

Institut für Pharmazeutische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany

Ermittlung der Dissoziationskonstanten aminomethylierter Phenole mittels UV-spektrometrischer Titration

N. WEBER UND J. LESSEL

Die Dissoziationskonstanten einfach und zweifach aminomethylierter mehrwertiger Phenole wurden mittels UV-spektrometrischer Titration bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der nichtlinearen Regression; die Bestimmtheitsmaße sprechen für eine hohe Übereinstimmung der errechneten mit den experimentellen Daten.

Determination of dissociation constants of aminomethyl phenols by UV spectroscopic titration

Dissociation constants of phenoles aminomethylated once or twice were determined using UV spectrometric titration. Pk_a values were computed by non linear regression; correlation coefficients show that experimental data and calculated curves fit well.

1. Einleitung

Penicilline **I** werden durch bakterielle Enzyme, die sog. Penicillinasen, zu den antibiotisch inaktiven Penicillosäuren **II** abgebaut (Schema). Dies repräsentiert einen weit verbreiteten und wirkungsvollen Abwehrmechanismus der lactamaseproduzierenden Mikroorganismen und ist für deren Resistenz gegen diese β -Lactamantibiotika verantwortlich [1, 2]. Neben „kleinen“ Nucleophilen wie Imidazol [3] und Zuckern [4], die in stöchiometrischen Mengen den β -Lactamring von Penicillinen **I** spalten, wurden als in katalytischen Mengen wirksame Modellsubstanzen aminomethylierte Phenole **III** eingesetzt [5]. Eine systematische Untersuchung des Abbaus einiger Penicilline durch diese phenolischen Mannichverbindungen **III** sollte den Mechanismus der Lactamspaltung klären und auch Analogien zu den Penicilline hydrolysierenden Enzymen aufzeigen [6, 7].

Zunächst waren die Dissoziationskonstanten der Modellsubstanzen **III** zu bestimmen, um den Einfluss der Basizität auf die Katalyse zu ermitteln. Außerdem dienen die pK_S -Werte der Berechnung der bei bestimmten pH-Werten vorliegenden Anteile an definierten Dissoziationszuständen, beispielsweise der katalytisch aktiven Spezies.

2. Untersuchungen und Ergebnisse

2.1. Darstellung der Modellsubstanzen III [7]

Aus mehrwertigen Phenolen und sekundären Aminen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Mannichverbindungen **1–17** synthetisiert [7]. Als Phenole fanden neben Brenzkatechin dessen 4-Methyl- und 4-*tert*-Butylderivat sowie 2,3-Naphthalindiol und Pyrogallol Verwendung, als Aminkomponenten dienten acyclische Amine (Dimethylamin, Diethylamin) und Pyrrolidin, Piperidin, Hexahydroazepin, α -Pipicolin sowie Morpholin. Somit standen neben monosubstituierten Verbindungen **15–17** die Disubstitutionsprodukte **1–14** zur Verfügung [7]. Die Verbindungen wurden mit den üblichen Methoden charakterisiert.

2.2. UV-spektrometrische Titration

Die UV-spektroskopische Bestimmung der Dissoziationskonstanten zeichnet sich gegenüber der früher üblichen potenziometrischen Titration durch größere Genauigkeit bei gleichzeitig geringerem Substanzbedarf aus [8]. Voraussetzung ist eine Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften vom Dissoziationszustand der zu untersuchen

den Substanzen. Bei dem Verfahren wird mit Hilfe des Titranten schrittweise der pH-Wert der Substanzlösung als unabhängige Variable eingestellt und die Absorption der Lösung als abhängige Variable registriert. Bei sich unterscheidenden molaren Absorptionskoeffizienten der beteiligten Spezies ergibt die Auftragung der gemessenen Absorptionen gegen die zugehörigen pH-Werte eine Titrationskurve, deren Wendepunkte die pK_S -Werte darstellen.

Zunächst waren für jede Substanz Wellenlängen zu ermitteln, bei denen sich die molaren Extinktionskoeffizienten der korrespondierenden Säure-Base-Paare ausreichend unterscheiden, um so die pK_S -Werte als Wendepunkte der Titrationskurve ermitteln zu können. Hierzu wurden UV-Spektren von Lösungen der Substanzen bei unterschiedlichen pH-Werten registriert. In Abb. 1 ist dies für Verbindung **2** dargestellt; hier wären die Bereiche um 310 nm und um 280 nm geeignet.

