

Institut für Pharmazie, Humboldt-Universität, Berlin, Germany

Optimierung kapillarelektrophoretischer Trennungen mehrbasischer Säuren

J. P. SURMANN und U. WARNKE

Bei der Entwicklung einer kapillarelektrophoretischen Methode zur Trennung mehrbasischer Säuren ist die Nettoladung der Moleküle eine wichtige Richtgröße, die die Auswahl eines geeigneten Puffersystems mitbestimmt. Der theoretische Zusammenhang zwischen den pK_a -Werten mehrbasischer Säuren mit beliebig vielen Dissoziationsstufen und den pH-Werten der Puffer unter Einbezug der Ionenstärke wird allgemein hergeleitet. Die aus den berechneten Nettoladungen nach Offord ermittelten Mobilitäten stimmen für verschiedene Nucleotidmonophosphate gut mit den experimentellen kapillarelektrophoretischen Daten überein.

Optimization of capillary electrophoretic analysis of acids with more than one dissociation constants

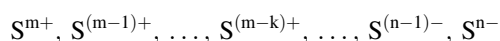
Capillary electrophoresis is a useful tool for the analysis of nucleotides. Their charge depends on the pH of the buffer system used. An equation is developed for calculation the partial charge of acids with more than one dissociation constant in dependence on the pH and the ionic strength of the buffer. There is no limitation to the number of dissociation constants. The partial charges and from these the relative mobility according to Offord were calculated for 4 nucleotidmonophosphates. They agree very well with the experimental electrophoretic data.

1. Einleitung

Die elektrophoretische Mobilität eines Teilchens korreliert direkt mit seiner Ladung. Für einbasische Säuren – positiv geladen oder ungeladen – werden, abgeleitet aus der Hendersson-Hasselbalch'schen Gleichung, unter Zugrundelegen der Aciditätskonstanten brauchbare Berechnungsformeln in der Literatur beschrieben [1–3]. Mehrbasische Säuren werden entweder in grober Näherung behandelt [3], oder es werden zur Berechnung der Mobilität nicht nur die Aciditätskonstanten sondern auch die Mobilitäten der einzelnen Spezies benötigt [2]. In Anlehnung an Hoffstetter-Kuhn [3] soll mit der empirischen Berechnungsformel von Offord aus der Nettoladung der Teilchen ihre relative Mobilität ermittelt werden. Dazu ist es nötig, den Zusammenhang zwischen der Nettoladung, den Aciditätskonstanten und dem pH-Wert zu kennen.

2. Ergebnisse und Diskussion

Liegt eine Substanz S je nach Protonierungsgrad in verschiedenen Ladungszuständen vor



deren Zusammenhang durch die Aciditätskonstanten K_{a1} bis $K_{a(m+n)}$ gegeben ist

$$K_{ai} = \frac{a_{S^{(m-i)+}}}{a_{S^{(m-i+1)+}} \cdot a_{H_3O^+}} = \frac{f_{m-i}}{f_{m-i+1}} \cdot \frac{c_{S^{(m-i)+}}}{c_{S^{(m-i+1)+}}} \cdot a_{H_3O^+} \quad (1)$$

so lassen sich die Konzentration c jeder Spezies mit Hilfe der Gesamtkonzentration c_0 und der Bruchteil α (Stoffmengengehalt, Molenbruch) der Spezies an der Gesamtkonzentration darstellen (s. Anhang).

$$\alpha_i = \frac{c_{S^{(m-i)}}}{c_0} = \frac{1}{\sum_{j=1}^i \frac{f_{m-i+1-j}}{f_{m-i+1}} \cdot \frac{10^{-j \cdot pH}}{\prod_{k=1}^j K_{a(i-j+k)}} + 1 + \sum_{j=1}^{m+n-i} \frac{f_{m-i+1+j}}{f_{m-i+1}} \cdot \frac{\prod_{k=0}^{j-1} K_{a(i+j-k)}}{10^{-j \cdot pH}}} \quad (2)$$

