

(Probe 2) AlCl_3 . Während 6 Stunden wurde bei 70° gerührt. Die Präparate wurden mit Wasser, Benzol und Äther gewaschen und im Vakuumtrockenschrank 48 Stunden bei 70° getrocknet. Der C-Gehalt der Proben betrug 8,57% und 18,94%.

Wir danken Fräulein dipl. sc. nat. *P. Miglioretto* und Herrn Dr. *R. Bach* für ihre Hilfe bei der Darstellung von Präparaten. Die *Zeisel*-Bestimmungen wurden von Herrn *Peisker*, Mikrolaboratorium, Brugg, und die C-Bestimmungen im Chem.-techn. Laboratorium der ETH von Fräulein *E. Kunz* ausgeführt. — Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel der *Arbeitsbeschaffungskredite des Bundes* ermöglicht, für die wir bestens danken.

Zusammenfassung.

Es wird die Gewinnung von Methoxy-, Äthoxy-, Äthyl- und Phenylderivaten des Montmorillonits beschrieben. Es wurde dazu das Chlorid des Montmorillonits mit Methanol, Äthanol, Äthylmagnesiumjodid bzw. Benzol mit Aluminiumchlorid behandelt.

Agrikulturchemisches Institut
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

204. Über die Entsalzung von Lösungen neutraler Aminosäuren mit Hilfe von Ionenaustauschern und ein neues präparatives Verfahren zur Gruppentrennung von Aminosäuren in Eiweisshydrolysaten

von **M. Brenner** und **Ruth Frey**.

(12. VI. 51.)

A. Entsalzung.

Wasser lässt sich mit Hilfe von Ionenaustauschern leicht und praktisch vollständig von gelösten Salzen befreien. Es gibt heute drei brauchbare Methoden, um solche Entsalzungen oder „Entionisierungen“ durchzuführen¹⁾. Sie sind alle dadurch gekennzeichnet, dass anwesende Salze in erster Stufe durch Kontakt mit einem stark sauren oder stark basischen Austauscherharz zerlegt werden, indem entweder die vorhandenen Kationen gegen Wasserstoffionen oder die Anionen gegen Hydroxylionen ausgetauscht werden. Die hierbei entstehende Säure oder Base wird dann in zweiter Stufe unter Verwendung eines beliebig stark basischen oder sauren Harzes durch Adsorption bzw. abermaligen Austausch zum Verschwinden gebracht²⁾.

Die Entsalzung von Aminosäurelösungen lässt sich nicht nach diesem Schema durchführen. Dies hängt damit zusammen, dass die in Wasserentsalzungsanlagen gebräuchlichen, stark sauren oder stark

¹⁾ *R. Kunin & F. X. McGarvey*, Ind. Eng. Chem. **43**, 734 (1951).

²⁾ Vgl. auch *C. Calmon*, in *F. C. Nachod*, „Ion Exchange“, New York 1949.

basischen Austauscher die Aminosäuren adsorbieren. Soll die Entfernung von Salzen ohne die gleichzeitige Adsorption von neutralen Aminosäuren erfolgen, so muss man mit Harzen von niedriger Acidität und Basisität arbeiten¹⁾. Solche Austauscher besitzen indessen ein sehr geringes Neutralsalz-Spaltungsvermögen und reagieren speziell im Bereich niedriger Konzentrationen verhältnismässig langsam. Das für Entsalzungen übliche Zweisäulenverfahren ist deshalb nicht anwendbar, und auch das an sich wirksamere Einsäulenverfahren gibt unbefriedigende Resultate²⁾. Es ist also bei Verwendung „schwacher“ Austauscher notwendig, von den konventionellen konstruktiven Anordnungen abzuweichen.

Die gewählte Versuchsanordnung ist in Figur 1 dargestellt. Eine NaCl-haltige Aminosäurelösung fliesst, aus einem Vorratsgefäß A kommend, von oben nach unten zuerst durch eine mit Amberlite IR-4B³⁾ beschickte Säule. Ein kleiner Teil des anwesenden Kochsalzes wird hierbei zerlegt, indem das Harz Chlorionen aufnimmt und dafür Hydroxylionen in Lösung schickt. Die nunmehr schwach alkalische Lösung fliesst weiter durch eine mit Amberlite IRC-50⁴⁾ oder Harz IC⁵⁾ beschickte Säule, welche die entstandene Lauge aufnimmt und eine Lösung in das Sammelgefäß B abfliessen lässt, die etwas weniger NaCl enthält als die Anfangslösung. Sobald sich die Hauptmenge der Flüssigkeit in B befindet – ein Leerlauf der Säulen ist zu vermeiden –, tritt ein passend eingestellter Heber H in Funktion, durch den sich B nach C entleert. Gefäß C steht auf einer Waage W; diese betätigt über ein Relais die Pumpe P. Die Lösung wird durch die Pumpe nach A zurückbefördert und fliesst von dort mit beliebig einstellbarer Geschwindigkeit wiederum auf die obere Säule. Der Kreislauf wiederholt sich nun, und die Apparatur bleibt in Betrieb, bis die Lösung salzfrei

