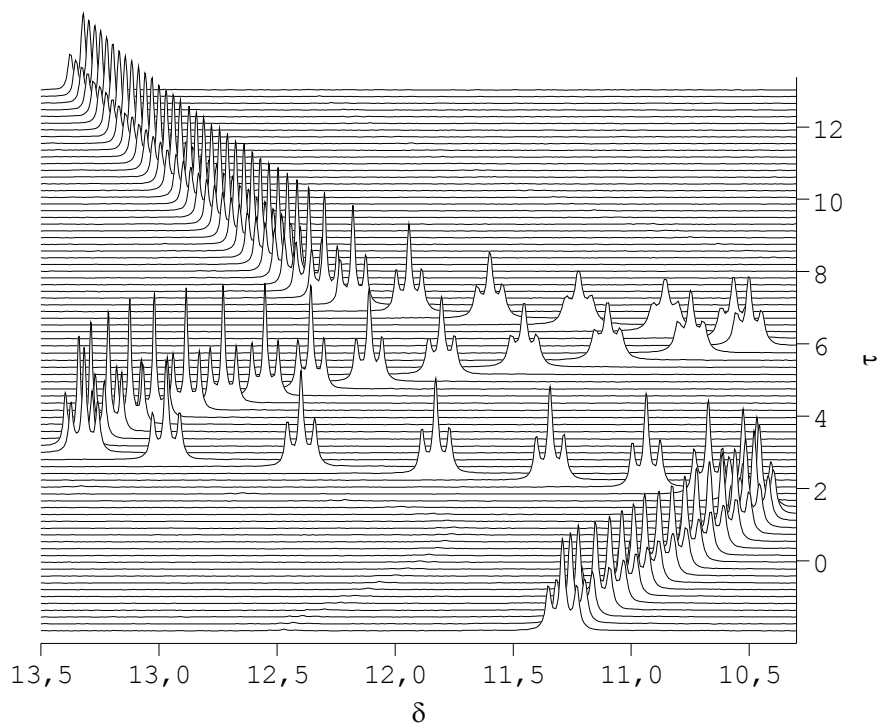


Abbildung 84: Stack-Plot der 202,46 MHz ^{31}P -NMR Messung von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH vs. 1,0 M TMAOH

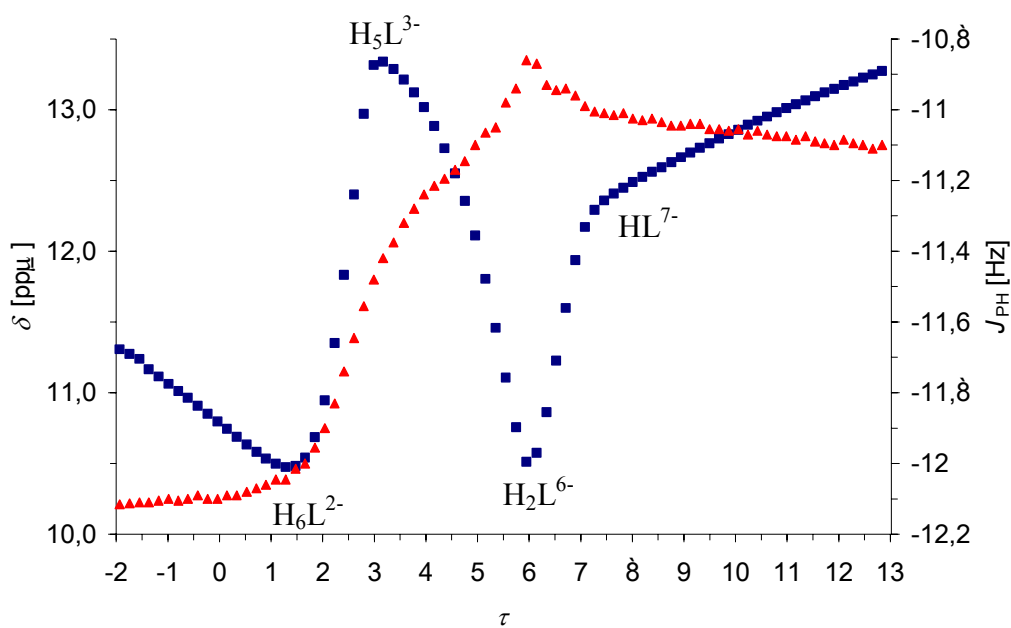


Abbildung 85: Auftragung der mittleren chemischen Verschiebung (■) und Kopplungskonstante J_{PH} (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

6.4.2.3 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von EDTMP

Für die Bestimmung der ionenspezifischen Parameter der 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierten Titration kann nur das Resonanzsignal der Ethylen-Gruppe verwendet werden, weil es durch die Hochfeldverschiebung des Resonanzsignals der Methylen-Gruppen zu einer Überlagerung mit dem Resonanzsignals des Ionenpuffers TMACl kommt.

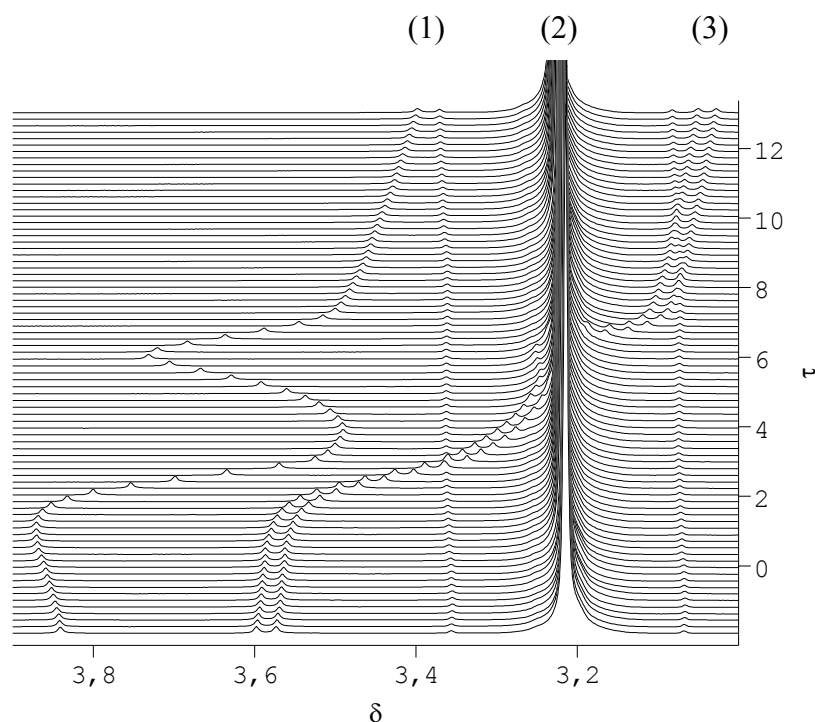


Abbildung 86: Stack-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR Messung von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH; (1) = Ethylen-Gruppe vom EDTMP 4, (2) = Methylen-Gruppen vom TMACl, (3) = Methylen-Gruppen vom EDTMP 4

Anhand von Abbildung 86 ist zu erkennen, dass das Resonanzsignal für die Methylen-Gruppen von 3,5860 ppm ($\tau = -2$) zu 3,0391 ppm ($\tau = 13$) verschoben wird.

	$\tau = -1$	$\tau = 0$	$\tau = 1$	$\tau = 2$
δ_{H} [ppm]	3,2145	3,0963	2,8468	2,4894
Δ_{H} [ppm]	0,1182	0,2495	0,3574	-
$^2J_{\text{PH}}$	-13,21	-12,76	-11,59	-10,32

Tabelle 50: Chem. Verschiebungen und $^2J_{\text{PH}}$ -Kopplungen im 500,13 MHz- ^1H -NMR der Methylen-Gruppe von AMPA (Einzelprobenmessungen)

Ein Vergleich mit der Aminomethanphosphonsäure (AMPA) zeigt, dass das Resonanzsignal für die Methylen-Gruppe ebenfalls zu höherem Feld verschoben wird.

Abbildung 87 zeigt den Stack- und den Kontur-Plot für die Ethylen-Gruppe der EDTMP 4.

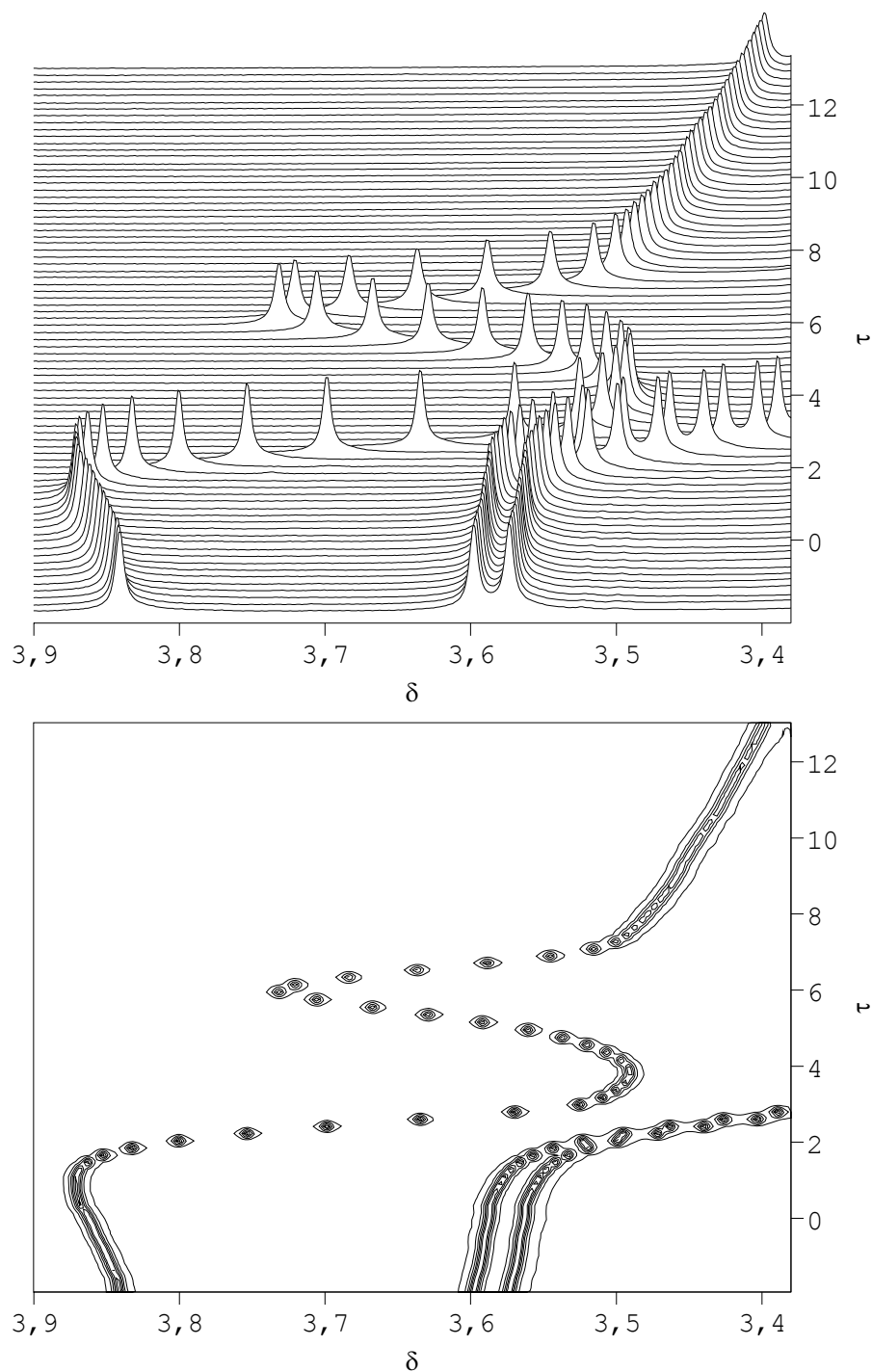


Abbildung 87: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR Messung von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

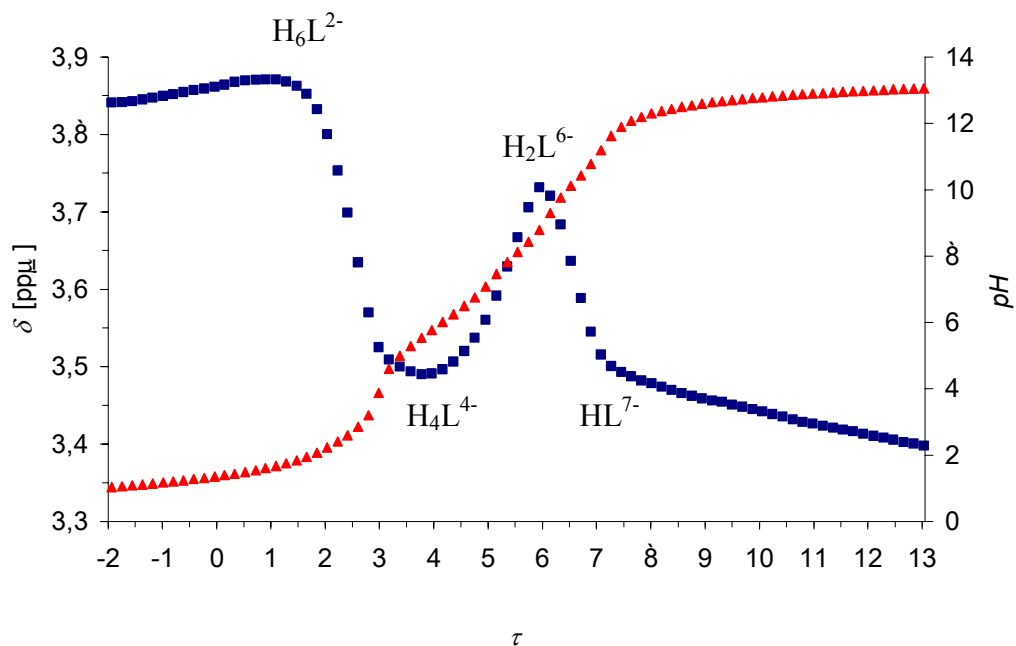


Abbildung 88: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_H (■) der Ethylen-Gruppe und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 500,13 MHz ^1H -NMR-Messung von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

Tabelle 51 gibt die ermittelten ionenspezifischen Parameter für die Ethylen-Gruppe der Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) wieder. Hier sind wie bei der $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung die Fehler für Spezies H_8L , H_7L^- und L^{8-} am Größten.

Spezies	δ_H [ppm]	Δ_H [ppm]
H_8L	$3,413 \pm 0,048$	$-0,640 \pm 0,053$
H_7L^-	$4,053 \pm 0,021$	$0,267 \pm 0,022$
H_6L^{2-}	$3,786 \pm 0,009$	$0,311 \pm 0,012$
H_5L^{3-}	$3,475 \pm 0,008$	$-0,023 \pm 0,010$
H_4L^{4-}	$3,498 \pm 0,006$	$-0,118 \pm 0,012$
H_3L^{5-}	$3,611 \pm 0,011$	$-0,133 \pm 0,013$
H_2L^{6-}	$3,744 \pm 0,007$	$0,252 \pm 0,008$
HL^{7-}	$3,492 \pm 0,004$	$0,348 \pm 0,020$
L^{8-}	$3,144 \pm 0,020$	

Tabelle 51: Ionenspezifische Parameter δ_H der Ethylen-Gruppen von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

Für bestimmte Titrationsgrade werden für die Methylen-Gruppe in Tabelle 52 die chemischen Verschiebungen und die Werte für die $^2\text{J}_{\text{PH}}$ -Kopplung angegeben.

	$\tau = -2$	$\tau = -1$	$\tau = 0$	$\tau = 1$	$\tau = 2$	$\tau = 3$	$\tau = 4$	$\tau = 7$	$\tau = 8$
δ_{H} [ppm]	3,586	3,580	3,575	3,564	3,511	3,349	3,276	3,108	3,086
Δ_{H} [ppm]	0,006	0,005	0,009	0,053	0,021	0,073	0,168	0,022	-
$^2J_{\text{PH}}$	-12,29	-12,12	-12,12	-12,13	-11,97	-11,80	-11,31	-11,40	-11,34

Tabelle 52: Chem. Verschiebungen und $^2J_{\text{PH}}$ -Kopplungen im 500,13 MHz- ^1H -NMR der Methylen-Gruppe von EDTMP 4

6.4.2.4 Vergleich der NMR-kontrollierten Titrationsen von EDTMP 4

Durch die Auftragung der reduzierten chemischen Verschiebungen δ_{Hred} und δ_{Pred} gegen den Titrationsgrad ist zu erkennen, dass im Verlauf der Titration die beiden Resonanzsignale entgegengesetzte Gradienten erfahren.

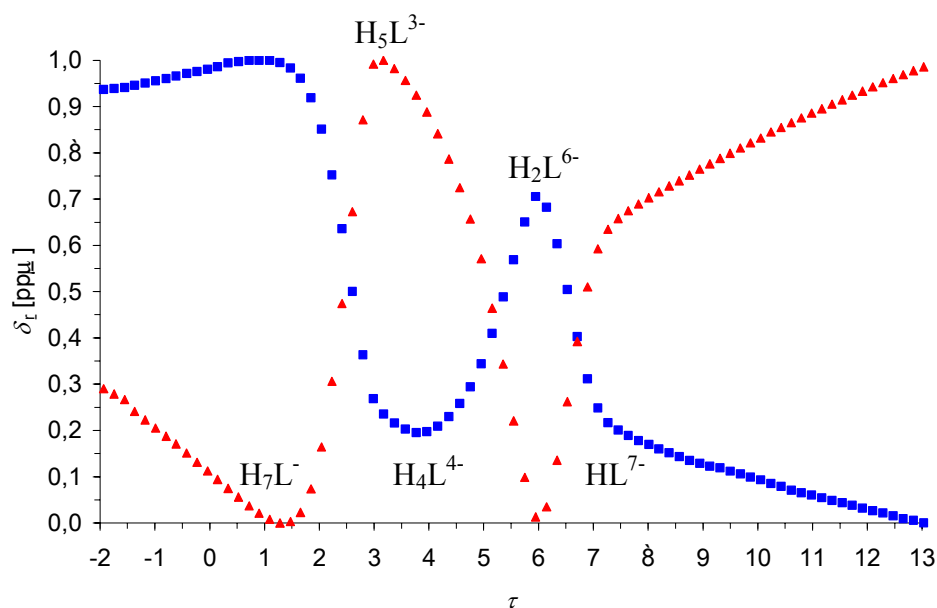


Abbildung 89: Auftragung der reduzierten chemischen Verschiebungen δ_{Hred} der Ethylen-Gruppe (■) der 500,13 MHz ^1H - und δ_{Pred} (▲) der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Messung vs. Titrationsgrad τ von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

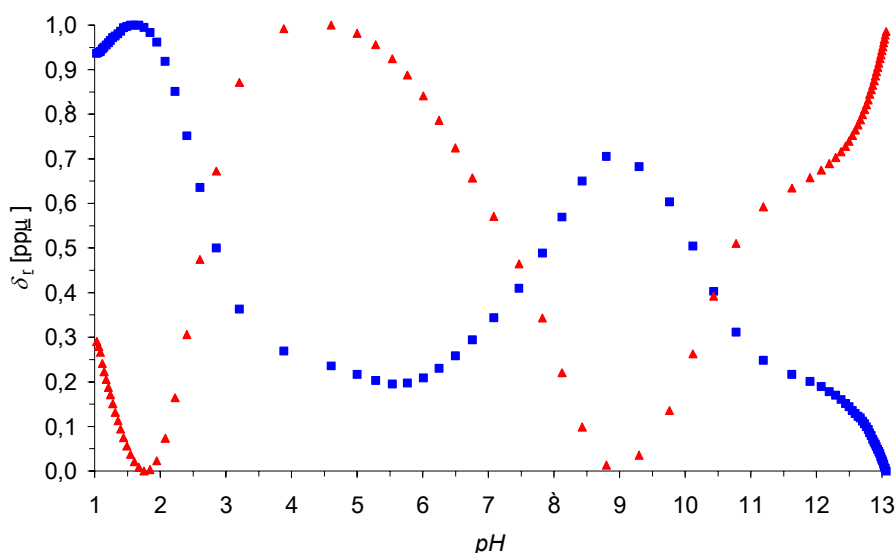


Abbildung 90: Auftragung der reduzierten chemischen Verschiebungen $\delta_{H_{red}}$ der Ethylen-Gruppe (■) der 500,13 MHz ^1H - und $\delta_{P_{red}}$ (▲) der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Messung vs. pH von EDTMP 4 vs. 1,0 M TMAOH

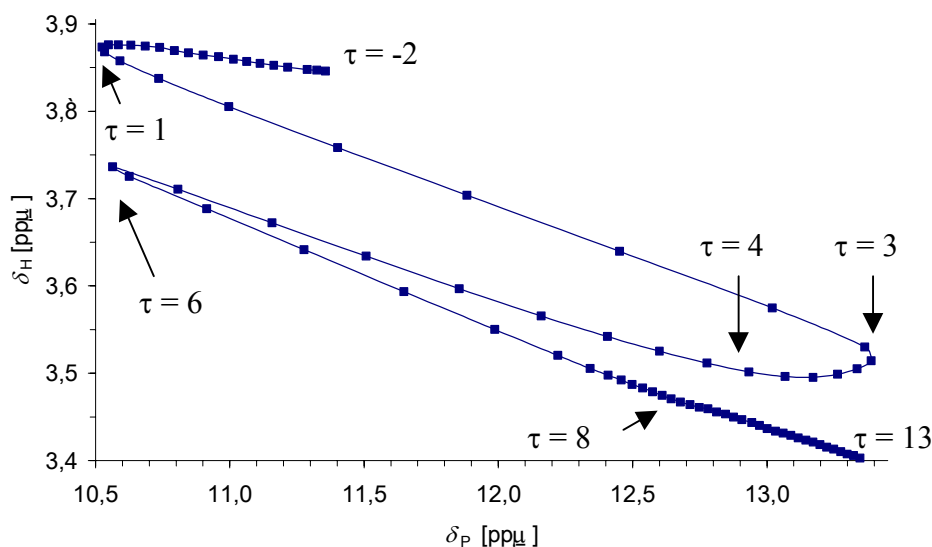


Abbildung 91: Auftragung von $\Delta\delta_H$ der Ethylen-Gruppe (500,13 MHz ^1H -NMR-Messung) vs. $\Delta\delta_P$ von EDTMP 4 (202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung) (Titration vs. 1,0 M TMAOH)

Abbildung 91 ist zu entnehmen, dass es vier Sektionen gibt, in den die Gradienten der chemischen Verschiebungen eine Linearität aufweisen ($-2 < \tau < 1$, $1 < \tau < 3$, $4 < \tau < 6$ und $6 < \tau < 13$). Somit kann gezeigt werden, dass beide Resonanzsignale bis auf den Bereich $3 < \tau < 4$ zwar mit unterschiedlichen Gradienten aber gleich empfindlich auf die Deprotonierung der Phosphonsäure-Gruppen reagieren.

6.5 1:1 Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex

EDTMP ist ein potenter Komplexbildner für viele Metallionen. Eine Übersicht über die Komplexbildung mit einer Vielzahl von Metallionen bietet der Review von Kabachnik [112]. Die Komplexbildung von Cadmium mit EDTMP zum 1:1 Cadmium-Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure)-Komplex wurde schon mehrfach untersucht [96] [106] [108] [113] [114] [115].

Im Rahmen dieser Arbeit wird zur Bestimmung der Stabilitätskonstanten mit TMAOH als Base und TMACl als Ionenpuffer gearbeitet. Hierdurch kann die Bildung von zusätzlichen Metallkomplexen durch die Alkalilaugen ausgeschlossen werden. Zur Bestimmung der Stabilitätskonstanten vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex werden jeweils drei Titrations durchgeführt.

In Tabelle 53 sind die Stabilitätskonstanten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Titrations und der in der Literatur beschriebenen Messungen aufgeführt.

	0,1 M TMAOH	1,0 M TMAOH	Kabachnik [106]	Rizkalla [113]	Bezhadi [115]
$\log\beta_{011}$	$17,05 \pm 0,20$	$16,78 \pm 0,085$	13,88	16,53	12,82
$\log\beta_{111}$	$26,10 \pm 0,18$	$25,63 \pm 0,11$	23,28	26,54	22,41
$\log\beta_{211}$	$33,47 \pm 0,16$	$32,96 \pm 0,09$	32,09	34,58	30,16
$\log\beta_{311}$	$39,32 \pm 0,14$	$38,77 \pm 0,13$	39,03	40,57	36,44
$\log\beta_{411}$	$44,10 \pm 0,12$	$43,51 \pm 0,14$	44,48	45,14	41,43
$\log\beta_{511}$	$46,79 \pm 0,24$	$46,33 \pm 0,30$	47,25	k. A.	k. A.
RMS	0,319	0,696	-	-	-
c [mol/l]	0,0015	0,012	0,002	k. A.	0,002
Titration	TMAOH	TMAOH	KOH	KNO ₃	NaOH
I	0,1 TMACl	1,0 M TMACl	0,1 KCl	k. A.	0,1 NaCl
T [°C]	25	25	25	25	25

Tabelle 53: Stabilitätskonstanten des 1:1 Cd-EDTMP-Komplexes

Die Titrationsen im Rahmen dieser Arbeit wurden wie folgt durchgeführt:

Titration gegen 0,1 M TMAOH: Jeweils 0,15 mmol Wirkstoff und 0,15 mmol Cadmiumchlorid mit einer Zugabe von 0,30 mmol HCl ($c = 0,1001 \text{ mol/l}$) und 5,00 ml 0,5000 M TMACl ($I = 0,1$) werden mit bi.-dest. Wasser auf ein Volumen von 25,00 ml aufgefüllt. Die Titrationsen erfolgen unter Stickstoffatmosphäre gegen 0,1003 M bei $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Titration gegen 1,0 M TMAOH: Jeweils 1,20 mmol Ligand und 1,20 mmol Cadmiumchlorid mit einer Zugabe von 2,40 mmol HCl ($c = 0,9533 \text{ mol/l}$) und 2,74 g TMACl ($I = 1,0$) werden mit bi.-dest. Wasser auf ein Volumen von 50,0 ml aufgefüllt. Unter Stickstoffatmosphäre erfolgen die Titrationsen gegen 1,0057 M TMAOH bei $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Abbildung 94 und Abbildung 96 zeigen die Molenbrüche der Komplextitrationsen von Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure) unter Zusatz von Cadmiumchlorid gegen 0,1 M TMAOH.

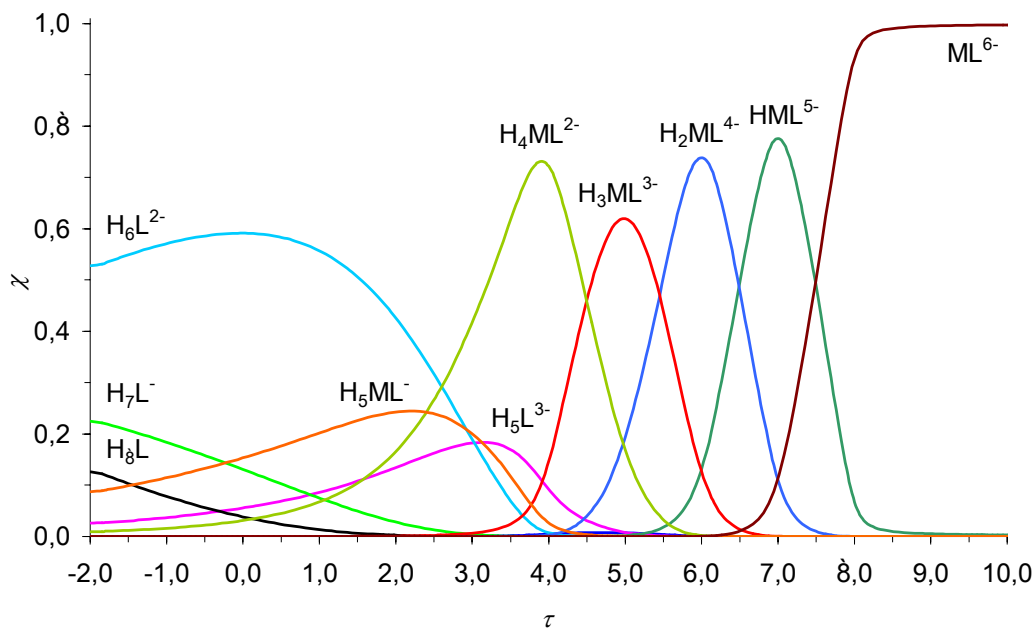


Abbildung 92: Molenbruchverteilungsdiagramm $\chi_{H_h M_m L_l}^{(L)}$ der Ligandspezies vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. Titrationsgrad τ (vs. 0,1 M TMAOH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 54)

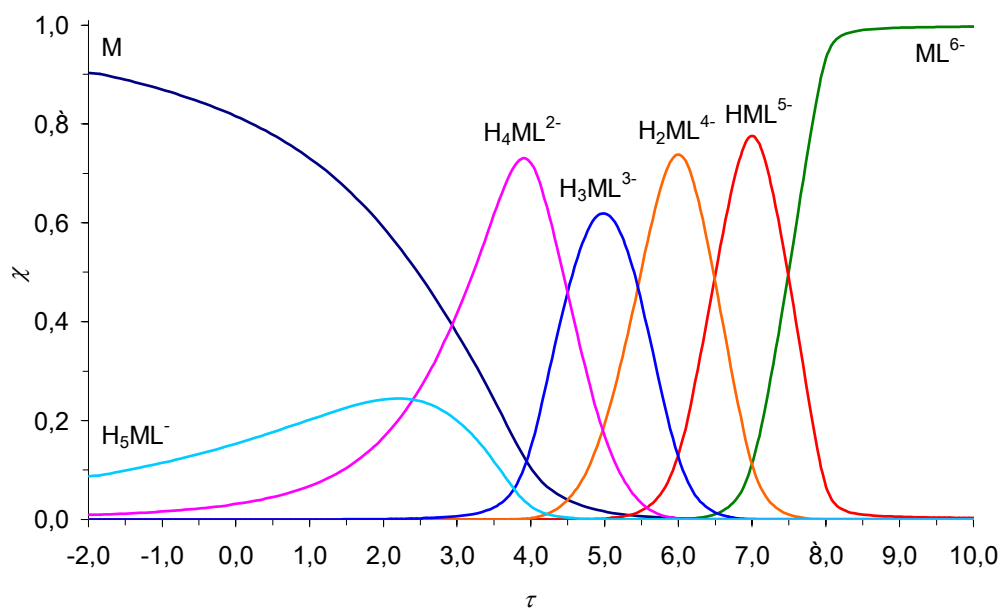


Abbildung 93: Molenbruchverteilungsdiagramm der Metallspezies $\chi_{H_h M_m L_l}^{(M)}$ vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. Titrationsgrad τ (vs. 0,1 M TMAOH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 54)

Abbildung 94, Abbildung 95, Abbildung 96 und Abbildung 97 zeigen die Molenbrüche der Komplextitrationen von Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure) unter Zusatz von Cadmiumchlorid gegen 1,0 M TMAOH.

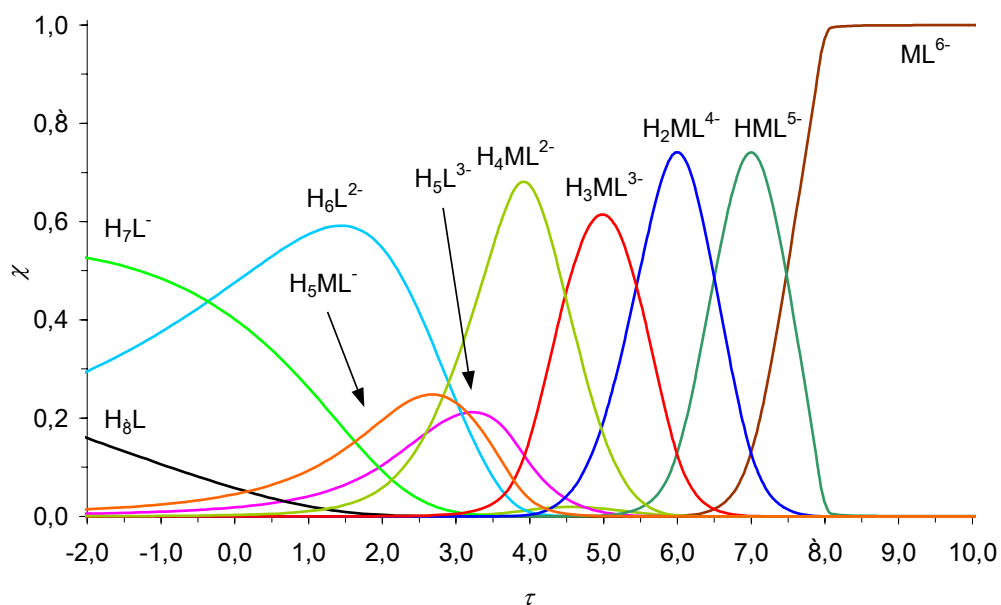


Abbildung 94: Molenbruchverteilungsdiagramm der Ligandspezies $\chi_{H_h M_m L_l}^{(L)}$ vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. Titrationsgrad τ (vs. 1,0 M TMAOH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 58)

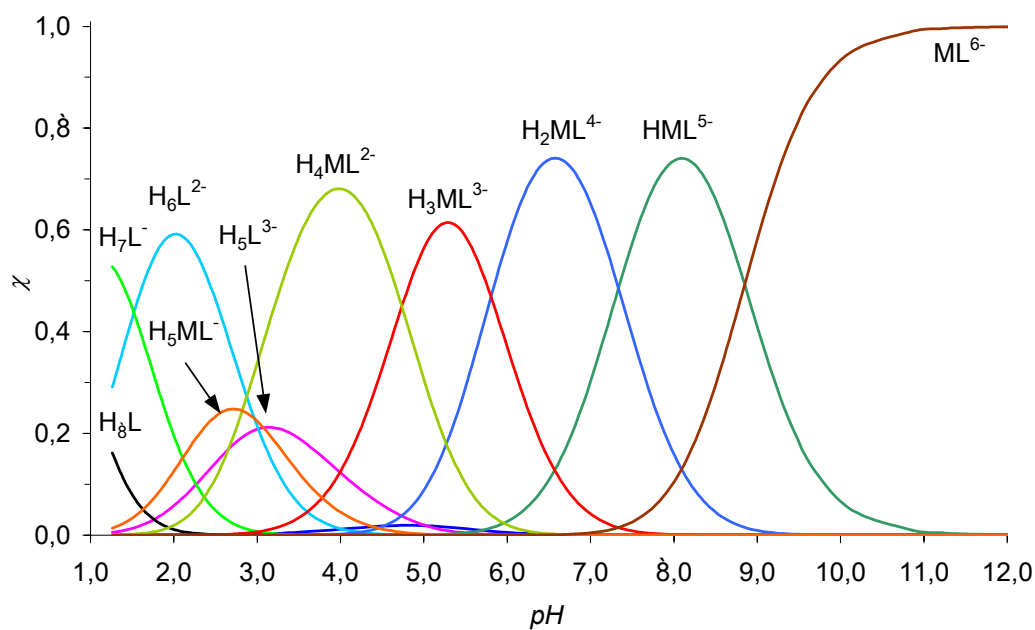


Abbildung 95: Molenbruchverteilungsdiagramm der Ligandspezies $\chi_{H_h M_m L_l}^{(L)}$ vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. pH (vs. 1,0 M TMAOH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 58)

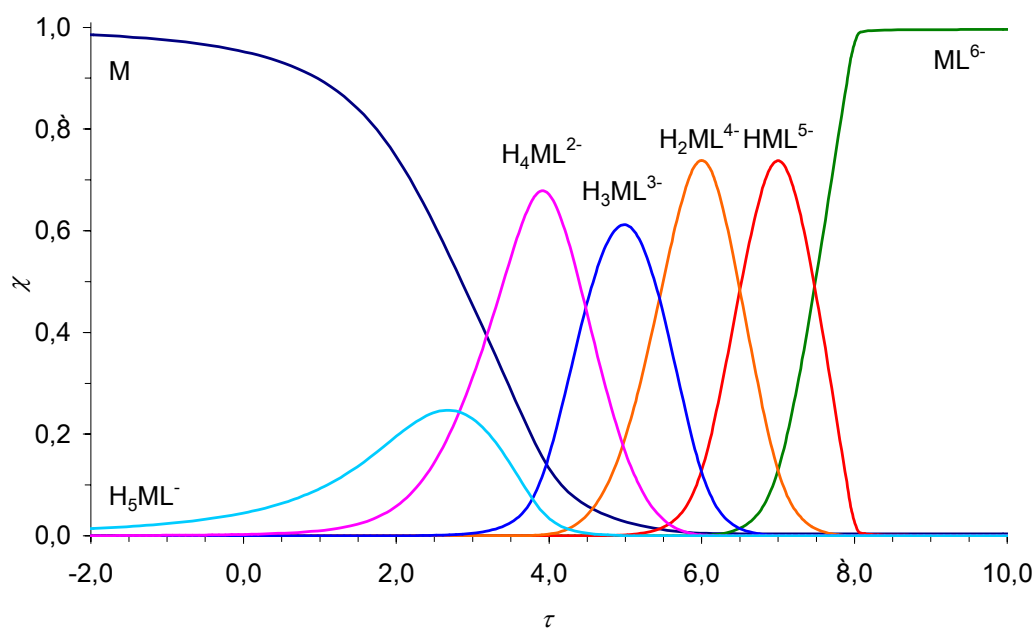


Abbildung 96: Molenbruchverteilungsdiagramm der Metallspezies $\chi_{H_h M_m L_l}^{(M)}$ vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. Titrationsgrad τ (vs. 1,0 M TMAOH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 58)

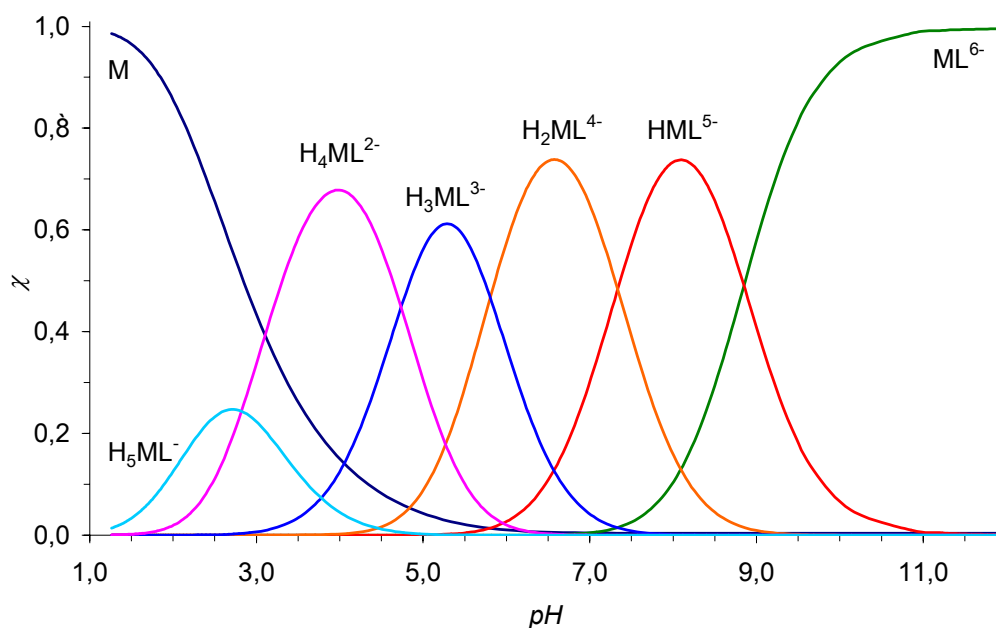


Abbildung 97: Molenbruchverteilungsdiagramm der Metallspezies $\chi_{H_h M_m L_l}^{(M)}$ vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. pH (vs. 1,0 M TMAOH) (Exp. Parameter: siehe Tabelle 58)

Zu Beginn der Titration gegen 1,0 M TMAOH liegt bei dem Titrationsgrad $\tau = -2$ unkomplexiertes Cadmium zu 98,2 Molprozent vor. An diesem Punkt ist die Spezies H_5CdL^- bereits zu 1,8 Molprozent gebildet. Das Maximum dieser Spezies liegt bei $\tau = 2,7$ mit 24,7 Molprozent. Die Spezies erreichen ihren Maximum bei: H_4CdL^{2-} bei $\tau = 3,9$ mit 67,8 Molprozent, H_3CdL^{3-} bei $\tau = 5,0$ mit 61,1 Molprozent, H_2CdL^{4-} bei $\tau = 6,0$ mit 73,8 Molprozent, $HCdL^{5-}$ bei $\tau = 7,0$ mit 73,7 Molprozent und CdL^{6-} bei $\tau = 8,0$ mit 99,4 Molprozent.

6.5.1 1:1 Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex gegen 0,1 M TMAOH

In Tabelle 54 werden die experimentellen Parameter der Titration aufgeführt.

