

**Bestimmung der kinetischen
Zerfallskonstanten und der kinetischen
Bildungskonstanten ausgewählter MRT-
Kontrastmittel**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes**

von

**Diplom-Chemiker
Michael Weibert**

**Saarbrücken
2019**

Tag des Kolloquiums: 21 November 2019
Dekan: Prof. Dr. G. Kickelbick
Berichterstatter: Prof. Dr. K Hegetschweiler
Priv.-Doz. Dr. R. Kautenburger
Vorsitz: Prof. Dr. G. Kickelbick
Akad. Mitarbeiter: Dr. A. Rammo

Danksagung

Ich bedanke mich bei meiner Familie und meiner Freundin, die mich in allen Phasen dieser Arbeit unterstützt hat.

Abkürzungsverzeichnis

AMWHV	Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung
CEST	Chemical Exchange Saturation Transfer
CT	Computer Tomographie
DEPP	Diethylpiperazin
GMP	Good Manufacturing Practice
ICH	International Council for Harmonisation
ISE	Ionensensitive Elektrode
IQ	Installation Qualification
MRT	Magnetresonanztomographie
MOPS	3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure
NaTPB	Natriumtetraphenylborat
NPOE	2-Nitrophenyl-octyl-ether
OQ	Operational Qualification
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PID-Regler	Proportional-Integral-Derivative Regler
PQ	Performance Qualification
PyTU ₄ NO ₂	N-(2-Pyridyl)-N'-(4-nitrophenyl)thioharnstoff
TMACl	Tetramethylammoniumchlorid
TMAOH	Tetramethylammoniumhydroxid
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
WFI	Wasser für Injektionszwecke

Ligandenverzeichnis

BOPTA	(4S)-4-(4-Ethoxybenzyl)-3,6,9 triazacyclododec-1-yl}tricarboxymethylundecansäure
BT-DO3A	4-[(4-benzothiazol-2-yl-phenylcarbamoyl)-methyl]-7,10-bis- carboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl}essigsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EOB-DTPA	2-[4,10-bis(carboxylatomethyl)-7-(1,3,4-trihydroxybutan- 2-yl)-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl]acetat
HP-DO3A	2-[4,7-bis(carboxylatomethyl)-10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10- tetraazacyclododec-1-yl]acetat

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	1
Abstract	1
Zusammenfassung	2
1. Einleitung	5
1.1 Bildgebende Verfahren in der Medizin.....	5
1.2 Bedeutung von MRT - Kontrastmitteln bei der Bildgebung.....	6
1.3 Nephrogene Systemische Fibrose als Nebenwirkung bei Kontrastmittelgabe.....	8
1.4 Thermodynamische Stabilität der MRT-Kontrastmittel.....	9
1.5 Kinetische Stabilität von MRT-Kontrastmitteln.....	11
1.6 Zielsetzung.....	13
2. Ergebnisse und Diskussion	14
2.1 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten mit der pH-Stat Methode.....	14
2.1.1 Beschreibung der pH-Stat Methode und Auswertung der Messungen.....	14
2.1.2 Qualifizierung vom pH-Stat.....	17
2.1.3 Optimierung der pH-Stat Methode zur Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten.....	22
2.1.4 Validierung der pH-Stat Methode.....	28
2.1.5 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten von GdDTPA.....	34
2.1.6 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten von GdDOTA.....	38
2.1.7 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A.....	40
2.1.8 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A.....	48
2.1.9 Vergleich von kinetischen Zerfallskonstanten k_{obs} der untersuchten Komplexe.....	57
2.1.10 Zerfallsmechanismus der Komplexe Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A.....	59
2.1.11 Vergleich der kinetischen Zerfallsreaktion bei hohen und niedrigen pH-Werten.....	74
2.1.12 In vivo Zerfall der MRT-Kontrastmittel.....	81
2.2 Bestimmung der Bildungskinetik mit einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode.....	83
2.2.1 Beschreibung der Funktionsweise einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode.....	83

2.2.2	Qualifizierung der Gd ³⁺ -sensitiven Elektrode.....	83
2.2.3	Optimierung der Methode zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten mit einer Gd ³⁺ -sensitiven Elektrode.....	84
2.2.4	Beschreibung der optimierten Methode zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten.....	91
2.2.5	Auswertung der Messungen zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten.....	91
2.2.6	Validierung der Methode zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten mit einer Gd ³⁺ -sensitiven Elektrode.....	93
2.2.7	Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten von GdDTPA mit einer Gd ³⁺ -sensitiven Elektrode.....	97
2.2.8	Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten von GdDOTA mit einer Gd ³⁺ -sensitiven Elektrode.....	100
2.2.9	Nachteile der Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten mit einer Gd ³⁺ -sensitiven Elektrode.....	101
3.	Experimenteller Teil.....	102
3.1	Chemikalien, Geräte und Materialien.....	102
3.2	Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd ³⁺ Komplexen.....	104
3.2.1	Isolierung der Liganden aus ihren Kontrastmitteln.....	104
3.2.2	Herstellung der Probelösungen für die Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten mit aufgereinigten Liganden.....	104
3.2.3	Herstellung der Probelösungen für die Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten durch Zugabe einer Injektionslösung.....	104
3.2.4	Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten durch pH-Stat Reaktion mit aufgereinigten Liganden.....	105
3.2.5	Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten durch pH-Stat Titration mit Injektionslösungen.....	106
3.3	Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten von Gd ³⁺ Komplexen.....	107
3.3.1	Synthese von N-(2-Pyridyl)-N'-(4-nitrophenyl)thioharnstoff.....	107
3.3.2	Herstellung der Gd ³⁺ -sensitiven Elektrode.....	107
3.3.3	Herstellung der Probelösungen für die Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten.....	108
3.3.4	Durchführung der Messungen zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten von Gd ³⁺ Komplexen.....	108

3.3.5 Untersuchung von TMAcI als Inertelektrolyt bei Messungen mit einer ISE..108

4 Literaturverzeichnis.....109

5. Anhang.....112

Kurzzusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten von Komplexen GdDTPA (Gadolinium-Diethylentriaminpentaessigsäure) und GdDOTA (Gadolinium-1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) bei 25 °C mit einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode durchgeführt. Weiterhin wurde der Zerfall der Komplexe GdDTPA, GdDOTA, Gd-BT-DO3A (Gadolinium-4-[(4-benzothiazol-2-yl-phenylcarbamoyl)-methyl]-7,10-bis-carboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyc-lododec-1-yl)-essigsäure) und Gd-HP-DO3A (Gadolinium-2-[4,7-bis(carboxylatomethyl)-10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl]acetat) bei 25 °C und 37 °C mit der pH-Stat Methode untersucht. Mit Ausnahme von GdDTPA sind die untersuchten Komplexe momentan als MRT-Kontrastmittel für den Markt zugelassen.

Hierbei fand eine Validierung der verwendeten Methoden zur Bestimmung der Bildungs- und Zerfallskonstanten statt. Dabei konnte der Arbeitsbereich und Limitierung der verwendeten Methoden gezeigt werden.

Die Bestimmung der Zerfallskonstanten von GdDTPA und GdDOTA war mit der pH-Stat Methode nicht möglich. Zerfallskonstanten dieser Komplexe liegen außerhalb des Arbeitsbereiches von der pH-Stat Methode.

Der Zerfall von Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A verläuft säurekatalysiert, wobei der Komplex Gd-HP-BT-DO3A bei vergleichbaren Bedingungen langsamer zerfällt als Gd-HP-DO3A. Sowohl bei 25 °C als auch bei 37 °C werden die Komplexe Gd-BT-DO3A und HP-DO3A zunächst protoniert, anschließend zerfallen die monoprotinierten Komplexe.

Die Bildung vom Komplex GdDTPA im Bereich zwischen pH 4,2 und pH 4,8 verläuft basenkatalysiert, die Bildungsgeschwindigkeit wird mit einem steigendem pH-Wert größer. Der Komplex GdDOTA wird bei pH 7,4 und 25 °C langsamer gebildet als GdDTPA bei pH 4,8 und 25 °C.

Abstract

The purpose of this thesis is a determination of the kinetic formation constants from the complexes GdDTPA (Gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid) and GdDOTA (Gadolinium-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) with a Gadolinium(III)-sensitive electrode. Furthermore, the decay of the complexes GdDTPA, GdDOTA, Gd-BT-DO3A (Gadolinium-4-[(4-benzothiazol-2-yl-phenylcarbamoyl)-methyl]-

7,10-bis-carboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl} acetic acid) and Gd-HP-DO3A (Gadolinium-1,4,7-triscarboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane) at 25 °C and 37 °C was investigated with the pH-Stat method. With the exception of GdDTPA, these complexes are used as MRI contrast agents. Methods for determination of the formation and decay constants, have been validated, so the work area and limitation of the methods could be shown.

It was not possible to investigate the decay of the complexes GdDTPA and GdDOTA with the pH-Stat method. Decay constants of these complexes at 25 °C are outside the working range of the pH-Stat method.

The decay of Gd-BT-DO3A and Gd-HP-DO3A is acid-catalyzed. Under comparable conditions the complex Gd-HP-BT-DO3A decays more slowly than Gd-HP-DO3A.

During the decay of Gd-BT-DO3A and HP-DO3A at 25 °C and 37 °C a protonation of the complexes takes place. After the protonation, in a second reaction step the monoprotonated Gd³⁺ complexes decay.

The formation of GdDOTA and GdDTPA is base catalyzed. Due to structural differences between the ligands DOTA and DTPA, the formation of the complex GdDTPA is faster than the formation of GdDOTA.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bestimmung von kinetischen Zerfallskonstanten der Komplexe GdDTPA (Gadolinium-Diethylentriaminpentaessigsäure) GdDOTA (Gadolinium-1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) Gd-BT-DO3A (Gadolinium-4-[(4-benzothiazol-2-yl-phenylcarbamoyl)-methyl]-7,10-bis-carboxymethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl} essigsäure) und Gd-HP-DO3A (Gadolinium-2-[4,7-bis(carboxylatomethyl)-10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododec-1-yl]acetat) bei 25 °C und 37 °C durchgeführt. Weiterhin wurde die Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten von GdDOTA und GdDTPA durchgeführt. Mit Ausnahme von GdDTPA, sind alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Komplexe momentan als MRT-Kontrastmittel für den Markt zugelassen. Die Genauigkeit, Präzision, Detektionsgrenzen, Quantifikationslimit, Messbereich der Methoden für die Bestimmung der kinetischen Bildungs- und Zerfallskonstanten wurden validiert. Alle Messungen wurden mit qualifiziertem Equipment durchgeführt.

Die Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten wird mit der pH-Stat Methode

durchgeführt. Dabei wird bei niedrigen pH-Werten die Rückkehr der Komplexe in das thermodynamische Gleichgewicht beobachtet, was zum Komplexzerfall führt.

Die kinetischen Zerfallskonstanten von GdDTPA konnten bei 25 °C und pH-Werten tiefer als 2 nicht mit der pH-Stat Methode bestimmt werden.

Innerhalb des Zeitraums von 5 Tagen bei pH 1,5 und 25 °C konnte kein Komplexzerfall von GdDOTA beobachtet werden.

Bei 25 °C wurde der Zerfall von Gd-BT-DO3A im Bereich zwischen pH 2,31 und pH 1,54 untersucht. Die Zerfallskonstanten k_{obs} liegen zwischen $1,62 \cdot 10^{-6}$ /s und $1,99 \cdot 10^{-7}$ /s, dies entspricht Halbwertszeiten von 118,8 h und 967,6 h.

Der Zerfall von Gd-HP-DO3A bei 25 °C wurde im Bereich zwischen pH 1,20 und pH 2,97 untersucht, die Zerfallskonstanten liegen zwischen $3,34 \cdot 10^{-5}$ /s und $3,27 \cdot 10^{-7}$ /s, was den Halbwertszeiten von 5,8 h und 588,8 h entspricht. Bei 37 °C wurde der Zerfall von Gd-BT-DO3A im Bereich zwischen pH 1,14 und pH 2,88 untersucht. Die ermittelten Zerfallskonstanten k_{obs} liegen im Bereich zwischen $1,89 \cdot 10^{-5}$ /s und $2,20 \cdot 10^{-7}$ /s (Halbwertszeiten 10,2 h und 8752 h). Die Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A bei 37 °C liegen zwischen $1,03 \cdot 10^{-4}$ /s und $3,51 \cdot 10^{-6}$ /s, dies entspricht den Halbwertszeiten von 1,9 h und 54,6 h. Die Bestimmung der Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A bei 37 °C wurde im Bereich zwischen pH 1,31 und pH 2,65 durchgeführt.

Der Zerfall von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A verläuft säurekatalysiert und verlangsamt sich mit einem steigenden pH-Wert. Beim Zerfall der Komplexe von Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A im Bereich zwischen pH 1 und pH 3 werden sowohl bei 25 °C als auch bei 37 °C die Komplexe protoniert, anschließend zerfällt der Komplex. Das Verhältnis der protonierten und nicht protonierten Komplexspezies, wird durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschrieben. Die vom pH-Wert unabhängige Zerfallskonstante k_1 , welche den Zerfall eines Komplexes nach der Protonierung beschreibt, wurden anhand experimenteller Daten ermittelt. Die Zerfallskonstante k_1 von Gd-HP-DO3A beträgt bei 25 °C $5,58 \cdot 10^{-4}$ /s und bei 37 °C $2,15 \cdot 10^{-3}$ /s. Die Zerfallskonstante k_1 von Gd-BT-DO3A beträgt bei 25 °C $5,33 \cdot 10^{-5}$ /s und bei 37 °C beträgt die Zerfallskonstante k_1 $2,55 \cdot 10^{-4}$ /s.

Im pH-Bereich, bei welchem im thermodynamischen Gleichgewicht die Liganden HP-DO3A und BT-DO3A nicht vollständig komplexiert sind, findet nicht der gesamte Zerfall unter Bedingungen pseudoerster Ordnung statt. Bei einer Annäherung der Konzentration während des Zerfalls zu den Konzentrationsverhältnissen im thermodynamischen Gleichgewicht findet eine Rückreaktion vom freien Gd^{3+} und dem Liganden zum jeweiligen Komplex statt. Dadurch wird der Komplexzerfall zusätzlich verlangsamt.

Die Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten wurde mit Gd^{3+} sensitiven PVC Membranelektroden durchgeführt, welche für die Messungen speziell hergestellt wurden. Alle Messungen wurden in einem 0,1M KCl Medium durchgeführt. Die Bildung des Komplexes GdDTPA verläuft basenkatalysiert. Zum Ermitteln vom Einfluss des pH-Wertes auf die Komplexbildung, werden die Messungen bei einem konstanten pH-Wert durchgeführt.

Die kinetischen Bildungskonstanten von GdDTPA in DEPP (Diethylpiperazin) gepufferten Lösungen zwischen pH 4,2 und pH 4,8 bei 25 °C liegen im Bereich zwischen 0,198/min und 1,160/min. Bei einem pH von 7,4 und 25 °C beträgt die Bildungskonstante von GdDOTA 0,996/min. Bei pH 7,4 wird für die Pufferung MOPS (3-morpholinopropan-1-sulfonsäure) verwendet.

1. Einleitung

1.1 Bildgebende Verfahren in der Medizin

Nichtinvasive Untersuchungsmethoden spielen eine wichtige Rolle in der medizinischen Diagnostik. Sie können eine Aussage über Struktur, Lage der inneren Organe und Fehlfunktionen im Körper liefern. Der Patient wird dabei nicht durch Operationen belastet. Es werden unterschiedliche physikalische Eigenschaften des Körpers zur Bildgebung ausgenutzt.

Zu den gängigen und häufig eingesetzten bildgebenden Untersuchungsmethoden zählen Röntgendiagnostik, Ultraschall (Sonographie) und MRT (Magnet Resonanz Tomographie). Röntgendiagnostik wie zum Beispiel die Computertomographie (CT) findet eine häufige Anwendung in der medizinischen Diagnostik. Die Methode beruht darauf, dass in verschiedenen Gewebearten abhängig von ihrer Dichte, den Elementen aus welchen das Gewebe aufgebaut ist, und dem Abstand von der Strahlungsquelle die Röntgenstrahlung unterschiedlich stark absorbiert wird.¹ Aufgrund des Einsatzes von ionisierender Strahlung werden Röntgenuntersuchungsmethoden als karzinogen eingestuft.

Ultraschall (Sonographie) beruht darauf, dass sich Schallwellen, abhängig von Gewebeart, verschieden stark ausbreiten, reflektiert oder absorbiert werden.

Der Nachteil von sonographischen Untersuchungsmethoden ist, dass tiefer liegende Gewebeschichten schlecht aufgelöst werden verglichen mit alternativen nicht invasiven bildgebenden Untersuchungsmethoden. Weiterhin erschweren Knochen und gashaltige Organe eine Ausbreitung der Schallwellen.¹

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein häufig eingesetztes Verfahren zur bildlichen Darstellung von inneren Organen. Dabei wird die Relaxationszeit nach Anregung des ^1H Protons an den Wassermolekülen in einem Magnetfeld gemessen. Je nach Gewebe, in dem sich die angeregten Protonen befinden, werden unterschiedliche Relaxationszeiten und die daraus resultierenden Signale erhalten.²

Unterschiedliche Signale können zu einem dreidimensionalen Bild verarbeitet werden.²

Der Vorteil von MRT gegenüber den Diagnosemethoden der Nuklearmedizin wie zum Beispiel CT ist, dass bei der Untersuchung nicht ionisierende Strahlung verwendet wird.³

1.2 Bedeutung von MRT - Kontrastmitteln bei der Bildgebung

Der Kontrast ist ein wichtiges Kriterium bei allen nichtinvasiven, bildgebenden Untersuchungsmethoden. Dadurch können verschiedene Gewebearten besser voneinander unterschieden werden.

Im Gegensatz zu alternativen bildgebenden Verfahren, ist bei der MRT-Untersuchung das verwendete Kontrastmittel selbst nicht sichtbar. Die Kontrastmittel wechselwirken mit den Protonen des Wassers im Gewebe. Dadurch wird die Relaxationszeit erniedrigt, was zu einem stärkeren Signal führt am Ort an dem sich das Kontrastmittel befindet.⁴

Im Vergleich zu superparamagnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln und CEST-Kontrastmitteln (Chemical Exchange Saturation Transfer), werden Gd^{3+} -Komplexe bei MRT-Untersuchungen am häufigsten als Kontrastmittel eingesetzt.⁵

Gadolinium ist ein Element aus der Gruppe der Lanthanoide und hat aufgrund der halb besetzten f-Orbitale, sieben ungepaarte Elektronen, was zu stark ausgeprägten paramagnetischen Eigenschaften führt.⁶

Eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den ungepaarten Elektronen des Gd^{3+} mit den Protonen des H_2O -Moleküls, welches direkt an das Metall koordiniert ist, führt zu einer schnelleren Spinnkehr der Protonen. Dadurch wird hauptsächlich die T_{1-} -Relaxation beschleunigt.² Aufgrund des Ligandenaustauschs zwischen der inneren Sphäre des Komplexes und dem Lösemittelbulk wird der Effekt im Gewebe verteilt, indem sich das Kontrastmittel befindet.⁷

Nicht komplexiertes Gadolinium ist toxisch. Der LD_{50} Wert von Gd^{3+} beträgt 50mmol/kg .⁸ Die Anwesenheit von nicht komplexierten Gd^{3+} im Körper, führt unter anderem zur Störung der Blutgerinnung und Nervenschäden. Weiterhin hemmt Gadolinium(III) die Enzyme, die durch Ca^{2+} und Mg^{2+} aktiviert werden.⁸

Zur Komplexierung von Gd^{3+} beim Einsatz als Kontrastmittel werden Liganden, die zur Klasse der Polyaminopolycarboxylaten gehören eingesetzt. Dabei koordinieren die Liganden achtzählig an das Metall. Die neunte Koordinationsstelle des Gadoliniums wird von einem H_2O Molekül besetzt, was die Wechselwirkung des Kontrastmittels mit dem Gewebe ermöglicht.

Es können die Derivate der Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und die Derivate der 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA), komplexiert mit Gd^{3+} als MRT – Kontrastmittel eingesetzt werden.

Je nach Struktur können sich die Gd^{3+} -Komplexe selektiv in unterschiedlichen Geweben

anlagern und dort den Kontrast beeinflussen.

Durch das Einführen einer Phenyl-Gruppe in das DTPA Grundgerüst, wird die Hydrophobie der Komplexe erhöht. Aufgrund dessen können sich GdBOPTA und GdEOB-DTPA in den Epithelzellen der Leber anlagern und anschließend durch die Galle ausgeschieden werden. Dies ermöglicht eine MRT-Untersuchung der Leber.

Alle anderen für den Markt zugelassenen Kontrastmittel sind gut wasserlöslich und werden hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden.⁹

Liganden, die im Komplex mit Gd^{3+} als MRT-Kontrastmittel eingesetzt werden können, sind in der Abbildung 1 dargestellt.

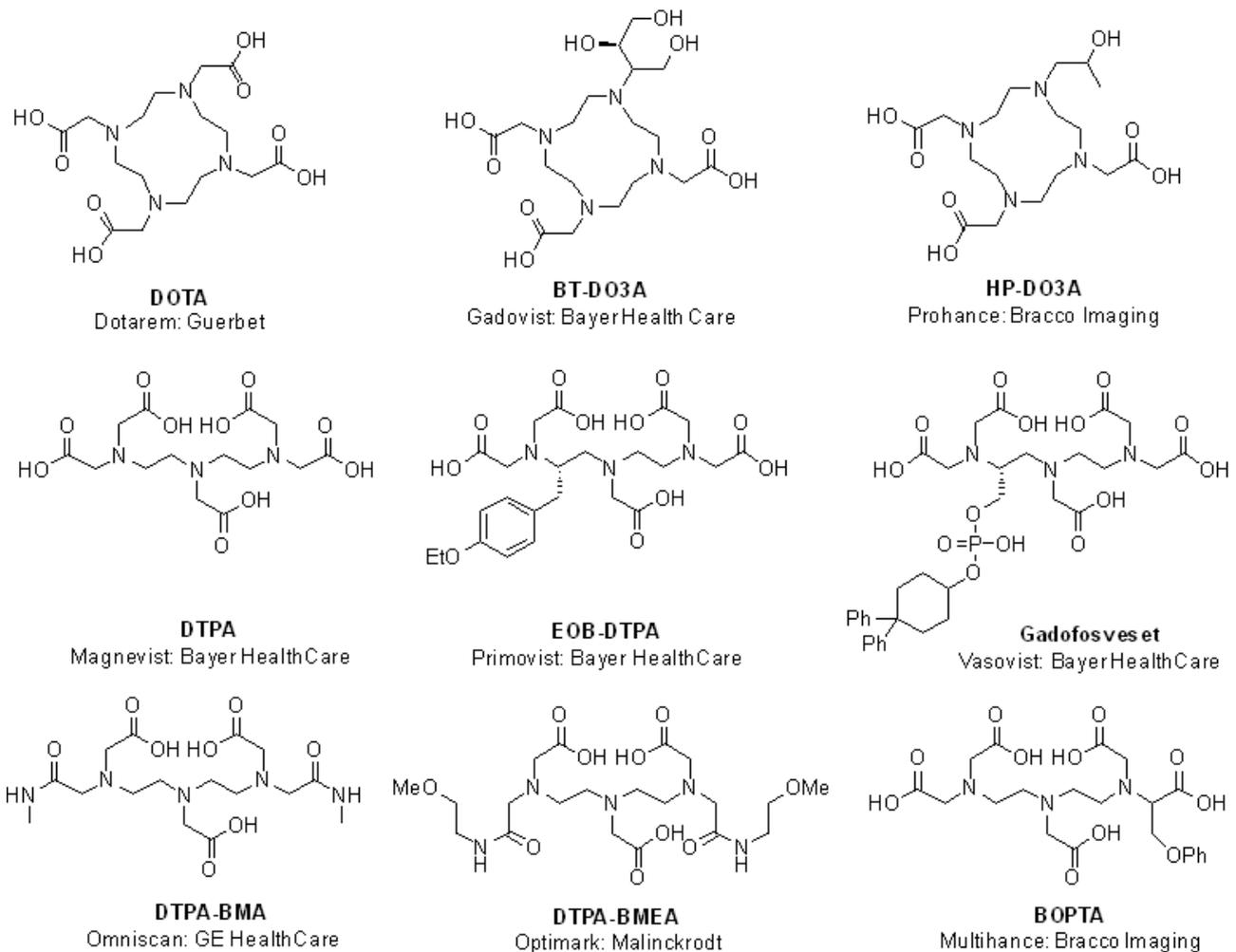


Abbildung 1: Liganden der kommerziell erhältlichen MRT-Kontrastmittel auf Gd^{3+} Basis

1.3 Nephrogene Systemische Fibrose als Nebenwirkung bei Kontrastmittelgabe

Eine der Nebenwirkungen, die in Zusammenhang mit der Gabe von Gd^{3+} -haltigen Kontrastmitteln in Verbindung gebracht wird, ist die Nephrogene Systemische Fibrose (NSF). Diese Krankheit tritt mehrere Tage bis Jahre nach Gabe von Gadolinium haltigen Kontrastmitteln, ausschließlich bei Patienten mit Niereninsuffizienz und verringerter Nierenausscheidung auf. Durch die Niereninsuffizienz wird die Halbwertszeit der Ausscheidung von MRT-Kontrastmitteln von 1,3 h auf ca. 30 h erhöht.¹

Weiterhin wurden in allen aufgetretenen Fällen von NSF Gadolinium Ablagerungen im Gewebe nachgewiesen.

Nephrogene Systemische Fibrose, führt unter anderem zu Kontrakturen, Hautulzeration und massiven Bewegungseinschränkungen, 5% aller auftretenden NSF Fälle verlaufen tödlich.¹⁰ Die einzige Therapiemöglichkeit zur Behandlung von NSF, ist eine Nierentransplantation.¹¹

Bei mehr als 147 Mio. Patienten, denen Gadolinium-haltige Kontrastmittel verabreicht wurden, sind 177 Fälle von NSF bekannt (Stand 2007).⁴

Als Ursache von NSF wird der Zerfall von Gadolinium(III)-Komplexen innerhalb des Körpers vermutet.

Neunzig Prozent aller auftretenden Fälle von NSF werden mit dem Komplex Gd-DTPA-BMA, der unter Markennamen Omniscan vertrieben wird, in Verbindung gebracht.¹²

Dieser Komplex hat im Vergleich zu anderen verwendeten Kontrastmitteln auf Gadolinium(III) Basis eine sehr geringe kinetische und thermodynamische Stabilität.

Die konditionelle Stabilitätskonstante, von Omniscan bei $pH=7,4$ in 1M TMACl Medium beträgt $15,48^{13}$ und seine Dissoziationskonstante k_{obs} ist größer als $2,19 \cdot 10^{-3}/s$. Der offenkettige Komplex Gd-EOB-DTPA, der nicht in Verbindung mit NSF gebracht wird, hat ein pGd Wert von 19,41 und hat eine ähnlich geringe kinetische Stabilität.

Die geringe thermodynamische und kinetische Stabilität von Kontrastmitteln, welche NSF auslösen können, legt die Vermutung nahe, dass der Zerfall der Komplexe im Körper stattfindet. Dies macht eine Studie über die kinetische und thermodynamische Stabilität aller Kontrastmittel unter gleichen Bedingungen erforderlich.

1.4 Thermodynamische Stabilität der MRT-Kontrastmittel

Das thermodynamische Gleichgewicht für eine Komplexbildung kann allgemein durch die Gleichung 1 definiert werden.

$$K = \frac{[ML]}{[M] \cdot [L]} \quad (1)$$

Je Größer die Konstante K ist, desto mehr wird das Gleichgewicht auf die Seite des Komplexes ML verschoben. Besonders stabile Komplexe, die als MRT-Kontrastmittel eingesetzt werden, müssen möglichst hohe Komplexbildungskonstanten haben, so dass im thermodynamischen Gleichgewicht die Konzentration an freiem Metall sehr gering ist.

Eine hohe Komplexstabilität von den zugelassenen MRT-Kontrastmitteln kann damit erklärt werden, dass es nach der Koordination von Ligand an das Gd^{3+} Chelat-5 Ringe entstehen. Weiterhin wird die Komplexstabilität dadurch begünstigt, dass das Gd^{3+} zu den harten Kationen zählt. Die Sauerstoffatome der Acetat Gruppen der Liganden, die an das Metall koordinieren, zählen zu den harten Liganden. Durch die Koordination von harten Liganden an ein hartes Kation wird die Komplexstabilität ebenfalls erhöht.

Die Komplexbildung und die Protonierung des Liganden sind Konkurrenzreaktionen.

Abhängig von pH-Wert und den pK_s Werten der einzelnen Liganden können sich die Stabilitätskonstanten unterscheiden. Aus diesem Grund werden zur Beurteilung der Komplexstabilität konditionelle Stabilitätskonstanten herangezogen.

Die konditionellen Stabilitätskonstanten werden unter Berücksichtigung der Konkurrenzreaktionen berechnet, welche die Komplexstabilität beeinflussen.⁸ Die konditionellen Konstanten, welche durch Protonierung als Konkurrenzreaktion beeinflusst werden, sind durch Formel 2 definiert.

$$K_{cond} = K_{therm} \cdot \frac{[L]}{[L + [LH] + [LH_2] + [LH_3] + \dots + [LH_x]]} \quad (2)$$

Die Konzentration an freiem Gadolinium(III) ist ausschlaggebend für die Toxizität der Kontrastmittel, deswegen werden allgemein nicht die konditionellen Konstanten, sondern der negative dekadische Logarithmus der Konzentration an freiem Gadolinium im thermodynamischen Gleichgewicht (pGd-Wert) angegeben. Je größer der pGd-Wert, desto höher ist die thermodynamische Stabilität eines Kontrastmittels.⁴

Nur pGd-Werte, die unter gleichen Bedingungen sowie bei gleichen pH-Werten bestimmt wurden, können miteinander verglichen werden.

Durch potentiometrische Titration wurden pGd-Werte bei einer Ligand und Metall Konzentration von 10mmol/l pH=7,4 und 25 °C, aller kommerzieller MRT-Kontrastmittel, auf Gd³⁺ Basis, im Rahmen der Doktorarbeit von Angela Klein im 1M TMACl Medium bestimmt (Abbildung 2).¹³

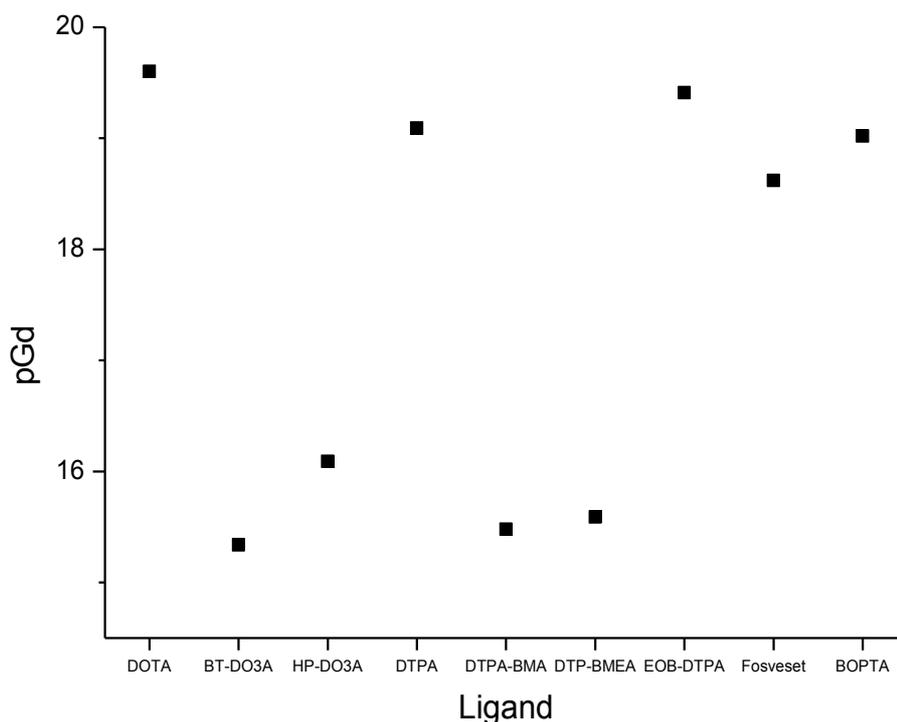


Abbildung 2: pGd-Werte von Komplexen welche als MRT-Kontrastmittel eingesetzt werden⁴⁰

Aus der Abbildung 2 ist erkennbar, dass der Komplex Gd-DTPA-BMA, welcher mit den 90% aller auftretenden Fällen von NSF in Verbindung gebracht wird, eine geringere thermodynamische Stabilität aufweist, verglichen mit anderen offenkettigen MRT-Kontrastmitteln. Die sekundären Amid-Gruppen des Ligands Gd-DTPA-BMA können verglichen mit den primären Amid-Gruppen anderer offenkettiger Liganden weniger stark an das Gadolinium(III) koordinieren, was die geringere thermodynamische Stabilität erklärt.

Weiterhin ist aus der Abbildung 2 erkennbar, dass die makrozyklischen Komplexe Gd-BT-

DO3A und Gd-HP-DO3A eine geringere thermodynamische Stabilität haben als offenkettige, ionische MRT Kontrastmittel. Die thermodynamische Stabilität von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A ist ähnlich hoch wie vom Komplex Gd-DTPA-BMA. Es sind jedoch keine auftretenden Fälle von NSF in Zusammenhang mit der Gabe von makrozyklischen Kontrastmitteln bekannt, weil die makrozyklischen Liganden eine hohe kinetische Stabilität aufweisen.

1.5 Kinetische Stabilität von MRT-Kontrastmitteln

Kinetische Stabilität bestimmt die Geschwindigkeit mit der ein Komplex zerfällt. Wie im Kapitel 1.4 diskutiert, haben nicht ionische MRT-Kontrastmittel mit makrozyklischen Liganden (Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A) eine geringere thermodynamische Stabilität verglichen zu anionischen Komplexen mit offenkettigen Liganden.

Es sind jedoch keine auftretenden NSF-Fälle im Zusammenhang mit der Gabe von makrozyklischen Kontrastmitteln bekannt.¹²

Aufgrund der langsamen Zerfallsgeschwindigkeit von makrozyklischen Kontrastmitteln, kann sich auch bei längerer Verweilzeit der makrozyklischen Komplexe im Körper, das thermodynamische Gleichgewicht nicht einstellen und freies Gadolinium(III) wird nicht freigesetzt.

Die langsame Zerfallsgeschwindigkeit von makrozyklischen Gadolinium(III) Komplexen verglichen mit den offenkettigen Komplexen, kann dadurch erklärt werden, dass der Cyclam-Ring, der das Grundgerüst von makrozyklischen Kontrastmitteln bildet, eine hohe konformationelle Rigidität und preorganisierte Struktur aufweist. Weiterhin korreliert die Größe des Cyclams gut mit der Größe des Gd^{3+} Ions, dadurch wird die kinetische Stabilität der makrozyklischen Komplexe erhöht. Die Acetat-Gruppen, die sich an den Amin-Gruppen des Cyclams befinden, koordinieren an das Gadolinium(III) und schirmen das Metall zusätzlich ab. Dadurch werden Zerfallsreaktionen durch Transmetallierung, Umkomplexierung und Protonierung erschwert.^{15 16}

Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur Bestimmung der Bildungs- und Zerfallskinetiken von offenkettigen- und makrozyklischen-Kontrastmitteln.^{17 18 19} Bei diesen Untersuchungen werden häufig Umkomplexierungsreaktionen mit UV aktiven Metallen wie zum Beispiel Cu^{2+} oder Eu^{3+} beobachtet. Eine Reaktion zur Bestimmung der Zerfallskinetik von Gd^{3+} Komplexen mit Eu^{3+} , ist in der Abbildung 3 gezeigt.



Abbildung 3: Reaktion zur Bestimmung der Zerfallskinetik von Gadolinium(III)-Komplexen durch Transmetallierung mit Eu³⁺

Komplexiertes und nicht komplexiertes Europium(III) haben unterschiedliche Fluoreszenz Spektren. Dadurch ist es möglich die Konzentration vom komplexierten und nicht komplexierten Metall zu jedem Zeitpunkt der Reaktion zu bestimmen.

Bei der Ermittlung der Bildungs- und Zerfallskinetik durch Transmetallierung des Liganden wird die Reaktionsgeschwindigkeit von den Metallen, welche für die Transmetallierung eingesetzt werden beeinflusst.¹⁸ Die Ergebnisse aus den einzelnen Studien können aus diesem Grund nur im geringen Maße miteinander verglichen werden.

Obwohl die Messung der Zerfallsgeschwindigkeiten von MRT-Kontrastmitteln durch Transmetallierung bei physiologischen pH-Werten möglich ist, können diese Messungen eine sehr begrenzte Aussage über die Zerfallsvorgänge von MRT Kontrastmitteln im Körper liefern. Die Konzentration an freien Übergangsmetallen und Lanthanoiden im menschlichen Körper ist sehr gering. Weiterhin besteht eine sehr viel höhere Wahrscheinlichkeit, dass freie Metalle im menschlichen Körper, eher mit anderen Liganden wie zum Beispiel Aminosäuren, Proteinfragmenten oder Phosphatverbindungen einen Komplex bilden, als das ein Gadolinium(III)-Komplex mit dem freien Metall wechselwirken kann.

Sowohl freies und komplexiertes Gadolinium(III) als auch die Liganden, welche als MRT-Kontrastmittel eingesetzt werden, haben eine sehr geringe Extinktion. Deswegen ist eine direkte Bestimmung der Bildungs- und Zerfallskinetik von MRT-Kontrastmitteln mit spektroskopischen Methoden wie zum Beispiel UV-VIS oder Fluoreszenzspektroskopie nicht möglich.

