

pK_a-Werte von Ethidiumbromid und 7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid

pK_a-Values of Ethidiumbromide and 7-Amino-9-phenyl-10-ethyl-phenanthridinium-bromide

Ingfried Zimmermann und Herbert W. Zimmermann

Institut für Physikalische Chemie der Universität Freiburg i. Br.

(Z. Naturforsch. 31 c, 656–660 [1976]; eingegangen am 16. August 1976)

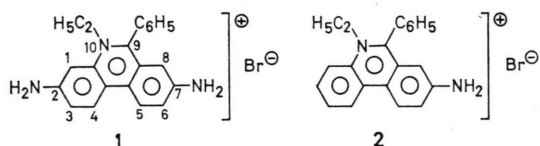
Ethidiumbromide, pK_a-Values

Ethidiumbromide (1) has two amino groups in 2- and 7-position which are protonated in acidic water solution. Both pK_a-values of 1 are determined at 20 °C by means of the pH-dependence of the electronic spectra using a iterative calculating procedure, pK_{a1}=0.713, pK_{a2}=2.43. Acetylation of 1 and quantum mechanical calculations lead to the conclusion that the electronic density at the 7-amino group is greater than in 2-position. Therefore with decreasing pH preferably the 7-amino group is protonated (pK_{a2}), followed by the protonation of the 2-amino group (pK_{a1}).

The pK_a of 7-amino-9-phenyl-10-ethyl-phenanthridinium-bromide in water solution at 20 °C is determined to pK_a=1.25.

Einleitung

In der Literatur wurden wiederholt Substanzen beschrieben, die mit DNA in Wechselwirkung treten und an das Makromolekül gebunden werden. Klassische Beispiele hierfür sind Acridinorange und das von uns untersuchte Ethidiumbromid (1).



Die Bindung dieser Moleküle an DNA wird heute im allgemeinen mit dem von L. S. Lerman vorgeschlagenen Intercalationsmodell beschrieben¹. Danach soll sich das Molekül unter geringer Aufwindung der DNA-Doppelhelix zwischen zwei benachbarte Basenpaare einschieben.

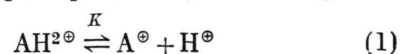
Unabhängig von speziellen Bindungsmodellen scheinen für die Bindung an DNA die Aminogruppen der betrachteten Moleküle Bedeutung zu haben. Ersetzt man z. B. die Aminogruppen des Ethidiumbromids durch Nitrogruppen, so gelangt man zum schwerlöslichen 2,7-Dinitro-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid, das an DNA nicht gebunden wird². Andere, unter gleichen Bedingungen in Wasser schwerlösliche Verbindungen treten jedoch mit DNA in Wechselwirkung³.

J. B. LePecq und C. Paoletti⁴ beobachteten, daß die Bindung des Ethidiumbromids an DNA stark vom pH-Wert abhängt, d. h. vom Protonierungszustand des Moleküls. Um den Zustand des Moleküls in diesem Bereich charakterisieren zu können, ist die Kenntnis der pK_a-Werte von 1 erforderlich. Es ist überraschend, daß diese Werte bisher nicht gemessen wurden. Schuld daran sind ungünstige experimentelle Bedingungen, die den Einsatz spezieller iterativer Auswertungsverfahren erforderlich machen.

Ethidiumbromid ist ein biologisch hoch aktives Molekül. Es wird unter anderem wegen seiner trypanociden Wirksamkeit verwendet⁵. Von vielen anderen Substanzen ist bekannt, daß ihre biologische Aktivität mit dem pK_a-Wert in enger Beziehung steht⁶. Auch unter diesem Gesichtspunkt ist die Kenntnis der pK_a-Werte von 1 wünschenswert. Entsprechende Messungen werden im folgenden beschrieben. Ergänzend wurde 7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid (2) untersucht. Analoge Messungen an der 2-Aminoverbindung scheiterten an der Schwerlöslichkeit der Substanz in Wasser.