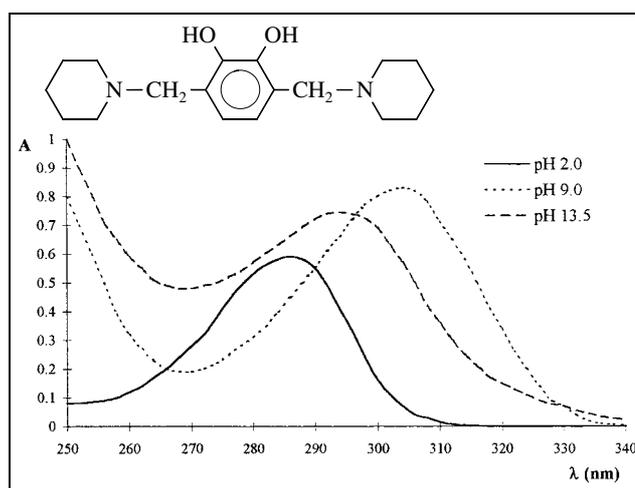


Abb. 1: UV-Spektren von **2**

Schema

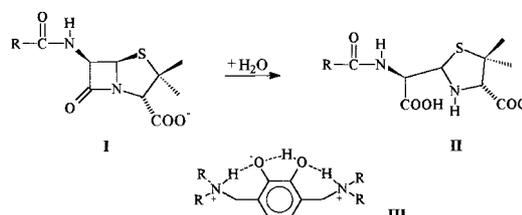
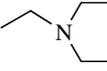
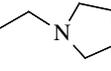
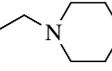
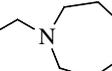
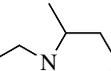
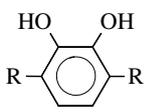
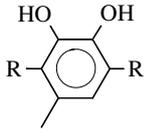
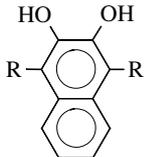
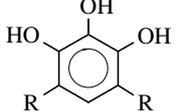
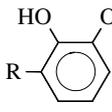
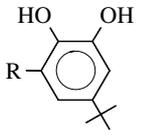


Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Modellsubstanzen III

R =							
	1		2	3			4
							5
	6	7	8	9	10	11	
				12	13		14
							15
				16			17

Bei Auftragung der bei den einzelnen Messwellenlängen erhaltenen Absorptionen gegen die zugehörigen pH-Werte erhält man einen Satz von Titrationskurven; deren sich entsprechende Wendepunkte sind dem gleichen pH-Wert

zuzuordnen, der den pK_S -Wert repräsentiert (Abb. 2, 3). Eine graphische Wendepunktanalyse ist nur zulässig, wenn sich die pK_S -Werte um mindestens 3,5 Einheiten unterscheiden, dann liegt nämlich eine Folge von einstufigen

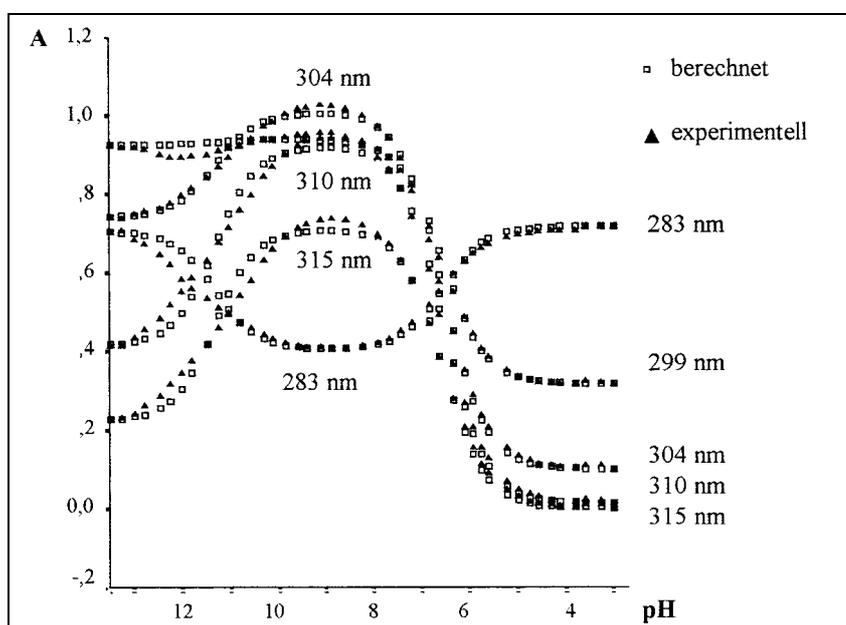
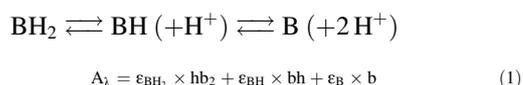


Abb. 2:
Experimentelle und für zweistufige Dissoziation berechnete Titrationskurven für **2**, $r^2 = 0,995$ ($pK_{S1} = 6,53$, $pK_{S2} = 11,32$)

Dissoziationssystemen vor [8]. Da hier aufgrund geringerer Differenzen der pK_S -Werte Überlappungen der Kurvenabschnitte zu erwarten waren, wurde eine rechnerische Auswertung bevorzugt.