Die Kationen Y³⁺, Sm³⁺ und Lu³⁺ haben ähnliche chemische Eigenschaften wie Gd³⁺.

Außerdem haben diese Lanthanoide im Gegensatz zu Gd³⁺ keine stark ausgeprägten paramagnetischen Eigenschaften, die bei Untersuchungen durch NMR-Spektroskopie zur Peakverbreiterung führen. Daher ist es möglich mit Hilfe von NMR-Spektroskopie eine Aussage zur kinetischen Stabilität und den Zerfallsmechanismen vom Lanthanoid-Komplexen zu machen und die Erkenntnisse auf Gadolinium(III) Komplexe zu extrapolieren.⁶

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Bildungs- und Zerfallskinetik ist die

Bestimmung der Relaxivität. Beim Zerfall von Gadolinium(III) werden die Koordinationsstellen des Metalls durch H₂O-Moleküle substituiert. Je mehr Wasser Moleküle an Gadolinium(III) angelagert werden, desto höher wird die Relaxivität der Probe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zerfallsgeschwindigkeit von MRT-Kontrastmitteln mit der pH-Stat Methode bestimmt.

Die Bestimmung der Zerfallskonstanten mit der pH-Stat Methode wird bei niedrigen pH-Werten durchgeführt. Die Messungen finden in einem pH-Bereich, innerhalb dessen im thermodynamischen Gleichgewicht ausreichende Konzentration an freiem nicht komplexiertem Metall bzw. Ligand vorliegt. Das Gleichgewichtsverhältnis von komplexierten und nicht komplexiertem Gadolinium(III) ist abhängig vom pH-Wert. Die Rückkehr des Systems in das thermodynamische Gleichgewicht führt zum Komplexzerfall und Verbrauch der Protonen in der Probelösung, weil die Liganden nach dem Komplexzerfall protoniert werden. Während des Komplexzerfalls werden durch den pH-Stat zugegebene Protonen und Zugabezeiten, nach dem Start der Zerfallsreaktion, aufgezeichnet. Die Zerfallskonstanten werden aus den von zeitabhängigen Zugaberaten von HCl während einer pH-Stat Titration berechnet.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten der Komplexe GdDTPA, GdDOTA, Gd-BT-DO₃A und Gd-HP-DO₃A durch die pH-Stat Titration und eine Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten der Komplexe GdDOTA und GdDTPA mit einer Gadolinium(III) sensitive Elektrode. Weiterhin ist es notwendig die verwendeten Methoden für die Bestimmung der kinetischen Bildungs- und Zerfallskonstanten zu optimieren und die optimierten Methoden zu validieren um den Arbeitsbereich, Eignung und Limitierung der eingesetzten Methoden zeigen zu können.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten mit der pH-Stat Methode

2.1.1 Beschreibung der pH-Stat Methode und Auswertung der Messungen

Der Zerfall von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Komplexen, bei tiefen pH-Werten in einem pH Bereich bei welchem genügend freies Metall im thermodynamischen Gleichgewicht vorliegt. Der Komplexzerfall während einer pH-Stat Titration, kann durch die allgemeine Reaktionsgleichung (Abbildung 4) beschrieben werden.



Abbildung 4: Zerfall von MRT-Kontrastmitteln bei tiefen pH-Werten

Bei einem Zerfall von Gadolinium(III)-Komplexen (wenn der Zerfall bei niedrigen pH-Werten stattfindet) kehrt das System in das von pH-Wert abhängige thermodynamische Gleichgewicht zurück. Die Anzahl der Protonen, die an den Liganden im Gleichgewicht angelagert werden, hängt von der Art des Liganden und dem pH-Wert ab.

Am Beispiel der Teilchenverteilung des Komplexes Gd-BT-DO3A (Abbildung 5), ist erkennbar, dass je höher der pH-Wert ist, desto weniger freies Metall im thermodynamischen Gleichgewicht vorliegt. Andere im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Komplexe, weisen ein ähnliches Verhalten auf.

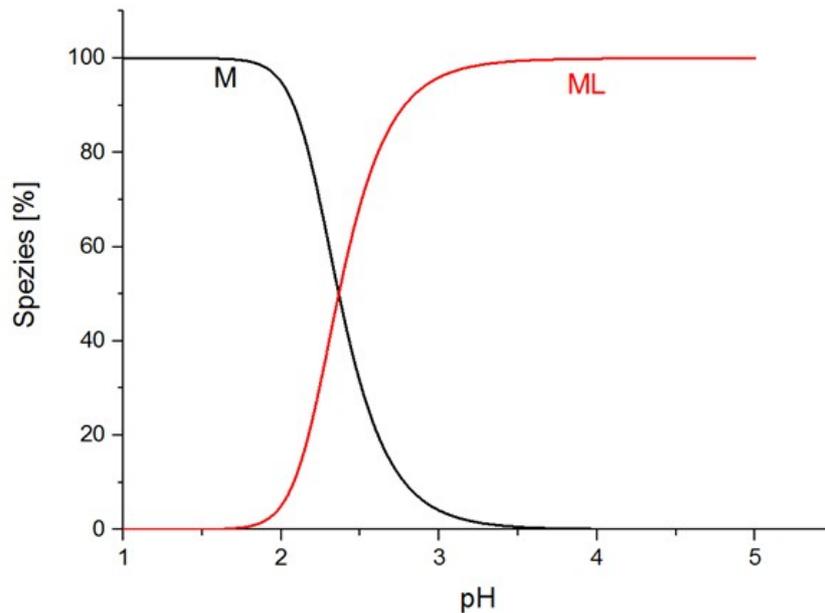


Abbildung 5: Mit Hyss berechnete Teilchenverteilung des Liganden Gd-BT-DO3A²⁰

Bei einer pH-Stat Titration wird der Zerfall der Gadolinium(III) Komplexe innerhalb eines pH-Bereiches beobachtet, in welchem der freie Ligand bzw. freies nicht komplexiertes Metall in signifikanten Mengen vorliegt, sobald das thermodynamische Gleichgewicht erreicht ist.

Bei einem Zerfall verbrauchte Protonen werden durch den pH-Stat nachgeliefert.

Deswegen bleibt die Protonenkonzentration in der Lösung während einer Titration konstant. Aus diesem Grund liegen Bedingungen für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung vor, bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit hauptsächlich von der Komplexkonzentration und Art des Komplexes abhängt.

Die Zugabe von HCl ist proportional zur Zerfallsgeschwindigkeit des Komplexes. Eine pH-Stat Titrierkurve von Gd-BT-DO3A zur Bestimmung der Zerfallsgeschwindigkeit ist in der Abbildung 6 gezeigt.

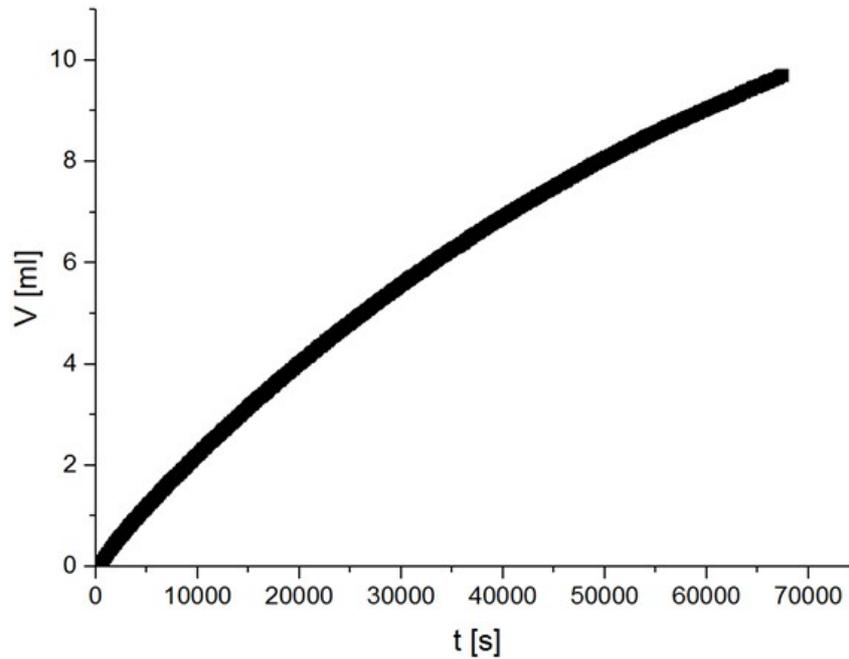


Abbildung 6: Zugabevolumen (1M HCl) bei der pH-Stat Titration von BT-DO3A bei pH=1,2 und T=37°C. Die Titration wurde bis zu einem Volumen von 10 ml durchgeführt.

Um aus der zeitabhängigen Zugabe von HCl die kinetische Zerfallskonstante zu ermitteln, ist es notwendig die Protonenkonzentration zu berechnen, die notwendig ist, um den Komplex vollständig zu protonieren (Formel 3).

Als Grundlage zur Berechnung, dienen die Komplexbildungskonstanten und pK_s-Werte der jeweiligen Liganden, welche im Rahmen der Master- bzw. Doktorarbeit vom Tim Scharding und Angela Klein bestimmt wurden.^{20 13} Dazu wird die Konzentration der einzelnen protonierten Komplex-Spezies im thermodynamischen Gleichgewicht mit der Anzahl der angelagerten Protonen multipliziert und über alle Teilchen die Summe gebildet.

$$[H]_{tot} = [LH] + 2 \cdot [LH_2] + 3 \cdot [LH_3] + 4 \cdot [LH_4] + 5 \cdot [LH_5] \quad (3)$$

Ausgehend von [H]_{tot} wird das Volumen berechnet, das durch den pH-Stat bei einem vollständigen Komplexzerfall in die Probelösung titriert wird. Bei einem vollständigen Zerfall von Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A werden maximal 14,7 ml 1M HCl bzw. 147 ml 0,1M HCl durch den pH-Stat in die Probelösung titriert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden maximal 10 ml 1M HCl zu der Probelösung zugegeben.

Mit der Formel 4 wird, ausgehend von der Protonenkonzentration [H]_{tot}, der Anteil an zerfallenem Komplex zum Zeitpunkt t berechnet. Dabei ist V_t das vom pH-Stat

zugegebene HCl Volumen zum Zeitpunkt t und V_{ges} ist das Volumen, welches bei einem vollständigen Zerfall des Komplexes durch den pH-Stat zur Probelösung zugegeben werden muss.

$$GdL_t = \frac{100 \cdot V_t}{V_{ges}} \quad (4)$$

Zur Bestimmung der Zerfallskonstante k_{obs} , wird der Anteil an freigesetztem Gd^{3+} zum Zeitpunkt t logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 7). Die Steigung der erhaltenen Gerade entspricht der Zerfallskonstante k_{obs} .

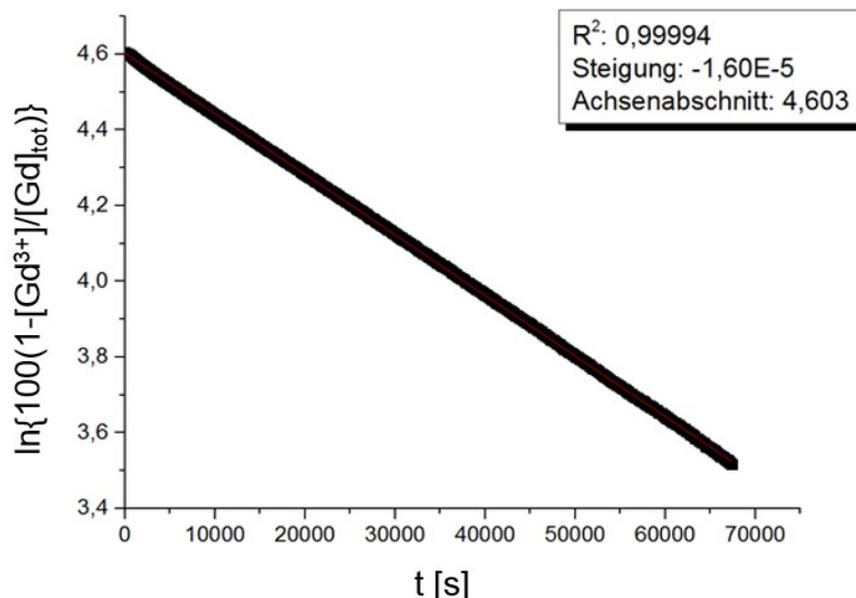


Abbildung 7: Auftragung $\ln(1-[GdL])$ des Liganden BT-DO3A bei $pH=1,2$ und $T=37^\circ C$

2.1.2 Qualifizierung vom pH-Stat

Qualifizierung ist der dokumentierte Beweis, dass das eingesetzte Equipment den benötigten Anforderungen entspricht und für die vorgesehenen Aufgaben geeignet ist.²¹

Eine Qualifizierung von pH-Stat wird durchgeführt um zu beweisen, dass der pH-Stat dafür geeignet ist, die kinetischen Zerfallskonstanten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Komplexe bestimmen zu können. Weitere eingesetzte Laborgeräte und Equipment wie zum Beispiel die Feinwaage oder die Eppendorfpipetten wurden nicht qualifiziert, weil diese Geräte regelmäßig kalibriert werden und damit sichergestellt ist, dass die

Genauigkeit und Präzision der Einwaagen und Volumenzugaben den nötigen Anforderungen entsprechen.

Mit dem pH-Stat soll es möglich sein, die Bestimmung von Zerfallskonstanten, anhand der zeitabhängigen Zugabe von HCl bei einer konstanten Temperatur durchzuführen. Das Standardpotential der verwendeten pH-Elektrode muss während einer Messung zur Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten möglichst konstant bleiben, damit die Änderung des gemessenen Potentials nur durch eine Änderung der Protonenkonzentration in der Probelösung erfolgt. Um zeigen zu können, dass eine Änderung des Standardpotentials während, einer Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten nicht beeinflusst, wird das Standardpotential der verwendeten pH-Elektrode an vier Tagen hintereinander bestimmt. Die Messung des Standardpotentials wurde bei 37 °C als auch bei 25 °C an vier Tagen hintereinander jeweils nach einer mehrstündigen pH-Stat Titration durchgeführt. Die gemessenen Standardpotentiale sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Standardpotentiale der Elektrode bestimmt bei 25 °C und 37 °C

	E₀ 25 °C [mV]	E₀ 37 °C [mV]
	467,30 Durchgeführt am: 2.12.2015	480,53 Durchgeführt am: 8.9.2015
	467,15 Durchgeführt am: 3.12.2015	480,70 Durchgeführt am: 9.9.2015
	467,59 Durchgeführt am: 4.12.2015	480,12 Durchgeführt am: 10.9.2015
	466,75 Durchgeführt am: 5.12.2015	480,90 Durchgeführt am: 11.9.2015
Standardabweichung	0,35	0,33
Mittelwert	467,20	480,56

Aus der Tabelle 1 ist erkennbar, dass sich das Standardpotential bei 25 °C zwischen

466,75 mV und 467,59 mV bewegt. Die Standardabweichung des Elektrodenpotentials ist 0,35mV bei 25 °C. Die Änderung des Standardpotentials um maximal 0,35 mV führt dazu, dass sich der pH-Wert um 0,006 pH-Einheiten während einer Messung ändert. Bei 37 °C bewegt sich das Standardpotenzial zwischen 480,90 mV und 480,12 mV. Die Standardabweichung beträgt bei 37 °C 0,33 mV. Eine Änderung des Standardpotentials um maximal 0,33 mV führt dazu, dass der pH-Wert während einer Messung um maximal 0,005 pH Einheiten verändert wird. Eine so geringe Änderung des pH-Wertes liegt innerhalb des Driftbereichs der pH-Elektrode. Deswegen hat eine Änderung des Standardpotentials um Maximal 0,35 mV während der Messung kein Einfluss auf die Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten.

Eine Reaktionskinetik wird von der Temperatur beeinflusst, aus diesem Grund müssen die Messungen bei einer konstanten Temperatur stattfinden. Die Temperatur innerhalb vom Titriergefäß wird durch einen PT1000 Temperaturfühler überwacht. Weiterhin wird die Temperatur während einer pH-Stat Titration durch einen Thermostat konstant gehalten. Als Beweis, dass der verwendete Thermostat dafür geeignet ist, die Temperatur während einer pH-Stat Titration konstant zu halten, sind die Änderungen der Temperatur bei Titrationen durchgeführt bei 25 °C und 37 °C aufgezeichnet (Abbildung 8 und Abbildung 9).

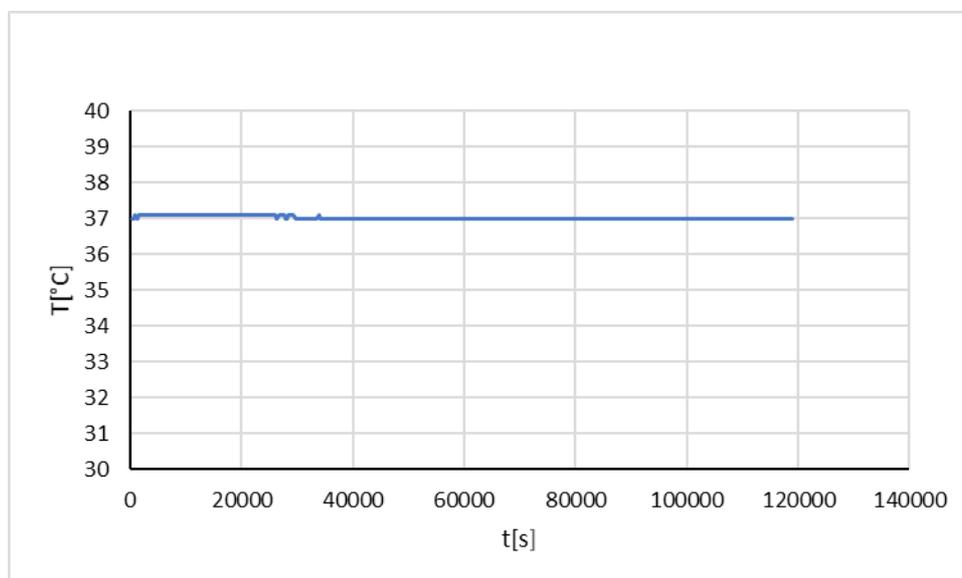


Abbildung 8: Änderung der Temperatur bei Einer pH-Stat Titration durchgeführt bei 37 °C

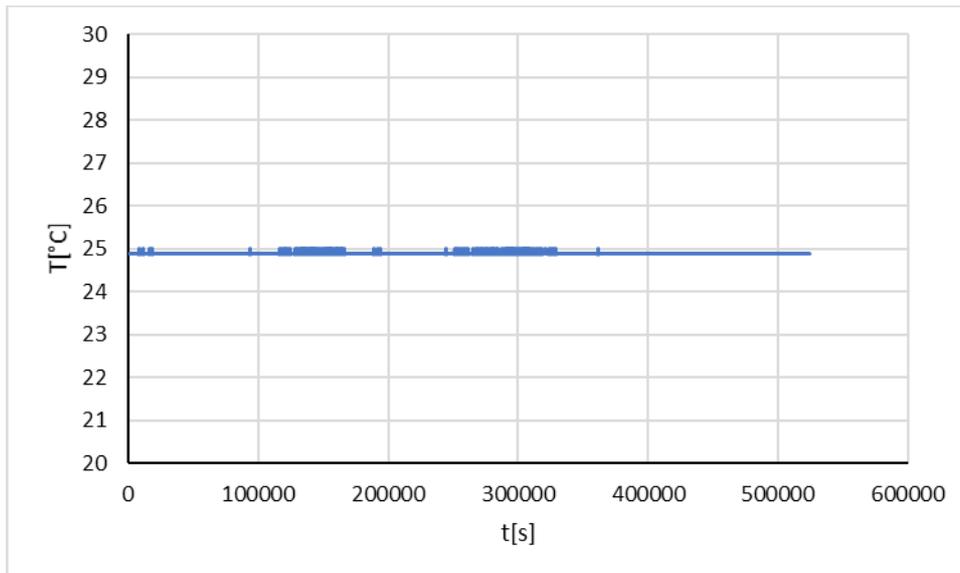


Abbildung 9: Änderung der Temperatur bei einer pH-Stat Titration durchgeführt bei 25 °C

Aus den Abbildungen 8 und 9 ist erkennbar, dass sich die Temperatur während einer pH-Stat Titration um maximal 0,1 °C von der Solltemperatur abweicht. Es ist somit sichergestellt, dass der Thermostat den gestellten Anforderungen entspricht und die Temperatur während einer pH-Stat Titration sowohl bei 25 °C als auch 37 °C konstant halten kann.

Als Beweis, dass der pH-Stat den gewünschten pH-Wert möglichst genau ansteuern und den eingestellten pH-Wert konstant halten kann, wurde eine neutrale wässrige Lösung, welche 1M TMACl enthält, durch Zugabe von 0,1M HCl auf einen pH-Wert von 2 gebracht. Die Änderung des Volumens und des gemessenen Potentials, während der Einstellung des definierten pH-Wertes, ist in der Abbildung 10 gezeigt.

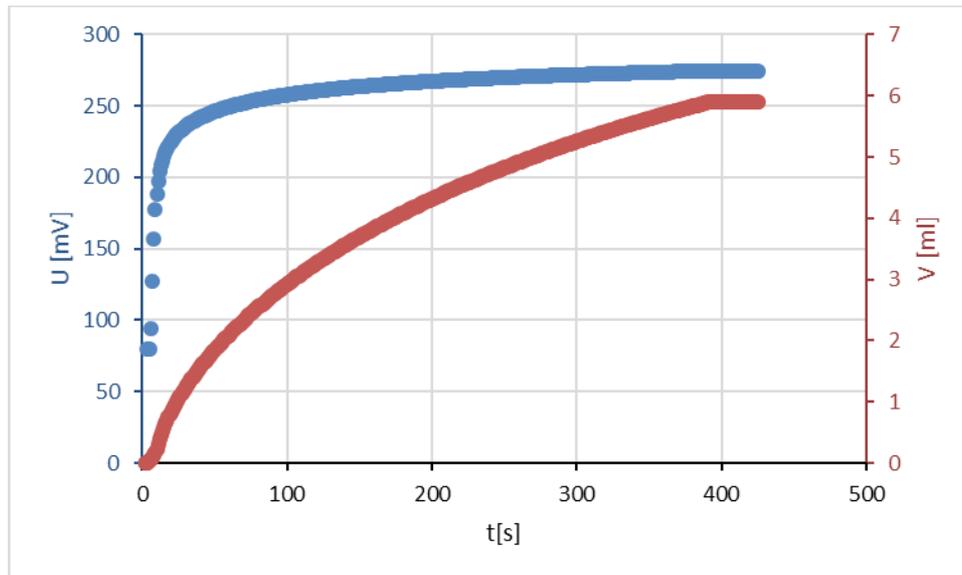


Abbildung 10: Änderung vom Potential (blau) und des Volumens (rot) bei der Ansteuerung vom pH-Wert

Aus der Abbildung 10 ist erkennbar, dass nachdem der definierte pH-Wert durch HCl Zugabe erreicht ist, erfolgt keine weitere Volumenzugabe. Der pH-Stat hält somit den eingestellten pH-Wert konstant. Gründe für eine Potentialänderung während einer pH-Stat Titration, sind somit eine Drift der pH-Elektrode und Änderung der Protonenkonzentration welche durch den Komplexzerfall verursacht wird.

Bei einer pH-Stat Titration sollte das eingestellte Potential möglichst konstant bleiben. Es ist notwendig, dass der pH-Stat die HCl Lösung während einer Titration nicht überdosiert und möglichst schnell auf eine Erhöhung des Potentials aufgrund eines Komplexzerfalls reagiert.

Bei einer pH-Stat Titration ändert sich der pH-Wert um durchschnittlich 0,002 pH-Einheiten vom eingestellten pH-Wert, bei welchem eine pH-Stat Titration durchgeführt wird. Der eingestellte pH-Wert wird bei einer pH-Stat Titration nicht überschritten (siehe Anhang). Es ist somit sichergestellt, dass der pH-Stat mit einer ausreichenden Präzision den pH-Wert bei dem gewünschten Sollwert durch HCl Zugabe einregeln kann.

Fazit: Der verwendete pH-Stat ist für die Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten geeignet.

2.1.3 Optimierung der pH-Stat Methode zur Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die pH-Stat Methode zur Bestimmung der Zerfallskonstanten von makrozyklischen Gd^{3+} Komplexen in mehreren Schritten optimiert.

2.1.3.1 Durchführung von pH-Stat Titrations mit aufgereinigten Komplexen und Injektionslösungen

Zum Ausschließen der Matrixeinflüsse bei einer pH-Stat Titration, wurden zunächst Messungen mit Lösungen durchgeführt, die nur den aufgereinigten Komplex und Inertelektrolyt enthalten.

Zum Aufreinigen der Liganden wurde das komplexierte Gd^{3+} und andere in der Injektionslösung enthaltene Metalle durch Umkomplexierung mit Oxalat gefällt.

Im nächsten Schritt wurde der Ligand durch Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt.

Nach der Isolierung und Aufreinigung der Liganden, werden diese im Verhältnis 1:1 mit Gd^{3+} in Wasser aufgelöst.

Die hergestellte Probelösung wird mit Tetramethylammoniumhydroxid auf einen pH-Wert höher als 3 eingestellt, weil oberhalb dieses pH-Wertes alle, im Rahmen dieser Arbeit, untersuchten Liganden vollständig als Gadolinium(III) Komplexe vorliegen. Sobald das thermodynamische Gleichgewicht erreicht ist und Gd^{3+} vollständig komplexiert ist, wird die Probelösung das Tetramethylammoniumchlorid zugegeben um eine konstante Ionenstärke während der Titration gewährleisten zu können.

Der Nachteil einer Verwendung von aufgereinigten Komplexen, zur Bestimmung der Zerfallskonstanten, ist der große Aufwand bei der Isolierung der Liganden aus der Injektionslösung, der anschließenden Aufreinigung und einer erneuten Komplexierung der Liganden mit Gd^{3+} . Weiterhin sind die untersuchten Liganden sehr inert und die Komplexierung von Gd^{3+} durch makrozyklische Liganden verläuft sehr langsam. Bei einer Temperatur von 40 °C dauerte die vollständige Komplexierung der untersuchten Liganden mehr als 15 Tage.

Aufgrund der Zeitersparnis bei der Vorbereitung der Probelösungen, wurden zur Bestimmung der Zerfallskonstanten zusätzlich nicht aufgereinigte Injektionslösungen Prohance, welche den Komplex Gd-HP-DO3A enthält, sowie Gadovist, welche den Komplex Gd-BT-DO3A beinhaltet, verwendet.

Die eingesetzten Injektionslösungen wurden unter GMP (Good Manufacturing Practice)

Bedingungen hergestellt. Die Konzentration der einzelnen Komponenten in den Injektionslösungen wurden im Rahmen der Freigabeanalytik in Übereinstimmung mit §14 AMWHV durchgeführt. Aus diesem Grund stimmen die angegebenen Konzentrationen der jeweiligen Komponenten in den verwendeten Injektionslösungen mit der tatsächlichen Konzentration im Rahmen der Messungsgenauigkeiten und Toleranzgrenzen überein.

Der Inhalt und Konzentrationen der Injektionslösungen sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 2: Inhaltsstoffe und Konzentration der der Prohance Injektionslösung

Inhaltsstoffe	Konzentration [mmol/l]
Gd-HP-DO3A	500
Ca ²⁺	0,5
HP-DO3A	0,5

Tabelle 3: Inhaltsstoffe und Konzentration der Gadovist Injektionslösung

Inhaltsstoffe	Konzentration [mmol/l]
Gd-BT-DO3A	1000
Ca ²⁺	1
BT-DO3A	1
TRIS	1

Alle in der Tabelle 2 und Tabelle 3 angegebenen Inhaltsstoffe sind in WFI (Wasser für Injektionszwecke) gelöst. Gemäß den Bestimmungen des Europäischen Arzneimittelbuches darf die Leitfähigkeit von WFI maximal 1,1 µS/cm² bei 20 °C betragen. Weiterhin darf WFI keine Calcium-, Magnesium-, und Sulfationen enthalten. Die Konzentration an Ammonium und Nitrat muss geringer als 0,2 ppm sein.²² Die Ionenkonzentration im verwendeten WFI beeinflusst in sehr geringem Maße das gemessene Potential in den Probelösungen, weil der Inertelektrolyt Tetramethylammoniumchlorid, welches den Probelösungen als Inertelektrolyt zugegeben wird, im deutlichen Überschuss in den Probelösungen vorhanden ist.

Die Ca²⁺ Konzentration sowohl in der Prohance als auch in der Gadovist Injektionslösung beträgt 0,5 mmol/l bzw. 1 mmol/l und ist somit deutlich geringer als die Konzentration des Inertelektrolyten in den Probelösungen, die aus den Injektionslösungen hergestellt werden. Deswegen wird das Elektrodenpotential von der Ca²⁺ Konzentration nicht beeinflusst. Unterhalb von pH 3, im Bereich in welchem die pH-Stat Titrationen durchgeführt werden,

ist die Wahrscheinlichkeit einer Bildung von Calcium Komplexen mit den untersuchten Liganden während einer Titration sehr gering, weil die Liganden unterhalb von pH 3 im thermodynamischen Gleichgewicht hauptsächlich in einer protonierten Form und nicht als Komplexe vorliegen. Weiterhin bilden die, im Rahmen dieser Arbeit, untersuchten Liganden mit Gd^{3+} stabilere Komplexe als mit Ca^{2+} . Aus diesem Grund ist eine Umkomplexierung mit Ca^{2+} während der Lagerung von den Injektionslösungen oder während der Titration unwahrscheinlich. In der Gadovist Injektionslösung enthaltener TRIS Puffer beeinflusst die Titrationsen ebenfalls nicht, da er im Bereich von pH 8,1 puffert und bei pH-Werten kleiner als 3 innerhalb von wenigen Sekunden vollständig protoniert wird. Ein Zerfall, der makrozyklischen Gadolinium(III) Komplexe erfolgt über einen Zeitraum von mehreren Stunden.

Freie Liganden, welche ebenfalls in den Injektionslösungen vorhanden sind, werden verglichen mit dem Zerfall der untersuchten makrozyklischen Komplexe schneller protoniert. Weiterhin ist die Komplexkonzentration in den Injektionslösungen deutlich höher als die Konzentration der nicht komplexierten Liganden. Deswegen wird eine pH-Stat Titration nur in einem vernachlässigbar geringen Maß von der Konzentration an nicht komplexierten Liganden in der Probelösung beeinflusst.

Als endgültiger Beweis, dass die in den jeweiligen Injektionslösungen zusätzlich zu den Komplexen enthaltene Inhaltsstoffe die Messungen zur Bestimmung der Zerfallskonstanten nicht beeinflussen, wurden pH-Stat Titrationsen sowohl mit den aufgereinigten Komplexen Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A als auch mit den jeweiligen Injektionslösungen bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Durch die pH-Stat Titration ermittelten Zerfallskonstanten, mit aufgereinigten Liganden und Probelösungen welche aus Injektionslösungen hergestellt wurden, sind in der Tabelle 4 miteinander verglichen.

Tabelle 4: Vergleich der Zerfallskonstanten k_{obs} bestimmt mit der Injektionslösung und dem aufgereinigten Kontrastmittel

Komplex	pH	K_{obs} [1/s]
Gd-HP-DO3A (Injektionslösung)	2,22	$1,11 \cdot 10^{-5}$
Gd-HP-DO3A (Aufgereinigt)	2,22	$1,11 \cdot 10^{-5}$
Gd-BT-DO3A (Injektionslösung)	1,76	$9,47 \cdot 10^{-7}$
Gd-BT-DO3A (Aufgereinigt)	1,75	$9,50 \cdot 10^{-7}$

Aus der Tabelle 4 ist erkennbar, dass die pH-Stat Titration nicht durch die in den Injektionslösungen enthaltenen Zusatzstoffe beeinflusst werden. Die Unterschiede der in Tabelle 4 angegebenen Konstanten, liegen innerhalb der Messungenauigkeit von der pH-Stat Methode.

Aus diesem Grund werden zur Herstellung der Probelösungen nicht die aufgereinigten Komplexe, sondern die Injektionslösungen verwendet.

2.1.3.2 Durchführung der Titrationsen mit 1 M und 0,1 M HCl

Für die Optimierung der pH-Stat Titration wurden Messungen sowohl mit 1 M Salzsäure als auch mit der 0,1 M Salzsäure durchgeführt. Die Titrationskurven bei vergleichbaren pH-Werten sind in der Abbildung 11 und Abbildung 12 gezeigt.

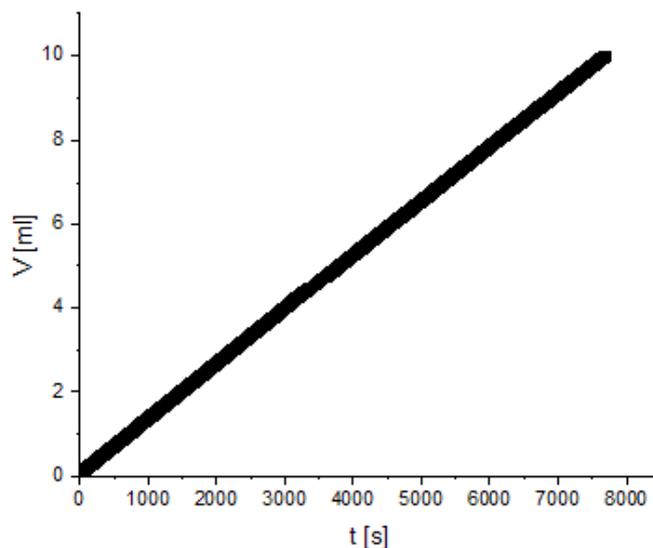


Abbildung 11: Titrationskurve von GD-HP-DO3A bei 25 °C und pH 1,85 durchgeführt mit 0,1 M HCl

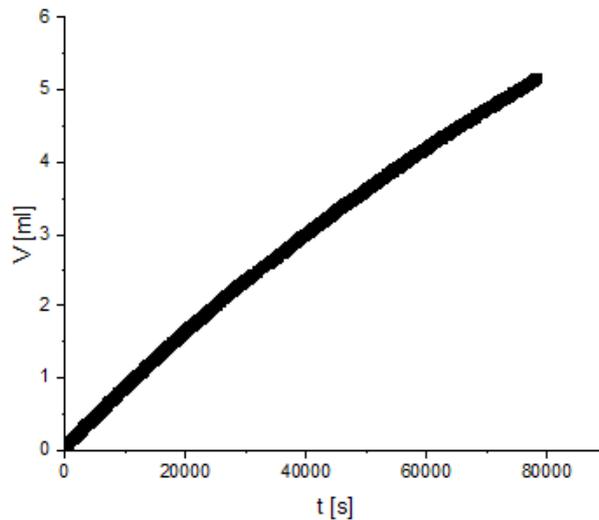


Abbildung 12: Titrationskurve von GD-HP-DO3A bei 25 °C und pH 1,95 durchgeführt mit 1 M HCl

Beim Vergleich der Titrationskurven, gezeigt in der Abbildung 11 und der Abbildung 12 ist, erkennbar, dass bei einer Durchführung der Titration mit 0,1 M HCl in kürzerer Zeit mehr Volumen zugegeben wird, verglichen mit der Titration welche mit einer 1 M HCl durchgeführt wurde.

Dies kann damit erklärt werden, dass in der 0,1 M HCl Lösung die Protonenkonzentration geringer ist, als in einer 1 M HCl. Bei einer pH-Stat Titration, durchgeführt mit 0,1 M HCl M, werden pro Zugabeschritt weniger Protonen in die Probelösung gegeben verglichen mit Titrationsen welche mit 1 M HCl durchgeführt werden.

Der Nachteil von 0,1 M HCl als Maßlösung ist, dass ein höheres Volumen an Titrationslösung notwendig ist, zum Analysieren der gesamten Zerfallsreaktion mit der pH-Stat Methode.

Die Komplexkonzentration in den Probelösungen beträgt 70 mmol/l, das Volumen der Probelösung beträgt 45 ml zum Zeitpunkt t_0 (Start der Reaktion). Bei einem Komplexzerfall von den untersuchten makrozyklischen Komplexen, werden 4 Protonen an einen Komplex angelagert. Bei der Verwendung der 0,1 M HCl Titrationslösung sind 147 ml notwendig um den pH-Wert während des gesamten Komplexzerfalls konstant zu halten. Bei der Verwendung von 1 M HCl Titrationslösung sind lediglich 14,7 ml notwendig um den pH-Wert während des gesamten Komplexzerfalls konstant zu halten.

Der Einsatz von 1 M HCl Maßlösung bei den pH-Stat Titrationsen zur Bestimmung der Zerfallskonstanten hat den Vorteil, dass die Probelösung, welche den zu untersuchenden

Komplex enthält, während einer Titration weniger verdünnt wird und somit die kinetische Zerfallskonstanten k_{obs} durch Verdünnungseffekte nur im geringen Maße beeinflusst werden. Weiterhin ist es möglich, den gesamten Zerfall durch eine pH-Stat Titration beobachten zu können. Aus diesem Grund werden pH-Stat Titrations zur Bestimmung der Zerfallskonstanten mit 1 M HCl durchgeführt.

