

3',4'-Dihydroxy-3-benzoyl-flavon (4)

Aus 9 wurde durch Oxidation mit Selendioxid nach⁵⁾ 8 dargestellt, das entsprechend der für 7 angegebenen Vorschrift, jedoch mit kürzerer Reaktionszeit (1 Std. bei - 50 bis - 60°), entmethylt wurde. Schwachgelbe Nadeln (aus Äthanol), Schmp. 247 - 249° (Zers.), Ausb. 93 %. UV (Methanol): λ_{max} : 252, 295 (s), 340 nm, IR (KBr): $\nu_{\text{C=O}}$: 1650/cm.

$\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{O}_5$ (358,3)

Ber.: C 73,74 H 3,94
Gef.: C 73,39 H 4,32

Verbindung 10:

10 g 8 wurden in einem Gemisch von 70 ml Acetanhydrid, 135 ml Eisessig und 100 ml Jodwasserstoffsäure ($d = 1,7$) so unter Rückfluß gekocht, daß das gebildete Methyljodid und z.T. das Lösungsmittel abdestillierten. Nach 1 Std. wurde in 10proz. Natriumhydrogensulfidlösung eingegossen, der Niederschlag aus Dimethylformamid mit Wasser umgefällt und aus einem Pyridin-Äthanol-Gemisch umkristallisiert. Eine weitere Reinigung erfolgte über das Diacetylderivat.

$\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{O}_4$

Ber.: C 77,26 H 4,13 Mol.-Gew. 342,3
Gef.: C 76,67 H 4,36 Mol.-Gew. 342 (ms).

Darstellung von Acetylderivaten:

Die Substanzen wurden mit wasserfreiem Natriumacetat und Acetanhydrid (im Verhältnis 1 : 10) in großem Überschuß 1 Std. gekocht, dann mit viel Wasser verdünnt und der Niederschlag aus Alkohol umkristallisiert. 3',4'-Diacetoxy-3-benzoyl-flavon: Schmp. 174°, Diacetylderivat von 10: Schmp. 228 - 229°.

Anschrift: Prof. Dr. H. Loth, 66 Saarbrücken, Im Stadtwald

[Ph 163]

B.C. Lippold und I. Jaeger

Stabilität sowie Dissoziationskonstanten von L-Dopa und α -L-Methyldopa

Aus der pharmazeutisch-technologischen Abteilung am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München
(Eingegangen am 16. März 1972)

L-Dopa und α -L-Methyldopa werden in alkalischer Lösung oxidativ zersetzt. Zunahme des Sauerstoffangebotes und des pH-Wertes sowie Verringerung der Anfangskonzentration beschleunigen den Reaktionsablauf. Die pK_s -Werte für L-Dopa sind 2,3 bzw. 9,0 bzw. 10,2 bzw. 12,5; für α -L-Methyldopa 2,25 bzw. 9,0 bzw. 10,35 bzw. 12,6.

Stability and Dissociation Constants of L-Dopa and α -L-Methylropa

L-Dopa and α -L-methylropa are oxidized in alkaline solution. The reaction rate increases with increasing supply of oxygen, increasing pH, but decreasing concentration of starting material. The pK_a -values of L-dopa are 2.3, 9.0, 10.2, and 12.5, of α -L-methylropa 2.25, 9.0, 10.35, and 12.6.

Die orale Applikation von L-Dopa [Levodopum, (-)- β -(3,4-Dihydroxyphenyl)-L-alanin] und α -L-Methylropa [Methylropum, (-)- β -(3,4-Dihydroxyphenyl)- α -methyl-L-alanin] erfordert wesentlich höhere Dosen als parenterale Gaben dieser Arzneisubstanzen, um vergleichbare therapeutische Effekte zu erzielen¹⁻⁷. Pharmakokinetische Untersuchungen mit ¹⁴C-markierten Präparaten zeigen, daß im Falle von L-Dopa zwar im Harn bis zu 90 % die Radioaktivität der applizierten Dosis meßbar ist, daß aber nur sehr geringe Mengen (15 – 30 %) an unverändertem Arzneistoff in die Blutbahn gelangen^{2,9}. Enzymatischer Abbau im Gastrointestinaltrakt und bei der ersten Leberpassage^{2,5,9} sowie nichtenzymatische Zersetzung wie Decarboxylierung, Desaminierung^{10,11,12} und Oxidation^{9,10,11,13,14} dürften für diese Befunde verantwortlich zu machen sein. Im Falle von α -L-Methylropa dagegen wurden nach oralen Gaben nur zwischen ca. 40 und 50 % der markierten Substanz resorbiert^{3,6,8}, wobei allerdings die Umwandlung zu Sekundärprodukten wesentlich geringer zu sein scheint⁶.