Tabelle 55 gibt die gewählten Parameter für die NMR-Experimente wieder. Vor der Aufnahme des ersten Spektrums eines bestimmten Titrationszustandes wird eine Mischzeit von 300 Sekunden und eine Wartezeit von 420 Sekunden eingehalten.

Substanz: Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) 4

Molmasse [g/mol]:	436,12	Vorlagevolumen [ml]:	25,00
m (Substanz) [mg]:	65,4		
m (Wirkstoff) [mg]:	62,7	n (Wirkstoff) [mmol]:	0,1437
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0058
Substanz: Cadmiumchlorid (wasserfrei, Reinheit > 99,9 %)			
Molmasse [g/mol]:	183,21		
m (Metallsalz) [mg]:	62,7	n (Metallsalz) [mmol]:	0,1437
Zusatz HCl [mmol]:	0,2874	c (HCl) [mol/l]:	0,1000
I (Ionenpuffer: TMACl) [mol/l]:	0,1	c (TMACl) [mol/l]:	0,5000
		V _Z (TMACl) [ml]:	5,00
c (Titrator: TMAOH) [mol/l]:	0,1003		

Tabelle 54: Experimentelle Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 500 vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 0,1 M TMAOH

Parameter	³¹ P{ ¹ H}-NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	16384
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	16384
Zahl der Scans (NS)	192
Spektrale Breite (SW) [Hz]	10162,602
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	5061,40

Tabelle 55: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 200 vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

6.5.1.1 202,46 MHz ³¹P{¹H}-NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

In Abbildung 98 wird der Stack- und der Kontur-Plot der 202,46 MHz ³¹P{¹H}-NMR-kontrollierten Titration der 1:1 Cd-EDTMP-Komplexbildung dargestellt. Für diese Abbildung wurden die Spektren mit einem LB von 5,0 Hz prozessiert, damit wird das Signal-Rausch-Verhältnis die visuelle Darstellung verbessert werden kann. Für die Bestimmung der Halbwertsbreiten und chemischen Verschiebungen wurden die Spektren mit einem LB von 1 Hz prozessiert. Dies bedingt zwar eine manuelle Kontrolle der Halbwertsbreiten,

doch kann somit die Vergleichbarkeit mit den übrigen Messungen (z. B. EDTMP 4) gewährleistet werden. Die Signalaufspaltung ab $\tau = 7$ ist nicht auf eine Kopplung durch das Cadmium, sondern auf eine zu geringe Entkopplerpulsleistung zurückzuführen. Da die Entkopplerleistung für die Spektren im sauren Bereich ermittelt worden ist, kann es gelegentlich vorkommen, dass diese Leistung im alkalischen Bereich zu gering ist.

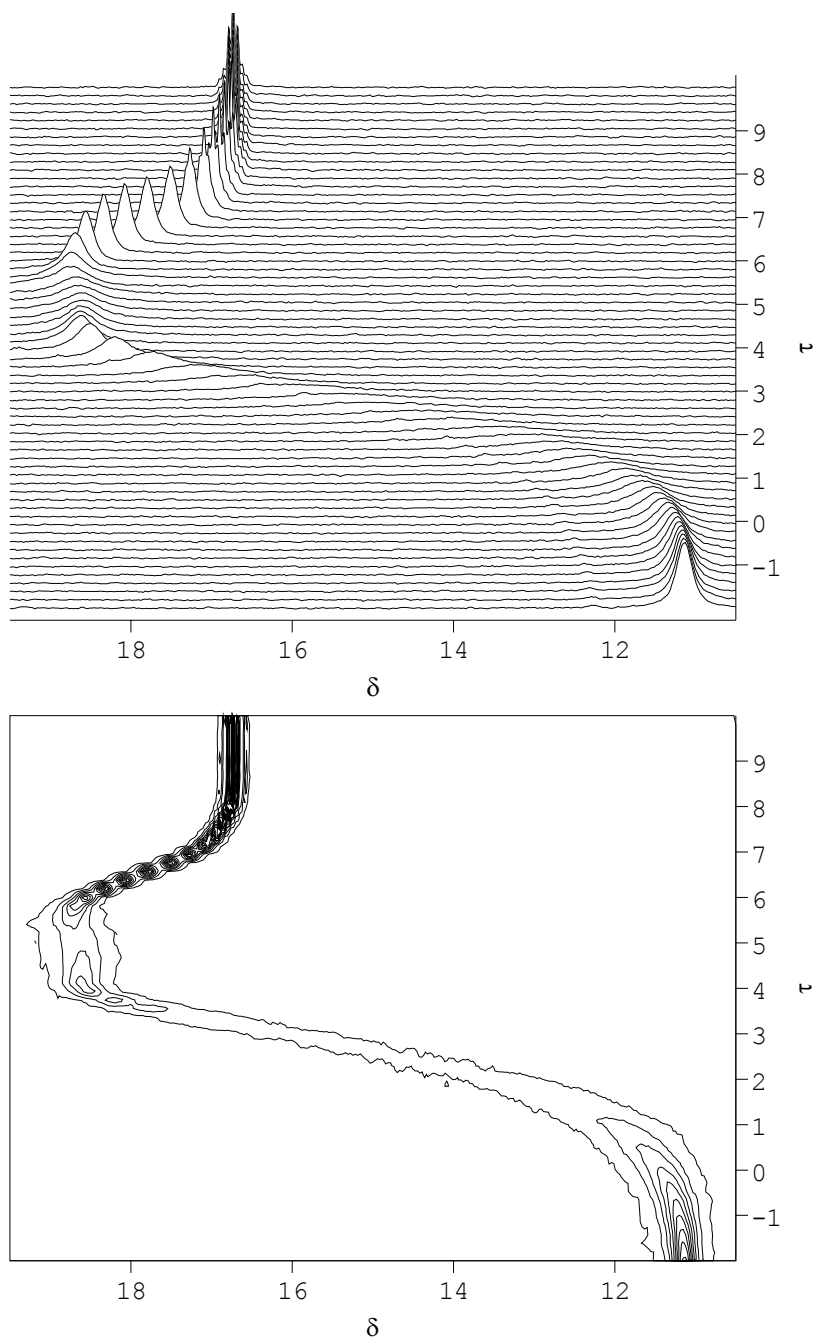


Abbildung 98: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$ -NMR Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 0,1 M TMAOH LB = 5 Hz) (δ_{P} vs. τ)

In Abbildung 99 ist unter Berücksichtigung der Molenbruchverteilungsdiagramme für die Ligandspezies (Abbildung 94) und die Metallspezies (Abbildung 96) zu erkennen, dass die Bildung der H_4ML^{2-} -Spezies mit einer Tieffeldverschiebung des ^{31}P -Resonanzsignals verbunden ist. Zwischen den Titrationsgraden $4 < \tau < 6$ verändert sich die chemische Verschiebung nur geringfügig. Mit beginnender Deprotonierung der ersten Aminofunktion wird das Resonanzsignal wieder Hochfeld verschoben.

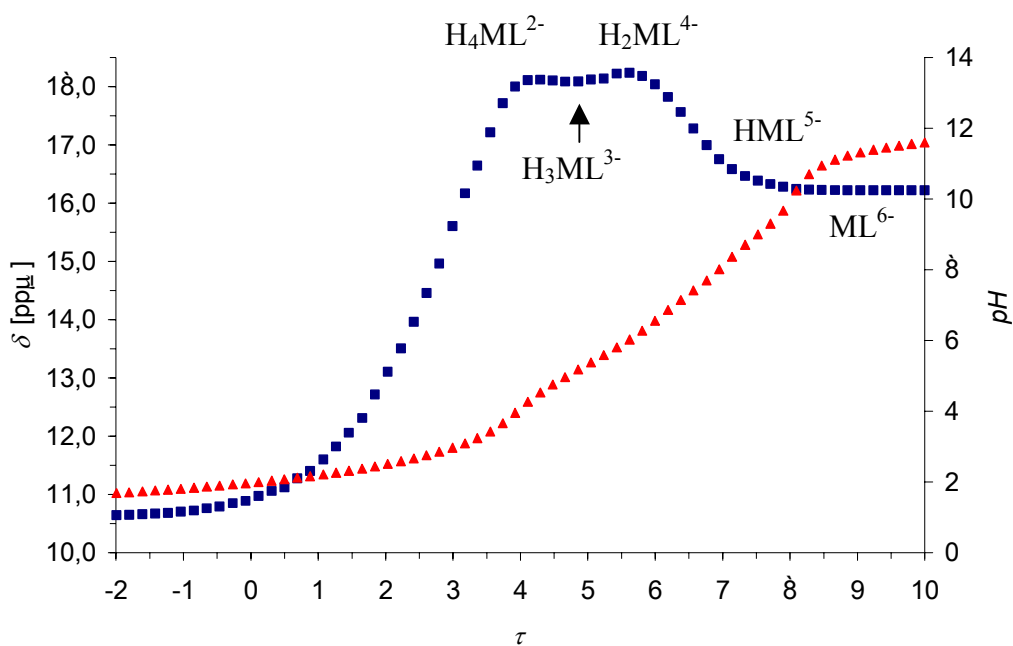


Abbildung 99: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR-Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 0,1 M TMAOH

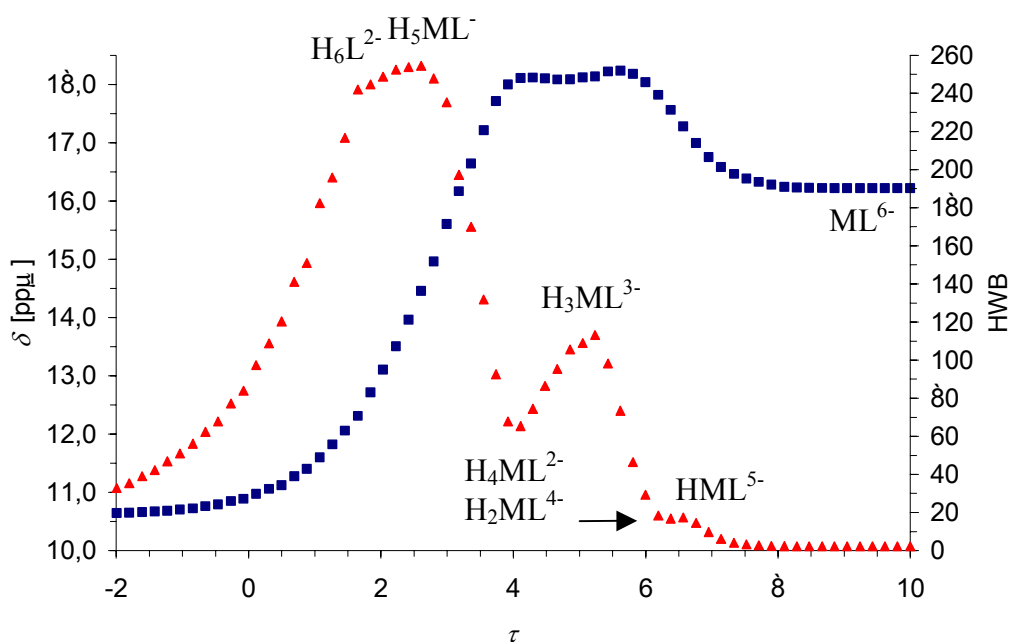


Abbildung 100: Auftragung der mittleren chemischen Verschiebung (■) und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 0,1 M TMAOH

Die größten Werte für die Halbwertsbreiten treten in einem Bereich auf, in dem die Komplexierung von EDTMP mit Cadmium nur zu einem geringen Prozentsatz vorliegt.

Da bei Erstellung dieser Arbeit im Programm *canpod* [21] das Modul zur Berechnung des Fehlers noch nicht fertiggestellt war, können hier keine Standardabweichungen für die ionenspezifischen Verschiebungen angegeben werden.

Spezies	δ_p [ppm]	Δ_p [ppm]
H_5ML^-	12,823	-6,607
H_4ML^{2-}	19,430	1,848
H_3ML^{3-}	17,582	-0,909
H_2ML^{4-}	18,491	2,105
HML^{5-}	16,386	0,158
ML^{6-}	16,228	

Tabelle 56: Ionenspezifischen Parameter δ_p vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex (Titration vs. 0,1 M TMAOH)

6.5.2 1:1 Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex gegen 1,0 M TMAOH

Tabelle 57 gibt die gewählten Parameter für die NMR-Experimente wieder. Vor der Aufnahme des ersten Spektrums eines bestimmten Titrationszustandes wird eine Mischzeit von 480 Sekunden und eine Wartezeit von 600 Sekunden eingehalten.

Parameter	^{31}P -NMR	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR	^1H -NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46	202,46	500,13
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	16384	16384	32768
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	16384	16384	32768
Zahl der Scans (NS)	64	16	64
Spektrale Breite (SW) [Hz]	10162,602	10162,602	5296,610
Einstrahlungsfrequenz (O1) [Hz]	5061,40	5061,40	2600,68

Tabelle 57: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 500 vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 1,0 M TMAOH

In Tabelle 58 werden die experimentellen Parameter der Titration aufgelistet:

Substanz: Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) <u>4</u>			
Molmasse [g/mol]:	436,12	Vorlagevolumen [ml]:	35,00
m (Substanz) [mg]:	270,7		
m (Wirkstoff) [mg]:	259,5	n (Wirkstoff) [mmol]:	0,5950
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0170
Substanz: Cadmiumchlorid (wasserfrei, Reinheit > 99,9 %)			
Molmasse [g/mol]:	183,21		
m (Metallsalz) [mg]:	109,1	n (Metallsalz) [mmol]:	0,595
Zusatz HCl [mmol]:	1,1900	c (HCl) [mol/l]:	0,9530
I (Ionenpuffer: TMACl) [mol/l]:	1,0	m (TMACl) [g]:	2,74
c (Titrator: TMAOH) [mol/l]:	1,0220		

Tabelle 58: Experimentelle Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 500 vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 1,0 M TMAOH

6.5.2.1 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

In Abbildung 101 werden von der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex der Stack- und der Kontur-Plot dargestellt.

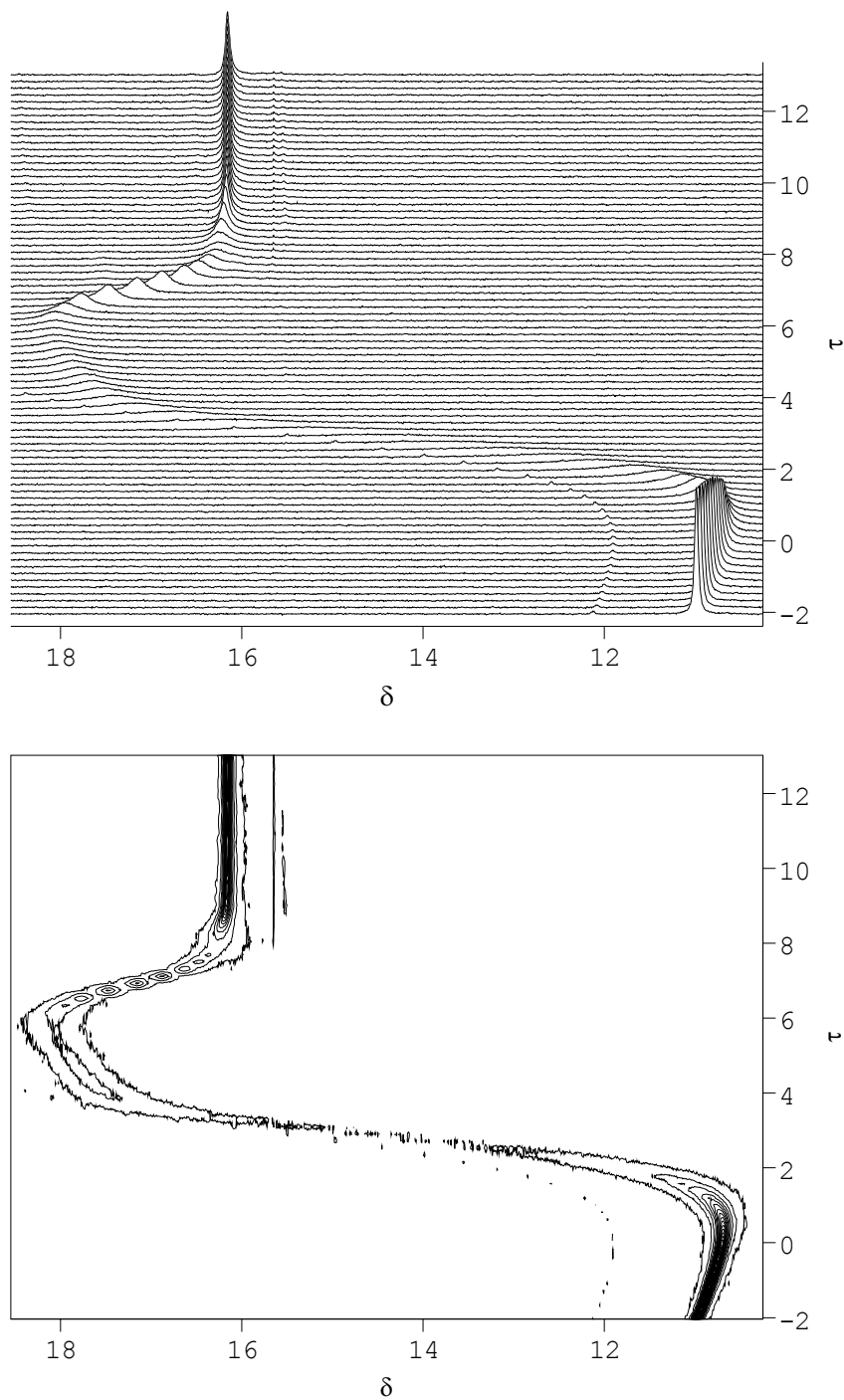


Abbildung 101: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 1,0 M TMAOH (δ_P vs. τ)

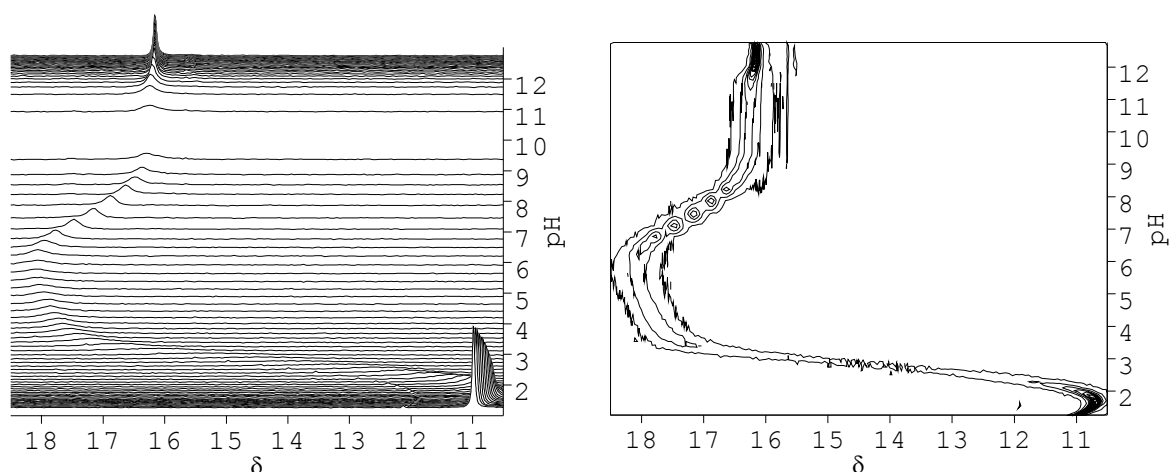


Abbildung 102: links: Stack-Plot - rechts: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 1,0 M TMAOH (δ_p vs. pH)

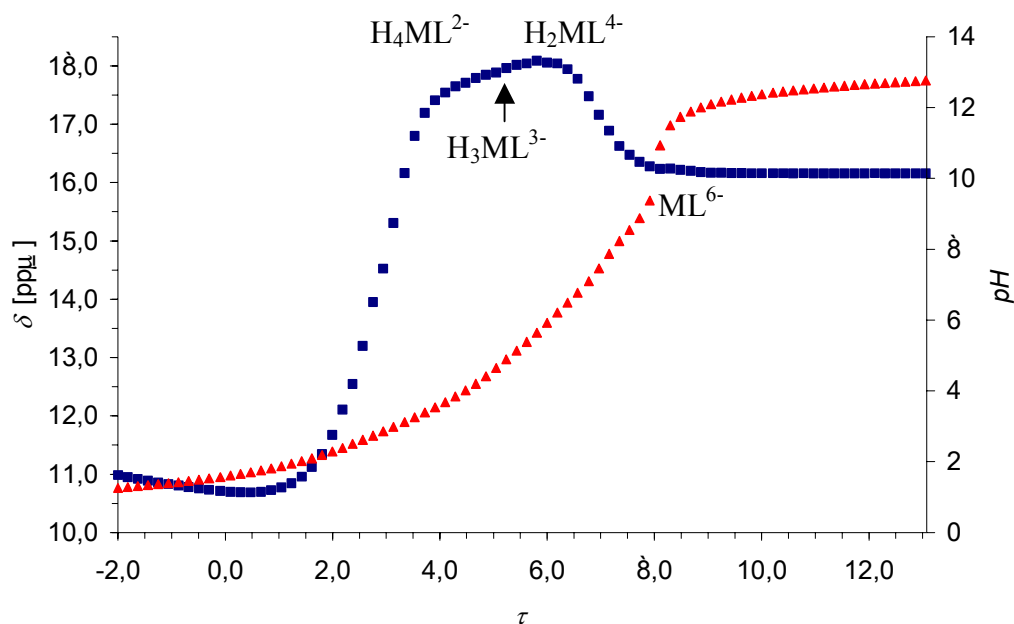


Abbildung 103: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_p (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 1,0 M TMAOH

In Abbildung 103 ist unter Berücksichtigung der Molenbruchverteilungsdiagramme für die Ligandspezies (Abbildung 94, siehe Seite 132) und die Metallspezies (Abbildung 96, siehe Seite 133) zu erkennen, dass die Bildung der H_4ML^{2-} -Spezies mit einer Tieffeldverschiebung des ^{31}P -Resonanzsignals verbunden ist. Mit beginnender Deprotonierung der ersten Aminofunktion wird das Resonanzsignal wieder zu hohem Feld.

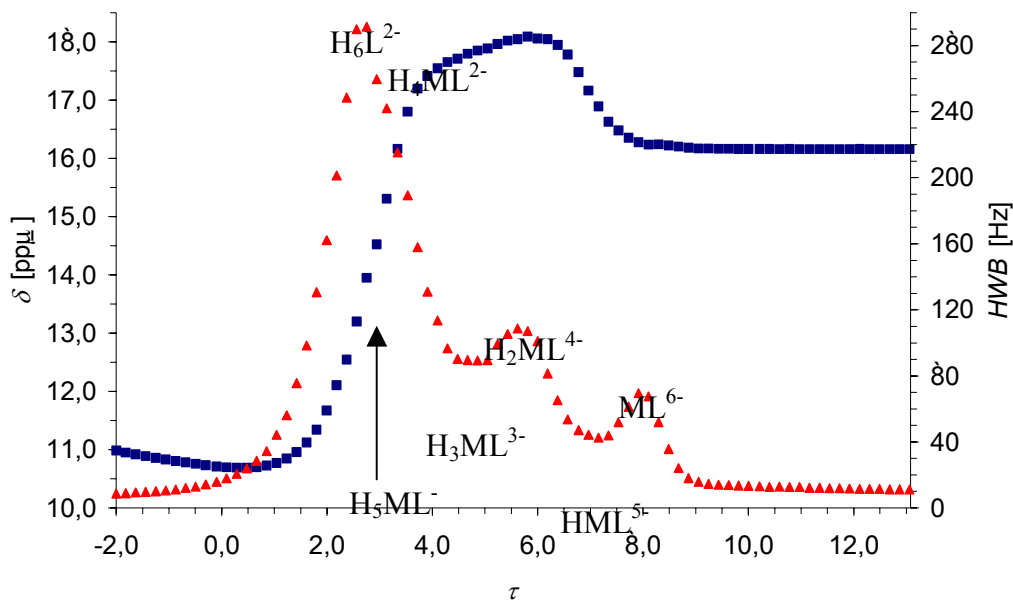


Abbildung 104: Auftragung der mittleren chemischen Verschiebung (■) und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 1,0 M TMAOH

Da bei Erstellung dieser Arbeit im Programm *canpod* [21] das Modul zur Berechnung des Fehlers noch nicht fertiggestellt war, können hier keine Standardabweichungen für die ionenspezifischen Verschiebungen angegeben werden.

Spezies	δ_p [ppm]	Δ_p [ppm]
H_5ML^-	12,120	-8,576
H_4ML^{2-}	20,696	3,426
H_3ML^{3-}	17,270	-1,351
H_2ML^{4-}	18,621	1,694
HML^{5-}	16,927	0,762
ML^{6-}	16,165	

Tabelle 59: Ionenspezifische Parameter δ_p vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex (Titration vs. 0,1 M TMAOH)

6.5.2.2 202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

Bei der 202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex kann auf Grund der Linienverbreiterung des Resonanzsignals nicht über den gesamten Verlauf der Titration die Halbwertsbreite ermittelt werden.

Bei einem Titrationsgrad von $\tau = -2$ tritt ein Triplett mit einer $^2J_{\text{PH}}$ -Kopplung von -11,18 Hz. Im Bereich $0 < \tau < 9$ geht die Kopplungskonstante in der Linienbreite unter. Erst bei $\tau = -9$ tritt diese Kopplung ($^2J_{\text{PH}} = -10,24$ Hz) wieder auf.

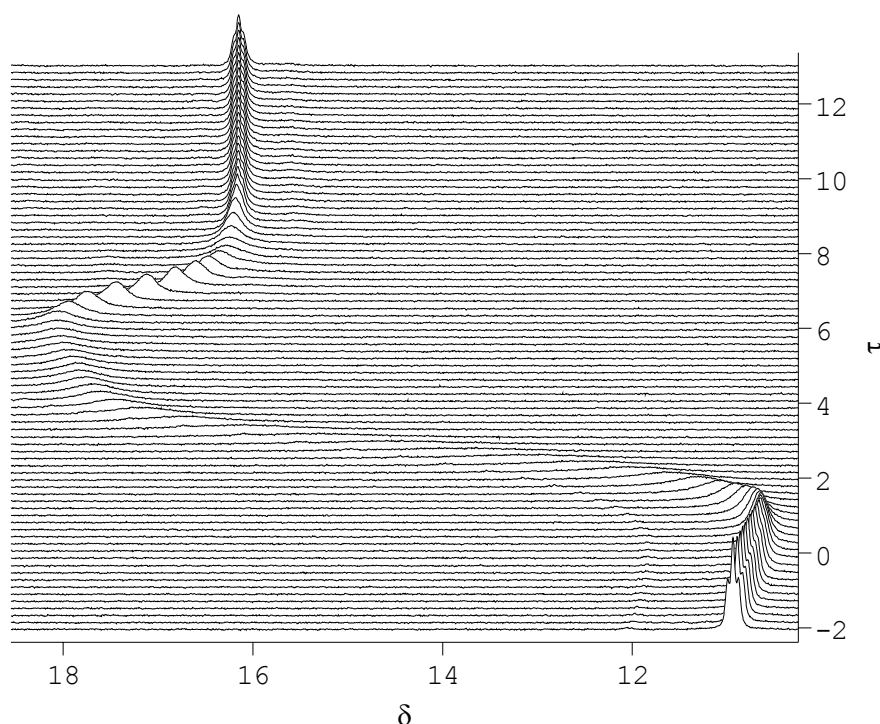


Abbildung 105: Stack-Plot der 202,46 MHz ^{31}P -NMR Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 1,0 M TMAOH (δ_{P} vs. τ)

6.5.2.3 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

Wie aus Abbildung 106 zu erkennen ist, verändert sich die Resonanzlage der beiden Protonensignale derart, dass ab $\tau > 4$ eine Überschneidung mit dem Resonanzsignal für das TMACl stattfindet. Eine Bestimmung der ionenspezifischen Parameter ist somit bei dieser Messung nicht vollständig möglich. Eine Messung unter Verwendung von Alkalilaugen erscheint als Lösung nicht sinnvoll, da eine Komplexierung mit Alkalimetallen stattfinden kann.

Durch die Komplexbildung zum 1:1 Cd-EDTMP-Komplex werden die Resonanzsignale für die Ethylen-Gruppe und die Methylen-Gruppen im Bereich $-2 < \tau < 4$ zu höherem Feld verschoben.

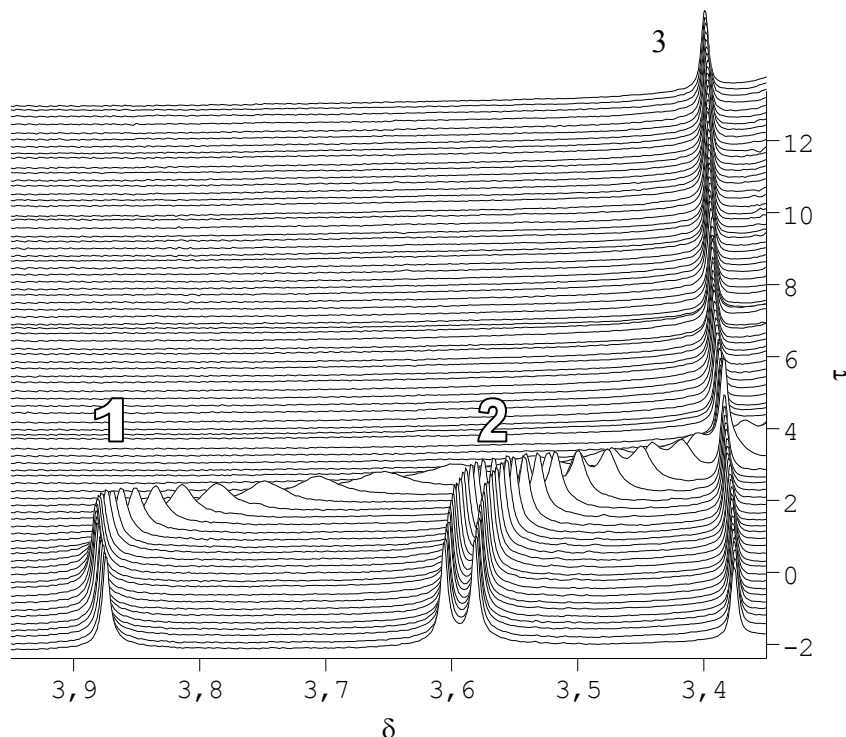


Abbildung 106: Stack-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 1,0 M TMAOH (δ_{H} vs. τ) (1: Ethylen-Gruppe; 2: Methylen-Gruppen; 3: ^{13}C -Satellit vom TMACl)

6.5.3 44,39 MHz ^{113}Cd -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex

In der Literatur finden sich nur wenige Arbeiten, die sich mit der pH-Abhängigkeit der ^{113}Cd -NMR chemischen Verschiebung bei Phosphonsäuren beschäftigt. Keller [114] baut auf die Arbeiten von Jensen [99] auf. Beide berichten von einer starken pH-Abhängigkeit des ^{113}Cd -NMR-Resonanzsignals im Bereich von pH 6 bis 11. In diesem pH-Intervall findet eine Tieffeldverschiebung von 28 ppm statt. Allerdings wurden bei Keller [114] die einzelnen Titrationsgrade durch die Zugabe von KOH beziehungsweise NaOH eingestellt, so dass bei diesen Messungen auch eine zusätzliche Komplexierung der EDTMP mit Na^+ beziehungsweise K^+ in Betracht gezogen werden muss. Bei Jensen [99] wurden die Titrationsgrade durch Zugabe von TMAOH eingestellt.

Um im Rahmen dieser Arbeit die Messungen an dem 1:1 Cadmium-Ethylen-diamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex abzuschließen, wurde eine ^{113}Cd -NMR-kontrollierte Titration unter Verwendung des DRX 200 durchgeführt. Die Titration wurde vom basischen zum aciden Bereich durchgeführt, da die Löslichkeit vom EDTMP im Basischen höher ist. Die nachfolgende Abbildung 107 veranschaulicht die Problemstellung bei dieser Messung.

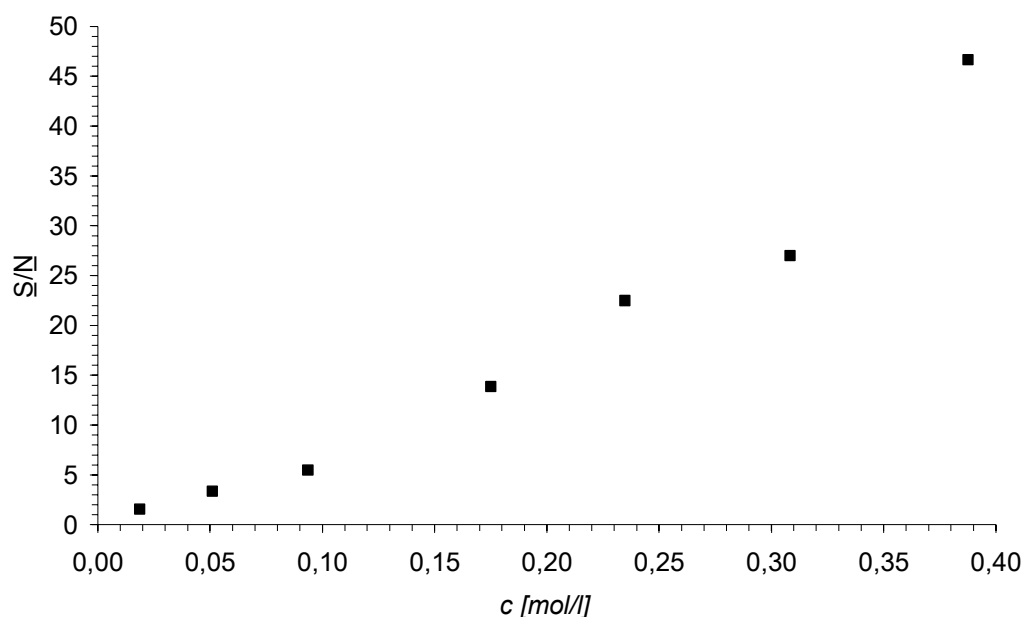


Abbildung 107: Auftragung des Signal-Rausch-Verhältnisses im ^{113}Cd -NMR gegen die Konzentration an $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$

Die Konzentration an Cadmium muss mindestens 0,1 mol/l betragen damit ein Signal-Rausch-Verhältnis von 5 erreicht wird. Da sich im Verlauf der Titration die Konzentration weiter verringert, muss mit konzentrierter Salzsäure titriert werden. Aufgrund der Löslichkeit von EDTMP konnte die maximale Konzentration der Startlösung aber nicht mehr als 0,11 mol/l betragen.

Die Messparameter für die NMR-kontrollierte Titration werden in Tabelle 60 aufgeführt. Vor der Aufnahme des ersten Spektrums eines bestimmten Titrationszustandes wird eine Mischzeit von 30 Sekunden und eine Wartezeit von 15 Sekunden eingehalten.

Parameter	^{113}Cd -NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	44,39
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	32768
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	16384
Zahl der Scans (NS)	2560
Spektrale Breite (SW) [Hz]	17730,496
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	-8435,02

Tabelle 60: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 200 vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

Für die Titration werden die in Tabelle 61 aufgelisteten analytischen Parameter gewählt:

Substanz: Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) <u>4</u>			
Molmasse [g/mol]:	436,12	Vorlagevolumen [ml]:	140,00
m (Substanz) [mg]:	7165,8		
m (Wirkstoff) [mg]:	6869,3	n (Wirkstoff) [mmol]:	15,7510
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,1125
Substanz: Cadmiumchlorid (wasserfrei, Reinheit > 99,9 %)			
Molmasse [g/mol]:	183,21		
m (Metallsalz) [mg]:	2887,3	n (Metallsalz) [mmol]:	15,7510
Zusatz TMAOH [mmol]:	157,5099	c (TMAOH) [mol/l]:	1,1364
I (Ionenpuffer: TMACl) [mol/l]:	2,0	m (TMACl) [g]:	5,48
c (Titrator: HCl) [mol/l]:	2,0310		

Tabelle 61: Experimentelle Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 200 vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 2,0 M HCl

6.5.3.1 44,39 MHz ^{113}Cd -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

Abbildung 108 stellt den Stack-Plot der 44,39 MHz ^{113}Cd -NMR-kontrollierte Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex dar.

Diese NMR-kontrollierte Titration wurde als Retrotitration durchgeführt. Der Stack-Plot (Abbildung 108) gibt den umgekehrten Titrationsverlauf wieder.

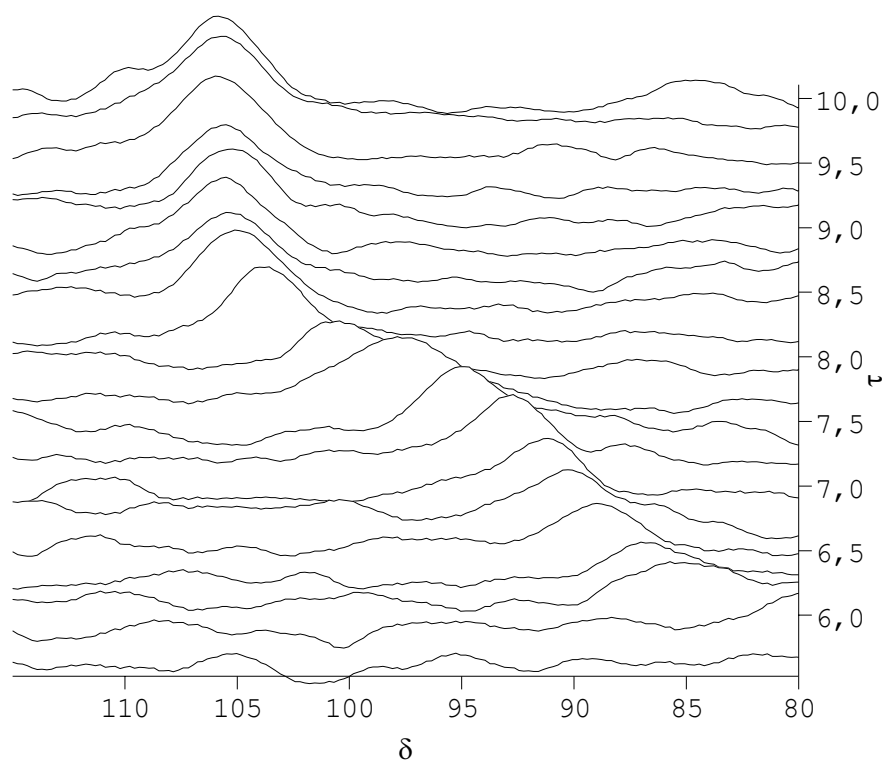


Abbildung 108: Stack-Plot der 44,39 MHz ^1H -NMR Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 2,0 M HCl (δ_{Cd} vs. τ)

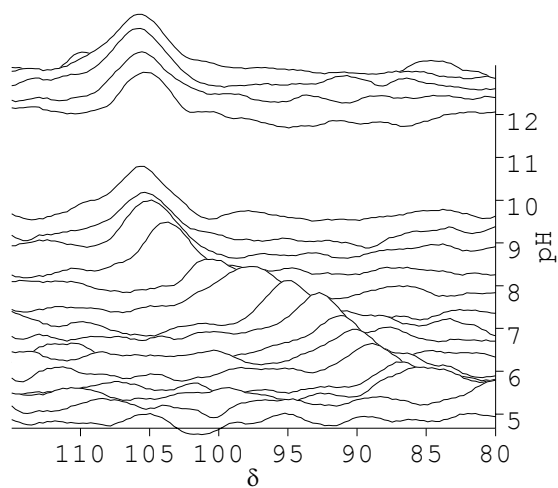


Abbildung 109: Stack-Plot der 44,39 MHz ^1H -NMR Messung vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex vs. 2,0 M HCl (δ_{Cd} vs. pH)

Aufgrund der für die ^{113}Cd -NMR notwendigen Konzentrationen (siehe Abbildung 107) fällt im Aciden der Komplex aus. Bei einem Titrationsgrad von $\tau = 6,25$ ist die Konzentration der Lösung so gering, dass im ^{113}Cd -NMR kein Resonanzsignal mehr beobachtet werden. Für den 1:1 Cd-EDTMP-Komplex ist die chemische Verschiebung im Intervall $\tau = 6$

bis $\tau = 10$ stark pH-abhängig (siehe Abbildung 109 und Abbildung 111). Zu den gleichen Ergebnissen kommen Keller [114] für den Cd-EDTMP-Komplex und Jensen [99] für den 1:1 Cd-EDTA-Komplex. Die Tieffeldverschiebung begründet Jensen [99] für den 1:1 Cd-EDTA-Komplex und Keller [114] für den 1:1 Cd-EDTMP- sowie den 1:1 Cd-EDTA-Komplex mit der Deprotonierung von an dem Metall koordinierten Wassermolekülen.