2.1.3.3 Optimierung des Reaktionsstarts am Anfang der Titration

Die Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten, der im Rahmen dieser Arbeit, untersuchten Komplexe durch pH-Stat Titration muss bei pH-Werten tiefer als 3 durchgeführt werden. Damit die untersuchten Komplexe nicht vor dem Start der Titration zerfallen, werden die Probelösungen bei pH-Werten höher als 4 gelagert und erst kurz vor dem Start der Reaktion auf einen pH-Wert gebracht, bei dem die pH-Stat Titration stattfindet. Für eine weitere Optimierung der pH-Stat Methode wurden unterschiedliche Möglichkeiten zum Starten der Zerfallsreaktion untersucht.

Die Reaktion wurde zunächst gestartet, indem der pH-Wert durch die Zugabe vom 1 M HCl, welche auch für die pH-Stat Titration verwendet wird, eingestellt wurde.

Diese Methode die Titration zu starten, hat den Nachteil, dass hohe HCl Mengen vor dem Start der pH-Stat Titration zugegeben werden. Bei einer pH-Stat Titration welche bei pH 2,5 durchgeführt wurde, waren 4,5 ml 1 M HCl notwendig um den gewünschten pH-Wert zu erreichen.

Bei Titrations, welche bei tieferen pH-Werten durchgeführt werden sind noch größere Volumen an 1 M HCl notwendig um den gewünschten pH-Wert einzustellen. Ein weiterer Nachteil vom Starten der Reaktion durch Zugabe von 1 M HCl ist, dass Startvolumen am Anfang der pH-Stat Titration sich je nach pH-Wert unterscheidet. Je tiefer der pH-Wert, bei dem die Titration durchgeführt wird, desto höher das Startvolumen zum Zeitpunkt t_0 am Anfang der Titration. Somit ist das Startvolumen am Anfang der Reaktion nicht gleich.

Es ist weiterhin möglich, die Reaktion durch die Zugabe von konzentrierter HCl zu starten, dadurch werden die Probelösungen vor dem Start der Reaktion weniger verdünnt.

Jedoch wird das Volumen auch durch die Zugabe von konzentrierter HCl vor dem Start der Titration verändert. Aus diesem Grund werden die Messungen im Rahmen dieser Arbeit nicht durch die Zugabe von HCl gestartet.

Als optimale Möglichkeit eine pH-Stat Titration zu starten, ist das Vorlegen eines immer gleichen Volumens an HCl mit einer unterschiedlichen Protonenkonzentration.

Die Konzentration vom TMACl, welches als Inertelektrolyt eingesetzt wird, ist in den vorgelegten Lösungen konstant. Zu der vorgelegten HCl Lösungen wird anschließend die Injektionslösung, welche den zu untersuchenden Komplex enthält, zugegeben so dass die Komplexkonzentration nach der Zugabe 70 mmol/l beträgt.

Das Vorlegen der Salzsäure und Zugabe der Injektionslösung zum Starten der Reaktion hat den Vorteil, dass das Volumen beim Starten der Reaktion unabhängig vom pH-Wert, bei dem die jeweilige Titration stattfindet immer konstant ist.

Fazit: Im Rahmen dieser Methode werden die Bestimmungen der kinetischen Zerfallskonstanten durch Titrations mit 1 M HCl durchgeführt. Bei der Titration wird die Reaktion durch Zugabe der Injektionslösung zur vorgelegten HCl gestartet. Weil in den Injektionslösungen enthaltenen Zusatzstoffe die pH-Stat Titration nicht beeinflussen, werden die Messungen nicht mit den isolierten und aufgereinigten Komplexen, sondern mit den Injektionslösungen, welche den Patienten verabreicht werden, durchgeführt. Die Startkonzentration von 70 mmol wurde gewählt, weil bei dieser Konzentration bei einem Zerfall ausreichend viele Protonen verbraucht werden, so dass die verwendete pH-Elektrode eine Abnahme der Protonenkonzentration bestimmen kann.

2.1.4 Validierung der pH-Stat Methode

Methodenvalidierung ist der formelle Beweis, dass die Genauigkeit, Präzision und Reproduzierbarkeit der Methode den Anforderungen entspricht.²³

Bei der Validierung einer Methode handelt es sich nicht um eine einmalige Studie, sondern um einen kontinuierlichen Prozess, der im Laufe dieser Arbeit immer wieder kritisch betrachtet und durchgeführt wurde. Nach der Entwicklung der Methode und Festlegung der initialen Anforderungen erfolgt eine Basisvalidierung. Nach dem Anwenden der Methode, erfolgt eine erneute Eignungsprüfung und Revalidierung. Dies kann zu einer Weiterentwicklung der Methode führen, was eine erneute Revalidierung erfordert.

Der Prozess einer Methodenvalidierung ist in der Abbildung 13 verdeutlicht.

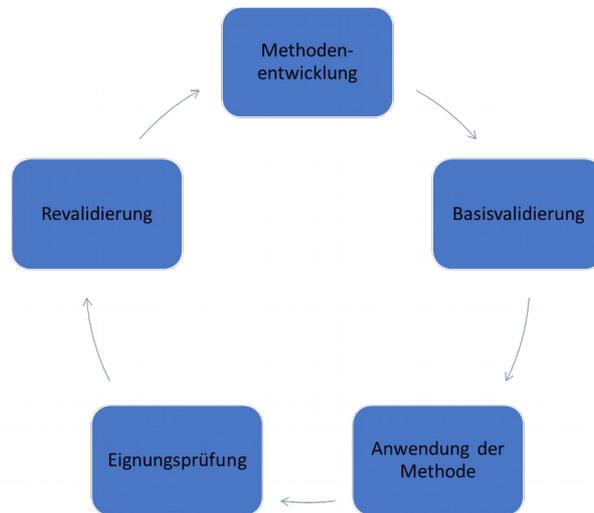


Abbildung 13: Schematischer Ablauf einer Methodenevalidierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Parameter validiert:

Spezifität, Detektionsgrenze, Quantifikationslimit, Messbereich der Methode.

Im Abschnitt 2.1.4 wird eine Validierung der optimierten Methode durchgeführt und diskutiert, die auch für die Bestimmung der Zerfallskonstanten verwendet wird.

2.1.4.1 Spezifität der pH-Stat Methode

Der ICH definiert Spezifität als die Fähigkeit den Analyten in der Gegenwart anderer Stoffe bestimmen und identifizieren zu können.²³

Die Ermittlung der Zerfallskonstanten von Gd^{3+} Komplexen durch die Messung des pH-Wertes und Zugabe von HCl um den eingestellten pH-Wert während der Titration konstant zu halten. Die Bestimmung der Protonenkonzentration erfolgt durch eine potentiometrische Messung mit einer Glaselektrode. Potentiometrische Messungen des pH-Wertes werden hauptsächlich durch einwertige Kationen gestört, welche mit der ionensensitiven Glasmembran der pH-Elektrode wechselwirken können.²⁴

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nicht untersucht, inwieweit die Bestimmung der Zerfallskonstanten durch die Anwesenheit von einwertigen Kationen und Anionen beeinflusst wird. Der Grund dafür ist, dass die Konzentration an einwertigen Kation in den Probelösungen vernachlässigbar gering ist.

Alle pH-Stat Titrations wurden im Bereich zwischen pH 1,2 und pH 3,0 durchgeführt. Die pH-Elektrode wird in diesem Bereich nicht durch die Anwesenheit von Fremdionen gestört,

solange der Inertelektrolyt im Überschuss in der Probelösung vorhanden ist. Bei allen pH-Stat Titrationen wird Tetramethylammoniumchlorid mit einer Konzentration von 1 mol/l als Inertelektrolyt verwendet, der nicht mit der Glasmembran der pH-Elektrode wechselwirken kann.

2.1.4.2 Bestimmung der Detektionsgrenzen und Quantifikationslimits

Das Detektionslimit wird als die Menge an Analyt definiert, welche bei einer Messung detektiert jedoch nicht quantifiziert werden kann. Quantifizierungslimit wird als die kleinste Menge des Analyten definiert, die quantifiziert werden kann.²³

Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Evaluierung der Detektionsgrenzen und des Quantifikationslimits der verwendeten pH-Elektrode durchgeführt.

Die minimale Komplexkonzentration in der Probelösung wird durch das Detektionslimit und Quantifikationslimit der pH-Elektrode bestimmt. Bei einer niedrigen Komplexkonzentration können bei einem vollständigen Komplexzerfall nur geringe Mengen an Protonen freigesetzt werden.

Ein Komplex, der bei einem vollständigen Zerfall maximal 6 Protonen aufnehmen kann, wird bei einem Start pH von 1 zum Zeitpunkt t_0 und einer Konzentration von 10 mmol/l, nach einem vollständigen Zerfall den pH-Wert nur um 0,4 pH Einheiten erhöhen. Die Erhöhung des pH-Wertes erfolgt durch die Aufnahme von Protonen durch den Komplex, wenn die Reaktion nicht pH-statisiert ist. Eine Reaktion mit einer so geringen Änderung des pH-Wertes bei einem vollständigen Komplexzerfall, kann nicht mit Hilfe der pH-Stat Methode beobachtet werden. Bei einer so geringen Änderungen des pH-Wertes, wenn der Komplex vollständig zerfällt, kann es dazu kommen, dass HCl bei den einzelnen Schritten während der pH-Stat Titration überdosiert wird. Grund dafür ist, dass die Änderungen des pH-Wertes welcher durch die einzelnen Zugaben von HCl während der Titration auslösen, sehr gering sind und nicht zuverlässig mit der verwendeten pH-Elektrode detektiert werden können. Aus diesem Grund kann der Komplexzerfall bei einer Startkonzentration von 10 mmol/l nicht mit der pH-Stat Methode quantifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit werden Titrationen mit einer initialen Konzentration von 70 mmol/l durchgeführt. Bei diesen Komplexkonzentrationen werden im Messbereich zwischen pH 1 und pH 3 während des Zerfalls genügend Protonen verbraucht, so dass die Reaktion durch eine pH-Stat Titration beobachtet und quantifiziert werden kann.

2.1.4.3 Validierung des Messbereiches der pH-Stat Methode

Der Messbereich ist ein Intervall, in dem es möglich ist, mit der definierten Präzision und der Empfindlichkeit, die Messergebnisse zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich die Zerfallskonstanten im Bereich zwischen $2,66 \cdot 10^{-7} 1/s$ und $1,03 \cdot 10^{-4} 1/s$ zu ermitteln.

Titrationen wurden im Bereich zwischen pH 1 und 3, bei einer Temperatur von 25 °C und 37 °C durchgeführt.

Untere Bestimmungsgrenze der Zerfallskonstanten.

Die untere Bestimmungsgrenze für die Zerfallskonstanten wird durch die Drift der Elektrode begrenzt. Bei sehr langsamen Zerfallsreaktionen ist es nicht möglich zwischen der Potentialänderung der pH-Elektrode aufgrund der Elektrodendrift und einer Potentialänderung, durch den Verbrauch von Protonen in der Lösung zu unterscheiden.

Eine Änderung des Potentials, größer als 10 mV/min wird von der Tiamo Steuerungssoftware des pH-Stat als Elektrodendrift erfasst. Dies entspricht einer Änderung des pH-Wertes von durchschnittlich 0,16 pH-Einheiten in einer Minute.

Zerfallsreaktionen, bei denen die Änderung des gemessenen Potentials die kleiner als die Elektrodendrift ist, können nicht durch pH-Stat Titration untersucht werden. Nach der Zugabe von HCl sollte das Absinken auf das eingestellte Potential mit einer Geschwindigkeit schneller als 10 mV/min erfolgen.

Obere Bestimmungsgrenze der kinetischen Zerfallskonstanten

Die Bestimmung der Zerfallskonstanten mit der pH-Stat Methode, kann sowohl durch die Reaktionszeit der pH-Elektrode auf die Potentialänderungen, als auch durch die maximale Zugaberate der Dosino Titriereinheit limitiert werden.

Eine Bürette mit dem Volumen 10 ml, hat gemäß den Angaben des Herstellers eine maximale Zugabegeschwindigkeit von 1,8ml/s. Unter der Annahme, dass die obere Bestimmungsgrenze der pH-Stat Methode nur von der maximalen Zugaberate beeinflusst wird, wird die Titrierkurve für den Komplex Gd-DTPA an der Bestimmungsgrenze bei einer Komplexkonzentration von 70 mM und Startvolumen 45 ml simuliert (Abbildung 14).

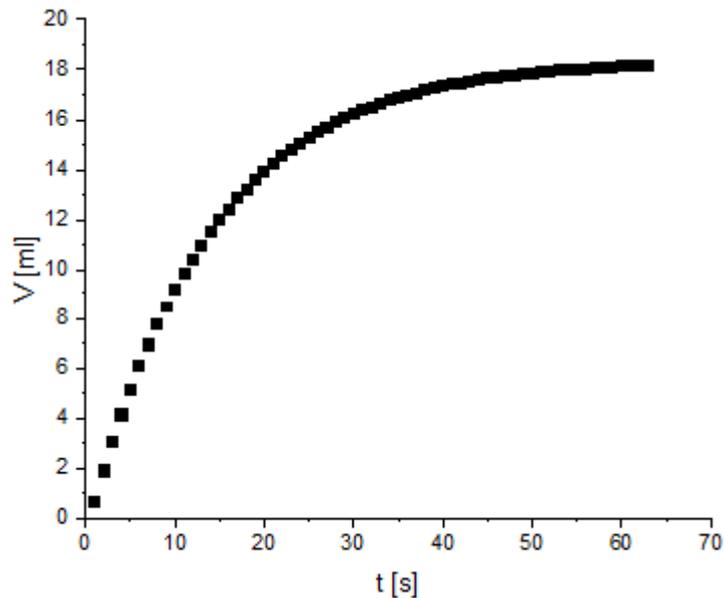


Abbildung 14: Simulierte Titrierkurve beim Zerfall vom Komplex Gd-DTPA an der Bestimmungsgrenze unter der Annahme, dass die Bestimmungsgrenze von der Zugaberate limitiert wird

Die Halbwertszeit der Zerfallsreaktion, die mit der simulierten Titrierkurve in der Abbildung 14 korreliert, beträgt 9,4 s. Die Reaktionskonstante unter den Bedingungen pseudo-erster Ordnung beträgt $7,31 \cdot 10^{-2}/s$.

Die Ansprechzeit einer pH-Elektrode auf Änderung des pH-Wertes beträgt 30 s. Deswegen ist es unwahrscheinlich, dass die Bestimmungsgrenze durch die Zugaberate vom pH-Stat limitiert wird. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die obere Detektionsgrenze hauptsächlich durch die Reaktionszeit der pH-Elektrode beeinflusst wird.

Eine simulierte Titrierkurve, welche nur durch eine Reaktionszeit der verwendeten pH-Elektrode beeinflusst wird, ist in der Abbildung 15 gezeigt.

Um zu gewährleisten, dass der pH-Stat bei der Titration auf die sehr geringen Änderungen vom pH-Wert reagieren kann, wird als die Wartezeit zwischen den einzelnen Zugabeschritten von HCl die doppelte Reaktionszeit der pH-Elektrode angenommen.

Ausgehend von der doppelten Reaktionszeit der pH-Elektrode auf Potentialänderungen und einer maximalen Zugaberate von 1,8 ml/min, während der pH-Stat Titration, wurde eine Titrationskurve an der Bestimmungsgrenze der pH-Stat Methode simuliert (Abbildung 15). Die logarithmische Auftragung zum Ermitteln der kinetischen Zerfallskonstante, resultierend aus der Simulierten Titrationskurve, ist in der Abbildung 16 dargestellt.

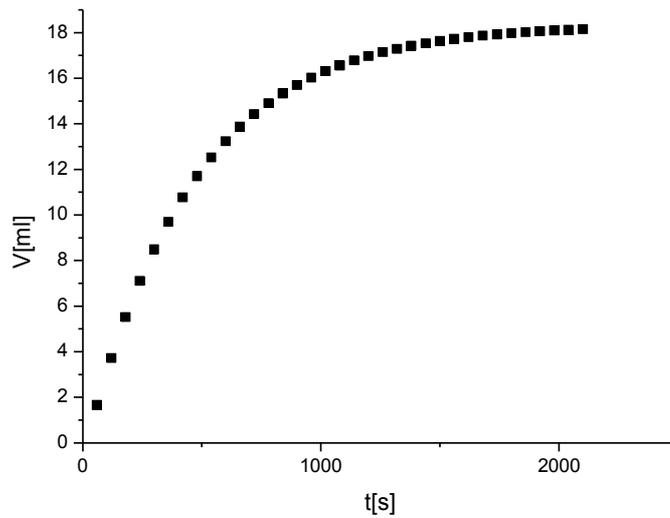


Abbildung 15: Simulierte Titrierkurve beim Zerfall vom Komplex Gd-DTPA an der Bestimmungsgrenze unter der Annahme, dass die Bestimmungsgrenze von der Reaktionszeit der pH-Elektrode (1 Minute) limitiert wird

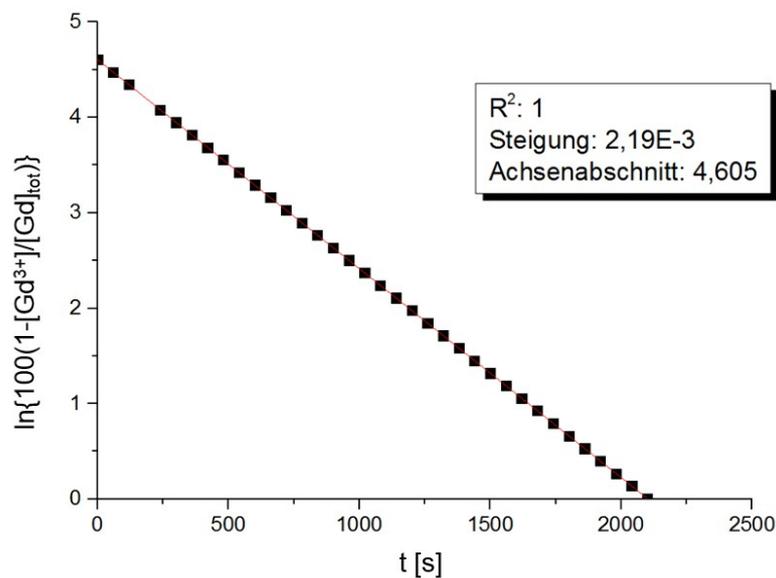


Abbildung 16: logarithmische Auftragung einer simulierten Titrierkurve, welche von der Reaktionszeit der pH-Elektrode beeinflusst wird, im Bereich der oberen Bestimmungsgrenze

Aus der Abbildung 16 ist erkennbar, dass die Zerfallskonstante der simulierten

Titrationsskurve, welche von der Reaktionszeit der Elektrode limitiert wird, $2,19 \cdot 10^{-3}/s$ beträgt.

Die Halbwertszeit der simulierten Reaktion, die durch die Reaktionszeit der pH-Elektrode limitiert wird beträgt 5,3 min. Reaktionen mit einer kleineren Halbwertszeit, können nicht mit der pH-Stat Methode bestimmt werden. Die Zerfallskonstanten, welche größer sind als $2,19 \cdot 10^{-3}/s$ können somit mit der pH-Stat Methode nicht ermittelt werden.

Evaluierung vom Temperaturbereich der pH-Stat Titration

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Messungen bei einer Temperatur von 25 °C und 37 °C erfolgreich durchgeführt. Weiterhin wurden im Rahmen der Dissertation von Tim Scharding pH-Stat Titrationsen bei 0 °C durchgeführt. Grundsätzlich sind Messungen im Bereich zwischen 0 °C und 100 °C möglich. Der Temperaturbereich in dem eine pH-Stat Titration möglich ist, wird durch den Schmelz- und Siedepunkt des Wassers limitiert.

Evaluierung vom pH Bereich der pH-Stat Titration

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Titrationsen im Bereich zwischen pH 1 und pH 3 durchgeführt. Der untere pH Bereich wird dadurch begrenzt, dass bei einem pH-Wert tiefer als 1, die Messungen durch einen möglichen Säurefehler der pH Elektrode beeinflusst werden können. Ein Säurefehler der pH Elektrode, führt dazu, dass pH-Werte detektiert werden, die höher als die tatsächlichen pH-Werte in der Probelösung sind.

Der obere pH-Bereich, bei dem eine Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten möglich ist, wird dadurch limitiert, dass mit steigendem pH-Wert im thermodynamischen Gleichgewicht immer weniger nicht komplexierter Ligand vorliegt. Bei pH-Werten höher als 3 ist im thermodynamischen Gleichgewicht, der überwiegende des Liganden/Metalls komplexiert. Deswegen ist eine pH-Stat Titration nicht möglich ist.

2.1.5 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten von GdDTPA

Alle offenkettigen MRT-Kontrastmittel besitzen das DTPA-Grundgerüst (Abbildung 17). Von BAYER HealthCare werden GdDTPA Komplexe als MRT Kontrastmittel unter dem Markennamen Magnevist vertrieben.¹² Zum jetzigen Zeitpunkt besteht keine Marktzulassung für Magnevist.

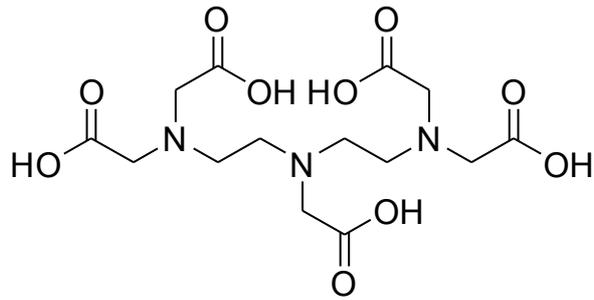


Abbildung 17: Ligand DTPA

Bei 25 °C und einem pH-Wert von 2 und kleiner, konnten im Rahmen dieser Arbeit keine kinetische Zerfallskonstanten mit der pH-Stat Methode bestimmt werden. Bei höheren pH-Werten, bei welchen der säurekatalysierte Komplexzerfall langsamer abläuft, war die Bestimmung von Zerfallskonstanten ebenfalls nicht möglich, weil bei pH-Werten höher als 2, im thermodynamischen Gleichgewicht nicht genügend freies Gadolinium(III) freigesetzt werden kann. Dieser Sachverhalt wird in der mit Hyss berechneten Teilchenverteilung in der Abbildung 18 gezeigt.²⁰

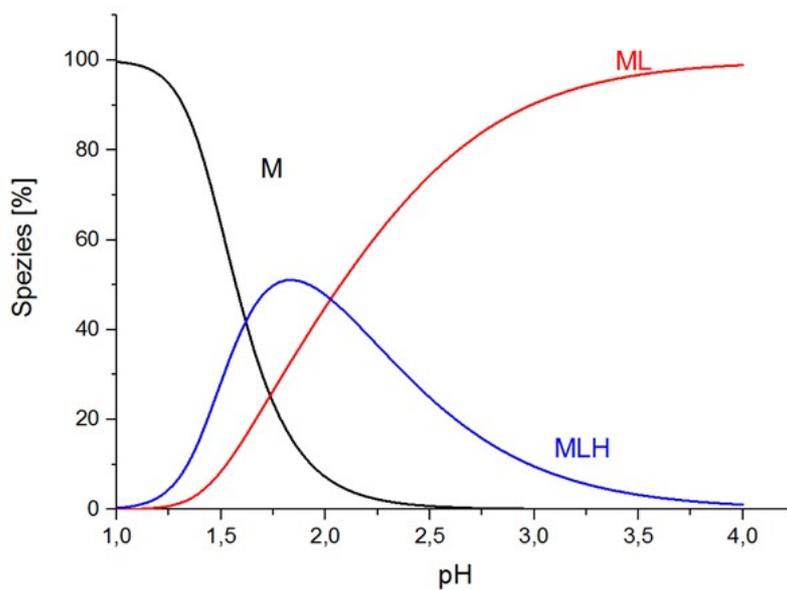


Abbildung 18: Mit Hyss berechnete Teilchenverteilung des Komplexes Gd-DTPA²⁰

Bei einer pH-Stat Titration von Gd-DTPA, versucht der pH-Stat mit einer maximal möglichen Zugabegeschwindigkeit Protonen nachzuliefern, welche durch den Zerfall sofort nach der Zugabe verbraucht werden. Weil der Komplex schneller zerfällt, als der pH-Stat

bei einer maximalen Zugaberate, Protonen nachliefern kann und die pH-Elektrode auf pH-Änderung beim Zerfall von GdDTPA nicht ausreichend schnell reagiert, wird als Titrierkurve eine Gerade erhalten (Abbildung 19).

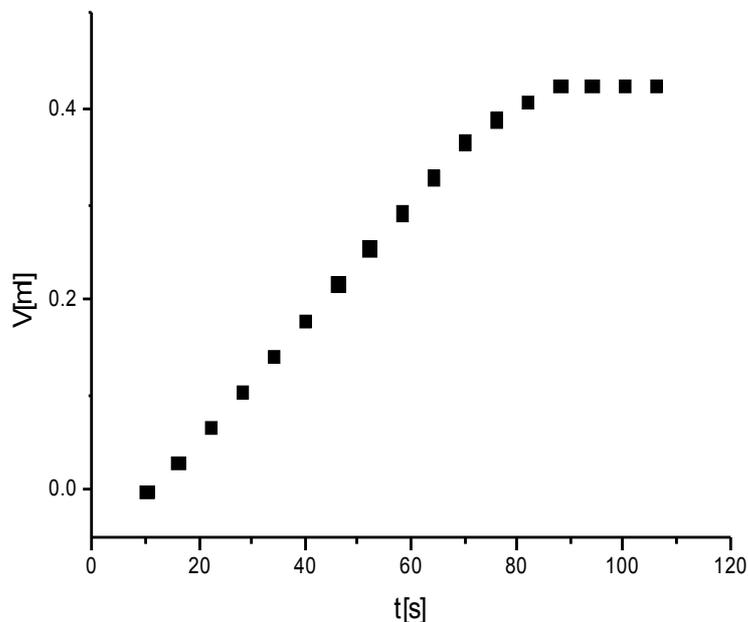


Abbildung 19: HCl Zugabe bei einer pH-Stat Titration von GdDTPA

Die erhaltene Titrierkurve spiegelt nicht den tatsächlichen Reaktionsverlauf wieder.

In der Abbildung 19 dargestellte Titrierkurve, zeigt die schnellst mögliche Zugabe von HCl des pH-Stats bei den gegebenen Bedingungen.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Zerfallskonstanten von Gd-DTPA nicht mit der pH-Stat Methode bestimmt werden kann ist, dass das berechnete Volumen, welches notwendig ist um den pH bei einem vollständigen Zerfall konstant zu halten, bei keiner der Titrationen von Gd-DTPA vom pH-Stat zugegeben wurde. Bei einem vollständigen Zerfall von GdDTPA mit einer Konzentration von 70 mmol/l und einem Startvolumen von 45 ml sind 18,35 ml 1 M HCl notwendig um den pH-Wert konstant zu halten.

Ein Grund für das nicht Zugeben des berechneten Volumens, bei der Titration von GdDTPA, ist der schnelle Zerfall des labilen Komplexes, während der Einstellung des pH-Wertes und dem Driften der pH-Elektrode sofort nach dem Start der Reaktion.

Der Grund für die geringe kinetische Stabilität von offenkettigen Gd^{3+} Komplexen mit

einem DTPA Grundgerüst im Vergleich zu makrozyklischen Gd³⁺ Komplexen, ist die hohe Konformationsmobilität des Liganden DTPA. Die hohe Konformationsmobilität führt dazu, dass eine Umlagerung von Protonen, welche während des Komplexzerfalls mit einer hohen Geschwindigkeit erfolgt und die Zerfallsreaktion deswegen nicht mit der pH-Stat Methode beobachtet werden kann.

Weitere offenkettige, für den Markt zugelassene, MRT-Kontrastmittel auf Gd³⁺ Basis, besitzen ebenfalls das DTPA Grundgerüst. Aus diesem Grund ist zu erwarten, dass alle offenkettige MRT-Kontrastmittel, die für den Markt zugelassen sind, ebenfalls eine geringe kinetische Stabilität haben. Deswegen ist die Bestimmung der Zerfallskonstanten von offenkettigen MRT-Kontrastmittel mit der pH-Stat Methode nicht möglich.⁵

2.1.5.1 Vergleich der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-DTPA

Aus der Literatur bekannte kinetische Zerfallskonstanten k_{obs} von Gd-DTPA, die durch Umkomplexierung bestimmt wurden, sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Vergleich der unterschiedlichen Studien zur Bestimmung der Zerfallskonstanten von Gd-DTPA bei 25 °C

Studie	Methode	k_{obs} [1/s]	$t_{1/2}$ [s]
Brucher ¹⁹	Umkomplexierung mit Cu ²⁺ (pH=4,92, T=25 °C)	$1,38 \cdot 10^{-2}$	50,2
	Umkomplexierung mit Zn ²⁺ (pH=4,62, T=25 °C)	$0,32 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^{-3}$
	Umkomplexierung mit Eu ³⁺ (pH=4,75, T=25 °C)	$2,0 \cdot 10^{-4}$	3474
Tweedel ¹⁸	Umkomplexierung mit Cu ²⁺ (pH=1, T=25 °C)	$1,2 \cdot 10^{-3}$	577,6
Port ¹⁷	Umkomplexierung mit Eu ³⁺ (pH=1, T=25 °C)	n. d.	< 5
Weibert	pH-Stat (T=25 °C)	$< 2,19 \cdot 10^{-3}$	>316

Beim Vergleich der Zerfallskonstanten in der Tabelle 5 ist erkennbar, dass Gd-DTPA sehr labil ist. Die Halbwertszeiten weichen je nach Studie stark voneinander ab und sind nur in geringerem Maße miteinander vergleichbar.

Die Studie von Brucher et al¹⁹ zeigt, dass der Zerfall durch Transmetallierung vom verwendeten Metall beeinflusst wird. Weiterhin wird laut der Studie von Brucher der Zerfall von Gd-DTPA durch Transmetallierung mit Cu²⁺ und Zn²⁺ nicht vom pH-Wert beeinflusst, was der Studie von Tweedle¹⁸ widerspricht.

2.1.6 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten von GdDOTA

Der Komplex GdDOTA wird von der Firma Guerbet unter dem Markennamen Dotarem vertrieben und findet Anwendung als MRT-Kontrastmittel. Neben dem Einsatz als Kontrastmittel hat DOTA (Abbildung 20) weitere Einsatzmöglichkeiten in der Medizin.⁴

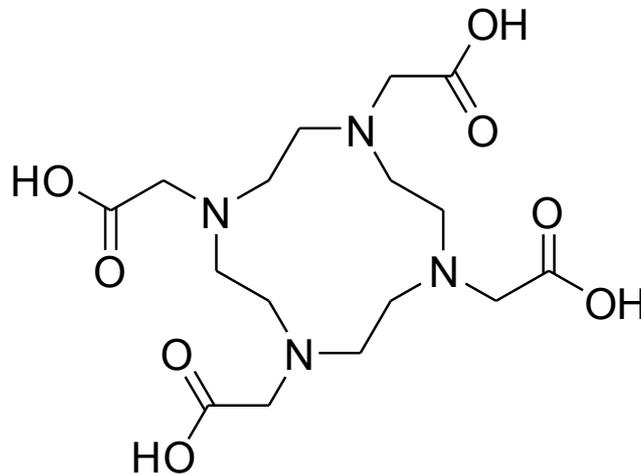


Abbildung 20: Ligand DOTA

Verglichen mit den makrozyklischen Liganden BT-DO3A und HP-DO3A, die mit Gd^{3+} komplexiert als MRT-Kontrastmittel verwendet werden, hat DOTA eine sehr viel höhere kinetische Stabilität und zerfällt sehr langsam.

Das hängt damit zusammen, dass DOTA im Unterschied zu anderen makrozyklischen MRT-Kontrastmitteln vier Carbonsäuregruppen hat, die besonders gut an das Gd^{3+} koordinieren.

Bei pH 1,5 und einer Temperatur von 25 °C konnte innerhalb eines Zeitraums von fünf Tagen kein Zerfall des DOTA Komplexes beobachtet werden. Aus der Abbildung 21, ist erkennbar, dass bei einer nicht pH-statisierten Messung das gemessene Elektrodenpotential im Bereich zwischen 314,9 mV und 315 mV schwankt. Bei dieser Schwankung handelt es sich um den Drift der verwendeten pH-Elektrode. Nach weiteren fünf Tagen, blieb das gemessene Potential weiterhin konstant.

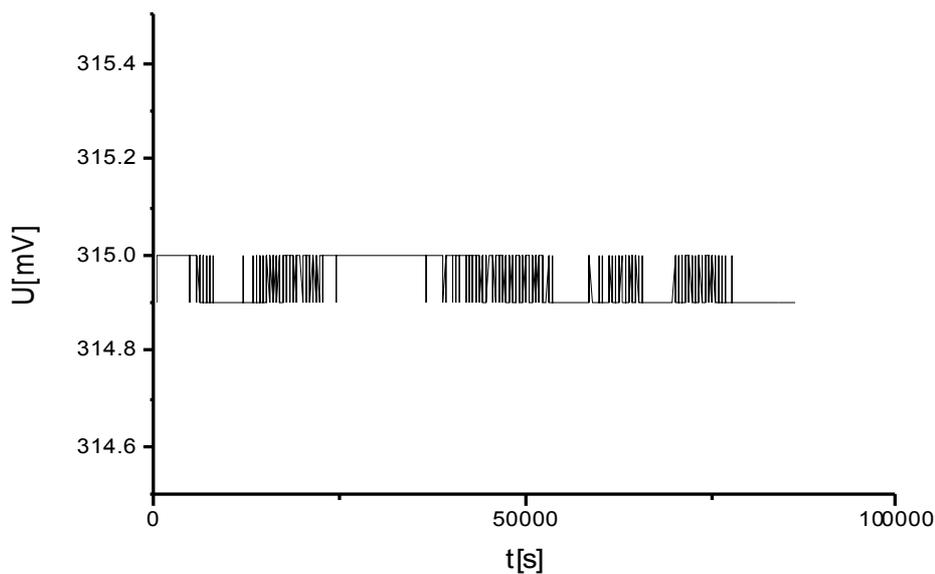


Abbildung 21: Potentialänderung von Komplex DOTA bei pH=1,5 und T=25°C

Bei pH-Werten die kleiner sind als 1,5, bei denen der säurekatalysierte Komplexzerfall von GdDOTA schneller abläuft, fällt der Komplex in Form eines farblosen Niederschlags wenige Minuten nach dem Start der Messung aus. Dies macht eine pH-Stat Titration bei pH- Werten kleiner als 1,5 bei den gegebenen Bedingungen unmöglich.

Um den Zerfall von GdDOTA zu untersuchen, ist es notwendig die Messung bei 37 °C durchzuführen.

2.1.6.1 Vergleich der kinetischen Zerfallskonstanten von GdDOTA

Literaturbekannte Zerfallskonstanten von GdDOTA sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Vergleich der unterschiedlichen Studien zur Bestimmung der Zerfallskonstanten von GdDOTA bei 25 °C und bei 37 °C

Studie	Methode	k_{obs} [1/s]
Wang ²⁵	Adsorption von ^{135}Gd an Ionenaustauscher (T=25 °C)	$8,4 \cdot 10^{-6}$
Toth ²⁶	Umkomplexierung mit Eu^{3+} (pH=2,7, T=25 °C)	$2,0 \cdot 10^{-5}$
Schwitzer ²⁷	Adsorption von ^{135}Gd an Ionenaustauscher (pH>2, T=25 °C)	$3,6 \cdot 10^{-5}$
Port ¹⁷	Umkomplexierung (pH=1,2, T=37 °C)	$2,3 \cdot 10^{-6}$
Port ¹⁷	Umkomplexierung (pH=1,0, T=37 °C)	$7,3 \cdot 10^{-6}$
Port ¹⁷	Umkomplexierung (pH=1,0, T=25 °C)	$5,7 \cdot 10^{-7}$
Weibert	pH-Stat (pH<1,3 T=25 °C)	$>2,0 \cdot 10^{-7}$

Beim Vergleich, der in der Tabelle 6 angegebenen Zerfallskonstanten und der dafür verwendeten Methoden wird erkennbar, dass der Komplex GdDOTA sehr inert ist. Die Halbwertszeit des Zerfalls von GdDOTA bei 25 °C gemessen mit der pH-Stat Methode ist größer als 962,7 Stunden.

Weiterhin konnte der Zerfall vom Komplex GdDOTA nur bei kleinen pH-Werten beobachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich mit der pH-Stat Methode die Zerfallskonstanten von GdDOTA zu ermitteln, da der Komplex sehr inert ist.

Die kinetischen Zerfallskonstanten von GdDOTA bei 25 °C bestimmt mit der pH-Stat Methode liegen außerhalb des Arbeitsbereichs der Methode. Die Zerfallskonstanten sind kleiner als $2,0 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$. Die Halbwertszeit des Zerfalls von GdDOTA bei 25 °C beobachtet mit der pH-Stat Methode ist größer als 962,7 Stunden. Der Zerfall von GdDOTA wird durch die Anwesenheit von Lanthanoiden und Übergangsmetallen in der Probelösung katalysiert. Weiterhin wurde der Zerfall bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Deswegen sind die Zerfallskonstanten von GdDOTA, welche in der Tabelle 6 angegeben sind, nur bedingt miteinander vergleichbar.

2.1.7 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A

Der Ligand BT-DO3A (Abbildung 22) komplexiert mit Gd^{3+} und wird unter dem Markennamen Gadovist von der Firma BAYER HealthCare als MRT-Kontrastmittel vertrieben.