Biopharmazeutische Maßnahmen, etwa Entwicklung spezieller Arzneiformen mit stabilisierendem bzw. resorptionsverbesserndem Effekt, könnten die Verfügbarkeit von oral appliziertem L-Dopa und α -L-Methylropa verbessern. Solche Maßnahmen setzen Kenntnis nicht nur der pharmakokinetischen Parameter, sondern auch der

- 1 Council on Drugs (Am. Med. Assoc.), J. Amer. Med. Assoc. 215, 1969 (1971).
- 2 C.B. Coutinho, H.S. Spiegel, S.A. Kaplan, M. Yu, R.P. Christian, J.J. Carbone, J. Symington, J.A. Cheripko, M. Lewis, A. Tonchen und T. Crews, J. pharmac. Sci, 60, 1014 (1971).
- 3 B. Duhm, W. Maul, H. Medenwald, K. Patschke und L.A. Wegner, Z. Naturforsch. 20b, 434 (1965).
- 4 L. Heilmeyer und H.J. Holtmeier (Herg.) „Therapie des Bluthochdrucks“ (Symp. Univ. Freiburg 1963), Verl. für Gesamtmedizin, Berlin 1963
- 5 A. Pletscher, G. Bartholini, K.F. Gey und A. Jenni, Schweiz. med. Wschr. 100, 797 (1970).
- 6 C.A. Stone und C.C. Porter, Advanc. Drug. Res. 4, 71 (1967).
- 7 H.E. Kaeser, D. Ferel und P. Wurmser, Schweiz. med. Wschr. 100, 1 (1970).
- 8 R.P. Buhs, J.L. Beck, O.C. Speth, J.L. Smith, N.R. Trenner, P.J. Cannon und J.H. Laragh, J. Pharmacol. exp'tl. Therap. 143, 205 (1964).
- 9 J.R. Bianchine, L.R. Calimlim, J.P. Morgan, C.A. Dujuvne und L. Lasagna, Annal. N. Y. Acad. Sci. 179, 126 (1971).
- 10 B. Bloch und F. Schaaf, Biochem. Z. 162, 181 (1926).
- 11 C. Monder, J.N. Williams und H.A. Waisman, Arch. Biochem. Biophys. 72, 255 (1957).
- 12 H.W. Vogel, Naturwissenschaften 56, 462 (1969).
- 13 J.D. Bu'Lock und J. Harley-Mason, J. chem. Soc. London 1951, 712.
- 14 R.A. Heacock, Chem. Rev. 59, 181 (1959).

physikalisch-chemischen Eigenschaften voraus¹⁵⁾. In diesem Zusammenhang werden in der vorliegenden Arbeit Stabilitäts- und Dissoziationsverhalten dieser Substanzen untersucht.

Untersuchungen zur Stabilität

Abweichend von anderen Befunden¹⁶⁾ zeigen in den vorliegenden Untersuchungen stark saure Lösungen (0,1 n HCl) von L-Dopa und α -L-Methyl-dopa über mehrere Tage bei 20° konstante Absorption im Spektralbereich von 220 bis 350 nm. In annähernd neutralem Milieu (pH 6,2) ist ebenfalls bis zu 50 Std. keine signifikante Änderung der UV-Absorption festzustellen. Dagegen zeigen in schwach alkalischer Lösung (Phosphatpuffer pH 8,0; Konzentrationen um $1 \cdot 10^{-4}$ Mol./l) die in Abhängigkeit von der Zeit registrierten Spektren ausgeprägte Instabilität an (Abb. 1, L-Dopa). Dabei erhöht sich die Extinktion im gesamten Spektralbereich, Maximum und Minimum werden zu höheren Wellenlängen verschoben, und ein Plateau bildet sich aus. Parallel dazu ist nach 3 bis 5 Std. beginnende Rosafärbung festzustellen, die allmählich in violettbraun übergeht. Diese Erscheinungen sind auf die unter Sauerstoffverbrauch ablaufende Bildung von L-Dopachinon, L-Dopachrom (bzw. der entsprechenden Methyl-derivate) und anderer Produkte zurückzuführen, deren vollständige Oxidation zu den Melaninen führt^{10,11,14,17,18)}. Der Reaktionsablauf ist wesentlich langsamer in einer fünfzehnfach konzentrierten Lösung (Abb. 2). Diese Befunde stehen nur scheinbar im Widerspruch zu den Untersuchungsergebnissen von Monder und Mitarb.¹¹⁾, die mit steigender Konzentration (bis zu einem Grenzwert von ca. $7 \cdot 10^{-3}$ Mol./l) eine Beschleunigung der Oxidation von D,L-Dopa feststellen. Der Widerspruch ist durch unterschiedliches Sauerstoffangebot zu erklären.

