

267. Neue kationische Puffer¹⁾

von G. Semenza, S. Landucci und E. Mülhaupt

Zum 70. Geburtstag von Professor H. FISCHER

(23. VIII. 62)

Aus verschiedenen Gründen ist zu erwarten, dass eine Proteinchromatographie auf Ionenaustauschern in der Nähe der isoelektrischen Punkte bessere Trennungen ergibt als bei pH-Werten, die davon weit entfernt sind. In der Nähe des isoelektrischen Punktes bestehen nämlich grössere relative Unterschiede in der Zahl der Ladungen und deshalb auch grössere Unterschiede zwischen den Adsorptionskoeffizienten der einzelnen Proteine. In der Nähe des isoelektrischen Punktes verschwinden allmählich die Besonderheiten der Ionenaustausch-Chromatographie von Polyelektrolyten²⁾: insbesondere sind kleinere Schwanzbildungen und messbarere Rf-Werte zu erwarten, was zur besseren Ausnützung der Unterschiede in den Adsorptionskoeffizienten führt. In der Tat besteht eine der gebräuchlichsten Methoden zur Entwicklung von Proteinchromatogrammen eben in der Anwendung von pH-Gradienten in Richtung der isoelektrischen Punkte³⁾.

Da die meisten Eiweisskörper im leicht sauren Gebiet liegende isoelektrische Punkte haben und die grösste Stabilität oberhalb dieses pH aufweisen, werden in der Proteinchromatographie allgemein Anionenaustauscher angewandt (DEAE-C⁴⁾, TEAE-C⁵⁾, AE-C⁶⁾, GE-C⁶⁾, DEAE-Sephadex⁷⁾ usw.). Auf Anionenaustauschern sollte man aber kationische Puffer anwenden, weil dadurch eine bessere pH-Kontrolle ermöglicht wird, wie BOMAN & WESTLUND gezeigt haben⁸⁾: Es ist nämlich bekannt, dass der Adsorptionskoeffizient der Proteine besonders empfindlich auch gegen kleine pH-Änderungen ist, was durch einfache theoretische Überlegungen erklärbar ist²⁾.

¹⁾ Chromatographie von Polyelektrolyten: VII. Mitteilung, VI. Mitteilung; G. SEMENZA, *Chimia* 14, 325 (1960). Ein Teil dieser Arbeit ist schon in vorläufiger Form mitgeteilt worden: G. SEMENZA, Proteinanalytisches Symposium 1961, MFA der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen, 5.–15. Sept. 1961.

Verwendete Abkürzungen: DEAE-C: Diäthylamino-äthyl-cellulose; TEAE-C: Triäthylamino-äthyl-cellulose; AE-C: Aminoäthyl-cellulose; GE-C: Guanidinoäthyl-cellulose; DEAE-Sephadex: Diäthylamino-äthyl-Sephadex; Tris: Tris(hydroxymethyl)-amino-methan; Penta: 2,3-Dihydroxypropyl-(trishydroxymethyl-methyl)-amin; THEDA: Tetrakis-(2-hydroxyäthyl)-äthylendiamin; TEEDA: Tetraäthyl-äthylendiamin; DiMEA: Dimethylamino-äthylamin.

²⁾ Siehe z. B. G. SEMENZA, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 19, C 110 (1961); H. G. BOMAN, «Ion Exchange Chromatography of Proteins and Some Applications to the Study of Different Phosphodiesterases», Stockholm/Uppsala 1958; E. A. PETERSON & H. A. SOBER in «Methods in Enzymology», herausgegeben von S. P. COLOWICK & N. O. KAPLAN, Band 5, S.3, New York 1961.

³⁾ H. A. SOBER, F. J. GUTTER, M. M. WYCKOFF & E. A. PETERSON, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 756 (1956).

⁴⁾ E. A. PETERSON & H. A. SOBER, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 751 (1956).

⁵⁾ J. PORATH, *Arkiv Kemi* 11, 97 (1957).

⁶⁾ G. SEMENZA, *Helv.* 43, 1057 (1960).

⁷⁾ Von der Firma PHARMACIA, Uppsala, Schweden, erhältlich.

⁸⁾ H. G. BOMAN & L. WESTLUND, *Arch. Biochemistry Biophysics* 64, 217 (1956).

Der Gebrauch kontinuierlicher Gradienten von alkalischen zu sauren pH-Werten (wie es gewöhnlich auf Anionenaustauschern der Fall ist) mit kationischen Puffern führt auch ohne weiteres zu einer gleichzeitigen Erhöhung der Konzentration des Elutionsmittels (z. B. Chlorid usw.). Die gleichzeitige Änderung dieser zwei Parameter kann aber zu keinem Artefakt führen, da sowohl die Erniedrigung des pH als auch die Erhöhung der Elutionsmittelkonzentration eine gleichsinnige Änderung des Adsorptionskoeffizienten der Proteine auf Anionenaustauschern, d. h. eine Herabsetzung, herbeiführen.

Unseres Wissens ist aber kein kationischer Puffer für Chromatographien auf Anionenaustauschern im *sauren* Bereich je gebraucht worden – der mit Erfolg von BOMAN & WESTLUND⁹⁾ gebrauchte kationische Puffer Tris-hydroxymethyl-aminomethan wirkt bekanntlich zwischen pH 7,3 und 9. Wir haben deshalb nach weiteren kationischen Puffern gesucht, die im sauren Bereich wirksam sein und zudem folgende Bedingungen erfüllen sollten: gute Wasserlöslichkeit; keine wesentliche Adsorption bei 280 m μ (damit die übliche bequeme Bestimmung der Proteinkonzentration in den zahlreichen chromatographischen Fraktionen nicht wesentlich gestört wird); gute Stabilität; keine Reaktion mit Eiweisskörpern, Adsorptionsmitteln usw. unter den Bedingungen der Proteinchromatographie; keine hemmende Wirkung auf Enzyme; günstiger Preis.