Der Komplex Gd-BT-DO3A wird hauptsächlich als Kontrastmittel für Untersuchungen des Gehirns, der Wirbelsäule und der Blutgefäße verwendet. Durch die Injektion von Gadovist ist es möglich pathogenes Gewebe im Körper darzustellen.⁵

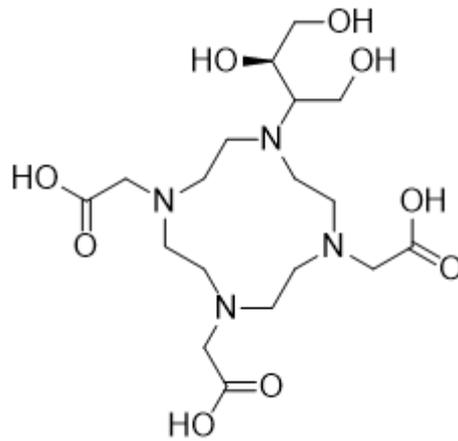


Abbildung 22: Ligand BT-DO3A

Zur Bestimmung der Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A mit der pH-Stat Methode, wurde der Komplex bei einer Temperatur von 25 °C und 37 °C titriert.

Die kinetischen Zerfallskonstanten k_{obs} von Gd-BT-DO3A bei 25 °C und die dazugehörigen Halbwertszeiten sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zerfallskonstanten von Komplex Gd-BT-DO3A bei 25 °C

pH	k_{obs} [1/s]	$t_{1/2}$ [s]	$t_{1/2}$ [h]
1,54	$1,62 \cdot 10^{-6}$	426815	118,56
1,59	$1,31 \cdot 10^{-6}$	527309	146,47
1,75	$9,47 \cdot 10^{-7}$	731600	203,22
1,76	$8,96 \cdot 10^{-7}$	773774	214,94
1,76	$9,50 \cdot 10^{-7}$	729628	202,67
1,89	$5,80 \cdot 10^{-7}$	1195493	332,08
2,01	$4,63 \cdot 10^{-7}$	1498049	416,12
2,10	$3,57 \cdot 10^{-7}$	1940502	539,03
2,28	$2,40 \cdot 10^{-7}$	2886910	801,92
2,28	$2,26 \cdot 10^{-7}$	3065666	851,57
2,30	$2,26 \cdot 10^{-7}$	3067023	851,95
2,31	$1,99 \cdot 10^{-7}$	3491925	969,98

Die Zerfallskonstanten k_{obs} von Gd-BT-DO3A, aufgenommen bei unterschiedlichen pH-Werten und einer Temperatur von 25 °C sind in der Abbildung 23 gezeigt.

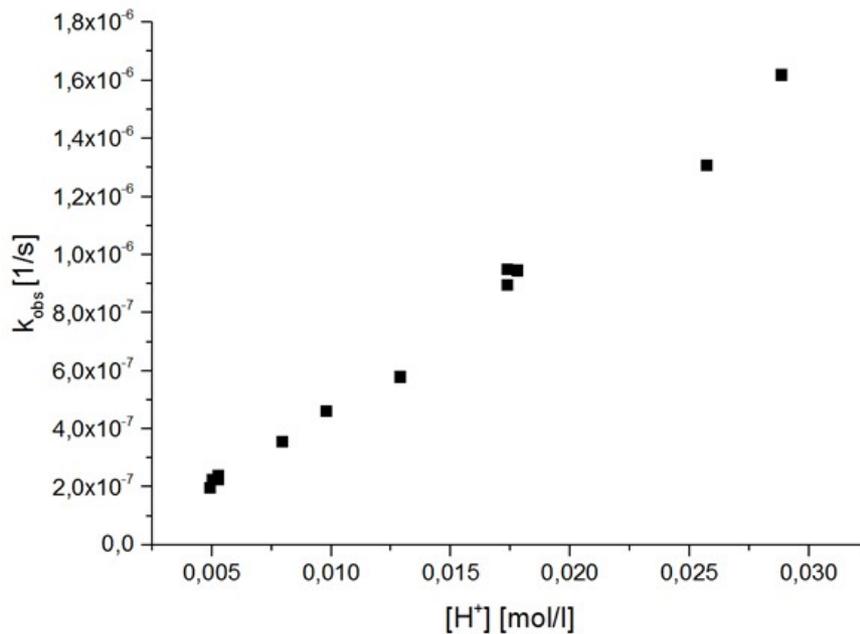


Abbildung 23: Änderung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A abhängig von der Protonenkonzentration bei 25 °C

Aus der Abbildung 23 ist erkennbar, dass mit steigender Protonenkonzentration die Konstanten k_{obs} größer werden, die Zerfallsgeschwindigkeit vom Komplex Gd-BT-DO3A sinkt dementsprechend mit steigendem pH-Wert. Dies wird auch beim Vergleich der Halbwertszeiten in Tabelle 7 sichtbar. Die Steigung der Zerfallsgeschwindigkeit bei einer Erhöhung der Protonenkonzentration in der Probelösung, kann damit erklärt werden, dass beim Zerfall der Komplex Gd-BT-DO3A protoniert wird. Mit steigender Protonenkonzentration in der Probelösung, steigt auch die Wahrscheinlichkeit einer Protonierung des Komplexes.

Der Zerfallsmechanismus von Komplexen, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wird im Abschnitt 2.1.10 diskutiert.

Zerfallskonstanten und Halbwertszeiten von Komplex Gd-BT-DO3A, bei einer Temperatur von 37 °C ermittelt durch pH-Stat Titration sind in Tabelle 8 gezeigt. Die Änderung der Zerfallskonstanten k_{obs} abhängig von der Protonenkonzentration bei einer Temperatur von 37 °C ist in der Abbildung 24 dargestellt.

Tabelle 8: Kinetische Zerfallskonstanten vom Komplex Gd-BT-DO3A bei 37 °C

pH	k_{obs} [1/s]	t_{1/2} [s]	t_{1/2}[h]
1,14	1,89·10 ⁻⁵	36752	10,21
1,18	1,60·10 ⁻⁵	43322	12,03
1,20	1,60·10 ⁻⁵	43241	12,01
1,38	1,01·10 ⁻⁵	68358	18,99
1,41	8,68·10 ⁻⁶	79837	22,18
1,42	8,78·10 ⁻⁶	78937	21,93
1,51	5,76·10 ⁻⁶	120422	33,45
1,52	5,76·10 ⁻⁶	120296	33,42
1,52	6,10·10 ⁻⁶	113612	31,56
1,79	3,18·10 ⁻⁶	218108	60,59
1,80	3,07·10 ⁻⁶	225854	62,74
1,96	2,46·10 ⁻⁶	281653	78,24
2,07	1,65·10 ⁻⁶	420599	116,83
2,08	1,67·10 ⁻⁶	414810	115,22
2,09	1,54·10 ⁻⁶	449803	124,95
2,27	1,16·10 ⁻⁶	597541	165,98
2,28	1,18·10 ⁻⁶	588660	163,52
2,38	8,14·10 ⁻⁷	851741	236,59
2,46	6,90·10 ⁻⁷	1003877	278,85
2,46	7,03·10 ⁻⁷	986406	274,00
2,57	5,14·10 ⁻⁷	1349664	374,91
2,75	4,00·10 ⁻⁷	1733301	481,47
2,83	2,50·10 ⁻⁷	2770372	769,55
2,86	2,20·10 ⁻⁷	3150669	875,19
2,87	2,21·10 ⁻⁷	3143525	873,20
2,88	2,20·10 ⁻⁷	3150669	875,19

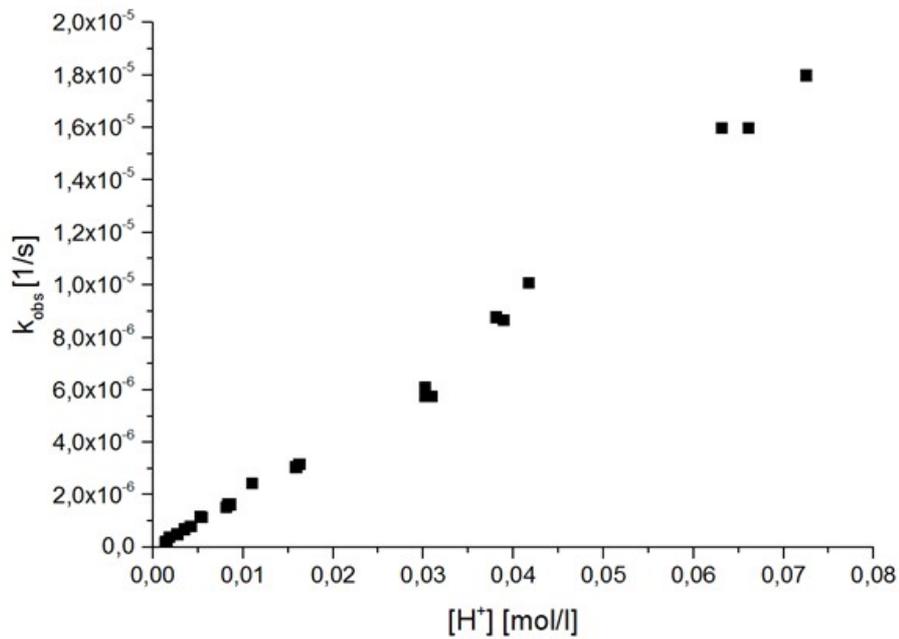


Abbildung 24: Änderung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A abhängig von der Protonenkonzentration bei 37 °C

Um die einzelnen Messreihen bei 25 °C und 37 °C besser miteinander vergleichen zu können werden die Zerfallskonstanten k_{obs} logarithmisch gegen den pH aufgetragen (Abbildung 25).

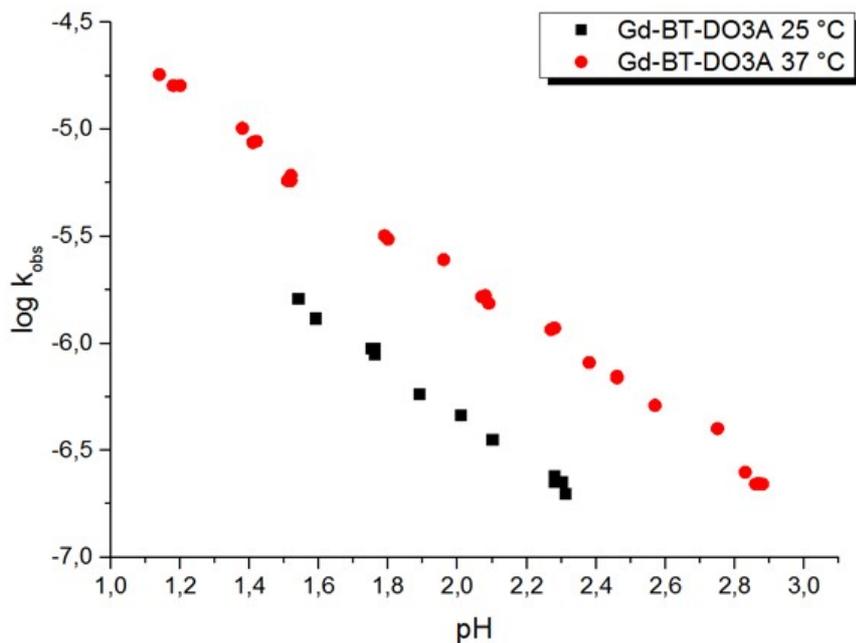


Abbildung 25: Logarithmische Auftragung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A bei 25 °C und 37 °C

Aus dem direkten Vergleich der kinetischen Zerfallskonstanten (Abbildung 25) von Gd-BT-DO3A ist erkennbar, dass der Zerfall bei 37 °C schneller abläuft. Diese Tatsache wird auch beim Vergleich der Halbwertszeiten in Tabelle 7 und Tabelle 8 sichtbar.

Die höhere Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C kann dadurch begründet werden, dass je höher die Reaktionstemperatur ist, desto schneller kann für die Reaktion benötigte Aktivierungsenergie aufgebracht werden. Dies führt zu einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit.

Die logarithmische Auftragung der Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A liefert sowohl bei 37 °C als auch bei 25 °C jeweils eine Gerade. Beide Geraden verlaufen parallel zueinander, da sich die Zerfallskonstanten k_{obs} von GD-BT-DO3A im gleichen Maße abhängig vom pH-Wert beeinflusst werden.

Der lineare Fit der logarithmischen Auftrugungen der Konstanten k_{obs} gegen den pH, bei 37 °C und 25 °C von Komplex Gd-BT-DO3A sind in der Abbildung 26 und Abbildung 27 gezeigt.

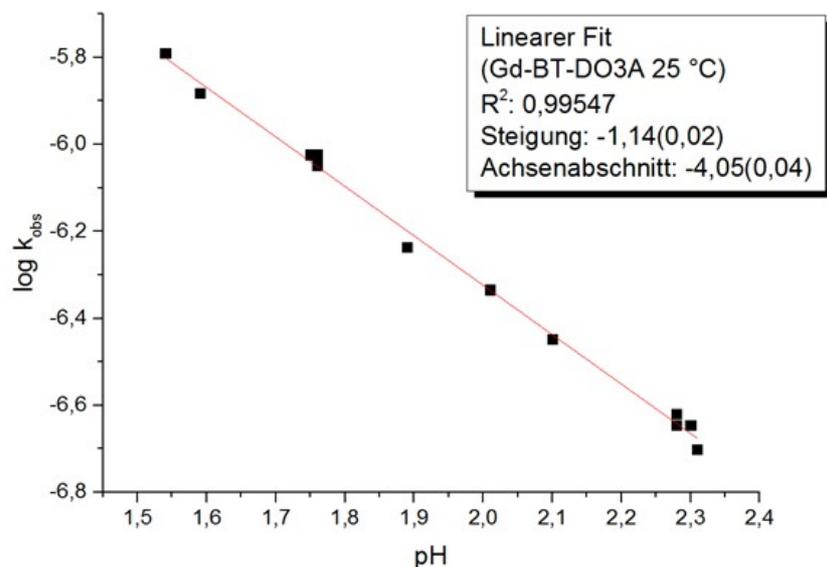


Abbildung 26: Linearer Fit der logarithmischen Auftragung von Zerfallskonstanten k_{obs} gegen den pH von Gd-BT-DO3A bei 25 °C

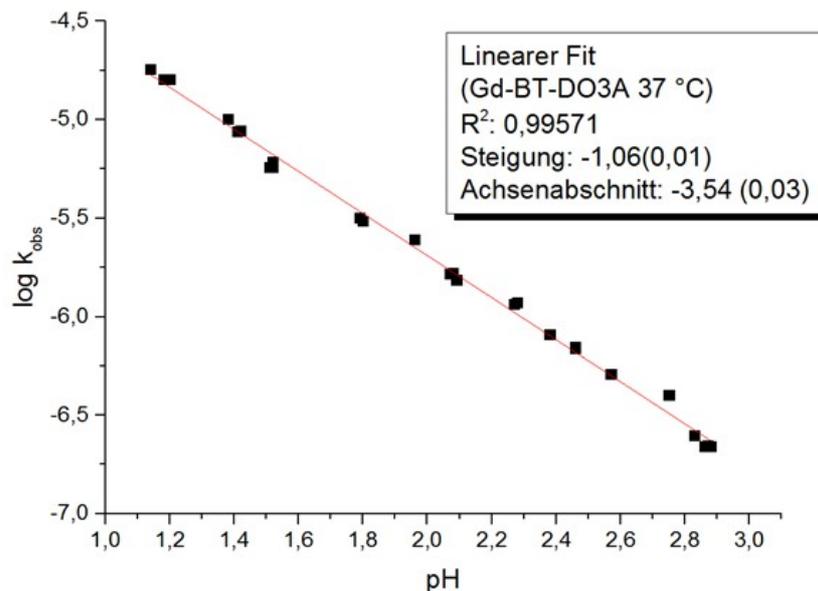


Abbildung 27: Linearer Fit der logarithmischen Auftragung von Zerfallskonstanten k_{obs} gegen den pH von Gd-BT-DO3A bei 37 °C

Beim Vergleich der Steigungen von den linearen Fits der Messreihen von Gd-BT-DO3A bei 25 °C und 37 °C (Abbildung 26 und Abbildung 27) ist zu sehen, dass die logarithmische Auftragung der Messreihen, aufgenommen bei einer Temperatur von 25 °C, die Steigung von 1,14 hat. Die Steigung der Messreihe, aufgenommen bei 37 °C, hat die Steigung 1,06. Der geringe Unterschied der Steigungen kann damit erklärt werden, dass der Komplex Gd-BT-DO3A sowohl bei 37 °C als auch bei 25 °C innerhalb des Messbereichs den gleichen Zerfallsmechanismus hat, der in gleichem Maße von der Protonenkonzentration beeinflusst wird.

Der höhere Achsenabschnitt der logarithmischen Auftragung bei der Messreihe, aufgenommen bei 37 °C, verglichen mit der logarithmischen Auftragung der Messreihe bei 25 °C, kann damit erklärt werden, dass der Komplexzerfall bei 37 °C schneller erfolgt.

Mit Hilfe der Geradengleichung, die durch das Anpassen der logarithmischen Auftragung der Konstanten k_{obs} gegen den pH einer Messreihe, aufgenommen bei gleicher Temperatur, ist es möglich die Zerfallskonstanten k_{obs} bei jeden beliebigen pH-Werten innerhalb des Messbereich zu bestimmen.

Der Messbereich bei hohen pH-Werten, wird im thermodynamischen Gleichgewicht zwischen komplexierten und nicht komplexierten Liganden begrenzt, die sich bei einem definierten pH-Wert einstellt. Je höher der pH-Wert, desto geringer ist der Anteil an nicht komplexierten Ligand im thermodynamischen Gleichgewicht.

Die Teilchenverteilung von BT-DO3A bei Anwesenheit von Gd^{3+} nach der Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts, abhängig von pH, ist in Abbildung 28 gezeigt.²⁰

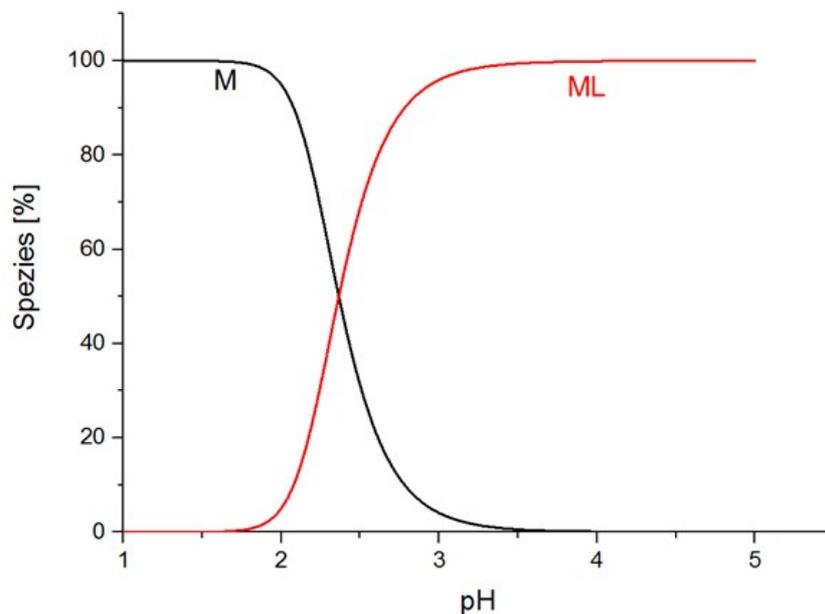


Abbildung 28: Teilchenverteilung von Ligand BT-DO3A in Anwesenheit von Gadolinium (III) abhängig vom pH-Wert

Aus der Teilchenverteilung (Abbildung 28) ist erkennbar, dass bei pH-Werten höher als 3 der Ligand BT-DO3A in signifikanten Mengen komplexiert vorliegt. Da bei einer pH-Stat Titration die Rückkehr in das thermodynamische Gleichgewichts beobachtet wird, ist die Bestimmung der Zerfallskonstanten mit der pH-Stat Methode bei pH-Werten höher als 3 nicht möglich. Bei pH-Werten höher als 3 werden maximal 4 % des Metalls freigesetzt, sobald das thermodynamische Gleichgewicht erreicht ist, was zu einer sehr geringen Änderung des pH-Wertes führt.

Die Bestimmung der Zerfallskonstanten, durch die Extrapolation der logarithmischen Auftragung der Zerfallskonstanten k_{obs} gegen den pH einer Messreihe zu Werten höher als pH 3, ist nicht möglich. Bei hohen pH-Werten ist die Wahrscheinlichkeit einer Protonierung des Komplexes, welche für den Zerfall notwendig ist, sehr gering.

2.1.7.1 Vergleich der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A

Aus der Literatur bekannte kinetische Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Vergleich der Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A

Studie	Methode	k_{obs} [1/s]
Toth ²⁸	Umkomplexierung mit Eu ³⁺ (pH=3,2, T=25 °C)	$2,8 \cdot 10^{-5}$
Port ¹⁷	Umkomplexierung (pH=1, T=25 °C)	$4,5 \cdot 10^{-6}$
Port ¹⁷	Umkomplexierung (pH=1, T=37 °C)	$2,4 \cdot 10^{-5}$
Weibert	pH-Stat (pH 1,54 bis 2,31, T=25 °C)	$1,62 \cdot 10^{-6}$ bis $1,99 \cdot 10^{-7}$
Weibert	pH-Stat (pH 1,14 bis 2,31, T=37 °C)	$1,89 \cdot 10^{-5}$ bis $2,20 \cdot 10^{-7}$

Aus der Tabelle 9 ist erkennbar, dass die vom Port et al¹⁸ bestimmte kinetische Zerfallskonstanten, sowohl bei einer Temperatur von 25 °C als auch bei einer Temperatur von 37 °C, trotz einer unterschiedlichen Bestimmungsmethode eine ähnliche Größenordnung hat, wie die Zerfallskonstanten, welche im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden.

Die Studie von Toth³¹ wurde bei einem pH-Wert durchgeführt, in der die Bestimmung der Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A mit der pH-Stat Methode nicht möglich ist. Die von Toth et al³¹ bestimmte Zerfallskonstante von Gd-BT-DO3A sind höher, als die Zerfallskonstanten, die mit der pH-Stat Methode im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden.

2.1.8 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A

Der Ligand HP-DO3A (Abbildung 29) komplexiert mit Gd³⁺ wird unter dem Markennamen Prohance von der Firma Bracco Imaging als MRT-Kontrastmittel vertrieben.

Der Komplex Gd-HP-DO3A wird hauptsächlich als MRT Kontrastmittel für Spinal- und Zerebral- MRT-Untersuchungen, um Läsionen des Gewebes in diesen Bereichen sichtbar zu machen, eingesetzt.⁹

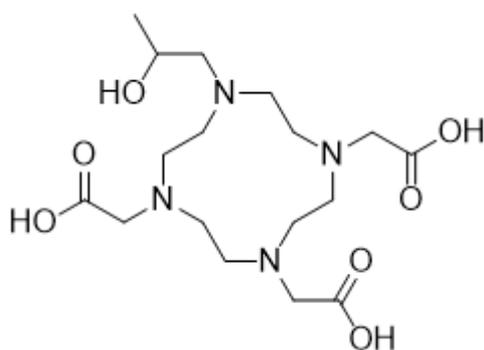


Abbildung 29: Ligand HP-DO3A

Zur Bestimmung der Zerfallskonstanten mit der pH-Stat Methode, wurde der Komplex Gd-HP-DO3A bei einer Temperatur von 25 °C und 37 °C titriert.

Die Zerfallskonstanten k_{obs} von Gd-HP-DO3A bei 25 °C und die dazugehörigen Halbwertszeiten sind in der Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Zerfallskonstanten vom Komplex Gd-HP-DO3A bei 25 °C

pH	k_{obs} [1/s]	$t_{1/2}$ [s]	$t_{1/2}$ [h]
1,20	$3,34 \cdot 10^{-5}$	20753	5,76
1,37	$2,30 \cdot 10^{-5}$	30111	8,36
1,47	$1,81 \cdot 10^{-5}$	38338	10,65
1,63	$1,39 \cdot 10^{-5}$	49867	13,85
1,91	$6,16 \cdot 10^{-6}$	112579	31,27
1,95	$5,49 \cdot 10^{-6}$	126302	35,08
2,01	$4,73 \cdot 10^{-6}$	146419	40,67
2,02	$4,61 \cdot 10^{-6}$	150445	41,79
2,30	$2,36 \cdot 10^{-6}$	293619	81,56
2,35	$1,81 \cdot 10^{-6}$	382954	106,38
2,40	$1,51 \cdot 10^{-6}$	459525	127,65
2,60	$7,93 \cdot 10^{-7}$	874082	242,80
2,71	$5,78 \cdot 10^{-7}$	1199217	33312
2,97	$3,27 \cdot 10^{-7}$	2121663	589,35

Die Zerfallskonstanten k_{obs} von Gd-HP-DO3A aufgenommen bei unterschiedlichen pH-Werten sind in der Abbildung 30 gezeigt.

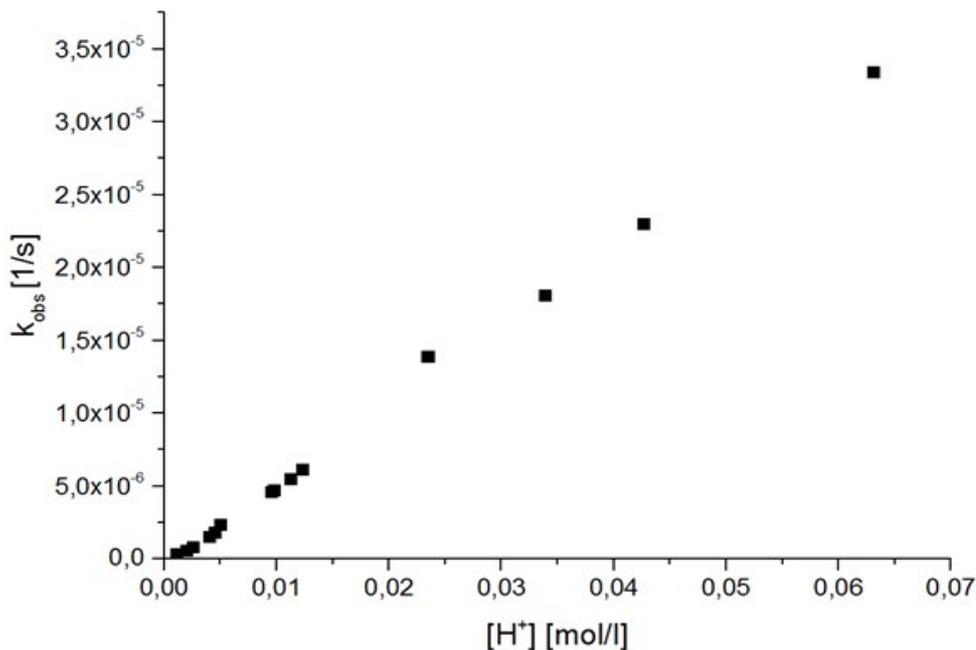


Abbildung 30: Änderung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A abhängig von der Protonenkonzentration bei 25 °C

Aus der Abbildung 30 ist erkennbar, dass mit steigender Protonenkonzentration die Konstanten k_{obs} größer werden. Die Zerfallsgeschwindigkeit vom Komplex Gd-HP-DO3A wird dementsprechend mit steigendem pH-Wert langsamer, was auch beim Vergleich der Halbwertszeiten in Tabelle 10 sichtbar ist. Die Steigung der Zerfallsgeschwindigkeit, bei einer Erhöhung der Protonenkonzentration in der Probelösung, kann damit erklärt werden, dass beim Zerfall von Gd-HP-DO3A zunächst eine Protonierung vom Komplex erfolgt. Mit steigender Protonenkonzentration in der Probelösung, steigt auch die Wahrscheinlichkeit einer Protonierung des Komplexes. Der genaue Zerfallsmechanismus, der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Komplexe, wird im Abschnitt 2.1.10 diskutiert.

Zerfallskonstanten vom Komplex Gd-HP-DO3A, die bei einer Temperatur von 37 °C aufgenommen worden sind, werden in der Tabelle 11 gezeigt. Die Zerfallskonstanten k_{obs} vom Komplex Gd-HP-DO3A, abhängig vom pH-Wert sind in der Abbildung 31 dargestellt.

Tabelle 11: Kinetische Zerfallskonstanten vom Komplex Gd-HP-DO3A bei 37 °C

pH	k_{obs} [1/s]	t_{1/2} [s]	t_{1/2}[h]
1,31	1,03·10 ⁻⁴	6730	1,87
1,42	8,30·10 ⁻⁵	8354	2,32
1,44	7,41·10 ⁻⁵	9354	2,60
1,53	6,46·10 ⁻⁵	10724	2,98
1,62	4,72·10 ⁻⁵	18653	5,18
1,72	3,72·10 ⁻⁵	18650	5,18
1,72	3,72·10 ⁻⁵	18653	5,18
1,81	3,21·10 ⁻⁵	21593	6,00
1,99	1,77·10 ⁻⁵	39117	10,87
2,08	1,49·10 ⁻⁵	46554	12,93
2,09	1,62·10 ⁻⁵	42787	11,89
2,22	1,11·10 ⁻⁵	62266	17,30
2,22	1,11·10 ⁻⁵	62446	17,35
2,24	9,79·10 ⁻⁶	70802	19,67
2,26	9,78·10 ⁻⁶	70907	19,70
2,37	7,29·10 ⁻⁶	95082	26,41
2,52	5,06·10 ⁻⁶	137040	38,07
2,55	4,77·10 ⁻⁶	145405	40,39
2,63	3,81·10 ⁻⁶	182086	50,58
2,65	3,51·10 ⁻⁶	197590	54,89

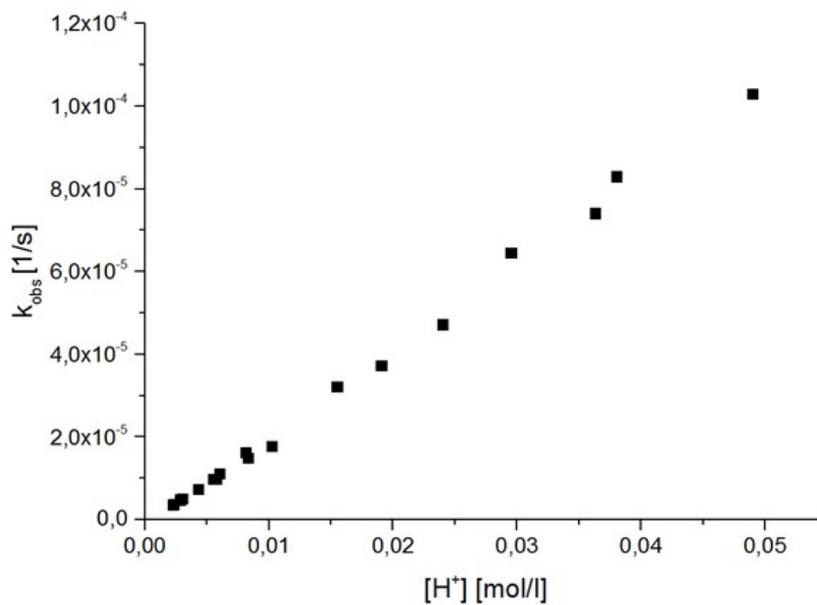


Abbildung 31: Änderung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A abhängig von der Protonenkonzentration bei 37 °C

Aus der Abbildung 31 ist erkennbar, dass der Komplex Gd-HP-DO3A bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C mit einer steigenden Protonenkonzentration schneller zerfällt. Der Zerfall von Gd-HP-DO3A, verläuft sowohl bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C als auch bei 37 °C säurekatalysiert.

Um die einzelnen Messreihen bei 25 °C und 37 °C besser miteinander vergleichen zu können werden kinetische Zerfallskonstanten k_{obs} vom Gd-HP-DO3A logarithmisch gegen den pH aufgetragen (Abbildung 32).

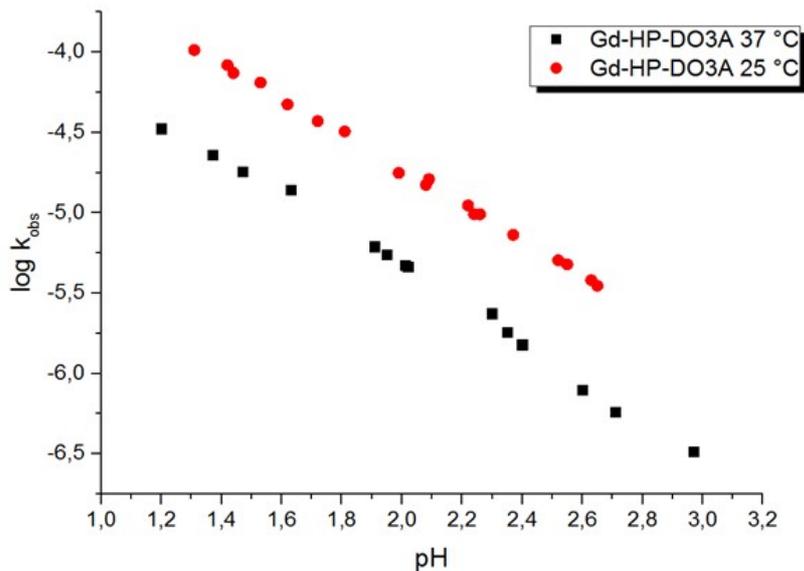


Abbildung 32: Logarithmische Auftragung der kinetischen Zerfallskonstanten vom Komplex Gd-HP-DO3A bei 25 °C und 37 °C

Aus dem direkten Vergleich der kinetischen Zerfallskonstanten (Abbildung 32) von HP-DO3A ist erkennbar, dass der Zerfall bei 37 °C schneller abläuft, was auch beim Vergleich der Halbwertszeiten in Tabelle 11 und Tabelle 10 sichtbar wird.

Die höhere Reaktionsgeschwindigkeit bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C kann dadurch begründet werden, dass je höher die Reaktionstemperatur ist, desto schneller kann für die Reaktion benötigte Aktivierungsenergie aufgebracht werden. Dies führt zu einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit.

Die logarithmische Auftragung der Zerfallskonstanten von HP-DO3A sowohl bei 37 °C als auch bei 25 °C liefert jeweils eine Gerade. Beide Geraden verlaufen parallel zueinander, da sich die Zerfallskonstanten k_{obs} von GD-HP-DO3A im gleichen Maße abhängig vom pH-Wert beeinflusst werden.

Bei der logarithmischen Auftragung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A bei 25 °C abhängig vom pH-Wert, kann in Bereich zwischen pH 2,3 und 3,0 eine höhere Steigung beobachtet werden als im Bereich zwischen pH 1,2 und pH 2,3. Bei 37 °C wurden keine unterschiedlichen Steigungen bei einer Messreihe beobachtet. Die Ursache für die scheinbar höhere Steigung im Bereich zwischen pH 2,3 und 3,0, ist eine Streuung der ermittelten Zerfallskonstanten, verursacht durch Elektrodendrift. Die kinetischen Zerfallskonstanten können um 2,9 % vom tatsächlichen Wert abweichen die Abweichung der Zerfallskonstanten im Bereich zwischen pH 2,3 und 3,0 liegt innerhalb des Intervalls

dieses Intervalls von 2,9 %.

Der lineare Fit der logarithmischen Auftragung der Konstanten k_{obs} gegen den pH der Messreihen bei 37 °C und 25 °C von Komplex Gd-HP-DO3A sind in Abbildungen 33 und 34 gezeigt.

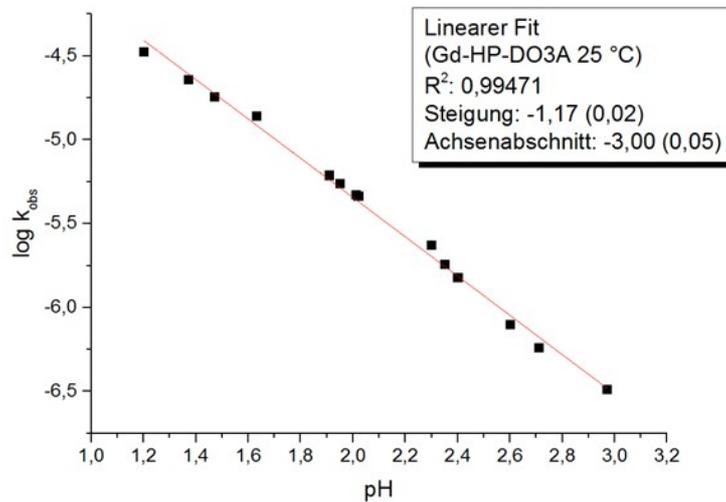


Abbildung 33: Linearer Fitt der logarithmischen Auftragung von kinetischen Zerfallskonstanten k_{obs} von Gd-HP-DO3A bei 25 °C

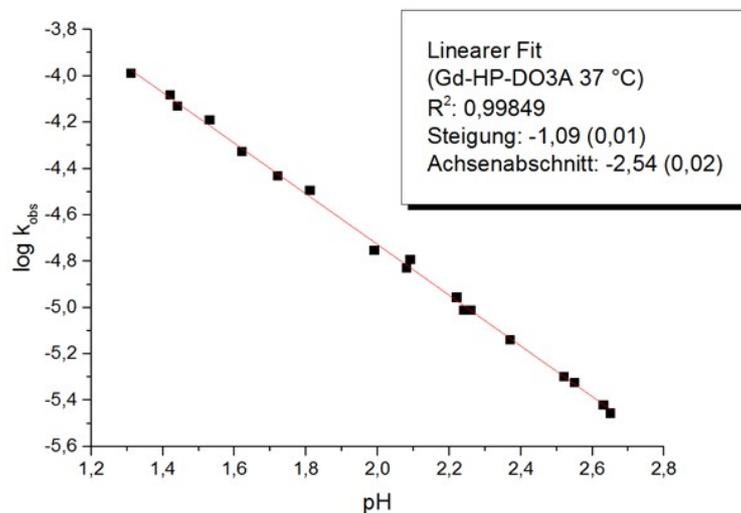


Abbildung 34: Linearer Fitt der logarithmischen Auftragung von Zerfallskonstanten k_{obs} von Gd-HP-DO3A bei 37 °C

Bei einem Vergleich der Steigungen von linearen Fitts der Messreihen vom Komplex Gd-HP-DO3A bei 25 °C und 37 °C (Abbildung 33 und Abbildung 34) ist erkennbar, dass die logarithmische Auftragung der Messreihe aufgenommen bei einer Temperatur von 25 °C die Steigung von 1,16 hat. Die Steigung der Messreihe aufgenommen bei 37 °C hat die

Steigung 1,08.