Bei der konzentrierten Lösung (Abb. 2) handelt es sich um ein ruhendes System. Die Oberfläche der Lösung wird nur durch die Probenentnahme (je 0,3 ml) leicht bewegt, die Probe selbst nach spektrophotometrischer Analyse verworfen. Das Sauerstoffangebot ist gering. Im Falle der Ansätze mit niedrigen Konzentrationen (Abb. 1) ist durch die Rückgabe der Proben (je 3 ml) und damit starker Bewegung der Oberfläche erleichtertes Nachlösen von Sauerstoff aus der überstehenden Luft möglich: Die umgesetzte Menge pro Zeit erhöht sich. Während im Falle der Untersuchungsergebnisse von Monder u. Mitarb. ausschließlich der Einfluß der Konzentration die Kinetik der Umsetzung bestimmt, ist diese in den Systemen der Abb. 1 u. 2 vom Sauerstoffangebot^{10,11,14)} abhängig.

Das kommt auch dann zum Ausdruck, wenn die oxidative Zersetzung bei unterschiedlichen Konzentrationen, sonst aber gleichen Bedingungen (bewegtes System)

15 B.C. Lippold, Pharmaz. J, 55 (1972).

16 M. Nedergaard, Pharmac. Acta Helvetiae 45, 373 (1970).

17 H.S. Mason und C.I. Wright, J. biol. Chemistry 180, 235 (1949).

18 R.A. Morton „Biochemistry of Quinones“, Academic Press, London 1965, S. 14 f.

verfolgt wird. Die prozentuale Änderung der Absorption bei 280,5 nm im Zeitintervall t=0 bis t=25 Std. ist aus den Daten von Abb. 1 und 3 berechnet:

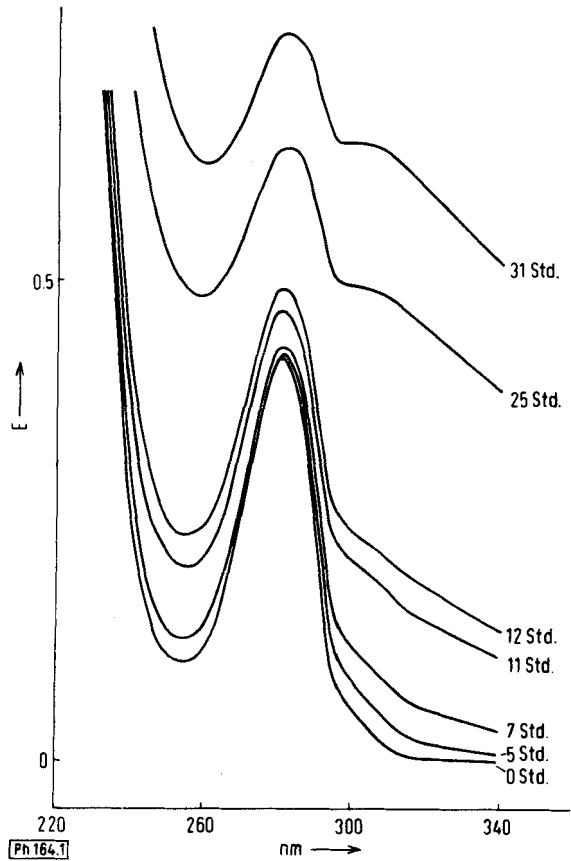


Abb. 1: UV-Absorptionsspektren von L-Dopa in Abhängigkeit von der Zeit bei pH 8,0
 Konzentration: $1,38 \cdot 10^{-4}$ Mol./l, Quarzküvetten 1 cm;
 Phosphatpuffer, Ionenstärke $\mu = 0,1$; Temperatur: $20 \pm 0,5^\circ$

Konzentration der Lösung

Zunahme der Extinktion in %
 nach 25 Std.

L-Dopa:	$1,38 \cdot 10^{-4}$ Mol./l	54
	$9,27 \cdot 10^{-5}$ Mol./l	61
α -L-Methyldopa:	$1,15 \cdot 10^{-4}$ Mol./l	68
	$7,64 \cdot 10^{-5}$ Mol./l	78

Es zeigt sich, daß die Geschwindigkeit der Reaktion mit abnehmender Konzentration steigt. Da pro Zeiteinheit nur begrenzte Sauerstoffmengen verfügbar sind, ist der prozentuale Umsatz in den konzentrierteren Lösungen geringer. In jedem Fall scheint die Zersetzungsreaktion in den