Das Produkt aus der jeweiligen Ladung und dem Stoffmengengehalt ist der Anteil der Ladung, den die zugehörige Teilchensorte zur Gesamtnettoladung Z beiträgt, die somit beschreibbar ist mit

$$Z = \sum_{i=0}^{m+n} \alpha_{m-i} \cdot (m-i) \quad (3)$$

Wird die Ionenstärke I als konstant und nur durch den Puffer bedingt angenommen, so ist nach Debye-Hückel für das Verhältnis der Aktivitätskonstanten unter der Annahme eines mittleren k -Parameters von 9 nach Kielland [4] zu schreiben

$$\frac{f_{m-i+1 \pm j}}{f_{m-i+1}} = \frac{10^{-\frac{0,509 \cdot (m-i+1 \pm j)^2 \cdot \sqrt{I}}{1+3 \cdot \sqrt{I}}}}{10^{-\frac{0,509 \cdot (m-i+1)^2 \cdot \sqrt{I}}{1+3 \cdot \sqrt{I}}}} = 10^{\pm \frac{0,509 \cdot \sqrt{I}}{1+3 \cdot \sqrt{I}} \cdot j \cdot (2(m-i+1) \pm j)} \quad (4)$$

Die entwickelte Berechnungsformel zeigt anhand der Konzentrationen der einzelnen Spezies, daß abhängig vom pH-Wert durchaus drei Spezies nebeneinander existieren, somit die Näherungsformeln [3] keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern (Fig.1).

Dass der Einfluss der Aktivitätskoeffizienten und damit der Ionenstärke nicht ohne merkliche Fehler vernachlässigt werden darf, zeigt Fig. 2.

Ein Vergleich der experimentell ermittelten Mobilitäten (Fig. 3) mit den mit obiger Formel aus den Nettoladungen nach Offord berechneten (Fig.4) zeigt für alle Nucleosidmonophosphate eine gute Übereinstimmung im prinzipiellen Verlauf und damit die Brauchbarkeit der entwickelten Berechnungsformel.

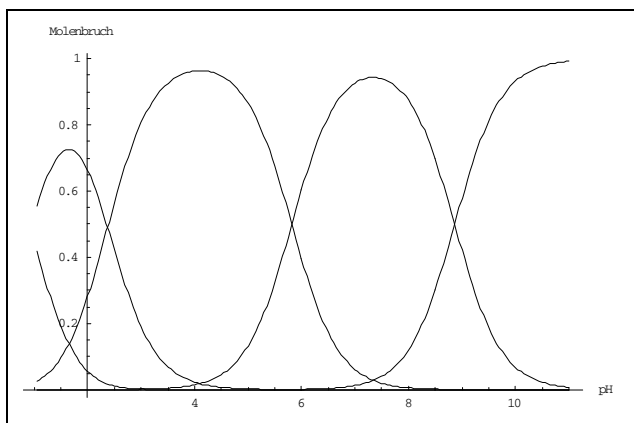


Fig. 1: Für Guanosinmonophosphat berechnete Stoffmengenanteile (Molenbrüche) der verschiedenen Spezies in Abhängigkeit vom pH-Wert

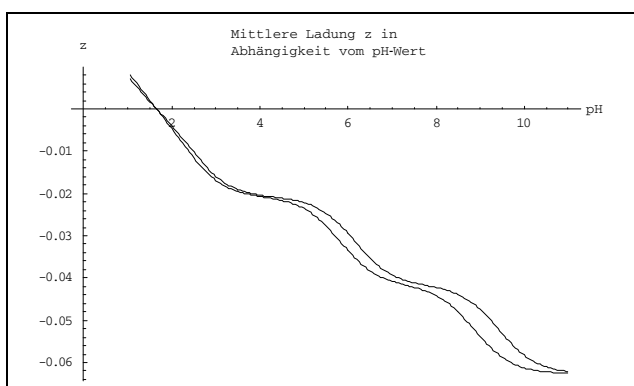


Fig. 2: Berechnete Nettoladungen für Guanosinmonophosphat (pK_a-Werte im Anhang 2) für die Ionenstärken 1 und 0,001