Der geringe Unterschied der Steigungen kann damit erklärt werden, dass der Komplex Gd-HP-DO3A sowohl bei 37 °C als auch bei 25 °C, innerhalb des Messbereichs, den gleichen Zerfallsmechanismus hat, welcher im gleichem Maß von der Protonenkonzentration beeinflusst wird.

Der höhere Achsenabschnitt der logarithmischen Auftragung bei der Temperatur von 37 °C verglichen mit der Messreihe bei 25 °C, kann damit erklärt werden, dass der Komplexzerfall bei 37 °C schneller erfolgt.

Die logarithmische Auftragung der einzelnen Konstanten gegen den pH macht es möglich die Zerfallskonstanten k_{obs} innerhalb einer Messreihe, aufgenommen bei gleicher Temperatur, bei jeden beliebigen pH-Wert, innerhalb der Bestimmungsgrenzen durch Extrapolation zu bestimmen.

Die Grenze des Messbereichs bei hohen pH-Werten, wird von thermodynamischen Gleichgewicht begrenzt, welches sich abhängig vom pH-Wert einstellt. Je höher der pH-Wert, desto geringer ist der Anteil an nicht komplexiertem Ligand im thermodynamischen Gleichgewicht.

Die Teilchenverteilung von HP-DO3A im thermodynamischen Gleichgewicht ist in der Abbildung 35 abgebildet.

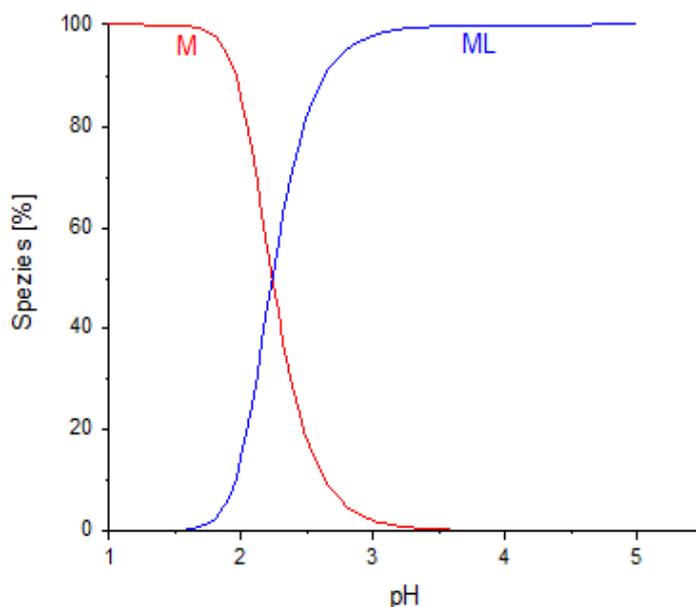


Abbildung 35: Teilchenverteilung von Ligand HP-DO3A in Anwesenheit von Gadolinium (III) abhängig vom pH-Wert²⁰

Aus der Teilchenverteilung (Abbildung 35) ist erkennbar, dass bei pH-Werten höher als 3 der Ligand HP-DO3A in signifikanten Mengen komplexiert vorliegt. Da bei einer pH-Stat Titration das Einstellen des thermodynamischen Gleichgewichts beobachtet wird, ist die Bestimmung der Zerfallskonstanten mit der pH-Stat Methode bei pH-Werten höher als 3 nicht möglich, weil der Ligand HP-DO3A bei pH-Werten höher als 3 im thermodynamischen Gleichgewicht, vollständig komplexiert vorliegt.

2.1.8.1 Vergleich der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A

Aus der Literatur bekannte Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A sind in der Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Literaturbekannte kinetische Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A

Studie	Methode	k_{obs} [1/s]
Kumar ²⁹	Umkomplexierung (pH>3; T=25 °C)	$6,4 \cdot 10^{-4}$
Toth ²⁹	Umkomplexierung (pH>3; T=25 °C)	$2,6 \cdot 10^{-4}$
Port ¹⁶	Umkomplexierung (pH=1,0, T=25 °C)	$4,93 \cdot 10^{-5}$
Port ¹⁶	Umkomplexierung (pH=1,0, T=37 °C)	$9,62 \cdot 10^{-5}$
Port ¹⁶	Umkomplexierung (pH=1,2, T=37 °C)	$4,81 \cdot 10^{-5}$
Weibert	pH-Stat (pH 1,20 bis 2,97, T=25 °C)	$3,34 \cdot 10^{-5}$ bis $3,27 \cdot 10^{-7}$
Weibert	pH-Stat (pH 1,31 bis 2,65; T=37 °C)	$1,03 \cdot 10^{-4}$ bis $3,51 \cdot 10^{-6}$

Aus der Tabelle 12 ist erkennbar, dass sowohl alle im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Zerfallskonstanten als auch die literaturbekannten Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A die gleiche Größenordnung haben. Die unterschiedlichen kinetischen Zerfallskonstanten in den jeweiligen Studien, können dadurch erklärt werden, dass die Bestimmungsmethoden unterschiedlich sind und bei einer Umkomplexierung der Zerfall der Gadolinium(III) Komplexe durch Lanthanoide und Übergangsmetalle katalysiert werden kann.

2.1.9 Vergleich von kinetischen Zerfallskonstanten k_{obs} der untersuchten Komplexe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht die Zerfallskonstanten der Komplexe Gd-DTPA, Gd-DOTA, Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A mit der pH-Stat Methode zu bestimmen.

Der Komplex Gd-DTPA ist sehr labil und eine Bestimmung der Zerfallskonstanten mit der pH-Stat Methode ist deswegen nicht möglich, was im Abschnitt 2.1.5 gezeigt wurde.

Der Komplex Gd-DOTA hat eine hohe kinetische Stabilität. Eine Bestimmung der Zerfallskonstanten von Gd-DOTA mit der pH-Stat Methode bei einer Temperatur von 25 °C war mit der pH-Stat Methode nicht möglich. Dieser Sachverhalt wird in Abschnitt 2.1.6 gezeigt. Grund für die hohe kinetische Stabilität vom Komplex Gd-DOTA, ist die rigide vordefinierte Struktur des Tetraazacyclododecan, welches das makrozyklische Grundgerüst des DOTA Moleküls bildet. Weiterhin können die Acetatgruppen, die an die Stickstoff Atome des Tetraazacyclododecan angelagert sind, zu den harten Liganden zugeordnet werden können. Diese harten Liganden koordinieren besonders gut an das Gd^{3+} , dadurch wird die Komplexstabilität zusätzlich erhöht.

Die Liganden BT-DO3A und HP-DO3A bilden mit Gd^{3+} Komplexe welche im Vergleich zu Gd-DOTA Komplex labiler sind. Zerfallskonstanten der Komplexe von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A konnten im Rahmen dieser Arbeit mit der pH-Stat Methode bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C und 37 °C bestimmt werden.

Grund für die unterschiedliche kinetische Stabilität der Komplexe Gd-HP-DO3A, Gd-BT-DO3A und Gd-DOTA ist aus der Struktur der Liganden (Abbildung 36) ersichtlich.

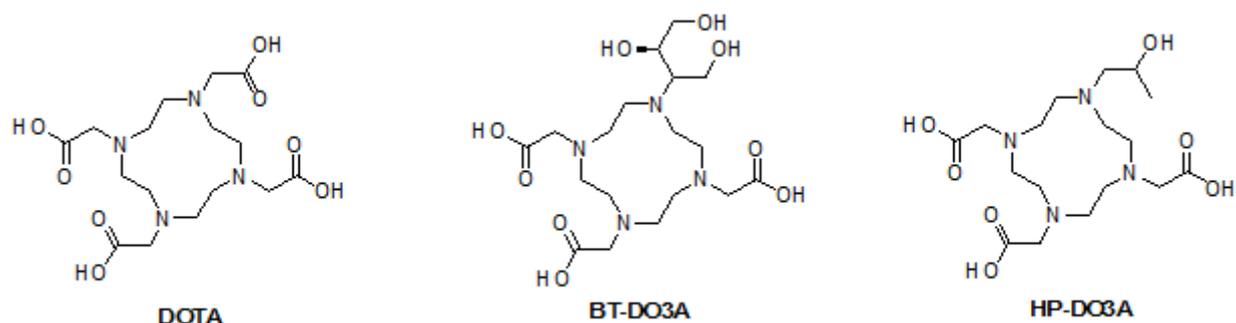


Abbildung 36: Struktur der Liganden DOTA, BT-DO3A, HP-DO3A

Bei den Liganden HP-DO3A und BT-DO3A ist eine Acetatgruppe am Tetraazacyclododecan substituiert. Bei dem Ligand HP-DO3A wurde die Acetatgruppe

durch eine Propan-2-ol Gruppe substituiert. Bei dem Ligand BT-DO3A wurde der Acetyl Rest durch eine Triolgruppe substituiert. Da eine Alkoholgruppe, verglichen mit Carbonsäuren, weniger gut an Gd^{3+} koordinieren kann, haben die Komplexe Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A eine geringere kinetische Stabilität.

Die Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A bestimmt durch pH-Stat Titration, aufgenommen bei einer Temperatur von 25 °C und 37 °C sind in Abbildung 37 und Abbildung 38 dargestellt.

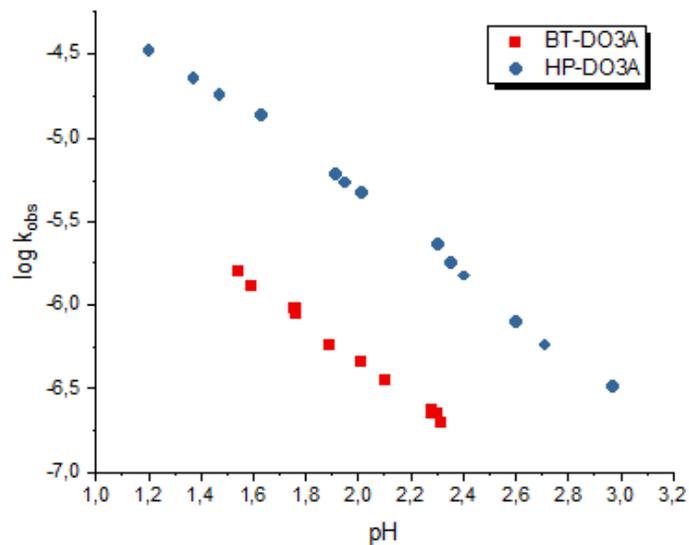


Abbildung 37: Logarithmische Auftragung der Zerfallskonstanten k_{obs} gegen den pH der Komplexe Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A ermittelt bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C

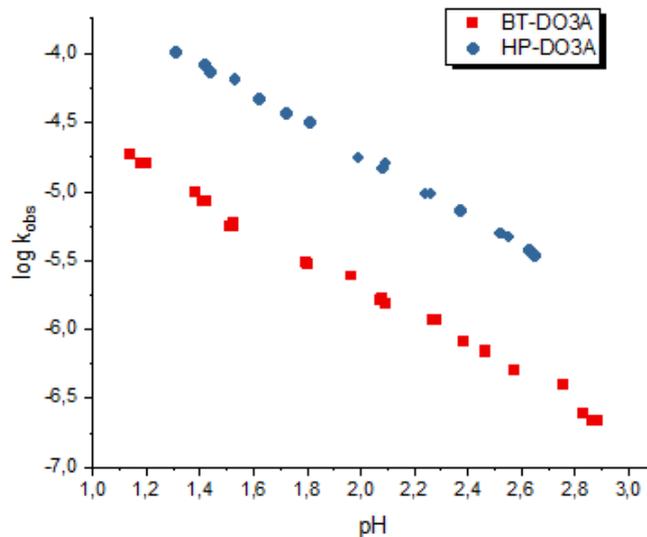


Abbildung 38: Logarithmische Auftragung der Zerfallskonstanten k_{obs} gegen den pH der Komplexe Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A ermittelt bei einer Reaktionstemperatur von 37 °C

Die Abbildungen 37 und 38 zeigen, dass der Komplex Gd-BT-DO3A im Vergleich zum Komplex Gd-HP-DO3A eine höhere kinetische Stabilität hat.

Der Komplex Gd-BT-DO3A zerfällt sowohl bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C als auch 37 °C langsamer als Gd-HP-DO3A.

Der Grund für den langsameren Zerfall von Gd-BT-DO3A verglichen mit Gd-HP-DO3A kann durch die Struktur der Liganden erklärt werden. Die sekundäre Alkoholgruppe welche am Ligand HP-DO3A angelagert ist, hat eine geringere sterische Hemmung als die Triolgruppe, welche an dem Ligand BT-DO3A angelagert ist. Durch eine höhere sterische Hemmung der Triolgruppe am Komplex Gd-BT-DO3A wird die Protonierung des makrozyklischen Komplexes und eine Umlagerung des Protons nach der Protonierung erschwert.

2.1.10 Zerfallsmechanismus der Komplexe Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A

Mit steigender Protonenkonzentration in der Probelösung werden die Zerfallskonstanten k_{obs} vom Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A größer. Der säurekatalysierte Verlauf der Zerfallsreaktion der Liganden HP-DO3A und BT-DO3A, wird weiterhin durch Messungen der Zerfallskonstanten durch Umkomplexierung mit UV aktiven Metallen bestätigt.^{30 26}

Weiterhin wird der Komplexzerfall von Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A im gleichen Maße von der Protonenkonzentration beeinflusst. Die logarithmische Auftragung der Zerfallskonstanten k_{obs} gegen pH, der Komplexe Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A, zeigt nur geringe Unterschiede, was im Abschnitt 2.1.7 und 2.1.8 gezeigt wurde. Ein weiterer Grund dafür, dass der Zerfallsmechanismus vom Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A gleich ist, sind die geringen Strukturunterschiede der Liganden BT-DO3A und HP-DO3A. Beide Liganden haben das makrozyklische Tetraazacyclododecan Grundgerüst. An den drei Stickstoffatome des Makrozyklus befinden sich sowohl bei HP-DO3A als auch bei BT-DO3A Acetatgruppen. Am vierten Stickstoffatom befindet sich eine Alkoholgruppe, wobei am Ligand HP-DO3A Isopropanol angebunden ist. Am Ligand BT-DO3A ist eine Triolgruppe am vierten Stickstoffatom des Makrozyklus angelagert.

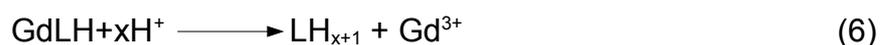
Obwohl bei den pH-Stat Titrationsen, handelsübliche für den Markt freigegebene Injektionslösungen verwendet wurden, welche Ca^{2+} mit einer Konzentration von 0,5 mmol/l bzw. 1 mmol/l enthalten, ist das Entstehen von binuclearen Komplexen als Übergangszustand bei dem Zerfall der untersuchten Komplexen nicht möglich.

Die untersuchten Liganden können achtzählig an ein Metall koordinieren. Die Koordinationszahl von Gd^{3+} komplexiert mit den Liganden HP-DO3A und BT-DO3A ist neun, was die Bildung von mehrkernigen Komplexen erschwert, weil die Anzahl von möglichen Koordinationsstellen für die Bildung von mehrkernigen Komplexen nicht ausreichend ist.⁵ Der Angriff von anderen mehrzähligen Liganden beim Zerfall von untersuchten Gd^{3+} Komplexen ist unwahrscheinlich.

Das Gadolinium ist von vier Stickstoffatomen und vier Sauerstoffatomen der Carboxylgruppen umgeben. Aus sterischen Gründen ist deswegen die Koordinierung eines weiteren mehrzähligen Liganden an das komplexierte Gadolinium(III) nicht möglich. Der säurekatalysierte Zerfallsmechanismus von DOTA Derivaten komplexiert mit Lanthanoiden wurde ebenfalls von Merbach durch NMR Spektroskopie untersucht und bestätigt.⁷ Weil die Anwesenheit von Gd^{3+} zur Verbreiterung der NMR Peaks führt, wurde für die Ermittlung des Zerfallsmechanismus Lu^{3+} Komplexe verwendet. Sowohl Lu^{3+} als auch Gd^{3+} können zur Gruppe der Lanthanoide zugeordnet werden und deswegen ein ähnliches Reaktionsverhalten zeigen. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass der Zerfall von DOTA Derivaten komplexiert mit Gd^{3+} auf dem gleichen Reaktionspfad erfolgt, wie der Zerfall von Lu(III)-DOTA Komplexen. Aus diesem Grund können die Ergebnisse von Merbach auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Komplexe HP-DO3A und BT-DO3A angewendet werden.

Gemäß dem vom Merbach ermittelten Reaktionsmechanismus, wird ein makrozyklischer Komplex zuerst an einer Acetatgruppe protoniert. Der entstandene monoprotonierte Komplex hat eine geringere Stabilität als der nicht protonierte Komplex und das chemische Gleichgewicht liegt hauptsächlich auf der Seite vom nicht protonierten Komplex. Nach der Protonierung der Carboxylgruppe erfolgt eine langsame Umlagerung des Protons, zum Stickstoffatom des makrozyklischen Grundgerüsts des Liganden. Nach der Umlagerung des Protons zum Stickstoff, ist das Metall nicht mehr an den protonierten Stickstoff koordiniert und verlässt langsam den Koordinationskäfig. Bei einer hohen Protonenkonzentration wird zusätzlich das Stickstoffatom protoniert, welches diagonal zum bereits protonierten Stickstoffatom liegt. Nachdem das Metall den Koordinationskäfig verlassen hat, koordinieren H₂O Moleküle an das Metall. Beim weiteren Komplexzerfall werden weitere Bindungen zwischen den Liganden und Metall gelöst und weitere Protonen werden an den Liganden angelagert. Die Anzahl der angelagerten Protonen ist abhängig vom pH-Wert bei welchem der Zerfall stattfindet.

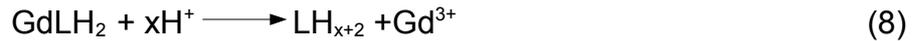
Bei einer pH-Stat Titration ist nur der Verbrauch der Protonen während der Zerfallsreaktion sichtbar. Die Umlagerung von H⁺ nach Protonierung eines Komplexes kann nicht mit der pH-Stat Methode beobachtet werden. Der Zerfall der untersuchten Komplexe, ausgehend von einem monoprotonierten Komplex, wird durch die Gleichung 5 und Gleichung 6 dargestellt.



Die Gleichung 5 beschreibt eine schnelle Protonierung des Komplexes, der entstandene monoprotonierte Komplex ist sehr labil, deswegen kann der Komplex wieder deprotoniert werden.

Die Reaktion, dargestellt durch die Gleichung 6, zeigt den Zerfall des monoprotonierten Komplexes und eine anschließende Protonierung des Liganden. Dieser Reaktionsschritt ist der langsamste Schritt des postulierten Reaktionsmechanismus und ist deswegen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Komplexzerfalls.

Bei tiefen pH-Werten ist eine weitere Protonierung des Komplexes möglich, nachdem die erste Protonierung des Liganden erfolgt ist. Die Gleichung 7 und Gleichung 8 zeigen den Zerfall der Komplexe ausgehend von einem diprotonierten Komplex.



Die Reaktionsgleichung 7 beschreibt eine Protonierung des Komplexes, bei dieser Gleichung, handelt es sich um eine Bruttoreaktionsgleichung. Die Protonierung des Komplexes erfolgt stufenweise, weil eine Reaktion dritter Ordnung, bei der zwei Protonen an den Komplex gleichzeitig angelagert werden, sehr unwahrscheinlich ist.

Der Zerfall eines diprotonierten Komplexes wird durch die Gleichung 8 beschrieben.

Weiterhin kann ein spontaner Zerfall der untersuchten Komplexe nicht ausgeschlossen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Komplexe sind chiral. In gelöster Form liegen die Komplexe in Form von zwei Diastereomeren, welche sich in je zwei Enantiomere aufspalten. Insgesamt sind in gelöster Form vier unterschiedliche Komplexspezies vorhanden, die in einem dynamischen Gleichgewicht miteinander liegen.⁵ Die einzelnen Komplexisomere in Lösung, sind am Beispiel von LnDOTA Komplexen in der Abbildung 39 dargestellt

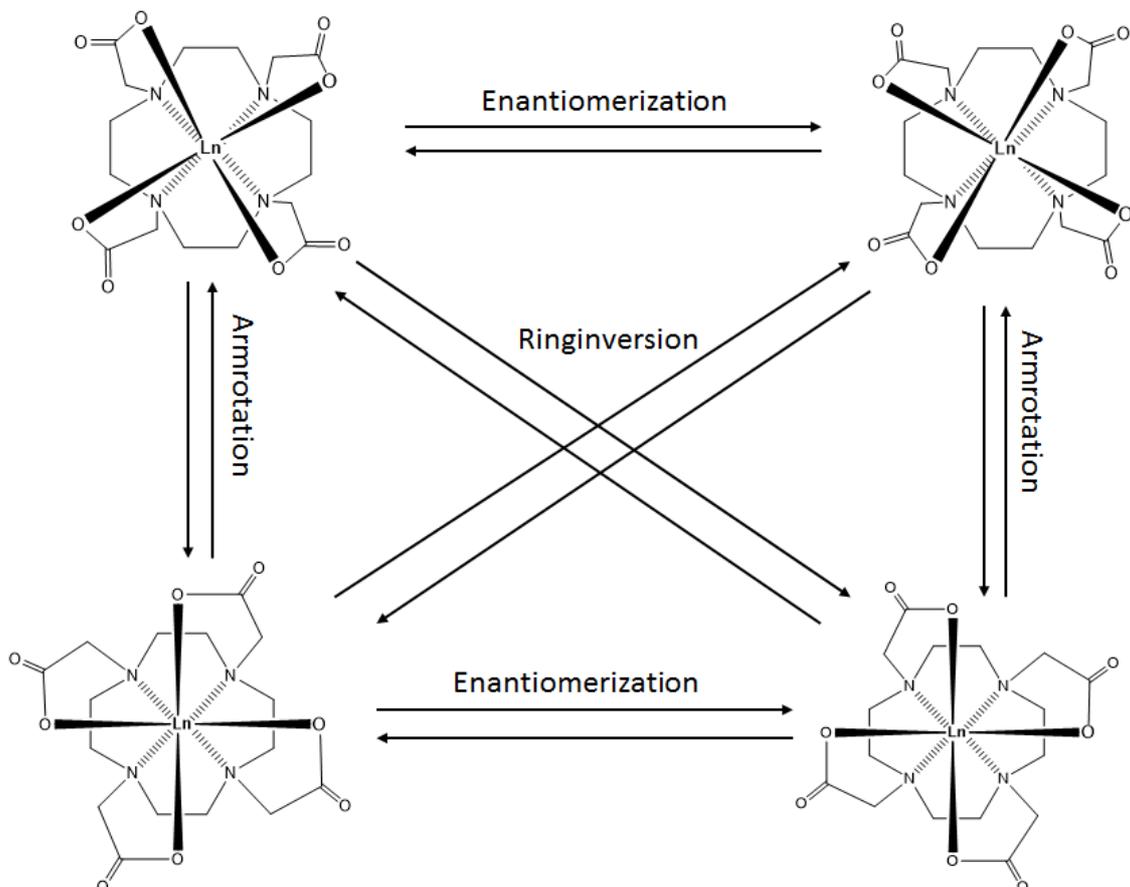


Abbildung 39: Isomere des Komplexes LnDOTA in einer wässrigen Lösung⁵

Aus der Abbildung 39 ist erkennbar, dass einzelne Isomere ineinander umgewandelt werden können. Bei der Umwandlung der einzelnen Stereoisomere ineinander ist es möglich, dass geringe Mengen Gd^{3+} freigesetzt werden.

Insgesamt gibt es drei Möglichkeiten für den Zerfall von makrozyklischen Gadolinium(III) Komplexen, die als MRT Kontrastmittel eingesetzt werden. Ein spontaner Zerfall des Komplexes, ausgehend von einem nicht protonierten Komplex, wird durch die Zerfallskonstanten k_0 beschrieben. Die Zerfallskonstante k_1 charakterisiert den Zerfall ausgehend von einem monoprotonierten Komplex so wie er durch die Gleichung 7 beschrieben wird. Die Konstante k_2 charakterisiert den Zerfall ausgehend von einem diprotonierten Komplex (Gleichung 8).

Die Formel 9, wird zum Berechnen der einzelnen vom pH-Wert unabhängigen kinetischen Zerfalls- und Gleichgewichtskonstanten aus den experimentell ermittelten kinetischen Zerfallskonstanten eingesetzt ²⁸

$$k_{obs} = \frac{k_0 + k_1 \cdot [H] + k_2 \cdot [H]^2 + k_3 [M]}{1 + K_1 \cdot [H] + K_2 [H]^2 + K_3 [M]} \quad (9)$$

In der Formel 9 angegebenen Konstanten k_0 , k_1 und k_2 sind die kinetischen Konstanten, für die Zerfallsgeschwindigkeit ausgehend von einer spontanen Dissoziation, eines monoprotonierten und einem diprotonierten Komplex. Konstante k_3 ist die Geschwindigkeitskonstante für die Umkomplexierungsreaktion mit einem UV aktiven Metall. In der Formel 9 angegebenen Konstanten K_1 und K_2 sind die thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten, die das vorgelagerte Gleichgewicht, zwischen den jeweiligen protonierten und nicht protonierten Komplexspezies beschreiben. Das thermodynamische Gleichgewicht, beschrieben durch die Konstanten K_1 und K_2 , stellt sich während der Zerfallsreaktion ein. Die Konstante K_3 beschreibt das thermodynamische Gleichgewicht bei einer Umkomplexierung der makrozyklischen Komplexen durch UV aktive Metalle.²⁸

Die Diskussion des Komplexzerfalls bei den Bedingungen einer pH-Stat Titration, erfolgt im Abschnitt 2.1.10.1.

2.1.10.1 Bestimmung der pH-Wert unabhängigen kinetischen Zerfallskonstanten

Es ist möglich die Zerfallskonstanten k_0 , k_1 und k_2 aus den Konstanten k_{obs} zu berechnen, welche durch die pH-Stat Titrations bei unterschiedlichen pH-Werten erhalten wurden.

Die Änderung der Komplexkonzentration, während des Zerfalls wird durch die Formel 10 beschrieben.

$$\frac{-d[GdL]_t}{dt} = k_{obs}[GdL]_t \quad (10)$$

Der Zerfall von den untersuchten Komplexe kann spontan oder ausgehend von mono- oder diprotonierten Komplexspezies erfolgen. Die Konzentration der einzelnen Komplexspezies während des Zerfalls, ist vom pH-Wert abhängig bei dem der Zerfall stattfindet. Bei hohen pH-Werten ist die Konzentration von Mono- und Diprotonierten Komplexspezies gering. Die Gesamtkonzentration des Komplexes $[GdL]$ in Lösung zum Zeitpunkt t ist eine Summe aus den unterschiedlichen Komplexspezies. Dieser Sachverhalt wird in der Gleichung 11 gezeigt

$$[GdL]_t = [GdL] + [GdLH] + [GdLH_2] \quad (11)$$

Durch das substituieren von $[GdL]_t$ in Gleichung 10 durch den Term in Gleichung 11 wird die Gleichung 12 erhalten.

$$\frac{-d[GdL]}{dt} = k_{obs} \cdot ([GdL] + [GdLH] + [GdLH_2]) \quad (12)$$

Jede in der Gleichung 11 gezeigten Komplexspezies zerfallen mit einer eigenen Zerfallsgeschwindigkeit, welche durch die jeweilige Zerfallskonstante beschrieben wird. Der spontane Komplexzerfall, wird durch die konstante k_0 definiert. Der Zerfall ausgehend von einem monoprotinierten Komplex $GdLH$ wird durch die Konstante k_1 beschrieben. Die Konstante k_2 beschreibt den Komplexzerfall, nach dem der Komplex doppelt protoniert wurde.

Unter der Annahme, dass der Komplex ausgehend von den Spezies welche in der Gleichung 11 gezeigt wurden erfolgt und die Zerfallsgeschwindigkeit der einzelnen

Komplexspezies unterschiedlich ist, kann die Gleichung 10 in die Gleichung 13 umgewandelt werden.

$$\frac{-d[GdL]_t}{dt} = k_0 \cdot [GdL] + k_1 \cdot [GdLH] + k_2 \cdot [GdLH_2] \quad (13)$$

Die Gleichung 14 wird durch das Gleichsetzen von Gleichung 13 und Gleichung 12 erhalten.

$$k_{obs} \cdot ([GdL] + [GdLH] + [GdLH_2]) = k_0 \cdot [GdL] + k_1 \cdot [GdLH] + k_2 \cdot [GdLH_2] \quad (14)$$

Die Konzentration vom monoprotonierten Komplex GdLH, diprotonierten Komplex GdLH₂ und von nicht protonierten Komplex GdL kann während der Zerfallsreaktion nicht bestimmt werden. Während der Zerfallsreaktion stellt sich ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen dem nicht protonierten Komplex und der protonierten Komplexspezies ein, Dieser Sachverhalt wird durch Gleichung 15 und Gleichung 16 beschrieben. Die Gleichungen 15 und 16, beschreiben das Gleichgewicht zwischen den protonierten und nicht protonierten Komplexen.

$$K_1 = \frac{[GdLH]}{[GdL] \cdot [H]} \quad (15)$$

$$K_2 = \frac{[GdLH_2]}{[GdL] \cdot [H]^2} \quad (16)$$

Eine Umstellung der Gleichung 14 nach k_{obs} und anschließende Substitution von [GdLH] und [GdLH₂] durch die Gleichungen 15 und 16, ergibt Gleichung 17.

$$k_{obs} = \frac{k_0 [GdL] + k_1 \cdot K_1 \cdot [H] \cdot [GdL] + k_2 \cdot K_2 \cdot [H]^2 \cdot [GdL]}{[GdL] + K_1 \cdot [GdL] \cdot [H] + K_2 \cdot [GdL] \cdot [H]^2} \quad (17)$$

Nach dem Ausklammern und Kürzen von [GdL], aus Gleichung 17 wird Gleichung 18 erhalten.

$$k_{obs} = \frac{k_0 + k_1 \cdot K_1 \cdot [H] + k_2 \cdot K_2 \cdot [H]^2}{1 + K_1 \cdot [H] + K_2 \cdot [H]^2} \quad (18)$$

Die Gleichung 18 zeigt wie die Konstante k_{obs} , welche durch die pH-Stat Titration erhalten wird, von der Protonenkonzentration in der Probelösung beeinflusst wird. Durch das Anfitzen der experimentell erhaltenen Konstanten k_{obs} gegen die Protonenkonzentration, mit der Gleichung 18, ist es möglich die thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten, welche durch die Gleichungen 15 und 16 definiert sind, zu erhalten. Die kinetischen Zerfallskonstanten k_0 , k_1 und k_2 sind nicht von der Säurekonzentration abhängig und können ebenfalls durch einen Fit der Gleichung 18 bestimmt werden. Dazu werden die Werte der Konstanten mit dem Least Squares Verfahren variiert, bis die erhaltene Kurve, möglichst gut mit den experimentellen Daten konvergiert. Je mehr Faktoren zum Fitten variiert werden können, desto besser konvergiert der Graph mit den experimentellen Daten, unabhängig davon ob die erhaltenen Konstanten das tatsächliche Reaktionsverhalten widerspiegeln. Die Gleichung 18 hat 5 Konstanten, welche durch das Anfitzen der experimentellen Daten an die Gleichung ermittelt werden können. Die Ergebnisse des Kurvenfits von der Gleichung 18 an die experimentell bestimmten kinetischen Zerfallskonstanten k_{obs} abhängig vom pH-Wert ist in der Tabelle 13 gezeigt.

Tabelle 13: Konstanten von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A bei 25 °C und 37 °C, ermittelt durch eine Kurvenfit an die Gleichung 21

	25 °C		37 °C	
	Gd-HP-DO3A	Gd-BT-DO3A	Gd-HP-DO3A	Gd-BT-DO3A
k₀	0	0	$7,33 \cdot 10^{-8}$	$1,39 \cdot 10^{-7}$
k₁	$1,35 \cdot 10^{-3}$	$3,68 \cdot 10^{-6}$	$8,59 \cdot 10^{-4}$	$1,22 \cdot 10^{-5}$
k₂	$4,46 \cdot 10^{-6}$	$6,54 \cdot 10^{-2}$	$1,97 \cdot 10^{-4}$	4,55
K₁	0,35	11,587	1,87	12,37
K₂	97,70	0,01639	149	$9,86 \cdot 10^{-4}$
R²	0,99678	0,98943	0,99737	0,99573

Aus der Tabelle 13 ist erkennbar, dass bei 25 °C die kinetischen Konstanten k_0 welche den spontanen Zerfall beschreiben 0 sind. Bei 37 °C ist durch den Kurvenfit ermittelte Zerfallskonstante k_0 von Gd-HP-DO3A kleiner als von Gd-BT-DO3A, obwohl der Komplex Gd-HP-DO3A schneller zerfällt als Gd-BT-D3A. Die Halbwertszeit für den spontanen

Zerfall ausgehend von den Zerfallskonstanten k_0 bei 37 °C beträgt mehr als 100 Tage. Somit ist ein spontaner Komplexzerfall bei den Bedingungen einer pH-Stat Titration nicht der dominierende Reaktionspfad und kann deswegen vernachlässigt werden. Die Zerfallskonstante k_2 (Komplexzerfall ausgehend von einem diprotonierten Komplex) von Gd-HP-DO3A bei 25 °C und 37 °C ist kleiner als die Zerfallskonstante k_1 .

Die hohen R^2 Werte bei einem Fit der Gleichung 18 an die experimentell ermittelten Zerfallskonstanten, werden dadurch erhalten, dass insgesamt fünf Faktoren beim fitten variiert werden können. Unter der Annahme, dass der Spontane Komplexzerfall ausgehend von einem nicht protonierten Komplex, nicht der dominierende Reaktionspfad bei den Bedingungen einer pH-Stat Titration ist, kann die Gleichung 18 zu der Gleichung 19 vereinfacht werden.

$$k_{obs} = \frac{k_1 \cdot K_1 \cdot [H] + k_2 \cdot K_2 \cdot [H]^2}{1 + K_1 \cdot [H] + K_2 \cdot [H]^2} \quad (19)$$

Die Gleichung 19 zeigt wie eine experimentell ermittelte Konstante k_{obs} von der Protonenkonzentration und den kinetischen und thermodynamischen Konstanten beeinflusst wird. Die kinetische Zerfallskonstante k_1 beschreibt den Zerfall ausgehend von einem monoprotonierten Komplex GdLH. Die kinetische Konstante k_2 beschreibt den Komplexzerfall ausgehend von einem diprotonierten Komplex GdLH₂. Die thermodynamische Gleichgewichtskonstante K_1 definiert das Gleichgewicht zwischen den protonierten und nicht protonierten Komplex (Formel 15). Die Konstante K_2 beschreibt das thermodynamische Gleichgewicht zwischen den diprotonierten Komplex GdLH₂ und dem nicht protonierten Komplex (Gleichung 16). Die Gleichung 19 hat insgesamt vier Faktoren, welche bei einem Kurvenfit variiert werden können. Durch das anfitten der Gleichung 19 an die vom pH-Wert abhängigen Zerfallskonstanten von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A bei 25 °C und 37 °C sind in der Tabelle 14 angegeben.

Tabelle 14: Konstanten von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A bei 25 °C und 37 °C erhalten durch den Kurvenfit an die Gleichung 22

	25 °C		37 °C	
	Gd-HP-DO3A	Gd-BT-DO3A	Gd-HP-DO3A	Gd-BT-DO3A
k₁	2,79·10 ⁻⁵	2,52·10 ⁻⁵	1,00·10 ⁻⁵	1,66·10 ⁻⁴
k₂	1,31·10 ⁻⁴	7,11·10 ⁻⁶	0,057	6,88·10 ⁻⁵
K₁	16,50	1,65	139	1
K₂	100	100	5,48	28,04
R²	0,9973	0,99094	0,99721	0,99588

Aus der Tabelle 14 ist erkennbar, dass die R² Werte, alle höher als 0,99 sind. Somit korrelieren alle Fits gut mit den experimentellen Daten. Trotz der hohen R² Werte haben die ermittelten Konstanten in der Tabelle 14 einen vergleichsweise hohen Standardfehler. Mit Ausnahme der kinetischen Konstante k₁ von Gd-HP-DO3A bei 37 °C, haben alle kinetischen Zerfallskonstanten k₁ (Zerfallskonstanten ausgehend von einem monoprotonierten Komplex) und die kinetischen Konstanten k₂ (Zerfallskonstanten ausgehend von einem diprotonierten Komplex) eine ähnliche Größenordnung. Dies bedeutet, dass der Zerfall von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A nur im geringen Maße von der Temperatur beeinflusst wird. Dies widerspricht allen literaturbekannten Studien zur kinetischen Stabilität von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A und den experimentellen Beobachtungen des Zerfalls durch pH-Stat Titration. Weiterhin ist der Standardfehler der ermittelten kinetischen und thermodynamischen Konstanten, höher als die ermittelten Konstanten. Diese Tatsachen sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass der diprotonierte Zerfall bei den Bedingungen einer pH-Stat Titration nicht der dominierende Reaktionspfad für den Zerfall von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A im Bereich zwischen pH 1 und pH 3 ist.