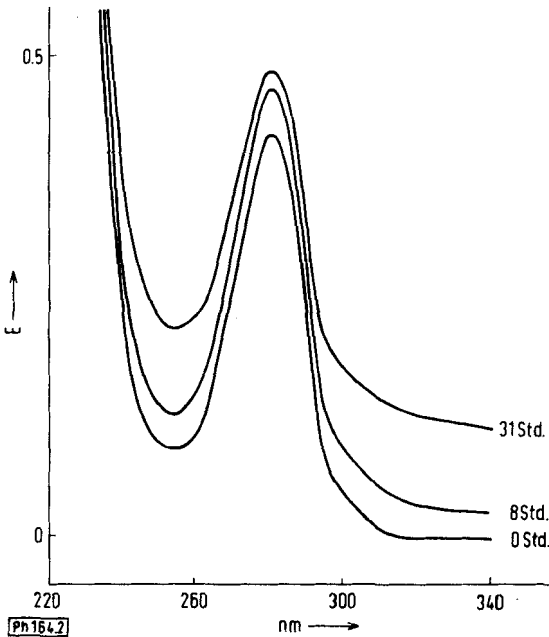


Abb. 2: UV-Absorptionsspektren von L-Dopa in Abhängigkeit von der Zeit bei pH 8,0 Konzentration: $1,52 \cdot 10^{-3}$ Mol./l, gemessen nach Verdünnen 1 + 10 in Quarzküvetten 1 cm; Phosphatpuffer, Ionenstärke $\mu = 0,1$; Temperatur: $20 \pm 0,5^\circ$

ersten Stunden – nach einer charakteristischen Induktionsphase^{11,14)} von 3 bis 4 Std. – nullter Ordnung zu sein (Abb. 3). Dies dürfte auf die Konstanz der pro Zeiteinheit angebotenen Sauerstoffmengen zurückzuführen sein. Im weiteren Verlauf sind anscheinend Folgereaktionen von Intermediärprodukten und Autokatalyse geschwindigkeitsbestimmend, die Reaktionsordnung wird komplex^{10,11)}.

Der Vergleich der prozentualen Extinktionszunahme macht außerdem deutlich, daß α -L-Methyl-dopa hierbei schneller reagiert als L-Dopa. Diese Befunde sind auch visuell zu beobachten: die α -L-Methyl-dopalösungen beginnen sich bereits zwischen 3 und 4 Std., die L-Dopalösungen erst nach 4 bis 5 Std. zu verfärben.

Mit steigendem pH wird die Änderung der Spektren beschleunigt. Dabei verringert sich die Dauer der Induktionsperiode bis zum Verschwinden bei pH 10.

Daraus ergeben sich experimentelle Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten (Abb. 4). Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom pH, bereits von Florence¹⁹⁾ beobachtet, wird dabei durch mehrere Faktoren bestimmt: Oxidation scheint nur dann beschleunigt abzulaufen, wenn mindestens eine phenolische Gruppe dissoziiert¹¹⁾. Eine die Gesamtgeschwindigkeit hemmende Akkumulation von Zwischenprodukten, etwa der entsprechenden Chinone, tritt nicht in stark alkalischem Milieu auf ($\text{pH} = \text{pK}_s$ der Aminogruppe), da

19 G. Florence und S. Bessieres, Bull. Soc. chim. biol. 28, 657 (1946).

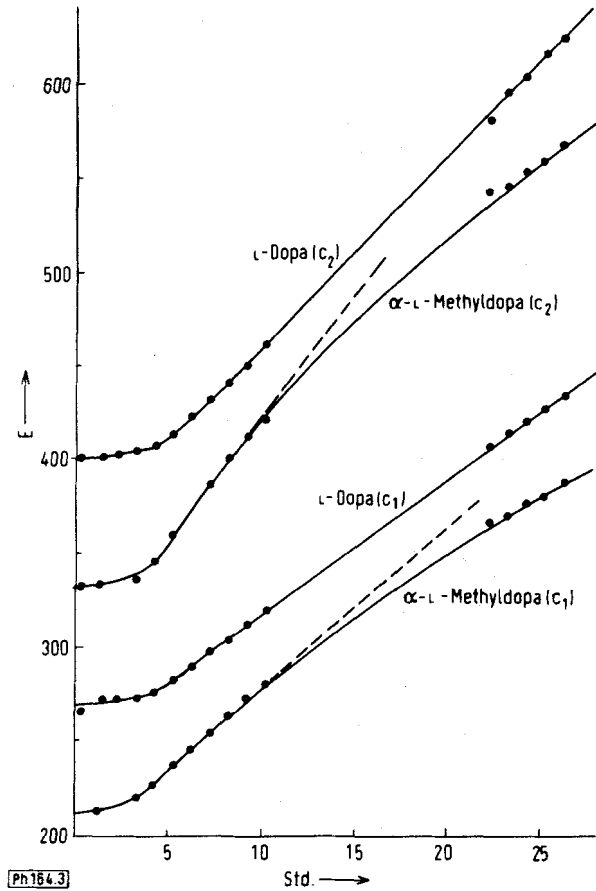


Abb. 3: Extinktion im UV-Maximum von L-Dopa und α -L-Methyldopa: $c_1 = 7,64 \cdot 10^{-5}$, $c_2 = 1,15 \cdot 10^{-4}$ Mol./l Mol./l, Quarzküvetten 1 cm; Phosphatpuffer, Ionenstärke $\mu = 0,1$; Temperatur: $20 \pm 0,5^\circ$

hier die Folgereaktion zu L-Dopa- bzw. α -L-Methyldopachrom rasch abläuft¹³⁾. Schließlich sind katalytisch wirkende Intermediärprodukte gefunden worden, deren Aktivität ebenfalls pH-abhängig zu sein scheint¹¹⁾.