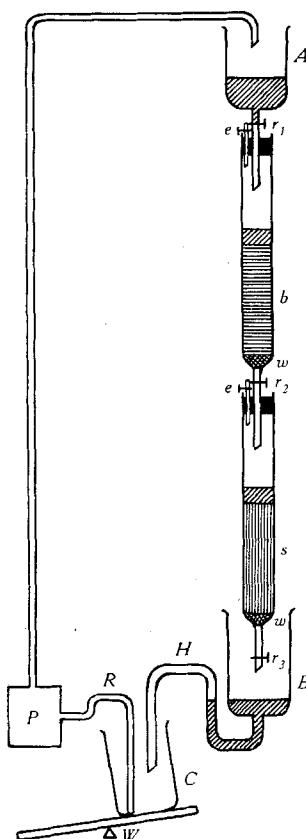


Fig. 1.

- R bewegliches Saugrohr
- b basisches Harz
- s saures Harz
- e Entlüftungshahn
- r Regulierhahn
- w Watte

¹⁾ Vgl. die Zusammenstellung über die Adsorptionsverhältnisse der Aminosäuren bei M. Brenner & C. H. Burckhardt, Helv. **34**, 1070 (1951).

²⁾ R. Kunin & F. X. McGarvey, loc. cit.

³⁾ R. Kunin & R. J. Myers, Am. Soc. **69**, 2874 (1947); F. J. Myers, Ind. Eng. Chem. **35**, 858 (1943).

⁴⁾ R. Kunin & R. E. Barry, Ind. Eng. Chem. **41**, 1269 (1949).

⁵⁾ Diesen schwach sauren Austauscher haben wir zu einer Zeit, da Amberlite IRC-50 noch nicht erhältlich war, aus Brenztraubensäure, Phenol und Formaldehyd selbst hergestellt (vgl. exp. Teil).

ist¹). Die Anzahl notwendiger Zyklen ist von der Aminosäurekonzentration und dem Mengenverhältnis Salz : Austauscher abhängig. Die unten beschriebene Entsalzung von Rohleucin war je nach der Art des verwendeten sauren Austauschers nach 10–20 Stunden beendet (ca. 60–120 Zyklen, vgl. Fig. 2).

Die Neutralsalzspaltung durch Amberlite IR-4B bildet die Grundlage unseres Verfahrens. Diese Spaltung ist gering, wird aber durch die Gegenwart von Aminosäuren begünstigt. Dieselben fangen als Puffer die gebildete Lauge auf und verringern dadurch den raschen pH-Anstieg, der den Umsatz zwischen Salz und Harz in rein wässriger Lösung sofort zum Stillstand bringt. Der Effekt ist im Modellversuch deutlich feststellbar (Fig. 2).

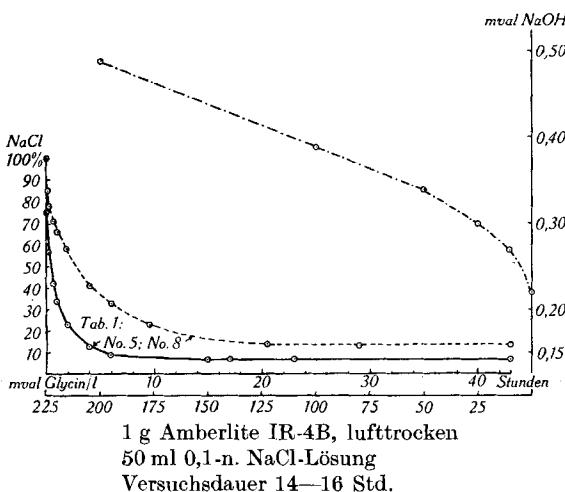


Fig. 2.

NaCl-Spaltung durch Amberlite IR-4B in Gegenwart von Glycin (strichpunktierte Kurve)
Ordinate: mval NaOH, gebildet durch NaCl-Spaltung (ermittelt durch Titration mit 0,02-n. H_2SO_4 , Tashiro-Indikator²).

Abszisse: Glycinkonzentration, mval/l. (Kjeldahl-Bestimmungen²) am Anfang und Ende der Versuche ergaben keine Veränderungen im N-Gehalt der Lösungen) und

Zeitlicher Verlauf der Entsalzung im System Amberlite IR-4B/Harz IC (ausgezogene Kurve) und Amberlite IR-4B/Amberlite IRC-50 (gestrichelte Kurve). Versuche No. 5 und 8 in Tabelle 1.

Ordinate: NaCl-Gehalt in % des Anfangswertes. Abszisse: Zeit in Stunden.

Weitere Modellversuche ergaben, dass die Kochsalzspaltung bei konstanter Aminosäurekonzentration, konstanter Harzmenge und konstantem Volumen mit abnehmender Salzkonzentration kleiner wird. Es liegt hier eine einfache Massenwirkung vor³). Ferner zeigte

¹⁾ Bestimmung des NaCl-Gehaltes: *J. M. Kolthoff & V. A. Stenger*, Volumetric Analysis, Vol. II, 331, New York 1947.

²⁾ *G. Frey*, Helv. 31, 709 (1948).

