

134. Chromatographie von Polyelektrolyten V. Aminoäthyl-Cellulose und Guanidinoäthyl-Cellulose¹⁾

von G. SEMENZA

(20. IV. 60)

Noch vor wenigen Jahren hielt man es für fast unmöglich, Proteine zu chromatographieren. Da diese Polyelektrolyte leicht denaturiert werden, können die meisten der gebräuchlichen Adsorbentien und organischen Lösungsmittel nicht zur Anwendung gelangen. Auch extreme pH-Werte und nur leicht erhöhte Temperaturen müssen vermieden werden. Nachdem jedoch einige Versuche zur chromatographischen Reinigung von einfachen Proteinen gelungen waren – entweder durch Verteilungs-²⁾ oder durch Ionenaustauscher-Chromatographie³⁾ – hat die Proteinchromatographie in den letzten Jahren rasch die Stufe einer allgemein verwendeten Technik erreicht, hauptsächlich durch die Arbeiten von TISELIUS *et al.*⁴⁾, BOMAN *et al.*⁵⁾, SOBER & PETERSON⁶⁾, sowie PORATH⁷⁾. Der grösste Teil der einschlägigen Literatur kann neueren Veröffentlichungen entnommen werden⁸⁾.

¹⁾ Zu dieser Serie gehören jetzt die folgenden Mitteilungen: a) G. SEMENZA, Biochim. biophys. Acta 24, 401 (1957); b) *id.*, Arkiv Kemi 11, 89 (1957); c) *id.*, Acta Vitaminologica, 12, 245 (1958); d) G. SEMENZA, L. S. PRESTIDGE, D. MÉNARD-JECKER & M. BETTEX-GALLAND, Helv. 42, 669 (1959). Eine vorläufige Mitteilung über einen Teil der Resultate, die hier beschrieben werden, ist in Helv. physiol. pharmacol. Acta 17, C 39 (1959) erschienen.

Verwendete Abkürzungen: AE-Cellulose: Aminoäthyl-cellulose; DEAE-Cellulose: Diäthylaminoäthyl-cellulose; ECTEOLA-Cellulose: Cellulose-Derivat, das nach der Vorschrift von PETERSON & SOBER^{6a)} durch Reaktion von Epichlorhydrin und Triäthanolamin mit Alkali-Cellulose erhalten wurde; TEAE-Cellulose: Triäthylaminoäthyl-cellulose; TRIS: Tris (hydroxymethyl)-aminomethan.

²⁾ A. J. P. MARTIN & R. R. PORTER, Biochem. J. 49, 215 (1951); R. R. PORTER, *ibid.* 53, 320 (1953); 59, 405 (1955).

³⁾ S. PALEUS & J. B. NEILANDS, Acta chem. scand. 4, 1024 (1950); C. H. W. HIRS, S. MOORE & W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 200, 493 (1953); H. H. TALLAN & W. H. STEIN, *ibid.*, 200, 507 (1953); C. H. W. HIRS, *ibid.* 205, 93 (1953); H. H. TALLAN, Biochim. biophys. Acta 27, 407 (1958).

⁴⁾ A. TISELIUS, Arkiv Kemi 7, 443 (1954); A. TISELIUS, S. HJERTÉN & Ö. LEVIN, Arch. Biochemistry Biophysics 65, 132 (1956).

⁵⁾ a) H. G. BOMAN, Biochim. biophys. Acta 76, 245 (1955); b) *id.*, Nature, 173, 447 (1954); c) H. G. BOMAN & L. E. WESTLUND, Arch. Biochemistry Biophysics 64, 217 (1956); d) *id.*, *ibid.* 70, 572 (1957); e) H. G. BOMAN & U. KALETTA, Biochim. biophys. Acta 24, 619 (1957); f) H. G. BOMAN, in Symposium on Protein Structure (NEUBERGER, ed.), S. 100, Methuen & Co., London 1958.

⁶⁾ a) E. A. PETERSON & H. A. SOBER, J. Amer. chem. Soc. 78, 751 (1956); b) H. A. SOBER, F. J. GUTTER, M. M. WYCKOFF & E. A. PETERSON, *ibid.* 78, 756 (1956).

⁷⁾ J. PORATH, Arkiv Kemi 11, 97 (1957).

⁸⁾ a) S. MOORE & W. H. STEIN, Adv. Protein Chemistry 11, 191 (1956); b) H. A. SOBER & E. A. PETERSON, in Ion Exchangers in Organic and Biochemistry (C. CALMON & T. R. E. KRESS-MAN, ed.), S. 318, Interscience Publ. Inc., New York 1957; c) F. TURBA, Chromatographische Methoden in der Proteinchemie, Springer-Verlag, Berlin 1954; d) H. G. BOMAN, Ion Exchange Chromatography of Proteins and Some Applications to the Study of Different Phosphoesterases, Alqvist & Wiksell, Stockholm-Uppsala 1958; e) U. GMÜNDER-KALETTA, Enzymchromatographie an DEAE-Cellulose, Dissert. an der Universität Zürich, 1958; f) R. L. HILL, J. R. KIMMEL & E. L. SMITH, Ann. Rev. Biochemistry, 28, 97 (1959).

Obwohl es möglich ist, Proteine an den gebräuchlichen, synthetischen Austauscherharzen zu chromatographieren³⁾^{5b)}, sind die meist verwendeten Adsorptionsmittel das Calciumphosphat nach TISELIUS⁴⁾ und gewisse Cellulosederivate. Die Tatsache, dass von den zur Anwendung gelangten Ionenaustauschern die Cellulosederivate den gewöhnlichen Harzen vorgezogen werden, ist auf die höheren Ausbeuten und die grössere Kapazität für Polyelektrolyte zurückzuführen. Die hohe Ausbeute wird gewöhnlich dem stark hydrophilen Charakter der Cellulosederivate zugeschrieben. Die grosse Kapazität ist eine Folge der Tatsache, dass die aktiven Gruppen an den Faseroberflächen fixiert sind, weshalb die Ionendiffusion durch eine poröse Struktur keinen limitierenden Faktor darstellt, wie das bei den gewöhnlichen Harzen der Fall sein kann⁹⁾.