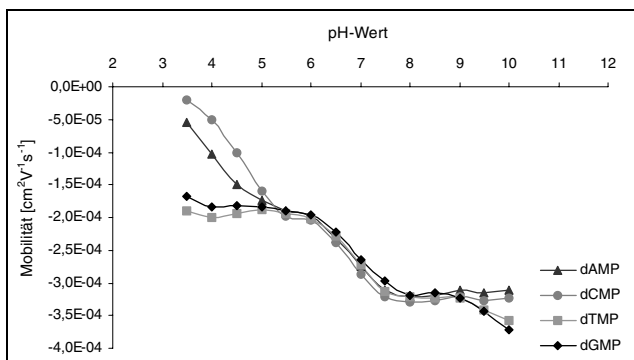


Fig. 3: Experimentell ermittelte Mobilitäten für Nucleosidmonophosphate

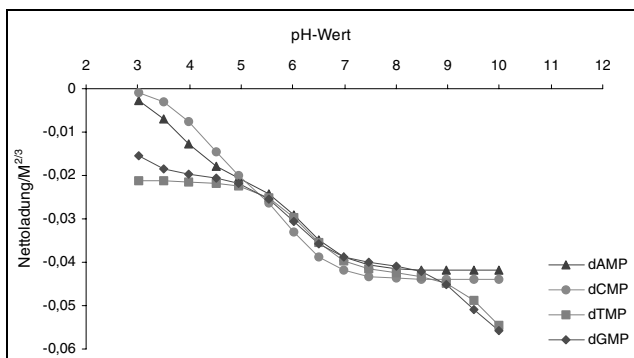


Fig. 4: Berechnete Mobilitätsmaße für Nucleosidmonophosphate (pK_a-Werte im Anhang 2)

3. Anhang

3.1. Anhang I

Um die Konzentration der Spezies S^{m-i} zu erhalten, werden in c_0 mit Hilfe der Aciditätskonstanten (zunächst unter Vernachlässigung der Aktivitätskoeffizienten) alle Konzentrationen der Spezies S^{m-i+j} auf S^{m-i} und alle Konzentrationen der Spezies S^{m-i-j} auf S^{m-i} zurückgeführt

$$c_{S^{(m-i+1)}} = \frac{10^{-pH}}{K_{a_i}} \cdot c_{S^{(m-i)}}$$

$$c_{S^{(m-i+2)}} = \frac{10^{-pH}}{K_{a_{(i+1)}}} \cdot c_{S^{(m-i+1)}} = \frac{10^{-pH}}{K_{a_{(i+1)}}} \cdot \frac{10^{-pH}}{K_{a_i}} \cdot c_{S^{(m-i)}}$$

$$c_{S^{(m-i+j)}} = \frac{10^{-pH}}{K_{a_{(i+j-1)}}} \cdot c_{S^{(m-i+j-1)}}$$

$$c_{S^{(m-i+j)}} = \frac{10^{-pH}}{K_{a_{(i+j-1)}}} \cdot \frac{10^{-pH}}{K_{a_{(i+j-2)}}} \cdot \dots \cdot \frac{10^{-pH}}{K_{a_{(i+j-k)}}} \cdot c_{S^{(m-i+j-k)}}$$

$$c_{S^{(m-i+j)}} = \frac{10^{-pH \cdot j}}{\prod_{k=1}^j K_{a_{(i+j-k)}}} \cdot c_{S^{(m-i)}} \quad (1)$$

$$c_{S^{(m-i-j)}} = \frac{K_{a_{(i-j)}}}{10^{-pH}} \cdot c_{S^{(m-i-j+1)}}$$

$$c_{S^{(m-i-j)}} = \frac{K_{a_{(i-j)}} \cdot K_{a_{(i-j+1)}} \cdot \dots \cdot K_{a_{(i-j+k)}}}{10^{-pH}} \cdot c_{S^{(m-i-j+k+1)}}$$

$$c_{S^{(m-i-j)}} = \frac{\prod_{k=0}^{j-1} K_{a_{(i-j+k)}}}{10^{-pH \cdot j}} \cdot c_{S^{(m-i)}} \quad (2)$$

Einsetzen von Gleichung 1 und 2 in die Gesamtkonzentration

$$c_0 = \sum_{j=0}^{m+n} c_{S^{(m-j)}} = \sum_{j=1}^i c_{S^{(m-i+j)}} + c_{S^{(m-i)}} + \sum_{j=1}^{m+n-i} c_{S^{(m-i-j)}}$$

liefert den Ausdruck für die Konzentration von $S^{(m-i)}$

$$c_0 = \sum_{j=1}^i \frac{10^{-pH \cdot j}}{\prod_{k=1}^j K_{a_{(i+j-k)}}} \cdot c_{S^{(m-i)}} + c_{S^{(m-i)}} + \sum_{j=1}^{m+n-i} \frac{\prod_{k=0}^{j-1} K_{a_{(i-j+k)}}}{10^{-pH \cdot j}} \cdot c_{S^{(m-i)}}$$

$$c_{S^{(m-i)}} = \frac{c_0}{\sum_{j=1}^i \frac{10^{-j \cdot pH}}{\prod_{k=1}^j K_{a_{(i+j-k)}}} + 1 + \sum_{j=1}^{m+n-i} \frac{\prod_{k=0}^{j-1} K_{a_{(i-j+k)}}}{10^{-j \cdot pH}}}$$