Formalismus

Das an der Aminogruppe protonierte Molekül 2 ist formal als einbasige Säure aufzufassen, die in wäßriger Lösung entsprechend der Gleichung



dissoziiert. Elementare Anwendung des Massenwirkungsgesetzes führt zu der Beziehung:

$$\text{pK}_a = \text{pH} + \log \frac{1 - \alpha}{\alpha} \quad (2)$$

mit α = Dissoziationsgrad der Säure. Der pK_a-Wert ist damit aus der pH-Abhängigkeit von α zugänglich.

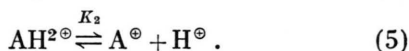
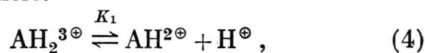
Der pK_a-Wert von AH²⁺ kann spektroskopisch bestimmt werden. Die Gesamttextinktion E der Lösung setzt sich bei gegebener Wellenzahl additiv aus den Extinktionen der beiden absorbierenden Spezies A⁺ und AH²⁺ mit Konzentrationen $c_{A^+} = c_0 = \alpha \cdot c$, $c_{AH^{2+}} = c_1 = (1 - \alpha) \cdot c$ zusammen:

$$E = \varepsilon_0 c_0 d + \varepsilon_1 c_1 d = [\varepsilon_0 \alpha + \varepsilon_1 (1 - \alpha)] c d = \varepsilon c d.$$

$c = c_0 + c_1$ = Einwaagekonzentration, c_0 , c_1 = Konzentrationen und ε_0 , ε_1 = Extinktionskoeffizienten von nicht bzw. einfach protoniertem A⁺, d = Schichtdicke, $\varepsilon = \varepsilon_0 \alpha + \varepsilon_1 (1 - \alpha)$. $\varepsilon = E/cd$ ist experimentell zugänglich und damit auch α , wenn ε_0 und ε_1 bekannt sind:

$$\text{pK}_a = \text{pH} + \log \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon}{\varepsilon - \varepsilon_1}. \quad (3)$$

Protoniertes Ethidiumbromid (1) kann formal als zweibasige Säure aufgefaßt werden, die in zwei Stufen dissoziiert:



Falls sich K_1 und K_2 um mehr als drei Zehnerpotenzen unterscheiden, können beide Stufen getrennt gemessen und K_1 , K_2 einzeln nach Gleichung (2) bestimmt werden. Bei Ethidiumbromid ist das nicht der Fall. Nach A. Albert und E. P. Serjeant⁷ lassen sich beide pK_a-Werte aus der pH-Abhängigkeit der Gesamttextinktion E in diesem Fall nach einem iterativen Verfahren bestimmen.

Elementare Anwendung des Massenwirkungsgesetzes liefert für die im Gleichgewicht stehenden Konzentrationen

$$c_{\text{AH}_2^{3+}} = c_2 = c_{\text{H}^+}^2 c / N \quad (6)$$

$$c_{\text{AH}^{2+}} = c_1 = K_1 c_{\text{H}^+} c / N \quad (7)$$

$$c_{\text{A}^+} = c_0 = K_1 K_2 c / N \quad (8)$$

mit $N = c_{\text{H}^+}^2 + K_1 c_{\text{H}^+} + K_1 K_2$

und $c = c_0 + c_1 + c_2$ = Einwaagekonzentration. Die Gesamttextinktion ergibt sich zu:

$$E = (\varepsilon_0 c_0 + \varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2) d. \quad (9)$$

ε_0 , ε_1 , ε_2 und c_0 , c_1 , c_2 sind die Extinktionskoeffizienten und Konzentrationen der nicht, einfach

bzw. zweifach protonierten Form von 1. ε_0 und ε_2 sind aus den Spektren von Lösungen mit genügend hohem bzw. niedrigem pH-Wert experimentell zugänglich.