Die auf diesem Gebiet verwendeten Cellulosederivate – ausgenommen die Oxycellulose – sind entweder Ester oder Äther. Sie sind weniger stabil als die Harze. Trotzdem können vor allem die Äther auch nach der Behandlung mit den zur Proteinchromatographie gebrauchten Methoden leicht regeneriert werden, weshalb die Resultate innerhalb einer beträchtlichen Zeitspanne reproduzierbar sind.

Für die Chromatographie von Polyelektrolyten sind einige gute Kationenaustauscher aus Cellulose hergestellt worden, die sich hauptsächlich für die Trennung von basischen Peptiden und Proteinen gut bewährt haben: Oxycellulose, Carboxymethylcellulose, phosphorylierte Cellulose⁶⁾, Sulfomethyl- und Sulfoäthyl-Cellulose⁷⁾. Bis jetzt sind aber nur wenige Anionenaustauscher beschrieben worden: nämlich DEAE-Cellulose⁶⁾, TEAE-Cellulose⁷⁾ und ECTEOLA-Cellulose⁶⁾. Anscheinend gelangen nur die TEAE-Cellulose und die DEAE-Cellulose (die sich neuerdings auch für die Chromatographie von Polysacchariden bewährt hat¹⁰⁾) für die Proteinchromatographie zur Anwendung, während die ECTEOLA-Cellulose ausschliesslich für die Nucleinsäure-Chromatographie herangezogen wird¹¹⁾. Alle drei Cellulosederivate sind schwach basisch, da das pK' der kationischen Gruppen (in 0,5 N NaCl) zwischen 7,5 und 9,5 liegt.

Im Hinblick auf die Mannigfaltigkeit natürlich vorkommender Proteingemische, haben wir einige neue Cellulosederivate hergestellt, die weitere Möglichkeiten eröffnen könnten. Bis jetzt haben wir zwei davon auf ihre Eignung für die Proteinchromatographie geprüft und ihre Eigenschaften untersucht. Es handelt sich um das Aminoäthyl- und das Guanidinoäthyl-Derivat der Cellulose. Das erste wurde nach der Methode von GUTHRIE¹²⁾, die wir weitgehend modifizierten, hergestellt und scheint einige Vorteile gegenüber anderen schwachen Anionenaustauschern aufzuweisen. Das zweite Produkt ist, soweit wir wissen, der stärkste auf Cellulosebasis herstellte Anionenaustauscher. Vieles weist darauf hin, dass die neuen Austauscher mit Vorteil zur Chromatographie von Polyelektrolyten herangezogen werden können.

⁹⁾ Unterschiede in der Diffusionsgeschwindigkeit durch das Netzwerk von Harzen wurden verwendet, um Polymere von niedermolekularen Stoffen zu trennen. Siehe z. B. H. DEUEL, J. SOLMS, L. ANYAS-WEISZ & G. HUBER, Helv. 34, 1849 (1951).

¹⁰⁾ H. NEUKOM, H. DEUEL, W. J. HERI & W. KÜNDIG, Helv. 43, 64 (1959).

¹¹⁾ a) Desoxynucleinsäure auf ECTEOLA-Cellulose: A. BENDICH, J. R. FRESCO, H. S. ROSENKRANZ & S. M. BEISER, J. Amer. chem. Soc. 77, 3671 (1955); A. BENDICH, H. B. PAHL, G. C. KORNGOLD, H. S. ROSENKRANZ & J. R. FRESCO, *ibid.* 80, 3949 (1958); b) Ribonucleinsäure auf ECTEOLA-Cellulose: D. F. BRADLEY & A. RICH, *ibid.* 78, 5898 (1956).

¹²⁾ a) J. D. GUTHRIE, Textile Research J. 17, 625 (1947); W. A. REEVES & J. D. GUTHRIE, *ibid.* 23, 522 (1953); W. A. REEVES, O. J. McMILLAN & J. D. GUTHRIE, *ibid.* 23, 527 (1953).

Experimenteller Teil

A. Substanzen und Methoden. – In den meisten Versuchen wurde Holzcellulose wegen ihrer hohen Reaktionsfähigkeit¹³⁾ verwendet. Sie wurde von der Firma BROWN & Co., New York, bezogen (Solka-Floc SW-40-A).

2-Aminoäthylschwefelsäure (*pract.* FLUKA) wurde nach Behandlung der wässerigen Lösung mit Aktivkohle aus Äthylalkohol umkristallisiert¹⁴⁾.

Äthylbromid (*purissimum*) wurde von der Firma FLUKA bezogen. O-Methyl-isoharnstoffsulfat wurde nach BELLO¹⁴⁾ synthetisiert.

Analytische Methoden. Die Veraschung wurde nach SCHÖNIGER¹⁵⁾ durchgeführt und der Schwefel nach der Methode von WAGNER¹⁶⁾ bestimmt. Die SAKAGOUCHI-Reaktion wurde nach der Vorschrift von CERIOTTI¹⁷⁾ mit 8-Hydroxychinolin ausgeführt. Für die übrigen Bestimmungen wählten wir die klassischen Methoden.

Alle analytischen Angaben über die Cellulosederivate beziehen sich auf luftgetrocknete Proben.

Titrationskurven: Zu 0,4 g Cellulosederivat werden 30 ml einer 0,5 M NaCl-Lösung zugegeben und das pH wird mit wenigen Tropfen HCl auf ca. 2,5 gebracht. Nachdem die Suspension wenige Min. gekocht und wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt worden ist, wird mit 0,1 N NaOH am METROHM-pH-Meter (Präzisions-Potentiometer E 187, Elektrode U) titriert.

Bestimmung der Chlorionen-Kapazität. Eine Kolonne, die eine bekannte Menge Cellulosederivat enthält, wird in die Chloridform (siehe unten) übergeführt; nach Waschen der Kolonne mit Wasser werden die Chloride mit 1 M Na₂SO₄-Lösung eluiert und dann titriert. Die auf diese Weise ermittelten Kapazitäten entsprachen immer denjenigen Werten, die auf Grund der Titrationskurve oder des Stickstoffgehaltes berechnet worden waren.