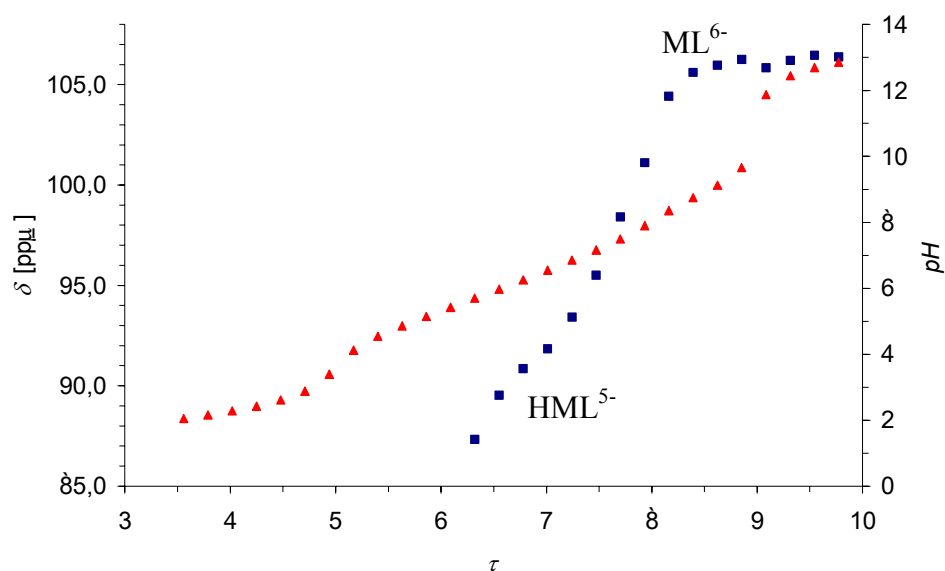


Abbildung 110: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_{Cd} (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der 44,39 MHz ^{113}Cd -NMR-kontrollierten Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

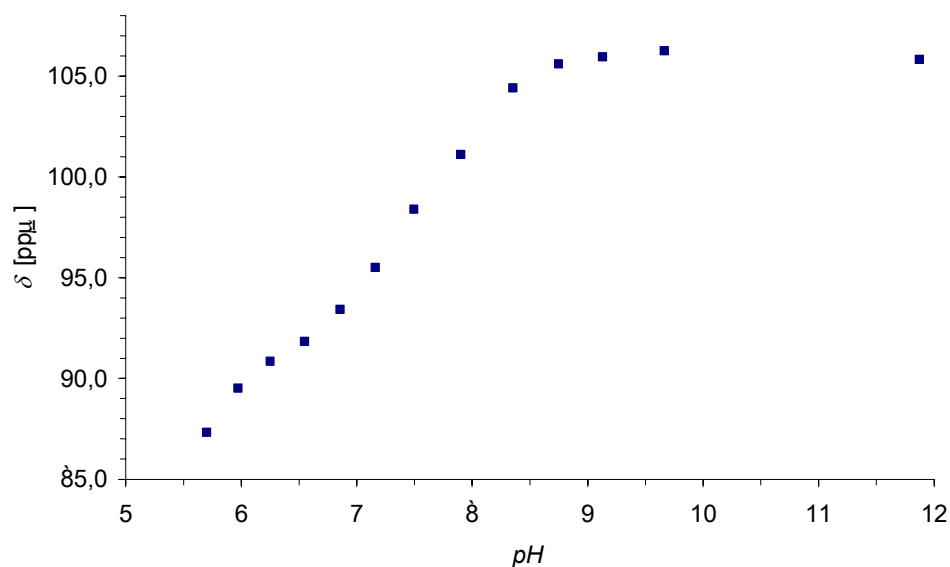


Abbildung 111: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_{Cd} (■) vs. pH-Wert der 44,39 MHz ^{113}Cd -NMR-kontrollierten Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

Da bei Erstellung dieser Arbeit im Programm *canpod* [21] das Modul zur Berechnung des Fehlers noch nicht fertiggestellt war, können hier keine Standardabweichungen für die ionenspezifischen Verschiebungen angegeben werden.

Spezies	δ_{Cd} [ppm]	Δ_{Cd} [ppm]	Bezhadi [115] δ_{Cd} [ppm]	Keller [114] δ_{Cd} [ppm]
H_2ML^{4-}	78,7	-13,9	-	77
HML^{5-}	92,6	-15,2	-	86
ML^{6-}	106,1		107,3	104
c [mol/l]	0,1125		0,1	k. A.
Titratoren	2,0 M HCl		0,1 M NaOH	NaOH / KOH
I	2,0 (TMACl)		0,1 (NaCl)	k. A.

Tabelle 62: Ionenspezifische Parameter der 44,39 MHz ^{113}Cd -NMR-kontrollierten Titration vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

6.5.4 Vergleich der Messungen von EDTMP zum 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

In Abbildung 112 ist die Titrationskurve von Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure) mit und ohne Zugabe von Cadmium dargestellt.

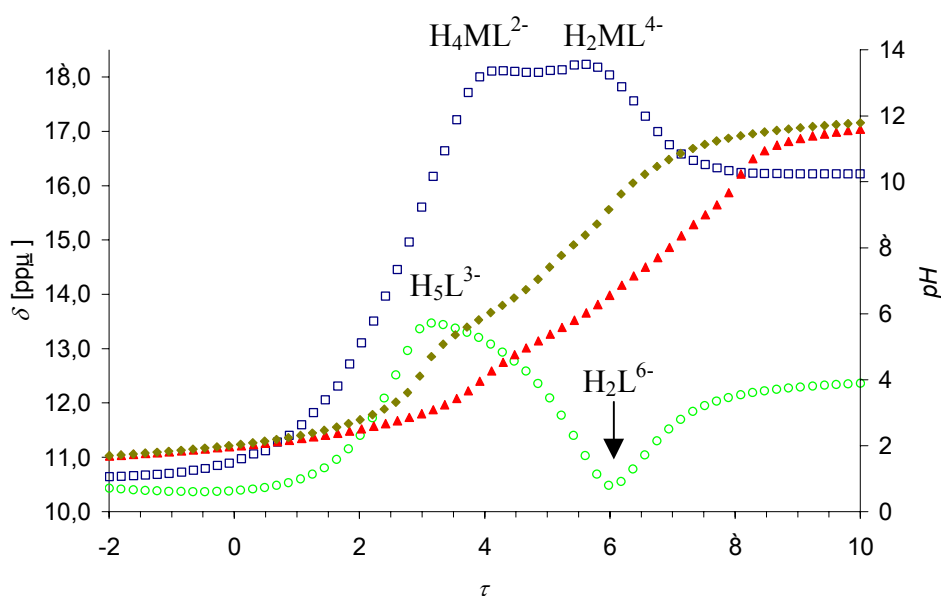


Abbildung 112: Vergleich der chem. Verschiebungen im 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR und des pH-Wertes bei EDTMP (O: δ_{P} ; ◆: pH) in Bezug zum 1:1 Cd-EDTMP-Komplex (□: δ_{P} ; ▲: pH) vs. Titrationsgrad τ (0,1 M TMAOH)

Die Trennung der beiden Kurven (ab $\tau = 1$) zeigt die Bildung der Komplexe an. Die Differenz der beiden Kurven ist ein Indikator für die Stabilität der gebildeten Komplexe.

Im direkten Vergleich der beiden Messungen ist zu erkennen, dass die Komplexierung der EDTMP eine Tieffeldverschiebung bedingt. Während die Bildung der ML^{6-} -Spezies eine positive Änderung des Gradienten bedingt, ist der Gradient bei der Bildung der L^{8-} -Spezies negativ.

Aufgrund der großen Änderung der Halbwertsbreite bei der Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplextitration ist es sinnvoll einen Vergleich der beiden Messungen über reduzierten Halbwertsbreite (Abbildung 113) durchzuführen. Es fällt auf, dass die größte Änderung in der Halbwertsbreite bei der Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Messung bei einem Titrationsgrad von $\tau = 5,5$ stattfindet, wohingegen sie bei der Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Messung bei $\tau = 2,5$ auftritt.

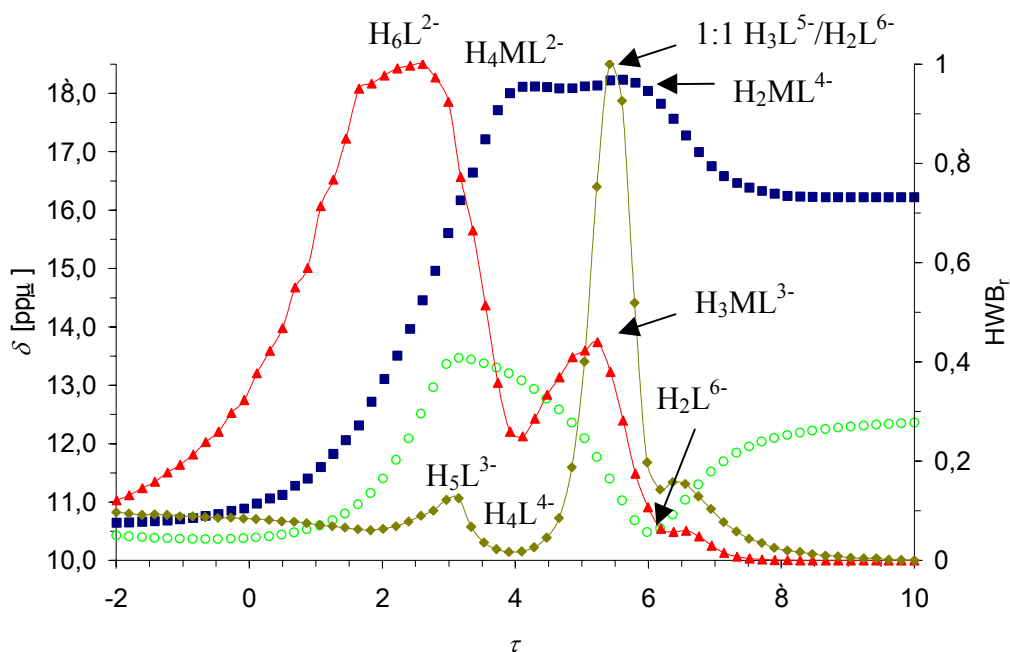


Abbildung 113: Vergleich der chem. Verschiebungen im 202,46 MHz $^{31}P\{^1H\}$ -NMR und der reduzierten Halbwertsbreite bei EDTMP (O: δ_r ; -◇-: HWB_t) in Bezug zum 1:1 Cd-EDTMP-Komplex (■: δ_r ; -▲-: HWB_t) vs. Titrationsgrad τ (0,1 M TMAOH)

Bei EDTMP ist die Änderung der Halbwertsbreite auf die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Diphosphonyltrianionen ($-N(CH_3PO_3^{2-})-H-(O_3^{2-}PCH_3)N-$) zurückzuführen.

In Abbildung 114 werden die reduzierten chemischen Verschiebungen und die reduzierten Halbwertsbreiten gegen den pH-Wert aufgetragen.

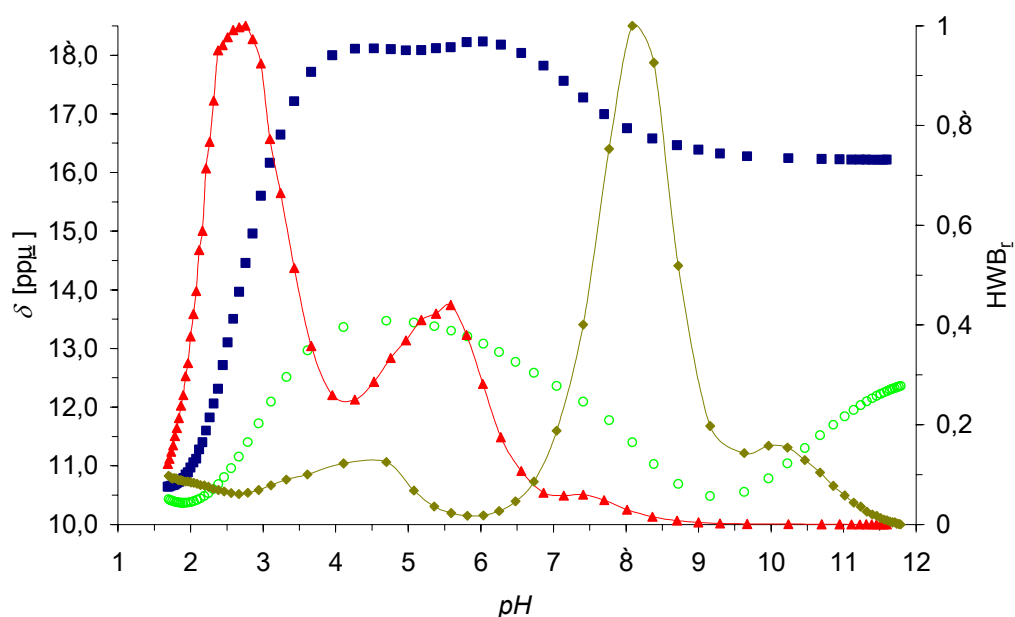


Abbildung 114: Vergleich der chem. Verschiebungen im 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR und der reduzierten Halbwertsbreite bei EDTMP (○: δ_r ; -◇-: HWB_r) in Bezug zum 1:1 Cd-EDTMP-Komplex (■: δ_r ; -▲-: HWB_r) vs. pH-Wert (0,1 M TMAOH)

In Tabelle 63 werden die ionenspezifischen Parameter der beiden EDTMP-Messungen gegenübergestellt.

	0,1 M TMAOH		1,0 M TMAOH	
Spezies	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]
H_8L	$13,175 \pm 0,436$	$3,629 \pm 0,470$	$16,291 \pm 0,441$	$7,234 \pm 0,479$
H_7L^-	$9,546 \pm 0,177$	$-0,615 \pm 0,180$	$9,056 \pm 0,187$	$-1,926 \pm 0,204$
H_6L^{2-}	$10,161 \pm 0,029$	$-3,519 \pm 0,034$	$10,982 \pm 0,082$	$-2,900 \pm 0,112$
H_5L^{3-}	$13,679 \pm 0,017$	$0,555 \pm 0,026$	$13,882 \pm 0,076$	$1,066 \pm 0,093$
H_4L^{4-}	$13,124 \pm 0,019$	$0,853 \pm 0,028$	$12,816 \pm 0,052$	$1,262 \pm 0,113$
H_3L^{5-}	$12,271 \pm 0,021$	$2,018 \pm 0,026$	$11,554 \pm 0,100$	$1,145 \pm 0,116$
H_2L^{6-}	$10,253 \pm 0,015$	$-1,950 \pm 0,022$	$10,408 \pm 0,059$	$-1,918 \pm 0,069$
HL^{7-}	$12,203 \pm 0,016$	$-8,694 \pm 0,770$	$12,326 \pm 0,035$	$-3,609 \pm 0,186$
L^{8-}	$20,897 \pm 0,770$		$15,935 \pm 0,183$	

Tabelle 63: Ionenspezifische Parameter von EDTMP 4

Es zeigt sich, dass bei beiden Messungen die Standardabweichungen für die Spezies H_8L , H_7L^- und L^{8-} am höchsten sind. Insgesamt sind die Abweichungen zwischen den beiden Messungen im Vergleich zu den Cd-EDTMP-Messungen größer.

Die ionenspezifischen Parameter der beiden Cd-EDTMP-Messungen werden Tabelle 64 zusammengefasst.

	0,1 M TMAOH		1,0 M TMAOH	
Spezies	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]
H_5ML^-	12,823	-6,607	12,120	-8,576
H_4ML^{2-}	19,430	1,848	20,696	3,426
H_3ML^{3-}	17,582	-0,909	17,270	-1,351
H_2ML^{4-}	18,491	2,105	18,621	1,694
HML^{5-}	16,386	0,158	16,927	0,762
ML^{6-}	16,228		16,165	

Tabelle 64: Ionenspezifische Parameter vom 1:1 Cd-EDTMP-Komplex

Für den Cd-EDTMP-Komplex stimmen die ionenspezifischen Parameter bei beiden Messungen bis auf für die Spezies H_4ML^{2-} gut überein. Die Abweichung hängt mit einer schon im Spektrum sichtbaren größeren Tieffeldverschiebung zusammen.

6.6 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

In Tabelle 65 sind die Dissoziationskonstanten der von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 tabelliert.

pK_{s1}	pK_{s2}	pK_{s3}
$1,49 \pm 0,03$	$5,64 \pm 0,01$	$12,55 \pm 0,05$

Tabelle 65: Dissoziationskonstanten [57] von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5; ($n = 0,05 \text{ mmol}$); NaOH ($c = 0,1 \text{ mol/l}$), $I (\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$, $n (\text{HCl}) = 0,1 \text{ mmol}$, $V = 5,0 \text{ ml}$, $T = 25^\circ\text{C}$

Abbildung 115 gibt das Molenbruchverteilungsdiagramm und Abbildung 117 das Dissoziationsschema der 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 wieder.

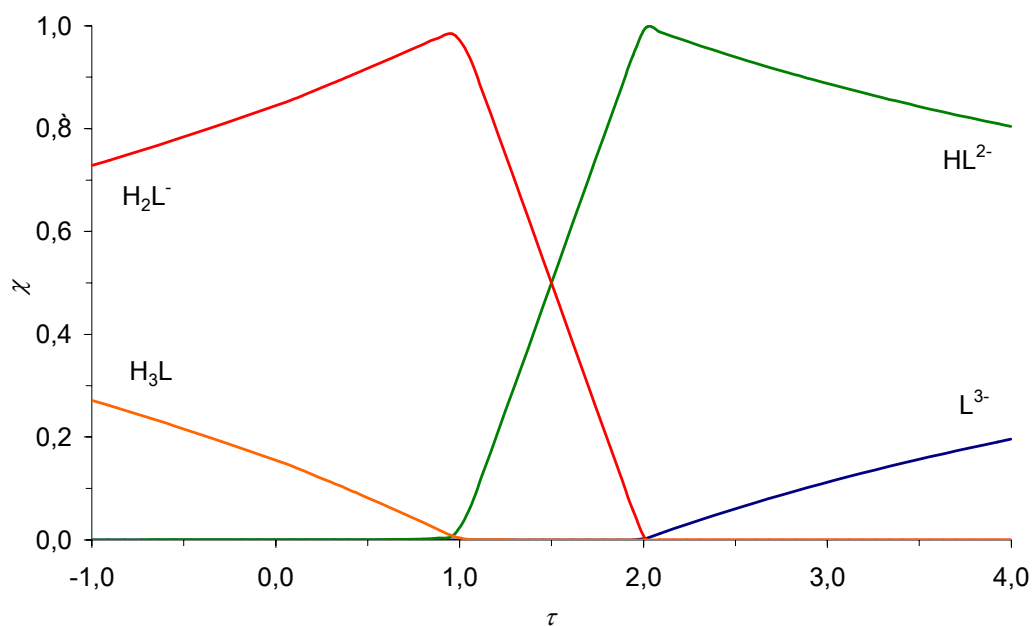


Abbildung 115: Molenbruchverteilungsdiagramm von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 vs. Titrationsgrad τ (Exp. Parameter: siehe Tabelle 72)

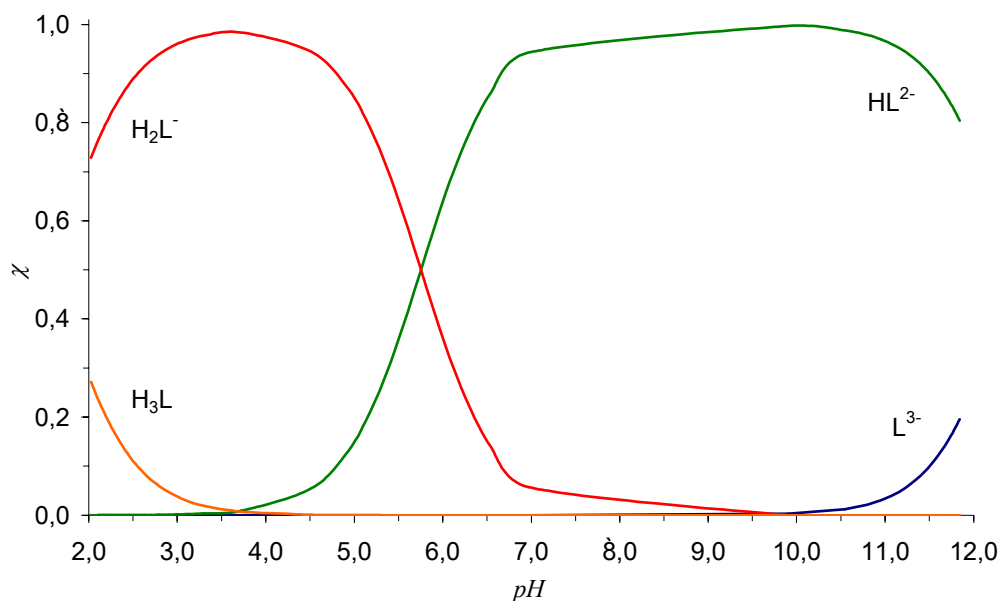


Abbildung 116: Molenbruchverteilungsdiagramm von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 vs. pH (Exp. Parameter: siehe Tabelle 72)

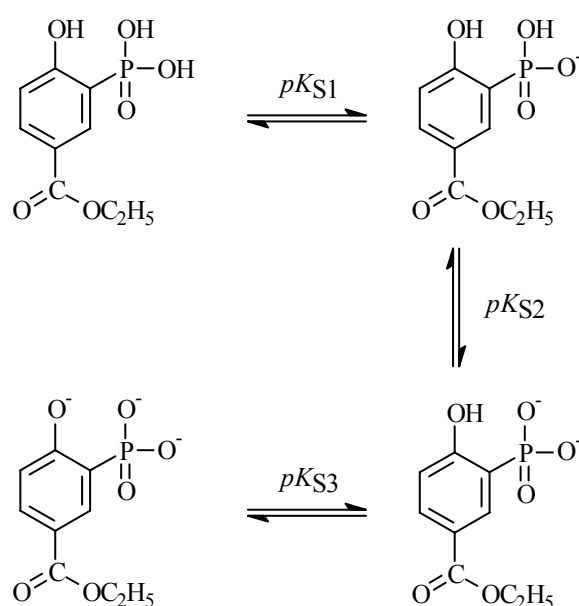


Abbildung 117: Dissoziationsschema von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Die Substanz 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 lässt sich als AMRX-Spinsystem für den aromatischen Teil und als A₂B₃-Spinsystem für den aliphatischen Teil beschreiben. Das gesamte Spinsystem lässt sich als Superposition der beiden Spinsysteme beschreiben. Um die ionenspezifischen Parameter im ¹H-NMR ermitteln zu können, ist es notwendig, dass Spektrum zu iterieren.

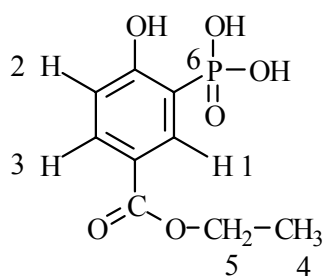


Abbildung 118: Strukturformel der 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 mit Zuordnung der Protonen

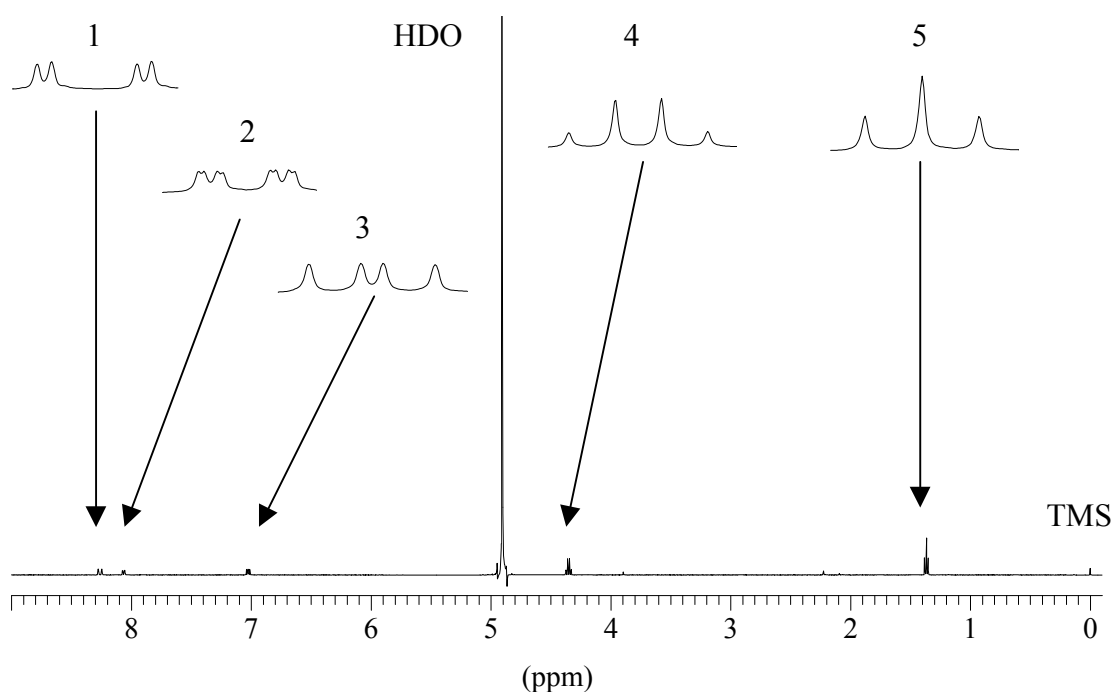


Abbildung 119: 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektrum der 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 ($c = 0,1231 \text{ mol/l}$ in D_2O)

In Tabelle 66 sind die Ergebnisse für die Resonanzfrequenzen aus der Iteration für die Protonen zu entnehmen.

SNr	Iso	Typ	δ [ppm]	ν [Hz]	Stabw [Hz]	Spinsystem
1	^1H	A	8,1244	4063,2521	$\pm 0,0262$	AMRX
2	^1H	M	7,9262	3964,1274	$\pm 0,0328$	

3	^1H	R	6,8886	3445,1870	$\pm 0,0260$	
6	^{31}P	X	13,971	2828,5642	-	
4	^1H	A	4,215	2108,1120	$\pm 0,0128$	A_2B_3
5	^1H	B	1,230	615,3121	$\pm 0,0062$	

Tabelle 66: Iterierte chemische Verschiebungen des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums sowie des 200,46 MHz- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrums von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 ($c = 0,1231 \text{ mol/l}$ in D_2O)

Die Kopplungskonstanten, die durch Iteration eines Präzisions- ^1H -NMR ermittelt worden sind, werden in Tabelle 67 aufgelistet. Tabelle 68 gibt die statistischen Gütekriterien für die Iteration wieder.

SNr	SNr	KIso	KTyp	J [Hz]	Stabw [Hz]	Spinsystem
1	2	$^5\text{J}_{\text{HH}}$	J_{AM}	0,8215	$\pm 0,0414$	AMRX
1	3	$^4\text{J}_{\text{HH}}$	J_{AR}	0,2324	$\pm 0,0159$	
1	6	$^3\text{J}_{\text{PH}}$	J_{AX}	15,4971	$\pm 0,0479$	
2	3	$^3\text{J}_{\text{HH}}$	J_{MR}	8,6900	$\pm 0,0362$	
2	6	$^4\text{J}_{\text{PH}}$	J_{MX}	6,0628	$\pm 0,0479$	
3	6	$^5\text{J}_{\text{PH}}$	J_{RX}	2,3076	$\pm 0,0337$	
4	5	$^3\text{J}_{\text{HH}}$	J_{AB}	7,1464	$\pm 0,0093$	A_2B_3

Tabelle 67: Iterierte Kopplungskonstanten des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 ($c = 0,1231 \text{ mol/l}$ in D_2O)

Statistical Information	AMRX- und A_2B_3 -Spinsystem
FSS	6,2382
NSP	77472
SDM	0,0090
R%	0,4351

Tabelle 68: Statistische Gütekriterien der Iterationen aus Tabelle 66 und Tabelle 67

6.6.1 NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxy-phenylphosphonsäure 5 unter Verwendung des 200 MHz Spektrometers

Zuerst wurde zur Bestimmung der ionenspezifischen Parameter eine 81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration durchgeführt, deren analytische Parameter in Tabelle 69 aufgeführt werden. Die Parametereinstellungen für die NMR-Spektren sind in Tabelle 70 aufgelistet. Vor der Aufnahme des Spektrums eines bestimmten Titrationsgrades wurde eine Mischzeit von 15 Sekunden und eine Wartezeit von 10 Sekunden eingehalten.

Substanz: 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u>			
Molmasse [g/mol]:	246,15	Vorlagevolumen [ml]:	80,00
m (Substanz) [mg]:	118,5		
m (Wirkstoff) [mg]:	118,0	n (Wirkstoff) [mmol]:	0,4795
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0060
Zusatz HCl [mmol]:	0,4795	c (HCl) [mol/l]:	0,0980
I (Ionenpuffer: NaCl) [mol/l]:	0,1	c (NaCl) [mol/l]:	0,8000
		V _Z (NaCl) [ml]:	10,00
c (Titrator: NaOH) [mol/l]:	0,1033		

Tabelle 69: Experimentelle Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 200 von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxy-phenylphosphonsäure gegen NaOH

Parameter	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	81,01
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	4096
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	4096
Zahl der Scans (NS)	256
Spektrale Breite (SW) [Hz]	1132,246
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	931,66

Tabelle 70: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 200 von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

6.6.1.1 81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

In Abbildung 120 werden der Stack- und der Kontur-Plot der 81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration der 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 gezeigt.

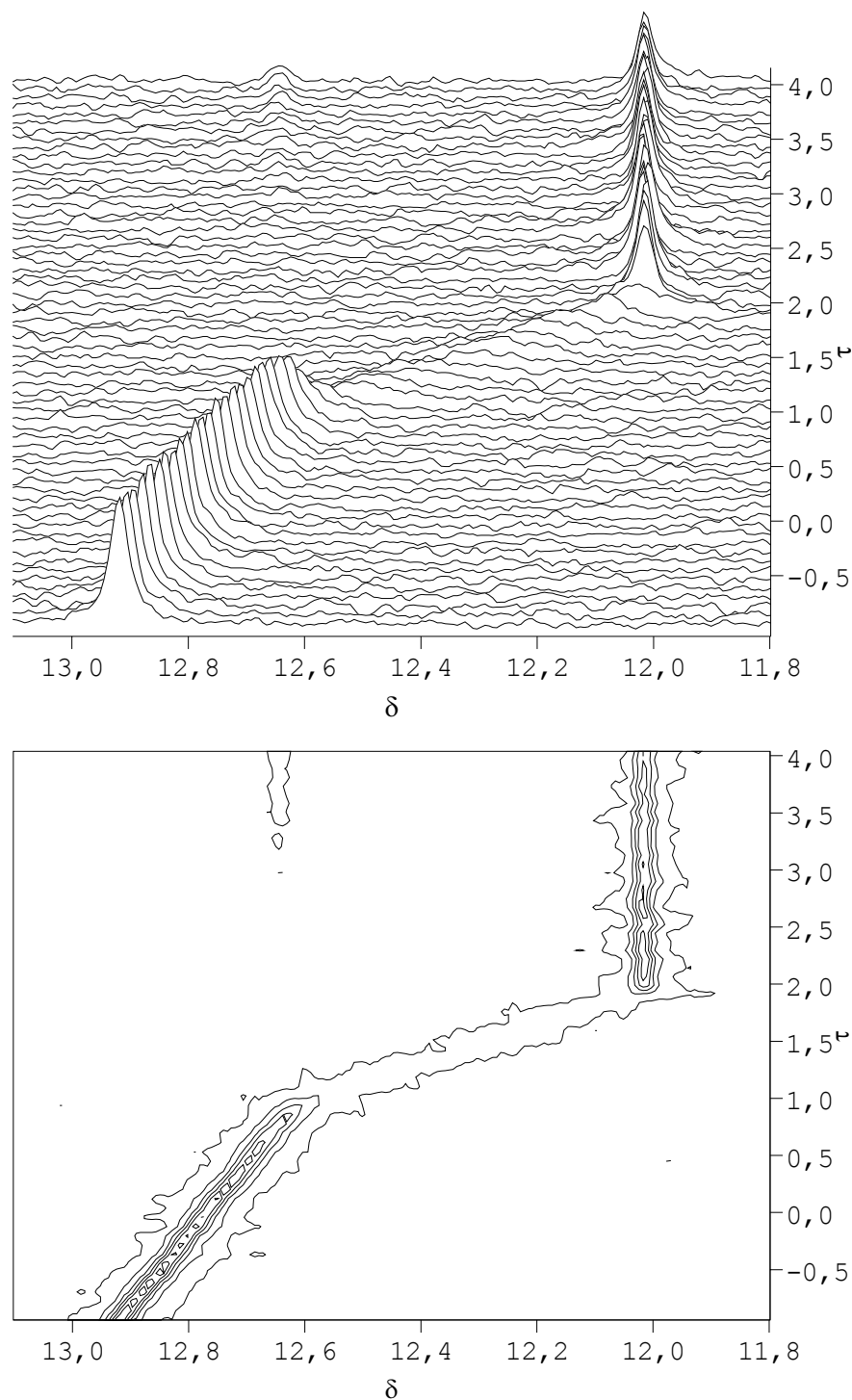


Abbildung 120: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 vs. 0,1 NaOH (δ_P vs. τ)

Die Abbildungen zeigen, dass ab einem Titrationsgrad $\tau = 3$ ein weiteres Resonanzsignal auftritt. Dieses zusätzliche NMR-Resonanzsignal im ^{31}P -NMR ist auf die durch die Abspaltung von Ethanol entstehende Carbonsäure (3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure geht über in 3-Carboxy-6-hydroxyphenylphosphonsäure) zurückzuführen. NMR-spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Abspaltung im zeitlichen Rahmen (45 min) einer Titration zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten nicht zu beobachten ist.

Durch den elektronenziehenden Einfluss des PO_3H^- -Anions und den stärkeren elektronenabstoßenden Einfluss des PO_3^{2-} -Dianions wird das Phosphoratom in der Phosphonyl-Gruppe stärker abgeschirmt und das Resonanzsignal wandert zu hohem Feld.

Bei der Auswertung zeigt sich, dass durch die Verbreiterung des Resonanzsignals im Bereich von $0,7 < \tau < 2,0$ die Bestimmung der chemischen Verschiebungen und der Halbwertsbreiten erschwert wird. Durch manuelle Nachbearbeitung der Einzelspektren ist es gelungen, die benötigten Parameter aus den Spektren zu ermitteln.

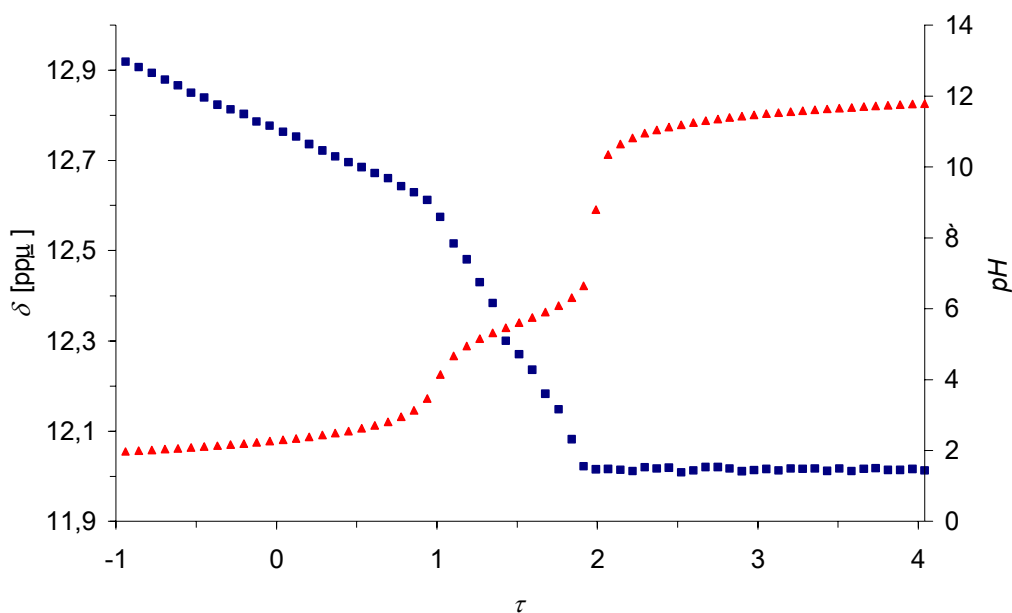


Abbildung 121: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_p (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Bei $\tau = 1,5$ findet sich in Maximum für die Halbwertsbreite. Dies lässt den Schluss auf die Bildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zu.

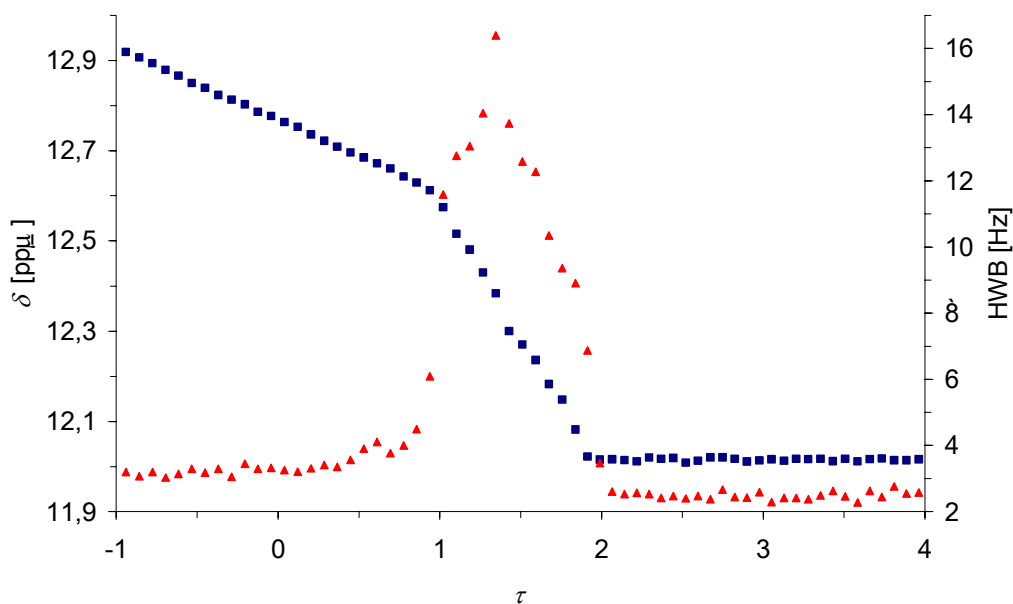


Abbildung 122: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Spezies	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]
H_3L	$13,935 \pm 0,026$	$1,353 \pm 0,027$
H_2L^-	$12,582 \pm 0,004$	$0,582 \pm 0,006$
HL^{2-}	$12,000 \pm 0,004$	$-0,153 \pm 0,045$
L^{3-}	$12,153 \pm 0,045$	

Tabelle 71: Ionenspezifischen Parameter von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Weil $\chi_{\text{H}_3\text{L}}$ und $\chi_{\text{L}^{3-}}$ relativ kleine Werte annehmen, (siehe Molenbruchverteilungsdiagramm (Abbildung 115, Seite 153)) können die ionenspezifischen Parameter $\delta_{\text{H}_3\text{L}}$ und $\delta_{\text{L}^{3-}}$ nur mit einem relativ großen Fehler bestimmt werden.

6.6.2 NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 unter Verwendung des 500 MHz Spektrometers

Mit der titrationsabhängigen NMR Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure ist es zum ersten Mal gelungen, innerhalb einer Titration vier verschiedene NMR-Experimente durchzuführen. Bei dieser NMR-kontrollierten Titration muss der erhebliche Zeitbedarf für die Messungen (55 Stunden) berücksichtigt werden.

Tabelle 72 gibt die experimentellen Parameter und Tabelle 73 die Parameter für die NMR-Experimente wieder. Vor der Aufnahme des ersten Spektrums eines bestimmten Titrationsgrades wurde eine Mischzeit von 300 Sekunden und eine Wartezeit von 420 Sekunden eingehalten.

Substanz: 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u>			
Molmasse [g/mol]:	246,15	Vorlagevolumen [ml]:	25,00
m (Substanz) [mg]:	36,0		
m (Wirkstoff) [mg]:	35,9	n (Wirkstoff) [mmol]:	0,1463
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0058
Zusatz HCl [mmol]:	0,1463	c (HCl) [mol/l]:	0,0989
I (Ionenpuffer: NaCl) [mol/l]:	0,1	c (NaCl) [mol/l]:	0,5000
		V _Z (NaCl) [ml]:	5,00
c (Titrator: NaOH) [mol/l]:	0,1054		

Tabelle 72: Experimentelle Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 500 von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 vs. NaOH

Parameter	³¹ P-NMR	³¹ P{ ¹ H}-NMR	¹ H-NMR	¹ H-NMR (WATER)
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46	202,46	500,13	500,13
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	8192	8192	32768	32768
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	8192	8192	32768	32768
Zahl der Scans (NS)	256	256	64	64
Spektrale Breite (SW) [Hz]	4045,307	4045,307	10330,579	10330,579
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	1822,10	1822,10	3088,51	2337,47

Tabelle 73: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 500 von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Bei einem "Water"-Spektrum handelt es sich um ein Protonen-Spektrum, welches mit einem speziellen Pulsprogramm aufgenommen wird. Durch eine Vorsättigung des Wassersignals wird eine Abschwächung dieses Signals und dabei ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis für die übrigen Signale erzielt.