Im folgenden sind die Eigenschaften einiger kationischer Puffer angegeben, die die obengenannten Bedingungen erfüllen: Piperazin, Tetrakis-(2-hydroxyäthyl)-äthylendiamin (THEDA), Tetraäthyl-äthylendiamin (TEEDA), Dimethylamino-äthylamin (DiMEA), 2,3-Dihydroxypropyl-tris-(hydroxymethyl)-methylamin (Penta). Abgesehen von letzterer Substanz sind alle diese Amine im Handel erhältlich. Die Synthese von Penta wird in einer späteren Arbeit beschrieben werden. Piperazin ist schon von SMITH & SMITH⁹⁾ als Puffer empfohlen worden. Allerdings wurde dieser Puffer früher selten, wenn überhaupt, angewandt. Wir haben das Piperazin in diesen letzten Jahren auch für die Regenerierung von Anionenaustauschern gebraucht; diese Regenerierungsprozedur ist früher diskutiert worden^{6) 1)}.

pK_A-Werte und Zusammensetzung der Pufferlösungen. Sie sind in Tabelle I angegeben. Über die Einzelheiten der Herstellung der Pufferlösungen s. exp. Teil. Die zweite Dezimale nach dem Komma ist unsicher; die Ungenauigkeit ist im Falle des Penta und des THEDA etwas grösser, da diese Substanzen noch mit anderen Aminen verunreinigt waren.

Die thermodynamischen pK-Werte wurden nicht bestimmt. Wir haben jedoch beobachtet, dass, wie erwartet, die pK_A-Werte stark von der Ionenstärke abhängig sind, vor allem diejenigen der zweiwertigen Amine in saurem Milieu. So führt z. B. die Senkung der Ionenstärke einer sauren TEEDA-Lösung von 1 auf 0,01 zu einer Senkung des pK_A um beinahe 0,5 pH-Einheiten. Die pH-Änderung, die bei Verdünnung eines sauren TEEDA-, THEDA- oder Piperazin-Puffers eintritt, darf also nicht übersehen werden.

Mit geeigneten Mischungen dieser kationischen Puffer kann man Puffersysteme herstellen, die eine beinahe konstante Pufferkapazität in bestimmten pH-Gebieten haben. Es ist nämlich berechnet worden, dass eine fast konstante Pufferkapazität

⁹⁾ M. E. SMITH & L. B. SMITH, *Biological Bull.* 96, 233 (1949).

Tabelle I. *Zusammensetzung einiger Pufferlösungen*
 Endmolarität: 0,05 M

TEEDA		THEDA		DiMEA		Piperazin ^{a)}		Penta	
0,1N HCl ml	pH	0,1N HCl ml	pH	0,1N HCl ml	pH	0,1N HCl ml	pH	0,1N HCl ml	pH
7,4	10,0	5,0	9,73	6,18	10,4	6,85	10,6	4,55	8,4
10,8	9,8	15,0	8,94	9,15	10,2	10,04	10,4	6,85	8,2
15,2	9,6	25,0	8,54	13,1	10,0	14,25	10,2	10,0	8,0
20,4	9,4	35,0	8,18	19,0	9,8	19,35	10,0	14,25	7,8
26,2	9,2	55,0	6,43	23,61	9,6	25,0	9,8	19,35	7,6
31,8	9,0	75,0	4,56	29,31	9,4	30,75	9,6	25,0	7,4
36,8	8,8			34,65	9,2	35,75	9,4	30,65	7,2
40,85	8,6			39,16	9,0	39,96	9,2	35,75	7,0
43,9	8,4			42,75	8,8	43,15	9,0	40,0	6,8
46,44	8,2			45,39	8,6	40,45	8,8	43,15	6,6
								45,45	6,4
55,3	6,8			55,25	7,4	55,48	6,4		
58,04	6,6			58,1	7,2	58,15	6,2		
61,73	6,4			61,9	7,0	61,80	6,0		
66,43	6,2			66,6	6,8	66,45	5,8		
71,72	6,0			72,0	6,6	71,80	5,6		
77,55	5,8			77,85	6,4	77,55	5,4		
83,05	5,6			83,3	6,2	83,55	5,2		
87,75	5,4			88,0	6,0	87,75	5,0		
91,5	5,2			91,65	5,8	91,5	4,8		
94,3	5,0			94,3	5,6	94,25	4,6		
19,25 ^{b)}	4,8			19,26 ^{b)}	5,4	19,25 ^{b)}	4,4		
pK _A ' ($\mu = 0,025$)	5,89	ca. 4,5		6,50		5,49		ca. 7,4	
pK _A ^{a)} ($\mu = 0,1$)	9,24	ca. 8,5		9,55		9,80			

a) aus den Daten von SMITH & SMITH⁹⁾
 b) 0,5 N HCl

erreicht werden kann, wenn die verschiedenen Puffersubstanzen in gleicher molarer Konzentration vorhanden sind und die verschiedenen pK_A-Werte einen Abstand von 1–1,4-Einheiten haben¹⁰⁾. Die verschiedenen «Universalpuffer» erfüllen eben diese Bedingung. Einige solcher Systeme kann man auch mit den hier beschriebenen Puffersubstanzen erreichen. Einige Beispiele sind in Tabelle II aufgeführt.

Die angegebenen pH-Grenzen dieser kationischen Puffersysteme müssen selbstverständlich als ungefähr betrachtet werden.