Im Falle von organischen Lösungsmitteln wie n-Octanol und n-Octanol-Puffergemischen*) wird dagegen bis zu 66 Std. keine Änderung der UV-Absorption festgestellt.

Dissoziationskonstanten: Spektrale pK_s -Werte (pK_{s2} und pK_{s4})

Wegen der hohen Zersetzungsgeschwindigkeit und dem Fehlen einer Induktionsperiode in alkalischer Lösung ($pH > 10$) lassen sich auch bei schnellem Arbeiten die ursprünglichen UV-Spektren nicht registrieren. Während bei niedrigen pH-Werten

* 100 T. Octanol : 2 T. 0,1 n HCl bzw. Phosphatpuffer pH 6,2 und 8.

noch isobestische Punkte ausgebildet werden ($\lambda = 220, 230, 265$ und 280 nm für α -L-Methyldopa), sind bei stärker alkalischer Reaktion Abweichungen davon beträchtlich (Abb. 4). Die Bestimmung der pK_s -Werte erfolgt deshalb nach einer spektrophotometrischen Extrapolationsmethode^{15,20}. Die danach für die Zeit $t = 0$ erhaltenen Extinktionen E_0 bei den analytischen Wellenlängen $\lambda = 250,0$ und $300,0$ nm werden gegen den pH-Wert der entsprechenden Lösung aufgetragen (Abb. 5).

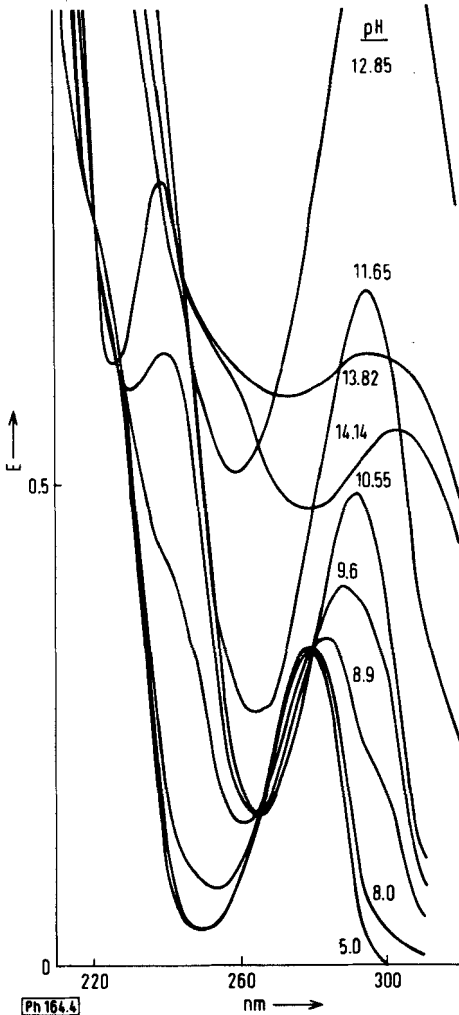


Abb. 4: UV-Absorptionsspektren von α -L-Methyldopa in Abhängigkeit vom pH-Wert. Konzentration: $1,25 \cdot 10^{-4}$ Mol./l, registriert sofort nach Zugabe von $30 \mu\text{l}$ einer $1,26 \cdot 10^{-2}$ Mol./l wässrigen Lösung zu 3 ml Puffer in Quarzküvetten 1 cm; Temperatur: $23 \pm 1^\circ$