Setzt man (6), (7) und (8) in (9) ein, so erhält man für die gemessene Gesamttextinktion

$$E = (1/N) (\varepsilon_0 K_1 K_2 + \varepsilon_1 K_1 c_{\text{H}^+} + \varepsilon_2 c_{\text{H}^+}^2) c d = \varepsilon c d \quad (10)$$

mit

$$\varepsilon = (1/N) (\varepsilon_0 K_1 K_2 + \varepsilon_1 K_1 c_{\text{H}^+} + \varepsilon_2 c_{\text{H}^+}^2). \quad (11)$$

Gleichung (11) läßt sich in der Form darstellen:

$$\frac{c_{\text{H}^+}^2}{K_1} \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_2}{\varepsilon - \varepsilon_0} \right) + c_{\text{H}^+} \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_1}{\varepsilon - \varepsilon_0} \right) + K_2 = 0. \quad (12)$$

ε , ε_0 , ε_2 und c_{H^+} sind bekannt, ε_1 , K_1 und K_2 unbekannt.

Bei geeigneter Auftragung stellt (12) die Gleichung einer Geraden dar, deren Anstieg und Ordinatenabschnitt ($1/K_1$) und K_2 bestimmen. Die gewünschten Gleichgewichtskonstanten sind dann aus der pH-Abhängigkeit von ε zugänglich, wenn ε_1 bekannt ist. Letzteres ist auf folgendem Weg zugänglich:

Gleichung (12) enthält drei additive Glieder, wovon K_2 unabhängig von c_{H^+} ist, die beiden anderen aber $c_{\text{H}^+}^2$ bzw. c_{H^+} enthalten. Bei genügend hohen Konzentrationen an H⁺ ist K_2 gegen die Glieder mit $c_{\text{H}^+}^2$ und c_{H^+} zu vernachlässigen. (12) geht dann über in

$$\varepsilon = \varepsilon_1 + \frac{c_{\text{H}^+}}{K_1} (\varepsilon_2 - \varepsilon). \quad (13)$$

(13) ist wieder die Gleichung einer Geraden, für $\varepsilon = \varepsilon(c_{\text{H}^+})$, deren Ordinatenabschnitt das unbekannte ε_1 darstellt.

Mit fallender Konzentration an H⁺ nimmt in Gl. (12) das quadratische Glied mit $c_{\text{H}^+}^2$ schneller ab als das Glied, das linear in c_{H^+} ist. Bei genügend kleinen Konzentrationen muß es deshalb einen pH-Bereich geben, in dem das quadratische Glied gegen K_2 und das in c_{H^+} lineare Glied vernachlässigbar ist. Dann erhält man näherungsweise:

$$\varepsilon = \varepsilon_1 + \frac{K_2}{c_{\text{H}^+}} (\varepsilon_0 - \varepsilon). \quad (14)$$

Auch Gl. (14) ist bei geeigneter Auftragung die Gleichung einer Geraden, aus deren Ordinatenabschnitt ε_1 zugänglich ist.

Damit haben wir zwei Gln. (13) und (14) erhalten, die es gestatten, in geeignetem pH-Bereich ε_1 zu ermitteln.

Im ersten Schritt der Iterationsrechnung wird ε_1 aus Gl. (13) oder Gl. (14) abgeschätzt und K_1 , K_2 näherungsweise aus Gl. (12) ermittelt. Mit diesen

Werten kann man wieder in Gl. (13) oder Gl. (14) eingehen, um ein verbessertes ε_1 zu bestimmen. Es wird in einem erneuten Rechencyclus in Gl. (12) eingesetzt. Das Iterationsverfahren wird bis zur Konsistenz von K_1 und K_2 fortgeführt. Die Konvergenz des Verfahrens wird beschleunigt, wenn jeweils nur diejenige der Gln. (13) oder (14) verwendet wird, die den getroffenen Voraussetzungen besser genügt. Die bestmögliche Anpassung der experimentellen Daten an die entsprechenden Geradengleichungen wird mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate realisiert und die Iteration mit einem Computer durchgeführt.