Diese kationischen «Universalpuffer» unterscheiden sich von den anderen¹¹⁾ vor allem dadurch, dass sich in den eben angegebenen Systemen (Tab. II) die Ionenstärke (bei gleicher Molarität) mit dem pH viel stärker ändert als in den anderen Universalpuffern, bei deren Pufferwirkung auch Anionen beteiligt sind: ein 0,1 M

¹⁰⁾ D. D. VAN SLYKE, *J. biol. Chemistry* 52, 525 (1922).

¹¹⁾ T. THEORELL & E. STENHAGEN, *Biochem. Z.* 299, 416 (1938); D. A. ELLIS, *Nature* 191, 1099 (1961); P. FASELLA, C. BAGLIONI & C. TURANO, *Experientia* 13, 406 (1957).

Tabelle II. *Rein kationische «Universalpuffer»* (Säure: HCl oder H₂SO₄ usw.)

Basen-Zusammensetzung (mol. Verhältnis)	pH-Gebiet	Bemerkungen
TEEDA (oder DiMEA) + Tris (1:0,7)	ca. 10,5–5,6 (s. Fig. 1)	Kleinere Pufferwirkung zwischen ca. pH 5,7 und 5,3.
TEEDA (oder DiMEA) + THEDA + Penta (1:1:1)	ca. 10,5–3,5 (s. Fig. 2)	
Äthylendiamin + 2-Amino-2-methyl- propandiol (1:0,65)	ca. 10,5–6	Kleinere Pufferwirkung zwischen ca. pH 6,7 und 6,3.
Piperazin + THEDA + Penta (1:1:1)	ca. 10,5–3,5	
Piperazin + THEDA + Penta + TEEDA (oder DiMEA) (1:1:1:1)	ca. 10,5–3,5	Doppelte Pufferwirkung zwischen ca. pH 10,5 und 9.

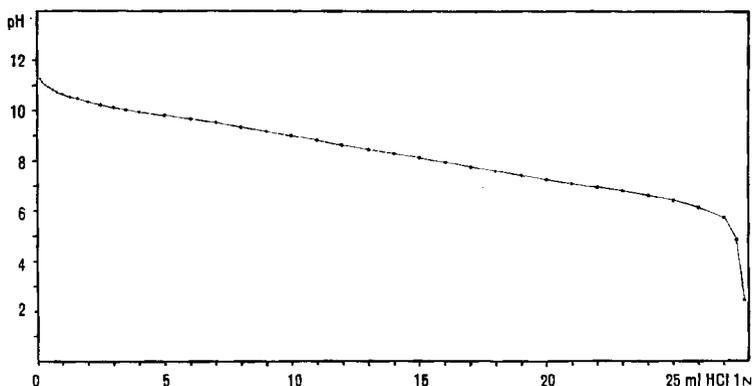


Fig. 1. *Titrationkurve eines Gemisches von DiMEA (10 Millimole) + Tris (7 Millimole) in 5 ml Wasser bei Zimmertemperatur*

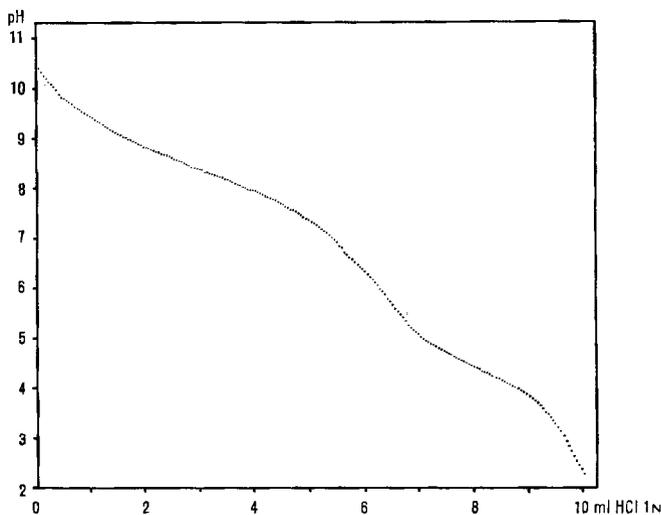


Fig. 2. *Titrationkurve eines Gemisches von TEEDA (2 Millimole) + THEDA (2 Millimole) + Penta (2 Millimole) in 100 ml Wasser bei Zimmertemperatur*

Piperazin/THEDA/Penta/TEEDA + HCl-Puffer hat beispielsweise eine Ionenstärke von fast 1 bei pH 3,5 und von ca. 0,05 bei pH 10. Dies mag für gewisse Zwecke nachteilig sein – ist es aber nicht in der Proteinchromatographie. Tatsächlich verursacht die Erhöhung der Ionenstärke mit fallendem pH eine Erhöhung der Löslichkeit der Proteine (in der Eiweisskörperchromatographie auf Cellulosederivaten wird maximal eine Ionenstärke von 0,5–1 erreicht). Dies wirkt der Herabsetzung der Löslichkeit von Proteinen entgegen, welche die pH-Erniedrigung an und für sich mit sich bringt. Dadurch sollten unerwünschte Nebeneffekte, wie Aussalzungseffekte, Verstopfung der Säule usw., seltener werden.

Eignung für Proteinchromatographie. Dass die pH-Kontrolle mit diesen Puffern optimal ist, ist in Fig. 3 gezeigt. Eine AE-C-Säule wurde mit NaOH, dann mit saurem Piperazin/HCl/NaCl gewaschen. Nachdem sie gegen verdünntes TEEDA/HCl pH 7,3 ins Gleichgewicht gebracht worden war, wurde sie mit Pufferlösungen von gleichem pH, aber grösseren Konzentrationen gewaschen. Die Figur zeigt, dass unter diesen Bedingungen im Eluat keine pH-Änderungen zu beobachten waren – was eben zu erwarten war, da kationische Puffer auf Anionenaustauschern nicht ausgetauscht werden können.

