Ein makroporöses Polyacrylamid für immunologische Diffusionstechniken

Macroporous Polyacrylamide, its Use for Immunological Diffusion Techniques

HELMUT DETERMANN und AXEL WALCH *

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt (M)

(Z. Naturforsch. 27 b, 683—688 [1972]; eingegangen am 17. Januar 1972, revidiert am 13. März 1972)

Immundiffusion, Polyacrylamid-Gel, Elektrophorese

Gel layers of crosslinked polyacrylamide with different porosities were synthesized and their properties compared. At high concentrations of bifunctional monomers macroporous gels were formed, one of which (total monomer concentration 14%, methylene-bis-acrylamide 40%) permitted even high molecular weight proteins (e.g. γ -globulins) to diffuse more readily than in 2 per cent agar or agarose gels. Different immunological techniques were modified for application with this polymer. It offers advantages especially with respect to porosity, storability and sample application for quantitative diffusion techniques.

Bei den heute für Immuntechniken eingesetzten Gelschichten bestehen vor allem im anwendungstechnischen Bereich noch zahlreiche ungelöste Probleme. Die Mehrzahl der Geldiffusionstechniken wird in großporigem Agar- bzw. Agarosegel ausgeführt¹. Die Polysaccharidketten sind im wäßrigen Medium nur über schwache Wasserstoffbrücken miteinander vernetzt, so daß insbesondere die ladungsfreie Agarose kaum Wechselwirkung mit Proteinen zeigt. Dies bedingt aber zugleich eine unzulängliche chemische und thermische Stabilität der Trägerschichten. Zudem müssen die Gele sorgfältig vor irreversibler Austrocknung und mikrobiellem Befall geschützt sein, weshalb die ständig frische Präparation bevorzugt wird. Dem Einsatz von Celluloseacetatfolien² für Immuntechniken sind enge Grenzen gesetzt, da sie sehr rasch austrocknen und Schwierigkeiten bei der Probenapplikation bereiten. Geringer poröse Gele aus teilhydrolysierter Stärke³ lassen sich hingegen bestenfalls für elektrophoretische Teilschritte anwenden.

Kovalent vernetztes Polyacrylamid ist thermisch und chemisch wesentlich stabiler, läßt sich als synthetisches Polymeres besser in gewünschten Porengrößen reproduzieren und zeigt keine elektroosmotischen Erscheinungen⁴. Seine bisherige Anwendung für Immunelektrophoresen⁵ erlaubt bei kurzer Elektrophoresedauer gute Auftrennungen, jedoch ist für den abschließenden Diffusionsschritt ein etwa dreifach höherer Zeitaufwand erforderlich. Außer-

dem lassen sich in diesem sehr elastischen Polyacrylamid Probenreservoir nur durch vorherige Einpolymerisation, nicht aber nachträglich durch Einstanzen einbringen. Dies beschränkt die Variationsmöglichkeiten in der Arbeitstechnik.

Säulenchromatographische Experimente mit makroporösen Gelperlen aus Cellulose⁶, Polyacrylamid⁷ und Polystyrol⁸ gaben den Anstoß zu dem Versuch, Gelschichten aus makroporösem Polyacrylamid für Methoden der Immundiffusion zu entwickeln. Die Matrix des makro- oder heteroporösen Geltyps ist starrer⁹ als die homogener Gele und zeigt außer einer Quellungsporosität auch permanente Poren, die selbst nach Entzug des Dispersionsmittels bestehen bleiben. Durch Polymerisation unter starker Verdünnung, insbesondere unter Zusatz von Fällungsmitteln sowie durch starke Vernetzung bilden sich weniger intermolekular als vorwiegend intramolekular vernetzte Polymerketten. Erst mit fortschreitendem Umsatz verknüpfen sich die dichten Zentren auch untereinander¹⁰. Hierdurch entsteht eine heterogene Struktur starrer Polymerzentren mit großen permanenten Zwischenräumen, in denen eine unbehinderte Diffusion auch voluminöser Antigen- bzw. Antikörpermoleküle möglich sein sollte.

Material und Methoden

Polymerisationsbedingungen. — Acrylamid (Serva, Heidelberg) und *N,N'*-Methylen-bis-acrylamid (Ega,

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. DETERMANN, c/o Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica-Werk, D-8132 Tutzing (Obb.), Postfach 120.