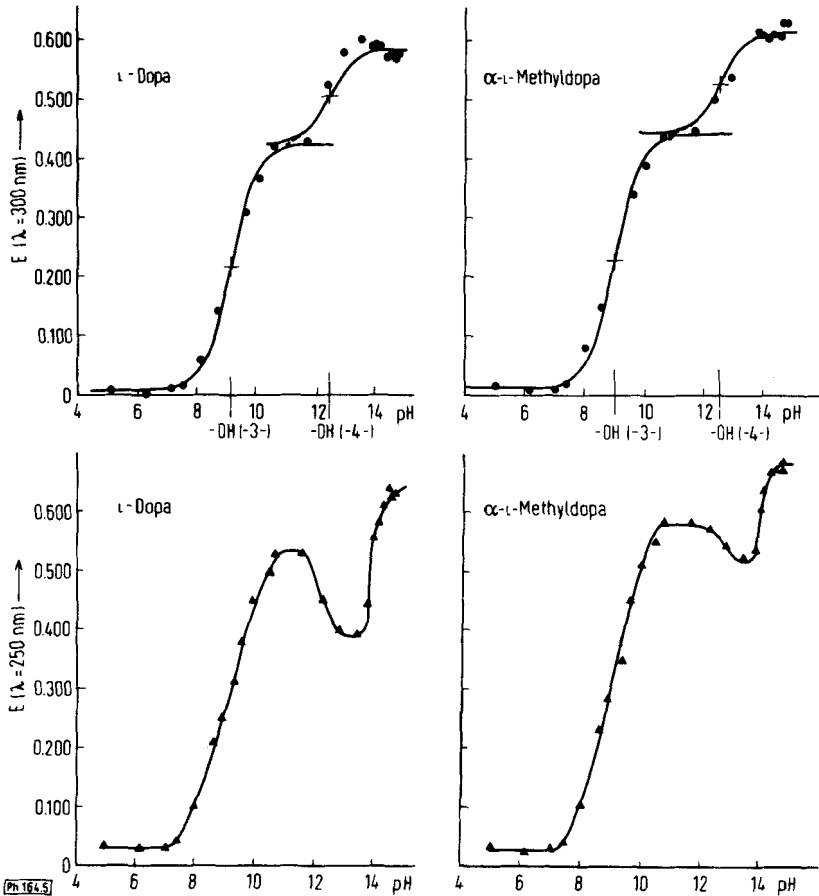


Abb. 5: Spektrophotometrische Titrationskurven für L-Dopa und α -L-Methyldopa
 Konzentration: L-Dopa = $1,26 \cdot 10^{-4}$ Mol./l, α -L-Methyldopa = $1,25 \cdot 10^{-4}$ Mol./l, Quarzküvetten 1 cm; Temperatur: $23 \pm 1^\circ$

Dabei können die experimentellen Werte für $\lambda = 300,0$ nm hinlänglich gut mit einer der Henderson-Hasselbach-Gleichung²¹⁾ entsprechenden Kurve zur Deckung gebracht werden. Die pK_s -Werte, die den beiden phenolischen Gruppen zuzuordnen sind (pK_{s2} und pK_{s4}), lassen sich aus den Wendepunkten der spektrophotometrischen Titrationskurven (Mittel der beiden Asymptotenwerte) bestimmen (Abb. 5 Tab. 1). Die spektrophotometrische Titrationskurve für $\lambda = 250,0$ nm zeichnet sich demgegenüber durch einen unerwarteten Kurvenverlauf aus. Die analytische Wellenlänge von 250,0 nm ist aber nahe dem Absorptionsmaximum des $n-\sigma^*$ -Überganges

21 A.N. Martin, J. Swarbrick und A. Cammarata, „Physical Pharmacy“, Lea und Febiger, Philadelphia 1969, S. 181, 196, 201, 237 ff.

der Aminogruppe bei ca. 195 nm²²⁾. Wie aus Spektren von Phenylalanin bei pH-Werten zwischen 7 und 11,5 hervorgeht, ändert sich die Absorption dieser Verbindung, die keine phenolischen Gruppen besitzt, in diesem pH-Bereich wegen der Protonierung der Aminogruppe²³⁾. Um die pK_s -Werte der phenolischen Gruppen abzuschern, erfolgt deren Ermittlung nicht nur spektrophotometrisch, sondern auch potentiometrisch. Die Bestimmung der pK_s -Werte von Amino- und Carboxygruppe ohne ausgeprägte chromophore Eigenschaften wird ausschließlich potentiometrisch vorgenommen.

Potentiometrische pK_s -Werte

Für die potentiometrische Bestimmung der pK_s -Werte instabiler Verbindungen hat sich besonders die Punkt-für-Punkt Titration^{15,20)} bewährt, durchgeführt entsprechend der Differenzmethode von Parke und Davis²⁴⁾. Aus den Wendepunkten der Differenzkurven können dabei die pK_s -Werte abgelesen werden (Abb. 6, Tab. 1).

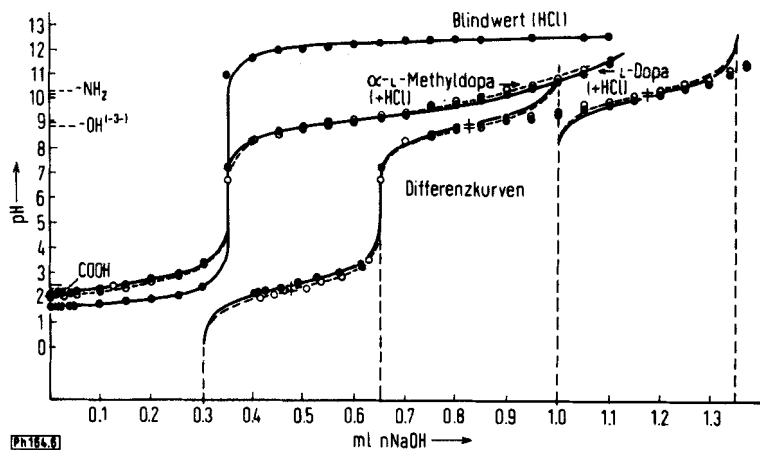


Abb. 6: Potentiometrische Punkt-für-Punkt Titrationskurven für L-Dopa · HCl und α -L-Methyldopa · HCl sowie Blindwert- und Differenzkurve

