

NMR-TITRATIONEN UND NEUE
AUSWERTEKONZEPTE ZUR AUFKLÄRUNG
DER MIKROSKOPISCHEN DISSOZIATION UND
DER pH-ABHÄNGIGEN KONFORMATION VON
BIORELEVANTEN PHOSPHINSÄUREN UND
CARNOSINDERIVATEN

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

vorgelegt von
Dipl.-Chem. **Zoltán Szakács**
aus Budapest

Düsseldorf 2002

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

Referent: Professor Dr. Gerhard Hägele
Korreferent: Professor Dr. Wolfgang Kläui
Auswärtiger Korreferent: Professor Dr. William S. Sheldrick

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2002

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis Juli 2001 am Institut für Anorganische Chemie und Strukturchemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

Größter Dank gehört meinem Doktorvater, *Herrn Prof. Dr. Gerhard Hägele*. Er hat mir die faszinierende Welt der NMR-Spinsysteme geöffnet. Bei ihm habe ich auch das Glück gehabt, viel Zeit meinem Lieblingsbereich, der Chemometrie widmen, viel programmieren und mit ihm über mathematische Aspekte nachdenken zu können. Er hatte immer Zeit für mich und nicht nur zum Thema Chemie. Die vielseitigen Diskussionen ergaben so viele Anregungen und neue Ideen, dass sie nicht nur für die vorgelegte Dissertation, sondern noch für viele weitere Jahre Forschungsarbeit ausreichen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kläui, dem Direktor des Institutes, danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates. Mein Dank gilt auch meinem auswärtigen Korreferenten, *Herrn Prof. Dr. William S. Sheldrick* (Ruhr-Universität Bochum).

Herrn Prof. Dr. Roman Tyka (Technische Universität Wroclaw) bin ich für die Synthese und Überlassung der Aminophosphinophosphonsäuren **1** und **2** zu Dank verpflichtet.

Dem *Deutschen Akademischen Austauschdienst* gilt mein ganz besonderer Dank für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit in Form eines Promotionsstipendiums.

Allen Mitdoktoranden gilt mein herzlicher Dank für die gute Arbeitsatmosphäre und auch dafür, dass sie mir das Einleben in Düsseldorf erleichtert und mich in einige kulinarische Geheimnisse der Stadt eingeweiht haben. Mein besonderer Dank gehört *Christian Pfaff* und *Ingolf Reimann*, die gute Team-Worker bei den Programmentwicklungen waren. Die kritischen Bemerkungen und kreativen Problemstellungen von *Stefan Hermens* werde ich nie vergessen. *Sven Augner*, *Carsten Uhlemann* und dem Leiter des NMR-Service, *Dr. Wilfried Peters*, gilt mein Dank für wertvolle Diskussionen und einige spezielle NMR-Messungen.

Ich danke *Beate Rau* für die Hilfe in vielen offiziellen Angelegenheiten der Universität sowie nicht zuletzt für die mühevollte Schreibfehlersuche.

Meiner Frau Vicky gilt mein ganz herzlicher Dank für die unendliche Geduld bei durchgearbeiteten Wochenenden, und dass sie mir in guten sowie schlechteren Zeiten immer zur Seite stand. *Meine Eltern* haben mein Promotionsstudium aus der fernen Heimat mit aufmunternden Worten begleitet und in den Ferien für gute Erholung gesorgt.

Schließlich danke ich meinen ungarischen Freunden, *Ágoston Drüszler*, *Ádám Neubrandt* und *Róbert Szakács*, dass sie mir in Düsseldorf ein Gastzimmer und ein ruhiges „Hinterland“ zur Niederschrift der Dissertation ermöglichten.

*Meiner lieben Frau Vicky
und meinen Eltern*

Abstract

In the present dissertation simultaneous protonation and conformational equilibria of multidentate ligands have been studied by potentiometric and $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ NMR titrations. Two phosphinic acid analogues of the herbicide *N*-phosphonomethylglycine were characterised by a novel technique called electrodeless NMR titration. This method allows the determination of small pK values (in the very acidic region) with markedly increased precision. 3-(*P*-Methylphosphino)propionic acid has been studied by NMR controlled titration (hyphenation of the spectrometer with a titrator). The remaining NMR titrations were performed using a series of single samples of different pH values. To evaluate the pH dependent chemical shifts and coupling constants, new computer programs have been developed. MULTINMRPK is used for simultaneous optimization of pK values and ion-specific NMR parameters $d(\text{H,L})$ and $J(\text{H,L})$ by means of multiple non-linear regression and target factor analysis. The new program LAOTIT enables the simulation of the pH dependent spectral pattern of strongly coupled spin systems. The site-specific acidity of individual tautomers (microspecies) of multidentate ligands can be characterised in terms of microscopic dissociation constants. Their determination demands the assumption of spins having chemical shifts which selectively monitor the dissociation of the individual groups. In this work the first quantitative method has been developed to identify group-specific sensor atoms, based on the Sudmeier-Reilly approach. Microconstants have been determined for carnosine, glycylhistidine, 3-(*P*-methylphosphino)propionic acid and the herbicide phosphinothricine. In case of ligands having ethane like rotational segments the canonical conformational analysis of the individual dissociation states H_iL and their tautomers have been performed on the basis of extended Karplus type equations. From these rotamer populations, rotamer-specific dissociation constants have been deduced, which enable the speciation of all sub-microspecies (fine-structures of the ligand with definite conformation and site of protonation).

Inhalt

1 Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1 Allgemein	1
1.2 Problemstellung und Aufgabenstellung	3
1.3 Die untersuchten Substanzen	5
1.3.1 Aminophosphinophosphonsäuren	6
1.3.2 Phosphinsäuren, Phosphinocarbonsäuren und Derivate	7
1.3.3 Carnosin und biorelevante Histidyl-derivate	8
2 Theoretische Grundlagen	9
2.1 Ionenaktivitäten und Konzentrationen	9
2.2 pH, pD und deren Messung	10
2.2.1 pH-Skalen in H ₂ O	10
2.2.1.1 Autoprotolyse des Wassers	12
2.2.1.2 pH-Messung mit der Glaselektrode	13
2.2.1.3 Ausdehnung der pH-Skala, Aciditätsfunktionen	17
2.2.2 pD-Skalen und pD-Messung in D ₂ O	18
2.2.3 pH-Skalen und pH-Messung in H ₂ O/D ₂ O Lösemittelgemischen	19
2.2.4 Zusammenfassung	19
2.3 Makroskopische Protolysegleichgewichte mehrwertiger Liganden	20
2.3.1 Dissoziationskonstanten in H ₂ O	20
2.3.2 Dissoziationskonstanten in D ₂ O und H ₂ O/D ₂ O-Gemischen	22
2.3.3 Aciditätssysteme	23
2.3.4 Molenbrüche der Protolysespezies	24
2.3.5 Die Bjerrum-Funktionen	24
2.3.6 Mittlere Ladung	26
2.3.7 Vorausplanung der Titration eines mehrwertigen Liganden bei konstanter Ionenstärke	27
2.3.7.1 Analytische Form des Liganden	27
2.3.7.2 Einstellung des pH-Wertes mittels starker Säure/Base	28
2.3.7.3 Einstellung der Gesamtionenstärke mittels Ionenpuffer	29

2.3.8	Simulationsformel für mehrere Liganden	30
2.3.9	Bestimmung von makroskopischen Dissoziationskonstanten	30
2.4	Mikroskopische Protolysegleichgewichte zweiwertiger Liganden	30
2.4.1	Mikroskopisches Dissoziationsschema, Mikrokonstanten	31
2.4.2	Wechselwirkungsparameter	33
2.4.3	Stabilitätskonstanten und Molenbrüche der Mikrospesies	33
2.4.4	Gruppenspezifischer Dissoziationsgrad	34
2.4.5	Bestimmung von Mikrokonstanten	35
2.4.5.1	Spezialfall: symmetrische zweibasige Liganden	35
2.4.5.2	Deduktive Abschätzung von Mikrokonstanten	36
2.4.5.3	Experimentelle Bestimmung von Mikrokonstanten	37
2.4.5.4	Theoretische Berechnung von Mikrokonstanten	38
3	NMR-Untersuchung makroskopischer Protolysegleichgewichte	40
3.1	Ionenspezifische NMR-Parameter	40
3.2	Grundlagen der chemischen Verschiebung von Ligandkernen	41
3.2.1	Dissoziationsverschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum	43
3.2.2	Dissoziationsverschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum	43
3.2.3	Dissoziationsverschiebungen im ^{31}P -NMR-Spektrum	44
3.3	Experimentelle Aspekte von NMR-Titrationen	45
3.4	Eine neue Titrationsart: die „elektrodenlose“ NMR-Titration	48
3.4.1	Grundlagen der pH^c -Messung mit NMR-Indikatormolekülen	48
3.4.2	Abdeckung der ganzen pH^c -Skala mit NMR-Indikatormolekülen	50
3.4.3	NMR-spektroskopische Bestimmung sehr kleiner pK^c -Werte	51
3.4.4	Vergleich mit bislang veröffentlichten Simultantitrationen	52
3.5	Übersicht über die bislang entwickelten Auswertungskonzepte von NMR- Titrationen	53
3.5.1	Sonderfälle: Aciditätssysteme erster Ordnung	53
3.5.1.1	Präzise Bestimmung der pK -Differenz mit NMR- Simultantitration	54
3.5.2	Aciditätssysteme höherer Ordnung	56
3.5.2.1	Die Dissoziationskonstanten sind bekannt	56

3.5.2.2	Die Dissoziationskonstanten sind nicht bekannt.....	56
3.6	Zielsetzungen der Programmentwicklung.....	60
3.7	Das Programm MULTINMRPK.....	61
3.7.1	Eingabedaten, Hauptmenü.....	62
3.7.2	Multiple nichtlineare Regression.....	62
3.7.2.1	Parameterauswahl, Startwerte	62
3.7.2.2	Zielfunktion, Datenwichtung.....	63
3.7.2.3	Parameteroptimierung nach der Levenberg-Marquardt- Methode	64
3.7.2.4	Fehlerrechnung.....	65
3.7.2.5	Residual-Analyse und Güte der Kurvenanpassung.....	66
3.7.3	Ein neues Auswertungskonzept: die Zielfaktorenanalyse (TFA)	68
3.7.3.1	Abstrakte Faktorenanalyse	69
3.7.3.2	Datenkomprimierung.....	72
3.7.3.3	Zieltransformation	73
3.7.3.4	Simplex-Parameteroptimierung.....	74
3.7.3.5	Monte Carlo Fehleranalyse.....	75
3.7.4	Ausgabe der Ergebnisse	77
3.7.5	Numerische Erfahrungen mit MULTINMRPK.....	77
3.7.5.1	Einfluss der zu iterierenden Gleichgewichtskonstante	78
3.7.5.2	Vergleich der Zielfaktorenanalyse mit der multiplen Regression.....	79
3.8	Zusammenfassung der Auswertungskonzepte	80

4 Das Programm LaoTit – Simulation titrationsabhängiger

	Kernresonanzspektren höherer Ordnung	81
4.1.1	Quantenmechanische Berechnung eines Spinsystems (Fragmentes).....	85
4.1.1.1	Berechnung der Energieniveaus	85
4.1.1.2	Die Näherung erster Ordnung (X-Approximation).....	88
4.1.1.3	Berechnung der Übergangsfrequenzen und Intensitäten.....	89
4.1.1.4	Linien spezifische Halbwertsbreiten.....	90
4.1.1.5	Spektrumsimulation eines Fragmentes	91

4.1.1.6	Kontrollsumme zur Spektrumsimulation	91
4.1.2	Spinsysteme aus mehreren Fragmenten	92
4.1.3	Anwendungsbeispiel: Spektrumsimulation von Phosphinothricin 6	92
5	NMR-Untersuchung mikroskopischer Protolysegleichgewichte	95
5.1	Einleitung	95
5.2	Selektive Verfolgung der gruppenspezifischen Dissoziation.....	96
5.3	Der nichtselektive Fall: die Sudmeier-Reilly-Gleichung	97
5.3.1	Einsatzmöglichkeiten der Sudmeier-Reilly-Gleichung	99
5.4	Aufgabenstellung.....	99
5.5	Ein neues Verfahren zur Auswahl selektiver Sensorkerne auf Grund normierter NMR-Titrationskurven.....	100
5.6	Mikroskopische Auswertung mit den Programmen MULTINMRPK und NMRMICROPK.....	106
5.6.1	Numerische Erfahrungen mit NMRMICROPK	108
5.7	Zusammenfassung	110
6	NMR-Untersuchung rotamerenspezifischer Protolysegleichgewichte	112
6.1	Einleitung	112
6.2	Karplusbeziehungen	112
6.2.1	Karplusgleichungen für $^3J_{\text{HH}}$	113
6.2.2	Karplusgleichungen für $^3J_{\text{CH}}$	116
6.2.3	Karplusgleichungen für $^3J_{\text{PP}}$	116
6.3	Kontinuierliche Beschreibung der Rotamerenverteilung	116
6.3.1	Rotamerenanalyse nach Lin	117
6.3.1.1	Rotamerenanalyse von 1,2-disubstituierten Ethanen nach Lin....	117
6.3.1.2	Rotamerenanalyse für 1,1,2-trisubstituierte Ethane.....	119
6.3.2	Die „CUPID“-Rotamerenanalyse.....	119
6.4	Die kanonische Rotamerenanalyse anhand von $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten	120
6.4.1	Rotamerenanalyse von 1,2-disubstituierten Ethanen mit äquivalenten <i>gauche</i> -Rotameren	120
6.4.1.1	Rechenweg 1: das N-Wert-Modell.....	121

6.4.1.2	Rechenweg 2: das „Mittelwertmodell“	122
6.4.1.3	Vergleich der beiden Rechenwege	122
6.4.2	Rotamerenanalyse von 1,2-disubstituierten Ethanen mit nichtäquivalenten <i>gauche</i> -Rotameren	123
6.4.3	Rotamerenanalyse von 1,1,2-trisubstituierten Ethanen	125
6.4.4	Rotamerenanalyse an mehreren Segmenten	127
6.5	Berechnung rotamerenspezifischer Dissoziationskonstanten	129
6.6	Zusammenfassung	133
7	Experimenteller Teil.....	134
7.1	Chemikalien	134
7.2	Potentiometrische Titrationsen	135
7.2.1	Anlage und Messbedingungen	135
7.2.2	Auswertung	137
7.3	Kernresonanzspektroskopische Messungen	137
7.3.1	Einzelproben-NMR-Titrationsen	138
7.3.2	„Elektrodenlose“ NMR-Titrationsen bei $I = 1 \text{ M}$	138
7.4	Multinukleare NMR-kontrollierte Titration der 3-(<i>P</i> - Methylphosphinoyl)propansäure (5)	139
7.5	Auswertung und Abbildung der Spektren	141
8	Darstellung und Diskussion der Ergebnisse	142
8.1	Vorversuche zu den „elektrodenlosen“ Titrationsen	142
8.1.1	Auswahl der NMR-Indikatormoleküle	142
8.1.2	NMR-spektroskopische Bestimmung des pK_1 -Wertes von Histidin.....	142
8.1.3	NMR-spektroskopische pK -Bestimmung der Dichloressigsäure.....	143
8.1.4	Ermittlung der Indikatorparameter weiterer Sondenmoleküle.....	145
8.2	Aminophosphinophosphonsäuren	146
8.2.1	[<i>N</i> -(<i>P</i> -methylphosphinoylmethyl)- <i>N</i> - methyl]aminomethanphosphonsäure (1)	146
8.2.1.1	Dissoziationskonstanten	146
8.2.1.2	Zuordnung der ^1H - und ^{31}P -Spektren	148

8.2.1.3	Einzelproben- $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Titration bei 0,1 M Ionenstärke.....	148
8.2.1.4	„Elektrodenlose“ $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Titration bei 1 M Ionenstärke.....	152
8.2.2	[<i>N</i> -(<i>P,P</i> -Dimethylphosphinoylmethyl)- <i>N'</i> -(<i>P'</i> - methylphosphinoylmethyl)]aminomethanphosphonsäure (2)	155
8.2.2.1	Dissoziationskonstanten.....	155
8.2.2.2	Zuordnung der ^1H -, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ - und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren	157
8.2.2.3	„Elektrodenlose“ $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Titration bei 1 M Ionenstärke.....	158
8.2.3	Vergleichende Diskussion der Ergebnisse	161
8.3	Phosphinsäuren, Phosphinocarbonsäuren und Analoga	164
8.3.1	<i>P</i> -Ethyl- <i>P</i> -methylphosphinsäure (3).....	164
8.3.1.1	Zuordnung und Analyse der ^1H -NMR-Spektren	164
8.3.2	Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) (4).....	165
8.3.2.1	Makroskopische Dissoziationskonstanten.....	165
8.3.2.2	Berechnung der mikroskopischen Dissoziationskonstanten.....	167
8.3.2.3	Auswertung der titrationsgradabhängigen ^1H -, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ - und $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren	168
8.3.2.4	Konformationsanalyse aus $^3\text{J}_{\text{PP}}$	171
8.3.3	3-(<i>P</i> -Methylphosphinoyl)propansäure (5).....	171
8.3.3.1	Makroskopische Dissoziationskonstanten.....	171
8.3.3.2	Zuordnung und Analyse der ^1H - und ^{31}P -Spektren	172
8.3.3.3	200-MHz- $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration.....	175
8.3.3.4	Berechnung der mikroskopischen Dissoziationskonstanten.....	179
8.3.3.5	Konformationsanalyse am Ethanskelett anhand $^3\text{J}_{\text{HH}}$	184
8.3.3.6	Vergleichende Diskussion der Rotamerenverteilung	185
8.3.3.7	Berechnung der rotationspezifischen Aziditätskonstanten.....	188
8.3.4	Phosphinothricin (Glufosinat, 6).....	189
8.3.4.1	Makroskopische Dissoziationskonstanten.....	189
8.3.4.2	Zuordnung und Analyse der ^1H - und ^{31}P -Spektren	191

8.3.4.3	Einzelproben- $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Titration bei $I = 0,1 \text{ M}$	197
8.3.4.4	Einzelproben- $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Titration bei $I = 1 \text{ M}$	199
8.3.4.5	Berechnung der mikroskopischen Dissoziationskonstanten	201
8.3.4.6	Rotamerenanalyse am Torsionswinkel c_1	204
8.3.4.7	Rotamerenanalyse am Torsionswinkel c_2	205
8.3.4.8	Berechnung der rotamerenspezifischen Dissoziationskonstanten	206
8.3.5	Glutaminsäure (7).....	208
8.3.5.1	Makroskopische und mikroskopische Dissoziationskonstanten	208
8.3.5.2	Zuordnung und Analyse der ^1H -Spektren.....	209
8.3.5.3	Rotamerenanalyse am Torsionswinkel c_1	211
8.3.5.4	Rotamerenanalyse am Torsionswinkel c_2	212
8.3.5.5	Berechnung der rotamerenspezifischen Dissoziationskonstanten	213
8.4	Carnosin und biorelevante Histidyllderivate	215
8.4.1	3-Aminopropansäure (b -Alanin, 8).....	215
8.4.1.1	Dissoziationskonstanten	215
8.4.1.2	Spektralanalyse und ^1H -NMR-Titration	216
8.4.1.3	Konformationsanalyse.....	218
8.4.2	N-Acetylhistamin (9).....	221
8.4.2.1	pK-Bestimmung	221
8.4.2.2	Spektralanalyse und ^1H -NMR-Titration	221
8.4.2.3	Konformationsanalyse am Torsionswinkel χ_1	223
8.4.3	N-Acetylhistidin (10)	225
8.4.3.1	Makroskopische Dissoziationskonstanten	225
8.4.3.2	Spektralanalyse und ^1H -NMR-Titration	226
8.4.3.3	Konformationsanalyse am Torsionswinkel χ_1	229
8.4.4	Glycylhistidin Hydrochlorid (11).....	230
8.4.4.1	Makroskopische Dissoziationskonstanten	230
8.4.4.2	Zuordnung und Analyse der ^1H -NMR-Spektren	231

8.4.4.3	Einzelproben- ¹ H-NMR-Titration	233
8.4.4.4	Berechnung der Mikrokonstanten	235
8.4.4.5	Konformationsanalyse am Torsionswinkel χ_1	237
8.4.5	Carnosin (12)	237
8.4.5.1	Makroskopische Dissoziationskonstanten	237
8.4.5.2	Zuordnung und Analyse der ¹ H-Spektren	239
8.4.5.3	Einzelproben- ¹ H-NMR-Titration	242
8.4.5.4	Berechnung der Mikrokonstanten	244
8.4.5.5	Konformationsanalyse am Torsionswinkel χ_1	245
8.4.5.6	Konformationsanalyse am Torsionswinkel ω	246
8.4.6	Vergleichende Diskussion der Ergebnisse	247
9	Zusammenfassung.....	250
10	Literatur.....	255

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

1.1 Allgemein

Biorelevante Verbindungen, wie Aminocarbonsäuren, Peptide oder Aminophosphonsäuren verfügen über diverse funktionelle Gruppen, mit denen sie Metallionen komplexieren oder Redoxreaktionen eingehen können. In biologischen Medien, wässrigen Lösungen mit definierten Werten für pH und Ionenstärke, kommt es immer als begleitende Nebenreaktion zu Protonierungs-Deprotonierungsgleichgewichten. Die Konkurrenz der Protonen für die Donorgruppen beeinflusst somit die Konzentration der bioaktiven Spezies. Zu einer quantitativen Beschreibung biochemischer Gleichgewichte und kinetischer Prozesse sind deshalb Kenntnisse über die Protolyseeigenschaften aller beteiligten Substanzen unerlässlich [1].

Die Charakterisierung der Acidität einer Verbindung erfolgt traditionell über die „klassischen“ Dissoziationskonstanten (pK -Werte). In dieser sog. makroskopischen Beschreibung wird nur die Stöchiometrie der entstehenden Protolysespezies H_iL beachtet, nicht aber die Topologie der Dissoziationsspezies. Die Kenntnis der pK -Werte ermöglicht die Berechnung der Konzentration aller Protolysestufen oder der pH-abhängigen Gesamtladung. Diese Informationen sind beispielsweise zur Optimierung bestimmter Syntheseschritte oder analytischer Trennverfahren nützlich. Die systematische Untersuchung von Dissoziationskonstanten führt ferner hin zu chemischen Grundbegriffen, wie z. B. die Hammettschen Sigma-Konstanten zur Beschreibung induktiver Effekte [2]. pK -Werte werden in vereinfachender Weise mit einer Reihe von Variablen der pharmazeutischen Forschung linear korreliert (Beziehungen der Linearen Freien Enthalpie).

Das Verständnis biologischer Prozesse auf molekularer Ebene verlangt aber eine detailliertere Behandlung. Die sog. Mikrospiezies eines mehrbasigen Liganden (Protonierungsisomere, spezielle Tautomere) haben zwar die gleiche Zusammensetzung H_iL , unterscheiden sich aber in der Stelle der Protonierung [1]. Deren Gleichgewichte werden durch mikroskopische pK -Werte (Mikrokonstanten) beschrieben, die im Unterschied zu makroskopischen pK -Werten den einzelnen Protolysezentren zuzuordnen

sind. Da in biochemischen Reaktionen nicht immer die in größter Konzentration vorliegende Mikrospesies die größte Reaktivität besitzt [3][4], sollte die Verteilung aller Mikrospesies bekannt sein. Auch der Transport eines Arzneimittels bis zum Targetorgan wird durch dessen intramolekulare Ladungsverteilung beeinflusst, denn nur neutrale, nicht aber zwitterionische, Mikrospesies können ohne spezielle Mechanismen durch Biomembranen penetrieren.

Die Kenntnis der mikroskopischen Speziesverteilung versetzt uns in die Lage, Metallkomplexbildung [4][5][6], Biopolymer-Ligand-Wechselwirkung [7] oder Redoxgleichgewichte [8] auf der Ebene einzelner funktioneller Gruppen zu behandeln.

Eine noch detailreichere, submolekulare Beschreibung ermöglicht die Kenntnis der pH-abhängigen Konformation eines Liganden [12]. In diesem Fall können die Dissoziationskonstanten (Rota-Makrokonstanten oder Rota-Mikrokonstanten) und dadurch auch die Konzentrationen der einzelnen Rotamere abgeleitet werden [13]. Unsere Modellvorstellungen lassen erwarten, dass sich aus diesen submikroskopischen Daten auch feinere strukturelle Einzelheiten der Enzym-Ligand-Wechselwirkung aus der Sicht des Liganden charakterisieren lassen.

Makroskopische pK -Werte werden in der Regel durch potentiometrische Titration bestimmt. Zur Ermittlung von Mikro- und Submikrokonstanten müssen Titrationsmethoden mit spektroskopischen Methoden kombiniert werden [9]. Im Düsseldorfer Arbeitskreis von G. Hägele wurden zu diesem Zweck automatisierte Verbundtechniken wie die UV-kontrollierte Titration [10][11] oder die NMR-kontrollierte Titration [14][15][16][18] entwickelt und damit zahlreiche Organophosphorverbindungen charakterisiert.

Es interessierten technische und biorelevante Gesichtspunkte von Phosphonsäuren [16], Phosphinsäuren [19], Phosphinoxiden [20], die durch weitere Substituenten wie Carboxylat- [21], Amino- [15] oder Guanidinogruppen [22] funktionalisiert waren.

NMR-Titrations-, Mikrodissoziations- und Konformationsanalyse sind ebenfalls Schwerpunkte der Forschungsthemen im Budapester Arbeitskreis von Prof. Béla Noszál. Hier werden unter anderem Aminosäuren [13], Oligopeptide [8] und Pharmazeutika charakterisiert.

Der Erfahrungsschatz beider Arbeitsgruppen sollte nun vereinigt werden und dafür bot mein DAAD-Promotionsstipendium eine ideale Möglichkeit.

1.2 Problemstellung und Aufgabenstellung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, auf der theoretischen Seite, neuere Auswertekonzepte zu NMR-Titrationsen zu entwickeln, die auf modernen, multivariaten statistischen Methoden basieren. Damit soll der ganze Informationsgehalt der pH-abhängigen NMR-Spektrenreihe erfasst werden.

Die bis heute gebräuchliche Methode der makroskopischen Auswertung ist die simultane nichtlineare Regression [23], wobei Makrokonstanten und chemische Verschiebungen der individuellen Protolysespezies optimiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein neues Auswerteprogramm erstellt werden, mit dem die Anwendbarkeit der Zielfaktorenanalyse untersucht werden soll. Es war zu hoffen, dass in diesem neuartigen Ansatz die Anzahl der zu iterierenden Parameter wesentlich reduziert werden kann.

Grundlage der Berechnung von Mikrokonstanten aus NMR-Titrationsen stellt die Auswahl geeigneter Spins (Sensoratome) dar, die auf die Dissoziation einer einzelnen Gruppe spezifisch reagieren. Manchmal gelingt das nicht streng, aber es lassen sich brauchbare Approximationen finden, so dass die gewünschten Mikrokonstanten mit befriedigender Genauigkeit erhalten werden können. Einen allgemeineren Ansatz stellt die Sudmeier-Reilly-Gleichung [24][25] dar, wobei die dissoziationsbedingte Änderung der chemischen Verschiebung aus Einflüssen mehrerer Gruppen zusammengesetzt wird. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob objektive, mathematische Kriterien zur Auswahl von Sensoratomen entwickelt werden können. Die neuen Ansätze sollen im Rahmen eines integrierten Programmsystems verwirklicht werden, wobei die Übergabe der NMR- und Gleichgewichtsparameter aus der makroskopischen Auswertung in die mikroskopische einfach und mit möglichst wenigen Benutzereingaben erfolgt.

Ethanähnliche Rotatoren mit geladenen Gruppen in wässriger Lösung stellen aktuelle Schwerpunkte der NMR-spektroskopischen, quantenchemischen oder moleküldynamischen Konformationsanalyse dar [26][27]. In dieser Arbeit soll ein kritischer Vergleich

unter den bestehenden kontinuierlichen und kanonischen Ansätzen der Rotamerenanalyse aus vicinalen $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle$ -Kopplungskonstanten durchgeführt werden. Unter Betrachtung simultaner Protolyse- und Rotationsgleichgewichte sollen die Dissoziationskonstanten einzelner Rotamere ermittelt werden. Dabei werden Moleküle mit zwei Torsionswinkeln, d.h. mit neun kanonischen Rotameren, erstmals durch Rota-p*K*-Werte beschrieben.

Die in dieser Arbeit neu zu entwickelnden Auswertekonzepte sollen durch praktische Beispiele, ${}^1\text{H}$ - und ${}^{31}\text{P}$ -NMR-Titrationsen der im nachfolgenden Kapitel beschriebenen Modellsubstanzen verifiziert werden.

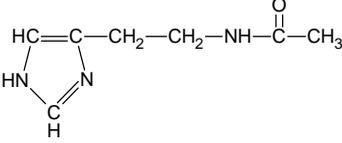
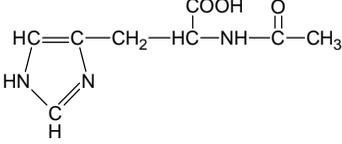
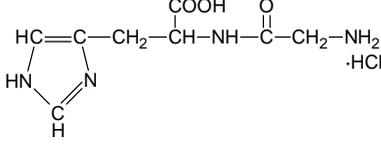
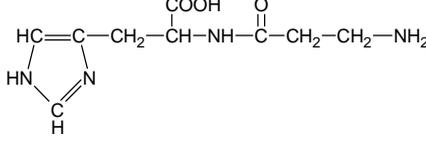
$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	3-Aminopropansäure (<i>b</i> -Alanin) 8 $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ (Aldrich, p.a., 99%)
	N^w -Acetylhistamin 9 $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3$ (Aldrich, p.a., 99,5%)
	N^a -Acetyl-L-Histidin 10 $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$ (Sigma, p.a., 99,5%)
	Glycyl-L-histidin Hydrochlorid 11 $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$ (Aldrich, p.a.)
	N^α -(<i>b</i> -Alanyl)-L-histidin (Carnosin) 12 $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_3$ (Aldrich, p.a., 98%)

Tabelle 1.1 (Fortsetzung): Strukturformel, Herkunft und Reinheit der charakterisierten Liganden

1.3.1 Aminophosphinophosphonsäuren

Aminophosphonsäuren, als Phosphonoanaloga der natürlichen Aminocarbonsäuren und Peptide weisen diverse herbizidale und antibiotische Wirkungen auf [28].

In dieser Arbeit werden zwei Derivate **1** und **2** der Nitrilotris(methylenphosphonsäure) NTMP untersucht. Beide Verbindungen wurden von Herrn Prof. R. Tyka (Wroclaw, Heinrich Hertz Stipendiat, Düsseldorf) durch Kombination mehrerer Synthesesequenzen unter Einbezug des Moedritzer-Verfahrens [29] synthetisiert [19].

An [*N*-(*P*-Methylphosphinoylmethyl)-*N*-methyl]aminomethanphosphonsäure **1** wurden erste, orientierende ^{31}P -NMR-kontrollierte Titrationen von J. Peters durchgeführt [30]. [*N*-(*P,P*-Dimethylphosphinoylmethyl)-*N*-(*P'*-methylphosphinoylmethyl)]aminomethanphosphonsäure **2** stellt hingegen eine neue Verbindung dar, deren Acidität und ^{31}P -NMR-

spektroskopisches Verhalten erstmals in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollen. Beide Strukturen enthalten mehrere Phosphor-Sensorkerne (Phosphono, Phosphino, und in Verbindung **2** auch Phosphinoxid), woraus grundlegende Erkenntnisse über den induktiven Einfluss der Protolysezentren auf die ^{31}P chemischen Verschiebungen dieser Gruppen erhofft wurden. Zudem sollte die Dissoziation auch ^1H -NMR-spektroskopisch verfolgt werden.

1.3.2 Phosphinsäuren, Phosphinocarbonsäuren und Derivate

Während die komplexchemischen und kernresonanzspektroskopischen Eigenschaften der aliphatischen und aromatischen *Phosphonsäuren* bereits weitgehend bekannt sind, wurde den entsprechenden *Phosphinsäuren* weniger Beachtung geschenkt [30]. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die einfachen Vertreter **3**, **4** und **5** analytisch, bzw. ^{31}P - und ^1H -NMR-spektroskopisch charakterisiert werden. Es handelt sich dabei um Abkömmlinge der *P*-Methyl-*P*-Alkylphosphinsäuren.

Phosphinothricin (Glufosinat) **6**, das γ -Methylphosphino-Analogon der Glutaminsäure **7** ist eine Verbindung natürlicher Herkunft und wurde aus zwei Gattungen von *Streptomyces fungi* isoliert. In Form seines Ammoniumsalzes **6a** wird es auch industriell in großem Maßstab produziert und in der Landwirtschaft als Kontaktherbizid eingesetzt [31]. Die Verbindung greift beim Enzym Glutamin-Synthetase ein, die in der Biosynthese der Aminosäure Glutamin eine Schlüsselrolle spielt. Durch Hemmung von Glutamin-Synthetase werden in den Zellen des Schädling toxische Verbindungen wie Ammoniak akkumuliert, worauf die Pflanze innerhalb weniger Tage stirbt. Ein zur Zeit aktueller Schwerpunkt der Pflanzenzüchtung liegt in der Entwicklung von Glufosinat-resistenten Getreidesorten [32].

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die mikroskopischen Dissoziationskonstanten und die Rotamerenverteilung von Glufosinat **6** durch pH-abhängige ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektroskopie aufgeklärt und mit denen der Stammverbindung Glutaminsäure **7** verglichen werden.

3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5** stellt zudem ein Metabolit von Glufosinat in Pflanzen dar.

1.3.3 Carnosin und biorelevante Histidyllderivate

Die Imidazolgruppen von Histidylresten spielen enorm eine wichtige Rolle in einer Reihe von Metalloenzymen [1][33]. Die mittels ^1H -NMR-Titration gewonnenen pK -Werte erwiesen sich als guter Indikator für die Mikroumgebung der betreffenden Imidazolgruppe in Proteinen [34]. Der Dissoziationsgrad von Imidazolgruppen wurde sogar in intakten Tieren durch *in vivo* Kernresonanzspektroskopie ermittelt [35].

Auch einfachere Histidyllderivate wie etwa Dipeptide sind in der lebenden Natur von Bedeutung. Carnosin, *b*-Alanylhistidin **12** kommt in relativ hohen Konzentrationen (1 bis 4 mM) im menschlichen Muskel vor [36], in dem sogar mit in-vivo NMR-Spektroskopie detektiert werden kann [37]. Die biologische Funktion dieses Dipeptids ist noch nicht in allen Details aufgeklärt worden. Carnosin ist ein Antioxidans und spielt vielleicht auch in der Wundheilung eine Rolle. Zur Umwandlung von Carnosin gibt es im Körper Carnosinase. Carnosin war bereits wiederholt Gegenstand von ^1H - und ^{13}C -NMR-Studien. Auch die Komplexbildung mit Zn^{2+} [40] und Ca^{2+} [41] wurde untersucht.

N-Acetylhistidin stellt das einfachste Modell für C-terminales Histidin in Enzymen dar [42][45].

Die Tautomerieverhältnisse des Imidazolringes sind für viele Abkömmlinge schon weitgehend bekannt [40][42].

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollen die bislang unbekanntenen Mikrokonstanten und Rotamerenverteilung des *b*-Alanylteils von Carnosin mittels ^1H -NMR-Titration bestimmt werden. Zu Vergleichszwecken sollen auch die weiteren Imidazollderivate **8** bis **11** untersucht werden. Die Kenntnis der Mikrokonstanten und der pH-abhängigen c_1 -Rotamerenverteilung könnte auch zur Identifizierung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen dem *a*-Stickstoff und dem Imidazolring führen [43].

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Ionenaktivitäten und Konzentrationen

Die thermodynamische Behandlung chemischer Gleichgewichte verwendet den Begriff der Aktivitäten für alle beteiligten Spezies. Die Aktivität a_i der i -ten Komponente setzt sich aus deren molarer Konzentration c_i (in mol dm⁻³ oder M) und dem Aktivitätskoeffizienten f_i zusammen:

$$a_i = c_i f_i \quad (2.1)$$

f_i wird definitionsgemäß gleich eins, wenn sich der gelöste Stoff im Standardzustand befindet. Als Standardzustand stellt man sich eine hypothetische Lösung mit $c_i = 1$ M vor, worin aber jede Komponente i die gleiche Umgebung haben möge wie in einer „unendlich verdünnten“ Lösung.

Die Aktivitätskoeffizienten lassen sich berechnen sowie messen. Zur Berechnung gibt es theoretisch abgeleitete oder semiempirische Gleichungen, die alle auf dem Konzept der Ionenstärke I beruhen [47]:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (2.2)$$

Die Summe läuft über alle in der Lösung befindlichen Ionen. Das bekannteste Aktivitätsmodell stellt das Grenzgesetz von Debye und Hückel dar, es gilt jedoch nur für Lösungen mit $I \leq 10^{-3}$ M [48]. Für konzentriertere Lösungen kommen dessen Erweiterungen und andere semiempirische Modelle, wie z. B. die Pitzer-Theorie [49] zum Einsatz. Eine Übersicht der Aktivitätsmodelle (auch für Neutralteilchen) findet sich in der Dissertation von I. Reimann [50]. Hier soll nur die empirische Davies-Gleichung [51] erwähnt werden, die das von IUPAC bis zu $I = 0,1$ M empfohlene Aktivitätsmodell darstellt [52]:

$$\lg f_i = -Az_i^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0,3I \right) \quad (2.3)$$

A bezeichnet darin die Debye-Hückelsche Konstante: 0,509 für Wasser bei 25 °C.

Genauer betrachtet sind die spezifischen Aktivitätskoeffizienten einzelner Kationen und Anionen thermodynamisch undefiniert und auch nicht messbar. Wird die elektromotorische Kraft galvanischer Zellen ohne Überführung gemessen, so ergibt sich daraus der mittlere Aktivitätskoeffizient f_{\pm} , der für ein Salz $M_{n^+}A_{n^-}$ den geometrischen Mittelwert von f_+ und f_- darstellt:

$$f_{\pm} = \sqrt[n_+ + n_-]{f_+^{n_+} f_-^{n_-}} \quad (2.4)$$

Zahlreiche Gleichgewichtsreaktionen werden bei konstant gehaltener Ionenstärke untersucht [53]. Zu der Probelösung wird dabei in hoher Konzentration ein vollständig dissoziierter, starker Elektrolyt (sog. Inertsalz oder Ionenpuffer) hinzugefügt, so dass dessen Beitrag zur Gesamtionenstärke dominant wird. Bei einer derart konstant* gehaltenen Ionenstärke bleiben auch die Aktivitätskoeffizienten konstant. Das Anion und das Kation des Inertsalzes dürfen mit den zu untersuchenden Komponenten (Liganden oder Metallionen) naturgemäß in keinerlei Wechselwirkung treten [1]. Im Regelfall wird das Salz aus dem Kation der eingesetzten starken Base und dem Anion der starken Säure verwendet, wie z. B. NaNO_3 , NaClO_4 , NaCl oder KCl . Um eine Komplexbildung des Liganden mit Alkaliionen zu vermeiden, kommen auch $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ als starke Base und $(\text{CH}_3)_4\text{NX}$ ($X = \text{Cl}, \text{NO}_3$) als Ionenpuffer zum Einsatz.

2.2 pH, pD und deren Messung

2.2.1 pH-Skalen in H_2O

Zur quantitativen Beschreibung verschiedener Gleichgewichtsprozesse und Reaktionsmechanismen in wässriger Lösung ist ein exaktes Maß für die Acidität erforderlich. Es war Sørensen, der 1909 den negativen dekadischen Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration unter dem Namen „Wasserstoffionenexponent“ p_{H} einführte [54]. Seitdem hat die Definition von „pH“ eine kontinuierliche Entwicklung erfahren. Einen historischen Überblick darüber gibt Bates in [55].

* Während einer Titration kommt es unvermeidlich zur Fluktuation der Ionenstärke wegen der Neutralisierung der starken Säure mit der Titrator Base, aber diese Schwankung kann durch geeignete Wahl der Zusammensetzung der Vorlage- und Zugabelösungen vermindert werden. Somit bleiben die Aktivitätskoeffizienten *nahezu* konstant.

Heute sind in H_2O (mindestens) drei pH-Skalen gebräuchlich [56]: die „praktische“ (pH_{mess}), die aktivitätsbezogene (pH^a) und die konzentrationsbezogene Skala (pH^c). Die ersten beiden beruhen auf primären Standard-Pufferlösungen gemäß den Standards nach NIST (Tabelle 2.1). Die durch $\text{pH}(\text{S})$ bezeichneten pH^a -Werte dieser Pufferlösungen wurden nach internationaler Konvention mit der Standard-Wasserstoffelektrode ermittelt [57]. Die zu kalibrierende pH-Messkette sollte dann mit diesen Puffern einer Mehrpunkt-kalibration unterworfen werden, mit anschließender linearer Regression (siehe [50]). Auf diese Weise kalibrierte Elektroden liefern Anzeigewerte pH_{mess} auf der praktischen pH-Skala (*operational pH scale*, [58]). pH_{mess} wird in der vorliegenden Arbeit auch einfach als pH geschrieben.

Für Lösungen, die in ihrer Zusammensetzung den oben erwähnten Pufferlösungen nahe liegen, stimmt der Anzeigewert in guter Näherung mit pH^a überein:

$$\text{pH} = \text{pH}_{\text{mess}} \cong \text{pH}^a = -\lg a_{\text{H}^+} \quad (2.5)$$

Messzellen können auch in Bezug auf die Wasserstoff-Ionenkonzentration $[\text{H}^+]$ geeicht werden. Zu diesem Zweck wird Irving *et al.* [59] folgend eine starke Säure bei konstanter Ionenstärke gegen eine starke Base titriert (*Blanktitration*). Falls die Konzentration beider Lösungen genau bekannt und der Dissoziationsgrad α der beiden Reaktanden gleich 1 ist, was allgemein angenommen wird, lässt sich $[\text{H}^+]$ und damit der pH^c -Wert für jeden Titrationspunkt errechnen:

$$\text{pH}^c = -\lg [\text{H}^+] \quad (2.6)$$

Die Umrechnung von pH_{mess} auf pH^c erfolgt durch ein empirisches Konversionsglied A ,

$$\text{pH}^c = \text{pH}_{\text{mess}} + A \quad (2.7)$$

dessen physikochemische Deutung für die Glaselektrode in Kapitel 2.2.1.2 diskutiert wird (siehe auch [59]).

Primärer Standard	pH(S) in H ₂ O		Primärer Standard	pD(S) in D ₂ O
	22 °C	25 °C		
0,05 m KH-Phthalat	4,004	4,008	0,05 m KD ₂ -Citrat	4,293
0,025 m KH ₂ PO ₄ 0,025 m Na ₂ HPO ₄	6,875	6,865	0,025 m KH ₂ PO ₄ 0,025 m Na ₂ HPO ₄	7,428
0,008695 m KH ₂ PO ₄ 0,03043 m Na ₂ HPO ₄	7,423	7,413	0,025 m NaDCO ₃ 0,025 m Na ₂ CO ₃	10,736
0,01 m Na ₂ B ₄ O ₇	9,207	9,180	–	–

Tabelle 2.1: Primäre Standard-Pufferlösungen nach NIST (früher NBS) für H₂O [57] und D₂O [60]. m bezeichnet die Konzentrationseinheit der Molalität (mol kg⁻¹)

2.2.1.1 Autoprotolyse des Wassers

Der Begriff von pH ist untrennbar verknüpft mit der Autoprotolysereaktion des Wassers:



Im Folgenden wird das hydratisierte Wasserstoffion als H⁺ bezeichnet. Das Gleichgewicht 2.8 wird durch das Ionenprodukt des Wassers K_w^a charakterisiert:

$$K_w^a = a_{\text{H}^+} a_{\text{OH}^-} \quad (2.9)$$

Diese Konstante ist bei konstantem Druck nur von der Temperatur abhängig, z. B. $\text{p}K_w^a = 13,997$ bei 25 °C [61].

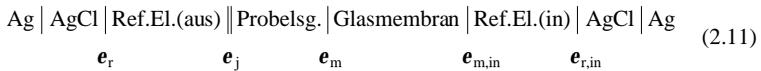
Das konzentrationsbezogene Ionenprodukt des Wassers K_w^c ,

$$K_w^c = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = \frac{K_w^a}{f_{\pm}^2} \quad (2.10)$$

ist durch die Aktivitätskoeffizienten auch von der jeweiligen Ionenstärke abhängig (z. B. $\text{p}K_w^c = 13,78$ bei $I = 0,1 \text{ M}$ und $T = 25 \text{ °C}$ [61]). Die Zahlenwerte von K_w^c wurden für verschiedene Temperaturen und Ionenstärken experimentell ermittelt [61][62] oder lassen sich nach Gleichung 2.10 aus K_w^a berechnen [50].

2.2.1.2 pH-Messung mit der Glaselektrode

Bei der potentiometrischen pH-Bestimmung wird die Potentialdifferenz E zwischen einer Indikator- und Bezugselektrode vermessen. Der primäre Standard der Indikatorelektrode ist zwar die Wasserstoffelektrode [55], doch im Labor werden wegen deren einfacherer Handhabung nahezu ausschließlich Glaselektroden benutzt. Als Bezugselektrode fungieren Elektroden zweiter Art, z. B. Ag/AgCl. Die Kombination der beiden Halbzellen liefert die kommerziellen *Einstabmessketten*, die sich im Allgemeinen mit dem folgenden Zellen-symbol beschreiben lassen [65]:



„Ref.El.(aus)“ bezeichnet hierin den Referenzelektrolyten der Ag/AgCl-Bezugselektrode, eine Lösung bekannter Chloridionenaktivität (bei Schott-Elektroden: 3 M KCl). In der inneren Referenzlösung der Glaselektrode, „Ref.El.(in)“ befinden sich neben KCl spezielle Pufferkomponenten, um eine wohldefinierte Wasserstoff-Ionenaktivität einzustellen. An allen Phasengrenzen treten Potentialdifferenzen auf, die im Folgenden einfach „Potentiale“ genannt und durch \mathbf{e} gekennzeichnet werden, wie in der Elektrochemie üblich [55][65]. Die Potentialterme \mathbf{e} , $\mathbf{e}_{m,in}$ und $\mathbf{e}_{r,in}$ sind konstant und von der zu messenden Probelösung unabhängig. Das Potential am Flüssigkeitskontakt (Diffusionspotential, *liquid junction potential*) \mathbf{e}_j ist geringfügig von der Zusammensetzung der Probelösung abhängig, worauf noch zurück gekommen wird. Es ist aber das Potential der Glasmembran \mathbf{e}_m , das sensitiv auf die Aktivität der Wasserstoffionen und, unter Umständen, der Alkaliionen reagiert. Die messbare Potentialdifferenz zwischen Glas- und Bezugselektrode (Klemmenspannung, E) setzt sich als algebraische Summe der einzelnen „Potentiale“ zusammen:

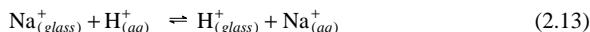
$$E = \mathbf{e}_{r,i} - \mathbf{e}_{m,i} - \mathbf{e}_r + \mathbf{e}_m + \mathbf{e}_j \quad (2.12)$$

Betrachten wir nun, nach welchem Mechanismus das Membranpotential \mathbf{e}_m die Ionenaktivitäten in der Probelösung indiziert. Für den Moment sei der Beitrag des Diffusionspotentials \mathbf{e}_j vernachlässigt.

Die nichtkristalline, pH-sensitive Membran wird aus speziellem Glas hergestellt. Die Ausbildung einer Potentialdifferenz zwischen der Glasmembran und einer Probelösung ist

zwar seit 1906 bekannt [63], doch das Verständnis für e_m nahm mehr als 80 Jahre in Anspruch [64][65].

Nach der Grundidee von Horovitz [66] und Schiller [67] hat Nicolsky die Theorie des reversiblen Ionenaustausches zwischen der Lösung und der „Glasphase“ aufgestellt [68]:



Für dieses Gleichgewicht gilt eine Austauschkonstante $K_{\text{H,Na}}$. Damit soll die experimentelle Tatsache beschrieben werden, dass die Glaselektrode in alkalischen Lösungen eine Querempfindlichkeit für Alkaliionen M^+ aufweist („Alkalifehler“):

$$E = E^0 + G \ln(a_{\text{H}^+} + K_{\text{H,M}} a_{\text{M}^+}) \quad (2.14)$$

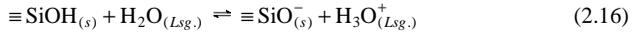
G repräsentiert den Nernstschen Steigungsfaktor (59,16 mV/pH bei 25 °C):

$$G = \frac{RT \ln 10}{F} \quad (2.15)$$

Eisenman hat diese, rein thermodynamische Theorie weiterentwickelt, um eine bessere Übereinstimmung mit den gemessenen Potentialwerten zu erzielen [69]. Als Bindungsort der Kationen wurde (unter anderem) die mit der Lösung in Kontakt stehende, etwa 100 nm dicke, durch Wasser gequollene Kieselgelschicht (Haber-Haugaard-Schicht oder Quellschicht) vermutet.

Die experimentelle Aufklärung der Ionenkonzentrationsprofile innerhalb dieser Schicht startete mit Pionierarbeiten von Boksay *et al.* [70]. Wichtige Erkenntnisse lieferten später *ion bombardment for chemical analysis* (IBSCA), nukleare Reaktionsanalyse (NRA) und Infrarotspektroskopie (für eine Zusammenfassung siehe [65]).

Diese Ergebnisse veranlassten Baucke 1985, den alternativen *Dissoziationsmechanismus* der Glaselektrode zu entwickeln [71]. Nach seiner Theorie findet an der Glas/Lösungsphasengrenze die Dissoziation der Silanol-Endgruppen $\equiv\text{SiOH}$ statt:



wofür eine heterogene Dissoziationskonstante $K_{d,H}$ mit Oberflächenaktivitäten a' gilt. Die somit entstehende Oberflächenladung verursacht die Ausbildung des Membranpotentials e_m , das mit a_{H^+} der Probelösung in folgender Beziehung steht [64][65]:

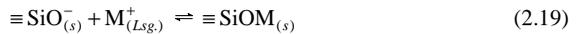
$$e_m = -G \lg K_{d,H} + G \lg \frac{a'_{\text{SiO}^-}}{a'_{\text{SiOH}} a_{\text{H}_2\text{O}}} + G \lg a_{H^+} \quad (2.17)$$

Die ersten beiden Terme sind in erster Näherung konstant und lassen sich in e_m^0 zusammenfassen. Damit ergibt sich die bekannte Nernstsche Elektrodenfunktion:

$$e_m = e_{m,H^+}^0 + G \lg a_{H^+} \quad (2.18)$$

Das Gleichgewicht 2.16 beschreibt die Funktionsweise der Glaselektrode nicht über die ganze pH-Skala. Es gibt einen *Transitions-pH-Wert* pH_{tr} , wo die Empfindlichkeit für H^+ und Alkaliionen M^+ gleich ist [71]. Bei $\text{pH} \leq \text{pH}_{tr}-2$ zeigt die Elektrode eine selektive pH-Funktion, und dann ist deren Oberfläche vorwiegend protoniert ($\equiv \text{SiOH}$).

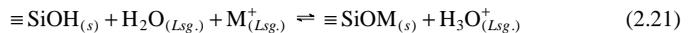
Im stark alkalischen Bereich, $\text{pH} \geq \text{pH}_{tr}+2$ kommt es zu einer heterogenen Salzbildung mit den Alkaliionen an der ionisierten Silica-Oberfläche [64][65]:



Eine ähnliche Ableitung mit Oberflächenaktivitäten und der Assoziationskonstante $K_{a,M}$ führt zu einer Nernstschen Gleichung, die 100% Selektivität auf Alkaliionen beschreibt:

$$e_m = e_{m,Na^+}^0 + G \lg a_{Na^+} \quad (2.20)$$

Im Übergangsbereich $\text{pH}_{tr}-2 \leq \text{pH} \leq \text{pH}_{tr}+2$ findet das folgende kombinierte Gleichgewicht statt:



woraus eine gemischte Elektrodenfunktion folgt [64][65]:

$$\mathbf{e}_m = \mathbf{e}_{m,H^+}^0 + G \lg(a_{H^+} + K_{d,H}'' K_{a,M}' a_{Na^+}) \quad (2.22)$$

mit

$$K_{d,H}'' = K_{d,H} \frac{f_{SiOH} a_{H_2O}}{f_{SiO^-}} \quad \text{und} \quad K_{a,M}' = K_{a,M} \frac{f_{SiO^-}}{f_{SiOM}} \quad (2.23)$$

Es ist hier aus Platzgründen nicht möglich, weitere Ergebnisse der Dissoziationstheorie zu erläutern. Zusammenfassend lässt sich aber feststellen, dass im Rahmen der Dissoziationstheorie auch solche experimentellen Befunde über die Funktionsweise der Glaselektrode quantitativ interpretiert werden können, die sich nach dem Austauschmechanismus nicht beschreiben lassen (siehe [64][65]).

In dieser Arbeit wurden keine Messungen in jenen pH/pNa-Bereichen durchgeführt, wo beträchtliche Alkalifehler auftreten können (dies wäre der Fall z. B. für $\text{pH} > 10$ und $[\text{Na}^+] = 1 \text{ M}$). Somit kann die Elektrodenfunktion mit der einfacheren Beziehung 2.18 beschrieben werden.

Andere Probleme bereitet jedoch das Diffusionspotential \mathbf{e}_j . Einsetzen der Gleichungen 2.15 und 2.18 in Gleichung 2.12 liefert für die Zellenspannung folgenden Ausdruck:

$$E = \mathbf{e}_{r,i} - \mathbf{e}_{m,i} - \mathbf{e}_r + \mathbf{e}_{m,H^+}^0 - G \text{pH}^a + \mathbf{e}_j = E^0 - G \text{pH}^a + \mathbf{e}_j \quad (2.24)$$

Zur Aufrechterhaltung der Linearität mit pH^a in Gleichung 2.24 ist es erforderlich, das Diffusionspotential \mathbf{e}_j auf einem konstanten Wert zu halten. \mathbf{e}_j hat erst bei pH-Extrema ($\text{pH}^a < 1,5$ oder $\text{pH}^a > 12$) einen nennenswerten Beitrag, bei denen sich in der Ausbildung von \mathbf{e}_j auch die H^+ und OH^- Ionen beteiligen. Wegen deren speziellem Transport (Grotthus-Mechanismus) besitzen H^+ und OH^- eine um eine Zehnerpotenz größere Ionenbeweglichkeiten als andere Ionen. Nach Biedermann und Sillén kann \mathbf{e}_j als lineare Funktion von $[\text{H}^+]$, bzw. $[\text{OH}^-]$ ausgedrückt werden [53]. Diese Näherung führt zur erweiterten Nernstschen Gleichung der Form:

$$E = E^0 - G \text{pH}^a + j_{\text{H}^+} [\text{H}^+] + j_{\text{OH}^-} [\text{OH}^-] \quad (2.25)$$

Sollte die Einstabmesskette an Stelle von Pufferlösungen mittels Blanktitration auf pH^c kalibriert werden, gilt die erweiterte Nernstsche Gleichung mit pH^c :

$$E = E^{0'} - G \text{pH}^c + j_{\text{H}^+}[\text{H}^+] + j_{\text{OH}^-}[\text{OH}^-] \quad \text{mit } E^{0'} = E^0 + G \lg f_{\pm} \quad (2.26)$$

Moderne pH-Einstabmessketten können im Bereich $1,5 < \text{pH}^c < 12$ als linearer pH^c -Sensor eingesetzt werden.

2.2.1.3 Ausdehnung der pH-Skala, Aciditätsfunktionen

Die Glaselektrode ist für Messungen in stark sauren Lösungen nicht geeignet. Bei $\text{pH}^c < 1,5$ kommt es zu Abweichungen von der Nernstschen Linearität (Säurefehler der Glaselektrode), die durch Glieder wie $j_{\text{H}^+}[\text{H}^+]$ in Gleichung 2.26 nur zum Teil beschrieben werden können.

Für eine verlässliche pH-Bestimmung im stark sauren Bereich stehen folgende Spezialmethoden zur Verfügung:

1. Zur Ausdehnung der pH^a -Skala in den negativen Bereich hat Hammett die Aciditätsfunktion H_0 eingeführt. Es handelt sich dabei um die spektrophotometrische Erfassung der Acidität mittels Indikatoren. Die Hammettsche H_0 -Funktion wurde durch substituierte Nitroaniline für H_2SO_4 -Lösungen bis zu $H_0 = -10$ konstruiert [72][73][74].

$$H_0 = -\log \frac{a_{\text{H}^+} f_{\text{Ind}}}{f_{\text{HInd}^+}} = \text{p}K_{\text{a}}^a - \log \frac{[\text{HInd}^+]}{[\text{Ind}]} \quad (2.27)$$

Der zweite Term auf der rechten Seite ist spektrophotometrisch messbar. In Kenntnis der Dissoziationskonstante $\text{p}K_{\text{a}}^a$ kann der H_0 -Wert der Probelösung berechnet werden. Da jedes Indikatormolekül nur im eigenen Dissoziationsbereich $-1 < H_0 < \text{p}K_{\text{s}}^a + 1$ eingesetzt werden kann, müssen Moleküle mit überlappenden $\text{p}K_{\text{s}}^a$ -Werten gewählt werden. Die Verbindungen sollten auch strukturverwandt sein, damit das Verhältnis $f_{\text{Ind}}/f_{\text{HInd}^+}$ in Gleichung 2.27 konstant bleibt.

Neben H_0 existieren Aciditätsfunktionen für andere starke Säuren und Indikatormoleküle [75]. Als „universale“ Aciditätsfunktion wurde später die *X-Skala* (*excess acidity scale*) eingeführt [76][77][78], wobei Einflüsse der Protonierung und der Solvatisierung separiert werden können [79][80].

2. In Kapitel 3.4 wird ein ähnliches Verfahren für die Kernresonanzspektroskopie eingeführt, womit sich pH^c -Werte im aciden Grenzwertintervall 0 bis 2 auf 0,02 pH-Einheiten genau erfassen lassen.

Das Ionenprodukt des Wassers $\text{p}K_w^a$, als obere „Grenze“ der pH-Skala, kann mit einer anderen Aciditätsfunktion, H , überschritten werden [81].

2.2.2 pD-Skalen und pD-Messung in D_2O

Analog zu H_2O verläuft die Autoprotolysereaktion in D_2O und liefert solvatisierte Deuteronen und Deuteroxidionen:



Das aktivitätsbezogene Ionenprodukt $\text{p}K_w^{a,\text{D}}$ beträgt bei 25 °C 13,14 nach Gold und Lowe [82] und 13,17 nach Rondinini *et al.* [83].

Seit den 1960er Jahren ist bekannt, dass kommerzielle Glaselektroden auch in D_2O reproduzierbar funktionieren [84][85]. Neuere Untersuchungen von Baucke ergaben, dass die Glaselektrode auf Deuteronen in D_2O nach dem gleichen Dissoziationsmechanismus reagiert, wie auf Protonen in H_2O [86].

Die pD(S)-Werte primärer Standardpuffer in D_2O wurden von Paabo und Bates ermittelt (siehe Tabelle 2.1) [60]. Die Elektrodenleichung mit diesen deuterierten Pufferlösungen führt zur „praktischen“ pD-Skala und zur aktivitätsbezogenen pD^a -Skala.

Die Messkette kann aber auch mittels NIST-Pufferlösungen in H_2O kalibriert werden. Der Anzeigewert in D_2O liefert dann „praktische“ pH^{D} -Werte, wofür der Standardzustand ($a_{\text{H}^+} = 1$) in verdünntem H_2O vorliegt [86][86]. Zur Umrechnung der Anzeigewerte pH^{D} in pD wird ein Korrekturglied d_{glass} addiert:

$$\text{pD} = \text{pH}^{\text{D}} + d_{\text{glass}} \quad (2.29)$$

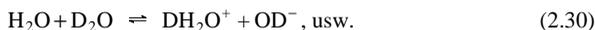
Für den Bereich $1 < \text{pD} < 13$ bei 25 °C wurde d_{glass} von mehreren Autoren ermittelt (siehe [84][87] und die darin zitierten Veröffentlichungen), der Mittelwert beträgt $0,41 \pm 0,03$.

Zu einer pD^c -Kalibration der Einstabmesskette sollte eine Blanktitration von DCl in D_2O mit NaOD vorgenommen werden, dieser kostenintensive Weg wird jedoch nur selten beschritten.

2.2.3 pH-Skalen und pH-Messung in H₂O/D₂O Lösemittelgemischen

Nach ähnlichen Prinzipien können pH-Skalen für H₂O/D₂O-Gemische abgeleitet werden. Dieser Bereich wurde jedoch weniger ausführlich erforscht, es fehlen beispielsweise die NIST-Standardpuffer für H₂O/D₂O-Systeme.

Schon bei der Formulierung der Autoprotolyse stößt man auf Komplikationen wegen der Austauschvorgänge zwischen Protonen und Deuteronen,



Die Modellvorstellungen über die Verteilung der Isotope in diesen Spezies wurden von Purlee [88] zusammengefasst. Das Ionenprodukt von H₂O/D₂O-Gemischen lässt sich als Polynom des prozentualen Deuteriumgehaltes ausdrücken [82][89].

In der vorliegenden Arbeit wird ein Mischsolvens aus 90 v/v% H₂O und 10 v/v% D₂O verwendet. Die Mindestkonzentration von D₂O bestimmen NMR-Gesichtspunkte; stabile Lockkonditionen müssen sicher gestellt werden.

Die Aciditätsverhältnisse des Lösemittels H₂O/D₂O 9/1 liegen nahe zu denen von H₂O. In diesen Lösungen werden zwei pH-Skalen benutzt, beide mit dem Standardzustand ($a_{\text{H}^+} = 1$) in 100% H₂O.

1. Die Elektrodeneichung wird mittels NIST-Pufferlösungen in H₂O durchgeführt. Unkorrigierte Anzeigewerte für Probelösungen mit $I = 0,1 \text{ M}$ in H₂O/D₂O 9/1 liefern pH^D-Werte.
2. Probelösungen 1 molarer Ionenstärke sind solchermäßen nicht ideal, so dass man anstelle einer Pufferkalibration eine pH^c-Kalibration durch Blanktitration in H₂O bei $I = 1 \text{ M}$ vorzieht. Die unkorrigierten Ablesewerte in H₂O/D₂O 9/1 werden mit pH^{c,D} bezeichnet, wofür mit guter Näherung gilt:

$$\text{pH}^{c,D} \cong -\lg(c_{\text{H}^+} + c_{\text{D}^+}) \quad (2.31)$$

2.2.4 Zusammenfassung

Der Vergleich von pK-Werten verschiedener Verbindungen ist nur dann sinnvoll, wenn sie unter gleichen Bedingungen bestimmt und auf die gleiche pH-Skala bezogen werden. Die

in dieser Arbeit benutzten pH-Skalen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Die Definition der betreffenden pK -Werte findet sich in den Kapiteln 2.3.1 und 2.3.2.

Bedingungen der Elektrodenkalibration				Bedingungen der pH-Messung				
Kalibrationsart	Lö.-Mi.	I [M]	T [°C]	Lö.-Mi.	I [M]	T [°C]	Skale	pK
Blanktitration	H ₂ O	0,1	25,0	H ₂ O	0,1	25,0	pH ^c	pK^c
Blanktitration	H ₂ O	1	25,0	H ₂ O	1	25,0	pH ^c	pK^c
NIST-Puffer	H ₂ O	–	22,0	10% D ₂ O	0,1	22	pH ^D	$pK^{mix,D}$
Blanktitration	H ₂ O	1	22,0	10% D ₂ O	1	22	pH ^{c,D}	$pK^{c,D}$
NIST-Puffer	H ₂ O	–	22,0	D ₂ O	–	22	pH ^D	$pK^{mix,D}$

Tabelle 2.2: Die in dieser Arbeit benutzten pH-Skalen mit der betreffenden Elektrodenkalibration und den resultierenden pK -Werten

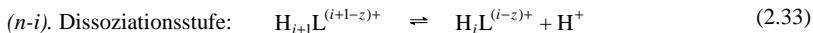
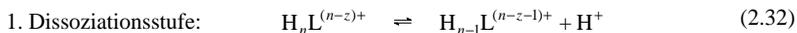
2.3 Makroskopische Protolysegleichgewichte mehrwertiger Liganden

In der nachfolgenden Diskussion werden Protolysegleichgewichte ein- und mehrbasiger Säuren, Basen und deren Salze (im allgemeinen: Liganden oder Protolyten) einheitlich beschrieben.

2.3.1 Dissoziationskonstanten in H₂O

Betrachten wir die vollprotonierte Form $H_nL^{(n-z)+}$ eines n -wertigen Liganden. Es gilt $z = n$ für n -wertige Neutralsäuren und $z = 0$ für n -wertige Basen.

Die Dissoziation von H_nL^{z+} lässt sich in n diskreten Schritten formulieren, wobei die Laufvariable i die Protonenzahl in den entstandenen Spezies bezeichnet:



Auf dieser makroskopischen Ebene der Beschreibung wird nur die Stöchiometrie der entstandenen Spezies beachtet, nicht aber die Stelle der Dissoziation.

Die thermodynamische Behandlung der Gleichgewichte 2.32 bis 2.34 erfolgt durch aktivitätsbezogene Dissoziationskonstanten pK_s^a . Wie bei der Behandlung von Komplexbildungsgleichgewichten üblich, beschränken wir uns hier auf konzentrationsbezogene Konstanten, die nur bei der betreffenden Ionenstärke und Temperatur Gültigkeit haben.

Die Dissoziationskonstante oder Aciditätskonstante K_s (als negativer Logarithmus pK_s , im Englischen pK_A) lautet für den $(n-i)$ -ten Deprotonierungsschritt:

$$K_{s,n-i}^c = \frac{[H_i L^{(i-z)+}] \cdot [H^+]}{[H_{i+1} L^{(i+1-z)+}]} \quad (2.35)$$

Im Fall einer Pufferkalibration wird a_{H^+} an Stelle von $[H^+]$ erfasst. Damit ergeben sich praktische oder gemischte (*mixed*) Dissoziationskonstanten [90]:

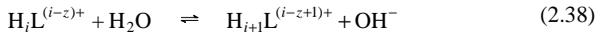
$$K_{s,n-i}^{mix} = \frac{[H_i L^{(i-z)+}] \cdot a_{H^+}}{[H_{i+1} L^{(i+1-z)+}]} \quad (2.36)$$

Da in vielen biologischen Studien statt der Blanktitration die einfachere Pufferkalibration durchgeführt wird, besteht Interesse auch an diesen praktischen Konstanten [56]. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden pK_s -Werte mit dem oberen Index c oder mix nur dann versehen, wenn diese Unterscheidung von Bedeutung ist.

Die Gleichgewichte 2.32 bis 2.34 rückwärts betrachtend gelangt man zu Protonierungskonstanten $K_{H,i+1}$ ($\log K_{H,i+1}$ oder einfach $\log K_{i+1}$):

$$K_{H,i+1} = \frac{[H_{i+1} L^{(i-z+1)+}]}{[H_i L^{(i-z)+}] \cdot [H^+]} = \frac{1}{K_{s,n-i}} \quad (2.37)$$

Insbesondere für basische Gruppen wird die Protonenaufnahme auch als basische Dissoziation der konjugierten Säure aufgefasst,



mit der betreffenden basischen Dissoziationskonstante $K_{b,i+1}$ (oder $pK_{b,i+1}$):

$$K_{b,i+1} = \frac{[H_{i+1} L^{(i-z+1)+}] \cdot [OH^-]}{[H_i L^{(i-z)+}]} = \frac{K_w}{K_{s,n-i}} = K_w \cdot K_{H,i+1} \quad (2.39)$$

Schließlich kann auch die Bildung der Protolysespezies aus den freien Komponenten L^{z-} und H^+ betrachtet werden:



Dafür gilt die Stabilitätskonstante b_i (oder $\log b_i$), die eine einheitliche mathematische Beschreibung von Protolyse- und Komplexbildungsgleichgewichten ermöglicht:

$$b_i = \frac{[H_i L^{(i-z)+}]}{[L^{z-}] \cdot [H^+]^i} = \prod_{k=n-i+1}^n \frac{1}{K_{s,k}} = \prod_{k=1}^i K_{H,k} = \prod_{k=1}^i \frac{K_{b,k}}{K_w} \quad (2.41)$$

Für die Stabilitätskonstante der volldeprotonierten Spezies L^{z-} gilt definitionsgemäß:

$$b_0 = 1 \quad (2.42)$$

Die pK_s -, $\log K_H$ -, pK_b - und $\log b$ -Werte bilden vier äquivalente Formalismen zur Beschreibung makroskopischer Protolysevorgänge. Für den Chemiker sind pK_s -Werte geläufig, unter „ pK “ werden immer Dissoziationskonstanten verstanden. In stöchiometrischen Herleitungen und in tabellarischen Konstantensammlungen [91] wird meist die kompakte $\log b$ -Schreibweise benutzt.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Auswertprogramm MULTINMRPK ermöglicht die Iteration von Gleichgewichtskonstanten in allen vier Formalismen (siehe Kapitel 3.7).

2.3.2 Dissoziationskonstanten in D_2O und H_2O/D_2O -Gemischen

Unterschiede der pK -Werte in D_2O und H_2O können auf intramolekulare Effekte und Mediumeffekte zurückgeführt werden.

1. Die beiden konjugierten Säuren BD^+ und BH^+ einer Base B haben unterschiedliche Nullpunktsenergien. Nach Berechnung der Schwingungsfrequenzen $\nu(B-D)$ und $\nu(B-H)$ wurde mit den Methoden der statistischen Thermodynamik $K^D/K^H = 3,26$ abgeleitet [92][2]. Der Mittelwert zahlreicher Messungen ergab sich zu $K^D/K^H \approx 3$ [93].
2. Der Mediumeffekt bedeutet eine unterschiedliche Solvatation der Spezies B und BH^+ in D_2O und H_2O und zeichnet sich durch Veränderungen deren Aktivitätskoeffizienten [55] aus. Wie bereits diskutiert, sind die pH-Skalen in beiden Solvenzien nicht gleich.

Konzentrationsbezogene und praktische Dissoziationskonstanten in D_2O werden mit den folgenden Ausdrücken definiert:

$$K_{n-i}^{c,D} = \frac{[D_i L^{(i-z)^+}] \cdot [D^+]}{[D_i L^{(i+1-z)^+}]} \quad \text{und} \quad K_{n-i}^{mix,D} = \frac{[D_i L^{(i-z)^+}] \cdot a_{D^+}}{[D_i L^{(i+1-z)^+}]} \quad (2.43)$$

pK^D -Werte liegen tendenziell um etwa 0,4-0,7 pK -Einheiten höher als pK^H -Werte [94][95]. Viele Autoren haben gefunden, dass die Differenz $pK^D - pK^H$ mit steigenden pK^H -Werten wächst [96][97][98][268]. Die Korrelationsgleichung in [268] lautet:

$$pK^D = 0,41 + 1,020 pK^H \quad (2.44)$$

Von Delgado *et al.* wurde kürzlich aus 138 Konstantenpaaren folgende Korrelationsgleichung aufgestellt [98]:

$$pK^D = 0,32 + 1,044 pK^H \quad (2.45)$$

Diese linearen Ansätze versagen aber für Zyklopeptide [98] oder wenn intramolekulare Wasserstoffbrücken vorhanden sind [99].

Trotz der empirischen Korrelationen empfiehlt es sich in der Praxis, pK -Werte in D_2O oder H_2O/D_2O -Gemischen mittels NMR-Titration stets erneut zu ermitteln (siehe Kapitel 3).

2.3.3 Aciditätssysteme

Mehrbasige Liganden lassen sich in Abhängigkeit ihrer Dissoziationskonstanten wie folgt klassifizieren. Die erstmals in der Dissertation von Grzonka [14] und später davon unabhängig in meiner Diplomarbeit [46] eingeführte Symbolik für Aciditätssysteme weist Analogien zu NMR-Spinsystemen auf.

Unter einem *Aciditätssystem erster Ordnung* wird ein mehrwertiger Protolyt verstanden, dessen Dissoziationsschritte nicht überlappend, d.h. in getrennten pH-Bereichen, verlaufen:

$$\Delta pK_i = pK_{i+1} - pK_i \geq 3 \quad (2.46)$$

Die makroskopischen Dissoziationskonstanten sind in diesem Fall den einzelnen Gruppen zuzuordnen. Ein Beispiel für das AMX-Aciditätssystem stellt Histidin mit $pK_1 = 1,92$ (COOH), $pK_2 = 6,03$ (Imidazoliumgruppe) und $pK_3 = 9,14$ (Ammoniumgruppe) dar [100].

Gilt die Beziehung 2.46 für mindestens zwei, aufeinanderfolgende pK -Werte nicht, gehört der Ligand einem *Aciditätssystem höherer Ordnung* an. Als Beispiel für das AXY-Aciditätssystem kann Glycylhistidin **11** mit $pK_1 = 2,53$, $pK_2 = 6,783$ und $pK_3 = 8,25$

herangezogen werden. Während die erste Dissoziationskonstante dieses Dipeptids eindeutig zur Carboxylgruppe zuzuordnen ist, beschreiben pK_2 und pK_3 nicht unmittelbar die Acidität der Imidazolium- und Ammoniumgruppe. Die eigene (intrinsische) Acidität dieser Gruppen wird in Kapitel 8.4.4.4 durch mikroskopische Dissoziationskonstanten charakterisiert.

2.3.4 Molenbrüche der Protolysespezies

Die Totalkonzentration des Liganden lässt sich als Konzentrationssumme aller Protolysespezies ausdrücken:

$$c_{L^{z-}}^t = [L^{z-}] + \sum_{j=1}^n [H_j L^{(j-z)+}] \quad (2.47)$$

Der Molenbruch der Protolysespezies $H_i L^{(i-z)+}$ gibt deren Stoffmengenanteil bezüglich der Totalmenge des Liganden an:

$$x_{H_i L^{(i-z)+}} = \frac{[H_i L^{(i-z)+}]}{c_{L^{z-}}^t} = \frac{b_i [H^+]^i}{\sum_{j=0}^n b_j [H^+]^j} \quad (2.48)$$

Damit sind alle Molenbrüche auf eins normiert:

$$\sum_{i=0}^n x_{H_i L^{(i-z)+}} = 1 \quad (2.49)$$

Bei Verbindungen mit $\Delta pK > 3$ (Aciditätssysteme erster Ordnung) treten die Protolysespezies in gesonderten pH-Bereichen auf, wo deren Anteil nahezu 100% beträgt (als Beispiel siehe die Molenbruchverteilung von *N*-Acetylhistidin **10** in Abbildung 8.85 des Kapitels 8.4.3.1). Wie in Kapitel 3.5.1 näher diskutiert, erleichtert diese Eigenschaft die Auswertung der NMR-Titrationskurven wesentlich. Aciditätssysteme höherer Ordnung sind daran erkennbar, dass der Maximalanteil einer oder mehrerer Protolysespezies nicht 100% beträgt (siehe z. B. Abbildung 8.91 in Kapitel 8.4.4.1 für Glycylhistidin **11**).

2.3.5 Die Bjerrum-Funktionen

Jannik Bjerrum hat 1941 den revolutionären Ansatz veröffentlicht, wonach Dissoziations- und Komplexbildungsgleichgewichte mittels glaselektrodenindizierter Titrations quanti-

tativ untersucht werden können [101]. Bjerrum hat auch die Konzepte der mittleren Protonierung und mittleren Ligandierung eingeführt, was später auch zur Auswahl der Komplexspezies weiterentwickelt wurde (für eine Übersicht siehe die Dissertation von I. Reimann [50]).

Der *mittlere Protonierungsgrad* \bar{n}_H gibt an, wieviel Protonen durchschnittlich an einem Liganden in Abhängigkeit vom pH-Wert koordiniert sind:

$$\bar{n}_H = \sum_{i=1}^n i \cdot x_{H,L^{(i-z)+}} = \frac{\sum_{i=1}^n i \cdot \mathbf{b}_i \cdot [\text{H}^+]^i}{\sum_{j=0}^n \mathbf{b}_j \cdot [\text{H}^+]^j} \quad (2.50)$$

Der *mittlere Dissoziationsgrad* \bar{h} zeigt hingegen an, wieviel Protonen durchschnittlich von einem Molekül her abdissoziiert worden sind:

$$\bar{h} = \sum_{i=0}^n (n-i) \cdot x_{H,L^{(i-z)+}} = \frac{\sum_{i=0}^n (n-i) \cdot \mathbf{b}_i \cdot [\text{H}^+]^i}{\sum_{j=0}^n \mathbf{b}_j \cdot [\text{H}^+]^j} = n - \bar{n}_H \quad (2.51)$$

Es gilt also:

$$\bar{n}_H + \bar{h} = n \quad (2.52)$$

Da Gleichgewichte in der vorliegenden Arbeit immer in Richtung Dissoziation behandelt werden, wird konsequenterweise die Funktion \bar{h} benutzt. Abbildung 2.1 zeigt die mittlere Dissoziation für Histidin und Glycylhistidin an. Diese Darstellung ist für Histidin besonders anschaulich: bei $\bar{h} = 0,5, 1,5$ und $2,5$ kann man die pK -Werte auf der Abszisse ablesen („Halbstufenregel“). Bei Glycylhistidin gilt die Halbstufenregel nur für pK_1 . Die \mathbf{b}_i -Werte, und daraus pK_2 und pK_3 sollten als unbekannte Koeffizienten der gebrochenen rationalen Funktion im Rahmen einer nichtlinearen Regression rechnerisch ermittelt werden.

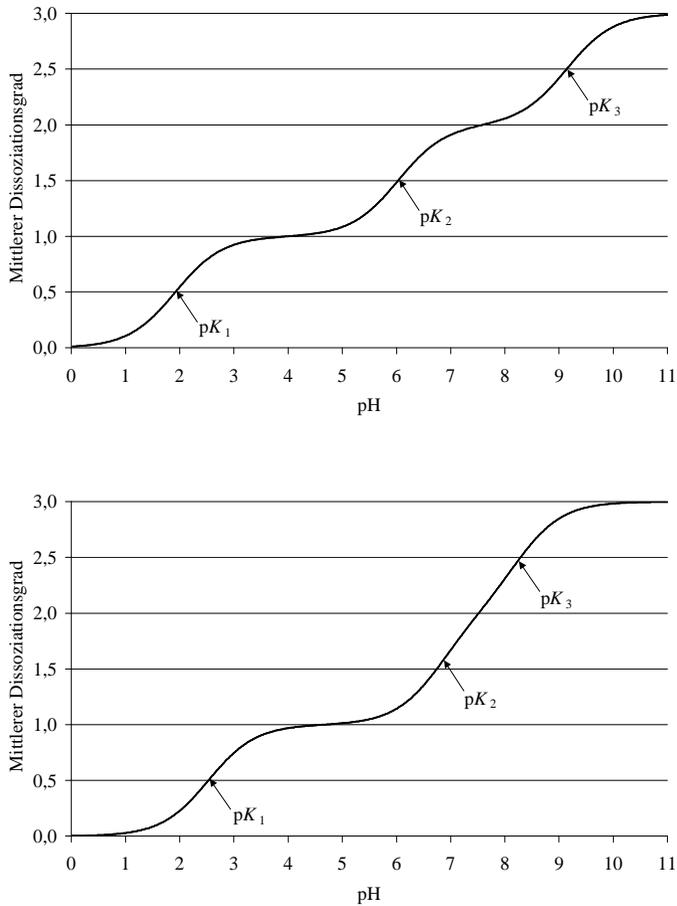


Abbildung 2.1: Mittlerer Dissoziationsgrad \bar{h} der Liganden Histidin (oben, Aciditätssystem erster Ordnung) und Glycylhistidin (unten, Aciditätssystem höherer Ordnung)

2.3.6 Mittlere Ladung

Die gemittelte Ladung \bar{q} des Liganden ergibt sich als die mit den Molenbrüchen gewichtete Summe der Ladungen der einzelnen Spezies $H_iL^{(i-z)+}$:

$$\bar{q} = \sum_{i=0}^n q_{H_iL^{(i-z)+}} x_{H_iL^{(i-z)+}} = \sum_{i=0}^n (i-z) x_{H_iL^{(i-z)+}} \quad (2.53)$$

Kombinieren der Gleichungen 2.50, 2.51 und 2.53 führt zu einfacheren Ausdrücken für die mittlere Ladung:

$$\bar{q} = \bar{n}_H - z = n - \bar{h} - z \quad (2.54)$$

Die Kenntnis der mittleren Ladung ist pharmazeutisch besonders wichtig, denn nur die neutrale Spezies eines Liganden vermag durch biologische Membranen, wie die Hirn-Blut-Schranke, ohne einen aktiven Transport zu penetrieren. Die pH-abhängige Ladung ist auch vom analytischen Aspekt her bedeutsam, z. B. bei Optimierung und Vorausplanung von RP-HPLC und kapillarelektrophoretischen Trennmethoden.

2.3.7 Vorausplanung der Titration eines mehrwertigen Liganden bei konstanter Ionenstärke

Zu einer pH-äquidistanten NMR-Titration sollen Probelösungen mit den folgenden vorgegebenen Eigenschaften erstellt werden:

1. konstante Totalkonzentration an Liganden (z. B. $c_{L^-}^1 = 20 \text{ mM}$)
2. ein vorgegebener pH-Wert
3. konstante Gesamtionenstärke (z. B. $I = 1 \text{ M}$).

Berücksichtigt man die Verdünnung infolge der Zugabe des Titrators, gelten die nachfolgenden Gleichungen auch für potentiometrische Titrationsen. Weitere Einzelheiten über Titrationssimulationen sind in hauseigenen Dissertationen nachzulesen [50][175].

2.3.7.1 Analytische Form des Liganden

Als Erstes sollte beschrieben werden, in welcher analytischen Form (freie Säure, Hydrochlorid, Dinatriumsalz, usw.) der zu untersuchende Ligand in die Lösung eingeführt wird. Dies geschieht durch zwei Parameter in dieser Arbeit.

Der *Protonierungsgrad des Liganden* N_H beschreibt, wieviel dissoziierbare Protonen ein Ligandmolekül in die Lösung einbringt, z. B. $N_H = 2$ für KH_2PO_4 oder $N_H = 3$ für Glutaminsäure Hydrochlorid.

Der zweite Parameter ist der *Beitrag der Gegenionen zur Gesamtionenstärke* I_G :

$$I_G = \sum_g z_g^2 n_g \quad (2.55)$$

wobei z_g die Ladungszahl und n_g der stöchiometrische Koeffizient des Gegenions g bedeutet. Als Beispiel seien $I_G = 2$ für Na_2HPO_4 (2Na^+) oder $I_G = 1$ für Glutaminsäure Hydrochlorid (1Cl^-) genannt.

2.3.7.2 Einstellung des pH-Wertes mittels starker Säure/Base

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgt durch Zugabe berechneter Menge an einer starken Säure, wie etwa HNO_3 oder einer starken Base, wie z. B. NaOH . Die Simulationsformel sollte beide Situationen einheitlich behandeln können. Werden sowohl HNO_3 als auch NaOH einer Probelösung zugesetzt, dann tritt partielle, im Sonderfall totale, Neutralisation ein. Daher tritt in der Gleichung immer die *Differenz* der Totalkonzentrationen, $c_{\text{HNO}_3}^t - c_{\text{NaOH}}^t$ auf. Diese Differenz gibt an, wieviel HNO_3 , bzw. NaOH die Probelösung enthalten soll, um die vorgegebene Konzentration von $[\text{H}^+]$ zu erreichen.

In einer Probelösung mit den Totalkonzentrationen $c_{\text{HNO}_3}^t$, c_{NaOH}^t und $c_{\text{L}^{z-}}^t$ beschreibt der *Titrationgrad*, wieviel Äquivalente einer starken Base per Ligandmolekül hinzugefügt worden sind:

$$t = \frac{c_{\text{NaOH}}^t - c_{\text{HNO}_3}^t}{c_{\text{L}^{z-}}^t} + \frac{c_{\text{positive Gegenionen}}^t - c_{\text{negative Gegenionen}}^t}{c_{\text{L}^{z-}}^t} \quad (2.56)$$

t ist positiv, wenn NaOH -, aber negativ, wenn HNO_3 -Überschuss vorhanden ist. Der zweite Term in Gleichung 2.56 berücksichtigt den Einfluss der mit dem Liganden eingebrachten Gegenionen.

Die *Protonenbilanz* besagt, dass die mit HNO_3 und dem Liganden eingebrachten Protonen entweder als freie Teilchen $[\text{H}^+]$ oder an dem Liganden gebunden zugegen sind:

$$c_{\text{H}^+}^t - c_{\text{OH}^-}^t = c_{\text{HNO}_3}^t - c_{\text{NaOH}}^t + N_{\text{H}} \cdot c_{\text{L}^{z-}}^t = [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] + \sum_{i=1}^n i \cdot [\text{H}_i\text{L}^{(i-z)+}] \quad (2.57)$$

Kombinieren der Gleichungen 2.50 und 2.57 führt zu einem Ausdruck, der den mittleren Dissoziationsgrad enthält:

$$c_{\text{HNO}_3}^t - c_{\text{NaOH}}^t + N_{\text{H}} c_{\text{L}^{z-}}^t = [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] + c_{\text{L}^{z-}}^t (n - \bar{h}) \quad (2.58)$$

Umstellen dieser Gleichung auf \bar{h} führt zu einer Beziehung, die den Gedankengang von Jannik Bjerrum verdeutlicht, wie Stabilitätskonstanten der Protolysespezies aus potentiometrischen Titrations berechnet werden:

$$\bar{h} = n - \frac{c_{\text{H}^+}^t - c_{\text{OH}^-}^t - [\text{H}^+] + [\text{OH}^-]}{c_{\text{L}^{z-}}} + N_{\text{H}} \quad (2.59)$$

Die Totalkonzentrationen der Komponenten sind an jedem Titrationspunkt bekannt, $[\text{H}^+]$ wird mit der Glaselektrode gemessen, der Dissoziationsgrad \bar{h} ergibt sich daraus nach Gleichung 2.59. Aus dem Dissoziationsgrad sind die Stabilitätskonstanten nach Gleichung 2.51 zu berechnen.

Durch Kombinieren der Gleichungen 2.56 und 2.59 ergibt sich:

$$t = n - \bar{h} + \frac{[\text{OH}^-] - [\text{H}^+]}{c_{\text{L}^{z-}}} + N_{\text{H}} \quad (2.60)$$

Während \bar{h} den aktuellen Dissoziationsgrad des Moleküls unabhängig von den Totalkonzentrationen und der analytischen Form des Liganden charakterisiert, trifft dies nicht für den Titrationsgrad t zu.

2.3.7.3 *Einstellung der Gesamtionenstärke mittels Ionenpuffer*

Die bislang in die Probelösung eingeführten Komponenten machen bereits einen Teil der einzustellenden Gesamtionenstärke I aus. Dabei tragen alle Protolysespezies und die bereits erwähnten Gegenionen des Liganden zur Ionenstärke bei:

$$I_1 = \frac{1}{2} \left\{ J_{\text{G}} \cdot c_{\text{L}^{z-}}^t + \sum_{i=0}^n (i-z)^2 \cdot [\text{H}_i\text{L}^{(i-z)+}] \right\} = \frac{c_{\text{L}^{z-}}^t}{2} \left\{ I_{\text{G}} + \sum_{i=0}^n (i-z)^2 \cdot x_{\text{H}_i\text{L}^{(i-z)+}} \right\} \quad (2.61)$$

Darüber hinaus befinden sich in der Lösung H^+ , OH^- und die Gegenionen der zur pH-Einstellung eingebrachten HNO_3 oder NaOH :

$$I_2 = \frac{1}{2} \left\{ [\text{H}^+] + [\text{OH}^-] + c_{\text{HNO}_3}^t + c_{\text{NaOH}}^t \right\} \quad (2.62)$$

Hypothetisch sollte stets soviel Ionenpuffer (z. B. NaNO_3) zugegen sein, dass eine Soll-Ionenstärke I konstant gehalten werden kann:

$$c_{\text{NaNO}_3}^t = I - I_1 - I_2 \quad (2.63)$$

Das lässt sich punktuell, nicht aber streng während der gesamten Titration verwirklichen.