³⁾ Vgl. dazu *R. Kunin & R. J. Myers*, loc. cit., Fig. 4.

es sich, dass die für die Salzzerlegung ausnützbare Kapazität des Harzes recht gering ist. Schon bei einer Beladung von rund 1 mval HCl pro g lufttrockenes Harz hört die Umsetzung mit Kochsalz auf (Glycinkonzentration 200 mval/l). Dieser durch die geringe Harzbasisität¹⁾ bedingte Effekt macht es notwendig, für jedes mMol NaCl, das zerlegt werden soll, rund 1 g lufttrockenes Harz zu verwenden.

Die Kapazität der zur Entfernung der gebildeten Lauge dienenden Carboxylharze kann ebenfalls nur unvollständig ausgenutzt werden. Dies ergibt sich als unmittelbare Folge der bei vollbeladenen Carboxylharzen (z. B. Amberlite IRC-50—Na) auftretenden hydrolytischen Abspaltung von NaOH²⁾. Der bei einem gegebenen pH erreichbare Ausnützungsgrad der Harze ist erwartungsgemäss in erster Annäherung von ihrer Totalkapazität unabhängig. Er beträgt beim Harz IC (Kapazität ~ 3) wie beim Amberlite IRC 50 (Kapazität ~ 6) etwa 50 %. Nach Überschreiten dieser Beladung bleibt das pH der aus dem sauren Harz abfliessenden Lösung so hoch, dass im basischen Austauscher keine Salzspaltung mehr erfolgt³⁾. Die Salzspaltung durch das Carboxylharz haben wir nicht überprüft. Wir vermuten jedoch, dass auch dieser Vorgang, d. h. die Bildung kleiner Mengen HCl aus Harz-COOH und NaCl, wenigstens anfänglich am Gesamtumsatz beteiligt ist⁴⁾.

Aus den angegebenen Daten über die Harzkapazitäten und den Ausnützungsgrad errechnet sich ein minimaler Bedarf von 0,7 g Harz IC bzw. 0,35 g Amberlite IRC-50 (lufttrockene Produkte) pro mMol NaCl. Im Entsalzungsversuch zeigt sich aber, dass diese Mengen, wie auch die Menge an Amberlite IR-4B, vorteilhaft um 50—100 % vermehrt werden. Es ist dann möglich, fast alles Salz in einer Operation aus der Lösung zu entfernen.

Namentlich bei der Verarbeitung grösserer Mengen ist es jedoch rationeller, stufenweise nach dem Gegenstromprinzip zu arbeiten.

In einer ersten Entsalzungsapparatur (Fig. 1) wird z. B. unter Erschöpfung der Austauscher auf rund 20% entsalzt. Die Lösung gelangt dann auf eine zweite Einheit gleicher Grösse, in welcher der Salzgehalt spielend auf 0% reduziert wird. Man sieht leicht ein, dass sich auf diese Weise wesentliche Einsparungen an Austauschern, Waschwasser und Regenerierlösungen erzielen lassen.

Einsparungen an Harz sind um so wichtiger, als die sauren Austauscher erhebliche Mengen neutraler Aminosäuren adsorbieren. Die Adsorption geht zwar bei fortschreitender Natriumaufnahme zurück,

¹⁾ Titrationskurve von Amberlite IR-4B: *J. C. Winters & R. Kunin*, Ind. Eng. Chem. **41**, 460 (1949); siehe ferner *R. Kunin & R. J. Myers*, loc. cit. Fig. 1 und 4, *S. M. Partridge & R. C. Brimley*, Biochem. J. **44**, 513 (1949), Fig. 1.

²⁾ *F. X. McGarvey & J. Thompson*, Ind. Eng. Chem. **43**, 741 (1951), Fig. 9.

³⁾ Titrationskurve von Amberlite IRC-50: *R. Kunin & R. E. Barry*, loc. cit., Fig. 1. Titrationskurve von Harz IC: exp. Teil dieser Arbeit.

⁴⁾ Vgl. *R. Kunin & R. E. Barry*, loc. cit., Fig. 4.

bleibt aber bei der im vorliegenden System maximal erreichbaren Beladung immer noch ziemlich gross (Fig. 3).

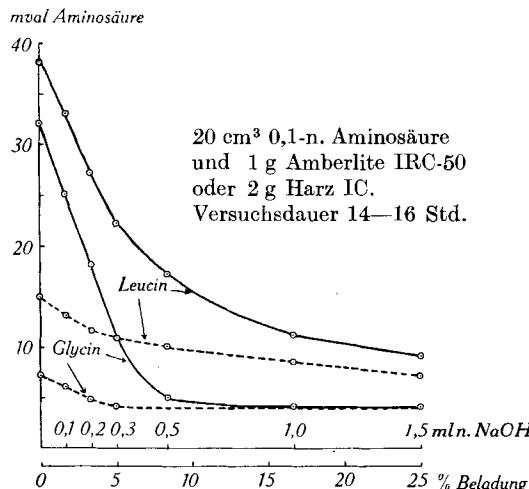


Fig. 3.

Adsorption von Glycin und Leucin an Harz IC (ausgezogene Kurven) und Amberlite IRC-50 (gestrichelte Kurven) bei wachsender Natriumbeladung der Harze.