6.6.2.1 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Bei der Betrachtung der Abbildung fällt sofort das, im Gegensatz zur 81,01 MHz NMR-kontrollierten Titration, verbesserte Signal-Rausch-Verhältnis auf.

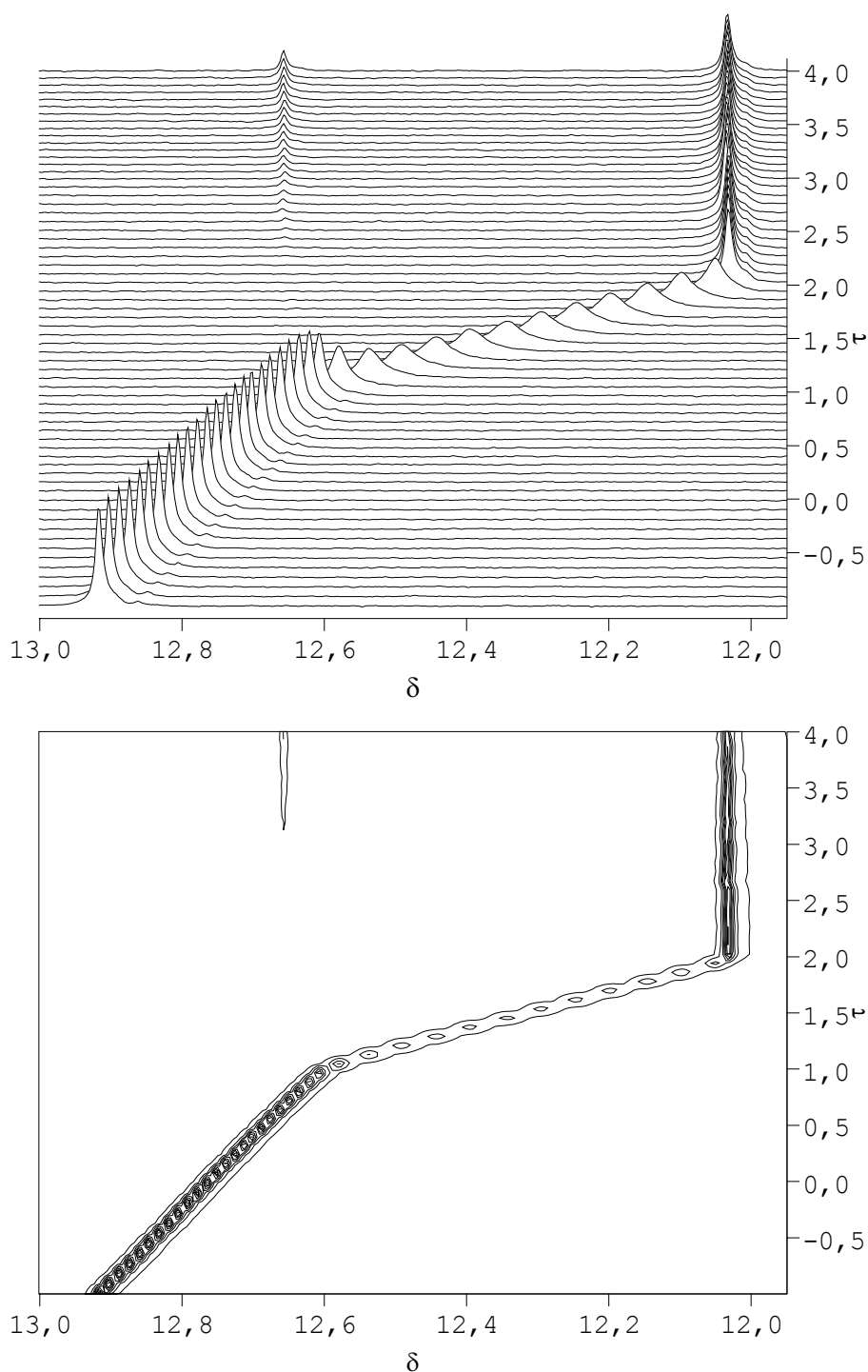


Abbildung 123: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 (δ_P vs. τ)

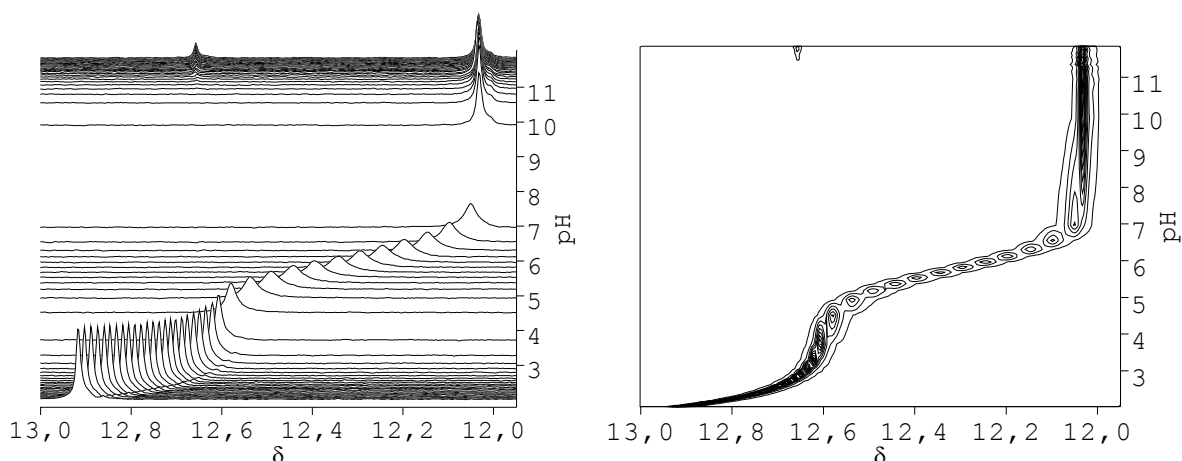


Abbildung 124: links: Stack-Plot - rechts: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 (δ_P vs. pH)

Durch das verbesserte Signal-Rausch-Verhältnis lassen sich bei dieser NMR-kontrollierten Titration die chemischen Verschiebungen und Halbwertsbreiten mit Hilfe des Deconvolutionsprogramms automatisch bestimmen.

In Kapitel 6.6.1.1 wird bereits auf das durch die Abspaltung von Ethanol entstehende zusätzlich NMR-Resonanzsignal im ^{31}P -NMR des Carbonsäurederivates hingewiesen. Die Abbildungen zeigen, dass diese Abspaltung ab einem Titrationsgrad von ungefähr $\tau = 2,5$ (pH = 11,2) beginnt.

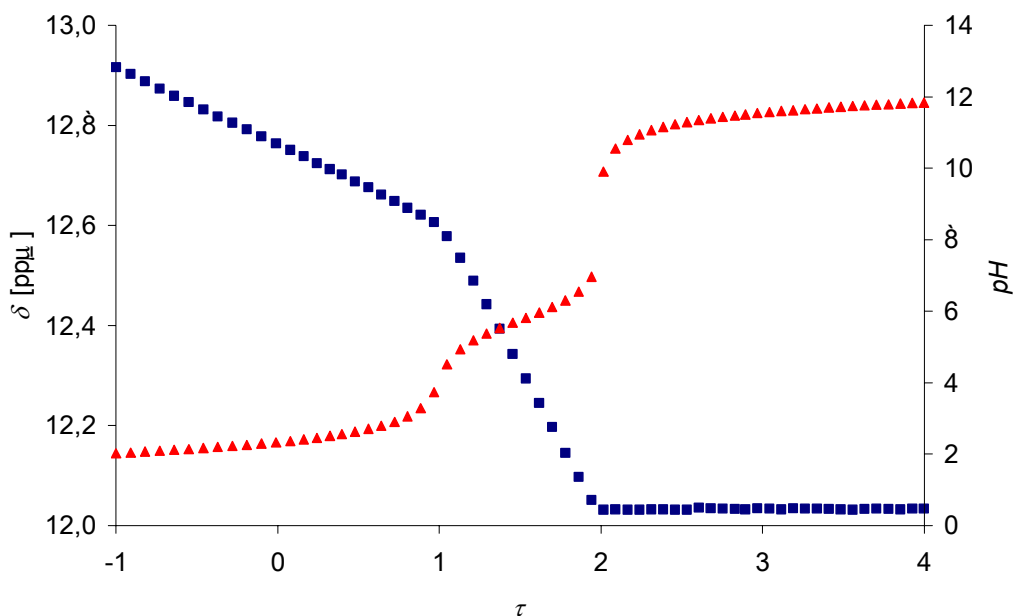


Abbildung 125: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Durch die Deprotonierung erst zum PO_3H^- -Anions und dann weiter zum PO_3^{2-} -Anions wird das Resonanzsignal des Phosphoratoms zu höherem Feld verschoben. Aus Abbildung 126 ist aufgrund der gewählten Titrationsbedingungen nur der Wert für $\text{pK}_{\text{S}2} = 5,64$ zu entnehmen.

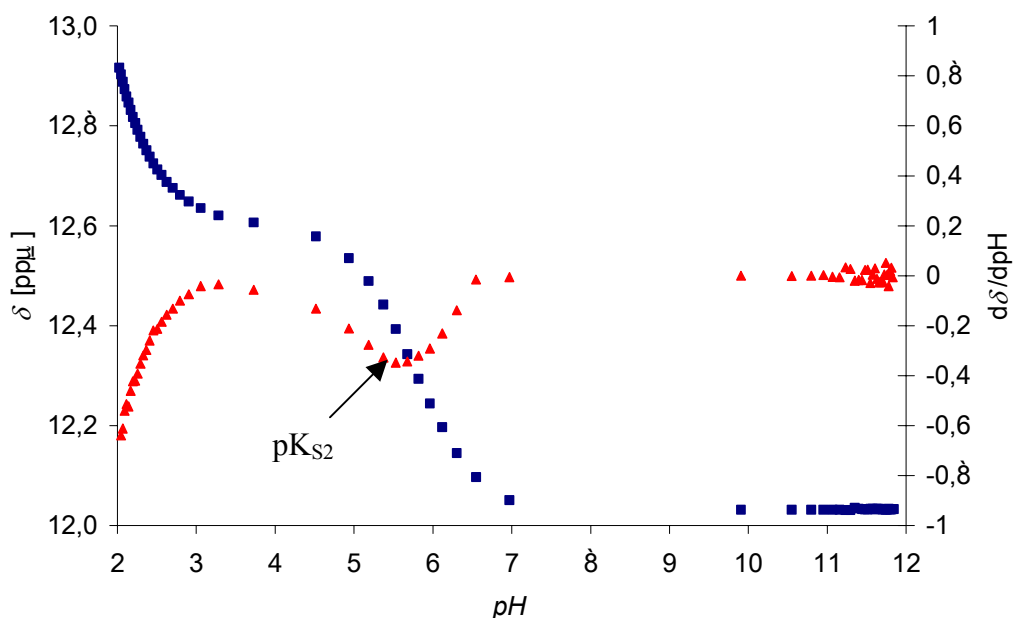


Abbildung 126: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_{P} (■) und der 1. Ableitung $d\delta_{\text{P}}/dpH$ (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Aus Abbildung 127 lässt sich entnehmen, dass bei einem Titrationsgrad von $\tau = 1,5$ der höchste Wert für die Halbwertsbreite resultiert. Dies bestätigt die Annahme von Reimann [57] auf die Ausbildung einer intermolekularen Wasserstoffbrückenbindung.

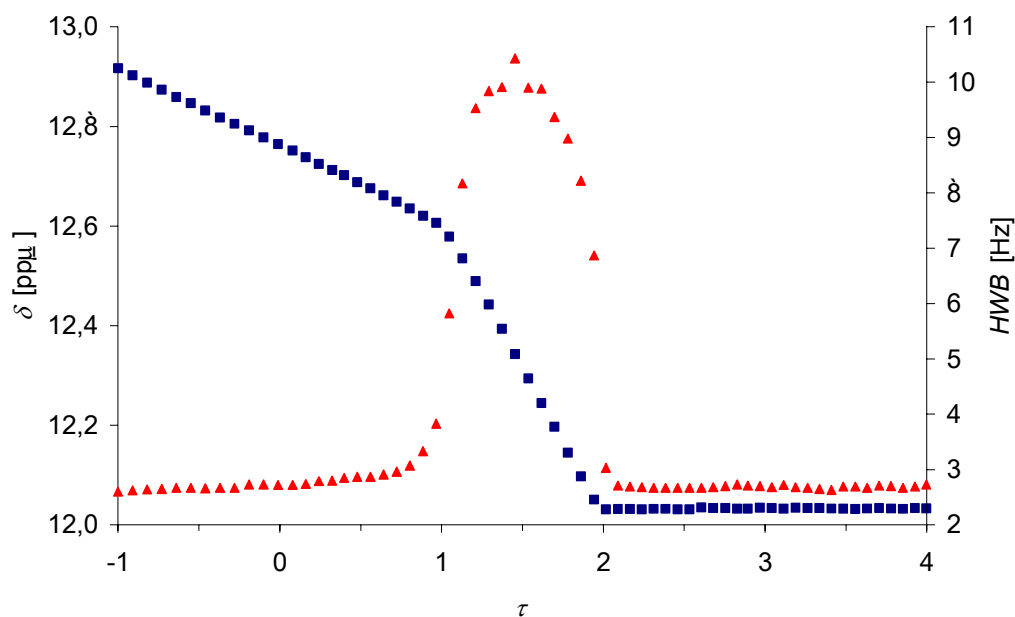


Abbildung 127: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_p (■) und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

In Tabelle 74 sind die ionenspezifischen Parameter der 202,46 MHz NMR-kontrollierten Titration der 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 tabelliert.

Spezies	δ_p [ppm]	Δ_p [ppm]
H_3L	$13,874 \pm 0,0264$	$1,259 \pm 0,027$
H_2L^-	$12,614 \pm 0,004$	$0,573 \pm 0,005$
HL^{2-}	$12,042 \pm 0,004$	$0,075 \pm 0,034$
L^{3-}	$11,967 \pm 0,034$	

Tabelle 74: Ionenspezifische Parameter von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Auch hier zeigt sich, dass die Standardabweichungen bei den ionenspezifischen Verschiebungen für die Spezies H_3L und L^{3-} höher sind.

6.6.2.2 202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Mit Hilfe der ^{31}P -NMR-kontrollierten Titration lässt sich sehr gut die Bildung des, durch die Abspaltung von Ethanol entstandenen, Carbonsäurederivates beobachten.

Erwartungsgemäß weist das Carbonsäurederivat das gleiche Aufspaltungsmuster im ^{31}P -NMR wie die von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure auf.

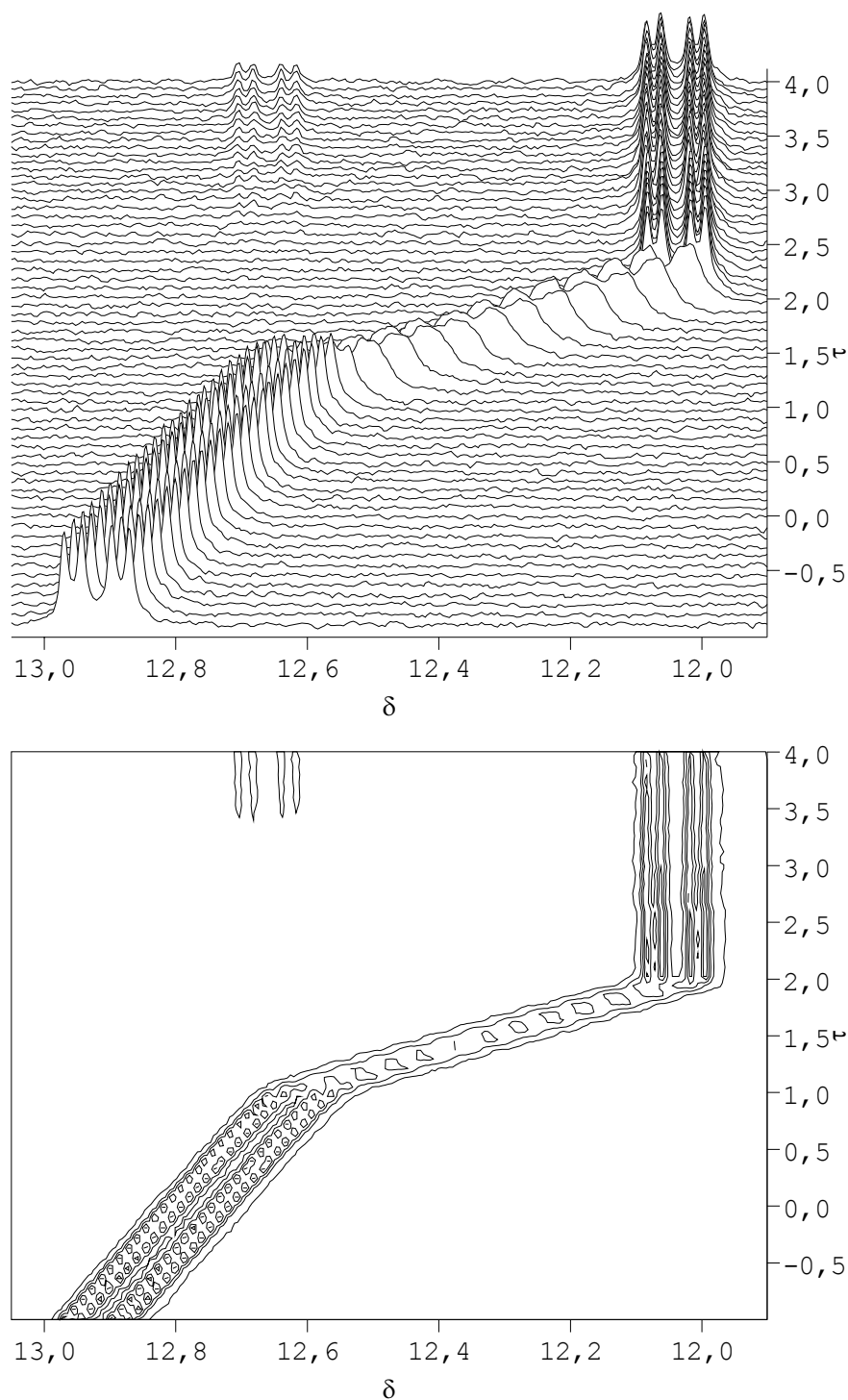


Abbildung 128: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz ^{31}P -NMR Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure **5** (δ_{P} vs. τ)

Wegen der Linienverbreiterung im Bereich $1 < \tau < 2$ können die Kopplungskonstanten nicht durchgängig bestimmt werden. Für bestimmte Titrationsgrade werden die Kopp-

lungskonstanten in Tabelle 75 aufgeführt. Mit zunehmender Deprotonierung nehmen Werte für $^3J_{\text{PH}}$ - und $^4J_{\text{PH}}$ -Kopplung ab.

	$^3J_{\text{PH}}$ [Hz]	$^4J_{\text{PH}}$ [Hz]
$\tau = -1$	14,88	4,88
$\tau = 0$	14,32	5,43
$\tau = 1$	14,57	5,18
$\tau = 2$	13,33	4,44
$\tau = 3$	13,33	4,44
$\tau = 4$	13,33	4,44

Tabelle 75: Kopplungskonstanten der 202,46 MHz ^{31}P -NMR-Spektren von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

6.6.2.3 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

Bei der in diesem Kapitel vorgestellten 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierten Titration handelt es sich um die erste ^1H -NMR-kontrollierte Titration unter Verwendung eines 500 MHz Spektrometers. Wie aus Abbildung 129 und Abbildung 130 zu erkennen ist, ist das Signal-Rausch-Verhältnis nur unbefriedigend. Dies ist auf die relativ niedrige Scan-Zahl zurückzuführen. Jedes NMR-Spektrum wurde mit nur 64 Scans aufgenommen.

Abbildung 129 zeigt eine Spreizung des Spektrums für die Resonanzsignale zwischen 7,8 ppm und 8,2 ppm. Dabei handelt es sich um das zur Phosphonyl-Gruppe ortho-ständige (bei 8,15 ppm) und das para-ständige Proton (bei 7,95 ppm) am Aromaten. Abbildung 130 zeigt das meta-ständige Proton (bei 6,90 ppm) am Aromaten. Die größten Veränderungen in der chemischen Verschiebung im Fortgang der Titration erfahren das para- und das meta-ständige Proton ($\Delta\delta = 0,1$ ppm). Dieser Effekt ist auf die elektronenziehende Wirkung der substituierten Ethoxycarbonyl-Gruppe und auf die elektronenabstoßende Wirkung des Phosphonyldianions zurückzuführen.

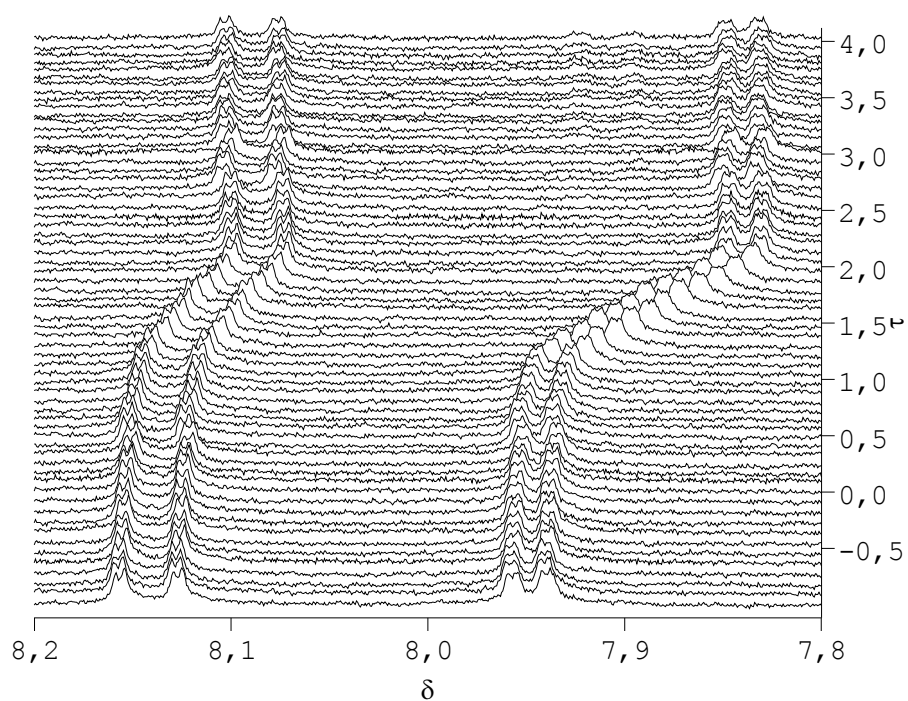


Abbildung 129: Stack-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 (Bereich zwischen 7,8 ppm und 8,2 ppm) (δ_{H} vs. τ)

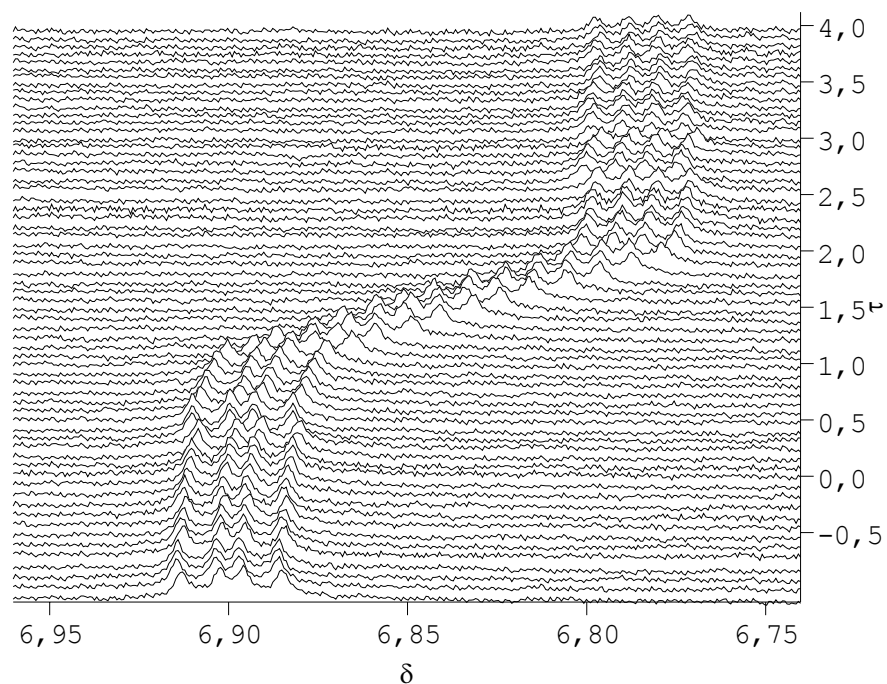


Abbildung 130: Stack-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR Messung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure (Bereich 7,1 ppm und 6,7 ppm) (δ_{H} vs. τ)

6.6.2.4 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration mit Wasserunterdrückung von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure

Bei der Betrachtung der Spektren der 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration mit Wasserunterdrückung (Wasserunterdrückung durch Vorsättigung des Wassersignals) zeigt sich bei dieser Messung im Vergleich zu der ^1H -NMR-Messung keine wesentliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Zudem zeigt sich, dass durch die Unterdrückung des Wassersignals Phasenfehler auftreten, die eine Phasenkorrektur der Spektren erschweren. Eine genaue Beschreibung zur Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren mit Wasserunterdrückung steht in dem Buch von Braun, Kalinowski und Berger [116].

6.6.3 Vergleich der 81,01 MHz und 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

In Abbildung 131 wird ein grafischer Vergleich der beiden $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 gezogen. Bis zum Titrationsgrad $\tau = 1$ sind nur geringe Unterschiede in den Halbwertsbreiten festzustellen. Zwischen dem ersten und zweiten Deprotonierungsschritt beträgt der Unterschied maximal 6 Hz.

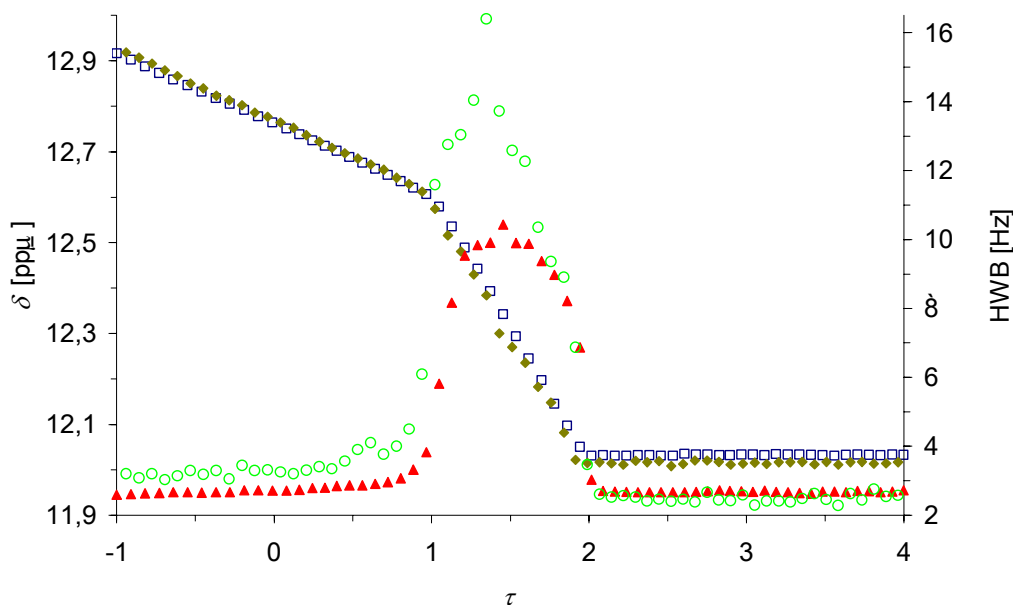


Abbildung 131: Auftragung der chem. Verschiebung δ_P ($\square$) und der Halbwertsbreite HWB ($\blacktriangle$) der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ - sowie der chem. Verschiebung δ_P ($\blacklozenge$) und der Halbwertsbreite HWB ($\bullet$) der 81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ - NMR-kontrollierten Messung vs. Titrationsgrad τ von 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5

6.7 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6

In Tabelle 76 sind die von Reimann [57] ermittelten Dissoziationskonstanten der von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 angegeben.

pK_{S1}	pK_{S2}	pK_{S3}	pK_{S4}	pK_{S5}	pK_{S6}
$1,09 \pm 0,03$	$1,48 \pm 0,04$	$5,54 \pm 0,01$	$6,54 \pm 0,01$	$12,56 \pm 0,09$	$12,66 \pm 0,08$

Tabelle 76: Dissoziationskonstanten [57] von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6; ($n = 0,05 \text{ mmol}$); NaOH ($c = 0,1 \text{ mol/l}$), $I (\text{NaCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$, $n (\text{HCl}) = 0,1 \text{ mmol}$, $V = 5,0 \text{ ml}$, $T = 25^\circ\text{C}$

Aus dem Molenbruchverteilungsdiagramm (Abbildung 132) lässt sich entnehmen, dass die Spezies H_6L und L^{6-} unter den gewählten experimentellen Bedingungen nur geringe Beiträge zur mittleren chemischen Verschiebung $\langle\delta_p\rangle$ liefern können. Demzufolge werden die ionenspezifischen Parameter $\delta_{\text{H}_6\text{L}}$ und $\delta_{\text{L}^{6-}}$ stark fehlerbehaftet ermittelt.

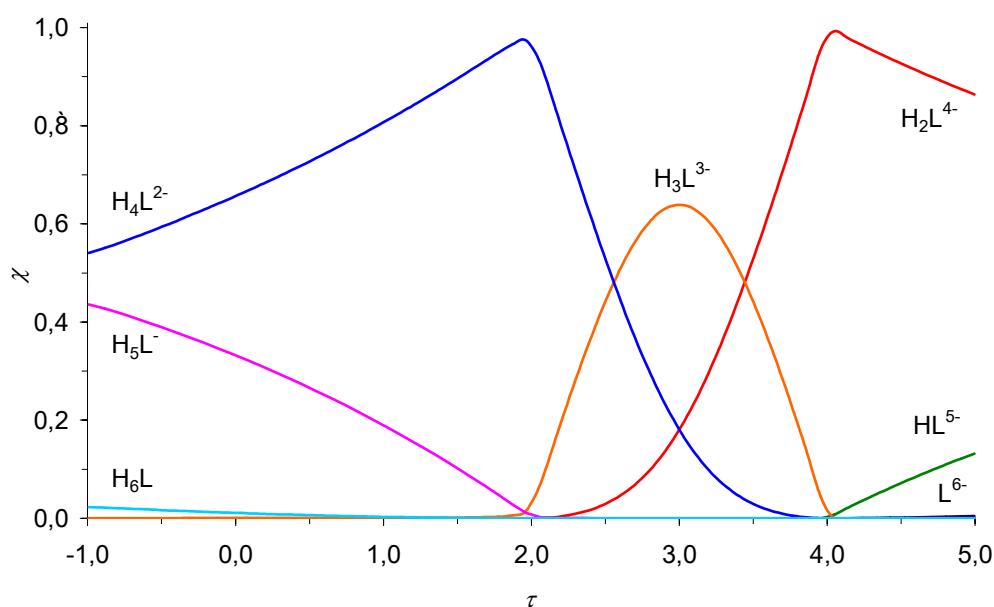


Abbildung 132: Molenbruchverteilungsdiagramm von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 vs. Titrationsgrad τ (Exp. Parameter: siehe Tabelle 81)

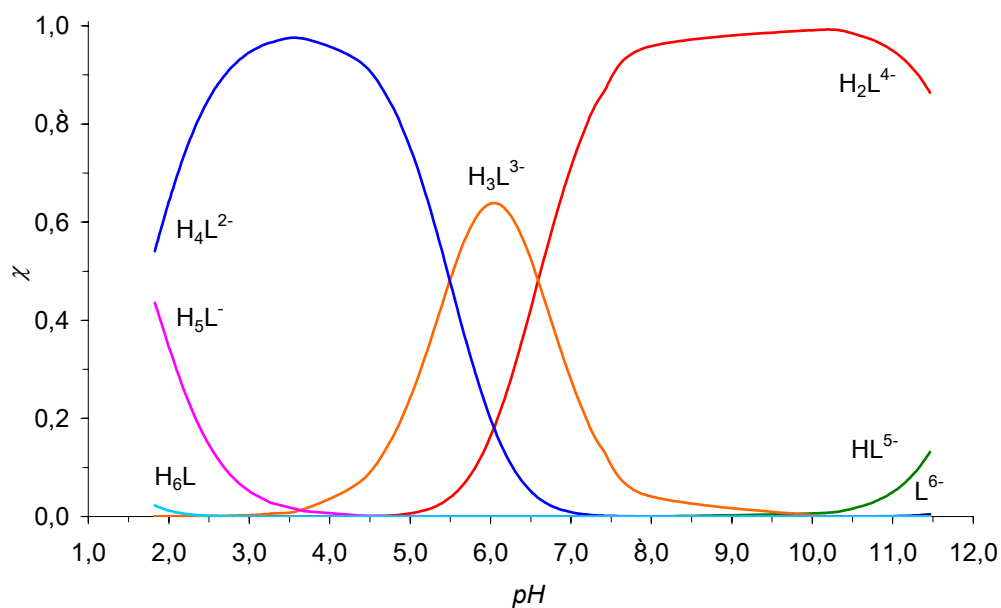


Abbildung 133: Molenbruchverteilungsdiagramm von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 vs. pH (Exp. Parameter: siehe Tabelle 81)

Abbildung 134 zeigt das Dissoziationsschema der 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 (vgl. [57]):

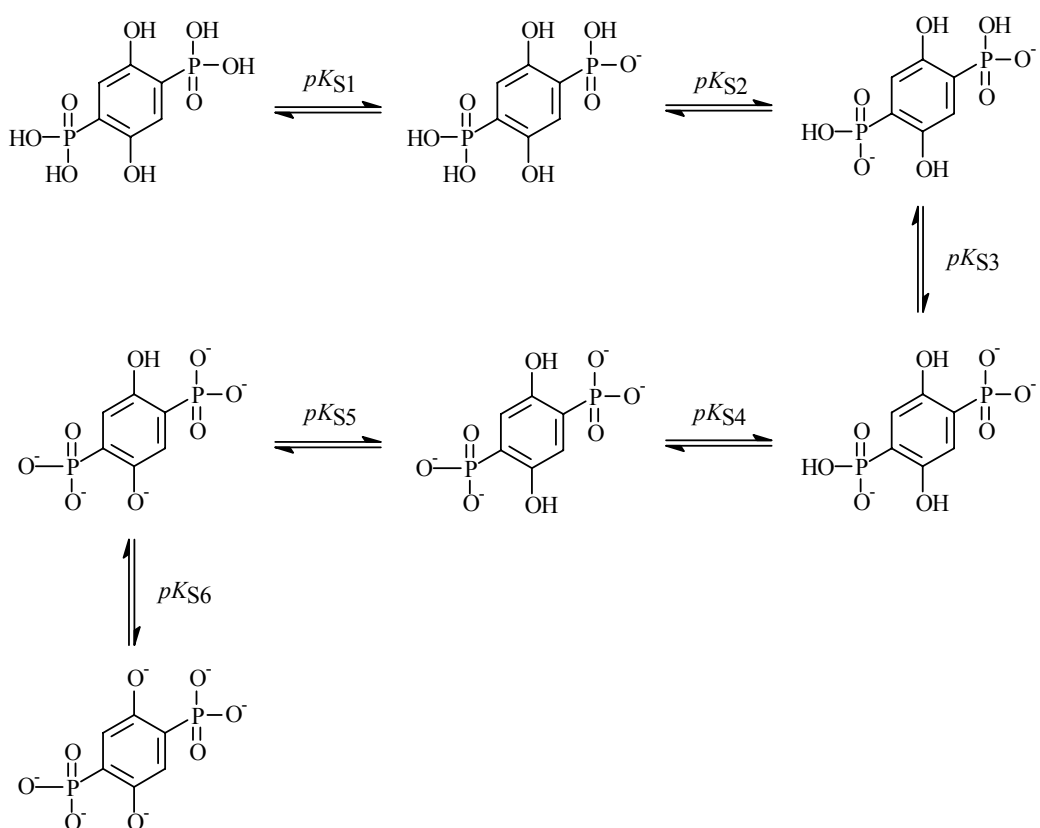


Abbildung 134. Dissoziationsschema von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6

2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bis(phosphonsäure) 6 [36] lässt sich als $[AX]_2$ -Spinsystem beschreiben. Die Zuordnung der Spins ist Abbildung 135 zu entnehmen.

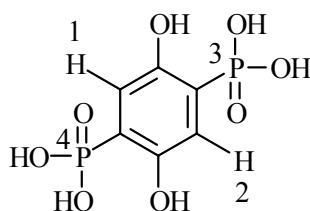


Abbildung 135: Strukturformel der 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 mit Zuordnung der Protonen und der Phosphoratome

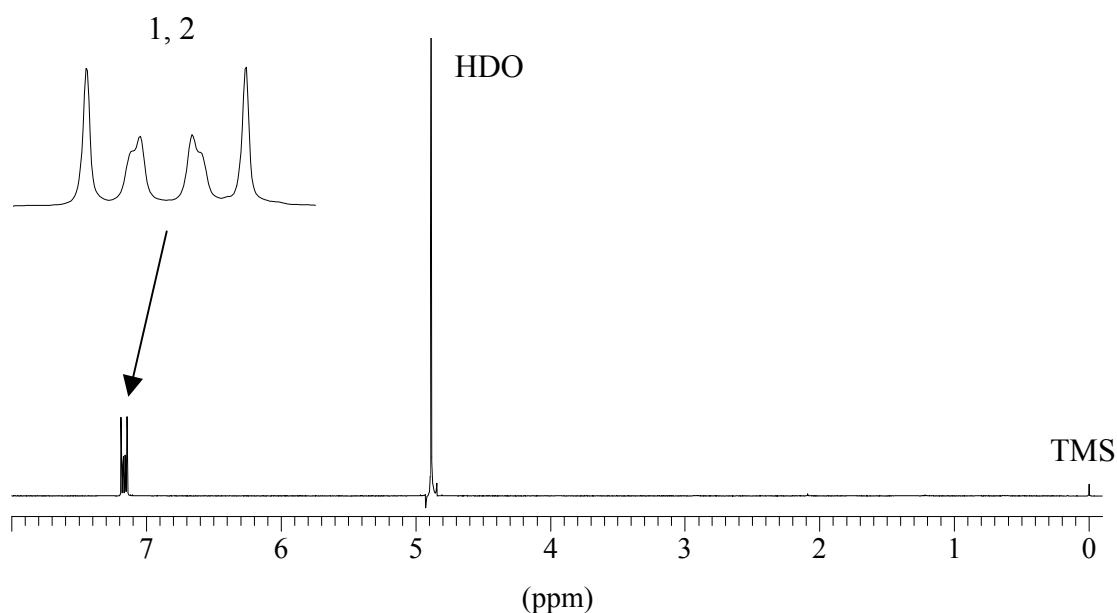


Abbildung 136: 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektrum der 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 ($c = 0,1211 \text{ mol/l}$ in D_2O)

In Tabelle 77 sind die Ergebnisse für die chemischen Verschiebungen aus der Iteration für die Protonen zu entnehmen.

SNr	Iso	Typ	δ [ppm]	ν [Hz]	Stabw [Hz]
1, 2	^1H	A	7,1648	3583,3489	$\pm 0,0005$
3, 4	^{31}P	X	14,050	7026,8527	-

Tabelle 77: Iterierte chemische Verschiebung des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums sowie chemische Verschiebung des 200,46 MHz- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrums von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 ($c = 0,1211 \text{ mol/l}$ in D_2O)

Tabelle 78 listet die aus der Iteration eines Präzisions- ^1H -NMR erhaltenen Kopplungskonstanten auf. Die statistischen Gütekriterien für die Iteration gibt Tabelle 79 wieder.

SNr	SNr	KIso	KTyp	J [Hz]	Stabw [Hz]
1	2	$^5J_{\text{HH}}$	$J_{\text{AA'}}$	0,6070	$\pm 0,0018$
1	3	$^4J_{\text{PH}}$	J_{AX}	6,9433	$\pm 0,0013$
1	4	$^3J_{\text{PH}}$	$J_{\text{AX'}}$	15,5541	$\pm 0,0013$
3	4	$^5J_{\text{PP}}$	$J_{\text{XX'}}$	1,4548	$\pm 0,0019$

Tabelle 78: Iterierte Kopplungskonstanten des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 ($c = 0,1211 \text{ mol/l}$ in D_2O)

Statistical Information	[AX] ₂ -Spinsystem
FSS	28,2377
NSP	17194
SDM	0,0405
R%	0,6826

Tabelle 79: Statistische Gütekriterien der Iterationen aus Tabelle 77 und Tabelle 78.

