

Auswahlkriterien für Puffersysteme

Übersetzen Sie die Kernaussagen des folgenden englischen Textes stichwortartig. Erklären Sie die Hintergründe.

Goods buffers are twelve buffering agents selected and described by NORMAN GOOD and colleagues in 1966. GOOD selected the buffers based on a number of criteria which make them candidates for use in biochemistry and biological research. Many remain staples (deutsch: Grundstoffe) in modern biology laboratories. GOOD sought to identify buffering compounds which met several criteria likely to be of value in biological research.

- a) **pK_a**. Because most biological reactions take place at near-neutral pH between 6 and 8, ideal buffers would have pK_a values in this regime to provide maximum buffering capacity there.
- b) **Solubility**. For ease in handling and because biological systems are in aqueous systems, good solubility in water was required. Low solubility in nonpolar solvents (fats, oils, and organic solvents) was also considered beneficial, as this would tend to prevent the buffer compound from accumulating in nonpolar compartments in biological systems: cell membranes and other cell compartments.
- c) **Membrane impermeability**. Ideally, a buffer will not readily pass through cell membranes, this will also reduce the accumulation of buffer compound within cells.
- d) **Stability**. The buffers should be chemically stable, resisting enzymatic and non-enzymatic degradation.
- e) **Optical absorbance**. Buffers should not absorb visible or ultraviolet light at wavelengths longer than 230 nm so as not to interfere with commonly-used spectrophotometric assays.

Q: Engl. Wikipedia, Stichwort: Good's buffers (gekürzt)

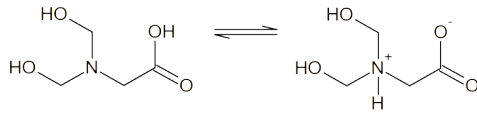
1. Beispiel: TRIS

Abkürzung, Namen und Strukturformel	Bemerkungen
<div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOCH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ </div> <p>TRIS (Tris-Base, Trizma) 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol</p>	<p>Eigenschaften: pH-Wert einer 1M-Lösung des Stoffs: pH = ca. 10-12. Da korresp. Säure pK_s(TRISH⁺) = 8,1 ⇒ pK_b(TRIS) = <i>siehe TRIS-HCl</i>. M(TRIS) = 179,17 g/mol</p> <p>Herstellung: Wirkt als schwache Base für sich allein noch nicht puffernd. Erst muss ein Anteil der Base durch HCl in die korrespondierende Säure (TRISH⁺) überführt werden: TRIS in H₂O lösen und mit halbkonz. HCl Wunsch-pH einstellen und auf das benötigte Endvolumen auffüllen. ODER: TRIS und TRIS-HCl im gewünschten Verhältnis mischen.</p> <p>Verwendung: Überall wo mit Nucleinsäuren gearbeitet wird. Verwendung als puffernder Bestandteil des TAE-Puffers.</p>
<div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \text{Cl}^- \\ \\ \text{HOCH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ </div> <p>TRIS-HCl (Tris-Hydrochlorid, Trizma-Hydrochlorid)</p>	<p>Eigenschaften: pH-Wert einer 0,5M-Lösung des Stoffs: pH = 3,5 – 5, pK_s = 8,1, korrespondierende Säure von TRIS</p> <p>Verwendung: Wird manchmal anstelle von konz. HCl benutzt um den pH-Wert von TRIS (<i>siehe oben</i>) auf den gewünschten pH-Wert einzustellen (Mischen von Tris mit TRIS-HCl).</p> <p>Bemerkung: Das organische Ion ist die korrespondierende Säure von TRIS</p>

1.1 Beschreiben Sie zwei Möglichkeiten, um 1 L eines TRIS-Puffer mit pH ≈ 7,5 und c(TRIS) = 250 mmol/L herzustellen.

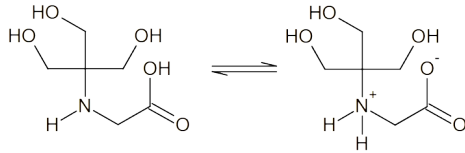
2. Beispiel: Bicin und Tricin

Bicin und Tricin sind weiße, wasserlösliche Pulver und gehören zur Gruppe der Good's Puffer. Die Verbindungen liegen in wässriger Lösung als **Zwitterionen** vor.