Ethidiumbromid

Die Spektren von wäßrigen Ethidiumbromid-Lösungen wurden in einem weiten pH-Bereich gemessen, Abb. 1. Für $\text{pH} \geq 5,2$ zeigen die Kurven

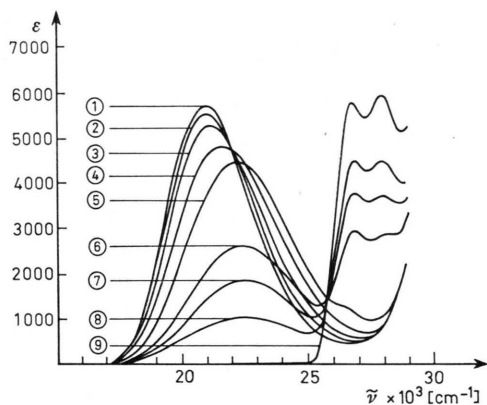


Abb. 1. pH-Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten ε von Ethidiumbromid in wäßrigen HCl-Lösungen bei 20 °C. (1) $\text{pH}=7,0$; (2) $\text{pH}=3,2$; (3) $\text{pH}=2,8$; (4) $\text{pH}=2,17$; (5) $\text{pH}=1,5$; (6) $\text{pH}=0,7$; (7) $\text{pH}=0,54$; (8) $\text{pH}=0,1$; (9) 4 N HCl.

keine Veränderungen und stellen das Spektrum des unprotonierten Ethidiumbromids dar. Zwischen $\text{pH} = 5,2$ und 2,6 nimmt der Extinktionskoeffizient der längstwelligsten Bande bei 20800 cm^{-1} rasch ab. Gleichzeitig wird das Maximum kurzwellig in Richtung auf 22400 cm^{-1} verschoben. Die Absorptionsspektren haben bei 21800 cm^{-1} einen isosbestischen Punkt, der das Gleichgewicht zwischen der unprotonierten und einfachprotonierten Form anzeigt. Er ist wegen der großen Steigung der Spektren in diesem Spektralbereich nur schwer zu bestimmen.

Mit fallendem pH-Wert nimmt der Extinktionskoeffizient der längstwelligsten Bande weiter ab.

Gleichzeitig treten bei 26800 und 28000 cm^{-1} zwei neue Banden mit steigender Intensität auf. Sie sind der doppelt protonierten Form des Ethidiumbromids zuzuordnen. Für das Gleichgewicht zwischen einfach und doppelt protoniertem Ethidiumbromid ist der isosbestische Punkt bei 25700 cm^{-1} charakteristisch. Die längstwellige Bande der einfach protonierten Form bei 22400 cm^{-1} verschwindet erwartungsgemäß in konzentrierter HCl vollständig. Das Spektrum der doppelt protonierten Form des Ethidiumbromids ist dem des 9-Phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromids außerordentlich ähnlich, Abb. 2. Damit wird angezeigt, daß die Protonierung des Moleküls an den beiden Aminogruppen des Ethidiumbromids erfolgt.