Zu berücksichtigen ist, dass die monosubstituierten Modellspezies **15–17** drei dissoziierbare Gruppen aufweisen, nämlich die beiden phenolischen OH-Gruppen und die protonierte tertiäre Aminfunktion. Die disubstituierten Verbindungen **1–11** enthalten einen zusätzlichen Aminstickstoff und die Pyrogallolderivate **12–14** eine weitere Hydroxylgruppe. Die Dissoziation der zweiten bzw. dritten phenolischen Gruppe kann aber sicherlich im wässrigen Milieu nicht mehr vollständig erfasst werden, so dass hier zwei- bzw. dreistufige Dissoziationssysteme vorliegen sollten. Bisher wurden allerdings auch für disubstituierte Verbindungen wie **2** nur zwei pK_S -Werte beschrieben [9].

Die Absorption A_λ der Lösung eines zweistufigen Dissoziationssystems ergibt sich als Summe der Absorptionen von vollständig protonierter Substanz BH_2 , einfach deprotonierter Spezies BH und vollständig deprotonierter Form B (Gl. 1 [8]). Die Absorption während der Titration ließe sich mit Hilfe von Gl. 2 bei bekannten pK_S -Werten berechnen. Für dreistufige Systeme erweitert sich die Formel gemäß Gleichung 3.



$$A_\lambda = \epsilon_{BH_2} \times hb_2 + \epsilon_{BH} \times bh + \epsilon_B \times b \quad (1)$$

ϵ_{BH_2} = molarer Absorptionskoeffizient der vollständig protonierten Spezies

hb_2 = Konzentration der vollständig protonierten Spezies

$$A_\lambda = b_0 \times \frac{\epsilon_{BH_2} \times h^2 + \epsilon_{BH} \times h \times K_{S1} + \epsilon_B \times K_{S1} \times K_{S2}}{h^2 + K_{S1} \times h + K_{S1} \times K_{S2}} \quad (2)$$

$A_\lambda = b_0$

$$\times \frac{\epsilon_{BH_2} \times h^3 + \epsilon_{BH_2} \times h^2 \times K_{S1} + \epsilon_{BH} \times h \times K_{S1} \times K_{S2} + \epsilon_B \times K_{S1} \times K_{S2} \times K_{S3}}{h^3 + h^2 \times K_{S1} + h \times K_{S1} \times K_{S2} + K_{S1} \times K_{S2} \times K_{S3}} \quad (3)$$

Hier wurde die Auswertung durch nichtlineare Regression mit dem Programm SPSS [10] (Statistical Package for the Social Sciences), Version 7.5.2 d, durchgeführt. Das Programm verlangt neben der zugrundeliegenden mathema-

tischen Formel (Gl. 2 bzw. 3) eine Matrix aus den Absorptionsdaten bei der jeweiligen Wellenlänge und den entsprechenden pH-Werten. Zur simultanen Auswertung der Absorptionsdaten aller Wellenlängen wurde für zweistufige Systeme die „Superformel“ Gl. 4 anstelle von Gl. 2 verwendet.

$$A_\lambda = \frac{b_0 \times \begin{bmatrix} F_{\lambda,1} \times (\epsilon_{BH_{2,\lambda 1}} \times h^2 + \epsilon_{BH_{\lambda 1}} \times h \times K_{S1} + \epsilon_{B_{\lambda 1}} \times K_{S1} \times K_{S2}) \\ + F_{\lambda,2} \times (\epsilon_{BH_{2,\lambda 2}} \times h^2 + \epsilon_{BH_{\lambda 2}} \times h \times K_{S1} + \epsilon_{B_{\lambda 2}} \times K_{S1} \times K_{S2}) \\ + F_{\lambda,3} \times (\epsilon_{BH_{2,\lambda 3}} \times h^2 + \epsilon_{BH_{\lambda 3}} \times h \times K_{S1} + \epsilon_{B_{\lambda 3}} \times K_{S1} \times K_{S2}) \end{bmatrix}}{h^2 + K_{S1} \times h + K_{S1} \times K_{S2}} \quad (4)$$