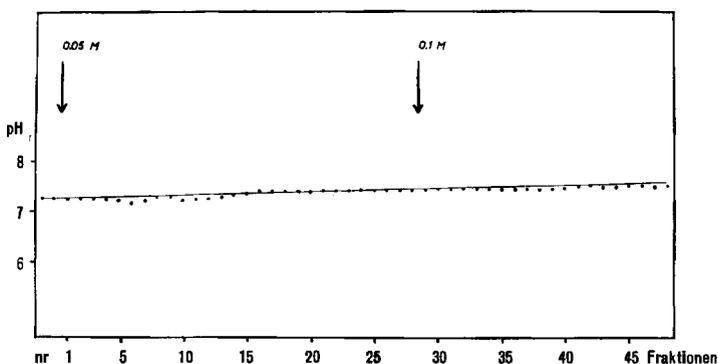


Fig. 3. pH-Kontrolle durch kationische Puffer

Eine Säule (cm $12 \times 1,5$) von AE-C (0,44 mÄq./g) wurde mit 1-proz. NaOH, dann mit 0,1M Piperazin/HCl (pH 4,4) (+ 20% NaCl) gewaschen, dann gegen 0,02M TEEDA/HCl pH 7,3 ins Gleichgewicht gebracht. Es folgten zwei Waschungen mit 0,05M, bzw. 0,1M, TEEDA/HCl-Puffern von pH = 7,3. Das Volumen jeder Fraktion entsprach ca. 3 ml. Alle verwendeten Lösungen waren CO_2 -frei; während des Versuchs wurde die Säule gegen das Eintreten von CO_2 geschützt.

Die theoretischen Überlegungen, nach welchen zu erwarten ist, dass diese Puffer für Proteinchromatographie besonders geeignet sind, haben wir oben erwähnt. In der Tat konnten sowohl PECHÈRE & ZANEN¹²⁾ als auch BÜRGI¹³⁾ mit einigen unserer kationischen Puffer viel bessere Trennungen auf DEAE-C erreichen als mit anionischen Puffern. Die ersteren Verfasser waren imstande, zwei Exopenicillasen von *B. cereus* mit Piperazin-Puffern zu trennen, was mit Phosphatpuffern nicht

¹²⁾ J.-F. PECHÈRE & J. ZANEN, Nature, im Druck und pers. Mitt.

¹³⁾ W. BÜRGI, Biochem. biophys. Acta, im Druck und pers. Mitt.

gelingen war. BÜRGI hat das Orosomucoïd vom Albumin (s. Fig. 4) auf DEAE-C mit einem geeigneten pH-Gradienten mit Piperazin/HCl-Puffern getrennt: Im so erhaltenen Orosomucoïd konnte immunochemisch keine Verunreinigung nachgewiesen werden: Es ist somit mindestens 99,9% rein. Mit Acetat-Puffern war die Trennung viel weniger zufriedenstellend.

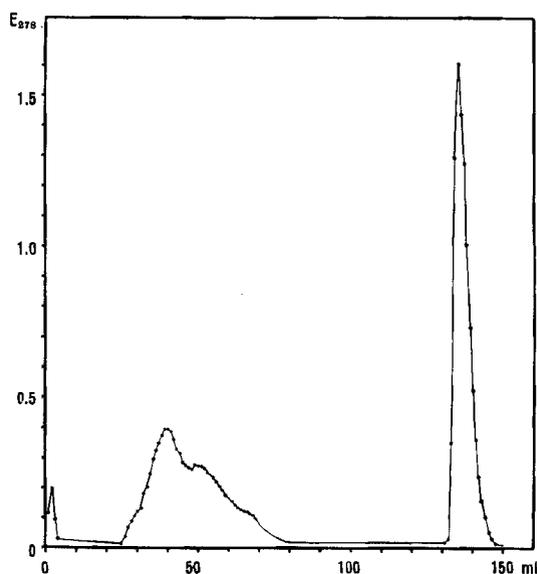


Fig. 4. Trennung von Orosomucoïd (ml 133–145) vom Albumin (ml 26–75) an einer DEAE-C-Säule. Piperazin-Puffer, Gradient von pH 5,0 bis pH 4,6. Aus BÜRGI¹³⁾.

Chromatographische Trennungsversuche von menschlichem Serum auf AE-C mit pH-Gradienten von pH 8,6 zu pH 4 mit TEEDA-THEDA-Penta/HCl-Puffern haben gezeigt, dass die pH-Kontrolle gut ist (der pH-Gradient im Eluat entsprach dem berechneten Eingangsgradient) und das chromatographische Verhalten der Serumproteine mit deren pI übereinstimmt (cf. auch Ref.⁸⁾). Diese und weitere chromatographische Versuche werden bald veröffentlicht werden.

Wirkung auf verschiedene Enzyme. Wir haben versucht festzustellen, ob und wie weit diese kationischen Puffer Enzyme hemmen (s. Tabelle III). Wie man sieht, haben die geprüften Substanzen keine hemmende Wirkung auf Muskelaldolase, Leberkatalase und Zwischenferment. Das letzte Enzym ist bekanntlich sowohl ein Metall-aktiviertes als auch ein SH-Enzym. Die Aminooxydase des Ochsen-serums wird von Piperazin, Penta, TEEDA, THEDA und Tris nicht gehemmt. Hingegen hemmen sowohl Äthylendiamin als auch Dimethylamino-äthylamin die Oxydation des Benzylamins durch dieses Enzym: wahrscheinlich werden diese primären Amine an Stelle des Benzylamins oxydiert. Dieser Reaktion wegen (bei welcher H_2O_2 freigesetzt wird) sollten diese beiden letzten Amine nicht als Puffer gebraucht werden, wenn der Gewebeextrakt Aminooxydase-Aktivität besitzt.