2.3.8 Simulationsformel für mehrere Liganden

Wenn sich in der Lösung mehrere Liganden befinden, sind die Gleichungen 2.57, 2.58 und 2.63 für jede Verbindung mit einem neuen Glied zu erweitern. Diese allgemeinere Berechnung wurde in der Excel-Datei „Nmr-plan.xls“ verwirklicht. Mit diesem Excel-Makro wurden alle NMR-Titrationen der vorliegenden Arbeit vorausgeplant.

2.3.9 Bestimmung von makroskopischen Dissoziationskonstanten

Seit der Pionierarbeit von Jannik Bjerrum gilt die glaselektrodenindizierte Titration als die Methode der Wahl zur pK -Bestimmung. Details über deren Durchführung und Auswertung finden sich in einer Reihe von Monographien [176][177]. Potentiometrische Titrationen erfordern die Mindestlöslichkeit von 10^{-3} M des zu untersuchenden Liganden über den ganzen pH-Bereich.

Für Verbindungen mit Chromophorgruppen kann die pK -Bestimmung durch UV-Vis-Spektroskopie bei einer wesentlich geringeren Konzentration erfolgen [118].

Theorie und Praxis der NMR-spektroskopischen pK -Bestimmung werden in Kapitel 3 ausführlich diskutiert.

Außer diesen Techniken werden makroskopische Dissoziationskonstanten auch mit Fluoreszenzspektrometrie, Kalorimetrie, Konduktometrie [103], Polarographie oder aus der pH-abhängigen Löslichkeit der Verbindung [104] ermittelt (für eine Übersicht siehe [102][105]).

2.4 Mikroskopische Protolysegleichgewichte zweiwertiger Liganden

In der mikroskopischen (submolekularen, gruppenspezifischen) Behandlung der Protolyse mehrwertiger Liganden wird auch die Stelle der Dissoziation beachtet. Die vorliegende Arbeit enthält theoretische Entwicklungen und Modellbeispiele nur für zweibasige Systeme.

2.4.1 Mikroskopisches Dissoziationsschema, Mikrokonstanten

Das mikroskopische Dissoziationskonzept wurde 1895 von Wegscheider eingeführt [106], gefolgt im Jahre 1923 durch das grundlegende Werk von Niels Bjerrum [107]. Seitdem werden mikroskopische Gleichgewichtssysteme mit zahlreichen Symboliken beschrieben. Heute sind insbesondere die Nomenklaturen nach Hägele und Arendt [10], nach Hill [108] und nach Rabenstein und Noszál [46] gebräuchlich. Abbildung 2.2 zeigt diese Repräsentationen am Beispiel einer zweibasigen Säure. In der vorliegenden Arbeit findet eine vierte, gemischte Nomenklatur Verwendung, die im Folgenden in Details besprochen wird.

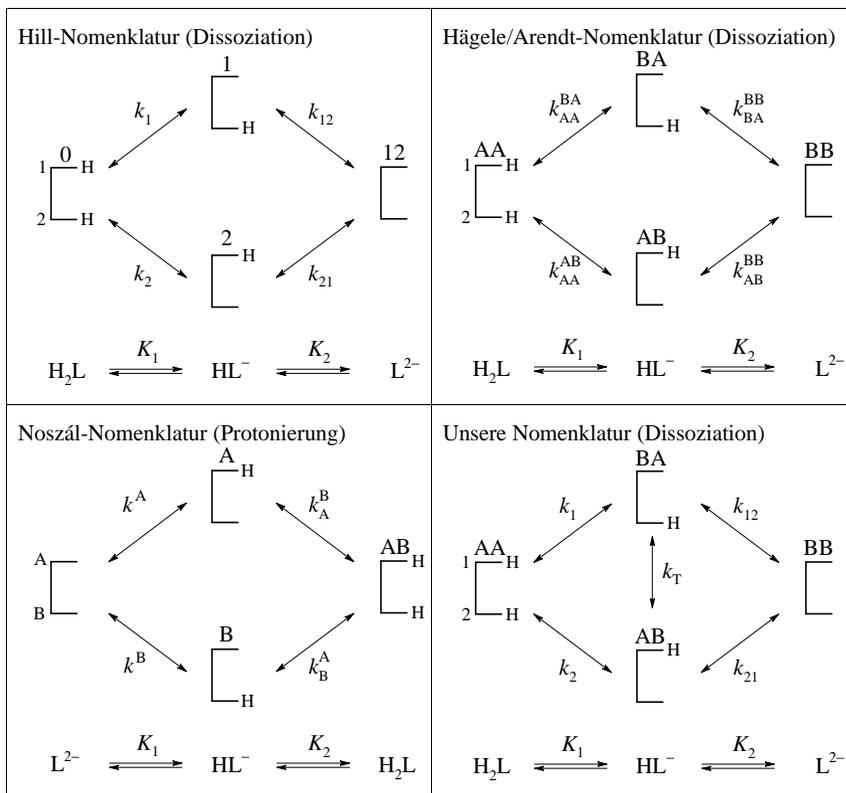


Abbildung 2.2: Mikroskopische Protolysegleichgewichte einer zweibasigen Säure in vier Repräsentationen. Unten werden jeweils die betreffenden makroskopischen Gleichgewichte dargestellt

Gegeben ist eine zweiwertige Säure, deren dissoziierbare Gruppen mit 1 und 2 durchnummeriert sind. Bezeichnet man den jeweiligen Dissoziationszustand dieser Gruppen mit A (Acid) oder B (Base), so entstehen die Buchstabensequenzen AA, AB, BA und BB (Hägele/Arendt Nomenklatur [10]). Diese Buchstabensequenzen gelten als eindeutiges Kennzeichen für jede Spezies in dem mikroskopischen Dissoziationsschema (Abbildung 2.2, die Ladung der Mikrospiezies ist zur Vereinfachung weggelassen). Es ist ersichtlich, dass die Makrospiezies HL^- in Form zweier *Mikrospiezies* BA und AB vorliegt, die sich nur in der Stelle der Protonierung unterscheiden:

$$[HL^-] = [BA] + [AB] \quad (2.64)$$

Es handelt sich dabei um einen Sonderfall von Tautomerie, wofür der Begriff „Protonierungsisomerie“ vorgeschlagen wird.

Die gruppenspezifische Dissoziation der Mikrospiezies wird mittels mikroskopischer Aciditätskonstanten k (oder pK) charakterisiert:

$$k_1 = \frac{[BA][H^+]}{[AA]}, \quad k_2 = \frac{[AB][H^+]}{[AA]}, \quad k_{12} = \frac{[BB][H^+]}{[BA]}, \quad k_{21} = \frac{[BB][H^+]}{[AB]} \quad (2.65)$$

Hierin identifiziert die letzte Ziffer der *Mikrokonstante* die in der betreffenden Reaktion deprotonierende Gruppe, das ist ein Element der Hillschen Nomenklatur. Die Mikrokonstanten gelten als Maß für die gruppenspezifische Acidität (*intrinsic, site-specific acidity*) in jedem Protonierungszustand des Moleküls.

Kombinieren der Massenwirkungsausdrücke 2.35 und 2.65 mit der Bilanzgleichung 2.64 führt zu Beziehungen zwischen Mikro- und Makrokonstanten [107]:

$$k_1 + k_2 = K_1 \quad \text{und} \quad k_{12}^{-1} + k_{21}^{-1} = K_2^{-1} \quad (2.66)$$

Das *Tautomerienverhältnis* k_T beschreibt den Aciditätsunterschied der Gruppen [107]:

$$k_T = \frac{[BA]}{[AB]} = \frac{k_1[H^+]}{k_2[H^+]} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{k_{21}}{k_{12}} \quad (2.67)$$

Für Gruppen, die durch Zufall oder aus Symmetriegründen identische Acidität besitzen, gilt $k_T = 1$ (siehe Kapitel 2.4.5.1).

Aus Gleichung 2.67 folgt, dass das Konzentrationsverhältnis der Mikrospesies BA und AB unabhängig vom pH-Wert ist. k_T gibt auch das Besetzungsverhältnis der beiden alternativen Dissoziationspfade, $AA \rightarrow BA \rightarrow BB$ und $AA \rightarrow AB \rightarrow BB$, wieder.

2.4.2 Wechselwirkungsparameter

Der Wechselwirkungsparameter E_{12} (als negativer Logarithmus pE_{12}) gibt an, in welcher Weise die Acidität der Gruppe 1 durch die Dissoziation an der Gruppe 2 beeinflusst wird [107]:

$$E_{12} = \frac{k_{21}}{k_1} = \frac{k_{12}}{k_2} \quad (2.68)$$

Die aciditätsmodifizierende Wechselwirkung der Gruppen kann induktiv (*through-bond*), elektrostatisch (*through-space*) oder durch eine Wasserstoffbrücke erfolgen. Der Regelfall ist die negative Kooperativität der Gruppen ($\log E_{12} < 0$, $pE_{12} > 0$), wenn die Protonierung an einer Stelle die Protonenaffinität an einer anderen Gruppe reduziert.

2.4.3 Stabilitätskonstanten und Molenbrüche der Mikrospesies

Die Stabilitätskonstanten der Mikrospesies, \mathbf{k} , werden in Analogie zu den bereits in Kapitel 2.3 besprochenen \mathbf{b} -Werten eingeführt [14][46][107]. Für das zweibasige System in Abbildung 2.2 gelten folgende Ausdrücke:

$$\mathbf{k}_{BB} \equiv 1 \quad \text{und} \quad \mathbf{k}_{AA} = \frac{[AA]}{[BB][H^+]^2} = k_1 k_{12} = k_2 k_{21} \quad (2.69)$$

$$\mathbf{k}_{BA} = \frac{[BA]}{[BB][H^+]} = \frac{1}{k_{12}} \quad \text{und} \quad \mathbf{k}_{AB} = \frac{[AB]}{[BB][H^+]} = \frac{1}{k_{21}} \quad (2.70)$$

Die \mathbf{b} - und \mathbf{k} -Stabilitätskonstanten sind durch die folgenden Beziehungen verknüpft:

$$\mathbf{b}_0 = \mathbf{k}_{BB} \equiv 1, \quad \mathbf{b}_1 = \mathbf{k}_{BA} + \mathbf{k}_{AB} \quad \text{und} \quad \mathbf{b}_2 = \mathbf{k}_{AA} \quad (2.71)$$

Die Zahlenwerte sind zwar für die vollprotonierte und volldissoziierte Spezies immer gleich, deren Unterscheidung durch andere Buchstaben macht jedoch deutlich, dass sie zu verschiedenen Ebenen der Behandlung gehören.

Die Molenbrüche x der Mikrospesies geben deren Anteil bezüglich der Totalkonzentration des Liganden an. Aus Gleichung 2.64 folgt:

$$x_{\text{HL}^-} = x_{\text{BA}^-} + x_{\text{AB}^-} \quad (2.72)$$

2.4.4 Gruppenspezifischer Dissoziationsgrad

Der *Dissoziationsgrad* von Gruppe 1 (*dissociation fraction*) ist gleich der Molenbruchsumme derjenigen Mikrospesies, die Gruppe 1 im deprotonierten Zustand enthalten:

$$\mathbf{a}_1 = x_{\text{BA}} + x_{\text{BB}} = \frac{\mathbf{k}_{\text{BA}}[\text{H}^+] + 1}{1 + (\mathbf{k}_{\text{BA}} + \mathbf{k}_{\text{AB}})[\text{H}^+] + \mathbf{k}_{\text{AA}}[\text{H}^+]^2} \quad (2.73)$$

Ein analoger Ausdruck gilt für Gruppe 2:

$$\mathbf{a}_2 = x_{\text{AB}} + x_{\text{BB}} = \frac{\mathbf{k}_{\text{AB}}[\text{H}^+] + 1}{1 + (\mathbf{k}_{\text{BA}} + \mathbf{k}_{\text{AB}})[\text{H}^+] + \mathbf{k}_{\text{AA}}[\text{H}^+]^2} \quad (2.74)$$

Diese Funktionen zeigen ähnlichen sigmoiden Verlauf zwischen Dissoziationsgrad 0 (protoniert) und 1 (dissoziiert), wie das makroskopische Analogon \bar{h} in Abbildung 2.1.

Die \mathbf{a} -Dissoziationsgrade sind aus pH-abhängigen spektroskopischen Daten zugänglich (siehe Kapitel 2.4.5.3). Die Logarithmen der unbekanntenen \mathbf{k} -Werte werden durch simultane Anpassung der Gleichungen 2.73 und 2.74 berechnet (*multiple nonlinear Regression*, Details siehe Kapitel 3.7.2). Aus den \mathbf{k} -Stabilitätskonstanten sind die k -Mikrokonstanten nach den Gleichungen 2.69 und 2.70 zugänglich.

Die Summe der \mathbf{a} -Funktionen führt zum makroskopischen „brutto“ Dissoziationsgrad:

$$\mathbf{a}_1 + \mathbf{a}_2 = \bar{h} \quad (2.75)$$

Betrachtet man die Mikrogleichgewichte in Richtung Protonierung, können analoger Weise gruppenspezifische *Protonierungsgrade* (*protonation fraction*) abgeleitet werden, die traditionsgemäß [24][145] als f bezeichnet werden:

$$f_1 = x_{\text{AB}} + x_{\text{AA}} = \frac{\mathbf{k}_{\text{AB}}[\text{H}^+] + \mathbf{k}_{\text{AA}}[\text{H}^+]^2}{1 + (\mathbf{k}_{\text{BA}} + \mathbf{k}_{\text{AB}})[\text{H}^+] + \mathbf{k}_{\text{AA}}[\text{H}^+]^2} = 1 - \mathbf{a}_1 \quad (2.76)$$

$$f_2 = x_{\text{BA}} + x_{\text{AA}} = \frac{\mathbf{k}_{\text{BA}}[\text{H}^+] + \mathbf{k}_{\text{AA}}[\text{H}^+]^2}{1 + (\mathbf{k}_{\text{BA}} + \mathbf{k}_{\text{AB}})[\text{H}^+] + \mathbf{k}_{\text{AA}}[\text{H}^+]^2} = 1 - \mathbf{a}_2 \quad (2.77)$$

$$f_1 + f_2 = \bar{n}_{\text{H}} \quad (2.78)$$

2.4.5 Bestimmung von Mikrokonstanten

Die aus der Potentiometrie zugänglichen Makrokonstanten $\text{p}K_1$ und $\text{p}K_2$ genügen im Generalfall nicht, das mikroskopische Dissoziationsschema vollständig aufzulösen. Diese Aussage wird durch folgende, von Bjerrum stammende Herleitung verdeutlicht [107]. Kombinieren der Gleichungen 2.66 bis 2.68 führt zu einem Ausdruck, der die $\text{p}K$ -Differenz mit dem Wechselwirkungsparameter $\text{p}E_{12}$ und dem Tautomerenverhältnis k_{T} verknüpft:

$$\Delta \text{p}K = \text{p}K_2 - \text{p}K_1 = \text{p}E_{12} + \lg \frac{(1 + k_{\text{T}})^2}{k_{\text{T}}} = \text{p}E_{12} + \lg \left(2 + k_{\text{T}} + \frac{1}{k_{\text{T}}} \right) \quad (2.79)$$

Aus dieser Gleichung können beide Unbekannten, $\text{p}E_{12}$ und k_{T} , nicht gleichzeitig berechnet werden.

Auch in Gleichung 2.71 findet man drei unbekannte \mathbf{k} -Stabilitätskonstanten gegenüber zwei $\log \mathbf{b}$ -Werten, so dass der Freiheitsgrad des mikroskopischen Gleichgewichtssystems drei ist [46]. Man braucht somit neben $\text{p}K_1$, $\text{p}K_2$ eine Zusatzinformation strukturspezifischer Natur (z. B. $\text{p}E_{12}$ oder k_{T}), um die Konzentration aller Mikrospesies zu berechnen [46].

2.4.5.1 Spezialfall: symmetrische zweibasige Liganden

Sind die beiden Protolysezentren infolge der Molekülsymmetrie äquivalent, liegt die nötige Zusatzinformation auf der Hand: die Gruppen besitzen die gleiche Acidität, d.h. $k_{\text{T}} = 1$. In diesem Grenzfall genügen die potentiometrisch zugänglichen $\text{p}K$ -Werte zur Berechnung aller vier unbekannte Mikrokonstanten:

$$\text{p}k_1 = \text{p}k_2 = \text{p}K_1 + \lg 2 \quad \text{und} \quad \text{p}k_{12} = \text{p}k_{21} = \text{p}K_2 - \lg 2 \quad (2.80)$$

Bei jedem pH -Wert gelten dann folgende Zusammenhänge für die Konzentration der Mikrospesies:

$$[AA] \equiv [H_2L], \quad [BA] = [AB] = \frac{[HL^-]}{2} \quad \text{und} \quad [BB] \equiv [L^{2-}] \quad (2.81)$$

Durch Einsetzen von $k_T = 1$ in Gleichung 2.79 und Umstellen kann der Wechselwirkungsparameter ausgedrückt werden [107]:

$$pE_{12} = pK_2 - pK_1 - \lg 4 \quad (2.82)$$

2.4.5.2 Deduktive Abschätzung von Mikrokonstanten

Die nötige Zusatzinformation kann auch aus Aciditätsangaben strukturverwandter Moleküle gewonnen werden. Hier werden zwei solche deduktive Methoden angeführt. Die erste basiert auf der chemisch-präparativen Blockierung einiger funktioneller Gruppen, der anderen liegt die Übertragbarkeit der Wechselwirkungsparameter zu Grunde.

1. Die Idee der chemischen Funktionalisierung stammt von Wegscheider [106]. Zur Aufklärung der Mikrodissoziation eines mehrbasigen Liganden werden einige Protolysezentren blockiert. Die so gewonnenen Abkömmlinge enthalten weniger Gruppen, so dass deren pK -Werte einfacher, z. B. mittels Potentiometrie, bestimmbar sind. Sehr häufig wird eine partielle Veresterung vorgenommen, wobei die nichtdissoziierte Carboxylgruppe $COOH$ durch deren Methyl- oder Ethylester $COOR$ imitiert wird [110]. Die Güte der Näherung hängt davon ab, inwieweit diese Estergruppe alle Einflüsse imitieren kann, die die ursprünglich vorhandene $COOH$ -Gruppe auf die anderen Protolysezentren im Molekül ausübt.

Zur chemischen Blockierung werden auch andere chemische Analogien ausgenutzt. Eine der besten Näherungen ist es, die Carboxylgruppe durch die isoelektronische, isostere und im $-I$ -Effekt sehr naheliegende Carboxamidgruppe zu substituieren. Die wichtigsten Analogien sind mit Beispielen in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Gruppe	Modell	Beispiel [Ref.]
$COOH$	$COOCH_3$ $COOC_2H_5$	Glycin [110], Citronensäure [112][113] Glutaminsäure [111]
$COOH$	$CONH_2$	Asparaginsäure [13]
NH_2	$NHCOCH_3$	Tobramycin [114]

Tabelle 2.3: Die bislang benutzten Analogien zur deduktiven Abschätzung von Mikrokonstanten

2. Durch Substitution eines zweibasigen Liganden mit zusätzlichen Gruppen verändert sich der Wechselwirkungsparameter der ursprünglich vorhandenen Gruppen in geringerem Maße, als die Mikrokonstanten selbst [115]. Somit können pE -Werte in zweibasigen Liganden gemessen und mit guter Näherung auf kompliziertere Systeme, die das gleiche Gruppenpaar im gleichen kovalenten Abstand enthalten, übertragen werden [277].

Die deduktiven Methoden waren der einzige Weg der Mikrokonstanten-Berechnung vor der Verbreitung der spektroskopischen Techniken. Sie sind auch heute unerlässlich, wenn die unterpopulierte Mikrospesies, z. B. die nicht zwitterionische Form von Phenylalanin, in so kleinem Anteil auftritt, dass deren Beitrag zum spektroskopischen Signal kleiner als der Messfehler ist [1][40].

2.4.5.3 Experimentelle Bestimmung von Mikrokonstanten

Protonierungsisomere (Mikrospesies) existieren in wässriger Lösung immer nebeneinander, sie sind mit analytischen Methoden untrennbar. Infolge der rapiden, diffusionskontrollierten Kinetik sind deren eigene Spektren nicht zugänglich, nur das Gesamtspektrum. Die experimentelle pK -Bestimmung erfolgt durch Kombination der potentiometrischen Titration mit spektroskopischen Methoden, womit die Dissoziation einzelner Gruppen verfolgt werden kann.

Wenn das Protolysezentrum gleichzeitig einen UV-Vis-Chromophor darstellt (wie etwa Phenol, Thiol, Pyridin, Anilin, usw.), kann Spektrophotometrie angewandt werden. pH -abhängige Absorptionsmessungen werden bei jener Wellenlänge durchgeführt, die nur für diese Chromophorgruppe charakteristisch ist. Der gruppenspezifische Dissoziationsgrad ergibt sich nach:

$$a_1(\text{pH}) = \frac{A(\text{pH}) - A_{\text{H}_2\text{L}}}{A_{\text{L}} - A_{\text{H}_2\text{L}}} \quad (2.83)$$

Die Absorptionen $A_{\text{H}_2\text{L}}$ und A_{L} werden bei solchen pH -Werten aufgezeichnet, bei denen H_2L und L dominant vorliegen. In diesen Spezies befinden sich beide Gruppen im vollständig protonierten, bzw. dissoziierten Zustand. Sollte der Dissoziationsgrad von Gruppe 2 spektrophotometrisch nicht erfasst werden können, dann bietet Gleichung 1.82 einen weiteren Weg zur Berechnung der Mikrogleichgewichte.

Nach diesem Prinzip wurden Mikrokonstanten erstmals für Cystein bestimmt [109], die Auflistung weiterer Beispiele ist auf Seite 29 in [1] zu finden.

Unter dem Namen PHOTO_T wurde von G. Hägele und C. Arendt eine Verbundtechnik erstellt, die die computergesteuerte Aufnahme der pH-abhängigen UV-Vis-Spektren mit Hilfe einer Tauchsonde ermöglicht [10]. Unter der Annahme von selektiven Wellenlängen werden Mikrokonstanten mit dem Programm WINMIKRO von C. Arendt berechnet [11].

In kürzlich publizierten Veröffentlichungen wurden Versuche gemacht, die Annahme selektiver Wellenlängen aufzuheben. Im Generalfall, wenn beide Gruppen signifikant zum UV-Spektrum beitragen, können die einzelnen Mikrospesies nicht unterschieden werden, solange nur die pH-Abhängigkeit der Spektren beachtet wird [117][118]. Erst wenn die UV-pH-Titration auch bei verschiedenen Temperaturen [117] oder in Gegenwart eines organischen Cosolvens [118] durchgeführt wird, sind unter günstigen Bedingungen die Spektren einzelner Mikrospesies zugänglich.

Da sich spinaktive Kerne (^1H , ^{13}C , ^{14}N) in nahezu allen Liganden befinden, repräsentiert die NMR-Spektroskopie eine viel allgemeinere Messtechnik zur Untersuchung der Mikrodissoziation. Hierbei wird über einige Spins des Moleküls angenommen, dass deren chemische Verschiebung selektiv die Deprotonierung einer einzigen Gruppe indiziert:

$$a_1(\text{pH}) = \frac{d(\text{pH}) - d_{\text{H}_2\text{L}}}{d_{\text{L}} - d_{\text{H}_2\text{L}}} \quad (2.84)$$

Die wichtige Entscheidung, ob ein Kern einen gruppenspezifischen Sensor darstellen kann, ist ein Hauptthema der vorliegenden Arbeit. Der NMR-spektroskopischen Bestimmung von Mikrokonstanten wird das ganze Kapitel 5 gewidmet.

Zum Abschluss sollte noch erwähnt werden, dass Mikrokonstanten auch durch Raman-Spektroskopie [119], IR-Spektroskopie [120], Fluoreszenzspektrometrie [121][122] oder kalorimetrische Titrations [123][124][125] ermittelt wurden.

2.4.5.4 Theoretische Berechnung von Mikrokonstanten

Insbesondere in der pharmazeutischen Forschung besteht der Bedarf an Computerprogrammen, die pK-Werte aus der Molekülstruktur nach linearen Beziehungen der Freien Enthalpie- (LFER) vorhersagen können [2]. Mit einer Software dieser Art, SPARC kann

man sogar mikroskopische Dissoziationskonstanten berechnen [126]. Zur Zeit werden aber für kleinere Moleküle noch die Experimentalmethoden der pK -Bestimmung bevorzugt.

Bei Enzymen ist die Kenntnis der intrinsischen Acidität einiger Gruppen von besonderem Interesse bezüglich der katalytischen Aktivität oder Stabilisierung der Sekundärstruktur durch Salzbrücken. Durch Isotopentechnik eingeführte oder angereicherte NMR-Kerne wie ^{13}C oder ^{15}N können die Dissoziation dieser Gruppen anzeigen („*reporter nuclei*“).

Für Biopolymere spielen theoretische Berechnungen wie die Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung zur Aufklärung der räumlichen Ladungsverteilung eine viel bedeutendere Rolle.

3 NMR-UNTERSUCHUNG MAKROSKOPISCHER PROTOLYSEGLEICHGEWICHTE

3.1 Ionenspezifische NMR-Parameter

Nimmt ein Ligand an einer Protolyse- oder Komplexbildungsreaktion teil, verändern sich im Prinzip die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten aller spinaktiven Kerne. Manchmal ändern sich auch die Halbwertsbreiten einiger Resonanzsignale. Die für jede Protolyse- oder Komplexspezies individuellen Werte dieser Spektrenparameter nennt man *ionenspezifische Parameter*. Sie können wichtige Strukturinformationen über die betroffene Spezies enthalten, und deshalb ist deren Bestimmung ein Hauptziel der NMR-Titrationen.

Nahezu alle Protolysereaktionen verlaufen in wässriger Lösung diffusionskontrolliert, mit einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von 10^8 bis $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [129]. Ein Richtwert für die Dissoziationsverschiebung eines Protons bei $B_0 = 500 \text{ MHz}$ ist ca. 0,3 ppm, d.h. 150 Hz. Der Protonenaustausch findet somit schnell* in der NMR-Zeitskala statt (*fast exchange regime*). Es treten im Spektrum dynamisch gemittelte Resonanzsignale auf [128], woraus die NMR-Parameter der Einzelspezies im Generalfall nur durch Berechnung zugänglich sind.

Betrachten wir die NMR-Titration eines Liganden H_nL in $m = 1, 2, \dots, M$ Titrationschritten und unter Beobachtung von $k = 1, 2, \dots, K$ Homo- oder Heterokernen. In Kenntnis vom pH-Wert und der Stabilitätskonstanten \mathbf{b} , lassen sich die Molenbrüche der Protolysespezies $x_{\text{H}_i\text{L}, m}$ am Messpunkt m nach Gleichung 2.48 berechnen. Die experimentell zugängliche chemische Verschiebung des k -ten Kernes setzt sich aus den Molenbrüchen und ionenspezifischen chemischen Verschiebungen der Einzelspezies H_iL zusammen:

$$\langle \mathbf{d}_{m,k} \rangle = x_{\text{L}, m} \cdot \mathbf{d}_{\text{L}, k} + x_{\text{HL}, m} \cdot \mathbf{d}_{\text{HL}, k} + \dots + x_{\text{H}_n\text{L}, m} \cdot \mathbf{d}_{\text{H}_n\text{L}, k} = \sum_{i=0}^n x_{\text{H}_i\text{L}, m} \cdot \mathbf{d}_{\text{H}_i\text{L}, k} \quad (3.1)$$

* Ein in der NMR-Zeitskala langsamer Protonenaustausch wird in wässriger Lösung hauptsächlich bei Enzymen beobachtet [130][131].

Die Ladungen der Protolysespezies werden im Folgenden erst dann gekennzeichnet, wenn deren Betrag von Bedeutung ist.

Die durch Dissoziation bewirkte Änderung der chemischen Verschiebung, $\Delta \mathbf{d}_k$, wird als Dissoziationsverschiebung (im Englischen *dissociation shift*, *titration shift*) oder Dissoziationsgradient bezeichnet:

$$\Delta_{\text{H}_{i+1}\text{L}}^{\text{H}_i\text{L}} \mathbf{d}_k = \mathbf{d}_{\text{H}_i\text{L},k} - \mathbf{d}_{\text{H}_{i+1}\text{L},k} \quad (3.2)$$

Die gleiche dynamische Mittelung findet im Fall der Kopplungskonstanten statt, so werden ionenspezifische Kopplungskonstanten $J_{\text{H}_i\text{L},jk}$ und deren Gradienten definiert:

$$\langle J_{m,jk} \rangle = x_{\text{L},m} \cdot J_{\text{L},jk} + x_{\text{HL},m} \cdot J_{\text{HL},jk} + \dots + x_{\text{H}_n\text{L},m} \cdot J_{\text{H}_n\text{L},jk} = \sum_{i=0}^n x_{\text{H}_i\text{L},m} \cdot J_{\text{H}_i\text{L},jk} \quad (3.3)$$

$$\Delta_{\text{H}_{i+1}\text{L}}^{\text{H}_i\text{L}} J_{jk} = J_{\text{H}_i\text{L},jk} - J_{\text{H}_{i+1}\text{L},jk} \quad (3.4)$$

Kernspezifische Halbwertsbreiten der Protolysespezies, $\Delta \mathbf{n}_{1/2, \text{H}_i\text{L},k}$ werden nach ähnlichen Prinzipien in Kapitel 4.1.1 eingeführt.

3.2 Grundlagen der chemischen Verschiebung von Ligandkernen

Wenn ein Molekül einem äußeren Magnetfeld \mathbf{B}_0 ausgesetzt ist, herrscht am Ort des k -ten Kernes infolge der Abschirmung der Elektronenhülle eine um den Betrag $\mathbf{s}_k \mathbf{B}_0$ geringere Feldstärke [202]:

$$\mathbf{B}_k = \mathbf{B}_0(1 - \mathbf{s}_k) \quad (3.5)$$

\mathbf{s}_k ist dabei die Abschirmungskonstante (im Generalfall ein Tensor), die experimentell unzugänglich ist. Die messbare chemische Verschiebung \mathbf{d}_k wird immer auf die Resonanzlinie einer Referenzsubstanz bezogen:

$$\mathbf{d}_k = \frac{\mathbf{n} - \mathbf{n}_{ref}}{\mathbf{n}_{ref}} = \frac{\mathbf{s}_{ref} - \mathbf{s}}{1 - \mathbf{s}_{ref}} \approx \mathbf{s}_{ref} - \mathbf{s} \quad (3.6)$$

Die Abschirmungskonstante setzt sich näherungsweise aus drei Komponenten zusammen:

$$\mathbf{s}_k = \mathbf{s}_k^{\text{dia}} + \mathbf{s}_k^{\text{para}} + \mathbf{s}'_k \quad (3.7)$$

Der diamagnetische Beitrag $\mathbf{s}_k^{\text{dia}} > 0$ beschreibt die abschirmende Wirkung von Kreisströmen, die in der Elektronenhülle durch \mathbf{B}_0 induziert werden. Im ^1H -NMR überwiegt dieser Term und wurde in vielen Fällen proportional zu der am betreffenden Proton herrschenden Elektronendichte gefunden [134]. $\mathbf{s}_k^{\text{dia}}$ lässt sich nach der Lambschen Formel berechnen [132] und gibt für ein isoliertes, kugelsymmetrisches Atom die vollständige Abschirmung wieder.

Dem durch $\mathbf{s}_k^{\text{para}} < 0$ charakterisierten Paramagnetismus liegen Anregungen der Valenzelektronen in energetisch tiefliegenden unbesetzten Orbitalen zugrunde. $\mathbf{s}_k^{\text{para}}$ kann nach der Karplus-Pople-Gleichung berechnet werden [135]. Dieser Beitrag ist nur bei schweren Kernen wie ^{13}C oder ^{31}P bedeutend, bei ^1H -NMR kann er vernachlässigt werden [136].

Im dritten Term \mathbf{s}'_k werden alle weiteren Effekte zusammengefasst. Dazu gehören die magnetische Anisotropie von räumlich naheliegenden Gruppen und Ringen, elektrische Feldeffekte anisotroper C-X Bindungen und van-der-Waals-Effekte [133][202]. Protonen, die sich „am Rand“ des Moleküls befinden, sind zudem auch intermolekularen Effekten, wie etwa Aggregations- oder Lösungsmittelleffekten in erhöhtem Maße ausgesetzt.

Die durch \mathbf{s}'_k beschriebenen Effekte hängen auch mit der Konformation des Moleküls zusammen. Kürzlich wurde von Perczel und Császár eine Studie über Formyl-L-Valinamid veröffentlicht, wobei direkte Korrelationen zwischen \mathbf{d}_H bzw. \mathbf{d}_C und quantenchemisch berechneten Diederwinkeln gefunden wurden [137]. Ähnliche Ansätze könnten künftig die Möglichkeit eröffnen, die Gerüstkonformation von Proteinen allein aufgrund chemischer Verschiebungen vorauszusagen. Es ist jedoch fraglich, ob solche einfache Korrelationen auch in Gegenwart von (de)protonierbaren Gruppen zu erwarten sind, denn die pH-abhängige Ladung der Gruppen vermag einen viel größeren Effekt induktiver oder elektrostatischer Natur auf \mathbf{d} auszuüben. Gerade diese Einflüsse werden im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit studiert.

3.2.1 Dissoziationsverschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum

Das Hauptinteresse dieser Arbeit liegt nicht nur in den chemischen Verschiebungen d selbst, sondern auch in deren Dissoziationsgradienten Δd . Bei Deprotonierung einer Gruppe nimmt die Elektronendichte in deren Umgebung zu. Bei den benachbarten C-H Protonen beobachtet man im Regelfall eine *Hochfeldverschiebung* der Resonanzlinien, da im ^1H -NMR die durch s_k^{dia} beschriebenen induktiven Effekte relevant sind. Der Betrag von Δd_{H} nimmt mit steigender Anzahl der „isolierenden“ Sigmabindungen zwischen dem Protolysezentrum und dem betreffenden Spin ab. Aufgrund dieser Beobachtung können selektive „Sensorprotonen“ zur Verfolgung der Dissoziation einzelner Gruppen ausgewählt werden (siehe Kapitel 5.2). In mehrwertigen Liganden, wie etwa Polyaminopolycarbonsäuren [24][25] oder Zyklamen [138][139][142], wo ein Proton durch mehrere benachbarte Basezentren beeinflusst wird, findet man zum Teil auch *Tieffeldverschiebungen*.

Aus Δd -Werten vereinfachter Modellverbindungen haben Sudmeier und Reilly 1964 eine empirische Beziehung vorgeschlagen, die Δd in Polyaminopolycarbonsäuren als Linearkombination der Protonierungsgrade der einzelnen Gruppen ausdrückt [24][25]. In diesem Ansatz werden vor allem induktive und elektrostatische Effekte berücksichtigt. Wenn jedoch die Protolyse auch mit einer wesentlichen Konformationsänderung begleitet wird, beschreibt die Sudmeier-Reilly-Gleichung die Realität nicht mehr quantitativ [138][139]. Eine weitere Diskussion über die Sudmeier-Reilly-Gleichung im Zusammenhang mit mikroskopischer Dissoziation findet sich in Kapitel 5.3.

3.2.2 Dissoziationsverschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum

In d_{C} ist der paramagnetische Beitrag dominant, so bewirkt die Dissoziation einer benachbarten Gruppe tendenziell eine *Tieffeldverschiebung* der ^{13}C -Resonanzlinien. Man findet aber auch hier Ausnahmen (siehe [143][144][145][146] und die darin zitierten Veröffentlichungen). Mit steigendem Abstand vom Protolysezentrum nimmt der Betrag von Δd_{C} ab, mit der seit langem bekannten Ausnahme von *a*-Aminosäuren, wo die Deprotonierung der *a*-Aminogruppe einen größeren Shift am *b*-Kohlenstoffatom als am C^{α} bewirkt [40][144]. Dieser Befund lässt sich im Rahmen der LEFS-Theorie (*linear electric field shift theory*) von Batchelor *et al.* interpretieren [144].

Von besonderem Interesse ist das empirische Modell von Rabenstein und Sayer, womit d_c für Aminosäuren und Analoga aus Substituentenkonstanten von CH_3 , NH_3^+ , NH_2 , COOH und COO^- Gruppen zusammengestellt wird [145]. Zur Berechnung der ^{13}C -Verschiebungen für jeden Protonierungszustand von Polyaminen wurde eine ähnliche empirische Beziehung mit „*amine shift parameters*“ abgeleitet [147].

3.2.3 Dissoziationsverschiebungen im ^{31}P -NMR-Spektrum

Dissoziationsbedingte Änderungen von d_p bei phosphorhaltigen Liganden werden im Arbeitskreis von G. Hägele über zehn Jahre lang sorgfältig dokumentiert. Im Folgenden können aus Platzgründen nur die wichtigsten hauseigenen Erkenntnisse und Literaturergebnisse zusammengefasst werden.

In Abwesenheit von weiteren Protolysezentren weist das ^{31}P -Signal bei aliphatischen Phosphon- und Phosphinsäuren [15], 1-Hydroxyphosphonsäuren [148] wie auch bei Pyrophosphaten [171] eine *Hochfeldverschiebung* während der Dissoziation auf.

In Gegenwart von anderen dissoziierbaren Gruppen wird der Ablauf der ^{31}P -NMR-Titrationskurven uneinheitlicher. Bei **a**- und **b**-(Aminoalkyl)phosphonsäuren findet man eine Hochfeldverschiebung beim Dissoziationsschritt $\text{PO}_3\text{H}^- \rightarrow \text{PO}_3^{2-}$, aber eine wesentlich größere Tieffeldverschiebung für $\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_2$ [15][149][150]. Eine frühe Interpretation dieses Phänomens war die Änderung der Hybridisierung des Stickstoffatoms während der Protolyse [149]. Polyazamakrocyclische Methylenphosphonate verhalten sich ähnlich [151][152][153][154]. Die Beobachtung erscheint allgemeingültig, da das Minimum der d_p vs. pH Titrationskurve immer der zwitterionischen Spezies mit protonierten Ammonium- und dissoziierten Phosphonatgruppen entspricht (siehe [154] und die darin zitierten Veröffentlichungen). Auch eine Tieffeldverschiebung wurde bei Aminomethylphosphinoxiden verzeichnet, wo allerdings am Phosphorkern selbst keine Deprotonierung stattfindet [20].

Die bislang erwähnten Beispiele verdeutlichen, dass neben dem „Direkteffekt“, d.h. der Hochfeldverschiebung infolge der eigenen Dissoziation, auch „Ferneffekte“, durch Einflüsse weitliegender Gruppen auf d_p eine Rolle spielen.

Bei Bis- und Trisphosphonsäuren [155] sowie Phosphonopolycarbonsäuren [21] und Phosphonoanaloga der Asparaginsäure [156] weisen die ^{31}P -NMR-Titrationskurven diverse Maxima und Minima auf, abhängig auch davon, ob die aciden Gruppen eine

vicinale oder geminale Stellung einnehmen. Bemerkenswert sind die betragsmäßig geringfügigen Dissoziationsgradienten der technisch und in der Humanmedizin relevanten 1,1-Bisphosphonate, wobei auch eine Verbreiterung der Resonanzlinien in bestimmten pH-Bereichen zu beobachten ist [173][175].

Zusammenfassend wird festgelegt, dass d_p einer Phosphon- oder Phosphingruppe im Generalfall auch durch Dissoziationsvorgänge entfernter Gruppen beeinflusst wird. Aus diesem Grund dürfte der ^{31}P -Kern zur selektiven Verfolgung der eigenen Dissoziation zwar in vielen günstigen, aber nicht in allen Fällen eingesetzt werden.

3.3 Experimentelle Aspekte von NMR-Titrationsen

NMR-gestützte Säure-Base-Titrationsen lassen sich unter experimentellen Gesichtspunkten folgendermaßen eingliedern.

In *titrationsgradabhängigen* NMR-Messungen werden die NMR-Spektren bei vorgegebenen, meist äquidistanten Titrationsgraden aufgenommen. Bei vordefinierten pH-Werten handelt es sich um eine *pH-abhängige NMR-Titration*, deren Vorausplanung in Kapitel 2.3.7 erörtert wurde. Der generelle Begriff *NMR-Titration* schließt beide Situationen ein.

Wenn die Klassifizierung nach dem Spektrentyp erfolgt, gibt es beispielsweise ^1H - oder $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Titrationsen. In einer durch $^1\text{H}/^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ bezeichneten NMR-Titration [23] werden bei jedem Dosierschritt ein ^1H - und ein $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Spektrum aufgenommen (*multinukleare NMR-Titration*). Wenn die Überlappung der Resonanzsignale die Gewinnung der d vs. pH-Profile für Einzelkerne verhindert, wird bei jedem pH-Wert ein geeignetes 2D-Spektrum vermessen, was z. B. zu einer pH-abhängigen TOCSY-NMR-Spektrenreihe führt [157].

Bei einer *Simultantitration* werden mehrere Liganden in der gemeinsamen Probelösung titriert. Wie in Kapitel 3.5.1.1 näher erläutert, lassen sich auf diese Weise *pK-Differenzen* um eine Größenordnung genauer bestimmen als durch NMR-Titration der einzelnen Verbindungen.

Nach den Erfahrungen im Arbeitskreis von G. Hägele ist das B_0 -Feld in den heutigen Cryomagneten in solchem Maße stabil, dass das Locksystem für die Dauer der NMR-

Titration ausgeschaltet werden kann [14][158]. In dieser Weise lassen sich NMR-Titration auch in 100% H₂O verwirklichen.

Bezüglich der experimentellen Durchführung können NMR-Titrationen in folgende vier Gruppen unterteilt werden. Der Ligandverbrauch dieser Techniken wird bei einer Ligandkonzentration von 5 mM und für 32 Titrationsschritte verglichen.

1. *NMR-kontrollierte Titration*

Die Geräte- und Softwareentwicklungen für automatisierte *NMR-kontrollierte Titrationen* gehen im Arbeitskreis von G. Hägele auf die Mitte der achtziger Jahre zurück [14][15][16].

Das heutige Setup verlangt den Einbau eines Durchfluss-Probenkopfes [15]. Der Ligandenverbrauch ist durch das Gesamtvolumen der Titrationsanlage und des Schlauchsystemes bestimmt und beträgt z. Z. etwa 0,4 mmol für das DRX 200 und 0,1 mmol für das DRX 500 Spektrometer [158].

Die NMR-kontrollierte Titration verlangt zwar zeitaufwändige Vorbereitung mit dem Einbau des Durchfluss-Probenkopfes, andererseits erzielt man bei dieser Titrationsart mehr Titrationsschritte pro Zeiteinheit im Vergleich zu Einzelprobenmessungen, da zeitaufwändiger Austausch der NMR-Röhrchen und Magnetfeld-Optimierung (*shimming*) entfallen. Der Hauptvorteil der Messmethode ist, dass nur eine Probenlösung hergestellt wird und dann vollautomatisiert 32, 64 oder gar 128 Titrationsschritte durchgeführt werden können. Das entspricht etwa 6 µmol Ligandverbrauch pro Titrationsschritt.

Der neueste Stand der Entwicklung sowie die Durchführung von NMR-kontrollierten Titrationen werden in den Dissertationen von S. Augner [158], C. Uhlemann [159] und S. Hermens [175] detailliert beschrieben.

2. *Einzelproben-NMR-Titration oder Konstant-Volumen-Titration*

Konventionell werden NMR-Titrationen in Form von Einzelproben durchgeführt. Hierbei werden Probelösungen von ca. 3 ml mit konstanter Gesamtionenstärke und Ligandkonzentration erstellt, deren pH-Wert mit einer Glaselektrode unter kontrollierter Temperatur und Rühren gemessen wird. Anschließend werden die Proben in einzelne NMR-Röhrchen eingefüllt. Die pK-Werte der zu untersuchenden Substanz werden in vorangegangenen potentiometrischen Titrationen bestimmt. Somit lässt sich

nach den Überlegungen in Kapitel 2.3.7 eine sehr präzise Kontrolle der Ionenstärke verwirklichen.

Der Ligandenverbrauch für die oben angeführten Bedingungen beträgt ca. 15 μmol per Titrationsschritt.

3. *Eintröhrchen-Titration*

Die zeitaufwändige Vorbereitung von Einzelproben entfällt und der Ligandenverbrauch lässt sich auf ca. 0,1 μmol pro Titrationsschritt reduzieren, wenn man die ganze Titration in einem NMR-Röhrchen (mit einem Füllvolumen von ca. 0,7 ml) ausführt. Der Titrator wird in dieses Röhrchen in 10 bis 50 μl Volumenschritten dosiert. Der pH-Wert wird anschließend mit einer speziellen, ins NMR-Röhrchen hineinpassenden Glaselektrode ermittelt. Auf diese Weise ist jedoch das Rühren nicht praktikabel und es kommt zu einer schleppenden Elektrodenantwort, bzw. größerer Ungenauigkeit der pH-Messwerte. Ein weiteres Problem ist hierbei, dass durch das Herausziehen der Elektrode das Gesamtvolumen und die Stoffmengen verändert werden (Tropfen an der Glaselektrode verbleibt).

4. „*Elektrodenlose*“ Titration

Zur Aufhebung aller, mit der Glaselektrode zusammenhängenden, Probleme wurde in der vorliegenden Arbeit das Konzept der „*elektrodenlosen*“ Titration eingeführt. Die ganze Titration wird ähnlich zur Einröhrchen-Titration in einem NMR-Röhrchen durchgeführt, aber in Gegenwart von mehreren einwertigen Liganden. Die chemische Verschiebung dieser sog. NMR-Indikatormoleküle spiegelt den aktuellen pH-Wert wider. Es handelt sich dabei methodisch um eine *Simultantitration* bei konstanter Ionenstärke von 1,0 M. Der Ligandverbrauch bleibt genauso gering wie bei der Einröhrchen-Titration (etwa 0,1 μmol pro Titrationsschritt).

Die theoretischen Grundlagen der neuen Methode werden im nachfolgenden Kapitel dargestellt, während die experimentellen Bedingungen in Kapitel 7.3.2 und die Ergebnisse in Kapitel 8.1 nachzulesen sind.

3.4 Eine neue Titrationsart: die „elektrodenlose“ NMR-Titration

In diesem Kapitel werden der Einfachheit halber die Symbole pH^c und $\text{p}K^c$ verwendet, obwohl diese Methode tatsächlich für das Lösungsmittelgemisch $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1 entwickelt wurde, wobei $\text{pH}^{c,\text{D}}$ und $\text{p}K^{c,\text{D}}$ gelten (siehe Kapitel 2.2.4).

3.4.1 Grundlagen der pH^c -Messung mit NMR-Indikatormolekülen

Als NMR-Indikatormolekül fungiere hier eine einwertige Säure HL mit der bekannten Dissoziationskonstante $\text{p}K^c$. Beobachtet wird die gemittelte chemische Verschiebung $\langle d \rangle$ eines NMR-Kernes mit den Grenzwerten d_L und d_{HL} . Wie lässt sich nun der pH^c -Wert aus $\langle d \rangle$ berechnen?

Die Anwendung der dynamischen Mittelung der chemischen Verschiebungen (Gleichung 3.1) führt zu:

$$\langle d \rangle = d_L x_L + d_{\text{HL}} x_{\text{HL}} = \frac{d_L K^c + d_{\text{HL}} [\text{H}^+]}{K^c + [\text{H}^+]} \quad (3.8)$$

Durch Umstellen auf $[\text{H}^+]$ und Logarithmieren erhält man den Grundzusammenhang der rein NMR-spektroskopischen pH^c -Messung:

$$\text{pH}^c = \text{p}K^c + \lg \frac{d_{\text{HL}} - \langle d \rangle}{\langle d \rangle - d_L} \quad (3.9)$$

Mit welcher Genauigkeit lässt sich der pH^c -Wert auf diese Weise bestimmen? Eine der Fehlerquellen ist der NMR-Messfehler in $\langle d \rangle$. Die drei bekannten Variablen, die sog. *Indikatorparameter* $\text{p}K^c$, d_L und d_{HL} stammen aber ebenfalls aus (vorher durchgeführten) Messungen und sind demnach auch mit gewisser Unsicherheit behaftet.

Alle vier Variablen werden im statistischen Sinne als unabhängige Zufallsvariablen mit Normalverteilung aufgefasst. Deren Messfehler wird durch die Standardabweichung s beschrieben. Die Anwendung des Gauss'schen Gesetzes der Fehlerfortpflanzung [160] auf Gleichung 3.9 liefert für die Gesamtvarianz von pH^c folgenden Ausdruck:

$$s_{\text{pH}^c}^2 = \left(\frac{\partial \text{pH}^c}{\partial \text{p}K^c} \right)^2 s_{\text{p}K^c}^2 + \left(\frac{\partial \text{pH}^c}{\partial \langle d \rangle} \right)^2 s_{\langle d \rangle}^2 + \left(\frac{\partial \text{pH}^c}{\partial d_{\text{HL}}} \right)^2 s_{d_{\text{HL}}}^2 + \left(\frac{\partial \text{pH}^c}{\partial d_L} \right)^2 s_{d_L}^2 \quad (3.10)$$

Nach Ausführung der partiellen Ableitungen ergibt sich:

$$\mathbf{s}_{\text{pH}^c}^2 = \mathbf{s}_{\text{pK}^c}^2 + \frac{(\mathbf{d}_L - \mathbf{d}_{\text{HL}})^2 \mathbf{s}_{<d>}^2 + (<\mathbf{d}> - \mathbf{d}_L)^2 \mathbf{s}_{\mathbf{d}_{\text{HL}}}^2 + (\mathbf{d}_{\text{HL}} - <\mathbf{d}>)^2 \mathbf{s}_{\mathbf{d}_L}^2}{(\ln 10)^2 (\mathbf{d}_{\text{HL}} - <\mathbf{d}>)^2 (<\mathbf{d}> - \mathbf{d}_L)^2} \quad (3.11)$$

Der Fehlerbeitrag der Dissoziationskonstante pK^c ist konstant, während selbige der chemischen Verschiebungen über $<\mathbf{d}>$ vom pH^c -Wert abhängig sind.

In welchem Bereich lässt sich pH^c am genauesten bestimmen? Dazu sollte die Minimumstelle von $\mathbf{s}_{\text{pH}^c}^2$ (Gleichung 3.11) ermittelt werden, indem man die erste partielle Ableitung von $\mathbf{s}_{\text{pH}^c}^2$ nach $[\text{H}^+]$ gleich Null setzt. Unter Verwendung der Kettenregel ergibt sich:

$$\frac{\partial \mathbf{s}_{\text{pH}^c}^2}{\partial [\text{H}^+]} = \frac{\partial \mathbf{s}_{\text{pH}^c}^2}{\partial <\mathbf{d}>} \cdot \frac{\partial <\mathbf{d}>}{\partial [\text{H}^+]} = 0 \quad (3.12)$$

Durch algebraische Manipulationen, die hier aus Platzgründen nicht angeführt werden, lässt sich zeigen, dass der erste Multiplikator nie Null wird. Folglich muss die zweite partielle Ableitung gleich Null sein:

$$\frac{\partial <\mathbf{d}>}{\partial [\text{H}^+]} = \frac{(\mathbf{d}_{\text{HL}} - \mathbf{d}_L) \cdot (K_s^c - [\text{H}^+])}{(K_s^c + [\text{H}^+])^2} = 0 \quad (3.13)$$

Die Lösung dieser Gleichung ist $[\text{H}^+] = K^c$, was verdeutlicht, dass die pH^c -Messung am Punkt der Halbneutralisierung am genauesten ist.

Die Präzision der ^1H -NMR-spektroskopischen pH^c -Messung wird am Beispiel der Dichloressigsäure illustriert. Die in Abschnitt 3.4.3 skizzierte Bestimmung der *Indikatorparameter* führt zu: $\text{pK}^c = 1,06 \pm 0,01$, $\mathbf{d}_L = 6,067 \pm 0,001$ ppm und $\mathbf{d}_{\text{HL}} = 6,328 \pm 0,001$ ppm. Der typische ^1H -NMR-Messfehler wurde in dieser Arbeit zu etwa $\pm 0,001$ ppm ermittelt (siehe auch [23]). Nach diesen Angaben wurde die Unsicherheit der pH^c -Bestimmung nach Gleichung 3.11 simuliert und in Abbildung 3.1 dargestellt.

Die Ergebnisse der Fehleranalyse werden in folgenden zwei Punkten zusammengefasst.

1. Ein NMR-Indikatormolekül kann nur im eigenen „Pufferbereich“, $\text{pH}^c = \text{pK}^c \pm 1$ zur pH^c -Bestimmung angesetzt werden. Wie im Abschnitt 2.2.1.3 diskutiert, gilt Analoges für UV-Indikatormoleküle bei Erfassung der Hammettschen Aciditätsfunktion H_0 .
2. Innerhalb des Pufferbereiches kann aber eine Messgenauigkeit von $\pm 0,03$ pH^c -Einheiten oder besser erzielt werden. Diese Präzision ist sogar bei pH-Extrema

erreichbar, was für eine pH^c -Messung mit der Glaselektrode nach den Erläuterungen in Kapitel 2.2.1.2 nicht mehr zutrifft.

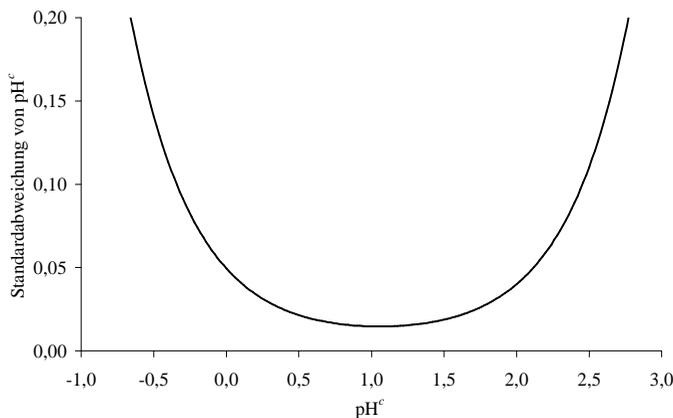


Abbildung 3.1: Mit Hilfe der Dichloressigsäure **20** erreichbare Präzision der pH^c -Messung

3.4.2 Abdeckung der ganzen pH^c -Skala mit NMR-Indikatormolekülen

Da jedes NMR-Indikatormolekül nur in seinem engen Pufferbereich als pH^c -Sensor fungiert, muss eine lückenlose pH^c -Erfassung mit einem geeigneten Gemisch von NMR-Indikatoren erfolgen.

Bei der Auswahl von pH^c -Sondenmolekülen gelten folgende vier Gesichtspunkte.

1. Jedes Indikatormolekül führt neue Peaks ins Spektrum ein. Dieser Beitrag sollte möglichst aus einem Singulett bestehen. Der Resonanzpeak sollte nicht mit anderen Linien überlappen. Auf der breiteren Skala der ^{31}P - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie wird solch eine störende Überlappung weniger wahrscheinlich.
2. Es ist günstig, wenn das Indikatorsingulett durch mehrere magnetisch äquivalente Spins erzeugt wird. Die Konzentration des Sondenmoleküls kann dann niedriger gehalten werden, folglich wird dessen pH -abhängiger Beitrag zur Gesamtionenstärke auch geringer.
3. Ein Indikatormolekül darf in keinerlei Wechselwirkung oder gar chemische Reaktion mit der zu untersuchenden Substanz treten. Besondere Beachtung soll dabei elektrostatisch oder durch Wasserstoffbrücken verbundenen Ionenpaaren gelten. Zur

Erkennung solcher Phänomene sollten die Grenzverschiebungen der Indikatormoleküle in mehreren elektrodenlosen Titrationen verglichen werden. Eine, den Messfehler übertreffende Änderung von d_L oder d_{HL} kann darauf hindeuten, dass die betroffene Sondenverbindung nicht nur an Protolysegleichgewichten teilnimmt und deshalb nicht zur Berechnung des pH-Wertes herangezogen werden sollte.

4. Die Verbindung sollte einbasig sein oder nur Dissoziationsstufen erster Ordnung aufweisen, wie z. B. Phosphorsäure. Die *Indikatorparameter* pK^c , d_L und d_{HL} müssen vor der elektrodenlosen Titration durch unabhängige NMR-Messungen bestimmt werden.

Nach diesen Kriterien wurde in dieser Arbeit eine Reihe von pH^c-Sondenmolekülen ausgewählt. Die Bedingungen der Vermessung und die Ergebnisse werden in den Kapiteln 7.3.2 und 8.1 beschrieben.

3.4.3 NMR-spektroskopische Bestimmung sehr kleiner pK^c -Werte

Die unter 1,5 liegende Dissoziationskonstante einer Säure HL lässt sich durch glaselektrodenindizierte Titrationen nicht reproduzierbar ermitteln. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit eine spezielle ¹H-NMR-Titration entwickelt.

Einzelproben äquidistanten pH^c-Wertes wurden mit $c_{HL}^t = 0,02$ M und einer konstanten Ionenstärke von 1 M durch Zugabe von berechneten Mengen an HNO₃ und NaNO₃ (evt. NaOH) erstellt. Die Zusammensetzung wird nach dem Rechenweg in Kapitel 1.3.7. vorausgeplant, wozu aber auch derjenige pK^c -Wert gebraucht wird, der wiederum das Ziel der Messung darstellt. Das erfordert eine iterative Vorgehensweise.

Nach einem Schätzwert von $pK^{c(0)}$ aus der Literatur wird die in Kapitel 2.3.7 diskutierte Vorausplanung der Einzelproben titration durchgeführt, und die Probelösungen werden erstellt.

Liegt der geplante pH^c-Wert einer Probe höher als 2, wird der tatsächliche pH^c-Wert mit der Glaselektrode gemessen, die zuvor durch eine geeignete Blanktitration kalibriert wurde. Bei Proben mit pH^c < 2 wird jedoch der exakte pH^c-Wert der Lösung nach den folgenden Überlegungen berechnet.

Die Ladungsbilanz für das betrachtete Elektrolytsystem lautet:

$$[Na^+] - [NO_3^-] + [H^+] - [L^-] = 0 \quad (3.14)$$

Geht man von der vollständigen Dissoziation von HNO_3 und NaNO_3 aus, so gelten folgende Ausdrücke:

$$[\text{Na}^+] = c_{\text{NaNO}_3}^t \quad \text{und} \quad [\text{NO}_3^-] = c_{\text{NaNO}_3}^t + c_{\text{HNO}_3}^t \quad (3.15)$$

Nach Literaturangaben ist der Dissoziationsgrad von Salpetersäure bei $c_{\text{HNO}_3}^t > 2 \text{ M}$ nicht mehr vollständig [163] und diese Tatsache stellt eine klare Grenze der Methode dar.

Substituieren der Ausdrücke für $[\text{Na}^+]$ und $[\text{NO}_3^-]$ in Gleichung 3.14 und Umstellung auf $[\text{H}^+]$ führt zu:

$$[\text{H}^+] = c_{\text{HNO}_3}^t + [\text{L}^-] \quad (3.16)$$

Diese Gleichung enthält zwar noch zwei Unbekannte, $[\text{H}^+]$ und $[\text{L}^-]$. Letztere lässt sich aber aus der aktuellen, gemittelten chemischen Verschiebung $\langle d \rangle$ berechnen nach:

$$[\text{L}^-] = \frac{[\text{L}^-]}{c_{\text{HL}}^t} c_{\text{HL}}^t = \frac{d_{\text{HL}} - \langle d \rangle}{d_{\text{HL}} - d_{\text{L}^-}} c_{\text{HL}}^t \quad (3.17)$$

In Kenntnis der Grenzverschiebungen d_{L^-} und d_{HL} kann nun $[\text{L}^-]$ berechnet werden, die nach Gleichung 3.16 wiederum zu $[\text{H}^+]$, bzw. pH^c führt. Aus den $\langle d \rangle$ vs. pH^c Daten wird die bereits verbesserte Näherung $\text{p}K^{c,(1)}$ der gesuchten Aciditätskonstante nach der folgenden Formel,

$$\text{p}K^{c,(1)} = -\lg \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{L}^-]}{[\text{HL}]} = -\lg \left([\text{H}^+] \cdot \frac{d_{\text{HL}} - \langle d \rangle}{\langle d \rangle - d_{\text{L}^-}} \right) \quad (3.18)$$

oder vorzugsweise mittels nichtlinearer Regression berechnet. Falls die Abweichung zwischen $\text{p}K^{c,(0)}$ und $\text{p}K^{c,(1)}$ größer als 0,3 ist, sollen die ganze Vorausplanung, die Probenvorbereitung und die NMR-Messungen mit dem Wert $\text{p}K^{c,(1)}$ wiederholt werden. Da in dieser zweiten Messreihe die Kontrolle der Ionenstärke strenger ist, steigt auch die Genauigkeit der erhaltenen Dissoziationskonstante.

3.4.4 Vergleich mit bislang veröffentlichten Simultantitrationen

Es existieren bereits NMR- und UV-spektroskopische Simultantitrationen, womit die „elektrodenlosen“ Titrationen verglichen werden können.

Die UV-spektroskopische Bestimmung der Hammettschen Aciditätsfunktion (Kapitel 2.2.1.3) weist besonders viele Ähnlichkeiten auf, der pH-Wert wird in beiden Fällen aus dem spektroskopisch ermittelten Dissoziationsgrad eines „Indikatormoleküls“ berechnet. Während aber beim Hammettschen Ansatz sich immer ein Indikatormolekül in der Probelösung befindet, enthält die Lösung in einer „elektrodenlosen“ Titration gleichzeitig alle pH-Sondenmoleküle.

In den in Kapitel 3.5.1.1 erwähnten NMR-Simultantitrationen wird der pH-Wert gar nicht berechnet, die pK -Differenz wird unmittelbar aus den gemessenen $\langle d \rangle$ -Werten der Testsubstanz und einer Referenzsubstanz erhalten.

3.5 Übersicht über die bislang entwickelten Auswertungskonzepte von NMR-Titrationen

Unter NMR-Titrationskurve des k -ten Kernes (im Englischen *chemical shift titration curve*) wird im Folgenden die Funktion $\langle d_k \rangle = f(\text{pH})$ verstanden, die in Kurzform auch als $d_k(\text{pH})$ bezeichnet wird. Die Auswertung dieser Funktion liefert die individuellen chemischen Verschiebungen $d_{\text{H}_i, L, k}$ der einzelnen Protolysespezies H_iL . Sollten die unter NMR-Messbedingungen gültigen pK -Werte unbekannt sein, müssen diese ebenfalls aus den NMR-Titrationskurven berechnet werden.

Die gleichen Verfahren können zur Berechnung der ionenspezifischen Kopplungskonstanten $J_{\text{H}_i, L, jk}$ aus den $\langle J_{jk} \rangle$ vs. pH Messkurven herangezogen werden.

3.5.1 Sonderfälle: Aciditätssysteme erster Ordnung

Die Auswertung gestaltet sich besonders einfach für Liganden mit wohlseparierten pK -Werten. Wie bereits in Kapitel 2.3.4 angedeutet, gibt es für diese Moleküle pH-Bereiche, wo jeweils eine Protolysespezies dominant vorliegt, so dass deren ionenspezifische chemische Verschiebung auf der Ordinatenachse abgelesen werden kann (siehe z. B. *N*-Acetylhistidin in Abbildung 8.88 aus Kapitel 8.4.3.2). Die Wendepunkte der NMR-Titrationskurven, die für alle Kerne gleich sind, geben unmittelbar den pK -Wert an („Halbstufenregel“) [164]. In der Praxis wählt man für die pK -Bestimmung jenen Spin mit der größten Dissoziationsverschiebung aus [171].

Die Verlässlichkeit der pK -Werte kann gesteigert werden, wenn nicht nur den Wendepunkt, sondern alle Messpunkte in die Auswertung einbezogen werden. Für jeden sigmoiden Abschnitt der NMR-Titrationskurve gilt folgender Zusammenhang zwischen der gemessenen chemischen Verschiebung $\langle d \rangle$ und den ionenspezifischen Grenzwerten d_L und d_{HL} :

$$\langle d \rangle = \frac{d_L + d_{HL} \cdot 10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}} \quad (3.19)$$

Die drei unbekannt Parameter d_L , d_{HL} und pK werden durch nichtlineare Regression ermittelt. Es gibt zwar auch linearisierte Formen von Gleichung 3.19, wie die Henderson-Hasselbach-Gleichung, doch liefern diese im statistischen Sinne keine erwartungstreuen Fehlerschätzungen für die Parameter [179].

Sollte ein Abschnitt der d vs. pH-Kurve fehlen, z. B. weil das betroffene Signal im aciden pH-Bereich unter dem Solventpeak verschwindet, kann d_{HL} über Gleichung 3.19 nur mit einer erhöhten Standardabweichung berechnet werden. Hierfür stellt die Linearisierung nach Giralt *et al.* [168] eine wesentlich verlässlichere Auswertungsmethode dar.

3.5.1.1 Präzise Bestimmung der pK -Differenz mit NMR-Simultantitration

Die pK -Differenz zweier Verbindungen lässt sich in einer NMR-Simultantitration um mehr als eine Größenordnung genauer ermitteln als die pK -Werte selbst [165][166][167]. Der Grund dafür liegt im Messfehler der mit Einstabmessketten erfassten pH-Werte. In Einzelproben-titrations geht der pH-Wert in die Berechnung ein, während in den NMR-Simultantitrations die pK -Differenz ohne die Kenntnis des aktuellen pH-Wertes, nur aus den chemischen Verschiebungen zugänglich ist [165][166][167]. Auf diese Weise haben Rabenstein und Mariappan den subtilen ^{15}N -Isotopeneffekt, d.h. die pK -Differenz von [^{15}N]- und [^{14}N]-Glycin zu $0,00962 \pm 0,00011$ bestimmt, die bei der Aufklärung enzymatischer Umsetzungen dieser Aminosäure eine Rolle spielt [165]. Würden hingegen die pK -Werte aus den d vs. pH Profilen beider Verbindungen berechnet, ergäbe sich deren Differenz zu $0,0096 \pm 0,0127$ [165].

Perrin und Fabian haben einen anderen Ansatz zur Auswertung von NMR-Simultantitrations entwickelt [166][167], der in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung von pK_4

der Aminophosphinophosphonsäure **2** (HL) in bezug auf pK_T von Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (HT) verwendet.

Umstellung der Gleichung 3.19 auf den zu eliminierende $[H^+]$ führt zu:

$$[H^+] = K_T \cdot \frac{\langle d_T \rangle - d_{HT}}{d_{HT} - \langle d_T \rangle} = K_4 \cdot \frac{\langle d_L \rangle - d_{HL}}{d_{HL} - \langle d_L \rangle} \quad (3.20)$$

Aus dieser Gleichung wird die experimentell zugängliche $\langle d_L \rangle$ ausgedrückt:

$$\langle d_L \rangle = \langle d_T \rangle + \frac{(d_L - d_{HL}) \cdot (\langle d_T \rangle - d_T)}{(1 - K^{rel}) \cdot (\langle d_T \rangle - d_T) + K^{rel} \cdot (d_{HT} - d_T)} \quad (3.21)$$

Hierin repräsentiert K^{rel} die relative Acidität der Liganden:

$$K^{rel} = \frac{K_4}{K_T} \quad \text{und} \quad pK^{rel} = \Delta pK = pK_T - pK_4 \quad (3.22)$$

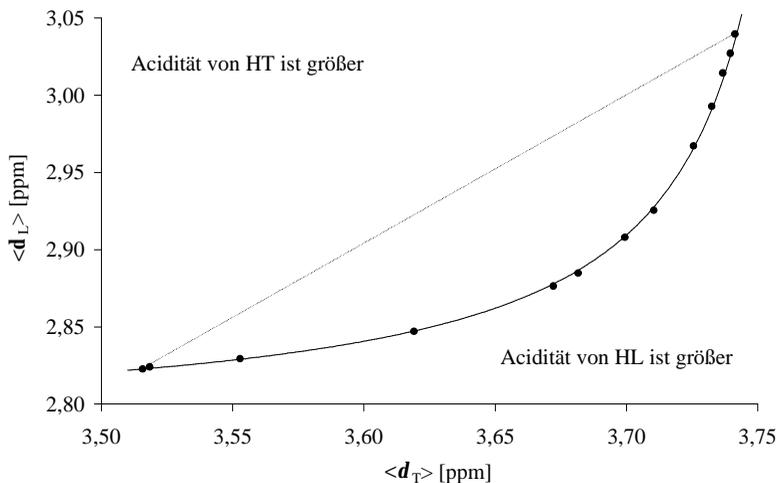


Abbildung 3.2: Bestimmung der pK -Differenz von TRIS **21** und der Aminophosphonsäure **2** nach der Perrin-Fabian-Methode [166] (eigene Messung)

Wie aus Abbildung 3.2 ersichtlich, würde sich bei $pK_{HT} = pK_{HL}$ eine Gerade ergeben. Die konvexe Kurve deutet auf $pK_{HT} > pK_{HL}$ hin. Zur Ermittlung der pK -Differenz wurde ein Turbo-Pascal-Programm entwickelt, das Gleichung 3.21 an die Messdaten anpasst. Die

Regression lieferte das folgende Ergebnis: $\Delta pK = pK_T - pK_4 = 0,822 \pm 0,006$. Weitere Einzelheiten über diese NMR-Titration werden in Kapitel 8.2.1.4 beschrieben.

Zum Abschluss soll erwähnt werden, dass die obigen ΔpK -Bestimmungen nur für einbasige Liganden oder Aciditätssysteme erster Ordnung möglich sind. Die in Gleichung 3.21 dargestellte Eliminierung des pH-Wertes ist bei der Überlappung mehrerer Dissoziationsschritte nicht möglich.

3.5.2 Aciditätssysteme höherer Ordnung

Wenn die Dissoziationsschritte einer Verbindung überlappen, können die ionenspezifischen Parameter $d_{H,L,k}$ nur rechnerisch ermittelt werden. Die Auswertung gestaltet sich leichter, wenn die Stabilitätskonstanten der Protolysespezies (oder die Dissoziationskonstanten) genau bekannt sind. Mit einem größeren numerischen Aufwand sind die Berechnungen verknüpft, wenn $\log b$ - oder pK -Werte mititeriert werden sollen.

3.5.2.1 Die Dissoziationskonstanten sind bekannt

Sind die unter NMR-Messbedingungen gültigen pK - oder $\log b$ -Werte genau bekannt, können die Molenbrüche $x_{H_i,L,m}$ nach Gleichung 2.48 berechnet werden. In Kenntnis der Molenbrüche sind $d_{H_i,L,k}$ als lineare Unbekannte von Gleichung 3.1 durch lineare Regression oder implizite Regression zugänglich. Diese Verfahren werden in Details in der Dissertation von C. Pfaff beschrieben [173].

3.5.2.2 Die Dissoziationskonstanten sind nicht bekannt

pK -Werte werden konventionell durch potentiometrische Titrations ermittelt. Es gibt aber Unterschiede in den optimalen Messbedingungen für Einzelproben-NMR-Titrations und Potentiometrie.

Als Lösemittel werden in NMR-Titrations D_2O oder D_2O/H_2O Mischsolvenzien verwendet, um das Einlocken des Magnetfeldes zu gewährleisten. Während die typische Ligandkonzentration bei der Potentiometrie 1 bis 10 mM beträgt, gelten 5 bis 50 mM für 1H - und $^{31}P\{^1H\}$ -NMR, bzw. 50 bis 200 mM für $^{13}C\{^1H\}$ -NMR [15]. Im Regelfall werden NMR-Spektren bei Raumtemperatur (22 °C) aufgenommen*. Für Potentiometrie ist

* Die am Ort der NMR-Probe herrschende Temperatur kann allerdings von der Raumtemperatur geringfügig abweichen [174].

$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ der internationale Standard. Des Weiteren wurde in den meisten bisher veröffentlichten NMR-Titrationsen auf die Kontrolle der Ionenstärke nicht geachtet.

Diese Unterschiede haben zur Folge, dass die potentiometrisch ermittelten pK -Werte unter den NMR-Messbedingungen nicht mehr gültig sind. Die im Arbeitskreis von G. Hägele entwickelten NMR-kontrollierten Titrationsen stellen in dieser Hinsicht Ausnahmen dar, denn es wird neben der titrationsgradabhängigen Spektrenreihe eine potentiometrische Titrationskurve $E(V_2)$ unter den gleichen Messbedingungen mit aufgenommen. Dieser zusätzliche Datensatz ermöglicht eine viel aussagekräftigere Auswertung, wie in der Dissertation von S. Hermens diskutiert wird [175].

In der vorliegenden Arbeit wurden meist NMR-Titrationsen in Form von Einzelprobenmessungen durchgeführt, wobei man eine viel genauere Kontrolle der Ionenstärke erzielen kann und keinen zeitaufwändigen Austausch des NMR-Probenkopfes braucht. Diese Messungen liefern NMR-Titrationskurven $\langle d \rangle = f(\text{pH})$, aus denen nicht nur die ionenspezifischen NMR-Parameter, sondern auch die Dissoziationskonstanten zu berechnen sind.

Die rein *NMR-spektroskopische pK -Bestimmung* besitzt auch Vorteile über die konventionelle potentiometrische Titration.

1. Zahlreiche Substanzen natürlicher oder industrieller Herkunft enthalten protolytisch aktive Verunreinigungen oder liegen als Diastereomerengemisch vor [21]. Bei der Auswertung der potentiometrischen Titrationskurve lassen sich Beiträge der Einzelverbindungen im Generalfall nicht separieren. Versuche zur simultanen Berechnung individueller pK -Werte führen zu mehrdeutigen Lösungen [15].

Die Peaks im ^1H -, ^{13}C - oder ^{31}P -NMR-Spektrum des Gemisches sind dagegen mittels 2D-NMR-Experimente den einzelnen Verbindungen zuzuordnen. Die Analyse der $\langle d \rangle$ vs. pH-Profile liefert derart die wahren pK -Werte der Substanzen. Naturgemäß dürfen die Komponenten des titrierten Gemisches untereinander keine chemische Reaktion aufweisen.

2. Bei potentiometrischen Titrationsen sind spezielle Maßnahmen erforderlich, die CO_2 -Absorption aus der Atmosphäre zu verhindern. Diese entfallen bei NMR-Titrationsen, da CO_2 dabei keine störende Komponente darstellt.

3. Die NMR-spektroskopischen pK -Bestimmungen können auch in komplexen Matrizen wie Blutplasma erfolgen, wenn die Substanz in geeigneter Konzentration vorhanden ist. Mit Hilfe von derart ermittelten Dissoziationskonstanten kann wiederum der pH -Wert der Bioflüssigkeit durch *in vivo*-Kernresonanzspektroskopie erfasst werden.
4. Durch geeignete NMR-Simultantitrationen lassen sich pK -Werte bei pH -Extrema (Kapitel 3.4.1) oder die pK -Differenz zweier Verbindungen (Kapitel 3.5.1.1) um mindestens eine Größenordnung genauer bestimmen als mit den üblichen potentiometrischen Titrationen.

Schon zuvor wurden Auswerteprogramme veröffentlicht, die gleichzeitig ionenspezifische Parameter und pK - oder $\log b$ -Werte iterieren (siehe Tabelle 3.5). Die Grundlage dieser Auswertung ergibt sich durch Einsetzen der Definition der Molenbrüche (Gleichung 2.48) in Gleichung 3.1:

$$\langle d_{m,k} \rangle = \frac{d_{L,k} + d_{HL,k} b_1 [H^+] + \dots + d_{H_nL,k} b_n [H^+]^n}{1 + b_1 [H^+] + \dots + b_n [H^+]^n} = \frac{\sum_{i=0}^n d_{H_iL,k} b_i [H^+]^i}{\sum_{i=0}^n b_i [H^+]^i} \quad (3.23)$$

Im Rahmen einer nichtlinearen Regression werden die unbekannt Parameter $d_{H_iL,k}$ und b_i so lange optimiert, bis eine gute Übereinstimmung der gemessenen und berechneten $\langle d_{k,m} \rangle$ -Werte erreicht ist.

Seit den 1980er Jahren ist es bekannt, dass bei Aciditätssystemen höherer Ordnung die nichtlineare Regression aus den Titrationskurven einzelner Kerne unterschiedliche Stabilitätskonstanten (oder pK -Werte) liefert, obwohl die Güte der Anpassung in jedem Fall hervorragend (>95%) ist [40][146][171][23]. Diese Beobachtung wird am eigenen Beispiel von Glycylhistidin illustriert (siehe Abbildung 3.3 und Tabelle 3.4). Die teilweise außerordentlich große Abweichung der pK -Werte lässt sich auf der mikroskopischen Ebene der Behandlung erklären. Die Sudmeier-Reilly-Gleichung besagt, dass die Dissoziationsverschiebung Δd_k der einzelnen Kerne aus unterschiedlichen Beiträgen der überlappend dissoziierenden Imidazolium- und Aminogruppe besteht (siehe Kapitel 5.3). Die Spins H^1 und H^2 erfahren einen größeren Einfluss der acideren Imidazoliumgruppe, liefern somit scheinbar niedrigere pK -Werte als die Protonen H^7 und H^8 in der

Nachbarschaft des basischeren Stickstoffzentrums. Gerade diese Unterschiede können im Endeffekt zur Bestimmung der mikroskopischen Dissoziationskonstanten führen (siehe Kapitel 5.2).

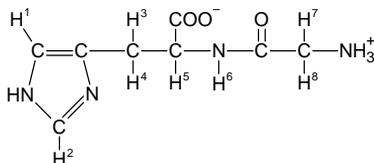


Abbildung 3.3: Strukturformel von Glycylhistidin 11

aus der Titrationskurve des Kernes	pK_1	pK_2	pK_3
H ¹	2,51 (11)	6,82 (4)	8,27 (32)
H ²	2,90 (35)	6,82 (4)	8,21 (38)
H ³	2,40 (4)	6,79 (5)	8,17 (30)
H ⁴	2,40 (1)	6,65 (3)	7,46 (5)
H ⁵	3,20 (4)	6,88 (10)	8,55 (36)
H ⁷	1,791 (3)	8,478 (6)	8,693 (6)
H ⁸	1,66 (11)	7,27 (8)	8,50 (4)
simultan alle Kerne	2,62 (6)	6,830 (9)	8,36 (1)

Tabelle 3.4: Aus den NMR-Titrationskurven einzelner, bzw. aller Kerne iterierte Dissoziationskonstanten von Glycylhistidin 11 (eigene Messung, Auswertung mit dem Programm MULTINMRPK). In Klammern wird jeweils die Standardabweichung der letzten Ziffer angeführt

Bezieht man hingegen alle kernspezifischen Titrationskurven $d_i(\text{pH})$ in eine simultane Auswertung ein (multiple nichtlineare Regression), erhält man einen einzigen, gemeinsamen Satz der pK -Werte [146][171][23]. Dann müssen allerdings außer den n pK -Werten zusätzlich $(n+1)$ ionenspezifische chemische Verschiebungen pro NMR-Kern, also insgesamt $n+K \cdot (n+1)$ Parameter gleichzeitig optimiert werden. Diese erhöhte Parameteranzahl stellt spezielle Anforderungen an den verwendeten Iterator.

Die verschiedenen Konzepte und Programme zur Auswertung von NMR-Titrationsen seien in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Programm [Ref.]	Spezies	Eingabedaten	Methode	Ergebnis
GAUSS [173]	H,L	$d(x_{m,i})$ $d(x_{m,i})$	gewichtete lineare Regression implizite Regression	$d_{H,L}$ $x_{m,i} \cdot d_{H,L}$
PKA-I [42] PHFIT [146] TIFIT [171]	H,L	Mehrere $d_k(\text{pH})$	multiple nichtlineare Regression	$d_{k,H,L}, pK_i$
HYPNMR [23]	H _n L _i M _m	Mehrere $d_k(\text{pH})$	gewichtete multiple nichtlin. Regr.	d_i, b_i
CANPOD [175]	H _n L _i M _m	$E(V_z)$ $d(x_i)$	nichtlineare Regression lineare Regression	$\lg b_i$ d_i
MULTINMRPK ^a	H,L	Mehrere $d_k(\text{pH})$	Gewichtete multiple nichtlin. Regr.	$d_{k,H,L}, pK_i$

Tabelle 3.5: Überblick der Auswerteprogramme zu NMR-Titrationen. ^a diese Arbeit

3.6 Zielsetzungen der Programmentwicklung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Programm zur simultanen Auswertung von mehreren NMR-Titrationskurven $d_k(\text{pH})$ erstellt werden. Es sollte im Vergleich zu bereits bestehenden Programmen folgende *neue Funktionalitäten* besitzen.

1. Die vier Formalismen für makroskopische Säure-Base-Gleichgewichte, pK_s , $\log K$, pK_b oder $\log b$ sollen frei wählbar sein zur Untersuchung, welcher Formalismus die Konstanten mit dem kleinsten Fehler und Korrelation liefert.
2. Alternativ zu der bewährten multiplen Regression soll die Anwendbarkeit der Zielfaktorenanalyse (Target-Faktorenanalyse, TFA) zur makroskopischen Auswertung von multinuklearen NMR-Titrationen erprobt werden.
3. Auf Grund der Ergebnisse der makroskopischen Auswertung sollen die Eingabedaten für eine mikroskopische Auswertung möglichst automatisch, mit wenigen Benutzer-eingaben erstellt werden.
4. Die neu eingeführten normierten NMR-Titrationskurven sollen die Auswahl gruppenspezifischer Sensorkerne unterstützen (siehe Kapitel 5.5).

3.7 Das Programm MULTINMRPK

Im Folgenden wird die Funktionsweise des objektorientierten C++-Programms MULTINMRPK (Multinukleare NMR-Bestimmung von pK-Werten) dargestellt. Der Ablauf der Auswertung ist in Abbildung 3.4 zusammengefasst. In den nachfolgenden Kapiteln werden die einzelnen Schritte und die zugrundeliegenden Algorithmen in Details erläutert.

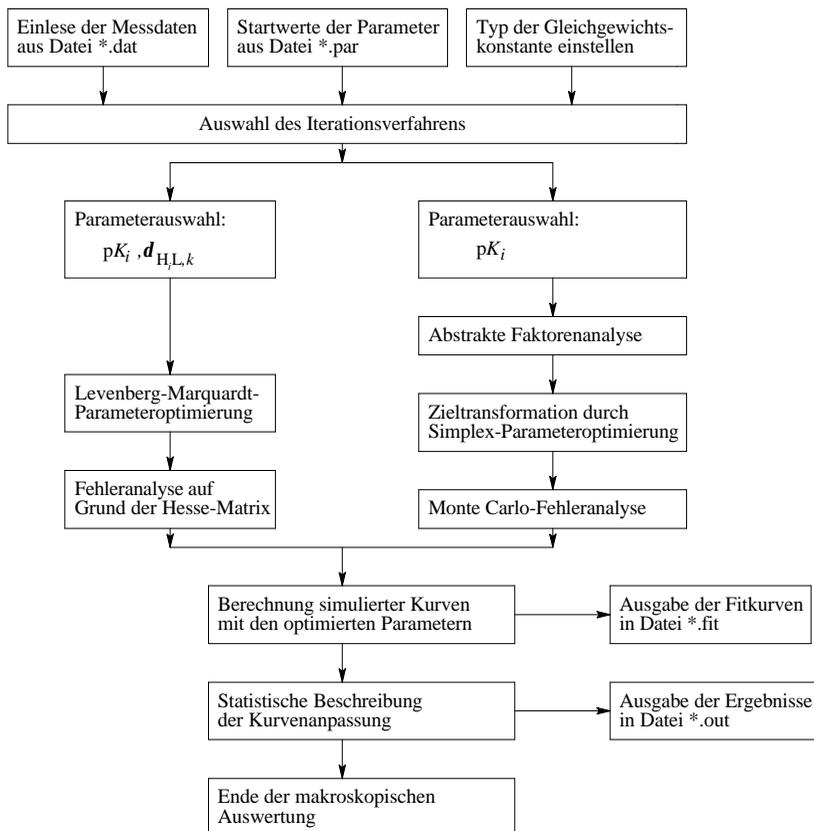


Abbildung 3.4: Schematisierter Ablauf der makroskopischen Auswertung von NMR-Titrationen im Programm MULTINMRPK

3.7.1 Eingabedaten, Hauptmenü

Die Messdaten werden aus einer Textdatei *.dat eingelesen. Die erste Spalte enthält immer pH-Werte, die übrigen bestehen aus den gemessenen chemischen Verschiebungen $\langle \mathbf{d}_{m,k} \rangle$. Im Hauptmenü des Programms kann man den Typ der zu optimierenden Gleichgewichtskonstanten einstellen, die zu minimierende Zielfunktion und das Wichtungsschema auswählen und anschließend die Parameterschätzung starten.

3.7.2 Multiple nichtlineare Regression

Die bewährtesten Methoden zur iterativen Anpassung simulierter Kurven an Experimentelle basieren auf dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate (*least-squares parameter estimation*). Eine detaillierte Beschreibung dieser Verfahren füllt Monographien [179][180], hier werden nur jene Aspekte dargestellt, die für die vorliegende Arbeit von direkter Relevanz sind.

Eine wichtige Voraussetzung der Methode ist, dass die unabhängige Variable pH, die der chemometrischen Nomenklatur folgend als \mathbf{x} -Vektor bezeichnet wird, fehlerfrei ist*. Jede dynamisch gemittelte chemische Verschiebung $\langle \mathbf{d}_k \rangle$ (oder abhängige Variable, \mathbf{y}_k) wird zudem als normalverteilte Zufallsvariable mit einer Standardabweichung von $\mathbf{s}_{\langle \mathbf{d}_k \rangle}$ (in Kurzform: \mathbf{s}_k) aufgefasst.

3.7.2.1 Parameterauswahl, Startwerte

Zur Iteration können beliebig viele Gleichgewichtskonstanten und ionenspezifische Parameter freigegeben werden. Die Startwerte für die Gleichgewichtskonstanten müssen vom Benutzer eingegeben werden und zumindest eine grobe Näherung an die tatsächlichen Werte darstellen. Die Startwerte für $\mathbf{d}_{H,L}$ werden auf Grund der Messdaten und Gleichgewichtskonstanten automatisch erzeugt.

Alle Parameter werden in einem gemeinsamen Start-Parametervektor \mathbf{p} zusammengefasst und simultan iteriert. Sollten zur Iteration keine Stabilitätskonstanten $\log \mathbf{b}$, sondern $\text{p}K_s^-$, $\log K_p^-$ oder $\text{p}K_b$ -Werte freigegeben werden, werden diese in den Parametervektor \mathbf{p} als solche gelagert und optimiert. Erst zur Berechnung der Zielfunktion werden diese Konstanten nach Gleichung 2.41 in $\log \mathbf{b}$ umgerechnet.

* Diese Voraussetzung trifft in der Realität nicht zu. In der Dissertation von C. Pfaff wird ein Auswerteverfahren dargestellt, womit die Fehlerbeiträge der pH-Werte berücksichtigt werden können [173].

3.7.2.2 Zielfunktion, Datenwichtung

Eine Besonderheit von MULTINMRPK besteht darin, dass nicht alle Kerne in die simultane Regression einbezogen werden müssen. Es können auch die Titrationskurven nur $K' \leq K$ Kerne ausgewertet werden.