Ordinate: mval adsorbierte Aminosäure (berechnet aus der Änderung im N-Gehalt¹⁾ der Lösungen).

Abszisse: cm³ zugesetzte 1-n. NaOH, bzw. Beladungszustand der Harze in % der Totalkapazität²⁾. (NaOH-Mengen von mehr als 1,5 cm³ wurden bei der gewählten Versuchsdauer nicht mehr vollständig aufgenommen.)

Resultate: Entsalzungsversuche sind durchgeführt worden mit Lösungen von Glycin, Leucin und technischem Rohleucin (Gemisch aus Leucin, Isoleucin, Valin, Methionin und Phenylalanin mit 15–20% NaCl). Tabelle 1 gibt Auskunft über die Versuchsansätze, den jeweils erzielten Entsalzungsgrad und die Verluste an Aminosäure im Ein- und Mehrstufenverfahren. Bei den Ansätzen Nr. 5 und 8 der Tabelle 1 haben wir den Verlauf der Entsalzung zeitlich verfolgt. Aus den diesbezüglichen Kurven in Figur 2 geht hervor, dass der Endwert bei Verwendung von Harz IC nach rund 10 Stunden erreicht wird. Amberlite IRC-50 arbeitet wesentlich langsamer.

Die Aminosäureverluste sind, dem in Figur 3 dargestellten Ergebnis entsprechend, verhältnismässig gross. Immerhin zeigt das Mehrstufenverfahren auch hier einen Vorteil, indem einerseits ein Harz, das einmal mit Aminosäure gesättigt ist, keine weiteren Verluste mehr bedingt, und andererseits die Verluste mit zunehmender Harzausnutzung kleiner werden. Leider gewinnen die Austauscher ihr unerwünschtes Adsorptionsvermögen bei der Regeneration weitgehend zurück.

¹⁾ Semimikro-Kjeldahl-Bestimmungen nach G. Frey, loc. cit.

²⁾ Totalkapazität = 6 (Bestimmung und Definition der Kapazität siehe exp. Teil). Die wahre Kapazität von Amberlite IRC-50 beträgt ungefähr 10: R. Kunin & F. X. McGarvey, Ind. Eng. Chem. 41, 1265 (1949).

Tabelle 1.

Entsalzung von Aminosäure-Lösungen im Ein- und Mehrstufenverfahren.

Nr.	Anfangslösung		Nr. 1: 70 mval Glycin und 33 mval NaCl in 500 cm ³ dest. Wasser		NaCl-Gehalt (% des Anfangswertes) und Aminosäureverlust (% des Anfangswertes) der Endlösungen		im Mehrstufenverfahren	
	Anfangslösungen		Nr. 2: 70 „ Leucin „ 33 „ NaCl „ 500 „ „ „		im Einstufenverfahren			
	Anfangslösungen „ 3-8: 84 „ Rohleucin „ 42 „ NaCl „ 500 „ „ „				Kolonne 1*) NaCl AS-Verlust ⁴⁾			
	Basischer Austauscher ¹⁾	Saurer Austauscher ²⁾						
	g mval NaCl	g ³⁾	g mval NaCl	g ³⁾				
1	2	66 ⁶⁾	2	66 ^{6,7)}	3 ± 1			
2	2	66	2	66 ⁷⁾	3 ± 1 12 ± 2			
3	1,5	63	1,5	63 ⁷⁾	5 ± 1 10 ± 2	0 ± 1	32	
4	0,75	31,5	0,75	31,5 ⁷⁾	26 ± 1 5 ± 2	2 ± 1	14	
5	0,75	31,5	1,5	63 ⁷⁾	8 ± 1			
6	1,5	63	0,75	31,5 ⁸⁾	6 ± 1 12 ± 2	0 ± 1	17 ⁹⁾	
7	0,75	31,5	0,38	16 ⁸⁾	26 ± 1 5 ± 2	3 ± 1	11	
8	0,75	31,5	0,75	31,5 ⁸⁾	14 ± 1			

*) 18stündige¹⁰⁾ Zirkulation der Anfangslösungen durch die voll regenerierte Apparatur.

**) 18stündige¹⁰⁾¹¹⁾ Zirkulation der Endlösungen¹²⁾ von Kolonne 1 durch die voll regenerierte Apparatur.

***) 18stündige¹⁰⁾ Zirkulation frischer Anfangslösungen durch die partiell erschöpften, mit destilliertem Wasser gewaschenen Austauscher¹³⁾ der Versuche von Kolonne 2.