Tabelle III. *Wirkung kationischer Puffer auf einige Enzyme*

Temperatur: 25° für Aldolase, Zwischenferment, Katalase und Aminooxydase; 37° für Maltase, Isomaltase und Saccharase

Enzym	Puffer (Endkonz.)	pH	Beobachtete Hemmung (%)	
Aldolase aus Kaninchenmuskel	Piperazin/HCl 0,02 M	7,5	0	
	THEDA/HCl 0,024 M	7,5	0	
	TEEDA/HCl 0,024 M	7,5	0	
	Penta/HCl 0,02 M	7,5	0	
	DiMEA/HCl 0,02 M	7,5	0	
	Äthylendiamin/HCl 0,02 M	7,5	0	
Zwischenferment aus Hefe	Piperazin/HCl 0,02 M	7,5	0	
	THEDA/HCl 0,024 M	7,5	0	
	TEEDA/HCl 0,024 M	7,5	0	
	Penta/HCl 0,02 M	7,5	0	
	DiMEA/HCl 0,02 M	7,5	0	
	Äthylendiamin/HCl 0,02 M	7,5	0	
Katalase aus Rindsleber	Piperazin/HCl 0,02 M	7,5	0	
	THEDA/HCl 0,024 M	7,5	0	
	TEEDA/HCl 0,024 M	7,5	0	
	Penta/HCl 0,02 M	7,5	0	
	DiMEA/HCl 0,02 M	7,5	0	
	Äthylendiamin/HCl 0,02 M	7,5	0	
Aminooxydase aus Ochsen Serum (Substrat: Benzylamin 0,0033 M)	Piperazin/HCl 0,02 M	7,5	0	
	THEDA/HCl 0,024 M	7,5	0	
	TEEDA/HCl 0,024 M	7,5	0	
	Penta/HCl 0,02 M	7,5	0	
	DiMEA/HCl 0,02 M	7,5	60	
	Äthylendiamin/HCl 0,02 M	7,5	90	
Maltase aus menschlicher Darm- schleimhaut	THEDA/HCl 0,0125 M	7,0	25 ^{a)}	5 ^{b)}
	TEEDA/HCl 0,0125 M	7,0	11 ^{a)}	4 ^{b)}
	Penta/HCl 0,0125 M	7,0	24 ^{a)}	16 ^{b)}
	Tris/HCl 0,0125 M	7,0	61 ^{a)}	46 ^{b)}
Isomaltase aus menschlicher Darm- schleimhaut	THEDA/HCl 0,0125 M	7,0	8 ^{a)}	8 ^{b)}
	TEEDA/HCl 0,0125 M	7,0	8 ^{a)}	8 ^{b)}
	Penta/HCl 0,0125 M	7,0	31 ^{a)}	20 ^{b)}
	Tris/HCl 0,0125 M	7,0	86 ^{a)}	61 ^{b)}
Saccharase aus menschlicher Darm- schleimhaut	THEDA/HCl 0,0125 M	7,0	0 ^{a)}	
	TEEDA/HCl 0,0125 M	7,0	14 ^{a)}	6 ^{b)}
	Penta/HCl 0,0125 M	7,0	25 ^{a)}	20 ^{b)}
	Tris/HCl 0,0125 M	7,0	52 ^{a)}	44 ^{b)}
a) Substrat 0,028 M; b) Substrat 0,056 M				

Es ist bekannt, dass Tris und andere Amine die 1,6-Glucosidase, die Maltase¹⁴⁾, die Saccharase und die Melecitase¹⁵⁾ aus Schweinsjejunum sowie die Maltase aus *Penic. notatum*¹⁶⁾ hemmen. Wie aus Tab. III ersichtlich ist, zeigen unsere Daten,

¹⁴⁾ J. LARNER & R. E. GELLESPIE, J. biol. Chemistry 223, 709 (1956).

¹⁵⁾ A. DAHLQVIST, Acta chem. scand. 12, 2012 (1958).

¹⁶⁾ A. DAHLQVIST, Biochem. J. 80, 547 (1961).

dass Tris die menschlichen Oligosaccharidasen auch hemmt; hingegen hemmen die meisten anderen hier geprüften kationischen Puffer die Oligosaccharidasen der menschlichen Darmschleimhaut viel weniger als Tris, oder überhaupt nicht (im Penta war noch eine beträchtliche Menge Tris vorhanden). Das TEEDA ist ein kompetitiver Hemmstoff der Cholinesterase^{16a)}.

Da diese kationischen Puffer relativ gute Komplexbildner für Schwermetalle und relativ schwache für Erdalkalien sind, sollten sie die meisten Metall-aktivierten Enzyme nicht hemmen; sie sollten jedoch eine schützende Wirkung auf die meisten Proteine ausüben, indem sie die denaturierende Wirkung vieler Metall-Ionen, wie etwa Cu^{2+} , aufheben.

Einfluss auf in der Proteinchromatographie gebräuchliche analytische Methoden. –

a) *Bestimmung der Cl⁻-Konzentration in Anwesenheit kationischer Puffer.* BJÖRK & SVENSSON¹⁷⁾ haben beobachtet, dass die mercurimetrische Chlorid-Titration nach KOLTHOFF in Anwesenheit von Tris oder von 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol zu hohe Werte gibt. Dies ist wahrscheinlich auf das Vermögen des Tris zurückzuführen, Komplexe mit Quecksilber zu bilden. Sie empfehlen deshalb, diese Amine vor der mercurimetrischen Cl-Titration zu zerstören. Da die von uns beschriebenen kationischen Puffer auch Komplexbildner sind, stören sie ebenfalls in der Titration nach KOLTHOFF.