Die zu minimierende *Zielfunktion* lautet nach dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate wie folgt:

$$U = \sum_{m=1}^M \sum_{k=1}^{K'} w_{m,k} (y_{m,k}^{\text{exp}} - y_{m,k}^{\text{calc}})^2 \rightarrow \min! \quad (3.24)$$

Die Datenwichtung verringert den Einfluß der mit größerem Fehler behafteten Messwerte auf die gesamte Kurvenanpassung.

Mit *kernspezifischen Wichtungsfaktoren* $w_{m,k}$ wird berücksichtigt, dass chemische Verschiebungen im ^1H -, ^{13}C - und ^{31}P -NMR mit verschiedener Genauigkeit zu erfassen sind [23]:

$$w_{m,k} = \frac{1}{N_w} \frac{1}{\mathbf{s}_k^2} \quad \text{mit } N_w = \sum_{k=1}^{K'} \frac{M}{\mathbf{s}_k^2} \quad (3.25)$$

Die Ungenauigkeit chemischer Verschiebungen ist von der digitalen Auflösung der betreffenden Spektren abhängig, typische Werte betragen $\mathbf{s}_{^1\text{H}} = 0,001$ ppm und $\mathbf{s}_{^{31}\text{P}} = \mathbf{s}_{^{13}\text{C}} = 0,01$ ppm (siehe z. B. [23]).

Bei bestimmten Titrationsgraden kann es auch dazu kommen, dass die chemische Verschiebung eines Kernes infolge Peakverbreiterung oder spektraler Überlappung viel ungenauer oder gar nicht bestimmbar ist als in anderen Bereichen der NMR-Titration. In diesem Fall kommt die *kern- und messpunktspezifische Datenwichtung* zum Einsatz.

$$w_{m,k} = \frac{1}{N_w} \frac{1}{\mathbf{s}_{m,k}^2} \quad \text{mit } N_w = \sum_{k=1}^{K'} \sum_{m=1}^M \frac{1}{\mathbf{s}_{m,k}^2} \quad (3.26)$$

Die Standardabweichungen für einzelne Messpunkte müssen aus einer zusätzlichen Textdatei (*.err) eingelesen werden.

Sollten jedem NMR-Kern und jedem Messpunkt während der Kurvenanpassung der gleiche Einfluss erteilt werden, so wird die Datenwichtung ausgeschaltet ($w_{m,k} = 1$). Die Normierungsfaktoren N_w in den Gleichungen 3.25 und 3.26 dienen gerade dazu, dass die

Ergebnisse gewichteter und nichtgewichteter Regressionen untereinander vergleichbar bleiben [179].

Werden alle $y_{m,k}^{\text{exp}}$ -Werte nach der Symbolik in [179] in der $M \times K'$ -Datenmatrix \mathbf{Y} und die nach der *Modellfunktion* (Gleichung 3.23) berechneten $y_{m,k}^{\text{calc}}$ -Werte in Matrix \mathbf{F} angeordnet, ergibt sich folgende Matrixgleichung:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{F}(\mathbf{x}, \mathbf{p}) + \mathbf{E} \quad (3.27)$$

wobei Matrix \mathbf{E} die Messfehler $\mathbf{e}_{m,k}$ enthält. In dieser Schreibweise lässt sich die Zielfunktion (Gleichung 3.24) kompakter formulieren:

$$U(\mathbf{p}) = [\mathbf{Y} - \mathbf{F}(\mathbf{p})]^T \cdot \mathbf{W} \cdot [\mathbf{Y} - \mathbf{F}(\mathbf{p})] \rightarrow \min! \quad (3.28)$$

3.7.2.3 Parameteroptimierung nach der Levenberg-Marquardt-Methode

Die iterative Optimierung der Parameter erfolgt nach dem von Levenberg [182] und Marquardt [183] modifizierten Gauss-Newton-Verfahren. Die Berechnung wird vom vorangegebenen Parametervektor $\mathbf{p}^{(0)}$ aus gestartet. Der erste Iterationsschritt liefert einen bereits verfeinerten Parametervektor $\mathbf{p}^{(1)}$ nach dem folgenden Algorithmus.

Die Grundlage des Gauss-Newton-Verfahrens bildet die lokale lineare Näherung der nichtlinearen Modellfunktion $\mathbf{F}(\mathbf{p})$ um den Punkt $\mathbf{F}(\mathbf{p}^{(0)})$ als:

$$\mathbf{F}(\mathbf{p}) \approx \mathbf{F}(\mathbf{p}^{(0)}) + \mathbf{J} \cdot [\mathbf{p} - \mathbf{p}^{(0)}] \quad (3.29)$$

Hierin repräsentiert \mathbf{J} die *Jacobi-Matrix* der ersten partiellen Ableitungen von \mathbf{F} nach den einzelnen Parametern p_i , die im Programm MULTINMRPK numerisch berechnet wird. Einsetzen der Gleichung 3.29 in Gleichung 3.28 führt zur Iterationsformel der Gauss-Newton-Methode [179]:

$$\mathbf{p}^{(1)} = \mathbf{p}^{(0)} - \mathbf{p}^{(0)} = (\mathbf{J}^T \mathbf{W} \mathbf{J})^{-1} \mathbf{J}^T \mathbf{W} (\mathbf{Y} - \mathbf{F}) \quad (3.30)$$

Da Gleichung 3.29 nur eine lokale Näherung darstellt, konvergiert dieses Verfahren nur in der Umgebung des optimalen (unbekannten) Parametervektors $\mathbf{p}^{(\text{opt})}$. Weit von diesem Punkt entfernt ist die *Hesse-Matrix*

$$\mathbf{H} = \mathbf{J}^T \mathbf{W} \mathbf{J} \quad (3.31)$$

nahezu singular (det $\mathbf{H} \approx 0$) und damit nicht invertierbar.

Die Invertierbarkeit von \mathbf{H} wurde durch Addieren von \mathbf{II} , wobei \mathbf{I} den nach Marquardt benannten Parameter und \mathbf{I} die Einheitsmatrix darstellt, wesentlich verbessert [182][183],

$$\mathbf{p}^{(1)} = \mathbf{p}^{(0)} - \mathbf{p}^{(0)} = (\mathbf{J}^T \mathbf{W} \mathbf{J} + \mathbf{II})^{-1} \mathbf{J}^T \mathbf{W} (\mathbf{Y} - \mathbf{F}) \quad (3.32)$$

Somit wird die Konvergenz auch aus einem weitliegenden Parametervektor $\mathbf{p}^{(0)}$ gewährleistet. Das robuste Levenberg-Marquardt-Verfahren ist deshalb die Methode der Wahl für nichtlineare Regression geworden.

In aufeinander folgenden Iterationsschritten werden immer bessere Schätzwerte der Parameter, $\mathbf{p}^{(1)}$, $\mathbf{p}^{(2)}$, usw. erlangt. Die Iteration wird abgebrochen, wenn sich die Parameterwerte kaum mehr ändern: $\|\Delta \mathbf{p}\| < 10^{-6}$ oder die Zielfunktion „klein genug“ wird: $U(\mathbf{p}) < \text{ca. } 10^{-3}$ (beide Kriterien sind im Programm MULTINMRPK einstellbar).

3.7.2.4 Fehlerrechnung

Ein wesentlicher Vorteil der Methode der kleinsten Fehlerquadrate besteht darin, dass sie zu den optimierten Parametern $\mathbf{p}^{(\text{opt})}$ auch eine statistisch begründete Fehlerschätzung liefert. Die Varianz-Kovarianzmatrix der Parameter, \mathbf{C}_p , wird aus der Hesse-Matrix des letzten Iterationsschrittes berechnet:

$$\mathbf{C}_p = \text{rms}^2 \cdot \mathbf{H}^{-1} = \text{rms}^2 \cdot (\mathbf{J}^T \mathbf{W} \mathbf{J})^{-1} \quad (3.33)$$

Der *rms*-Wert (*root-mean-square*) quantifiziert die mittlere Abweichung zwischen gemessenen und berechneten Kurven:

$$\text{rms} = \sqrt{\frac{U(\mathbf{p}^{(\text{opt})})}{K \cdot M - P}} \quad (3.34)$$

Im Nenner geben $K \cdot M$ die Anzahl aller Messpunkte, P die Anzahl der optimierten Parameter und deren Differenz ($K \cdot M - P$) die Anzahl der Freiheitsgrade an. Die Güte der Anpassung ist akzeptabel, wenn *rms* in der Größenordnung der Messfehler (z. B. 0,001 ppm im $^1\text{H-NMR}$) liegt (für andere Kriterien siehe Abschnitt 3.7.2.5).

Die Standardabweichung (Fehlerschätzer) s_i der i -ten Parameter ergibt sich als Wurzel aus dem i -ten Diagonalelement (Varianz) von \mathbf{C}_p . Noch interessanter ist die Frage, ob die

Parameter untereinander korreliert sind. Der Korrelationskoeffizient $r_{i,j}$ zwischen Parameter p_i und p_j definiert sich über:

$$r_{i,j} = \frac{c_{i,j}}{\sqrt{c_{i,i}c_{j,j}}} \quad (3.35)$$

Die r_{ij} -Werte liegen zwischen -1 und $+1$. Im Falle von $|r_{ij}| \approx 0$ sind im Prinzip beide Parameter p_i und p_j aus den Messdaten „genau“, d.h. mit kleinen Fehlerschranken, bestimmbar. Für nichtlineare Parameter folgt jedoch aus $|r_{ij}| \approx 0$ nicht direkt, dass sie im statistischen Sinne voneinander unabhängig wären.

Noch wichtiger ist der Fall, wenn zwei Parameter untereinander eine hohe Korrelation aufweisen, $|r_{ij}| \approx 1$. In dieser Situation können die Parameter nicht verlässlich ermittelt werden, denn die Änderung eines Parameters kann durch eine Verschiebung des Anderen kompensiert werden. Häufig werden dabei unrealistisch große Standardabweichungen erhalten. Die Hauptkomponentenanalyse von \mathbf{C} kann in solchen Fällen verborgene Zusammenhänge unter den Parametern zu Tage bringen [179].

Die Untersuchung der Korrelation von Gleichgewichtskonstanten untereinander, bzw. mit den ionenspezifischen NMR-Parametern stellt ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit dar.

3.7.2.5 *Residual-Analyse und Güte der Kurvenanpassung*

Die statistische Beschreibung der Kurvenanpassung ist der einzige Punkt, wo der in C++ umgesetzte Originalcode aus [179] ergänzt wurde.

Für jede k -te NMR-Titrationskurve werden sog. *Residuen* $r_{m,k}$ gebildet

$$r_{m,k} = y_{m,k}^{\text{exp}} - y_{m,k}^{\text{calc}} \quad (3.36)$$

zur Beurteilung, ob die Abweichungen tatsächlich die anfangs angenommene Gaußsche Normalverteilung mit dem Mittelwert \mathbf{m} und der Varianz \mathbf{s}^2 aufweisen:

$$y_i = \frac{1}{\mathbf{s}\sqrt{2\mathbf{p}}} e^{-\frac{(x_i - \mathbf{m})^2}{2\mathbf{s}^2}} \quad (3.37)$$

Das arithmetische Mittel[†] $\mathbf{m}_{,k}$ der Abweichungen sollte für jede Messkurve Null betragen:

[†] Streng genommen werden aus den Residuen nur Schätzwerte der Momente gebildet.

$$\mathbf{m}_{1,k} = \sum_{m=1}^M \frac{r_{m,k}}{M} \quad (3.38)$$

Der Mittelwert der Abweichungen und die Standardabweichung der Residuen sollen beide den instrumentellen Fehler annähern. Die Varianz der k -ten Observablen, $\mathbf{m}_{2,k}$ ergibt sich als Differenz beider Größen [50][197]:

$$\mathbf{m}_{2,k} = s_k^2 = \sum_{m=1}^M \frac{(r_{m,k} - \mathbf{m}_{1,k})^2}{M-1} \quad (3.39)$$

Die Symmetrie (Schiefe, *skewness*) der Residuenverteilung wird durch das dritte Moment charakterisiert und sollte bei einer symmetrischen Verteilung gleich Null sein [50][197]:

$$\mathbf{m}_{3,k} = \sum_{m=1}^M \frac{(r_{m,k} - \mathbf{m}_{1,k})^3}{M \mathbf{m}_{2,k}^{3/2}} \quad (3.40)$$

Das vierte Moment der Verteilung, die Wölbung (*kurtosis*) sei für eine Gausssche Normalverteilung gleich 3 [50][197]:

$$\mathbf{m}_{4,k} = \sum_{m=1}^M \frac{(r_{m,k} - \mathbf{m}_{1,k})^4}{M \mathbf{m}_{2,k}^2} \quad (3.41)$$

Zur Beurteilung der Güte der Kurvenanpassung (*goodness-of-fit*, GOF) dienen im Programm MULTINMRPK drei Kriterien.

Der *rms*-Wert wurde bereits besprochen (siehe Gleichung 3.34).

Der ursprünglich für die Röntgenkristallographie eingeführte *Hamiltonsche R-Faktor* wird auch für Titrationskurven verwendet [198]. Er beschreibt die Güte der Anpassung relativ zu den quadrierten Messwerten $y_{m,k}$ und ist im Idealfall gleich Null:

$$R_k = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^F w_{m,k} r_{m,k}^2}{\sum_{m=1}^F w_{m,k} y_{m,k}^2}} \quad (3.42)$$

Das dritte Kriterium ist das „Goodness-Of-Fit%“ *GOF%* [179], das für eine gute Anpassung über 99% liegen soll:

$$GOF\%_k = \left\{ 1 - \frac{\sum r_{k,m}^2 \cdot (M-1)}{[\sum y_{k,m}^2 - (\sum y_{k,m})^2 / M] \cdot (K'M-1)} \right\} \cdot 100\% \quad (3.43)$$

3.7.3 Ein neues Auswertungskonzept: die Zielfaktorenanalyse (TFA)

Faktorenanalyse ist ein mathematisch-statistisches Mittel zum Extrahieren und Komprimieren der Information aus großen Datenmatrizen in wenige lineare Komponenten (Faktoren). Eine ausführliche Beschreibung über faktorenanalytische Methoden und deren chemische Anwendungen ist in der Monographie von Malinowski nachzulesen [184].

Im Folgenden wird nur das im Programm MULTINMRPK implementierte Spezialverfahren, die Zielfaktorenanalyse oder Target-Faktorenanalyse (*target factor analysis*, TFA) näher dargestellt. Die meisten chemischen Anwendungen der TFA liegen in der Gemischanalytik.

Die Zielfaktorenanalyse wurde kürzlich zur pK-Bestimmung amphoterer Arzneimoleküle aus pH-abhängigen Spektrenreihen angewandt [185]. Die Grundlage der Auswertung bildet in diesem Fall das Lambert-Beersche Gesetz (für Vereinfachung auf eine Schichtdicke von $l = 1$ cm angewandt):

$$\mathbf{A} = \mathbf{C} \mathbf{E} \quad (3.44)$$

Hierin werden die gemessenen Absorptionen in der Datenmatrix \mathbf{A} angeordnet. Die Spalten von Matrix \mathbf{C} enthalten die pH-abhängigen Konzentrationsprofile und die Zeilen von Matrix \mathbf{E} die Spektren der einzelnen Protolysespezies. Die unbekanntenen Matrizen \mathbf{C} und \mathbf{E} werden in folgenden zwei Schritten berechnet [184][185].

Als erstes wird die *abstrakte Faktorenanalyse* von \mathbf{A} durchgeführt. Daraus ergibt sich die Anzahl der linear unabhängigen Komponenten, die unter gewissen Bedingungen die Anzahl der lichtabsorbierenden Spezies angibt [9][186]. Man erhält somit die „abstrakten“ Matrizen $\mathbf{C}^{\text{abstr}}$ und $\mathbf{E}^{\text{abstr}}$, die noch keine chemische Bedeutung haben.

Während der *Zieltransformation* (Target-Transformation) werden die gesuchten pK-Werte iterativ so lange variiert, bis eine Transformationsmatrix \mathbf{T} gefunden ist, womit $\mathbf{C}^{\text{abstr}}$ und $\mathbf{E}^{\text{abstr}}$ in die „wahren“, chemisch signifikanten Konzentrationsmatrix \mathbf{C} und Spektrenmatrix \mathbf{E} überführt werden.

Die dynamische Mittelung der chemischen Verschiebungen (Gleichung 3.1) lässt sich in Matrixschreibweise ausdrücken wie folgt:

$$\mathbf{A} = \mathbf{X} \mathbf{D} \quad (3.45)$$

In der $M \times K$ -Datenmatrix \mathbf{A} werden die gemessenen chemischen Verschiebungen $\langle \mathbf{d}_{m,k} \rangle$ angeordnet. Die Spalten der unbekanntes $M \times S$ -Molenbruchmatrix \mathbf{X} enthalten die pH-abhängigen Molenbrüche aller $S = n+1$ Protolysespezies, während die Zeilen der $S \times K$ -„NMR-Matrix“ \mathbf{D} aus den ebenfalls unbekanntes ionenspezifischen chemischen Verschiebungen bestehen.

Es lässt sich beim Vergleich der Gleichungen 3.44 und 3.45 erkennen, dass die Auswertung von UV- und NMR-Titrationen ein mathematisch völlig analoges Problem darstellt, die mit faktorenanalytischen Methoden erstmals in dieser Arbeit ausgenutzt wird. Da die Vorgehensweise von TFA nicht so allgemein bekannt ist, wie die der multiplen Regression, wird der im Programm MULTINMRPK angesetzte Algorithmus etwas eingehender erörtert.

3.7.3.1 Abstrakte Faktorenanalyse

Im ersten Schritt wird untersucht, wieviel linear unabhängige Komponenten (sog. *primäre Faktoren*) die titrationsabhängigen chemischen Verschiebungen beeinflussen.

Zu diesem Zweck wird aus der experimentellen Datenmatrix \mathbf{A} die $K \times K$ -Kovarianzmatrix \mathbf{C}_A aufgestellt:

$$\mathbf{C}_A = \mathbf{A}^T \mathbf{A} \quad (3.46)$$

Die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) von \mathbf{C}_A liefert einerseits K reelle Eigenwerte $\mathbf{I}_1 > \mathbf{I}_2 > \dots > \mathbf{I}_K \geq 0$, die in der Diagonalmatrix \mathbf{L} angeordnet werden, andererseits K orthonormale Eigenvektoren $\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2, \dots, \mathbf{v}_K$, die die Spalten von Matrix \mathbf{V} bilden:

$$\mathbf{C}_A = \mathbf{V}^T \mathbf{L} \mathbf{V} \quad (3.47)$$

Die Hauptkomponentenanalyse wird nach dem Jacobi-Verfahren durchgeführt [179]. Die gesuchte Anzahl der primären Faktoren ergibt sich als Rang von \mathbf{C}_A , der gleich dem (generalisierten) Rang der ursprünglichen (nichtquadratischen) Datenmatrix \mathbf{A} ist [184][9]:

$$\text{Rang}(\mathbf{A}) = \text{Rang}(\mathbf{C}_A) = \min\{\text{Rang}(\mathbf{X}), \text{Rang}(\mathbf{D})\} \leq \min\{M, K, S\} \quad (3.48)$$

Zur Anwendbarkeit der Matrix-Ranganalyse müssen folgende Ungleichheiten gelten für die Anzahl der Messungen (M), der Kerne (K) und der Spezies (S):

$$M > K > S \quad (3.49)$$

Bei der NMR-Titration einer mehrbasisigen Säure kann es dazu kommen, dass nicht genug NMR-Kerne (K) zur Verfügung stehen, da letztere durch die Konstitution der Verbindung bereits bestimmt sind. In diesem Fall kann die Faktorenanalyse nicht durchgeführt werden. In einer UV-pH-Titration besteht solche Gefahr nicht, die Messung kann bei „beliebig vielen“ Wellenlängen (K) erfolgen.

Wird Gleichung 3.49 erfüllt, ist:

$$\text{Rang}(\mathbf{A}) \leq S \quad (3.50)$$

Da die Datenmatrix \mathbf{A} aus der Molenbruchmatrix \mathbf{X} und der NMR-Matrix \mathbf{D} besteht (siehe Gleichung 3.45), kann die Ungleichheit in Gleichung 3.50 in zwei Fällen gelten.

Zum Ersten kann sich der Molenbruch einer Spezies als lineare Kombination derer von anderen Spezies zusammensetzen (lineare Abhängigkeit in Molenbruch-Matrix \mathbf{X}):

$$\text{Rang}(\mathbf{X}) \leq S \quad (3.51)$$

Dies ist der Fall bei den Molenbrüchen von Mikrospezies und deshalb kann die Faktorenanalyse für eine mikroskopische Auswertung in dieser Form nicht eingesetzt werden.

Zum Zweiten können die ionenspezifischen chemischen Verschiebungen eines Kernes als lineare Kombination derer von anderen Kernen ausgedrückt werden können (lineare Abhängigkeit in NMR-Matrix \mathbf{D}), wie es manchmal für geminale Methylenprotonen geschieht:

$$\text{Rang}(\mathbf{D}) \leq S \quad (3.52)$$

In anderen Fällen ist es über Gleichung 3.50 prinzipiell möglich, die Anzahl der Spezies mit unterschiedlichen NMR-Parametern zu ermitteln. Für Protolysespezies von H_nL ist diese Information bekannt: $S = n + 1$, deshalb wird die Ranganalyse von NMR-Matrizen in

der vorliegenden Arbeit an Säure-Base-Systemen getestet (Ergebnisse: siehe Abschnitt 3.7.5). Die Bestimmung der Anzahl der in einem Metall-Ligand-Proton-System gebildeten Spezies ist jedoch komplizierter [50]. Die Ranganalyse von UV-Datenmatrizen wurde seit langem zu diesem Zweck eingesetzt [184][9][186]. Einen neuen Anwendungsbereich stellt zur Zeit die Untersuchung der Peakhomogenität in dreidimensionalen HPLC-DAD-UV- und HPCE-DAD-UV-Chromatogrammen dar [187]. Es ist jedenfalls zu beachten, dass die Matrixranganalyse nur dann eindeutige Ergebnisse liefert, wenn die Spektren der einzelnen Komponenten sich stark unterscheiden.

In der Praxis ist die Datenmatrix \mathbf{A} mit Messfehlern behaftet, so dass immer K von Null verschiedene Eigenwerte erhalten werden [184][186]. Darunter befinden sich F „große“ (primäre) Eigenwerte, die die chemische Information tragen. Die übriggebliebenen ($K-F$) Eigenwerte sind betragsmäßig nahezu Null (sekundäre Eigenwerte) und beschreiben nur den Messfehler. Die sekundären Eigenwerte werden während der Datenkomprimierung „weggeworfen“ (siehe Kapitel 3.7.3.2).

Häufig gibt es aber keinen größenordnungsmäßigen Sprung zwischen primären und sekundären Eigenwerten. Zur Feststellung der Anzahl der Komponenten werden kontinuierlich neue Kriterien entwickelt [184]. Im Programm MULTINMRPK stehen zu diesem Zweck die „klassischen“ Funktionen von Malinowski zur Verfügung (für Definitionen siehe [184]): die *residual standard deviation* (RSD), die *imbedded error function* (IE) und die *factor indicator function* (IND), sie zeigen alle ein Minimum bei der korrekten Anzahl der Faktoren F . Für NMR-Datensätze erwies sich IND als am besten geeignet.

Die Ermittlung der Anzahl Faktoren nach den verschiedenen Funktionen wird in Abbildung 3.5 an einem gemessenen Beispiel illustriert.

In diesem Zusammenhang soll noch die graphische Matrixrang-Analyse von Lachmann erwähnt werden, wobei die Dissoziationsverschiebungen verschiedener Kerne gegeneinander aufgetragen werden und daraus auf die Anzahl und Überlappung der Dissoziationsstufen gefolgert werden kann [171].

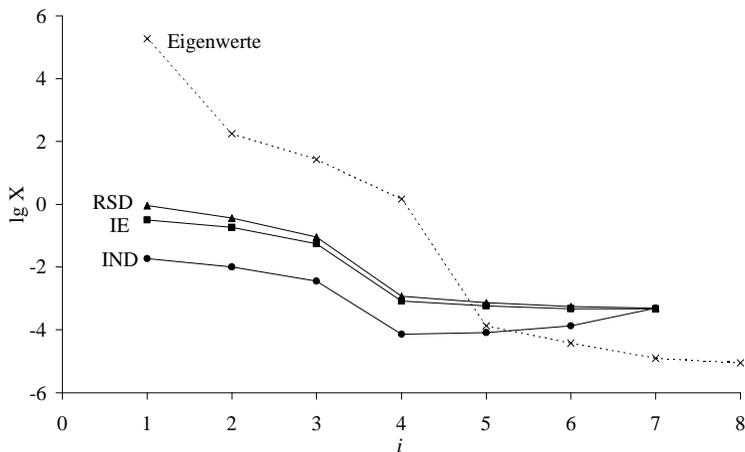


Abbildung 3.5: Bestimmung der Anzahl der Faktoren in der $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ -NMR-Titration von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})-N\text{-methyl}]\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$ (8 Kerne) nach logarithmierten Eigenwerten, RSD-, IE- und IND-Funktion. Alle Kriterien deuten darauf hin, dass die pH-abhängige Spektrenreihe durch vier Protolysespezies ($F = 4$), d.h. drei pK-Werte, beeinflusst wird

3.7.3.2 Datenkomprimierung

Die primären Eigenwerte werden in der Diagonale der komprimierten Eigenwertmatrix \mathbf{L}^* angeordnet. Aus den dazugehörigen primären Eigenvektoren, \mathbf{v}_1^* , \mathbf{v}_2^* , ..., \mathbf{v}_F^* wird spaltenweise die abstrakte NMR-Matrix, $\mathbf{D}^{\text{abstr}}$ gebildet. Diese Matrix hat zwar die gleiche Dimension wie die unbekannte „ionenspezifische“ NMR-Matrix \mathbf{D} , besitzt aber noch keine chemische Deutung. Aus dieser reinen mathematischen Lösung gelangt man zur „wahren“ ionenspezifischen NMR-Matrix \mathbf{D} erst durch die Target-Transformation (siehe im nächsten Abschnitt).

Das gleiche gilt für die Matrix der abstrakten Molenbrüche, $\mathbf{X}^{\text{abstr}}$:

$$\mathbf{X}^{\text{abstr}} = \mathbf{A} (\mathbf{D}^{\text{abstr}})^T \quad (3.53)$$

Die $(K-F)$ Eigenwerte und Eigenvektoren, die nur die Messfehler beschreiben, werden nicht in \mathbf{L}^* und $\mathbf{D}^{\text{abstr}}$ eingehen. Deshalb entspricht die Faktorkomprimierung eigentlich einer Glättung der Messdaten [184].

3.7.3.3 Zieltransformation

Aus den „abstrakten“ Matrizen $\mathbf{D}^{\text{abstr}}$ und $\mathbf{X}^{\text{abstr}}$ können durch unitäre Transformation beliebig viele \mathbf{D} und \mathbf{X} Matrizen abgeleitet werden [184]. Unter chemischen Gesichtspunkten heisst das, dass die Molenbrüche und NMR-Parameter der Einzelspezies ohne zusätzliche Informationen über das Gleichgewichtssystem nicht eindeutig berechnet werden können.

Als chemische Zusatzinformation wird ausgenutzt, dass die Elemente der Molenbruchmatrix \mathbf{X} nach Gleichung 2.48 berechnet werden. \mathbf{X} wird somit eine Funktion der unbekanntenen Gleichgewichtskonstanten im Parametervektor \mathbf{p} .

Man legt die Startwerte der Gleichgewichtskonstanten im $\mathbf{p}^{(0)}$ fest und berechnet damit eine Test-Molenbruchmatrix \mathbf{X}^{test} , die auch „Zielmatrix“ (*target*) genannt wird. Daraus wird durch Matrixalgebra die sog. Target-Transformationsmatrix \mathbf{T} erstellt,

$$\mathbf{T} = (\mathbf{L}^*)^{-1} (\mathbf{V}^*)^T \mathbf{X}^{\text{test}} \quad (3.54)$$

womit die Testmatrix \mathbf{X}^{test} in die prognostizierte (*predicted*) Matrix \mathbf{X}^{pred} umgerechnet wird:

$$\mathbf{X}^{\text{pred}} = \mathbf{X}^{\text{test}} \mathbf{T} \quad (3.55)$$

Falls \mathbf{X}^{pred} und \mathbf{X}^{test} gut übereinstimmen, werden die „wahre“ Transformationsmatrix \mathbf{T} und gleichzeitig die chemisch signifikanten Gleichgewichtskonstanten gefunden. Die Suche nach der optimalen \mathbf{T} gibt Anlass zu einem Parameteroptimierungsproblem: die Gleichgewichtskonstanten werden nach einer Iterationsstrategie so lange variiert, bis die Übereinstimmung zwischen \mathbf{X}^{pred} und \mathbf{X}^{test} erreicht wird.

Als zu minimierende Zielfunktion stehen zwei Funktionen im MULTINMRPK zur Verfügung. Die bekannteste ist die *SPOIL*-Funktion von Malinowski [184]:

$$SPOIL = \sum_{k=0}^K \frac{RET_k}{REP_k} \rightarrow \min! \quad (3.56)$$

Hierin dienen *AET* (*apparent error in target*), *REP* (*real error of prediction*) und *RET* (*real error of target*) als Hilfsvariablen (Details: siehe [184]):

$$AET_k = \sqrt{\frac{\sum_{m=1}^M (x_{m,k}^{\text{pred}} - x_{m,k}^{\text{test}})^2}{M}} \quad (3.57)$$

$$REP_k = \sqrt{\frac{\left(\sum_{k=F+1}^K I_k \right) \left(\sum_{k=1}^F t_{k,i}^2 \right)}{M(K-F)}} \quad (3.58)$$

$$RET_k = \sqrt{AET_k^2 - REP_k^2} \quad (3.59)$$

Als zweite Zielfunktion wurde in der vorliegenden Arbeit die quadrierte Abweichung der Matrizen \mathbf{X}^{pred} und \mathbf{X}^{test} , eigentlich eine *least-squares*-Zielfunktion, eingeführt:

$$U_{LS} = (\mathbf{X}^{\text{pred}} - \mathbf{X}^{\text{test}})^T (\mathbf{X}^{\text{pred}} - \mathbf{X}^{\text{test}}) \rightarrow \min! \quad (3.60)$$

Die Erfahrungen zeigen, dass in der Regel die Zielfunktion U_{LS} das schärfste Minimum im Parameterraum aufweist (siehe Kapitel 3.7.5.2).

Mit der „wahren“ Molenbruchmatrix \mathbf{T} wird zum Abschluss die Matrix der ionenspezifischen chemischen Verschiebungen \mathbf{D} berechnet:

$$\mathbf{T}^{-1} \mathbf{D}^{\text{abstr}} = \mathbf{D}^{\text{pred}} \quad (3.61)$$

Man sollte hier beachten, dass $(n+1) \cdot K$ Elemente von \mathbf{D} keine weiteren, zu optimierenden Parameter darstellen, im Gegensatz zur multiplen Regression, wo sie die Mehrzahl der unbekannt Parameter ausmachen. Die Verringerung der Parameterzahl und dadurch die Möglichkeit einer einfacheren Parametersuche sind zwei wichtige Vorteile des TFA-Ansatzes (siehe die Ergebnisse in Kapitel 3.7.5).

3.7.3.4 Simplex-Parameteroptimierung

Die Minimierung der Zielfunktionen $SPOIL$ oder U_{LS} erfolgt nach der in Numerical Recipes veröffentlichten „Amöba“ Version [188] der Simplexmethode [189], die ohne Änderung übernommen wurde.

Zur Optimierung von P Parametern wird aus $P + 1$ Punkten im Parameterraum ein „Simplex“ aufgestellt und die Zielfunktion wird für jeden Apex berechnet [189][190]. Der „beste“ Punkt mit dem kleinsten Wert der Zielfunktion wird immer behalten, während die

anderen P Apizes (Parametervektoren) nach geometrisch interpretierbaren Transformationen wie Spiegelung, usw. verschoben werden. Am Ende der Iteration „zieht“ sich das Simplex um den besten Parametervektor $\mathbf{p}^{(\text{opt})}$ zusammen. Weitere Einzelheiten über den Simplex-Algorithmus finden sich in [189][190].

Es werden während der Simplexmethode keine Jacobi- und Hesse-Matrizes aufgestellt, worauf die Fehlerschätzung der iterierten Gleichgewichtskonstanten basieren könnte. Es wurde zwar 1988 eine ergänzende Fehleranalyse zur Simplexmethode entwickelt [191], die auch im MULTINMRPK angesetzt wurde. Es stellte sich aber heraus, dass die zugrundeliegende quadratische Näherung der Fehlerhyperfläche für die nichtkonventionellen Zielfunktionen $SPOIL$ oder U_{LS} keine Gültigkeit mehr besitzt. Diese Fehleranalyse lieferte unrealistische oder in vielen Fällen gar keine Standardabweichungen für die optimierten Parameter.

3.7.3.5 Monte Carlo Fehleranalyse

Eine robustere, verlässlichere Fehlerrechnung lässt sich durch Monte Carlo-Methoden verwirklichen [192][193][194][195][196].

Aufgrund des optimierten Parametervektors $\mathbf{p}^{(\text{opt})}$ werden die „wahren“ Molenbruch- und NMR-Matrizen $\mathbf{X}^{(\text{pred})}$ und $\mathbf{D}^{(\text{pred})}$ erstellt, woraus sich eine fehlerfreie, berechnete Datenmatrix \mathbf{A}^{calc} ergibt, die die experimentelle \mathbf{A} -Matrix annähert:

$$\mathbf{A}^{\text{calc}} = \mathbf{X}^{\text{pred}} \mathbf{D}^{\text{pred}} \cong \mathbf{A} \quad (3.62)$$

Für jede NMR-Titrationskurve werden anschließend Residuen $r_{m,k}$ berechnet über

$$r_{m,k} = a_{m,k} - a_{m,k}^{\text{calc}} \quad (3.63)$$

Im TFA-Ansatz werden n Gleichgewichtskonstanten aus $K \cdot M$ Messdaten optimiert, somit beträgt die Anzahl der Freiheitsgrade per Titrationskurve $\text{int}(M-n/K)$. Daraus folgt für den rms -Wert der k -ten NMR-Titrationskurve:

$$rms_k = \sqrt{\frac{1}{\text{int}(M-n/K)} \sum_{m=1}^M r_m^2} \quad (3.64)$$

Mit den so gewonnenen rms_k -Werten wird eine simulierte Monte Carlo Datenmatrix $\mathbf{A}^{(mc)}$ erzeugt:

$$a_{m,k}^{(mc)} = a_{m,k}^{\text{ber.}} + rms_k g_{m,k} \quad (3.65)$$

Die gaussverteilten Zufallszahlen $g_{m,k}$ vom Mittelwert 0 und der Varianz 1 werden nach dem Algorithmus „gasdev“ aus Numerical Recipes [188] berechnet.

An der simulierten Datenmatrix $\mathbf{A}^{(mc)}$ werden alle Schritte der Auswertung, d.h. die Hauptkomponentenanalyse, die Faktorenkomprimierung und die Simplex-Parameteroptimierung durchgeführt, die einen neuen „optimalen“ Parametervektor $\mathbf{p}^{(mc)}$ liefern.

Insgesamt werden MC Monte Carlo-Schritte („virtuelle Experimente“) ausgeführt, daraus erhält man MC „optimale“ Parametervektoren. Die statistische Behandlung dieser Grundgesamtheit liefert dann die gesuchten Standardabweichungen der einzelnen Parameter p_i , wie folgt.

Das Stichprobenmittel des i -ten Parameters ergibt sich als

$$\langle p_i \rangle = \frac{1}{MC} \sum_{mc=1}^{MC} p_i^{(mc)} \equiv p_i^{(opt)} \quad (3.66)$$

Da $\langle p_i \rangle$ im statistischen Sinne eine erwartungstreue Schätzung darstellt, sollte sie den aus der experimentellen \mathbf{A} -Matrix gewonnenen $p_i^{(opt)}$ gleich sein. Die gefundene Übereinstimmung der Gleichgewichtskonstanten beträgt etwa 0,02 pK-Einheiten.

Die Standardabweichung des i -ten Parameters ist:

$$s_{p_i} = \sqrt{\frac{1}{MC-1} \sum_{mc=1}^{MC} (p_i^{(mc)} - \langle p_i \rangle)^2} \quad (3.67)$$

Es sollten hinreichend viele Monte Carlo-Schritte ausgeführt werden, bis eine konstante, von MC unabhängige Standardabweichung erreicht wird. Die Erfahrungen zeigen, dass die optimale Zahl der Monte Carlo Schritte zwischen 100 und 150 liegt.

Die Standardabweichungen der ionenspezifischen chemischen Verschiebungen werden in analoger Weise berechnet. Das ermöglicht einen direkten Vergleich mit den Standardabweichungen aus der multiplen Regression.

3.7.4 Ausgabe der Ergebnisse

Die optimierten Parameter können in einer Datei *.par gespeichert werden. Die angepassten $d(\text{pH})$ -Kurven werden als x,y-Textdatei (*.fit) gespeichert, die z. B. mit Microsoft Excel eingelesen und graphisch dargestellt werden können.

3.7.5 Numerische Erfahrungen mit MULTINMRPK

Die in Kapitel 3.6 geschilderten Aspekte wurden an acht NMR-pH-Datensätzen mit jeweils 4 bis 9 beobachteten Kernen studiert. Der größte Teil dieses Datenmaterials stammt aus eigenen Messungen, die $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration von Phenylephrin wurde von J. Ollig [15] durchgeführt. Besonders anspruchsvoll war die Analyse im Falle von Verbindung **5**, wo die simultane Anpassung von acht kernspezifischen Titrationskurven die gleichzeitige Optimierung von 35 Parametern verlangte. Es stehen aber 288 Messwerte zur Verfügung, so dass das System nicht unterbestimmt ist.

Die Parameterschätzungen wurden jeweils vom selben Parametervektor $\mathbf{p}^{(0)}$ gestartet. In der multiplen Regression wurden alle Gleichgewichtskonstanten und ionenspezifischen NMR-Parameter gleichzeitig verfeinert. In der TFA wurden nur Gleichgewichtskonstanten optimiert durch Minimierung entweder der SPOIL-Funktion (Gleichung 3.56) oder der neu eingeführten U_{LS} -Zielfunktion (Gleichung 3.60).

Auf eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse wird hier aus Platzgründen verzichtet, die wichtigsten Merkmale der Datensätze und die gewonnenen pK -Werte werden in Tabelle 3.6 aufgeführt.

V.	NMR-Kerne	Anzahl der Protolysespezies			Anzahl Datenpunkte	Anzahl Parameter		pK _S -Werte nach der Auswertungsmethode		
		Wahre Anzahl	nach Eig.	nach IND		MR	TFA	MR	TFA mit SPOIL	TFA mit U _{LS}
1	2 ³¹ P, 4 ¹ H	3	3	3	126	20	2	0,69 (2) 5,22 (2)	0,79 (6) 5,23 (4)	0,76 (14) 5,24 (4)
2	3 ³¹ P, 5 ¹ H	4	4	4	288	35	3	1,292 (5) 3,108 (6) 7,71 (1)	1,316 (8) 3,10 (1) 7,72 (1)	1,32 (1) 3,10 (1) 7,72 (2)
5	1 ³¹ P, 3 ¹ H	3	3	2	256	14	2	2,4644 (6) 4,520 (9)	Keine Konvergenz	2,05 (1) 5,30 (2)
9	5 ¹ H	2	2	3	30	11	1	7,147 (8)	Keine Konvergenz	7,146 (4)
10	6 ¹ H	3	3	3	60	20	2	2,83 (2) 7,158 (4)	2,84 (2) 7,16 (1)	2,84 (2) 7,16 (1)
11	7 ¹ H	4	4	4	154	31	3	2,62 (6) 6,830 (9) 8,36 (1)	2,46 (18) 6,84 (4) 8,33 (3)	2,34 (6) 6,84 (3) 8,35 (2)
12	9 ¹ H	4	4	4	180	39	3	2,54 (2) 6,911 (6) 9,692 (9)	2,53 (4) 6,90 (2) 9,70 (2)	2,53 (3) 6,90 (1) 9,70 (1)
Ph.	9 ¹³ C	3	3	4	531	29	2	9,135 (3) 10,212 (4)	9,12 (1) 10,25 (2)	9,12 (1) 10,230 (9)

Tabelle 3.6: Durch multiple Regression (MR) und Zielfaktorenanalyse (TFA) berechnete pK-Werte von ausgewählten Modellverbindungen (V.). Die Anzahl der Spezies wurde in der abstrakten Faktorenanalyse nach Eigenwerten (Eig) und der IND-Funktion von Malinowski ermittelt. Der Datensatz von Phenylephrin (Ph.) wurde von J. Ollig vermessen [15]

3.7.5.1 Einfluss der zu iterierenden Gleichgewichtskonstante

Mit Hilfe der multiplen Regression wurde untersucht, welcher Formalismus der Gleichgewichtskonstanten zur Iteration am besten geeignet ist.

Die Optimierung in pK_S-, pK_B- und logK-Formalismen erwiesen sich im statistischen Sinne als völlig äquivalent. Werden die optimierten pK_B- und logK-Werte über die Gleichungen 2.39 und 2.37 in pK_S umgerechnet, stimmen sie mit den Ergebnissen der pK_S-Iterationen auf mindestens fünf Nachkommastellen überein. Nicht nur die Schätzwerte der Parameter,

sondern auch deren Standardabweichungen und Korrelationskoeffizienten bzw. die minimierte Zielfunktion sind gleich.

Es wurden aber Unterschiede zwischen den Optimierungen in pK_S - und in $\log b$ -Formalismen gefunden. Durch pK_S -Iterationen wurde im Regelfall ein niedrigeres Minimum der selben Zielfunktion erreicht als bei der $\log b$ -Optimierung. Die gefundenen Optima liegen jedoch im Parameterraum nicht voneinander entfernt, die Abweichung der aus $\log b$ umgerechneten und der direkt iterierten pK_S -Werte ist kleiner als 0,005. Die $\log b$ -Werte weisen tendenziell betragsmäßig größere Korrelationskoeffizienten untereinander und mit einigen mitoptimierten ionenspezifischen chemischen Verschiebungen auf als die pK_S -Werte.

3.7.5.2 *Vergleich der Zielfaktorenanalyse mit der multiplen Regression*

Zum Vergleich der beiden Auswertungskonzepte wurden für jeden Datensatz pK_S -Werte von gleichen Startwerten ausgehend iteriert. In drei Fällen wurde keine Konvergenz mit der SPOIL-Zielfunktion der TFA erreicht (siehe Tabelle 3.6).

Die Abweichung der resultierenden pK_S -Werte wird im Folgenden als statistisch signifikant betrachtet, wenn die durch TFA berechneten pK_S -Werte außerhalb den in multipler Regression gewonnenen Fehlerschranken ($\pm 1\sigma$) liegen. Wie aus Tabelle 3.6 hervorgeht, lieferten die beiden Auswertungsverfahren in diesem Sinne die gleichen pK_S -Werte für alle Verbindungen mit drei Ausnahmen.

Die Abweichung der Anzahl der primären Faktoren und der wahren Anzahl der Protolysespezies kann darauf hindeuten, dass die ionenspezifischen chemischen Verschiebungen voneinander nicht unabhängig sind (lineare Abhängigkeit in der NMR-Matrix \mathbf{D}). In diesen Fällen war das Versagen der Methode nicht unerwartet.

Woran kann nun der in [185] berichtete Erfolg der TFA-Methode bei der UV-spektroskopischen pK -Bestimmung und ihr Misserfolg bei NMR-Titrations liegen? Die Antwort steckt in der Anzahl der Observablen, die nach Gleichung 3.49 viel größer als die der Protolysespezies sein sollte. Wie bereits angedeutet, kann man in UV-pH-Titrations bei genügend vielen Wellenlängen messen, um diese Bedingung zu erfüllen, während die Anzahl der beobachteten spinaktiven Kerne häufig nicht ausreichend ist. Allerdings sollten die Ergebnisse der abstrakten Faktorenanalyse und die statistischen Eigenschaften

(Standardabweichungen, Korrelationskoeffizienten) der optimierten Parameter auch bei UV-Titrationen überprüft werden, um eventuell mehrdeutige Lösungen auszuschließen.

3.8 Zusammenfassung der Auswertungskonzepte

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass die Iteration von pK -Werten aus numerischen Gesichtspunkten Vorteile gegenüber $\log b$ -Iterationen besitzt.

Es wurde auch festgestellt, dass die multiple nichtlineare Regression die Methode der Wahl zur simultanen Auswertung mehrerer NMR-Titrationskurven verbleibt. In der Ziel-faktorenanalyse kann man zwar die Anzahl der zu iterierenden Parameter drastisch (um 70-90%) reduzieren, die Methode ist jedoch von Natur aus bezüglich linearer Abhängigkeiten der Datenmatrix \mathbf{A} sehr empfindlich und liefert in vielen Fällen mehrdeutige und unter chemischen Gesichtspunkten unrealistische Ergebnisse.

Aus diesem Grund werden im weiteren Verlauf der Arbeit die durch multiple Regression gewonnenen Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

4 DAS PROGRAMM LAOTIT – SIMULATION TITRATIONSABHÄNGIGER KERNRESONANZSPEKTREN HÖHERER ORDNUNG

Die Visualisierung titrationsabhängiger NMR-Spektrenreihen in Form von Kontur- und Stackplots stellt einen wichtigen Schritt der Interpretation dar. Im Arbeitskreis von G. Hägele werden Programme zu diesem Zweck seit 1989 erstellt [14][256]. Die neueste Entwicklung ist das Programm MULTIPLE NMR GRAPHICS von C. Pfaff [173].

Es ist besonders anschaulich, wenn diese Spektrenreihen auch simuliert werden können. Die ersten Ansätze dafür stellen in der Düsseldorfer Arbeitsgruppe GENTIT, SFSIM und WINPROT [50] dar, mit denen aber nur die protolysebedingte Wanderung eines einzigen Singulets simuliert und abgebildet werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Programm erstellt werden, womit titrationsabhängige Spektrenreihen erster oder höherer Ordnung simuliert werden können. Das Programm sollte die in der wässrigen Komplexchemie wichtigen $I = \frac{1}{2}$ -Spins behandeln können (^1H , ^{13}C , ^{31}P , usw.).

Den Ausgangspunkt der Programmentwicklung bildete das Turbo-Pascal-Programm MINILA von U. Weber und G. Hägele [200], in Anlehnung an LAOCOON von Castellano und Bothner-By [201]. Vielen Einschränkungen von MINILA, wie etwa eine maximale Spinzahl von 7, lag die MS-DOS-basierte Speicherverwaltung zu Grunde. Es erschien daher notwendig, den Algorithmus in Programmiersprache C++ unter Microsoft Windows[®] umzusetzen.

Die Funktionsweise des hier entwickelten objektorientierten C++-Programms LAOTIT (Laocon-Titrationssimulator) wird in Abbildung 4.6 dargestellt.

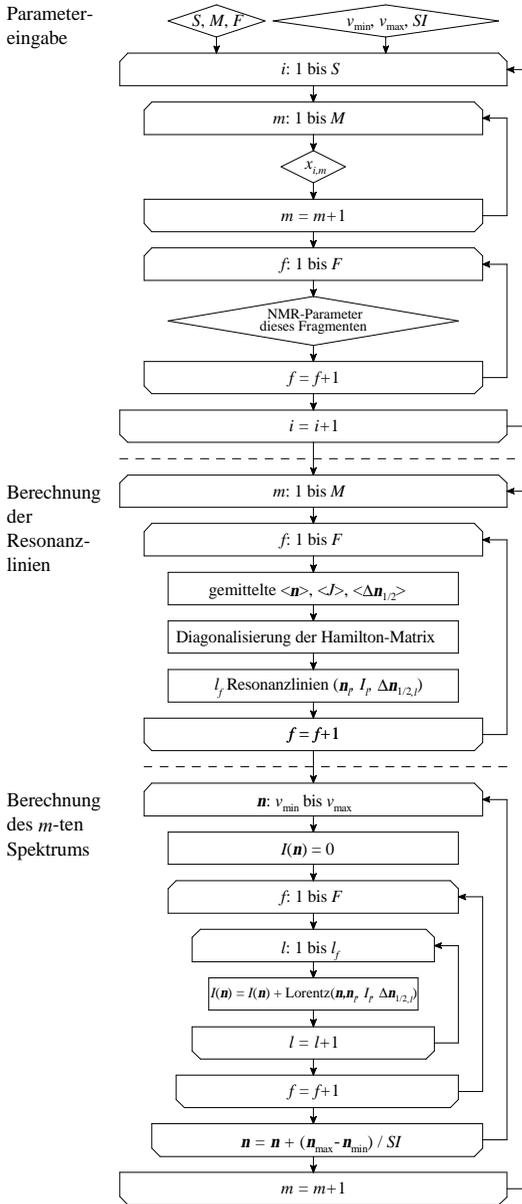


Abbildung 4.6: Flussdiagramm des Programms LAOTIT. Die Erklärung der Variablen befindet sich im nachfolgenden Text

Die Eingabe beginnt mit der Anzahl *Messpunkte* (Titrationsschritte) M und der Anzahl *Spezies* S . Die Molenbrüche der Spezies lassen sich für jeden Messpunkt z. B. mit WINSORE [50] berechnen. LAOTIT ist somit nicht auf Protolysespezies H_2L beschränkt, es können auch Metall-Ligand-Proton-Komplexe beliebiger Stöchiometrie behandelt werden. Darauf folgt die Eingabe der individuellen NMR-Parameter aller Spezies. Jede Spezies kann aus mehreren isolierten *Fragmenten*, d.h. miteinander nicht koppelnden Spinsystemen, bestehen (siehe Kapitel 4.1.2). Die Anzahl aller Fragmente wird durch F bezeichnet. Für jedes Fragment $f=1, 2, \dots, F$ sind die Anzahl der Spins K_f , die Massenzahlen der Spins (*ISO-Werte*), die Resonanzfrequenzen, die Kopplungskonstanten und die kernspezifischen Linienbreiten einzugeben.

Zum Abschluss sind die untere/obere Frequenzgrenze $\mathbf{n}_{\min}/\mathbf{n}_{\max}$ und die Anzahl der spektralen Punkte SI festzulegen. Im Fall eines heteronuklearen Spinsystems sollte auch der ISO-Wert des zu simulierenden Spektrums angegeben werden.

Nach der Eingabe der Parameter wird bei jedem Titrationsschritt m das Spektrum simuliert. Die Berechnung vollzieht sich separat für jedes Fragment f . Als erstes erfolgt die dynamische Mittelung der Resonanzfrequenzen (oder äquivalenterweise: der chemischen Verschiebungen) und der Kopplungskonstanten:

$$\langle \mathbf{n}_{f,m,k} \rangle = \sum_{i=1}^S x_{i,m} \mathbf{n}_{f,i,k} \quad (4.1)$$

$$\langle J_{f,m,k,j} \rangle = \sum_{i=1}^S x_{i,m} J_{f,i,k,j} \quad (4.2)$$

Ähnlich wie WINDAISY und andere Spinsimulatoren ermöglicht LAOTIT auch die Behandlung kernspezifischer Halbwertsbreiten $\Delta \mathbf{n}_{1/2}$ (in Hz). Bisher ist keine allgemeingültige Theorie zur Vorhersage von titrationsbedingten Änderungen der Halbwertsbreiten bekannt. Deshalb ist es von Bedeutung, die gemessene Spektrenreihe nach verschiedenen Halbwertsbreitenmodellen zu simulieren versuchen. Wesentliche Änderungen in $\Delta \mathbf{n}_{1/2}$ während einer Titration können auf Änderungen der intramolekularen Mobilität (z. B. wegen Wasserstoffbrücken) oder langsame Austauschvorgänge [130][131] hindeuten.

Im Programm LAOTIT stehen vier *Halbwertsbreiten-Modelle* zur Verfügung.

Im einfachsten Modell bleiben die Linienbreiten der Resonanzsignale im Verlauf der Titration konstant. Auch eine globale Halbwertsbreite kann einheitlich für das ganze Spektrum festgelegt werden.

In dem empirisch eingeführten „linearen Mittelungsmodell“ werden die kernspezifischen Halbwertsbreiten nach den Molenbrüchen der Spezies $x_{H,L}$ gemittelt:

$$\langle \Delta \mathbf{n}_{1/2, f, m, k} \rangle = \sum_{i=1}^S x_{i, m} \Delta \mathbf{n}_{1/2, f, i, k} \quad (4.3)$$

Die kernspezifischen Halbwertsbreiten $\Delta \mathbf{n}_{1/2, f, i, k}$ sollen in diesem Fall für jedes Fragment f aller Spezies i einzeln vorgegeben werden.

Das gleiche gilt für das phänomenologisch eingeführte „reziprokale Mittelungsmodell“ (Halbwertsbreitenmodell = 2), das von einer Konstante abgesehen die Mittelung der effektiven T_2^* Relaxationszeiten beschreibt:

$$\frac{1}{\langle \Delta \mathbf{n}_{1/2, f, m, k} \rangle} = \sum_{i=1}^S \frac{x_{i, m}}{\Delta \mathbf{n}_{1/2, f, i, k}} \quad (4.4)$$

Das vierte Modell ermöglicht, Halbwertsbreiten für jeden Kern an jedem Messpunkt einzeln vorzugeben. Damit können unter Anderem sprunghafte Änderungen in $\Delta \mathbf{n}_{1/2}$ simuliert werden ([15][175]).

Nach der dynamischen Mittelung der NMR-Parameter über alle Komplexspezies kommt es zur Berechnung der Frequenzen und Intensitäten der Resonanzlinien $l = 1, 2, \dots, L_f$ des betrachteten Fragments f . Zusätzlich wird für jeden Übergang eine „linienspezifische“ Halbwertsbreite errechnet. Diese Möglichkeit ist noch in wenigen heute gebräuchlichen Simulatoren (z. B. WINDAISY) verwirklicht und deshalb einer getrennten Diskussion im Abschnitt 4.1.1.4 wert. Alle Übergänge werden in einem Objektarray gespeichert.

Nachdem die obige Rechnung über alle Fragmente vollzogen ist, wird ein Lorentzspektrum erstellt. Die spektrale Intensität wird als Funktion der durchlaufenden Frequenz \mathbf{n} ($\mathbf{n}_{\min} \leq \mathbf{n} \leq \mathbf{n}_{\max}$) nach der Lorentzfunktion berechnet (siehe Abschnitt 4.1.2).

Die aufeinander folgenden Spektren werden in eine *.txt-Datei mit einem Dateiformat abgespeichert, die mit der neuesten Visualisierungssoftware von C. Pfaff [173] direkt eingelesen und dargestellt werden kann.

Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte der Simulation ausführlicher beschrieben.

4.1.1 Quantenmechanische Berechnung eines Spinsystems (Fragmentes)

Die quantenmechanischen Grundlagen und die Lösung der Schrödinger-Gleichung sind für verschiedene Spinsysteme allgemein bekannt. In diesem Kapitel wird der Themenkreis in Anlehnung an Günthers Lehrbuch [202] nur in solchem Umfang diskutiert, woraus sich der hier programmierte Algorithmus verstehen lässt. Auf weitere grundlegende Veröffentlichungen sei hier nur hingewiesen [203][204][205][206].

In diesem Kapitel genügt es, die Diskussion auf ein Fragment f zu beschränken, was zugunsten einer klaren Darstellung eine vereinfachte Schreibweise ermöglicht.

Gegeben sind $K \equiv K_f$ Kerne mit $I = 1/2$. Die Verschiedenheit der Spins wird durch die Massenzahl, ISO_k ausgedrückt. Vorgegeben sind ferner die Resonanzfrequenzen, Kopplungskonstanten und kernspezifische Halbwertsbreiten der Spins nach der folgenden, vereinfachten Schreibweise:

$$\mathbf{n}_k \equiv \langle \mathbf{n}_{f,m,k} \rangle, \quad J_{jk} \equiv \langle J_{f,m,j,k} \rangle \quad \text{und} \quad \Delta \mathbf{n}_{1/2,k} \equiv \langle \Delta \mathbf{n}_{1/2,f,m,k} \rangle \quad (4.5)$$

Ziel ist es, die quantenchemischen Übergänge des Spinsystems theoretisch zu ermitteln und für jede Resonanzlinie l deren Frequenz \mathbf{n}_l , relative Intensität I_l und eigene Linienbreite $\Delta \mathbf{n}_{1/2,l}$ zu berechnen. Aus diesen Ergebnissen wird anschließend das Lorentzspektrum generiert (siehe Abschnitt 4.1.1.5).

4.1.1.1 Berechnung der Energieniveaus

Nach der Quantenmechanik sind die Energiewerte E_i eines Spinsystems im Magnetfeld gequantelt und das System kann nur in bestimmten Zuständen, den Stationär- oder Eigenzuständen, existieren, die durch die Wellenfunktionen \mathbf{y}_i repräsentiert werden. E_i und \mathbf{y}_i sind Eigenwerte, bzw. Eigenfunktionen der zeitunabhängigen Schrödinger-Gleichung [202],

$$\hat{H} \mathbf{y}_i = E_i \mathbf{y}_i \quad (4.6)$$

Der Hamilton-Operator \hat{H} setzt sich aus zwei Termen zusammen [202]:

$$\hat{H} = -\sum_{k=1}^K \mathbf{n}_k \hat{I}_z(k) + \sum_{j=1}^{K-1} \sum_{k=j+1}^K J_{jk} \hat{I}(j) \hat{I}(k) \quad (4.7)$$

Hier beschreibt die erste Summe die potentielle Energie der Spins im Magnetfeld \mathbf{B}_0 in Abwesenheit von Kopplungseffekten und die zweite Doppelsumme die Spin-Spin-Kopplungsenergie, beides in der Frequenzeinheit Hz ausgedrückt. Der Kernspin-Operator $\hat{\mathbf{I}}(k)$ vom Spin k besteht aus den Komponenten $\hat{I}_x(k)$, $\hat{I}_y(k)$ und $\hat{I}_z(k)$ wobei $-z$ in Ausrichtung des äußeren \mathbf{B}_0 -Magnetfeldes liegt.

Das Operator-Eigenwertproblem 4.6 lässt sich numerisch in seiner Matrixrepräsentation lösen, wie es in der nachfolgenden, vereinfachten Ableitung geschildert wird.

Das Kernmoment eines einzigen Spins mit $I = 1/2$ kann in Bezug auf das polarisierende Magnetfeld \mathbf{B}_0 entweder eine parallele oder eine antiparallele Stellung einnehmen, diese sind gemeinsame Eigenzustände der kommutierenden Operatoren \hat{I}_z , \hat{I}^2 und \hat{H} [202]. Diese Eigenfunktionen werden durch die Symbole \mathbf{b} und \mathbf{a} bezeichnet, die dazugehörigen Eigenwerte betragen $m_I = -1/2$ und $m_I = +1/2$.

Zur Behandlung von Mehrspin-Systemen werden orthonormierte Basisproduktfunktionen \mathbf{j}_k durch Permutation der elementaren \mathbf{a} - und \mathbf{b} -Spinfunktionen aufgestellt, und jeder wird der Totalspin m_T aus den Magnetquantenzahlen der einzelnen Kerne $m_I(k)$ zugeordnet:

$$m_T = \sum_{k=1}^K m_I(k) \quad (4.8)$$

Für den allgemeinen Zweispin-Fall (AB-System) erhält man folgende vier Produktfunktionen: $\mathbf{j}_1 = \mathbf{bb}$ (mit $m_T = -1$), $\mathbf{j}_2 = \mathbf{ab}$, $\mathbf{j}_3 = \mathbf{ba}$ (beides mit $m_T = +1$) und $\mathbf{j}_4 = \mathbf{aa}$ (mit $m_T = -1$). Durch Einwirken des Hamilton-Operators auf diese Basisfunktionen entsteht die Hamilton-Matrix \mathbf{H} :

$$\mathbf{H} \equiv \begin{bmatrix} \langle \mathbf{aa} | \hat{H} | \mathbf{aa} \rangle & \langle \mathbf{aa} | \hat{H} | \mathbf{ab} \rangle & \langle \mathbf{aa} | \hat{H} | \mathbf{ba} \rangle & \langle \mathbf{aa} | \hat{H} | \mathbf{bb} \rangle \\ \langle \mathbf{ab} | \hat{H} | \mathbf{aa} \rangle & \langle \mathbf{ab} | \hat{H} | \mathbf{ab} \rangle & \langle \mathbf{ab} | \hat{H} | \mathbf{ba} \rangle & \langle \mathbf{ab} | \hat{H} | \mathbf{bb} \rangle \\ \langle \mathbf{ba} | \hat{H} | \mathbf{aa} \rangle & \langle \mathbf{ba} | \hat{H} | \mathbf{ab} \rangle & \langle \mathbf{ba} | \hat{H} | \mathbf{ba} \rangle & \langle \mathbf{ba} | \hat{H} | \mathbf{bb} \rangle \\ \langle \mathbf{bb} | \hat{H} | \mathbf{aa} \rangle & \langle \mathbf{bb} | \hat{H} | \mathbf{ab} \rangle & \langle \mathbf{bb} | \hat{H} | \mathbf{ba} \rangle & \langle \mathbf{bb} | \hat{H} | \mathbf{bb} \rangle \end{bmatrix} \quad (4.9)$$

Nach der Berechnung der einzelnen Matrixelemente wird ersichtlich, dass die symmetrische Hamilton-Matrix reelle Zahlen in einer Blockstruktur enthält:

$$\mathbf{H} = \begin{bmatrix} H_{11} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & H_{22} & H_{23} & 0 \\ 0 & H_{32} & H_{33} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & H_{44} \end{bmatrix} \quad (4.10)$$

Zur Lösung der Eigenwertaufgabe wird \mathbf{H} durch unitäre Transformation mit einer geeigneten Matrix \mathbf{U} auf Diagonalform gebracht, die gerade die gesuchten Energieniveaus E_k (in Hz) enthält:

$$\mathbf{U}^{-1}\mathbf{H}\mathbf{U} = \mathbf{D} = \begin{bmatrix} E_1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & E_2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & E_3 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & E_4 \end{bmatrix} \quad (4.11)$$

Die Matrix \mathbf{U} besteht aus den Eigenvektoren von \mathbf{H} , deren Komponenten nach dem Variationsprinzip die „Mischung“ der Basisfunktionen \mathbf{j} in den Eigenfunktionen \mathbf{y} beschreiben [202]. \mathbf{j}_1 und \mathbf{j}_4 fallen mit den Eigenfunktionen zusammen, während sich \mathbf{y}_2 und \mathbf{y}_3 aus den Basisfunktionen \mathbf{j}_2 und \mathbf{j}_3 „mischen“:

$$\mathbf{y}_1 = u_{11}(\mathbf{a}\mathbf{a}) = \mathbf{a}\mathbf{a} \quad (4.12)$$

$$\mathbf{y}_2 = u_{22}(\mathbf{a}\mathbf{b}) + u_{23}(\mathbf{b}\mathbf{a}) \quad (4.13)$$

$$\mathbf{y}_3 = u_{32}(\mathbf{a}\mathbf{b}) + u_{33}(\mathbf{b}\mathbf{a}) \quad (4.14)$$

$$\mathbf{y}_4 = u_{44}(\mathbf{b}\mathbf{b}) = \mathbf{b}\mathbf{b} \quad (4.15)$$

Im Falle von K Spins beträgt die Zahl der Basisproduktfunktionen $P = 2^K$, es gibt demzufolge ebensoviele Eigenzustände und Energieniveaus. Die Hamilton-Matrix \mathbf{H} besitzt aber ebenfalls eine Blockstruktur aus $K+1$ Untermatrizen. Die Dimension dieser Untermatrizen $\mathbf{H}^{(m)}$ gehorcht der m -ten Zeile des Pascalschen Dreieckes erster Ordnung ($m = 0, 1, \dots, K$):

$$\dim \mathbf{H}^{(m)} = \binom{K}{m} \quad (4.16)$$

Die maximale Größe, wofür Arbeitsspeicher reserviert werden muss, beträgt:

$$\max\{\dim \mathbf{H}^{(m)}\} = \binom{K}{\text{int}(K/2)} \ll \dim \mathbf{H} = 2^K \quad (4.17)$$

Die Untermatrizen $\mathbf{H}^{(0)}$ und $\mathbf{H}^{(K)}$ bestehen aus einem einzelnen Element, so brauchen diese nicht mehr auf Diagonalform gebracht werden. Daraus folgt, dass die Basisfunktionen $\mathbf{j}_1 = \mathbf{a}\mathbf{a}\dots\mathbf{a}$ und $\mathbf{j}_p = \mathbf{b}\mathbf{b}\dots\mathbf{b}$ gleichzeitig die Eigenfunktionen \mathbf{j}_1 und \mathbf{j}_p sind.

Die Elemente der m -ten Untermatrix $\mathbf{H}^{(m)}$ werden unter Anwendung des Hamilton-Operators aus den betreffenden Basisproduktfunktionen hergeleitet. Für die Diagonalelemente $H_{pp}^{(m)}$ gilt folgender Ausdruck, der aus dem Zeemann-Term und dem Kopplungsterm besteht [202]:

$$H_{pp}^{(m)} = \langle \mathbf{j}_p | \hat{H} | \mathbf{j}_p \rangle = -\sum_{k=1}^K \mathbf{n}_k m_I(k) + \frac{1}{4} \sum_{j=1}^{K-1} \sum_{k=j+1}^K J_{jk} T_{jk} \quad (4.18)$$

Hierin ist $T_{jk} = +1$, wenn in der betreffenden Basisfunktion \mathbf{j}_p die Kerne j und k parallele Spineinstellung aufweisen, ansonsten gilt $T_{jk} = -1$.

Die nichtdiagonalen Elemente zwischen zwei Basisfunktionen \mathbf{j}_p und \mathbf{j}_q enthalten den Mixingterm [202]:

$$H_{pq}^{(m)} = \langle \mathbf{j}_p | \hat{H} | \mathbf{j}_q \rangle = \frac{1}{2} J_{jk} U_{jk} \quad (4.19)$$

wobei $U_{jk} = 1$, wenn sich \mathbf{j}_p und \mathbf{j}_q nur durch Vertauschen der Spinfunktionen der Kerne j und k unterscheiden, ansonsten gilt $U_{jk} = 0$.

Die Hamilton-Matrix lässt sich blockweise diagonalisieren, was einen großen Gewinn an Rechenzeit bedeutet. Die Diagonalisierung erfolgt üblicherweise nach dem Jacobi-Verfahren und die resultierenden Eigenwerte E_i bzw. Eigenvektoren $\mathbf{u}^{(m)}$ werden für jede Untermatrix $\mathbf{H}^{(m)}$ separat abgespeichert.

4.1.1.2 Die Näherung erster Ordnung (X-Approximation)

Eine Spin-Spin-Kopplung wird als schwach bezeichnet, wenn für das koppelnde Kernpaar folgende Beziehung gilt:

$$\left| \frac{\mathbf{n}_j - \mathbf{n}_k}{J_{jk}} \right| > 10 \quad (4.20)$$

Je größer das obige Verhältnis ist, desto kleiner wird das entsprechende Nichtdiagonalelement in der Hamilton-Matrix. Da die Voraussetzung 4.20 im Falle eines hetero-

nuklearen Kernpaars ($ISO_j \neq ISO_k$) immer erfüllt wird, können die betreffenden Nichtdiagonalelemente willkürlich zu Null gesetzt werden (Näherung erster Ordnung oder X-Approximation). Da in Abwesenheit von nichtdiagonalen Elementen der rechenintensivste Schritt, die Diagonisierung der betreffenden Untermatrix, wegfällt, führt die X-Approximation im Programm LAOTIT zu einer weiteren Beschleunigung des Algorithmus.

4.1.1.3 Berechnung der Übergangsfrequenzen und Intensitäten

Betrachtet wird der 1-Quanten-Übergang ($\Delta m_T=1$) zwischen den Stationärzuständen \mathbf{y}_i und \mathbf{y}_j . Die Frequenz der betreffenden Resonanzlinie l ergibt sich als Differenz der Energieniveaus in Hz:

$$\mathbf{n}_l = E_j - E_i \quad (4.21)$$

Der Ausdruck für die Linienintensität I_l wird folgenderweise abgeleitet. Nach den Überlegungen in Abschnitt 4.1.1.1 setzt sich der Eigenzustand \mathbf{y}_i aus Basisproduktfunktionen \mathbf{j}_p zusammen, die alle den gleichen Totalspin $m_T = m-1$ besitzen:

$$\mathbf{y}_i = \sum_{p=1}^{\binom{K}{m-1}} u_{i,p}^{(m-1)} \mathbf{j}_p \quad (4.22)$$

Hierin ist $\mathbf{u}_i^{(m-1)}$ der i -te Eigenvektor der Hamilton-Untermatrix $\mathbf{H}^{(m-1)}$. Ein ähnlicher Ausdruck gilt für den Eigenzustand \mathbf{y}_j , in dem die Komponenten des Eigenvektors $\mathbf{u}_j^{(m)}$ der Hamilton-Submatrix $\mathbf{H}^{(m)}$ auftreten:

$$\mathbf{y}_j = \sum_{q=1}^{\binom{K}{m}} u_{j,q}^{(m)} \mathbf{j}_q \quad (4.23)$$

Nach der *Auswahlregel* finden Übergänge zwischen solchen Basisfunktionen \mathbf{j}_p und \mathbf{j}_q statt, die sich nur in der Einstellung eines einzigen Spins unterscheiden [202]. Bezeichnen wir diesen Spin durch k . Das *Übergangsmoment* M_k für $\mathbf{j}_p \rightarrow \mathbf{j}_q$ wird mit dem Erzeugungsoperator (*raising operator*) $\hat{I}^+(k)$ definiert, der den Spin k vom \mathbf{b} -Zustand in \mathbf{j}_p in \mathbf{a} -Zustand in \mathbf{j}_q überführt:

$$M_k = \langle \mathbf{j}_p | \hat{I}^+(k) | \mathbf{j}_q \rangle \quad (4.24)$$

M_k lässt sich in der Matrixrepräsentation folgendermaßen berechnen:

$$M_k = u_{i,p}^{(m-1)} u_{j,p}^{(m)} \quad (4.25)$$

Das Übergangsmoment lässt sich auch zwischen den Eigenzuständen \mathbf{y}_i und \mathbf{y}_j interpretieren:

$$M_{ij} = \langle \mathbf{y}_i | \sum_{k=1}^K \hat{I}^+(k) | \mathbf{y}_j \rangle \quad (4.26)$$

Aus der Linearität des Schiebeoperators $\hat{I}^+(k)$ folgt:

$$M_{ij} = \langle \mathbf{y}_i | \sum_{k=1}^K \hat{I}^+(k) | \mathbf{y}_j \rangle = \sum_{k=1}^K \langle \mathbf{j}_p | \hat{I}^+(k) | \mathbf{j}_q \rangle = \sum_{k=1}^K M_k \quad (4.27)$$

Die (relative) Intensität der l -ten Linie I_l ist gleich dem Quadrat des gesamten Übergangsmomentes:

$$I_l = M_{ij}^2 = \left(\sum_{k=1}^K M_k \right)^2 \quad (4.28)$$

Die Anzahl aller theoretisch möglichen Übergänge (Resonanzlinien) berechnet sich aus den Dimensionen der Submatrizen $\mathbf{H}^{(m-1)}$ und $\mathbf{H}^{(m)}$ zu:

$$L = \sum_{m=1}^K \binom{K}{m-1} \binom{K}{m} = \frac{(2K)!}{(K-1)!(K+1)!} \quad (4.29)$$

4.1.1.4 Linienspezifische Halbwertsbreiten

Eine Besonderheit des Programms LAOTIT besteht darin, dass für jede Resonanzlinie eine eigene, „linienspezifische“ Halbwertsbreite $\Delta n_{1/2,l}$ berechnet wird.

Es wird davon ausgegangen, dass sich ein Übergang aus Einzelspin-Übergängen $\mathbf{j}_p \rightarrow \mathbf{j}_q$ zusammensetzt, deren Wahrscheinlichkeit nach den Überlegungen im vorangehenden Kapitel proportional zu M_k^2 ist.

Die linienspezifische Halbwertsbreite $\Delta \mathbf{n}_{1/2,l}$ wird nun als eine gewichtete Summe der kernspezifischen Werte $\Delta \mathbf{n}_{1/2,k}$ aufgefasst, mit den Wichtungsfaktoren M_k^2 :

$$\Delta \mathbf{n}_{1/2,l} = \frac{\sum_{k=1}^K M_k^2 \Delta \mathbf{n}_{1/2,k}}{\sum_{k=1}^K M_k^2} \quad (4.30)$$

Der Übergang kann jenem Spin „zugeordnet“ werden, der den größten Koeffizienten M_k^2 hat. In Spinsystemen höherer Ordnung gibt es allerdings auch *Kombinationslinien*, wobei die M^2 -Beiträge der anderen Kerne nicht gleich Null sind, so trifft diese Zuordnung zu einem Kern nur in Näherung. Dieses Kriterium genügt aber zur Entscheidung, dass im Falle z. B. eines heteronuklearen H,P-Spinsystems eine berechnete Linie im ^1H - oder im ^{31}P -Spektrum dargestellt werden soll.

4.1.1.5 Spektromsimulation eines Fragmentes

Bei einer Spektromsimulation sollte die spektrale Intensität $S(\mathbf{n})$ für jede Frequenz $\mathbf{n}_{\min} \leq \mathbf{n} \leq \mathbf{n}_{\max}$ berechnet werden. $S(\mathbf{n})$ setzt sich aus Teilintensitäten aller Resonanzlinien l nach der Lorentz-Formel zusammen:

$$S(\mathbf{n}) = \sum_{l=1}^L \frac{I_l}{\mathbf{p} \cdot \Delta \mathbf{n}_{1/2,l} \left[1 + 4 \left(\frac{\mathbf{n} - \mathbf{n}_l}{\Delta \mathbf{n}_{1/2,l}} \right)^2 \right]} \quad (4.31)$$

4.1.1.6 Kontrollsumme zur Spektromsimulation

Zur Beurteilung der Güte der Simulation steht im Programm LAOTIT die *Gesamtintensität* aller Resonanzlinien zur Verfügung, deren Wert beträgt für K homonukleare Spins:

$$\sum_{l=1}^L I_l = K \cdot 2^{K-1} \quad (4.32)$$

Diese Gleichung gilt nur für homonukleare Spinsysteme. Wenn das zu simulierende Spinsystem aus K Homo- und K' Heterokernen besteht, muss Gleichung 4.32 mit dem hier empirisch eingeführten Faktor $K/(K+K')$ multipliziert werden.

In Kontrollsimulationen verschiedener Spinsysteme wurde festgestellt, dass die theoretischen und gefundenen Gesamtintensitäten im Regelfall auf $\pm 10^{-6}$ % übereinstimmen, was den quantenchemischen Teil des Programms verifiziert.

Für eine erfolgreiche Simulation sollten auch die Spektrparameter $n_{\max}-n_{\min}$ und SI so eingestellt werden, dass selbst schmale Peaks durch genügend viele spektrale Punkte repräsentiert werden. Empfohlen sind mindestens 20 Datenpunkte pro Halbwertsbreite.

4.1.2 Spinsysteme aus mehreren Fragmenten

Mit der Anzahl der spinaktiven Kerne steigt die Größe der zu diagonalisierenden Hamilton-Matrizen und dadurch die Simulationszeit exponentiell an. Es ist deshalb von Bedeutung, isolierte „Spininseln“, sog. Fragmente, getrennt simulieren und die entsprechenden Teilspektren zum Gesamtspektrum addieren zu können.

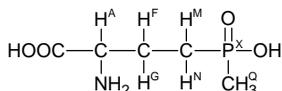
Im Programm LAOTIT können für jede Komplexspezies mehrere Fragmente f definiert werden, um die Simulation zu beschleunigen. Zudem kann jedes Fragment mit einem „statistischen Gewicht“ w_f multipliziert werden. So können beispielsweise die Resonanzlinien zweier äquivalenter Ethoxygruppen nur einmal mit $w_f = 2$ simuliert, aber mit doppelter Intensität dargestellt werden, im Vergleich zu Fragmenten mit $w_g = 1$.

Der Ausdruck für das Lorentzspektrum von mehreren Fragmenten f mit jeweils L_f Linien lautet:

$$S(\mathbf{n}) = \sum_{f=1}^F \sum_{l=1}^{L_f} \frac{w_f I_{f,l}}{\mathbf{p} \cdot \Delta \mathbf{n}_{1/2,f,l} \left[1 + 4 \left(\frac{\mathbf{n} - \mathbf{n}_{f,l}}{\Delta \mathbf{n}_{1/2,f,l}} \right)^2 \right]} \quad (4.33)$$

4.1.3 Anwendungsbeispiel: Spektrumsimulation von Phosphinothricin 6

In Phosphinothricin **6** liegt ein heteronukleares AFGMNQ₃X-Spinsystem vor:



Die 200,13 MHz ¹H-NMR-Titration von Phosphinothricin und deren Auswertung wird ausführlich in Kapitel 8.3.4.3 beschrieben. Hier sollen nur die Aspekte der Simulation der Spektrreihe diskutiert werden.

Die Direktsimulation des neun-Spin-Falles mit 512 Energieniveaus und 43758 Übergängen ist zwar mit LAOTIT möglich, aber nicht praktikabel. Die Berechnung pro Spektrum nahm ca. 6 Minuten in Anspruch auf einem 330-MHz-Pentium II-Rechner.

Die Option *Fragmentierung* ermöglicht aber die Zerlegung des Spinsystems in zwei „Spininseln“, AFGMNX und Q₃X. Dabei wird ausgenutzt, dass die Methylprotonen H^Q keine Kopplungen mit den Methylenprotonen H^M und H^N aufweisen. Da das Fragment Q₃X ein Dublett mit dreifacher Intensität aufweist, können zur weiteren Beschleunigung die Fragmente AFGMNX und QX mit den statistischen Gewichten $w_1 = 1$ und $w_2 = 3$ simuliert werden. In dieser Weise konnte die Simulationszeit pro Spektrum auf dem gleichen Rechner auf 12 Sekunden pro Spektrum reduziert werden.

Abbildung 4.7 zeigt die gemessene und simulierte Spektrenreihe in Form von Stackplots, abgebildet mit MULTIPLE NMR GRAPHICS [173].

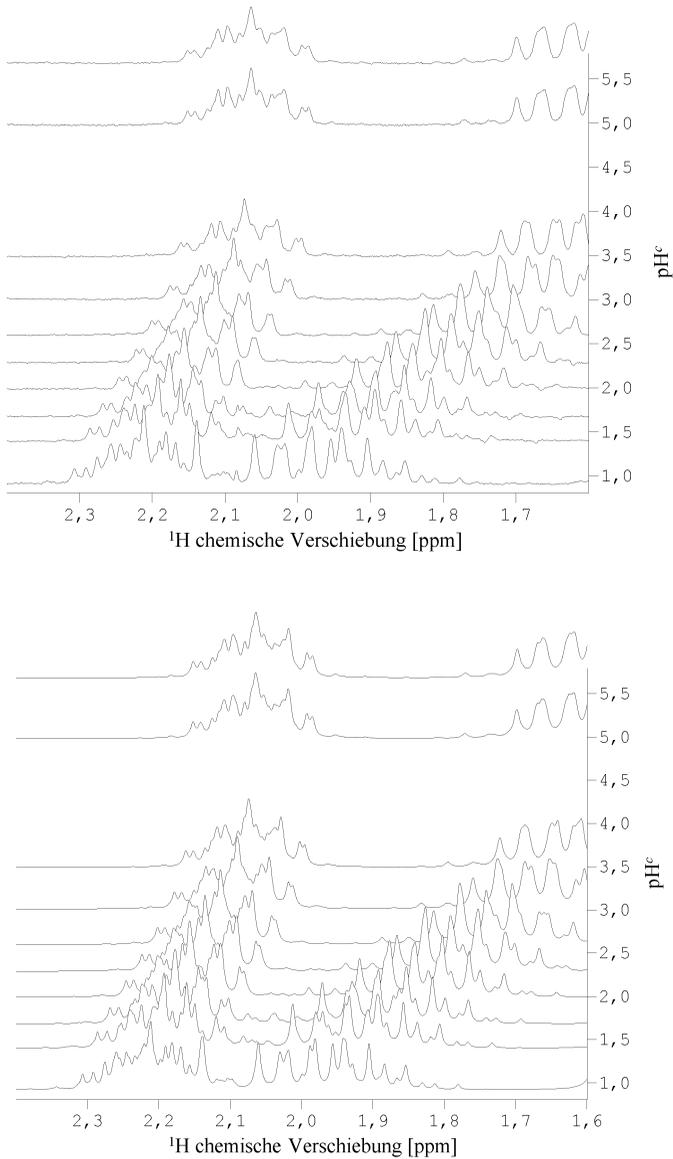


Abbildung 4.7: Oben: Ausschnitt der gemessenen, pH⁻abhängigen 200.13 MHz ^1H -Spektrereihe von Phosphinothricin 6 (FGMN-Teil des AFGMNQ₃X-Spinsystems, 0,020 M in H₂O, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C) Unten: der gleiche Ausschnitt der Spektrereihe, simuliert mit LAOTIT

5 NMR-UNTERSUCHUNG MIKROSKOPISCHER PROTOLYSEGLEICHGEWICHTE

5.1 Einleitung

Die meistbewährten Experimentalmethoden zur Untersuchung mikroskopischer Protolysegleichgewichte stellen UV- und NMR-Titrations dar. Erstere kann nur in Gegenwart von geeigneten Chromophorgruppen, aber auch bei niedrigerer Konzentration der Testsubstanz angewandt werden. Die Kernresonanzspektroskopie hingegen ist universeller einsetzbar, da nahezu alle organischen Liganden spinaktive Kerne wie ^1H oder ^{13}C enthalten.

Der Informationsgehalt der gemessenen $\langle d \rangle$ vs. pH Titrationskurven reicht immer aus, die Dissoziationsgleichgewichte auf der makroskopischen Ebene aufzuklären*. Viel schwieriger ist aber die Entscheidung, ob ein Spin selektiv auf die Dissoziation einer einzigen Gruppe reagiert und somit als *selektives Sensoratom* die Möglichkeit einer mikroskopischen Beschreibung eröffnet. Ein Hauptziel der vorgelegten Arbeit ist es, objektivere Kriterien zur Auswahl der Indikatorkerne zu entwickeln (siehe die normierten Titrationskurven in Kapitel 5.5).

In Kapitel 2.4 wurde das mikroskopische Dissoziationskonzept für zweibasige Liganden bereits dargestellt. Da in dieser Arbeit experimentell nur zweibasige Systeme untersucht wurden, wird die Diskussion im Folgenden auf diese Systeme beschränkt. Das dreibasige Mikrodissoziationssystem kann nach ähnlichen Prinzipien behandelt werden [209]. In Gegenwart von vier oder mehr Gruppen sind aber spezielle Auswertungsverfahren erforderlich. Die eingehende Darstellung dieser Methoden würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen, so sei auf einschlägige Referenzen nur hingewiesen [46][116][199].

* Es kann aber vorkommen, dass die NMR-Kerne auf die Dissoziationsvorgänge unempfindlich reagieren, d.h. Δd zu klein ist. In diesem Fall können naturgemäß keine verlässlichen pK -Werte berechnet werden.

5.2 Selektive Verfolgung der gruppenspezifischen Dissoziation

Es gilt die folgende Beziehung zwischen der dynamisch gemittelten chemischen Verschiebung des k -ten Spins am m -ten Messpunkt und den Molenbrüchen der Makro- bzw. Mikrospesies:

$$\langle d_{m,k} \rangle = d_{H_2L,k} x_{H_2L,m} + d_{AB,k} x_{AB,m} + d_{BA,k} x_{BA,m} + d_{L,k} x_{L,m} \quad (5.1)$$

Die Ladungen aller Spezies werden der Einfachheit halber weggelassen.

Es wird nun angenommen, dass der k -te Kern ein selektives Sensoratom zur Verfolgung der Dissoziation von Gruppe 1 darstellt, d.h. deren chemische Verschiebung sei vom Protonierungszustand der Gruppe 2 unabhängig. Dann gelten folgende Ausdrücke [40][15]:

$$d_{AB,k} = d_{H_2L,k} \quad \text{und} \quad d_{BA,k} = d_{L,k} \quad (5.2)$$

Einsetzen der Gleichung 5.2 in Gleichung 5.1, Berücksichtigung der Normierung der Molenbrüche und Umstellen auf den Dissoziationsgrad a_1 von Gruppe 1 führt zu:

$$a_1 = x_{BA} + x_L = \frac{d_{H_2L,k} - \langle d_{m,k} \rangle}{d_{H_2L,k} - d_{L,k}} \quad (5.3)$$

Der Dissoziationsgrad von Gruppe 2 wird durch den l -ten Spin angezeigt:

$$a_2 = x_{AB} + x_L = \frac{d_{H_2L,l} - \langle d_{m,l} \rangle}{d_{H_2L,l} - d_{L,l}} \quad (5.4)$$

Die Voraussetzung nach Gleichung 5.2 ist in der Praxis gelegentlich nicht (streng) zu erfüllen. Im Folgenden wird untersucht, welche Kernsorten am besten zur selektiven Verfolgung der Dissoziation geeignet sind.

Wie bereits in Kapitel 3.2 angedeutet, dominiert in der ^1H chemischen Verschiebung der diamagnetische Beitrag. Wenn sich ein Proton in vicinaler Stellung zu einem Protolysezentrum befindet und von anderen Gruppen durch mehr als drei σ -Bindungen „isoliert“ ist, belegen etliche experimentelle Befunde dessen Gruppenselektivität [210]. Nach diesem Prinzip wurden Mikrokonstanten in erster Reihe für solche Peptide und Aminosäuren

bestimmt [40][211][5], bei denen die funktionellen Gruppen durch mehr als drei Einfachbindungen isoliert vorliegen.

Im ^{13}C -NMR überwiegt hingegen der paramagnetische Term in der Abschirmung, so kommen Protolyseeinflüsse von weitliegenden Gruppen auch zum Ausdruck. Aus diesem Grund müssen ^{13}C -Kerne zur selektiven Verfolgung der gruppenspezifischen Deprotonierung sorgfältig ausgewählt werden [40][15].

Die mikroskopische Protolyse von biorelevanten Inositolphosphaten wurde in der Arbeitsgruppe von B. Spiess durch ^{31}P -NMR-Titration charakterisiert. Für diese *Phosphatester* C-O-PO₃H₂ belegen zahlreiche experimentelle Befunde, dass die d_p vs. pH Titrationkurve hauptsächlich die eigene Dissoziation der Phosphatgruppe widerspiegelt [209][213], obwohl dies kürzlich in Frage gestellt wurde [199].

Wie bereits in Kapitel 3.2.3 angedeutet, reagiert d_p in *Phosphonaten* und *Phosphinaten* im Generalfall nicht auf die eigene Dissoziation, deshalb sollte der Phosphorkern als selektive Dissoziationssonde nicht angesetzt werden. Die Ergebnisse in den Kapiteln 8.1 und 8.2 belegen diese Sicht.