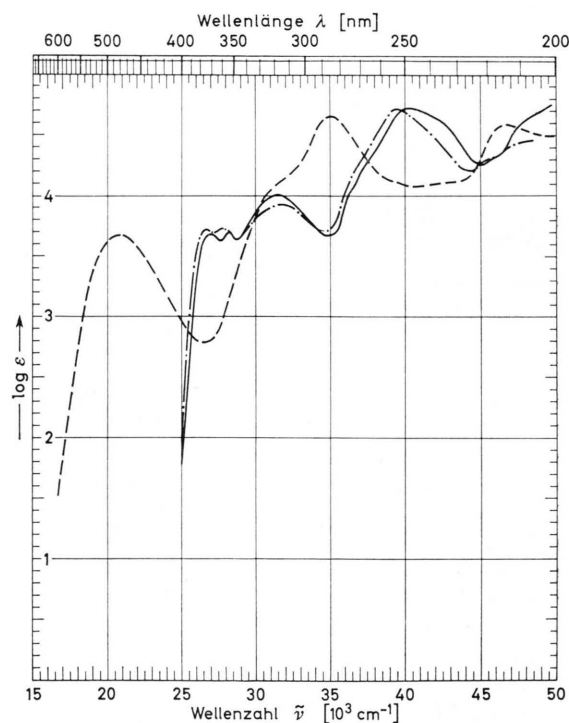


Abb. 2. Ethidiumbromid in H_2O (---), zweifach protoniertes Ethidiumbromid AH_2^{3+} in 4 N HCl (-·-), 9-Phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid in H_2O (—), 20 °C.

Die pK_a-Werte des Ethidiumbromids wurden nach dem oben beschriebenen Iterationsverfahren bei 20800 cm^{-1} bestimmt, $\varepsilon_0 = 5680$, $\varepsilon_1 = 4304$, $\varepsilon_2 = 0,00 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Für 20 °C ergeben sich: $\text{pK}_{a1} = 0,713$, $\text{pK}_{a2} = 2,43$.

7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridinium-bromid

Die pH-Abhängigkeit der Spektren wäßriger Lösungen von 7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridiniumbromid (**2**) ist in Abb. 3 dargestellt. Für

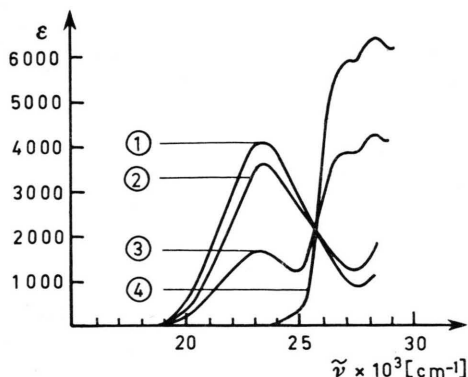
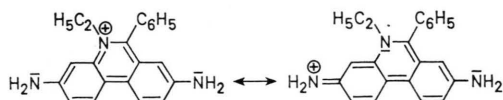


Abb. 3. pH-Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten ε von 7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridiniumbromid in wäßriger HCl-Lösung bei 20 °C. (1) pH=7,0; (2) pH=3,0; (3) pH=1,9; (4) 4 N HCl.

pH $\geq$ 3,2 ist das Spektrum unabhängig vom pH-Wert. Es liegt unprotoniertes **2** vor. Mit fallendem pH $<$ 3,2 nimmt die Intensität der längstwelligen Absorption ab, um in konzentrierter HCl zu verschwinden. Statt dessen beobachtet man eine neue Absorption bei 26500 cm⁻¹, deren Intensität zunimmt und die der einfach protonierten Form von **2** zuzuordnen ist. Das Protonierungsgleichgewicht wird durch den isobestischen Punkt bei 25000 cm⁻¹ belegt. Der pK_a-Wert ergibt sich bei 20 °C zu pK_a = 1,25.

Zuordnung der pK_a-Werte des Ethidiumbromids

Die beiden Aminogruppen des Ethidiumbromids unterscheiden sich formal darin, daß für die Aminogruppe in 2-Stellung eine Resonanzstruktur unter Einbeziehung des quarternierten Stickstoffatoms in 10-Stellung angegeben werden kann.