Wir konnten auch feststellen, dass, wie erwartet, sowohl die Methode von MOHR als auch diejenige von VOLHARD deshalb nicht gebraucht werden können, weil der Umschlag des Indikators verhindert wird¹⁸⁾. Aus dem gleichen Grunde kann Eosin als Indikator nicht angewandt werden. Die spektrophotometrische Silberchromat-Methode¹⁹⁾ und die Ferriperchlorat-Methode²⁰⁾ können ebenfalls nicht gebraucht werden. Die von uns geprüften nephelometrischen Methoden haben unbefriedigende Resultate ergeben. Potentiometrische Methoden haben wir nicht geprüft.

Auf der Suche nach einer relativ raschen Methode für die Bestimmung der Chlorid-Konzentration in Anwesenheit von Aminen in den zahlreichen chromatographischen Fraktionen haben wir festgestellt, dass die Brucin-Methode²¹⁾ von den meisten kationischen Puffern nicht wesentlich gestört wird. Demnach haben wir diese Methode modifiziert und dabei einerseits eine Vereinfachung und andererseits eine Verminderung von Störungen durch fremde Substanzen erzielt. Im weiteren haben wir auch verschiedene Methoden für die Enteiweissung geprüft. Unsere modifizierte Methode ist die folgende:

Reagenzien. – a) Brucin (*puriss.*, SIEGFRIED, Zofingen) 1% (Gew./Vol.) in 5-proz. H_3PO_4 (Gew./Vol.). Diese Lösung ist mindestens zwei Wochen bei Zimmertemperatur haltbar.

b) 50-proz. H_3PO_4 (Gew./Vol.): 177 ml H_3PO_4 (MERCK, *puriss.*, z. A., 84,5%) werden mit H_2O auf 300 ml gebracht.

c) 1-proz. Kaliumpersulfat (Gew./Vol.) in H_2O . Diese Lösung ist bei Zimmertemperatur mindestens drei Wochen haltbar.

^{16a)} S. L. FRIESS & H. D. BALDRIDGE, J. Amer. chem. Soc. 78, 199 (1956).

¹⁷⁾ W. BJÖRK & I. SVENSSON, J. Chromatography 4, 88 (1960).

¹⁸⁾ Das Piperazin stört wegen seiner reduzierenden Eigenschaften.

¹⁹⁾ T. KATO & K. SHINRA, Nippon Kagaku Zasshi 77, 245 (1956); Chem. Abstr. 51, 15330c (1957).

²⁰⁾ P. W. WEST & H. COLL, Analyt. Chemistry 28, 1834 (1956).

²¹⁾ F. BINKLEY, J. biol. Chemistry 173, 403 (1948).

Ausführung. Drei Teile von Reagens *b* werden mit einem Teil von Reagens *a* unmittelbar vor Gebrauch gut gemischt. 1 ml dieses Gemisches wird zu je 1 ml der zu prüfenden Lösung (enthaltend 0,5 bis 8 Micromol Cl^-) bzw. der Standardlösungen und Leerwertlösung zugegeben. Gut mischen.

Dazu gibt man je 0,1 ml Reagens *c*. Wir verwenden dafür eine halbautomatische CARLSBERG-Pipette²²). Gut mischen, dann sofort 10 Min. im kochenden Wasserbad erhitzen. Abkühlen. Gegen den Leerwert bei 546 μ ablesen. Wir verwenden dazu einen EPPENDORF-Photometer mit Hg-Lampe und Hg-546-Filter. Die Farbe ist während mindestens eines Tages stabil.

Störende Substanzen. Eiweisskörper stören wesentlich und müssen deshalb entfernt werden. Es zeigte sich, dass unter den Reagenzien, die für Enteiweissung gebraucht werden, HClO_4 und Sulfosalicylsäure stören. Trichloressigsäure: die Farbausbeute des Cl^- ist mit oder ohne Trichloressigsäure die gleiche. Die meisten Handelspräparate dieser Säure enthalten jedoch Verunreinigungen, die bei den zur Enteiweissung nötigen Konzentrationen hohe oder sogar störend hohe Leerwerte ergeben. Unter den verschiedenen geprüften Handelspräparaten hat eine frische Analar Trichloressigsäure von BRITISH DRUG HOUSES die niedrigsten Leerwerte ergeben. Es ist aber notwendig, der Leerwert-Probe und den Standard-Proben die gleiche Menge Trichloressigsäure zuzugeben wie den eigentlichen Proben. Die ZnSO_4 -NaOH-Methode wirkt bei dieser Cl^- Bestimmung nicht störend.

Die kationischen Puffer stören in dieser Methode unwesentlich, solange folgende Molaritätsverhältnisse, bezogen auf die Chlorid-Konzentration, nicht überschritten werden: Tris (20mal die Cl^- -Konzentration), Penta und THEDA (10mal), TEEDA (8mal), Piperazin (4mal), 2-Äthylamino-äthanol und DiMEA (3mal).

Spezifizität. Nach der Literatur kann die Brucin-Methode für die Bestimmung anderer Halogenide angewendet werden.