5.3 Der nichtselektive Fall: die Sudmeier-Reilly-Gleichung

Im Generalfall erfahren die spinaktiven Kerne die Protolyseeinflüsse beider Gruppen. Zu einer quantitativen Beschreibung wurde 1964 von Sudmeier und Reilly ein Modell veröffentlicht [24][25]. Die erste Modellvorstellung liegt darin, dass zu $\langle d_k \rangle$ beide Gruppen proportional zu deren Protonierungsgrad f beitragen [128]. Die zweite Annahme besagt, diese pH-abhängigen Beiträge der Protolysezentren seien linear additiv:

$$\langle d_k \rangle - d_{L,k} = C_{k,1} \cdot f_1 + C_{k,2} \cdot f_2 \quad (5.5)$$

Die Sudmeier-Reilly-Gleichung (SR-Gleichung) wurde ursprünglich mit Protonierungs-shift-Koeffizienten $C_{k,i}$ formuliert. Da in der vorliegenden Arbeit alle Gleichgewichte in Richtung Dissoziation behandelt werden, wird Gleichung 5.5 mit der folgenden Notation umgesetzt:

$$\Delta d_k = d_{H_2L,k} - \langle d_k \rangle = s_{k,1} \cdot a_1 + s_{k,2} \cdot a_2 \quad (5.6)$$

$\Delta \mathbf{d}_k$ bedeutet hierin die aktuelle, pH-abhängige Dissoziationsverschiebung des k -ten Kernes. $s_{k,i}$ sind die Sudmeier-Reilly-Koeffizienten in der Einheit ppm. \mathbf{a}_i bezeichnet schließlich den pH-abhängigen Dissoziationsgrad der Gruppen. Die maximale Änderung der chemischen Verschiebung ist gleich dem in Kapitel 3.1 eingeführten Dissoziationsgradienten:

$$\Delta \mathbf{d}_{k,\max} = \Delta_{\text{H}_2\text{L}}^{\text{L}} \mathbf{d}_k = \mathbf{d}_{\text{H}_2\text{L},k} - \mathbf{d}_{\text{L},k} = s_{k,1} + s_{k,2} \quad (5.7)$$

Es wird vorausgesetzt, dass die SR-Gleichung 5.6 für jeden Kern k und jede Messung m gilt und auch in Matrixschreibweise formuliert werden kann als:

$$\mathbf{D} = \mathbf{S} \mathbf{A} \quad (5.8)$$

Die Datenmatrix \mathbf{D} enthält die experimentellen Werte $\Delta \mathbf{d}_{m,k}$, die zwei Spalten der Matrix \mathbf{S} bestehen aus den SR-Koeffizienten $s_{k,i}$ und in den zwei Zeilen von Matrix \mathbf{A} befinden sich die Dissoziationsgrade $\mathbf{a}_{1,m}$ und $\mathbf{a}_{2,m}$.

Sudmeier und Reilly haben die s -Koeffizienten aus Dissoziationsgradienten von aliphatischen (Poly)aminen und (Poly)carbonsäuren berechnet, um sie anschließend zur Aufklärung der Dissoziationsabfolgen linearer Polyaminocarbonsäuren einzusetzen [24]. Seitdem wurde die Methode auch an anderen Verbindungsklassen angewandt. Die SR-Koeffizienten geben hauptsächlich induktive oder elektrostatische Einflüsse der Protolysezentren wieder. Es stellte sich heraus, dass die Additivität der Gruppenbeiträge nur dann gewährleistet ist, wenn die räumliche Orientierung der Gruppen über den ganzen pH-Bereich unverändert bleibt. Dies ist nicht der Fall bei Polyaza- und Oxaaza-Makrocyclen, wo die SR-Koeffizienten keine „Konstanten“ darstellen, sondern selbst pH-abhängig sind [138][139].

Obwohl die SR-Gleichung für viele Systeme nur näherungsweise funktioniert, stellt dieser Ansatz zur Zeit die einzige Möglichkeit dar, $\Delta \mathbf{d}$ als Funktion des Dissoziationszustandes der Gruppen zu behandeln.

Zum Abschluss wird in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Ausdruck abgeleitet, der den Zusammenhang zwischen den ionenspezifischen Parametern der Makrospezies, den SR-Konstanten und den Mikrokonstanten k_1 und k_2 , bzw. dem Tautomerenverhältnis k_T angibt:

$$\mathbf{d}_{\text{HL},k} = \mathbf{d}_{\text{L},k} + \frac{s_{k,1} \cdot k_1 + s_{k,2} \cdot k_2}{k_1 + k_2} = \mathbf{d}_{\text{L},k} + \frac{s_{k,1} + k_{\text{T}} \cdot s_{k,2}}{1 + k_{\text{T}}} \quad (5.9)$$

5.3.1 Einsatzmöglichkeiten der Sudmeier-Reilly-Gleichung

Das SR-Verfahren kann in Abwesenheit selektiver Sondenatomen zur Aufklärung der Dissoziationsabfolgen auf zweierlei Weise beitragen.

1. Die SR-Koeffizienten werden aus $\Delta\mathbf{d}$ -Werten vereinfachter Modellverbindungen mit weniger basischen Stellen abgeschätzt [115][24][13]. In Kenntnis der Matrizen \mathbf{D} und \mathbf{S} in Gleichung 5.8 können die \mathbf{a} -Dissoziationsgrade (Elemente der Matrix \mathbf{A}) durch lineare Regression berechnet werden [24]. In einer eingehenden Auswertung werden aus den \mathbf{a} -Funktionen die Mikrokonstanten durch multiple nichtlineare Regression ermittelt (siehe Kapitel 2.4.4) [140][141].
2. Wenn die Mikrokonstanten einer Verbindung aus unabhängigen Messungen bekannt sind, lassen sich die SR-Koeffizienten auf Grund der Gleichung 5.8 durch lineare Regression berechnen. Letztere können wiederum dazu dienen, für strukturverwandte, kompliziertere Verbindungen nach Punkt 1. Mikrokonstanten abzuleiten.

Im Jahre 2000 wurde eine Studie über die gleichzeitige Iteration von NMR-Parametern und mikroskopischen Gleichgewichtsparametern aus NMR-Titrationskurven veröffentlicht [199]. Dieser Ansatz widerlegt die zur Zeit allgemein anerkannte These, dass die Mikrokonstanten aus experimentellen Messdaten ohne Zusatzinformation nicht zugänglich sind (siehe Kapitel 2.4.5). Es sollte überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen NMR- und Gleichgewichtsparametern eventuell zu Mehrdeutigkeiten führen kann oder nicht. Diesbezüglich wurde in [199] keine statistische Information angegeben.

5.4 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Programm entwickelt werden, womit die simultane sowie auch getrennte Iteration von NMR- und mikroskopischen Parametern möglich ist. Besondere Beachtung soll den Standardabweichungen und Korrelationskoeffizienten geschenkt werden.

Die Eindeutigkeit der Lösung wurde bei der makroskopischen Auswertung durch simultane Betrachtung aller NMR-Titrationskurven gewährleistet. Es soll untersucht

werden, ob eine ähnliche gemeinsame Behandlung hier auch zu einer objektiveren Identifizierung der Sensoratome beitragen kann.

5.5 Ein neues Verfahren zur Auswahl selektiver Sensorkerne auf Grund normierter NMR-Titrationskurven

Dieses Verfahren stützt sich auf die Sudmeier-Reilly-Gleichung, d.h. die pH-bedingte Änderung von \mathbf{d}_k wird durch lineare Beiträge der dissoziierenden Gruppen beschrieben. Anhaltspunkte der Methode sind die aus der makroskopischen Auswertung (Kapitel 3.5) resultierenden ionenspezifischen Parameter $\mathbf{d}_{H_2L,k}$ und $\mathbf{d}_{L,k}$, mit Hilfe derer alle NMR-Titrationskurven nach der folgenden Gleichung normiert,

$$\mathbf{y}_{m,k} = 2 \cdot \frac{\mathbf{d}_{H_2L,k} - \langle \mathbf{d}_{m,k} \rangle}{\mathbf{d}_{H_2L,k} - \mathbf{d}_{L,k}} = 2 \cdot \frac{\Delta \mathbf{d}_k}{\Delta \mathbf{d}_{k,\max}} \quad (5.10)$$

und dadurch mit der Bjerrum-Funktion \bar{h} auf eine gemeinsame Skala gebracht werden:

$$0 \leq \mathbf{y}_k, \bar{h} \leq 2 \quad (5.11)$$

Ähnlich der ursprünglichen SR-Gleichung 5.6 werden auch die normierten Titrationskurven als lineare Kombination der Dissoziationsgrade \mathbf{a} aufgefasst,

$$\mathbf{y}_{m,k} = \tilde{s}_{k,1} \mathbf{a}_{1,m} + \tilde{s}_{k,2} \mathbf{a}_{2,m} \quad (5.12)$$

Hierin sind $\tilde{s}_{k,i}$ die normierten „SR-Koeffizienten“ enthalten:

$$\tilde{s}_{k,1} = 2 \cdot \frac{s_{k,1}}{s_{k,1} + s_{k,2}} \quad \text{und} \quad \tilde{s}_{k,2} = 2 \cdot \frac{s_{k,2}}{s_{k,1} + s_{k,2}} \quad (5.13)$$

Damit ergibt sich folgende Normierungsbedingung:

$$\tilde{s}_{k,1} + \tilde{s}_{k,2} = 2 \quad (5.14)$$

Sollte der k -te Spin ein Sondenatom für Gruppe 1 darstellen, gelten $\tilde{s}_{k,1} = 2$ und $\tilde{s}_{k,2} = 0$. Andernfalls lässt Gleichung 5.13 den Quotienten der ursprünglichen Gruppenbeiträge $s_{k,1}$ und $s_{k,2}$ unverändert:

$$\frac{\tilde{s}_{k,1}}{\tilde{s}_{k,2}} = \frac{s_{k,1}}{s_{k,2}} \quad (5.15)$$

Ähnlich der Bjerrum-Funktion \bar{h} zeigen die \mathbf{y}_k vs. pH Kurven einen sigmoiden Verlauf, falls $\tilde{s}_{k,1}$ und $\tilde{s}_{k,2}$ gleichen Vorzeichens sind. Die Lage der normierten Titrationskurven bezüglich der Bjerrum-Funktion \bar{h} vermittelt wichtige Informationen über die Gruppenbeiträge \tilde{s} zu $\Delta \mathbf{d}_k$. Noch anschaulicher zeigt diese Information die am gleichen Messpunkt (pH-Wert) gebildete Differenz von \mathbf{y}_k und \bar{h} :

$$\Delta \mathbf{y}_{m,k} = \mathbf{y}_{m,k} - \bar{h}_m = \tilde{s}_{k,1} \mathbf{a}_{1,m} + \tilde{s}_{k,2} \mathbf{a}_{2,m} - (\mathbf{a}_{1,m} + \mathbf{a}_{2,m}) \quad (5.16)$$

Drückt man die Dissoziationsgrade in Gleichung 5.16 mit Hilfe von Mikro-Stabilitätskonstanten \mathbf{k} aus, ergeben sich die folgenden Zusammenhänge:

$$\Delta \mathbf{y}_{m,k} = \frac{(\tilde{s}_{k,1} - 1) \cdot (\mathbf{k}_{BA} - \mathbf{k}_{AB}) \cdot [\mathbf{H}^+]_m}{1 + (\mathbf{k}_{BA} + \mathbf{k}_{AB}) \cdot [\mathbf{H}^+]_m + \mathbf{k}_{AA} \cdot [\mathbf{H}^+]_m^2} \quad (5.17)$$

$$\Delta \mathbf{y}_{m,k} = \frac{(\tilde{s}_{k,2} - 1) \cdot (\mathbf{k}_{AB} - \mathbf{k}_{BA}) \cdot [\mathbf{H}^+]_m}{1 + (\mathbf{k}_{BA} + \mathbf{k}_{AB}) \cdot [\mathbf{H}^+]_m + \mathbf{k}_{AA} \cdot [\mathbf{H}^+]_m^2} \quad (5.18)$$

Der pH-abhängige Ablauf der \mathbf{y}_k und $\Delta \mathbf{y}_k$ Funktionen wird an einem simulierten Beispiel illustriert. Hierzu wurde ein hypothetisches, zweibasiges Mikrodissoziationssystem mit $\log \mathbf{k}_{AB} = 8$, $\log \mathbf{k}_{BA} = 10$ und $\log \mathbf{k}_{AA} = 17$ aufgestellt. Sieben NMR-Kerne wurden mit den folgenden \tilde{s} Gruppenbeiträgen simuliert:

$$\mathbf{y}_1 = 2 \cdot \mathbf{a}_1 \quad (5.19)$$

$$\mathbf{y}_2 = 1,5 \cdot \mathbf{a}_1 + 0,5 \cdot \mathbf{a}_2 \quad (5.20)$$

$$\mathbf{y}_3 = \mathbf{a}_1 + \mathbf{a}_2 = \bar{h} \quad (5.21)$$

$$\mathbf{y}_4 = 0,7 \cdot \mathbf{a}_1 + 1,3 \cdot \mathbf{a}_2 \quad (5.22)$$

$$\mathbf{y}_5 = 0,5 \cdot \mathbf{a}_1 + 1,5 \cdot \mathbf{a}_2 \quad (5.23)$$

$$y_6 = 2 \cdot a_2 \quad (5.24)$$

$$y_7 = -0,25 \cdot a_1 + 2,25 \cdot a_2 \quad (5.25)$$

Die somit erhaltenen normierten NMR-Titrationskurven und die nach Gleichung 5.16 berechneten Δy -Funktionen werden in Abbildung 5.8. in Abhängigkeit vom pH aufgetragen.

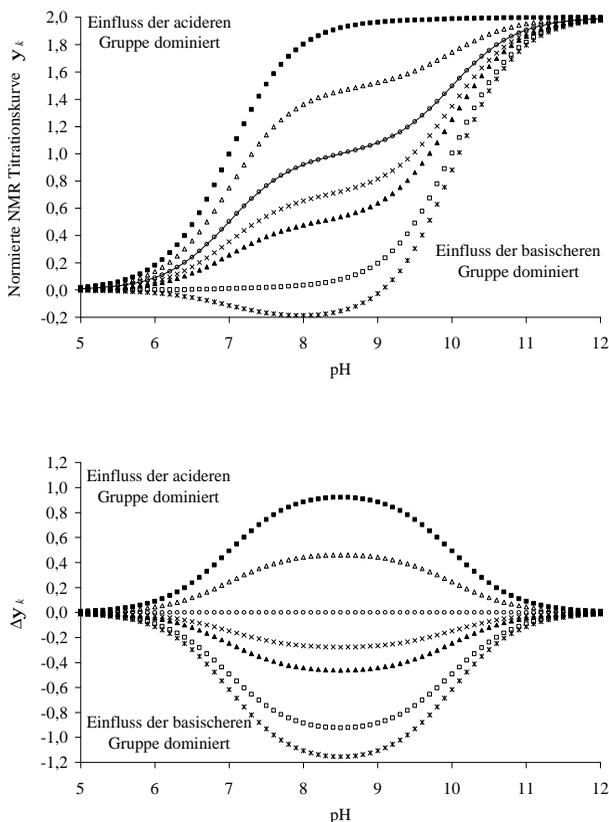


Abbildung 5.8: Auswahl selektiver Sensorkerne eines hypothetischen zweibasigen Moleküls auf Grund normierter Titrationskurven y . Bezeichnungen: Kern 1 (i), Kern 2 (?), Kern 3 (o), Kern 4 (x), Kern 5 (?), Kern 6 (?), Kern 7 (*) und die Bjerrum-Funktion (-). Die Kernpaare 1/6 und 2/5 können gruppenselektive Sensoratome darstellen

Als Erstes betrachten wir den Fall, wenn beide \tilde{s} Koeffizienten positiv sind. Für Kerne 1 und 2 überwiegt der Beitrag der acideren (in diesem Beispiel ersten) Gruppe zur Δd_k . Die zugehörigen y_k -Funktionen liegen deshalb über der Bjerrum-Funktion und die Δy_k -Kurven weisen positive Werte mit einem Maximum auf. Es kann gezeigt werden, dass dieses Maximum bei $\text{pH} = (\text{p}K_1 + \text{p}K_2) / 2$ auftritt:

$$\frac{\partial \Delta y_k}{\partial [\text{H}^+]} = (\tilde{s}_{k,1} - 1)(\mathbf{k}_{\text{BA}} - \mathbf{k}_{\text{AB}})(1 - \mathbf{k}_{\text{AA}}[\text{H}^+]^2) = 0 \quad (26)$$

$$1 - \mathbf{k}_{\text{AA}}[\text{H}^+]^2 = 1 - \frac{[\text{H}^+]^2}{K_1 K_2} = 0 \quad (27)$$

$$[\text{H}^+] = (K_1 K_2)^{1/2} \quad (28)$$

Auf die Kerne 4, 5 und 6 übt dagegen die basischere (zweite) Gruppe einen größeren Einfluss aus, die y -Funktionen liegen dementsprechend unter der Bjerrum-Funktion. Die Δy -Kurven weisen negative Werte mit einem Minimum auf. Wären beide \tilde{s} Koeffizienten negativ, wären diese Verhältnisse gerade vertauscht.

Wie die normierte Titrationskurve y_7 in Abbildung 5.8 verdeutlicht, weist ein Minimum (oder Maximum) der y vs. pH Kurven darauf hin, dass die Gruppenbeiträge \tilde{s} entgegengesetzte Vorzeichen haben.

Würden zwei Kurven y_k und y_l deckungsgleich aufeinander liegen, wären die *relativen* Gruppenbeiträge zur Δy_k und Δy_l identisch:

$$\frac{\tilde{s}_{k,1}}{\tilde{s}_{k,2}} = \frac{\tilde{s}_{l,1}}{\tilde{s}_{l,2}} \Rightarrow \frac{s_{k,1}}{s_{k,2}} = \frac{s_{l,1}}{s_{l,2}} \quad (5.29)$$

Der Zusammenfall zweier y -Kurven kann nicht nur visuell ermittelt werden. Die Distanz der Kurven lässt sich numerisch über die Euklidische Distanzformel charakterisieren:

$$d(\mathbf{y}_k, \mathbf{y}_l) = \sqrt{\sum_{m=1}^M (\mathbf{y}_{m,k} - \mathbf{y}_{m,l})^2} \quad (5.30)$$

Auf Grund der Gleichungen 5.17 und 5.18 kann der Zusammenfall zweier normierter Titrationskurven zwei Gründe haben.

1. Die Basizität beider Gruppen stimmt aus Symmetriegründen oder per Zufall überein, $k_{AB} = k_{BA}$. In diesem Fall müssen jedoch *alle* y_k -Kurven auf der Bjerrum-Funktion liegen und folglich *alle* Δy_k -Funktionen Null sein. Daran wird das A_2 -Aciditätssystem erkannt, für das die Mikrokonstanten besonders einfach zu berechnen sind (siehe Kapitel 2.4.5.1).

Als experimentelles Beispiel hierfür dient die symmetrische Ethan-bis(*P*-methylphosphinsäure) **4** in Abbildung 5.9.

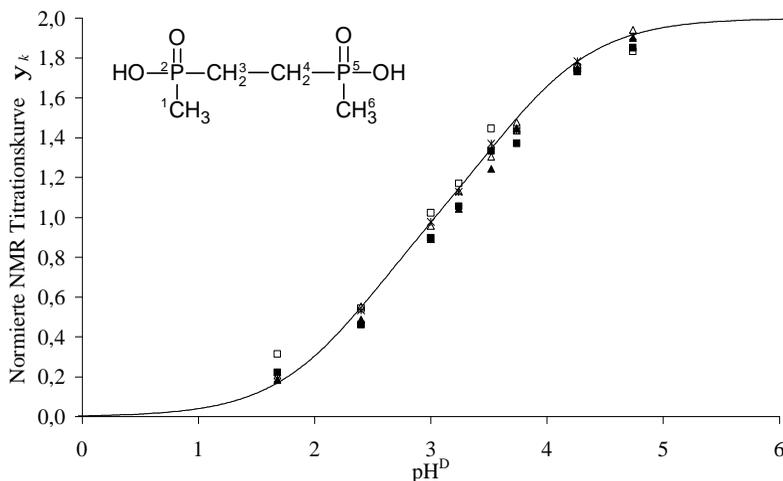


Abbildung 5.9: Normierte NMR-Titrationskurven von Ethan-bis(*P*-methylphosphinsäure) **4**.
Bezeichnungen: $H^{1,6}$ (?), $C^{1,6}$ (?), $H^{3,4}$ (?), $C^{3,4}$ (!), $P^{2,5}$ (*) und die Bjerrum-Funktion (–).
Messung: A. Gaedcke [267], Auswertung: diese Arbeit

2. Liegen hingegen nur einige y_k -Profile auf der Bjerrum-Funktion, folgt daraus, dass die Einflüsse der Protolysezentren auf den betreffenden Kern gleich sind:

$$\tilde{s}_{k,2} = \tilde{s}_{k,2} = 1 \quad \text{und deshalb} \quad s_{k,2} = s_{k,2} \quad (5.31)$$

Von besonderer Bedeutung ist der Fall, wenn ein „Bild-Spiegelbild“ Verhältnis zwischen den „Glockenkurven“ Δy_k und Δy_l vorliegt:

$$\Delta y_{m,k} = -\Delta y_{m,l} \quad \text{für jeden Messpunkt } m \quad (5.32)$$

Durch Kombinieren der Gleichungen 5.17 und 5.18 mit der Normierungsbedingung (Gleichung 5.14) ergibt sich folgende Beziehung zwischen den relativen Gruppenbeiträgen:

$$\tilde{s}_{k,1} = \tilde{s}_{l,2} \quad \text{und} \quad \tilde{s}_{l,1} = \tilde{s}_{k,2} \quad (5.33)$$

Diese spiegelsymmetrische Beziehung bietet im Prinzip die Möglichkeit, die selektiven Sondenatome zu identifizieren, für die gilt:

$$\tilde{s}_{k,1} = \tilde{s}_{l,2} = 2 \quad \text{und} \quad \tilde{s}_{k,2} = \tilde{s}_{l,1} = 0 \quad (5.34)$$

Es ist aber einzusehen, dass Gleichung 5.34 aus Gleichung 5.33 nicht unmittelbar folgt. Auch die nach den Gleichungen 5.19 bis 5.25 simulierten Kurven in Abbildung 5.8 verdeutlichen, dass sich die Kernpaare H^1/H^6 und H^2/H^5 in dieser Hinsicht identisch verhalten, obwohl nur H^1 und H^6 gruppenspezifische Sensoratome sind. Als Nebenbedingung muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass die Distanz der y -Kurven von der Bjerrum-Funktion für ein selektives Kernpaar wie H^1/H^6 maximal ist. Obwohl die Distanz zwischen \bar{h} und y_7 noch größer ist, weist letztere ein Minimum auf. Wie bereits erläutert, weist dieses Extremum auf Gruppenbeiträge entgegengesetzten Vorzeichens hin, somit kann Kern 7 kein selektives Sondenatom im Sinne der Gleichung 5.34 darstellen.

Damit sind wir schon in der Lage, die Bedingung der Gruppenselektivität im Rahmen der SR-Näherung zu formulieren.

Satz über Identifizierung selektiver Sondenatome

Gegeben seien mehrere normierte NMR-Titrationskurven y und die Bjerrum-Funktion \bar{h} . Es wird vorausgesetzt, dass die normierte Sudmeier-Reilly-Gleichung 5.12 für jede y gültig ist. Die Kerne k und l stellen dann und nur dann gruppenspezifische Dissoziations-sonden dar, wenn

- a) y_k und y_l keine Extrema aufweisen und
- b) bei jedem Messpunkt m die spiegelsymmetrische Beziehung $Dy_{m,k} = -Dy_{m,l}$ gilt.

Dieses Ergebnis widerspricht scheinbar der zur Zeit herrschenden These, dass gruppenselektive Indikatoratome ohne chemische Zusatzinformation erkannt und zur Bestimmung von Mikrokonstanten herangezogen werden können. Der obigen Herleitung liegen in der Tat einschränkende Annahmen zugrunde. Einerseits müssen alle Kerne der SR-Gleichung

gehören. Andererseits lassen sich in dieser Weise nur diejenigen Sensoratome erkennen, deren Dissoziationsgradienten gleichen Vorzeichens sind. Schließlich setzt die Anwendbarkeit des Verfahrens die Beobachtung möglichst vieler Spins voraus. Es kann nur ein *Paar* selektiver Spins identifiziert werden.

5.6 Mikroskopische Auswertung mit den Programmen MULTINMRPK und NMRMICROPK

Im Programm MULTINMRPK wurde erstmals die Überführung der Messdaten und Parameter in die mikroskopische Auswertung mit minimaler Benutzereingabe verwirklicht (siehe Abbildung 5.10). Nach dem Abschluss der makroskopischen Auswertung wird die oben diskutierte Berechnung normierter Titrationskurven durchgeführt, die y -Kurven werden in einer Datei *.nor abgespeichert. Darauf folgt die Auswahl, welche Makrospezies H₂L der vollprotonierten und volldissoziierten Mikrospezies entsprechen. Auf Grund dieser Informationen werden Startwerte für die Mikro-Stabilitätskonstanten und SR-Koeffizienten automatisch generiert. Diese werden in einer Parameterdatei unter dem Namen *_micro.par abgespeichert. In diese Parameterdatei kann die „chemische Zusatzinformation“ zur Aufklärung der Mikrodissoziation auf dreierlei Weise eingeführt werden. Zum Ersten können selektive Sensoratome ausgewählt werden, indem man die betreffenden SR-Koeffizienten nulliert. Zum Zweiten können SR-Koeffizienten aus Modellverbindungen festgelegt und während der anschließenden Berechnung konstant gehalten werden. Schließlich, wenn die Mikrokonstanten aus unabhängigen Messungen genau bekannt sind, werden sie konstant gehalten bei der Optimierung der SR-Koeffizienten. Die Entscheidung, welche Art Zusatzinformation für die zu charakterisierende Verbindung angesetzt werden soll, erfordert gründliche chemische Kenntnisse und Erfahrung, so darf sie vom Chemiker nicht übernommen werden.

Das neu entwickelte C++-Programm NMRMICROPK liest die obige Parameterdatei und die Messdaten ein. Anschließend wird gewählt, nach welcher Symbolik die mikroskopischen Gleichgewichte beschrieben werden sollen (siehe Kapitel 2.4.1). Das Programm ist in der Lage, die Mikrogleichgewichte sowohl in Richtung Dissoziation wie auch in Richtung Protonierung zu behandeln.

Darauf folgt die Auswahl der zu iterierenden Parameter und der in die Kurvenanpassung einzubeziehenden Kerne. Die gemittelten chemischen Verschiebungen werden nach der SR-Gleichung berechnet:

$$\langle \mathbf{d}_{m,k} \rangle = \mathbf{d}_{\text{H}_2\text{L},k} + s_{k,1} \cdot \mathbf{a}_{1,m} + s_{k,2} \cdot \mathbf{a}_{2,m} \quad (5.35)$$

Nach dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate ergibt sich die folgende zu minimierende Zielfunktion

$$U = \sum_{m=1}^M \sum_{k=1}^{K'} (\langle \mathbf{d}_{m,k}^{\text{exp}} \rangle - \langle \mathbf{d}_{m,k}^{\text{calc}} \rangle)^2 + w \cdot \sum_{i=1}^n (\log \mathbf{b}_i^{\text{const}} - \log \mathbf{b}_i^{\text{calc}})^2 \quad (5.36)$$

Der letzte Term in U ermöglicht, die makroskopischen Stabilitätskonstanten als Nebenbedingung konstant zu halten. Die Parameterschätzung erfolgt nach dem in Kapitel 3.7.2 dargestellten Levenberg-Marquardt-Algorithmus, mit der anschließenden Fehleranalyse und Ausgabe der Ergebnisse. Als letzter Schritt der Auswertung werden alle Mikrokonstanten $p\mathbf{k}$ aus den optimierten Mikro-Stabilitätskonstanten $\log \mathbf{k}$ berechnet, zusammen mit den gruppenspezifischen Dissoziationsgraden \mathbf{a} und der pH-abhängigen Molenbruchverteilung der Mikrospesies. Alle Ergebnisse werden in separaten Dateien abgespeichert (siehe Flussdiagramm in Abbildung 5.10).

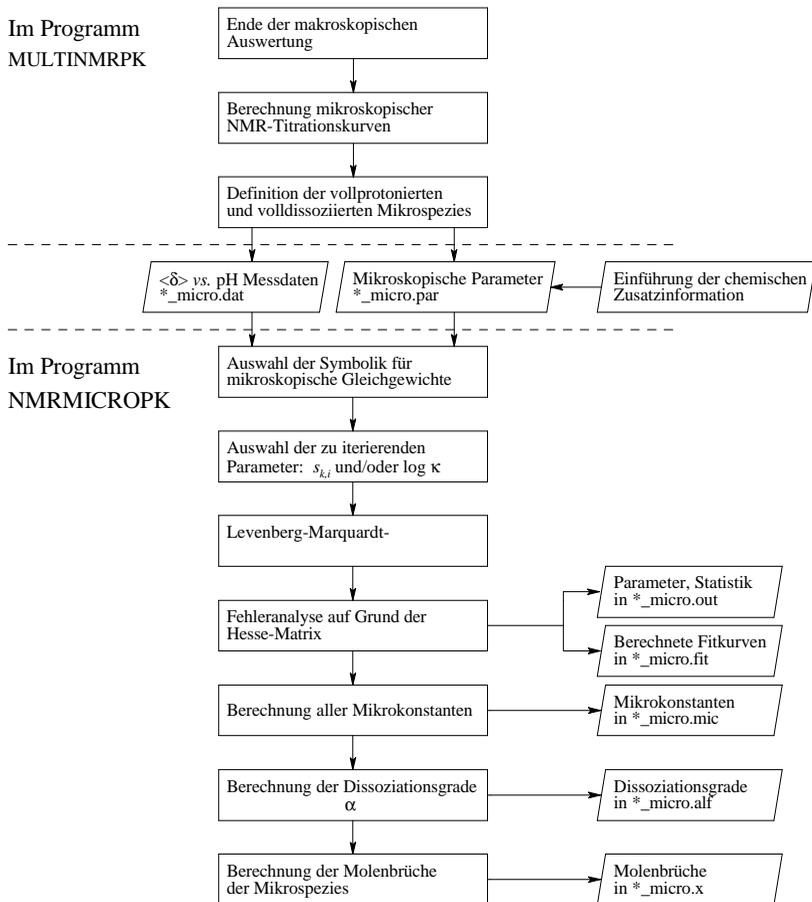
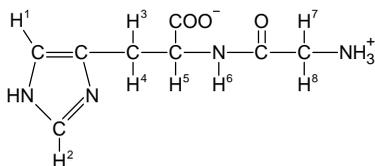


Abbildung 5.10: Schematisierter Ablauf der mikroskopischen Auswertung mit den Programmen MULTINMRPK und NMRMICROPK

5.6.1 Numerische Erfahrungen mit NMRMICROPK

Die simultane und getrennte Optimierung der SR-Koeffizienten und mikro-Stabilitätskonstanten wurde am Beispiel des Glycylhistidins **11** studiert:



Auf Grund normierter Titrationskurven kann man hier die Selektivität des Protons H² für die Imidazolgruppe und die von H⁷ für die Ammoniumgruppe annehmen. In die Iteration wurden nur diese beiden Kerne einbezogen ($K' = 2$). Es wurden nur 17 Datenpunkte mit $\text{pH} > 5,3$ benutzt, um die zusätzliche Protonierungsstufe an der Carboxylatgruppe im aciden Bereich außer Acht zu lassen.

Drei Parameterschätzungen wurden durchgeführt (siehe Tabelle 5.7).

In Optimierung 1 wurden die Stabilitätskonstanten der Mikrospesies AB, BA und AA mit festgehaltenen SR-Koeffizienten iteriert, die die Selektivität der Kerne beschreiben. Die Ergebnisse in Tabelle 5.7 verdeutlichen, dass trotz der Gleichheit der Startwerte für $\log k_{AB}$ und $\log k_{BA}$ chemisch sinnvolle, untereinander mäßig korrelierte Parameterwerte erzielt wurden.

In Optimierung 2 wurden die Mikro-Stabilitätskonstanten und die SR-Koeffizienten gleichzeitig iteriert. Obwohl die Güte der Anpassung hier sogar besser als in Optimierung 1 ist, sind die gefundenen SR-Konstanten chemisch unrealistisch und mit den $\log k$ -Werten stark korreliert.

In Optimierung 3 wurden die Startwerte für $\log k_{AB}$ und $\log k_{BA}$ vertauscht. Das Programm war nicht in der Lage, die korrekten Aciditätsverhältnisse der Imidazolium- und Ammoniumgruppe wieder herzustellen.

Es ist ersichtlich, dass in Optimierungen 2 und 3 reine mathematische, keine physikalisch-chemisch sinnvolle Lösungen gefunden wurden.

Parameter	Optimierung 1		Optimierung 2		Optimierung 3	
	Start	Optimiert	Start	Optimiert	Start	Optimiert
$s_{2,1}$ [ppm]	-0,923	–	-0,4615	-1,03 (1)	-0,4615	0,11 (1)
$s_{2,2}$ [ppm]	0	–	-0,4615	0,11 (1)	-0,4615	-1,03 (1)
$s_{7,1}$ [ppm]	0	–	-0,2728	0,0030 (9)	-0,2728	-0,548 (2)
$s_{7,2}$ [ppm]	-0,5456	–	-0,2728	-0,548 (2)	-0,2728	0,0030 (9)
$\log k_{AB}$	8,1	7,30 (2)	7,0	7,56 (2)	7,6	8,284 (9)
$\log k_{BA}$	8,1	8,239 (8)	7,6	8,284 (9)	7,0	7,56 (2)
$\log k_{AA}$	15,2	15,090 (8)	15,2	15,19 (1)	15,2	15,19 (1)
$r(\log k_{AB}, \log k_{BA})$	0,521		0,765		0,765	
$r(\log k_{AB}, \log k_{AA})$	0,222		0,851		0,886	
$r(\log k_{BA}, \log k_{AA})$	0,814		0,886		0,851	
$r(s_{2,1}, \log k_{AB})$	–		-0,995		-0,995	
$r(s_{2,1}, \log k_{BA})$	–		-0,558		-0,885	
$r(s_{2,2}, \log k_{BA})$	–		0,546		-0,902	
$r(s_{2,1}, \log k_{BA})$	–		-0,798		-0,790	
$r(s_{2,2}, \log k_{BA})$	–		0,790		-0,798	
U_{\min}	$1,7423 \cdot 10^{-3}$		$9,4758 \cdot 10^{-4}$		$9,4758 \cdot 10^{-4}$	
GOF% für H^2	99,9945		99,9958		99,9958	
GOF% für H^2	99,9851		99,9946		99,9946	

Tabelle 5.7: Drei Ansätze zur mikroskopischen Auswertung der ^1H -NMR-Titration von Glycylhistidin **11** mit NMRMIKROPK. Aufgeführt sind die Startwerte und iterierten Werte der Parameter (Standardabweichungen in Klammern), einige Korrelationskoeffizienten r , das Minimum der Zielfunktion U_{\min} und das GOF% Kriterium zur Güte der Anpassung für Kerne H^2 und H^1

5.7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auf der Sudmeier-Reilly-Gleichung basierende Auswertungsverfahren für das zweibasige Mikrodissoziationssystem bearbeitet. Es wurde ein objektives Kriterium zur Identifizierung der Sensorkerne auf Grund normierter NMR-Titrationskurven entwickelt.

Die Ermittlung der Mikrokonstanten aus mehreren $\langle d \rangle$ vs. pH-Messkurven erfolgt durch multiple nichtlineare Regression. Im Unterschied zu [199] wurde festgestellt, dass eine simultane Optimierung der mikroskopischen Gleichgewichtskonstanten und SR-Koeffizienten zu Mehrdeutigkeiten und zum Teil stark korrelierten, vom chemischen Gesichtspunkt her unrealistischen Ergebnissen führt. Entweder die NMR- oder die Gleichgewichtskonstanten müssen also vorgegeben und während der Berechnung als Konstante festgehalten werden, so dass eindeutige, chemisch sinnvolle Ergebnisse zu erlangen. Nur die in dieser Weise vorgegebene chemische Zusatzinformation kann zu eindeutigen Parameterwerten führen.

6 NMR-UNTERSUCHUNG ROTAMERENSPEZIFISCHER PROTOLYSEGLEICHGEWICHTE

6.1 Einleitung

Kernresonanzspektroskopie stellt die leistungsfähigste Messtechnik zur quantitativen Konformationsanalyse in der Lösungsphase dar. Die aus homo- und heteronuklearen Kopplungskonstanten abgeleiteten Informationen sind unentbehrlich zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur neuer Verbindungen. Obwohl heute solche Aufgaben hauptsächlich durch zweidimensionale NMR-Experimente gelöst werden, bleiben die klassischen „Karplusbeziehungen“ auch weiterhin wichtig für Moleküle mit vielen konformationellen Freiheitsgraden (im einfachsten Falle handelt es sich hier quasi „sektorenweise“ um ethanähnliche Rotatoren).

Für biorelevante Verbindungen, die in der Regel mehrere protolytisch aktive Gruppen enthalten, ist zudem die Untersuchung pH-abhängiger Konformationsänderungen von Interesse [219][13].

Da die Rotation um eine C–C-Einfachbindung in der Regel schnell in der NMR-Zeitskala verläuft, sind aus den Spektren nur rotationsgemittelte NMR-Parameter, also auch die mittleren vicinalen Kopplungskonstanten $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle$ zugänglich. Diese sind in zweierlei Hinsicht gemittelt, denn die dynamische Mittelung findet einerseits über alle Protolyse-spezies, andererseits über alle Rotamere statt.

In den nachfolgenden Kapiteln werden Ansätze dargestellt, mit denen die Rotameren-verteilung von 1,2-disubstituierten und 1,1,2-trisubstituierten Ethanen nur aus $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle$ -Kopplungskonstanten, d.h. ohne anschließende Geometrieoptimierung ermittelt werden kann. In Kapitel 6.5 werden aus den pH-abhängigen Rotamerenanteilen die für jedes Rotamer individuellen Dissoziationskonstanten berechnet.

6.2 Karplusbeziehungen

Nach Valence Bond-Rechnungen hat Karplus 1959 die Abhängigkeit der vicinalen ${}^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten vom Diederwinkel der koppelnden Kerne \mathbf{f} abgeleitet [214]:

$${}^3J_{\text{HH}}(\mathbf{f}) = A \cos^2 \mathbf{f} + B \cos \mathbf{f} + C \quad (6.1)$$

Hierin sind A , B und C empirische Fitparameter. Die Karplusfunktion 6.1 wurde später auch für heteronukleare Kopplungskonstanten parametrisiert (siehe die Kapitel 6.2.2 und 6.2.3).

6.2.1 Karplusgleichungen für ${}^3J_{\text{HH}}$

Spätere, eingehende Untersuchungen führten zum Schluss, dass die vicinale Kopplungskonstante ${}^3J_{\text{HH}}$ außer durch den Diederwinkel auch durch andere Faktoren, wie z. B. von der Bindungslänge oder dem Bindungswinkel [215], am stärksten jedoch von den Elektronegativitäten [216] und der räumlichen Anordnung der Ethansubstituenten [217][224] beeinflusst wird. Zur Berücksichtigung dieser Effekte wurde die Karplusgleichung 6.1 um empirische Glieder erweitert (für eine Literaturübersicht siehe [217] und [221]). Weitere Einflüsse, wie etwa Lösungsmittelleffekte oder der Protonierungszustand der Substituenten wurden erst kürzlich untersucht [218][219][221], und diese bilden einen Schwerpunkt der hier vorgelegten Arbeit. Im Folgenden werden jene Karplusbeziehungen dargestellt, die für die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle relevant sind.

Der älteste Ansatz zur Berücksichtigung der Elektronegativität \mathbf{c} der Ethansubstituenten stammt von Abraham und Gatti [229]. Nach diesem Modell können nur vicinale Kopplungskonstanten der kanonischen Rotamere von 1,2-disubstituierten Ethanen berechnet werden. Diese Beziehung stellt streng genommen keine allgemeine Karplusgleichung dar:

$${}^3J_{\text{HH}} = P_1 + P_2(\mathbf{c}_1 + \mathbf{c}_2) \quad (6.2)$$

Hierin bedeuten P_i empirische Konstanten, die für die kanonischen Rotamere spezifisch sind (siehe unten). \mathbf{c}_1 und \mathbf{c}_2 repräsentieren die Huggins-Elektronegativitäten [231] der an das Ethanskelett gebundenen Substituentenatome.

Nach der semiempirischen Gleichung von Haasnoot und Altona [217]

$${}^3J_{\text{HH}}(\mathbf{f}) = P_1 \cos^2 \mathbf{f} + P_2 \cos \mathbf{f} + P_3 + \sum_i \Delta \mathbf{c}_i \left[P_4 + P_5 \cos^2 (s_i \mathbf{f} + P_6 |\Delta \mathbf{c}_i|) \right] \quad (6.3)$$

werden die Substituenten bereits über Gruppenelektronegativitäten $\Delta \mathbf{c}_i$ charakterisiert:

$$\Delta c_i = \Delta c^{a\text{-Subst.}} - P_7 \sum_j \Delta c_j^{b\text{-Subst.}} \quad (6.4)$$

$\Delta c^{a\text{-Subst.}}$ bezeichnet die auf Wasserstoff bezogene Elektronegativität des unmittelbar an das Ethanskelett gebundenen Atoms und $\Delta c_j^{b\text{-Subst.}}$ diejenigen der um eine Bindung weiter liegenden Atome. Auch die räumliche Abfolge der Ethansubstituenten wird durch deren Vorzeichenfaktoren $s_i = \pm 1$ berücksichtigt, sie sind $+1$ für Substituenten mit im Uhrzeigersinn „positiver“ Stellung und -1 für in diesem Sinne „negativer“ Substituenten (siehe Abbildung 6.11).

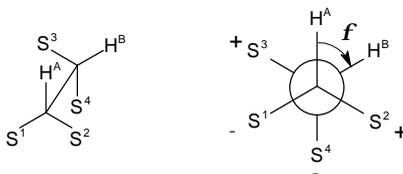


Abbildung 6.11: Definition „positiver“ und „negativer“ Ethansubstituenten in den Haasnoot-Altona-Modellen [217][221]

Die Fitparameter P_1 bis P_7 werden in [217] tabellarisch angegeben. Mit unterschiedlichen Parametersätzen für di- und trisubstituierte Ethane (Modelle C und D in [217]) wurde eine bessere Übereinstimmung mit dem Experiment erzielt (rms-Wert für Modell C: 0,37 Hz, für Modell D: 0,48 Hz) als mit einem globalen Parametersatz (Modell B mit einem rms-Wert von 0,48 Hz) [217].

In Gleichung 6.3 wird implizit angenommen, dass die Beiträge der Ethansubstituenten zur Kopplungskonstante ${}^3J_{\text{HH}}$ additiv sind. Theoretische sowie experimentelle Befunde zeigen jedoch, dass diese Voraussetzung nur näherungsweise erfüllt wird [220][221]. Der Effekt der Elektronegativität auf ${}^3J_{\text{HH}}$ kann von anderen Einflüssen isoliert studiert werden, indem man vicinale Kopplungskonstanten von monosubstituierten Ethanen $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-X}$ untersucht [220]. Infolge der freien Rotation der Methylgruppe entfallen die $\cos(\mathbf{f})$ - und $\cos^2(\mathbf{f})$ -Terme in der Karplusgleichung 6.1, somit wird die gemessene Kopplungskonstante $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle$ gleich der Karpluskonstante C . Es wurde festgestellt, dass keine bislang definierte Skala für Gruppenelektronegativitäten in der Lage ist, die vicinalen Kopplungskonstanten innerhalb der heute erreichbaren Messgenauigkeit (ca. $\pm 0,03$ Hz)

wiederzugeben [220]. Die Einführung einer neuen, empirischen I -Skala und Berücksichtigung der Wechselwirkung der Substituenten durch einen Kreuzterm $I_1 I_2$ nach der Gleichung

$$\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle = C_{00} + C_{01}(I_1 + I_2) + C_{012}(I_1 I_2) \quad (6.5)$$

verbessert die Übereinstimmung mit dem Experiment wesentlich. Von Altona *et al.* wurde eine rms-Abweichung von 0,018 Hz für 93 mono- und 1,1-disubstituierte Ethane erzielt [220]. Durch Gleichung 6.5 können Gruppenelektronegativitäten I_i für verschiedene Protonierungsgrade der betreffenden Gruppen berechnet werden [221]. Mit derart abgeleiteten I -Substituentenkonstanten wurden dann die fünf P -Parameter der Haasnoot-Altona-Gleichung 6.3 erneut angepasst [221],

$${}^3J_{\text{HH}}(\mathbf{f}) = P_1 \cos^2 \mathbf{f} + P_2 \cos \mathbf{f} + P_3 + \sum_i I_i [P_4 + P_5 \cos^2(s_i \mathbf{f} + P_6 |I_i|)] \quad (6.6)$$

Somit wurde die erste, speziell für wässrige Lösungen optimierte Karplusgleichung erstellt.

Die Dissoziation einer Gruppe kann deren Gruppenelektronegativität (induktiver Effekt), deren Raumerfüllung [166] und deren Tendenz zur Wasserstoffbrückenbildung beeinflussen. Diese Änderungen sollten im Prinzip die I -Konstanten widerspiegeln. Für die meisten funktionellen Gruppen wurde festgestellt, dass die durch Dissoziation bewirkte Änderung der Substituentenkonstanten weniger als $\pm 0,03$ I -Einheiten beträgt. Lediglich bei der Aminogruppe wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt: es gelten $I = 0,82$ für $-\text{NH}_3^+$ und $I = 1,10$ für $-\text{NH}_2$ [221].

Eine Besonderheit der I -Elektronegativitätsskala liegt darin, dass aus der gemessenen $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle$ Kopplungskonstante einer $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-X}$ Modellverbindung die I -Konstante der neuen Gruppe X abgeleitet werden kann [221]:

$$I_{\text{X}} = \frac{7,755 - \langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle}{0,529} \quad (6.7)$$

In der vorliegenden Arbeit wurden die I -Werte der $-\text{P}(\text{CH}_3)(\text{O})(\text{OH})$ und $-\text{P}(\text{CH}_3)(\text{O})(\text{O}^-)$ Gruppen in dieser Weise zum ersten Mal ermittelt. Als Modellverbindung dient dazu die P -Ethyl- P -methylphosphinsäure **3**. Die Spinanalyse des ^1H -Spektrums bei $\text{pD} \approx 0$ liefert

$\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle = 7,740$ Hz (siehe Kapitel 8.3.1.1), woraus für die $\text{P}(\text{CH}_3)(\text{O})(\text{OH})$ -Gruppe $I = 0,029$ resultiert. Im alkalischen Bereich wird $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle = 7,744$ Hz verzeichnet, daraus ergibt sich $I = 0,021$ für die $\text{P}(\text{CH}_3)(\text{O})(\text{O}^-)$ -Gruppe. Mit Hilfe dieser Zahlenwerte werden in Kapitel 6.4.2 und 6.4.3 verbindungs- und dissoziationsspezifische Karpluskurven für 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5** berechnet.

6.2.2 Karplusgleichungen für ${}^3J_{\text{CH}}$

Eine Karplusgleichung für heteronukleare ${}^3J_{\text{CH}}$ Kopplungskonstanten wurde von Fujiwara *et al.* [232] abgeleitet. Die eindeutige Zuordnung von diastereotopen Methylenprotonen und die anschließende Konformationsanalyse der meisten Aminosäuren und Peptiden ist im Generalfall nur unter simultaner Betrachtung der ${}^3J_{\text{HH}}$ - und ${}^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstanten möglich [225].

6.2.3 Karplusgleichungen für ${}^3J_{\text{PP}}$

Grossmann und Mitarbeiter haben die Abhängigkeit der ${}^3J_{\text{PP}}$ -Kopplungskonstante vom P–C–P Diederwinkel \boldsymbol{f} in 1,2-Bisphosphonsäuren und ihren Derivaten studiert [234]. Eine gute Anpassung der Karpluskurve an die experimentellen Daten war erst durch Einführung eines $\cos 3\boldsymbol{f}$ -Terms möglich:

$${}^3J_{\text{PP}}(\boldsymbol{f}) = P_1 + P_2 \cos \boldsymbol{f} + P_3 \cos 2\boldsymbol{f} + P_4 \cos 3\boldsymbol{f} \quad (6.8)$$

Für die Bisphosphonsäuren, deren Salze und Ester wurden unterschiedliche *P*-Parameter-sätze erhalten [234].

Karplusgleichungen für 1,2-Bisphosphinsäuren sind in der Literatur nicht auffindbar.

6.3 Kontinuierliche Beschreibung der Rotamerenverteilung

Zur heutigen Zeit sind zwei Ansätze bekannt, mit denen die kontinuierliche Verteilung (Wahrscheinlichkeitsdichte) der Konformere um eine C–C-Rotationsachse aus dynamischen $\langle {}^3J \rangle$ -Kopplungskonstanten rekonstruiert werden kann. Da im Folgenden nur vicinale Kopplungskonstanten behandelt werden, wird der hochgestellte Index 3 in $\langle {}^3J \rangle$ weggelassen.

6.3.1 Rotamerenanalyse nach Lin

Der erste Ansatz wurde Ende der 60er Jahre von Wei-Chuwan Lin entwickelt [235][236][237]. Für die einfache Durchführung der Methode werden im Arbeitskreis von G. Hägele seit 1977 Programme erstellt [238][239][240][241].

6.3.1.1 Rotamerenanalyse von 1,2-disubstituierten Ethanen nach Lin

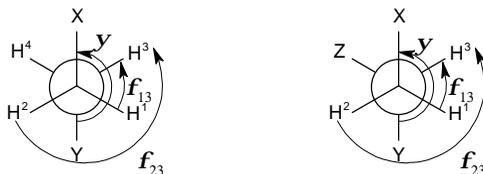


Abbildung 6.12: Definition des Diederwinkels γ und des Karpluswinkels f für di- und trisubstituierte Ethane zur Linschen Rotamerenanalyse mit den Programmen LIN_IT_1 und LIN_IT_2 von G. Hägele [241]

Abbildung 6.12 verdeutlicht den Unterschied zwischen dem Diederwinkel γ der X,Y-Substituenten und den „Karpluswinkeln“ f_{13} und f_{23} . Für 1,2-disubstituierte Ethane gelten folgende Phasenverschiebungen für diese Winkel:

$$f_{23} = \gamma \quad \text{und} \quad f_{13} = \gamma - 120^\circ \quad (6.9)$$

Zur Beschreibung der Rotation um die zentrale C–C-Bindungsachse wird nach Tabacik [243][244] und Lin [235][236][237] die Potentialfunktion $E(\gamma)$ vom Gwinn-Pitzer-Typ [242] verwendet:

$$\frac{E(\gamma)}{RT} = \mathbf{a} \cdot \cos(3\gamma) + \mathbf{b} \cdot \cos(\gamma) \quad (6.10)$$

Hier beschreibt \mathbf{a} die Rotationsbarriere im Ethan und wird mit Kenntnis von Literaturdaten zu 2,5 gesetzt [235]. \mathbf{b} gibt die Wechselwirkung zwischen den Substituenten X und Y wieder und ist für jedes Substituentenpaar X,Y einzeln zu ermitteln wie folgt.

Die Karplusgleichung 6.1 wird nach Lin neu parametrisiert:

$$J_{\text{HH}} = A_{\text{HH}} \cdot \cos^2(\mathbf{f}) + B_{\text{HH}} \cdot \cos(\mathbf{f}) + C_{\text{HH}} \quad (6.11)$$

Für zahlreiche aliphatische Verbindungen gilt mit guter Näherung $C_{\text{HH}} = 0$ und aus Literaturvergleichen folgt nach Lin $B_{\text{HH}} / A_{\text{HH}} = -0,1$ [235]. Damit lässt sich die Karplusgleichung 6.11 umschreiben zu:

$$J_{\text{HH}}(\mathbf{f}) = A_{\text{HH}} \cdot \cos(\mathbf{f}) \cdot [\cos(\mathbf{f}) - 0,1] \quad (6.12)$$

So muss außer \mathbf{b} jeweils noch der Wert A_{HH} ermittelt werden, um eine Karpluskurve zu erhalten, die dann für das Substituentenpaar X,Y spezifisch ist.

Die Häufigkeit der einzelnen Rotamere wird von der Boltzmannverteilung abgeleitet:

$$H(\mathbf{y}) = e^{-\frac{E(\mathbf{y})}{RT}} \quad (6.13)$$

Die observable Kopplungskonstante $\langle J_{\text{HH}} \rangle$ ergibt sich damit zu:

$$\langle J_{\text{HH}} \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} J_{\text{HH}}(\mathbf{f}) \cdot H(\mathbf{y}) \, d\mathbf{y}}{\int_0^{2\pi} H(\mathbf{y}) \, d\mathbf{y}} \quad (6.14)$$

Aus den Messdaten $\langle J_{13} \rangle$ und $\langle J_{23} \rangle$ werden nun die Kombinationen $\langle N \rangle = \langle J_{13} \rangle + \langle J_{23} \rangle$ und $\langle L \rangle = \langle J_{13} \rangle - \langle J_{23} \rangle$ gebildet, deren Quotient den folgenden Ausdruck liefert:

$$\frac{\langle L \rangle}{\langle N \rangle} = \frac{\langle J_{13} \rangle - \langle J_{23} \rangle}{\langle J_{13} \rangle + \langle J_{23} \rangle} = \frac{\int_{\mathbf{f}=0}^{360^\circ} [J_{13}(\mathbf{y} + 120^\circ) - J_{23}(\mathbf{y})] \cdot H(\mathbf{y}) \, d\mathbf{y}}{\int_{\mathbf{f}=0}^{360^\circ} [J_{13}(\mathbf{y} + 120^\circ) + J_{23}(\mathbf{y})] \cdot H(\mathbf{y}) \, d\mathbf{y}} \quad (6.15)$$

Diese Gleichung enthält noch zwei Unbekannte, A_{HH} und \mathbf{b} , die sich jeweils in den Termen $J_{\text{HH}}(\mathbf{f})$ und $H(\mathbf{y})$ verbergen. A_{HH} lässt sich aber durch Normierung der Karplusgleichung 6.12 eliminieren:

$$\frac{J_{\text{HH}}(\mathbf{f})}{A_{\text{HH}}} = \cos(\mathbf{f}) \cdot [\cos(\mathbf{f}) - 1] \quad (6.16)$$

Gleichung 6.16 wird somit Funktion eines einzigen Unbekannten \mathbf{b} , die sich mit dem Programm LIN_1_IT von G. Hägele [241] einfach berechnen lässt.

Im letzten Schritt wird A_{HH} aus dem experimentellen $\langle N \rangle$ -Wert ermittelt:

$$A_{\text{HH}} = \frac{\langle N \rangle \cdot \int_{f=0}^{360^\circ} H(\mathbf{y}) \, d\mathbf{y}}{\int_{f=0}^{360^\circ} [J_{13}(\mathbf{y} + 120^\circ) + J_{13}(\mathbf{y})] H(\mathbf{y}) \, d\mathbf{y}} \quad (6.17)$$

In dieser Weise ist eine verbindungspezifische Karpluskurve erhältlich, die das wahre Verhalten des Rotators besser wiedergibt.

6.3.1.2 Rotamerenanalyse für 1,1,2-trisubstituierte Ethane

Die Potentialkurve eines 1,1,2-trisubstituierten Ethans enthält bereits einen dritten Term:

$$\frac{E(\mathbf{y})}{RT} = \mathbf{a} \cos(3\mathbf{y}) + \mathbf{b} \cos(\mathbf{y}) + \mathbf{g} \cos(\mathbf{y} + 240^\circ) \quad (6.18)$$

Es wird nun angenommen, dass der für die Modellverbindung X-CH₂-CH₂-Y erhaltene **b**-Wert die X-Y Wechselwirkung auch im trisubstituierten Rotator X-CH₂-CH-YZ beschreibt [21][236][237]. **g** charakterisiert die Wechselwirkung von X mit dem neu eingeführten Z und muss in jedem Fall einzeln ermittelt werden.

Da im Rahmen dieser Arbeit keine trisubstituierten Systeme nach Lin behandelt werden, sei auf die detaillierte Lösung nur hingewiesen [21].

6.3.2 Die „CUPID“-Rotamerenanalyse

Da die Häufigkeitsverteilung der Rotamere $H(\mathbf{y})$ eine periodische Funktion des Diederwinkels \mathbf{y} darstellt, kann sie durch eine abgebrochene Fourierreihe angenähert werden [245]:

$$H(\mathbf{y}) = H_0 + \sum_{n=1}^N A_n \cdot \cos(n\mathbf{f}) + \sum_{n=1}^N B_n \cdot \sin(n\mathbf{f}) \quad (6.19)$$

Vorausgesetzt, dass um eine Rotationsachse mindestens $2N$ vicinale Kopplungskonstanten beobachtet werden und für jede Kopplung die entsprechenden Karplusgleichungen bekannt sind, können die Koeffizienten A_n und B_n durch multiple lineare Regression berechnet werden [245]. Da die CUPID-Methode in der vorliegenden Arbeit mangels hinreichend vieler heteronuklearer Kopplungskonstanten nicht einsetzbar ist, sei auf die einschlägigen Literaturstellen nur hingewiesen [245][246][247].

6.4 Die kanonische Rotamerenanalyse anhand von $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten

In der kanonischen Näherung wird die kontinuierliche Rotamerenverteilung auf drei diskrete, gestaffelte Rotamere mit $\tau_{\text{HH}} = 60^\circ$, 180° und 240° eingeschränkt. Im Folgenden werden die Rechenwege mit jeweils einem Beispiel dargestellt, die die Populationen der kanonischen Rotamere aus dynamisch gemittelten $\langle ^3J_{\text{HH}} \rangle$ -Werten liefern (der hochgestellte Index wird weiterhin weggelassen). Alle hier diskutierten Berechnungen wurden am neu entwickelten Excel-Datenblatt „Rotamerenanalyse.xls“ durchgeführt.

6.4.1 Rotamerenanalyse von 1,2-disubstituierten Ethanen mit äquivalenten *gauche*-Rotameren

Die zwitterionische Spezies von *b*-Alanin stellt die einfachste Modellverbindung für einen ethanähnlichen Rotator mit geladenen Gruppen dar. Aus diesem Grund war sie in den letzten fünf Jahren Gegenstand mehrerer theoretischer und ^1H -NMR-spektroskopischer Studien [248][249].

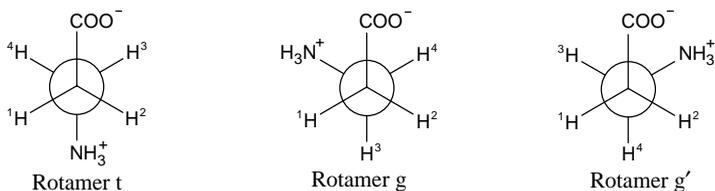


Abbildung 6.13: Kanonische Rotamere des zwitterionischen *b*-Alanins **8**

Abbildung 6.13 zeigt die drei kanonischen Rotamere um die zentrale C–C-Bindung. Diese Rotamere werden der Nomenklatur von Martin [228] folgend durch t (*trans*) und g (*gauche*) bezeichnet. Die Rotamere g und g' sind symmetrieäquivalent und energiegleich, somit werden sie äquipopuliert, $p_g = p_{g'}$. Die Rotamerenanteile sind auf 1 normiert:

$$p_t + p_g + p_{g'} = p_t + 2p_g = 1 \quad (6.20)$$

In der meist detaillierten Form der Rotamerenanalyse werden für jedes Rotamer individuelle Kopplungskonstanten eingeführt. Diese lauten

für Rotamer t: $J_{14} = J_{23} = J_t^G$ und $J_{13} = J_{24} = J_t^T$

und für Rotamer g: $J_{14} = J_g^T, J_{13} = J_g^{G13}, J_{23} = J_g^{G23}, J_{24} = J_g^{G24}$.

Der hochgestellte Index T (trans) oder G (gauche) zeigt die Stellung der koppelnden Protonen (in der deutschen Fachliteratur werden die Bezeichnungen *anti* und *syn* verwendet). Der tiefgestellte Index g weist auf das betreffende Rotamer hin.

Die mit „Rotamerenanalyse.xls“ berechneten Rota-Kopplungskonstanten von **b**-Alanin sind in Tabelle 6.9 aufgeführt.

	J_t^T	J_t^G	J_g^T	J_g^{G13}	J_g^{G23}	J_g^{G24}
Abraham, Gatti	13,10	4,91	13,08	3,63	2,37	3,63
Haasnoot B	12,87	3,38	12,87	3,38	2,51	2,51
Haasnoot C	13,52	3,52	13,52	3,59	2,52	2,98
Altona	13,73	4,02	13,73	3,81	2,98	3,20

Tabelle 6.8: Nach verschiedenen Karplusgleichungen berechnete Rota-Kopplungskonstanten [Hz] für das **b**-Alanin Zwitterion

Sind die Rotamere g und g' symmetriäquivalent, so müssen die observablen dynamischen Kopplungskonstanten paarweise gleich sein:

$$\langle {}^3J_{13} \rangle = \langle {}^3J_{24} \rangle = p_t J_t^T + p_g J_g^{G13} + p_g J_g^{G24} = p_t J_t^T + p_g (J_g^{G13} + J_g^{G24}) \quad (6.21)$$

$$\langle {}^3J_{14} \rangle = \langle {}^3J_{23} \rangle = p_t J_t^G + p_g J_g^T + p_g J_g^{G23} = p_t J_t^G + p_g (J_g^T + J_g^{G23}) \quad (6.22)$$

Von diesen Werten ausgehend lassen sich die unbekanntenen Rotamerenanteile p_g und p_t auf zwei Wegen berechnen.

6.4.1.1 Rechenweg 1: das N-Wert-Modell

Die Berechnung nach Abraham *et al.* [229][230] basiert auf dem experimentellen $\langle N \rangle$ -Wert, $\langle N \rangle = \langle J_{13} \rangle + \langle J_{14} \rangle$. Wenn das $[AB]_2$ -Spinsystem eines 1,2-disubstituierten Ethans ein linienarmes, „*deceptively simple*“ Spektrum aufweist, ist daraus anstelle von $\langle J_{13} \rangle$ und $\langle J_{14} \rangle$ nur $\langle N \rangle$ oder der Durchschnittswert $\langle J_{AB} \rangle = \langle N \rangle / 2$ erhältlich.

Der kürzeren Schreibweise halber werden N -Werte auch für die einzelnen Rotamere eingeführt:

$$N_t = J_t^T + J_t^G \quad (6.23)$$

$$N_g = 0,5(J_g^T + J_g^{G13} + J_g^{G23} + J_g^{G24}) = N_{g'} \quad (6.24)$$

Addieren der Gleichungen 6.21 und 6.22, Eliminierung von p_t aus der Normierungsbedingung 6.20 und Umstellen auf die Unbekannte $2p_g$ führt zu folgendem Ausdruck:

$$p_g + p_{g'} = 2p_g = \frac{\langle N \rangle - N_t}{N_g - N_t} \quad (6.25)$$

Der Anteil des *trans*-Rotamers ergibt sich durch:

$$p_t = 1 - 2p_g = \frac{N_g - \langle N \rangle}{N_g - N_t} \quad (6.26)$$

6.4.1.2 Rechenweg 2: das „Mittelwertmodell“

Sind sowohl $\langle J_{13} \rangle$ als auch $\langle J_{14} \rangle$ experimentell zugänglich, eröffnet sich der Rechenweg nach Gregorie *et al.* [248]. Die *trans*-Population wird aus $\langle J_{13} \rangle$ durch Kombinieren der Gleichungen 6.21 und 6.22 ausgedrückt:

$$p_t(\text{aus } \langle J_{13} \rangle) = \frac{2\langle J_{13} \rangle - (J_g^{G13} + J_g^{G23})}{2J_t^T - (J_g^{G13} + J_g^{G23})} \quad (6.27)$$

Aus der Kopplungskonstante $\langle {}^3J_{14} \rangle$ leitet sich ein anderer Wert für p_t ab:

$$p_t(\text{aus } \langle J_{14} \rangle) = \frac{2\langle J_{14} \rangle - (J_g^T + J_g^{G23})}{2J_t^G - (J_g^T + J_g^{G23})} \quad (6.28)$$

Als Ergebnis wird der Mittelwert der beiden *trans*-Anteile genommen:

$$p_t = \frac{p_t(\text{aus } \langle J_{13} \rangle) + p_t(\text{aus } \langle J_{14} \rangle)}{2} \quad (6.29)$$

6.4.1.3 Vergleich der beiden Rechenwege

Für das **b**-Alanin Zwitterion wurden bei 60 MHz die Kopplungskonstanten $\langle J_{13} \rangle = 6,84$ Hz und $\langle J_{14} \rangle = 6,52$ Hz gemessen [229]. Von diesen Daten ausgehend wurden in der

vorliegenden Arbeit Rotamerenanteile mit dem Linschen Ansatz (Kapitel 6.3.1.1), dem kanonischen N -Wertmodell und dem Mittelwertmodell berechnet. Die somit erhaltenen *trans*-Anteile sind in Tabelle 6.9 angeführt.

	N -Wert-Modell	Mittelwertmodell		
Karplusgleichung	p_t	p_t aus $\langle J_{13} \rangle$	p_t aus $\langle J_{14} \rangle$	gemittelte p_t
Abraham-Gatti	0,30	0,34	0,43	0,38
Haasnoot-B	0,49	0,39	0,27	0,33
Haasnoot-C	0,39	0,36	0,33	0,34
Altona	0,25	0,33	0,42	0,38
Lin	0,36	–	–	–

Tabelle 6.9: Nach verschiedenen Ansätzen berechnete Rotamerenanteile für die zwitterionische Form von **b**-Alanin **8**

Bei der statistischen Verteilung der Rotamere gäbe es $p_t = 0,333$. Die Ergebnisse nach dem N -Wertmodell für **b**-Alanin machen deutlich, dass die verschiedenen Karplusmodelle dieses Zwitterion stark unterschiedlich beschreiben. Die p_t -Werte aus $\langle J_{13} \rangle$ und $\langle J_{14} \rangle$ sind zwar im Einklang mit denen von Gregorie *et al.* [248] unterschiedlich, deren Mittelwerte stimmen aber unter den verschiedenen Karplusmodellen und mit dem Ergebnis der Linschen Rotamerenanalyse auf $\pm 2\%$ überein. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden deshalb die durch das Mittelwertmodell erhaltenen Rotamerenanteile aufgelistet und diskutiert.

6.4.2 Rotamerenanalyse von 1,2-disubstituierten Ethanen mit nichtäquivalenten *gauche*-Rotameren

Wenn die Ethansubstituenten weitere Rotationsachsen enthalten oder einen chiralen Rest tragen, beeinflusst auch ihre Orientierung den Energieinhalt der drei kanonischen Rotamere. Aus diesem Grund werden die beiden *gauche*-Rotamere nicht mehr äquivalent, es gilt im Allgemeinen $p_g \neq p_g$.

Als Beispiel hierfür dienen die kanonischen Rotamere von Phosphinothricin **6** um den Diederwinkel c_2 (siehe Abbildung 6.14). Im Folgenden wird der Einfachheit halber die für

die Zuordnung verwendete Nummerierung der betreffenden Ethanprotonen H^2 , H^3 , H^4 und H^5 behalten.

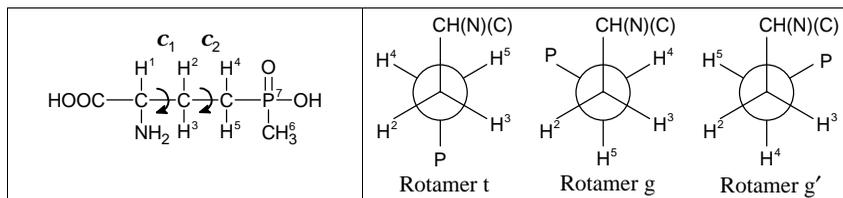


Abbildung 6.14: Strukturformel und kanonische Rotamere von Phosphinothricin **6** am Diederwinkel c_2

Die rotamerenspezifischen Kopplungskonstanten lauten in diesem Fall:

$$\text{für Rotamer t:} \quad J_{24} = J_{35} = J_t^G, J_{34} = J_{25} = J_t^T,$$

$$\text{für Rotamer g:} \quad J_{24} = J_g^T, J_{25} = J_g^{G25}, J_{35} = J_g^{G35}, J_{34} = J_g^{G34},$$

$$\text{und für Rotamer g':} \quad J_{35} = J_{g'}^T, J_{34} = J_{g'}^{G34}, J_{24} = J_{g'}^{G24}, J_{25} = J_{g'}^{G25}.$$

Für die kanonischen Rotamere von Phosphinothricin wurden nach verschiedenen Karplusmodellen die in Tabelle 6.10 angeführten individuellen Kopplungskonstanten berechnet.

Karplusgleichung	J_t^T	J_t^G	$J_g^T = J_{g'}^T$	$J_g^{G25} = J_{g'}^{G34}$	$J_g^{G35} = J_{g'}^{G24}$	$J_g^{G34} = J_{g'}^{G25}$
Abraham, Gatti	13,89	4,34	13,62	4,48	3,66	4,48
Haasnoot B	14,88	2,98	14,88	2,91	3,19	3,25
Haasnoot C	16,36	2,49	16,36	2,47	3,35	3,37

Tabelle 6.10: Nach verschiedenen Ansätzen berechnete rotamerenspezifische Kopplungskonstanten [Hz] für die c_2 -Rotamere von Phosphinothricin **6** bei $\text{pH}^D = 6,12$

Es gelten nun folgende Zusammenhänge zwischen den dynamischen und den rotamerenspezifischen Kopplungskonstanten:

$$\langle J_{24} \rangle = p_t J_t^G + p_g J_g^T + p_{g'} J_{g'}^{G24} \quad (6.30)$$

$$\langle J_{25} \rangle = p_t J_t^T + p_g J_g^{G25} + p_{g'} J_{g'}^{G25} \quad (6.31)$$

$$\langle J_{34} \rangle = p_t J_t^T + p_g J_g^{G34} + p_{g'} J_{g'}^{G34} \quad (6.32)$$

$$\langle J_{35} \rangle = p_t J_t^G + p_g J_g^{G35} + p_{g'} J_{g'}^T \quad (6.33)$$

Diese vier Gleichungen stellen mit der Normierungsbedingung 6.20 ein überbestimmtes System für die drei Unbekannten p_t , p_g und $p_{g'}$ dar. Die Rotamerenanteile werden deshalb einerseits aus $\langle J_{24} \rangle$ und $\langle J_{25} \rangle$, andererseits aus $\langle J_{34} \rangle$ und $\langle J_{35} \rangle$ berechnet und anschließend die Mittelwerte gebildet.

Die gemessenen Kopplungskonstanten von Phosphinothricin im physiologischen Bereich ergeben sich aus dem 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektrum zu $\langle J_{24} \rangle = 11,84$ Hz, $\langle J_{25} \rangle = 5,06$ Hz, $\langle J_{34} \rangle = 4,95$ Hz und $\langle J_{35} \rangle = 11,86$ Hz (siehe Kapitel 8.3.4.2). Aus diesen Messdaten wurden mit „Rotamerenanalyse.xls“ die in Tabelle 6.11 aufgeführten Populationen erhalten.

Es ist bemerkenswert, dass der aus $\langle J_{24} \rangle$ und $\langle J_{25} \rangle$ resultierende *gauche*-Anteil nahezu gleich der aus $\langle J_{34} \rangle$ und $\langle J_{35} \rangle$ berechneten *gauche'*-Population ist. Die Rotamere g und g' können somit nicht unterschieden werden.

Karplusgleichung	aus $\langle J_{24} \rangle$ und $\langle J_{25} \rangle$			aus $\langle J_{34} \rangle$ und $\langle J_{35} \rangle$		
	p_t	p_g	$p_{g'}$	p_t	p_g	$p_{g'}$
Abraham, Gatti	0,78	0,09	0,13	0,78	0,14	0,08
Haasnoot B	0,74	0,17	0,08	0,75	0,09	0,16
Haasnoot C	0,66	0,18	0,16	0,67	0,17	0,17

Tabelle 6.11: Nach verschiedenen Ansätzen berechnete Populationen der c_2 -Rotamere von Phosphinothricin **6** bei $\text{pH}^D = 6,12$

6.4.3 Rotamerenanalyse von 1,1,2-trisubstituierten Ethanen

Die kanonische Analyse eines trisubstituierten ethanähnlichen Rotators wird am Beispiel des Phosphinothricins **6** am Torsionswinkel c_1 dargestellt. Die drei Rotamere in Abbildung 6.15 werden nach Martin [228] durch t (*trans*), h (*hindered*) und g (*gauche*) gekennzeichnet.

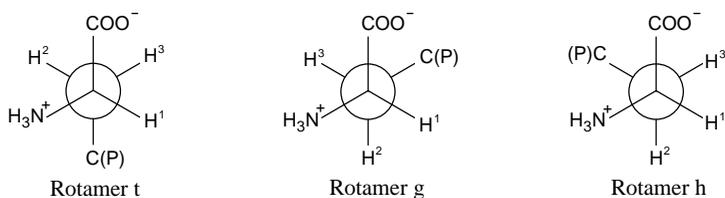


Abbildung 6.15: Kanonische Rotamere von Phosphinothricin **6** am Torsionswinkel c_1

Die Normierung der Rotamerenanteile p_t , p_g und p_h lautet:

$$p_t + p_g + p_h = 1 \quad (6.34)$$

Insgesamt sechs individuellen Kopplungskonstanten können abgeleitet werden. Sie lauten

für Rotamer t: $J_{12} = J_t^G, J_{13} = J_t^T,$

für Rotamer g: $J_{12} = J_g^T, J_{13} = J_g^G,$

und für Rotamer h: $J_{12} = J_h^{G1}, J_{13} = J_h^{G2}.$

Diese Konstanten werden mit den bereits erwähnten Karplusgleichungen berechnet. Die mit „Rotamerenanalyse.xls“ für Phosphinothricin erhaltenen Werte sind in Tabelle 6.12 angeführt.

Auf Grund der Kopplungskonstanten von Modellverbindungen bekannter Konformation [222][223] wurden von Pachler [224], Hansen [225] und Martin [228] Standardwerte für *gauche*- und *trans*-Kopplungskonstanten für α -Aminosäuren und Peptide abgeleitet, die auch für Phosphinothricin einsetzbar sind (die Zahlenwerte siehe in Tabelle 6.12). Diese Konstanten seien von der jeweiligen Seitenkette der Aminosäure unabhängig und deren Anwendung entspricht den folgenden vereinfachenden Annahmen:

$$J^T = J_t^T = J_g^T \quad (6.35)$$

$$J^G = J_t^G = J_g^G = J_h^{G1} = J_h^{G2} \quad (6.36)$$

Karplusgleichung	J_t^G	J_t^T	J_g^G	J_g^T	J_h^{G1}	J_h^{G2}
Hansen	2,56	13,60	2,56	13,60	2,56	2,56
Martin	2,40	13,30	2,40	13,30	2,40	2,40
Haasnoot B	2,58	12,10	2,58	12,10	3,25	3,25
Haasnoot D	2,85	11,80	2,62	11,80	3,39	3,63

Tabelle 6.12: Nach verschiedenen Ansätzen berechnete, rotamerenspezifische Kopplungskonstanten in [Hz] für Segment c_1 in Phosphinothricin **6**

Die messbaren dynamischen Kopplungskonstanten werden durch folgende Ausdrücke beschrieben:

$$\langle J_{12} \rangle = p_t J_t^G + p_g J_g^T + p_h J_h^{G1} \quad (6.37)$$

$$\langle J_{13} \rangle = p_t J_t^T + p_g J_g^G + p_h J_h^{G2} \quad (6.38)$$

Die drei unbekannt Rotamerenanteile können aus dem linearen Gleichungssystem aus den Gleichungen 6.34, 6.37 und 6.38 eindeutig berechnet werden [228]. Die Berechnungen mit „Rotamerenanalyse.xls“ für Phosphinothricin lieferten die in Tabelle 6.13 aufgelisteten Werte. Hier kann eine gute Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Karplusmodellen beobachtet werden.

Karplusgleichung	p_t	p_g	p_h
Hansen	0,37	0,23	0,40
Martin	0,39	0,24	0,37
Haasnoot B	0,41	0,24	0,36
Haasnoot D	0,40	0,22	0,37

Tabelle 6.13: Nach verschiedenen Ansätzen berechnete Rotamerenanteile für die c_1 -Rotamere von Phosphinothricin **6**

6.4.4 Rotamerenanalyse an mehreren Segmenten

Nach der segmentspezifischen Analyse wird nun die Gesamtkonformation von Glufosinat betrachtet. Wie Abbildung 6.14 zeigt, lassen sich neun Rotamere ableiten: tt, tg, tg', usw.

Hierbei repräsentiert der erste Buchstabe die Konformation am Segment c_1 und der zweite den Rotationszustand am Segment c_2 .

Wenn die Rotation um die beiden Torsionsachsen nicht korreliert ist, ergibt sich die relative Häufigkeit eines Konformers als Produkt der beteiligten segmentspezifischen Rotamerenanteilen, z. B.

$$P_{hg'} = P_h \cdot P_{g'} \quad (6.39)$$

Aus den segmentspezifischen Anteilen in den Tabellen 6.13 und 6.11 können in dieser Weise die in Abbildung 6.14 dargestellten Populationen berechnet werden.

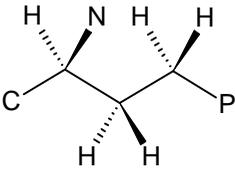
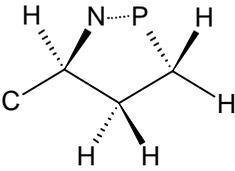
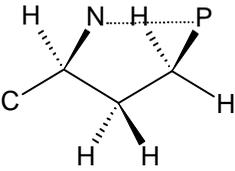
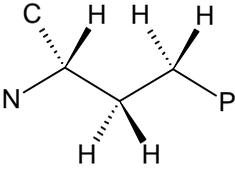
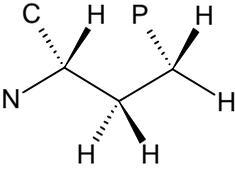
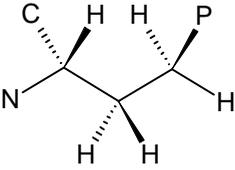
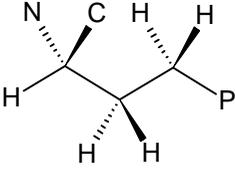
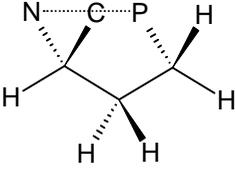
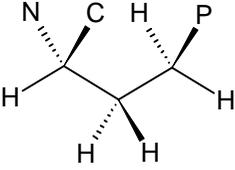
c_1/c_2	t	g	g'
t	 tt 29%	 tg 5%	 tg' 5%
g	 gt 18%	 gg 3%	 gg' 3%
h	 ht 26%	 hg 5%	 hg' 5%

Tabelle 6.14: Ensemble der kanonischen Rotamere von Phosphinothricin **6**

N, C, und P bezeichnen die Substituenten NH_3^+ , COO^- und $\text{P}(\text{CH}_3)(\text{O})\text{O}^-$ bei $\text{pH}^{\text{D}} = 6,12$

Enthält das betrachtete Molekül n ethanähnliche Segmente, steigt die Anzahl der kanonischen Rotamere auf 3^n an.

6.5 Berechnung rotamerenspezifischer Dissoziationskonstanten

Aus den pH-abhängigen vicinalen Kopplungskonstanten kann eine pH-abhängige Rotamerenverteilung abgeleitet werden. Bei bestimmten pH-Werten treten jedoch mehrere Protolysespezies H_iL nebeneinander, eventuell auch in Form tautomerer Mikrospezies auf, und tragen nach deren jeweiligen Molenbrüchen x_i zu den Rotamerenanteilen bei (siehe die nachfolgende Gleichung 6.46).

Das Ziel ist es nun, die Rotamerenverteilung eines Liganden in wohldefinierten Dissoziationszuständen zu charakterisieren.

In Abbildung 6.16 werden simultane Protolyse- und Rotamerengleichgewichte einer einbasigen Säure $YCH_2-CHX-COOH$ dargestellt. Die Acidität der individuellen Rotaspezies, Ht, Hg und Hh wird nach Noszál [13][251] wie folgt charakterisiert.

Bei jedem pH-Wert gilt für die Totalkonzentration der Neutralsäure HL die folgende Bilanzgleichung:

$$c_{HL}^t = [HL] + [L^-] \quad (6.40)$$

Die Konzentrationen der Protolysespezies HL und L^- setzen sich aus den Beiträgen der einzelnen Rotameren zusammen:

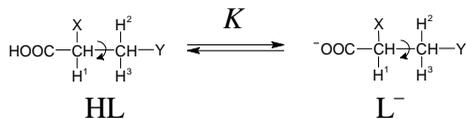
$$[HL] = [Ht] + [Hg] + [Hh] \quad (6.41)$$

$$[L^-] = [t^-] + [g^-] + [h^-] \quad (6.42)$$

Die Dissoziationskonstante *trans*-Rotamers Ht ist somit definiert als:

$$K_t = \frac{[t^-][H^+]}{[Ht]} \quad (6.43)$$

Dissoziation von HL



Dissoziation der Rotamere von HL

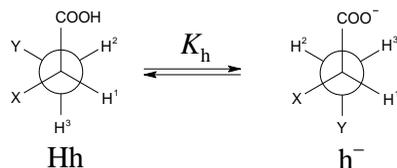
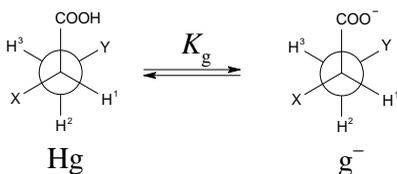
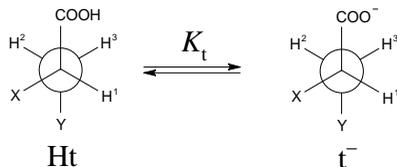


Abbildung 6.16: Dissoziationsschema einer einbasigen Säure HL und deren drei kanonischen Rotamere

Der Anteil des Rotamers Ht unter allen monoprotonierten Rotameren Ht, Hg und Hh gibt den speziesbezogenen Rotamerenanteil f_{Ht} an:

$$f_{\text{Ht}} = \frac{[\text{Ht}]}{[\text{Ht}] + [\text{Hg}] + [\text{Hh}]} = \frac{[\text{Ht}]}{[\text{HL}]} \quad (6.44)$$

Für die deprotonierte Rota-Spezies t^- gilt analog folgende Gleichung:

$$f_{\text{t}^-} = \frac{[\text{t}^-]}{[\text{t}^-] + [\text{g}^-] + [\text{h}^-]} = \frac{[\text{t}^-]}{[\text{L}^-]} \quad (6.45)$$

Es gibt wesentliche Unterschiede zwischen speziesbezogenen und „bulk“ Populationen. f_{Ht} und f_{t^-} sind pH-unabhängige Größen. Dies gilt für den brutto *trans*-Anteil p_{t} nicht mehr, denn er umfasst alle *trans*-Rotamere, unabhängig vom Protolysezustand:

$$p_{\text{t}}(\text{pH}) = f_{\text{Ht}} \cdot x_{\text{HL}}(\text{pH}) + f_{\text{t}^-} \cdot x_{\text{L}^-}(\text{pH}) \quad (6.46)$$

Die Gleichungen 6.43 bis 6.46 werden für die *gauche*- und *hindered*-Rotamere sinngemäß modifiziert.

Für die speziesbezogenen Rotamerenanteile gelten folgende Normierungsbedingungen:

$$f_{\text{Ht}} + f_{\text{Hg}} + f_{\text{Hh}} = 1 \quad (6.47)$$

$$f_{\text{t}^-} + f_{\text{g}^-} + f_{\text{h}^-} = 1 \quad (6.48)$$

Nun erhebt sich die Frage, wie die speziesbezogenen Rotamerenanteile aus den Messdaten abgeleitet werden. Als Anhaltspunkte dienen die bekannte Makrokonstante pK , die pH-Werte und die pH-abhängigen dynamischen Kopplungskonstanten $\langle J_{12} \rangle$ und $\langle J_{13} \rangle$. Es bieten sich im Prinzip zwei Rechenwege an.

Nach einem bereits veröffentlichten Ansatz [13][251] werden aus $\langle J_{12} \rangle$ und $\langle J_{13} \rangle$ für jeden pH-Wert die Rotamerenpopulationen p_{t} , p_{g} und p_{h} errechnet. Da in einer sehr aciden bzw. alkalischen Lösung dominant nur HL bzw. L^- vorliegt, gelten mit guter Näherung:

$$f_{\text{Ht}} \cong p_{\text{t}} \quad (\text{im aciden Grenzfall}) \quad (6.49)$$

$$f_{\text{t}^-} \cong p_{\text{t}} \quad (\text{im alkalischen Grenzfall}) \quad (6.50)$$

Im mittleren pH-Bereich versetzt die Kenntnis der Aziditätskonstante K uns in die Lage, die Molenbrüche x_{HL} und x_{L^-} an jedem Punkt der Titration zu berechnen. f_{Ht} und f_{t^-} sind dann als lineare Koeffizienten der Gleichung (6.46) durch lineare Regression erhältlich.

In der vorgelegten Arbeit wurde eine allgemeinere Rechenmethode entwickelt. Als Erstes werden für jeden pH-Wert die Molenbrüche x_{HL} und x_{L^-} berechnet. Darauf folgt die Berechnung der in Kapitel 3.1 eingeführten individuellen Kopplungskonstanten der Makrospezies, $J_{\text{HL},12}$, $J_{\text{HL},13}$, $J_{\text{L}^-,12}$ und $J_{\text{L}^-,13}$. Dieses Problem ist mathematisch völlig

analog zur in Kapitel 3.5 geschilderten Berechnung der ionenspezifischen chemischen Verschiebungen, somit können die gleichen Auswerteprogramme, wie z. B. MULTINMRPK eingesetzt werden.

Im nächsten Schritt werden die ionenspezifischen Kopplungskonstanten an Stelle der dynamisch gemittelten $\langle J \rangle$ -Werte in die Gleichungen 6.37 und 6.38 eingesetzt. Die Lösung des linearen Gleichungssystems aus den Gleichungen 6.34, 6.37 und 6.38 liefert unmittelbar die speziesbezogenen Rotamerenanteile f_{Ht} , f_{Hg} und f_{Hh} .

Wenn die f -Populationen für beide Dissoziationsstufen bekannt sind, können die pK -Werte der individuellen Rotamere (Rota-Dissoziationskonstanten) wie folgt berechnet werden [13]. Kombinieren der Gleichungen 6.43, 6.44 und 6.45 führt zu den folgenden Beziehungen:

$$K_t = \frac{f_{\text{t}^-}}{f_{\text{Ht}}} K, \quad K_g = \frac{f_{\text{g}^-}}{f_{\text{Hg}}} K \quad \text{und} \quad K_h = \frac{f_{\text{h}^-}}{f_{\text{Hh}}} K \quad (6.51)$$

Die Umstellung und Addition dieser Gleichungen liefert den Zusammenhang der brutto und rotamere-spezifischen Dissoziationskonstanten:

$$f_{\text{Ht}} K_t + f_{\text{Hg}} K_g + f_{\text{Hh}} K_h = (f_{\text{t}^-} + f_{\text{g}^-} + f_{\text{h}^-}) K = K \quad (6.52)$$

Zum Abschluss werden die Molenbrüche der Rota-Spezies hergeleitet. Der pH-abhängige Molenbruch von Ht setzt sich aus dem pH-unabhängigen f_{Ht} und dem pH-abhängigen Molenbruch von HL zusammen [13][251]:

$$x_{\text{Ht}} = \frac{[\text{Ht}]}{[\text{HL}] + [\text{L}^-]} = f_{\text{Ht}} \frac{[\text{HL}]}{[\text{HL}] + [\text{L}^-]} = f_{\text{Ht}} x_{\text{HL}} \quad (6.53)$$

Die derart berechneten Molenbrüche gehorchen bei jedem pH-Wert der folgenden Normierungsbedingung:

$$x_{\text{Ht}} + x_{\text{Hg}} + x_{\text{Hh}} + x_{\text{t}^-} + x_{\text{g}^-} + x_{\text{h}^-} = 1 \quad (6.54)$$

Wenn im Molekül mehrere funktionelle Gruppen vorhanden sind, sollte die Berechnung mit Mikrokonstanten durchgeführt werden, die die Deprotonierung einzelner Gruppen im betreffenden Rotamer beschreiben. In diesem Fall wird in Gleichung 6.51 an Stelle der

Makrokonstante K z. B. die Mikrokonstante k_1 eingesetzt und somit werden die Rota-Mikrokonstanten $k_{1,i}$, $k_{1,g}$ und $k_{1,h}$ erhalten [13].