* Aus der Dissertation von A. WALCH, Frankfurt (M) 1970, D-30.

Steinheim) wurden in Veronalpuffer pH 8,2 bzw. 8,6 zu vernetztem Polyacrylamid umgesetzt. Die Nomenklatur der Polymere entspricht folgender Übereinkunft: Bei einer Totalkonzentration von beispielsweise 14 Gew.-% und einem Vernetzeranteil von 40 Gew.-% lautet die Bezeichnung des Gels: (14–40)-Gel. Die Polymerisationen wurden in einer Kammer durchgeführt, die aus zwei Aluminiumplatten (150 × 150 × 15 mm) bestand, zwischen die ein Glaträger (120 × 120 × 3 mm) und eine Plexiglasdeckplatte mit Hilfe von Schrauben so eingespannt war, daß über dem Glas ein Hohlraum (100 × 110 × 1 mm) verblieb, der in die Deckplatte eingefräst war. Um eine ausreichende Gelhaftung zu erzielen, mußte die Glasplatte an der Oberseite rauh mattiert sein.

Zur Herstellung eines (14–40)-Gels wurden 1,68 g Acrylamid und 1,12 g Vernetzer bei 50–60 °C in 17,2 g Veronalpuffer gelöst und auf Zimmertemperatur abgekühlt. Nach Auflösung von 0,02 g Ammoniumperoxodisulfat und Zugabe von 0,1 ml 3-Dimethylaminopropionitril wurde die Monomerenlösung rasch in den Hohlraum zwischen Glas und Plexiglas der vertikal stehenden Kammer eingegossen. Die Polymerisation des Gels erfolgte innerhalb 10 Min. Nach weiteren 10 Min. konnte die Kammer geöffnet und die 1 mm stark beschichtete Glasplatte für wenigstens 2 Stdn. in Puffer eluiert werden.

Austesten der Gele. — Der Einfluß des Vernetzers (Anteil von 0,5 bis 75%) auf Porosität und Quellverhalten der Gele ließ sich durch Messung der Elektrophoresegeschwindigkeit eines Standardproteins (Humanalbumin) sowie aus dem Ausmaß der Schrumpfung bei der Trocknung standardisierter Gelvolumina ermitteln. Ergänzende Aussagen über die Polymeren lieferten der Grad ihrer Transparenz im gequollenen und getrockneten Zustand sowie die Flexibilität bzw. Sprödhheit gequollener Proben. Zusätzlich konnte die Porosität der Gele untereinander durch Messung der radialen Diffusionswege von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht (u. a. Cytochrom C, Hämoglobin, Katalase) verglichen werden.

Einfache radiale Immundiffusion (Mancini-Technik^{11,12}). — Zur Durchführung der Geldiffusionstechniken wurden gebräuchliche Vorschriften für Agar- und Agarosegele entsprechend modifiziert. Um Gele mit definierten Antiserumkonzentrationen zu erhalten, wurde jeweils ein geeignetes Gelvolumen auf dem Glaträger isoliert und in die feuchte Schicht mit einem Lochmesser (Durchmesser 3 mm) die gewünschte Lochanordnung ausgestanzt, wobei die Gelpfropfen zunächst noch in der Schicht verblieben. In einer waagerechten feuchten Kammer wurde die Geloberfläche mit Filterpapier angetrocknet und mit Antiserum überschichtet. Für hohe Antiserumkonzentrationen (40%) war es notwendig, zunächst Teilchargen in das Gel einziehen zu lassen und das Polymere mehrmals zu beschichten. Nach 20 Stdn. konnten die Gelpfropfen aus den vorgestanzten Löchern entfernt, die Geloberfläche mit pufferfeuchtem Filterpapier nachgefeuchtet und jeweils 5 µl Antigenlösung appliziert werden.

Nach 40–60-stdg. Diffusion wurde das Gel in physiologischer Natriumchloridlösung eluiert (40 Stdn.) und präzipitiertes Protein in 20-proz. Trichloressigsäure 10 Min. fixiert. Die Färbung (5 Min.) erfolgte in wäßriger Lösung von 0,1-proz. Coomassie-Blau (Serva, Heidelberg) und 20-proz. Trichloressigsäure¹³. Die Dauer des abschließenden Entfärbeschrittes in 10-proz. Trichloressigsäure wurde von der Antiserumkonzentration bestimmt und betrug für ein 5-proz. Antiserumgel 1–2 Stdn.