Zur korrekten Lösung müssen anstelle der Aciditätskonstanten die mit dem Verhältnis der Aktivitätskoeffizienten multiplizierten eingesetzt werden

$$\prod_{k=1}^j K_{a_{(i+j-k)}} \cdot \frac{f_{m+1-(i+j-k)}}{f_{m-(i+j-k)}} \quad \text{und} \quad \prod_{k=0}^{j-1} K_{a_{(i-j+k)}} \cdot \frac{f_{m+1-(i-j+k)}}{f_{m-(i-j+k)}}$$

Die Ausdrücke lassen sich vereinfachen mit

$$\prod_{k=0}^{j-1} \frac{f_{m+1-(i-j+k)}}{f_{m-(i-j+k)}} = \frac{f_{m-(i-j)+1}}{f_{m-(i-j)}} \frac{f_{m-(i-j)}}{f_{m-(i-j)-1}} \frac{f_{m-(i-j)-1}}{f_{m-(i-j)-2}} \dots \frac{f_{m-i+2}}{f_{m-i+1}} = \frac{f_{m-i+1+j}}{f_{m-i+1}}$$

$$\prod_{k=1}^j \frac{f_{m+1-(i+j-k)}}{f_{m-(i+j-k)}} = \frac{f_{m-(i+j)+2}}{f_{m-(i+j)+1}} \frac{f_{m-(i+j)+3}}{f_{m-(i+j)+2}} \frac{f_{m-(i+j)+4}}{f_{m-(i+j)+3}} \dots \frac{f_{m-i+1}}{f_{m-i}} = \frac{f_{m-i+1}}{f_{m-i+1-j}}$$

zu

$$\prod_{k=1}^j K_{a(i+j-k)} \cdot \frac{f_{m+1-(i+j-k)}}{f_{m-(i+j-k)}} = \frac{f_{m-i+1}}{f_{m-(i+j)+1}} \cdot \prod_{k=1}^j K_{a(i+j-k)}$$

$$\prod_{k=0}^{j-1} K_{a(i-j+k)} \cdot \frac{f_{m+1-(i-j+k)}}{f_{m-(i-j+k)}} = \frac{f_{m-(i-j)+1}}{f_{m-i+1}} \cdot \prod_{k=0}^{j-1} K_{a(i-j+k)}$$

Damit lautet α_i

$$\alpha_i = \frac{1}{\sum_{j=1}^i \frac{f_{m-i+1-j}}{f_{m-i+1}} \cdot \frac{10^{-j \cdot \text{pH}}}{\prod_{k=1}^j K_{a(i-j+k)}} + 1 + \sum_{j=1}^{m+n-i} \frac{f_{m-i+1+j}}{f_{m-i+1}} \cdot \frac{\prod_{k=0}^{j-1} K_{a(i-j+k)}}{10^{-j \cdot \text{pH}}}}$$

3.2. Anhang 2

Verwendete Aciditätskonstanten der Nucleosidmonophosphate (pK_a Werte)

Adenosinmonophosphat:	0,8; 3,8; 6,2
Cytosinmonophosphat:	0,8; 4,3; 6,2
Guanosinmonophosphat:	0,8; 2,5; 6,2; 9,5
Tymidinmonophosphat:	0,8; 6,2; 9,9

Literatur

- 1 Li C. F. Y.: Capillary Electrophoresis, Elsevier, Amsterdam 1993
- 2 Khaledi Morteza G. et al.: Controlling Migration Behavior in Capillary Electrophoresis: Optimization Strategies for Methods Development in Guzman N. A.: Capillary Electrophoresis Technology, Marcel Dekker, New York 1993
- 3 Kuhn R., Hoffstetter-Kuhn S.: Capillary electrophoresis: principles and practice, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg 1993
- 4 Kunze U. R.: Grundlagen der quantitativen Analyse, 3. Ed., Thieme Verlag, Stuttgart 1990

Eingegangen am 20. Mai 2001
Angenommen am 4. Juli 2001

J. Peter Surmann
Humboldt Universität zu Berlin
Institut für Pharmazie
Goethestr. 54
D-13086 Berlin