Bicin: ungeladene Form

Zwitterion



Tricin: ungeladene Form

Zwitterion

Für die in der Biochemie genutzte Pufferwirkung ist nur die Ammoniumgruppe verantwortlich!

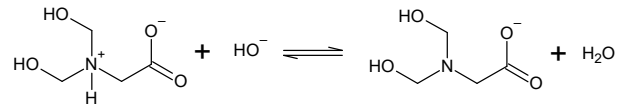
Bicin: $pK_s(R_3NH^+) = 8,4$

Tricin: $pK_s(R_2NH_2^+) = 8,2$

Rund um diese pK_s -Werte kommt es zur Pufferwirkung.

Löst man Bicin oder Tricin in H_2O , so stellt sich ein saurer pH-Wert ein, z.B. $pH = 4$ und es liegen die oben angegebenen

Zwitterionen vor. Durch Zugabe von NaOH wird ein Teil der Zwitterionen in die korrespondierende Base, die basische Pufferkomponente, überführt. Dabei wird die Ammoniumgruppe deprotoniert. Für Bicin gilt beispielsweise:



Zwitterion (sauer Pufferkomponente)

basische Pufferkomponente

Die Lösungen, die die saure Komponente, also das Zwitterion und ähnlich große Mengen der basischen Pufferkomponente enthalten, wirken puffernd.

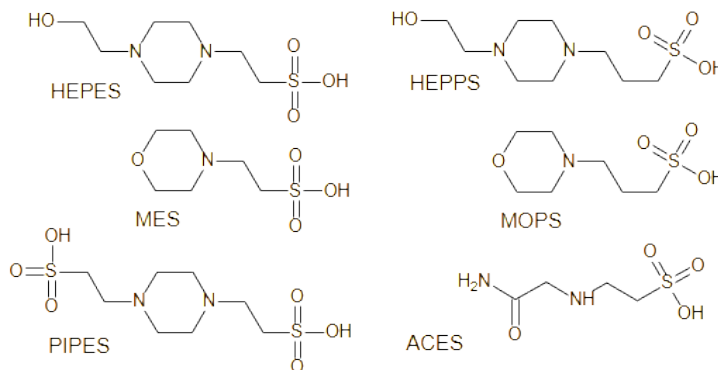
Eine besondere Eigenschaft von Tricin ist sein Bindevermögen für zweiwertige Metallionen wie Ca^{2+} oder Fe^{2+} . Die Metallionen werden dabei komplex gebunden.

Verwendung: Bei der Gelelektrophorese von Proteinen kann statt Glycin auch Tricin oder Bicin im Laufpuffer benutzt werden.

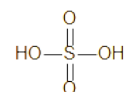
2.1 Erklären Sie mit Reaktionsgleichungen die Pufferwirkung von Bicin.

3. Beispiel: HEPES, HEPPS, PIPES, ACES, MES und MOPS: Alles Sulfonsäuren!

Ersetzt man in der Schwefelsäure, $H-O-S(O)_2-O-H$, (vgl. auch Strukturformel in Abb.) eine OH-Gruppe durch einen organischen Rest R, so entstehen **Sulfonsäuren**: $H-O-S(O)_2-R$. Sechs Vertreter der Good's Puffer sind solche Sulfonsäuren, mit jeweils unterschiedlichem organischen Rest R.



Das sind alles Derivate der Schwefelsäure



Alle Vertreter besitzen mindestens eine Aminogruppe. Durch die permanente und vollständige Deprotonierung der Sulfonsäuregruppe (pK_s häufig kleiner 0!) und der Protonierung der Aminogruppe liegen auch hier die Moleküle im Pufferbereich als **Zwitterionen** vor, wie bei Tricin und Bicin.

3.1 Notieren Sie die Strukturformeln des puffernden Säure-Base-Paars von MES!

3.2 Begründen Sie, ob die Verbindungen aufgrund einer Aromatizität im analytisch wichtigen UV-Bereich absorbieren!