Hier wird für die Booleschen Faktoren $F_{\lambda,i}$ für die jeweilige Messwellenlänge der Wert eins eingesetzt, für die anderen Wellenlängen beträgt er null. Die Extinktionskoeffizienten der vollständig protonierten bzw. deprotonierten Spezies (ϵ_{BH_2} und ϵ_B für zweistufige, ϵ_{BH_3} und ϵ_B für dreistufige Systeme) sind aus den Absorptionen in stark saurem bzw. stark alkalischem Medium direkt zu errechnen. Ausgehend von Schätzwerten für die Extinktionskoeffizienten der Ampholyte (d.h. ϵ_{BH} für einstufige und zusätzlich ϵ_{BH_2} für zweistufige Systeme) sowie für die unbekannteren pK_S -Werte optimiert das Programm in Iterationen diese Parameter, wobei die berechnete Kurve an die experimentellen Daten angepasst wird.

3. Diskussion

Die Daten der monosubstituierten Substanzen **15–17** wurden nach Gleichung 2 bzw. 4 ausgewertet, da hier im wässrigen Milieu nur zwei Dissoziationen möglich sind. Für disubstituierte Verbindungen war zu klären, ob zwei oder drei Dissoziationsstufen erfassbar sind, da in der älteren Literatur für einzelne Substanzen nur zwei pK_S -Werte mittels graphischer Wendepunktanalyse ermittelt worden waren [9]. Deshalb wurden diese Substanzen als zweierwertige sowie auch als dreiwertige Säuren ausgewertet. In Abbildungen 2 und 3 sind die entsprechenden berechneten Titrationskurven den experimentell ermittelten Daten für das Piperidinderivat **2** gegenübergestellt. Man sieht, dass die Auswertung als dreistufiges Dissoziationssystem in Abb. 3 besser übereinstimmende Kurven ergibt. Dies geht auch aus den Werten für die Bestimmtheitsmaße r^2 hervor.

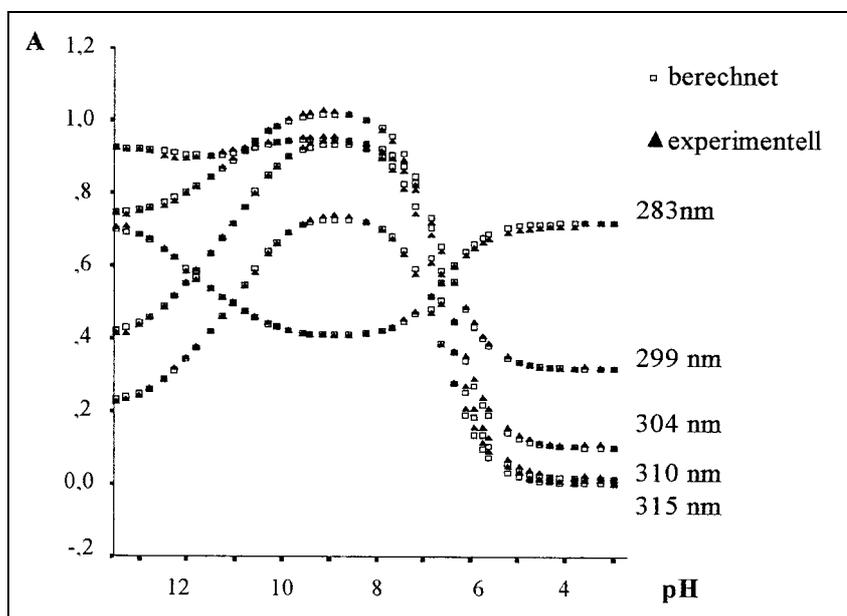


Abb. 3:
Experimentelle und für dreistufige Dissoziation berechnete Titrationskurven für **2**, $r^2 = 0,999$ ($pK_{S1} = 6,57$, $pK_{S2} = 10,76$, $pK_{S3} = 12,14$)

Tabelle 2: pK_S-Werte und Bestimmtheitsmaß r² der Modellsubstanzen

Substanz	pK _{S1}	pK _{S2}	pK _{S3}	r ²
1	6,46	10,93	12,55	0,998
2	6,57	10,76	12,14	0,999
3	6,34	11,10	12,62	0,998
4	5,64	7,49	10,25	1,000
5	5,35	7,48	10,94	0,998
6	5,14	10,71	12,18	0,995
7	4,91	10,92	13,04	0,998
8	5,46	10,46	12,46	0,996
9	5,25	10,12	11,48	0,981
10	4,99	9,30	11,41	0,989
11	4,64	10,95	11,33	0,995
12	6,94	9,97	11,07	0,998
13	6,78	9,56	11,96	0,999
14	6,21	7,30	10,59	0,987
15	6,89	10,14	–	0,987
16	8,30	11,98	–	0,981
17	6,85	10,10	–	0,990

Da pK_{S2} und pK_{S3} hier nur eine Differenz von $\Delta pK_S \approx 1,4$ aufweisen, ist jedoch optisch kein Wendepunkt für pK_{S3} zu erkennen.