Konzentration: $5,0 \cdot 10^{-2}$ Mol./l in 0,05 n HCl; Vorlage 25,0 ml, Temperatur: $20 \pm 1^\circ$

Die pK_s -Werte der Carboxy- und OH(-3-)Gruppe sind in Ergänzung dazu durch automatische potentiometrische Titration – ebenfalls nach der Parke-Davis-Methode – ermittelt. Eine Verfälschung der Ergebnisse ist dabei durch Instabilität nicht zu befürchten. Die Kombination der spektralen und potentiometrischen Ti-

22 D.H. Williams und I.A. Fleming, „Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie“, Georg Thieme Verl., Stuttgart 1968, S. 9f.

23 S. Miyamoto und C.L.A. Schmidt, J. biol. Chemistry 90, 165 (1931).

24 T.V. Parke und W.W. Davis, Analyt. Chem. 26, 642 (1954).

tration erlaubt eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen pK_s -Werte zu den einzelnen funktionellen Gruppen (Tab. 1).

Tabelle 1: pK_s -Werte für L-Dopa und α -L-Methyl-dopa

Substanz	pK_s	bei Temp. ° C	pK_{s1}	pK_{s2}	pK_{s3}	pK_{s4}
	aus		-COOH	-OH(-3-)	-NH ₂	-OH(-4-)
L-Dopa	Eigene	20	2,25 ^a	9,0 ^a		
	Unters.	20	2,35 ^b	9,0 ^b	10,2 ^b	
		23		9,1 ^c		12,5 ^c
α -L-Methyl- dopa		20	2,3 ^a	9,1 ^a		
		20	2,2 ^b	8,95 ^d	10,35 ^b	
		23		9,0 ^c		12,6 ^c
L-Dopa	Literatur- Angaben:					
	(25)	25	2,3 ^a	8,7 ^a	9,7 ^a	13,4 ^a
	(19)	20–25	2,5 ^d	9,5 ^d	8,0 ^d	11,5 ^d
	(23)	25	2,4	8,7 ^a	9,9 ^a	11,7 ^{a*}
α -L-Methyl- dopa	(26)	25	2,2 ^a	9,2 ^a	10,6 ^a	12 ^a
	(27)	25		9,3 ^c		

a: potentiometrische Titration, b: potentiometrische Punkt-für-Punkt Titration, c: spektrophotometrische Extrapolationsmethode, d: spektrophotometrische Titration, *) D, L-Form

Dabei ist anzunehmen, daß die phenolische Gruppe in 4-Stellung schwächer saure Eigenschaften besitzt als die in 3-Stellung, da Resonanzstabilisierung des Anions durch paraständige die Alkylgruppe eingeschränkt ist.

Die Acidität der Carboxygruppe von α -L-Methyl-dopa scheint nicht signifikant geringer zu sein als die von L-Dopa (Tab. 1), was durch den positiven induktiven Effekt der Methylgruppe an sich zu erwarten wäre. Vergleicht man allerdings die genaueren Werte der automatischen potentiometrischen Titration, so läßt sich ihr Einfluß nachweisen. Bei den Aminogruppen ist die Auswirkung der α -Methylsubstitution dagegen deutlicher festzustellen: α -L-Methyl-dopa besitzt den höheren pK_{s3} , d.h. größere Basizität als L-Dopa. In Tab. 1 sind die in der vorliegenden Arbeit ermittelten pK_s -Werte Literaturangaben gegenübergestellt. Den Abweichungen dürften neben Unterschieden in der Untersuchungstemperatur ungenügende Berücksichtigung der Instabilität zugrunde liegen sowie falsche Zuordnung zu den entsprechenden funktionellen Gruppen.

25 J.E. Gorton und R.F. Jameson, J. chem. Soc. (London) 1968 A, 2615.

26 J. Halmekoski, Farm. Notisb. 11, 259 (1965).

27 J. Halmekoski und S. Lukkari, Farm. Aika-Farm. Notisb. 74, 273 (1965).

Beschreibung der Versuche

Untersuchung der Stabilität

Die Änderung der UV-Absorption in Lösungen von L-Dopa und von α -L-Methyldopa (Konz. siehe Abb.) wird in 0,1 n HCl und in Phosphatpuffer (pH 6,2 und 8,0) bei $20 \pm 0,5^\circ$ im gesamten Spektralbereich oder im Maximum ($\lambda = 280,5$ nm bestimmt*). Nach Entnahme der Proben (3,0 ml bei den Lösungen mit ca. $1 \cdot 10^{-4}$ Mol/l; 0,3 ml im Falle der Lösungen mit $1,52 \cdot 10^{-3}$ Mol/l, dabei Verdünnung 1 + 10) aus den Ansätzen (30,0 ml in verschlossenen Meßkölbchen mit 50 ml Fassungsvermögen) erfolgt deren Rückgabe nur bei den verd. Lösungen.