6.7.1 NMR-kontrollierte Titration von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure

6

Tabelle 80 gibt die gewählten Parameter für die NMR-kontrollierte Titration der 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 wieder.

Parameter	^{31}P -NMR	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR	^1H -NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46	202,46	500,13
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	8192	8192	32768
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	8192	8192	32768
Zahl der Scans (NS)	256	256	128
Spektrale Breite (SW) [Hz]	4045,307	4045,307	10330,579
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	1822,10	1822,10	3088,51

Tabelle 80: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 500 von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6

Vor der Aufnahme des ersten Spektrums eines jeden Titrationsgrades wurde eine Mischzeit von 300 Sekunden und eine Wartezeit von 420 Sekunden eingehalten.

Die analytischen Parameter für die NMR-Messungen werden in Tabelle 81 aufgelistet.

Substanz: 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure <u>6</u>			
Molmasse [g/mol]:	270,07	Vorlagevolumen [ml]:	25,00
m (Substanz) [mg]:	40,5		
m (Wirkstoff) [mg]:	40,3	n (Wirkstoff) [mmol]:	0,1499
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0060
Zusatz HCl [mmol]:	0,1499	c (HCl) [mol/l]:	0,0989
I (Ionenpuffer: NaCl) [mol/l]:	0,1	c (NaCl) [mol/l]:	0,5000
		V _Z (NaCl) [ml]:	5,00
c (Titrator: NaOH) [mol/l]:	0,1052		

Tabelle 81: Experimentelle Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 500 von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 vs. NaOH

6.7.1.1 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6

Abbildung 137 zeigt den Stack- und Kontur-Plot (δ_{P} vs. τ) der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6. Aufgrund des sehr guten Signal-Rausch-Verhältnisses können die chemischen Verschiebung und Halbwertsbreiten mit Hilfe der automatischen Deconvolution ermittelt werden.

Zu Beginn der Titration dominieren H_4L^{2-} und H_5L^- . Durch den abschirmenden Einfluss der Hydroxy-Gruppen wandert das Resonanzsignal der Phosphoratome zu hohem Feld. Die partielle Tieffeldverschiebung zwischen $\tau = 2$ bis $\tau = 4$ (mit einem Maximum bei $\tau = 3$) ist auf die Bildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen.

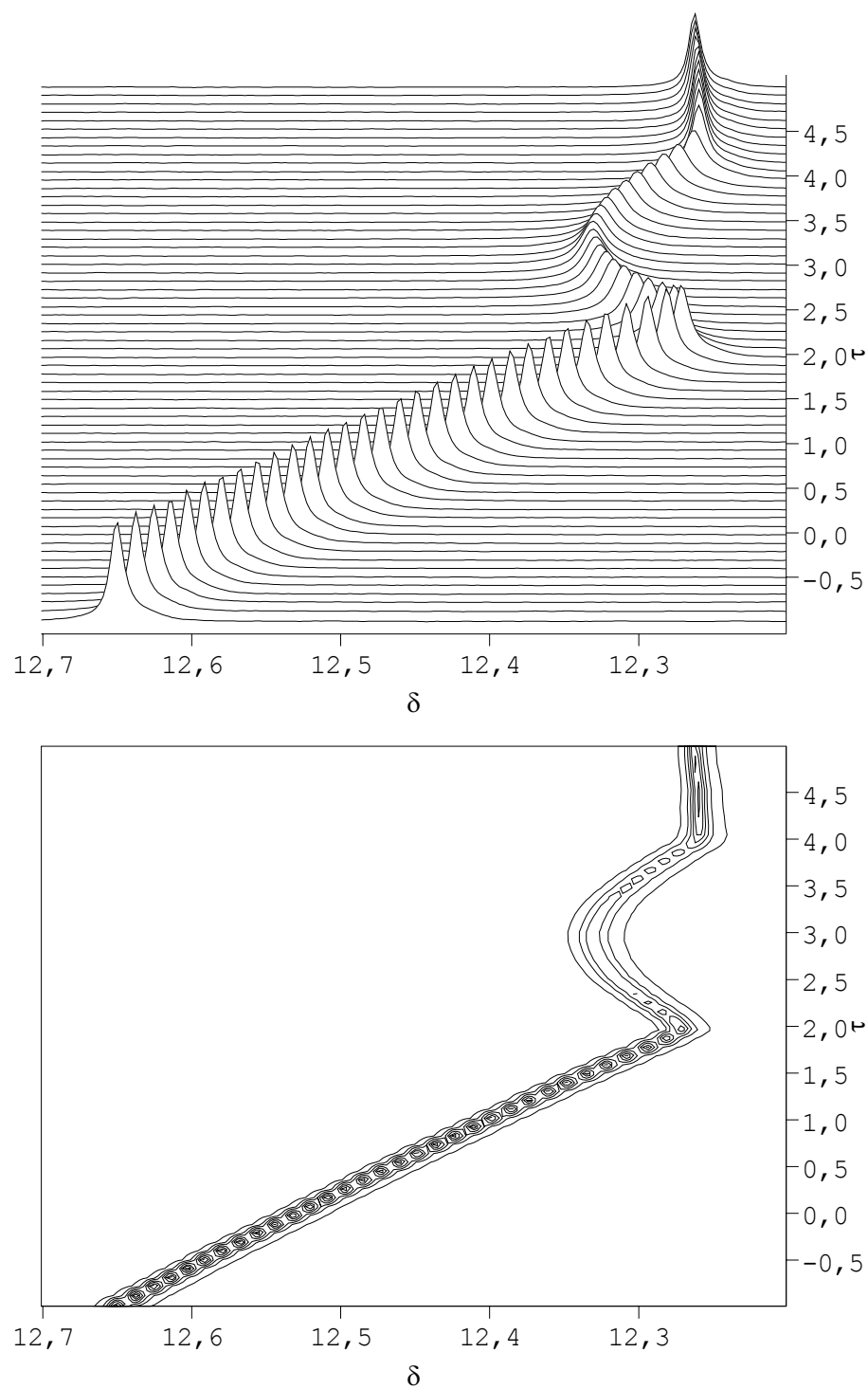


Abbildung 137: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 (δ_{P} vs. τ)

Abbildung 138 zeigt den Stack- und Kontur-Plot (δ_{P} vs. pH) der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6.

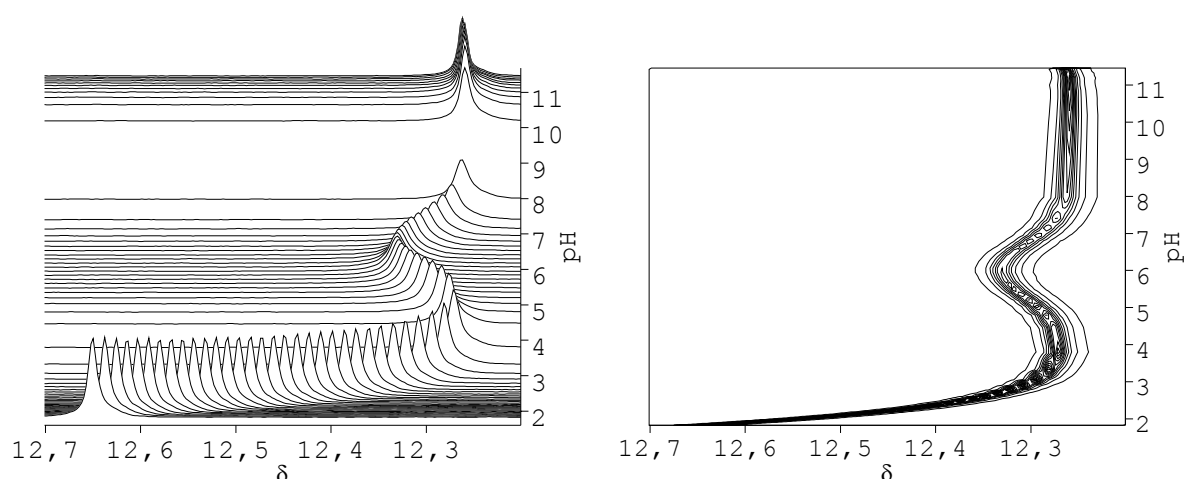


Abbildung 138: *links*: Stack-Plot - *rechts*: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 (δ_P vs. pH)

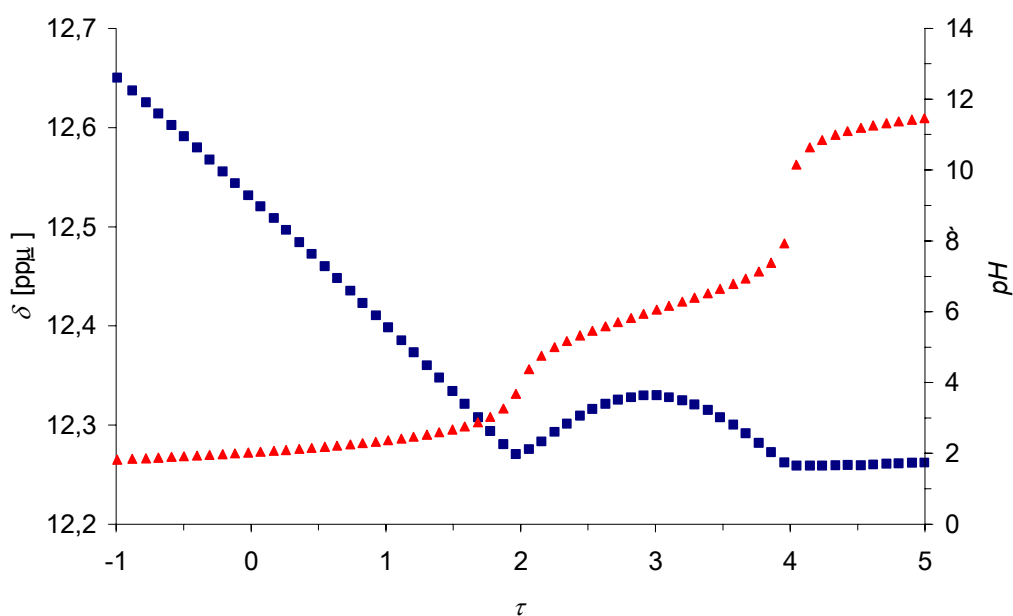


Abbildung 139: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6

Abbildung 140 ist zu entnehmen, dass die Deprotonierung der beiden Phosphonsäure-Funktionen bis pH = 7,5 abgeschlossen ist.

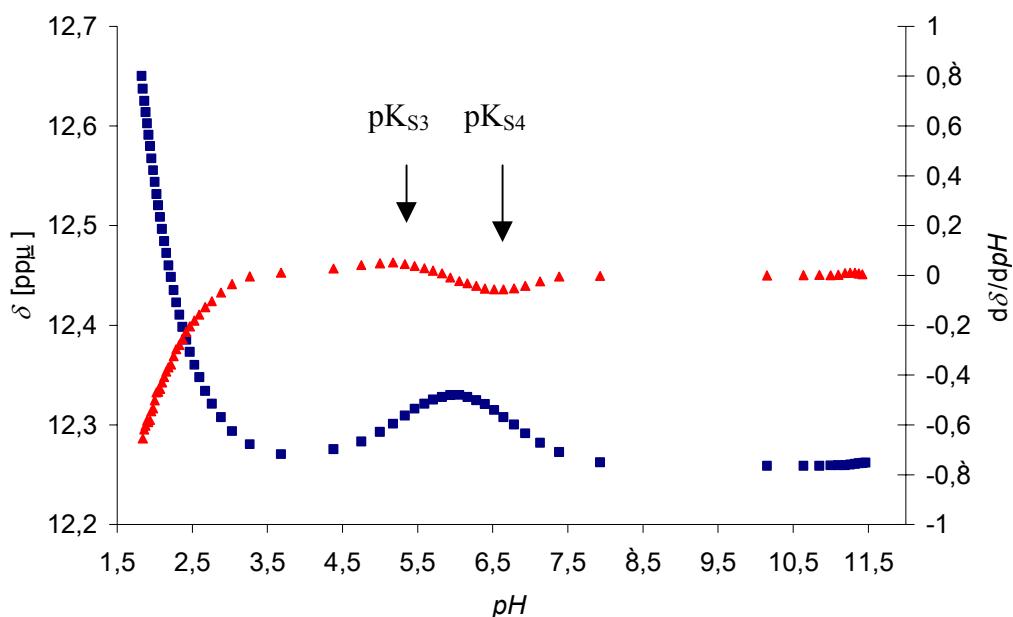


Abbildung 140: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und der 1. Ableitung $d\delta_P/dpH$ (▲) vs. pH-Wert der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}P\{^1H\}$ -NMR-Messung von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6

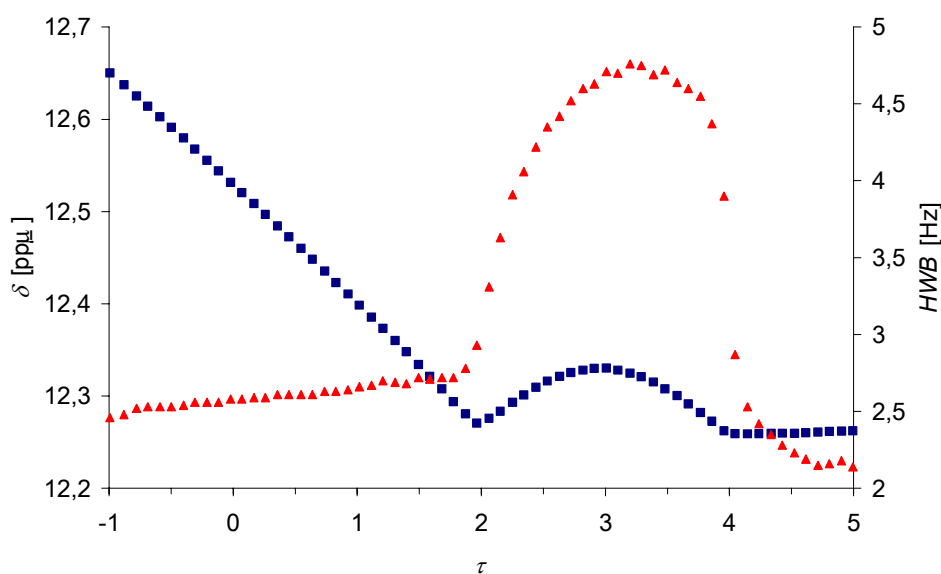


Abbildung 141: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und der Halbwertsbreite HWHH (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}P\{^1H\}$ -NMR-Messung von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6

Die Ermittlung der ionenspezifischen Parameter (Tabelle 82) zeigt, dass die Bestimmung der ionenspezifischen Parameter δ_{H_6L} , δ_{HL}^{5-} und δ_L^{6-} fehlerbehaftet sind. Da wegen der gewählten experimentellen Bedingungen (siehe Abbildung 132) diese Spezies nur geringe

Beiträge zur mittleren chemischen Verschiebung $\langle \delta_P \rangle$ liefern können, werden die Parameter mit größeren Fehlern ermittelt.

Spezies	δ_P [ppm]	Δ_P [ppm]
H_6L	$13,232 \pm 0,031$	$-0,160 \pm 0,0316$
H_5L^-	$13,392 \pm 0,005$	$1,126 \pm 0,005$
H_4L^{2-}	$12,267 \pm 0,001$	$-0,108 \pm 0,001$
H_3L^{3-}	$12,374 \pm 0,001$	$0,116 \pm 0,001$
H_2L^{4-}	$12,259 \pm 0,001$	$-0,005 \pm 0,036$
HL^{5-}	$12,263 \pm 0,036$	$-0,678 \pm 0,594$
L^{6-}	$12,941 \pm 0,593$	

Tabelle 82: Ionenspezifische Parameter von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6

6.7.1.2 202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure

Abbildung 142 zeigt den Stack-Plot der 202,46 MHz ^{31}P -NMR Messung von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 (δ_P vs. τ).

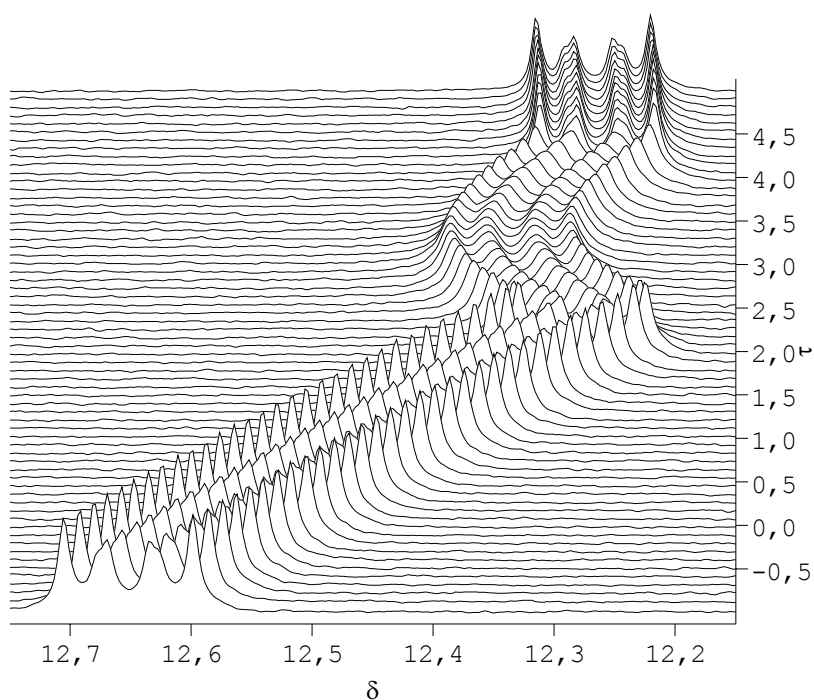


Abbildung 142: Stack-Plot der 202,46 MHz ^{31}P -NMR Messung der 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 (δ_P vs. τ)

Die Betrachtung des Stack-Plots der ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration der 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 zeigt, dass über weite Teile der Titration die Parameter chemische Verschiebung, Halbwertsbreite und Kopplungskonstante aus den Einzelspektren ermittelt werden könnten. Wegen der Linienverbreiterung im Bereich $2 < \tau < 4$ wird die Bestimmung der Kopplungskonstanten erschwert. Für bestimmte Titrationsgrade werden die Kopplungskonstanten in Tabelle 83 aufgeführt.

	$^3J_{\text{PH}}$ [Hz]	$^4J_{\text{PH}}$ [Hz]	$^5J_{\text{PP}}$ [Hz]
$\tau = -1$	15,81	5,93	1,49
$\tau = 0$	15,81	5,88	1,49
$\tau = 1$	15,80	5,43	1,48
$\tau = 2$	15,80	5,43	1,48
$\tau = 4$	14,33	4,45	1,49
$\tau = 5$	14,32	4,47	1,48

Tabelle 83: Kopplungskonstanten der 202,46 MHz ^{31}P -NMR-Spektren von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 ($^2J_{\text{HH}} = 0$ Hz)

Mit zunehmender Deprotonierung nehmen Werte für die $^3J_{\text{PH}}$ - und $^4J_{\text{PH}}$ -Kopplungen ab, während die Werte für die $^5J_{\text{PP}}$ -Kopplungen fast unverändert bleibt.

6.7.1.3 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6

Abbildung 144 zeigt den Stack-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierten Titration der 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 gegen 0,1 M NaOH. Die Deprotonierung verschiebt das Resonanzsignal der Protonen am Aromaten im Verlauf der Deprotonierung um maximal $\Delta_{\text{max}} = 0,15$ ppm.

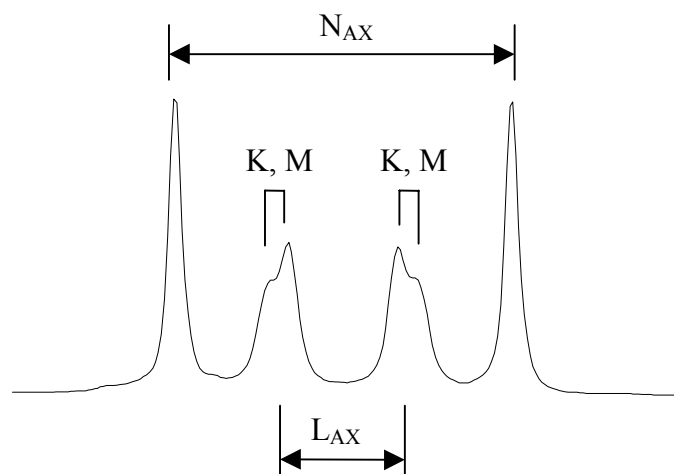


Abbildung 143: Beschreibung der Kopplungskonstanten im $[AX]_2$ -Spinsystem

Die Kopplungen berechnen sich wie folgt:

$$N_{AX} = {}^4J_{PH} + {}^3J_{PH}$$

$$L_{AX} = {}^4J_{PH} - {}^3J_{PH}$$

$$K = {}^5J_{HH} + {}^5J_{PP}$$

$$M = {}^5J_{HH} - {}^5J_{PP}$$

In Tabelle 84 werden für ausgewählte Titrationsgrade die chemischen Verschiebungen δ_H und die Kopplungskonstanten angegeben.

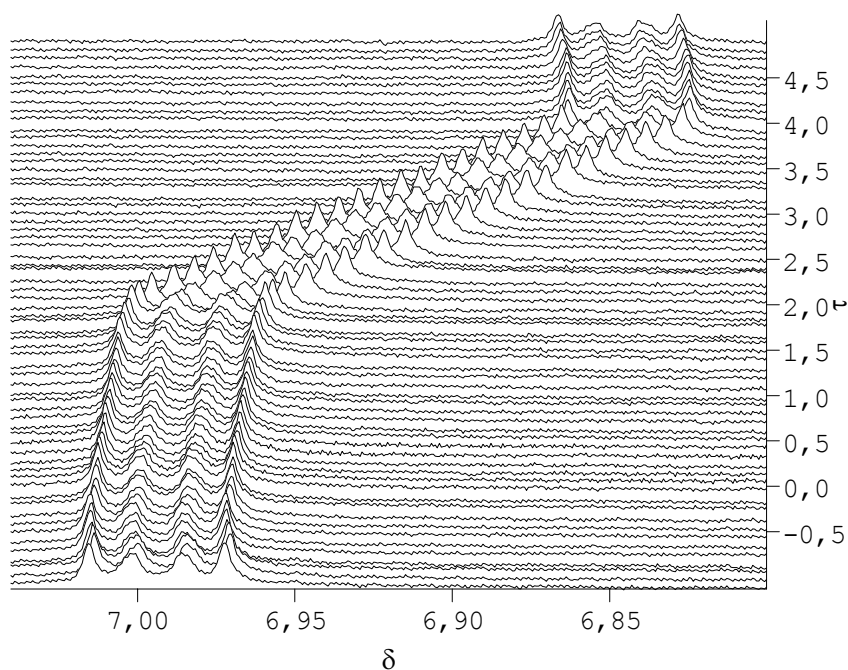


Abbildung 144: Stack-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR Messung von 2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bisphosphonsäure 6 (δ_H vs. τ)

	δ_{H} [ppm]	$^3J_{\text{PH}}$ [Hz]	$^4J_{\text{PH}}$ [Hz]
$\tau = -1$	6,9939	15,76	5,99
$\tau = 0$	6,9911	15,70	6,14
$\tau = 1$	6,9867	15,76	5,67
$\tau = 2$	6,9782	15,61	5,52
$\tau = 4$	6,8458	14,19	5,05
$\tau = 5$	6,8474	14,50	4,42

Tabelle 84: Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten der 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektren von 2,5-Dihydroxy-benzol-1,4-bisphosphonsäure 6 (Bestimmt aus den Spektren aus Abbildung 144)

Mit zunehmender Deprotonierung nehmen Werte für die $^3J_{\text{PH}}$ - und $^4J_{\text{PH}}$ -Kopplungen ab. Da die Spektren aufgrund des Signal-Rausch-Verhältnisses nur wenig hochaufgelöst sind, können die Werte für die Kopplungskonstanten $^5J_{\text{PP}}$ und $^5J_{\text{HH}}$ nicht bestimmt werden.

6.8 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Protolyseverhalten des 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 studiert.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 werden jeweils drei Titrationsen durchgeführt.

Titration gegen 0,1 M TMAOH: Jeweils 0,18 mmol Ligand mit einer Zugabe von 0,36 mmol HCl ($c = 0,1008 \text{ mol/l}$) und 5,00 ml 0,5000 M TMACl ($I = 0,1$) werden mit bi.-dest. Wasser auf ein Volumen von 25,00 ml aufgefüllt. Die Titrationsen erfolgen unter Stickstoffatmosphäre gegen 0,1010 M TMAOH bei $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Titration gegen 1,0 M TMAOH: Jeweils 1,75 mmol Ligand mit einer Zugabe von 2,50 mmol HCl ($c = 0,9530 \text{ mol/l}$) und 2,74 g TMACl ($I = 1,0$) werden mit bi.-dest. Wasser auf ein Volumen von 25,0 ml aufgefüllt. Unter Stickstoffatmosphäre erfolgen die Titrationsen gegen 1,0220 M TMAOH bei $25,0 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Titратор	$\text{pK}_{\text{s}1}$	$\text{pK}_{\text{s}2}$	$\text{pK}_{\text{s}3}$	RMS
0,1 M TMAOH	$1,15 \pm 0,05$	$5,88 \pm 0,01$	$6,75 \pm 0,01$	0,054
1,0 TMAOH	$0,65 \pm 0,14$	$5,90 \pm 0,11$	$6,57 \pm 0,06$	0,154

Tabelle 85: Dissoziationskonstanten der 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7

Abbildung 145 zeigt das makroskopische Molenbruchverteilungsdiagramm der Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 gegen 1,0 M TMAOH. Bei dieser Verbindung handelt es sich um eine zweibasige Säure. Wie Tabelle 85 und Abbildung 145 entnommen werden kann, erhält man durch die Deprotonierung drei Dissoziationskonstanten beziehungsweise vier Spezies. Das Auftreten von vier Spezies lässt sich durch eine Ringöffnung erklären. Somit wandelt sich die zweibasige Säure (geschlossener Ring) in eine dreibasige Säure (offener Ring) um. Alleine durch die Werte für die Dissoziationskonstanten kann noch keine Aussage getroffen werden, ab welchem Deprotonierungsschritt diese konzertierte Reaktion aus Ringöffnung und Protonentransfer stattfindet. Daher werden die Spezies im Molenbruchverteilungsdiagramm zunächst mit arabi-

schen Ziffern gekennzeichnet. In der Zusammenfassung des Kapitels (Kapitel 6.8.3) wird eine Zuordnung der Spezies erfolgen.

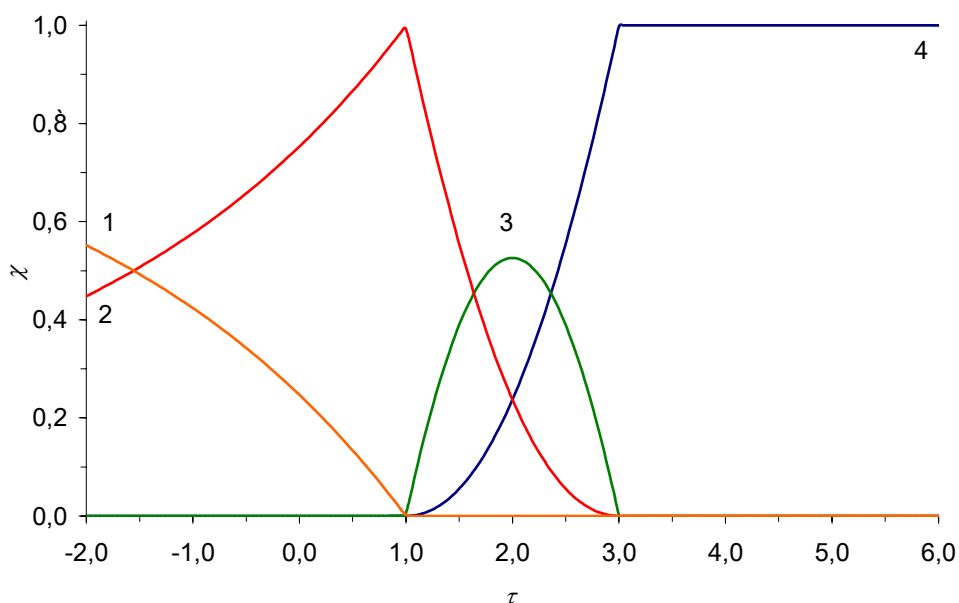


Abbildung 145: Molenbruchverteilungsdiagramm von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** vs. Titrationsgrad τ (Exp. Parameter: siehe Tabelle 97)

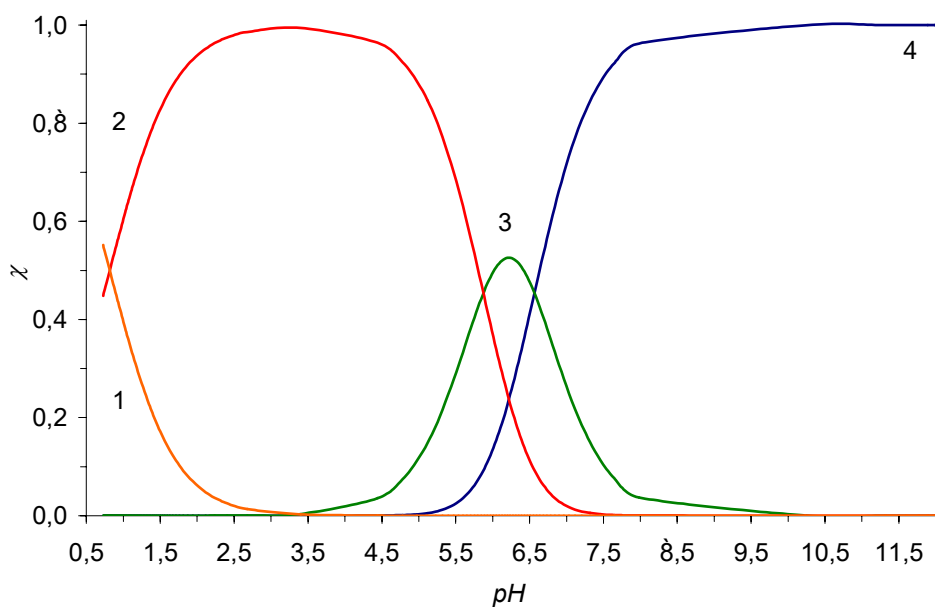


Abbildung 146: Molenbruchverteilungsdiagramm von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** vs. pH (Exp. Parameter: siehe Tabelle 97)

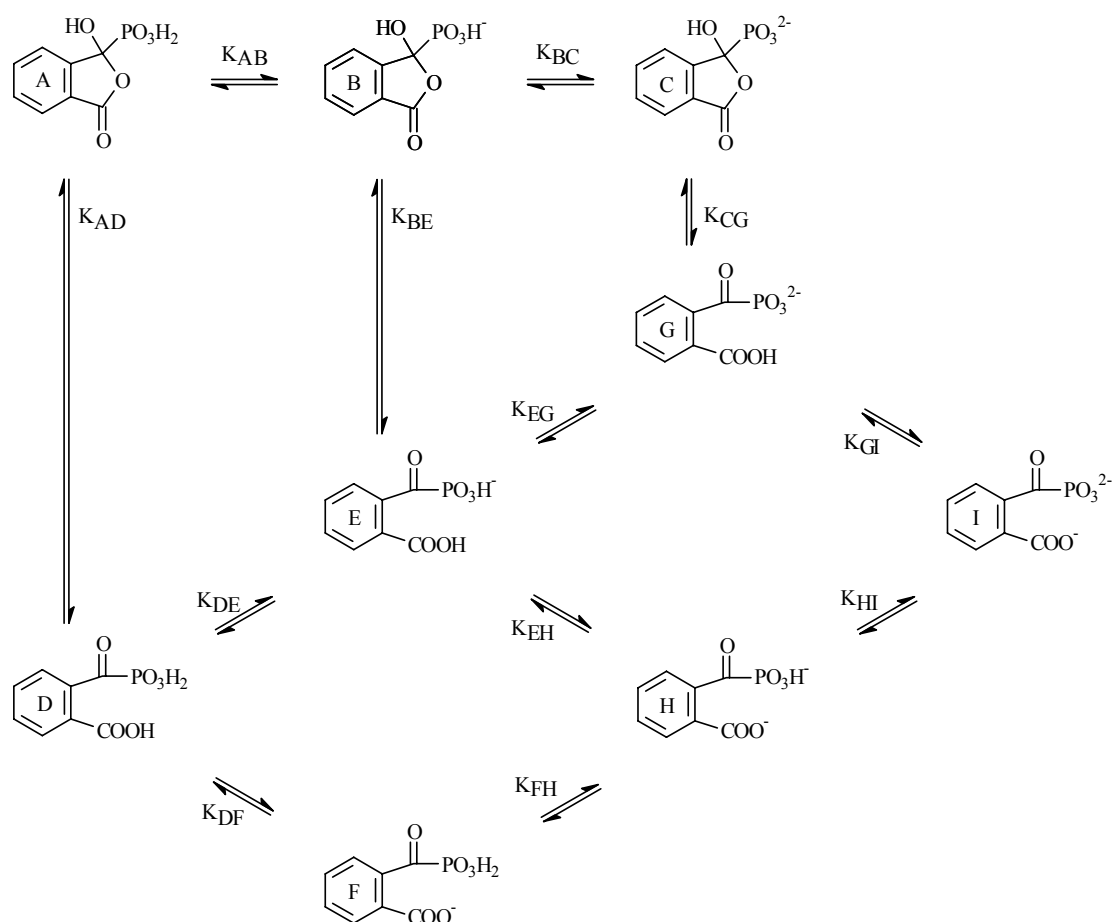


Abbildung 147: Hypothetisches Dissoziationsschema mit allen Gleichgewichten.

Abbildung 147 zeigt verschiedene hypothetische Möglichkeiten des Dissoziationsverhaltens des 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7. Mit Hilfe NMR-spektroskopischer Untersuchungen kann gezeigt werden, dass die Ringöffnung erst während der Deprotonierung stattfindet. Wie im Verlauf dieser Arbeit gezeigt wird, handelt es sich dabei um einen reversiblen Prozess.

Unter Verwendung der ^{31}P - und der ^{13}C -NMR kann der Ringöffnungs- und Ringschlussprozess nachgewiesen werden. Im sauren Milieu gibt das α -C-Atom zur Phosphonsäurefunktion ein Resonanzsignal bei $\delta = 107,4$ ppm (d, $^1J_{\text{PC}} = 197,7$ Hz). Durch die Zugabe von Lauge verschwindet dieses Resonanzsignal und ein neues Resonanzsignal bei $\delta = 219,1$ ppm (d, $^1J_{\text{PC}} = 159,9$ Hz) tritt auf. Da dieses Resonanzsignal und die Größe der Kopplungskonstante typisch für *ortho*-Phosphonoformylbenzoate sind [117], lässt dies auf die Bildung einer *ortho*-Phosphonoformylbenzoylsäure schließen. Im NMR-Experiment konnte nachgewiesen werden, dass durch erneutes Ansäuern der Probe das ^{13}C -

Resonanzsignal bei $\delta = 219,1$ ppm verschwindet und das Resonanzsignal für das benzyliche Kohlenstoffatom bei $\delta = 107,4$ ppm wieder erscheint.

In der Literatur ist die pH-Abhängigkeit von Ring-Kette-Tautomerie von Oxocarboxylsäuren und deren Derivaten genau dokumentiert [118] [119]. Die Geschwindigkeit der Cyclisierung ist die Konsequenz aus der hohen Reaktivität der Carbonylgruppen, die durch den stark elektronenziehenden Einfluss der Phosphonyl-Gruppe verursacht wird [120].

Durch Einzelprobenmessungen bei verschiedenen Titrationsgraden konnte ermittelt werden, dass das Resonanzsignal für das benzyliche Kohlenstoffatom bis zu einem Titrationsgrad von $\tau = 1$ im Spektrum auftritt. Erst am Titrationsgrad von $\tau = 3$ tritt wieder ein scharfes Resonanzsignal für der *o*-Phosphonoformylbenzoylsäure bei $\delta = 219,1$ ppm auf. In Abbildung 148 ist der Stack-Plot von 125,77 MHz $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Einzelmessungen abgebildet. Zur Verdeutlichung sind die betreffenden Signale gekennzeichnet.

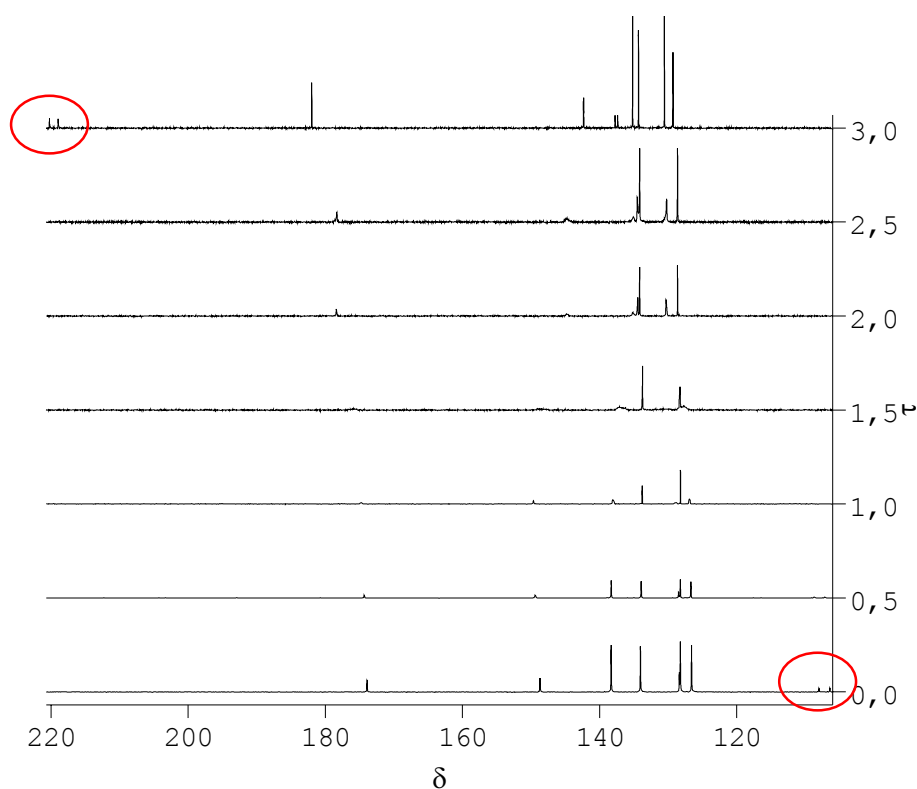


Abbildung 148: Stack-Plot der 125,77 MHz $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR single-sample-Messungen von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7

Die Zuordnung der Kerne erfolgt über 1-D Spektren (^1H -, $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ - und ^{31}P -NMR-Spektren) sowie 2-D Spektren (H,C-COSY und HMBC).

Zur Theorie und Funktion der 2-D Spektren sei auf [116] verwiesen.