Diese Möglichkeit besteht für die Aminogruppe in 7-Stellung nicht. Wegen der Positivierung der 2-Aminogruppe, die nach dieser einfachen Betrachtung

zu erwarten ist, sollte das an beiden Aminogruppen doppelt protonierte Ethidiumbromid AH₂³⁺ bevorzugt das Proton in 2-Stellung abgeben. pK_{a1} = 0,713 entspräche dann dem Protonierungsgleichgewicht (4) der 2-Aminogruppe, pK_{a2} = 2,43 dem Gleichgewicht (5) der 7-Aminogruppe. Ähnliche Verhältnisse wären auch bei den Monoaminoverbindungen zu erwarten, die eine Aminogruppe in 2- bzw. 7-Stellung besitzen. Leider war es nicht möglich, die pK_a-Werte dieser Verbindungen zu vergleichen, da die Schwerlöslichkeit der 2-Aminoverbindung die Messung ihres pK_a-Werts in Wasser unmöglich machte. Wir haben deshalb nach anderen experimentellen Kriterien gesucht, die eine Zuordnung der pK_a-Werte ermöglichen.

Unterschieden in den pK_a-Werten entsprechen Unterschiede in der Elektronendichte. Je niedriger die Elektronendichte an einer Aminogruppe ist, um so schwerer wird die Gruppe protoniert bzw. um so leichter wird die protonierte Aminogruppe wieder deprotoniert und um so kleiner ist ihr pK_a-Wert. Unterschiede in der Elektronendichte machen sich andererseits auch in der chemischen Reaktivität bemerkbar. So spricht die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid empfindlich auf kleine Dichteunterschiede an. Der Angriff der Reaktion erfolgt dabei am Ort höherer Elektronendichte^{8,9}. Wir haben deshalb versucht, mit Hilfe der Acetylierung der Aminogruppen des Ethidiumbromids eine Zuordnung seiner pK_a-Werte zu treffen.

Behandelt man eine wäßrige Lösung von Ethidiumbromid mit Essigsäureanhydrid, so erfolgt praktisch ausschließlich Acetylierung der 7-Aminogruppe². Der Nachweis ist leicht zu erbringen durch Diazotierung der noch freien Aminogruppe und anschließendem Austausch gegen Wasserstoff. Das gebildete 7-Acetamido-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridiniumbromid geht nach Abspaltung des Acetylrests in 7-Amino-9-phenyl-10-äthyl-phenanthridiniumbromid über. Die Verbindung war mit einer authentisch synthetisierten Vergleichsprobe identisch. Danach ist die Elektronendichte an der 7-Aminogruppe höher als in 2-Stellung und in Übereinstimmung mit oben ist pK_{a1} = 0,713 dem Protonierungsgleichgewicht (4) der 2-Aminogruppe, pK_{a2} = 2,43 dem Protonierungsgleichgewicht (5) der 7-Aminogruppe zuzuordnen.

Zum gleichen Resultat gelangt man aufgrund einer quantenmechanischen Berechnung der Elektronendichteverteilung des Ethidiumbromids in semi-

empirischer SCF-CI-PPP-Approximation¹⁰. Danach ist die Elektronendichte an der 2-Aminogruppe deutlich niedriger als an der 7-Aminogruppe.

Die numerischen Rechnungen wurden auf der Datenverarbeitungsanlage UNIVAC 1106 des Rechenzentrums der Universität Freiburg durchgeführt.

¹ L. S. Lerman, J. Mol. Biol. **3**, 18 [1961].

² I. Zimmermann, Dissertation, Freiburg 1975.

³ M. Craig u. I. Isenberg, Biopolymers **9**, 689 [1970].

⁴ J. B. LePecq u. C. Paoletti, J. Mol. Biol. **27**, 87 [1967].

⁵ R. S. Theobald u. K. Schofield, Chem. Revs. **46**, 171 [1950].

⁶ L. P. Walls, J. Chem. Soc. **1945**, 294.

⁷ A. Albert u. E. P. Serjeant, The Determination of Ionization Constants, Chapman and Hall Ltd., London 1971.

⁸ S. S. Berg, J. Chem. Soc. **1963**, 3635.

⁹ L. P. Walls, J. Chem. Soc. **1950**, 3514.

¹⁰ I. Zimmermann u. H. W. Zimmermann, Ber. Bunsenges. Physikal. Chem., im Druck.