Bestimmung der Kapazität für Proteine. Zu 50 mg Cellulosederivat in Sulfat- oder Chloridform werden 10 ml einer Ovalbuminlösung (MERCK; ca 3 mg/ml), welche gegen einen 0,02 M TRIS/HCl-Puffer pH 7,9 dialysiert worden ist, zugegeben. Nach zweistündigem Röhren bei Zimmertemperatur wird die Abnahme der optischen Dichte bei 280 m μ ¹⁸⁾ im Überstehenden bestimmt. Längeres Röhren bewirkte keine weitere signifikante Abnahme der optischen Dichte.

Säulenchromatographie. Die Kolonne wird nach bekanntem Verfahren hergestellt¹⁹⁾ und nachher in die für die Chromatographie gewünschte Form gebracht. Wird die Acetatform gebraucht, ist das Waschen mit 2 N Essigsäure oder mit Acetatpuffer pH 4,3 zweckdienlich. Ist

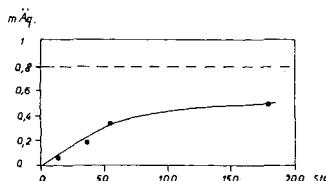


Fig. 1. Überführung der AE-Cellulose von der OH- in die Chloridform bei neutralem pH in Abhängigkeit der Zeit

Eine Kolonne von AE-Cellulose (0,44 mÄq/g; totale Kapazität der Kolonne: 0,8 mÄq) in der OH-Form wurde während unterschiedlich langer Zeit mit neutraler 25-proz. NaCl-Lösung bei Zimmertemperatur gewaschen. Nach einer weiteren Waschung mit Wasser wurde das fixierte Chlorid mit 1 M Na₂SO₄-Lösung eluiert. Dieselbe Prozedur wurde für jeden Punkt der Kurve wiederholt.

¹³⁾ C. S. MARVEL, C. F. BEILEY & M. S. SPARBERG, J. Amer. chem. Soc. 49, 1833 (1927).

¹⁴⁾ J. BELLO, Biochim. biophys. Acta 18, 448 (1955).

¹⁵⁾ W. SCHÖNIGER, Mikrochim. Acta 1956, 869.

¹⁶⁾ H. WAGNER, Mikrochim. Acta 1957, 19.

¹⁷⁾ G. CERIOTTI & L. SPANDRIO, Biochem. J. 66, 603 (1957).

¹⁸⁾ J. GRÓH & M. HANÁK, Z. physiol. Chem. 190, 169 (1930).

¹⁹⁾ J. PORATH, Biochim. biophys. Acta 22, 151 (1956); B. DRAKE, Analyt. chim. Acta 3, 452 (1949); siehe auch 7c).

der Austauscher in der Acetat- oder Sulfatform, eignet sich zur Rückführung in die Chloridform eine 25-proz. NaCl-Lösung.

Die Überführung der AE-Cellulose aus der freien Base (oder «OH-Form») in die Chloridform durch Waschen mit NaCl bei neutralem pH nimmt lange Zeit in Anspruch (Fig. 1). Dieser Nachteil kann durch Waschen mit 0,1N HCl, die 25% NaCl enthält, vermieden werden. Diese Methode ist harmlos, wenn man sie nicht unnötig in die Länge zieht oder zu oft wiederholt. Am besten eignet sich jedoch ein 0,1N Piperazin-HCl-Puffer pH 4,5 mit 25% NaCl²⁰). Das Waschen während der Dauer einer Nacht genügt meist. Die Überführung der OH- in die Chloridform ist an GE-Cellulose nicht untersucht worden, da das Derivat in Form der freien Base instabil ist.

Nachdem die Kolonne in die für die Chromatographic geplante Ionenform übergeführt worden ist, wird sie über Nacht mit dem Ausgangspuffer bei der entsprechenden Temperatur gewaschen. Am Schluss muss kontrolliert werden, ob das pH des Eluates mit dem des Ausgangspuffers übereinstimmt. Die zu chromatographierende Mischung wird gegen denselben Puffer und bei derselben Temperatur über Nacht dialysiert und anschliessend während ca. 20 Min. bei 22000 g zentrifugiert.

Bei Versuchen mit stufenweiser Elution entsprach die Menge der chromatographierten Proteine annähernd $1/_{10}-1/_{15}$ der Säulenkapazität für Proteine, d.h. ungefähr 20 mg Protein pro mÅq. der Säulenkapazität für Chlorionen²¹).

Der Proteingehalt der chromatographischen Fraktionen wurde anhand der optischen Dichte bei 280 mµ berechnet und, wenn nötig, durch Abzug des Nucleinsäuregehaltes korrigiert²²). Der Flavingeinhalt der Fraktionen wurde aus der Differenz von E_{455} (oder E_{465}) und E_{500} berechnet ($\Delta E \times 10^{-3} = 11,5$)²³.

B. Herstellung der Cellulosederivate. — 1. *Vernetzte Cellulose*. Eine Lösung von 20 g NaOH in 85 ml Wasser wird langsam und portionenweise zu 30 g Cellulosepulver gefügt. Es muss ständig gerührt werden, um eine gleichmässige Verteilung zu erzielen²⁴). Die bröcklige Masse wird im Eisbad 30 Min. stehengelassen, dann werden 50 ml frisch dest. Äthylenbromid unter starkem Rühren langsam zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 Std. auf 100° erhitzt, dann in 1 l 95-proz. Äthanol gegossen und mit Essigsäure neutralisiert. Nach Dekantieren wird die Cellulose mit Hilfe eines Mixers in 1 l Wasser suspendiert, auf einem BÜCHNER-Trichter mit grossen Mengen Wasser, Äthanol und Äther gewaschen und schliesslich luftgetrocknet. Der erreichte Vernetzungsgrad wurde qualitativ durch Vergleich der Löslichkeit im SCHWEIZER-Reagens ermittelt. Cellulose ist darin löslich, Äthylenbromid-Cellulose aber praktisch nicht.

2. *Aminooäthyl-Cellulose (AE-Cellulose)*. Eine Mischung von 18 g kristallisierter 2-Aminoäthylschwefelsäure und 30 g NaOH wird in 26,5 ml Wasser gelöst. Die frisch zubereitete, noch heisse Lösung wird portionenweise unter ständigem starkem Rühren²⁴) zu 10 g Cellulosepulver (oder vernetzter Cellulose) gegeben und unverzüglich in einen vorerhitzten Autoklaven gebracht, der dann 1 Std. auf 120° gehalten wird.

