

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.

ben hier den der Methode zugrunde liegenden Diffusionsvorgang durch folgende Gleichungen:

$$D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} = \frac{\partial c}{\partial t}, \quad (2)$$

$$c = c_0 \quad (x = 0, \quad t > 0), \quad (3)$$

$$\alpha c + \beta \frac{\partial c}{\partial x} + \gamma \frac{\partial c}{\partial t} = 0 \quad (x = d, \quad t > 0), \quad (4)$$

$$c = 0 \quad (0 < x \leq d, \quad t = 0), \quad (5)$$

wobei in den Bezeichnungen von I

$$c_0 = k_{M/R} c_R, \quad (6)$$

$$\alpha = \frac{V}{k_{M/A}} \geq 0, \quad \beta = QD \geq 0, \quad \gamma = \frac{\Phi}{k_{M/A}} \geq 0 \quad (7)$$

ist. Dieser Ansatz ist allgemeiner und gibt die Verhältnisse besser wieder als der in I, da dort an Stelle der Randbedingung (4) vereinfachend

$$c = 0 \quad (x = d, \quad t > 0) \quad (8)$$

gesetzt ist. (8) wird in I, 4 damit begründet, dass für die verwendeten Substanzen $c(d, t) \ll c(0, t)$ ist.

Wie ändert sich nun (1), wenn (8) durch (4) ersetzt wird?

2. Berechnung der Induktionszeit. – (2), (3) und (5) wurden bereits in I begründet. Zur neuen Randbedingung (4) gelangen wir durch folgende Überlegung. Aus dem Außenraum A [I, Fig. 1] wird die Substanz S einerseits in der Konzentration $c_A(t)$ mit der Volumenströmungsgeschwindigkeit V entfernt, und andererseits diffundiert S aus dem Reservoir R durch die Membran M mit dem Querschnitt Q in den Raum A hinein. Für die Summe dieser Ströme gilt, wenn D die Diffusionskonstante von S in M und Φ das Volumen von A ist,

$$-Vc_A - QD \frac{\partial c}{\partial x} = \Phi \frac{\partial c_A}{\partial t} \quad (x = d, \quad t > 0). \quad (9)$$

Wie in I setzen wir noch voraus, dass an der Stelle $x = d$ bezüglich S Gleichgewicht herrsche:

$$c = k_{M/A} c_A \quad (x = d, \quad t > 0). \quad (10)$$

Dann ergibt sich die Randbedingung (4) durch Elimination von c_A aus (9) und (10) unter Berücksichtigung von (7).

Zur Berechnung von L bilden wir wie in I, 2. 2

$$N(t) = A \int_0^t \int_0^d c(x, \tau) \varphi(x) dx d\tau \quad (11)$$

mit

$$\varphi(x) = e^{-\mu(d-x)}. \quad (12)$$

Doch werden wir hier nicht wie in I mit einem expliziten Ausdruck für $c(x, t)$ arbeiten, sondern, ähnlich wie in einer früheren Arbeit²⁾, nur die Gleichungen (2)–(5) verwenden

²⁾ F. GRÜN & B. MARZETTA, Helv. physica Acta 32, 339 (1959).

und ausnützen, dass $c(x, t)$ für $t \rightarrow \infty$ stationär wird. Wie man z. B. der LAPLACE-Transformierten von $c(x, t)$ ansieht³⁾, gilt, wenn wir noch zur Abkürzung

$$\eta = \frac{\beta}{\alpha d + \beta} \quad (13)$$

einführen,

$$c(x, t) = c_0 \left[\eta + (1 - \eta) \left(1 - \frac{x}{d} \right) \right] + o(1) \quad (t \rightarrow \infty); \quad (14)$$

dabei konvergiert $o(1)$ für $t \rightarrow \infty$ gleichmässig in x nach 0.