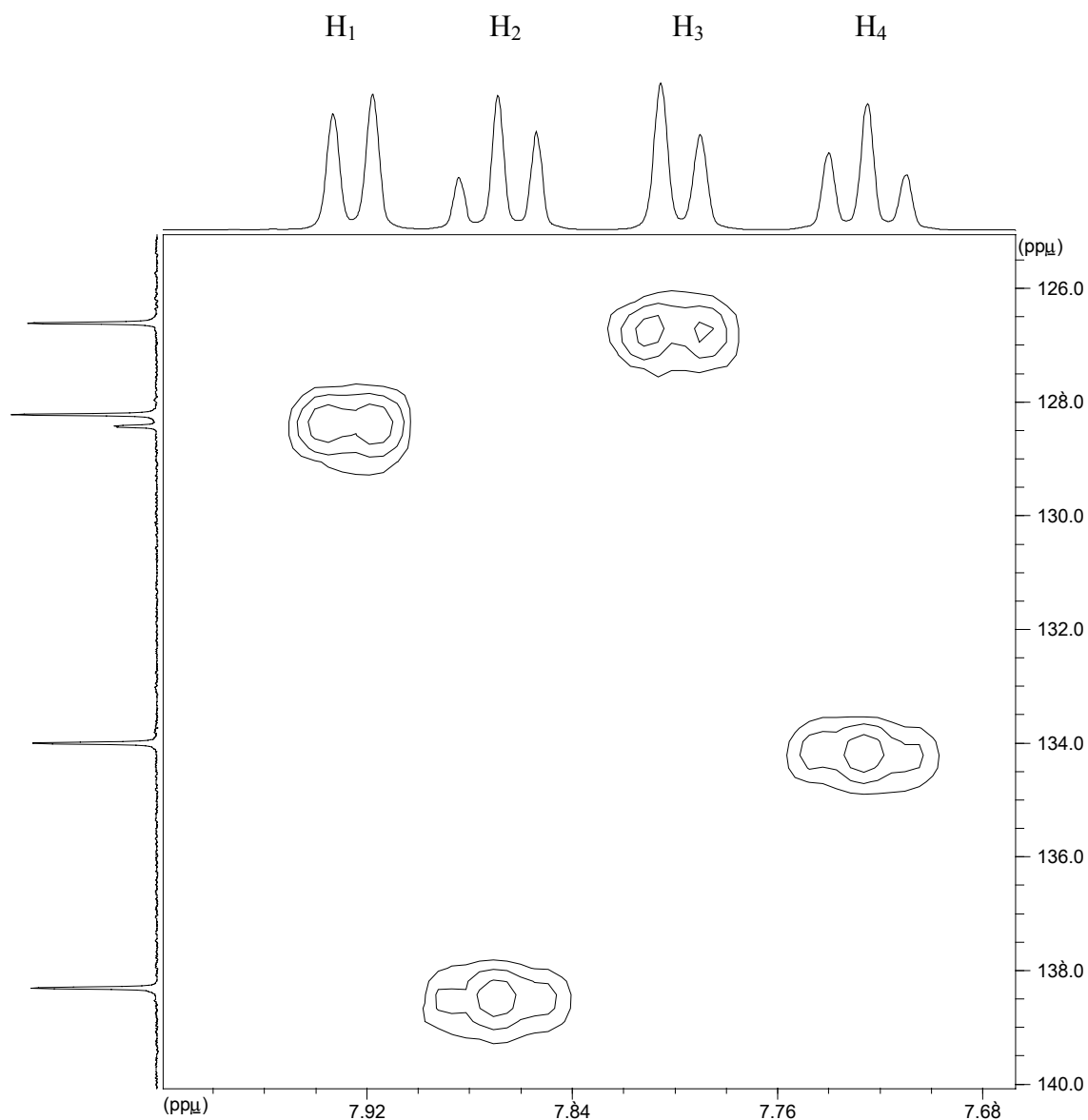


Abbildung 149: H,C -COSY von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7**
($c = 0,2510 \text{ mol/l}$ in D_2O)

	δ_H [ppm]	δ_C [ppm]
H₁	7,9262	128,229
H₂	7,8693	138,289
H₃	7,7980	126,622
H₄	7,7258	133,998

Tabelle 86: Auflistung der Korrelationssignale im 1H - und $^{13}C\{^1H\}$ -NMR des H,C -COSY
($c = 0,2510 \text{ mol/l}$ in D_2O)

H₁ H₂ H₃ H₄

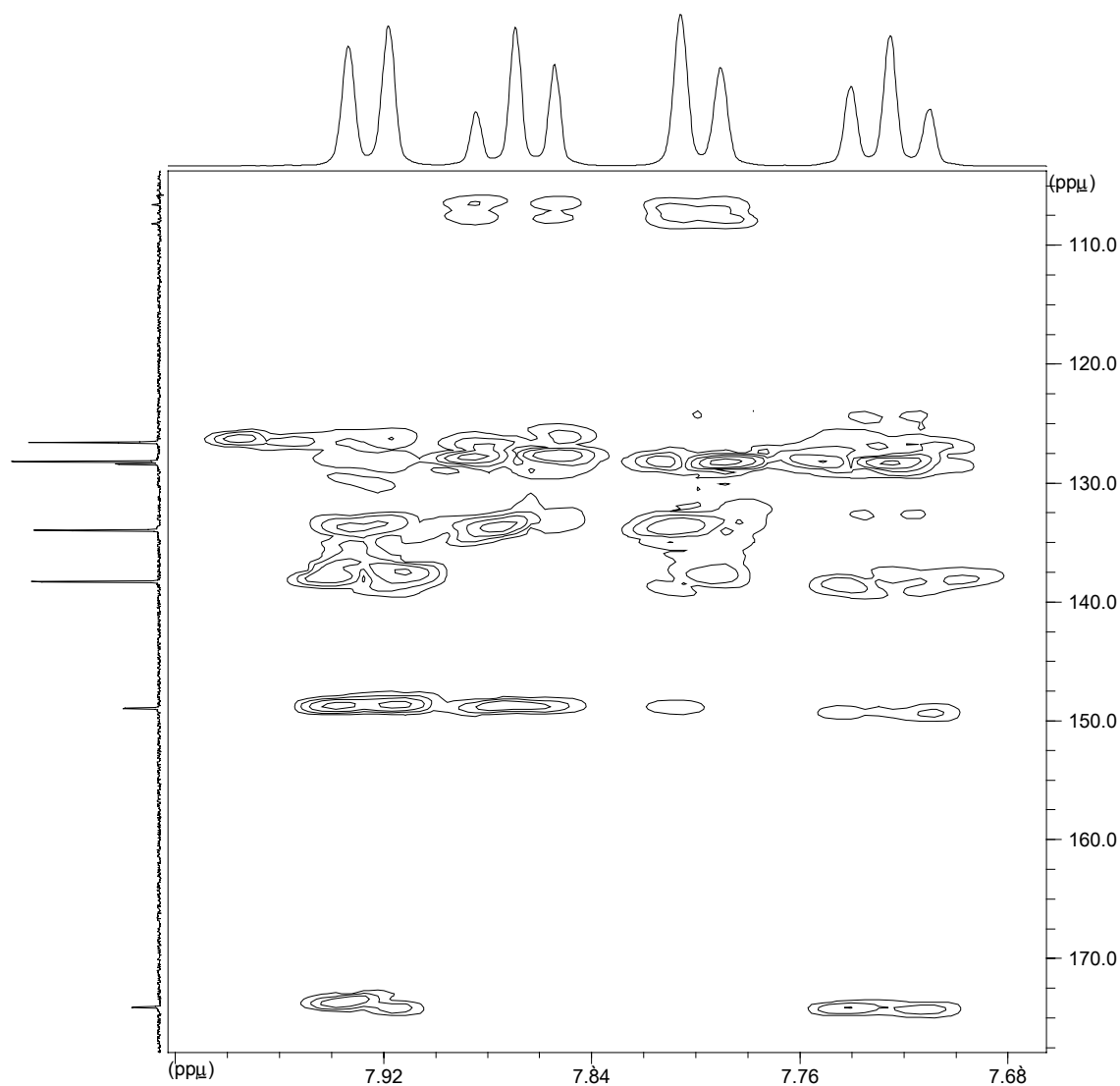


Abbildung 150: HMBC von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7
($c = 0,2510 \text{ mol/l}$ in D_2O)

	δ_H [ppm]	δ_C [ppm]
H₁	7,9262	126,622; 128,229 ; 133,998; 138,289; 148,941; 174,044
H₂	7,8693	107,439; 126,622; 128,229; 133,998; 148,941
H₃	7,7980	107,439; 126,622 ; 128,229; 133,998; 138,289; 148,941
H₄	7,7258	126,622; 128,229; 133,998 ; 138,289; 148,941; 174,044

Tabelle 87: Auflistung der Korrelationssignale im 1H - und $^{13}C\{^1H\}$ -NMR im HMBC
($c = 0,2510 \text{ mol/l}$ in D_2O)

H₃

H₄ H₂ H₁

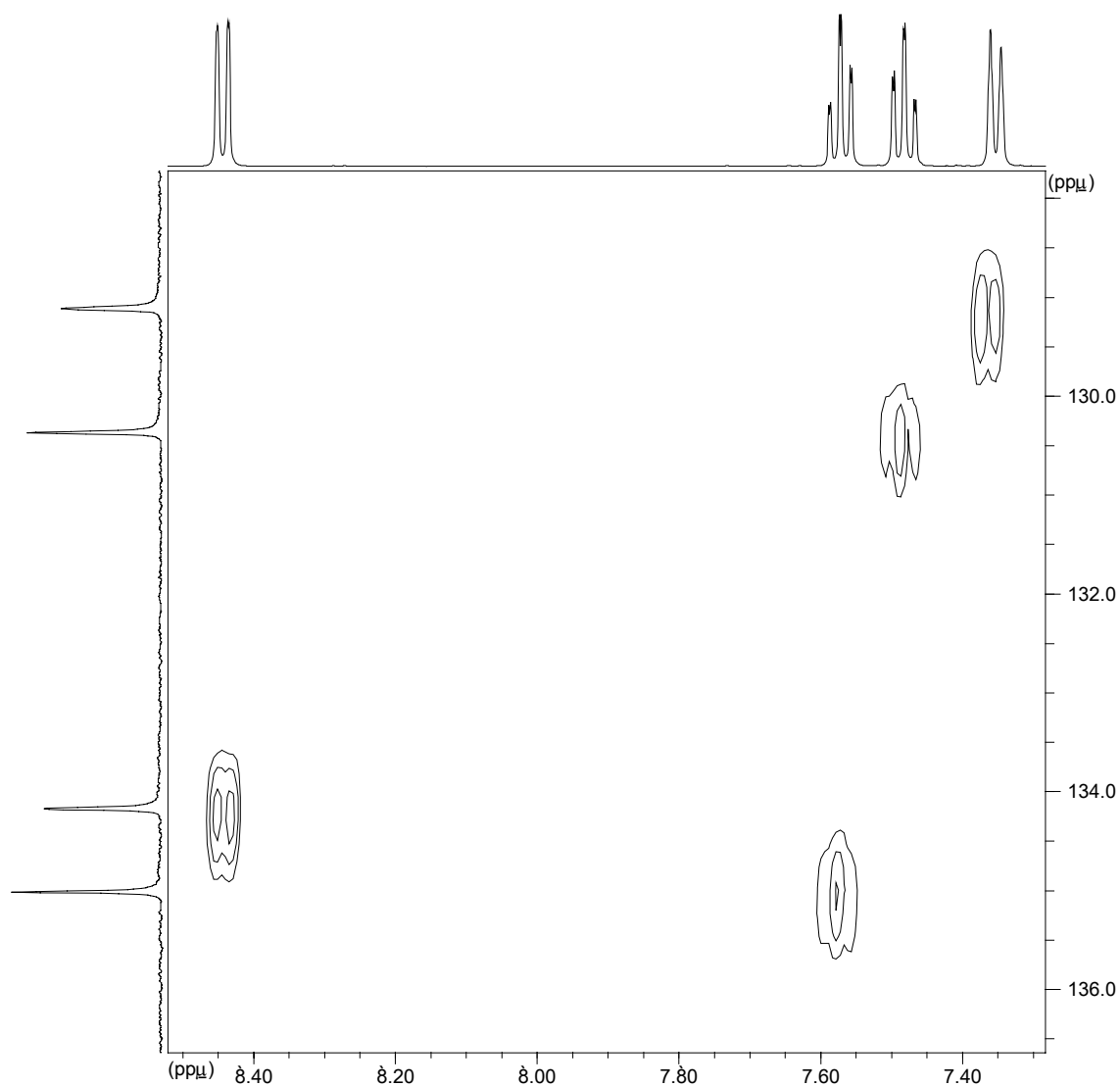


Abbildung 151: H,C -COSY von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7
($c = 0,1919 \text{ mol/l}$ in 1 M KOD)

	δ_H [ppm]	δ_C [ppm]
H₁	7,3534	129,123
H₂	7,4826	130,3764
H₃	8,4427	134,171
H₄	7,5729	135,013

Tabelle 88: Auflistung der Korrelationssignale im 1H - und $^{13}C\{^1H\}$ -NMR des H,C -COSY
($c = 0,1919 \text{ mol/l}$ in 1 M KOD)

H₃

H₄ H₂ H₁

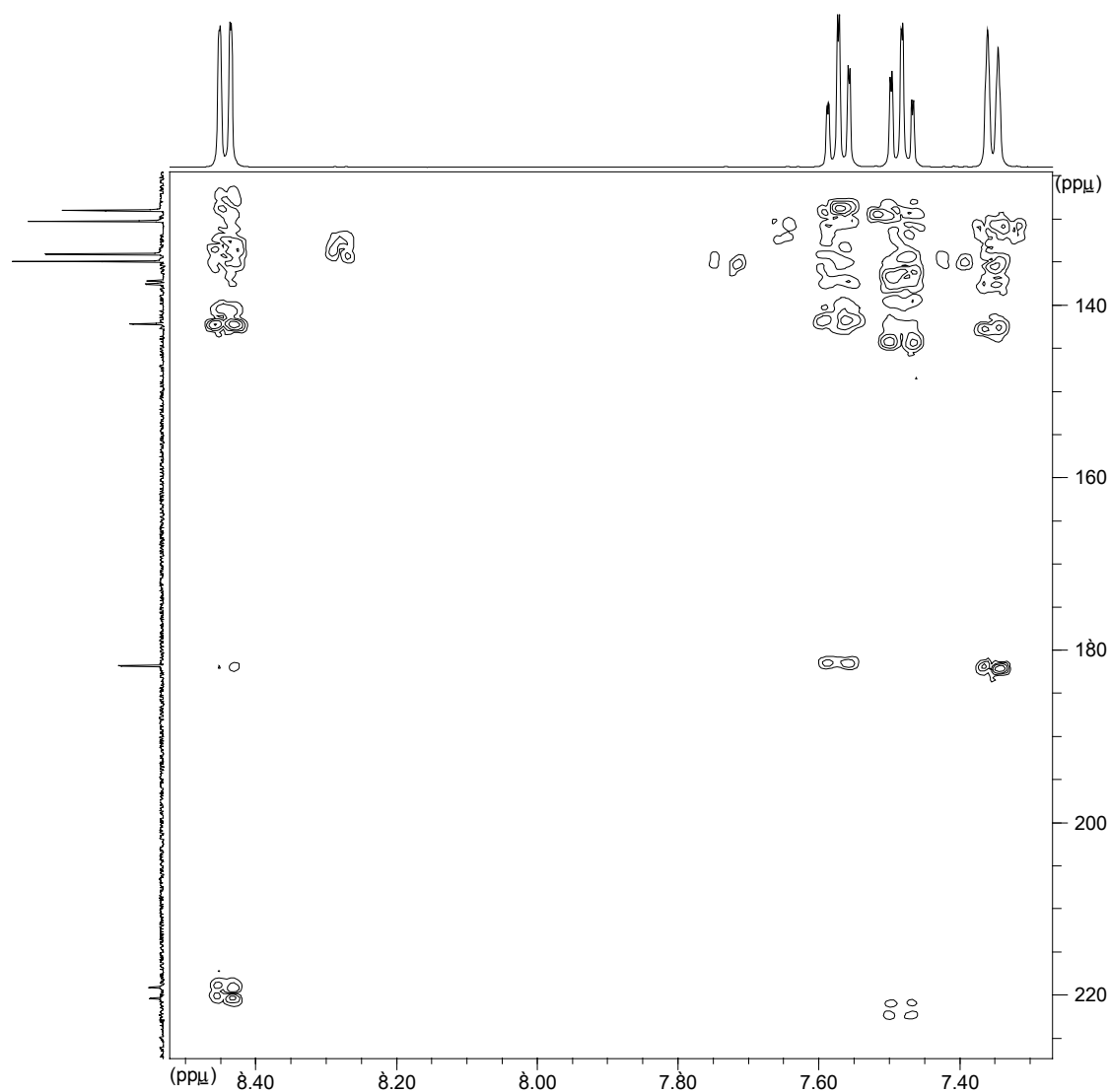


Abbildung 152: HMBC von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7**
($c = 0,1919 \text{ mol/l}$ in 1 M KOD)

	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]
H₁	7,3534	130,376; 134,171; 135,013; 137,456; 142,240; 181,811
H₂	7,4826	129,123; 134,171; 135,013; 137,456; 142,240; 219,679
H₃	8,4427	129,123; 130,376; 134,171 ; 135,013; 142,240; 181,811; 219,679
H₄	7,5729	129,123; 130,376; 134,171; 135,013 ; 137,456; 142,240; 181,811

Tabelle 89: Auflistung der Korrelationssignale im ^1H - und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR im HMBC
($c = 0,1919 \text{ mol/l}$ in 1 M KOD)

3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** lässt sich als ABCDX-Spinsystem beschreiben. Um die ionenspezifischen Parameter im ^1H -NMR ermitteln zu können, muss

das Spektrum iterativ berechnet werden. Aus der Auswertung der ^1H -COSY- und HMBC-Spektren resultiert die Bezeichnung der Kerne in Abbildung 153.

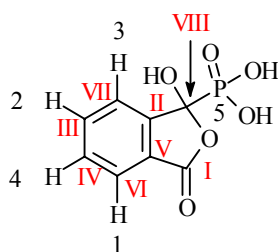


Abbildung 153: Strukturformel vom 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** mit Zuordnung der Protonen, der Kohlenstoffatome und des Phosphoratoms

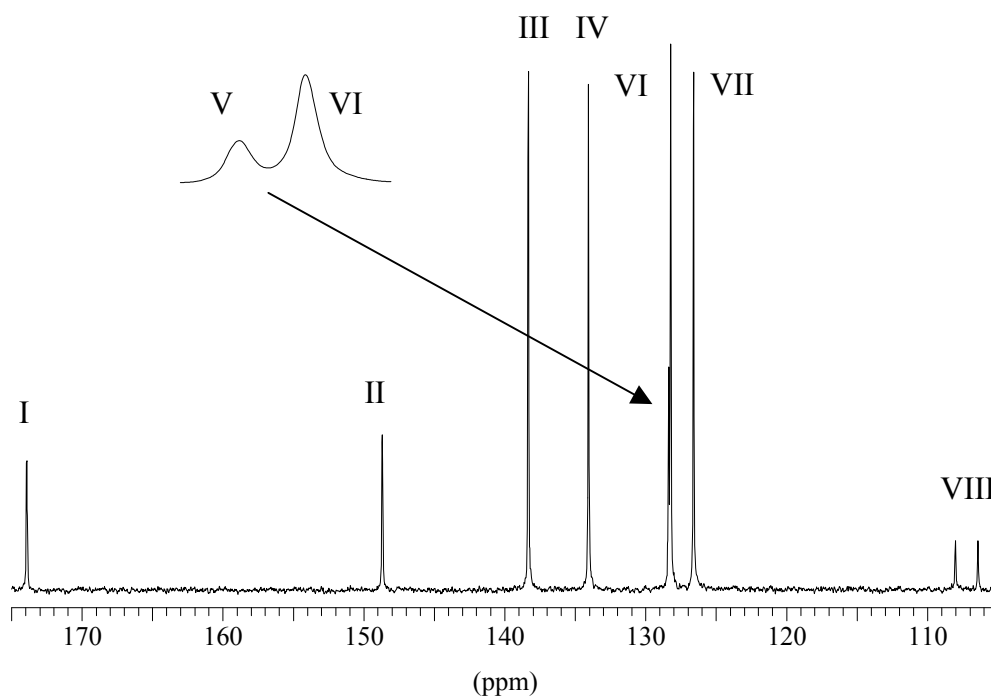


Abbildung 154: 125,77 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** ($c = 0,2510 \text{ mol/l}$ in D_2O)

	C_I	C_II	C_III	C_IV	C_V	C_VI	C_VII	C_VIII
δ_c [ppm]	174,044	148,941	138,289	133,998	128,397	128,229	126,622	107,439

Tabelle 90: Chem. Verschiebung δ_c aus dem 125,77 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** ($c = 0,2510 \text{ mol/l}$ in D_2O)

Abbildung 155 zeigt für den aromatischen Bereich im 500,13 MHz ^1H -NMR das experimentelle und das simulierte NMR-Spektrum.

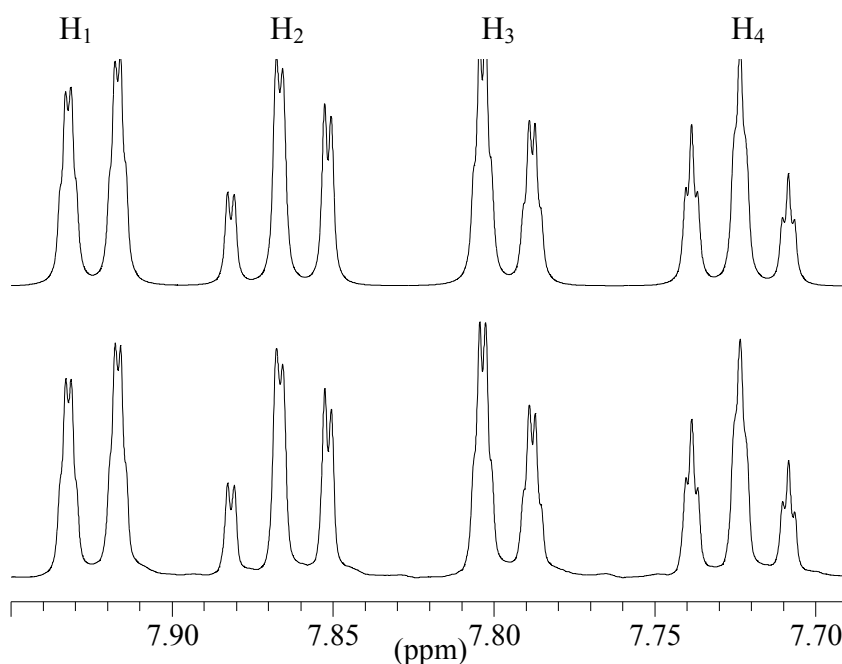


Abbildung 155: Simuliertes (oben) und experimentelles (unten) 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** ($c = 0,2510 \text{ mol/l}$ in D_2O)

In Tabelle 91 sind die Ergebnisse für die Resonanzfrequenzen aus der Iteration für die Protonen am Aromaten aufgelistet. Die aus der Iteration eines Präzisions- ^1H -NMR erhaltenen Kopplungskonstanten werden in Tabelle 92 aufgeführt. Tabelle 93 gibt die statistischen Gütekriterien für die Iteration wieder.

SNr	Iso	Typ	δ [ppm]	ν [Hz]	Stabw [Hz]
1	^1H	A	7,9242	3963,1894	$\pm 0,0009$
2	^1H	B	7,8654	3933,7422	$\pm 0,0008$
3	^1H	C	7,7967	3899,3410	$\pm 0,0009$
4	^1H	D	7,7242	3863,0805	$\pm 0,0009$
5	^{31}P	X	9,398	1902,8221	-

Tabelle 91: Iterierte chemische Verschiebungen des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums sowie die chemische Verschiebung des 200,46 MHz- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrums von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** ($c = 0,2510 \text{ mol/l}$ in D_2O)

SNr	SNr	KIso	KTyp	J [Hz]	Stabw [Hz]
1	2	$^4\text{J}_{\text{HH}}$	J_{AB}	1,0387	$\pm 0,0010$
1	3	$^5\text{J}_{\text{HH}}$	J_{AC}	0,8136	$\pm 0,0041$

1	4	$^3J_{HH}$	J_{AD}	7,7308	$\pm 0,0013$
1	5	$^5J_{PH}$	J_{AX}	0,7308	$\pm 0,0035$
2	3	$^3J_{HH}$	J_{BC}	7,7421	$\pm 0,0012$
2	4	$^3J_{HH}$	J_{BD}	7,4592	$\pm 0,0013$
2	5	$^5J_{PH}$	J_{BX}	0,2137	$\pm 0,0048$
3	4	$^4J_{HH}$	J_{CD}	0,8480	$\pm 0,0080$
3	5	$^4J_{HH}$	J_{CX}	1,0800	$\pm 0,0054$
4	5	$^6J_{PH}$	J_{DX}	0,9908	$\pm 0,0086$

Tabelle 92: Iterierte Kopplungskonstanten des 500,13 MHz- 1H -NMR-Spektrums von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** ($c = 0,2510$ mol/l in D_2O)

Statistical Information	ABCDX-Spinsystem
FSS	88,3767
NSP	4665
SDM	0,0829
R%	0,1573

Tabelle 93: Statistische Gütekriterien der Iterationen aus Tabelle 91 und Tabelle 92

Die Substanz **7** wurde zusätzlich auch im alkalischen Milieu vermessen und das 1H -NMR iteriert. Die Ergebnisse der Iteration für die Resonanzfrequenzen sind in Tabelle 94 und für die Kopplungskonstanten in Tabelle 95 aufgeführt.

SNr	Iso	Typ	δ [ppm]	ν [Hz]	Stabw [Hz]
1	1H	A	7,3540	3677,9346	$\pm 0,0010$
2	1H	B	7,4832	3742,5942	$\pm 0,0006$
3	1H	C	8,4423	4222,2400	$\pm 0,0007$
4	1H	D	7,5717	3786,8131	$\pm 0,0006$
5	^{31}P	X	-0,6386	-129,2945	-

Tabelle 94: Iterierte chemische Verschiebungen des 500,13 MHz- 1H -NMR-Spektrums sowie die chemische Verschiebung des 200,46 MHz- $^{31}P\{^1H\}$ -NMR-Spektrums von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** ($c = 0,1919$ mol/l in 1 M KOD)

SNr	SNr	KIso	KTyp	J [Hz]	Stabw [Hz]
1	2	$^4J_{HH}$	J_{AB}	1,2611	$\pm 0,0009$

1	3	$^5J_{\text{HH}}$	J_{AC}	0,5820	$\pm 0,0007$
1	4	$^3J_{\text{HH}}$	J_{AD}	7,6065	$\pm 0,0013$
1	5	$^5J_{\text{PH}}$	J_{AX}	1,2932	$\pm 0,0022$
2	3	$^3J_{\text{HH}}$	J_{BC}	7,8928	$\pm 0,0009$
2	4	$^3J_{\text{HH}}$	J_{BD}	7,4479	$\pm 0,0012$
2	5	$^5J_{\text{PH}}$	J_{BX}	0,3392	$\pm 0,0021$
3	4	$^4J_{\text{HH}}$	J_{CD}	1,2202	$\pm 0,0006$
3	5	$^4J_{\text{HH}}$	J_{CX}	0,2183	$\pm 0,0021$
4	5	$^6J_{\text{PH}}$	J_{DX}	0,3228	$\pm 0,0017$

Tabelle 95: Iterierte Kopplungskonstanten des 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektrums von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 ($c = 0,1919 \text{ mol/l}$ in 1 M KOD)

Tabelle 96 gibt die statistischen Gütekriterien für die Iteration wieder.

Statistical Information	ABCDX-Spinsystem
FSS	181,0955
NSP	43002
SDM	0,0649
R%	0,3960

Tabelle 96: Statistische Gütekriterien der Iterationen aus Tabelle 94 und Tabelle 95

6.8.1 NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 vs. TMAOH

Die NMR-kontrollierten Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 wurde gegen 1,0 molare TMAOH als Titrator durchgeführt, um eine vollständige Deprotonierung zu erreichen.

Für die NMR-kontrollierte Titration wurden folgende analytische Parameter gewählt:

Substanz: 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon <u>7</u>			
Molmasse [g/mol]:	229,998	Vorlagevolumen [ml]:	25,0

m (Substanz) [mg]:	448,4		
m (Wirkstoff) [mg]:	445,7	n (Wirkstoff) [mmol]:	1,9379
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0775
Zusatz HCl [mmol]:	3,8758	c (HCl) [mol/l]:	0,9530
I (Ionenpuffer: TMAcI) [mol/l]:	1,0	m (TMAcI) [g]:	2,74
c (Titrator: TMAOH) [mol/l]:	0,9840		

Tabelle 97: Experimentelle Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 500 von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon gegen TMAOH

Tabelle 98 gibt die gewählten Parameter für die NMR-Experimente wieder. Vor der Aufnahme des ersten Spektrums eines bestimmten Titrationszustandes wurde eine Mischzeit von 300 Sekunden und eine Wartezeit von 420 Sekunden eingehalten.

Parameter	^{31}P -NMR	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR	^1H -NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46	202,46	500,13
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	32768	16384	32768
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	32768	16384	32768
Zahl der Scans (NS)	64	16	128
Spektrale Breite (SW) [Hz]	9124,088	10162,602	5296,610
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	-1012,28	-1012,28	2600,68

Tabelle 98: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 500 von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon

6.8.1.1 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon

Abbildung 156 zeigt den Stack- und den Kontur-Plot der $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7.

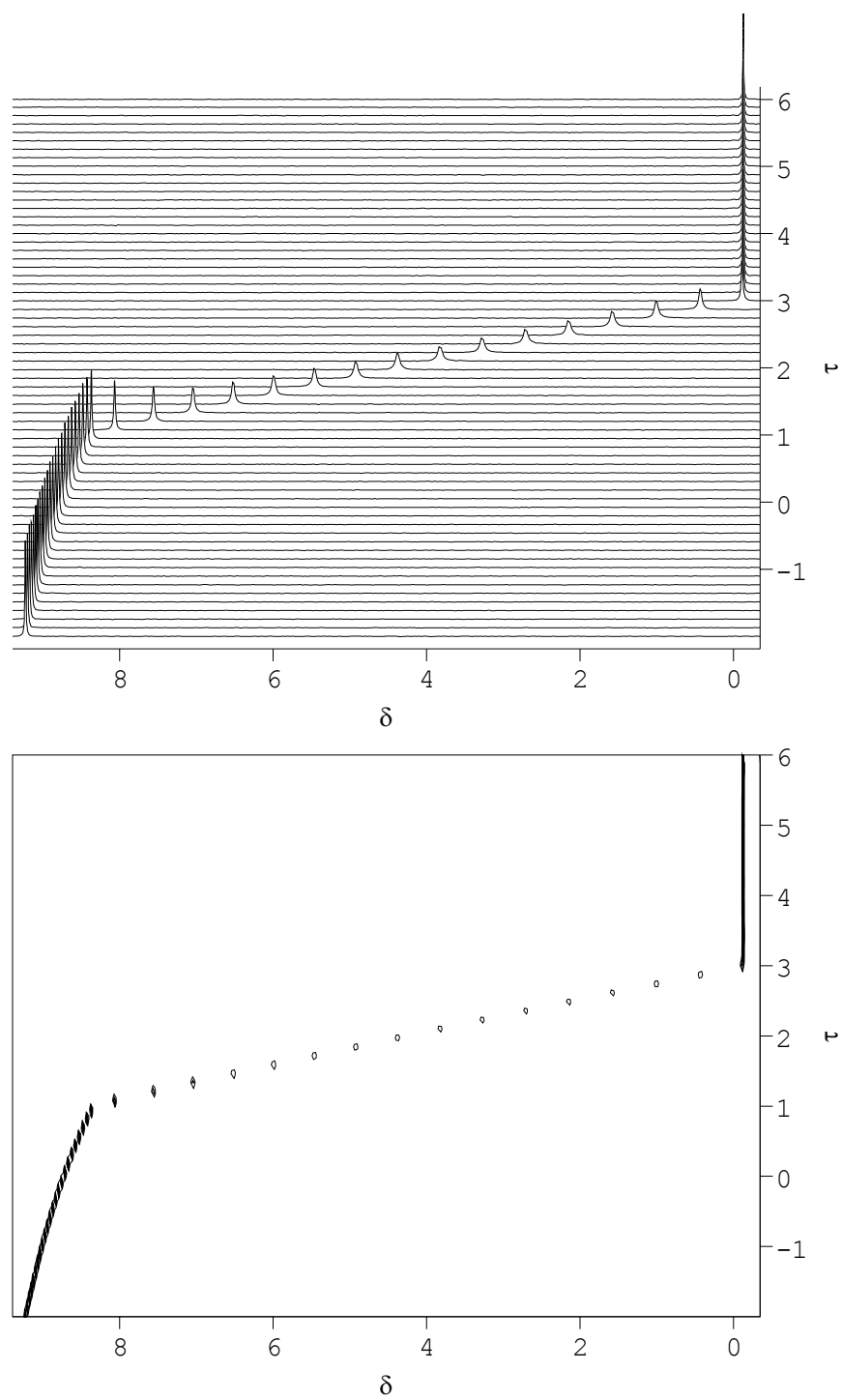


Abbildung 156: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** (δ_{P} vs. τ)

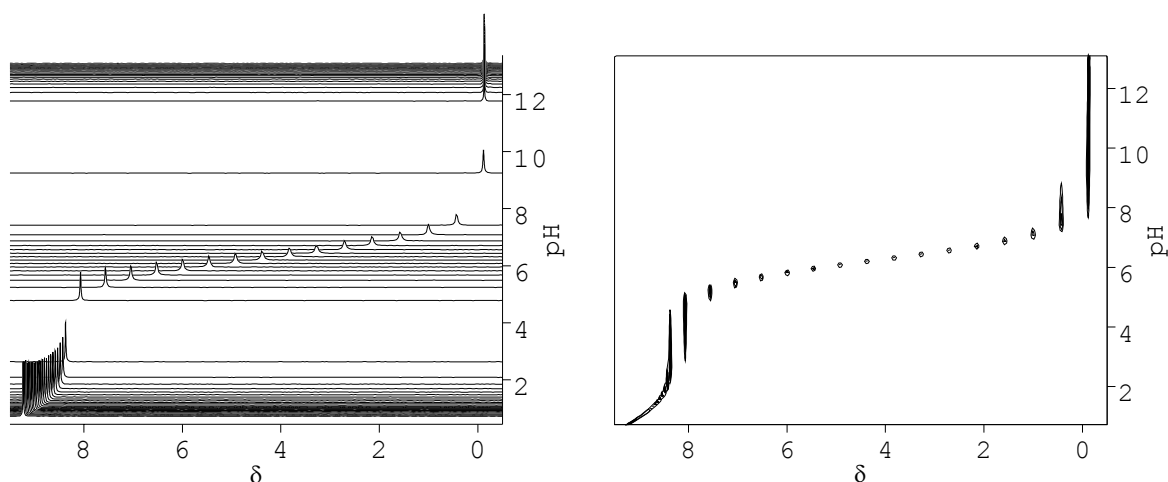


Abbildung 157: links: Stack-Plot - rechts: Kontur-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** (δ_{P} vs. pH)

Aus den Abbildungen ist zu erkennen, dass das ^{31}P -Resonanzsignal im Verlauf der Titration eine Tieffeldverschiebung erfährt.

Abbildung 158 zeigt die gemeinsame Auftragung des Molenbruchverteilungsdiagramms und der mittleren chemischen Verschiebung gegen den Titrationsgrad.

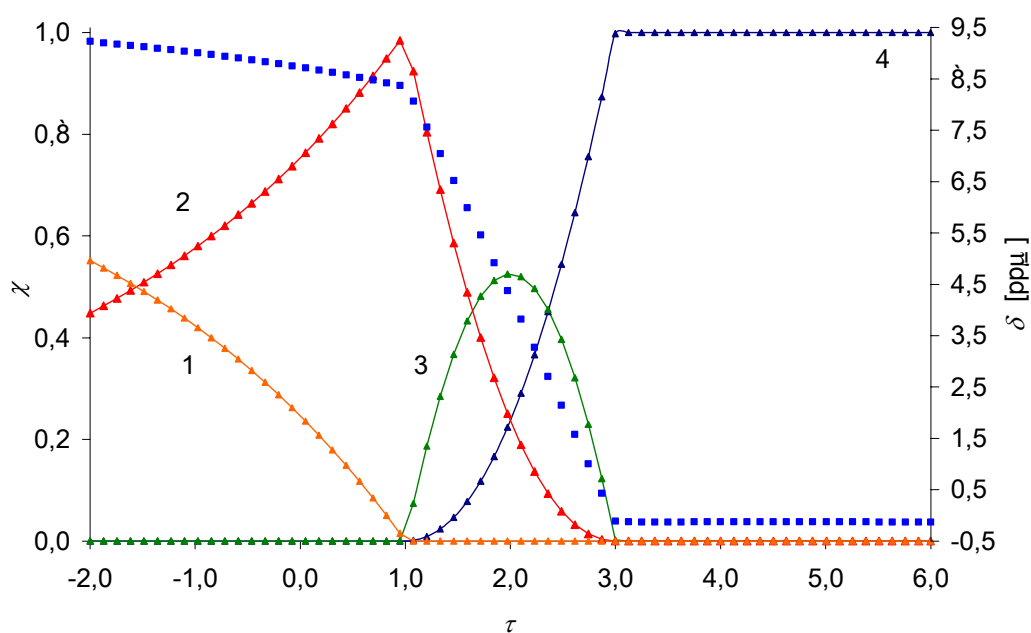


Abbildung 158: Molenbruchverteilungsdiagramm von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** mit Auftragung der chem. Verschiebung δ_{P} (■) der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung vs. den Titrationsgrad τ

In Kapitel 6.8.3 wird das Schema für die Deprotonierung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** gezeigt.

Abbildung 158 ist zu entnehmen, dass die Änderung der chemischen Verschiebung δ_P mit der Bildung der Spezies "3" und "4" in Zusammenhang steht. Die Änderung der chemischen Verschiebung im ^{31}P -NMR von 8,9 ppm zu -0,2 ppm für das Phosphoratom ist für die Bildung eines Acylphosphonates signifikant [117].

In Abbildung 161 sind die Halbwertsbreite und die mittlere chemische Verschiebung gegen den Titrationsgrad aufgetragen. Diesem Diagramm ist zu entnehmen, dass in dem Bereich zwischen $1 < \tau < 3$ ein starker Anstieg der Halbwertsbreite stattfindet (von 3,5 Hz auf 13,3 Hz). Die Linienverbreiterung kann auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder auf die Dynamik zurückgeführt werden.



Abbildung 159: Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen von *o*-Phosphonoformylbenzoesäureanion (H_2L)

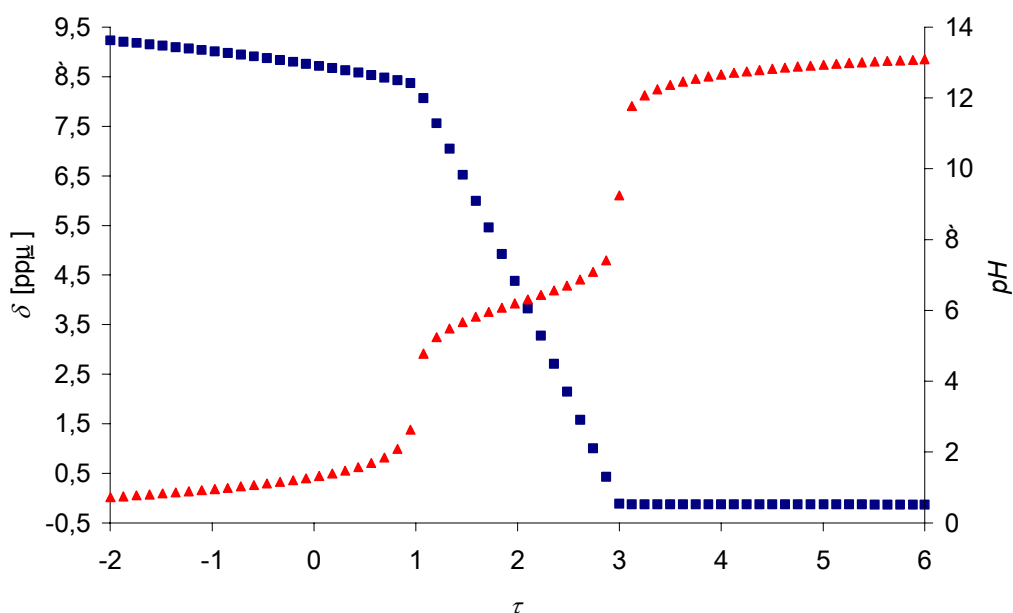


Abbildung 160: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und des pH-Wertes (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7

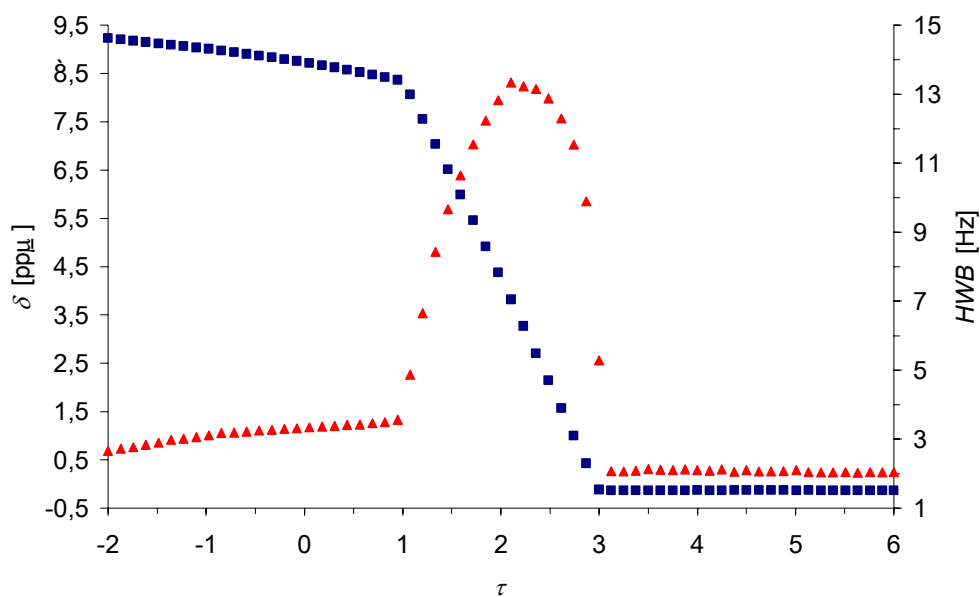


Abbildung 161: Auftragung mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und der Halbwertsbreite HWB (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7

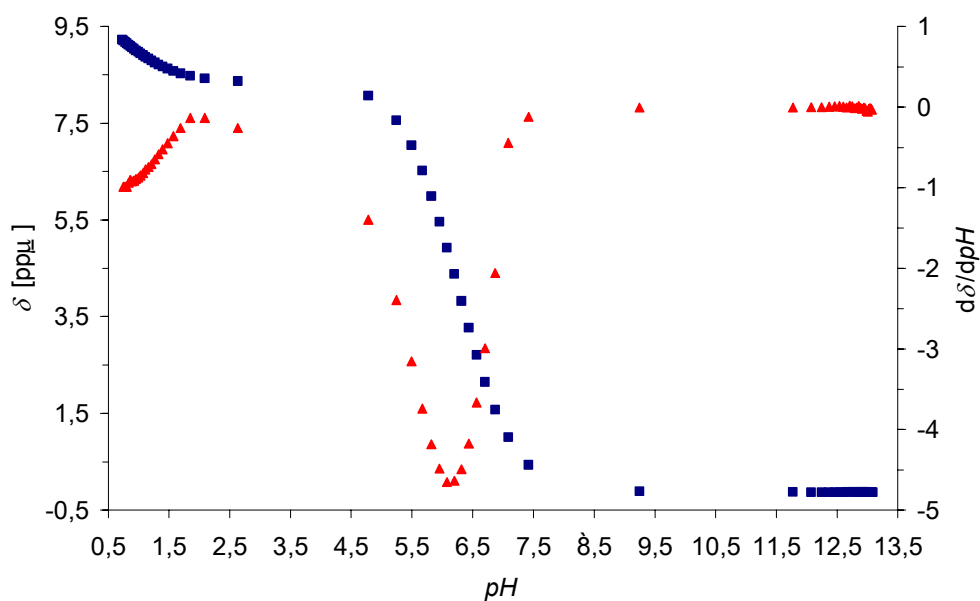


Abbildung 162: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und der 1. Ableitung $d\delta_P/dpH$ (▲) vs. pH-Wert der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7

Aus Abbildung 162 kann man entnehmen, dass die größte Veränderung der chemischen Verschiebung im Bereich $\text{pH} = 6$ stattfindet. Weil die Werte für $\text{pK}_{\text{S}2} = 5,90$ und $\text{pK}_{\text{S}3} = 6,57$ eng zusammenliegen, ist in Abbildung 162 nur ein gemeinsames Minimum zu erkennen.