Nach Abkühlen wird die AE-Cellulose durch Dekantieren mit grossen Volumina von 20-proz. Essigsäure in Äthanol²⁵), 95-proz. Äthanol, 3 M NaCl und Wasser gewaschen (während des Waschens können die feinsten und die grössten Partikel verworfen werden). Die AE-Cellulose wird

²⁰) Wir werden bald über die Verwendung dieses Puffers in der Proteinchromatographie berichten.

²¹) Diese Zahl bezieht sich auf Chromatographien, die mit stufenweiser Elution und bei neutralen oder schwach alkalischen pH-Werten durchgeführt wurden, und ist nur ein Leitwert. Unter Bedingungen, bei denen nur die wenigsten der Proteine der Mischung adsorbiert werden, muss dieses Verhältnis für jeden Fall bestimmt werden (wie z. B. beim Versuch in Fig. 6 angegeben).

²²) O. WARBURG & W. CHRISTIAN, Biochem. Z. 310, 384 (1941).

²³) R. W. ESTABROOK, J. biol. Chemistry 227, 1093 (1957).

²⁴) Die Volumina der Reagentien wurden so klein wie möglich gehalten. Es wurde nicht speziell darauf geachtet, Oxydation der alkalischen Cellulose zu vermeiden. Wird ein von Carboxylgruppen freies Produkt gewünscht, müssen spezielle Vorsichtsmassnahmen getroffen werden.

²⁵) Wird die Reaktionsmischung in neutrales Äthanol gegossen, kann das bei der Einwirkung von Alkali auf Taurin gebildete Produkt ausfallen.

in eine Kolonne eingefüllt und mit 1-proz. NaOH, 0,1N HCl, Wasser, Äthanol und Aceton gewaschen und schliesslich luftgetrocknet.

3. *Guanidinoäthyl-Cellulose (GE-Cellulose)*. 3 g AE-Cellulose werden in minimalen Volumen eines 0,5 M Hydrogencarbonat/Carbonat-Puffers pH 10 (gewöhnlich 20–40 ml) suspendiert. Unter stetem Rühren werden ca. 0,5 g fester O-Methylisoharnstoff pro ml Puffer zugegeben, und das pH wird, wenn nötig, zu 10 korrigiert. Die Mischung wird 4 Tage im Kührraum bei +4° gerührt und nachher mit viel Wasser gewaschen. Die GE-Cellulose wird in die Kolonne eingefüllt, mit Wasser, Äthanol und Aceton gewaschen und schliesslich luftgetrocknet.

Das Produkt sollte Ninhydrin-negativ sein. Bei hoch substituierten AE-Cellulosen tritt dies manchmal jedoch erst nach einer zweiten Behandlung mit O-Methylisoharnstoff ein.

Ergebnisse und Diskussion

1. *Aminoäthyl-Cellulose*. Durch Behandlung von Tosylcellulose mit Ammoniak hat KARRER²⁶⁾ als erster primäre Aminogruppen an Cellulose fixiert. Diese Aminocellulose liess sich besser einfärben, wurde aber wegen zu niedriger Substitution nicht als Anionenaustauscher verwendet.

Baumwolle wurde mit Äthylenimindämpfen umgesetzt²⁷⁾; die Wirksamkeit dieser Methode ist jedoch vor nicht langer Zeit in Frage gestellt worden^{12b)}. Es erscheint als wahrscheinlich, dass der grösste Teil des «fixierten» Äthylenimins an oder in den Fasern polymerisiert war, so dass es weitgehend durch Kochen mit verdünnter Lauge oder Säure weggewaschen werden konnte. Neuerdings hat man durch Einwirkung von Äthylenimin auf Cellulose in Benzol bei einer Temperatur von 140–145° gute Substituierungsquoten erzielt²⁸⁾. Einige in der Patentliteratur beschriebene Methoden basieren auf der Umsetzung der Cellulose mit Monoaminoalkylhaliden²⁹⁾; sie liefern jedoch sehr heterogene Produkte, da auch in hohem Masse substituierte Amine auftreten.

GUTHRIE hat die Fixierung von Aminogruppen an Cellulose durch Reaktion von 2-Aminoäthylschwefelsäure mit alkalischer Cellulose in Gegenwart eines Netzmittels erreicht¹²⁾. Das Produkt ist, soweit wir wissen, nie als Anionenaustauscher für Säulen-chromatographie verwendet worden, obwohl es sich bei der Entsalzung von Proteinlösungen³⁰⁾ und bei der Papierchromatographie von Aminosäuren³¹⁾ bewährt hat.

Für die Herstellung unserer AE-Cellulose haben wir die Methode von GUTHRIE modifiziert. Die leicht eintretende Denaturierung der Proteine veranlasste uns, vom Gebrauch eines oberflächenaktiven Stoffes abzusehen. Ausserdem haben wir die Kondensationsbedingungen (Konzentration der Reagenzien, Reaktionszeit etc.) variiert, bis wir eine gute und konstante Substituierungsquote erreichten.

Ein wichtiger Vorteil unserer Methode besteht darin, dass sie eine reproduzierbare Substituierungsquote ermöglicht. Aus einer grossen Anzahl von Experimenten geht hervor, dass die Substituierung nach einer Behandlung der Cellulose mit alkalischer 2-Aminoäthylschwefelsäure ziemlich konstant 0,19–0,21 mÄq/g beträgt. Nach einer zweiten Behandlung unter denselben Bedingungen bestimmten wir Kapazitäten von 0,40–0,44 mÄq/g und nach einer dritten Behandlung 0,70–0,75 mÄq/g. Nach vier

²⁶⁾ P. KARRER & W. WEHRLI, Helv. 9, 591 (1926).

²⁷⁾ H. FINK, W. K. BITTERFELD & R. STAHL, U.S. Patent 2.097.120 (1937).

²⁸⁾ L. M. SOFFA & E. CARPENTER, Textile Research J. 24, 847 (1954).

²⁹⁾ Vgl. z. B. M. HARTMANN, U.S. Patent 1.777.970 (1930).