Eindimensionale Elektroimmundiffusion (eindimensionale Laurell-Technik^{14,15}). — Die Herstellung antiserumhaltiger Gelschichten sowie Probenapplikation und Färbung der Präzipitate verlief wie für die Mancini-Technik beschrieben. Jedoch wurden die Antigentröge nur an der Kathodenseite des Gels angebracht, um den Diffusionsschritt durch Elektrophorese (Dünnschicht-Elektrophorese, Camag, Muttenz/Schweiz) etwa 10-fach zu beschleunigen (Versuchsbedingungen Abb. 5). Die Stromstärke (10–20 mA) ließ sich mit der Dicke der Pufferstreifen regulieren, jedoch mußte für ausreichende Wasserkühlung und Abdeckung der Gelschichten gesorgt sein.

Zweidimensionale Elektroimmundiffusion (zweidimensionale Laurell-Technik^{16–18}). — Die erste elektrophoretische Trennung des Antigengemisches erfolgte in Gelstreifen, die auf Glaträgern (120 × 25 × 3 mm) in der beschriebenen Polymerisationskammer hergestellt waren.

Ein Antigentrog (Durchmesser 3 mm) wurde für die Elektrophorese (Versuchsbedingungen Abb. 6) am Kathodenende ausgestanzt und 5 µl Antigengemisch appliziert. Für den zweiten Trennschritt dienten Polyacrylamidschichten auf großen Glaträgern (120 × 120 × 3 mm), von deren Rand ein schmaler Gelstreifen für die spätere Aufnahme des antigenhaltigen Gels abgetrennt war. Der verbleibende Teil wurde mit Antiserum, wie beschrieben, überschichtet. Der schmale Glaträger mit dem vorgetrennten Antigengemisch mußte mit der Gelschicht nach unten dicht an das Antiserumgel gepreßt und die Längsseite des Antigengels an die Kathode der Elektrophoresekammer angeschlossen werden. Nach beendeter Elektrophorese senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung wurde mit Coomassie-Blau angefärbt. Jedoch mußte die Elution in physiologischer Natriumchloridlösung und die Entfärbung in 10-proz. Trichloressigsäure auf 60 bzw. 6 Stdn. ausgedehnt werden. Ein verbleibender Blauton auf der Geloberfläche ließ sich leicht mit feuchtem Filterpapier entfernen.

Ergebnisse und Diskussion

Ermittlung einer geeigneten makroporösen Gelmatrix. — Die relative Änderung der Porengröße sowie die Volumenabnahme bei der Trocknung (Abb. 1) zeigen, daß ein (20–0,5)-Gel, bedingt durch den lockeren Zusammenhalt seiner Polymer-

Abb. 1. (○—○) Wanderungsgeschwindigkeit v (10^{-4} cm·sec $^{-1}$) von Humanalbumin in der Elektrophorese (Gelformat $70 \times 15 \times 2$ mm, 200 Volt, 4,2 mA, Veronalpuffer pH 8,2) und (x—x) Volumenabnahme ΔV (%) bei 48-stdg. Lufttrocknung der Polymerplatten in Abhängigkeit vom Vernetzergehalt Bis(%) eines 20-proz. Polyacrylamid-Gels.

ketten große Poren und starke Quellungsporosität besitzt. Steigender Vernetzerteil im Bereich der (20–1)- bis (20–10)-Gele verursacht abnehmende Quellungsporosität, ohne bereits eine heteroporöse Struktur zu erzeugen. Diese tritt erst bei über 10-proz. Vernetzung in Erscheinung. Durch bevorzugte intramolekulare Vernetzung erreicht die Porengröße bald ein Maximum, und die Transparenz gequollener Gele schwindet. Bedingt durch zusätzliche Quellungsporosität ist die Gelmatrix jedoch noch nicht sehr stabil, so daß die Polymerzentren bei rascher Trocknung adsorptiv zusammenlagern (Volumenabnahme $\sim 80\%$). Nur eine verbleibende Trübung trockener Gele zeigt an, daß restliche heteroporöse Bereiche vorhanden sind. Erst mit Erreichen eines 50-proz. Vernetzerteils steigt die Zahl permanenter Poren deutlich an. Die Polymeren trocknen bei geringerer Volumenabnahme rascher aus und bleiben weiß. Bei extrem hohem Vernetzungsanteil nimmt die Dichte der Gelmatrix wieder zu. Bereits bestehende Polymerzentren scheinen sich stärker zu vernetzen, und es bilden sich Bereiche aus dichtem Vernetzerpolymerem.