Bestimmung der pK_s -Werte

1. Spektralphotometrische Extrapolationsmethode

0,025 bzw. 0,030 ml einer wäßrigen Lösung von L-Dopa bzw. α -L-Methyldopa ($1,52 \cdot 10^{-2}$ bzw. $1,26 \cdot 10^{-2}$ Mol/l) werden mit einer Mikrospritze direkt in 1 cm Quarzküvetten zu 3,0 ml HCl- bzw. Puffer-, bzw. NaOH-Lösung** gegeben (Konz.: $1,26 \cdot 10^{-4}$ bzw. $1,25 \cdot 10^{-4}$ Mol/l). Nach sofortigen Durchmischen wird die sich mit der Zeit ändernde Extinktion bei 250,0 nm (im zweiten Versuch bei 300,0 nm) automatisch registriert*) (Abb. 7). Die Bestimmung des Zeitintervalls zwischen Reaktionsanfang (Mischen der Lösung, $t = 0$) und Beginn der automatischen Registrierung erlaubt die Extrapolation der kinetischen Extinktionskurve zu E_0 (E zur Zeit $t = 0$) (Abb. 7). Mit diesen E_0 -Werten sind die spektralen Titrationskurven (Abb. 5) erstellt.

2. Potentiometrische Titration

Eine salzsaure, stabile Lösung der Substanz (25,0 ml; $5,0 \cdot 10^{-2}$ Mol/l an L-Dopa bzw. α -L-Methyldopa, gelöst in 0,05 n HCl) wird mit n NaOH bei $20 \pm 1^\circ$ titriert[†]). (Hauptversuch). Als Blindwert dient die Titration der gleichen HCl ohne Substanz. Die Volumendifferenzen aus Haupt- und Blindversuch ergeben die Differenzkurven, an deren Wendepunkt die pK_s -Werte abgelesen werden^{15,20,24}).

3. Potentiometrische Punkt-für-Punkt-Titration

Es werden 7,0 ml Proben der gleichen Lösung wie für die automatische potentiometrische Titration verwendet, jeweils ansteigende Mengen an n NaOH zugesetzt, und der pH-Wert sofort nach Mischen bestimmt^{††}). Blindwerte sind pH-Messungen in 0,5 n HCl ohne Substanz nach Zugabe von n NaOH entsprechend dem Hauptversuch. Nach Auftragen von gemessenen pH-Werten gegen ml zugesetzte NaOH erhält man 2 Kurven (Abb. 6). Aus deren Differenzkurven werden die pK_s -Werte für die Carboxy-, die Amino- und die erste phenolische Gruppe bestimmt^{15,20,24}) (Tab. 1).

* Spektralphotometer DK 2A (selbstschreibend), Beckman Instruments (München) bzw. PMQ II, C. Zeiss (Oberkochen), Quarzküvetten 1 cm.

** Die pH-Werte der NaOH-Lösungen (Konz. $> 0,5$ n) sind ber. nach $\text{pH} = \text{pK}_w + \log f[\text{OH}^-]$, wobei die Aktivitätskoeffizienten f der Literatur²¹⁾ entnommen sind.

† Automatische Titriereinrichtung Radiometer (Kopenhagen): Titrator TTT 1c, Titrigraph SBR 2c, Autobürette ABU 1b (2,5 ml).

†† pH-Meter Metrohm (Herisau, Schweiz), Einstabelektrode EA 121.

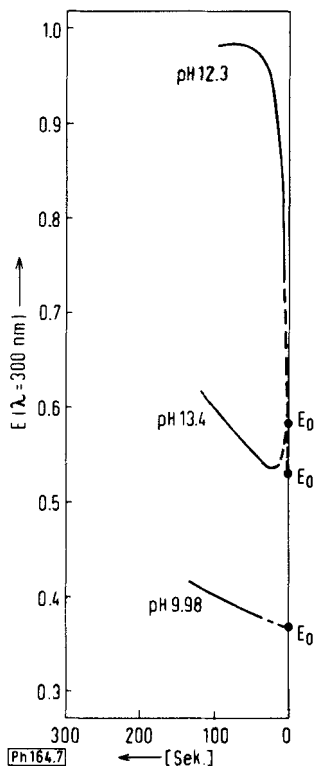


Abb. 7: Extrapolation der Extinktionswerte zu $t = 0$ (E_0) für L-Dopa bei verschiedenen pH-Werten
 Konzentration: $1,26 \cdot 10^{-4}$ Mol./l, Quarzküvetten 1 cm;
 Temperatur: $23 \pm 1^\circ$

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die gewährte Unterstützung der vorliegenden Arbeit, den Firmen Hoffmann LaRoche AG, Grenzach, und Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen, für die freundliche Überlassung von L-Dopa und α -L-Methyldopa.

Anregende Diskussionen mit Frau Professor Dr. E. Ullmann haben unsere Arbeiten gefördert.