Die Kochzeit ist im Vergleich mit der ursprünglichen Methode wesentlich gekürzt worden. Während des Kochens entwickeln sich nämlich zwei Farben: die kirschrote, die auf das Cl^- zurückzuführen ist, und eine andere, gelborange, die auch im Leerwert erscheint. Beide verblassen bei längerem Kochen. Die Farbausbeute des Cl^- ist bei 10 Min. maximal. Andererseits bietet längeres Kochen keine Vorteile: das Linearitätsgebiet, z. B., wird nicht grösser.

b) *Biuretreaktion.* Da die hier beschriebenen kationischen Puffer (abgesehen vom Piperazin) gute Komplexbildner für Schwermetalle sind, kann die Biuretmethode für die Proteinbestimmung nicht als solche gebraucht werden. Es ist andererseits auch bekannt, dass Tris an den Proteinen stark haftet und nicht durch Ausfällen der Proteine mit Trichloressigsäure entfernt werden kann²³). – Proteine haben wir am besten durch Messung ihrer optischen Dichte bei 280 μ bestimmt: unsere kationischen Puffer absorbieren im UV. unwesentlich.

Die Bildung eines blauen oder eines rosa Komplexes zwischen Cu^{2+} und kationischen Puffern liefert eine bequeme Methode zur Bestimmung der letzteren in Abwesenheit von Proteinen. Wir gebrauchen dazu das Biuretreaenz von WEICHSELBAUM²⁴)²⁵). Die Farbentwicklung ist innerhalb weniger Minuten beendet; die Farbe ist während einiger Stunden stabil.

Experimentelles. – *Materialien.* Piperazin, TEEDA, THEDA, DiMEA, Äthylendiamin und andere Amine sind von der Firma FLUKA, Buchs (SG), bezogen worden. Das Tris haben wir von der Firma BOEHRINGER, Mannheim, bezogen. Das 2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol war ein

²²) M. LEVY, Compt. rend. des trav. du lab. Carlsberg, sér. chimique 27, 101 (1936).

²³) U. KALETTA-GMÜNDER, H. P. WOLF & F. LEUTHARDT, Helv. 40, 1027 (1957); H. G. BOMAN & U. KALETTA, Biochim. biophys. Acta 24, 619 (1957).

²⁴) T. E. WEICHSELBAUM, Amer. J. clin. Path., Techn. Sect. 10, 40 (1946).

²⁵) G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDE & G. PFLEIDERER, Z. Naturforschung 8b, 555 (1953).

Produkt der COMMERCIAL SOLVENTS CORPORATION, New York. Das Penta wurde durch Einwirkung von Glyceringlycid auf Tris synthetisiert. Die ausführliche Beschreibung der Synthese wird später erscheinen.

Die folgenden Enzyme waren BOEINGER-Produkte: Katalase (aus Rindsleber), Aldolase (aus Kaninchenmuskel), Zwischenferment (aus Hefe). Für die Versuche mit Serum-Aminooxydase wurde acetongetrocknetes Pulver von Ochsen Serum verwendet, für die Oligosaccharidasen-Versuche eine Präparation von Mikrosomen und Mikrovillen aus menschlicher Darmschleimhaut.

Proteinchromatographien. Die Richtlinien wurden in früheren Publikationen angegeben¹⁾). Einzelheiten sind in den Legenden der Figuren vermerkt. Die AE-C wurde wie früher beschrieben⁶⁾ hergestellt; neuere Änderungen in der Herstellungsprozedur werden demnächst publiziert.

Herstellung der Pufferlösungen. Die flüssigen Amine wurden vor dem Gebrauch im Vakuum destilliert²⁶⁾. Das Piperazin wurde durch Sublimation gereinigt. THEDA (25-proz. Lösung in Wasser) und Tris wurden als solche gebraucht. Zur Herstellung der Pufferlösungen wurden von den verschiedenen Aminen 1M-Lösungen mit CO₂-freiem Wasser hergestellt (die Konzentration der THEDA-Stammlösung wurde durch Titration mit 2N HCl am pH-Meter kontrolliert).

Zu 5 ml dieser 1M-Lösungen wurden gemessene Mengen 0,1N bzw. 0,5N HCl (Titrisol MERCK) gegeben und die Volumina auf 100 ml mit CO₂-freiem Wasser gebracht. Die pH-Werte wurden bei 20° ± 1° mit einem METROHM-Präzisionspotentiometer E 187 mit Glaselektrode X gemessen. Die zweite Dezimalstelle nach dem Komma ist unsicher. Die jeweils zugegebenen HCl-Mengen und gemessenen pH-Werte sind in Tabelle I angegeben, sowie andere durch Berechnung interpolierte Werte. Im Falle von THEDA und von Penta sind die erhaltenen Werte mit dem Vorbehalt aufzunehmen, dass diese Substanzen noch unrein waren. Das THEDA z. B. enthält mindestens 6% einer Verunreinigung, die ein pK_A von ca. 8,5 hat.

Diese Pufferlösungen sind in der Kälte einige Wochen haltbar.

Bestimmungsmethoden: Der Proteingehalt wurde allgemein durch Messung der optischen Dichte bei 280 m μ bestimmt. Die Biuretmethode wurde in der BÜCHER'schen Modifikation²⁵⁾ der Methode von WEICHELBAUM²⁴⁾ angewandt. Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten haben wir die in folgenden Referenzen beschriebenen Methoden angewandt: Aldolase³⁰⁾; Aminooxydase³¹⁾; Zwischenferment³²⁾; Katalase³³⁾; Maltase, Isomaltase, Saccharase und Lactase³⁴⁾.

Herrn Prof. F. LEUTHARDT sind wir für sein ständiges Interesse an dieser Arbeit und für viele wertvolle Diskussionen dankbar, ebenso Herrn Dozent H.G. BOMAN für nützliche Ratschläge. Herrn Dr. J.-F. PECHÈRE, Lüttich, Herrn Dr. S. AURICCHIO, Zürich, und Herrn Dr. W. BÜRGI, Zürich, sei für die Mitteilung noch nicht veröffentlichter Ergebnisse herzlich gedankt.