Der gleiche Rechenweg gilt, wenn das Molekül mehrere Rotationsachsen enthält. Hierzu werden die für jede Protolysespezies individuellen Werte der relativen Häufigkeiten der Rotamere abgeleitet nach:

$$f_{\text{Hhg}'} = f_{\text{Hh}} \cdot f_{\text{Hg}'} \quad (6.55)$$

Aus diesen pH-unabhängigen relativen Häufigkeiten werden dann nach Gleichung 6.51 Rota-Dissoziationskonstanten abgeleitet. Als experimentelles Beispiel wird in dieser Arbeit Phosphinothricin dargestellt (Kapitel 8.3.4.8).

6.6 Zusammenfassung

Mit der neu erstellten Excel-Datei „Rotamerenanalyse.xls“ können nicht nur verbindungs-spezifische, sondern auch dissoziations-spezifische Karpluskurven berechnet werden.

Bei der Rotamerenanalyse von 1,2-disubstituierten Ethanen mit äquivalenten *gauche* und *gauche'* Rotameren wurde festgestellt, dass die verschiedenen Karplusmodelle stark abweichende Rotamerenanteile liefern, wenn die Auswertung auf dem experimentellen N -Wert basiert. Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf der Arbeit das Mittelwertmodell angewandt.

Es wurde auch beobachtet, dass die nicht symmetrieäquivalenten g und g' Rotamere in der kanonischen Betrachtungsweise schwer zu unterscheiden sind, wenn für die gemessenen Kopplungskonstanten gilt:

$$\langle J_{24} \rangle \approx \langle J_{35} \rangle \quad \text{und} \quad \langle J_{25} \rangle \approx \langle J_{34} \rangle$$

Mit der Ausnahme der Bernsteinsäure liefern die Linsche Analyse und das kanonische Mittelwertmodell auf $\pm 0,10$ gleiche Rotamerenanteile für 1,2-disubstituierte Ethane. In diesem Zusammenhang soll noch erwähnt werden, dass der Linsche Ansatz immer gleiche *gauche* und *gauche'* Populationen liefert, wegen der Parität der zugrundeliegenden Potentialfunktion. Die Haasnoot-Altona-Gleichungen enthalten hingegen nach der Elektronegativität der Substituenten phasenverschobene \cos^2 -Terme, sie eignen sich auch zur Beschreibung asymmetrischer Häufigkeitsverteilungen der Rotamere.

7 EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 Chemikalien

Die Summenformel, Herkunft und Reinheit der charakterisierten Liganden wurden bereits in Tabelle 1.1 des Kapitels 1.2 aufgeführt. Die nachfolgende Tabelle 7.1 enthält diese Angaben für die anderen verwendeten Chemikalien.

No.	Name	Summenformel	Hersteller	Reinheit
13	L-Histidin	$C_6H_9N_3O_2$	Reanal	p.a., 99%
14	Kaliumhydrogenphthalat	$C_8H_5KO_4$	Aldrich	p.a.
15	Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Aldrich	p.a.
16	Dinatriumhydrogenphosphat	Na_2HPO_4	Aldrich	p.a.
17	Natriumtetraborat (Borax) wasserfrei	$Na_2B_4O_7$	Aldrich	p.a.
18	Essigsäure	$C_2H_4O_2$	Riedel-de Haën	p.a.
19	Chloressigsäure	$C_2H_3O_2Cl$	Sigma	p.a.
20	Dichloressigsäure	$C_2H_2O_2Cl_2$	Sigma	p.a.
21	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	$C_4H_{11}NO_3$	Aldrich	p.a., 99,5%
22	Natriumhydroxid	NaOH	Baker	p.a.
23	Salpetersäure, konz.	HNO_3	Merck	p.a.
24	Natriumnitrat	$NaNO_3$	Riedel-de Haën	p.a., 99,5 %
25	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat, Na-Salz (DSS)	$C_6H_{15}NaO_3SSi_3$	Aldrich	97 %
26	Deuteriumoxid	D_2O	Sigma	99,5%

Tabelle 7.1: Name, Formel, Reinheit und Herkunft der verwendeten Basischemikalien

Carbonatarme NaOH-Titratorlösungen wurden nach einer Methode hergestellt, die sich auf Sørensen zurückführen lässt (siehe auf Seite 15 in [177]). Aus NaOH-pellets wird eine 50%ige Stammlösung angefertigt, worin das Natriumcarbonat unlöslich ist und sich auf

dem Boden absetzt. Aus der klaren, überstehenden Lösung wurden dann 0,1 M, 0,2 M, bzw. 1,0 M NaOH-Lösungen angefertigt. Auf diese Weise kann der Carbonatinhalt in der Regel unter 1% gehalten werden. Die Faktorisierung der NaOH-Lösungen erfolgte aus jeweils 3-7 potentiometrischen Titrations mit dynamischer Volumendosierung. Als Urtitersubstanz diente hierfür das gemahlene und bei 110 °C 8 Stunden lang getrocknete [254] Kaliumhydrogenphthalat.

Die 2 M, 0,2 M und 0,1 M HNO₃-Lösungen wurden aus konz. HNO₃-Lösung verdünnt. Die Faktorbestimmung erfolgte durch Titrations mit den faktorisierten NaOH-Titratoren oder mit der Urtitersubstanz TRIS **20** [255].

Die aktivitätsbezogene Kalibration der pH-Einstabmesskette wurde mit den in Tabelle 2.1 aufgeführten NIST-Standardpuffern durchgeführt.

Überall in der Arbeit wurde entionisiertes, bidestilliertes Wasser (Millipore, Leitfähigkeit 1,1 µS/cm) verwendet.

7.2 Potentiometrische Titrations

7.2.1 Anlage und Messbedingungen



Abbildung 7.1: Messapparatur zur Durchführung potentiometrischer Titrations

Die Apparatur zur Aufnahme der Glaselektrodenindizierten Titrationsen umfasste folgende Ausstattung und Software (siehe Abbildung 7.1):

- pH-Einstabmessketten Schott BlueLine® 11 und 16
- Thermostatisierbare Titrationsgefäße von 80 ml und 20 ml Gesamtvolumen
- Flüssigkeitsthermostat LAUDA B
- Magnetrührer (Schott-Geräte GmbH)
- Motorkolbenbürette Titroline Alpha® mit Dosieraufsätzen 10 ml und 20 ml (Dosiergenauigkeit $\pm 0,002$ ml bzw. $\pm 0,004$ ml, Schott-Geräte GmbH, Mainz)
- Steuerung und Messwerterfassung durch IBM-kompatiblen PC
- Messprogramm: MINI_T Version 4.01 von B. Drenker

Alle Titrationsen wurden bei $T = 25,0 \pm 0,1$ °C, bei den Ionenstärken von 0,1 M und 1 M in H₂O durchgeführt. Die konzentrationsbezogene Kalibration der Glaselektrode erfolgte durch Blanktitration. Um die Absorption von CO₂ aus der Luft zu minimieren wurde eine N₂-Schutzgasatmosphäre (99,999%, Linde) verwendet. Die experimentellen Parameter der pK-Bestimmungen sind in Tabelle 7.2 verzeichnet. Die entsprechenden Blanktitrationen wurden unter genau den gleichen Bedingungen, aber in Abwesenheit der zu untersuchenden Liganden durchgeführt.

Vorschrift	#1	#2	#3
Ionenstärke	0,1 M	0,1 M	1 M
pH-Einstabmesskette	Schott Blue Line 16	Schott Blue Line 11	Schott Blue Line 11
Titrationgefäß	20 ml	80 ml	80 ml
Vorlagevolumen	5,00 ml	25,00 ml	30,00 ml
Ligand in Vorlage	0,03 bis 0,10* mmol	0,15 bis 0,40* mmol	0,6 bis 0,8* mmol
Zusätze in der Vorlage	0,10* mmol HNO ₃ 0,50 mmol NaNO ₃	0,25* mmol HNO ₃ 2,50 mmol NaNO ₃	1,5* mmol HNO ₃ 28,5 mmol NaNO ₃
Titritator	0,1* M NaOH	0,1* M NaOH	0,2* M NaOH 1,0 M NaNO ₃
Dosierungsschritte	0,04 ml	0,04 ml	0,10 ml
Anzahl Messpunkte	80 bis 150	100 bis 150	100 bis 150
pK_w^c aus [51]	13,78	13,78	13,83

Tabelle 7.2: Experimentelle Parameter für potentiometrische Titrationsen. Die durch * gekennzeichneten Zahlen sind Richtwerte, deren exakte Beträge hingen von den jeweiligen Faktorwerten, bzw. Einwaagen ab

7.2.2 Auswertung

Zur Auswertung der gemessenen Titrationskurven wurden die hauseigenen Programme WINSCORE [50] und Iterax 4.0 [256] verwendet.

Als Erstes wurden aus der Blanktitration die aktuellen Elektrodenparameter der erweiterten Nernstschen Gleichung 2.26 ermittelt. Während der anschließenden Auswertung der pK-Titrationskurven wurden diese Parameter festgehalten. Weitere Einzelheiten über Blanktitrationen und Auswertungskonzepte finden sich in den Dissertationen von I. Reimann [50] und C. Tillmann [256], sowie in den Monographien [176][177][178].

7.3 Kernresonanzspektroskopische Messungen

Alle Kernresonanzspektren wurden mit den Spektrometern DRX 200 und DRX 500 der Firma BRUKER Analytik GmbH (Rheinstetten) bei 22 ± 1 °C aufgenommen. Bei der DRX 200-Anlage ergeben sich für die einzelnen Kerne folgende Messfrequenzen: 200,13 MHz für ^1H und 81,02 MHz für ^{31}P . Die Spektrometerfrequenzen von DRX 500 betragen 500,13 MHz für ^1H , 202,46 MHz für ^{31}P und 125,77 MHz für ^{13}C . Als interne Referenzsubstanz aller ^1H - und ^{13}C -Spektren diente das wasserlösliche DSS **25**. Die chemischen Verschiebungen werden in allen ^{31}P - und $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -Spektren auf externe 85%ige Phosphorsäure bezogen.

Die umfassende NMR-spektroskopische Charakterisierung der Liganden **1**, **2** und **5** bis **12** erfolgte in zwei Schritten.

1. Zur Reinheitskontrolle und Analyse des Spinsystems wurden konzentrierte (0,05 bis 0,10 M) Einzelproben in D_2O angefertigt (über die Herstellung dieser Proben siehe Vorschrift #1 in Tabelle 7.3).

Die 500,13 MHz- ^1H - und $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ -Spektren wurden jeweils mit $\text{TD} = 64\text{K}$ und $d_1 = 5$ s vermessen und anschließend so transformiert, dass im Spektrum eine FIDRES von mindestens 0,05 Hz/pt erreicht wurde. Die 200,67 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ - und ^{31}P -Spektren wurden mit $\text{TD} = 32\text{K}$ registriert und deren Bearbeitung führte zu einer FIDRES von 0,1 Hz/pt.

2. Die titrationsabhängigen ^1H - bzw. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -Spektrenreihen wurden auf der DRX 200 Anlage vermessen (siehe die Kapitel 7.3.1 bis 7.4). Zu einer genauen Ermittlung der Kopplungskonstanten wurden ausgewählte Proben auch auf dem DRX 500 untersucht.

Die Aufnahme von Protonenspektren in H₂O oder im Mischsolvens H₂O/D₂O 9/1 erfordert die Unterdrückung des Wasserpeaks. Für diesen Zweck wurde die Vorsättigungsmethode (*presaturation*) verwendet [259], die im Bruker-Pulsprogramm *zgpcpr* implementiert ist. Typische Einstellungen auf dem DRX 200 Spektrometer waren p19 = 60 dB, d1 = 2 s und rg = 32.

7.3.1 Einzelproben-NMR-Titrationsen

Die Zusammensetzung aller NMR-Einzelproben wurde in der Excel-Arbeitsmappe „nmr-plan.xls“ vorausgeplant. Wie in Kapitel 2.3.7 erläutert, lässt sich auf diese Weise eine hochpräzise Kontrolle von pH und Ionenstärke verwirklichen. Typische Parameter der Einzelproben werden in Tabelle 7.3 aufgeführt.

Titrationvorschrift	#1	#2	#3
Probevolumen	1,00 ml	3,00 ml	3,00 ml
Ligandkonzentration	0,05 M (0,1 M ^b)	0,02 M	0,02 M
pH-Einstellung mit	1 M DCIO ₄ 1 M NaOD	0,1 M/2 M HNO ₃ 0,1 M NaOH	0,1 M/2 M HNO ₃ 0,1 M NaOH
Referenzsubstanz	ca. 1 mM DSS	0,3 mM DSS	0,3 mM DSS
Gesamtionenstärke, eingestellt mit	$I \approx 0,05\text{-}0,2$ M nicht kontrolliert	$I = 0,1$ M 0,2 M NaNO ₃	$I = 0,1$ M 0,2 M NaNO ₃
D ₂ O-Inhalt	100%	10% (0,30 ml)	kein (100% H ₂ O)
Temperatur	22 ± 1 °C	22 ± 1 °C	22 ± 1 °C
Elektrodenkalibration	Pufferlösungen in H ₂ O	Pufferlösungen in H ₂ O	Blanktitration bei $I = 0,1$ M in H ₂ O
Benutzte pH-Skale	pH ^D	pH ^D	pH ^C
Charakterisierte Verbindungen	alle außer 4 und 8	8, 9, 10, 11 und 12	1

Tabelle 7.3: Vorschriften zur Erstellung von Einzelproben für Spektralanalyse (#1) und zur NMR-Titration (#2 und #3). ^b für Ammonium-Glufosinat **6a**

7.3.2 „Elektrodenlose“ NMR-Titrationsen bei $I = 1$ M

Die theoretischen Grundlagen dieser neu eingeführten Methode wurden in Kapitel 3.4 diskutiert. Die am Anfang alkalische Probelösung enthält folgende Komponenten:

die zu untersuchende Substanz: H_nL

20 mM

NMR-Indikatormoleküle:	NaH ₂ PO ₄ 16	5,1 mM
	Essigsäure 18	2,0 mM
	Chloressigsäure 19	3,3 mM
	Dichloressigsäure 20	3,1 mM
	Tris 21	2,0 mM
zur Einstellung von pH ≈ 12:	NaOH	ca. 100 mM (je nach H _n L)
zur Einstellung von <i>I</i> = 1,00 M:	NaNO ₃	ca. 800 mM
zum Lock des Spektrometers:	10% D ₂ O.	

Die Konzentration aller Komponenten wird am Excel-Datenblatt „nmr-plan.xls“ so berechnet, dass die einzustellenden Soll-pH-Wert und Soll-Ionenstärke genau erreicht werden.

0,6 ml der obigen Probelösung wird in ein NMR-Röhrchen gefüllt. Bis zum Erreichen von 0,08 ml Zugabevolumen ($\text{pH}^{\text{c,D}} \approx 2$) wurde Titrator „A“ (1,0 M HNO₃, 1,5 M NaNO₃ in H₂O/D₂O 9/1) in 0,003 ml Schritten dosiert. Nach jeder Zugabe wird ein 200 MHz-¹H-Spektrum und ein 81 MHz ³¹P{¹H}-Spektrum aufgenommen. Der jeweilige $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Wert der Lösung wird aus $\langle d \rangle$ des entsprechenden NMR-Indikators berechnet. Niedrigere $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Werte werden durch Zugabe vom Titrator „B“ (2 M HNO₃ in H₂O/D₂O 9/1) erreicht. In elektrodenlosen Titrationen werden $\text{pK}^{\text{c,D}}$ -Werte bestimmt (siehe Kapitel 2.2.4).

7.4 Multinukleare NMR-kontrollierte Titration der 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure (5)

Das Protolyseverhalten der Verbindung **5** wurde im Rahmen einer NMR-kontrollierten Titration studiert. Der schematische Aufbau der benutzten Anlage wird in Abbildung 7.2 dargestellt. Die Durchführung der Messung wird im Folgenden in Kurzform erläutert.

Die potentiometrische Titrationsanlage besteht aus der Motorkolbenbürette T200 \mathfrak{R} , pH-Meter CG 841 \wp (Schott), einem Magnetrührer T120 \oplus (Schott) und Titrationsgefäß \otimes (Eigenentwurf [15]) mit der Einstabmesskette „Blueline 16“ und dem Temperaturfühler PT1000 (beide von Schott).

Die konzentrationsbezogene Kalibration der Einstabmesskette erfolgt durch eine Blanktitration ($\text{pK}_w^{\text{c}} = 13,92$ für 21,0 °C [61]), die durch den IBM-kompatiblen Rechner \mathfrak{S} (mit einem i486-Prozessor) gesteuert wird.

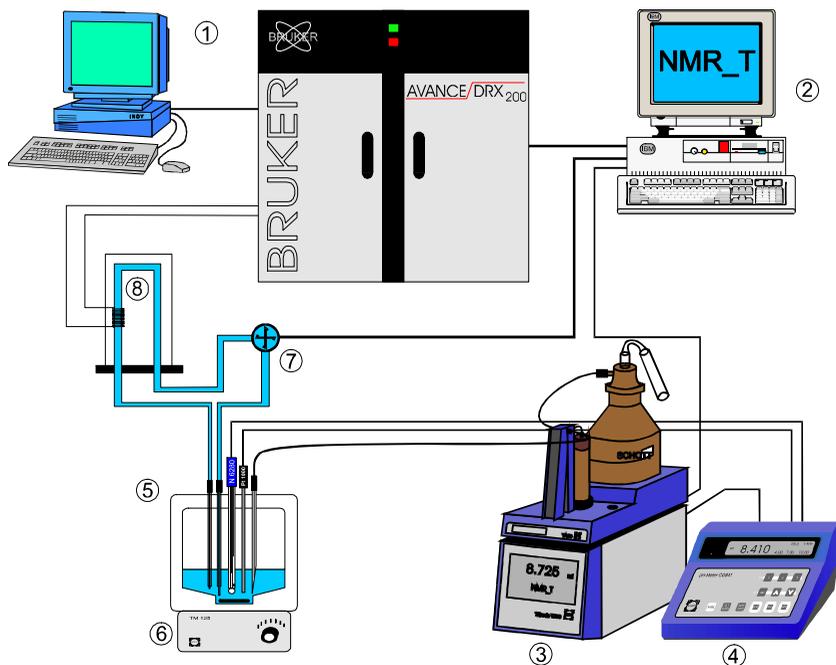


Abbildung 7.2: Schematischer Aufbau der von S. Hermens verbesserten Anlage zu NMR-kontrollierten Titrationsen [175]

Als Nächstes wird ein LC-Probenkopf \cap (umgebauter 5 mm QNP-Kopf von Bruker) in das DRX 200 Spektrometer \otimes eingebaut. Die Titrationsanlage wird dann mit der zu titrierenden Lösung gefüllt und durch die peristaltische Pumpe \emptyset (Reichelt Chemie Technik, Nr. 90513) über das 3-mm-Schlauchsystem in den Durchfluss-Probenkopf geleitet.

Die Zugabe des Titrators NaOH und die anschließende pH^f-Messung erfolgt in 127 Schritten von jeweils 0,20 ml, während für jeden zweiten Dosierungsschritt mit dem AU-Programm *xau_sfmrm* [175] ein ^1H -Spektrum und ein $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -Spektrum aufgenommen werden. Die Protonenspektren werden im spektralen Bereich von 3,54 bis $-1,90$ ppm registriert, somit kann der störende Wasserpeak eliminiert werden. Die experimentellen Bedingungen dieser Messung sind in Tabelle 7.4 zusammengefasst.

Temperatur, Lösungsmittel	21,0 ± 0,1 °C, H ₂ O
Start- und Endvolumen in der Vorlage	80,00 ml und 111,79 ml
Einwaage an Liganden	96,7 mg
Effektive Einwaage an Liganden	94,85 mg (0,6237 mmol)
Start und Endkonzentration an Liganden	7,80 mM und 5,58 mM
Zusätze in der Vorlage	2,4256 mmol HNO ₃ 8,00 mmol NaNO ₃ 0,1 mmol DSS 24
Titratoren	0,099 M NaOH
Anzahl der Titrationsschritte und Spektren	128 und 64
Registrierte Spektren	¹ H (bei 202,13 MHz) und ³¹ P{ ¹ H} (bei 81,02 MHz)
Referenzierung der Spektren	Internes DSS 25 für ¹ H, externe 85%ige H ₃ PO ₄ für ³¹ P{ ¹ H}

Tabelle 7.4: Experimentelle Parameter für die 200-MHz NMR-kontrollierte Titration von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5**

7.5 Auswertung und Abbildung der Spektren

Die Analyse, Simulation und iterative Berechnung der NMR-Parameter aller ¹H- und ³¹P-Spektren erfolgten mit dem Programm WINDAISEY 4.0 der Firma Bruker Analytik GmbH.

Die gemessenen und iterierten Einzelspektren wurden entweder in WINNMR 6.0 der Bruker Analytik GmbH abgebildet oder mit Hilfe des Importfilters von C. Pfaff [173] in MICROSOFT EXCEL überführt und dort bearbeitet. Zur Visualisierung der pH-abhängigen Spektrenreihen kam das Programm MULTIPLE NMR GRAPHICS von C. Pfaff [173] zum Einsatz.

Die hieraus resultierenden $\langle d \rangle = f(\text{pH})$ bzw. $\langle J \rangle = f(\text{pH})$ Messkurven wurden mit den in dieser Arbeit entwickelten Programmen MULTINMRPK und NMRMICROPK ausgewertet. Die Messpunkte und die Fitkurven wurden anschließend in MICROSOFT EXCEL abgebildet.

8 DARSTELLUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE

8.1 Vorversuche zu den „elektrodenlosen“ Titrationsen

8.1.1 Auswahl der NMR-Indikatormoleküle

Nach den Überlegungen in Kapitel 3.4.2 wurden zur Abdeckung der ganzen $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Skala die NMR-Indikatormoleküle Dichloressigsäure **20**, Chloressigsäure **19**, Essigsäure **18**, Dinatriumhydrogenphosphat **16** und TRIS **21** ausgewählt. Um diese Verbindungen als $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Sonden einsetzen zu können, sollen zuerst deren Indikatorparameter ($\text{pK}^{\text{c,D}}$, d_{HL} und d_{L}) ermittelt werden. Im Fall der sehr aciden Dichloressigsäure verlangt diese Aufgabe ein Spezialverfahren.

8.1.2 NMR-spektroskopische Bestimmung des pK_1 -Wertes von Histidin

In Kapitel 3.4.3 wurde eine neue Art der NMR-Titrationsen zur Bestimmung sehr kleiner pK -Werte ($\text{pK} < 2$) eingeführt. Zur Verifizierung dieser Methode wurde die erste Dissoziationskonstante von L-Histidin **13** durch Einzelproben-NMR-Titration in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1 bei $I = 1 \text{ M}$ ermittelt. Die unter 2 liegenden $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Werte wurden aus der Bilanzgleichung 3.16 berechnet, aber die Anzeigewerte der Glaselektrode wurden ebenfalls verzeichnet. In Abbildung 8.1 ist die chemische Verschiebung des Methynprotons in Abhängigkeit von beiden $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Werten aufgetragen. Aus dem Vergleich der beiden Datensätze geht hervor, dass die durch Glaselektrode indizierten $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Werte positive Abweichungen von der wahren Acidität der Lösung aufweisen.

Beide Datensätze wurden mit MULTINMRPK ausgewertet. Der somit ermittelte $\text{pK}_1^{\text{c,D}}$ -Wert stimmt mit den für $I = 1 \text{ M}$ publizierten Literaturwerten gut überein (siehe Tabelle 8.1). Diese Konstante liegt an der Grenze der verlässlichen pK -Bestimmung mittels Potentiometrie.

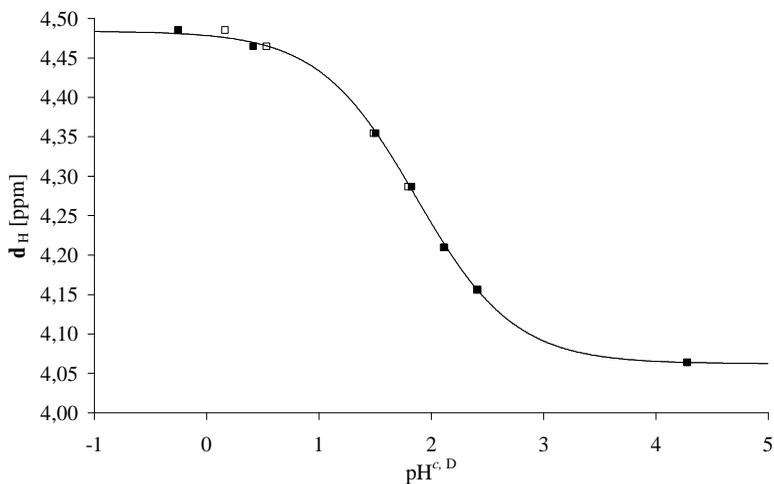


Abbildung 8.1: Bestimmung des pK_3 -Wertes von Histidin **13** durch 200-MHz ^1H -NMR-Titration (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 1$ M, $T = 22$ °C). $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Werte aus Konzentrationsbilanzen (□) und Anzeigewerte der Glaselektrode (■)

pK_1	Messbedingungen	Methode	Ref.
1,83 (2) ^d	22 °C, 1,00 M NaNO_3 , 10% D_2O	^1H NMR, $\text{pH}^{\text{c,D}}$	diese Arbeit
1,86 (2)	22 °C, 1,00 M NaNO_3 , 10% D_2O	^1H NMR, Glaselektrode	diese Arbeit
1,82	25 °C, 1,00 M NaNO_3	potentiometrische Titr.	[261]
1,82	20 °C, 1,0 M NaClO_4	potentiometrische Titr.	[262]

Tabelle 8.1: Der pK_1 -Wert von Histidin **13** aus eigener Messung und der Literatur

^d(in Klammern wird jeweils die Standardabweichung der letzten Ziffer angegeben, z. B. $1,83 \pm 0,02$)

8.1.3 NMR-spektroskopische pK -Bestimmung der Dichloressigsäure

Nach der Feststellung der Funktionstüchtigkeit der Methode wurde sie zur pK -Bestimmung des Indikatormoleküls Dichloressigsäure **20** angewandt. Die chemische Verschiebung des CH-Protons ist in Abbildung 8.2 gegen den wahren $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Wert bzw. den Anzeigewert der Glaselektrode aufgetragen. Hierbei wird wieder der positive Säurefehler der Elektrodenfunktion beobachtet.

Die berechnete Dissoziationskonstante ist in Tabelle 8.2 angeführt. Hier gibt es bereits einen wesentlichen Unterschied in der Hinsicht, ob die wahren $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Werte oder die

Anzeigewerte der Glaselektrode in die Auswertung einbezogen werden. In Tabelle 8.2 werden auch einige Literaturwerte aufgelistet. In diesen Messungen wurden allerdings keine Massnahmen zur präzisen Kontrolle der Ionenstärke oder zur Steigerung der Verlässlichkeit sehr acider pH-Werte getroffen.

Die Auswertung der ^1H -NMR-Titrationskurve liefert auch die Grenzverschiebungen $d_L = 6,0673 \pm 0,0008$ ppm und $d_{HL} = 6,328 \pm 0,001$ ppm. Mit Kenntnis dieser „Indikatorparameter“ kann die aktuelle chemische Verschiebung der Dichloressigsäure, $\langle d \rangle$ zur Berechnung des tatsächlichen $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Wertes bei 1 molarer Ionenstärke verwendet werden.

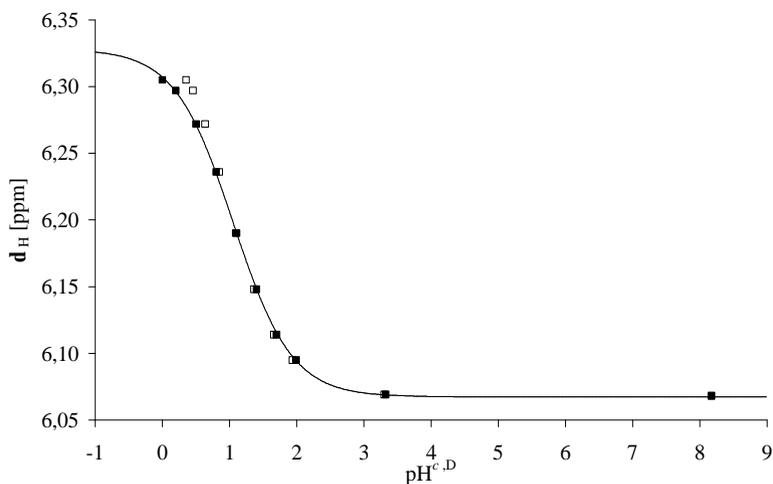


Abbildung 8.2: NMR-spektroskopische pK -Bestimmung für Dichloressigsäure **20** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 1$ M, $T = 22$ °C) $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Werte aus Konzentrationsbilanzen (■) und Anzeigewerte der Glaselektrode (□)

pK_1	Messbedingungen	Methode	Ref.
0,93 (1)	22 °C, 1,00 M NaNO_3 , 10% D_2O	^1H NMR, Anzeigewerte	diese Arbeit
1,06 (1)	22 °C, 1,00 M NaNO_3 , 10% D_2O	^1H NMR, Konz.Bilanzen	diese Arbeit
1,00	25 °C, ≈ 0 M Ionenstärke	^1H NMR	[263]
1,00	25 °C, 0,4 M NaNO_3	^1H NMR	[264]
1,3	20 °C, 1,00 M NaClO_4	Pot. Tit.	[265]

Tabelle 8.2: Der pK -Wert von Dichloressigsäure **20** aus eigener Messung und der Literatur

8.1.4 Ermittlung der Indikatorparameter weiterer Sondenmoleküle

Wie in Kapitel 8.1.1 bereits angedeutet, müssen die pK-Werte bzw. die Grenzwerte der chemischen Verschiebungen aller Indikatormoleküle in einer getrennten Messreihe ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden NMR-Einzelproben mit der in Kapitel 7.3.2 beschriebenen Zusammensetzung angefertigt. Um den Einfluss der Anwesenheit eines zu untersuchenden Liganden H_nL auf das Verhalten der Indikatormoleküle simulieren zu können, enthielten diese Lösungen auch 25 mM Ammonium-Glufosinat **6a**.

Die über 2 liegende $pH^{c,D}$ -Werte der Probelösungen wurden mit der Glaselektrode erfasst, während acidere $pH^{c,D}$ -Werte aus $\langle d_H \rangle$ von Dichloressigsäure **20** berechnet wurden.

Die Auswertung der $\langle d_H \rangle$ vs. $pH^{c,D}$ -Profile führte zu den in Tabelle 8.3 aufgelisteten Resultaten. Wie Abbildung 8.3 zeigt, kann mit diesen Indikatormolekülen eine lückenlose Erfassung des $pH^{c,D}$ -Wertes außer dem Intervall 10,0 bis 11,0 erfolgen (in diesem Intervall könnte Methylamin mit $pK \approx 10,8$ eingesetzt werden).

Zu Vergleichszwecken wurden die Dissoziationskonstanten dieser Verbindungen auch in 100% H_2O bei $I = 1,0$ M ($NaNO_3$) und $T = 22$ °C durch potentiometrische Titrations bestimmt (für weitere Messbedingungen siehe Vorschrift #3 in Tabelle 7.2). Es ist ein linearer Zusammenhang zwischen den $pK^{c,D}$ -Werten NMR und den pK^c -Werten aus Potentiometrie zu verzeichnen:

$$pK^{c,D} = (0,004 \pm 0,026) + (1,013 \pm 0,003) \cdot pK^c \quad (8.1)$$

Die gute Korrelation ($r^2 = 0,9999$) erlaubt, die aus späteren „elektrodenlosen“ NMR-Titrations resultierenden Aciditätskonstanten auf das Medium 100% H_2O umzurechnen.

pK	Pot. Titr. (pK^c)	NMR ($pK^{c,D}$)	d_L [ppm]	d_{HL} [ppm]
Dichloressigsäure 20	–	$1,06 \pm 0,01$	$6,0673 \pm 0,0008$	6,328 (1)
Chloressigsäure 19	2,63 (2)	2,656 (9)	4,0645 (5)	4,2847 (7)
Essigsäure 18	4,62 (1)	4,648 (7)	1,9171 (4)	2,0924 (3)
Phosphat 16	11,26 (10)	–	–	–
	6,48 (2)	6,487 (8)	3,954 (3)	1,370 (4)
	1,77 (10)	1,63 (7)	1,370 (4)	1,10 (1)
TRIS 21	8,54 (2)	8,578 (6)	3,5151 (6)	3,7421 (2)

Tabelle 8.3: Indikatorparameter der $pH^{c,D}$ -Sondenmoleküle zu „elektrodenlosen“ NMR-Titrations

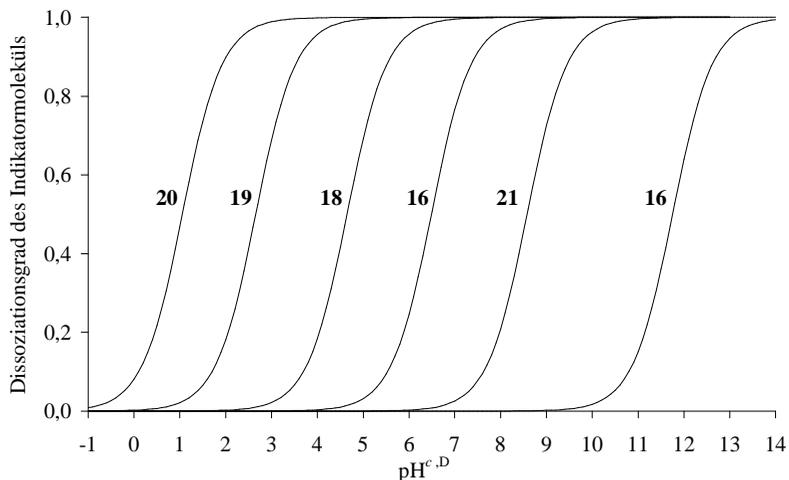


Abbildung 8.3: Abdeckung der ganzen $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Skala mit NMR-Indikatormolekülen

8.2 Aminophosphinophosphonsäuren

8.2.1 [*N*-(*P*-methylphosphinoylmethyl)-*N*-methyl]aminomethanphosphonsäure (**1**)

8.2.1.1 Dissoziationskonstanten

Zur Bestimmung der $\text{p}K^{\text{c}}$ -Werte von **1** wurden sieben potentiometrische Titrations nach Vorschrift #1 in Tabelle 7.2 durchgeführt. Wegen der geringen Substanzmenge (ca. 30 mg), die zur Verfügung stand, wurden aus einer Einwaage mehrere potentiometrische Titrationskurven aufgenommen [176]. In Abbildung 8.4 ist eine repräsentative Messkurve ersichtlich, während die resultierende Molenbruchverteilung ist Abbildung 8.5 zu entnehmen.

Die $\text{p}K$ -Werte im Mischsolvens $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1 wurden durch eine elektrodenlose $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ -NMR-Titration ermittelt (siehe Kapitel 8.2.1.4). Wie die Standardabweichungen der Dissoziationskonstanten in Tabelle 8.4 verdeutlichen, ließ sich $\text{p}K_2$ nach diesem Spezialverfahren um mehr als eine Größenordnung genauer bestimmen als mit Potentiometrie. Es wurde auch festgelegt, dass $\text{p}K_1$ definitiv einen negativen Wert besitzt.

pK_1	pK_2	pK_3	pK_4	Typ	T [°C]	I [M]	Medium	c_L^{tot} [mM]	Mth. Ref.
< 0,8	0,8 (2)	5,38 (1)	9,73 (2)	pK^c	25	0,1 NaNO ₃	H ₂ O	4-12	Pot. d.A.
< 0	0,69 (1)	5,22 (2)	≈ 9,7	$pK^{c,D}$	22	1 NaNO ₃	10% D ₂ O	20	¹ H d.A.

Tabelle 8.4: Makroskopische Dissoziationskonstanten von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-methylaminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$. d.A.: diese Arbeit

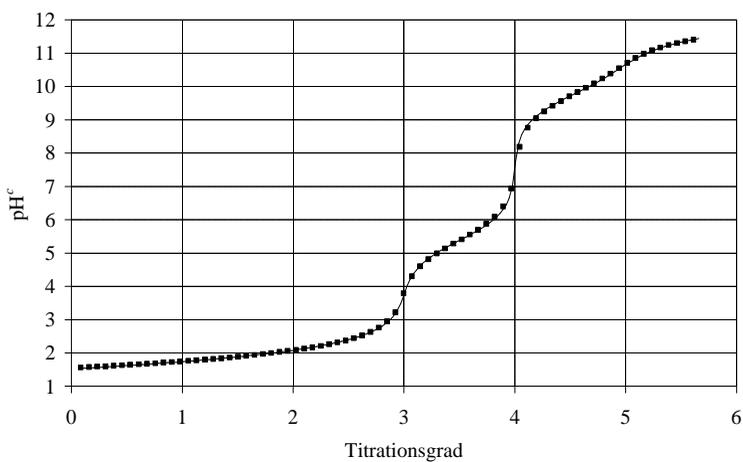


Abbildung 8.4: Experimentelle und berechnete Titrationskurven von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-methylaminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$ ($I = 0,1 \text{ M}$, $T = 25 \text{ °C}$)

Zu diesem Zweck wurden in der hier vorliegenden Arbeit sieben NMR-Einzelproben in 100% H₂O nach Vorschrift #3 aus Tabelle 7.3 erstellt. Für diese Probelösungen bleiben die unter gleichen Bedingungen mittels Potentiometrie erhaltenen pK^c-Werte gültig.

Die mit MULTINMRPK berechneten ionenspezifischen NMR-Parameter sind in Tabelle 8.5 aufgelistet. Abbildung 8.8 zeigt die bei 200,13 MHz gemessene ¹H-NMR-Spektrenreihe als Stackplot. Aus den Abbildungen 8.9 und 8.10 ist ersichtlich, dass alle beobachteten Spins auf die Dissoziation der tertiären Ammoniumgruppe reagieren, was für Aminomethanphosphonsäuren typisch ist [15]. Bei pH 5 zeigen die Spins der –CH₂–P⁶O₃H₂-Gruppe, während bei pH<1 jene der –CH₂³–P²(O)(CH₃)¹(OH)-Gruppe größere Δ*d*-Werte. Mit diesen Befunden steht die folgende Dissoziationsabfolge im Einklang:

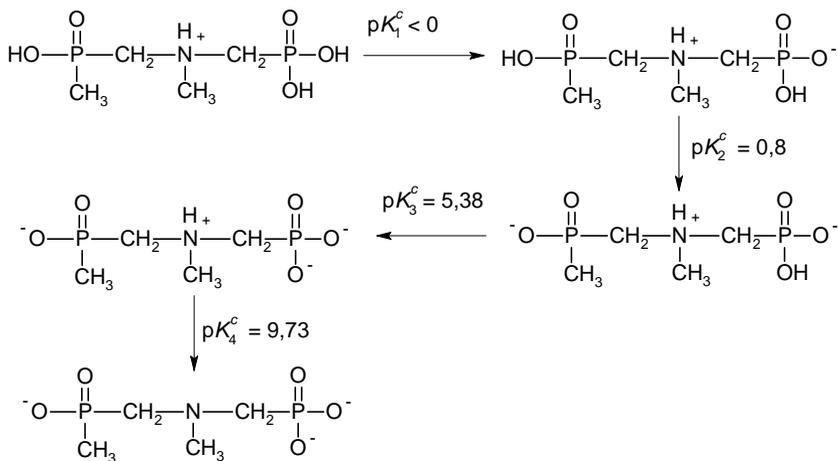


Abbildung 8.7: Das nach Δ*d*-Werten abgeleitete Dissoziationsschema von [*N*-(*P*-Methylphosphinoyl-methyl)-*N*-methyl]aminomethanphosphonsäure **1** (0,02 M in H₂O, *I* = 0,1 M, *T* = 22 °C)

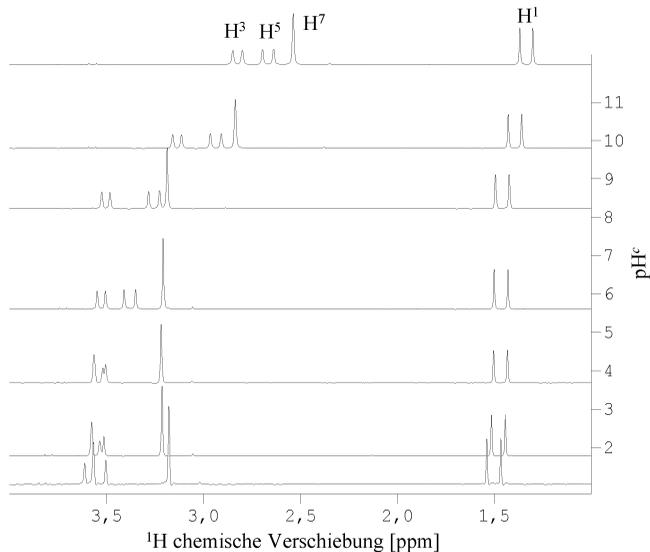


Abbildung 8.8: Mit MULTIPLE NMR GRAPHICS [173] dargestellter Stackplot der 200,13 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrereihe von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-methyl}]\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$ (0,02 M in H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$)

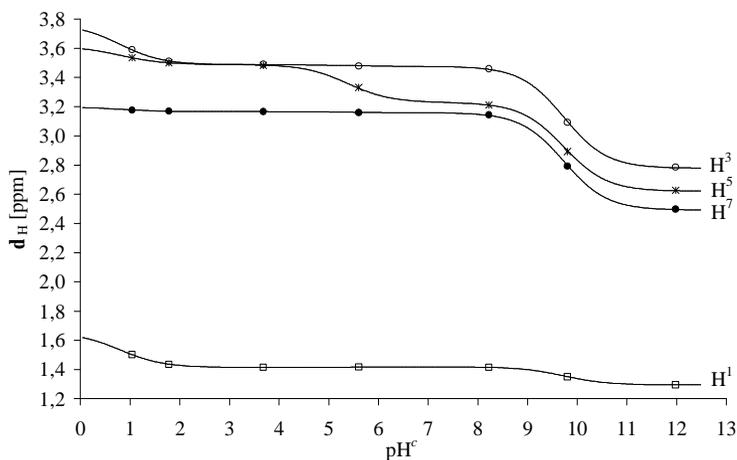


Abbildung 8.9: 200,13 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Titrationskurven von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-methyl}]\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$ (0,02 M in H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$)

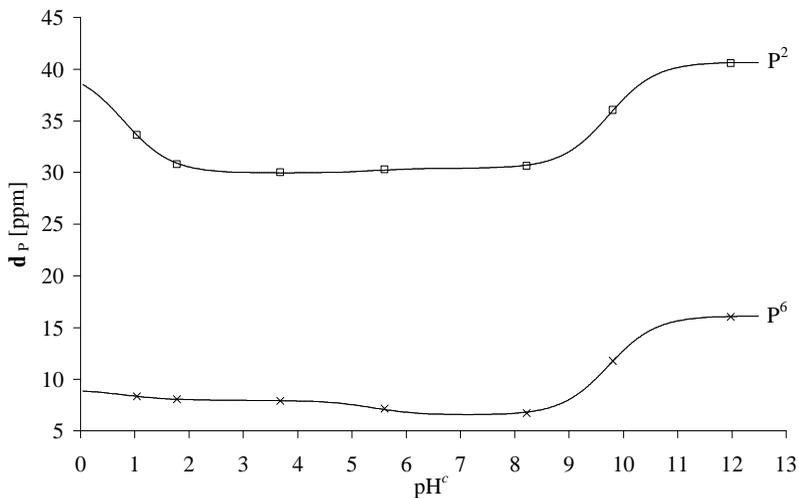


Abbildung 8.10: 81,02 MHz ^{31}P -NMR-Titrationskurven von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-methyl}]\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$ (0,02 M in H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$)

Parameter		H_3L	$\Delta_{\text{H}_3\text{L}}^{\text{H}_2\text{L}^+}$	H_2L^-	$\Delta_{\text{H}_2\text{L}^-}^{\text{HL}^{2-}}$	HL^{2-}	$\Delta_{\text{HL}^{2-}}^{\text{L}^{3-}}$	L^{3-}
d_{H}	d_1	1,654 (7)	-0,241 (8)	1,414 (2)	0,004 (3)	1,418 (2)	-0,124 (3)	1,294 (2)
d_{H}	d_3	3,766 (7)	-0,279 (8)	3,487 (2)	-0,011 (3)	3,476 (2)	-0,698 (3)	2,778 (2)
d_{H}	d_5	3,615 (7)	-0,126 (8)	3,489 (2)	-0,261 (3)	3,228 (2)	-0,608 (3)	2,620 (2)
d_{H}	d_7	3,199 (7)	-0,033 (8)	3,166 (2)	-0,006 (3)	3,159 (2)	-0,668 (3)	2,491 (2)
d_{P}	d_2	40,00 (9)	-10,06 (9)	29,94 (2)	0,46 (3)	30,41 (2)	10,28 (4)	40,68 (3)
d_{P}	d_6	9,01 (9)	-1,06 (9)	7,95 (2)	-1,42 (3)	6,53 (2)	9,60 (4)	16,13 (3)
$^2J_{\text{PH}}$	J_{12}	-14,9 (3)	0,6 (3)	-14,30 (7)	0,03 (9)	-14,27 (7)	0,88 (9)	-13,39 (8)
$^2J_{\text{PH}}$	J_{13}	-9,0 (3)	0,2 (3)	-8,81 (7)	0,42 (9)	-8,39 (7)	-1,39 (9)	-9,78 (8)
$^2J_{\text{PH}}$	J_{56}	-14,0 (3)	1,8 (3)	-12,26 (7)	0,91 (9)	-11,35 (7)	-0,11 (9)	-11,46 (8)

Tabelle 8.5: Mit MULTINMRPK berechnete NMR-Parameter d [ppm] und J [Hz] der Protolysespezies von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-methyl}]\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$ (0,02 M in H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$)

8.2.1.4 „Elektrodenlose“ $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ -NMR-Titration bei 1 M Ionenstärke

Die „elektrodenlose“ Titration von **1** wurde in der in Kapitel 7.3.2 beschriebenen Weise durchgeführt. Aus dem in Abbildung 8.12 dargestellten Stackplot geht hervor, dass in den Bereichen $4 < \text{pH}^{\text{c,D}} < 6$ bzw. $8 < \text{pH}^{\text{c,D}} < 11$ eine unerwartete Verbreiterung der Resonanzlinien auftritt. Die pK -Werte der Verbindung **1** fallen gerade in diese Intervalle (siehe Tabelle 8.4). Das gleiche Verhalten weisen die Indikatormoleküle in ihren eigenen Pufferbereichen auf, obwohl in den anderen elektrodenlosen Titrationen (Kapitel 8.1.4 und 8.2.2.3) dafür kein Anzeichen gibt. Die Annahme liegt nahe, dass das dynamische Gleichgewicht zwischen den betreffenden Protolysespezies von **1** (und vermutlich auch den Indikatormolekülen) in der NMR-Zeitskala verlangsamt wird.

In der NMR-Titration von **1** bei $I = 0,1 \text{ M NaNO}_3$ wird keine Linienverbreiterung beobachtet (siehe Abbildung 8.8), so hängt der Effekt entweder mit dem erhöhten Na^+ -Gehalt der Lösung, oder mit den Indikatormolekülen zusammen. Die letztere Alternative wird nach zwei weiteren Befunden ausgeschlossen. Erstens, die in Tabelle 8.3 angeführten Grenzverschiebungen der Sondenverbindungen verändern sich nur geringfügig ($\pm 0,002 \text{ ppm}$) in der „elektrodenlosen“ Titration von **1**, d.h. die Indikatormoleküle unterliegen in erster Linie Säure-Base-Gleichgewichten. Zweitens, die Einröhrchen-NMR-Titration von **1** bei $I = 1 \text{ M NaNO}_3$ in *Abwesenheit* der Indikatormoleküle zeigt die gleiche Verbreiterung, somit wird eine Wechselwirkung (vielleicht sogar eine schwache Komplexierung) mit den Natriumionen wahrscheinlich. Dieses Thema wird in Kapitel 8.2.3 ausführlicher diskutiert.

Die pH-abhängigen d_{H} - und d_{P} -Messkurven sind den Abbildungen 8.13 und 8.14 zu entnehmen. Infolge der erheblichen Peakverbreiterung konnte der letzte Dissoziationschritt nur näherungsweise ausgewertet werden. Die mit MULTINMRPK erhaltenen pK -Werte sind in Tabelle 8.4, die NMR-Parameter der Protolysespezies in Tabelle 8.6 aufgelistet.

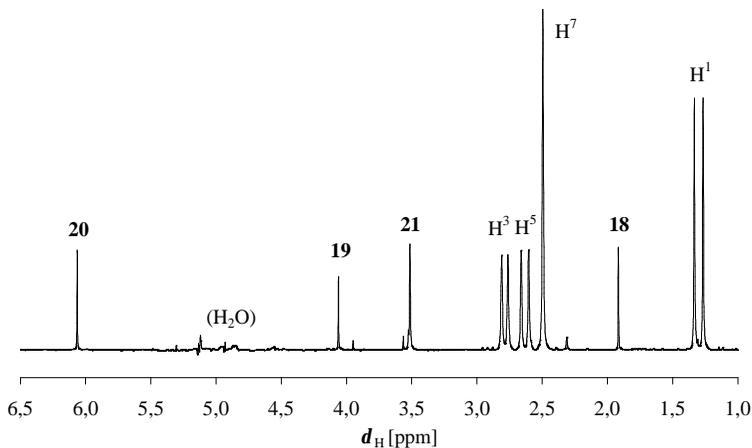


Abbildung 8.11: Das erste 200,13 MHz ^1H -NMR-Spektrum der „elektrodenlosen“ Titration von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-methyl}]\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$ ($\text{pH}^{\text{D}} = 12,20$, $0,02 \text{ M}$ in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O } 9/1$, $I = 1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$). H^1 , H^3 , H^5 und H^7 bezeichnen die Protonen von $\mathbf{1}$, die anderen Peaks stammen von der NMR-Indikatormolekülen Dichloressigsäure $\mathbf{20}$, Chloressigsäure $\mathbf{19}$, TRIS $\mathbf{21}$ und Essigsäure $\mathbf{18}$

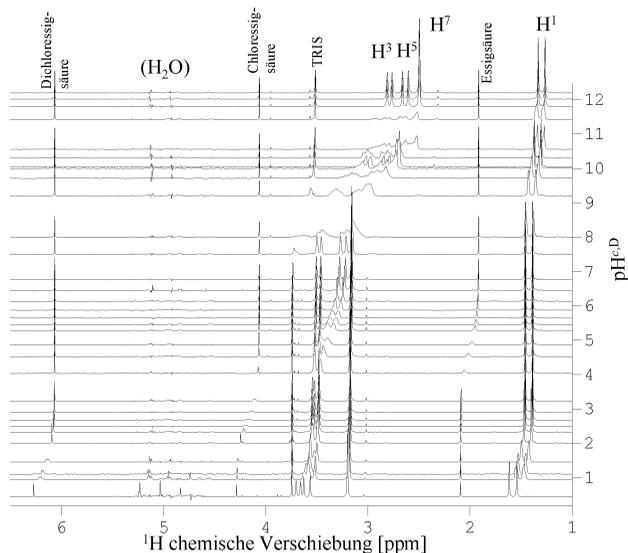


Abbildung 8.12: Mit MULTIPLE-NMR-Graphics [173] dargestellter Stackplot der 200,13 MHz ^1H -NMR-Spektrenreihe von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-methyl}]\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$ ($0,02 \text{ M}$ in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O } 9/1$, $I = 1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$)

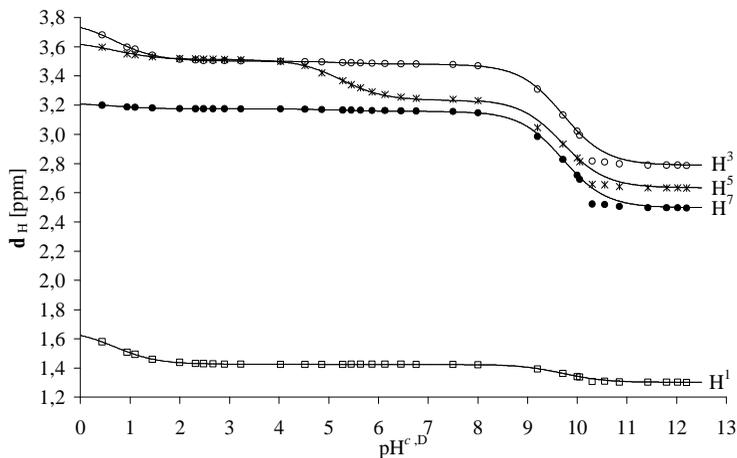


Abbildung 8.13: 200,13 MHz ^1H -NMR-Titrationskurven von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-methyl}]\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$ (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 1$ M, $T = 22$ °C)

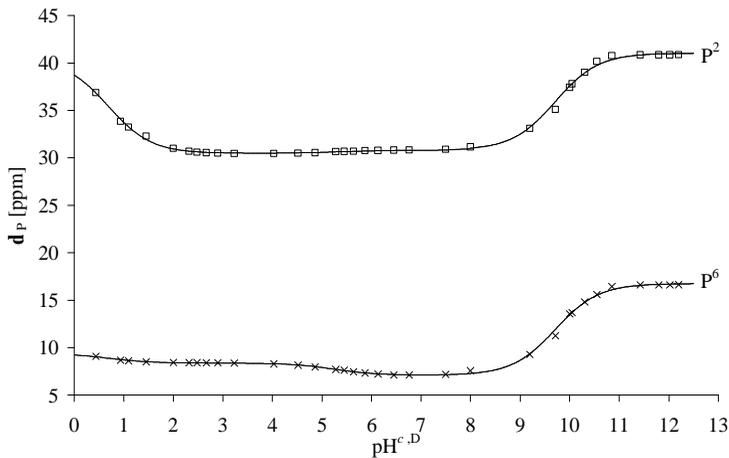


Abbildung 8.14: 81,02 MHz ^{31}P -NMR-Titrationskurven von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-methyl}]\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{1}$ (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 1$ M, $T = 22$ °C)

Parameter		H ₃ L	$\Delta_{\text{H}_3\text{L}}^{\text{H}_2\text{L}^+}$	H ₂ L ⁻	$\Delta_{\text{H}_2\text{L}^-}^{\text{HL}^{2-}}$	HL ²⁻	$\Delta_{\text{HL}^{2-}}^{\text{L}^{3-}}$	L ³⁻
d_H	d₁	1,663 (7)	-0,238 (8)	1,425 (2)	0	1,425 (2)	-0,124	1,301
d_H	d₃	3,778 (8)	-0,277 (8)	3,501 (2)	-0,020 (3)	3,481 (2)	-0,692	2,789
d_H	d₅	3,636 (7)	-0,122 (7)	3,513 (2)	-0,272 (3)	3,241 (3)	-0,607	2,634
d_H	d₇	3,213 (6)	-0,039 (6)	3,174 (2)	-0,014 (3)	3,160 (2)	-0,663	2,497
d_P	d₂	40,4 (2)	-9,9 (2)	30,46 (2)	0,37 (3)	30,83 (2)	10,20	41,03
d_P	d₆	9,39 (6)	-1,02 (7)	8,37 (2)	-1,27 (3)	7,10 (2)	9,64	16,74
² J _{PH}	J ₁₂	ca. -14,8	ca. 0,5	-14,31	0,05	-14,26	0,88	-13,38
² J _{PH}	J ₁₃	ca. -8,7	ca. 0,1	-8,55	0,12	-8,43	-1,10	-9,53
² J _{PH}	J ₅₆	ca. -12,6	ca. 0,1	-12,48	1,20	-11,28	-0,23	-11,51

Tabelle 8.6: Mit MULTINMRPK berechnete NMR-Parameter **d** [ppm] und **J** [Hz] der Protolysespezies von [*N*-(*P*-Methylphosphinomethyl)-*N*-methyl]aminomethanphosphonsäure **1** (0,02 M in H₂O/D₂O 9/1, *I* = 1 M, *T* = 22 °C)

8.2.2 [*N*-(*P,P*-Dimethylphosphinoylmethyl)-*N*-(*P*′-methylphosphinoylmethyl)]aminomethanphosphonsäure (**2**)

8.2.2.1 Dissoziationskonstanten

Verbindung **2** stand ebenfalls in kleiner Substanzmenge zur Verfügung (ca. 50 mg). Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten in H₂O erfolgte durch sieben potentiometrische Titrationskurven nach Vorschrift #1 in Tabelle 7.2. Eine Titrationskurve ist in Abbildung 8.4 dargestellt. Die p*K*-Werte in H₂O/D₂O 9/1 wurden durch eine „elektrodenlose“ ¹H/³¹P-NMR-Titration ermittelt (siehe Kapitel 8.2.1.4).

Die ermittelten Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 8.4 zusammengefasst.

p <i>K</i> ₁	p <i>K</i> ₂	p <i>K</i> ₃	p <i>K</i> ₄	Typ	<i>T</i> [°C]	<i>I</i> [M]	Medium	<i>c</i> _L ^{tot} [mM]	Methode
< 1	1,2 (1)	3,18 (2)	7,93 (1)	p <i>K</i> ^C	25	0,1 NaNO ₃	H ₂ O	4-10	Pot. Tit.
< 0	1,29 (3)	3,09 (1)	7,72 (2)	p <i>K</i> ^{C,D}	22	1 NaNO ₃	10% D ₂ O	20	¹ H/ ³¹ P

Tabelle 8.7: Dissoziationskonstanten von [*N*-(*P,P*-Dimethylphosphinoylmethyl)-*N*-(*P*′-methylphosphinoylmethyl)]aminomethanphosphonsäure **2**

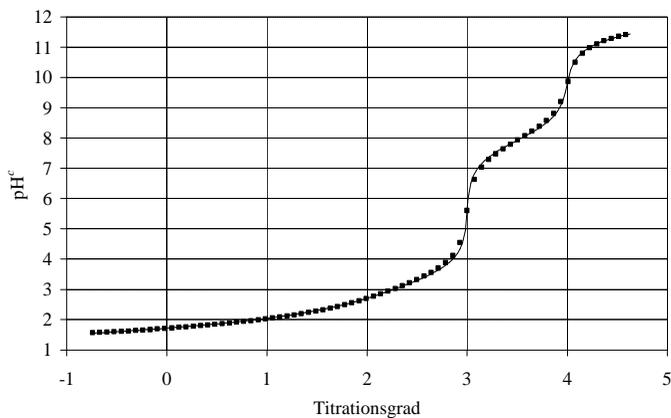


Abbildung 8.15: Experimentelle und berechnete Titrationskurven von $[N-(P,P\text{-Dimethylphosphinoylmethyl})-N-(P'\text{-methylphosphinoylmethyl})\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{2}$ vs. 0,1 M NaOH ($I = 0,1 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

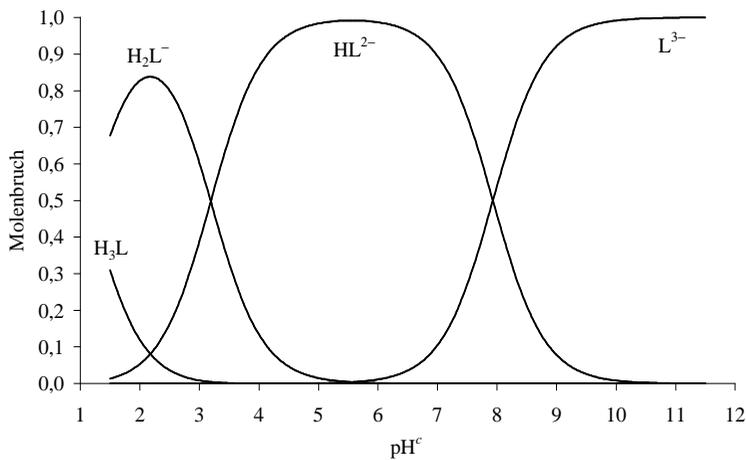


Abbildung 8.16: pH-abhängige Verteilung der Protolysespezies von $[N-(P,P\text{-Dimethylphosphinoylmethyl})-N-(P'\text{-methylphosphinoylmethyl})\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{2}$ ($I = 0,1 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

8.2.2.2 Zuordnung der ^1H -, $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ - und $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ -NMR-Spektren

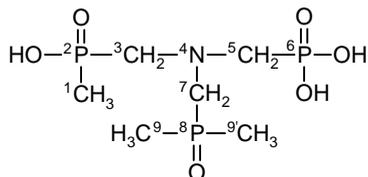


Abbildung 8.17: Durchnummerierung der spinaktiven Kerne von $[N-(P,P\text{-Dimethylphosphinoylmethyl})\text{-}N\text{-}(P'\text{-methylphosphinoylmethyl})\text{aminomethanphosphonsäure } 2$

Die Nummerierung der spinaktiven ^1H , ^{13}C und ^{31}P -Kerne von **2** ist Abbildung 8.17 zu entnehmen. Da es sich hierbei um eine neue Verbindung handelt, wurde die Zuordnung erst in der vorliegenden Arbeit getroffen. Zu diesem Zweck wurde eine 0,034 M Probe von **2** in D_2O mit dem Eigen- pH^{D} -Wert von 1,5 erstellt.

Zuerst werden die drei Singulets im $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ -Spektrum zugeordnet: bei 16 ppm resoniert die Phosphonogruppe (P^6), bei 41,5 ppm die *P*-Methylphosphinogruppe (P^2) und bei 56 ppm die Phosphinoxidgruppe (P^8) [20].

Das 500,13 MHz ^1H -Spektrum besteht aus fünf Dubletts infolge der direkten $^2J_{\text{PH}}$ -Kopplungen. Die Dubletts bei 1,60 ppm (Integral: 6H) und 1,42 ppm (Integral: 3H) gehören zu den H^9 bzw. H^1 Methylprotonen. Die Zuordnung der teilweise überlappenden Methylengruppen liegt nicht auf der Hand, kann aber auf Grund einer ^{31}P - ^1H -Korrelation getroffen werden (siehe Abbildung 8.18). Dieses 2D-Spektrum bestätigt auch die obige Zuordnung der Phosphorresonanzen. Die Zuordnung ist ferner konsistent mit einer Faustregel für $^2J_{\text{PH}}$ in der folgenden Verbindungsreihe: $|^2J_{\text{PH, Phosphonsäuren}}| > |^2J_{\text{PH, Phosphinsäuren}}| > |^2J_{\text{PH, Phosphinoxide}}|$. Aus der „elektrodenlosen“ NMR-Titration in Kapitel 8.2.2.3 geht hervor, dass sich die H^3 - und H^5 -Methyldubletts mit steigendem $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Wert sogar zweimal kreuzen und erst bei $\text{pH}^{\text{c,D}} > 8$ wohlseparierte Dubletts aufweisen.

Ein ^{13}C - ^1H -HMQC-Spektrum ermöglicht schließlich die Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen. Alle Ergebnisse der obigen Zuordnung seien in Tabelle 8.8 zusammengestellt.

Parameter	CH ₃ ¹	CH ₂ ³	CH ₂ ⁵	CH ₂ ⁷	CH ₃ ⁹
d_H	1,62	3,45	3,42	3,60	1,72
$^2J_{PH}$	-14,5	-8,2	-11,4	-5,8	-13,2
d_C	17,01	59,31	57,14	58,62	16,84
$^1J_{PC}$	94,3	99,9	146,7	73,9	69,4

Tabelle 8.8: Durch 2D-NMR-Experimente zugeordnete chemische Verschiebungen [ppm] und Kopplungskonstanten [Hz] von [*N*-(*P,P*-Dimethylphosphinoylmethyl)-*N'*-(*P'*-methylphosphinoylmethyl)]aminomethanphosphonsäure **2**

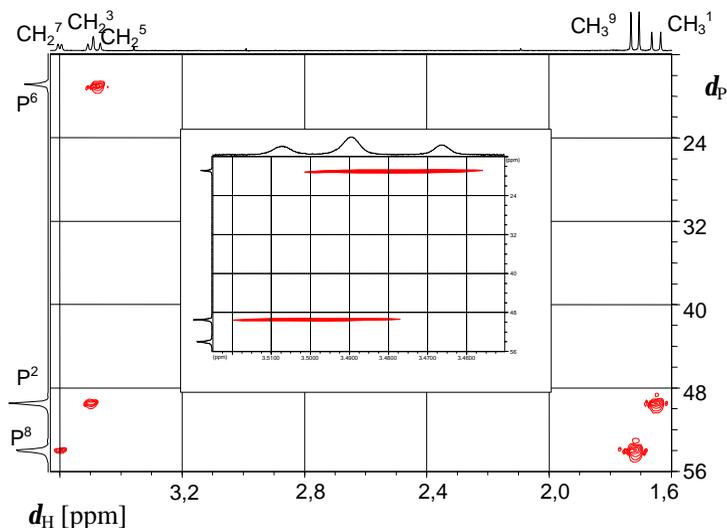


Abbildung 8.18: Ausschnitt und Vergrößerung des ^{31}P - ^1H -COSY-Spektrums von [*N*-(*P,P*-Dimethylphosphinoylmethyl)-*N'*-(*P'*-methylphosphinoylmethyl)]aminomethanphosphonsäure **2** (0,034 M in D_2O , $\text{pH}^{\text{D}} = 1,5$, $T = 22^\circ\text{C}$)

8.2.2.3 „Elektrodenlose“ $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Titration bei 1 M Ionenstärke

Zur präzisen Bestimmung der sehr kleinen ersten und zweiten Dissoziationskonstanten wurde eine „elektrodenlose“ $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Titration durchgeführt (siehe Kapitel 7.3.2). Die somit erhaltene pH-abhängige Spektrenreihe zeigt Abbildung 8.20 in Form eines Stackplots.

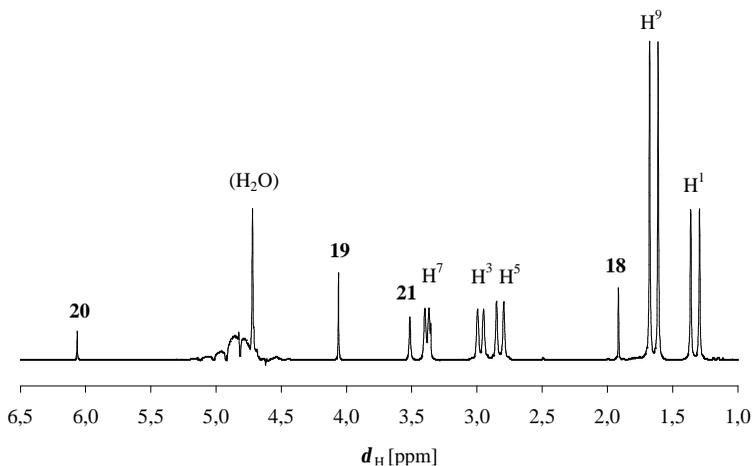


Abbildung 8.19: Das erste 200,13 MHz ^1H -NMR-Spektrum der „elektrodenlosen“ Titration von $[N-(P,P\text{-Dimethylphosphinoylmethyl})-N'(P'\text{-methylphosphinoylmethyl})\text{aminomethanphosphonsäure } 2$ ($\text{pH}^{\text{D}} = 12,25$, $0,02 \text{ M}$ in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O } 9/1$, $I = 1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$). H^1 , H^3 , H^5 , H^7 und H^9 bezeichnen die Protonen von **1**, die anderen Peaks stammen von der NMR-Indikatormolekülen Dichloressigsäure **20**, Chloressigsäure **19**, TRIS **21** und Essigsäure **18**

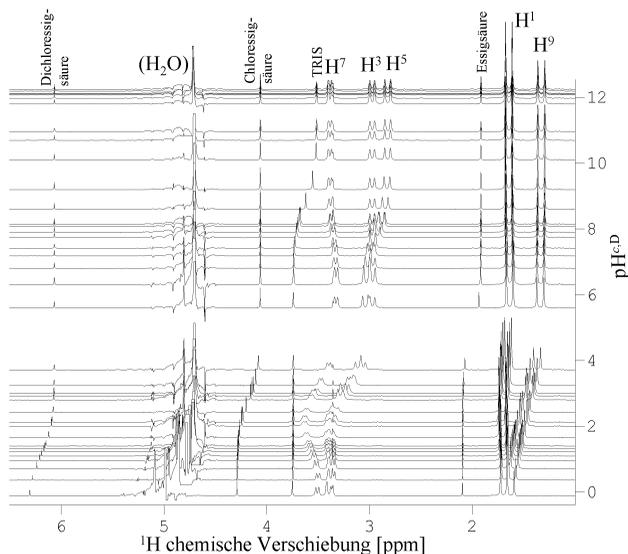


Abbildung 8.20: Stackplot der 200,13 MHz ^1H -NMR-Spektrenreihe von $[N-(P,P\text{-Dimethylphosphinoylmethyl})-N'(P'\text{-methylphosphinoylmethyl})\text{aminomethanphosphonsäure } 2$ ($0,02 \text{ M}$ in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O } 9/1$, $I = 1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$)

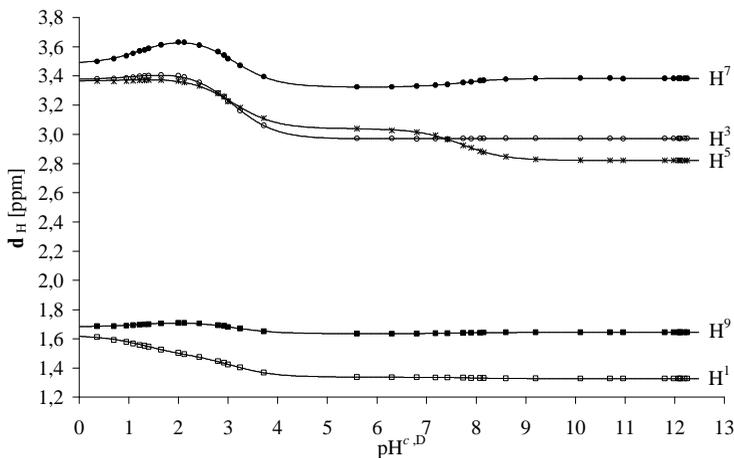


Abbildung 8.21: 200,13 MHz ^1H -NMR-Titrationskurven von $[N-(P,P\text{-Dimethylphosphinoylmethyl})-N'(P'\text{-methylphosphinoylmethyl})\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{2}$ (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 1$ M, $T = 22$ °C)

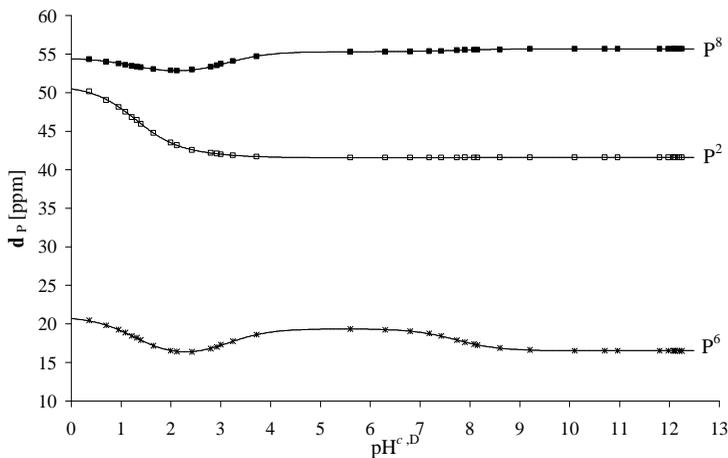


Abbildung 8.22: 81,02 MHz ^{31}P -NMR-Titrationskurven von $[N-(P,P\text{-Dimethylphosphinoylmethyl})-N'(P'\text{-methylphosphinoylmethyl})\text{aminomethanphosphonsäure } \mathbf{2}$ (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 1$ M, $T = 22$ °C)

Wie aus den NMR-Titrationskurven in Abbildungen 8.21 und 8.22 sowie aus den Δd -Werten in Tabelle 8.9 hervorgeht, kann das Dissoziationsschema aus den durch Dissoziation verursachten Hoch- und Tieffeldverschiebungen nicht eindeutig abgeleitet

werden. Die elektrostatische Abstoßung der entstehenden negativ geladenen Säuregruppen ist dann minimal, wenn die Dissoziation nach dem gleichen Schema abläuft, die für Verbindung **1** in Abbildung 8.7 des vorangegangenen Kapitels 8.2.1.3 bereits dargestellt wurde.

Parameter		H ₃ L	$\Delta_{\text{H,L}^-}^{\text{H}_3\text{L}}$	H ₂ L ⁻	$\Delta_{\text{HL}^{2-}}^{\text{H}_2\text{L}^-}$	HL ²⁻	$\Delta_{\text{L}^-}^{\text{HL}^{2-}}$	L ⁻
d_H	d₁	1,623 (2)	-0,133 (3)	1,490 (2)	-0,152 (3)	1,337 (2)	-0,010 (2)	1,328 (1)
d_H	d₃	3,376 (2)	0,057 (3)	3,433 (2)	-0,464 (3)	2,969 (2)	0,003 (2)	2,972 (1)
d_H	d₅	3,366 (2)	0,020 (3)	3,386 (2)	-0,347 (3)	3,039 (2)	-0,217 (2)	2,822 (1)
d_H	d₇	3,483 (2)	0,196 (3)	3,679 (2)	-0,355 (3)	3,324 (2)	0,060 (2)	3,384 (1)
d_H	d₉	1,682 (2)	0,036 (3)	1,718 (2)	-0,082 (3)	1,635 (2)	0,009 (2)	1,644 (1)
d_P	d₂	50,92 (3)	-8,73 (4)	42,18 (2)	-0,61 (3)	41,58 (2)	0,02 (2)	41,60 (1)
d_P	d₆	20,96 (2)	-5,50 (4)	15,46 (2)	3,91 (3)	19,37 (2)	-2,85 (2)	16,51 (1)
d_P	d₈	54,50 (2)	-2,15 (3)	52,35 (2)	2,97 (3)	55,31 (2)	0,36 (2)	55,67 (1)

Tabelle 8.9: Mit MULTINMRPK berechnete NMR-Parameter **d** [ppm] der Protolysespezies von [N-(P,P-Dimethylphosphinoylmethyl)-N-(P'-methylphosphinoylmethyl)]aminomethanphosphonsäure **2** (0,02 M in H₂O/D₂O 9/1, I = 1 M, T = 22 °C)

8.2.3 Vergleichende Diskussion der Ergebnisse

In Tabelle 8.10 werden die Dissoziationskonstanten der hier untersuchten Verbindungen **1** und **2** mit denen von strukturverwandten Liganden verglichen.

Der höchste pK-Wert der Aminophosphonsäuren beschreibt die Deprotonierung der Ammoniumgruppe. In der Verbindungsreihe **1a**, **1e**, **1c** und **1b** kann der induktive Einfluss des **a**-Substituenten studiert werden. Die Basizität der Aminogruppe nimmt in dieser Reihenfolge ab, was auf steigende -I-Effekte der Substituenten hinweisen lässt: H < PO₃²⁻ < P(O)(CH₃)O⁻ < P(O)(CH₃)₂. Die unter den Aminophosphonsäuren extrem niedrigen Dissoziationskonstanten von **2**, pK₄ = 7,93 und pK₃ = 3,22, können durch die stark elektronenanziehenden Phosphinoxid- und Methylphosphinogruppen begründet werden.

Den Einfluss der *Anzahl* der am Stickstoff angebondenen Säuregruppen verdeutlichen die Liganden **1e**, **1g** und **1h**. Mit steigender Gesamtladung des Moleküls nimmt die

Protonenaffinität des Stickstoffatoms zu [283]. Die elektrostatische Wechselwirkung der Phosphonat- und Ammoniumgruppen spielt hier auch eine Rolle [284]. Trotz der gleichen Gesamtladung hat Verbindung **1** um ca. eine Einheit niedrigere pK-Werte als Ligand **1i**. Der +I-Effekt der Methylgruppe wird hier überkompensiert mit der –I-Effekt der Methylphosphinogruppe. Es muss daher für die –I-Effekte gelten: $\text{P(O)(CH}_3\text{)(O}^-\text{)} \gg \text{COO}^-$.

In der wässrigen Komplexchemie ist bekannt, dass Liganden mit höherer kumulativen Basicität $\sum \text{p}K$ in der Regel eine größere Affinität für Metallionen aufweisen [1]. Sollte diese Beobachtung auch für schwache Na^+ -Komplexe gelten und sollten zudem diese Komplexe einen in der NMR-Zeitskala langsamen Austausch vorweisen, könnte damit die Linienverbreiterung bei **1** und deren Abwesenheit bei **2** erklärt werden. Nach diesem Gedankengang wäre eine noch ausgeprägtere Linienverbreiterung bei der NMR-Titration von NTMP **1h** bei höher Na^+ -Konzentrationen ($I = 1 \text{ M}$) zu erwarten. Diese Vermutung wird durch die ^{31}P -Messungen von S. Hermens belegt [175].

$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \mathbf{1a} \end{array}$	10,64 (N) [278]	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{P}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{O} \\ \mathbf{1b} \end{array}$	7,54 (N) [20]
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \mathbf{1c} \end{array}$	8,40 (N) 0,89 (P) [281]	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{OH} \\ \mathbf{1d} \end{array}$	11,06 (N) 5,19 (P) 1,3 (P) [279]
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \\ \mathbf{1e} \end{array}$	10,36 (N) 5,41 (P) [30]	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HN}-\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{OH} \\ \mathbf{1f} \end{array}$	10,91 (N) 5,31 (P) 0,6 (P) [279]
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HN}-(\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH})_2 \\ \\ \text{OH} \\ \mathbf{1g} \end{array}$	9,71 (N) 6,26 (P) 5,28 (P') [282] ^a	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{N}-(\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH})_3 \\ \\ \text{OH} \\ \text{„NTMP“} \\ \mathbf{1h} \end{array}$	14 ^a [175] (N) 7,43 (P) 5,98 (P') 4,67 (P'') 1,21 (P) 0,87 [280]
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{OH} \\ \mathbf{1i} \end{array}$			10,03 (N) 5,37 (P) 1,88 (C) [284]
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{CH}_3 \quad \quad \text{OH} \\ \mathbf{1} \end{array}$			9,73 (N) 5,38 (P _o) 0,8 (P _i) diese Arbeit
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2-\text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{CH}_3 \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{OH} \\ \quad \quad \quad \text{H}_3\text{C}-\text{P}-\text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{O} \\ \mathbf{2} \end{array}$			7,93 (N) 3,18 (P _o) 1,2 (P _i) diese Arbeit

Tabelle 8.10: Vergleich der p*K*-Werte von ausgewählten Aminophosphonsäuren bei *T* = 25 °C und *I* = 0,1 M. Durch N, P_o, P_i und C werden die Protolysezentren NH₂, PO₃H₂, P(O)(CH₃)(OH) und COOH bezeichnet.

^a p*K* bei *I* = 1 M

8.3 Phosphinsäuren, Phosphinocarbonsäuren und Analoga

8.3.1 P-Ethyl-P-methylphosphinsäure (3)

P-Ethyl-*P*-methylphosphinsäure **3** stellt eine einbasige Säure dar. Der pK -Wert von **3** lässt sich auf Grund des $pK = 3,29$ für *P,P*-Diethylphosphinsäure zu ca. 3,1 einschätzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die ^1H - und ^{31}P -NMR-Parameter der beiden Dissoziationsstufen, HL und L^- ermittelt werden.

8.3.1.1 Zuordnung und Analyse der ^1H -NMR-Spektren

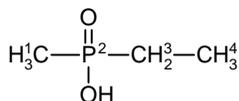


Abbildung 8.23: Durchnummerierung der untersuchten Spins von *P*-Ethyl-*P*-methylphosphinsäure **3**

Zwei 0,2 M Einzelproben von **3** wurden in D_2O erstellt. Die erste enthielt 1 M DClO_4 ($\text{pH}^{\text{D}} \approx 0$), in dieser Lösung überwiegt die protonierte Form HL. In der anderen Lösung mit 1 M NaOD ($\text{pH}^{\text{D}} > 13$) liegt dominant L^- vor. Die 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektren dieser Proben werden in Abbildung 8.24 dargestellt.

Die mit WINDAISY iterierten ^1H chemischen Verschiebungen bzw. Kopplungskonstanten sind in Tabelle 8.11 aufgelistet. Auf Grund der vicinalen $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten wurde in Kapitel 6.2.1 die Altona-Substituentenkonstante **I** für die neutrale und dissoziierte Methylphosphinogruppe abgeleitet.

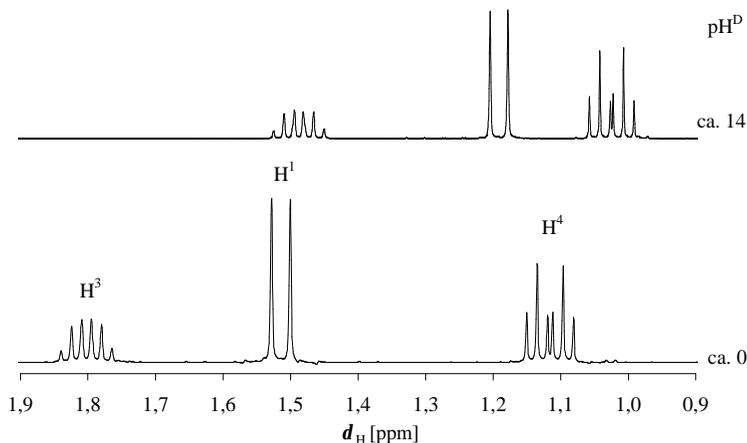


Abbildung 8.24: Zuordnung der pH^D-abhängigen 500,13 MHz ¹H-NMR-Spektren von *P*-Ethyl-*P*-methylphosphinsäure **3** (0,2 M in D₂O, *T* = 22 °C)

pH ^D der Probe Hauptspezies		≈ 0 HL	> 13 L ⁻
d_H	d_1	1,5140	1,191
d_H	d_3	1,8015	1,487
d_H	d_4	1,1157	1,025
$^2J_{PH}$	J_{12}	-13,886	-13,18
$^2J_{PH}$	J_{23}	-14,448	-14,18
$^3J_{PH}$	J_{24}	19,239	17,60
$^3J_{HH}$	J_{34}	7,740	7,744

Tabelle 8.11: Mit WINDAISO iterierte chemische Verschiebungen d [ppm] und Kopplungskonstanten J [Hz] aus 500,13 MHz ¹H-NMR-Spektren von *P*-Ethyl-*P*-methylphosphinsäure **3** (0,2 M in D₂O, *T* = 22 °C)

8.3.2 Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) (**4**)

8.3.2.1 Makroskopische Dissoziationskonstanten

Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4** stand als Rohprodukt technischen Grades der Firma Hoechst zur Verfügung. Die potentiometrische Titration gegen 0,1 M NaOH zeigte einen

zusätzlichen Pufferbereich bei $\text{pH}^c \approx 7,3$. Diese Verunreinigung kann als 8,9 mol% Monophosphonsäure oder als 4,5 mol% Bisphosphonsäure quantifiziert werden, die aus Spuren von Trichlorphosphin im Edukt Methylchlorphosphin entstehen dürfte [266]. Durch einmaliges Umkristallisieren von **4** aus Methanol [266] wurde diese Verunreinigung entfernt (siehe die Titrationskurve in Abbildung 8.25).

Die Dissoziationskonstanten von **4** wurden in drei potentiometrischen Titrationen nach Vorschrift #2 in Tabelle 7.2 ermittelt. Die erhaltenen pK^c -Werte sind in Tabelle 8.12 aufgelistet.

pK_1	pK_2	Typ	c_L^{tot}	Messbedingungen	Method
1,93 (3)	3,22 (1)	pK^c	6 mM	25 °C, 0,1 M NaNO_3	Potentiometr.Titr.
2,38	3,69	pK^{mix}	250 mM	umgerechnet auf D_2O	nach der Gl. 2.44

Tabelle 8.12: Makroskopische Dissoziationskonstanten von Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4**

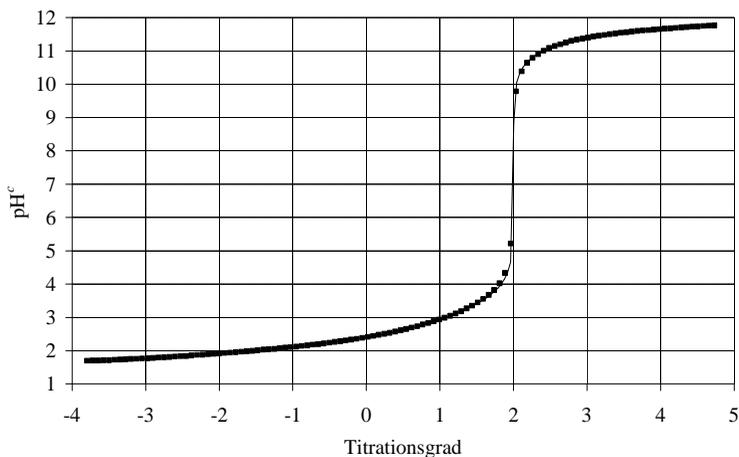


Abbildung 8.25: Experimentelle (?) und berechnete (–) Titrationskurven von Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4** vs. 0,1 M NaOH ($I = 0,1$ M NaNO_3 , $T = 25$ °C)

8.3.2.2 Berechnung der mikroskopischen Dissoziationskonstanten

Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4** enthält zwei äquivalente Phosphinogruppen (A_2 -Aciditätssystem). In Abbildung 8.26 ist das mikroskopische Dissoziationsschema dargestellt. Wie in Kapitel 2.4.5.1 bereits erörtert, genügen in diesem symmetrischen Fall schon die Makrokonstanten pK zur Berechnung aller vier Mikrokonstanten:

$$pk_1 = pk_2 = pK_1 + \log 2 = 1,93 + \log 2 = 2,23 (\pm 0,03) \quad (8.2)$$

$$pk_{12} = pk_{21} = pK_2 - \log 2 = 3,22 - \log 2 = 2,92 (\pm 0,01) \quad (8.3)$$

Die pH-abhängige Verteilung der Mikro- und Makrospezies von **4** ist Abbildung 8.27 zu entnehmen.

Schließlich wird die Wechselwirkungsparameter der Methylphosphinogruppen berechnet:

$$pE = pk_{21} - pk_1 = pk_{12} - pk_2 = 2,92 - 2,23 = 0,69 (\pm 0,03) \quad (8.4)$$

Dieser pE -Wert wird in Kapitel 8.3.3.4 zur Berechnung der Mikrokonstanten von 3-(Methylphosphinoyl)propansäure **5** herangezogen werden.