Erfolgt die Polymersynthese unter Zusatz eines Verdünnungsmittels wie Methanol anstelle rein wäßriger Pufferlösungen, so wird die hydrophile Polymerphase durch das mehr hydrophobe Verdünnungsmittel nur schlecht solvatisiert, und bereits bei geringerer Vernetzung kann eine Phasentrennung, die zur Ausbildung der makroporösen Matrix führt, auftreten (Abb. 2). Das Porenmaximum erscheint nun schon unterhalb einer 30-proz. Ver-

Abb. 2. Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeit v (10^{-4} cm·sec $^{-1}$) von Humanalbumin in 20-proz. Polyacrylamid-Gele ohne Methanolzusatz (○—○) und mit 40% Methanol (x—x) bei steigendem Vernetzerteil Bis(%). Versuchsbedingungen siehe Abb. 1.

netzung. Im Gegensatz zur Polymerisation mit wäßrigem Verdünnungsmittel ist die abnehmende Porengröße jenseits des Maximums nicht allein auf dichtere Vernetzung, sondern auf eine weniger heteroporöse Struktur zurückzuführen, da die Gele wieder zunehmend transparent und kleinporiger werden. Methanol kann N,N' -Methylenbisacrylamid besser solvatisieren als Acrylamid, so daß eine Verdünnung mit Wasser eher zur Phasentrennung führt als mit Methanol.

Eine Variation der Gesamtkonzentration der Polymeren im Verdünnungsmittel übt hingegen schwächeren Einfluß auf die Gelstruktur aus (Abb. 3). Lediglich in Konzentrationsbereichen

Abb. 3. (○—○) Wanderungsgeschwindigkeit v (10^{-4} cm·sec $^{-1}$) von Humanalbumin in der Elektrophorese (Gelformat $82,9 \times 19 \times 2$ mm, 190 Volt, 3 mA, Veronalpuffer pH 8,2) und (x—x) Volumenabnahme ΔV (%) bei 48-stdg. Lufttrocknung in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration G (Gew.%) von Polyacrylamid-Gele mit 33,3% Vernetzergehalt.

unterhalb 10% sowie oberhalb von 20% verschlechtern sich insbesondere die mechanischen Eigenschaften der Gele. Für eine Synthese aus wäßriger Lösung liegt der geeignete Kompromiß zwischen Stabilität und ausreichender Porengröße bei einer Gelkonzentration von 14%.

Der für ausreichende Makroporosität notwendige Vernetzeranteil liegt hingegen bei 40%. Verstärkt sich der makroporöse Charakter durch höheren Vernetzergehalt, werden die Gele spröde, trocknen rascher aus, zeigen erschwerte Probenapplikation und sind nach Anfärbung aufgrund zunehmend hydrophober Eigenschaften schlechter zu eluieren.

Für die Immundiffusionstechniken nach MANCINI, LAURELL, OUCHTERLONY¹⁹ sowie für Immunelektrophoresen²⁰ zeigte daher ein (14–40)-Gel die besten Ergebnisse. Durch Vergleich mit Angaben von FAWCETT und MORRIS⁷ für geringer vernetztes Polyacrylamid läßt sich aus der Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit von Serumalbumin (Abb. 1 u. 3) mit zunehmendem Vernetzeranteil und steigender Gesamtkonzentration ein mittlerer Porendurchmesser von 200 Å abschätzen. Demnach wird ein (14–40)-Gel beispielsweise die Diffusion von γ -Globulinen (Längsdurchmesser 235 Å, Querdurchmesser 44 Å²¹) weniger behindern als ein 2-proz. Agargel, dessen Porendurchmesser mit ca. 90 Å¹ angegeben wird.