Für die Unterstützung dieser Arbeit danken wir der STIFTUNG FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG AN DER UNIVERSITÄT ZÜRICH, dem SCHWEIZ. NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG und der INTERNATIONAL FEDERATION OF UNIVERSITY WOMEN, London.

²⁶⁾ Einige Daten sind uns von der Firma FLUKA mitgeteilt worden: TEEDA (M.-G. 172,32), Sdp. 70–72°/10 Torr²⁷⁾, $d_4^{20} = 0,80$; DiMEA (M.-G. 88,16), Sdp. 106–107°²⁸⁾, $d_4^{20} = \text{ca. } 0,827$; 2-Äthylamino-äthanol (M.-G. 89,14), Sdp. 167–169°²⁹⁾, $d_4^{20} = 0,914$ ²⁹⁾; Äthylendiamin (M.-G. 60,10), Sdp. 116–117°²⁹⁾, $d_4^{20} = 0,8994$ ²⁹⁾.

²⁷⁾ BEILSTEIN 4, II, 691.

²⁸⁾ Chem. Zbl. 1930, II, 626.

²⁹⁾ Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Publ. Co., Cleveland.

³⁰⁾ E. RACKER, J. biol. Chemistry 167, 843 (1947).

³¹⁾ C. W. TABOR, H. TABOR & S. M. ROSENTHAL, J. biol. Chemistry 208, 645 (1954).

³²⁾ B. L. HORECKER & P. Z. SMYRNIOTIS, in «Methods in Enzymology», herausgegeben von S. P. COLOWICK & N. O. KAPLAN, Band 2, S. 323, New York 1955.

³³⁾ B. CHANCE & A. C. MAEHLY, in «Methods in Enzymology», herausgegeben von S. P. COLOWICK & N. O. KAPLAN, Band 2, S. 764, New York 1955.

³⁴⁾ A. DAHLQVIST, J. clin. Investigation 41, 463 (1962), modif. von S. AURICCHIO, G. SEMENZA, A. RUBINO, M. LANDOLT & A. PRADER, J. clin. Investigation, in Vorbereitung (1962).

SUMMARY

Since in chromatography of proteins on anion exchangers the best separations are to be expected with the use of cationic buffers and of pH-gradients reaching acidic pH-values, new cationic buffers have been studied, covering the pH-range from 10,5 to 3,5. Their composition and their properties are reported; in particular, their capacity to give a good pH-control during chromatography, their lack of inhibition over most enzyme systems, their interference with many procedures for Cl⁻ determination (a modification of the brucin method has been worked out) have been studied.

Biochemisches Institut der Universität Zürich

268. Über diuretisch wirksame Benzoessäure-Derivate

Untersuchungen über synthetische Arzneimittel, 9. Mitteilung¹⁾

von **E. Jucker** und **A. Lindenmann**

(7. IX. 62)

Seit vor ca. 50 Jahren die diuretische Wirkung natürlich vorkommender Xanthine und Purine von E. FISCHER und W. TRAUBE entdeckt worden war, ist die Suche nach neuartigen und besseren Diuretica eines der wichtigsten Forschungsgebiete der pharmazeutischen Chemie geblieben. Ausgehend von diesen Naturstoffen begann man in der Folge diese heterocyclischen Ringsysteme chemisch abzuwandeln, indem man – neben der Herstellung synthetischer Theophyllin-Derivate – besonders Pyrimidin- und Triazin-Verbindungen bearbeitete und auf ihre Wirkung untersuchte. Später lenkte die Beobachtung, dass antisiphilitische organische Quecksilberverbindungen diuretische Eigenschaften aufweisen, die chemische Forschung mehr in diese Richtung, wobei einige auch heute noch therapeutisch wertvolle Diuretica entwickelt wurden. Die Entdeckung der diuretischen Wirkung des schon lange bekannten Prontosils im Jahre 1949²⁾ war dann wiederum Ausgangspunkt einer neuen Forschungsrichtung, und in den folgenden Jahren wurden Sulfamylverbindungen in verschiedenen Laboratorien intensiv bearbeitet. Es sind denn auch aus dieser Körperklasse in der jüngsten Zeit oral wirksame und gut verträgliche Diuretica hergestellt worden. Einige dieser neuen Verbindungen, die sich meist von Benzo-1,2,4-thiadiazinen oder substituierten Anilinen ableiten, haben grosse therapeutische Bedeutung erlangt und sind aus dem heutigen Arzneischatz nicht mehr wegzudenken³⁾.

Wir stellten uns vor einiger Zeit ebenfalls die Aufgabe, diuretisch aktive Verbindungen herzustellen, und untersuchten u. a. einfache Sulfamyl-Derivate der

¹⁾ 8. Mitteilung: *Helv.* **45**, 1860 (1962).

²⁾ W. B. SCHWARTZ, *New England J. Med.* **240**, 173 (1949).

³⁾ Für ausführliche Übersichtsarbeiten über Diuretica siehe: J. M. SPRAGUE, *Ann. New York Acad. Sci.* **177**, 328 (1949); K. H. BEYER & J. E. BAER, in E. JUCKER, *Fortschritte der Arzneimittelforschung*, Birkhäuser-Verlag, Basel-Stuttgart, Bd. *II*, 9 (1960); H. HELLER & M. GINSBURG, in G. P. ELLIS & G. B. WEST, *Progr. Med. Chem.* **7**, 132 (1961); E. SCHLITTLER, G. DE STEVENS & L. WERNER, *Angew. Chemie* **74**, 317 (1962).