¹⁾ Amberlite IR-4B.²⁾ Vgl. die Fussnoten ⁷⁾ und ⁸⁾.³⁾ Lufttrocken gewogen.⁴⁾ Nach Abtropfen der Endlösungen aus den Säulen und dreimaligem Waschen der Harze mit je 200 cm³ dest. Wasser. Die dritte Portion Waschwasser enthielt nur noch Spuren von Aminosäure.⁵⁾ Verlustsumme aus 1. und 2. Stufe (Mittelwerte).⁶⁾ Die mit n. HCl bzw. n. NaOH regenerierten Austauscher sind hier mit Leitungswasser neutralgewaschen worden; in allen anderen Fällen wurde destilliertes Wasser verwendet.⁷⁾ Harz IC (H-Form).⁸⁾ Amberlite IRC-50 (H-Form).⁹⁾ Die geringe Adsorption in der 2. Stufe ist hier wahrscheinlich der kurzen Versuchsdauer zuzuschreiben.¹⁰⁾ Die Versuchsdauer basiert auf den Zeitversuchen der Figur 2.¹¹⁾ Die Versuchsdauer ist hier zweifellos zu gross: vgl. No. 6, wo die Versuchsdauer probeweise auf 2 Stunden beschränkt wurde.¹²⁾ Abgetropfte Endlösung mit den Waschwässern (vgl. Fussnote ⁴⁾) vereinigt und auf 500 cm³ eingeengt.¹³⁾ Zum Waschprozess vgl. Fussnote ⁴⁾.

Die vorliegende Entsalzungsmethode beruht im Prinzip auf einer „Entionisierung“, die sich nicht auf anorganische Ionen beschränken lässt. Deshalb werden die in neutraler, wässriger Lösung kationischen Diamino-monocarbonsäuren und anionischen Monoamino-dicarbonsäuren ebenso wie Na^+ und Cl^- adsorbiert. Sollen diese Aminosäuren in Lösung bleiben, so ist unser Verfahren nicht anwendbar. Es beschränkt sich deshalb ausdrücklich auf die Entsalzung von Lösungen neutraler Aminosäuren und ist auch dann nur brauchbar, wenn gewisse unvermeidliche Verluste tragbar sind. Letztere werden in der Regel bei Gemischen mit einem hohen Prozentsatz an Aminosäuren mit aromatischer oder grosser aliphatischer Seitenkette bedeutender sein als bei Gemischen von niedermolekularen Aminosäuren¹⁾.

B. Gruppentrennung.

Das soeben erwähnte Verhalten der sauren und basischen Aminosäuren bietet die Möglichkeit, sie mit Hilfe unserer Austauscheranordnung zwar nicht ganz quantitativ, dafür aber in beliebigem präparativem Maßstab aus salzfreien Eiweisshydrolysaten abzutrennen. Orientierende Versuche haben in dieser Hinsicht sehr zufriedenstellende Resultate ergeben.

Eine Mischung von 84 mval Leucin (11,08 g), 42 mval Glutaminsäure (6,18 g) und 42 mval Arginin (7,32 g) in 500 cm³ destilliertem Wasser lieferte nach 23ständigem Kreislauf durch 63 g Amberlite IR-4B und 31,5 g Amberlite IRC-50, Abtropfen und dreimaligem Auswaschen der Harze mit je 150 cm³ Wasser, eine Leucinfraktion von 10 g. Das saure Harz wurde mit 1000 cm³ 1-n. HCl behandelt und die resultierende, argininhaltige Lösung zum Sirup eingedampft. Nach der Methode von Cox²⁾ liessen sich daraus 7,1 g Argininmonohydrochlorid erhalten. Die Extraktion des basischen Harzes mit 1000 cm³ 1-n. NH₃ ergab 5,3 g glutaminsaures Ammonium. Alle diese Ausbeuten beziehen sich auf effektiv isoliertes, kristallines Material. Die drei Fraktionen wurden mikrobiologisch auf ihre Reinheit untersucht; das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Präparative Trennung von Leucin, Arginin und Glutaminsäure. Mikrobiologische Gehaltsbestimmung der erhaltenen Fraktionen³⁾.

Fraktion	Leucin ⁴⁾ %	Glutaminsäure ⁵⁾ %	Arginin ⁶⁾ %
Leucin	95 ± 10	2 ± 0,2	2 ± 0,2
Glutaminsäure . .	0,5 ± 0,05	90 ± 10	0,2 ± 0,02
Arginin	0	0	100 ± 10

¹⁾ Vgl. die Diskussion über die molekulare Adsorption bei *M. Brenner & C. H. Burckhardt*, loc. cit.

²⁾ *G. J. Cox*, *J. Biol. Chem.* **78**, 475 (1928).

³⁾ Wir danken Herrn Dr. *V. Kocher*, Mikrobiologisches Laboratorium St. Jakob, für die Ausführung dieser Bestimmungen.

⁴⁾ *Neurospora crassa* leucineless.

⁵⁾ *Lactobacillus arabinosus*.

⁶⁾ *Streptococcus faecalis*.

In einem weiteren Versuch wurde ein salzsaures Hydrolysat von Fibrin durch Röhren mit Amberlite IR-4B auf pH 7,6 gebracht und anschliessend während 16 Stunden im Kreislauf über Amberlite IR-4B (48 g) und Amberlite IRC-50 (15 g) geleitet. Die Wahl dieses Harzverhältnisses basiert auf der in der Literatur¹⁾ angegebenen Zusammensetzung des Fibrins. Papierchromatogramme des Hydrolysates liessen erkennen, dass Asparagin, Glutaminsäure, Arginin und Lysin bei sonst gleichbleibender Zusammensetzung des Gemisches praktisch verschwunden waren. Über das Verhalten des nur in geringer Menge vorhandenen Histidins gaben die Versuche keine zureichende Auskunft²⁾. Wahrscheinlich wird es unter unsren Versuchsbedingungen nicht oder nur geringfügig adsorbiert³⁾. Die weitere Aufarbeitung des Versuches musste aus äusseren Gründen leider unterbleiben.