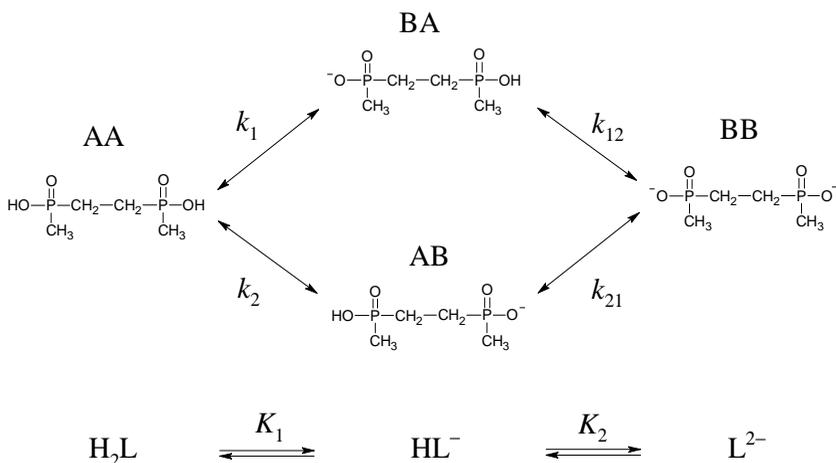


Abbildung 8.26: Mikroskopisches (oben) und makroskopisches (unten) Dissoziationsschema von Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4** (A_2 -Aciditätssystem)

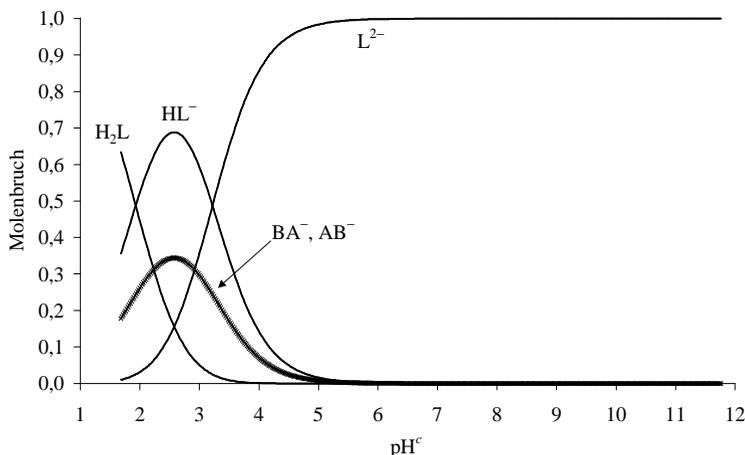


Abbildung 8.27: pH-abhängige Verteilung der makroskopischen (H_2L) und mikroskopischen (BA^- , AB^-) Protolysespezies von Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4**

8.3.2.3 Auswertung der titrationsgradabhängigen 1H -, $^{31}P\{^1H\}$ - und $^{13}C\{^1H\}$ -NMR-Spektren

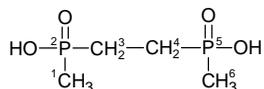


Abbildung 8.28: Durchnummerierung der untersuchten Spins von *P*-Ethyl-*P*-methylphosphinsäure **4**

A. Gaedcke hat in ihrer Dissertation die Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4** mittels titrationsgradabhängiger 1H -, $^{31}P\{^1H\}$ - und $^{13}C\{^1H\}$ -NMR-Spektroskopie in D_2O charakterisiert [267]. Dabei wurden allerdings keine ionenspezifischen NMR-Parameter berechnet. Die tabellierten Messdaten aus [267] werden daher mit MULTINMRPK neu bearbeitet.

Die durch Potentiometrie in H_2O ermittelten pK^c -Werte (Tabelle 8.12) werden nach der empirischen Konversionsgleichung 2.44 in pK^D -Werte überführt: $pK_1^D = 2,38$ und $pK_2^D = 3,69$.

Die $d_{\text{H-}}$, $d_{\text{C-}}$, $d_{\text{P-}}$ bzw. ${}^3J_{\text{PP}}$ -Werte aus [267] sind in Abbildungen 8.29 bis 8.31 in Abhängigkeit von pH^{D} aufgetragen. Aus diesen Daten werden mit MULTINMRPK die in Tabelle 8.13 aufgeführten ionenspezifischen NMR-Parameter berechnet.

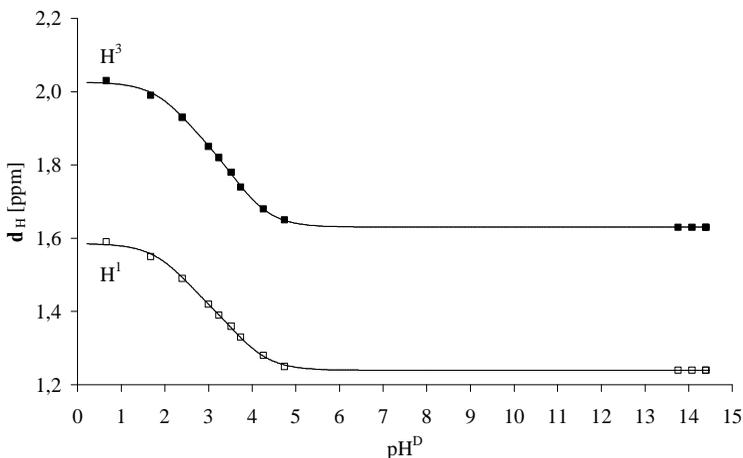


Abbildung 8.29: 200,13 MHz ${}^1\text{H}$ -NMR-Titrationskurven von Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4** (0,25 M in D_2O , 22 °C). Messung: A. Gaedcke [267], Auswertung: diese Arbeit

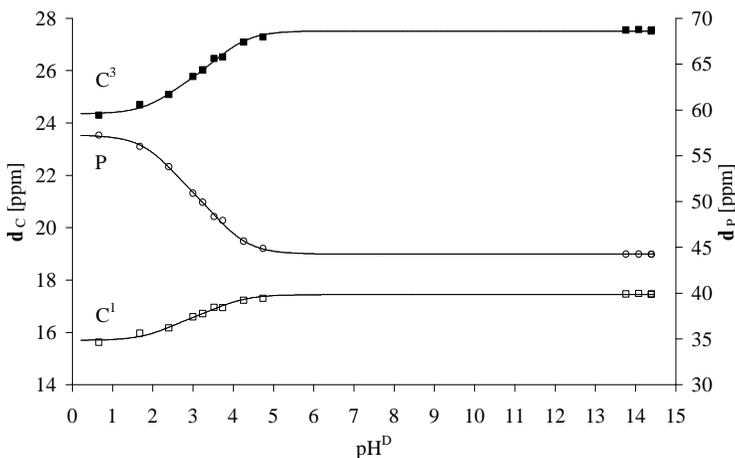


Abbildung 8.30: 81,02 MHz ${}^{31}\text{P}$ - und 50 MHz ${}^{13}\text{C}$ -NMR-Titrationskurven von Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4** (0,25 M in D_2O , 22 °C). Messung: A. Gaedcke [267], Auswertung: diese Arbeit

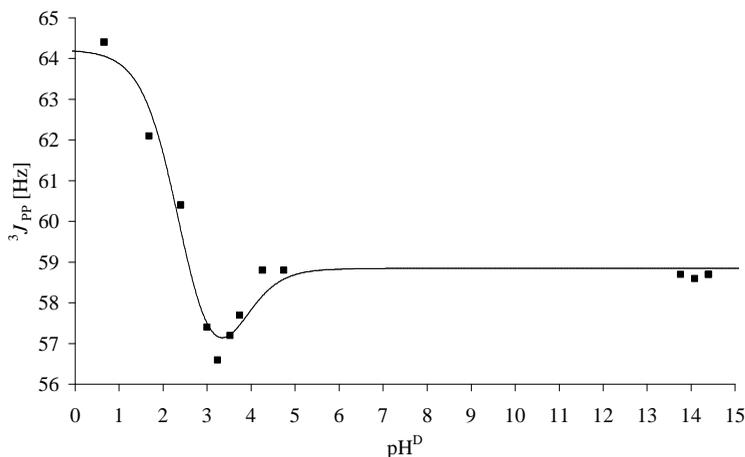


Abbildung 8.31: ${}^3J_{PP}$ in Abhängigkeit von pH^D aus 50 MHz ${}^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4** (0,25 M in D_2O , 22 °C). Messung: A. Gaedcke [267], Auswertung: diese Arbeit

Parameter	H_2L	$\Delta_{\text{HL}^-}^{\text{H}_2\text{L}}$	HL^-	$\Delta_{\text{L}_2^-}^{\text{HL}^-}$	L_2^-
d_{CH_2}	2,026 (3)	-0,171 (4)	1,856 (3)	-0,225 (4)	1,630 (2)
d_{CH_3}	1,586 (3)	-0,168 (4)	1,417 (3)	-0,177 (4)	1,240 (2)
d_{P}	57,2 (1)	-6,38 (2)	50,9 (1)	-6,58 (1)	44,28 (7)
d_{CH_2}	24,35 (5)	1,38 (8)	25,73 (6)	1,78 (7)	27,51 (3)
d_{CH_3}	15,69 (5)	0,92 (8)	16,61 (6)	0,83 (7)	17,44 (3)
${}^3J_{PP}$	64,2 (3)	-8,6 (5)	55,6 (4)	3,2 (4)	58,8 (2)

Tabelle 8.13: Aus den Messdaten von A. Gaedcke [267] berechnete ionenspezifische chemische Verschiebungen d [ppm] und Kopplungskonstante J [Hz] von Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4**

Aus der Sudmeier-Reilly-Gleichung kann abgeleitet werden, dass für symmetrische dibasige Säuren $\Delta_{\text{HL}^-}^{\text{H}_2\text{L}}d = \Delta_{\text{L}_2^-}^{\text{HL}^-}d$ gelten muss. Die hervorgehobenen Werte in Tabelle 8.13 erfüllen diese Beziehung. Die ${}^1\text{H}$ - und ${}^{13}\text{C}$ -Kerne der Methylengruppe gehorchen jedoch nicht dieser Gleichung. Die Vermutung liegt nahe, dass zu den Δd -Werten dieser Kerne außer induktiven Effekten auch die pH-bedingte Konformationsänderung einen Beitrag liefern kann.

8.3.2.4 Konformationsanalyse aus $^3J_{PP}$

Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4** stellt einen ethanähnlichen Rotator dar, deren Konformation in der kanonischen Näherung durch zwei *gauche*-Rotamere (g, g') und ein *trans*-Rotamer (t) behandelt wird.

Die $^3J_{PP}$ -Kopplungskonstante wurde von A. Gaedcke [267] bei verschiedenen pH^D -Werten durch Analyse des X-Teiles des AA'X-Spinsystems ermittelt, das im $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -Spektrum der P- ^{13}C - ^{12}C -P Isotopomeren erscheint. Wie in Abbildung 8.31 ersichtlich, weist diese konformationsrelevante Kopplung bei $\text{pH}^D = 3,34$ ($t = 1,37$) ein Minimum auf. Nach Berechnungen dieser Arbeit liegen an diesem Punkt H_2L zu 7,0%, HL^- zu 64,2% und L^{2-} zu 28,8% vor.

Nach dem beobachteten Minimum in $^3J_{PP}$ wurde für HL^- eine durch intramolekulare Wasserstoffbrücke stabilisierte *gauche*-Konformation vorgeschlagen [267].

8.3.3 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure (**5**)

8.3.3.1 Makroskopische Dissoziationskonstanten

Die $\text{p}K^c$ -Werte der Verbindung **5** wurden aus acht potentiometrischen Titrations nach Vorschrift #2 in Tabelle 7.2 ermittelt. Eine Titrationskurve ist in Abbildung 8.32 dargestellt. Die $\text{p}K^c$ -Werte indizieren, dass die Dissoziation der beiden Gruppen überlappt. Die vollständige Beschreibung dieser simultanen Gleichgewichte ist nur mit Mikrokonstanten möglich (siehe Kapitel 8.3.3.4).

$\text{p}K_1$	$\text{p}K_2$	Typ	Messbedingungen	Method
2,50 (3)	4,60 (1)	$\text{p}K^c$	25 °C, 0,1 M NaNO_3	Potentiometrische Titration
2,46 (1)	4,59 (1)	$\text{p}K^c$	21 °C, 0,1 M NaNO_3	$^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontr. Tit.

Tabelle 8.14: Die makroskopischen Dissoziationskonstanten von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5**

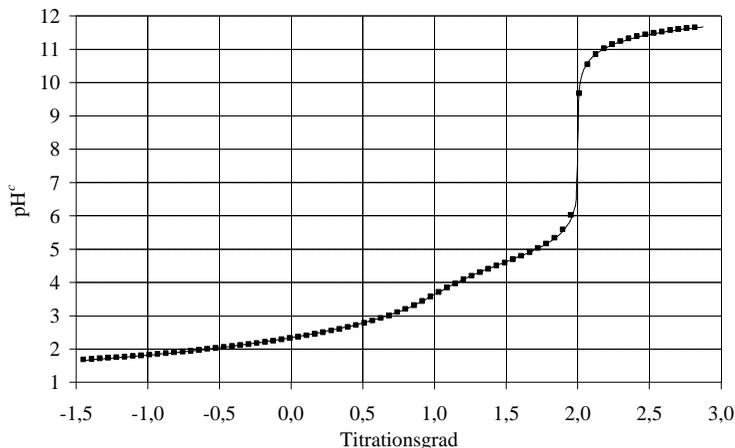


Abbildung 8.32: Experimentelle (•) und berechnete (–) Titrationskurven von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5** vs. 0,1 M NaOH ($I = 0,1$ M NaNO₃, $T = 25$ °C)

8.3.3.2 Zuordnung und Analyse der ¹H- und ³¹P-Spektren

Die spinaktiven Kerne von **5**, H^{1/2}, H^{3/4}, H⁵ und P⁶ bilden in dieser Reihenfolge ein heteronukleares [AM]₂Q₃X Spinsystem, wie Abbildung 8.33 zu entnehmen ist.



Abbildung 8.33: Durchnummerierung und Zuordnung der spinaktiven ¹H- und ³¹P-Kerne von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5**

Zur Spinanalyse wurden nach Vorschrift #1 in Tabelle 7.3 drei Einzelproben in D₂O erstellt und am DRX 500 Spektrometer vermessen. Die bei pH^D = 1 aufgenommenen ¹H- bzw. ³¹P-Spektren sind in Abbildungen 8.34 und 8.35 dargestellt. Das selbe Aufspaltungsmuster wurde beim Eigen-pH-Wert = 2 beobachtet. Wie aus den Abbildungen 8.36 und 8.37 hervorgeht, verändert sich im alkalischen Bereich (pH^D = 12) das spektrale Erscheinungsbild wesentlich. Die mit WINDAISY iterierten Spektrenparameter sind in Tabelle 8.15 aufgelistet.

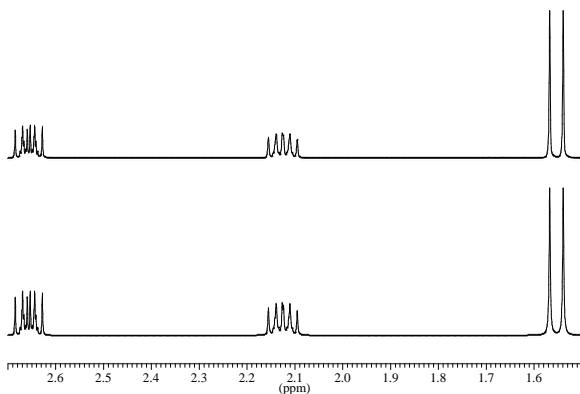


Abbildung 8.34: Oben: 500,13 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ($[\text{AM}]_2\text{Q}_3$ -Teil des $[\text{AM}]_2\text{Q}_3\text{X}$ -Spinsystems) von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5** (0,05 M in D_2O , $\text{pH}^{\text{D}}=1$). Unten: Simulation des Iterationsergebnisses

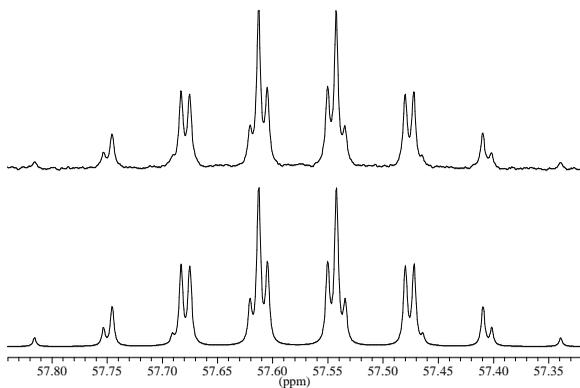


Abbildung 8.35: Oben: 202,46 MHz $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum (X-Teil des $[\text{AM}]_2\text{Q}_3\text{X}$ -Spinsystems) von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5** (0,05 M in D_2O , $\text{pH}^{\text{D}}=1$). Unten: Simulation des Iterationsergebnisses

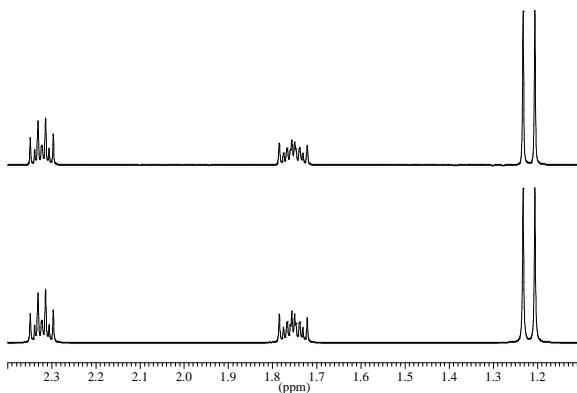


Abbildung 8.36: Oben: 500,13 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ($[\text{AM}]_2\text{Q}_3$ -Teil des $[\text{AM}]_2\text{Q}_3\text{X}$ -Spinsystems) von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5** (0,05M in D_2O , pH^{D} =12). Unten: Simulation des Iterationsergebnisses

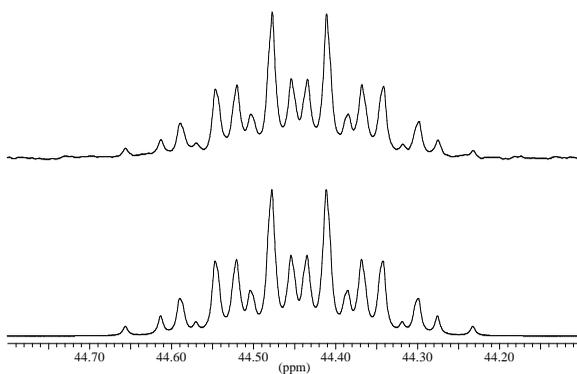


Abbildung 8.37: Oben: 202,46 MHz $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum (X-Teil des $[\text{AM}]_2\text{Q}_3\text{X}$ -Spinsystems) von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5** (0,05 M in D_2O , pH^{D} =12). Unten: Simulation des Iterationsergebnisses

NMR-Parameter bei pH ^D			1	2	12
d_H	A, A'	H ¹ , H ²	2,6560	2,6473	2,3222
d_H	M, M'	H ³ , H ⁴	2,1248	2,0985	1,7528
d_H	Q	H ⁵	1,5521	1,5257	1,2182
d_P	X	P ⁶	57,5774	56,4124	44,4442
$^2J_{HH}$	$J_{AA'}$	J_{12}	-17,0 (n.i.)	-19,0 (n.i.)	-17,0 (n.i.)
$^3J_{HH}$	$J_{AM} = J_{A'M'}$	$J_{13} = J_{24}$	9,68 (1)	9,18 (1)	12,50 (1)
$^3J_{HH}$	$J_{A'M'} = J_{A'M}$	$J_{14} = J_{23}$	6,12 (1)	6,67 (1)	4,84 (1)
$^2J_{HH}$	$J_{MM'}$	J_{34}	-15,23 (n.i.)	-19,0 (n.i.)	-17,0 (n.i.)
$^3J_{PH}$	$J_{AX} = J_{A'X}$	$J_{16} = J_{26}$	12,24 (2)	12,48 (1)	8,73 (1)
$^2J_{PH}$	$J_{MX} = J_{M'X}$	$J_{36} = J_{46}$	-14,40 (2)	-14,36 (1)	-14,23 (1)
$^2J_{PH}$	J_{QX}	J_{56}	-14,168 (5)	-14,114 (3)	-13,327 (4)

Tabelle 8.15: Mit WINDAISY iterierte chemische Verschiebungen d [ppm] und Kopplungskonstanten J [Hz] aus 500,13 MHz ¹H- und 202,46 MHz ³¹P-NMR-Spektren von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5**
n.i.: nicht iterierter Wert

8.3.3.3 200-MHz-¹H/³¹P{¹H}-NMR-kontrollierte Titration

Die pH-bedingten Änderungen der ¹H- bzw. ³¹P{¹H}-NMR-Spektren wurden im Rahmen einer multinuklearen NMR-kontrollierten Titration an der DRX 200 Anlage studiert. Die experimentellen Parameter dieser Messung wurden in Kapitel 7.4 bereits beschrieben.

Die Abbildungen 8.38 und 8.39 zeigen die ¹H- bzw. ³¹P{¹H}-Spektrenreihen als Stackplots. Die ³¹P chemischen Verschiebungen wurden aus den ³¹P{¹H}-Spektren durch die „Dekonvolution 1“ Methode von WINNMR bestimmt. Die pH^c-abhängigen d_P -Werte weisen ein Minimum auf (siehe Abbildung 8.40 und 8.42). Es ist bemerkenswert, dass dieses Minimum nicht bei $t = 1$ zu beobachten ist, wo ansonsten der Molenbruch von HL⁻ maximal ist (96%). Wie in Kapitel 8.3.3.4 gezeigt wird, kann dieser Kurvenverlauf quantitativ beschrieben werden als Überlagerung zweier mikroskopischen Dissoziationsprozesse, deren Einfluss auf Δd_P entgegengesetzten Vorzeichens ist.

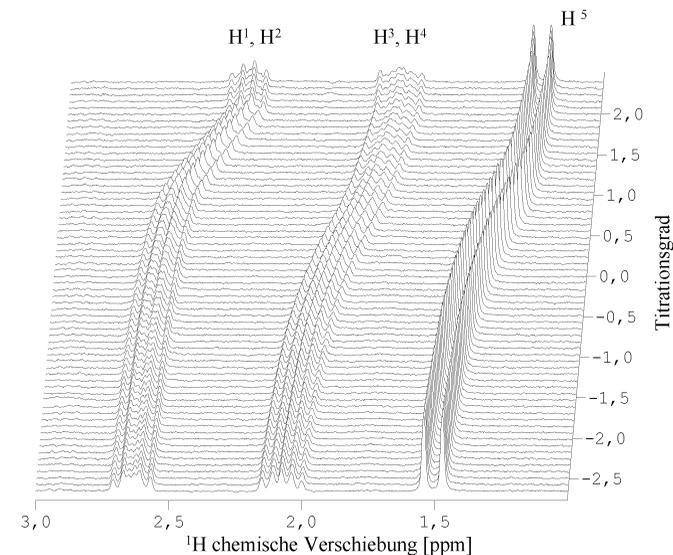


Abbildung 8.38: Stackplot der gemessenen ^1H -Spektrereihe in der 200,13 MHz NMR-kontrollierten Titration von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5** (7 mM in H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$, $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$)

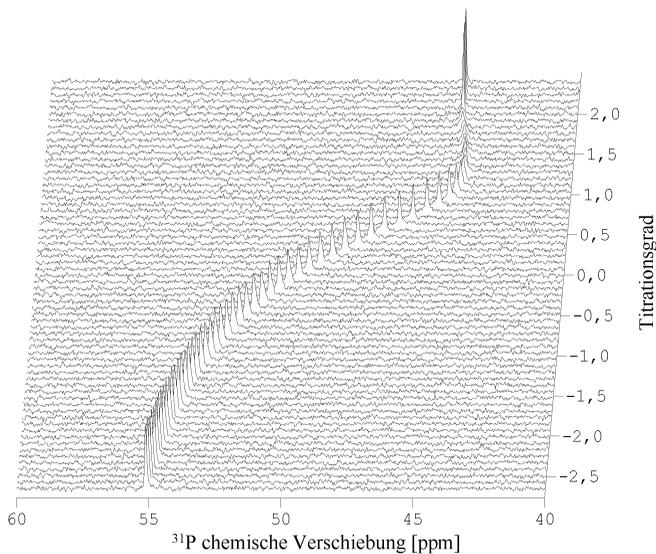


Abbildung 8.39: Stackplot der gemessenen $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -Spektrereihe in der 81,02 MHz NMR-kontrollierten Titration von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5** (7 mM in H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$, $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$)

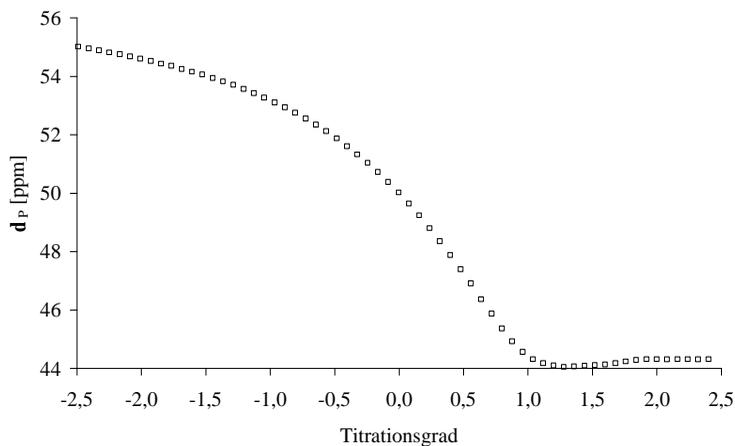


Abbildung 8.40: Chemische Verschiebung d_P gegen Titrationsgrad τ aus der 81,02 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierten Titration von 3-(P-Methylphosphinoyl)propansäure **5** (7 mM in H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$, $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$)

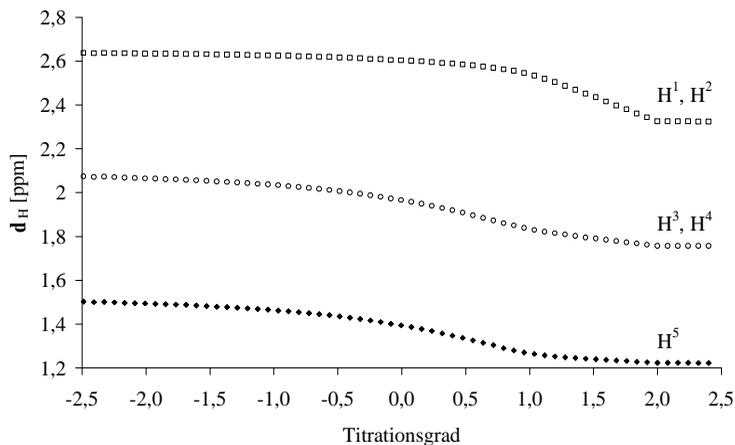


Abbildung 8.41: Chemische Verschiebungen d_H gegen Titrationsgrad τ aus der 200,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierten Titration von 3-(P-Methylphosphinoyl)propansäure **5** (7 mM in H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$, $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$)

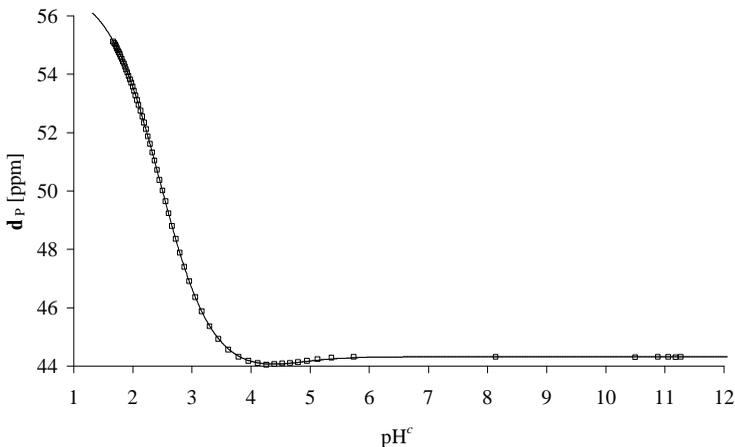


Abbildung 8.42: Chemische Verschiebung d_P gegen pH^c aus der 81,02 MHz ^{31}P -NMR-kontrollierten Titration von 3-(P-Methylphosphinoyl)propansäure **5** (7 mM in H_2O , $I = 0,1$ M, $T = 21$ °C)

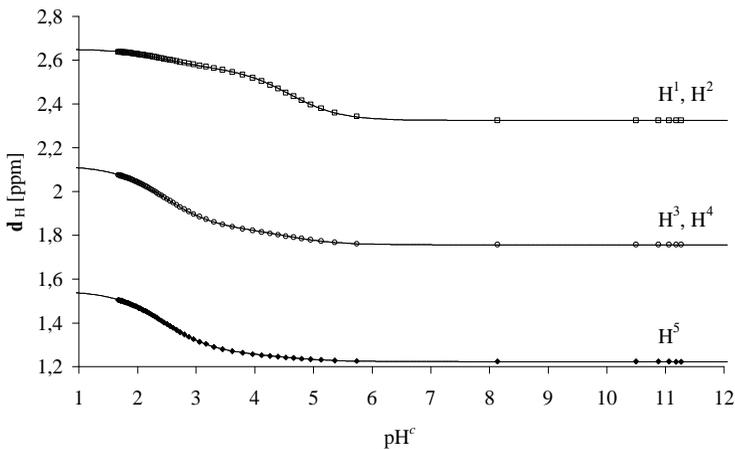


Abbildung 8.43: Chemische Verschiebungen d_H gegen pH^c aus der 200,13 MHz ^1H -NMR-kontrollierten Titration von 3-(P-Methylphosphinoyl)propansäure **5** (7 mM in H_2O , $I = 0,1$ M, $T = 21$ °C)

Die ^1H -Spektren wurden mit WINDAISY-Iterationen ausgewertet. Die derart erhaltenen chemischen Verschiebungen sind in Abhängigkeit vom Titrationsgrad, bzw. pH^c in den Abbildungen 8.41 und 8.43 dargestellt.

Die Auswertung der $\langle d \rangle$ vs. pH^c Messkurven erfolgte mit dem Programm MULTINMRPK. Die Tatsache, dass eine potentiometrische Titrationskurve E vs. V_z mitregistriert wurde, erlaubte den direkten Vergleich der zwei Methoden der pK -Bestimmung.

Einerseits wurden pK^c -Werte aus der E vs. V_z Titrationskurve mit WINSORE [50] iteriert. Andererseits wurden die Dissoziationskonstanten aus den NMR-Titrationskurven, $\langle d \rangle$ vs. pH^c ermittelt. Die Ergebnisse sind folgende:

$$\text{mit WINSORE:} \quad \text{pK}_1^c = 2,46 \pm 0,01 \quad \text{pK}_2^c = 4,592 \pm 0,009$$

$$\text{mit MULTINMRPK:} \quad \text{pK}_1^c = 2,4638 \pm 0,0007 \quad \text{pK}_2^c = 4,571 \pm 0,003$$

Die gute Übereinstimmung belegt die zur Zeit akzeptierte Sicht [23], dass die Auswertung von mehreren NMR-Titrationskurven durch simultane nichtlineare Regression eine verlässliche Methode der pK -Bestimmung darstellt.

Die NMR-Parameter der individuellen Protolysestufen sind in Tabelle 8.16 aufgeführt.

Parameter		H_2L	$\Delta_{\text{HL}^-}^{\text{H}_2\text{L}}$	HL^-	$\Delta_{\text{L}^{2-}}^{\text{HL}^-}$	L^{2-}
d_{H}	$d_1 = d_2$	2,6510 (3)	-0,0886 (5)	2,5624 (4)	-0,2375 (5)	2,3249 (4)
d_{H}	$d_3 = d_4$	2,1178 (3)	-0,2882 (5)	1,8296 (4)	-0,0726 (5)	1,7570 (4)
d_{H}	d_5	1,5469 (3)	-0,2888 (5)	1,2581 (4)	-0,0346 (5)	1,2235 (4)
d_{P}	d_6	56,992 (5)	-13,229 (5)	43,764 (4)	0,565 (5)	44,329 (4)
$^3J_{\text{HH}}$	$J_{13} = J_{24}$	9,29 (2)	1,02 (3)	10,30 (3)	1,97 (4)	12,27 (3)
$^3J_{\text{HH}}$	$J_{14} = J_{23}$	6,49 (2)	-0,50 (3)	5,99 (3)	-1,10 (4)	4,89 (3)
$^3J_{\text{PH}}$	$J_{16} = J_{26}$	12,56 (2)	-2,42 (3)	10,14 (3)	-1,44 (4)	8,69 (3)
$^2J_{\text{PH}}$	$J_{36} = J_{46}$	-14,39 (2)	0,40 (3)	-13,99 (3)	-0,12 (4)	-14,12 (3)
$^2J_{\text{PH}}$	J_{56}	-14,16 (2)	0,67 (3)	-13,49 (3)	0,17 (4)	-13,32 (3)

Tabelle 8.16: Aus der $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration berechnete ionenspezifische NMR-Parameter von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure **5**

8.3.3.4 Berechnung der mikroskopischen Dissoziationskonstanten

Die mikroskopischen Dissoziationspfade von **5** sind in Abbildung 8.44 ersichtlich. AA, AB, BA und BB bezeichnen dabei die Mikrospesies und k_i repräsentieren die unbekanntenen Mikrokonstanten.

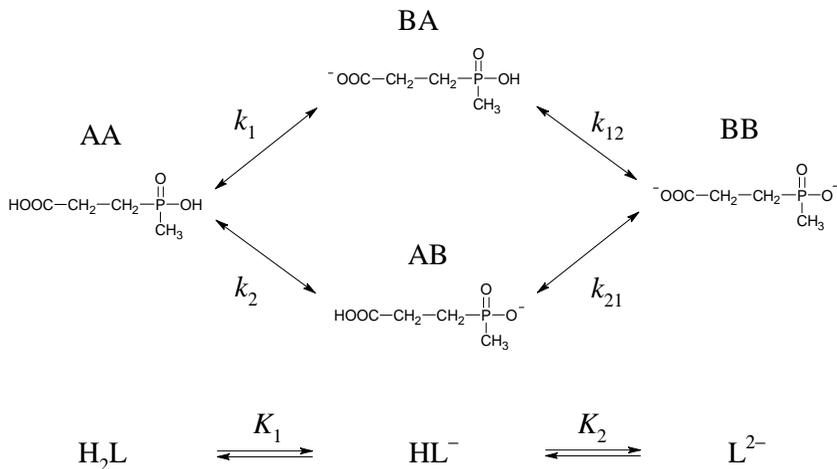


Abbildung 8.44: Mikroskopisches (oben) und makroskopisches (unten) Dissoziationsschema von 3-(*P*-Methylphosphinoyl)propansäure 5

Die mikroskopische Dissoziation wurde von J. Ollig durch $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration studiert [15]. Auf Grund des Stackplots dieser Titration wurde festgestellt, dass der ^{13}C -Kern der *P*-Methylgruppe selektiv auf die Dissoziation der Phosphinogruppe reagiert [15]. Die aus dieser Annahme resultierenden Mikrokonstanten [15] sind in Tabelle 8.17 zitiert.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration bietet einen unabhängigen Weg zur Bestimmung der Mikrokonstanten. Zur Auswahl möglicher selektiver Sondenkerne werden zunächst die in Kapitel 3.4 eingeführten normierten NMR-Titrationskurven berechnet (Abbildung 8.45). Diese Analyse zeigt aber, dass kein ^1H -Kern als selektives Sondenatom fungiert. Dieser Befund ist nicht überraschend, da die Protolysezentren nur durch 3 σ -Bindungen isoliert sind.

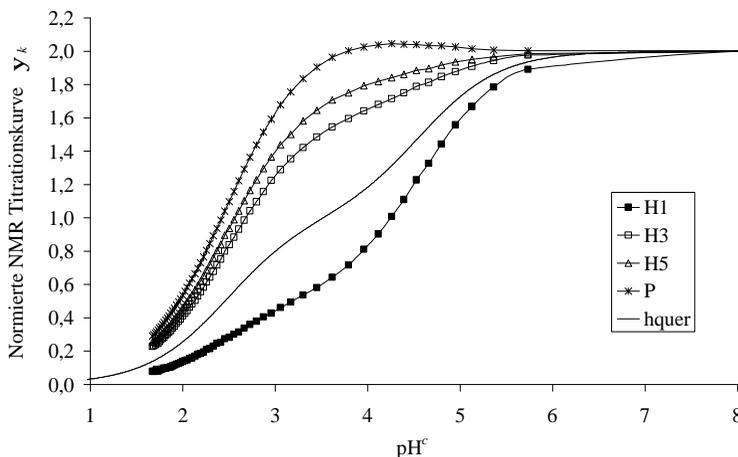


Abbildung 8.45: Normierte NMR-Titrationskurven im Vergleich zum mittleren Dissoziationsgrad (hquer) der $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ -NMR-kontrollierten Titration von 3-(Methylphosphinoyl)propansäure **5**

Einen alternativen Weg für die pK -Bestimmung bietet die in Kapitel 2.4.5.2 besprochene *deduktive Methode*. Als strukturverwandte Modellverbindungen werden hierfür Ethan-1,2-bis(methylphosphinsäure) **4** und Bernsteinsäure **5a** gewählt.

Der Wechselwirkungsparameter von **4** wurde in Kapitel 8.3.2.2 zu $pE_{PP} = 0,69$ berechnet. Die Dissoziationskonstanten von Bernsteinsäure **5b** unter den gleichen Messbedingungen betragen $pK_1^c = 4,03$ und $pK_2^c = 5,31$ [269], woraus $pE_{CC} = 0,68$ resultiert. Die Übereinstimmung dieser Werte legt die Annahme nahe, dass die gegenseitige Beeinflussung der Carboxy- und Methylphosphinogruppen in **5** auch mit dem Wert $pE_{PC} = 0,68$ charakterisiert werden kann (siehe Abbildung 8.46). Mit Kenntnis der pK -Werte und pE_{PC} ist das Mikrogleichgewichtssystem von **5** eindeutig auflösbar. Die berechneten Mikrokonstanten sind in Tabelle 8.17 angeführt.

Diese Ergebnisse quantifizieren, dass die Phosphinogruppe eine 24,5-mal größere Acidität besitzt als die Carboxylgruppe. Der dominante Dissoziationspfad in Abbildung 8.44 ist damit $AA \rightarrow AB \rightarrow BB$. Ollig findet die selbe Dissoziationsabfolge, aber mit einem größeren Aziditätsverhältnis von 436,5 [15]. Die Abweichung kann auf die größere (und unkontrollierte) Ionenstärke der $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -kontrollierten Titration zurückgeführt werden [15].

Die in dieser Arbeit verwendete Annahme von $pE = 0,68$ wird durch den von Ollig [15] experimentell gefundenen Wert von $pE = 0,68$ belegt.

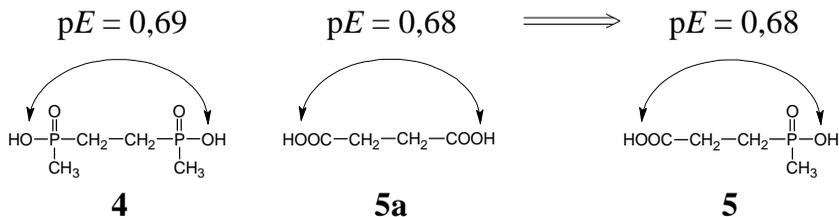


Abbildung 8.46: Deduktive Abschätzung des Wechselwirkungsparameters zwischen der Carboxy- und der Methylphosphinogruppe von 3-(Methylphosphinoyl)propansäure **5**

Messung	Potentiometrische Titration (diese Arbeit)	$^1\text{H} / ^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierte Titration (diese Arbeit)	$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR kontrollierte Titration [15]
Messbedingungen	25 °C, $I = 0,1 \text{ M}$ $c_{\text{H}_2\text{L}}^T = 7 \text{ mM}$	21 °C, $I = 0,1 \text{ M}$ $c_{\text{H}_2\text{L}}^T = 7 \text{ mM}$	25 °C, $c_{\text{H}_2\text{L}}^T = 240 \text{ mM}$
pK_1	2,50 (3)	2,46 (1)	1,85
pK_2	4,60 (1)	4,59 (1)	5,14
Annahme bei der mikroskopischen Auswertung	Übernahme des pE von Modellverbindungen		Selektivität des Kernes $\text{P}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$
pk_1	3,90 (1)	3,89 (1)	4,49
pk_2	2,52 (3)	2,48 (1)	1,85
pk_{12}	3,20 (3)	3,16 (1)	2,51
pk_{21}	4,58 (1)	4,57 (1)	5,14
k_2 / k_1	24,3	26,1	436,5
pE	0,68	0,68	0,66

Tabelle 8.17: Mikroskopische (pk) und makroskopische (pK) Dissoziationskonstanten, bzw. Wechselwirkungsparameter (pE) von 3-(Methylphosphinoyl)propansäure **5**

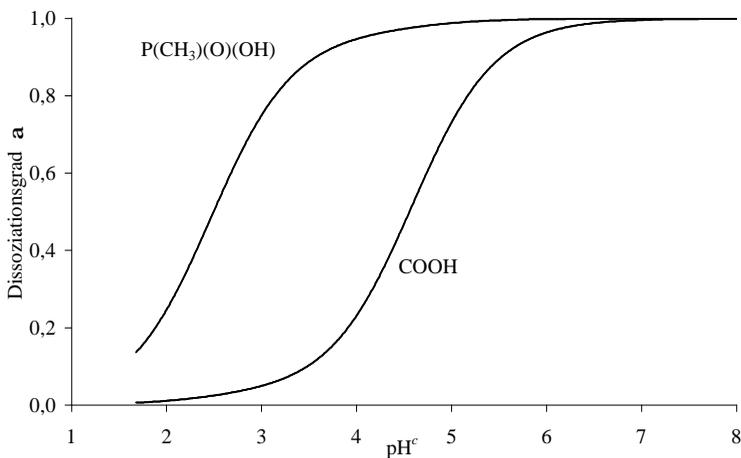


Abbildung 8.47: Gruppenselektive Titrationsgrade a in der $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-kontrollierten Titration von 3-(Methylphosphinoyl)propansäure **5**

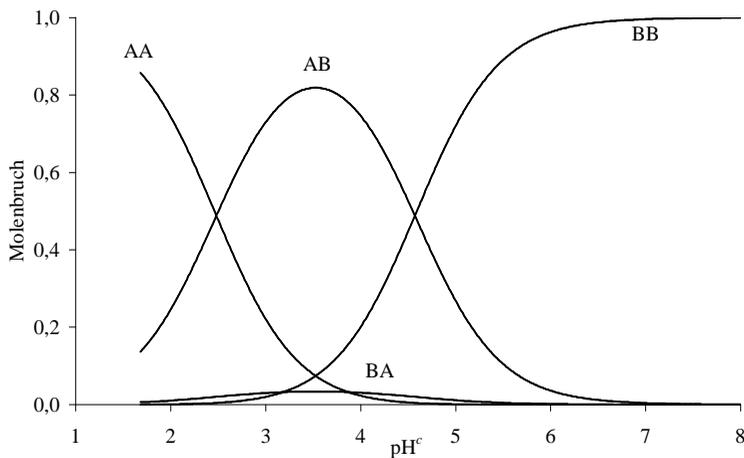


Abbildung 8.48: pH-abhängige Molenbruchverteilung der Mikrospesies von 3-(Methylphosphinoyl)propansäure **5**

Die Kenntnis der Mikrokonstanten versetzt uns in die Lage, die mikroskopische Speziesverteilung (Abbildung 8.48) und die Deprotonierungsgrade der Phosphino- und Carboxylgruppen, a_P und a_C (Abbildung 8.47) zu berechnen. In Kenntnis letzterer Funktionen

können nun für jeden Kern die Gruppenbeiträge (SR-Koeffizienten) zu $\Delta\delta$ ermittelt werden. Die multiple lineare Regression im Programm NMRMICROPK führt zu folgenden Koeffizienten:

$$d_{\text{H1}}(\text{pH}^c) = 2,6510 - 0,2434 \cdot a_{\text{C}}(\text{pH}^c) - 0,0825 \cdot a_{\text{P}}(\text{pH}^c) \quad (8.5)$$

$$d_{\text{H3}}(\text{pH}^c) = 2,1178 - 0,0620 \cdot a_{\text{C}}(\text{pH}^c) - 0,2985 \cdot a_{\text{P}}(\text{pH}^c) \quad (8.6)$$

$$d_{\text{H5}}(\text{pH}^c) = 1,5469 - 0,0222 \cdot a_{\text{C}}(\text{pH}^c) - 0,3009 \cdot a_{\text{P}}(\text{pH}^c) \quad (8.7)$$

$$d_{\text{P}}(\text{pH}^c) = 56,993 + 2,220 \cdot a_{\text{C}}(\text{pH}^c) - 13,873 \cdot a_{\text{P}}(\text{pH}^c) \quad (8.8)$$

Die beste Selektivität zeigen die H^5 -Methylprotonen. Das in Abbildung 8.42 erwähnte Minimum auf der d_{P} vs. pH^c -Kurve kann als die Linearkombination von a_{C} und a_{P} quantitativ erläutert werden.

8.3.3.5 Konformationsanalyse am Ethanskelett anhand $^3J_{\text{HH}}$

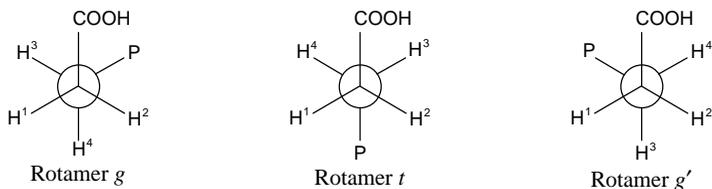


Abbildung 8.49: Kanonische Rotamere von 3-(Methylphosphinoyl)propansäure **5** entlang der Bindungsachse $\text{CH}_2\text{--CH}_2$. C und P repräsentieren die Carboxy- bzw. Methylphosphinogruppe

Durch Rotation um die Bindungsachse $\text{CH}_2\text{--CH}_2$ entstehen drei kanonische Rotamere (Abbildung 8.49). Die beiden *gauche*-Formen *g* und *g'* sind aus Symmetriegründen identisch und energiegleich. Die Rotamerenverteilung sollte für alle drei Protolysestufen H_2L , HL^- und L^{2-} aufgeklärt werden.

Aus den ionenspezifischen $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungen in Tabelle 8.16 wurden Rotamerenanteile nach dem Mittelwertmodell der kanonischen Analyse (Kapitel 6.4.1.2) berechnet. Die gleichen Rechnungen wurden auch für die Modellsubstanzen 3-Phosphonopropansäure **5a** und Bernsteinsäure **5b** durchgeführt.

Die speziesbezogenen Rotamerenanteile f (siehe Kapitel 6.5) sind in Tabelle 8.18 zusammengefasst. Im nachfolgenden Kapitel wird ein Vergleich der Rotamerenverteilung dieser Verbindungen gezogen.

Verbindung	Methode	H ₂ L		HL ⁻		L ²⁻	
		$f_g + f_{g'}$	f_l	$f_g + f_{g'}$	f_l	$f_g + f_{g'}$	f_l
5	Abraham, Gatti	0,49	0,51	0,38	0,62	0,13	0,87
	Haasnoot-B	0,53	0,47	0,45	0,55	0,26	0,74
	Haasnoot-C	0,54	0,46	0,47	0,53	0,32	0,68
	Altona	0,50	0,50	0,40	0,60	0,20	0,80
	Lin	0,50	0,50	0,42	0,58	0,25	0,75
5a	Abraham, Gatti	0,44	0,56	0,43	0,57	0,01	0,99
	Haasnoot-B	0,54	0,46	0,48	0,52	0,17	0,83
	Haasnoot-C	0,55	0,45	0,50	0,50	0,25	0,75
	Lin	0,47	0,53	0,46	0,54	0,13	0,87
5b	Abraham-Gatti	0,88	0,12	0,81	0,19	0,36	0,64
	Haasnoot-B	0,82	0,18	0,77	0,23	0,44	0,56
	Haasnoot-C	0,79	0,21	0,74	0,26	0,45	0,55
	Altona	0,81	0,19	0,73	0,27	0,45	0,55
	Lin	0,49	0,51	0,57	0,43	0,41	0,58

Tabelle 8.18: Nach verschiedenen Modellen berechnete Rotamerenverteilung von 3-(Methylphosphinoyl)-propansäure **5**, im Vergleich zu 3-Phosphonopropansäure **5a** [21] und Bernsteinsäure **5b** [271]

8.3.3.6 Vergleichende Diskussion der Rotamerenverteilung

Ein aktueller, widersprüchlicher Schwerpunkt der Konformationsanalyse ist der „gauche-Effekt“, d.h. unter welchen Bedingungen 1,2-disubstituierte Ethane die *gauche*-Konformation begünstigen [27][271]. 3-(*P*-Methylphosphinoylmethyl)propansäure **5**, 3-Phosphonopropansäure **5a** und Bernsteinsäure **5b** stellen ideale Beispiele dar. Die Rotamerenanteile der verschiedenen Dissoziationsstufen werden in Tabelle 8.19

verglichen. Ein weiteres, zwitterionisches Beispiel, **b**-Alanin **9** wird in Kapitel 8.4.1.3 dargestellt.

Mit der Rotamerenanalyse von 3-Phosphonopropansäure **5a** in D₂O-Lösungen befassten sich Kreidler [270] und Lindner [21]. In Tabelle 8.18 werden Rotamerenanteile für die Spezies H₂L⁻, HL²⁻ und L³⁻ angeführt, die aus von Lindner [21] gemessenen $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle$ Kopplungskonstanten in der vorliegenden Arbeit berechnet wurden.

Kreidler [270] gibt einen Überblick über die früheren ¹H-NMR-Messungen an Bernsteinsäure **5b**. Die $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle$ -Werte sind für dieses symmetrische Spinsystem nicht unmittelbar erhältlich, sie wurden von Lit *et al.* aus den Protonenspektren der ¹³C-angereicherten Bernsteinsäure bestimmt [271].

Unsere Auswertung lieferte erhöhte *gauche*-Anteile für H₂L und HL⁻ (siehe Tabelle 8.18). Kürzlich erschienene theoretische Berechnungen belegen diesen Befund [27]. In kristallinem Zustand dagegen liegt Bernsteinsäure in allen Dissoziationsstufen nahezu in *trans*-Konformation vor, in Salzen zum Teil auch durch Alkaliionen (Li⁺, K⁺) intermolekular verbrückt [272][273].

Die Tendenz zur *gauche*-Konformation scheint am größten zu sein, wenn das Ethanskelett mit den selben aciden Gruppen substituiert ist. Diese *gauche*-Konformation kann durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke oder Hydratation stabilisiert werden. Mit fortschreitender Dissoziation wächst die elektrostatische Abstoßung der Endgruppen und nimmt der *trans*-Anteil auf den Kosten des *gauche*-Rotamers zu.

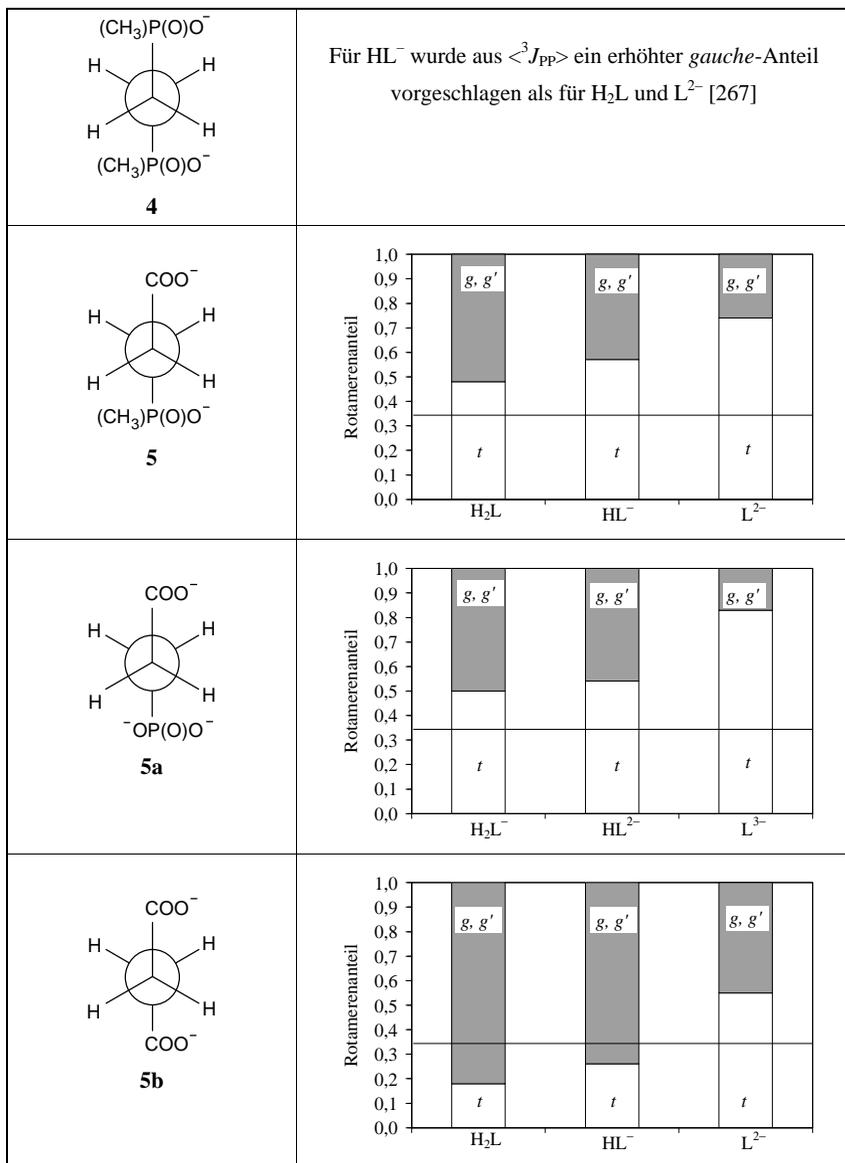


Tabelle 8.19: Vergleich der Rotamerenverteilung in Protolysestufen von Ethan-1,2-bis(methylphosphin säure) **4**, 3-(Methylphosphinoyl)propansäure **5**, 3-Phosphonopropansäure **5a** [21] und Bernsteinsäure **5b** [271]. Die Linie bei 0,333 zeigt die statistische Verteilung der Rotamere

8.3.3.7 Berechnung der rotationsspezifischen Aziditätskonstanten

Die Rota-Mikrokonstanten charakterisieren die gruppenspezifische Acidität der einzelnen Rotamere. Die für HL^- abgeleitete Rotamerenverteilung beschreibt hauptsächlich diejenige für die Mikrospesies AB, damit lassen sich Rota- pK -Werte für den unteren Protolysepfad in Abbildung 8.50 berechnen. Der Beitrag der unterpopulierten Mikrospesies BA zur Rotamerenverteilung ist zu gering (maximal 3,3%), um daraus verlässliche Auskunft über deren Konformation zu erlangen. Für den oberen Dissoziationspfad können deshalb keine Rota-Mikrokonstanten berechnet werden.

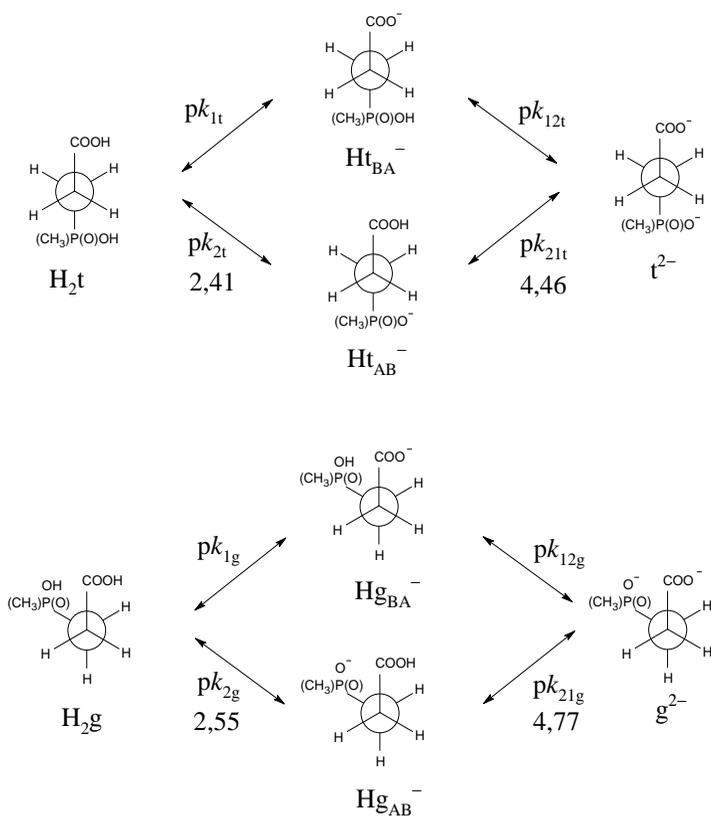


Abbildung 8.50: Rotamerspezifische Dissoziationskonstanten von 3-(Methylphosphinoyl)propansäure 5

8.3.4 Phosphinothricin (Glufosinat, **6**)

Die *S*-2-Amino-4-(Methylphosphinoyl)butancarbonsäure (*S*-Phosphinothricin, Glufosinat) stand sowohl als freie Säure (H_2L , **6**) als auch Monoammoniumsalz (Ammonium-*S*-glufosinat, **6a**) zur Verfügung.

8.3.4.1 Makroskopische Dissoziationskonstanten

Die pK^c -Werte von Phosphinothricin in H_2O wurden durch potentiometrische Titrationen bei verschiedenen Ionenstärken und Temperaturen ermittelt (siehe Tabelle 8.20). In Abbildung 8.51 sind zwei Titrationskurven bei $I = 0,1$ M und $T = 25$ °C dargestellt. Im Vergleich zur freien Säure **6** wird bei der Titration von Ammonium-Glufosinat **6a** ein zusätzliches Äquivalent NaOH zur Neutralisierung des Gegenions NH_4^+ verbraucht.

Die pH-abhängige Molenbruchverteilung in Abbildung 8.52 zeigt, dass die sehr ähnliche Acidität der Carboxy- und Methylphosphinogruppe eine detailliertere, mikroskopische Behandlung verlangt (siehe Kapitel 8.3.4.5).

pK_1	pK_2	pK_3	Typ	c_L^{tot} [mM]	Messbedingungen	Mth.	Ref.
1,7 (1)	2,69 (2)	9,44 (1)	pK^c	6	25 °C, 0,1 M $NaNO_3$	Pot. Titr.	d.A.
1,6 (1)	2,63 (2)	9,52 (2)	pK^c	5-20	22 °C, 0,1 M $NaNO_3$	Pot. Titr.	d.A.
< 2	2,44 (1)	9,00 (7)	pK^{mix}	–	25 °C, 0,1 M NaCl	Pot. Titr.	[275]
1,88 (6)	2,66 (6)	9,638 (4)	$pK^{c,D}$	30	22 °C, 1 M $NaNO_3$, H_2O/D_2O 9/1	$^1H/^31P$	d.A.

Tabelle 8.20: Durch verschiedene Methoden ermittelte Dissoziationskonstanten von Phosphinothricin **6**

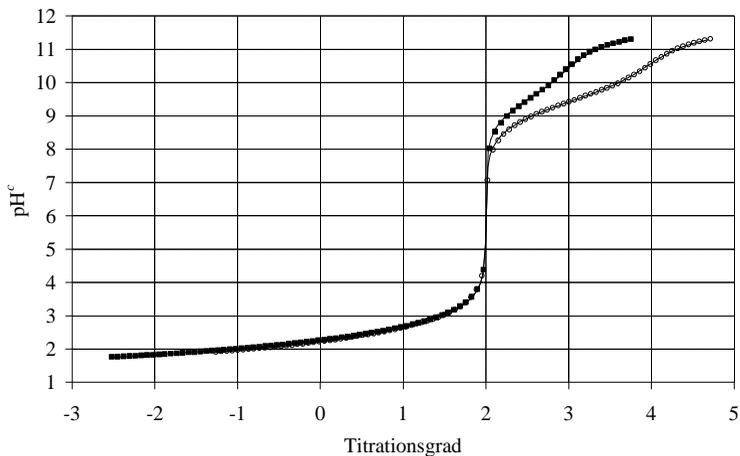


Abbildung 8.51: Experimentelle und berechnete Titrationskurven von Phosphinothricin **6** (?) und Ammonium-Glufosinat **6a** (o) vs. 0,1 M NaOH ($I = 0,1$ M NaNO_3 , $T = 25$ °C)

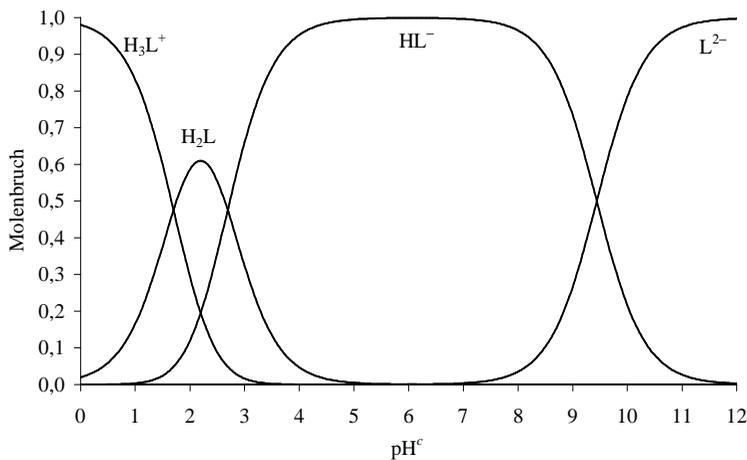


Abbildung 8.52: pH^c-abhängige Verteilung der makroskopischen Protolysespezies von Phosphinothricin **6** ($I = 0,1$ M NaNO_3 , $T = 25$ °C)

8.3.4.2 Zuordnung und Analyse der ^1H - und ^{31}P -Spektren

Die Durchnummerierung der untersuchten spinaktiven Kerne von **6** zeigt Abbildung 8.53. Wegen der Chiralität des Moleküls wird ein AFGMNQ₃X-Spinsystem im Spektrum beobachtet, wobei X den Heterokern ^{31}P repräsentiert.

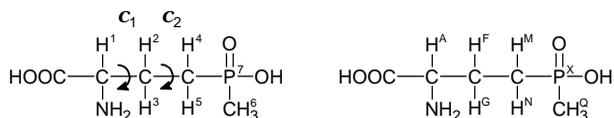


Abbildung 8.53: Durchnummerierung und Zuordnung der spinaktiven Kerne von Phosphinothricin **6**, mit Bezeichnung der Torsionswinkel c_1 und c_2

Zur Spektralanalyse wurden vier Einzelproben von Ammonium-Glufosinat **6a** in D₂O nach Vorschrift #1 in Tabelle 7.3 erstellt. Die Zuordnung und Spinanalyse wurde nach der folgenden Strategie durchgeführt.

Für jede Probe wurde zuerst ein 500,13 MHz- $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ -NMR-Spektrum aufgenommen und iteriert. Durch ^{31}P -Entkopplung vereinfacht sich das Spinsystem zu AFGMNQ₃, wobei das isolierte Singulett Q₃ zur H⁶-Methylgruppe gehört. Bei der Analyse des AFGMN-Teiles wird davon ausgegangen, dass das meist entschirmte Signal zum **a**-Proton H¹ gehören muss. Nach den vicinalen Kopplungen $^3J_{12}$ und $^3J_{13}$ werden dann die **b**-Methylenprotonen H^{2,3} im unmittelbar benachbarten Multiplett identifiziert, so muss das hochfeldverschobene Multiplett den **g**-Methylenprotonen H^{4,5} gehören. Diese Analyse ergab allerdings auch, dass die Spins H⁴ und H⁵ die Resonanzfrequenz im alkalischen Milieu (pH^D > 9) vertauschen. Eine ähnliche Kreuzung der Resonanzsignale wird auch bei Glutaminsäure beobachtet (siehe Kapitel 8.3.5.2).

Als zweiter Schritt der Spinanalyse wurden die phosphorgekoppelten 500,13 MHz- ^1H -NMR-Spektren unter den gleichen Bedingungen vermessen (siehe die Abbildungen 8.54, 8.56 und 8.58). Die Iterationen mit WINDAISY lieferten die J_{PH} -Werte. Die Vorzeichen der derart ermittelten J_{PH} -Kopplungskonstanten belegen die obige Zuordnung der Methylenprotonen: $^3J_{\text{FX}}, ^3J_{\text{GX}} > 0$ und $^2J_{\text{AX}}, ^2J_{\text{BX}} < 0$.

Zur Kontrolle wurde schließlich der X-Teil des Spinsystems mit den bislang ermittelten Kopplungskonstanten in WinDaisy simuliert und mit den experimentellen 202,46 MHz

^{31}P -NMR-Spektren verglichen (siehe die Abbildungen 8.55, 8.57 und 8.59). Die gute Übereinstimmung kann als weiterer Beweis für die Richtigkeit der Zuordnung aufgefasst werden.

Die bei verschiedenen pH^{D} -Werten erhaltenen Spektrenparameter sind in Tabelle 8.21 zusammengefasst.

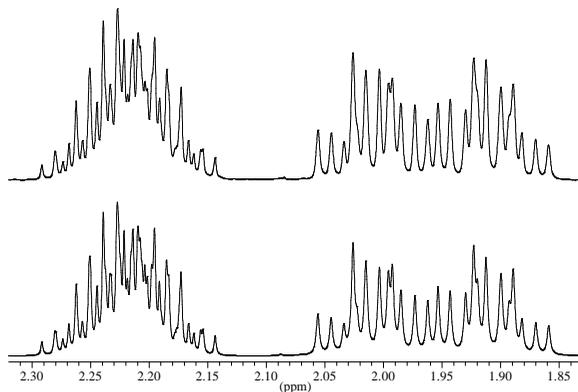


Abbildung 8.54: Oben: 500,13 MHz ^1H -NMR-Teilspektrum (FGMN-Teil des AFGMNQ₃X-Spinsystems) von Ammonium-Glufozinat **6a** (0,1 M in D₂O, $\text{pH}^{\text{D}} = 1,06$). Unten: Simulation des Iterationsergebnisses

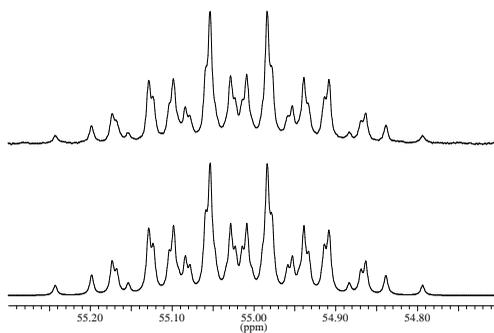


Abbildung 8.55: Oben: 202,46 MHz ^{31}P -NMR-Spektrum (X-Teil des AFGMNQ₃X-Spinsystems) von Ammonium-Glufozinat **6a** (0,1 M in D₂O, $\text{pH}^{\text{D}} = 1,06$). Unten: Simulation des Iterationsergebnisses

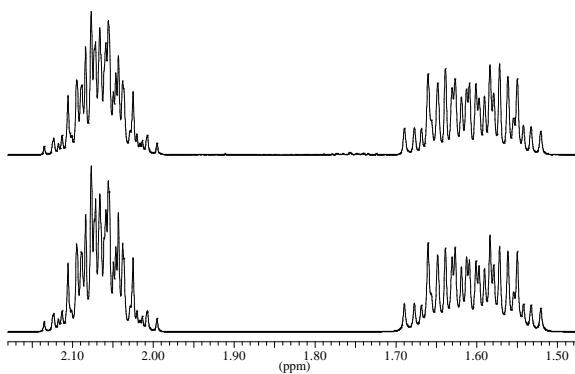


Abbildung 8.56: Oben: 500,13 MHz ^1H -NMR-Teilspektrum (FGMN-Teil des AFGMNQ₃X-Spinsystems) von Ammonium-Glufosinat **6a** (0,1 M in D₂O, pH^D = 6,12). Unten: Simulation des Iterationsergebnisses

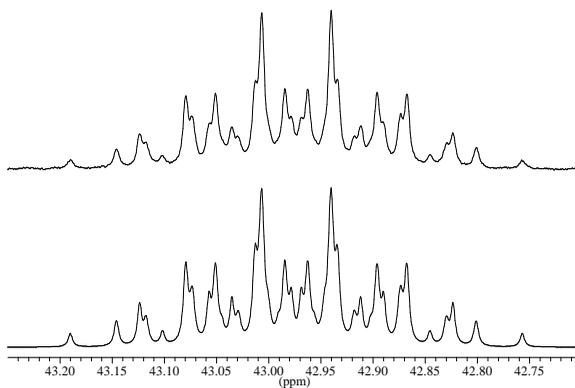


Abbildung 8.57: Oben: 202,46 MHz ^{31}P -NMR-Spektrum (X-Teil des AFGMNQ₃X-Spinsystems) von Ammonium-Glufosinat **6a** (0,1 M in D₂O, pH^D = 6,12). Unten: Simulation des Iterationsergebnisses

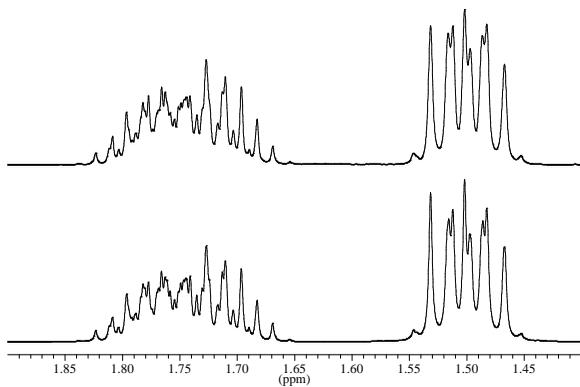


Abbildung 8.58: Oben: 500,13 MHz ^1H -NMR-Teilspektrum (FGMN-Teil des AFGMNQ₃X-Spinsystems) von Ammonium-Glufoinat **6a** (0,1 M in D₂O, pH^D = 12,16). Unten: Simulation des Iterationsergebnisses

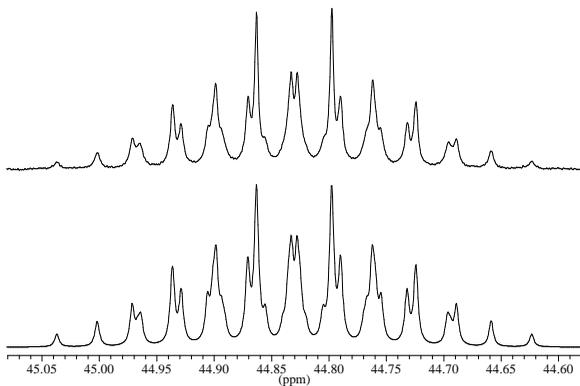


Abbildung 8.59: Oben: 202,46 MHz ^{31}P -NMR-Spektrum (X-Teil des AFGMNQ₃X-Spinsystems) von Ammonium-Glufoinat **6a** (0,1 M in D₂O, pH^D = 12,16). Unten: Simulation des Iterationsergebnisses

pH ^D der Probe (Hauptspezies)			pH ^D = 1,06 (H ₃ L ⁺ /H ₂ L)	pH ^D = 2,31 (H ₂ L/H ₃ L ⁺ /HL ⁻)	pH ^D = 6,12 (HL ⁻)	pH ^D = 12,16 (L ²⁻)
d_H	A	H ¹	4,1707	3,9785	3,7782	3,2482
d_H	F	H ²	2,2398	2,1568	2,0837	1,7756
d_H	G	H ³	2,1936	2,1235	2,0473	1,7157
d_H	M	H ⁴	2,0075	1,8146	1,6405	1,4980 (!)
d_H	N	H ⁵	1,9087	1,7260	1,5695	1,5020 (!)
d_H	Q	H ⁶	1,5393	1,3846	1,2484	1,2159
d_P	X	P ⁷	55,0185	48,5535	42,9736	44,8295
$^3J_{HH}$	J_{AF}	J_{12}	6,11 (1)	5,553 (8)	5,061 (7)	5,804 (5)
$^3J_{HH}$	J_{AG}	J_{13}	6,30 (1)	6,481 (8)	6,692 (7)	6,655 (5)
$^2J_{HH}$	J_{FG}	J_{23}	-14,77 (3)	-14,56 (4)	-14,78 (3)	-13,66 (2)
$^3J_{HH}$	J_{FM}	J_{24}	4,80 (2)	4,95 (2)	5,06 (2)	4,78 (4)
$^3J_{HH}$	J_{FN}	J_{25}	12,22 (2)	11,90 (1)	11,84 (2)	12,67 (4)
$^3J_{HH}$	J_{GM}	J_{34}	12,24 (2)	11,93 (1)	11,86 (1)	13,70 (4)
$^3J_{HH}$	J_{GN}	J_{35}	4,68 (2)	4,84 (2)	4,95 (1)	3,73 (5)
$^2J_{HH}$	J_{NM}	J_{45}	-15,09 (4)	-14,56 (2)	-14,60 (3)	-14,39 (7)
$^3J_{PH}$	J_{FX}	J_{27}	8,93 (2)	9,07 (2)	8,81 (2)	7,09 (2)
$^3J_{PH}$	J_{GX}	J_{37}	9,32 (2)	9,26 (2)	9,14 (2)	7,37 (1)
$^2J_{PH}$	J_{MX}	J_{47}	-15,23 (4)	-15,12 (2)	-14,92 (3)	-14,94 (2)
$^2J_{PH}$	J_{NX}	J_{57}	-15,40 (4)	-15,05 (2)	-14,58 (3)	-14,88 (2)
$^2J_{PH}$	J_{QX}	J_{67}	-14,115 (2)	-13,768 (2)	-13,458 (2)	-13,308 (1)

Tabelle 8.21: Mit WINDAISI iterierte chemische Verschiebungen d [ppm] (Standardabweichung ca. 0,01 Hz, d.h. $2 \cdot 10^{-5}$ ppm in ^1H) und Kopplungskonstanten J [Hz] (Standardabweichung in Klammern) aus den 500,13 MHz ^1H - und 202,46 MHz ^3P -NMR-Spektren von Ammonium-Glufosinat **6a** (0,1 M in D_2O)

Die stereospezifische Zuordnung der vier Methylenprotonen stellt ein besonderes Problem dar. Bei der räumlichen Anordnung von H² und H³ am **b**-Kohlenstoff gibt es zwei Alternativen, Strukturen I und II in Abbildung 8.60. Die Vorzugskonformation am Segment **c**₁ ist unbekannt und stellt eigentlich den Zweck der Analyse dar. Die vicinalen Kopplungskonstanten $^3J_{12}$ und $^3J_{13}$ genügen alleine nicht zur Unterscheidung.

Es wird zusätzlich angenommen, dass die c_1 -Rotamerenverteilungen des Phosphinothricins und des durch $\text{PO}(\text{CH}_3)(\text{OH}) \rightarrow \text{COOCH}_3$ Substitution modifizierten Glutaminsäure- β -methylsters nahezu gleich sind. Für letztere Verbindung veröffentlichten Hansen und Mitarbeiter [225] bei $\text{pD} = 4,2$ die folgende kanonische Rotamerenverteilung: $p_t = 0,46$, $p_g = 0,20$ und $p_h = 0,34$. Einsetzen dieser Anteile mit $J^G = 2,56$ Hz und $J^T = 13,6$ Hz in Gleichungen (6.37) und (6.38) liefert folgende rotationsgemittelte Konstanten für Zuordnung I: $\langle J_{12} \rangle = 4,77$ Hz und $\langle J_{13} \rangle = 7,64$ Hz. Für die alternative Zuordnung II ergibt sich: $\langle J_{12} \rangle = 7,64$ Hz und $\langle J_{13} \rangle = 4,77$ Hz. Da experimentell bei jedem pH^D -Wert $\langle J_{12} \rangle < \langle J_{13} \rangle$ beobachtet wird, muss Zuordnung I die richtige sein.

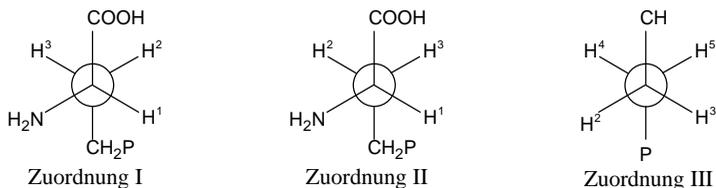


Abbildung 8.60: Stereospezifische Zuordnung der Protonen H^2 und H^3 (alternative Strukturen I und II), bzw. H^4 und H^5 (Struktur III) in Phosphinothricin **6**

Nach der Aufklärung der Konfiguration von H^2 und H^3 ist die stereospezifische Zuordnung von H^4 und H^5 durch Analyse der vicinalen $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle$ -Kopplungen möglich. Bei $\text{pH}^D = 12,16$ wurde $J_{34} \approx J_{25} \gg J_{24} \approx J_{35}$ beobachtet (siehe Tabelle 8.21). Das deutet darauf hin, dass Rotamer t am Torsionswinkel c_2 mit der *trans*-Stellung der α -Kohlenstoff- und Phosphoratome bevorzugt vorliegt.

Durch das Vorhandensein einer bevorzugten Konformation wird die Analyse wesentlich vereinfacht. Aus allen ${}^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungsbeziehungen in Kapitel 6.2.1 geht hervor, dass H^3 zum H^4 , bzw. H^2 zum H^5 *trans*-angeordnet sein müssen. Damit ergibt sich Struktur III in Abbildung 8.60 als die richtige stereospezifische Zuordnung.

Die $\langle {}^3J_{\text{PH}} \rangle$ -Kopplungen J_{27} und J_{37} betragen weniger als 10 Hz über den ganzen untersuchten pH^c -Bereich. Diese Tatsache unterstützt, dass Rotamer *trans* dominant vorliegt (in diesem Zusammenhang siehe [276]).

Unsere Analyse ergab erstmals die vollständige, räumliche Zuordnung des ABFGMQ₃X-Spinsystems zu Gerüstprotonen von Phosphinothricin (siehe Abbildung 8.61).

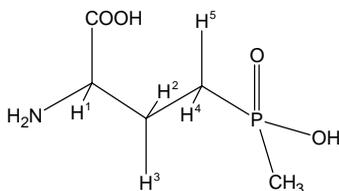


Abbildung 8.61: Stereospezifische Zuordnung der Gerüstprotonen von Phosphinothricin **6**

8.3.4.3 Einzelproben- $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Titration bei $I = 0,1\text{ M}$

Zur Aufklärung der Abfolge der Deprotonierung der Carboxy- und Methylphosphino-Gruppe wurde eine Einzelproben- $^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Titration nach Vorschrift #3 in Tabelle 7.3 durchgeführt.

Der pH-abhängige Stackplot der 200,13 MHz ^1H -NMR-Spektren ist in Abbildung 8.62 dargestellt, deren Simulation mit LAOTIT wurde in Kapitel 4.1.3 beschrieben.

Die mit WINDAISY ermittelten chemischen Verschiebungen sind in Abbildung 8.63 gegen pH^c aufgetragen.

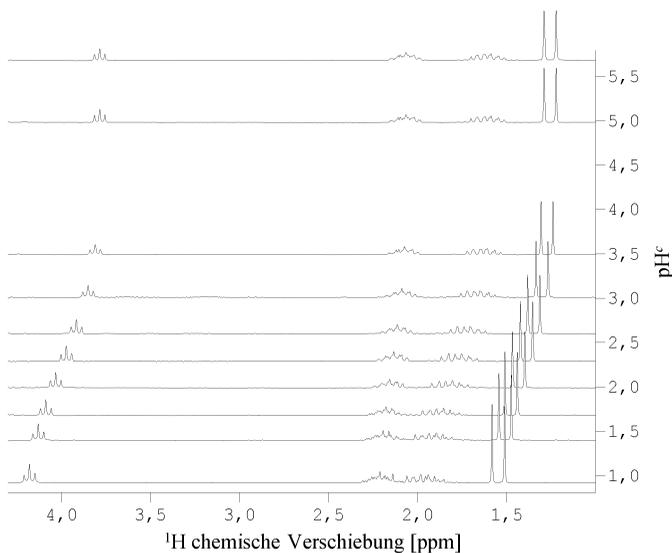


Abbildung 8.62: d_{H} vs. pH^c Stackplot der 200 MHz ^1H -NMR-Titration von Ammonium-Glufosinat **6a** ($I = 0,1\text{ M}$, $T = 22\text{ }^\circ\text{C}$)

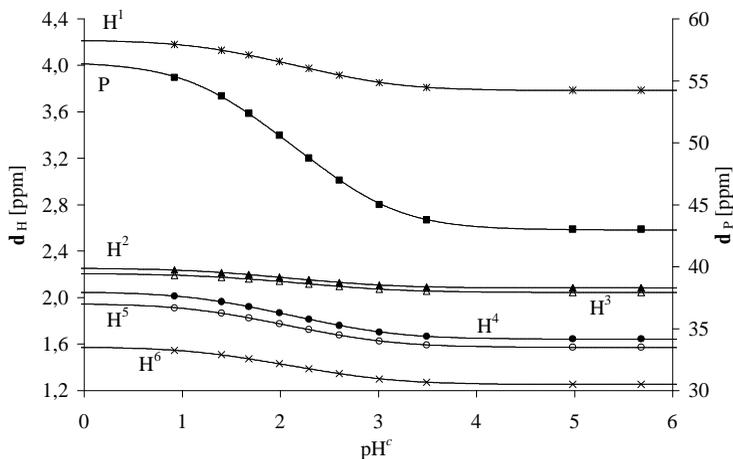


Abbildung 8.63: Chemische Verschiebungen d_{H} und d_{P} gegen pH der titrationsabhängigen 200,13 MHz ^1H - und 81,02 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von Ammonium-Glufosinat **6a** (in H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$)

Die Auswertung der ^1H -NMR-Titrationskurven wurde mit MULTINMRPK durchgeführt. Da die NMR-Messung unter den selben Bedingungen erfolgte wie zuvor die potentiometrischen Titrationsen, wurden die aus letzteren erhaltenen $\text{p}K^{\text{c}}$ -Werte während der Berechnungen konstant gehalten.

Die ionenspezifischen chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 8.22 aufgeführt.

Parameter		H_3L^+	$\Delta_{\text{H}_3\text{L}}^{\text{H}_3\text{L}^+}$	H_2L	$\Delta_{\text{HL}^-}^{\text{H}_2\text{L}}$	HL^-
d_{H}	d_1	4,217 (3)	-0,204 (4)	4,013 (3)	-0,230 (4)	3,783 (2)
d_{H}	d_2	2,253 (3)	-0,088 (4)	2,166 (3)	-0,082 (4)	2,084 (2)
d_{H}	d_3	2,207 (3)	-0,072 (4)	2,135 (3)	-0,089 (4)	2,046 (2)
d_{H}	d_4	2,051 (3)	-0,204 (4)	1,847 (3)	-0,205 (4)	1,643 (2)
d_{H}	d_5	1,949 (3)	-0,198 (4)	1,751 (3)	-0,179 (4)	1,572 (2)
d_{H}	d_6	1,576 (3)	-0,163 (4)	1,413 (3)	-0,160 (4)	1,253 (2)
d_{P}	d_7	56,52 (2)	-6,58 (4)	49,94 (3)	-6,98 (3)	42,96 (2)
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{12}	6,20 (13)	-0,83 (19)	5,37 (13)	-0,47 (15)	4,90 (7)
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{13}	6,15 (13)	0,62 (19)	6,78 (13)	0,04 (15)	6,82 (7)
${}^2J_{\text{HH}}$	J_{23}	-14,79 (27)	0,24 (38)	-14,56 (27)	-0,41 (30)	-14,97 (14)
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{24}	4,29 (27)	1,80 (38)	6,10 (0,27)	-0,90 (30)	5,19 (14)
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{25}	12,47 (27)	-0,97 (38)	11,50 (27)	0,27 (30)	11,77 (14)
${}^3J_{\text{PH}}$	J_{27}	9,34 (40)	-0,71 (57)	8,63 (40)	0,89 (45)	9,51 (21)
${}^2J_{\text{PH}}$	J_{56}	-14,16 (2)	0,67 (3)	-13,49 (3)	0,17 (4)	-13,32 (3)
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{34}	13,20 (40)	-2,94 (0,57)	10,25 (40)	1,65 (45)	11,91 (21)
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{35}	4,30 (13)	1,20 (19)	5,50 (13)	-0,46 (15)	5,04 (7)
${}^3J_{\text{PH}}$	J_{37}	8,86 (27)	0,98 (38)	9,84 (27)	-1,10 (30)	8,74 (14)
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{45}	-14,87 (13)	0,17 (19)	-14,69 (13)	-0,05 (15)	-14,74 (7)
${}^2J_{\text{PH}}$	J_{47}	-15,52 (13)	0,55 (19)	-14,97 (13)	-0,01	-14,98 (7)
${}^2J_{\text{PH}}$	J_{57}	-15,47 (13)	0,30 (19)	-15,17 (13)	0,55 (15)	-14,62 (7)
${}^2J_{\text{PH}}$	J_{67}	-14,18 (1)	0,34 (2)	-13,83 (1)	0,38 (1)	-13,455 (7)

Tabelle 8.22: Mit MULTINMRPK berechnete NMR-Parameter der Protolysespezies von Ammonium-Glufosinat **6a** (in H_2O , $I = 0,1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$)

8.3.4.4 Einzelproben- ${}^1\text{H}^{\text{31}}\text{P}\{\text{H}\}$ -NMR-Titration bei $I = 1 \text{ M}$

Das Dissoziationsverhalten von Ammonium-Glufosinat **6a** wurde im Rahmen einer „elektrodenlosen“ Titration unter den in Kapitel 7.3.2 angegebenen experimentellen Bedingungen an der DRX 200 Anlage durchgeführt. Der Vorteil der verwendeten

Titrationstyp liegt darin, dass die unterhalb 2 liegenden $\text{pH}^{\text{c,D}}$ -Werte aus $\langle d \rangle$ der Dichloressigsäure genauer zu erhalten sind als mit der Glaselektrode (siehe Kapitel 8.1).

Die ^1H chemischen Verschiebungen wurden iterativ mit WINDAISY ermittelt und sind in Abbildung 8.64 in Abhängigkeit von $\text{pH}^{\text{c,D}}$ dargestellt. Aus diesen Daten wurden anschließend die ionenspezifischen chemischen Verschiebungen mit MULTINMRPK berechnet (Tabelle 8.23).

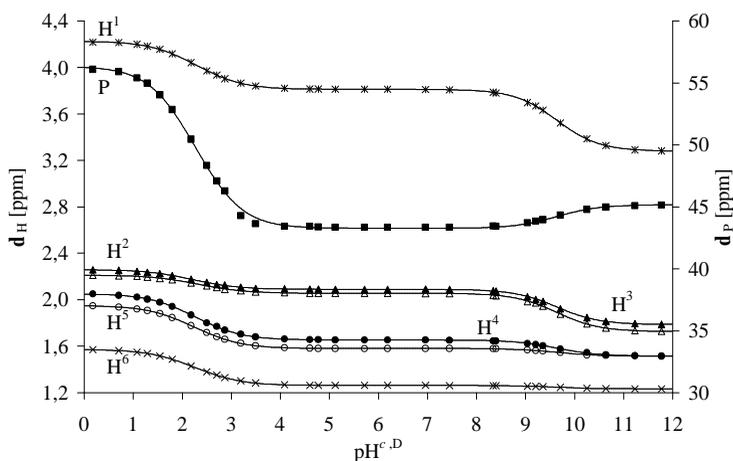


Abbildung 8.64: ^1H - und ^{31}P -NMR-Titrationskurven aus der 200,13 MHz ^1H - und 81,02 MHz $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Messung von Phosphinothricin **6** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 1 \text{ M}$, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$)

Parameter	H_3L^+	$\Delta_{\text{H}_3\text{L}^+}^{\text{H}_2\text{L}}$	H_2L	$\Delta_{\text{H}_2\text{L}}^{\text{HL}^-}$	HL^-	$\Delta_{\text{HL}^-}^{\text{L}^{2-}}$	L^{2-}
d_{H} d_1	4,225 (1)	-0,20 (2)	4,02 (2)	-0,21 (2)	3,811 (1)	-0,532 (1)	3,279 (1)
d_{H} d_2	2,259 (1)	-0,10 (1)	2,16 (1)	-0,07 (1)	2,090 (1)	-0,303 (1)	1,786 (1)
d_{H} d_3	2,211 (1)	-0,07 (1)	2,14 (1)	-0,08 (1)	2,056 (1)	-0,330 (1)	1,726 (1)
d_{H} d_4	2,051 (1)	-0,20 (2)	1,85 (2)	-0,19 (2)	1,654 (1)	-0,140 (1)	1,514 (1)
d_{H} d_5	1,949 (1)	-0,19 (2)	1,75 (2)	-0,17 (2)	1,581 (1)	-0,066 (1)	1,515 (1)
d_{H} d_6	1,572 (1)	-0,16 (2)	1,41 (2)	-0,15 (2)	1,262 (6)	-0,030 (1)	1,233 (1)
d_{P} d_7	56,33 (6)	-6,6 (8)	49,7 (8)	-6,5 (8)	43,26 (3)	1,90 (6)	45,16 (5)

Tabelle 8.23: Mit MULTINMRPK berechnete ionenspezifische chemische Verschiebungen [ppm] von Phosphinothricin **6** (in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1 \text{ M NaNO}_3$)

8.3.4.5 Berechnung der mikroskopischen Dissoziationskonstanten

Phosphinothricin **6** kann bei $\text{pH} < 6$ wie eine zweibasige Säure behandelt werden. Die vollständige, mikroskopische Dissoziationsschema der Verbindung ist in Abbildung 8.65 dargestellt. Die Mikrokonstanten k sollen aus den ^1H und ^{31}P chemischen Verschiebungen bei beiden verwendeten Ionenstärken ermittelt werden.