Wir entwickeln $c(x, t)$ an der Stelle $x = d$ und brechen nach dem zweiten Gliede ab:

$$c(x, t) = c(d, t) - (d - x) c_x(d, t) + \int_x^d (\xi - x) c_{xx}(\xi, t) d\xi. \quad (15)$$

Hieraus erhalten wir für das zeitliche Integral

$$C(x, t) = \int_0^t c(x, \tau) d\tau \quad (16)$$

wegen (2) und (5)

$$C(x, t) = C(d, t) - (d - x) C_x(d, t) + \frac{1}{D} \int_x^d (\xi - x) c(\xi, t) d\xi. \quad (17)$$

Hier setzen wir im Integranden für c den Ausdruck aus (14) ein; dies gibt

$$\left. \begin{aligned} C(x, t) &= C(d, t) - (d - x) C_x(d, t) + \\ &+ \frac{c_0 d^2}{6 D} \left[3 \eta \left(1 - \frac{x}{d} \right)^2 + (1 - \eta) \left(1 - \frac{x}{d} \right)^3 \right] + o(1) \quad (t \rightarrow \infty). \end{aligned} \right\} \quad (18)$$

Um $C(d, t)$ und $C_x(d, t)$ zu eliminieren, ziehen wir die beiden folgenden Gleichungen heran:

$$c_0 t = C(d, t) - d C_x(d, t) + \frac{c_0 d^2}{6 D} (2 \eta + 1) + o(1) \quad (t \rightarrow \infty), \quad (19)$$

$$0 = \alpha C(d, t) + \beta C_x(d, t) + \gamma \eta c_0 + o(1) \quad (t \rightarrow \infty). \quad (20)$$

(19) geht aus (18) hervor, indem man hier $x = 0$ setzt, und (20) folgt aus der Randbedingung (4) durch Integration nach t und unter Berücksichtigung von (5) und (14). Dem System (18)–(20) entnehmen wir nun

$$C(x, t) = A(x) t - B(x) + o(1) \quad (t \rightarrow \infty) \quad (21)$$

mit

$$A(x) = c_0 \left[\eta + (1 - \eta) \left(1 - \frac{x}{d} \right) \right], \quad (22)$$

$$\left. \begin{aligned} B(x) &= \frac{c_0 d^2}{6 D} \left\{ (2 \eta + 1) \left[\eta + (1 - \eta) \left(1 - \frac{x}{d} \right) \right] - \right. \\ &\left. - 3 \eta \left(1 - \frac{x}{d} \right)^2 - (1 - \eta) \left(1 - \frac{x}{d} \right)^3 \right\} + \frac{c_0 \gamma}{\alpha} \eta (1 - \eta) \frac{x}{d}. \end{aligned} \right\} \quad (23)$$

³⁾ R. COURANT & D. HILBERT, Methoden der mathematischen Physik II, Berlin 1937, S. 210.

Nach der Definition der Induktionszeit L erhalten wir aus (11) nach Vertauschung der Integrationen und mit Rücksicht auf (16) und (21)

$$L = \frac{\int_0^d B(x) \varphi(x) dx}{\int_0^d A(x) \varphi(x) dx}. \quad (24)$$

Setzen wir hier noch φ , A und B gemäss (12), (22) und (23) ein, so gelangen wir schliesslich zur gesuchten Beziehung zwischen L und D :

$$L = \frac{d^2}{D} F_1 + \frac{\gamma}{\alpha} F_2 \quad (25)$$

mit

$$F_1 = \frac{1+2\eta}{6} - \frac{\eta G_2 + (1-\eta) G_3}{\eta G_0 + (1-\eta) G_1}, \quad (26)$$

$$F_2 = \eta(1-\eta) \frac{G_0 - G_1}{\eta G_0 + (1-\eta) G_1}, \quad (27)$$

$$G_\nu = G_\nu(\mu d) = \frac{(\mu d)^{-\nu}}{\nu!} \int_0^{\mu d} e^{-z} z^\nu dz \quad (\nu = 0, 1, 2, 3). \quad (28)$$

G_ν findet man als leichte Modifikation der unvollständigen Gammafunktion in Tafelwerken⁴⁾.