Es scheint also festzustehen, dass der eingeschlagene Weg prinzipiell gangbar ist. Die Nachteile, die der Methode anhaften, beschränken sich im wesentlichen auf die durch molekulare Adsorption bedingten Effekte: Verluste einerseits und mangelhafte Trennschärfe andererseits. Ihr Vorteil besteht darin, dass die grösste Schwierigkeit, die sich dem Gebrauch der schwach basischen und sauren Austauscher entgegenstellt, nämlich ihre Reaktionsträgheit⁴⁾, im Kreislauf überwunden wird. Innerhalb der Grenzen ihres Anwendungsbereiches dürfte sie den verschiedenen ähnlichen Methoden⁵⁾, die für die Gruppentrennung vorgeschlagen wurden, überlegen sein. Die Verdrängungchromatographie nach *Partridge*⁶⁾ führt im Endeffekt auch zu einer Gruppentrennung. Ihr Hauptakzent liegt aber auf der Trennung innerhalb der Gruppen. Das Verfahren beruht zudem nicht auf blosser adsorptiver Filtration und lässt sich daher nicht mit dem unsrigen vergleichen.

Der eine von uns (M. B.) dankt der *Rockefeller Foundation* in New York für die gewährte Unterstützung.

Experimenteller Teil.

Vorbereitung der Harze und Herstellung von Harz IC.

Amberlite IR-4B: Das käufliche Harz wird nach mehrmaliger abwechselungsweiser Behandlung mit 1-n. HCl und 1-n. NaOH mit Wasser in eine Chromatographieröhre gespült. Man wäscht mit halogenfreier 1-n. NaOH halogenfrei (AgNO_3) und hierauf

¹⁾ *R. J. Block & D. Bolling*, The Amino Acid Composition of Proteins and Foods, Springfield, Illinois, 1947.

²⁾ Vgl. *C. E. Dent*, Biochem. J. **43**, 169 (1948), Bemerkung über Histidin.

³⁾ *J. C. Winters & R. Kunin*, loc. cit.

⁴⁾ Über Amberlite IR-4B siehe *R. Kunin & R. J. Myers*, loc. cit.; *S. M. Partridge & R. O. Brimley*, Biochem. J. **44**, 515 (1949); über Amberlite IRC-50 siehe *R. Kunin & R. E. Barry*, loc. cit.

⁵⁾ *C. S. Cleaver, R. A. Hardy & H. G. Cassidy*, Am. Soc. **67**, 1343 (1945); *C. S. Cleaver & H. G. Cassidy*, Am. Soc. **72**, 1147 (1950); *J. C. Winters & R. Kunin*, loc. cit.; vgl. auch *R. K. Cannan*, J. Biol. Chem. **152**, 401 (1944) und *R. J. Block*, in *F. C. Nachod, „Ion Exchange“*, New York 1949. Das „ideale Schema“ von *Cannan* (Ann. New York Acad. Sci. **47**, 135 (1946)) ist mit den zur Zeit verfügbaren Austauschern noch nicht durchführbar; das Verfahren von *A. Tiselius, B. Drake & L. Hagdahl* (Exper. **3**, 21 (1947)) ist eine ausgesprochen analytische Methode.

⁶⁾ *S. M. Partridge, R. C. Brimley & K. W. Pepper*, Biochem. J. **46**, 334 (1950); vgl. auch frühere Arbeiten.

mit destilliertem Wasser, bis das Eluat neutral abläuft und eine Probe des Harzes bei 12ständigem Stehen mit destilliertem Wasser kein Alkali mehr abgibt (Lackmus). Das Harz wird nunmehr zwischen Filtrierpapier bis zur Gewichtskonstanz luftgetrocknet (ca. 60 Stunden).

Amberlite IRC-50: Das käufliche Harz wird nach mehrmaliger, abwechslungsweiser Behandlung mit 1-n. NaOH und 1-n. HCl mit Wasser in eine Chromatographieröhre gespült. Man wäscht mit eisenfreier 1-n. HCl praktisch natriumfrei (Flammenfärbung am Platindraht) und hierauf mit destilliertem Wasser, bis eine Harzprobe bei 12ständigem Stehen in destilliertem Wasser keine Säure mehr abgibt (Lackmus). Es wird wie das basische Harz getrocknet. Zum Vergleich mit dem Harz IC wurde unter den dort angegebenen Bedingungen die Kapazität gegenüber Soda bestimmt; im Mittel wurde ein Wert von 6,3 mval/g lufttrockenes Harz IRC-50 gefunden.

Harz IC: Man verfährt wie bei Amberlite IRC-50. Vgl. im übrigen den Abschnitt über die Herstellung von IC.

Alle Gewichtsangaben beziehen sich auf die obigen, lufttrockenen Harze. Letztere sind im Hinblick auf die lange Versuchsdauer überall, wo sie in regenerierter Form frisch zur Verwendung gelangten, den Reaktionslösungen ohne vorherige Quellung direkt zugesetzt worden.