³⁰⁾ C. L. HOFFPAUIR & J. D. GUTHRIE, J. biol. Chemistry 178, 207 (1949).

³¹⁾ C. S. KNIGHT, Nature 183, 165 (1959).

Behandlungen erreicht man eine Kapazität von ca. 1,1 mÄq/g; dieses Produkt wird aber in Wasser gelartig und ist deshalb für die Chromatographie ungeeignet.

Niedrigere Substituierungsquoten fanden wir nach Umsetzung der Cellulose mit weniger konzentrierten oder einigen Stunden alten Lösungen von alkalischer Aminoäthylschwefelsäure.

Als Ausgangsmaterial eignet sich auch mercerisierte Cellulose, die nach einer Behandlung eine durchschnittliche Kapazität von 0,25 mÄq/g aufweist. Wenn vernetzte Cellulose mehreren Behandlungen unterworfen wird, erhält man erst bei einer Kapazität von 2 mÄq/g ein gelartiges Produkt.

Die Möglichkeit, den Substitutionsgrad kontrollieren zu können, bedeutet einen wichtigen Vorteil gegenüber anderen Substitutionsmethoden. Nicht nur hängt das physikalische Verhalten vom Substitutionsgrad ab, sondern man darf auch annehmen, dass der Misserfolg beim Reproduzieren von chromatographischen Resultaten mit verschiedenen Ansätzen von Ionenaustauschern deren unterschiedlichen Kapazitäten zugeschrieben werden muss³²⁾.

Eine Erklärung für die relativ niedrige, aber kontrollierbare Substituierungsquote liefert die Beobachtung, dass es sich bei der Bildung der AE-Cellulose um eine Nebenreaktion handelt: Wenn die alkalische Lösung von 2-Aminoäthylschwefelsäure eine Stunde auf 120° erhitzt oder mehrere Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen wird, verliert sie die Fähigkeit, die Cellulose signifikant umzusetzen. Es ist ein Produkt entstanden, das ninhydrinpositiv ist, elektrophoretisch gegen die Kathode bei pH 7,0 wandert und einen Rf-Wert von <0,05 in Phenol-Wasser hat (Rf von 2-Aminoäthylschwefelsäure: 0,39). Dieses Produkt ist nicht genauer untersucht worden. Seine Entstehung erklärt auch, warum eine verlängerte Reaktionszeit nur eine geringe Erhöhung der Substituierungsquote bewirkt, obwohl ein grosser Überschuss an 2-Aminoäthylschwefelsäure verwendet wird (siehe Fig. 2).

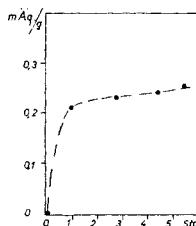


Fig. 2. Substituierungsquote der AE-Cellulose in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei 120° (siehe unter «Methoden»)

Die AE-Cellulosepräparate enthalten nur Spuren von Schwefel und sind ninhydrinpositiv (der Farbstoff wird an die Cellulose adsorbiert). Die Nitroprussid-Reaktion für primäre Amine³³⁾ ergibt positive Resultate. Nach Einwirkung von salpetriger Säure tritt Gasentwicklung auf. Auf Grund der Stickstoffwerte, wie auch aus der Änderung der Titrationskurve nach Behandlung mit salpetriger Säure, konnten wir schliessen, dass mindestens $\frac{3}{4}$ der kationischen Gruppen als primäre

³²⁾ Vgl. z. B. G. M. TENER, H. G. KHORANA, R. MARKHAM & E. H. POL, J. Amer. chem. Soc. 80, 6223 (1958).

³³⁾ F. FEIGL, Spot tests, Vol. II, 4th ed., Elsevier, Houston-New York 1954.

Amine vorliegen. Das gleiche Resultat ergab auch die Guanidierungsquote (siehe unten). Es möge hier darauf hingewiesen werden, dass die meisten gebräuchlichen Anionenaustauscherharze mehrere Typen funktioneller Gruppen enthalten.

Die Titrationskurve der AE-Cellulose in 0,5M NaCl (Fig. 3) zeigt ein pK' von 9,30³⁴⁾. Die Neigung der Kurve zeigt, dass alle kationischen Gruppen gleiche oder sehr ähnliche pK -Werte haben. Die Bestimmung der Chlorionen-Kapazität, des N-Gehalts und der Titrationskurve ergab immer übereinstimmende Resultate.

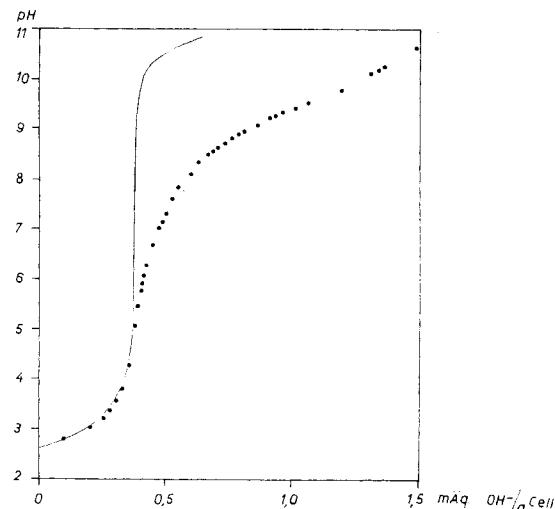


Fig. 3. Titrationskurven von AE-Cellulose (Kapazität 1,1 mÄq/g) (punktiert) und von einem «Leerwert» von Solka-Floc SW-40-A (ausgezogene Linie)

Wiederholtes Waschen mit neutralen, alkalischen oder verdünnten sauren Lösungen reduziert weder den Stickstoffgehalt noch die Kapazität, und es besteht eine Korrelation zwischen der Substituierungsquote und dem Zeitpunkt des Übergangs in den gelartigen Zustand des Cellulosederivates. Die Aminogruppen sind also an der Cellulose chemisch fixiert und nicht einfach mechanisch zurückgehalten.

Aus der Titrationskurve geht ausserdem hervor, dass während der Reaktion keine oder nur wenige Carboxylgruppen gebildet werden.