Der dominierende und wahrscheinlichste Reaktionspfad für den Zerfall von makrozyklischen Gd³⁺ Komplexen mit einem Cyclam Grundgerüst, innerhalb des Messbereichs der pH-Stat Methode, ist der Komplexzerfall ausgehend von einem monoprotonierten Komplex.⁵ Somit kann die Gleichung 19 zu Gleichung 20 vereinfacht werden. Bei einem Fit der Gleichung 20 an die experimentell erhalten Konstanten k_{obs} müssen lediglich zwei Parameter für den Fit variiert werden.

$$k_{obs} = \frac{k_1 \cdot K_1 [H]}{1 + K_1 [H]} \quad (20)$$

In der Gleichung 20 gezeigte Konstante k_1 , ist die kinetische Zerfallskonstante ausgehend von einem diprotonierten Komplex GdLH. Die Anzahl der Datenpunkte aller Messreihen aufgenommen sowohl bei 25 °C als 37 °C für die Komplexe Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A werden als ausreichend erachtet. Je nach Messreihe werden zwischen 12 und 28 Konstanten k_{obs} aufgenommen bei unterschiedlichen pH-Werten für einen Fit verwendet. Durch das Anfitzen erhaltenen Konstanten der einzelnen Messreihen sind in der Tabelle 15 gezeigt.

Tabelle 15: Erhaltene Konstanten K_1 und k_1 von HP-DO3A und BT-DO3A bei 25 °C und 37 °C

	25 °C		37 °C	
	HP-DO3A	BT-DO3A	HP-DO3A	BT-DO3A
k_1 (b)	$5,58 \cdot 10^{-4}$	$5,33 \cdot 10^{-5}$	$2,15 \cdot 10^{-3}$	$2,55 \cdot 10^{-4}$
K_2 (D)	1	1	1	1
R^2	0,996	0,982	0,993	0,978

Der Standardfehler in der Tabelle 15 gezeigten Konstanten ist kleiner, als die berechneten Konstanten. Obwohl die R^2 Werte von Gd-BT-DO3A bei 25 °C und 37 °C angegeben in der Tabelle 15 kleiner als 0,99 sind, wird die Korrelation des Fits mit den experimentellen Daten als ausreichend erachtet. Die Ursache für die kleineren R^2 Werte, ist eine größere Streuung der ermittelten Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A, welche für den Fit verwendet wurden. Eine größere Streuung der Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A verglichen mit Gd-HP-DO3A, kann damit erklärt werden, dass Gd-BT-DO3A verglichen mit Gd-HP-DO3A langsamer zerfällt und die Bestimmung der Zerfallskonstanten k_{obs} , die zum Berechnen der Konstanten K_1 und k_1 verwendet werden, im größerem Maße von der Drift der pH-Elektrode beeinflusst wird. Eine weitere Ursache für kleinere R^2 Werte ist das beim Anfitzen der Gleichung 20 an die experimentellen Werte nur 2 Faktoren variiert werden können. Ein Fit der Gleichung 20 korreliert am besten mit den experimentellen Daten, verglichen mit den Fits der Gleichungen 19 und 18 an die Zerfallskonstanten k_{obs} . Somit wird bestätigt, dass im pH-Bereich zwischen pH 1,2 und pH 3 ein monoprotionierter Zerfall, ausgehend vom Komplex GdLH, der dominierende Reaktionspfad ist.

Bei einem Vergleich der Zerfallskonstanten k_1 gezeigt in der Tabelle 15, ist erkennbar, dass

die berechneten kinetischen Konstanten, bei dem Komplex Gd-BT-DO3A kleiner sind als bei Gd-HP-DO3A. Der Komplex Gd-BT-DO3A zerfällt somit langsamer als Gd-HP-DO3A. Der langsamere Zerfall von Gd-BT-DO3A, kann damit erklärt werden, dass die Umlagerung des Protons am Ligand Gd-BT-DO3A von Carboxylring zum Stickstoffatom an makrozyklischen Tetraazacyclododecan Ring langsamer erfolgt als bei dem Komplex Gd-HP-DO3A. Bei einer Temperatur von 37 °C sind die berechneten Konstanten k_1 höher als bei 25 °C, somit steigt die Zerfallsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur.

Durch den Kurvenfit erhaltene thermodynamische Konstanten K_1 betragen 1 l/mol bei allen Messreihen unabhängig von der Temperatur oder der Art des Liganden. Somit ist die Stabilität von den protonierten Komplexen GdLH sehr gering. Die thermodynamische Gleichgewichtskonstante K_1 ist als Verhältnis der kinetischen Konstanten für die Bildung bzw. den Zerfall vom Komplex GdLH definiert, dies wird durch die Formel 21 beschrieben. Wenn die Gleichgewichtskonstante 1 beträgt, erfolgt die Protonierung und Deprotonierung mit gleicher Geschwindigkeit. Die kinetischen Protonierungs- und Deprotonierungskonstanten k_{hin} und $k_{rück}$ sind somit gleich groß.

$$K_1 = \frac{k_{hin}}{k_{rück}} \quad (21)$$

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten k_{hin} und $k_{rück}$, welche die Bildung bzw. den Zerfall der monoprotinierten Komplexe GdLH charakterisieren, ist durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten pH-Stat Titration, nicht möglich. Die Protonierung ist eine sehr schnelle Reaktion und kann aufgrund der Ansprechzeit der pH-Elektrode, welche deutlich langsamer als die Reaktionszeit ist, nicht beobachtet werden. Lediglich der Verbrauch angelagerter Protonen, welche weiter zum makrozyklischen Grundgerüst umgelagert werden und zu einem anschließenden Komplexzerfall führen, können mit Hilfe einer pH-Stat Titration beobachtet werden, weil durch diese Reaktion Protonen verbraucht werden.

Mit den berechneten Konstanten, gezeigt in der Tabelle 15 wird die Änderung der Zerfallskonstanten k_{obs} abhängig vom pH-Wert simuliert um die Änderung der Zerfallskonstanten außerhalb des Messbereiches der pH-Stat Methode zu zeigen. Die simulierte Änderung der Konstanten k_{obs} abhängig vom pH-Wert wird in der Abbildung 40 gezeigt.

Die Simulation einer Änderung der Konstanten k_{obs} abhängig vom pH-Wert erfolgt unter

der Annahme, dass der Zerfall bei jedem pH-Wert ausgehend von einem monoprotonierten Komplex GdLH erfolgt. Bei pH-Werten, höher als 3, ist die tatsächliche Größe der Zerfallskonstanten k_{obs} deutlich geringer als die Größe der simulierten Zerfallskonstanten, weil die Konzentration der monoprotonierten Komplexe in der Probelösung mit steigenden pH-Wert immer geringer wird, was die Wahrscheinlichkeit eines Komplexzerfalls verringert. Bei tiefen pH-Werten unterhalb von pH 1, können die tatsächlichen Zerfallskonstanten höher als die simulierten sein. Ursache dafür ist, dass bei tiefen pH-Werten die Bildung eines diprotonierten Komplexes GdLH₂ möglich ist, welcher schneller zerfällt als der monoprotonierte Komplex GdLH.

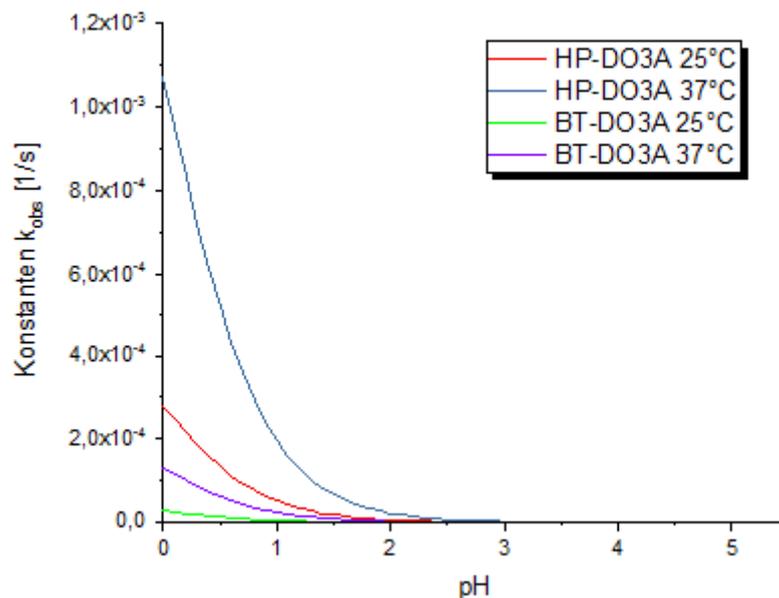


Abbildung 40: Simulierte Änderung der Zerfallskonstanten k_{obs} von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A bei 25 °C und 37 °C

Aus der Abbildung 40 ist erkennbar, dass die Zerfallskonstanten k_{obs} von Gd-HP-DO3A im größeren Maße von der Protonenkonzentration beeinflusst werden, verglichen mit Gd-BT-DO3A. Die Änderung der Konstanten von Gd-HP-DO3A sowohl bei 37 °C als auch bei 25 °C wird mit steigendem pH-Wert größer, verglichen mit der Änderung der Zerfallskonstanten von Gd-BT-DO3A.

Die Gleichgewichtskonstante K_1 für den Zerfall von H[Gd-HP-DO3A] und H[Gd-BT-DO3A] beträgt 1 l/mol. Bei einer gleichen Säurekonzentration in der Probelösung, wird die Änderung der Zerfallskonstanten k_{obs} hauptsächlich von der kinetischen Konstante k_1

beeinflusst, welche den Komplexzerfall ausgehend von einem monoprotonierten Komplex GdLH beschreibt. Je größer die Konstante k_1 ist, desto größer wird dementsprechend die Konstante k_{obs} . Die Größe der Konstante k_1 hängt hauptsächlich von der Struktur des Liganden und der Metall/Ligand Affinität ab. Die Abhängigkeit der Konstante k_{obs} von der Säurekonzentration der kinetischen Konstante k_1 und der thermodynamischen Gleichgewichtskonstante K_1 wird durch Formel 20 beschrieben.

Die Abbildung 41 zeigt ebenfalls, dass die Änderung der Konstanten k_{obs} ebenfalls von der Temperatur beeinflusst wird. Beim Vergleich der Konstanten k_{obs} der Messreihen aufgenommen bei 25 °C und 37 °C von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A, ist erkennbar, dass sowohl bei Gd-HP-DO3A als auch bei Gd-BT-DO3A die Änderung der Konstanten k_{obs} abhängig vom pH-Wert bei 37 °C größer ist als bei 25 °C.

Aus der Auftragung der berechneten Konstanten k_{obs} gegen den pH-Wert (Abbildung 40) ist erkennbar, dass mit steigendem pH-Wert die Konstanten kleiner werden, was ebenfalls aus der Formel 20 erkennbar ist. Bei hohen pH-Werten wird die Protonenkonzentration vernachlässigbar gering und der Zerfall wird hauptsächlich von der Größe der Konstanten K_1 und k_1 beeinflusst, die sich nicht ändern. Somit ist die Änderung der Zerfallskonstanten k_{obs} bei geringen Protonenkonzentrationen sehr gering. Bei niedrigen pH-Werten wird die Zerfallskonstante k_{obs} hauptsächlich von der Säurekonzentration beeinflusst.

Um zeigen zu können wie die Konstanten k_{obs} durch die Größe der Gleichgewichtskonstante K_1 beeinflusst werden, welche das thermodynamische Gleichgewicht zwischen dem nichtprotoniertem Komplex GdL und dem monoprotonierten Komplex GdLH während der Zerfallsreaktion beschreibt, werden unterschiedliche Zerfallskonstanten k_{obs} mit der Gleichung 20 berechnet. Die berechneten Kurvenverläufe werden gegen den pH-Wert aufgetragen. Bei der Simulation wird die kinetische Konstante k_1 auf einen Wert von $1 \cdot 10^{-4}$ /s definiert und konstant gehalten. Die Konstante K_1 wird variiert. Die simulierten Konstanten sind in der Abbildung 41 dargestellt.

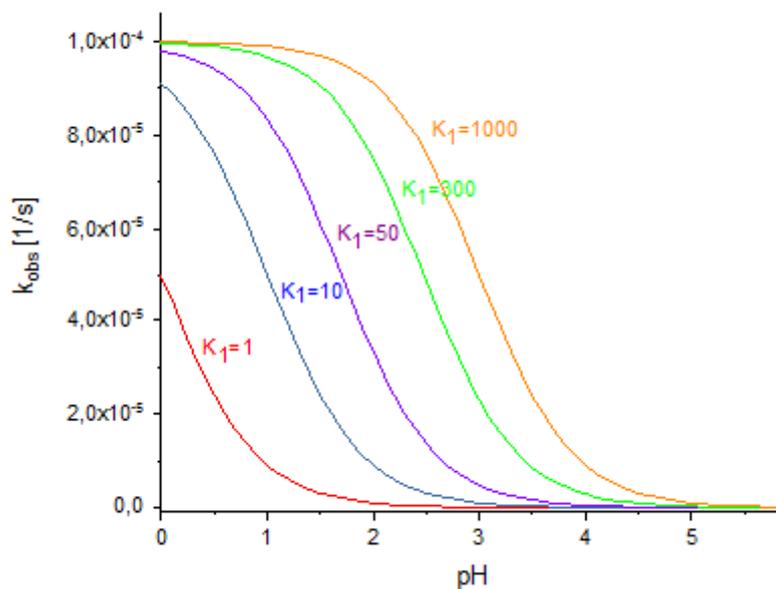


Abbildung 41: Verlauf der berechneten Konstanten k_{obs} abhängig vom pH-Wert

Aus der Abbildung 41 ist erkennbar, dass der Zerfall von Übergangsmetallkomplexen, welche über eine monoprotionierte Zwischenstufe verläuft unabhängig von der Größe der Gleichgewichtskonstante K_1 säurekatalysiert verläuft, solange die H_3O^+ kleiner als die Gleichgewichtskonstante K_1 ist. Die Konstanten k_{obs} und somit die Zerfallsgeschwindigkeit steigen mit zunehmender Protonenkonzentration.

Bei gleicher Protonenkonzentration steigt die Zerfallskonstante k_{obs} , wenn die Gleichgewichtskonstante größer wird. Diese Tatsache, kann damit erklärt werden, dass je größer die Gleichgewichtskonstante K_1 ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit einer Rückreaktion von einer protonierten Komplexspezies zu der nichtprotonierten Komplexspezies. Die Konzentration an protonierten Komplexspezies ist somit während der Reaktion erhöht. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit einer Weiterreaktion zum freiem Metall und dem nicht komplexiertem Ligand, was zu einer größeren Zerfallskonstante k_{obs} führt.

Je stabiler die protonierte Zwischenstufe MLH ist, desto höher ist der pH-Wert, bei dem sich die Reaktionsgeschwindigkeit einstellt, die nicht von der Protonenkonzentration beeinflusst wird. Diese Tatsache wird durch die Abbildung 42 verdeutlicht in der die Zerfallskonstanten k_{obs} logarithmisch gegen den pH-Wert aufgetragen werden.

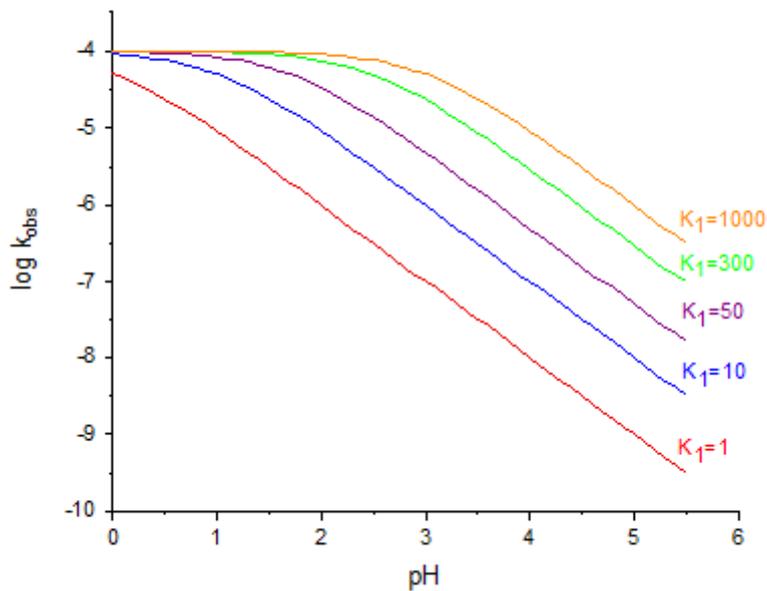


Abbildung 42: Logarithmische Auftragung der berechneten Konstanten k_{obs} gegen den pH-Wert

2.1.11 Vergleich der kinetischen Zerfallsreaktion bei hohen und niedrigen pH-Werten

Bei einem Vergleich der Titrationskurven von Gd-HP-DO3A und Gd-BT-DO3A ist erkennbar, dass mit steigendem pH-Wert nicht der gesamte Komplexzerfall eine Reaktion pseudoerster Ordnung ist. Bei pH-Werten kleiner als 1,4 ist der gesamte Komplexzerfall, welcher mit der pH-Stat Methode beobachtet werden konnte eine Reaktion pseudoerster Ordnung. Im pH-Bereich, in dem die Liganden HP-DO3A und BT-DO3A im thermodynamischen Gleichgewicht zum Teil als Gadolinium(III) Komplexe vorliegen, ist nicht die gesamte Reaktion ein Zerfall pseudoerster Ordnung. Je geringer der pH-Wert, desto größer ist die Komplexkonzentration, die unter Bedingungen pseudoerster Ordnung zerfällt. Dieser Sachverhalt wird in der Abbildung 43 gezeigt.

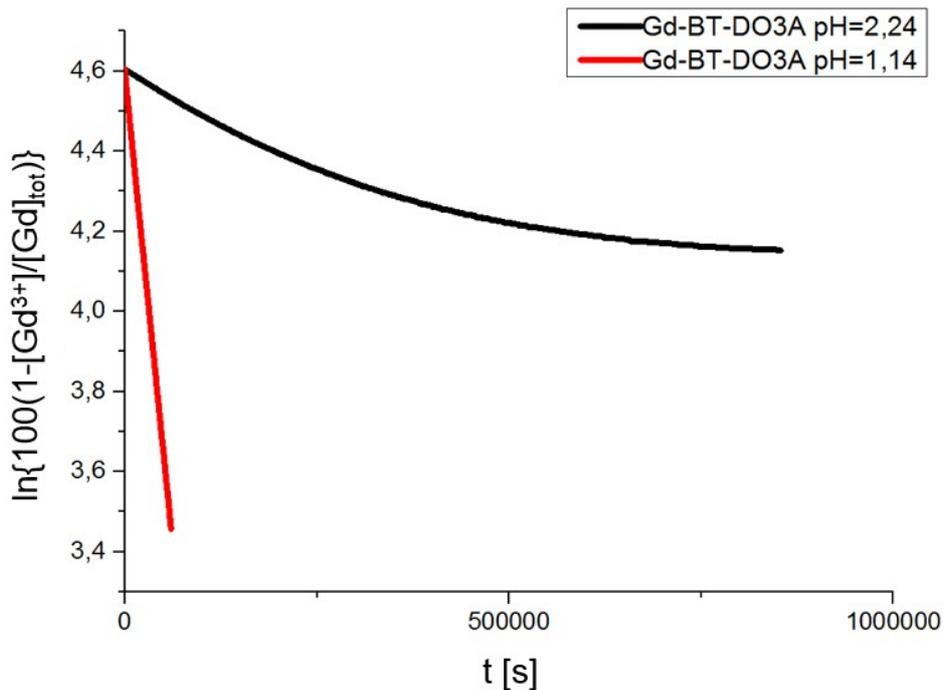


Abbildung 43: Auftragung $\ln(1-[GdL])$ der Titrationskurven von Gd-BT-DO3A bei 37 °C und unterschiedlichen pH-Werten

Aus der Abbildung 43 ist erkennbar, dass die Auftragung $\ln\{100(1-[Gd^{3+}]/[Gd]_{tot})\}$ zur Bestimmung der Zerfallskonstanten k_{obs} bei pH 1,14 eine Gerade ist. Die Auftragung $\ln\{100(1-[Gd^{3+}]/[Gd]_{tot})\}$ der Titrationskurve von Gd-BT-DO3A bei pH 2,24 ist nur am Anfang der Titration eine Gerade, wenn nur ein geringer Teil vom Komplex zerfallen ist. Bei einer Annäherung an die Gleichgewichtskonzentration von GdL ist der Zerfall keine Reaktion pseudoerster Ordnung, weil die Auftragung, gezeigt in der Abbildung 43, keine Gerade ist. Zur Ursachenanalyse dieser Tatsache wurde ein Ishikawa-Diagramm (Abbildung 44) erstellt. Das Ishikawa-Diagramm wurde vom japanischen Wissenschaftler Kaoru Ishikawa entwickelt.³¹ Das Ishikawa-Diagramm ist eine Methode aus der Six-Sigma-Toolbox. Es wird als Hilfsmittel verwendet, um zu ermitteln welche Faktoren einen Sachverhalt im signifikanten Maße beeinflussen können. Ishikawa-Diagramme werden hauptsächlich zur Prozessoptimierung und Analyse von Qualitätsproblemen verwendet. Einzelne Einflussfaktoren, welche potentiell den Sachverhalt beeinflussen können, werden in die Hauptgruppen Mensch, Maschine, Material und Methode unterteilt. Anschließend findet eine Beurteilung statt, welche die wahrscheinlichste Ursache für einen bestimmten Sachverhalt bzw. Problem ist.³¹

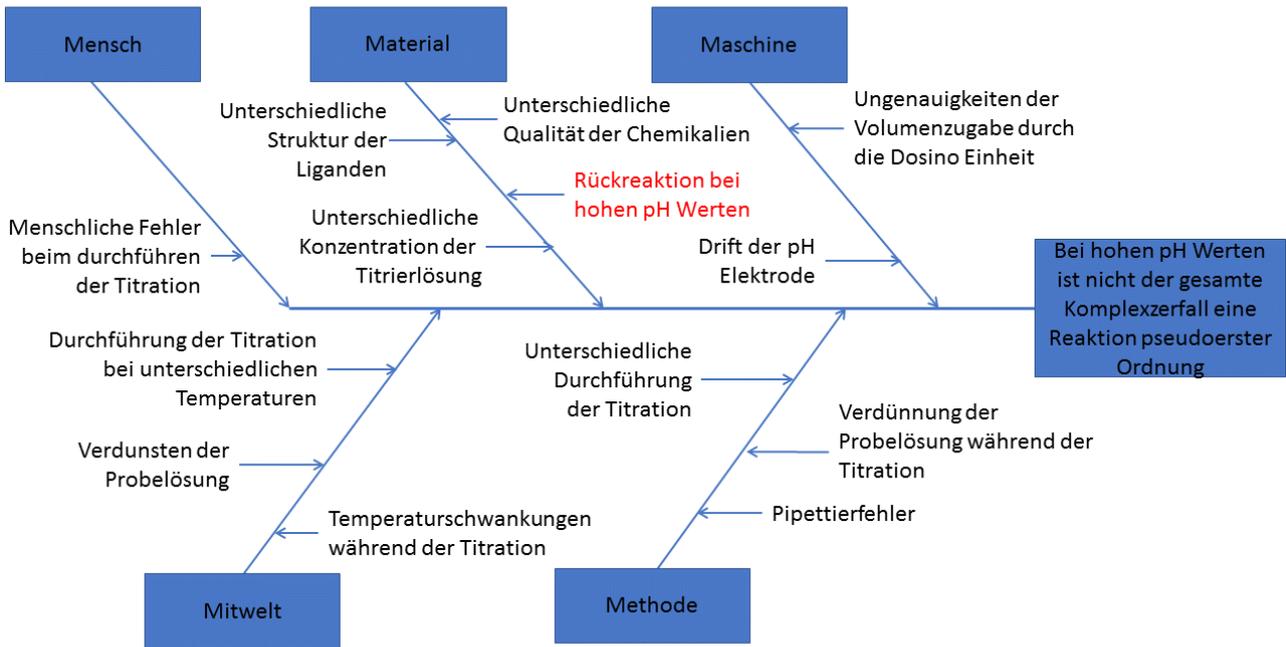


Abbildung 44: Ishikawa-Diagramm zur Ermittlung der Ursache, dass bei hohen pH-Werten, nicht der gesamte Komplexzerfall eine Reaktion pseudoerster Ordnung ist.

Die wahrscheinlichste Ursache dafür, dass bei hohen pH-Werten nicht der gesamte Komplexzerfall eine Reaktion pseudoerster Ordnung ist, konnte der Gruppe Material zugeordnet werden.

Im Abschnitt 2.1.1 wurde diskutiert, dass die Protonen in der Probelösung nur durch den Komplexzerfall während einer pH-Stat Titration verbraucht werden. Weiterhin wird bei einer pH-Stat Titration die Rückkehr des Systems in ein vom pH-Wert abhängiges thermodynamisches Gleichgewicht beobachtet. Sobald das thermodynamische Gleichgewicht erreicht ist, bleibt das Verhältnis zwischen der Hin- und Rückreaktion konstant. Daher kann sobald das thermodynamische Gleichgewicht eingestellt ist, keine Konzentrationsänderung zwischen den einzelnen in der Probelösung befindenden Spezies, beobachtet werden.

Wenn der Komplex, nachdem das thermodynamische Gleichgewicht erreicht wurde, vollständig zerfällt und das Gd^{3+} vollständig als nicht komplexiertes Metall in der Probelösung vorliegt, ist der gesamte Zerfall eine Reaktion pseudoerster Ordnung. Es findet keine Rückreaktion zum Komplex GdL statt, wenn der Komplex vollständig zerfallen ist, sobald das thermodynamische Gleichgewicht erreicht wurde.

Bei hohen pH-Werten, sobald das thermodynamische erreicht wurde und der Komplex

nicht vollständig zerfallen ist, erfolgt bei einer Annäherung an die Gleichgewichtskonzentration, eine Rückreaktion. Bei der Rückreaktion, erfolgt die Umwandlung vom nicht komplexierten Gd^{3+} mit dem jeweiligen Liganden zurück zum nicht protonierten Komplex GdL. Aus diesem Grund weicht der Komplexzerfall immer mehr von den Bedingungen pseudoerster Ordnung ab. Je mehr sich das System den Konzentrationsverhältnissen im thermodynamischen Gleichgewicht annähert und je höher die Komplexkonzentration (GdL) im thermodynamischen Gleichgewicht ist, desto geringer ist der Anteil vom Komplex, welcher unter Bedingungen pseudoerster Ordnung zerfällt.

Aufgrund der Rückreaktion ist die Gesamtreaktionszeit bis zum Erreichen eines thermodynamischen Gleichgewichts höher, als die Reaktionszeit, welche ausgehend von einem vollständigen Komplexzerfall unter Bedingungen pseudoerster Ordnung berechnet wird.

Je höher die Gd^{3+} Konzentration, welche nicht unter Bedingungen pseudoerster Ordnung freigesetzt wird, desto mehr weicht die Gesamtreaktionszeit von einer Reaktionszeit welche erhalten wird, wenn der Komplex vollständig bei Bedingungen pseudoerster Ordnung zerfällt.

Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich die Rückreaktionskonstante, durch einen Kurvenfit und den möglichen Reaktionsmechanismus für eine Rückreaktion zu ermitteln. Die Titrationskurven haben nicht mit den Reaktionsgleichungen, welche eine Gleichgewichtsreaktion beschreiben, korreliert.

Folgende Hypothesen wurden während der Ursachenrecherche verworfen.

Maschine:

Ungenauigkeit der Volumenzugabe durch die Dosino Einheit

Für die Zugabe der HCl während der Titration verwendeten Dosino Einheiten wurden vom Hersteller kalibriert und geprüft. Bei den einzelnen Dosierschritten zugegebene Volumen liegen innerhalb des vom Hersteller angegebenen Arbeitsbereiches. Weiterhin sind die zudosierten HCl Volumen bei den Zugabeschritten während der Titration gleich.

Die unterschiedlichen Titrationszeiten und somit der Unterschied zwischen den einzelnen Zerfallskonstanten kommen zustande, da sich die Zeit zwischen den einzelnen Zugabeschritten unterscheidet.

Weil das zudosierte Volumen bei den einzelnen Zugabeschritten bei allen pH-Stat Titrationsen sich nicht unterscheidet, ist die Genauigkeit der Dosino Einheit nicht die

Ursache, für das Abweichen von Bedingungen pseudoerster Ordnung bei hohen pH-Werten während des Komplexzerfalls.

Drift der verwendeten pH-Elektrode

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten pH-Stat Titrations wurden mit der gleichen pH-Elektrode durchgeführt. Somit ist die Elektrodendrift bei allen Titrations gleich.

Der Komplexzerfall weicht von Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung, nur in dem pH-Bereich ab, in dem die Komplexe nicht vollständig dissoziieren, sobald das thermodynamische Gleichgewicht erreicht ist. Wenn Elektrodendrift eine Ursache für das Abweichen von Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung ist, dann wäre es möglich ein Abweichen von Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung unabhängig von pH-Wert oder der Konzentration von nicht dissoziiertem Komplex im thermodynamischen Gleichgewicht beobachten zu können.

Methode:

Pipettierfehler

Zum Vermeiden der Pipettierfehler beim Herstellen der Probelösungen, wurden im Rahmen dieser Arbeit bei der Herstellung aller Probelösungen die gleichen Pipetten verwendet. Mitarbeiter, welcher die Probelösungen hergestellt hat, ist im richtigen und sachgemäßen Umgang mit Pipetten vertraut. Deswegen ist es unwahrscheinlich, dass Pipettierfehler die Ursache für das Abweichen von Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung während des Komplexzerfalls bei hohen pH-Werten sind.

Unterschiedliche Durchführung der Titration

Alle Messungen wurden auf die gleiche Weise gestartet und vorbereitet. Weiterhin wurde bei der Durchführung aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Titrations das gleiche Equipment eingesetzt.

Verdünnung der Probelösung während der Titration

Während einer pH-Stat Titration wird Titrierlösung zur Probelösung zugegeben. Dadurch kommt es zu einer Verdünnung der Probelösung. Abhängig vom pH-Wert und Titrationsdauer werden zwischen 1ml und 10ml HCl zur Probelösung dosiert. Je tiefer der pH-Wert bei dem eine pH-Stat Titration stattfindet, desto mehr HCl wird zur Probelösung zugegeben. In einem pH-Bereich, in dem die untersuchten Komplexe im

thermodynamischen Gleichgewicht vollständig dissoziiert sind, ist der Zerfall zu jedem Zeitpunkt der Titration, unabhängig von zugegebenen HCl Volumen, eine Reaktion pseudoerster Ordnung. Bei hohen pH-Werten wird während einer pH-Stat Titration, die Probelösung weniger durch die Zugabe von HCl verdünnt.

Trotz einer relativ geringen Verdünnung der Probelösung, bei einer Titration, wenn die untersuchten Komplexe im thermodynamischen Gleichgewicht nicht vollständig dissoziieren, ist nicht der gesamte Komplexzerfall eine Reaktion pseudoerster Ordnung.

Mitwelt:

Temperaturschwankungen während der Titration

Die Temperatur bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen, wird durch einen vom Hersteller kalibrierten PT-1000 Temperaturfühler überwacht und mit Hilfe der Tiamo Software aufgezeichnet. Beim Auswerten der Messungen wurden keine Temperaturschwankungen festgestellt.

Verdunsten der Probelösung

Das Titriergefäß wird sofort nach dem Ansetzen der Probelösung verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Wenn nach dem Einstellen des thermodynamischen Gleichgewichts der Komplex nicht vollständig zerfallen ist, beträgt die maximale Titrationsdauer 24 Stunden. In diesem Zeitraum ist ein verdunsten der Probelösung sehr unwahrscheinlich.

Deswegen ist ein Verdunsten der Probelösung als Ursache für das Abweichen von Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung ausgeschlossen.

Durchführung der Titrationsen bei unterschiedlichen Temperaturen

Eine Abweichung von Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung bei hohen pH-Werten während des Komplexzerfalls, tritt sowohl bei Messungen welche bei 25 °C als auch bei Messungen die bei 37 °C durchgeführt werden auf. Deswegen ist die Durchführung der Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen nicht die Ursache für das Abweichen von Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung.

Mensch:

Menschliche Fehler bei der Durchführung der Titration

Menschliche Fehler beim Starten bzw. Durchführen der Titration oder Ansetzen der Probelösungen können nicht ausgeschlossen werden, sind jedoch sehr unwahrscheinlich.

Person, die die Proben vorbereitet hat und die Messungen durchführte, hat die dafür benötigte Erfahrung und Ausbildung.

Beim Ansetzen der Probelösungen und beim Starten der Reaktion, war die durchführende Person nicht abgelenkt und konnte sich vollständig auf die jeweilige Tätigkeit konzentrieren.

Im Rahmen dieser Arbeit definierte Vorgehensweise zum Vorbereiten der Probelösungen und das Starten der Messungen wurden jedes Mal eingehalten.

Material:

Unterschiedliche Qualität der Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von gleichen Lieferanten mit dem gleichen Reinheitsgrad bezogen. Die verwendeten Injektionslösungen wurden unter GMP Bedingungen hergestellt. Aus diesem Grund ist die Qualität der hergestellten Chargen gleich. Die Konzentration der Inhaltsstoffe in den verwendeten Lösungen wurde im Rahmen der Freigabeanalytik überprüft.

Weiterhin wurden alle Chemikalien so gelagert, dass eine Verunreinigung während der Lagerung ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grund ist es sichergestellt, dass die verwendeten Chemikalien nicht für das Abweichen von Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung bei dem Komplexzerfall verantwortlich sind.

Unterschiedliche Konzentration der verwendeten Maßlösungen ist als Ursache ausgeschlossen.

Bei allen Titrationen wurden ausschließlich Titripur Lösungen der Firma Merck verwendet. Die Konzentration der Maßlösungen kann durch ein Analysezertifikat bestätigt werden. Weiterhin wurden die Lösungen so gelagert, dass eine Verdunstung oder Wasseraufnahme der Titrierlösungen ausgeschlossen ist.

Unterschiedliche Struktur der Liganden

Die Liganden Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A haben ein makrozyklisches Zyklam Grundgerüst, an welches drei Acetatgruppen angelagert sind. Der Strukturunterschied zwischen HP-DO3A und BT-DO3A ist lediglich die vierte an das Zyklam Grundgerüst angelagerte Gruppe. Das Abweichen von Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung während der pH-Stat Titrationen bei hohen pH-Werten, wurde sowohl beim Zerfall von Gd-HP-DO3A als auch während des Zerfalls von Gd-BT-DO3A beobachtet. Weiterhin wurde

durch Messungen mit UV aktiven Metallen gezeigt, dass der Zerfallsmechanismus von Gd-BT-DO3A und Gd-HP-DO3A trotz der Strukturunterschiede gleich ist.

Diese Gründe sprechen dafür, dass die Strukturunterschiede der Liganden HP-DO3A und BT-DO3A nicht die Ursache für das Abweichen von Reaktionsbedingungen pseudoerster Ordnung bei hohen pH-Werten ist.

2.1.12 In vivo Zerfall der MRT-Kontrastmittel

Die Bestimmung der Zerfallskonstanten erfolgte bei pH-Werten kleiner als 3, der nicht dem physiologischen pH-Wert im Serum entspricht.

Bei einem pH von 7,4 ist ein Komplexzerfall ausgehend von einem monoprotonierten Komplex sehr unwahrscheinlich. Ein möglicher Zerfall von makrozyklischen Kontrastmitteln im Serum erfolgt somit nicht über den säurekatalysierten Reaktionspfad.

Es wurde gezeigt, dass der säurekatalysierte Komplexzerfall nicht durch Ca^{2+} bei einer Konzentration von 1 mmol/l beeinflusst wird. Die Konzentration an freien nicht komplexierten Ca^{2+} im Serum beträgt durchschnittlich 1,15 mmol/l bis 1,35 mmol/l.

Somit wird der Zerfall von makrozyklischen MRT-Kontrastmitteln nicht durch die Anwesenheit von Ca^{2+} beeinflusst. Der Einfluss von weiteren Kationen auf den Zerfall von Gadolinium(III) Komplexen, wurde nicht untersucht. Kationen, die den Zerfall von Gadolinium(III) Komplexen katalysieren können, liegen innerhalb des menschlichen Körpers hauptsächlich in komplexierter Form vor. Daher ist es unwahrscheinlich das makrozyklische Komplexe über den Lanthanoid oder Übergangsmetall katalysierten Reaktionspfad innerhalb des menschlichen Organismus zerfallen. Es wurde nicht untersucht inwieweit Aminosäuren oder Proteinfragmente, die sich im Serum oder innerhalb der Zellen befinden können, den Zerfall von makrozyklischen Gadolinium Komplexen beeinflussen können.

Ein säurekatalysierter Zerfall von MRT-Kontrastmitteln auf Gd^{3+} Basis innerhalb der Lysosomen kann nicht ausgeschlossen werden. Lysosomen sind membranumhüllte Zellorganellen der Säugerzellen. Die Funktion der Lysosomen ist unter anderem die Spaltung von Biopolymeren und die interzelluläre Verdauung von körperfremden Verbindungen. Die Protonenkonzentration innerhalb der Lysosomen ist deutlich höher als die Protonenkonzentration im Serum oder anderen Zellorganellen. Durch die vergleichsweise hohe Protonenkonzentration wird das Freisetzen von Gd^{3+} aus den Liganden begünstigt, weil der Zerfall von MRT-Kontrastmitteln auf Gd^{3+} Basis

säurekatalysiert ist.