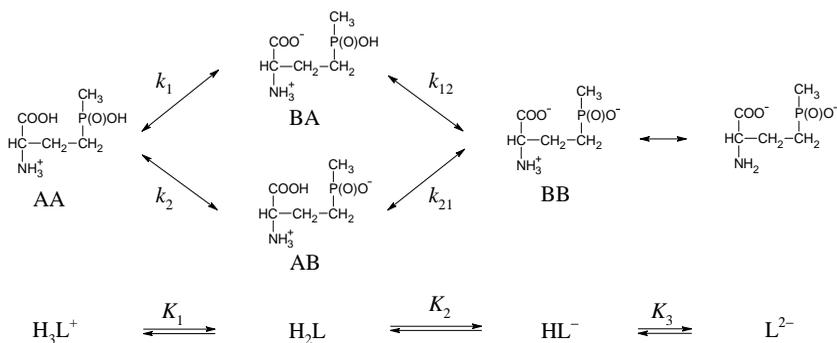


Abbildung 8.65: Mikroskopisches (oben) und makroskopisches (unten) Dissoziationsschema von Phosphinothricin **6**

Als Anhaltspunkt der Auswertung dient hier die Annahme, dass die *P*-Methylprotonen selektiv auf die Dissoziation der Phosphinogruppe reagieren, während das *a*-Proton H^1 einen Sensor für die Carboxygruppe darstellt. Diese Annahme wird dadurch belegt, dass die Deprotonierung der *a*-Ammoniumgruppe einen bedeutenden Dissoziationsshift von 0,53 ppm am benachbarten Proton H^1 , aber nur einen viel geringeren Δd von 0,03 ppm am Methylprotonen H^6 bewirkt (siehe Tabelle 8.22). Nach diesem Befund kann man davon ausgehen, dass die Dissoziation der im gleichen kovalenten Abstand liegenden COOH-Gruppe ebenso gering zu Δd von H^6 im aciden Bereich beiträgt.

Die mit NMRMICROPK berechneten Mikrokonstanten sind in Tabelle 8.24 verzeichnet. Sie werden hier zusammen mit Daten für Glutaminsäure **4** diskutiert, die eingehend in Kapitel 8.3.5.1 beschrieben wird.

Messung	$^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR-Titration (diese Arbeit)	$^1\text{H}/^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR-Titration (diese Arbeit)	Glutaminsäure Ref. [277]
Messbedingungen	22 °C, $I = 0,1 \text{ M}$ H_2O $c_{\text{H}_3\text{L}^+}^{\text{t}} = 20 \text{ mM}$	22 °C, $I = 1 \text{ M}$ $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O} \text{ 9/1}$ $c_{\text{H}_3\text{L}^+}^{\text{t}} = 30 \text{ mM}$	25 °C, $I = 1 \text{ M}$ H_2O $c_{\text{H}_3\text{L}^+}^{\text{t}} = 2.5 \text{ mM}$
$\text{p}K_1$	1,62	1,88 (6)	2,39
$\text{p}K_2$	2,62	2,66 (6)	4,07
Annahme bei der mikroskopischen Auswertung	Selektivität der Protonen $\alpha\text{-CH}$ und P-CH_3		Übernahme des $\text{p}E$ von Modell- verbindungen
$\text{p}k_1$	1,943 (5)	2,20	2,40
$\text{p}k_2$	1,912 (5)	2,18	3,95
$\text{p}k_{12}$	2,307 (3)	2,35	2,51
$\text{p}k_{21}$	2,337 (3)	2,37	4,05
$k_{\text{T}} = k_2 / k_1$	0,93	0,95	35,5
$\text{p}E$	0,395	0,17	0,11

Tabelle 8.24: Mikroskopische ($\text{p}k$) und makroskopische ($\text{p}K$) Dissoziationskonstanten, bzw. Wechselwirkungsparameter ($\text{p}E$) von Phosphinothricin **6**, im Vergleich zur Glutaminsäure **7**

Die Phosphinogruppe hat eine um 0,03 $\text{p}K$ -Einheiten größere Acidität als die Carboxygruppe in Phosphinothricin **6**. Diese Differenz ist kaum größer als die Fehlergrenze der Mikrokonstanten selbst, so ist die Acidität der beiden Gruppen praktisch gleich. Nach den Überlegungen in Kapitel 5.5 drückt sich diese Tatsache auch im Zusammenfall der normierten Titrationskurven aus (siehe Abbildung 8.66).

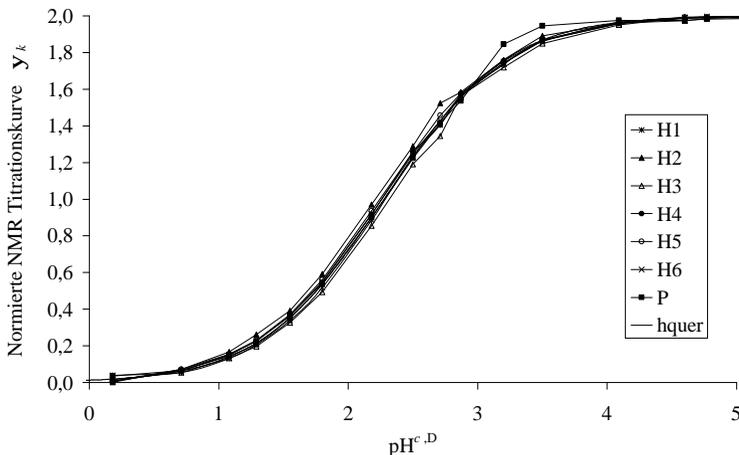


Abbildung 8.66: Normierte NMR-Titrationskurven von Phosphinothricin **6** im aciden Bereich (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $T = 22$ °C, $I = 1$ M). hquer repräsentiert den makroskopischen Dissoziationsgrad (Bjerrum-Funktion)

In Glutaminsäure weist dagegen die **a**-Carboxygruppe eine um 35,5-fach größere Acidität im Bezug auf die **g**-Carboxygruppe auf.

Die Wechselwirkungsparameter von Phosphinothricin **6** und Glutaminsäure **7** sind nahezu identisch bei 1 molarer Ionenstärke. Der pE -Wert von Phosphinothricin wächst auf 0,395 bei 0,1 molarer Ionenstärke, was jedoch noch immer kleiner als der für 3-(Methylphosphinoyl)propansäure **5** abgeleitete Wert von 0,68 ist. Dies kann einerseits mit der um eine Methylengruppe größeren Isolierung der beiden Gruppen erläutert werden. Darüber hinaus enthält Phosphinothricin **6** zusätzlich eine Aminogruppe am **a**-Kohlenstoff, die einen elektronenziehenden (-I) Effekt ausübt und damit den Wechselwirkungsparameter herabsetzt.

Die Molenbruchdiagramme von Phosphinothricin **6** und Glutaminsäure **7** sind in den Abbildungen 8.67 bzw. 8.71 ersichtlich. Im physiologischen pH-Bereich können keine wesentlichen Unterschiede beobachtet werden, die dominante Spezies ist die an der Aminogruppe protonierte HL^- . Im aciden Bereich unterscheidet sich jedoch die Speziesverteilung gravierend. Die Summe der drei pK -Werte ist für Glutaminsäure höher, das kann nach empirischen Korrelationen der Komplexchemie [1] zu höherer Stabilität der Übergangsmetallkomplexe führen.

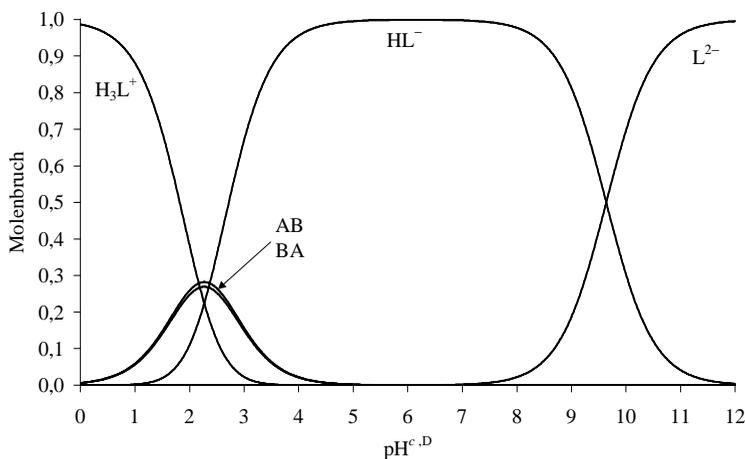


Abbildung 8.67: pH-abhängige Molenbruchverteilung der Mikrospesies von Phosphinothricin **6** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $T = 22^\circ\text{C}$, $l = 1\text{ M}$)

8.3.4.6 Rotamerenanalyse am Torsionswinkel c_1

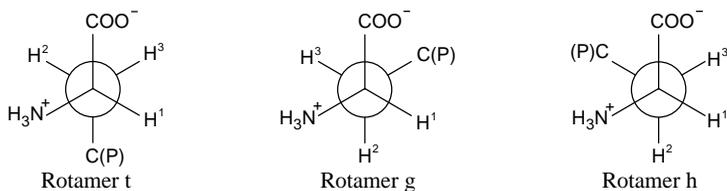


Abbildung 8.68: Kanonische Rotamere von Phosphinothricin **6** am Torsionswinkel c_1

Die kanonischen Rotamere von Phosphinothricin **6** um die Bindungsachse $\text{C}^a\text{-C}^b$ sind in Abbildung 8.68 dargestellt.

In Kapitel 6.4.3 wurde die Rotamerenanalyse der $\text{pH}^{\text{D}} = 6,12$ Probe in D_2O in Details erläutert. Die dort angeführten Methoden wurden auf die 500,13 Hz Kopplungskonstanten (Tabelle 8.25) angewandt und ergaben die in Tabelle 8.25 aufgelisteten Rotamerenanteile. Die gleichen Auswerteverfahren lieferten aus den 200,31 MHz ionenspezifischen Kopplungen (Tabelle 8.22) die in Tabelle 8.26 angeführten Ergebnisse.

pH ^D der Probe Hauptspezies	1,06 (dominiert H ₃ L ⁺)			2,13 (H ₃ L ⁺ und H ₂ L)			6,12 (HL ⁻)			11,98 (L ²⁻)		
Rotamer	<i>f_i</i>	<i>f_g</i>	<i>f_h</i>	<i>p_i</i>	<i>p_g</i>	<i>p_h</i>	<i>f_i</i>	<i>f_g</i>	<i>f_h</i>	<i>f_i</i>	<i>f_g</i>	<i>f_h</i>
Hansen	0,34	0,32	0,34	0,36	0,27	0,37	0,37	0,23	0,40	0,37	0,29	0,34
Martin	0,36	0,34	0,30	0,37	0,29	0,34	0,39	0,24	0,36	0,39	0,31	0,30
Haasnoot B	0,37	0,35	0,28	0,39	0,29	0,32	0,41	0,24	0,36	0,41	0,32	0,27
Haasnoot D	0,37	0,35	0,28	0,38	0,28	0,34	0,40	0,22	0,37	0,41	0,31	0,28

Tabelle 8.25: Aus $\langle^3J_{\text{HH}}\rangle$ -Kopplungskonstanten berechnete c_1 -Rotamerenverteilung von Phosphinothricin **6** (0,20 M in D₂O, 500,13 MHz ¹H-Messfrequenz, $T = 22$ °C)

Protolysespezies	H ₃ L ⁺			H ₂ L			HL ⁻		
Rotameranteil	<i>f_i</i>	<i>f_g</i>	<i>f_h</i>	<i>f_i</i>	<i>f_g</i>	<i>f_h</i>	<i>f_i</i>	<i>f_g</i>	<i>f_h</i>
Hansen	0,33	0,33	0,34	0,38	0,25	0,36	0,39	0,21	0,40
Martin	0,34	0,35	0,31	0,40	0,27	0,33	0,41	0,23	0,37
Haasnoot B	0,35	0,36	0,29	0,42	0,27	0,31	0,42	0,22	0,36
Haasnoot D	0,35	0,36	0,29	0,42	0,26	0,32	0,42	0,21	0,38
Altona	0,32	0,33	0,36	0,39	0,23	0,38	0,39	0,18	0,43

Tabelle 8.26: Aus ionenspezifischen $\langle^3J_{\text{HH}}\rangle$ -Kopplungskonstanten c_1 -Rotamerenverteilung von Phosphinothricin **6** (0,02 M in H₂O, 200,13 MHz ¹H-Messfrequenz, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

8.3.4.7 Rotamerenanalyse am Torsionswinkel c_2

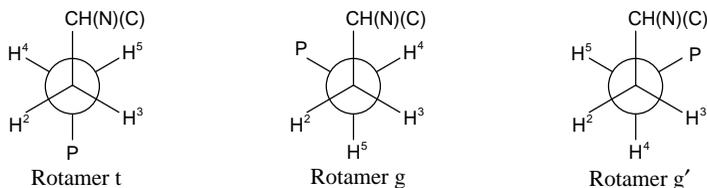


Abbildung 8.69: Kanonische Rotamere von Phosphinothricin **6** am Torsionswinkel c_2

Abbildung 6.14 zeigt die Rotamere von Phosphinothricin um die Bindungsachse C^b-C^g . Wegen des zusätzlichen Torsionswinkels c_1 sind Rotamere g und g' nicht mehr energiegleich.

In Kapitel 6.4.2 wurde die Rotamerenanalyse der $\text{pH}^{\text{D}} = 6,12$ Probe in D_2O bereits besprochen. Die dort dargestellten Ansätze wurden nun auf die 500,13 Hz Kopplungskonstanten (Tabelle 8.25) angewandt, die resultierenden Rotamerenanteile sind in Tabelle 8.27 verzeichnet. Die gleichen Auswerteverfahren lieferten aus den 200,31 MHz ionenspezifischen Kopplungen (Tabelle 8.22) die in Tabelle 8.28 angeführten speziesbezogenen Rotamerenanteile.

pH^{D} der Probe	1,06			2,13			6,12			11,98		
Hauptspezies	H_3L^+			H_3L^+ und H_2L			HL^-			L^{2-}		
Rotamer	f_t	f_g	$f_{g'}$	p_t	p_g	$p_{g'}$	f_t	f_g	$f_{g'}$	f_t	f_g	$f_{g'}$
Abraham,Gatti	0,82	0,09	0,08	0,79	0,11	0,10	0,78	0,11	0,10	0,93	0,07	0,01
Haasnoot B	0,78	0,12	0,11	0,85	0,08	0,07	0,74	0,13	0,12	0,86	0,09	0,05
Haasnoot C	0,69	0,16	0,15	0,87	0,07	0,06	0,66	0,17	0,16	0,76	0,14	0,10
Lin	0,71	0,14	0,14	0,74	0,13	0,13	0,72	0,13	0,14	0,84	0,08	0,08

Tabelle 8.27: Aus $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle$ -Kopplungskonstanten berechnete c_2 -Rotamerenverteilung von Phosphinothricin **6** (0,20 M in D_2O , 500,13 MHz ^1H -Messfrequenz, $T = 22\text{ }^\circ\text{C}$)

Protolysespezies	H_3L^+			H_2L			HL^-		
Rotamerenanteil	f_t	f_g	$f_{g'}$	f_t	f_g	$f_{g'}$	f_t	f_g	$f_{g'}$
Abraham, Gatti	0,89	0,04	0,07	0,68	0,22	0,10	0,78	0,11	0,10
Haasnoot B	0,83	0,07	0,10	0,66	0,22	0,11	0,84	0,08	0,08
Haasnoot C	0,74	0,12	0,15	0,59	0,25	0,15	0,87	0,07	0,06
Lin	0,83	0,08	0,09	0,62	0,19	0,19	0,77	0,12	0,12

Tabelle 8.28: Aus ionenspezifischen $\langle {}^3J_{\text{HH}} \rangle$ -Kopplungskonstanten c_2 -Rotamerenverteilung von Phosphinothricin **6** (0,02 M in H_2O , 200,13 MHz ^1H -Messfrequenz, $I = 0,1\text{ M}$, $T = 22\text{ }^\circ\text{C}$)

8.3.4.8 Berechnung der rotamerspezifischen Dissoziationskonstanten

Wie in Kapitel 6.4.4 bereits dargestellt wurde, lässt sich die Gesamtkonformation von Phosphinothricin durch neun kanonische Rotamere beschreiben, deren Verteilung in jeder Dissoziationsstufe der Verbindung charakterisiert werden soll. Nach dem Gedankengang in Kapitel 6.5 wurden die in Tabelle 8.29 angeführten Populationen berechnet. Beispielsweise

beträgt die relative Häufigkeit des monoprotonierten Rotamers hg 5%, die durch Dissoziation der Ammoniumgruppe auf 1,5% sinkt. Aus diesen Populationen wurden anschließend die Rota-Dissoziationskonstanten in Tabelle 8.30 berechnet, die die Acidität einzelner Gruppen in individuellen Rotameren beschreiben.

c_1/c_2	t	g	g'
t	<p>tt: H_3L^+ 27% \rightarrow H_2L 28% HL^- 29% \rightarrow L^{2-} 35%</p>	<p>tg: H_3L^+ 4% \rightarrow H_2L 6% HL^- 5% \rightarrow L^{2-} 2%</p>	<p>tg': H_3L^+ 4% \rightarrow H_2L 6% HL^- 5% \rightarrow L^{2-} 2%</p>
g	<p>gt: H_3L^+ 27% \rightarrow H_2L 19% HL^- 18% \rightarrow L^{2-} 28%</p>	<p>gg: H_3L^+ 4% \rightarrow H_2L 4% HL^- 3% \rightarrow L^{2-} 1,5%</p>	<p>gg': H_3L^+ 4% \rightarrow H_2L 4% HL^- 3% \rightarrow L^{2-} 1,5%</p>
h	<p>ht: H_3L^+ 24% \rightarrow H_2L 23% HL^- 26% \rightarrow L^{2-} 27%</p>	<p>hg: H_3L^+ 3% \rightarrow H_2L 5% HL^- 5% \rightarrow L^{2-} 1,5%</p>	<p>hg': H_3L^+ 3% \rightarrow H_2L 5% HL^- 5% \rightarrow L^{2-} 1,5%</p>

Tabelle 8.29: Verteilung der kanonischen Rotamere für alle Dissoziationsstufen von Glufosinat **6** (in H_2O , $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

	bulk	tt	tg	tg'	gt	gg	gg'	ht	hg	hg'
pK_1	1,94	1,92	1,76	1,76	2,09	1,94	1,94	1,96	1,72	1,72
pK_2	1,91	1,89	1,73	1,73	2,06	1,91	1,91	1,93	1,69	1,69
pK_{12}	2,31	2,29	2,39	2,39	2,33	2,43	2,43	2,26	2,31	2,31
pK_{21}	2,34	2,32	2,42	2,42	2,36	2,46	2,46	2,29	2,34	2,34
pK_3	9,66	9,58	10,06	10,06	9,47	9,96	9,96	9,64	10,18	10,18

Tabelle 8.30: Rotamerspezifische Dissoziationskonstanten von Phosphinothricin **6**
(in H_2O , $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

In den dominanten, gestreckten Konformationen tt, tg und ht ist die Entfernung der negativ geladenen funktionellen Gruppen maximal. Diese Analyse erlaubt aber die Diskussion weniger populierter Konformationen. In Protolysestufen H_3L^+ , H_2L und HL^- liegt die Aminogruppe protoniert vor. Infolge deren elektrostatischen Anziehung mit der Methylphosphinogruppe sind die Konformationen in den Spalten 2 und 3 der Tabelle 8.29 zu etwa 3-6% populiert. Wenn die Ammoniumgruppe dissoziiert ($HL^- \rightarrow L^{2-}$), wird die coulombsche Stabilisierung aufgehoben, so geht die negativ geladene Phosphinogruppe in *anti*-Stellung über und nimmt am Segment χ_2 der *trans*-Anteil zu (Spalte 1).

8.3.5 Glutaminsäure (7)

8.3.5.1 Makroskopische und mikroskopische Dissoziationskonstanten

Das vollständige, mikroskopische Dissoziationsschema von Glutaminsäure **7** ist Abbildung 8.70 zu entnehmen. Burger *et al.* haben den Wechselwirkungsparameter der Carboxygruppen anhand der *pK*-Werte von Glutarsäure zu $-0,11$ abgeschätzt [277]. Mit Hilfe dieser Zusatzinformation wurden die in Abbildung 8.70 dargestellten Mikrokonstanten abgeleitet und die Molenbruchverteilung in Abbildung 8.71 erstellt.

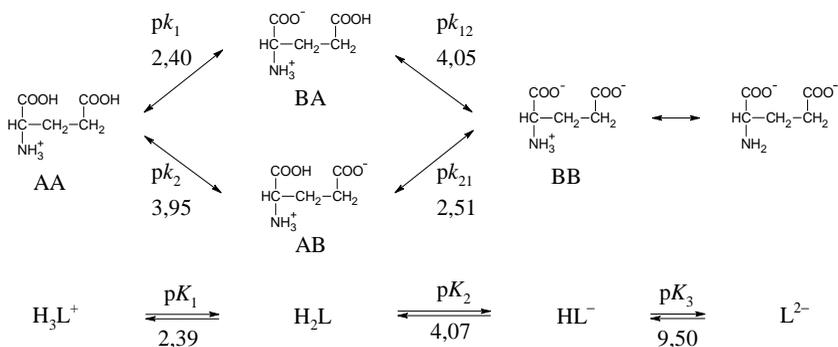


Abbildung 8.70: Makroskopische (unten) und mikroskopische (oben) Protolyseschemata von Glutaminsäure 7 mit den zugehörigen pK, bzw. pk-Werten aus [277] (in H_2O , $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1\text{ M}$)

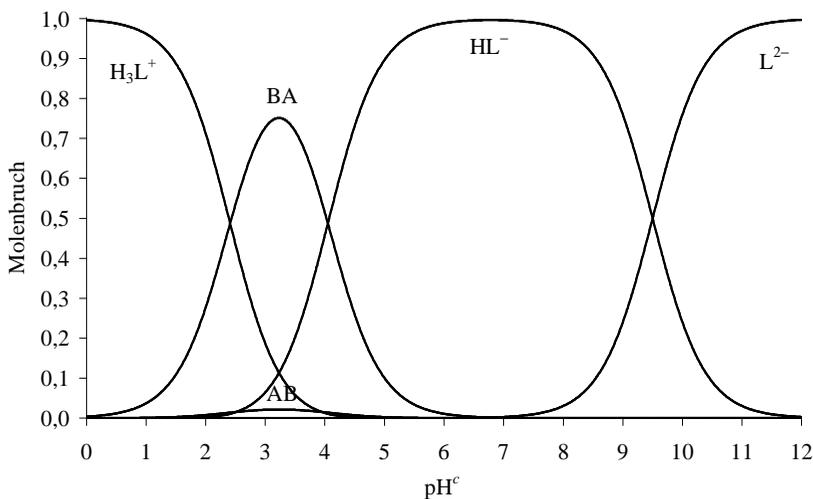


Abbildung 8.71: pH^c-abhängige Molenbruchverteilung der Mikrospesies von Glutaminsäure 7 (in H_2O , $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $I = 1\text{ M}$). Berechnet mit Mikrokonstanten aus [277]

8.3.5.2 Zuordnung und Analyse der ¹H-Spektren

Die Zuordnung und Spinanalyse von Glutaminsäure erfolgten an drei Einzelproben in D_2O , die nach Vorschrift #1 in Tabelle 7.3 erstellt wurden.

Abbildung 8.72 zeigt die Durchnummerierung der Gerüstprotonen des Moleküls. Im ^1H -Spektrum wird ein AFGMN-Spinsystem beobachtet. Die vollständige, pH-abhängige Zuordnung der Protonenspektren wurde erstmalig in dieser Arbeit getroffen, nach dem gleichen Gedankengang wie bei Phosphinothricin **6** in Kapitel 8.3.4.2. Auffallend in Abbildung 8.73 ist die Kreuzung der Resonanzsignale der geminalen Methylenprotonen mit steigendem pH^{D} -Wert. Die mit WINDAISY ermittelten ^1H -NMR-Parameter sind in Tabelle 8.31 zusammengefasst.

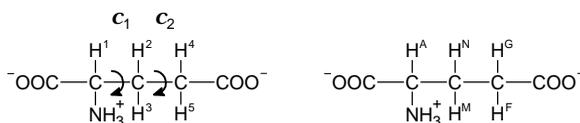


Abbildung 8.72: Durchnummerierung und Zuordnung der Gerüstprotonen von Glutaminsäure **7** mit Bezeichnung der Torsionswinkel c_1 und c_2

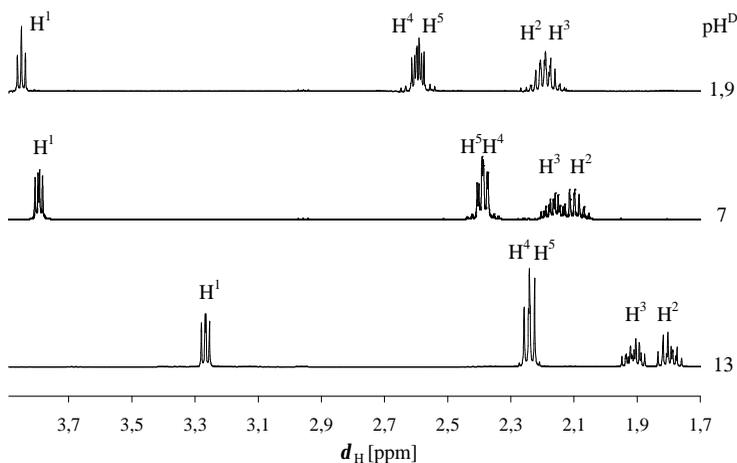


Abbildung 8.73: pH-Abhängigkeit und Zuordnung der 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektren von Glutaminsäure **7** (0,2 M in D_2O)

Parameter / Spinlabel (Hauptspezies)		eigen-pH ^D ≈ 1,9 (H ₃ L ⁺ und H ₂ L)		pH ^D ≈ 7 (HL ⁻)		pH ^D ≈ 13 (L ²⁻)	
d_H	H ¹	A	3,800 (1)	A	3,7447	A	3,2169
d_H	H ²	M	2,160 (1)	N	2,0447	N	1,7489
d_H	H ³	N	2,123 (1)	M	2,1177	M	1,8613
d_H	H ⁴	F	2,556 (2)	G	2,3297	F	2,1946
d_H	H ⁵	G	2,531 (1)	F	2,3475	G	2,1873
³ J _{HH}	J ₁₂	J _{AM}	6,04	J _{AN}	7,27	J _{AN}	7,27
³ J _{HH}	J ₁₃	J _{AN}	6,68	J _{AM}	4,66	J _{AM}	5,68
² J _{HH}	J ₂₃	J _{MN}	-14,65 (1)	J _{MN}	-14,81	J _{MN}	-13,60 (n.i.)
³ J _{HH}	J ₂₄	J _{FM}	6,575 (5)	J _{GN}	6,24	J _{FN}	5,28 (1)
³ J _{HH}	J ₂₅	J _{GM}	8,532 (6)	J _{FN}	8,68	J _{GN}	11,22 (1)
³ J _{HH}	J ₃₄	J _{FN}	8,496 (5)	J _{GM}	8,75	J _{FM}	11,19 (2)
³ J _{HH}	J ₃₅	J _{GN}	6,538 (5)	J _{FM}	6,71	J _{GM}	5,70 (2)
³ J _{HH}	J ₄₅	J _{FG}	-17,12 (2)	J _{FG}	-15,97	J _{FG}	-14,70 (n.i.)

Tabelle 8.31: Iterierte chemische Verschiebungen **d** [ppm] und Kopplungskonstanten **J** [Hz] aus 500,13 MHz ¹H-NMR-Spektren von Glutaminsäure **7** (0,2 M in D₂O)

8.3.5.3 Rotamerenanalyse am Torsionswinkel c_1

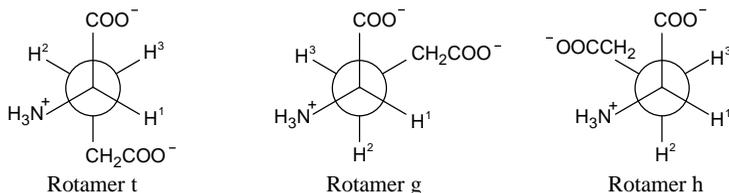


Abbildung 8.74: Kanonische Rotamere von Glutaminsäure **7** am Segment c_1

Die kanonischen Rotamere von Glutaminsäure am Torsionswinkel c_1 sind Abbildung 8.74 zu entnehmen. Deren Populationen werden in Tabelle 8.32 zusammengefasst.

Die nach verschiedenen Ansätzen berechneten Ergebnisse stimmen auf $\pm 4\%$ überein.

pH ^D der Probe (Hauptspezies)	eigen-pH ^D ≈ 1,9 (H ₃ L ⁺ und H ₂ L)			pH ^D ≈ 7 (HL ⁻)			pH ^D ≈ 13 (L ²⁻)		
	<i>p_t</i>	<i>p_g</i>	<i>p_h</i>	<i>p_t</i>	<i>p_g</i>	<i>p_h</i>	<i>p_t</i>	<i>p_g</i>	<i>p_h</i>
Hansen	0,37	0,32	0,31	0,43	0,19	0,38	0,43	0,28	0,29
Martin	0,39	0,33	0,27	0,45	0,21	0,35	0,45	0,30	0,25
Haasnoot B	0,41	0,34	0,25	0,46	0,19	0,35	0,47	0,31	0,22
Haasnoot D	0,42	0,34	0,24	0,47	0,18	0,35	0,48	0,30	0,21

Tabelle 8.32: Aus $\langle^3J_{\text{HH}}\rangle$ -Kopplungskonstanten berechnete *c*₁-Rotamerenverteilung von Glutaminsäure **7** (0,20 M in D₂O, 500,13 MHz ¹H-Messfrequenz, *T* = 22 °C)

8.3.5.4 Rotamerenanalyse am Torsionswinkel *c*₂

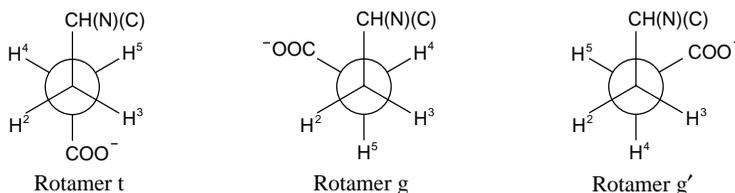


Abbildung 8.75: Kanonische Rotamere von Glutaminsäure **7** am Torsionswinkel *c*₂

Die kanonischen *g* und *g'* Rotamere am Segment *c*₂ sind nicht äquivalent. Aus Tabelle 8.33 geht hervor, dass die aus verschiedenen Karplusgleichungen nach dem Mittelwertmodell (Kapitel 6.4.1.2) berechneten Rotamerenanteile untereinander gute Übereinstimmung zeigen. Im aciden Bereich wurde ein *p_t:p_g* Rotamerenverhältnis von ca. 2:1 verzeichnet, das im Alkalischen auf ca. 6:1 ansteigt. Die Linsche Methode liefert hingegen eine unrealistisch große Präferenz für den *trans*-Rotamer. Zur Ermittlung der Gesamtkonformation von Glutaminsäure im nachfolgenden Kapitel werden deshalb die nach dem Haasnoot-B Modell berechneten Rotamerenpopulationen verwendet.

pH ^D der Probe (Hauptspezies)	1,9 (H ₃ L ⁺ und H ₂ L)			7 (HL ⁻)			13 (L ²⁻)		
	<i>p</i> _t	<i>p</i> _g	<i>p</i> _{g'}	<i>p</i> _t	<i>p</i> _g	<i>p</i> _{g'}	<i>p</i> _t	<i>p</i> _g	<i>p</i> _{g'}
Abraham, Gatti	0,47	0,27	0,26	0,49	0,23	0,28	0,76	0,10	0,14
Haasnoot B	0,50	0,25	0,25	0,52	0,22	0,26	0,75	0,11	0,14
Haasnoot C	0,46	0,27	0,27	0,47	0,24	0,28	0,68	0,15	0,18
Lin	0,90	0,05	0,05	0,90	0,05	0,05	0,80	0,10	0,10

Tabelle 8.33: Aus $\langle^3J_{\text{HH}}\rangle$ -Kopplungskonstanten berechnete c₂-Rotamerenverteilung von Glutaminsäure **7** (0,20 M in D₂O, 500,13 MHz ¹H-Messfrequenz, *T* = 22 °C)

8.3.5.5 Berechnung der rotamerspezifischen Dissoziationskonstanten

Die relativen Häufigkeiten der neun kanonischen Rotamere von Glutaminsäure wurden für drei Dissoziationszustände der Verbindung berechnet (siehe Tabelle 8.29). Da in den Probelösungen mit pH^D = 7 und 13 die Spezies HL⁻ bzw. L²⁻ dominant vorliegen, ergeben die angeführten Rotamerenanteile die Konformation dieser Spezies, woraus die in Tabelle 8.35 aufgeführten rotamerspezifischen p*K*₃-Werte erhältlich sind.

Die Rotamerenanteile bei pH^D = 1 sind jedoch nicht den einzelnen Protolysespezies H₃L⁺ und H₂L zuzuordnen (siehe die Molenbruchverteilung in Abbildung 8.71).

Die Rotamerenverteilung für die verschiedenen Dissoziationsstufen weist die gleichen Merkmale auf wie bei Phosphinothricin **6** (Kapitel 8.3.4.8). Der Unterschied besteht darin, dass die untergeordneten Rotamere (Spalten 2 und 3) von Glutaminsäure in ca. doppelt so großen Anteilen vorliegen wie bei **6**. Die elektrostatische Anziehung der Ammonium- und *g*-Carboxylatgruppe spielt hier eine größere Rolle.

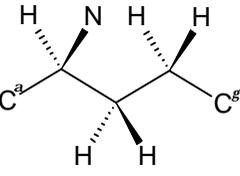
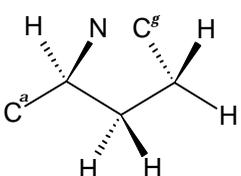
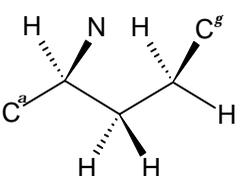
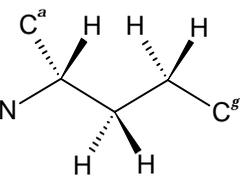
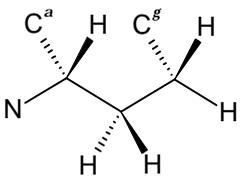
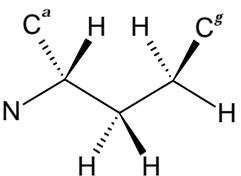
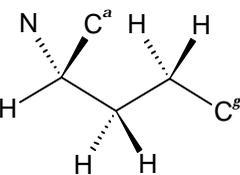
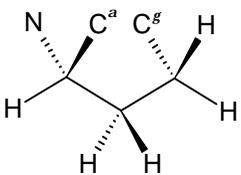
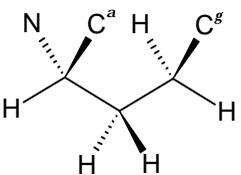
c_1/c_2	t	g	g'
t	 <p>tt: $H_3L^+ + H_2L$ 20% HL⁻ 23% → L²⁻ 34%</p>	 <p>tg: $H_3L^+ + H_2L$ 10% HL⁻ 10% → L²⁻ 5%</p>	 <p>tg': $H_3L^+ + H_2L$ 10% HL⁻ 12% → L²⁻ 6%</p>
g	 <p>gt: $H_3L^+ + H_2L$ 17% HL⁻ 11% → L²⁻ 23%</p>	 <p>gg: $H_3L^+ + H_2L$ 8% HL⁻ 5% → L²⁻ 3%</p>	 <p>gg': $H_3L^+ + H_2L$ 8% HL⁻ 5% → L²⁻ 4%</p>
h	 <p>ht: $H_3L^+ + H_2L$ 13% HL⁻ 18% → L²⁻ 19%</p>	 <p>hg: $H_3L^+ + H_2L$ 7% HL⁻ 7% → L²⁻ 3%</p>	 <p>hg': $H_3L^+ + H_2L$ 7% HL⁻ 9% → L²⁻ 4%</p>

Tabelle 8.34: Verteilung der kanonischen Rotamere für alle Dissoziationsstufen von Glutaminsäure **7** (0,2 M in D₂O, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

	bulk	tt	tg	tg'	gt	gg	gg'	ht	hg	hg'
pK_3	9,50	9,33	9,80	9,80	9,18	9,72	9,60	9,48	9,87	9,85

Tabelle 8.35: Rotamerspezifische Dissoziationskonstanten der Ammoniumgruppe in Glutaminsäure **7** (0,2 M in D₂O, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

8.4 Carnosin und biorelevante Histidyl-derivate

8.4.1 3-Aminopropansäure (*b*-Alanin, **8**)

8.4.1.1 Dissoziationskonstanten

Die pK^D -Bestimmung von *b*-Alanin **8** erfolgte durch eine Einzelproben- ^1H -NMR-Titration (siehe das nachfolgende Kapitel).

Die Dissoziationskonstanten in Tabelle 8.36 verdeutlichen, dass es sich hier um ein Aciditätssystem erster Ordnung handelt. Wie Abbildung 8.76 zeigt, treten die Protolysespezies H_2L^+ , HL und L^- in gesonderten pH-Bereichen auf.

pK_1	pK_2	Typ	T [°C]	I [M]	Medium	$c_{\text{L}}^{\text{tot}}$ [mM]	Mth. Ref.
3,49 (2)	10,39 (1)	pK^D	22	0,1 NaNO_3	10% D_2O	20	^1H d.A.
3,61	10,25	pK^D	25	kein Zusatz	D_2O	–	^1H [285]
3,57	10,14	pK^c	25	0,1	H_2O	–	Pot. [286]

Tabelle 8.36: Dissoziationskonstanten von *b*-Alanin **8**. d.A.: diese Arbeit

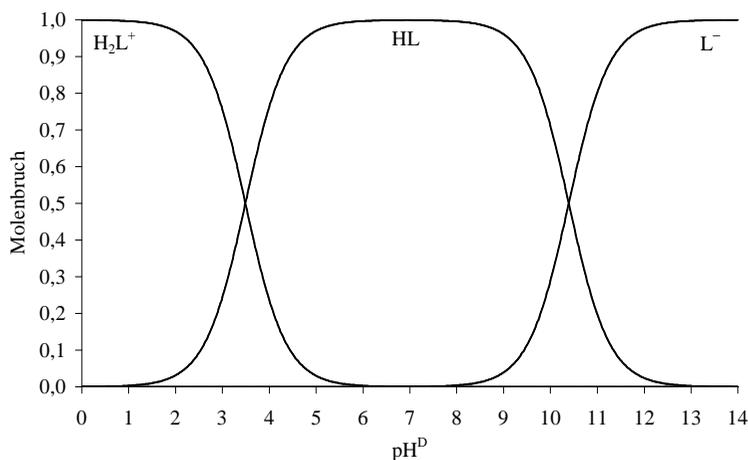


Abbildung 8.76: pH-abhängige Verteilung der Protolysespezies von *b*-Alanin **8** (in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 25$ °C)

8.4.1.2 Spektralanalyse und $^1\text{H-NMR-Titration}$



Abbildung 8.77: Durchnummerierung und Zuordnung der C-H Protonen von **b**-Alanin **8**

Neun Einzelproben von **8** wurden im Mischsolvens $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1 nach Vorschrift #1 in Tabelle 7.3 erstellt. Die Protonenspektren wurden bei 200,13 MHz, in fünf Fällen auch bei 500,13 MHz aufgezeichnet.

Bei den hier benutzten Feldstärken und $\text{pH}^{\text{D}} > 6$ liegt ein *deceptively simple* $[\text{AB}]_2$ -Spinsystem vor (Abbildung 8.78), woraus nur der Mittelwert $J_{\text{AB}} = (J_{13} + J_{14})/2$ zugänglich ist. Einzelne Werte von J_{13} und J_{14} wurden von Abraham *et al.* [230] bei 60 MHz bestimmt (siehe Tabelle 8.37).

Im Intervall $2 < \text{pH}^{\text{D}} < 6$ breitet sich das Signal von H^3 und H^4 auf ca. 5 Hz aus, um bei $\text{pH}^{\text{D}} < 2$ ein *quasi*-Sextett mit $\Delta\nu_{1/2} \approx 3$ Hz zu zeigen. In saurem Milieu verlangsamt sich der Austausch der Ammoniumprotonen mit den H_2O -Protonen in der NMR-Zeitskala. Dieses Phänomen ist für primäre aliphatische Amine seit den kinetischen Untersuchungen von Grunwald *et al.* bekannt [127]. Der verlangsamte Austausch der Ammoniumprotonen **M** gibt Anlass zu einer $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplung mit den **b**-Methylenprotonen ($\text{A}_2\text{B}_2\text{M}_3$ -Spinsystem). Mit den Kopplungskonstanten $J_{\text{AB}} = 6,47$ Hz und $J_{\text{BM}} \approx 5,8$ Hz konnte das beobachtete Aufspaltungsmuster simuliert werden. Zusätzlich ist eine Linienverbreiterung infolge der $^{14}\text{N-H}$ -Kopplung zu erkennen. Die weitere Untersuchung dieser dynamischen Effekte ist geplant.

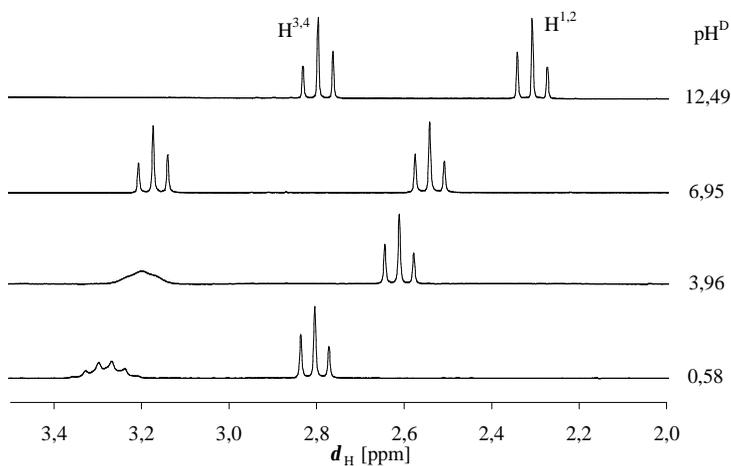


Abbildung 8.78: Zuordnung der pH^{D} -abhängigen 200,13 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von *b*-Alanin **8** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1)

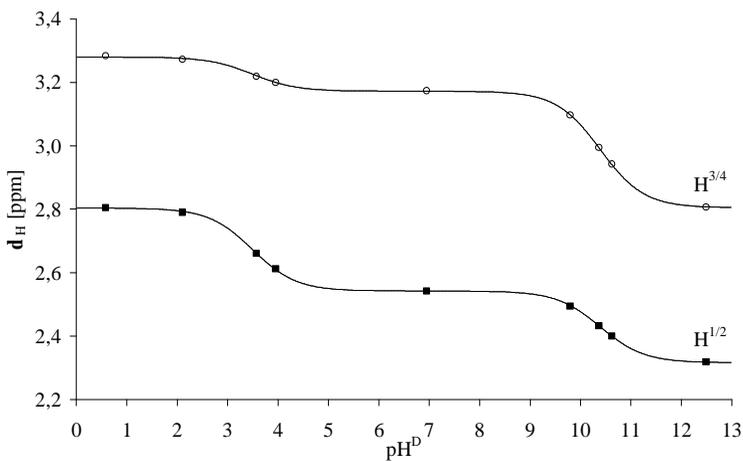


Abbildung 8.79: 200,13 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Titrationskurven von *b*-Alanin **8** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

NMR-Parameter		H_2L^+	$\Delta_{\text{HL}}^{\text{H}_2\text{L}^+}$	HL	$\Delta_{\text{L}^-}^{\text{HL}}$	L^-
d_{H}	$d_1 = d_2$	2,804 (2)	-0,262 (3)	2,542 (2)	-0,226 (3)	2,316 (2)
d_{H}	$d_3 = d_4$	3,280 (2)	-0,108 (3)	3,172 (2)	-0,368 (3)	2,805 (2)
$^3J_{\text{HH}}$	J_{AB}	6,47 (1)	0,20 (2)	6,67 (2)	0,23 (2)	6,90 (1)
$^3J_{\text{HH}}$	J_{AB}	6,45 ^a	–	6,68 ^a	–	6,89 ^a
	J_{13}	6,56 ^a	–	6,84 ^a	–	6,99 ^a
	J_{14}	6,34 ^a	–	6,52 ^a	–	6,78 ^a
$^3J_{\text{HH}}$	J_{AB}	6,70 ^b	–	6,70 ^b	–	6,70 ^b

Tabelle 8.37: ^1H -NMR-Parameter d [ppm] und J [Hz] der Protolysespezies von **b-Alanin 8** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C). ^a aus [230]. ^b aus [248].

Die ^1H -NMR-Titrationskurven in Abbildung 8.79 wurden mit MULTINMRPK ausgewertet, die Ergebnisse sind in Tabelle 8.37 zusammengestellt. Die ionenspezifischen d_{H} -Werte stimmen mit Angaben von Abraham *et al.* [230] für HL und L^- auf 0,01 ppm genau überein. Die in der vorliegenden Arbeit berechneten $d_{\text{H}_2\text{L}^+}$ -Werte sind um 0,08 ppm höher. Das legt die Vermutung nahe, der letzte Protonierungsschritt $\text{HL} \rightarrow \text{H}_2\text{L}^+$ sei in [230] nicht vollständig gewesen.

Die J_{AB} -Werte für die Spezies H_2L^+ , HL und L^- wurden aus den 500,13 MHz Spektren bei $\text{pH}^{\text{D}} = 0,58, 6,95$ und $12,49$ berechnet (Tabelle 8.37). Die Ergebnisse stimmen mit denen von Abraham *et al.* [230] auf 0,02 Hz überein, von Gregorie *et al.* [248] wurde hingegen einheitlich $J_{\text{AB}} = 6,70$ Hz, also unabhängig vom pH-Wert, veröffentlicht. Da die Kopplungskonstanten bei 500,13 MHz auf $\pm 0,03$ Hz reproduzierbar sind, wird deren Anstieg mit pH^{D} um insgesamt 0,43 Hz als ein signifikanter Effekt betrachtet, was auf eine mögliche Konformationsänderung hindeuten kann.

8.4.1.3 Konformationsanalyse

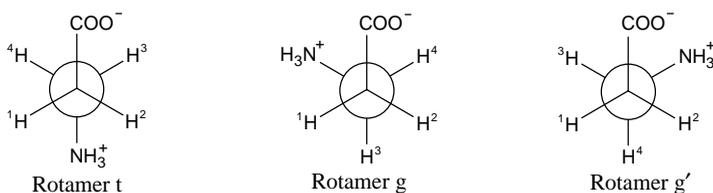


Abbildung 8.80: Kanonische Rotamere von **b-Alanin 8**

In Kapitel 6.4.1 wurde die Rotamerenanalyse des **b**-Alanin Zwitterions nach dem „*N*-Wertmodell“ und „Mittelwertmodell“ ausführlich diskutiert. Hier werden diese Berechnungen auch für die Spezies H_2L^+ und L^{2-} durchgeführt.

Die speziell für wässrige Lösungen optimierte Karplusgleichung von Altona [221] liefert eine starke *gauche*-Dominanz für H_2L^+ und HL. Eine stabilisierende Wasserstoffbrücke kann insbesondere für HL vermutet werden. Bei L^- spielen wahrscheinlich nur sterische und Solvatisierungseffekte eine Rolle, deshalb führen alle hier besprochenen Modelle einheitlich zu einem geringfügigen Vorzug des *trans*-Rotamers. Trotz der beobachteten pH^{D} -Abhängigkeit von J_{AB} liefert die Linsche Methode für jede Dissoziationsstufe eine grundsätzlich statistische Verteilung mit $p_{\text{t}} \approx 0,33$ und $p_{\text{g}} + p_{\text{g}'} \approx 0,67$.

Aus früheren ^1H -NMR-Messungen wurden nahezu statistische Rotamerenanteile für alle Dissoziationsstufen abgeleitet [230][247].

Protolysespezies	H_2L^+		HL		L^-	
	f_{t}	$f_{\text{g}} + f_{\text{g}'}$	f_{t}	$f_{\text{g}} + f_{\text{g}'}$	f_{t}	$f_{\text{g}} + f_{\text{g}'}$
Abraham-Gatti	0,23	0,77	0,30	0,70	0,36	0,64
Haasnoot-B	0,40	0,60	0,49	0,51	0,56	0,44
Haasnoot-C	0,31	0,69	0,39	0,61	0,46	0,54
Altona	0,17	0,83	0,25	0,75	0,40	0,60

Tabelle 8.38: Nach dem *N*-Wert-Modell berechnete Rotamerenverteilung für die Dissoziationsstufen von **b**-Alanin **8**.

Protolysespezies	H_2L^+		HL		L^-	
	f_t	$f_g + f_{g'}$	f_t	$f_g + f_{g'}$	f_t	$f_g + f_{g'}$
Abraham-Gatti	0,38 0,40 ^a	0,62 0,60 ^a	0,34 0,38 ^a	0,66 0,62 ^a	0,32 0,34 ^a	0,68 0,66 ^a
Haasnoot-B	0,32 0,34 ^a	0,68 0,66 ^a	0,31 0,33 ^a	0,69 0,67 ^a	0,29 0,31 ^a	0,71 0,69 ^a
Haasnoot-C	0,33 0,36 ^a	0,67 0,64 ^a	0,32 0,34 ^a	0,68 0,66 ^a	0,31 0,33 ^a	0,69 0,67 ^a
Altona	0,36 0,38 ^a	0,64 0,62 ^a	0,35 0,38 ^a	0,65 0,62 ^a	0,32 0,34 ^a	0,68 0,66 ^a
Lin	0,35 ^a	0,65 ^a	0,36 ^a	0,64 ^a	0,35 ^a	0,65 ^a

Tabelle 8.39: Nach dem Mittelwertmodell berechnete Rotamerenverteilung für die Dissoziationsstufen von **b**-Alanin **8**.^a Kopplungskonstanten aus [230], Rotamerenanalyse: diese Arbeit

Das monoprotonierte **b**-Alanin stellt das einfachste zwitterionische Modell für die quantenchemische (QM) Konformationsanalyse dar. Nach kürzlich veröffentlichten *ab initio*-Rechnungen [248][249] ist das *gauche*-Rotamer um ca. 20 kcal/mol stabiler im Vakuum als die *trans*-Form, wegen der elektrostatischen Anziehung, bzw. einer Wasserstoffbrücke, zwischen den geladenen Gruppen. Die durch Hydratation bewirkte Stabilisierung des *trans*-Konformers verringert diese Energiedifferenz auf 2-3 kcal/mol [248]. Erst QM-Rechnungen mit Elektronenkorrelation und polarisierbaren Kontinuumsmodellen [249] sind in der Lage, den experimentellen Wert von 0,1 kcal/mol [230][247] wiederzugeben. Von Nielsen *et al.* wurde eine geringfügige Präferenz des *trans*-Rotamers berechnet [249].

Die gegeneinander wirkenden Effekte, Abstoßung und Hydratation, führen zu einer nahezu statistischen Rotamerenverteilung, die in der vorliegenden Arbeit trotz der beobachteten Abnahme von J_{AB} mit pH^D NMR-spektroskopisch belegt wurde.

In der Kristallstruktur von **b**-Alanin [287][288] wurde ein NCCC-Diederwinkel von 84° gefunden, der dem $\gamma = 60^\circ$ im Rotamer g nahe liegt. Die COO⁻ und NH₃⁺-Gruppen sind aber nur mit *intermolekularen* Wasserstoffbrücken verknüpft.

8.4.2 N-Acetylhistamin (9)

8.4.2.1 *pK*-Bestimmung

Die Imidazolgruppe stellt die einzige protonierbare Stelle von *N*-Acetylhistamin **9** dar (siehe Abbildung 8.81). Die *pK*-Bestimmung erfolgte einerseits in H₂O durch potentiometrische Titrations, andererseits im Lösemittelgemisch H₂O/D₂O 9/1 mit Einzelproben-¹H-NMR-Titration (siehe Tabelle 8.40).

Die resultierende Verteilung der Protolysespezies ist einfach: HL⁺ liegt bei pH < 5 und L bei pH > 9 dominant vor.

<i>pK</i>	Typ	<i>T</i> [°C]	<i>I</i> [M]	Medium	<i>c</i> _L ^{tot} [mM]	Mth. Ref.
7,147 (8)	<i>pK</i> ^D	22	0,1 NaNO ₃	10% D ₂ O	20	¹ H d.A.
7,094 (3)	<i>pK</i> ^c	25	0,1 NaNO ₃	H ₂ O	5	Pot. d.A.
6,99	<i>pK</i> ^a	25	→ 0 M	H ₂ O	4	Pot. [289]

Tabelle 8.40: *pK* von *N*-Acetylhistamin **9** für verschiedene Bedingungen. d.A.: diese Arbeit

8.4.2.2 Spektralanalyse und ¹H-NMR-Titration

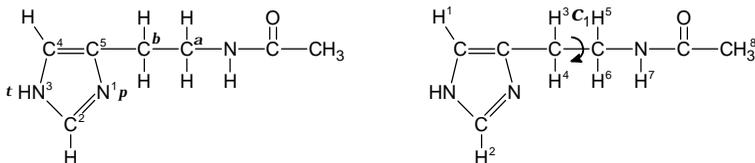


Abbildung 8.81: Das in der Biochemie übliche (links) und das in dieser Arbeit verwendete (rechts) Nummerierungsschema für *N*-Acetylhistamin **9**

Die Zuordnung des 500,13 MHz ¹H-NMR-Spektrums ist Abbildung 8.82 zu entnehmen.

H² zeigt ein Dublett bei 8,39 ppm (⁴*J*₁₂ = 1,37 Hz) und H¹ ein nicht vollständig aufgelöstes Multiplett bei 7,18 ppm (⁴*J*₁₃ ≈ 0,8 Hz, ⁴*J*₁₄ ≈ 0,4 Hz). Hier liegt ein *deceptively simple* [AB]₂-Spinsystem vor, woraus nur der Mittelwert von <³*J*₃₅> und <³*J*₃₆> erhältlich ist.

In H_2O -reichen Lösungen mit $\text{pH}^{\text{D}} < 8$ erscheint das H^7 -Amidsingulett bei ca. 8 ppm, und die α -Methylenprotonen $\text{H}^{5,6}$ weisen ein Quartett auf. Hier verringert sich die Geschwindigkeit des OH-katalysierten Austausches von H^7 , was zu einem effektiven $\text{A}_2\text{B}_2\text{X}$ -Spinsystem Anlass gibt (siehe z. B. [290]).

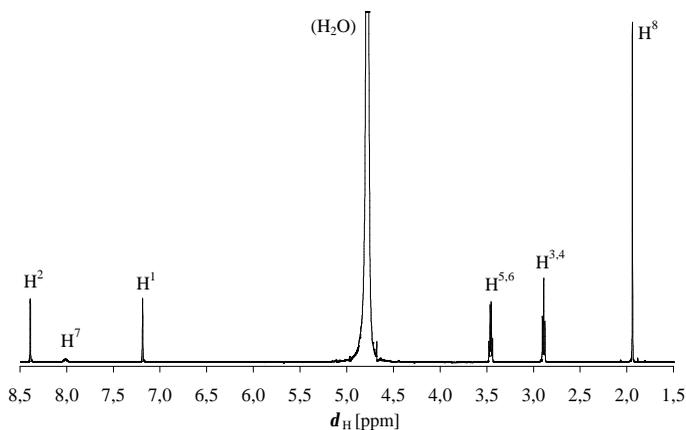


Abbildung 8.82: Zuordnung des 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektrums von *N*-Acetylhistamin **9** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $\text{pH}^{\text{D}} = 6,51$, $T = 22$ °C)

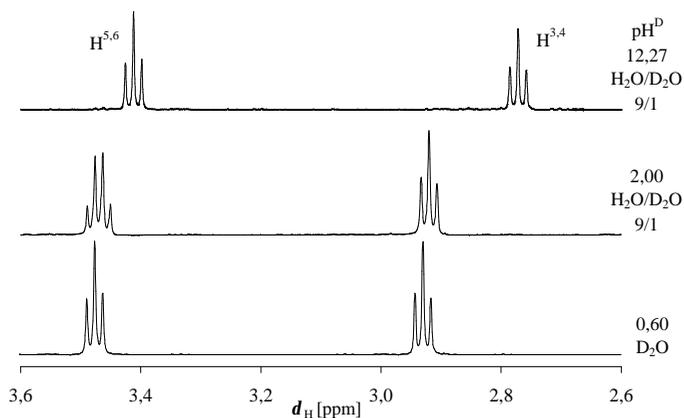


Abbildung 8.83: pH^{D} - und Solvensabhängigkeit der Methylensignale von *N*-Acetylhistamin **9** (0,02 M, 500,13 MHz, $T = 22$ °C)

Die $^1\text{H-NMR}$ -Titrationskurven aller Spins zeigen einen Wendepunkt beim gleichen pH^{D} -Wert, woraus sich $\text{p}K^{\text{D}} = 7,147 \pm 0,008$ ergibt.

Die ionenspezifischen chemischen Verschiebungen in Tabelle 8.41 verdeutlichen, dass die durch N^{p} -Protonierung bewirkten Δd_{H} -Werte mit steigendem Abstand von diesem Basezentrum abnehmen.

Die für die Protolysespezies HL^+ und L individuellen J_{AB} -Kopplungskonstanten wurden aus den 500,13 MHz-Spektren ermittelt und ebenfalls in Tabelle 8.41 angeführt.

NMR-Parameter		HL^+	$\Delta_{\text{L}}^{\text{HL}^+}$	L
d_{H}	d_1	7,253 (3)	-0,338 (4)	6,914 (3)
d_{H}	d_2	8,564 (4)	-0,894 (5)	7,670 (4)
d_{H}	$d_3 = d_4$	2,919 (3)	-0,147 (4)	2,772 (3)
d_{H}	$d_5 = d_6$	3,469 (3)	-0,057 (4)	3,413 (3)
d_{H}	d_8	1,942 (3)	-0,008 (4)	1,934 (3)
$^3J_{\text{HH}}$	J_{AB}	6,60 (2)	0,19 (2)	6,79 (2)

Tabelle 8.41: $^1\text{H-NMR}$ -Parameter d [ppm] und J [Hz] der Protolysespezies von *N*-Acetylhistamin **8** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

8.4.2.3 Konformationsanalyse am Torsionswinkel c_1

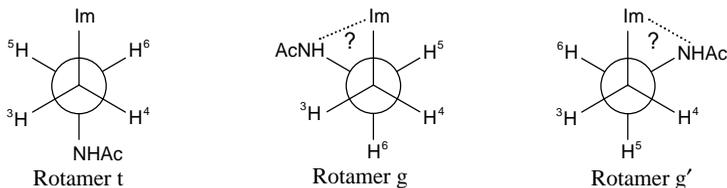


Abbildung 8.84: Kanonische Rotamere von *N*-Acetylhistamin **9** am Segment c_1 (Im = Imidazol)

Die beiden *gauche*-Rotamere, g und g' in Abbildung 8.84 sind symmetrieäquivalent und äquipopuliert. Die Altona-Elektronegativität I der neutralen Imidazol- und kationischen Imidazoliumgruppe wurde von M. Kraszni [43] zu 0,50, bzw. 0,47 bestimmt (vgl. mit $I = 0,45$ für Phenyl). Diese Angabe ermöglicht zum ersten Mal den Einsatz der für wässrige Lösungen optimierten Karplusgleichung von Altona [221].

Das *N*-Wertmodell ergibt den Vorzug des *trans*-Rotamers, die verschiedenen Karplusgleichungen liefern aber stark unterschiedliche Populationen (siehe Tabelle 8.42). Eine kürzlich veröffentlichte Studie über Histamin ($\text{H}_2\text{L}^{2+}/\text{HL}^+/\text{L}$) führte ebenfalls zur Präferenz des *trans*-Rotamers [43]. Für den monoprotonierten Zustand von Histamin wurde wegen des erhöhten *gauche*-Anteils eine Wasserstoffbrücke zwischen der Ammonium- und Imidazolgruppe vorgeschlagen [43].

Das Mittelwertmodell ergibt aber für *N*-Acetylhistamin eine nahezu statistische Rotamerenverteilung (Tabelle 8.43).

Protolysespezies	HL^+		L	
	f_t	$f_g + f_{g'}$	f_t	$f_g + f_{g'}$
Abraham-Gatti	0,28	0,72	0,33	0,67
Hansen	0,46	0,54	0,53	0,47
Haasnoot-B	0,50	0,50	0,56	0,44
Haasnoot-C	0,42	0,58	0,49	0,51
Altona	0,26	0,74	0,33	0,67

Tabelle 8.42: Nach dem *N*-Wert-Modell berechnete Rotamerenverteilung für die Dissoziationsstufen von *N*-Acetylhistamin **9**

Protolysespezies	HL^+		HL	
	f_t	$f_g + f_{g'}$	f_t	$f_g + f_{g'}$
Abraham-Gatti	0,35	0,65	0,33	0,67
Hansen	0,27	0,73	0,23	0,77
Haasnoot-B	0,30	0,70	0,29	0,71
Haasnoot-C	0,32	0,68	0,30	0,70
Altona	0,35	0,65	0,33	0,67

Tabelle 8.43: Nach dem Mittelwertmodell berechnete Rotamerenverteilung für die Dissoziationsstufen von *N*-Acetylhistamin **9**

8.4.3 N-Acetylhistidin (10)

8.4.3.1 Makroskopische Dissoziationskonstanten

Zur pK -Bestimmung von *N*-Acetylhistidin **10** wurden fünf potentiometrische Titrations in H_2O nach Vorschrift #2 in Tabelle 7.2 durchgeführt. Die Dissoziationskonstanten wurden in H_2O/D_2O 9/1 durch 1H -NMR-Titration ermittelt (Kapitel 8.4.3.2).

Die pK -Werte in Tabelle 8.44 und die Speziesverteilung in Abbildung 8.85 indizieren, dass die Dissoziation der Carboxyl- und Imidazoliumgruppe in wohlseparierten pH^c -Bereichen abläuft (Aciditätssystem erster Ordnung).

pK_1	pK_2	Typ	T [°C]	I [M]	Medium	c_L^{tot} [mM]	Mth. Ref.
2,83 (2)	7,158 (4)	pK^D	22	0,1 $NaNO_3$	10% D_2O	20	1H d.A.
2,78 (2)	7,092 (7)	pK^c	25	0,1 $NaNO_3$	H_2O	3-5	Pot. d.A.
2,83	7,023	pK^{mix}	25	0,1 $NaClO_4$	H_2O	–	Pot. [293]
2,94	7,11	pK^{mix}	25	0,1 KNO_3	H_2O	0,8	Pot. [294]
3,08	7,07	pK^D	37	ca. 0,1	D_2O	50	1H [42]
–	7,46	pK^{mix}	25	2,0 KCl	D_2O	200	Pot. [45]

Tabelle 8.44: Dissoziationskonstanten von *N*-Acetylhistidin **10**. d.A.: diese Arbeit

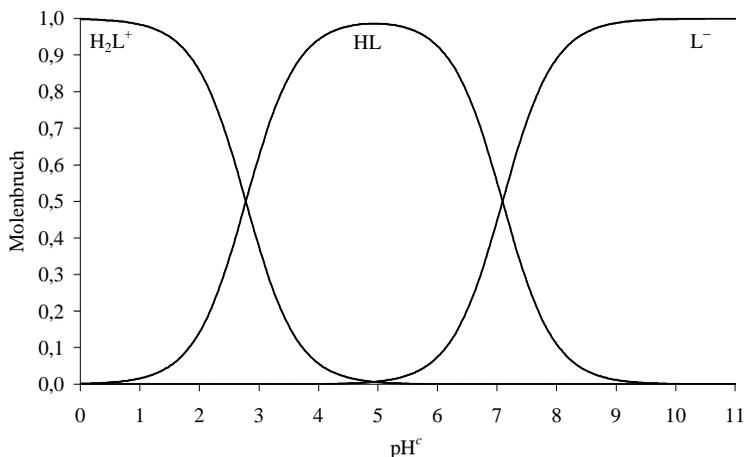


Abbildung 8.85: pH-abhängige Verteilung der Protolysespezies von *N*-Acetylhistidin **10** ($I = 0,1 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

8.4.3.2 Spektralanalyse und ^1H -NMR-Titration

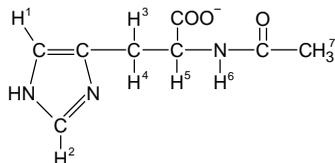


Abbildung 8.86: Durchnummerierung der Protonen von *N*-Acetylhistidin **10**

Acht Einzelproben von *N*-Acetylhistidin wurden in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1 nach Vorschrift #2 in Tabelle 7.3 erstellt und bei 200,13 MHz Spektrometerfrequenz vermessen. Weitere Proben wurden in D_2O nach Vorschrift #1 in Tabelle 7.3 angefertigt und sowohl bei 500,13 MHz als auch bei 200,13 MHz Spektrometerfrequenz untersucht.

Der aromatische Teil des ^1H -Spektrums von *N*-Acetylhistidin **10** zeigt den gleichen Habitus wie der von *N*-Acetylhistamin **9**, er wird hier nicht abgebildet. Im aciden pH^{D} -Bereich ergibt H^2 ein Dublett bei 8,60 ppm mit $^4J_{12} = 1,37 \text{ Hz}$. H^1 zeigt bei 7,31 ppm ein nicht vollständig aufgelöstes Multiplett infolge der weitreichenden Kopplungen $^4J_{13} \approx 0,8 \text{ Hz}$ und $^4J_{14} \approx 0,4 \text{ Hz}$. Im ganzen pH^{D} -Bereich erscheint das Singulett der

Acetylprotonen H^7 bei 1,98 ppm. H^3 , H^4 und H^5 ergeben ein charakteristisches ABX-Spinsystem in D_2O und auch bei $pH^D > 9$ in H_2O/D_2O 9/1 (siehe Abbildung 8.87). Wie im Falle von *N*-Acetylhistamin, verringert sich bei $pH^D < 9$ die Austauschgeschwindigkeit des Amidprotons H^6 und es erscheint bei ca. 8 ppm dessen verbreitetes Dublett mit $^3J_{56} \approx 8$ Hz. Gleichzeitig geht das Signal von H^5 in ein sechs-Linien-Multiplett über (ABMX-Spinsystem). Die Resonanzlinien von H^3 und H^4 zeigen eine zusätzliche Aufspaltung wegen deren oben erwähnten Fernkopplungen mit H^1 .

Da in den untersuchten ABX-, bzw. ABMX-Spinsystemen eine explizite Linienzuweisung möglich war, wurden die Spektrenparameter durch LAO-PC-Iterationen [200] bestimmt.

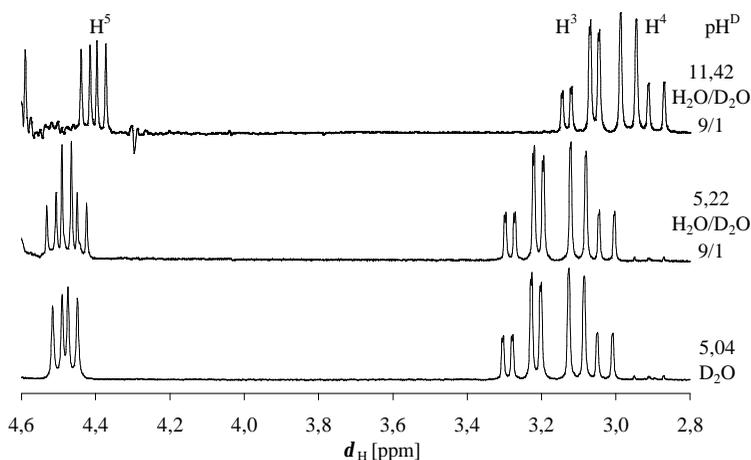


Abbildung 8.87: pH^D - und Solvensabhängigkeit des ABX-Spinsystems der Protonen H^3 , H^4 und H^5 von *N*-Acetylhistidin **10** (200,13 MHz, $c = 0,02$ M (H_2O/D_2O), bzw. 0,05 M (D_2O), $T = 22$ °C)

Die Auswertung der 1H -NMR-Titrationskurven (Abbildungen 8.88 und 8.89) erfolgte mit dem Programm MULTINMRPK. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8.45 aufgeführt.

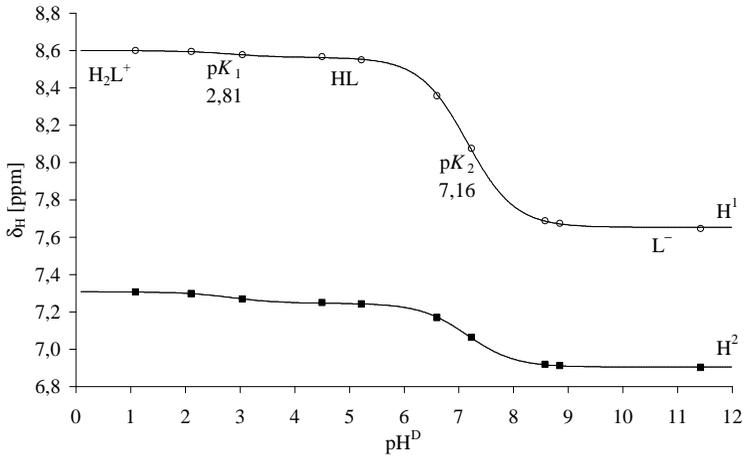


Abbildung 8.88: 200,13 MHz ^1H -NMR-Titrationskurven der aromatischen Protonen von *N*-Acetylhistidin **10** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C). Beispiel für ein Aciditätssystem erster Ordnung

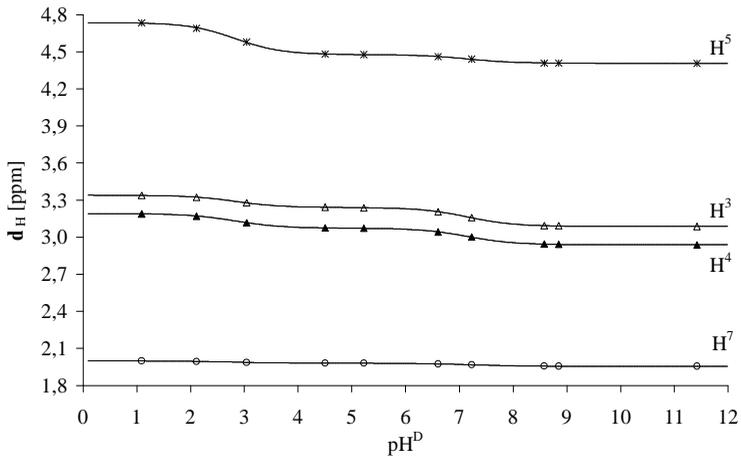


Abbildung 8.89: 200,13 MHz ^1H -NMR-Titrationskurven der aliphatischen Protonen von *N*-Acetylhistidin **10** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

NMR-Parameter		H_2L^+	$\Delta_{\text{HL}}^{\text{H}_2\text{L}^+}$	HL	$\Delta_{\text{L}^-}^{\text{HL}}$	L^-
d_{H}	d_1	7,307 (2)	-0,061 (2)	7,246 (2)	-0,342 (2)	6,904 (1)
d_{H}	d_2	8,601 (2)	-0,038 (2)	8,562 (2)	-0,910 (2)	7,653 (2)
d_{H}	d_3	3,340 (2)	-0,100 (2)	3,240 (2)	-0,152 (2)	3,087 (1)
d_{H}	d_4	3,190 (2)	-0,118 (2)	3,073 (2)	-0,134 (2)	2,939 (1)
d_{H}	d_5	4,736 (2)	-0,258 (3)	4,478 (2)	-0,071 (2)	4,407 (1)
d_{H}	d_7	1,998 (2)	-0,018 (2)	1,980 (2)	-0,023 (2)	1,957 (1)
${}^3J_{\text{HH}}$	${}^3J_{35}$	5,14 (2)	-0,19 (3)	4,95 (2)	-0,34 (2)	4,61 (2)
${}^3J_{\text{HH}}$	${}^3J_{45}$	8,67 (2)	-0,25 (3)	8,42 (2)	0,22 (2)	8,64 (2)
${}^2J_{\text{HH}}$	${}^3J_{34}$	-15,46 (2)	0,13 (3)	-15,33 (2)	0,35 (2)	-14,98 (2)
${}^3J_{\text{HH}}$	${}^3J_{56}$	8,0 ^a	–	8,1 ^a	–	–

Tabelle 8.45: Mit MULTINMRPK berechnete ${}^1\text{H}$ -NMR-Parameter d [ppm] und J [Hz] der Protolysespezies von *N*-Acetylhistidin **10** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C) ^a abgelesener, nicht iterierter Wert

8.4.3.3 Konformationsanalyse am Torsionswinkel c_1

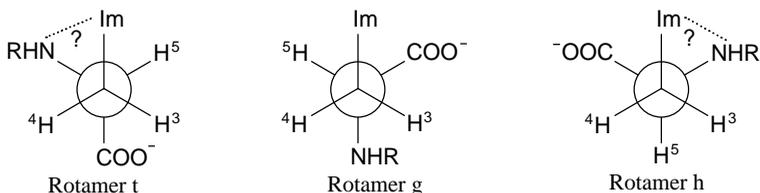


Abbildung 8.90: Kanonische Rotamere von *N*-Acetylhistidin **10** ($\text{R} = -\text{COCH}_3$), Glycylhistidin **11** ($\text{R} = -\text{COCH}_2\text{NH}_3^+$) und Carnosin **12** ($\text{R} = -\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$) am Segment c_1 (Im = Imidazol)

Die drei kanonischen Rotamere von *N*-Acetylhistidin **10** sind in Abbildung 8.90 dargestellt. Die stereospezifische Zuordnung der Methylenprotonen H^3 und H^4 stützt sich auf Untersuchungen am Methylester des *N*-Acetylhistidins [168].

Die nach den in Kapitel 6.4.3 besprochenen Methoden berechneten Rotamerenanteile sind in Tabelle 8.46 angeführt. Die Modelle liefern einheitlich ein Verhältnis $p_t : p_g : p_h$ von ca. 2:1:1 für jede Dissoziationsstufe. Bemerkenswert ist $f_h > f_g$ nach der Karplusgleichung mit den Altona I -Substituentenkonstanten, was auf eine stabilisierende intramolekulare Wasserstoffbrücke im Rotamer h hindeuten kann (siehe Abbildung 8.90).

Protolysespezies	H_2L^+			HL			L^-		
	f_t	f_g	f_h	f_t	f_g	f_h	f_t	f_g	f_h
Hansen	0,55	0,23	0,21	0,53	0,22	0,25	0,55	0,19	0,26
Martin	0,58	0,25	0,17	0,55	0,23	0,21	0,57	0,20	0,23
Haasnoot-B	0,60	0,25	0,15	0,57	0,22	0,20	0,59	0,19	0,22
Haasnoot-D	0,65	0,25	0,10	0,61	0,22	0,16	0,64	0,19	0,18
Altona	0,56	0,20	0,24	0,53	0,18	0,29	0,56	0,14	0,30

Tabelle 8.46: Nach verschiedenen Karplusgleichungen berechnete Rotamerenanteile der Protolysespezies von *N*-Acetylhistidin **10**

8.4.4 Glycylhistidin Hydrochlorid (11)

8.4.4.1 Makroskopische Dissoziationskonstanten

Die pK -Werte von **11** wurden einerseits in H_2O durch potentiometrische Titration, andererseits im Lösungsmittelgemisch H_2O/D_2O 9/1 durch Einzelproben- 1H -NMR-Titration nach Vorschrift #2 in Tabelle 7.3 bestimmt.

Tabelle 8.47 bietet einen Vergleich der hier ermittelten Dissoziationskonstanten mit Literaturwerten.

Der maximale Molenbruch von HL beträgt ca 0,7. Nach den Überlegungen in Kapitel 2.3.4 deutet dies darauf hin, dass der zweite und dritte Dissoziationsschritt wesentlich überlappen. Deshalb soll die eigene („intrinsic“) Acidität der Imidazolium- und Ammoniumgruppe mit Hilfe von Mikrokonstanten charakterisiert werden.

pK_1	pK_2	pK_3	Typ	T [°C]	I [M]	Medium	c_L^{tot} [mM]	Mth.	Ref.
2,62 (6)	6,830 (9)	8,36 (1)	pK^D	22	0,1 $NaNO_3$	10% D_2O	20	1H	d.A.
2,53 (4)	6,783 (9)	8,25 (2)	pK^c	25	0,1 $NaNO_3$	H_2O	5	Pot.	d.A.
2,51	6,77	8,22	pK^c	25	0,2 KCl	H_2O	–	Pot.	[292]
2,72	6,69	8,12	pK^D	37	ca. 0,1	D_2O	50	1H	[42]

Tabelle 8.47: Makroskopische Dissoziationskonstanten von Glycylhistidin **11**. d.A.: diese Arbeit

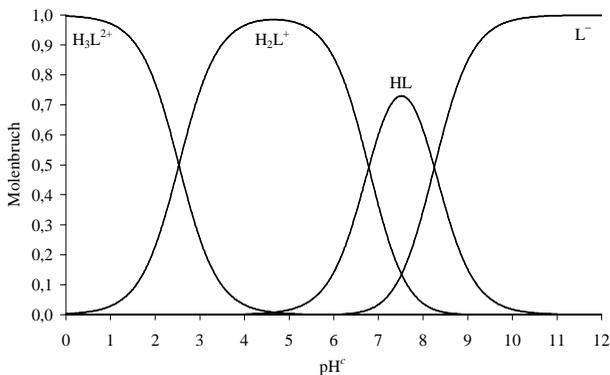


Abbildung 8.91: pH-abhängige Verteilung der makroskopischen Protolysespezies von Glycylhistidin **10** ($I = 0,1 \text{ M}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$)

8.4.4.2 Zuordnung und Analyse der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren

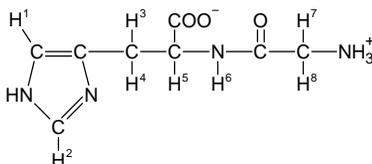


Abbildung 8.92: Durchnummerierung der betrachteten Protonen von Glycylhistidin **11**

Die Protonenspektren von Glycylhistidin **11** in Abbildung 8.93 zeigen das gleiche Erscheinungsbild wie jene von *N*-Acetylhistidin **10**. Zusätzlich wird hier das charakteristische AB-Multipllett der Glycylprotonen H⁷ und H⁸ beobachtet.

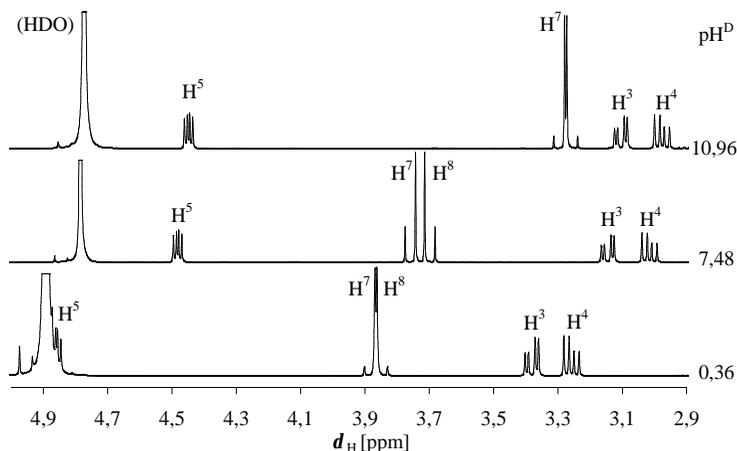


Abbildung 8.93: Zuordnung der aliphatischen Protonen in pH^{D} -abhängigen $500,13 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Glycylhistidin **11** ($0,05 \text{ M}$ in D_2O , $T = 22^\circ\text{C}$)

pH^{D} der Probe Hauptspezies		0,36 H_3L^{2+}	4,75 H_2L^+	7,48 $\text{HL}/\text{H}_2\text{L}^+/\text{L}^-$	10,96 L^-
d_{H}	d_1	7,333	7,269	6,998	6,906
d_{H}	d_2	8,033	8,588	7,875	7,644
d_{H}	d_3	3,380	3,256	3,143	3,103
d_{H}	d_4	3,260	3,146	3,017	2,978
d_{H}	d_5	4,859	4,535	4,483	4,449
d_{H}	d_7	3,877	3,851	3,754	3,287
d_{H}	d_8	3,856	3,799	3,703	3,265
$^4J_{\text{HH}}$	J_{12}	1,34	1,37	1,17	n.a.
$^4J_{\text{HH}}$	J_{13}	n.a.	0,55	n.a.	n.a.
$^2J_{\text{HH}}$	J_{34}	-15,63	-15,45	-15,14	-14,95
$^3J_{\text{HH}}$	J_{35}	5,21	5,38	4,88	4,66
$^3J_{\text{HH}}$	J_{45}	8,20	7,89	8,34	8,32
$^2J_{\text{HH}}$	J_{78}	-16,40	-16,16	-16,16	-16,90

Tabelle 8.48: Mit WINDAISY iterierte chemische Verschiebungen d [ppm] und Kopplungskonstanten J [Hz] aus $500,13 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Glycylhistidin **11** ($0,05 \text{ M}$ in D_2O , $T = 22^\circ\text{C}$) n.a.: nicht aufgelöst

8.4.4.3 Einzelproben-¹H-NMR-Titration

Zur NMR-spektroskopischen Bestimmung der Mikrokonstanten von Glycylhistidin **11** wurde eine ¹H-NMR-Titration nach Vorschrift #2 in Tabelle 7.3 durchgeführt.

Die dynamisch gemittelten chemischen Verschiebungen werden in den Abbildungen 8.94 und 8.95 in Abhängigkeit von pH^D dargestellt. Aus diesen Messkurven wurden anschließend die für jede Makrospezies individuellen Werte mit dem Programm MULTINMRPK berechnet (siehe Tabelle 8.48).

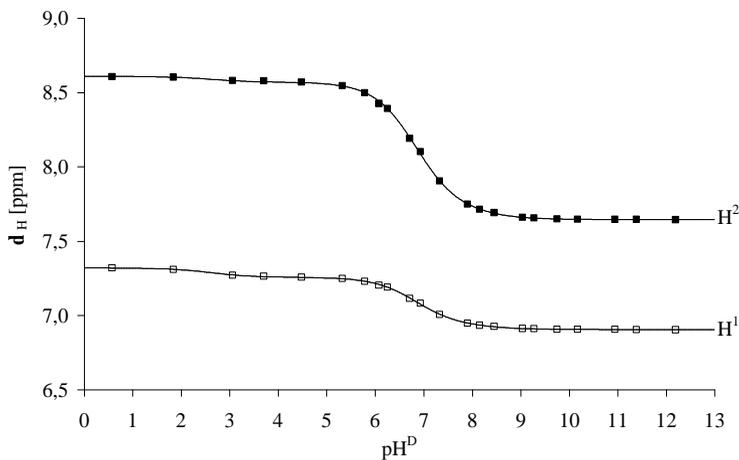


Abbildung 8.94: 200,13 MHz ¹H-NMR-Titrationskurven der aromatischen Protonen von Glycylhistidin **11** (0,02 M in H₂O/D₂O 9/1, I = 0,1 M, T = 22 °C)

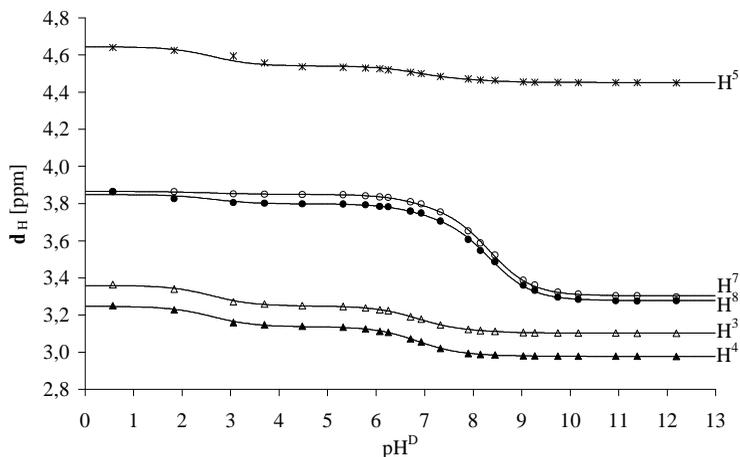


Abbildung 8.95: 200,13 MHz ^1H -NMR-Titrationskurven der aromatischen Protonen von Glycylhistidin **11** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

Parameter		H_3L^{2+}	$\Delta_{\text{H}_3\text{L}^{2+}}^{\text{H}_3\text{L}^{2+}}$	H_2L^+	$\Delta_{\text{HL}}^{\text{H}_2\text{L}^+}$	HL	$\Delta_{\text{L}^-}^{\text{HL}}$	L^-
d_{H}	d_1	7,320 (4)	-0,063 (4)	7,257 (2)	-0,318 (5)	6,939 (4)	-0,033 (5)	6,907 (2)
d_{H}	d_2	8,609 (4)	-0,039 (5)	8,570 (3)	-0,851 (6)	7,719 (6)	-0,072 (6)	7,647 (2)
d_{H}	d_3	3,360 (4)	-0,111 (5)	3,248 (2)	-0,129 (4)	3,119 (4)	-0,017 (4)	3,102 (2)
d_{H}	d_4	3,247 (4)	-0,110 (5)	3,137 (2)	-0,149 (4)	2,988 (4)	-0,011 (4)	2,978 (2)
d_{H}	d_5	4,644 (4)	-0,103 (5)	4,541 (2)	-0,072 (4)	4,469 (4)	-0,018 (4)	4,451 (2)
d_{H}	d_7	3,865 (4)	-0,015 (4)	3,850 (2)	-0,085 (6)	3,764 (5)	-0,460 (6)	3,304 (2)
d_{H}	d_8	3,849 (4)	-0,051 (4)	3,798 (2)	-0,084 (6)	3,714 (5)	-0,436 (6)	3,278 (2)
$^4J_{\text{HH}}$	J_{12}	1,37 ^a	–	1,40 ^a	–	1,08 ^a	–	1,14 ^a
$^4J_{\text{HH}}$	J_{13}	0,80 ^a	–	0,74 ^a	–	0,70 ^a	–	0,68 ^a
$^2J_{\text{HH}}$	J_{34}	5,25 (2)	0,01 (2)	5,26 (1)	-0,49 (2)	4,76 (2)	-0,11 (2)	4,66 (1)
$^3J_{\text{HH}}$	J_{35}	8,17 (2)	-0,21 (2)	7,96 (1)	0,53 (2)	8,50 (2)	-0,17 (2)	8,33 (1)
$^3J_{\text{HH}}$	J_{45}	-15,53 (2)	0,11 (2)	-15,41 (1)	0,36 (2)	-15,05 (2)	0,09 (2)	-14,96 (1)
$^3J_{\text{HH}}$	J_{56}	7,8 ^a	–	7,4 ^a	–	–	–	–
$^2J_{\text{HH}}$	J_{78}	-16,21 (2)	0,02 (2)	-16,19 (1)	0,02 (2)	-16,17 (2)	-0,71 (2)	-16,88 (1)

Tabelle 8.49: Mit MULTINMRPK berechnete NMR-Parameter d [ppm] und J [Hz] der makroskopischen Protolysespezies von Glycylhistidin **11** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

^a abgelesener, nicht iterierter Wert

8.4.4.4 Berechnung der Mikrokonstanten

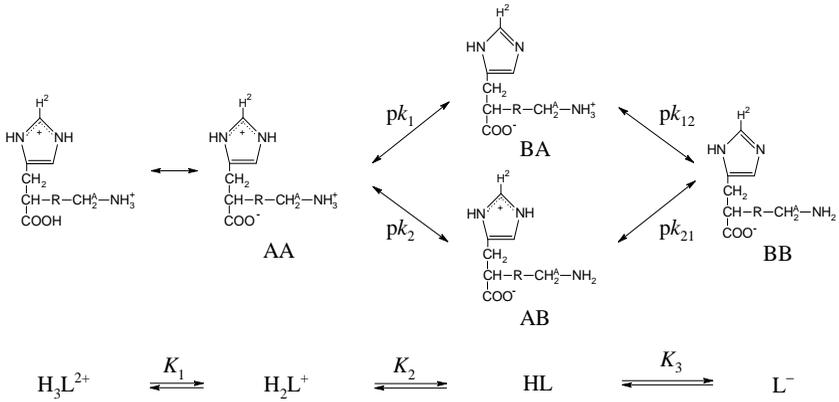


Abbildung 8.96: Mikroskopisches (oben) und makroskopisches (unten) Dissoziationsschema von Glycylhistidin **11** ($R = NH-CO-$, $H^A = H^7$) und Carnosin **12** ($R = NH-CO-CH_2-$, $H^A = H^9$)

Im Rahmen der Sudmeier-Reilly-Näherung werden mit MULTINMRPK normierte 1H -NMR-Titrationskurven und anschließend Δy_k -Funktionen berechnet (siehe Abbildung 8.97).