Alle zur Verfügung stehenden Daten stimmen also mit der Annahme überein, dass es sich bei der AE-Cellulose nicht um einen Ester handelt und dass deren kationische Gruppen hauptsächlich primäre Aminogruppen sind.

Stabilität. Wiederholtes Waschen oder langes Stehenlassen in 1N HCl müssen bei der AE-Cellulose vermieden werden (ebenso wie bei anderen Cellulosederivaten), da dadurch die Kapazität reduziert wird. Wiederholtes Waschen mit neutralen oder basischen Lösungen (1% NaOH) bei Zimmertemperatur oder in der Kälte bewirkte jedoch keine Veränderung der Kapazität. Ein Beispiel dazu gibt Fig. 4: eine Säule von AE-Cellulose wurde während drei Monaten bei Zimmertemperatur gehalten und für ca. 10 Chromatographien verwendet, wobei wir sie abwechselnd in der Chlorid-

³⁴⁾ Es darf hier in Erinnerung gerufen werden, dass das pK' der Ätanolamin-Aminogruppe 9,44 ist: N. F. HALL & M. R. SPRINKLE, J. Amer. chem. Soc. 54, 3469 (1932).

form (Piperazin/HCl-Puffer pH 4,5 + NaCl), in der OH-form (1% NaOH) und in der Acetatform (2N Essigsäure) benutzten. Es ist offensichtlich, dass sich das chromatographische Verhalten des Riboflavo-Proteins von Hühner-Eiweiss während dieser Zeit nicht verändert hat. Die Kapazität der Kolonne für Chlorid blieb ebenfalls konstant. Die Stabilität der AE-Cellulose steht also derjenigen anderer substituierten Cellulosen nicht nach.

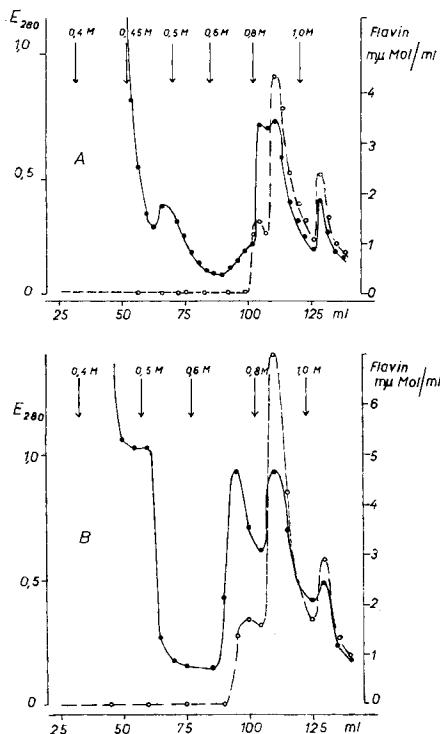


Fig. 4. *Chromatographie von Hühner-Eiweiss*

A: Gegen einen 0,02M Na-Acetat-Puffer pH 4,3 dialysiertes Hühner-Eiweiss (15 ml) wurde an eine Kolonne (1×8 cm) von AE-Cellulose (Kap.: 0,44 mÄq/g) in der Acetatform adsorbiert. Die Elution wurde mit gleichen Puffern steigender Konzentration durchgeführt. Molarität der Puffer und Zeitpunkt der Zugabe sind durch die Zahlen und Pfeile am oberen Rand der Figur angegeben. Die optische Dichte bei 280 μm (ausgezogene Linie) und der Flavingehalt (unterbrochene Linie) sind aufgezeichnet. B: Dasselbe Experiment, nach drei Monaten wiederholt. Die Reproduzierbarkeit der chromatographischen Resultate von Flavinprotein ist daraus klar ersichtlich (siehe unter «Stabilität»).

Chromatographische Eigenschaften. Die Kapazitäten einiger AE-Cellulosen für Ovalbumin sind in Tab. 1 dargestellt. Sie können nicht direkt mit den für DEAE-Cellulose angegebenen Kapazitäten für Serumalbumin^{6a)} verglichen werden, da die verwendeten Bestimmungsmethoden nicht übereinstimmen. Aber man kann feststellen, dass bei einer gegebenen Substituierungsquote nur geringe Unterschiede bestehen. Im untersuchten Bereich wurde eine gute Proportionalität zwischen der Substituierungsquote und der Kapazität für Ovalbumin festgestellt.

In der einschlägigen Literatur ist oft betont worden^{7d)}, dass bei chromatographischen Experimenten bessere Trenneffekte erzielt werden, wenn die Kolonne vorher in vollständiges Gleichgewicht gebracht wird. Es ist also sehr wichtig, dass die ganze Kolonne zuerst in diejenige Form versetzt wird, in der die Chromatographie stattfinden soll. Da die meisten Proteinchromatographien mit Anionenaustauschern in der Chloridform (TRIS/HCl^{5c)} oder Piperazin/HCl-Puffer²⁰) durchgeführt und die Cellulosederivate anschliessend gewöhnlich mit NaOH gewaschen werden, muss die Überführung aus der Hydroxyl- in die Chloridform sehr oft vorgenommen werden. Aus Fig. 1 lässt sich entnehmen, dass die Überführung bei der AE-Cellulose von der

Tabelle 1. Kapazitäten einiger AE- und GE-Cellulosen für Ovalbumin
Die Werte sind als mg fixiertes Ovalbumin pro g Austauscher ausgedrückt.

AE-Cellulose	Substituierungsquote mÄq/g . .	0,11	0,20	0,25	0,36	0,40	0,44	0,52	0,73
	Kapazität für Ovalbum. mg/g	18	27	45,5	76,5	81	96	113	178
GE-Cellulose	Substituierungsquote mÄq/g . .	0,38	0,44	0,73					
	Kapazität für Ovalbum. mg/g	71	97	136					

«OH-Form» (oder besser, von der NH₂-Form) in die Chloridform bei neutralem pH lange Zeit in Anspruch nimmt. Der Übergang bei saurem pH wird erwartungsgemäss viel rascher erreicht. Um das Waschen mit HCl (siehe oben) zu vermeiden, wurde ein Piperazin/HCl-Puffer verwendet (siehe «Methoden»). Das Waschen während der Dauer einer Nacht erwies sich meist als genügend. Es ist jedoch ratsam, die Regenerationszeit für jede Kolonne speziell zu bestimmen.