Es ist möglich, dass geringe Mengen der Gadolinium(III) Komplexe unspezifisch in die Zellen und anschließend in die Zellorganellen aufgenommen werden. Da bei Patienten mit verminderter Nierenfunktion die Halbwertszeit der vollständigen Ausscheidung der MRT-Kontrastmittel mehrere Wochen dauern kann, wird dadurch die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Aufnahme in die Organellen erhöht. Weil die Zell- und Lysosomenmembranen negativ geladen sind, können nur die positiv geladene und neutrale Komplexe in die Zelle aufgenommen werden, solange die Zelle nicht über aktive Aufnahmemechanismen für negativ geladene Verbindungen verfügt.

Der Zerfall von Gd^{3+} Komplexen innerhalb von Lysosomen wird durch die Tatsache bestätigt, dass kationische Gd^{3+} Komplexe toxisch sind und nicht als MRT-Kontrastmittel eingesetzt werden können.

Tierversuche und andere präklinische Studien zeigten, dass kationische Gd^{3+} Komplexe trotz einer ausreichend hohen kinetischen bzw. thermodynamischen Stabilität bei pH 7,4 nicht als MRT-Kontrastmittel verwendet werden können. Die Injektion von geringen Mengen der kationischen Gd^{3+} Komplexen führt zu schweren Vergiftungserscheinungen.⁵ Weil die Zellmembranen und die Membranen von Organellen negativ geladen sind, wird die Transfektion der Zellen durch positiv geladene Teilchen begünstigt. Anschließend kann der Zerfall von positiv geladenen Komplexen innerhalb der Lysosomen bei niedrigen pH-Werten stattfinden.

2.2 Bestimmung der Bildungskinetik mit einer Gd³⁺-sensitiven Elektrode

2.2.1 Beschreibung der Funktionsweise einer Gd³⁺-sensitiven Elektrode

Die Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDTPA und GdDOTA wurde mit Hilfe einer Gd³⁺-sensitiven Elektrode durchgeführt. Die Bestimmung der Bildungskonstanten mit einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode hat den Vorteil, dass der Verbrauch von Gd³⁺ während der Bildungsreaktion direkt beobachtet werden kann. Bei der häufig eingesetzten Methode zur Bestimmung von Bildungs- und Zerfallskonstanten von Gadolinium(III) Komplexen, einer Umkomplexierung mit UV aktiven Metallen, kann der Gd³⁺ Verbrauch nicht direkt beobachtet werden. Weiterhin wird die Bildungsreaktion nicht durch die Anwesenheit von Fremdionen wie zum Beispiel Eu³⁺ beeinflusst.

Es ist möglich mit einer ionensensitiven Elektrode freies Gd³⁺ zu detektieren, da in der ionensensitiven PVC Membran der Elektrode der Ionophor N-(2-Pyridyl)-N-(4-nitrophenyl)thioharnstoff (PyTu₄NO₂) eingebracht ist, welcher selektiv Gd³⁺ innerhalb der ionensensitiven Membran komplexieren kann.

Der Gd³⁺ Konzentrationsunterschied zwischen der ionensensitiven Membran und der Probelösung führt zu einem Potentialunterschied. Der detektierte Potentialunterschied ist proportional zur Gd³⁺ Konzentration in der Probelösung.

Die genaue Funktionsfähigkeit und Entwicklung der verwendeten Gadolinium(III) sensitiven Elektrode wurde im Rahmen der Diplomarbeit „Entwicklung einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode zur Bestimmung der Kinetik von Gadolinium(III) Komplexen“ beschrieben³²

2.2.2 Qualifizierung der Gd³⁺-sensitiven Elektrode

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Qualifizierung der Gd³⁺-sensitiven Elektrode und weiteren Equipments, das für die Bestimmung der Bildungskonstanten verwendet wurde, nicht durchgeführt. Die Funktionsfähigkeit und eine prinzipielle Eignung der Elektrode zur Bestimmung von Bildungskonstanten wurde während der Entwicklung der Gadolinium-sensitiven Elektrode, im Rahmen der Diplomarbeit im Jahr 2013 „Entwicklung einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode zur Bestimmung der Kinetik von Gadolinium(III) Komplexen“ gezeigt.³²

2.2.3 Optimierung der Methode zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten mit einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode.

2.2.3.1 Auswahl des geeigneten Inertelektrolyten

Zum konstant halten der Ionenstärke während der Bestimmung der Bildungskonstanten, ist es notwendig einen Inertelektrolyt im Überschuss zur Probelösung zu addieren, der mit den anderen in der Probelösung enthaltenen Verbindungen nicht wechselwirken kann. Da TMACl keine Komplexe mit den untersuchten Liganden bilden kann, wird TMACl als Inertelektrolyt bei der Bestimmung der Zerfallskonstanten mit der pH-Stat Methode und bei der Bestimmung der thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten eingesetzt.

Die Benutzung von TMACl als Inertelektrolyt, hat weiterhin den Vorteil, dass die Messungen zur Bestimmung der Bildungskonstanten, sich mit anderen Messungen, welche im Arbeitskreis Hegetschweiler durchgeführt worden sind, besser vergleichen lässt. Um die Eignung vom TMACl als Inertelektrolyt für die Bestimmung der Bildungskonstanten mit einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode zu prüfen, wurde eine Kalibrierkurve mit Gd^{3+} -haltigen Lösungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 10^{-1} mol/l (pGd 1) und 10^{-6} mol/l (pGd 6) mit Hilfe einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode aufgenommen.

Die TMACl Konzentration innerhalb der einzelnen Probelösungen beträgt 0,1 mol/l.

Die Kalibrierkurve aufgenommen mit einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode und einer Ag/AgCl Referenzelektrode in Probelösungen, welche TMACl enthalten, ist in der Abbildung 45 dargestellt.

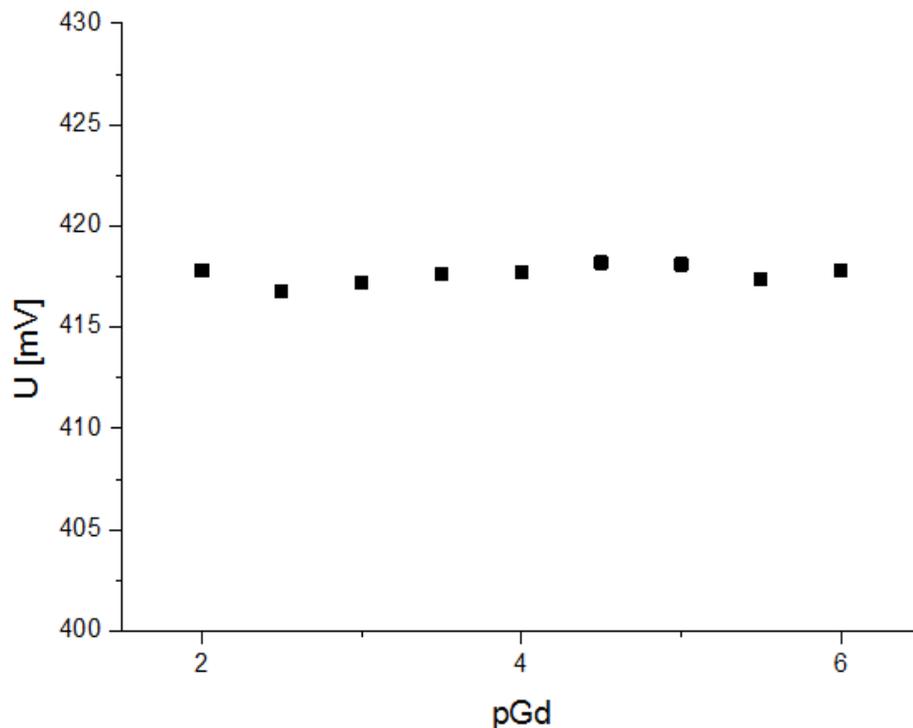


Abbildung 45: Messung der Gd^{3+} Konzentration bei Anwesenheit vom 0,1 M TMACl in der Probelösung

Wie aus der Abbildung 45 zu erkennen ist, kann eine Gadolinium(III)-sensitive Elektrode in Anwesenheit von TMACl eine Änderung der Gd^{3+} Konzentration nicht detektieren. Die Schwankungen der Kalibrierkurve in der Abbildung 45 liegen innerhalb der Messgenauigkeit der verwendeten Elektrode. Aus diesem Grund wird TMACl als Inertelektrolyt, für die Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDOTA und GdDTPA nicht verwendet.

Bei der Bestimmung der Bildungskonstanten von Gd^{3+} Komplexen wird der Inertelektrolyt KCl mit einer Ionenstärke von 0,1 mol/l verwendet.

Bei der Anwesenheit von Kaliumchlorid in den Probelösungen ist es immer noch möglich Gd^{3+} mit einer ausreichenden Genauigkeit und Präzision detektieren zu können.

Eine Kalibrierkurve aufgenommen mit einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode, in Probelösungen welche den Inertelektrolyt KCl mit einer Konzentration von 0,1 mol/l enthalten, ist in der Abbildung 46 dargestellt. Die Gd^{3+} Konzentration in den einzelnen Kalibrierlösungen wird im Bereich pGd 1 ($1 \cdot 10^{-1}$ mol/l) und pGd 5,5 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) verändert. Die KCl Konzentration in den Kalibrierlösungen ist konstant und beträgt 0,1 mol/l.

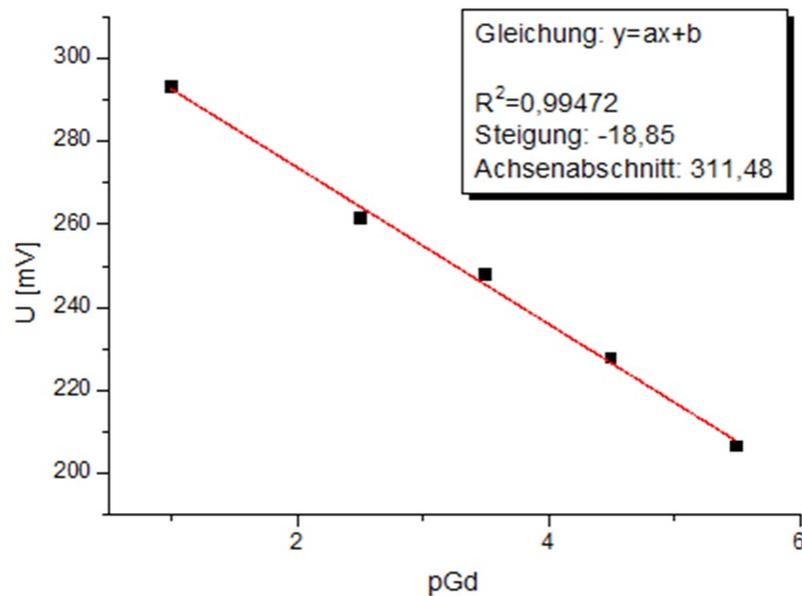


Abbildung 46: Kalibrierkurve aufgenommen mit einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode in Anwesenheit von KCl mit einer Konzentration von 0,1 mol/l

Die Abbildung 46 zeigt, dass KCl die Fähigkeit Gd^{3+} mit einer ionensensitiven Elektrode zu detektieren, nicht beeinflusst. Die Steigung der Kalibrierkurve (Abbildung 46) beträgt 18,85 mv/Dekade der Gd^{3+} Konzentration. Bei der Anwesenheit von Kaliumchlorid ist es möglich mit der verwendeten ionensensitiven Elektrode Gd^{3+} quantitativ in einem Konzentrationsbereich zwischen $1 \cdot 10^{-1}$ mol/l und $3 \cdot 10^{-6}$ mol/l zu erfassen. Durch die Anwesenheit von KCl in den Probelösungen ist eine konstante Ionenstärke sichergestellt. Von der ionensensitiven Elektrode detektierten Potentialunterschiede können nur aufgrund der sich ändernden Gd^{3+} Konzentration in den Probelösungen detektiert werden.

Die Anwesenheit von K^+ Ionen hat einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Bestimmung der Bildungskonstanten von den, im Rahmen dieser Arbeit, untersuchten Komplexe im Bereich zwischen pH 4 und pH 7,4.²⁰

2.2.3.2 Optimierung des verwendeten Puffers

Die Bildung von den Komplexen GdDOTA und GdDTPA verläuft basenkatalysiert.⁵ Je höher der pH-Wert, desto schneller verläuft die Bildung der Komplexe. Bei der Bildung von den eingesetzten Gadolinium (III) Komplexen werden Protonen freigesetzt. Dadurch wird die Bildungsgeschwindigkeit verringert, wenn der pH-Wert während der Reaktion nicht

konstant bleibt. Die Reaktionsgleichung 22 beschreibt das Freisetzen von Protonen während einer Bildungsreaktion von protonierten Gd^{3+} Komplexen.



Die Bestimmung der Bildungskonstanten wird bei konstanten pH-Werten durchgeführt. Dadurch ist es möglich, den Einfluss des pH-Wertes auf die Komplexbildung bestimmen zu können.

Um den pH-Wert während der Messungen zur Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDTPA konstant zu halten, wurde zunächst ein Essigsäure/Acetat Puffersystem verwendet. Dieses Puffersystem ist in der Lage den pH-Wert im Bereich zwischen pH 4 und pH 5 konstant zu halten. Bildungskonstanten, aufgenommen in Acetat gepufferten Probelösungen sind in Abbildung 47 gezeigt.

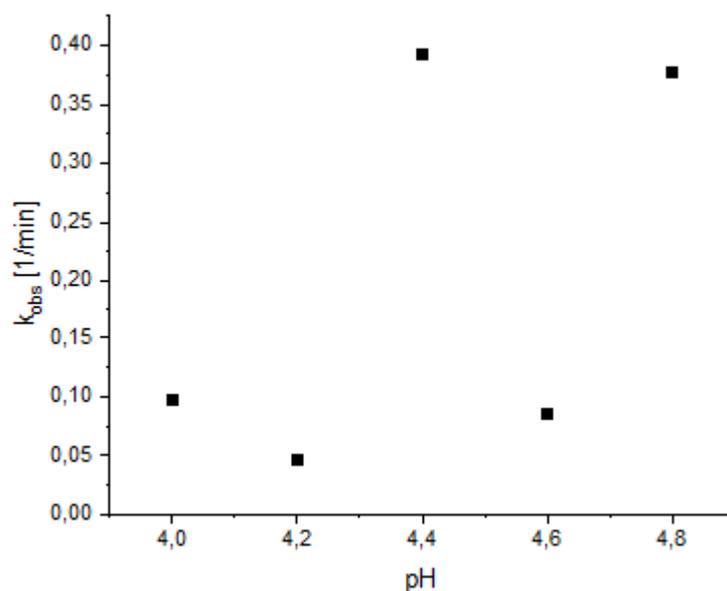


Abbildung 47: Bildungskonstanten k_{obs} bestimmt mit einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode bei Anwesenheit eines Acetatpuffers in den Probelösungen

Aus der Abbildung 47 ist erkennbar, dass bei Anwesenheit von Acetat in den Probelösungen, keine Korrelation zwischen dem pH-Wert und den bestimmten Konstanten erkennbar ist. Die zufällige Verteilung der bestimmten Zerfallskonstanten, kann damit erklärt werden, dass Acetat mit Gd^{3+} Komplexe bilden kann und dies die Messung

beeinflusst.

Um den Einfluss des Puffers auf die Bildung vom Komplex GdDTPA zu minimieren, wird bei der Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDTPA der Puffer Diethylpiperazin (DEPP) verwendet (Abbildung 48).

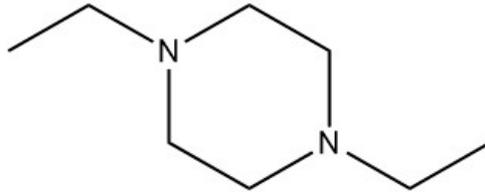


Abbildung 48: Strukturformel von Diethylpiperazin (DEPP)

In der Abbildung 48 gezeigter Puffer, ist ein tertiäres Diamin und hat deswegen eine sehr geringe Neigung zur Komplexbildung. Der verwendete DEPP Puffer hat eine ausreichend hohe Löslichkeit in Wasser. Die pK_s Werte vom DEPP bei 25 °C sind 4,48 und 8,58.³³ Bei einer Pufferkonzentration von 0,6 mol/l bleibt der pH-Wert, trotz der freigesetzten Protonen während der Komplexbildung konstant. Der Nachteil der Verwendung des DEPP Puffers ist eine Verdoppelung der Driftzeit der Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode, nachdem die Elektrode in die Probelösung getaucht wird.

Bei Anwesenheit des DEPP Puffers in den Probelösungen, ist es trotz einer Erhöhung der Driftzeit möglich mit einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode die Zerfallskonstanten zu bestimmen, das im Abschnitt 2.2.7 diskutiert wird.

Bei der Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDOTA bei pH 7,4 wird der Puffer 3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure (MOPS) verwendet. Die Struktur des verwendeten MOPS Puffers wird in der Abbildung 49 gezeigt.

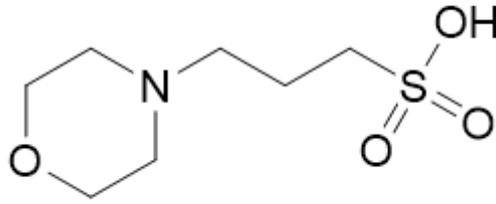


Abbildung 49: Strukturformel der 3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure (MOPS)

Der MOPS Puffer hat bei pH 7,4 eine sehr geringe Neigung zur Komplexbildung. Der Puffer besitzt bei der Temperatur von 25 °C einen pK_s Wert von 7,09. Diese Eigenschaften machen den MOPS Puffer geeignet den pH-Wert während der Messungen zur Bestimmung der Bildungskonstanten von Gadolinium(III) Komplexen konstant zu halten, weil sie nicht mit dem Analyt wechselwirken können.³³ Im Rahmen dieser Arbeit, war es möglich Bildungskonstanten in Anwesenheit des MOPS Puffers zu bestimmen, was im Abschnitt 2.2.7 diskutiert wird.

2.2.3.3 Ermittlung der optimalen Rührgeschwindigkeit

Eine ionensensitive PVC Membranelektrode kann eine Änderung der Ionenkonzentration nur dann detektieren, wenn sich eine Grenzschicht zwischen der ionensensitiven PVC Membran und der Probelösung ausbildet.³⁴ In einer nicht gerührten Lösung, kann sich eine Grenzschicht am besten ausbilden. Die Bestimmung der Bildungskonstanten in einer nicht gerührten Lösung hat jedoch den Nachteil, dass sich Konzentrationsgradienten während der Messungen innerhalb der Probelösung ausbilden können und die Gd^{3+} Konzentration nicht in jedem Bereich innerhalb des Probengefäßes gleich ist. In einer gerührten Probelösung können keine Gd^{3+} Konzentrationsgradienten innerhalb der Probelösung entstehen. Jedoch wird die Bildung von Grenzschichten in einer gerührten Lösung erschwert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine optimale Rührgeschwindigkeit von 60 Umdrehungen/Min ermittelt, bei der es möglich ist die Gd^{3+} Konzentration mit einer ausreichenden Genauigkeit und Präzision erfassen zu können. In der Abbildung 50 werden Kalibrierkurven aufgenommen in einer gerührten und nicht gerührten Probelösung dargestellt und miteinander verglichen.

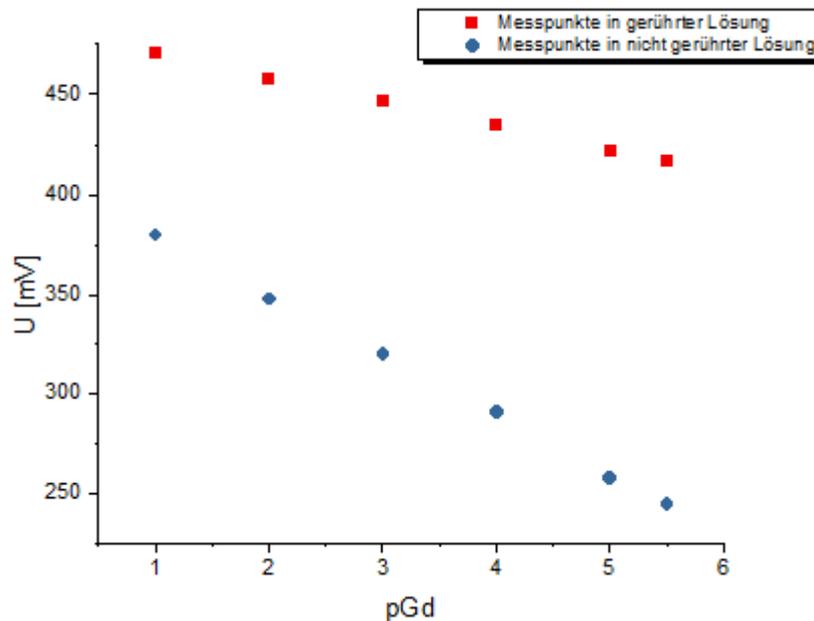


Abbildung 50: Vergleich der Potentiale in einer gerührten und nicht gerührten $GdCl_3$ Lösung

Aus der Abbildung 50 ist erkennbar, dass in einer gerührten Lösung die Empfindlichkeit der Gd^{3+} sensitiven Elektrode sinkt. Die Steigung der Kalibriergerade in ungerührter Lösung beträgt 30 mV/Dec der Gadolinium(III) Konzentration. In gerührter Lösung beträgt die Steigung der Kalibriergerade 12 mV/Dekade der Gadolinium(III) Konzentration. Unterschiedliche Steigungen, in der Abbildung 50 gezeigten Kalibriergeraden, können damit erklärt werden, dass sich eine Grenzschicht zwischen der ionensensitiven Elektrodenmembran und der Probelösung in einer gerührten Lösung schlechter ausbilden kann als in einer nicht gerührten Lösung.

Trotz einer verringerten Empfindlichkeit, der verwendeten ionensensitiven Elektrode auf Gd^{3+} in einer gerührten Probelösung, werden alle durchgeführten Messungen in einer gerührten Lösung durchgeführt. In einer gerührten Lösung ist es möglich Gd^{3+} mit einer ausreichend guten Präzision und Genauigkeit detektieren zu können. Der Hauptvorteil der Bestimmung von Bildungskonstanten in einer gerührten Lösung ist die sehr geringe Wahrscheinlichkeit einer Entstehung von Konzentrationsgradienten.

2.2.4 Beschreibung der optimierten Methode zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten

Bevor eine Bestimmung der Bildungskonstanten durchgeführt wird, erfolgt eine Kalibrierung der verwendeten Elektrode um sicherstellen zu können, dass die verwendete ionensensitive Elektrode funktionsfähig ist. Sowohl die Bestimmung der Bildungskonstanten als auch die Kalibrierung werden bei der konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 30 µl einer 0,1 M GdCl₃ Lösung gestartet. Nach der Zugabe der GdCl₃ Lösung beträgt die Gadolinium(III) Konzentration 1 mmol/l.

Die Probelösung besteht aus KCl, mit einer Konzentration von 0,1 mol/l, aus dem zu untersuchenden Ligand, mit einer Konzentration von 0,1 mol/l und einem Puffer. Bei der Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDOTA bei pH 7,4 wird der MOPS Puffer verwendet. Bei der Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDTPA im pH-Bereich zwischen 4 und 5 wird der DEPP Puffer verwendet. Die Bestimmung erfolgt in gerührter Lösung mit einer Rührgeschwindigkeit von 60 Umdrehungen/Minute.

2.2.5 Auswertung der Messungen zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten

Zum Umrechnen der Potentiale, die mit einer ISE detektiert wurden, in Gadolinium(III) Konzentrationen wird vor jeder Messung für die Bestimmung der Zerfallskonstanten eine Kalibrierung der verwendeten Elektrode durchgeführt.

Die Kalibrierung wird zusätzlich dazu verwendet die Funktionsfähigkeit der verwendeten Elektrode vor einer Messung zu prüfen. Für die Kalibrierung einer ionensensitiven Elektrode wird das Potential in 3 Kalibrierlösungen mit einer unterschiedlichen Gadolinium(III) Konzentration im Bereich zwischen 10⁻¹ mol/l und 3,16·10⁻⁶ mol/l gemessen. Die KCl und Puffer Konzentration ist in allen Kalibrierlösungen konstant.

Die Gd³⁺ Konzentration der Probelösungen wird logarithmisch gegen das mit der ISE detektierte Potential aufgetragen und mit einer Geradengleichung angefüttet.

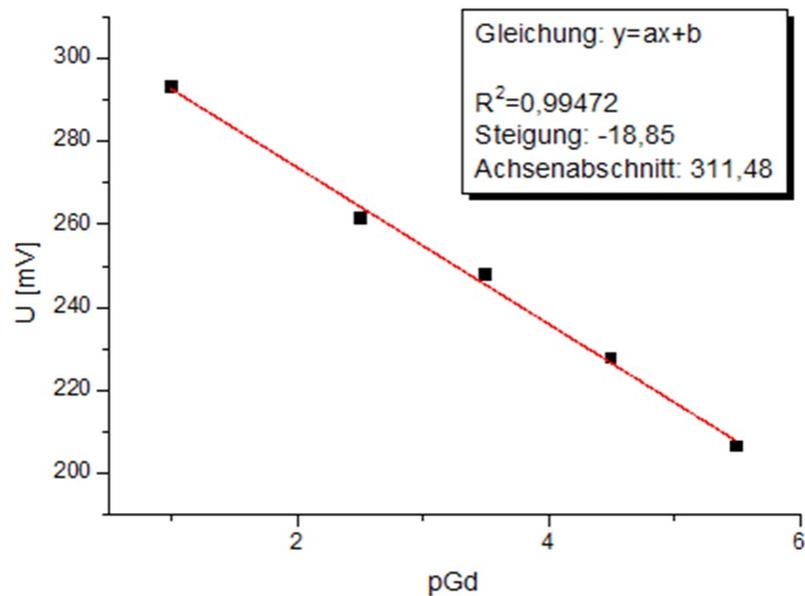


Abbildung 51: Kalibriergerade zur Umrechnung der mit einer ionensensitiven Elektrode detektierten Potentiale in pGd Werte

Eine Kalibrierkurve, aufgenommen mit einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode, ist in der Abbildung 51 gezeigt.

Aus der Geradengleichung erhaltenen Steigung (a) und dem y-Achsenabschnitt ist es mit Hilfe von Gleichung 23 möglich jede gemessene Spannung einem pGd Wert zuzuordnen.

$$pGd = \frac{U - b}{-a} \quad (23)$$

Dabei ist U ist mit der ionensensitiven Elektrode detektierte Spannung und b ist der y-Achsenabschnitt, der durch das Anfitzen der Geradengleichung an die Kalibrierpunkte erhalten wurde. Die Variable a ist die Steigung der Kalibriergeraden.

Mit der Formel 24 werden die pGd Werte in Gd^{3+} Konzentrationen umgerechnet.

$$[Gd] = 10^{-pGd} \quad (24)$$

Der Ligand wird im Vergleich zu Gd^{3+} in einem hundertfachen Überschuss eingesetzt. Aus diesem Grund findet die Reaktion unter Bedingungen pseudoerster Ordnung statt. Zum Bestimmen der Bildungskonstante k_{obs} wird die Änderung Gd^{3+} Konzentration mit der

Gleichung für eine Reaktion erster Ordnung angefitet (Abbildung 52).

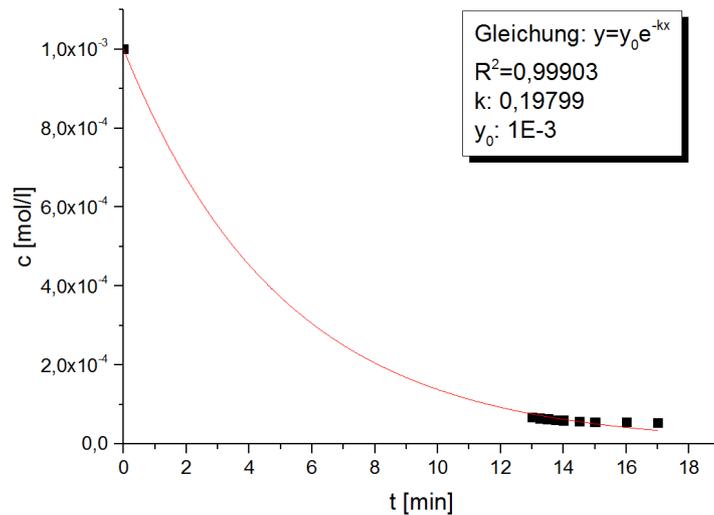


Abbildung 52: Kurvenfit zum bestimmen der kinetischen Bildungskonstante vom Komplex GdDTPA bei pH 4,2

Aufgrund der langen Ansprechzeit der Gd(III)-Sensitiven Elektrode, auf Änderungen der Gd^{3+} Konzentration, kommt es nach der Zugabe von $GdCl_3$ zur Probelösung zu einer Elektrodendrift, welche mehrere Minuten andauern kann. Aus diesem Grund kann nicht die gesamte Reaktion mit der ISE beobachtet werden.

2.2.6 Validierung der Methode zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten mit einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode

Um zeigen zu können, dass die verwendeten Gd^{3+} -sensitive Elektroden für Bestimmung der Bildungskonstanten von Gadolinium(III) Komplexen geeignet sind, wird eine Validierung dieser Methode durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit werden folgende Parameter validiert: Genauigkeit, Präzision, Spezifität, Detektionsgrenze, Quantifikationslimit und Messbereich der Methode.

2.2.6.1 Spezifität der Gd^{3+} -sensitiven Elektrode

Der ICH definiert die Spezifität als die Fähigkeit den Analyt in Gegenwart anderer Stoffe bestimmen und identifizieren zu können.²³

Die Bestimmung der Bildungskonstanten von Gd^{3+} Komplexen mit einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode erfolgt in Gegenwart von KCl, welches im Überschuss als

Inertelektrolyt eingesetzt wird. Weiterhin befindet sich der zu untersuchende Liganden in einem 100-fachen Überschuss und ein Puffer in den Probelösungen. Während der Entwicklung der Gadolinium-sensitiven Elektrode, im Rahmen der Diplomarbeit im Jahr 2012/2013 wurde gezeigt, dass die Messungen der Gadolinium(III) Konzentration nicht durch die Anwesenheit von Kalium beeinflusst werden. Die zu untersuchenden Liganden beeinflussen die Messung nicht, da sie nicht mit der apolaren ionensensitiven PVC Membran wechselwirken können. In Gegenwart anderer Lanthanoide oder Metallionen bis zu einer Konzentration von maximal 0,1 mol/l ist die verwendete Elektrode in der Lage Gadolinium(III) zuverlässig detektieren zu können.³⁵

Im Abschnitt 2.2.3.1 wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von TMACl innerhalb der Probelösung die Bestimmung von Gd^{3+} nicht möglich ist. Ein möglicher Grund dafür ist, dass sich das TMACl in der ionensensitiven Membran einlagert und deswegen die Messungen beeinflusst.

Während der Optimierung der Bestimmungsmethode (Abschnitt 2.2.3.2), konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung von Bildungskonstanten durch die Anwesenheit von Molekülen beeinflusst wird, welche in der Lage sind mit Gadolinium(III) Ionen Komplexe zu bilden.

Bei Anwesenheit von DEPP und MOPS Puffer in den Probelösungen ist es möglich Bildungskonstanten von den Komplexen GdDOTA und GdDTPA zu bestimmen, was im Abschnitt 2.2.3.2 diskutiert wird. Der Einfluss auf die Bestimmung der Bildungskonstanten durch den DEPP bzw. MOPS Puffer wurde nicht untersucht. Sowohl in den Kalibrierlösungen als auch in den Probelösungen sind die verwendeten DEPP bzw. DTPA Puffer in gleicher Konzentration vorhanden. Somit ist der Einfluss der Puffer auf die eingesetzten Elektroden während der Messungen immer konstant.

2.2.6.2 Detektions- und Quantifikationsgrenzen der Gd^{3+} -sensitiven Elektrode

Die Detektionsgrenze wird als die Menge an Analyt definiert, welche bei einer Messung detektiert jedoch nicht quantifiziert werden kann. Quantifizierungsgrenze wird als die kleinste Menge des Analyten, die quantifiziert werden kann.²³ Die eingesetzten ISE können Gadolinium(III) im Bereich zwischen pGd 1 ($1 \cdot 10^{-1}$ mol/l) und pGd 5,5 ($3 \cdot 10^{-6}$ mol/l) detektieren und quantifizieren.

2.2.6.3 Obere Bestimmungsgrenze der kinetischen Bildungskonstanten

Die obere Bestimmungsgrenze für die Bildungskonstanten, wird durch die Driftzeit der verwendeten ISE begrenzt. Wenn Gadolinium(III) schneller komplexiert wird, als die Driftzeit der Elektrode ist, kann die Bildungskonstante nicht mit einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode zuverlässig bestimmt werden.

Es war möglich Bildungskonstanten pseudoerster Ordnung im Bereich von 0,198 /min, diese entspricht einer Halbwertszeit von 3,50 Minuten, mit einer PVC Membranelektrode zu bestimmen. Nach dem Eintauchen braucht eine Elektrode durchschnittlich zwei Minuten oder länger, bis eine Änderung der Gadolinium(III) Konzentration zuverlässig in einer Probelösung detektiert werden kann. Bei Messungen im Bereich der oberen Bestimmungsgrenze kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Bestimmung im signifikanten Maße durch die Elektrodendrift beeinflusst wird.

2.2.6.4 Untere Bestimmungsgrenze der kinetischen Bildungskonstanten

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich eine minimale Bildungskonstante pseudoerster Ordnung bei der Bildung vom Komplex GdDOTA von 0,04 /min zu ermitteln, dies entspricht einer Halbwertszeit von 17,3 Minuten. Der untere Bestimmungsbereich wird dadurch begrenzt, dass die sehr fragile und empfindliche PVC Membran der verwendeten ISE während der Messung zerstört oder verändert wird. Die maximale Verweilzeit der ISE in der Probelösung während einer durchgeführten Messung betrug 90 Minuten, in dieser Zeit wurde keine Veränderung der Elektrode bemerkt und die Elektrode konnte die Gadolinium(III) Konzentration zuverlässig bestimmen.

2.2.6.5 Evaluierung des pH-Bereiches für die Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten

Der pH-Bereich, in dem Messungen mit einer Gadolinium(III)-sensitiven PVC Membranelektrode möglich ist, liegt zwischen pH 4 und pH 7,8. Der obere Messbereich wird dadurch begrenzt, dass bei pH-Werten höher als 7,8 schwerlösliches Gadoliniumhydroxid gebildet wird. Der untere Messbereich wird dadurch begrenzt, dass bei pH-Werten kleiner als 4,0 die detektierten Potentiale im signifikantem Maß durch die Protonenkonzentration beeinflusst werden.³⁵

Bei der Bestimmung der Bildungskonstanten wird der obere pH-Bereich, in dem Messungen möglich sind, zusätzlich dadurch begrenzt, dass bei hohen pH-Werten die Bildung der zu untersuchenden Komplexe schneller erfolgt als die verwendeten Elektroden eine Änderung der Gd^{3+} Konzentration zuverlässig detektieren können.

2.2.6.6 Genauigkeit und Präzision der Methode zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten

Die Genauigkeit wird von der ICH als ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem einzelnen Messergebnis und dem wahren Wert definiert.

Als wahrer Wert kann entweder ein Referenzwert, der mit einer alternativen Methode ermittelt wurde, oder der Mittelwert definiert werden. Die Streuung zwischen den einzelnen Messwerten, Standardabweichung und der Variationskoeffizient liefern eine Aussage über die Präzision einer analytischen Methode.³⁶

Im Rahmen dieser Arbeit wird keine statistische Auswertung der Messergebnisse für die Bestimmung der Präzision und Genauigkeit der Methode zur Ermittlung von Zerfallskonstanten mit einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode durchgeführt.

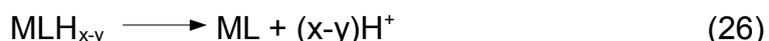
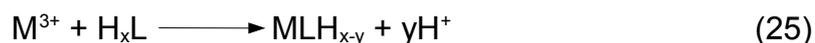
Eine ionensensitive PVC Membranelektrode ist sehr fragil und kann leicht zerstört oder beschädigt werden. Obwohl vor jeder Messung eine Kalibrierung der Elektrode durchgeführt wird, bei der die Funktionsfähigkeit einer Elektrode überprüft wird, kann diese Überprüfung nicht alle Defekte an einer Elektrode aufdecken. Weiterhin kann eine Elektrode während der Messung nach einer erfolgreich durchgeführten Kalibrierung beschädigt werden. Eine beschädigte Elektrode kann die Bestimmung der Bildungskonstanten negativ beeinflussen und verfälschen. Wenn die PVC Membran einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode beschädigt ist, werden Konstanten ermittelt, welche deutlich vom tatsächlichen Wert abweichen. Bei Messungen mit einer beschädigten PVC Membranelektrode ändert sich das gemessene Potential sehr langsam oder bleibt konstant.

Es ist maximal bei jeder achten Messung möglich die Bildungskonstanten mit einer ISE zu bestimmen, welche reproduziert werden konnten. Ein Großteil der durchgeführten Messungen lieferten trotz der gleichen Zusammensetzung der Probelösung, immer gleichen Umweltbedingungen während der Messung und einer gleichen Durchführung, Ergebnisse die nicht reproduziert werden konnten. Der Anteil der erfolgreich durchgeführten Messungen im Verhältnis zu den Messungen, die außerhalb der

Spezifikation liegen, ist sehr hoch. Diese Tatsachen sprechen gegen eine statistische Auswertung der Genauigkeit und Präzision, weil bei diesen Auswertungen ein Großteil der durchgeführten Messungen nicht berücksichtigt werden kann.