Herstellung von Harz IC: 44 g Brenztraubensäure werden in 150 cm³ konz. H₂SO₄ unter Eiskühlung gelöst. Unter stetem Rühren gibt man bei 0° portionenweise insgesamt 94 g Phenol zu. Nachdem alles Phenol gelöst ist, wird das Gemisch bei Zimmertemperatur noch 2 1/2 Stunden gerührt, auf Eis gegossen und der Niederschlag abfiltriert. Er wird mit Eiswasser gewaschen und im Exsikkator über konz. H₂SO₄ getrocknet. Ausbeute: 88 g p,p'-Dioxy-diphenyl-propionsäure¹). Die erhaltene Säure wird in 250 cm³ Wasser suspendiert und durch Zugabe von technischer, konz. NaOH gelöst. Die gegen Phenolphthalein schwach alkalische Lösung wird filtriert und auf dem Wasserbad eingeengt, bis sie leicht klebrig erscheint (das Volumen beträgt nunmehr ca. 180–200 cm³). Bei 60–70° werden jetzt 44 cm³ 30-proz. Formalinlösung langsam und unter Rühren zugeropft. Dann wird der Kolben verkorkt und in einem Wasserbad von 95–100° während 1 1/4 Stunden stehengelassen. Hierbei bildet sich ein Gel, das noch heiß herausgeholt und in kleinere Stücke zerteilt wird.

Zur Härtung werden die Harzstücke zunächst eine weitere Stunde im verschlossenen Kolben auf 95–100° erwärmt, 16 Stunden auf Filtrierpapier luftgetrocknet und nochmals im geschlossenen Kolben während 7 Stunden bei 95–100° erwärmt. Hierauf werden sie im Heizschränk in offener Schale 22 Stunden auf 80–90° und 4 Stunden auf 120–130° erwärmt. Das gehärtete Harz wird in einer Schlagmühle auf die Korngrösse 0,25–1,5 mm gemahlen und nach den beim Amberlite IRC-50 gemachten Angaben mit Alkali, Säure und dest. Wasser behandelt und schliesslich luftgetrocknet.

Kapazität von Harz IC: 1 g lufttrockenes Harz IC wird in 10 cm³ 1-n. Sodalösung suspendiert. Man lässt 48 Stunden quellen, kocht 15 Minuten am Rückfluss auf und titriert nachher je 2 cm³ der abfiltrierten Lösung mit 0,2-n. HCl gegen Methylorange als Indikator. Mittlerer HCl-Verbrauch: 6,75 ± 0,02 cm³. Daraus berechnet sich eine Kapazität von 3,25 mval pro 1 g lufttrockenes Harz IC. (Würde man an Stelle von Soda NaOH verwenden, so ergäben sich infolge der Mitbestimmung phenolischer Hydroxylgruppen höhere Werte.)

Titrationskurve des Harzes IC: Da die Einstellung des Gleichgewichtes viel Zeit benötigt²), kann man nicht direkt titrieren. Es wurden daher verschiedene Portionen von je 500 mg lufttrockenem Harz IC in je 50 cm³ 1-n. NaCl-Lösung mit zunehmenden Mengen von 0,5-n. NaOH versetzt und in Glasstöpselflaschen 16 Stunden lang bei 20° geschüttelt. Hierauf wurde das pH der Lösungen mit Hilfe eines Beckman-pH-Meters,

¹⁾ C. Böttänger, B. 16, 2071 (1883).

²⁾ R. Kunin & R. E. Barry, loc. cit.

Modell G, gemessen (Messgenauigkeit: $\pm 0,01$ pH). Die Messungen bei pH-Werten oberhalb 8,5 sind für den Na-Salzfehler der Glaselektrode in 1-n. NaCl korrigiert worden. Figur 4 zeigt das Ergebnis.

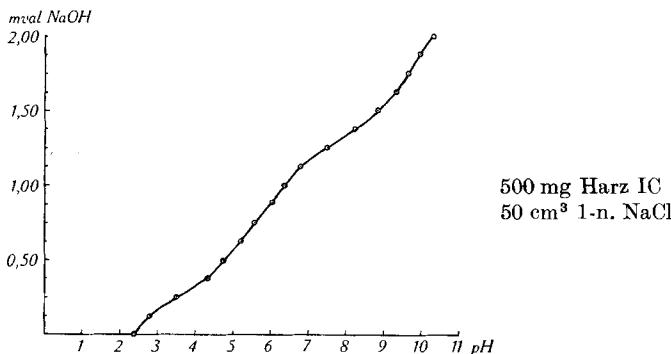


Fig. 4.
Titration curve of Harz IC¹⁾. Ordinate: mval NaOH. Abscisse: pH.

Entsalzungsversuche.