Auch das in Fig. 5 wiedergegebene Experiment weist daraufhin, dass die Überführung in die Cl⁻-Form mit der angegebenen Cellulose vollständig oder fast vollständig gewesen ist. Es ist nämlich bekannt, dass bei DEAE-Cellulose-Säulen, die ohne Waschen mit Säure regeneriert wurden, eine einzige Änderung der Cl⁻-Ionen-Konzentration des eluierenden Puffers zu zwei Stufen in der Cl⁻-Konzentration des Eluats führt, wobei in der Übergangszone das pH vorübergehend alkalischer wird^{7d)}. Dies muss der Bildung einer Hydrogencarbonatzone zugeschrieben werden, wobei das Carbonat bei der alkalischen Waschung aufgenommen wurde³⁵). Es findet aber auch sehr wahrscheinlich die Bildung einer OH⁻-Zone statt, da die Umwandlung in die Cl⁻-Form von der OH⁻-Form bei neutralem pH unvollständig war (siehe Fig. 1) und deshalb eine erhöhte Cl⁻-Konzentration des eluierenden Puffers zusätzliche OH-Ionen von der Säule verdrängen konnte. Auf jeden Fall führte, bei AE-Cellulose-Säulen, die nach der alkalischen Behandlung mit Piperazin/HCl + NaCl gewaschen wurden, eine Änderung der Chloridionen-Konzentration des eluierenden Puffers nur zu einem einzigen Anstieg der Cl⁻-Konzentration im Eluat, und die pH-Verschiebung ins Alkalische war schwach und nur schnell vorübergehend (Fig. 5). Diese Regenerierung von Anionenaustauschern führt also nicht zu Artefakten wie etwa der Aufsplitterung einer einheitlichen Komponente durch diesen Mechanismus^{7d)}.

³⁵⁾ W. BJÖRK & H. G. BOMAN, Biochim. biophys. Acta 34, 503 (1959); W. BJÖRK, J. Chromatography 2, 536 (1959).

Da dieser langsame Übergang von der OH⁻ in die Chlorid-Form bei neutralem pH auch eine Eigenschaft der DEAE-Cellulose zu sein scheint, könnte dies möglicherweise die Erklärung der in der Literatur hin und wieder erwähnten Tatsache liefern, dass die chromatographischen Resultate erst beim zweiten Experiment reproduzier-

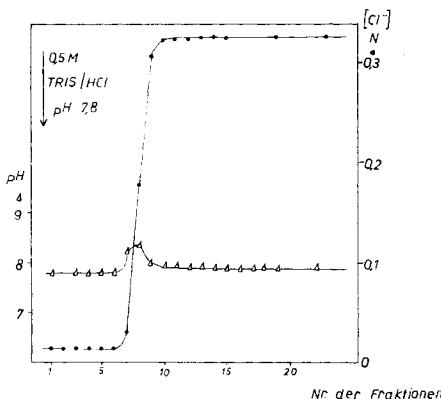


Fig. 5. Veränderung der Chloridkonzentration und des pH des Eluates von einer AE-Cellulose-Kolonne (Kap.: 0,52 mÄq/g) ohne Zugabe irgendeiner Substanz

Die Kolonne ($0,83 \times 18$ cm) wurde mit Piperazin/HCl + NaCl, pH 4,5, von der OH⁻-Form in die Cl⁻-Form überführt und dann mit einem 0,02 M TRIS/HCl-Puffer 7,8 ins Gleichgewicht gebracht und mit einem 0,5 M TRIS-HCl-Puffer pH 7,8 gewaschen. Volumen der Fraktionen: ca. 1,4 ml

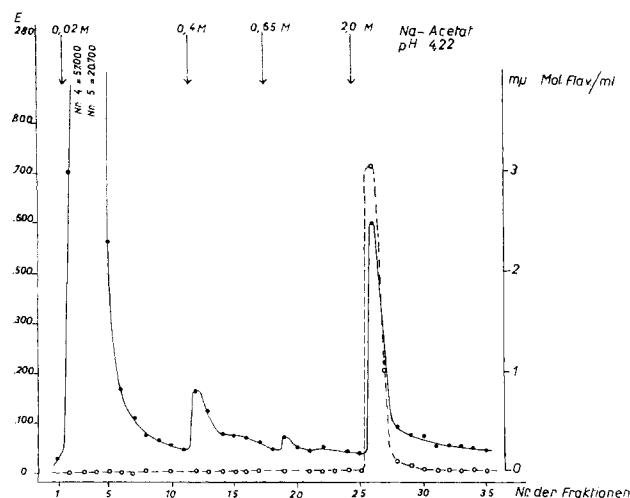


Fig. 6. Chromatographie von Hühner-Eiweiß auf AE-Cellulose

5 ml wurden auf einer Säule ($0,95 \times 1,6$ cm) von AE-Cellulose (Kap.: 0,52 mÄq/g) aufgetragen. Andere Bedingungen, wie unter Fig. 4 angegeben. Das auf diese Weise erhaltenen Riboflavinprotein (Fr. 26 und 27) erwies sich in der Ultrazentrifuge als einheitlich.

bar sind. (Beim ersten Experiment wird die DEAE-Cellulose mit HCl gewaschen und befindet sich also vollständig in der Chloridform, während bei späteren Experimenten die Cellulose nur noch unvollständig, wenn auch reproduzierbar gleich stark, regeneriert wird.)

Natürlich sind bis jetzt, im Vergleich zu anderen Cellulosederivaten, an AE-Cellulose erst relativ wenig Eiweisskörper gereinigt worden. Sie hat aber in Bezug auf alle untersuchten Systeme ein bemerkenswertes Trennvermögen gezeigt; wir hoffen, dass wir auf einige Beispiele, die in Tab. 2 zusammengestellt sind, in einer späteren Veröffentlichung näher eingehen können.