2.2.7 Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten von GdDTPA mit einer Gd³⁺-sensitiven Elektrode

Durch Fluoreszenz Messungen mit UV aktiven Metallkomplexen als auch durch NMR-Spektroskopie mit CeDTPA und CeDOTA Komplexen wurde folgender Bildungsmechanismus ermittelt, welcher durch Reaktionsgleichung 25 und Reaktionsgleichung 26 beschrieben wird.^{37 38 30} Da sowohl Ce³⁺ als auch Gd³⁺ zur Gruppe der Lanthanoide gehören und bei der Bestimmung der Bildungskonstanten im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls die Liganden DTPA und DOTA eingesetzt wurden, kann der Reaktionspfad für die Bildung GdDTPA und GdDOTA ebenfalls durch Reaktionsgleichung 25 und 26 beschrieben werden.



Durch die Gleichungen 25 und 26 beschriebener Reaktionsmechanismus ist eine Bildungsreaktion, die in zwei Schritten abläuft. Im ersten Reaktionsschritt erfolgt zunächst eine Koordinierung des Metalls an die Acetatgruppen der untersuchten Liganden. Dabei erfolgt der erste Deprotonierungsschritt des Komplexes. In einem zweiten Reaktionsschritt, nach der Koordinierung des Metalls an den Liganden, findet eine Umwandlung des Komplexes statt. Bei der Umwandlung des Komplexes erfolgt die vollständige Koordinierung des Metalls an den Liganden. Bei diesem Reaktionsschritt wird der Ligand vollständig deprotoniert.³⁰

Bei einer Bestimmung der Bildungskonstanten mit der Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode ist es möglich nur den ersten Reaktionsschritt der Bildungsreaktion zu beobachten, weil die verwendete ionensensitive Elektrode nur freies Gd³⁺ detektieren kann. Alle weiteren Reaktionsschritte, die nach der Komplexbildung des Metalls erfolgen, können mit dieser Methode nicht beobachtet werden.

Die Bildung von den Komplexen GdDOTA und GdDTPA verläuft basenkatalysiert.⁵

Je höher der pH-Wert ist, desto schneller erfolgt die Komplexbildung. Die Messungen zur

Bestimmung der Bildungskonstanten werden bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt um den Einfluss des pH-Wertes auf die Bildungsreaktion bestimmen zu können. Während der einzelnen Messungen wird der pH-Wert konstant gehalten, so dass die Komplexbildungsreaktion nicht durch die Veränderung des pH-Wertes während der Messung beeinflusst wird.

Trotz der schlechten Reproduzierbarkeit der Messungen und der Fragilität der zur Bestimmung von Bildungskonstanten verwendeten Elektroden, war es möglich Bildungskonstanten bei unterschiedlichen pH-Werten in einer DEPP gepufferten Lösung zu bestimmen. Die Mittelwerte der ermittelten Bildungskonstanten bei einer Temperatur von 25 °C und in Anwesenheit des DEPP Puffers sind in Tabelle 16 angegeben.

Tabelle 16: Bildungskonstanten und Halbwertszeiten von GdDTPA in einer durch DEPP gepufferten Lösung

pH	k_{obs} [1/min]	t_{1/2} [min]
4,2	0,198	3,50
4,4	0,405	1,70
4,6	0,896	0,77
4,8	1,160	0,59

Die Auftragung der ermittelten Bildungskonstanten gegen den pH-Wert ist in der Abbildung 53 dargestellt.

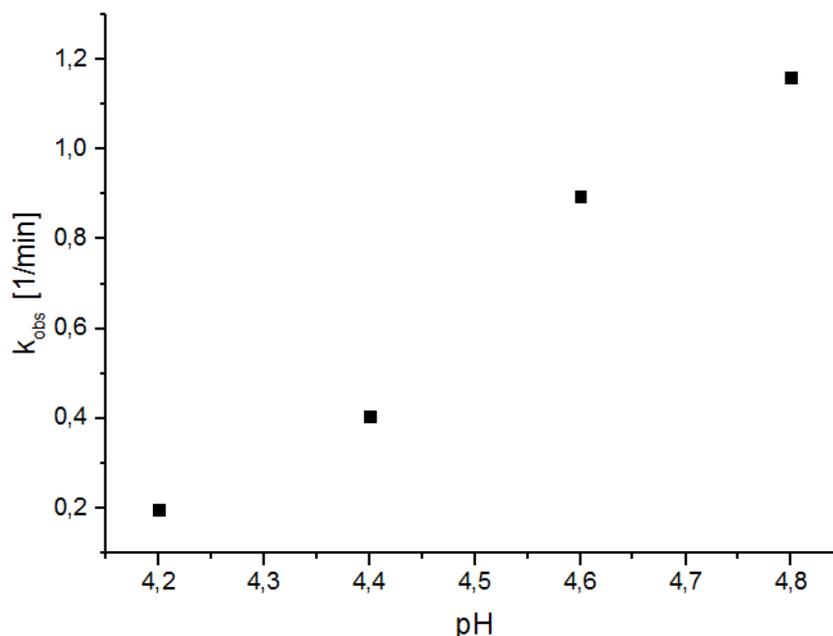


Abbildung 53: Bildungskonstanten k_{obs} von GdDTPA aufgenommen in DEPP gepufferten Probelösungen

Aus der Tabelle 16 und Abbildung 53 ist erkennbar, dass mit steigendem pH-Wert die Bildungskonstanten k_{obs} größer werden. Mit einem steigendem pH steigt somit auch die Bildungsgeschwindigkeit von Komplex GdDTPA. Die Bildung von GdDTPA ist somit basenkatalysiert. Innerhalb des Zeitraums, innerhalb dessen die Reaktion mit Hilfe einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode beobachtet werden konnte, verläuft die Bildung zwischen pH 4,2 und pH 4,8 unter Bedingungen pseudoerster Ordnung.

Für die Bestimmung der Bildungskonstanten konnte nicht die gesamte Änderung der Gd^{3+} Konzentration während der Bildung von GdDTPA berücksichtigt werden. Kurz nach dem Eintauchen der Elektrode in die Probelösung hat sich entweder das gemessene Potential so schnell verändert, dass eine Messung nicht möglich war oder es kam zu einem Anstieg der gemessenen Potentiale, welches als Elektrodendrift identifiziert werden konnte.

Die Gd^{3+} Konzentration zum Zeitpunkt t_0 betrug $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l, mit der Gd^{3+} -sensitiven Elektrode konnte die Bildungsreaktion erst beobachtet werden nachdem die Gd^{3+} Konzentration auf einen Wert von ca. $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l abgesunken ist.

2.2.8 Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten von GdDOTA mit einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode

Die Bildung von Komplex GdDOTA wurde bei pH 7,4 beobachtet, dies entspricht dem physiologischen pH-Wert des Blutes. Genau wie bei der Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDTPA lassen sich die Messungen zur Bestimmung von GdDOTA ebenfalls sehr schwer reproduzieren, da eine Wahrscheinlichkeit der Beschädigung der ionensensitiven Membran während der Messung sehr hoch ist.

Die Bildungskonstante k_{obs} von GdDOTA bei pH 7,4 beträgt 0,996/min. Die Änderung der Gd^{3+} Konzentration während der Bildung des Komplexes GdDOTA ist in der Abbildung 54 zu sehen.

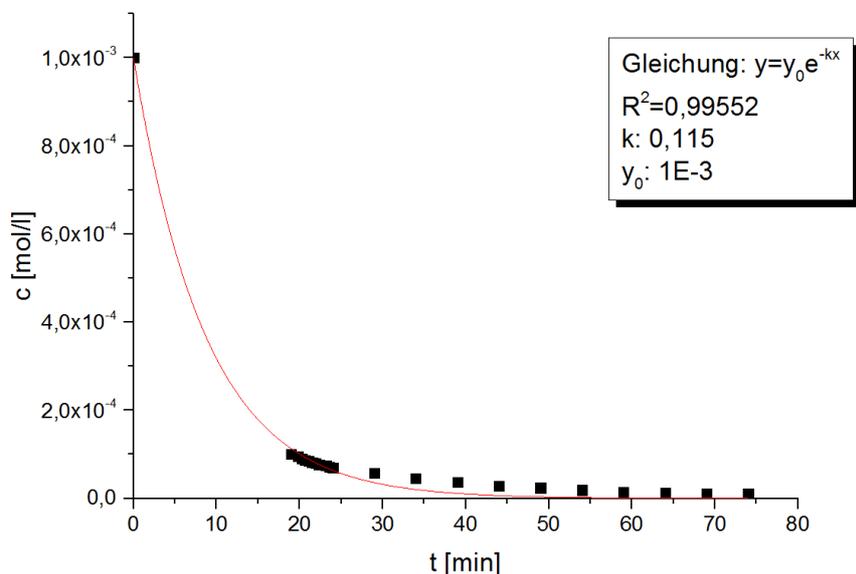


Abbildung 54: Änderung der Gd^{3+} Konzentration während der Komplexbildung von GdDOTA bei pH 7,4

Aus der Abbildung 54 ist erkennbar, dass die Bildungsreaktion mit einer ISE für einen Zeitraum von 60 Minuten beobachtet werden konnte. Verglichen mit der Komplexbildung von GdDTPA bei pH 4,8, erfolgt die Komplexbildung von GdDOTA bei pH 7,4 langsamer, obwohl die Komplexbildung von GdDOTA bei einem höheren pH-Wert ermittelt wurde und die Bildungsreaktion basenkatalysiert ist. Grund für die langsame Komplexbildung von GdDOTA ist die starre, rigide und wenig flexible Struktur des Liganden DOTA.

Bei DOTA sind im Gegensatz zu DTPA nicht alle Bindungen frei beweglich. Aus diesem Grund wird die Koordination von Gd^{3+} an den Ligand DOTA erschwert. Dies führt zu einer langsameren Gleichgewichtseinstellung

Aus der Abbildung 54 ist erkennbar, dass obwohl die Gd^{3+} Konzentration direkt nach der Zugabe 1 mmol/l beträgt, die Gd^{3+} Konzentration beim Start der Messung $1,007 \cdot 10^{-4}$ mol/l ist.

2.2.9 Nachteile der Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten mit einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode

Obwohl die Bestimmung von Bildungskonstanten grundsätzlich möglich ist hat diese Methode viele Nachteile.

Die verwendeten PVC-Membran Elektroden sind sehr fragil. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich eine Elektrode für maximal zwei Messungen zu verwenden. Danach konnten die Gd^{3+} -sensitiven Elektroden kein Gadolinium(III) in einer Probelösung detektieren. Aus diesem Grund war es notwendig für jede Messung eine neue Elektrode herzustellen. Weiterhin wurden viele Elektroden während der Messungen zur Bestimmung der Bildungskonstanten zerstört oder beschädigt, was zu vielen Ausreißern geführt hat und mehrere Wiederholungsmessungen notwendig waren. Ein zusätzliches Argument, der gegen die Verwendung von Gd^{3+} -sensitiven PVC Membranelektroden spricht, ist eine geringe Haltbarkeit. Die PVC Membranelektroden können deswegen nur innerhalb eines kurzen Zeitraums nach der Herstellung für Messungen verwendet werden.

Aufgrund der Fragilität und der geringen Haltbarkeit von PVC Membranelektroden ist es nicht möglich die Bildung von makrozyklischen Komplexen über einen längeren Zeitraum mit dieser Methode zu beobachten. Während einer längeren Messung ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass die Elektrode während der Messung zerstört, beschädigt oder die Fähigkeit verlieren kann auf die Änderung der Gd^{3+} Konzentration zu reagieren.

Die Driftzeit der Gd^{3+} -sensitiven Elektroden erschwert zusätzlich die Bestimmung der Bildungskonstanten. Aufgrund des Elektrodendriffs ist es nicht möglich eine Änderung von Gd^{3+} Konzentration während der gesamten Reaktion zu beobachten. Weiterhin ist es nicht bekannt inwieweit die bestimmten Konstanten k_{obs} von dem Elektrodendrift beeinflusst wird.

Ein zusätzlicher Nachteil der Bestimmung von Bildungskonstanten der offenkettigen Komplexe, mit einer Gadolinium(III)-sensitiven Elektrode ist der relativ geringe pH-Bereich, innerhalb dessen eine Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDTPA möglich war. Die Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDTPA war im Bereich zwischen pH 4 und pH

4,8 möglich. Der untere pH-Bereich wird von den Eigenschaften der ionensensitiven Membran begrenzt. Der obere pH-Bereich wird dadurch begrenzt, dass die Bildungsreaktion schneller als die Driftzeit der Elektrode ist.

Wie schnell die verwendeten Gd^{3+} -sensitiven Elektroden auf eine Änderung von Gadolinium(III) in der Probelösung während der Bildungsreaktion reagieren können, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Eine verzögerte Reaktion auf die Änderung der Gadolinium(III) Konzentration während der Bildung der Komplexe kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die ermittelten Bildungskonstanten durch eine verzögerte Reaktion der Gd^{3+} -sensitiven Elektroden auf die sich ständig ändernde Konzentration des Analyten beeinflusst werden.

Aufgrund dieser Tatsachen ist eine ionensensitive PVC Membranelektrode für die Bestimmung der Bildungskinetik schlecht geeignet. Die ermittelten Bildungskonstanten haben nur eine begrenzte Aussagekraft.

Es wird empfohlen für die Bestimmung der Bildungskonstanten von Gd^{3+} Komplexen eine Gadolinium-sensitive Kristallmembran Elektrode zu entwickeln.

Eine Kristallmembran Elektrode hat den Vorteil, dass sie im Vergleich zu einer PVC Membranelektrode eine stabilere und robustere Membran hat.²⁴ Aufgrund der höheren Stabilität und Robustheit einer Kristallmembran ist es möglich mehrere Messungen mit der gleichen Elektrode durchführen zu können, ohne dass die Elektrode von der Messung negativ beeinflusst wird. Weiterhin ermöglicht eine höhere Stabilität der Kristallmembran Elektrode eine Messung über einen längeren Zeitraum durchführen zu können.

3. Experimenteller Teil

3.1 Chemikalien, Geräte und Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, ABCR Chemikalien, Carl Roth Chemikalien oder vom zentralen Chemikalienlager der Universität des Saarlandes mit größtmöglicher Reinheit bezogen.

Für die Bestimmung der Bildungskonstanten von Gd-BT-DO3A, Gd-HP-DO3A und GdDOTA wurden Injektionslösungen verwendet, die unter aseptischen Bedingungen nach den geltenden GMP Standards hergestellt und abgefüllt wurden.

Aus der TitriPUR® Produktfamilie der Firma Merck wurden 1 M HCl bzw. 0,1 M HCl und 0,1 M KOH verwendet.

Die Lösungen der verwendeten Liganden und Chemikalien wurden stets mit entionisiertem Wasser aus einer Synergy® MILLIPORE Anlage der Firma Merck hergestellt.

Als Kationenaustauscherharz kam Dowex® 50WX2 (100–200 mesh) der Firma Acros Organics zum Einsatz.

Alle pH-Stat Titrationsen wurden mit einem Titrand 902 pH-Stat und 10 ml Dosino Einheiten durchgeführt.

Die NMR-Spektren wurden mit dem Avance Ultrashield 400 mit einer Resonanzfrequenz von 400.20 MHz der Firma Bruker aufgenommen. Die deuterierten Lösemittel wurden bei Sigma-Aldrich erworben. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms ACD/NMR Processor Academic Edition (Version 12.01).

Die Ag/AgCl-Referenzelektrode für die Messungen der Gd^{3+} Konzentration mit einer ISE wurde bei der Fa. BASi Electronics erworben.

Die Pufferlösungen wurden mit Hilfe eines Metrohm 780 pH-Meters und einer SCHOTT Instruments IoLine pH-Elektrode angesetzt. Die Daten der Kinetikmessungen wurden mit einem Metrohm 713 pH/mV-Meter aufgenommen und mit OriginPro 9.0G graphisch dargestellt.

3.2 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten von Gd³⁺ Komplexen

3.2.1 Isolierung der Liganden aus ihren Kontrastmitteln

Der Ligand HP-DO3A liegt in Form einer Injektionslösung komplexiert mit Gd³⁺ vor. Deswegen muss der Ligand aus der Formulierung isoliert werden. Hierzu wurde das Kontrastmittel mit drei Äquivalenten Oxalsäure-Dihydrat zur Fällung von Gadoliniumoxalat versetzt und mindestens 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wird filtriert und der Filterkuchen mehrfach mit entionisiertem Wasser gewaschen. Nachdem das Filtrat am Rotationsverdampfer eingedunstet wurde, kann es auf einen Kationenaustauscher, der zuvor mit 6.0 M HCl konditioniert wurde, aufgetragen werden. Das Rohprodukt wurde anschließend mit jeweils 1.5 l HCl steigender Konzentration (0.5 M, 1.0 M, 3.0 M, 6.0 M) vom Kationenaustauscher eluiert. Die reinen Liganden konnten als Hydrochloride aus der 1.0 M HCl Fraktion durch Entfernen des Lösemittels isoliert werden.

3.2.2 Herstellung der Probelösungen für die Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten mit aufgereinigten Liganden

Die Liganden und GdCl₃ werden im Verhältnis 1:1 in einen Maßkolben eingewogen. Weiterhin wird TMACl in den Maßkolben hinzugegeben. Nachdem Auffüllen des Kolbens soll die TMACl Konzentration von 1 mol/l erreicht werden. Die Ligand- und GdCl₃-Konzentration innerhalb des Kolbens nach dem Auffüllen beträgt 70 mmol/l.

In den Kolben hinzugegebene Chemikalien werden in entionisiertem Wasser gelöst und mit 1 M TMAOH auf einem pH-Wert höher als 5 eingestellt. Nachdem sichergestellt wurde, dass der pH-Wert innerhalb eines Zeitraums von mindestens 48 h konstant bleibt, wird der Maßkolben bis zum Eichstrich mit entionisiertem Wasser aufgefüllt.

3.2.3 Herstellung der Probelösungen für die Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten durch Zugabe einer Injektionslösung

In einen 50 ml Maßkolben werden 5,480 g TMACl eingewogen. Anschließend wird eine definierte Menge 1 M HCl zugegeben. Nach der Zugabe von HCl wird der Kolben bis zum Eichstrich mit entionisiertem Wasser gefüllt. Nach dem Füllen des Maßkolbens stellt sich der pH-Wert ein bei dem die Messung durchgeführt wird.

3.2.4 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten durch pH-Stat Reaktion mit aufgereinigten Liganden.

Die Bestimmung der Zerfallskonstanten von GdDTPA, GdDOTA, Gd-HP-DO3A, und Gd-BT-DO3A bei 25 °C wurde mit aufgereinigten Liganden durchgeführt. Eine konstante Ionenstärke wurde durch die Zugabe von TMACl zur Probelösung mit einer Konzentration von 1 mol/l erreicht.

Zur Potentialmessung wurden Schott IoLine Glaselektroden mit einem internen Iod/Iodid Referenzsystem verwendet. Der Brückenelektrolyt der Elektroden wurde durch 3.0 M TMACl Lösung ausgetauscht, um die pH-Glasmembran auf den Inertelektrolyten zu konditionieren und so ein schnelles Einstellverhalten des Sensors zu gewährleisten.

Zum Umrechnen der Potentiale, detektiert während einer pH-Stat Titration in pH-Werte, wird vor jeder pH-Stat Titration das Standardpotential E_0 der Elektrode unmittelbar vor jeder Messung bestimmt. Dazu werden 50 ml einer 20 mM HCl Eichsäure verwendet welche zusätzlich TMACl mit einer Konzentration von 1 mol/l enthält. Die Eichsäure wird mit 0,1 M KOH titriert. Die erhaltenen Titrationskurven wurden anschließend zur Bestimmung des Standardelektrodenpotentials E_0 , des experimentellen pK_w -Wertes und des pH-Sprungs in ml, mit dem Programm Elektrodenkalibrierung ausgewertet.³⁹

Für die Bestimmung der Zerfallskonstanten der jeweiligen Komplexe werden 45 ml der Probelösung in das Titriergefäß gegeben. Herstellung der Probelösung für die Bestimmung der Bildungskonstanten mit aufgereinigten Liganden wird im Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Nachdem sich eine konstante Temperatur von 25 °C innerhalb des Gefäßes eingestellt hat, wird die Zerfallsreaktion durch Zugabe von 1 M oder konzentrierter HCl gestartet. Das HCl Volumen zum Starten der Reaktion ist abhängig vom pH-Wert, bei welchem die Titration durchgeführt wird. Sobald das gewünschte Potential bei dem die pH-Stat Titration durchgeführt wird durch die HCl Zugabe eingestellt ist, wird die Titration gestartet. Während der Titration wird HCl durch eine Dosino Einheit zur Probelösung zugegeben, sobald die pH-Elektrode einen Potentialanstieg unterhalb des eingestellten Regelpunktes detektiert. Die Regelung der HCl Zugabe während einer pH-Stat Titration wird mit Hilfe eines PID Reglers durchgeführt.

3.2.5 Bestimmung der kinetischen Zerfallskonstanten durch pH-Stat Titration mit Injektionslösungen

Die Bestimmung der Bildungskonstanten mit Komplexen aus einer Injektionslösung wurden im Rahmen dieser Arbeit bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und 25 °C durchgeführt. Eine konstante Ionenstärke wurde durch die Zugabe von TMACl zur Probelösung mit einer Konzentration von 1 mol/l erreicht.

Zur Potentialmessung wurden Schott IoLine Glaselektroden mit einem internen Iod/Iodid Referenzsystem verwendet. Der Brückenelektrolyt der Elektroden wurde durch 3.0 M TMACl Lösung ausgetauscht um die pH-Glasmembran auf den Inertelektrolyten zu konditionieren und so ein schnelles Einstellverhalten des Sensors zu gewährleisten.

Zum Umrechnen der Potentiale in pH-Werte wird vor jeder pH-Stat Titration das Standardpotential E_0 der Elektrode unmittelbar vor jeder Messung bestimmt. Dazu werden 50 ml einer 20 mM HCl Eichsäure verwendet welche zusätzlich TMACl mit einer Konzentration von 1 mol/l enthält. Die Eichsäure wird mit 0,1 M KOH titriert. Die erhaltenen Titrationskurven wurden anschließend zur Bestimmung des Standardelektrodenpotentials E_0 , des experimentellen pK_W -Wertes und des pH-Sprungs in ml, mit dem Programm Elektrodenkalibrierung ausgewertet.³⁹

Für die Bestimmung der Zerfallskonstanten der jeweiligen Komplexe werden 45 ml der Probelösung in das Titriergefäß gegeben. Herstellung der Probelösung für die Bestimmung der Bildungskonstanten mit Injektionslösungen wird im Abschnitt 3.2.3 beschrieben. Nachdem sich eine konstante Temperatur von 25 °C bzw. 37 °C innerhalb des Gefäßes eingestellt hat, wird die Zerfallsreaktion durch Zugabe der Injektionslösung zur Probelösung gestartet. Nach der Zugabe der Injektionslösung zur Probelösung soll die Komplexkonzentration innerhalb des Titriergefäßes 70 mmol/l betragen.

Die pH-Stat Titration wird bei einem Potential durchgeführt welches sich drei Minuten nach Zugabe der Injektionslösung zur Probelösung eingestellt hat.

Während der Titration wird HCl durch eine Dosino Einheit zur Probelösung zugegeben sobald die pH-Elektrode einen Potentialanstieg unterhalb des eingestellten Regelpunktes detektiert. Die Regelung der HCl Zugabe während einer pH-Stat Titration wird mit Hilfe eines PID Reglers durchgeführt.

3.3 Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten von Gd^{3+} Komplexen

3.3.1 Synthese von N-(2-Pyridyl)-N'-(4-nitrophenyl)thioharnstoff

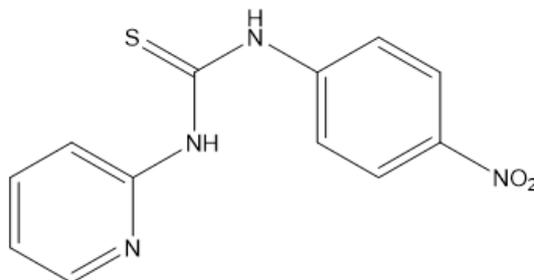


Abbildung 55: N-(2-Pyridyl)-N'-(4-nitrophenyl)thioharnstoff

Es wurden 0,266 g (2,83 mmol) 2-Aminopyridin und 0,5 g (2,78 mmol) 4-Nitrophenylisothiocyanat in 50 ml Ethanol gelöst und bei 75 °C Ölbadtemperatur für ca. 20 h erhitzt. Anschließend wurde das Lösemittel bei Raumtemperatur in einem Becherglas eingeeengt, bis sich ein Niederschlag bildete. Das Produkt wurde mit Isopropanol und Diethylether gewaschen und in einem Gemisch aus Aceton und Methanol (1:1) gelöst. Die Lösung wurde erneut bei Raumtemperatur eingeeengt, bis Kristalle entstanden sind. Diese wurden abfiltriert in Ethanol gelöst und bei Raumtemperatur auskristallisiert.

1H -NMR: NMR (400 MHz, ppm, DMSO-d₆):

δ = 7,17 (m, 1H); 7,28 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 7,88 (m, 1H); 8,16 (d, J = 8,6 Hz, 2H); 8,26 (d, J = 8,3 Hz, 2H); 8,37 (d, J = 4,7 Hz, 1H); 11,20 (s, 1H, NH); 14,48 (s, 1H, N'H)

3.3.2 Herstellung der Gd^{3+} -sensitiven Elektrode

Für die Membranlösung wurden ca. 3,3 mg des PyTu4NO₂, 2,3 mg NaTPB, 30 mg PVC und 60 mg NPOE in 2 ml THF gelöst. Es wurden Glasröhrchen mit 5 mm Außendurchmesser in die Lösung getaucht und nach ca. 10 s herausgezogen. Nach Verdampfen des Lösemittels, bildete sich die ionensensitive Membran.

Die Elektroden wurden nun mit einer $1 \cdot 10^{-3} M$ $GdCl_3$ -Lösung befüllt und für mindestens 48 h in einer $1 \cdot 10^{-2} M$ $Gd(NO_3)_3$ Lösung konditioniert. Als innere Referenzelektrode wurde ein Platindraht in das mit $GdCl_3$ befüllte Glasröhrchen eingesetzt.

3.3.3 Herstellung der Probelösungen für die Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten

Zu 9 mL einer 0,6 M Pufferlösung wurden so viel Ligand (DTPA bzw. DOTA) gegeben, bis sich eine Ligandkonzentration von 0,1 mol/l einstellte. Für die Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDOTA wurde der Puffer MOPS verwendet. Die Bestimmung der Bildungskonstanten von GdDTPA wurde sowohl in Anwesenheit des DEPP Puffers als auch in Anwesenheit vom Acetatpuffer durchgeführt. Der Puffer wurde anschließend mit einem bekannten Volumen an 12 M Kalilauge und 6 M Salzsäure auf einen pH-Wert gebracht bei dem die Bestimmung der Bildungskonstanten durchgeführt wird. Nach der Einstellung des gewünschten pH-Wertes, wird soviel KCl zur Probelösung zugegeben, bis die K^+ Konzentration 0,1 mol/l beträgt.

3.3.4 Durchführung der Messungen zur Bestimmung der kinetischen Bildungskonstanten von Gd^{3+} Komplexen

Alle Messungen wurden in thermostatisierten Gefäßen bei einer konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt. Die Bestimmung der Bildungskonstanten in gerührten Probelösungen erfolgte bei einer Rührgeschwindigkeit von 60 Umdrehungen/min.

Vor jeder Messung zur Bestimmung der Bildungskonstanten wurde eine Kalibrierkurve mit drei $GdCl_3$ -Lösungen (pGd 2,5, 3,5 und 4,5) aufgenommen. Dazu wurde die Gd^{3+} -sensitive Elektrode und die Ag/AgCl-Referenzelektrode in die Lösungen getaucht und die sich einstellende Spannung ermittelt. Für die Bestimmung der Bildungskonstanten wurde die Reaktion durch die Zugabe von ca. 21 μ l einer 0,1 M $GdCl_3$ -Lösung zu 2 ml der Ligand-Pufferlösung gestartet.

Vor dem Eintauchen der Elektroden wird die Probelösung bei einer hohen Rührgeschwindigkeit 30 Sekunden lang gerührt. Nach dem Rühren wurden die gemessenen Spannungen in regelmäßigen Zeitintervallen aufgezeichnet.

3.3.5 Untersuchung von TMAcI als Inertelektrolyt bei Messungen mit einer ISE

Es wurden neun $GdCl_3$ -Lösungen (pGd von 2,0 bis 6,0) mit einer konstanten TMAcI-Konzentration von 0,1 mol/l angesetzt und das sich einstellende Potential mit einer Gd^{3+} -sensitiven Elektrode und Ag/AgCl-Referenzelektrode bei einer Temperatur von 25 °C gemessen.

4. Literaturverzeichnis

1. Dössel, O., *Bildgebende Verfahren in der Medizin Von der Technik zur medizinischen Anwendung*. **2 Auflage** (Springer Verlag 1999).
2. Schilds, H., *MRI made easy*. (Scheering AG 1991).
3. Schwaiger, M., Pirich, C., Positronen-Emissions-Tomographie, *Z Kardiol* **89**, Suppl 1, 59-66 (2000).
4. Werner, E. J., Datta, A., Jocher, C. J., MRI-Kontrastmittel mit hoher Relaxivität: Komplexchemie im Dienste medizinischer Bildgebung, *Angewandte Chemie* **120**, 8696–8709 (2008).
5. Toth, E., Helm, L., Merbach, A., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. **2Nd Edition**, (John Wiley & Sons, Ltd., 2002).
6. Gschneidner, K. A., Bünzli, J.-C. G., Pecharsky, V. K., Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths **26 Auflage** (Elsevier Science & Technology 2014).
7. Szilagyi, E., Toth, E., Brücher, E., Merbach, A., Lanthanide(III)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid complexes in acidic medium: significant decrease in water exchange rate, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **15**, 2481–2486 (1999).
8. Idée, J.-M., Port, M., Robic, C., Medina, C., Sabatou, M., Corot, C., Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability, *J. Magn. Reson. Imaging* **30**, 1249–58 (2009).
9. Ba-Salmah, A., Happel, B., Kettenbach, J., Dirisamer, A., Wrba, F., Längle, F., Schima, W., MRT der Leber Klinische Bedeutung nichtspezifischer und leberspezifischer MRT-Kontrastmittel, *Radiologe* **12**, 1170–1184 (2004).
10. Khurana, A., Runge, V. M., Greene, J. F., Nickel, A. E., Nephrogenic Systemic Fibrosis, *Investigative Radiology: a review of 6 cases* temporally related to gadodiamide injection (omniscan) **42(2)**, 139–145 (2007).
11. Michaely, H. J., Thomsen, H. S., Reiser, M. F., Schoenberg, S. O., Nephrogene systemische Fibrose (NSF) – Implikationen für die Radiologie. *Radiologe* **47**, 785–793 (2007).
12. Heinrich, M., Uder, M., Nephrogene systemische fibrose nach Anwendung gadoliniumhaltiger Kontrastmittel - ein Statuspapier zum aktuellen Stand des wissens, *Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der Bildgebenden Verfahren* **179**, 613–617 (2007).

13. Klein, A. E., Einheitliche Neubestimmung der Stabilitätskonstanten kommerzieller MRT-Kontrastmittel auf Gd (III) -Basis und Synthese und Charakterisierung neuartiger Gd (III) -Komplexe für die potentielle Anwendung als MRT-Kontrastmittel. *Dissertation Saarbrücken* (2017).
14. Günzler, H., Bahadir, M., Borsdorf, R., *Analytiker-Taschenbuch 1 Auflage*, (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
15. Desreux, J. F., Barthelemy, P. P., Highly stable Lanthanide Macrocyclic Complexes: in Search of New Contrast Agents for NMR Imaging. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation*. **15**, 9–15 (1988).
16. Meyer, D., Schaefer, M., Bonnemain, B., Gd-DOTA, A Potential MRI Contrast Agent Current Status of Physicochemical Knowledge, *Investigative Radiology* **23**, 232–235 (1988).
17. Port, M., Idee, J. M., Medina, C., Robic C., Sabatou, M., Corot, C., Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review, *BioMetals* **21**, 469–490 (2008).
18. Wedeking, P., Kumar, K., Tweedle, M. F., Dissociation of gadolinium chelates in mice: Relationship to chemical characteristics. *Magn. Reson. Imaging* **10**, 641–648 (1992).
19. Sarka, L., Burai, L., Brücher, E., The Rates of the Exchange Reactions between [Gd(DTPA)]²⁻ and the Endogenous Ions Cu²⁺ and Zn²⁺: a kinetic model for the prediction of the in vivo stability of [Gd(DTPA)]²⁻ used as a contrast agent in magnetic resonance imaging, *Chem. Eur. J.* **6**, 719–724 (2000).
20. Scharding, T., Über den Einfluss der Ionenstärke und die Art des Inertelektrolyten in der potentiometrischen Titration zur Bestimmung von p K S -Werten und Stabilitätskonstanten Gadolinium (III) -haltiger MRT-Kontrastmittel, *Masterarbeit Saarbrücken*(2014).
21. Deshapande, G. V., Model & Validation Process-in the Pharmaceutical Industry - FDA Perspective, (SAP AG 2008).
22. *EUROPEAN PHARMACOPOEIA 8.0* (2014).
23. Chan, C. C., Principles and Practices of Analytical Method Validation. *Quality Assurance Journal* **14**, 61–64 (2011).
24. Skoog, D. A., Leary, J. J., *Instrumentelle Analytik. Grundlagen Geräte Anwendungen Grundlagen Geräte Anwendungen 4 Auflage* (Springer-Verlag, 1996).
25. Xiangyun W., Tianzhu J., Vinciane C., Lopez-Mut, A., Merciny, E., A kinetic investigation of the lanthanide DOTA chelates. Stability and rates of formation and of dissociation of a macrocyclic gadolinium(III) polyaca polycarboxylic MRI contrast agent, *Inorg. Chem.* **31**, 1095–1099 (1992).

26. Toth, E., Brucher, E., Lazar, I., Toth, I., Kinetics of Formation and Dissociation of Lanthanide (III) -DOTA Complexes *Inorg. Chem.* **33**, 4070–4076 (1994).
27. Schwizer, W., Fraser, R., Maecke, H., Siebold, K., Funck R., Fried, M., Gd-DOTA as a gastrointestinal contrast agent for gastric emptying measurements with MRI, *Magn. Reson. Med.* **31**, 388 (1994).
28. Tóth, E., Király, R., Platzek, B., Radüchel, B., Brücher, E., Equilibrium and kinetic studies on complexes of 10-[2,3-dihydroxy-(1-hydroxymethyl)-propyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetate, *Inorganica Chim. Acta* **249**, 191–199 (1996).
29. Kumar, K., Chang, A. C., Tweedle, M. F., Equilibrium and Kinetic Studies of Lanthanide Complexes of Macrocyclic Polyamino Carboxylates, *Inorg. Chem.* **32**, 587–593 (1993).
30. Balogh, E., Tripier, R., Fouskova, P., Reviriego, F., Handel, H. Toth, E., Monopropionate analogues of DOTA⁴⁻ and DTPA⁵⁻: kinetics of formation and dissociation of their lanthanide(III) complexes. *Dalt. Trans.* **32**, 3572–3581 (2007).
31. Simon, K., The Cause and Effect (a.k.a. Fishbone) Diagram, *Six Sigma* (2017).
32. Weibert, M. Herstellung einer Gadolinium-sensitiven Elektrode zur Bestimmung der Kinetik von Gadolinium(III) - Komplexen. *Diplomarbeit Saarbrücken* (2013).
33. Kandegedara, A. Rorabacher, D. B. Noncomplexing Tertiary Amines as Better Buffers Covering the Range of pH 3 - 11 . Temperature Dependence of Their Acid Dissociation Constants. *Anal. Chem.* **71**, 3140–3144 (1999).
34. Chen, L. D., *Supramolecular Chemistry From Molecules to Nanomaterials 7 Auflage*, 2539–2579 (2011).
35. Ganjali, M. R., Norouzi, P., Alizadeh, T., Tajarodi, A. Fabrication of a highly selective and sensitive Gd(III)-PVC membrane sensor based on N-(2-pyridyl)-N'-(4-nitrophenyl)thiourea. *Sensors Actuators B Chem*, **120**, 487–493 (2007).
36. *Cshayne, C. G., Pharmaceutical Manufacturing Handbook 1st Edition*, (WILEY-Interscience 2007).
37. Wu, S. L., Franklin S. J., Raymond, K. N., Horrocks, W., Kinetics of the Formation of Macrocyclic Polyaminocarboxylate Ligand Complexes: A Laser-Excited Luminescence Study of the Eu³⁺-DTPA-DIEN System. *Inorg. Chem.* **35**, 162–167 (1996).
38. Chang, A. C., Liu Y. L., Chen, C. Y., Chou X. M., Ligand Preorganization in Metal Ion Complexation: Molecular Mechanics/Dynamics, Kinetics, and Laser-Excited Luminescence Studies of Trivalent Lanthanide Complex Formation with Macrocyclic Ligands TETA and DOTA. *Inorg. Chem.* **40**, 3448–3455 (2001).

39. Basters, M., Arbeitskreis Prof. Dr. Hegetschweiler, Universität des Saarlandes, Saarbrücken. *Elektrodenkalibrierung (unveröffentlicht)* (2012).

5. Anhang

Der Anhang ist in digitaler Form auf einer CD dieser Arbeit beigefügt