In Tabelle 99 werden die ionenspezifischen Parameter der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 dargestellt. Durch die Verwendung einer 1,0 M Base können die ionenspezifischen Verschiebungen für die Spezies mit sehr geringen Standardabweichungen bestimmt werden.

Spezies	δ_{P} [ppm]	Δ_{P} [ppm]
1	$10,277 \pm 0,007$	$1,906 \pm 0,008$
2	$8,371 \pm 0,003$	$4,079 \pm 0,006$
3	$4,292 \pm 0,005$	$4,419 \pm 0,005$
4	$-0,127 \pm 0,001$	

Tabelle 99: Ionenspezifische Parameter δ_{P} von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)-isobenzofuranon 7

6.8.1.2 202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon

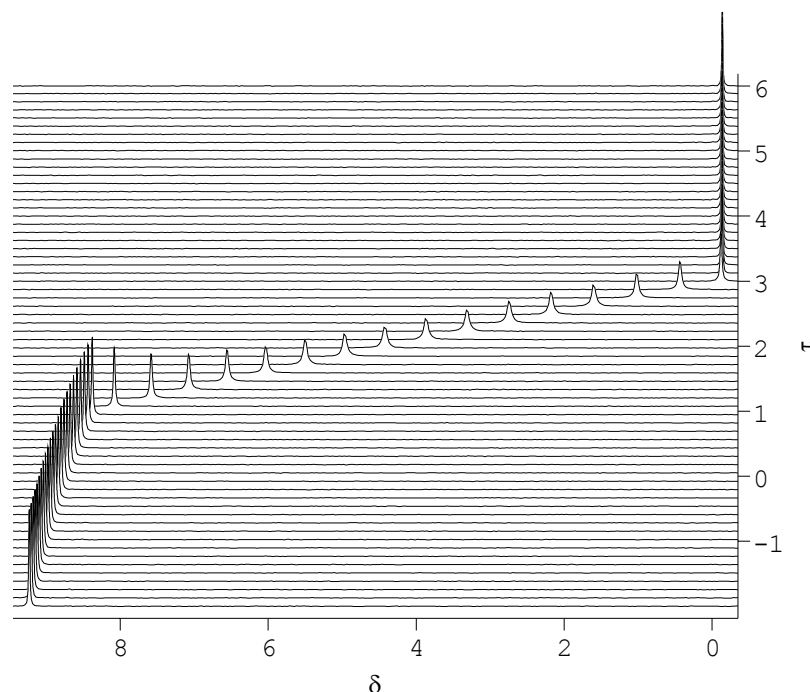


Abbildung 163: Stack-Plot der 202,46 MHz ^{31}P -NMR Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 (δ_{P} vs. τ)

Die Spektren der 202,46 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierten Titration zeigen erwartungsgemäß keine Aufspaltung.

Die nachfolgende Abbildung 164 zeigt einen Vergleich zwischen der ^{31}P - und der $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -Messung.

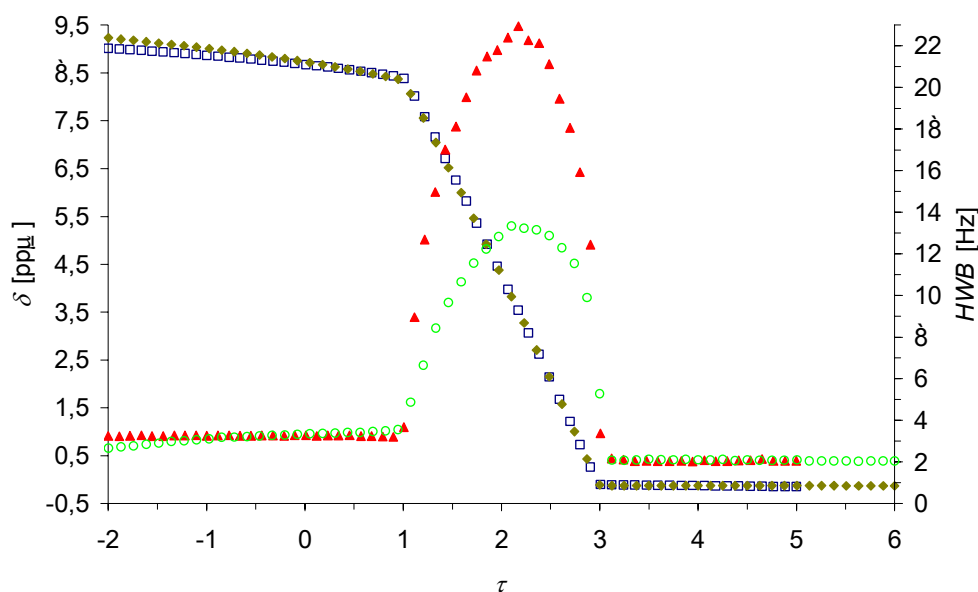


Abbildung 164: Auftragung mittleren chem. Verschiebungen und der Halbwertsbreiten HWB vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz ^{31}P -NMR-Messung (δ_{P} : ■; HWB: ▲) und der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung (δ_{P} : ●; HWB: ◆) von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7

Anhand dieses Diagramms ist zu erkennen, dass sich die beiden Messungen in der Halbwertsbreite unterscheiden. Bis zum Titrationsgrad von $\tau = 1$ beträgt die Differenz im Durchschnitt 0,7 Hz und ab $\tau = 3$ beträgt die Differenz annähernd gleichbleibend 1,0 Hz. Die geringe Differenz hängt direkt mit dem Pulsprogramm zusammen. Die Verwendung von Pulsprogrammen mit Protonenentkopplung führt zu schmalen Linienbreiten.

6.8.1.3 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon

Wie im einleitenden Teil zu diesem Kapitel erwähnt, zeigt das 500,13 MHz ^1H -Präzisions-NMR-Spektrum ein interessantes Aufspaltungsmuster. Leider kann dieses Aufspaltungsmuster bei Verwendung des Durchfluss-Probenkopfs nicht erzielt werden. Durch Iteration der 64 Einzelspektren gelingt es die chemischen Verschiebungen für die jeweiligen Protonen am Aromaten zu ermitteln.

H_3

H_4 H_2 H_1

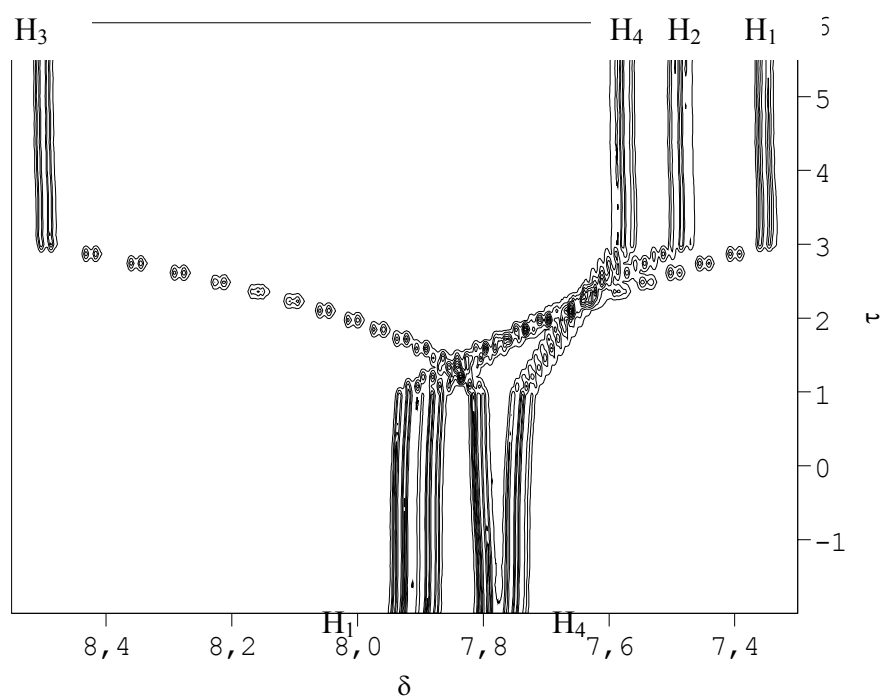
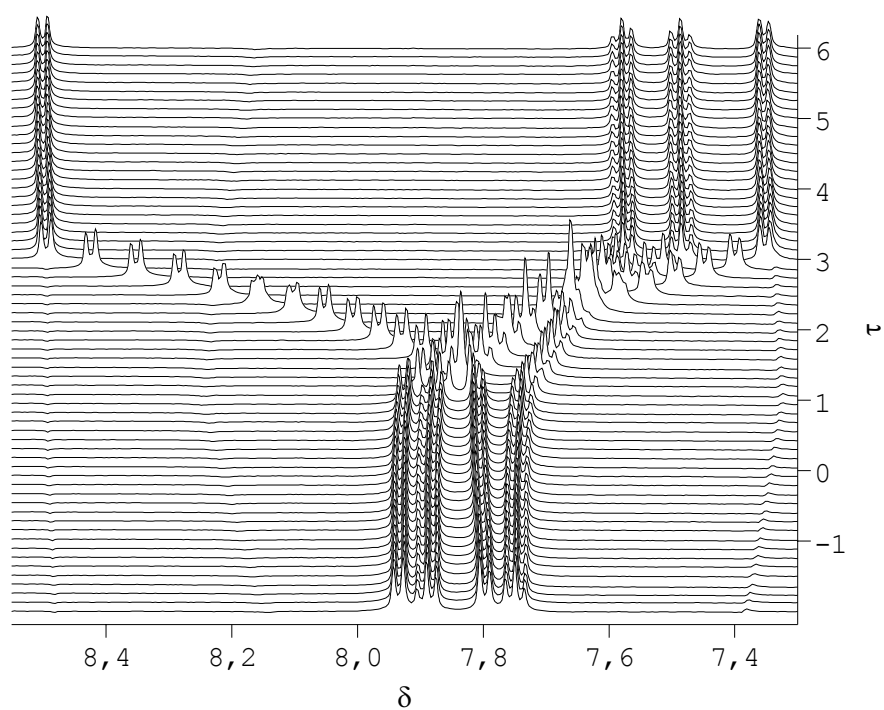


Abbildung 165: oben: Stack-Plot - unten: Kontur-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** (δ_{H} vs. τ)

H₃

H₄ H₂ H₁

H₃

H₄ H₂ H₁

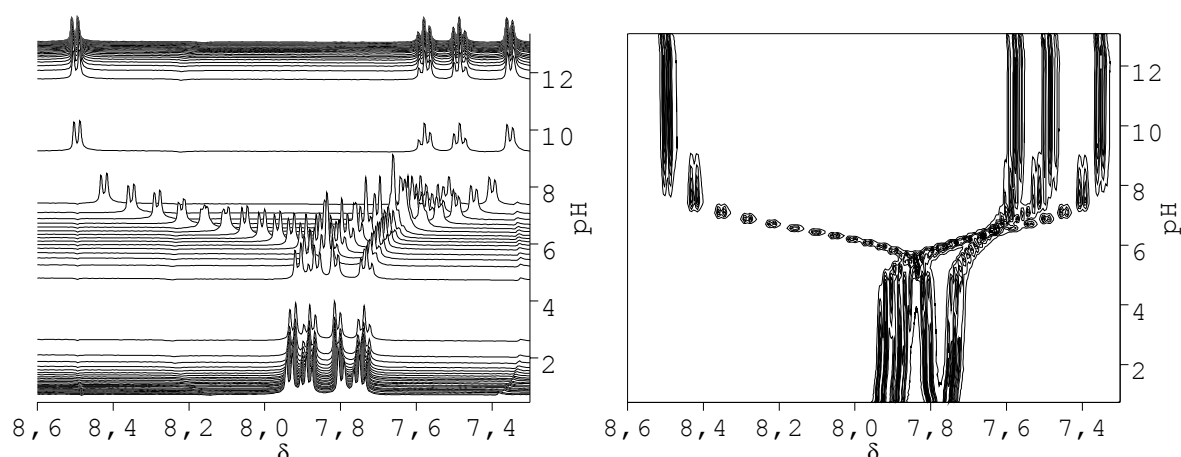


Abbildung 166: links: Stack-Plot - rechts: Kontur-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** (δ_{H} vs. pH)

Abbildung 167 zeigt die Auftragung der mittleren chemischen Verschiebungen der ^1H -Resonanzsignale in einem Molenbruchverteilungsdiagramm. Durch diese Darstellungsform sind leicht die chemischen Verschiebungen der Resonanzsignale mit den Speziesverteilungen in Bezug zu bringen.

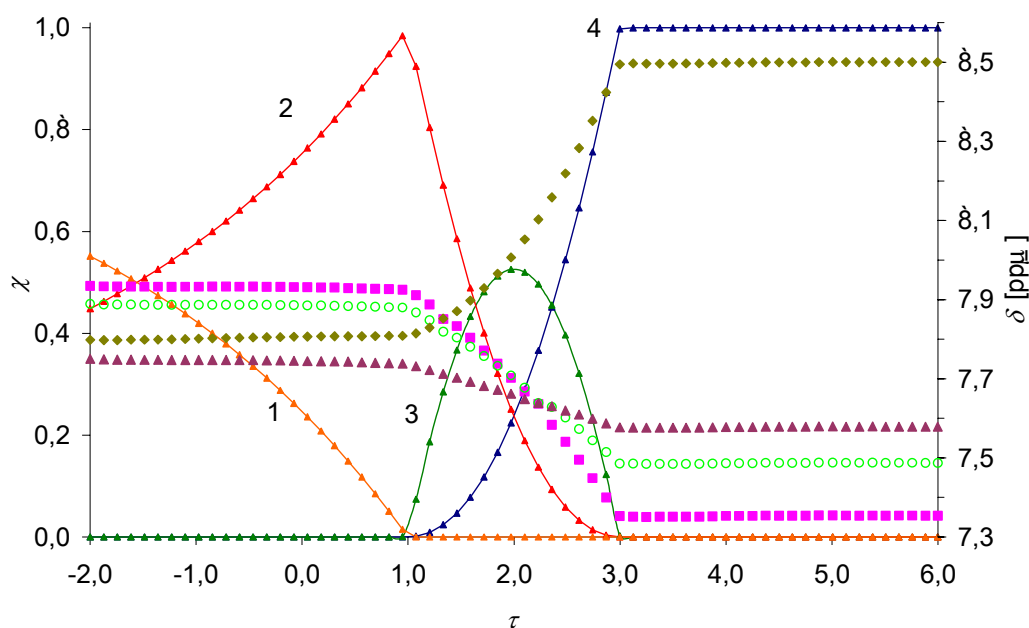


Abbildung 167: Molenbruchverteilungsdiagramm von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** mit Auftragung von δ_{H} (H_1 : $\blacksquare$; H_2 : $\circ$; H_3 : $\blacklozenge$; H_4 : $\blacktriangle$) der 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierten Titration vs. Titrationsgrad τ

Das ortho-ständige Proton Nr. 3 wird durch die Bildung der Keto- und der Carboxylgruppe ab $\tau = 1$ stärker abgeschirmt und erfährt dadurch eine Tieffeldverschiebung, während die

übrigen Protonen schwächer abgeschirmt werden und somit in Richtung Hochfeld verschoben werden.

Bei $\tau = 1,2$ und $\tau = 2,2$ ist eine akzidentelle Degeneration des ABCD-Spinsystems zu einem AA'A"B- beziehungsweise ABB'B"-Spinsystem zu erkennen.

Abbildung 168 zeigt eine Auftragung der chemischen Verschiebungen von den Resonanzsignalen der Protonen am Aromaten und des pH-Wertes gegen den Titrationsgrad τ .

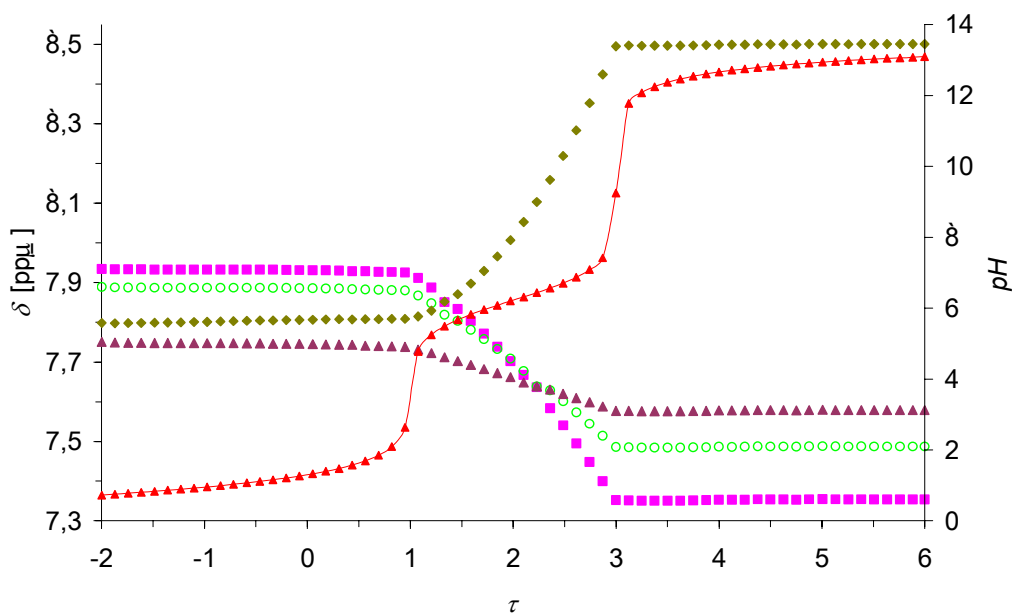


Abbildung 168: Auftragung von δ_H (H_1 : $\blacksquare$; H_2 : $\circ$; H_3 : $\blacklozenge$; H_4 : $\blacktriangle$) und des pH-Werts ($-\blacktriangle-$) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 500,13 MHz ^1H -NMR-Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** vs. 1,0 M TMAOH

Eine Auftragung der mittleren chemischen Verschiebungen von den Resonanzsignalen der Protonen gegen den pH ist in Abbildung 169 dargestellt..

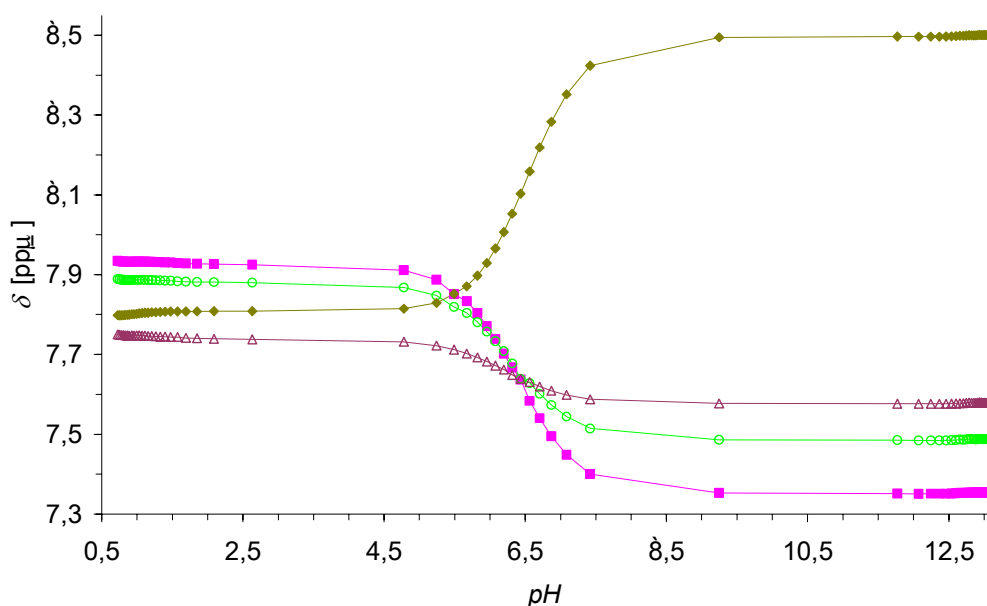


Abbildung 169: Auftragung der mittleren chem. Verschiebungen δ_H (H_1 : ■; H_2 : ○; H_3 : ◆; H_4 : △) vs. den pH-Wert der 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierten Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** vs. 1,0 M TMAOH

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, wurden durch Iteration der Einzelspektren die chemischen Verschiebungen für die jeweiligen Protonen am Aromaten ermittelt. Dadurch konnten die ionenspezifischen Parameter für die einzelnen Spezies berechnet werden.

τ	$^3J_{H_1H_4}$ [Hz]	$^3J_{H_2H_3}$ [Hz]	$^3J_{H_2H_4}$ [Hz]
-2	7,77	7,75	7,48
-1	7,77	7,76	7,45
0	7,75	7,75	7,48
1	7,72	7,73	7,44
2	7,40	7,88	7,51
3	7,73	7,97	7,40
4	7,59	7,91	7,04
5	7,46	7,98	7,56
6	7,60	7,95	7,23

Tabelle 100: Kopplungskonstanten aus den Spektren der titrationsgradabhängigen 500,13 MHz ^1H -NMR-Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **7** vs. 1,0 M TMAOH

Für bestimmte Titrationsgrade sind in Tabelle 100 die $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten angegeben, die aus der Iteration der Spektren ermittelt werden konnten.

Tabelle 101 gibt die ionenspezifischen Parameter für die Resonanzsignale der Protonen am Aromaten und Tabelle 102 die dazugehörigen Gradienten wieder.

Spezies	δ_{H1} [ppm]	δ_{H2} [ppm]	δ_{H3} [ppm]	δ_{H4} [ppm]
1	$7,946 \pm 0,002$	$7,898 \pm 0,002$	$7,784 \pm 0,002$	$7,763 \pm 0,002$
2	$7,926 \pm 0,001$	$7,882 \pm 0,001$	$7,810 \pm 0,001$	$7,740 \pm 0,001$
3	$7,741 \pm 0,001$	$7,709 \pm 0,001$	$7,895 \pm 0,001$	$7,657 \pm 0,001$
4	$7,353 \pm 0,001$	$7,486 \pm 0,001$	$8,499 \pm 0,001$	$7,578 \pm 0,001$

Tabelle 101: Ionenspezifische Verschiebungen δ_{H} von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7

Gradient	Δ_{H1} [ppm]	Δ_{H2} [ppm]	Δ_{H3} [ppm]	Δ_{H4} [ppm]
1	$0,020 \pm 0,002$	$0,016 \pm 0,002$	$-0,026 \pm 0,002$	$0,024 \pm 0,002$
2	$0,185 \pm 0,002$	$0,172 \pm 0,002$	$-0,086 \pm 0,002$	$0,083 \pm 0,002$
3	$0,388 \pm 0,001$	$0,223 \pm 0,001$	$-0,604 \pm 0,001$	$0,079 \pm 0,001$

Tabelle 102: Gradienten der ionenspezifischen Parameter δ_{H} von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7

6.8.2 NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon vs. HCl

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Ringöffnung tatsächlich um einen reversiblen Vorgang handelt, wird diese NMR-kontrollierte Titration wiederholt und als eine sogenannte Rücktitration durchgeführt. Es werden zu Beginn der Messung genau der Titrationsendzustand, der in Kapitel 6.8.1 vorgestellten Messung herrschte, eingestellt. Dies bedeutet, dass das Startvolumen statt 25,00 ml nun 40,76 ml beträgt.

Die analytischen Parameter für die Titration werden in Tabelle 103 aufgeführt. Tabelle 104 gibt die gewählten Parameter für die NMR-Experimente wieder. Vor der Aufnahme des ersten Spektrums eines bestimmten Titrationszustandes wurde eine Mischzeit von 360 Sekunden und eine Wartezeit von 420 Sekunden eingehalten.

Substanz: 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon <u>7</u>			
Molmasse [g/mol]:	229,998	Vorlagevolumen [ml]:	38,27
m (Substanz) [mg]:	448,4		
m (Wirkstoff) [mg]:	445,7	n (Wirkstoff) [mmol]:	1,9379
		c (Wirkstoff) [mol/l]:	0,0506
Zusatz HCl [mmol]:	3,8758	c (HCl) [mol/l]:	0,9530
Zusatz TMAOH [mmol]:	13,5652	c (TMAOH) [mol/l]:	0,9840
I (Ionenpuffer: TMACl) [mol/l]:	1,0	m (TMACl) [g]:	2,74
c (Titrator: HCl) [mol/l]:	0,9530		

Tabelle 103: Experimentelle Parameter der NMR-kontrollierten Titration am DRX 500 von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon vs. HCl

Parameter	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR	^1H -NMR
Basisfrequenz (SF) [MHz]	202,46	500,13
Zahl der Datenpunkte pro FID (TD)	16384	32768
Zahl der Datenpunkte im Imaginärteil des Spektrum (SI)	16384	32768
Zahl der Scans (NS)	16	128
Spektrale Breite (SW) [Hz]	10162,602	5296,610
Einstrahlfrequenz (O1) [Hz]	-1012,28	2600,68

Tabelle 104: Parametereinstellung der NMR-Spektren für die NMR-kontrollierte Titration am DRX 500 von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon vs. HCl

6.8.2.1 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon vs. HCl

Um eine besser Vergleichbarkeit mit der Messung in Kapitel 6.8.1.1 zu erzielen, wird die gleiche Ansicht für Stack- und Kontur-Plot (entsprechend der Hintitration) gewählt.

Anhand von Abbildung 171 kann man erkennen, dass die Rücktitration in Bezug auf die Änderung der chemischen Verschiebung und der Halbwertsbreitenänderung einen annähernd gleichen Verlauf nimmt, wie bei der Hintitration beobachtet werden kann. In Kapitel 6.8.3 werden Hin- und Rücktitration miteinander verglichen.

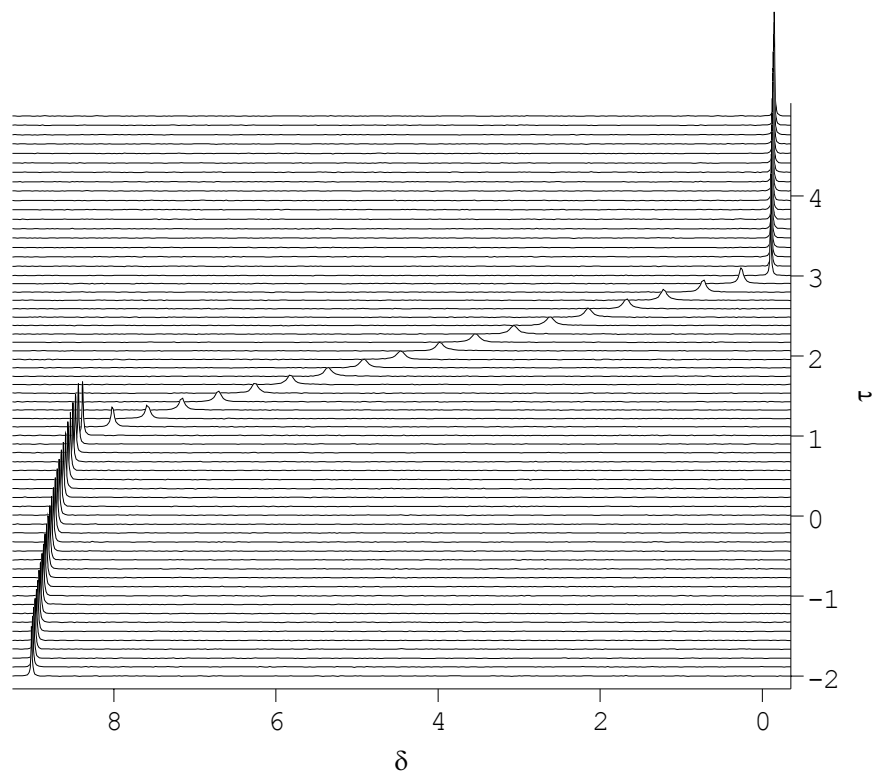


Abbildung 170: Stack-Plot der 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon vs. HCl (δ_P vs. τ)

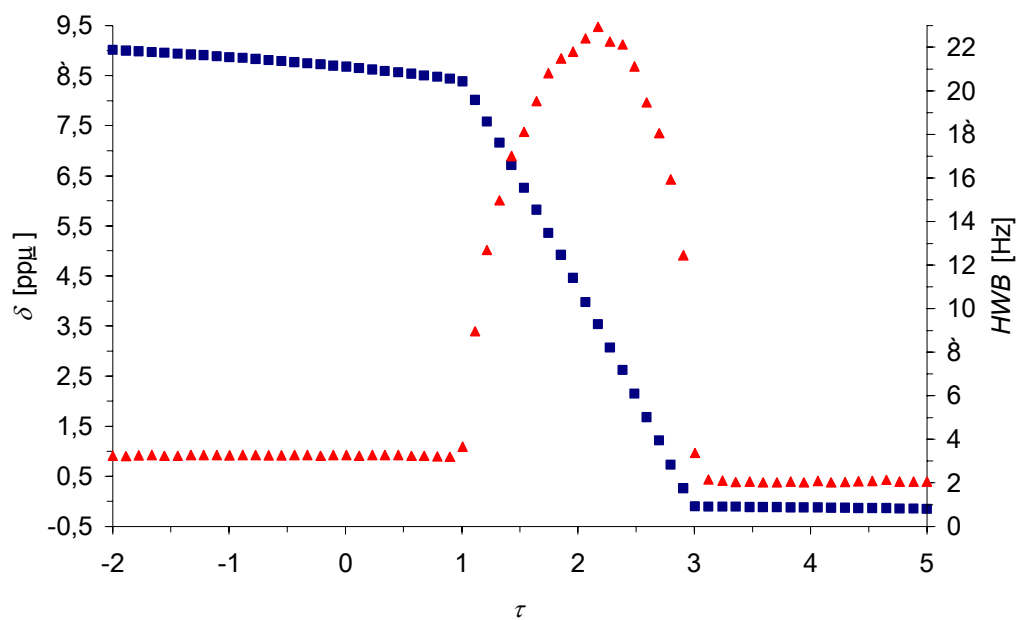


Abbildung 171: Auftragung mittleren chem. Verschiebung δ_P (■) und der Halbwertsbreite HWH (▲) vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 vs. HCl

6.8.2.2 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierte Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon vs. HCl

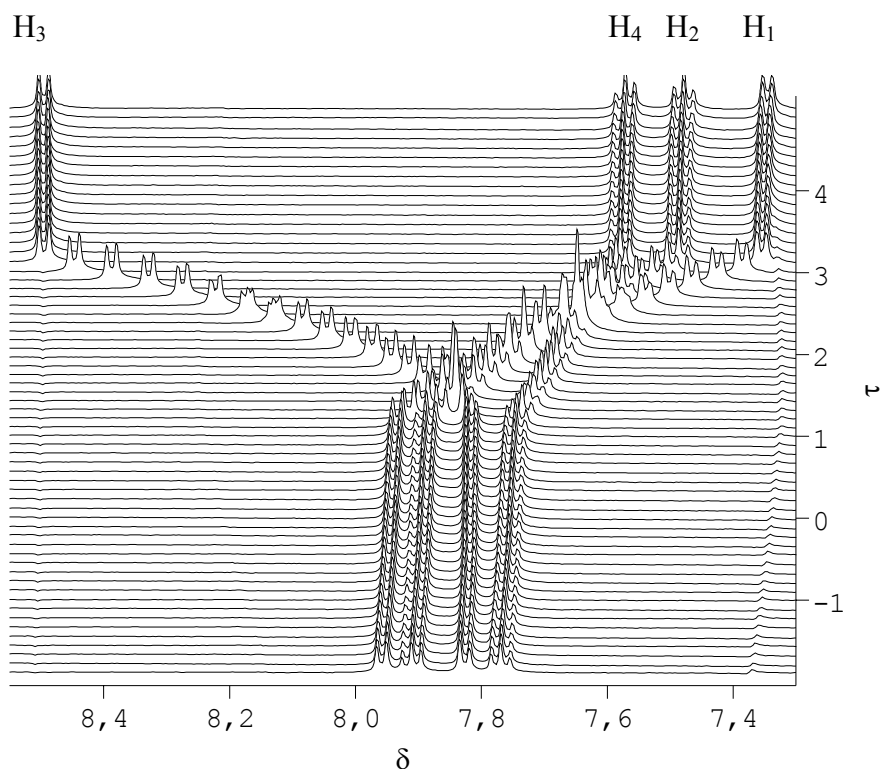


Abbildung 172: Stack-Plot der 500,13 MHz ^1H -NMR Messung von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon vs. HCl (δ_{H} vs. τ)

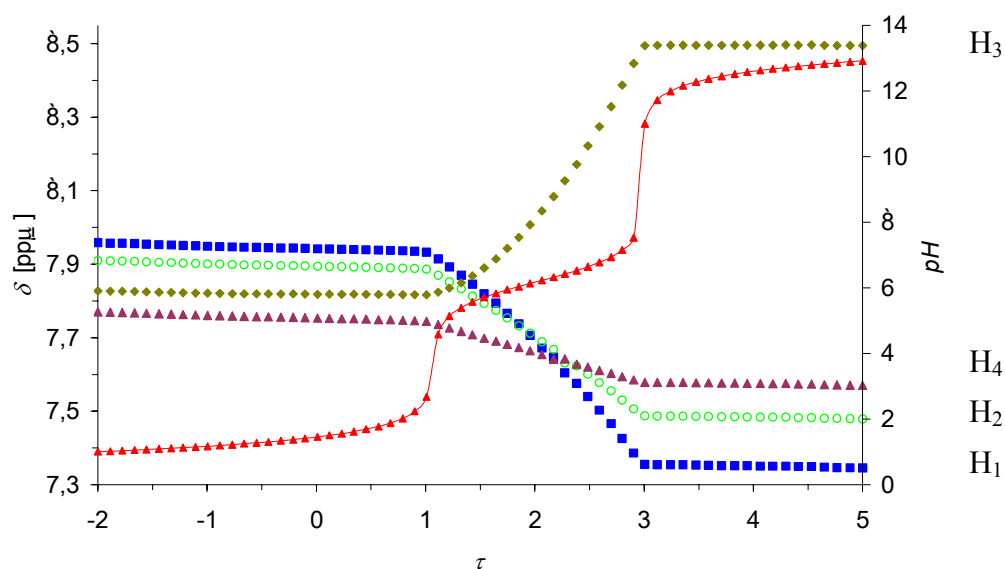


Abbildung 173: Auftragung der chem. Verschiebungen δ_{H} (H_1 : $\blacksquare$; H_2 : $\circ$; H_3 : $\blacklozenge$; H_4 : $\blacktriangle$) und des pH-Wertes ($-\blacktriangle-$) vs. Titrationsgrad τ der 500,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierten Titration von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 vs. 1 M HCl

Wie bei der Hintitration wurden hier die chemischen Verschiebungen der jeweiligen Protonen durch Iteration der Einzelspektren ermittelt. Abbildung 172 zeigt den gleichen Gang der chemischen Verschiebung für die Protonen, wie bei der Hintitration (Abbildung 168).

6.8.3 Vergleich zwischen Hin- und Rücktitration

Bei der Betrachtung der beiden Titrations (Hin- und Rücktitration) fallen die guten Übereinstimmungen der Parameter (chemische Verschiebung und Halbwertsbreiten) auf. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei der Ringöffnung tatsächlich um einen reversiblen Prozeß handelt.

Bei dem Vergleich der Hin- und Rücktitration (Abbildung 174) treten geringe Abweichungen in den mittleren chemischen Verschiebungen δ_P und den pH-Kurven ab $0 < \tau < -2$ auf. Diese Unterschiede sind direkt auf die bei beiden Messungen unterschiedlichen Konzentrationen zurückzuführen.

Zieht man den Verlauf der Halbwertsbreiten (Abbildung 175) bei den einzelnen Titrationschritten hinzu, fällt auf, dass in den Bereichen $-2 < \tau < 1$ und $3 < \tau < 5$ (6) die Halbwertsbreiten annähernd gleich sind. Unterschiede treten lediglich in dem Bereich $1 < \tau < 3$ auf. Dieser Effekt ist auf die Konzentrationsabhängigkeit der Halbwertsbreiten zurückzuführen.

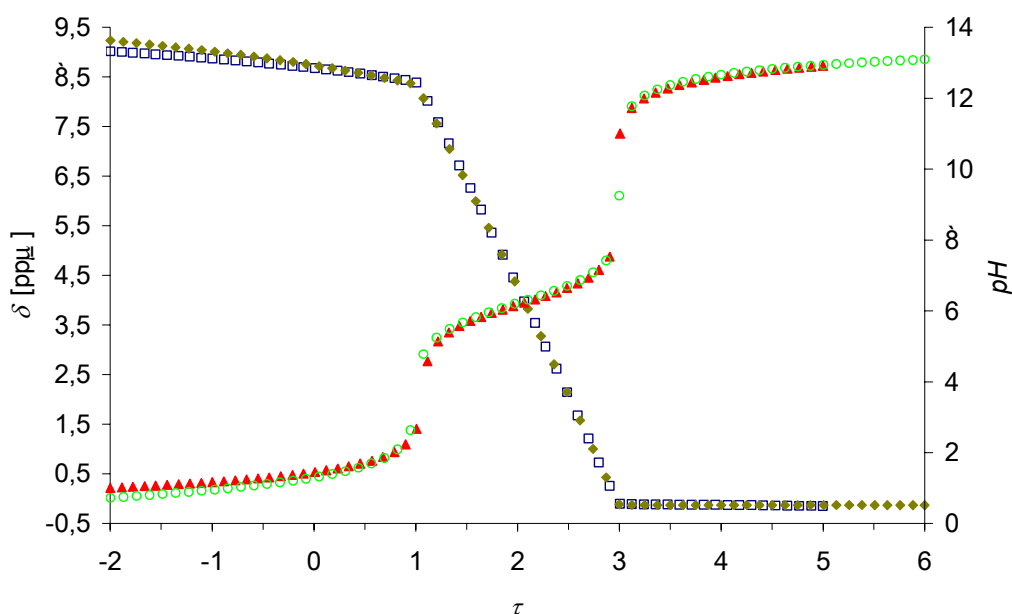


Abbildung 174: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P und des pH-Wertes vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^3\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR-Messungen von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon **2**; (Hintitration: δ_P : $\blacklozenge$; pH: $\circ$; Rücktitration: δ_P : $\blacksquare$; pH: $\blacktriangle$)

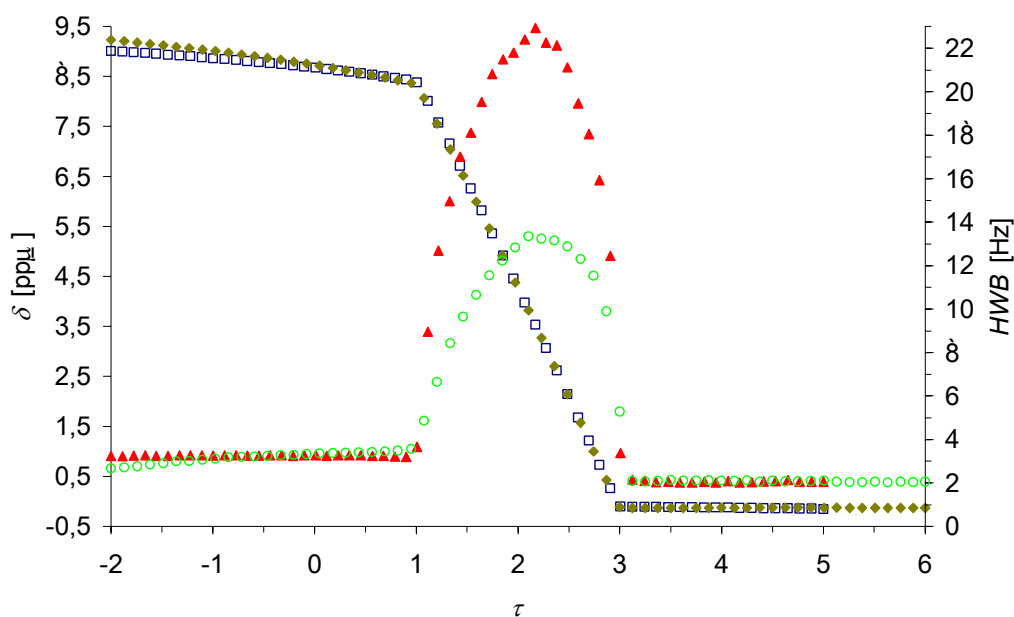


Abbildung 175: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_P und der Halbwertsbreite vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR-Messungen von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7; (Hintitration: δ_P : $\blacklozenge$; HWP: $\bigcirc$; Rücktitration: δ_P : $\blacksquare$; HWP: $\blacktriangle$)

Abbildung 176 gibt die Änderungen der chemischen Verschiebungen der Protonen am Aromaten wieder.