Bei schonender Trocknung gequollener, trägerfreier Gelschichten zunächst in Methanol, dann in Äther und an der Luft verringerte sich das Gelvolumen nur auf die Hälfte und ließ sich innerhalb weniger Stunden wieder vollständig rückquellen. Auch in rückgequollenen Gelen waren die aufgeführten Immuntechniken in gleicher Qualität durchführbar. Dies gewährleistete die praktisch unbegrenzte Lagerung trägerfreier Gelplatten bis zu ihrer Wiederverwendung. Makroporöses, gequollenes Polyacrylamid auf Trägern konnte aber ebenfalls über Monate feucht gelagert werden, so daß in keinem Falle eine frische Präparation vor der Anwendung notwendig war.

Quantitative Immundiffusion

Die Ausführung der Immuntechniken in (14–40)-Polyacrylamidgel unterschied sich charakteristisch von entsprechenden Arbeitstechniken in Agar- bzw. Agarosegel. Aufgrund der makroporösen Struktur trocknete das Polyacrylamidgel zwar etwas

schneller aus, konnte dadurch aber für quantitative Versuche sehr gut mit großen Mengen (bis 40%) Antiserum überschichtet werden; ein Vorgang der weitaus schonender verläuft als die Einpolymerisation in heiße Agar- oder Agaroselösungen. Die weißen Polymerschichten erlaubten zwar keine kontinuierliche Beobachtung der Präzipitatbildung, dafür konnte die Anfärbung aber direkt nach dem Experiment ohne vorherige Trocknung erfolgen. Bedingt durch die geringere Zahl sichtbarer Präzipitate scheint sich das Gel weniger für die qualitative Ouchterlony-Technik oder Immunelektrophoresen zu eignen. Hingegen ermöglichen die kontrastreichen Präzipitate vor allem eine Anwendung quantitativer Methoden.

Im Falle der Mancini-Technik (Abb. 4) ist

Abb. 4. Einfache radiale Immundiffusion von 0,4/0,5/1,0/1,6/2,0/4,0/8,0 μ g Humanalbumin (Probenvolumen je 5 μ l) in einer 1 mm starken (14–40)-Polyacrylamidschicht mit 14% Antihumanalbuminserum (Kaninchen, Behringwerke AG). Die Antigenkonzentration steigt zickzackförmig von rechts nach links. Puffer: Veronalpuffer pH 8,6. Diffusionszeit 40 Stdn. Elution in physiologischer NaCl-Lösung 42 Stdn. Danach direkte Anfärbung mit 0,1% Coomassie-Blau in 20-proz. wäßriger Trichloressigsäure.

z.B. an einen Ersatz der im Handel befindlichen teuren Immunplatten aus Agargel zu denken. Diese enthalten bereits spezielle Antisera und sind daher nicht variabel einzusetzen. Eine quantitative Auswertung der Flächenzunahme für die einfache radiale Immundiffusion ergab eine lineare Abhängigkeit der Kreisflächen von der Antigenmenge¹¹

$$S = S_0 + K \cdot Q_{Ag}.$$

S = Kreisfläche, S_0 = Fläche bei extrapolierte Antigenmenge Null, K = Steigung mit umgekehrter Proportionalität zur Antikörperkonzentration, Q_{Ag} = Antigenmenge.

Die jeweils notwendige Diffusionszeit wurde sowohl von der Antigen- als auch der Antiserummenge bestimmt (Tab. 1).

Std.	μg Albumin	
	5% Antiserum	14% Antiserum
10	—	1
20	1	4
40	2	8
60	3	—

Tab. 1. Zeitdauer, nach der für bestimmte Mengen an Humanalbumin lineare Abhängigkeit zur Präzipitatfläche auftrat, sowohl für ein (14–40)-Gel mit 5% als auch 14% Antihumanalbuminserum.