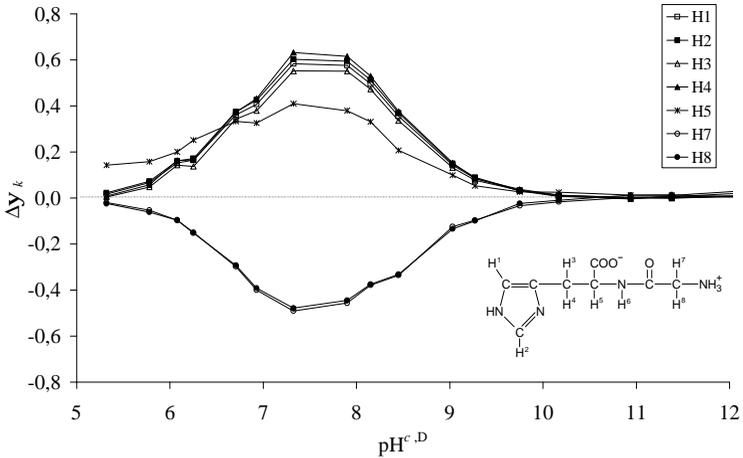


Abbildung 8.97: Aus normierten 1H -NMR-Titrationskurven erhaltene Δy_k -Kurven zur Auswahl der selektiven Sensorenatome in Glycylhistidin **11**

Betragsmäßig maximale Δy -Werte weisen (abgesehen von H^4) die Protonen H^2 und H^7 auf. Die d_H vs. pH^D -Kurven dieser Kerne zeigen keine Extrema, so können diese Protonen als gruppenspezifische Sensoren gewählt werden. Die bislang einzige 1H -spektroskopische Bestimmung der Mikrokonstanten von **11** basierte ebenfalls auf der angenommenen Selektivität der Protonen H^2 und H^7 , aber diese Messung wurde in D_2O und ohne Kontrolle der Ionenstärke durchgeführt [6].

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm NMRMICROPK. Die erhaltenen Mikrokonstanten sind in Tabelle 8.50 aufgelistet, die pH -abhängige Verteilung der Mikrospesies zeigt Abbildung 8.98. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Hauptpfad ($AA \rightarrow BA \rightarrow BB$) und der Nebenpfad ($AA \rightarrow AB \rightarrow BB$) der Dissoziation im Verhältnis von etwa 9:1 populiert sind.

pK_1	pK_2	pK_{12}	pK_{21}	k_2 / k_1	pE	Ref.
6,85 (1)	7,79 (2)	8,239 (8)	7,30 (2)	8,7	0,45	diese Arbeit
6,82	7,88	8,18	7,14	11,5	0,32	[6]

Tabelle 8.50: Mit NMRMICROPK berechnete mikroskopische Dissoziationskonstanten pK und Wechselwirkungsparameter pE von Glycylhistidin **11**. d.A.: diese Arbeit

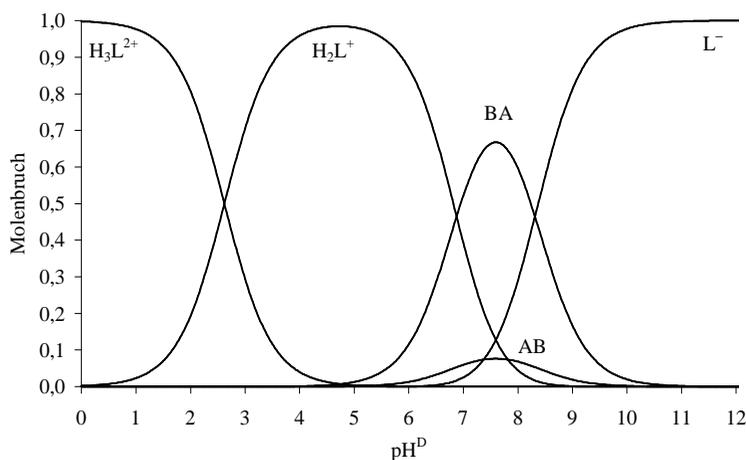


Abbildung 8.98: pH^D -abhängige Verteilung der makroskopischen und mikroskopischen Protolysespezies von Glycylhistidin **11** ($I = 0,1$ M, $T = 25$ °C)

8.4.4.5 Konformationsanalyse am Torsionswinkel c_1

Glycylhistidin **11** stellt in bezug auf den Torsionswinkel c_1 ein trisubstituiertes Ethan dar, dessen kanonischen Rotamere t, g und h in Abbildung 8.90 des vorangehenden Kapitels 8.4.4.4 bereits dargestellt wurden.

Die mit „Rotamerenanalyse.xls“ berechneten Rotamerenanteile der individuellen Makrospezies H₃L werden in Tabelle 8.56 zusammengefasst. Vom Protonierungszustand der funktionellen Gruppen praktisch unabhängig wurde, hier wie auch bei *N*-Acetylhistidin **10**, ein Verhältnis $f_t : f_g : f_h$ von ca. 2:1:1 gefunden, obwohl die Karplusgleichung mit den Altona *I*-Substituentenkonstanten wieder $f_h > f_g$ liefert.

Über die Rotamerenverteilung der unterpopulierten Mikrospezies AB kann keine Aussage getroffen werden, denn diese Mikrospezies trägt nur geringfügig zu den observablen $\langle J \rangle$ -Kopplungskonstanten bei.

Spezies	H ₃ L ²⁺			H ₂ L ⁺			HL			L ⁻		
	f_t	f_g	f_h	f_t	f_g	f_h	f_t	f_g	f_h	f_t	f_g	f_h
Hansen	0,51	0,24	0,25	0,49	0,24	0,27	0,54	0,20	0,26	0,52	0,19	0,29
Martin	0,53	0,26	0,21	0,51	0,26	0,23	0,56	0,22	0,22	0,54	0,21	0,25
Haasnoot-B	0,55	0,25	0,20	0,53	0,25	0,22	0,58	0,20	0,22	0,56	0,19	0,25
Haasnoot-D	0,59	0,26	0,15	0,56	0,26	0,18	0,62	0,20	0,18	0,60	0,19	0,21
Altona	0,51	0,20	0,29	0,49	0,21	0,31	0,54	0,16	0,30	0,52	0,14	0,33

Tabelle 8.51: Nach verschiedenen Karplusgleichungen berechnete Rotamerenanteile der Protolysespezies von Glycylhistidin **11**

8.4.5 Carnosin (12)

8.4.5.1 Makroskopische Dissoziationskonstanten

Zur p*K*-Bestimmung von Carnosin **12** in H₂O wurden sechs potentiometrische Titrations durchgeföhrt. Die Dissoziationskonstanten wurden auch in H₂O/D₂O 9/1 durch eine ¹H-NMR-Titration bestimmt (siehe Kapitel 8.4.5.3). Tabelle 8.52 enthält alle berechneten p*K*-Werte, zum Vergleich sind auch Literaturangaben mit aufgeföhrt.

Die Verteilung der Makrospezies in Abbildung 8.99 lässt erkennen, dass Carnosin in guter Näherung als Aciditätssystem erster Ordnung betrachtet werden kann (siehe Kapitel 2.3.4).

pK_1	pK_2	pK_3	Typ	T [°C]	I [M]	Medium	c_L^{tot} [mM]	Mth. Ref.
2,54 (2)	6,911 (6)	9,692 (9)	pK^D	22	0,1 NaNO ₃	10% D ₂ O	20	¹ H d.A.
2,63 (3)	6,83 (1)	9,44 (1)	pK^c	25	0,1 NaNO ₃	H ₂ O	2-5	Pot. d.A.
2,60	6,83	9,466	pK^c	25	0,1 KNO ₃	H ₂ O	–	Pot. [291]
2,59	6,774	9,372	pK^c	25	0,1 KCl	H ₂ O	–	Pot. [100]
2,63 (2)	6,74 (1)	9,35 (1)	pK^c	25	0,1 NaClO ₄	H ₂ O	10-25	Pot. [40]
2,619	6,656	9,237	pK^a	25	→ 0 M	H ₂ O	–	Pot. [295]
2,77	6,83	9,66	pK^D	37	ca. 0,1	D ₂ O	50	¹ H [42]
2,73 (7)	7,06 (13)	10,55 (3)	pK^D	25	> 0,5	D ₂ O	500	¹³ C [39]

Tabelle 8.52: Nach verschiedenen Methoden ermittelte Dissoziationskonstanten von Carnosin **11**

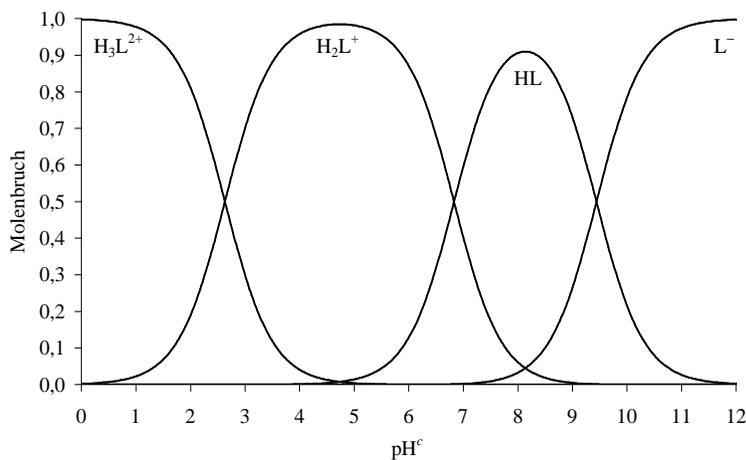


Abbildung 8.99: pH-abhängige Verteilung der makroskopischen Protolysespezies von Carnosin **12** ($I = 0,1 \text{ M}$, $T = 25 \text{ °C}$)

8.4.5.2 Zuordnung und Analyse der ^1H -Spektren

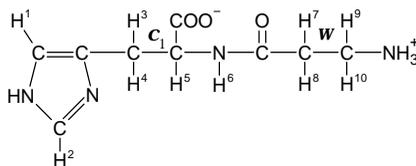


Abbildung 8.100: Durchnummerierung und Zuordnung der Protonen von Carnosin **12** beim physiologischen pH und Bezeichnung des Torsionswinkels \mathbf{c}_1 und \mathbf{w}

Der aromatische Spektralbereich von Carnosin **12** ist identisch mit dem von Glycylhistidin **11**. Im aliphatischen Bereich treten die Multipletts des ABX-Spinsystems der Protonen H^3 , H^4 und H^5 auf. Im Medium $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1 bei $\text{pH}^{\text{D}} < 6$ gibt das Amidproton wieder Anlass zu einem ABMX-Spinsystem (siehe Abbildung 8.101). Die Zuordnung dieser Protonen war zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit bereits bekannt [39], die Analyse des $[\text{AB}]_2$ -Spinsystems des \mathbf{b} -Alaninrestes war hingegen noch nicht beschrieben. Zu diesem Zweck wurden Einzelproben in D_2O erstellt und ^1H -Spektren bei 500,13 MHz aufgenommen.

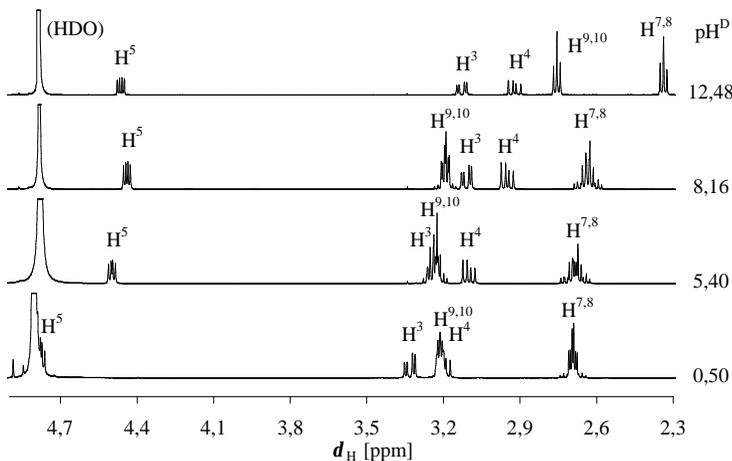


Abbildung 8.101: Zuordnung der pH^{D} -abhängigen 500,13 MHz ^1H -NMR-Spektren von Carnosin **12** (0,05 M in D_2O , $T = 22$ °C)

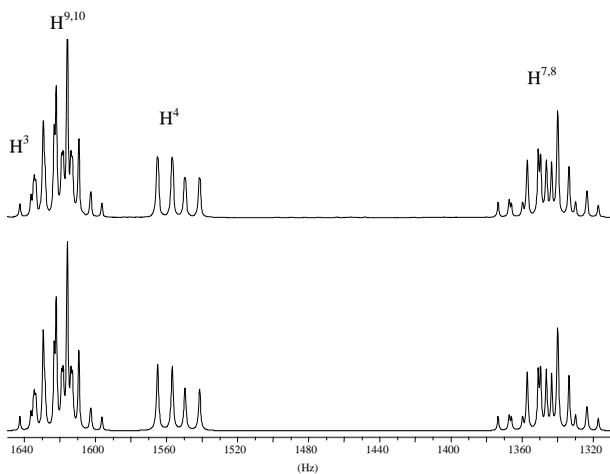


Abbildung 8.102: Oben: Ausschnitt des exp. 500,13 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von Carnosin **12** (0,05 mol/l Lösung in D_2O , $\text{pH}^{\text{D}} = 5,40$) Unten: WINDAISEY-Simulation des Iterationsergebnisses

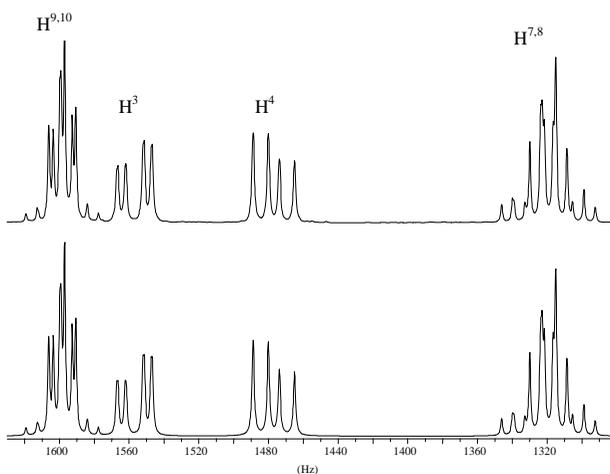


Abbildung 8.103: Oben: Ausschnitt des exp. 500,13 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von Carnosin **12** (0,05 mol/l Lösung in D_2O , $\text{pH}^{\text{D}} = 8,16$) Unten: WINDAISEY-Simulation des Iterationsergebnisses

pH ^D der Probe Hauptspezies		0,50 H ₃ L ²⁺	5,40 H ₂ L ⁺	8,16 HL	12,48 L ⁻
d_{H}	d_1	7,326	7,255	6,927	6,907
d_{H}	d_2	8,615	8,558	7,684	7,641
d_{H}	d_3	3,358	3,245	3,111	3,127
d_{H}	d_4	3,228	3,107	2,954	2,922
d_{H}	d_5	4,804	4,504	4,443	4,464
d_{H}	d_7	2,731	2,710	2,655	2,341
d_{H}	d_8	2,711	2,668	2,619	2,334
d_{H}	d_9	3,246	3,252	3,204	2,757
d_{H}	d_{10}	3,236	3,222	3,187	2,753
${}^4J_{\text{HH}}$	J_{12}	1,37	1,39	1,00	1,00
${}^4J_{\text{HH}}$	J_{13}	0,60	0,84	0,88	0,50
${}^2J_{\text{HH}}$	J_{34}	-15,56	-15,43	-15,04	-14,96
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{35}	5,32	5,24	4,69	4,51
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{45}	8,43	8,29	8,78	9,34
${}^2J_{\text{HH}}$	J_{78}	-16,70	-16,44	-16,21	-14,20
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{79}	7,21	7,98	7,69	6,66*
${}^3J_{\text{HH}}$	$J_{7,10}$	6,45	5,98	5,94	6,66*
${}^3J_{\text{HH}}$	J_{89}	6,32	5,84	5,88	6,66*
${}^3J_{\text{HH}}$	$J_{8,10}$	6,81	6,77	6,86	6,66*
${}^2J_{\text{HH}}$	$J_{9,10}$	-16,70	-13,12	-13,04	-14,37

Tabelle 8.53: Mit WINDAISY iterierte chemische Verschiebungen d [ppm] und Kopplungskonstanten J [Hz] aus 500,13 MHz ¹H-NMR-Spektren von Carnosin **12** (0,05 M in D₂O, $T = 22$ °C)

Die mit WINDAISY iterierten Spektrenparameter sind in Tabelle 8.53 zusammengefasst. Ausschnitte der gemessenen und simulierten Protonenspektren sind den Abbildungen 8.102 und 8.103 zu entnehmen.

8.4.5.3 Einzelproben-¹H-NMR-Titration

Zur NMR-spektroskopischen Bestimmung der Makrokonstanten von Carnosin wurden 18 Einzelproben nach Vorschrift #2 in Tabelle 7.3 erstellt und bei 200,13 MHz Spektrometerfrequenz vermessen. Die ¹H-NMR-Parameter wurden anschließend durch WINDAISY-Iterationen ermittelt. Die $\langle d \rangle$ vs. pH^D-Titrationskurven sind in den Abbildungen 8.104 und 8.105 dargestellt. Aus den pH^D-abhängigen chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten wurden dann mit MULTINMRPK diejenigen für die einzelnen Protolysespezies berechnet (siehe Tabelle 8.54). Die Kopplungskonstanten des *b*-Alaninteils wiesen größere Streuung auf, aus diesem Grund wurde deren Mittelwert $J_{AB} = (J_{79} + J_{7,10} + J_{89} + J_{8,10}) / 4$ in die Auswertung einbezogen.

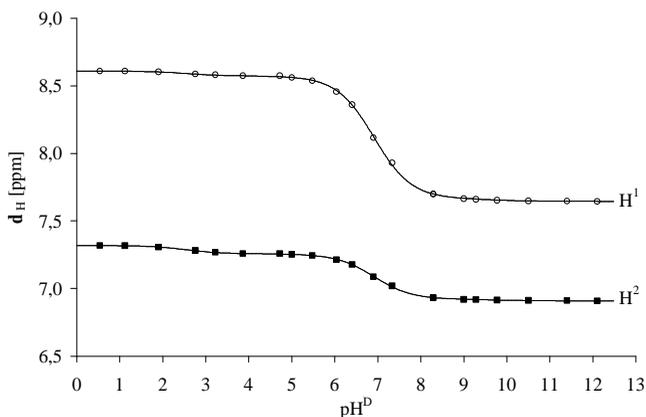


Abbildung 8.104: 200,13 MHz ¹H-NMR-Titrationskurven der aromatischen Protonen von Carnosin **12** (0,02 M in H₂O/D₂O 9/1, *I* = 0,1 M, *T* = 22 °C)

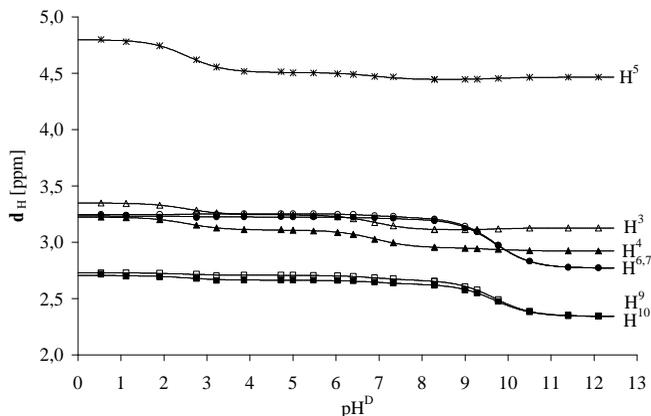


Abbildung 8.105: 200,13 MHz $^1\text{H-NMR}$ -Titrationskurven der aliphatischen Protonen von Carnosin **12** (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

Parameter		H_3L^{2+}	$\Delta_{\text{H}_3\text{L}^{2+}}^{\text{H}_2\text{L}^+}$	H_2L^+	$\Delta_{\text{H}_2\text{L}^+}^{\text{HL}}$	HL	$\Delta_{\text{HL}}^{\text{L}^-}$	L^-
d_{H}	d_1	7,319	-0,062	7,256	-0,335	6,921	-0,011	6,910
d_{H}	d_2	8,609	-0,037	8,572	-0,907	7,665	-0,020	7,646
d_{H}	d_3	3,348	-0,105	3,242	-0,136	3,107	0,020	3,126
d_{H}	d_4	3,222	-0,114	3,107	-0,157	2,949	-0,027	2,922
d_{H}	d_5	4,797	-0,292	4,505	-0,063	4,441	0,023	4,464
d_{H}	d_7	2,727	-0,022	2,705	-0,044	2,661	-0,319	2,343
d_{H}	d_8	2,704	-0,042	2,662	-0,036	2,626	-0,285	2,341
d_{H}	d_9	3,244	0,010	3,252	-0,036	3,218	-0,448	2,770
d_{H}	d_{10}	3,229	-0,008	3,222	-0,017	3,205	-0,436	2,769
$^3J_{\text{HH}}$	J_{35}	5,34 (2)	-0,11 (2)	5,23 (1)	-0,62 (2)	4,62 (1)	-0,09 (2)	4,52 (1)
$^3J_{\text{HH}}$	J_{45}	8,42 (2)	-0,14 (2)	8,27 (1)	0,56 (2)	8,83 (1)	0,51 (2)	9,35 (1)
$^3J_{\text{HH}}$	J_{56}	7,8 ^a	–	7,6 ^a	–		–	–
$^3J_{\text{HH}}$	J_{AB}^b	6,69 (2)	-0,08 (2)	6,61 (1)	-0,03 (2)	6,58 (1)	0,06 (2)	6,64 (1)

Tabelle 8.54: Mit MULTINMRPK berechnete $^1\text{H-NMR}$ -Parameter der makroskopischen Protolysespezies von Carnosin **12** aus 200,13 MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (0,02 M in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

^a nicht iterierter Wert. ^b $J_{\text{AB}} = (J_{79} + J_{7,10} + J_{89} + J_{8,10}) / 4$

8.4.5.4 Berechnung der Mikrokonstanten

Die mikroskopischen Dissoziationsschemata von Carnosin **12** und Glycylhistidin **11** sind identisch (siehe Abbildung 8.96 in Kapitel 8.4.4.4). Im Prinzip bieten sich die *b*-Alanylprotonen $H^{9,10}$ und das Imidazolproton H^2 als ideale Sensoren zur Verfolgung der Dissoziation der Ammonium- und Imidazoliumgruppe an. Dies ist eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für die Berechnung von Mikrokonstanten aus NMR-Titrationen. Es ist auch notwendig, dass die nichtdominante, in Abbildung 8.96 durch AB gekennzeichnete Mikropezies in nennenswerten Anteilen vorliegt, um die d_H vs. pH^D Kurven signifikant zu beeinflussen, wie es bei Glycylhistidin **11** geschieht. Wie bereits von Gajda *et al.* [40] festgestellt wurde, trifft diese Bedingung auf Carnosin **12** nicht zu. Die Mikrokonstanten müssen deshalb nach einer deduktiven Methode ermittelt werden.

Für den Hauptpfad der Dissoziation, $AA \rightarrow BA \rightarrow BB$ gilt mit guter Näherung $pK_1 \approx pK_2$ und $pK_{12} \approx pK_3$ (siehe Abbildung 8.96). Der alternative Pfad $AA \rightarrow AB \rightarrow BB$ kann mit Hilfe der Modellverbindung *N*-Acetylhistidin **10** simuliert werden. Es wird angenommen, dass die unbekannte Mikrokonstante der Imidazoliumgruppe k_{21} in der Mikropezies AB gleich der Makrokonstante K_2 von *N*-Acetylhistidin ist (Abbildung 8.106). Die auf diese Weise berechneten Mikrokonstanten sind in Tabelle 8.55 aufgelistet.

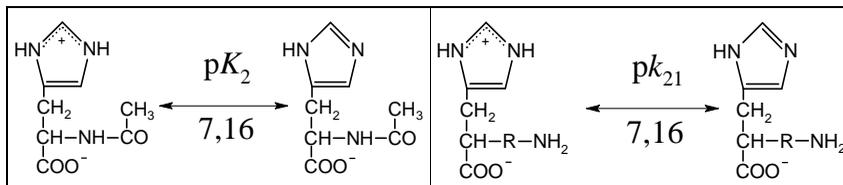


Abbildung 8.106: Deduktive Abschätzung von pK_{21} in Carnosin (rechts, $R = NH-CO-CH_2-CH_2$) anhand des pK_2 -Wertes von *N*-Acetylhistidin (links)

Annahme der Auswertung	pK_1	pK_2	pK_{12}	pK_{21}	k_2 / k_1	pE
AB \approx <i>N</i> -Acetylhistidin	6,91	9,44	9,69	7,16	339	0,25

Tabelle 8.55: Nach der deduktiven Methode berechnete mikroskopische Dissoziationskonstanten pK und Wechselwirkungsparameter pE von Carnosin **12** (0,02 M in H_2O/D_2O 9/1, $I = 0,1$ M, $T = 22$ °C)

Nach dem gleichen Gedankengang kann der in dieser Arbeit ermittelte pK -Wert von *N*-Acetylhistamin **9** zur Berechnung der bislang unbekanntenen Mikrokonstanten von Carcinin

(*b*-Alanylhistamin) verwertet werden. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 8.59 des Kapitels 8.4.6 angeführt, wo ein Vergleich der mikroskopischen Acidität aller in dieser Arbeit untersuchten Histidylderivate erfolgt.

8.4.5.5 Konformationsanalyse am Torsionswinkel c_1

Carnosin **12** stellt in Bezug auf den Torsionswinkel c_1 einen trisubstituierten ethan-ähnlichen Rotator dar. Die kanonischen Rotamere sind in Abbildung 8.90 des vorangehenden Kapitels 8.4.3.3 ersichtlich.

Die mit „Rotamerenanalyse.xls“ berechneten Rotamerenanteile der individuellen Makrospezies HL werden in Tabelle 8.56 aufgeführt. In Analogie zu *N*-Acetylhistidin **10** und Glycylhistidin **11** wurde hier auch $f_t : f_g : f_h \approx 2:1:1$ gefunden, obwohl die Karplusgleichung mit den Altona *I*-Substituentenkonstanten wieder $f_h > f_g$ liefert. Auffallend ist aber die Zunahme des *trans*-Anteiles auf Kosten des *h*-Rotamers bei der Dissoziation der Ammoniumgruppe ($HL \rightarrow L^-$, siehe die letzte Spalte in Tabelle 8.56).

Über die Gesamtkonformation von Carnosin können ohne Kenntnis der Konformation entlang der C–N-Bindung keine neue Aussagen getroffen werden. In [41] wurde eine wahrscheinliche Lösungsstruktur aus ^1H - und ^{13}C -Relaxationszeiten abgeleitet und dies weist keine Wasserstoffbrücke mit der Imidazolgruppe auf, das Molekül nimmt eine gestreckte Konformation ein.

Im Gegensatz zur Lösung liegt Carnosin im Festkörper als *g* Rotamer vor [298][299].

Über die c_1 -Rotamerenverteilung der unterpopulierten Mikrospezies AB kann keine Aussage gemacht werden, denn deren Beitrag zu den observablen $\langle J \rangle$ -Kopplungskonstanten ist zu gering.

Spezies	H_3L^{2+}			H_2L^+			HL			L^-		
	f_i	f_g	f_h	f_i	f_g	f_h	f_i	f_g	f_h	f_i	f_g	f_h
Hansen	0,53	0,25	0,22	0,52	0,24	0,24	0,57	0,19	0,25	0,62	0,18	0,21
Martin	0,55	0,27	0,18	0,54	0,26	0,20	0,59	0,20	0,21	0,64	0,19	0,17
Haasnoot-B	0,58	0,27	0,16	0,56	0,25	0,19	0,61	0,19	0,20	0,67	0,18	0,15
Haasnoot-D	0,62	0,27	0,11	0,60	0,26	0,14	0,66	0,19	0,15	0,72	0,18	0,10
Altona	0,53	0,22	0,25	0,52	0,21	0,28	0,58	0,14	0,28	0,64	0,13	0,23

Tabelle 8.56: Nach verschiedenen Modellen berechnete c_1 -Rotamerenverteilung für die Protolysespezies von Carnosin **12**

8.4.5.6 Konformationsanalyse am Torsionswinkel w

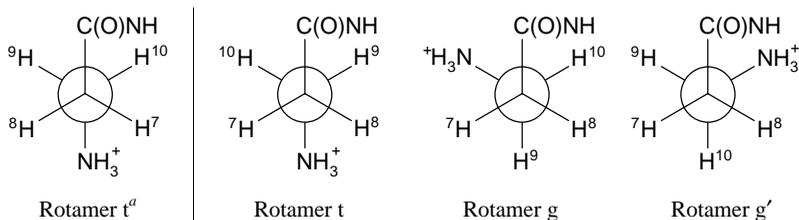


Abbildung 8.107: Kanonische Rotamere von Carnosin **12** am Segment w
^a alternative stereospezifische Zuordnung der Methylenprotonen

Ohne zusätzliche heteronukleare Kopplungskonstanten entlang der ω -Rotationsachse (CO)C–C(NH₂) von Carnosin können die alternativen Zuordnungen in Abbildung 8.107 nicht unterschieden werden. Aus diesem Grund wird die w -Rotamerenverteilung in dieser Arbeit mit der Näherung $p_g = p_{g'}$ charakterisiert.

Die Rotamerenanteile wurden nach dem in den Kapiteln 6.3.1.1 und 6.4.1 diskutierten Verfahren aus den bei 500 Hz vermessenen Kopplungskonstanten berechnet (Tabelle 8.53). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8.57 und 8.58 verzeichnet. Die w -Rotamerenverteilung ist praktisch gleich der des Modellmoleküls *b*-Alanin. Damit wurde erstmalig experimentell bewiesen, dass der weiter entfernte Histidylteil kaum einen Einfluss auf die Rotamerenverhältnisse am Torsionswinkel w ausübt.

Karplusgleichung	H_3L^{2+}		H_2L^+		HL		L^-	
	f_i	$f_g + f_{g'}$	f_i	$f_g + f_{g'}$	f_i	$f_g + f_{g'}$	f_i	$f_g + f_{g'}$
Abraham, Gatti	0,30	0,70	0,28	0,72	0,27	0,73	0,29	0,71
Haasnoot-B	0,51	0,49	0,48	0,52	0,47	0,53	0,49	0,51
Haasnoot-C	0,42	0,58	0,39	0,61	0,38	0,62	0,40	0,60
Altona	0,29	0,71	0,26	0,74	0,25	0,75	0,35	0,65
Lin ^a	0,38	0,62	0,44	0,56	0,43	0,57	–	–

Tabelle 8.57: Nach dem kanonischen N -Wertmodell und nach Lin berechnete w -Rotamerenverteilung der Protolysespezies von Carnosin **12**. ^a berechnet aus $\langle J_{HH} \rangle$ bei 500,13 MHz

Karplusgleichung	H_3L^{2+}		H_2L^+		HL		L^-	
	f_i	$f_g + f_{g'}$	f_i	$f_g + f_{g'}$	f_i	$f_g + f_{g'}$	f_i	$f_g + f_{g'}$
Abraham, Gatti	0,32	0,68	0,35	0,65	0,36	0,64	0,36	0,64
Haasnoot-B	0,27	0,73	0,29	0,71	0,31	0,69	0,30	0,70
Haasnoot-C	0,28	0,72	0,30	0,70	0,32	0,68	0,32	0,68
Altona	0,30	0,70	0,32	0,68	0,35	0,65	0,33	0,67

Tabelle 8.58: Nach dem kanonischen Mittelwertmodell aus J_{AB} berechnete w -Rotamerenverteilung der Protolysespezies von Carnosin **12**

8.4.6 Vergleichende Diskussion der Ergebnisse

Alle Abkömmlinge des Carnosins **12** wurden in dieser Arbeit durch ¹H-NMR-Titrations einheitlich im Lösemittelgemisch H₂O/D₂O 9/1 und bei $I = 0,1$ M charakterisiert. Einen breiteren Vergleich ermöglicht aber die Umrechnung der erhaltenen Mikrokonstanten auf das biorelevante Medium 100% H₂O. Diese Umrechnung kann nun auf dreierlei Weise erfolgen.

Nach den Überlegungen in Kapitel 8.4.5.4 lassen sich die H₂O-bezogenen Mikrokonstanten von Carnosin **12** und Carcinin **12a** aus pK^c -Werten der Modellverbindungen N -Acetylhistidin **10** und N -Acetylhistamin **9** berechnen.

Für Glycylhistidin **11** werden die Mikrokonstanten aus dem potentiometrischen pK^c - und dem NMR-spektroskopisch ermittelten $pE = 0,45$ -Wert über die Gleichungen 2.68 und 2.79 errechnet.

Für Histamin **9a**, Histidin **10a** und Histidylglycin **11a** werden die pK -Werte aus Literaturwerten für Makrokonstanten pK^c und den Wechselwirkungsparametern pE nach Noszál *et al.* [45] berechnet.

Alle mikroskopischen Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 8.59 zusammengefasst.

Verbindung	pK_{COOH}	pK_{ImH^+}		$pK_{\text{NH}_3^+}$		k_T	$pE_{\text{Im,NH}_2}$
		pK_1	pK_{21}	pK_2	pK_{12}		
AcHist 9	–	–	7,09	–	–	–	–
Hist 9a	–	6,07 ^b	7,09 ^b	8,79 ^b	9,81 ^b	525 ^b	1,02 ^a
AcHis 10	2,78	–	7,09	–	–	–	–
His 10a	1,92 ^c	6,03 ^c	6,96 ^c	8,21 ^c	9,14 ^c	149 ^c	0,93 ^a
HisGly 11a	2,82 ^d	6,01 ^d	6,93 ^d	6,70 ^d	7,62 ^d	4,9 ^d	0,92 ^a
GlyHis 11	2,62	6,85	7,30	7,79	8,24	8,7	0,45 0,32 ^f
GlyHist 11b	–	6,82 ^e	7,15 ^e	7,65 ^e	7,98 ^e	6,8 ^e	0,33 ^e
Carnosin 12	2,63	6,83	7,09	9,18	9,44	224	0,26
Carcinin 12a	–	6,84 ^e	7,09	8,96	9,21 ^e	132	0,25

Tabelle 8.59: Vergleich der Mikrokonstanten pK , Tautomerieverhältnisse k_T und Wechselwirkungsparameter pE von verschiedenen Abkömmlingen des Histidins (His)- und Histamins (Hist) in H_2O , $I=0,1\text{M}$ und 25°C . ^a aus [45]. ^b berechnet aus pK^c in [297] und pE in [45]. ^c berechnet aus pK^c in [100] und pE in [45]. ^d berechnet aus pK^c in [296] und pE in [45]. ^e aus [40] ^f aus [6] ^b Carcinin: **b**-Alanylhistamin

Abstand der Imidazol- und Aminogruppe	R	Verbindung	$pE_{\text{Im,NH}_2}$	Ref.
Im-CH ₂ -CHR-NH ₂	H	Hist 9a	1,02	[45]
	COOH	His 10a	0,93	[45]
Im-CH ₂ -CHR-NH-CO-CH ₂ -NH ₂	H	GlyHist 11b	0,33	[40]
	COOH	GlyHis 11	0,45 (0,32)	d.A.([6])
Im-CH ₂ -CHR-NH-CO-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	H	Carcinin 12a	0,25	d.A.
	COOH	Carnosin 12	0,26	d.A.

Tabelle 8.60: Vergleich der Wechselwirkungsparameter pE verschiedener Abkömmlinge des Histidins (His)- und Histamins (Hist) als Funktion des Abstandes der Amino- und Imidazolgruppe. d.A.: diese Arbeit

Die pK_{21} -Werte der Imidazoliumgruppe in Tabelle 8.59 quantifizieren, dass deren Acidität durch *N*-Acylierung des α -Stickstoffes kaum verändert wird. Die Anwesenheit einer

elektronenanziehenden Carboxygruppe verringert in erster Linie den pK-Wert der α -Ammoniumgruppe.

Tabelle 8.60 verdeutlicht, dass die Wechselwirkungsparameter der Imidazol- und Aminogruppen mit steigendem kovalenten Abstand der Gruppen abnehmen. In Carnosin und Carcinin sind die Imidazol- und Aminogruppen durch sieben σ -Bindungen isoliert, so kann deren induktive Wechselwirkung ausgeschlossen werden. Trotz dem großen kovalenten Abstand ändert sich die intrinsische Acidität der Imidazolgruppe durch die Protonierung der Aminogruppe um ca. 0,25 pK-Einheit. Dies deutet auf eine elektrostatische, *through-space* Wechselwirkung hin.

Die aus den $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten abgeleiteten c_1 -Rotamerenverteilung indiziert für jede Dissoziationsstufe ein Verhältnis von $f_t \gg f_h \approx f_g$. In den Rotameren *trans* und *hindered* liegen zwar die Amino- und Imidazolgruppe in geeigneter Orientierung für eine intramolekulare Wasserstoffbrücke vor. Die c_1 -Rotamerenanteile zeigen aber keine signifikante Abhängigkeit vom pH-Wert, so müssen bis zu einer endgültigen Aussage über Wasserstoffbrückenbildung noch weitere experimentelle Befunde erbracht werden.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Die NMR-Titration ist die aussagekräftigste Methode zur Charakterisierung der Dissoziation mehrbasiger Liganden auf makroskopischer, mikroskopischer (gruppen-spezifischer) und submikroskopischer (rotationsspezifischer) Ebene. Im Rahmen der vorgelegten Dissertation sind Entwicklungen zur Planung, experimentellen Durchführung sowie Auswertung von multinuklearen NMR-Titrationsen erfolgreich bearbeitet und experimentell an Modellbeispielen getestet worden.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Excel-Datenblatt „nmr-plan.xls“ verwendet durch Vorversuche ermittelte pK -Werte und ermöglicht so eine effiziente Vorausplanung von Einzelproben-NMR-Titrations-Serien auch für jene komplexen Fälle, wo gleichzeitig mehrere n -wertige Protolyte unter hochpräziser ($\pm 0,1\%$) Kontrolle der Ionenstärke charakterisiert werden sollen. Wie am Beispiel von Histidylderivaten gezeigt wurde, ist letztere Bedingung unerlässlich zur NMR-spektroskopischen Aufklärung von subtilen Unterschieden in der Acidität strukturverwandter Bioliganden.

Im Programm MULTiNMRPK wurden zwei makroskopische Auswertungskonzepte, die multiple nichtlineare Regression und die Zielfaktorenanalyse (TFA) verglichen. Bei Ersterer werden alle pK -Werte und die für die Spezies H_nL individuellen chemischen Verschiebungen gleichzeitig optimiert. Bei der Zielfaktorenanalyse (TFA), die erstmals zur Auswertung von NMR-Titrationsen eingesetzt wurde, kann zwar die Anzahl der zu iterierenden Parameter um 80-90% reduziert werden, die Methode liefert aber häufig mathematische Artefakte und keine physikalisch-chemisch sinnvollen Lösungen.

Das zentrale Problem des mikroskopischen (gruppenspezifischen) Dissoziationskonzeptes ist die Auswahl jener Spins („Sensoratome“) des Moleküls, die spezifisch auf die Dissoziation einer einzigen Gruppe reagieren. Dafür stand bislang kein quantitatives Kriterium zur Verfügung. In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein graphischer Ansatz entwickelt, der auf der Sudmeier-Reilly-Gleichung basiert. Nach diesem Modell setzt sich die Dissoziationsverschiebung Δd eines ausgewählten Kernes als Linearkombination der Dissoziationsgrade von einzelnen Gruppen zusammen. Die NMR-Titrationskurven, $\langle d \rangle$

vs. pH werden mit dem „makroskopischen“ mittleren Dissoziationsgrad \bar{h} auf einer gemeinsamen Skala verglichen. Die maximale und spiegelbildliche Abweichung zweier normierter Titrationskurven vom mittleren Dissoziationsgrad identifiziert ein Paar gruppenspezifischer Sensorkerne.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Auswerteprogramm für Mikrodissoziationsprozesse, NMRMICROPK, konnte für den zweibasigen Fall gezeigt werden, dass die simultane Iteration von Mikrokonstanten und NMR-Parametern (Sudmeier-Reilly-Koeffizienten) zu Mehrdeutigkeiten führen kann, eine wichtige Konsequenz, die frühere Betrachtungen relativiert.

Mit Hilfe der neu erstellten Excel-Datei „Rotamerenanalyse.xls“ können nicht nur verbindungs-, sondern auch dissoziationspezifische Karpluskurven berechnet werden. Diese ermöglichen die zur Zeit genaueste Rotamerenanalyse von 1,2-disubstituierten und 1,1,2-trisubstituierten Ethanen. Die Betrachtung der 1,2-disubstituierten Ethane zeigt, dass die verschiedenen Karplusmodelle nur dann einheitliche Rotamerenanteile liefern, wenn die Auswertung nicht auf dem experimentellen N -Wert ($\langle N \rangle = \langle {}^3J_{12} \rangle + \langle {}^3J_{13} \rangle$), sondern lediglich auf einer der beiden Kopplungskonstanten $\langle {}^3J_{12} \rangle$ oder $\langle {}^3J_{13} \rangle$ basiert.

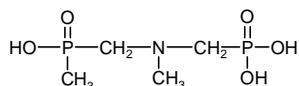
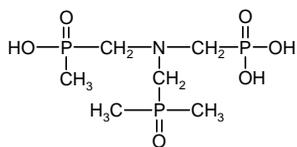
Das neu entwickelte Programm LAOTIT ermöglicht die Simulation titrationsabhängiger Spektrenreihen erster oder höherer Ordnung für alle in der wässrigen Komplexchemie wichtigen $I = 1/2$ -Kerne (${}^1\text{H}$, ${}^{13}\text{C}$, ${}^{15}\text{N}$, ${}^{31}\text{P}$, usw.). Die simulierte Spektrenreihe kann mit dem hauseigenen Programm MULTIPLENMRGRAPHICS [173] dargestellt werden.

Die im Rahmen der vorgelegten Dissertation entwickelten Programme, MULTINMRPK, NMRMICROPK, LAOTIT, ergänzt mit weiteren Neuentwicklungen der Düsseldorfer Arbeitsgruppe, stellen zur Zeit das umfangreichste Instrumentarium zur Simulation, Auswertung und Visualisierung von NMR-Titrationsen dar.

Auf experimenteller Seite wurde eine neue Titrationsart, die „elektrodenlose“ NMR-Titration, eingeführt. Hierbei wird der pH-Wert aus den dynamisch gemittelten chemischen Verschiebungen $\langle \delta \rangle$ einbasiger Liganden berechnet, die neben der Testsubstanz im NMR-

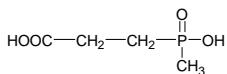
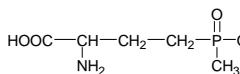
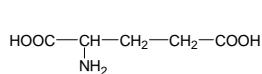
Röhrchen vorliegen und mittitriert werden. Nach dieser Methode können pK -Werte im Grenzwertintervall $0 < pK < 2$ bei 1 molarer Ionenstärke (NaNO_3) auf zwei Nachkommastellen genau erfasst werden, was unter Verwendung der Glaselektrode unmöglich ist (Säurefehler).

Die Dissoziationskonstanten von $[N-(P\text{-Methylphosphinoylmethyl})-N\text{-methyl}]\text{aminomethan-phosphonsäure } \mathbf{1}$ wurden durch „elektrodenlose“ NMR-Titration zu $pK_1 < 0$, $pK_2 = 0,69$, $pK_3 = 5,22$ und $pK_4 \approx 9,7$ ermittelt. Es wurden Verbreiterungen der Methylensignale in jenen pH-Bereichen beobachtet, wo eine Deprotonierung stattfindet. Ähnliche Linienverbreiterungen zeigten auch die Indikatormoleküle jeweils im eigenen Dissoziationsbereich. Es wurde gezeigt, dass dieses Phänomen auf die Na^+ -Ionen aus dem 1 molaren Ionenpuffer NaNO_3 zurückzuführen ist, denn bei 0,1 molarer Ionenstärke ist keine Peakverbreiterung zu verzeichnen.

**1****2**

Beim analogen $[N-(P,P\text{-Dimethylphosphinoylmethyl})-(N\text{-}P'\text{-Methylphosphinoylmethyl})]\text{-aminomethanphosphonsäure } \mathbf{2}$ zeigt sich dieser Effekt in geringerem Maße und erst im Intervall $1,8 < \text{pH} < 4$. Da hier der $-I$ -Effekt der Phosphinoxidgruppe die Protonenaffinität am Stickstoff ($pK_1 = 7,72$) und an der PO_3H^- -Gruppe ($pK_2 = 3,09$) wesentlich herabsetzt, verringert sich vermutlich auch die Wechselwirkung mit Natriumionen.

Die Acidität des Herbizides Phosphinothricin **6** und dessen Metaboliten **5** wurde erstmals auf der mikroskopischen Ebene charakterisiert:

**5****6****7**

Die erhaltenen Mikrokonstanten indizieren, dass die Methylphosphinogruppe in **5** um 1,36 pK -Einheit acider als die Carboxygruppe ist. Hingegen besitzen die beiden Gruppen in **6** die gleiche Acidität. Die induktive Wechselwirkung der Protolysezentren in **5** kann als

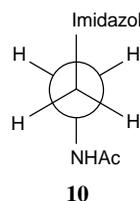
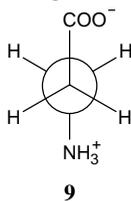
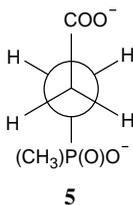
$pE = 0,68$ quantifiziert werden. In den Verbindungen **6** und **7** geht dieser Wert infolge der größeren Entfernung und des $-I$ -Effektes der protonierten Ammoniumgruppe auf $0,17$ bzw. $0,11$ zurück.

Der gleiche Abnahme des Wechselwirkungsparameter pE wurde für Carnosinderivate mit wachsendem Abstand der Amino- und Imidazolgruppe gefunden:

Abstand der Imidazol- und Aminogruppe	R	Verbindung	$pE_{\text{Im,NH}_2}$	Ref.
Im-CH ₂ -CHR-NH ₂	H	Hist 9a	1,02	[45]
	COOH	His 10a	0,93	[45]
Im-CH ₂ -CHR-NH-CO-CH ₂ -NH ₂	H	GlyHist 11b	0,33	[40]
	COOH	GlyHis 11	0,45 (0,32)	d.A.([6])
Im-CH ₂ -CHR-NH-CO-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	H	Carcinin 12a	0,25	d.A.
	COOH	Carnosin 12	0,26	d.A.

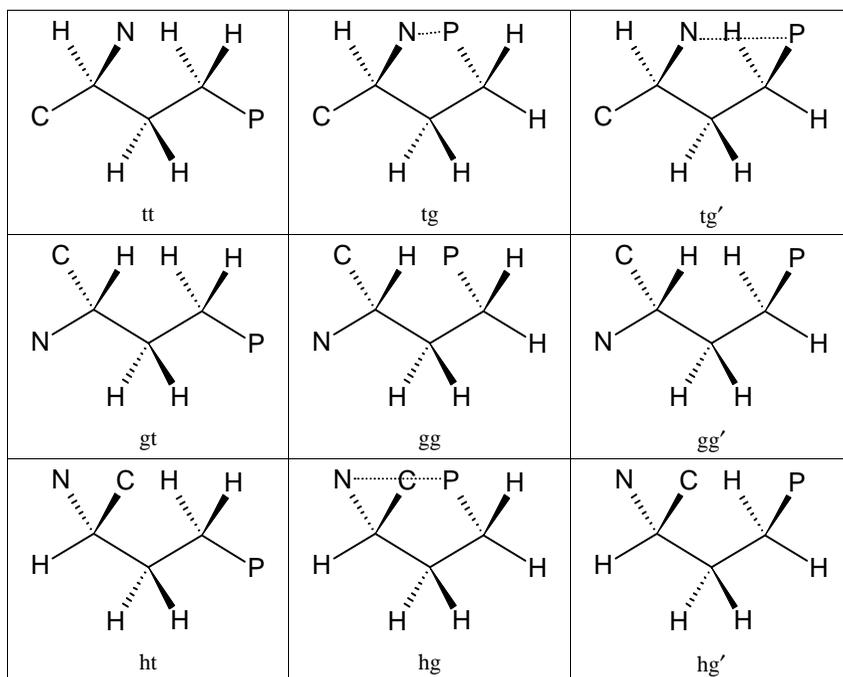
Mit Hilfe der hier abgeleiteten Mikrokonstanten kann nun die pH-abhängige Verteilung aller Tautomerenformen (Mikrospezies) abgeleitet werden, was zur Identifizierung der bioaktiven Spezies einen wichtigen Beitrag liefern kann.

Die Rotamerenverteilung folgender ethanähnlicher Rotatoren wurde in jeder Dissoziationsstufe aus den $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten abgeleitet.



Alle Protolysespezies von **5** liegen bevorzugt als *trans* Rotamer vor, dessen Anteil mit fortschreitender Dissoziation der Gruppen zunimmt. Für die Dissoziationsstufen von *b*-Alanin **9** und *N*-Acetylhistamin **10** liefert das kanonische Mittelwertmodell hingegen eine nahezu statistische Rotamerenverteilung.

Die Verteilung der 9 kanonischen Rotamere von Phosphinothricin **6** wurde für alle Protolysespezies berechnet:



Der konformationsbestimmende Faktor ist hier die sterische, bzw. elektrostatische Abstoßung der Säuregruppen. Die elektrostatische Anziehung der NH_3^+ - und $\text{P}(\text{O})(\text{CH}_3)\text{O}^-$ -Gruppen stabilisiert geringfügig auch die Rotamere tg und tg', die bei $\text{pH} < 7$ zu etwa 5% vorliegen. Durch Dissoziation der Ammoniumgruppe geht deren Anteil auf ca. 1,5% zurück. Die stabilisierende Wechselwirkung der Ammonium- und *g*-Carboxylatgruppe in Glutaminsäure **7** ist viel ausgeprägter, die Rotamere tg und tg' liegen bei $\text{pH} < 8$ mit der kationischen Ammoniumgruppe zu 10%, während bei $\text{pH} > 11$ mit der neutralen Aminogruppe zu 5% vor.

Die Kenntnis aller Mikrokonstanten und speziesbezogenen Rotamerenanteile von Glufosinat führte erstmals zur Berechnung der Acidität jeder einzelnen Gruppe in individuellen Rotameren eines zweisegmentigen Rotators. Dies repräsentiert das heute erreichbare detailreichste Niveau der Beschreibung von Dissoziationsgleichgewichten.

10 LITERATUR

- [1] K. Burger (Ed.), „*Biocoordination Chemistry: Coordination Equilibria in Biologically Active Systems*“, Ellis Horwood, Chichester, 1990
- [2] F. Ruff, I. G. Csizmadia, „*Organic Reactions: Equilibria, Kinetics and Mechanism*“, Elsevier, 1994
- [3] B. Noszál, V. Scheller-Krattiger, R. B. Martin, *J. Amer. Chem. Soc.* **104**, 1078 (1982)
- [4] T. Kiss, I. Sóvágó, R. B. Martin, *J. Amer. Chem. Soc.* **111**, 3611 (1989)
- [5] D. L. Rabenstein, *Anal. Chem.* **95**, 2797 (1973)
- [6] D. L. Rabenstein, M. S. Greenberg, C. A. Evans, *Biochemistry* **16**, 977 (1977)
- [7] D. L. Rabenstein, P. Bratt, T. D. Schierling, J. M. Robert, W. Guo, *J. Amer. Chem. Soc.* **114**, 3278 (1992)
- [8] D. A. Keire, E. Strauss, W. Guo, B. Noszál, D. L. Rabenstein, *J. Org. Chem.* **57**, 123 (1992)
- [9] J. Polster, H. Lachmann, „*Spectrometric Titrations*“, VCH-Verlag, Weinheim (1989)
- [10] C. Arendt, G. Hägele, *Computers Chem.* **19**, 263 (1995)
- [11] C. Arendt, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2002
- [12] A. Lindner, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2000
- [13] B. Noszál, P. Sándor, *Anal. Chem.* **61**, 2631 (1989)
- [14] M. Grzonka, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1989
- [15] J. Ollig, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1996
- [16] G. Hägele, „*NMR Controlled Titrations of Phosphorus-Containing Acids and Bases in Protolyses and Complex Formation*“ in L. D. Quin, J. G. Verkade (Eds.), „*Phosphorus-31P-NMR Spectral Properties in Compound Characterization and Structural Analysis*“, VCH-Verlag, Weinheim, 1994
- [17] G. Hägele, U. Holzgrabe, „*pH-Dependent NMR Measurements*“, in U. Holzgrabe, I. Wavez, B. Diehl (Eds.), „*NMR Spectroscopy in Drug Development und Analysis*“, VCH-Verlag, Weinheim, 1999

- [18] G. Hägele, Z. Szakács, J. Ollig, S. Hermens, C. Pfaff, *Heteroatom Chemistry* **11**, 562 (2000)
- [19] R. Tyka, G. Hägele, J. Peters, *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **34**, 31 (1987)
- [20] G. Hägele, S. Varbanov, J. Ollig, H.-W. Kropp, *Z. anorg. allg. Chem.* **620**, 914 (1994)
- [21] A. Lindner, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2000
- [22] M. Kriskovic, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2001
- [23] C. Frassinetti, S. Ghelli, P. Gans, A. Sabatini, M. S. Moruzzi, A. Vacca, *Anal. Biochem.* **231**, 374 (1995)
- [24] J. L. Sudmeier, C. N. Reilly, *Anal. Chem.* **36**, 1698 (1964)
- [25] J. L. Sudmeier, C. N. Reilly, *Anal. Chem.* **36**, 1707 (1964)
- [26] N. Todeschi, J. Gharbi-Benarous, F. Acher, R. Azerad, J.-P. Girault, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1337 (1996)
- [27] D. J. Price, J. D. Roberts, W. L. Jorgensen, *J. Amer. Chem. Soc.* **120**, 9672 (1998)
- [28] P. Kafarski, P. Mastalerz, „Aminophosphonates“, Beiträge zur Wirkstoffforschung, **21**, 1 (1984)
- [29] K. Moedritzer, R. R. Irani, *J. Org. Chem.* **31**, 1603 (1966)
- [30] J. Peters, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1992
- [31] W. Perkow, H. Ploss, „Wirksubstanzen der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel“, 3. Auflage, Band 3: Herbizide
- [32] E. Rasche, J. Cremer, G. Donn, J. Zink, „The Development of Glufosinate Ammonium Tolerant Crops into the Market“, in Brighton Crop Protection Conference, Weeds, Farnham, Surrey, UK, 1995
- [33] S. K. Nair, D. W. Christianson, *J. Amer. Chem. Soc.* **113**, 9455 (1991)
- [34] M. Tanokura, *J. Biochem.* **94**, 51 (1983)
- [35] M. Bernard, W. C. Perng, T. Burt, P. Okunieff, D. C. Johnson, *Amer. J. Physiol.* **266** R1008 (1992)

- [36] F. L. Margolis, *Science* **184**, 909 (1974)
- [37] C. Arus, M. Barany, W. M. Westler, J. L. Markley, *J. Magn. Reson.* **57**, 519 (1984)
- [38] M. Tanokura, *Biochim. Biophys. Acta* **742**, 576 (1983)
- [39] J. O. Friedrich, R. E. Wasylshen, *Can. J. Chem.* **64**, 2132 (1986)
- [40] T. Gajda, B. Henry, J.-J. Delpuech, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 157 (1994)
- [41] E. Gaggelli, G. Valensin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 401 (1990)
- [42] M. Tanokura, M. Tasumi, T. Miyazawa, *Biopolymers* **15**, 393 (1976)
- [43] M. Kraszni, J. Kökösi, B. Noszál, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **5**, 914 (2002)
- [44] W. G. Espersen, R. B. Martin, *J. Phys. Chem.* **80**, 741 (1976)
- [45] B. Noszál, D. L. Rabenstein, *J. Phys. Chem.* **95**, 4761 (1991)
- [46] Z. Szakács, B. Noszál, *J. Math. Chem.* **26**, 139 (1999)
- [47] G. N. Lewis, M. Randall, *J. Amer. Chem. Soc.* **43**, 1140 (1921)
- [48] P. Debye, E. Hückel, *Phys. Z.* **24**, 185 (1923)
- [49] K. S. Pitzer, *Acc. Chem. Res.* **10**, 371 (1977)
- [50] I. Reimann, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2001
- [51] C. W. Davies, *J. Chem. Soc.* 2093 (1938)
- [52] G. H. Nancollas, M. B. Tomson, *Pure Appl. Chem.* **54**, 2675 (1982)
- [53] G. Biedermann, L. G. Sillén, *Arkiv Kemi* **5**, 425 (1953)
- [54] S. P. L. Sørensen, *Biochem. Z.* **21**, 201 (1909)
- [55] R. G. Bates, „*Determination of pH, Theory and Practice*“, 2. Ausgabe, Wiley, 1973
- [56] H. Sigel, A. D. Zuberbühler, O. Yamauchi, *Anal. Chim. Acta* **255**, 63 (1991)
- [57] A. K. Covington, R. G. Bates, R. A. Durst, *Pure Appl. Chem.* **57**, 531 (1985)
- [58] R. G. Bates, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* **10**, 247 (1981)

- [59] H. M. Irving, M. G. Miles, L. D. Pettit, *Anal. Chim. Acta* **38**, 475 (1967)
- [60] M. Paabo, R. G. Bates, *Anal. Chem.* **41**, 283 (1969)
- [61] H. S. Harned, R. A. Robinson, *Trans. Faraday Soc.* **36**, 973 (1940)
- [62] P. Sipos, I. Bódi, P. M. May, G. T. Hefter, *Talanta* **44**, 617 (1997)
- [63] M. Cremer, *Z. Biol.* **47**, 562 (1906)
- [64] F. G. K. Baucke, *Fresenius J. Anal. Chem.* **349**, 582 (1994)
- [65] F. G. K. Baucke, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **100**, 1466 (1996)
- [66] K. Horovitz, *Z. Phys.* **15**, 369 (1923)
- [67] H. Schiller, *Ann. Phys.* **74**, 105 (1924)
- [68] B. P. Nicolsky, *Acta Physiochim. USSR* **7**, 579 (1937)
- [69] G. Eisenman, D. O. Rudin, J. O. Casby, *Science* **126**, 831 (1957)
- [70] Z. Boksay, G. Bouquet, S. Dobos, *Phys. Chem. Glasses* **8**, 140 (1967)
- [71] F. G. K. Baucke, *J. Non-Cryst. Solids* **73**, 215 (1985)
- [72] L. P. Hammett, A. J. Deyrup, *J. Am. Chem. Soc.* **54**, 2721 (1932)
- [73] L. P. Hammett, „*Physical Organic Chemistry*“, 2. Ausgabe, McGraw-Hill, New York, 1970, Kapitel 9.
- [74] M. A. Paul, F. A. Long, *Chem. Rev.* **57**, 1 (1957)
- [75] E. Jirásková, J. Kulhánek, T. Nevecná, O. Pytela, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **64**, 1253 (1999)
- [76] N. C. Marziano, G. M. Cimino, R. C. Passerini, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1915 (1973)
- [77] N. C. Marziano, P. G. Traverso, A. Tomasin, R. C. Passerini, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 309 (1977)
- [78] R. A. Cox, K. Yates, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3681 (1978)
- [79] R. A. Cox, K. Yates, *Can. J. Chem.* **59**, 1560 (1981)

- [80] Ü. Haldna, *Prog. Phys. Org. Chem.* **18**, 65 (1990)
- [81] R. A. Cox, R. Stewart, *J. Amer. Chem. Soc.* **98**, 488 (1976)
- [82] V. Gold, B. M. Lowe, *J. Chem. Soc. A* 936 (1967)
- [83] S. Rondinini, P. Longhi, P. R. Mussini, T. Mussini, *Pure Appl. Chem.* **59**, 1693 (1987)
- [84] P. K. Glasoe, F. A. Long, *J. Phys. Chem.* **64**, 188 (1960)
- [85] K. Mikkelsen, S. O. Nielsen, *J. Phys. Chem.* **64**, 632 (1960)
- [86] F. G. K. Baucke, *J. Phys. Chem. B* **102**, 4835 (1998)
- [87] A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Anal. Chem.* **40**, 700 (1968)
- [88] E. L. Purlee, *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 263 (1959)
- [89] P. Salomaa, L. L. Schaleger, F. A. Long, *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 1 (1964)
- [90] J. N. Brønsted, *Chem. Rev.* **5**, 293 (1928)
- [91] Critical Stability Constants
- [92] K. B. Wiberg, „*Physical Organic Chemistry*“, Wiley, New York, 1966, Kapitel 2-7
- [93] K. B. Wiberg, *Chem. Rev.* **55**, 713 (1955)
- [94] H. H. Hyman, A. Kaganove, J. J. Katz, *J. Phys. Chem.* **64**, 1653 (1960)
- [95] R. Gary, R. G. Bates, R. A. Robinson, *J. Phys. Chem.* **69**, 2750 (1965)
- [96] R. E. Robertson, P. M. Laughton, in „*Solute Solvent Interactions*“, J. F. Cotzee, C. D. Ritchie (Eds.), Marcel Dekker, New York, 1969, Seiten 400-538
- [97] I. N. Gordon, B. M. Lowe, *Chem. Comm.* 803 (1970)
- [98] R. Delgado, *et. al. Anal. Chim. Acta* **245**, 271 (1991)
- [99] A. O. McDougall, F. A. Long, *J. Phys. Chem.* **66**, 429 (1962)
- [100] P. Daniele, E. Prenesti, G. Ostacoli, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 3269 (1996)

- [101] J. Bjerrum, „*Metal Ammine Complex Formation in Aqueous Solution*“, Haase, Copenhagen, 1941
- [102] F. J. Rosotti, H. S. Rosotti, „*The Determination of Stability Constants*“, McGraw-Hill, New York, 1961
- [103] H. S. Harned, B. B. Owen, *Chem. Rev.* **25**, 31 (1939)
- [104] F. Apruzesse, E. Bottari, M. R. Festa, *Talanta* **56**, 459 (2002)
- [105] A. Albert, E. P. Serjeant, „*The Determination of Ionization Constants*“, 3. Ausgabe, Chapman and Hall, London, 1984
- [106] R. Wegscheider, *Monatsch. Chem.* **16**, 153 (1895)
- [107] N. Bjerrum, *Z. phys. Chem.* **56**, 219 (1923)
- [108] T. L. Hill, *J. Phys. Chem.* **48**, 101 (1944)
- [109] R. E. Benesch, R. Benesch, *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 5877 (1955)
- [110] L. Ebert, *Z. phys. Chem.* **121**, 385 (1926)
- [111] A. Neuberger, *Biochem. J.* **30**, 2085 (1936)
- [112] A. Loewenstein, J. D. Roberts, *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 2705 (1960)
- [113] R. B. Martin, *J. Phys. Chem.* **65**, 2053 (1961)
- [114] L. Szilágyi, Sz. Z. Pusztahelyi, S. Jakab, I. Kovács, *Carbohydrate Res.* **247**, 99 (1993)
- [115] M. A. Santos, M. A. Esteves, M. C. Vaz, J. J. R. Fraústo da Silva, B. Noszál, E. Farkas, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 1977 (1997)
- [116] B. Noszál, *J. Phys. Chem.* **90**, 4104 (1986)
- [117] J. C. D'Angelo, Timothy W. Collette, *Anal. Chem.* **69**, 1642 (1997)
- [118] K. Takács-Novák, K. Y. Tam, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**, 1171 (2000)
- [119] E. L. Elson, J. T. Edsall, *Biochemistry*, **1**, 1 (1962)
- [120] F. J. Anderson, A. E. Martell, *J. Amer. Chem. Soc.* **86**, 715 (1964)

- [121] R. J. Sturgeon, S. G. Schulman, *J. Pharm. Sci.* **66**, 958 (1977)
- [122] V. K. Bhatt, R. D. Jee, *Anal. Chem.* **167**, 233 (1985)
- [123] J. J. Christensen, D. P. Wrathall, R. M. Izatta, D. O. Tolman, *J. Phys. Chem.* **71**, 3001 (1967)
- [124] T. Kiss, B. Tóth, *Talanta* **29**, 539 (1982)
- [125] C. T. Huys, A. M. Goeminne, Z. Eechhaut, *Thermochim. Acta* **19** (1983)
- [126] S. H. Hilal, Y. El-Shabrawy, L. A. Carreira, S. W. Karickhoff, S. S. Toubar, M. Rizk, *Talanta* **43**, 607 (1996)
- [127] E. Grunwald, A. Loewenstein, S. Meiboom, *J. Chem. Phys.* **27**, 630 (1957)
- [128] E. Grunwald, A. Loewenstein, S. Meiboom, *J. Chem. Phys.* **27**, 641 (1957)
- [129] E. Grunwald, M. Cocivera, *Discuss. Faraday Soc.* **39**, 105 (1965)
- [130] J. L. Sudmeier, J. L. Evelhoch, N. B.-H. Jonsson, *J. Magn. Res.* **40**, 377 (1980)
- [131] W. W. Bachovchin, J. D. Roberts, *J. Amer. Chem. Soc.* **100**, 8041 (1978)
- [132] W. Lamb, *Phys. Rev.* **60**, 817 (1941)
- [133] A. D. Buckingham, *Can. J. Chem.* **38**, 300 (1960)
- [134] A. L. Allred, E. G. Rochow, *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 5361 (1957)
- [135] M. Karplus, J. A. Pople, *J. Chem. Phys.* **38**, 2803 (1963)
- [136] H. Sterk, H. Holzer, *Org. Magn. Reson.* **6**, 133 (1974)
- [137] A. Perczel, A. G. Császár, *Chem. Eur. J.* **7**, 1069 (2001)
- [138] M. T. S. Amorim, J. R. Ascenso, R. Delgado, J. J. R. Faústo da Silva, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 3449 (1990)
- [139] C. F. G. C. Geraldés, A. D. Sherry, M. Paula M. Marques, M. Carmen Alpoim, S. Cortes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 137 (1991)
- [140] R. F. Jameson, G. Hunter, T. Kiss, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1105 (1980)
- [141] E. Farkas, T. Kiss, B. Kurzak, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1255 (1990)

- [142] M. B. Inoue, P. Oram, M. Inoue, Q. Fernando, *Inorg. Chim. Acta* **232**, 91 (1995)
- [143] A. R. Quirt, J. R. Lyerla (Jr.), I. R. Peat, J. S. Cohen, W. F. Reynolds, M. H. Freedman, *J. Amer. Chem. Soc.* **96**, 570 (1974)
- [144] J. G. Batchelor, J. Feeney, G. C. K. Roberts, *J. Magn. Reson.* **20**, 19 (1975)
- [145] D. L. Rabenstein, T. L. Sayer, *J. Magn. Reson.* **24**, 27 (1976)
- [146] H. L. Surprenant, J. E. Sarneski, R. R. Key, J. T. Byrd, C. N. Reilley, *J. Magn. Reson.* **40**, 231 (1980)
- [147] D. N. Hague, A. D. Moreton, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 265 (1994)
- [148] Z. Glowacki, M. Hoffmann, M. Topolski, J. Rachon, *Phosphor, Sulfur and Silicon*, **60**, 67 (1991)
- [149] R. P. Carter, M. M. Crutchfield, R. R. Irani, *Inorg. Chem.*, **6**, 943 (1967)
- [150] K. Sawada, W. Duan, M. Ono, K. Satoh, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 919 (2000)
- [151] C. F. G. C. Geraldes, A. D. Sherry, W. P. Cacheris, *Inorg. Chem.* **28**, 3336 (1989)
- [152] Yu. M. Polikarpov, F. I. Bel'skii, S. A. Pisareva, M. I. Kabachnik, *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)* **38**, 1945 (1989)
- [153] W. Clegg, P. B. Iveson, J. C. Lockhart, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 3291 (1992)
- [154] J. Rohovec, M. Kyvala, P. Vojtisek, P. Hermann, I. Lukes, *Eur. J. Inorg. Chem.* 195 (2000)
- [155] U. Prior, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1992
- [156] E. Matczak-Jon, B. Kurzak, W. Sawka-Dobrowolska, B. Lejczak, P. Kafarski, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 161 (1998)
- [157] D. L. Rabenstein, S. P. Hari, A. Kaerner, *Anal. Chem.* **69**, 4310 (1997)
- [158] S. Augner, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2002
- [159] C. Uhlemann, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2002
- [160] J. Topping, „*Errors of Observation and Their Treatment*“, 3. Ausgabe, Chapman and Hall, London, 1965, Seiten 20-62.

- [161] S. Libich, D. Rabenstein, *Anal. Chem.* **45** 118 (1973)
- [162] D. Ensor, G. Choppin, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **42** 1477 (1980)
- [163] R. C. Axtmann, W. E. Shuler, B. B. Murray, *J. Phys. Chem.* **64**, 57-61 (1960)
- [164] H. Allgayer, J. Sonnenbichler, W. Kruis, G. Paumgartner, *Arzneimittel-Forschung* **35**, 1457 (1985)
- [165] D. L. Rabenstein, S. V. S. Mariappan, *J. Org. Chem.* **58**, 4487 (1993)
- [166] C. L. Perrin, M. A. Fabian, K. B. Armstrong, *J. Org. Chem.* **59**, 5246 (1994)
- [167] C. L. Perrin, M. A. Fabian, *Anal. Chem.* **68**, 2127 (1996)
- [168] E. Giralt, R. Viladrich, E. Pedrosa, *Org. Magn. Reson.* **21**, 208 (1983)
- [169] T. L. Sayer, D. L. Rabenstein, *Can. J. Chem.* **54**, 3392 (1976)
- [170] F. Göbber, H. Lachmann, *Z. Physiol. Chem.* **359**, 269 (1978)
- [171] H. Lachmann, K. D. Schnackerz, *Org. Magn. Reson.* **22**, 101 (1984)
- [172] K. Sawada, T. Kanda, Y. Naganuma, T. Suzuki, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2257 (1993)
- [173] C. Pfaff, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2002
- [174] C. Uhlemann, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2002
- [175] S. Hermens, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2002
- [176] A. E. Martell, R. J. Motekakis, „*The Determination and Use of Stability Constants*“, VCH Verlag, New York, 1988
- [177] M. Meloun, J. Havel, E. Högfeltdt, „*Computation of Solution Equilibria*“, Ellis Horwood, Chichester, 1988
- [178] D. J. Leggett (ed), „*Computational Methods for the Determination of Formation Constants*“, Plenum Press, New York, 1986
- [179] P. Valkó, S. Vajda, „*Advanced Scientific Computing in BASIC with applications in Chemistry, Biology and Pharmacology*“, Elsevier, Amsterdam, 1989
- [180] P. Gans, „*Data Fitting in the Chemical Sciences*“, Wiley, Chichester, 1992

- [181] M. Meloun, J. Militky, M. Forina, „*Chemometrics for analytical chemistry, Volume 2: PC-Aided Regression and Related Methods*“, Ellis Horwood, New York, 1994
- [182] K. A. Levenberg, *Quart. Appl. Math.* **2**, 164 (1944)
- [183] D. W. Marquardt, *J. Soc. Indust. Appl. Math.* **11**, 431 (1963)
- [184] E. R. Malinowski, D. G. Howery, „*Factor Analysis in Chemistry*“, Wiley & Sons, New York, 1980
- [185] K. Takács-Novák, K. Y. Tam, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**, 1171 (2000)
- [186] J. J. Kankare, *Anal. Chem.* **42**, 1322 (1970)
- [187] A. W. M. Lee, W. F. Chan, F. S. Y. Yuen, C. H. Lo, R. C. K. Chan, Y. Liang, *Anal. Chim. Acta*, **339**, 123 (1997)
- [188] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, B. P. Flannery, „*Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing*“, Cambridge University Press 1992.
- [189] J. A. Nelder, R. Mead, *Comput. J.* **8**, 308 (1965)
- [190] S. N. Deming, S. L. Morgan, *Anal. Chem.* **45**, 278A (1973)
- [191] G. R. Phillips, E. M. Eyring, *Anal. Chem.* **60**, 738 (1988)
- [192] G. E. Efstathiou, T. P. Hadjiioannou, *Anal. Chem.* **54**, 1525 (1982)
- [193] J. S. Alper, R. I. Gelb, *J. Phys. Chem.* **94**, 4747 (1990)
- [194] M. T. Bowser, D. D. Y. Chen, *J. Phys. Chem. A* **102**, 8063 (1998)
- [195] M. T. Bowser, D. D. Y. Chen, *J. Phys. Chem. A* **103**, 197 (1999)
- [196] J. Tellinghuisen, *J. Phys. Chem. A* **104**, 2834 (2000)
- [197] H. Toutenburg, „*Deskriptive Statistik*“, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (2000) Seite 75
- [198] A. Vacca, A. Sabatini, M. A. Gristina, *Coord. Chem. Rev.* **8**, 45 (1972)
- [199] M. Borkovec, G: J. M. Koper, *Anal. Chem.* **72**, 3272 (2000)
- [200] G. Hägele, R. Spiske, H. W. Hoeffken, T. Lenzen, U. Weber, S. Goudetsidis, *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **77**, 262 (1993)

- [201] S. Castellano, A. A. Bothner-By, *J. Chem. Phys.* **41**, 3863 (1964)
- [202] H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, 3. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1992
- [203] J. A. Pople, W. G. Schneider, H. J. Bernstein, „*High resolution Nuclear Magnetic Resonance*“, McGraw-Hill, New York, 1959
- [204] H. S. Gutowsky, D. W. McCall, *Phys. Rev.* **82**, 748 (1951)
- [205] H. S. Gutowsky, D. W. McCall, C. P. Slichter, *J. Chem. Phys.* **21**, 279 (1953)
- [206] P. L. Corio, *Chem. Rev.* **60**, 363 (1960)
- [207] C. Fischer, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1998
- [208] U. Weber, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1993
- [209] K. Mernissi-Arifi, L. Schmitt, G. Schlewer, B. Spiess, *Anal. Chem.* **67**, 2567 (1995)
- [210] J. E. Sarneski, C. N. Reilly, „*The determination of proton binding sites by NMR-titrations*“, in „*Essays on Analytical Chemistry*“, E. Wänninen (Ed.), Pergamon Press, Oxford, 1977, Seite 35
- [211] D. L. Rabenstein, T. L. Sayer, *Anal. Chem.* **48**, 1141 (1976)
- [212] T. Ishimitsu, Y. Fujiwara, S. Hirose, *Talanta* **26**, 67 (1979)
- [213] M. Felemez, P. Bernard, G. Schlewer, B. Spiess, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3156 (2000)
- [214] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **30**, 11 (1959)
- [215] M. Karplus, *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 2870 (1963)
- [216] H. Booth, *Progress in NMR Spectroscopy*, Vol. **5**, Pergamon Press, Oxford, 1969
- [217] C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. de Leeuw, C. Altona, *Tetrahedron* **36**, 2783 (1980)
- [218] W. J. Colucci, S. J. Jungk, R. D. Gandour, *Magn. Reson. Chem.* **23**, 335 (1985)
- [219] W. J. Colucci, R. D. Gandour, E. A. Mooberry, *J. Amer. Chem. Soc.* **108**, 7141 (1986)
- [220] C. Altona, J. H. Ippel, A. J. A. Westra Hoekzema, C. Erkelens, M. Groesbeek, L. A. Donders, *Magn. Reson. Chem.* **27**, 564 (1989)

- [221] C. Altona, R. Francke, R. de Haan, J. H. Ippel, G. J. Daalmans, A. J. A. Westra Hoekzema, J. van Wijk, *Magn. Reson. Chem.* **32**, 670 (1994)
- [222] R. J. Abraham, K. A. McLauchlan, *Mol. Phys.* **5**, 513 (1962)
- [223] K. G. R. Pachler, *Spectrochim. Acta* **20**, 581 (1964)
- [224] K. G. R. Pachler, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1936 (1972)
- [225] P. E. Hansen, J. Feeney, G. C. K. Roberts, *J. Magn. Reson.* **17**, 249 (1975)
- [226] J. Feeney, *J. Magn. Reson.* **21**, 473 (1976)
- [227] V. F. Bystrov, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **10**, 41 (1976)
- [228] R. B. Martin, *J. Phys. Chem.* **83**, 2404 (1979)
- [229] R. J. Abraham, G. Gatti, *J. Chem. Soc. B*, 961 (1969)
- [230] R. J. Abraham, B. D. Hudson, W. A. Thomas, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1635 (1986)
- [231] M. L. Huggins, *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 4123 (1953)
- [232] S. Fujiwara, H. Ishizuka, S. Fudano, *Chem. Letters* 1281 (1974)
- [233] R. Couffignal, H. B. Kagan, F. Mathey, O. Samuel, C. Santini, *C. R. Acad. Sci., Ser. C* **291**, 29 (1980)
- [234] G. Grossmann, R. Lang, G. Ohms, D. Scheller, *Magn. Reson. Chem.* **28**, 500 (1990)
- [235] W.-C. Lin, *J. Chem. Phys.* **50**, 1890 (1969)
- [236] W.-C. Lin, *J. Chem. Phys.* **52**, 2805 (1970)
- [237] W.-C. Lin, *J. Chem. Phys.* **58**, 4971 (1973)
- [238] D. Dolhaine, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1977
- [239] M. Engelhardt, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1986
- [240] G. Hägele, M. Batz, R. Peters, U. Niemeyer, J. Engel, *Z. Arzneimittel-Forschung*, **40** 599 (1990)
- [241] G. Hägele, unveröffentlichte PC-Programme zur Rotamerenanalyse nach Lin (2001)

- [242] W. D. Gwinn, K. S. Pitzer, *J. Chem. Phys.* **16**, 303 (1948)
- [243] V. Tabacik, *Tetrahedron Letters* **5**, 555 (1968)
- [244] V. Tabacik, *Tetrahedron Letters* **5**, 561 (1968)
- [245] Z. Dzakula, W. M. Westler, A. S. Edison, J. L. Markley, *J. Amer. Chem. Soc.* **114**, 6195 (1992)
- [246] Z. Dzakula, M. L. DeRider, J. L. Markley, *J. Amer. Chem. Soc.* **118**, 12796 (1996)
- [247] Z. Dzakula, W. M. Westler, J. L. Markley, *J. Magn. Reson. B* **111**, 109 (1996)
- [248] F. Gregorie, S. H. Wei, E. W. Streed, K. A. Brameld, D. Fort, L. J. Hanely, J. D. Walls, W. A. Goddard, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7537 (1998)
- [249] P. A. Nielsen, P.-O. Norrby, T. Liljefors, N. Rega, V. Barone, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3151 (2000)
- [250] B. Noszál, W. Guo, D. L. Rabenstein, *J. Phys. Chem.* **95**, 9609 (1991)
- [251] B. Noszál, D. Visky, M. Kraszni, *J. Med. Chem.* **43**, 2176 (2000)
- [252] G. Hägele, M. Engelhardt, W. Boenigk, *Simulation und automatisierte Analyse von Kernresonanzspektren*, VCH Verlag, Weinheim, 1987
- [253] R. C. Axtmann, W. E. Shuler, B. B. Murray, *J. Phys. Chem.* **64**, 57 (1960)
- [254] E. R. Caley, R. H. Brundin, *Anal. Chem.* **25**, 142 (1953)
- [255] W. F. Koch, D. L. Biggs, H. Diehl, *Talanta* **22**, 637 (1975)
- [256] C. Tillmann, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2000
- [257] A. De Marco, *J. Magn. Reson.* **26**, 527 (1977)
- [258] D. S. Wishart, B. D. Sykes, *Methods in Enzymol.* **239**, 363 (1994)
- [259] D. I. Hoult, *J. Magn. Reson.* **21**, 337 (1976)
- [260] G. Hägele, R. Spiske, H. W. Höffken, T. Lenzen, U. Weber, S. Goudetsidis, *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **77**, 262 (1993)
- [261] J. Blackburn, M. Jones, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **35**, 1605 (1973)

- [262] D. Perrin, *J. Chem. Soc.* 3120 (1958)
- [263] D. Ensor, G. Choppin, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **42**, 1477 (1980)
- [264] S. Libich, D. Rabenstein *Anal. Chem.* **45** 118 (1973)
- [265] L. Pajdowski und E. John, *Rocz. Chem.* **43** 1125 (1969)
- [266] P. Mastalerz, *Roczniki Chem.* **38**, 61 (1964)
- [267] A. Gaedcke, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1986
- [268] R. C. Gandour, R. L. Schowen (Eds.), *Transitions States of Biochemical Process*, Plenum Press, New York, 1978, Seite 244
- [269] V. Vasilev, G. Zaitseva, N. Tukumova, *Zhur. Neorg. Khim.* **42**, 229 (1997)
- [270] K. Kreidler, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1996
- [271] E. S. Lit, F. K. Mallon, H. Y. Tsai, J. D. Roberts, *J. Amer. Chem. Soc.* **115**, 9563 (1993)
- [272] H. Wiedenfeld, F. Knoch, *Acta Crystallogr. C Cryst. Struct. Comm.* **46**, 1038 (1990)
- [273] H. Kutzke, L. Wiehl, H. Klapper, *Z. Krist.* **209**, 256 (1994)
- [274] W. Sawka-Dobrowolska, T. Glowiak, Z. Siatecki, M. Soroka, *Acta Crystallogr. C*, 453 (1985)
- [275] K. B. Yatsimirskii, L. V. Tsymbal, E. I. Sinyavskaya, G. A. Bukivskaya, I. L. Odinets, R. M. Kalyanova, T. A. Mastryukova, M. I. Kabachnik, *Zh. Neorg. Khim.* **34**, 111 (1989)
- [276] Z. Siatecki, H. Kozlowski, *Org. Magn. Reson.* **14**, 431-433 (1980)
- [277] K. Burger, P. Sipos, M. Véber, I. Horváth, B. Noszál, M. Löw, *Inorg. Chimica Acta* **152**, 233 (1988)
- [278] R. Hancock, *J. Chem. Soc. Dalton* 416 (1980)
- [279] M. Wozniak, G. Nowogrocki, *Talanta* **26**, 1135 (1979)
- [280] K. A. Burkov, G. Grossmann, G. Hägele, L. A. Myund, C. Verwey, S. Hermens, S. M. Arat-ool, Publikation in Vorbereitung

- [281] J. Rohovec, I. Lukes, P. Vojtisek *J. Chem. Soc. Dalton* 2685 (1996)
- [282] F. Belski, I. Goryunova, *Izv. Akad. Nauk. USSR* **4** 103 (1982)
- [283] K. Sawada, T. Araki, T. Suzuki, *Inorg. Chem.* **26**, 1199 (1987)
- [284] M. Jezowska-Bojczuk, T. Kiss, H. Kozlowski, *J. Chem. Soc. Dalton* 811 (1994)
- [285] D. Rabenstein, R. Ozubko, S. Libich, *J. Coord. Chem.* **3**, 263 (1974)
- [286] I. Sóvágó, T. Kiss, A. Gergely, *Pure & Appl. Chem.* **65**, 1029 (1993)
- [287] P. Jose, L. M. Pant, *Acta Crystallogr.* **18**, 806 (1965)
- [288] E. Papavinasam, S. Natarajan, N. C. Shivaprakash, *Int. J. Pept. Protein Res.* **28**, 525 (1986)
- [289] T. B. Pavia, M. Tominaga, A. C. M. Pavia, *J. Med. Chem.* **13**, 689 (1970)
- [290] D. L. Rabenstein, D. A. Keire, in *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, D. Dolphin, R. Poulson, O. Avramovic (Eds.), Wiley, New York, 1989
- [291] G. Brookes, L. Pettit, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2112 (1975)
- [292] E. Farkas, I. Sóvágó, A. Gergely, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1545 (1983)
- [293] Y. Yamada, N. Nakasuka, M. Tanaka, *Inorg. Chim. Acta* **185**, 49 (1991)
- [294] P. Gockel, H. Vahrenkamp, A. D. Zuberbühler, *Helv. Chim. Acta* **76**, 511 (1993)
- [295] P. G. Pietta, A. Chersi, *Gazz. Chim. Ital.* **98**, 1503 (1968)
- [296] G. Brookes, L. Pettit, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2112 (1975)
- [297] S. Sjöberg, *Pure & Appl. Chem.* **69**, 1549 (1997)
- [298] Y. Barrans, A. M. Bellocq, M. Cortrait, H. Richard, *J. Mol. Struct.* **30**, 225 (1976)
- [299] H. Itoh, T. Yamane, T. Ashida, M. Kakudo, *Acta Crystallogr. Sect. B* **33**, 2959 (1977)

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 Titrations und Messungen, sowie alle Grafiken wurden auf einer Compact Disk gesichert und dem Arbeitsgruppenleiter übergeben.

Die übergebene Compact Disk enthält auch die entwickelten ausführbaren Programme sowie deren Quellen. Quellen und ausführbare Programme wurden durch Neukompilierung in Gegenwart von Prof. Dr. Gerhard Hägele verifiziert.

Die Funktionstüchtigkeit der Programme wird durch den Betreuer der Arbeit bestätigt.

Düsseldorf, den 7. Mai 2002

Zoltán Szakács

Prof. Dr. Gerhard Hägele