Im Spezialfall (8) der Randbedingung (4) ist $\beta/\alpha = \gamma/\alpha = 0$, und damit nach (13) auch $\eta = 0$. Mit diesen Werten folgt aus (25)

$$L = \frac{d^2}{D} \left(\frac{1}{6} - \frac{e^{\mu d} - 1 - \mu d - (\mu d)^2/2 - (\mu d)^3/6}{(\mu d)^2 (e^{\mu d} - 1 - \mu d)} \right). \quad (29)$$

Dies ist (1) in ausführlicher Schreibweise und stimmt mit (15)–(16) aus I überein.

3. Diskussion. – Zunächst bemerken wir, dass (25) für die Auswertung der in I mitgeteilten Versuche zu

$$L = \frac{d^2}{D} F_1 \quad (30)$$

vereinfacht werden darf. Denn einerseits gilt dort für die Versuchsparameter

$$0 \leq \gamma/\alpha = \Phi/V < 10^{-2} \text{ s}, \quad L > 10^2 \text{ s}, \quad (31)$$

und andererseits ist, wie man aus (27) und (28) leicht entnimmt,

$$0 \leq F_2 < 1 \quad (0 \leq \eta \leq 1; \quad 0 \leq \mu d < \infty). \quad (32)$$

Aus (31) und (32) folgt aber

$$0 \leq \frac{\gamma}{\alpha} F_2 < 10^{-4} L, \quad (33)$$

und dies bedeutet, dass der zweite Summand in (25) ohne weiteres vernachlässigt werden kann.

Wir können uns daher darauf beschränken, die Funktion $F_1 = F_1(\mu d, \eta)$ zu diskutieren. Ihre Abhängigkeit von μd ist hier 1 für einige spezielle Werte von η gra-

⁴⁾ E. JAHNKE & F. EMDE, Funktionentafeln, Leipzig 1938.

phisch dargestellt. Für die Differenz

$$\Delta F_1 = F_1(\mu d, \eta) - F_1(\mu d, 0) \quad (34)$$

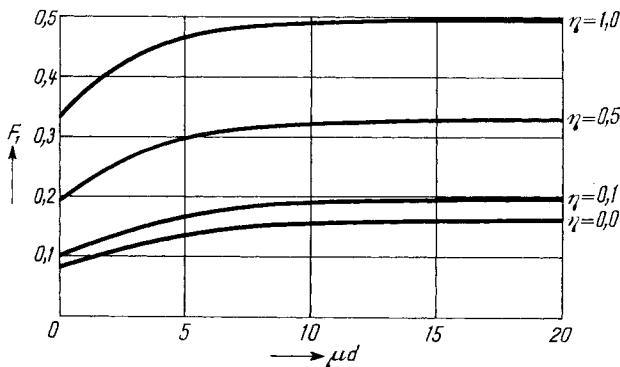
entnimmt man der Figur die Abschätzung

$$\frac{\eta}{6} \leq \Delta F_1 \leq \frac{\eta}{3} \quad (0 \leq \eta \leq 1; 0 \leq \mu d < \infty). \quad (35)$$

Zum Beweise dieser Ungleichungen bildet man ΔF_1 nach (26) und rechnet auf Grund der Definitionen (28) nach, dass $0 \leq G_1 G_2 - G_0 G_3 \leq G_1^2/6$ für alle $\mu d \geq 0$ gilt.

Jetzt können wir leicht angeben, wie gross der Fehler wird, wenn man D nach (30) berechnet, dabei aber η durch 0 ersetzt. Für den absoluten Fehler ΔD erhält man aus (30) und (35)

$$0 \leq \Delta D = \frac{d^2}{L} \Delta F_1 \leq \frac{d^2}{3L} \eta. \quad (36)$$



Berücksichtigt man hier, dass nach (13) und (7)

$$\eta \leq \frac{Q D k_{M/A}}{V d} \quad (37)$$

ist, so folgt aus (36) für den relativen Fehler

$$0 \leq \frac{\Delta D}{D} \leq \frac{Q d k_{M/A}}{3 V L}. \quad (38)$$

Damit lässt sich die in I gestellte Frage vollständig beantworten:

Berechnet man D wie in I nach der Formel (29) statt nach (25), gilt dabei wie in I

$$Q = 10 \text{ cm}^2, \quad V = 3 \cdot 10^3 \text{ cm}^3/\text{s}, \quad d/L < 3 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}, \quad (39)$$

und ist

$$k_{M/A} < 3 \cdot 10^5, \quad (40)$$

so beträgt nach (38) der relative Fehler höchstens 1%. Da die durch die übrigen Ungenauigkeiten der Methode verursachten Fehler mindestens ebenso gross sind, ist die in I vorgenommene Vereinfachung gerechtfertigt.