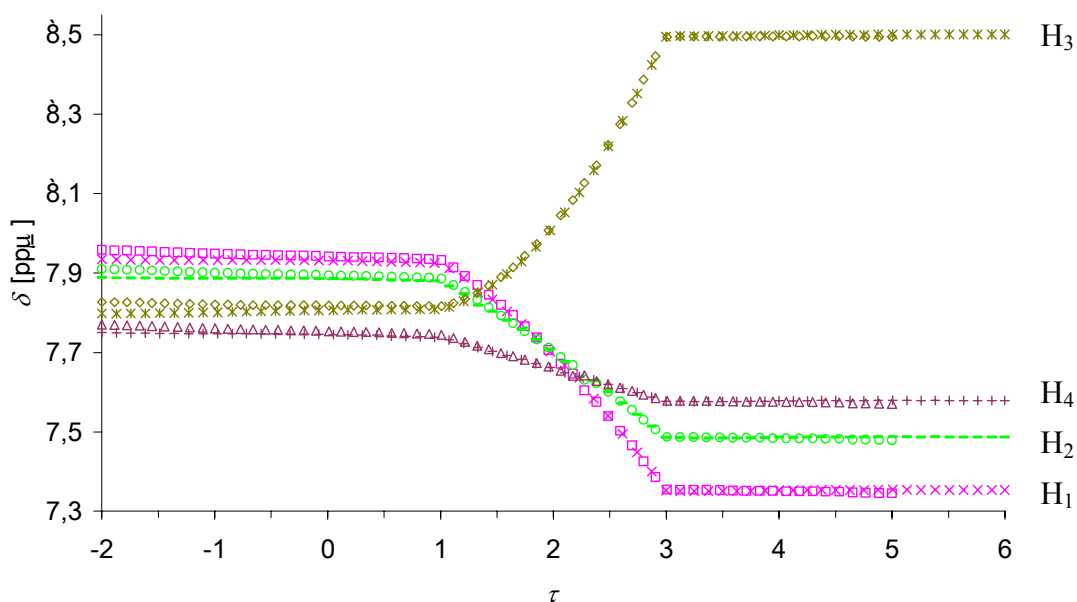


Abbildung 176: Auftragung der mittleren chem. Verschiebung δ_H vs. Titrationsgrad τ der titrationsgradabhängigen 202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR-Messungen (Hin- und Rücktitration) von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7

Auch hier werden wiederum nur konzentrationsbedingte Unterschiede in den chemischen Verschiebungen beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Aciden ein ^{31}P -Resonanzsignal bei $\delta_{\text{P}} = 8,9$ ppm auftritt, welches charakteristisch für α -Hydroxyphosphonate ist. Im ^{13}C -NMR-Spektrum erscheint bei $\delta_{\text{C}} = 107,4$ ppm Resonanzsignal (d, $^1J_{\text{PC}} = 197,7$ Hz). Ein Resonanzsignal bei dieser chemischen Verschiebung ist typisch für α -C-Atome von α -Hydroxyphosphonaten.

Im Alkalischen ergibt sich ein anderes Bild: Im ^{31}P -NMR erscheint bei $-0,2$ ppm ein Resonanzsignal, welches charakteristisch für *o*-Phosphonoformylbenzoate ist. Durch die Zugabe von Lauge entsteht im ^{13}C -NMR ein neues Resonanzsignal bei $\delta = 219,1$ ppm (d, $^1J_{\text{PC}} = 159,9$ Hz) tritt auf. Die Lage des Resonanzsignals und die Größe der Kopplungskonstante ist typisch für *o*-Phosphonoformylbenzoate [117] und lässt auf die Bildung einer *o*-Phosphonoformylbenzoylsäure schließen.

Durch die Deprotonierung wird das ortho-ständige Proton zu tieferem und die übrigen Protonen zu höherem Feld verschoben.

Für die Dissoziation ergibt sich folgendes Schema:

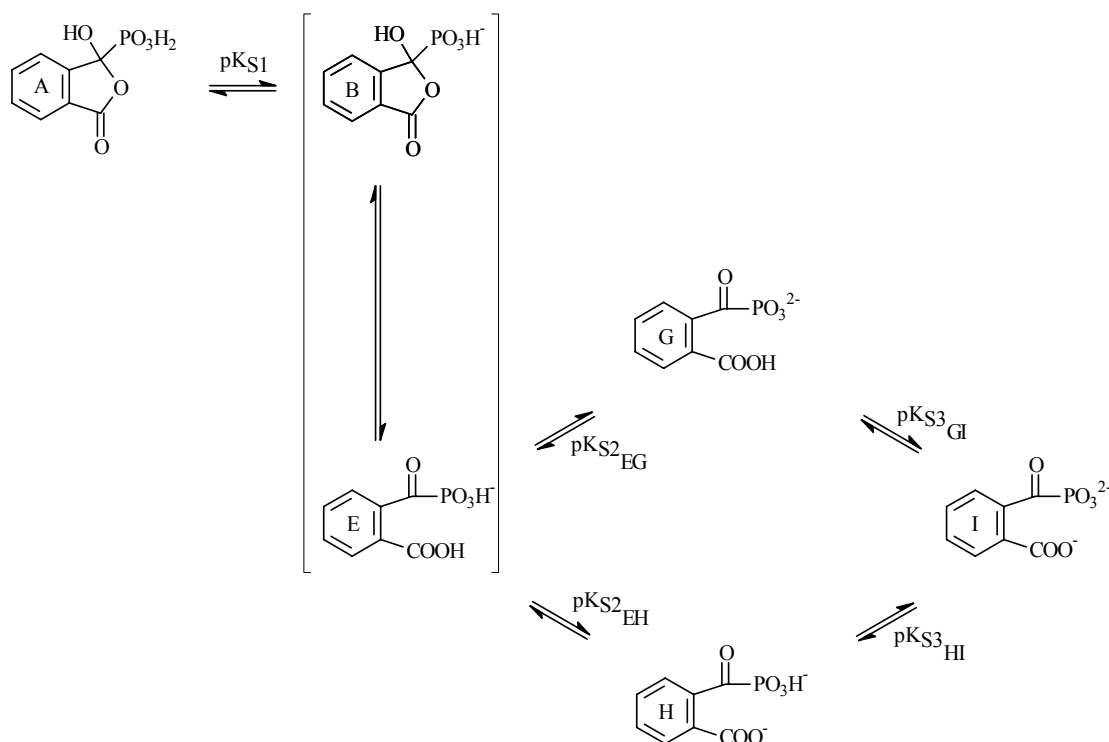


Abbildung 177: Dissoziationsschema von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon [7]

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bis jetzt die Gleichgewichtskonstanten für den Ringöffnungsprozeß nicht bestimmt werden. Untersuchungen an substituierten Benzyl-2-carboxylsäuren und 2-Phenylacetylbenzoesäuren [119] haben gezeigt, dass solche Interconversionen schnell ablaufen.

Das Molenbruchverteilungsdiagramm kann unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit wie folgt beschrieben werden:

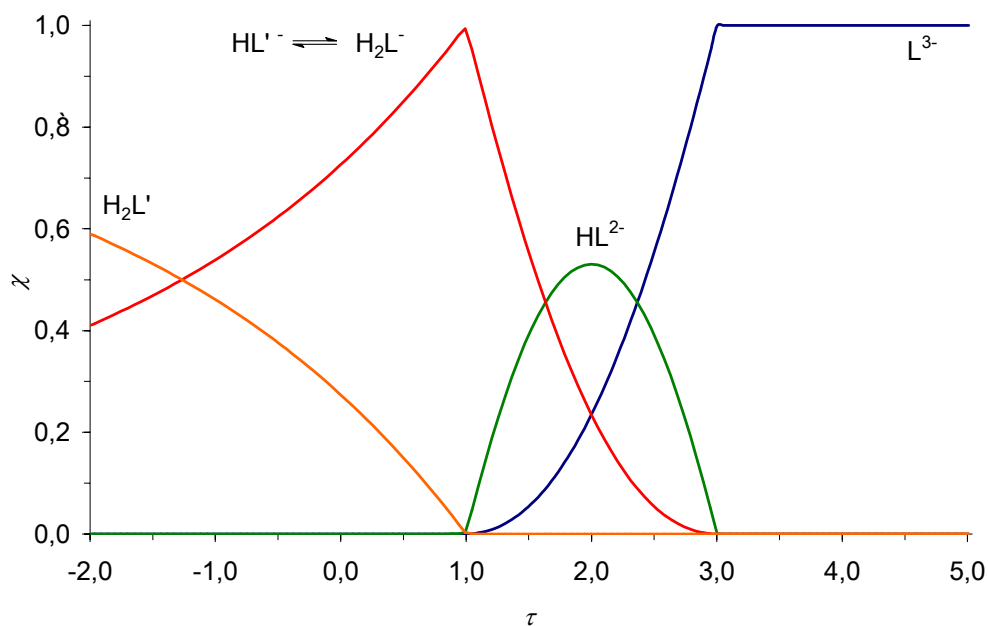


Abbildung 178: Molenbruchverteilungsdiagramm von 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon [7]

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die automatisierte NMR-kontrollierte Titration unter der Verwendung eines 500 MHz Spektrometers (Bruker Avance DRX 500) als Routinemessverfahren einzuführen. Erstmals konnten während einer einzigen NMR-kontrollierten Titration hintereinander gekoppelt ^{31}P -, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -, und ^1H -NMR-Spektren aufgenommen werden.

Die Reduzierung des Messvolumens durch Verwendung von Standard-Komponenten aus dem HPLC-Bereich (Schläuche, Schlauchverbindungen, Pumpe) führte zu einer Verringerung des Substanzbedarfs von 60 % im Vergleich zu der bereits bestehenden Anlage unter Verwendung eines 200 MHz Spektrometers. Die Verwendung standardisierter Schlauchverbindungen führte außerdem dazu, dass der Operatoreinfluss auf die Messung verringert werden konnte. Die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten Anlage zur Durchführung automatisierter NMR-kontrollierter Titrationsen konnte durch Messungen zu Feldstabilität und Einfluss durch die Verdünnung der Messlösung nachgewiesen werden. Durch diese Weiterentwicklungen konnte das Verbundmessverfahren in der Effizienz gesteigert werden.

Bei der Messapparatur zur Durchführung NMR-kontrollierten Titrationsen unter Verwendung des 200 MHz Spektrometers ermöglichte die Neukonzeption des Schlauchsystems durch Verwendung von standardisierten Verbindungsstücken eine konzeptionelle Verbesserung bei gleichzeitiger Verminderung der Störanfälligkeit der Messanlage.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal mit der Messung des 1:1 Cadmium-Ethylen-diamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplexes eine 44,36 MHz ^{113}Cd -NMR kontrollierte Titration unter Verwendung eines digitalen Spektrometers (Bruker Avance DRX 200) durchgeführt werden, um die Komplexbildung durch einen Metallkern titrationsgradabhängig NMR-spektroskopisch zu beobachten.

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Anlage ist weltweit die einzige Messapparatur zur Durchführung automatisierter ^{31}P -, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -, und ^1H -NMR-kontrollierter Titrationsen unter Einsatz eines 500 MHz Spektrometers. Durch das im Vergleich zum 200 MHz Spektrometer verbesserte Signal-Rausch-Verhältnis und dem dadurch verringerten Substanzbedarf ermöglicht diese Messapparatur insbesondere die Untersuchung biorelevanter Substanzen, wie der hier gezeigten Bisphosphonsäuren, Aminophosphonsäuren, phenolischen

Phosphonocarbonsäuren und Phosphinophosphonsäuren, hinsichtlich ihrem Deprotonierungsverhalten und des daraus resultierenden biorelevanten Verhaltens.

Mit den NMR-kontrollierten Titrationen der 1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure 1 und der 3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure 5 konnten an zwei Substanzen die Vorteile der Anlage unter Verwendung des 500 MHz Spektrometers gegenüber der Anlage unter Verwendung des 200 MHz Spektrometers gezeigt werden. Bei gleicher Scan-Zahl kann mit der 500 MHz Anlage ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden, wodurch die Spektren für eine automatische Auswertung besser zugänglich sind.

Die nachfolgende Tabelle zeigt alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten automatisierten NMR-kontrollierten Titrationen und Bestimmungen der Dissoziations- beziehungsweise Komplexstabilitätskonstanten auf.

Substanz	81,01 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR	500,13 MHz ^1H -NMR	202,46 MHz ^{31}P -NMR	202,46 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR	44,39 MHz ^{113}Cd -NMR	Dissoziations- / Stabilitätskonstantenbestimmung
1-Hydroxyethan-1,1-diphosphonsäure <u>1</u>	✓			✓		
1-Hydroxyethan-P,P'-dimethyl-1,1-diphosphonsäure <u>2</u>				✓		
1-Hydroxy-3-(P-methylphosphino)-propan-1,1-diphosphonsäure <u>3</u>		✓	✓	✓		✓
Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) <u>4</u>		✓	✓	✓		✓
1:1 Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplex		✓	✓	✓	✓	✓
3-Ethoxycarbonyl-6-hydroxyphenylphosphonsäure <u>5</u>	✓	✓	✓	✓		
2,5-Dihydroxybenzol-1,4-bis(phosphonsäure) <u>6</u>		✓	✓	✓		
3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon <u>7</u>		✓	✓	✓		✓

Tabelle 105: Aufstellung der durchgeführten NMR-kontrollierten Titrationen und Bestimmungen von Dissoziations- beziehungsweise Stabilitätskonstanten an den untersuchten Verbindungen

Mittels der Messungen der Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure) 4 und des 1:1 Cadmium-Ethylendiamintetrakis(methylenphosphonsäure)-Komplexes konnten zum ersten Mal unter Einhaltung vergleichbarer analytischer Bedingungen wichtige Erkenntnisse zur Art und Einfluss der Komplexbildung mit Cadmium gewonnen werden. Aufgrund der zu Calcium vergleichbaren Komplexbildungseigenschaften ermöglicht die Verwendung von Cadmium wichtige Informationen hinsichtlich der biologischen Aktivität der untersuchten Substanzen zu erhalten.

Durch die Untersuchungen an 3-Hydroxy-3-(dihydroxyphosphono)isobenzofuranon 7 konnten im Rahmen dieser Arbeit die konzertierte Ringöffnungs- und Protonentransferreaktion NMR-spektroskopisch verfolgt werden. Dass es sich hierbei um einen reversiblen Prozess handelt, konnte durch eine als Retrotitration durchgeführte NMR-kontrollierte Titration gezeigt werden.

Diese Arbeit liefert wichtige Beiträge zur Analytik und Strukturaufklärung bei Deprotonierungsreaktionen von Wirkstoffen, von denen nur geringe Stoffmengen für Messungen zur Verfügung gestellt werden können.

Durch Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Pulsprogramme für LC-NMR-Systeme [121] wird es in Zukunft möglich werden, im Rahmen automatisierter NMR-kontrollierter Titrations 2D-Spektren (z. B. H,H-COSY) zu messen.

8 Anhang und Verzeichnisse

8.1 Literatur

- [1] G. Hägele
NMR Controlled Titrations of Phosphorus-Containing Acids and Bases in Protolysis and Complex Formation.
Review in "Phosphorus-31P-NMR Spectral Properties in Compound Characterization and Structural Analysis". (Edit. L. D. Quin und J. G. Verkade). VCH (1994), 395
- [2] G. Hägele, Z. Szakács, J. Ollig, S. Hermens und C. Pfaff
NMR-controlled titrations: Characterizing aminophosphonates and related structures.
Heteroatom Chem., 11 (2000), 562
- [3] E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom, T. Keller
On-Line Coupling of High-Performance Liquid Chromatography and Nuclear Magnetic Resonance
J. Chromatogr., 186 (1979), 497
- [4] J.P. Yesinowski, R.J. Sunberg, J.J. Benedikt
pH Control and Rapid Mixing in Spinning NMR Samples
J. Magn. Reson., 47 (1982), 85
- [5] E. Bayer, K. Albert, M. Nieder, E. Grom
On-Line Coupling of Liquid cChromatography and High-Field Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry
Anal. Chem., 54 (1982), 1747
- [6] E. Bayer, K. Albert
Continuous-Flow Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
J. Chromatogr., 312 (1984), 91

- [7] K. Albert, E.-L. Dreher, H. Straub, A. Rieker
Monitoring Elektrochemical Reactions by ^{13}C NMR Spectroscopy
Magn. Res. Chem., 25 (1987), 919
- [8] R. Neudert, E. Ströfer, W. Bremser
On-Line NMR in Process Engineering
Magn. Res. Chem., 24 (1986), 1089
- [9] M. Grzonka
Untersuchungen zur titrationsabhängigen ^{31}P -Kernresonanzspektroskopie von
Phosphon- und Phosphinsäuren
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (1989)
- [10] M. Peters, L. Siegfried, Th.A. Kaden
A fully automated pH-NMR titration set-up for protonation studies
J. Chem. Soc, Dalton Trans., (1999), 1603
- [11] M. Peters, L. Siegfried, Th.A. Kaden
pH-metric and NMR studies of the complexation of Zn^{2+} , Cd^{2+} , and Pb^{2+} with
diazacrown ethers having dangling phosphonates groups
J. Chem. Soc, Dalton Trans., (2000), 4664
- [12] G. Hägele, M. Grzonka, H.-W. Kropp, J. Ollig und H. Spiegl
Phosphonic and Phosphinic Acids: Monitoring Protolytic and Complex Formation
Equilibria by Titration Dependend Stopped-Flow-NMR-Techniques.
Phosph., Sulf. and Silic., 77 (1993), 85
- [13] G. Hägele, S. Varbanov, J. Ollig and H.-W. Kropp
Aminomethylphosphine Oxides: Synthesis, Dissociation and Stability Constants,
 $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Controlled Titrations.
Z. Allg. Anorg. Chem., 620 (1994), 914
- [14] J. Ollig and G. Hägele
NMR-Controlled Titrations of Phosphorus Containing Acids and Bases.
Comp. Chem., 19/3 (1995), 287

- [15] G. Hägele, C. Arendt, H.-W. Kropp and J. Ollig
Protonation And Metal Complex Formation Of Phosphorus Containing Acids And Bases.
Phosphorus, Sulf. and Silic. 109-110 (1996), 205 - 208
- [16] J. Ollig, M. Morbach, G. Hägele and E. Breuer
Biorelevant Phosphonic Acids - Protonation And Complexformation Equilibria.
Phosphorus, Sulf. and Silic., 111 (1996), 55
- [17] G. Hägele und U. Holzgrabe
pH-Dependent NMR Measurements.
NMR Spectroscopy in Drug Development and Analysis. Editors in chief: U. Holzgrabe, I. Wawer and B. Diehl.
Wiley – VCH GmbH, Weinheim, (1999), 61
- [18] A. Bier, S. Failla, P. Finocchiaro, G. Hägele, M. Latronico, E. Libertini, J. Ollig
Pyridin-2-yl-(i-propylamino) methane phosphonic acid - Protonation and Metal Complex Formation - NMR-controlled Titration.
Phosphorus, Sulf., and Silic. and the rel. Elem., 155 (1999), 89
- [19] J. Ollig
Untersuchungen zur titrationsabhängigen Kernresonanzspektroskopie
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (1996)
- [20] S. Hermens
NMR-Spektroskopisch kontrollierte Titrationsen
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf (1996)
- [21] S. Hermens
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (in Vorbereitung)
- [22] H. Blum
Therapeutisch wirksame Phosphonate: Ergebnisse aus 30 Jahren Entwicklungsarbeiten über Polyphosphonsäuren
J. prakt Chem, 336 (1994), 492

- [23] Y. Yano, J. McRae, D.C. Van Dyke, H.O. Anger
Technetium-99m-Labeled Stannous ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate: A New Bone Scanning Agent
J. Nucl. Med., 14 (1973), 73

- [24] A. Schwarz, A. Steinsträßer
Tc-99m- ω -Alkylphosphinico-1-hydroxyalkan-1,1-diphosphonate enthaltene Präparate zur Knochenszintigraphie und Verfahren zur Herstellung dieser Präparate
Offenlegungsschrift DE 3810819 A1
Deutsches Patent- und Markenamt, München (1988)

- [25] L.R. Overby, E.E. Robishaw, J.B. Schleicher, A. Rueter, N.I. Shipkowitz, J.C. Mao
Inhibition of Herpes Simplex Virus Replication by Phosphonoacetic Acid
Antimicrob. Agents Chemotherapy, 6 (1974), 360

- [26] J.M. Reno, L.F. Lee, J.A. Boezi
Inhibition of Herpesvirus Replication and Herpesvirus-Induced Deoxyribonucleic Acid Polymerase by Phosphonoformate
Antimicrob. Agents Chemotherapy, 13 (1978), 188

- [27] L. Gerard, D. Salmon-Céron
Pharmacology and clinical use of foscarnet
Int. J. Antimicrob. Agents, 5 (1995), 209

- [28] B. Eriksson, A. Larsson, E. Helgstrand, N.G. Johansson, B. Öberg
Pyrophosphate Analogues as Inhibitors of Herpes Simplex Virus Type I DNA Polymerase
Biochim. Biophys. Acta, 608 (1980), 53

- [29] G.K. Scriba
Bisphosphonate im Überblick
Pharmazie in unserer Zeit., 29 (2000), 50

- [30] R. Chen, A. Schlossmann, E. Breuer, G. Hägele, C. Tillmann, J.M. Van Gelder, G. Golomb
Long-Chain Functional Bisphosphonates: Synthesis, Anticalcification, and Anti-resorption Activity
Heteroat. Chem., 11/7 (2000), 470
- [31] H. Fleisch
Bisphosphonates - Pharmacology and use in the treatment of tumor-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease
Drugs, 42 (1991), 919
- [32] M.J. Bloemink, J.P. Dorenbos, R.J. Heetebrij, B.K. Keppler, J. Reedijk, H. Zahn
New antitumor platinum compounds linked to amino phosphonic acids which lose the phosphonate and tertiary amine ligand upon to nucleic acids
Inorg. Chem., 33 (1994), 1127
- [33] J.A. Mikroyannidis
Hydroxy and/or Carboxy Substituted Phosphonic and Bisphosphonic Acids Usable as Corrosion and Scale Inhibitors
Phosphorus and Sulfur, 32 (1987), 113
- [34] P.G. Klepetsanis, P.G. Koutsoukos
Kinetics of calcium sulfate formation in aqueous media: effect of organophosphorus compounds
J. of Crystal Growth, 193 (1998), 156
- [35] G.A. Consiglio, S. Failla, P. Fionocchiaro, V. Siracusa
Synthesis of new ortho-Hydroxy aryl phosphonate monomers
Phosphorous, Sulfur and Silicon, 134/135 (1998), 413
- [36] B. Dhawan, D. Redmore
o-Hydroxyaryl Diphosphonic Acids
J. Org. Chem, 49 (1984), 4018

- [37] A.D. La Rosa, S. Failla, P. Finocchiaro, A. Recca, V. Siracusa
Flame-Retarding Properties of a New Phosphorus-Containing Monomer Used as
Hardner in an Epoxy System
J. Polym. Eng., 19/3 (1999), 151

- [38] R. Mannhold
Calciumantagonisten vom Dihydropyridintyp: Medizinisch-chemische und molekularpharmakologische Eigenschaften
Pharmazie in unserer Zeit., 24 (1995), 137

- [39] S. tom Dieck, E.D. Gundelfinger
Chemische Synapsen im Zentralnervensystem
Chemie in unserer Zeit, 34 (2000), 140

- [40] S. Klumpp, J.E. Schultz
Calcium und Calmodulin
Pharmazie in unserer Zeit, 14 (1985), 19

- [41] D.F. Shriver, P.W. Atkins, C.H. Langford
Anorganische Chemie
1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1992)

- [42] Bruker Almanac 2001
Bruker, Rheinstetten (2000)

- [43] N.N. Greenwood, A. Earnshaw
Chemie der Elemente
1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1990)

- [44] I.A. Armitage, Y. Boulanger
Cadmium-113 NMR
Review in "NMR of Newly Accessible Nuclei - Volume 2" (Edit. P. Laszlo),
Academic Press (1983), 337

- [45] R.T. Daher
Trace Metals (Lead and Cadmium Exposure Screening)
Anal. Chem., 67 No. 12 (1995), 405
- [46] H. von Baeyer, K.A. Hofmann
Acetophosphorige Säure
Ber. dtsch. chem Ges., 30 (1897), 1973
- [47] B. Blaser, K.-H. Worms, H.-G. Germscheid, K. Wollmann
Über 1-Hydroxyalkan-1,1-diphosphonsäuren
Z. anorg. allg. Chem., 381 (1971), 247
- [48] H.W. Kranz, K.-H. Worms
1-Hydroxyalkan,1-1-bis-alkylphosphinsäuren und Verfahren zu deren Herstellung
Offenlegungsschrift DE 2153998
Deutsches Patent- und Markenamt, München (1971)
- [49] H.W. Kranz, K.-H. Worms
Verfahren zur Herstellung von 1-Hydroxyalkan,1-1-bis-alkylphosphinsäuren
Offenlegungsschrift DE 2153999
Deutsches Patent- und Markenamt, München (1971)
- [50] H.W. Kranz, K.-H. Worms
Phosphonat-Phosphinatverbindungen und Verfahren zu deren Herstellung
Offenlegungsschrift DE 2334173
Deutsches Patent- und Markenamt, München (1973)
- [51] H.W. Kranz
1-Substituierte Alkan-1,1-bis-(alkylphosphinsäureester) und Verfahren zu deren Herstellung
Offenlegungsschrift DE 2334120
Deutsches Patent- und Markenamt, München (1973)

- [52] R. Heinrich, H.-J. Kleiner
 Stabilisierte Polyolefinformmassen
 Offenlegungsschrift DE 2442390
 Deutsches Patent- und Markenamt, München (1974)
- [53] W. Dürsch, F. Linke, M. Finke
 Verfahren zur Herstellung von Phosphor enthaltenden Polyaddukten
 Offenlegungsschrift DE 2556482
 Deutsches Patent- und Markenamt, München (1975)
- [54] W. Klose, H. Klemp
 1-Hydroxy- ω -(alkyl- bzw. arylphosphinico-)alkan-1,1-diphosphonate und deren
 Salze und Verfahren zur Herstellung dieser neuen Verbindungen
 Offenlegungsschrift DE 3805644 A1
 Deutsches Patent- und Markenamt, München (1988)
- [55] R.R. Irani, K. Moedritzer
 The Direct Synthesis of α -Aminomethylphosphonic Acids. Mannich-Type Reaction with Orthophosphonic Acid.
 J. Org. Chem., 31 (1966), 1603
- [56] R.J. Motekaitis, I. Murase, A.E. Martell
 New multidentate ligands – XI synthesis and chelating tendencies of Ethylenediamine-N,N'-di(methylenephosphinic) acid, Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetra(methylenephosphonic) acid and Ethylenediamine-N,N'-di(methylenephosphonic) acid
 J. Inorg. nucl. Chem., 33 (1971), 3353
- [57] I. Reimann
 WINTIT, WINPROT, WINSORE - Neue Programme zur Untersuchung von
 Protolyse- und Komplexbildungsgleichgewichten
 Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (2001)

- [58] J. Kehler, E. Breuer
3-Chloro-3-(dimethoxyphosphoryl)isobenzofuran-1(3*H*)-one - A New Reagent for the Rapid, Convenient Phthaloylation of Amines and Amino Acids in High Yields Synthesis, (1998), 1419.
- [59] C G. Pfaff
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (in Vorbereitung)
- [60] M. Kriskovic
Präparative, NMR-spektroskopische und analytische Untersuchungen an Guanidinoalkanphosphonsäuren und Guanidinoalkanphosphinsäuren
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (2001)
- [61] Z. Szakács
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (in Vorbereitung)
- [62] M. Meloun, J. Havel, E. Högfeltdt
Computation of Solution Equilibria
Ellis Horwood, Chichester, (1988)
- [63] A.E. Martell, R.J. Moteatikis
The Determination and Use of Stability Constants
VCH, New York, (1988)
- [64] D.J. Leggett (ed)
Computational Methods for the Determination of Formation Constants
Plenum Press, New York, (1986)
- [65] G. Hägele
persönliche Mitteilung
- [66] D.J. Leggett (Ed.)
Computational Methods for the Determination of Formation Constants
Plenum Press, New York (1986)

- [67] A.E. Martell, R.J. Motekaitis
The Determination and Use of Stability Constants
VCH, New York (1988)
- [68] J. Peters
Computer-gesteuerter Titrationsautomat AUTO-T, Entwicklung und Anwendung
auf Aminophosphon- und -phosphinsäuren
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (1992)
- [69] A. Bier
Computer-Einsatz in der Analytischen Chemie zur Untersuchung von Protolyse-
und Komplexbildungsgleichgewichten am Beispiel der Phosphonocarbonsäuren
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (1993)
- [70] A. Bier, G. Hägele
Computereinsatz bei modernen Titrationsverfahren - Teil IV: MINI_T
GIT Fachz. Lab., 6 (1992) 671
- [71] C. Tillmann
Entwicklung neuer Verfahren zur Simulation und Auswertung potentiometrischer
Titrationsen
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (2000)
- [72] H.-W. Kropp
Analytische und NMR-spektroskopische Untersuchungen an Organophosphorsäu-
ren
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf (1994)
- [73] I. Reimann
Programm "SF-Simulation" (2001)
- [74] Visio[®] Technical 5.0
Visio Corporation (1997)

- [75] XWINNMR Version 2.6
Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten (1999)
- [76] WINNMR Version 6.0
Burker-Frantzen Analytik, Bremen (1998)
- [77] H. Friebolin
Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie
2. Auflage, VCH, Weinheim, (1992)
- [78] H. Günther
NMR-Spektroskopie
3. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, (1992)
- [79] J.K.M. Sanders, B.K. Hunter
Modern NMR-Spectroscopy: a guide for chemists
2nd ed., Oxford University Press, Oxford, (1997)
- [80] A. Germanus, H. Thiele
Software Manual „1D WIN NMR“
Bruker; Bremen, (1997)
- [81] P. Bigler
NMR Spectroscopy: Processing Strategies
1. Auflage, VCH, Weinheim, (1997)
- [82] Römpp Lexikon Chemie
Version 1.3, Thieme-Verlag, Stuttgart (1997)
- [83] R. Spiske
Automatisierte Analyse großer Spinsysteme durch fragmentierte Simulation
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (1996)
- [84] U. Weber, H. Thiele
NMR Spectroscopy: Modern Spectral Analysis
1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, (1998)

- [85] U. Weber, H. Thiele
Software Manual „WIN DAISY“
Bruker, Bremen, (1998)
- [86] Bruker Benutzertagung, Ettlingen (2000)
- [87] Manual Magnetsystem, SUPERCONDUCTING NMR MAGNET SYSTEM, Version 24.11.95, SPECTROSPIN AG, CH - Fällanden (1995)
- [88] E.W. Hansen
Deuterated Methanol (99.8%) Nuclear Magnetic Resonance Thermometer
Anal. Chem., 57 (1985), 2993
- [89] C. Uhlemann
Inaugural-Dissertation, Universität Düsseldorf (in Vorbereitung)
- [90] Programm Autoblank, Version 1.0.0
Dissertation C. Tillmann
Universität Düsseldorf (2000)
- [91] S. Augner
Beiträge zur quantitativen Analytik mit Hilfe von spektroskopischen Methoden
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf (1999)
- [92] H. Jancke
NMR als primäre analytische Meßmethode
Nachr. Chem. Tech. Lab., 46 (1998), 720
- [93] Mitteilungen an die Teilnehmer des Ringversuchs NMR-2
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin (2000)
- [94] R.A.M.J. Claessens, J.G.M. van der Linden
Stability Constants of Tin (II) and Calcium Diphosphonate Complexes
J. Inorganic Biochemistry, 21 (1984), 73-82

- [95] P. Dietsch, T. Günther, M. Röhnelt
Dissociation Constants of Ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate [EHDP] and Dichloromethylene-diphosphonates [Cl₂MDP] for H⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and Zn²⁺
Z. Naturforsch., 31c (1976), 661
- [96] M.I. Kabachnik, R.P. Lastovskii, T.Ya. Medev, V.V. Medyntsev, I.D. Kolpakov, N.M. Dyatlova
The complexing properties of hydroxyethylidenediphosphonic acid in aqueous solutions
Dokl. Akad. Nauk SSR, 177 (1967), 582; C.A., 69 (1968), 5682h
- [97] Persönliche Mitteilung G. Hägele / B. Rau
- [98] K.-H. Worms, H. Kranz
Synthesen von 1-substituierten Alkan-1,1-bis(alkylphosphinylverbindungen)
Z. anorg. allg. Chemie, 399 (1973), 1
- [99] C.F. Jensen, S. Deshumukk, H.J. Jakobsen, R.R. Innes, P.D. Ellis
Cadmium-113 Nuclear Magnetic Resonance Studies of Cadmium-Ethylenediaminetetraacetic Acid Complexes
J. Am. Chem. Soc., 103 (1981), 3659
- [100] Persönliche Mitteilung G. Hägele / D. Grunewald
- [101] Unveröffentlichte Ergebnisse C. Verwey / G. Hägele
- [102] M.M. Jones, M.A. Basinger, S.J. Gibbs
Ethylenediaminetetra(methylenephosphonic) Acid (EDTPO) as a Therapeutic Agent
Toxicology Letters, 16 (1983) 117
- [103] W. Fischer, L. Belau, G. Schlunbaum, E. Preu
Zur Kenntnis chelatbildender Äthylendiamin-N,N'-methylenphosphonsäuren
Z. Chem., 5, 3 (1965), 109

- [104] G.V. Polyanchuk, L.M. Shkol'nikova, M.V. Rudomino, N.M. Dyatlova, S. S. Makarevich
X-ray Diffraction Structural Analysis of Organic Complexone Ligands. IX. Crystal and Molecular Structure of EDTMP – an EDTA Analog
Structure Chemistry, 26 (1985), 586
- [105] S. Westerback, K.S. Rajan, A.E. Martell
New Multidentate Ligand. III. Amino Acids Containing Methylenephosphonate Groups
J. Am. Chem. Soc., 87 (1965), 2567
- [106] M.I. Kabachnik, I.M. Dyatlova, T.A. Medved, Y.F. Belguin, V.V. Sidorenko
Complex-Forming Properties of EDTMP and Diethylene-Triamine-N,N,N',N'',N'''-penta(methylenephosphonic) Acids
Proc. Acad. Sci USSR, 175 (1967), 621
- [107] R. Motekaitis, I. Murase, A. Martell
Equilibria of Ethylene-N,N,N',N'-tetrakis(methylenephosphonic) Acid with Cu (II), Ni (II), Co (II), Zn (II), Mg (II), Ca (II), and Fe (III) Ions in Aqueous Solution
Inorg. Chem., 15 (1976), 2303
- [108] E. Rizkalla, M. Zaki
Stability of Some Ethylene-N,N,N',N'-tetrakis(methylenephosphonic) Acid Metal Chelates
Talanta, 26 (1979), 507
- [109] K. Sawada, T. Miyagawa, T. Skaguchi, K. Doi
Structure and Thermodynamic Properties of Aminopolyphosphonate Complex of the Alkine-Earth Metal Ions
J. Chem. Soc. Dalton Trans, (1993), 3777
- [110] K. Popov, E. Niskanen, H. Rönkkömäki, L.H.J. Lajunen
³¹P NMR Study of organophosphonate protonation equilibrium at high pH
New J. Chem., 23 (1999), 1209

- [111] G. Hägele, S. Goudetsidis, E. Wilke, J. Seega, H. Blum, M. Murray
Synthesis and Properties of Compounds Related to 1-t-Butylacetylene-2-phosphonic Acid and 1-t-Butylethane-1,2,2-triphosphonic Acid. Sterically Overcrowded Phosphorus Compounds. Part I.
Phosph. and Sulf., 48 (1990), 131
- [112] M. I. Kabachnik, T.Ya. Medved, N.M. Dyatlova, O.G. Arkhipova, M.V. Rudomino
Organophosphorus Complexones
Russian Chemical Review, 37, 7 (1968), 503
- [113] E.N. Rizkalla, M.T.M. Zaki
Metal Chelates of Phosphonate-containing Ligands-VI. Complexes of EDTMP with Cd, Mg, Ca and Ba
Talanta, 27 (1980), 769
- [114] A.D. Keller, T. Drakenberg, R.W. Briggs, I.A. Armitage
 ^{113}Cd NMR Studies of Small Dynamically Cd^{2+} Complexes
Inorg. Chem., 24 (1985), 1170
- [115] G. Behzadi
Cd-Komplexe von Aminophosphonsäuren
Diplomarbeit, Universität Düsseldorf (1999)
- [116] S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger
150 and More Basic NMR Experiments
2. erweiterte Auflage, WILEY-VCH, Weinheim (1998)
- [117] E. Breuer
in "The chemistry of organophosphorus compounds" Vol. 4, Edited by F. R. Hartly
John Wiley&Sons, (1996), 653
- [118] R. Valters, F. Fülöp, D. Korbonits
Recent Developments in Ring-Chain-Tautomerism
I. Intramolecular Reversible Addition Reactions to the C=O Group
Adv. Heterocycl. Chem., 68 (1995), 251

- [119] K. Bowden, F. P. Malik
Ring-Chain-Tautomerism. Part 7. Substituted Benzil-2-carboxylic and Phenylacet-
ylbenzoic Acids and their Methyl Esters
J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, (1993), 635
- [120] J. Katzhendler, I. Ringel, R. Karamann, H. Zaher, E. Breuer
Acylphosphonates hemiketals-formation rate and equilibrium. The electron-
withdrawing effect of dimethoxyphosphinyl group
J. Chem. Soc., Perkin Trans, 2 (1997), 341
- [121] T. Spitzer, A.M. Sefler, A. Rutkowske
An improved DEPT-HMQC secuencia for high-throughput NMR analysis
Mag. Reson. Chem., 39 (2001), 539

Weitere Danksagung

Bei KNF FLODOS AG (CH-Sursee), dort insbesondere bei Michael Davies, bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung bei der Suche nach einer geeigneten Pumpe und den Applikationstests in deren Räumen.

Bei BRUKER Analytik GmbH, dort insbesondere bei Dr. Michael Ackermann, Peter Ganz und Dr. Manfred Spraul, bedanke ich mich für die Unterstützung bei den Veränderungen an den Durchfluß-Probenköpfen.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls 1 für Anorganische Chemie und Strukturchemie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für die vielseitigen und zahlreichen Diskussionen und Anregungen bedanke ich mich bei Herrn Dr. Mirko Kriskovic, Herrn Dr. Winfried Peters, Herrn Dr. Ingolf Reimann, Herrn Dipl.-Chem. Stephan Hermens, Herrn Dipl.-Chem. Christian Pfaff, Herrn Dipl.-Chem. Marco Puhl, Herrn Dipl.-Chem. Zoltán Szakács, Herrn Dipl.-Chem. Carsten Uhlemann, Frau Beate Rau und Frau Dorothea Grunewald.

Meinen Freunden gilt mein Dank für Verständnis, Ablenkung und emotionale Unterstützung. Ohne sie wäre Manches in der Promotionszeit schwerer gewesen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig verfasst wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Zitate wurden deutlich gekennzeichnet.

Die Daten der Titrationsen und Messungen, sowie alle Grafiken wurden auf CD-ROM gesichert und dem Arbeitsgruppenleiter übergeben.

Düsseldorf, den 22. März 2002

Sven Thomas Augner

bestätigt:

Prof. Dr. Gerhard Hägele