Auch die *eindimensionale Laurell-Technik* (Abb. 5) scheint als quantitative Methode zur Durchführung geeignet und ergab eine lineare Ab-

Abb. 5. Eindimensionale Elektroimmundiffusion von 0,1/0,2/0,4/0,8/1,6/3,2 μg Humanalbumin (Probenvolumen je 5 μl) in einer 1 mm starken (14–40)-Polyacrylamidschicht mit 15% Antihumanalbuminserum (Kaninchen, Behringwerke AG). Die Antigenkonzentration nimmt von rechts nach links zu. Elektrophoresebedingungen: 4 Std., Veronalpuffer pH 8,2, 100 Volt, 14 mA. Elution in physiologischer NaCl-Lösung 62 Std. Danach direkte Anfärbung mit 0,1% Coomassie-Blau in 20-proz. wäßriger Trichloressigsäure.

hängigkeit der Höhe der Präzipitabögen von der applizierten Antigenmenge. Für diese Elektrophoresetechnik erweist es sich vorteilhaft, daß die Elektrosmose in Polyacrylamid zu vernachlässigen ist. Zudem werden Nachteile wie lange Diffusionszeiten und umständliche Probenapplikation in herkömmlichen Polyacrylamidgelen bei Verwendung einer makroporösen Gelmatrix vermieden.

Die Durchführung der *zweidimensionalen Elektroimmundiffusion* (Abb. 6) konnte nicht in der bei Agarose üblichen Technik durch Anpolymerisation eines antiserumhaltigen Gels an einen Gelstreifen

Abb. 6. Zweidimensionale Laurellelektrophorese in einer 1 mm starken (14–40)-Polyacrylamidschicht. 1. Dimension: 5-std. Elektrophorese von 5 μl einer 5-proz. Humanserumkonserve (Biseko, Biotest, Frankfurt/Main) in Veronalpuffer pH 8,6 bei 160 Volt und 2 mA. 2. Dimension: 22-stdg. Elektrophorese in einem Gel mit 36% Antihumanserum (Kaninchen, Behringwerke AG) in Veronalpuffer pH 8,6 bei 60 Volt und 4 mA. Elution in physiologischer Natriumchloridlösung für 62 Std. Danach direkte Anfärbung mit 0,1% Coomassie-Blau in 20-proz. wäßriger Trichloressigsäure. (Für die Aufnahme wurde der Gelstreifen der ersten Trennung von seinem Träger abgehoben. Die Zahl sichtbarer Präzipitate im Original lag bei 20.)

mit vorgetrenntem Antigengemisch vollzogen werden. Dafür war es aber bei getrennter Herstellung der Gelschichten möglich, durch Übersichten auch große Mengen an Antiserum schonend aufzubringen. Dies war insbesondere bei Antigenen hoher Konzentration notwendig, um die Ausbildung von Präzipitaten zu unterbinden. Durch zweidimensionale Auftrennung einer Humanserumkonserve (Biseko, Biotest, Frankfurt/M.) ließen sich etwa 20 Präzipitabögen erzielen. Die gegenüber Agarosegel etwas geringere Zahl an Linien wird jedoch durch die Tatsache kompensiert, daß große Moleküle wie γ -Globuline rascher diffundieren, so daß deren Präzipitate markanter ausgeprägt sind.

Vor allem aber läßt sich das Gel rasch und billig mit gut reproduzierbaren Eigenschaften herstellen. Die variablen Möglichkeiten der Probenapplikation sowie seine gute Lagerfähigkeit erlauben außerdem, daß Zeit und Zweck seiner Anwendung nicht bereits bei der Polymerisation genau festgelegt sein müssen.

¹ R. J. WIEME, Agar Gel Electrophoresis, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, London, New York 1965.

² C. VERGANI, R. STABILINI u. A. AGOSTINI, Immunochemistry 4, 233 [1967].

³ M. D. POULIK, Ann. New York Acad. Sci. 121, 470 [1964].

⁴ S. RAYMOND u. Y. J. WANG, Anal. Biochem. 1, 391 [1960].

⁵ D. E. VAN ORDEN, Immunochemistry 5, 497 [1968].