Diese Mitteilung gehört zu einem vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG subventionierten Forschungsprojekt; wir danken auch hier für die uns gewährten Mittel.

SUMMARY

In a diffusion experiment a radioactively tagged substance diffuses into and through a membrane and is observed with a G. M. counter. The time lag L associated with the approach to the steady counting rate is calculated. Although the diffusion problem has rather general boundary conditions, L is obtained in a simple way by making appropriate use of the easily available asymptotic solution of the problem without having to resort to the explicit solution.

Physikalisch-chemische Anstalt der Universität Basel
und Polymer Department, The WEIZMANN Institute of Science, Rehovoth

136. Resolution von DL-p-Bromphenylalanin

von R. Schwyzer und E. Surbeck-Wegmann¹⁾

(20. IV. 60)

Für verschiedene synthetische Zwecke benötigten wir grössere Mengen von D- und L-p-Bromphenylalanin. Die Herstellung dieser Antipoden ist bisher nicht beschrieben worden; im Folgenden möchten wir einen relativ einfachen und ergiebigen Weg zu deren Herstellung angeben.

Da in Vorversuchen²⁾ enzymatische Methoden zur Trennung (D-Aminosäureoxydase³⁾ – welche nur sehr langsam einwirkt und überdies den D-Antipoden zerstört –, sowie partielle Synthese des Acetyl-L-p-bromphenylalanin-p-toluidids⁴⁾ und -phenylhydrazids⁵⁾ mit Papain analog den entsprechenden Reaktionen mit DL-Phenylalanin versagt hatten, wurden chemische Methoden versucht. Am besten bewährte sich die Trennung der Aminosäure-ester mittels Dibenzoyl-D- und -L-weinsäure.

Ausgehend vom leicht zugänglichen DL-p-Bromphenylalanin (I)⁶⁾ wurden dessen Äthylester II⁶⁾ und Methylester IIa dargestellt. Diese wurden – analog der Vorschrift von LANGENBECK & HERBST für die Resolution von DL-Phenylalanin⁷⁾ – mit der halben molaren Menge von Dibenzoyl-D-weinsäure umgesetzt (siehe Formelschema), worauf die neutralen Dibenzoyl-D-tartrate der Ester des D-p-Bromphenylalanins (III bzw. IIIa) als schwerlösliche Diastereomere anfielen und durch Kristallisation aus Äthanol gereinigt werden konnten. Die Behandlung der in der Mutterlauge verbliebenen Dibenzoyl-D-tartrate (enthaltend viel IV und IVa und wenig III und IIIa) mit Salzsäure lieferte Ester-hydrochloride, welche noch ca. 30% Racemat enthielten, sich aber nicht (wie im Falle des Phenylalanins⁸⁾) durch Kristallisation auf reine

¹⁾ Teil der Diplomarbeit von Frau E. SURBECK-WEGMANN, phil. Fakultät II der Universität Zürich, 1958.

²⁾ Niedergelegt in der erwähnten Diplomarbeit¹⁾.

³⁾ J. R. PARIKH, J. P. GREENSTEIN, M. WINITZ & S. M. BIRNBAUM, J. Amer. chem. Soc. 80, 953 (1958).

⁴⁾ C. NIEMANN & H. T. HUANG, J. Amer. chem. Soc. 73, 475 (1951).

⁵⁾ C. NIEMANN & L. BENNETT, J. Amer. chem. Soc. 72, 1798 (1950).

⁶⁾ A. DORNOW & G. WINTER, Chem. Ber. 84, 307 (1951).

⁷⁾ W. LANGENBECK & O. HERBST, Chem. Ber. 86, 1524 (1953).

⁸⁾ G. LOSSE & H. JESCHKEIT, Chem. Ber. 90, 1275 (1957).