In Tabelle 2 sind die ermittelten pK_S-Werte für die Modellsubstanzen III aufgeführt. Das Bestimmtheitsmaß r² ist bei allen Bestimmungen größer als 0,98, die Übereinstimmung der ermittelten Ergebnisse mit den experimentellen Daten also hinreichend gut. Für die disubstituierten Verbindungen 1–14 wurden jeweils drei pK_S-Werte ermittelt, pK_{S1} liegt zwischen 4,6 und 6,9. In der ersten Dissoziationsstufe sind die Dihydroxynaphthalin-Derivate 6–11 stärker acide als die Brenzkatechine 1–5, die Pyrogallolabkömmlinge 12–14 stellen die schwächsten Säuren dar. Lässt man die Morpholinderivate 4, 5 und 14 außer Betracht, so betragen die Werte für pK_{S2} 9,3 bis 11,1, jene für die dritte Dissoziationsstufe liegen zwischen 10,2 und 13. Innerhalb der Gruppen mit gleicher Phenolkomponente weisen die Morpholine erwartungsgemäß jeweils die deutlich kleineren pK_S-Werte auf, dies gilt für alle drei Dissoziationsstufen. Dies trifft auch auf die monosubstituierten Verbindungen 15–17 zu.

Das verwendete UV-spektroskopische Verfahren zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten der untersuchten aminomethylierten Phenole liefert also bei geringem apparativem Aufwand aus statistischer Sicht gute Ergebnisse. Die hohen Bestimmtheitsmaße belegen eine weitgehende Übereinstimmung der errechneten mit den experimentellen Daten.

4. Experimenteller Teil

Die verwendete Apparatur besteht aus einem thermostatisierten Umwälzwasserbad mit Rührereinrichtung, einem Titrationsgefäß mit Argonzuleitung und einem pH-Meter.

6,25 · 10⁻⁴ mol der Substanz werden in 500,0 ml 0,5 M KCl-Lösung unter Argonbegasung gelöst, die Lösung wird auf 30,4 °C temperiert. Unter ständigem Rühren und Argonbegasung werden nacheinander ca. 45 unterschiedliche pH-Werte zwischen pH 2,0 und pH 13,5 durch Zusatz von HCl bzw. NaOH der Konzentrationen 0,05 N, 0,1 N, 1 N, 5 N eingestellt. Für jede Messung werden ca. 2 ml dieser Lösung in eine Quarzküvette überführt. Nach Aufnahme des UV-Spektrums (Perkin-Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda 16) bzw. Messung der Absorptionen bei den ausgewählten Wellenlängen werden Spül- und Messlösung in das Titrationsgefäß zurückgegeben.

Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie für die Unterstützung der Arbeit.

Literatur

- 1 Neu, H. C.: *Science* **257**, 1064 (1992)
- 2 Knowles, J. R.: *Acc. Chem. Res.* **18**, 97 (1985)
- 3 Bundgaard, H.: *J. Pharm. Pharmacol.* **24**, 985 (1972)
- 4 Bundgaard, H.; Larsen, C.: *Int. J. Pharmac.* **1**, 95 (1978)
- 5 Schwartz, M. A.; in: Hamilton-Miller, J. M. T.; Smith, J. T. (Hrsg.): *Beta-Lactamases*, S. 51, Academic Press, London 1979
- 6 Weber, N.: Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1999)
- 7 Latzel, U.: Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1998)
- 8 Polster, J.; Lachmann, H.: *Spectrometric Titrations*, Verlag Chemie, Weinheim 1989
- 9 Kinget, R. D.; Schwartz, M. A.: *J. Pharm. Sci.* **58**, 1102 (1969)
- 10 Nie, N. H.; Hull, C. H.: *SPSS 9*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1983

Eingegangen am 3. August 1999
Angenommen am 15. Oktober 1999

Priv.-Doz. Dr. J. Lessel
Institut für Pharm. Chemie
Heinrich-Heine-Universität
Universitätsstr. 1
D-40225 Düsseldorf