- ⁶ H. DETERMANN, H. REHNER u. TH. WIELAND, *Makromolekulare Chem.* **114**, 263 [1968].
- ⁷ J. S. FAWCETT u. C. J. O. R. MORRIS, *Separation Sci.* **1**, 9 [1966].
- ⁸ J. C. MOORE, *J. Polymer Sci. A* **2**, 835 [1964].
- ⁹ H. DETERMANN, *Gelchromatographie*, S. 15, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967.
- ¹⁰ J. SEIDL, J. MALINSKY, K. DUŠEK u. W. HEITZ, *Adv. Polymer Sci.* **5**, 113 [1967].
- ¹¹ G. MANCINI, A. O. CARBONARA u. J. F. HEREMANS, *Immunochemistry* **2**, 235 [1965].
- ¹² S. GOLDER, V. LOPEZ u. H. KELLER, *Z. Klin. Chem.* **7**, 448 [1969].
- ¹³ S. FAZEKAS, R. G. DE ST. GROTH, R. G. WEBSTER u. A. DATYNER, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **71**, 377 [1963].
- ¹⁴ A. BUSSARD, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **34**, 258 [1959].
- ¹⁵ C. B. LAURELL, *Anal. Biochem.* **15**, 45 [1966].
- ¹⁶ N. RESSLER, *Clin. Chim. Acta* **5**, 795 [1960].
- ¹⁷ C. B. LAURELL, *Anal. Biochem.* **10**, 358 [1965].
- ¹⁸ H. G. M. CLARKE u. T. FREEMAN, *Protides Biol. Fluids* **14**, 503 [1966].
- ¹⁹ Ö. OUCHTERLONY, *Progr. Allergy* **6**, 30 [1962].
- ²⁰ Ö. OUCHTERLONY, *Arkiv Kemi* **26 B**, 1 [1949].
- ²¹ L. ORNSTEIN, *Ann. New York Acad. Sci.* **121**, 350 [1964].

Chelation Reactions of Adenine

RAM NAYAN and ARUN K. DEY

Chemical Laboratories, University of Allahabad, Allahabad, India

(*Z. Naturforsch.* **27 b**, 688—690 [1972]; received January 4, 1972, revised February 4, 1972)

Chelation reactions of the antimitotic drug, 6-amino-purine (adenine; abbr. ADN) with the metal ions: Be(II), Al(III), Cr(III), Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Pb(II), and UO₂(II) have been investigated in aqueous solution at 30° using Bjerrum-Calvin pH titration technique. The formation constants have been determined at various ionic concentrations, and have been extrapolated to zero ionic strength to get the thermodynamic values of the constants.

The clinical efficiency of several purine derivatives has been responsible for their use in human cancer therapy². These include 8-azaguanine, 6-mercaptapurine, thioguanine, and 6-chloropurine, and various other derivatives; of which 8-azaguanine and 6-mercaptapurine are comparatively more effective as anticancer agents. Structurally 6-aminopurine (ADN) is similar to 6-mercaptapurine, the difference being that in the former an amino group takes the place of a mercapto group in the latter. All these compounds are known to possess chelating properties and some relationship between chelation and cancer is obvious^{4,5}. Therefore the study of chelation reactions of ADN with the carcinogenic metal ions, Be(II), Al(III), Cr(III), Fe(III), Co(II), Cu(II), Ni(II), Pb(II), UO₂(II), and the biologically important metal ion Mn(II) has been undertaken. The chelation reactions of ADN in 50% aqueous dioxan with Ni(II), Cu(II) and Zn(II) (at 25°; $\mu = 0.1M$) have already been reported by FREISER et al.³. ALBERT¹ studied the same systems in aqueous media (20°; $\mu = 0.1M$), but the chelates of other metal ions have not been described.

Here, the chelation reactions have been investigated at 30° and at various ionic concentrations viz. 0.01, 0.05, and 0.1 M maintained by KNO₃ in aqueous media using Bjerrum-Calvin pH titration technique. The stabilities of the species formed have been determined employing various computational methods. The thermodynamic values of the constants have been obtained by extrapolation of log *K* values to zero ionic strength.

Experimental

Materials

The nitrates of aluminium(III), chromium(III), manganese(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II), and lead(II) (all BDH AnalaR) were dissolved in water.

Beryllium(II) carbonate and metallic iron (both BDH AnalaR) were dissolved in known volumes of nitric acid to obtain the nitrates.

The metal solutions were standardized by conventional methods and were diluted to $2.0 \times 10^{-3}M$.

Potassium hydroxide (BDH AnalaR) solution was prepared in water and was standardized by potentiometric titration against standard oxalic acid. The solution was diluted to 0.1016 N. 1.0 M Potassium nitrate (BDH AnalaR) was prepared by direct weighing for the adjustment of ionic concentrations.

Nitric acid (BDH AnalaR) was diluted and was standardized by titrating against standard KOH solution.

Requests for reprints should be sent to Dr. ARUN K. DEY, Department of Chemistry, University of Allahabad, Allahabad, India.