Tabelle 2. Reinigung einiger Proteine auf AE-Cellulose und auf GE-Cellulose

Protein	Austauscher	Puffer-system	Elutions-typ	Unge-fähr Reini-gung x	Aus-beute	Noch nicht veröf-fent-lichte Ver-suche von
Flavoprotein (Hühnereiweiss)	AE-Cellulose (0,44 mÄq/g) (0,52 mÄq/g)	Na-Acetat pH 4,3	stufenweise	40–50		G. SEMENZA (Fig. 4) (Fig. 6)
Amino-oxydase (Ochsenserum)	AE-Cellulose (0,44 mÄq/g)	TRIS/HCl pH 7,5	stufenweise	4,4	70%	G. SEMENZA
Biotin-fixierende Eiweissfraktion aus Hühnerleber	AE-Cellulose (0,52 mÄq/g)	TRIS/HCl pH 7,5	stufenweise	6		F. LEUT-HARDT & A. GILGEN
Transamidinase (Schweinsniere)	AE-Cellulose (0,52 mÄq/g)	TRIS/HCl pH 7,74	«One step» ⁵⁾	3,7	95%	G. SEMENZA <i>et al.</i>
<i>id.</i>	GE-Cellulose (0,38 mÄq/g)	TRIS/HCl pH 7,5	«One step» ⁵⁾	2,7	60%	G. SEMENZA <i>et al.</i>
<i>id.</i>	GE-Cellulose (0,39 mÄq/g)	TRIS/HCl pH 7,5	stufenweise	5	80%	G. SEMENZA <i>et al.</i>

2. *Guanidinoäthyl-Cellulose*. Soweit wir wissen, ist bis jetzt noch kein starker Anionenaustauscher auf Cellulosegrundlage hergestellt worden.

Für die Guanidierung der AE-Cellulose zu GE-Cellulose haben wir eine bekannte Reaktion gewählt, die von anderen Autoren für die Guanidierung von zahlreichen Verbindungen verwendet worden ist. Die Guanidierung der primären Aminogruppen des Cellulosederivats scheint vollständig zu sein. Das Produkt ist Ninhydrin-negativ, nach Einwirkung von salpetriger Säure tritt keine Gasentwicklung auf, und die SAKAGOUCHI-Reaktion ist positiv. Die Kapazität in Bezug auf Chlorid stimmt mit derjenigen der entsprechenden AE-Cellulose überein, während der Stickstoffgehalt etwa dreimal höher ist. Natürlich werden die wenigen nicht-primären Aminogruppen, die in der ursprünglichen AE-Cellulose vorkommen, nicht guanidiert und können in der GE-Cellulose zwischen pH ca. 8,5 und 10 titriert werden.

Die Kapazität einiger GE-Cellulosepräparate für Ovalbumin ist aus Tab. 1 ersichtlich; sie ist derjenigen von AE-Cellulose bei vergleichbarer Substituierungsquote ähnlich.

Abgesehen von Verschiedenheiten der chromatographischen Eigenschaften, die starke Austauscher gegenüber schwachen aufweisen, erweitert die GE-Cellulose die bisherige pH-Grenze in der Proteinchromatographie um mindestens 1,5 pH-Einheiten gegen den alkalischen Bereich. Versuchsweise wurde Cytochrom C an diesem Anionenaustauscher bei pH 10 chromatographiert. Beispiele bei anderen pH-Werten sind in Tab. II dargestellt. Das Trennvermögen der GE-Cellulose ist gut.

Der hauptsächlichste Nachteil der GE-Cellulose besteht in ihrer geringen Stabilität, was bei der Regenerierung berücksichtigt werden muss. Zur Instabilität gegen Säuren, die auch anderen Cellulosederivaten eigen ist, kommt hier diejenige der Guanidinogruppen gegen Basen hinzu. Auch das Stehen während einiger Monate bei Zimmertemperatur in neutraler Lösung verursacht starke Veränderungen. Die Kolonne kann jedoch für eine begrenzte Anzahl von Versuchen durch Behandlung mit konzentrierten NaCl-Lösungen so regeneriert werden, dass eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der chromatographischen Resultate erreicht wird. Diese «regenerierte» GE-Cellulose sollte jedoch mit Vorsicht verwendet werden, und bei einer Wiederholung der Chromatographie dürfte der Gebrauch frischer GE-Cellulose derselben Präparation grössere Sicherheit bieten.

Herrn Prof. F. LEUTHARDT möchte ich für sein ständiges Interesse an dieser Arbeit und für viele wertvolle Diskussionen danken, ebenso den Herren Prof. A. TISELIUS, Dozent H. G. BOMAN und Dozent J. PORATH für die kritische Durchsicht des Manuskriptes und nützliche Ratschläge. Frau D. MÉNARD und Herr Dr. E. JENNY waren bei einem Teil der Arbeit behilflich, wofür ihnen hier gedankt sei.

SUMMARY

Two new anion-exchangers for protein chromatography have been prepared from cellulose: an aminoethyl- and a guanidoethyl-cellulose. Their preparation, properties, and some examples of their application are reported. A cross-linked cellulose has also been obtained.

Biochemisches Institut der Universität Zürich

135. Methode zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in hochmolekularen, membranbildenden Diffusionsmedien II

von B. MARZETTA und F. GRÜN

(20. IV. 60)

1. Fragestellung. – Bei der im ersten Teil¹⁾ dieser Arbeit ausführlich beschriebenen Methode zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten wird das Diffundieren der radioaktiv markierten Substanz mit Hilfe eines Zählrohrs verfolgt. Die Anzahl $N(t)$ der dabei registrierten Impulse ist asymptotisch eine lineare Funktion der Zeit t [I, Fig. 2]. Der Zeitachsenabschnitt L der Asymptoten, die *Induktionszeit*, wird experimentell bestimmt und der gesuchte Diffusionskoeffizient D daraus nach einer Formel von der Art

$$D = g/L \quad (1)$$

berechnet [(15)–(16) in I, sowie (29) im vorliegenden zweiten Teil]. Die Güte dieser in I verwendeten Beziehung zu diskutieren, ist das Ziel dieses zweiten Teils.

Zu diesem Zweck leiten wir erneut den Zusammenhang zwischen L und D her, diesmal unter weniger idealisierenden Voraussetzungen als in I. Wir beschrei-

¹⁾ P. HAEFELINGER & F. GRÜN, Helv. 43, 529 (1960). Im folgenden I genannt.