Herstellung der Lösungen: Die Zusammensetzung der Entsalzungslösungen ist aus Tabelle 1 ersichtlich. Glycin- und Leucinlösungen wurden aus den analysenreinen Bestandteilen bereitet²⁾. Zur Herstellung der Rohleucinlösungen diente technisches, grau-gelb gefärbtes Rohleucin. Rund 18 g dieses Produktes wurden zusammen mit 9 g Entfärbungskohle in 600 cm³ Wasser eingetragen, die Suspension unter Rühren zum Sieden erhitzt und kochend filtriert. Das klare Filtrat wurde auf Stickstoff (*Kjeldahl*) und NaCl³⁾ analysiert und gegebenenfalls durch Wasserzusatz auf den in Tabelle 1 angegebenen Gehalt gebracht.

Durchführung der Entsalzung: Man suspendierte das lufttrockene saure bzw. basische Harz in geeigneten Volumina der jeweiligen Entsalzungslösungen und brachte die beiden Suspensionen in die zu diesem Zwecke auseinandergekommenen Adsorptions-säulen der Entsalzungsapparatur (Fig. 1). Die in den Säulen überstehenden Lösungen wurden hierauf bis auf einen kleinen Rest abgelassen, die Apparatur zusammengestellt und das Niveau der überstehenden Lösungen durch Betätigung der Entlüftungs- und Regulierhähnen auf eine geeignete Höhe (1–3 cm über dem Harz) gebracht. Man beschickte das Vorratsgefäß A mit dem Rest der Lösung und setzte die Apparatur durch Öffnen der Hähne r_1 , r_2 und r_3 in Betrieb. Der Heber wurde so eingestellt, dass die Lösung kurz der der völligen Entleerung des Gefäßes A aus B nach C floss und von dort über die Pumpe nach A zurückbefördert wurde. Die Einstellung von r_3 bestimmte die Durchflussgeschwindigkeit.

Gruppentrennung.

Fibrinhydrolysat: 15 g Fibrin („Roche“, getrocknet) wurden mit 3 Liter 6-n. HCl während 18 Stunden am Rückfluss gekocht, das Hydrolysat am Vakuum eingedampft und der Rückstand dreimal abwechselungsweise in 500 cm³ dest. Wasser gelöst

¹⁾ Titration curve of Amberlite IRC-50 siehe *R. Kunin & R. E. Barry*, loc. cit. Titration curve of Wofatit C siehe *R. Griessbach*, Angew. Ch. **52**, 215 (1939).

²⁾ Zur Vermeidung von Bakterienwachstum wurden sie kurz vor Gebrauch aufgekocht und wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt.

³⁾ *J. M. Kolthoff & V. A. Stenger*, loc. cit.

und eingeengt. Man löste hierauf in 200 cm³ Wasser, kochte 15 Min. mit 5 g Entfärbungskohle, filtrierte, verdünnte das Filtrat auf 500 cm³, setzte unter Rühren portionenweise Amberlite IR-4B zu, bis das pH den Wert 7,6 erreichte, und dekantierte schliesslich vom Harz ab. Das Harz wurde dreimal mit je 250 cm³ Wasser gewaschen, Waschwasser und Dekantat vereinigt, die Lösung auf 500 cm³ eingeengt und hierauf im Kreislauf durch die Entsalzungsapparatur geleitet. Harzmenge usw. vgl. theoretischer Teil.

Papierchromatogramme: Nach der Methode von Dent¹⁾ wurden Proben des Fibrinhydrolysates vor und nach der Gruppentrennung auf *Whatman*-Papier Nr. 1 aufgetropft und zuerst in Phenol/Wasser bei Gegenwart von Essigsäuredampf (50% Essigsäure) und nachher (2. Dimension) in Collidin/Wasser aufsteigend²⁾ chromatographiert. Es fanden sich auf dem mit Ninhydrin entwickelten Chromatogrammen des Fibrinhydrolysates Flecken von Leucin, Isoleucin, Valin, Phenylalanin, Tyrosin, Threonin, Glykokoll, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Arginin und Lysin; nach dem Gruppentrennungsversuch waren die Flecken von Glutaminsäure, Asparaginsäure, Arginin und Lysin im Gegensatz zu den übrigen unveränderten Flecken praktisch verschwunden.

Zusammenfassung.

Es wird ein Verfahren zur Entsalzung von salzhaltigen Lösungen neutraler Aminosäuren beschrieben. Diese werden im Kreislauf durch ein System gepumpt, das aus zwei Adsorptionssäulen besteht. Die eine der Säulen ist mit einem schwach basischen und die andere mit einem schwach sauren Ionenaustauscher beschickt. Nach beendeter Operation enthält die basische Säule die Anionen und die saure Säule die Kationen der anfänglich vorhandenen Salze; die neutralen Aminosäuren bleiben in Lösung.

Nach dem gleichen Prinzip lässt sich die Gruppentrennung von Eiweisshydrolysaten durchführen, indem die sauren Aminosäuren als Anionen und die basischen, mit eventueller Ausnahme des Histidins, als Kationen adsorbiert werden.

Als basischer Austauscher diente Amberlite IR-4B, als saurer Austauscher Amberlite IRC-50 oder ein Harz IC, dessen Herstellung aus Brenztraubensäure, Phenol und Formaldehyd beschrieben wird.

Organ.-chem. Anstalt der Universität Basel.

¹⁾ C. E. Dent, Biochem. J. **43**, 169 (1949).

²⁾ R. J. Williams & H. Kirby, Science **107**, 481 (1948).