

Kurze Mitteilungen

Bis am 15. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht. Es werden auch Manuskripte aus dem Ausland angenommen. Maximalumfang: 6 Schreibmaschinenseiten (alles inbegriffen)

Graphische Bestimmung der Gleichgewichtszusammensetzung im Ionenaustausch*

Summary

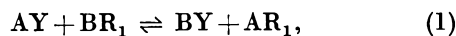
If an ion exchanger is contacted with a dilute solution the amount of ions, adsorbed by the exchanger together with the co-ions, is negligible. In a stationary system (batch system) of determined amounts of the solid phase, the exchanger, and the liquid phase, the dilute solution, the momentary increase of the absolute quantity of one ion, f.i. of the A-ion, in one of the phases is equal to the momentary decrease of the absolute quantity of the same ion in the other phase. The relation between the changes of the equivalent ionic fractions in the phases is consequently reciprocal to the relation between the total ion contents of the phases. The total ion content of the exchanger is its total capacity, RC_R , that of the solution is LC_L . This relation is valid during the whole ion exchange reaction.

The coordinates in the usual ion exchange phase diagram are the equivalent ionic fractions in the phases. The composition of a certain system is represented by a point with the corresponding coordinates and the change of the composition by a line. As consequence of the relation above, in the present case this line is a straight one, the slope of which having the tangent equal to the relation between the ion content of the solution to the total capacity of the exchanger. To determine the equilibrium composition of a given system a straight line with the predetermined slope has to be drawn through the point, corresponding to the initial state of the system. This line cuts the exchange isotherm in the point, the coordinates of which are the equivalent ionic fractions in the equilibrium.

Unlike to the mathematical method of the determination of the equilibrium composition this graphical method is independent of the shape of the isotherm.

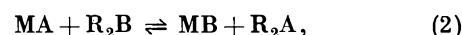
Im statischen Ionenaustausch wird eine bestimmte Menge eines Ionenaustauschers mit einer bestimmten Menge einer Lösung, die solche Ionen enthält, welche gegen die Ionen des Ionenaustauschers ausgetauscht werden können, solange gerührt, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Nachfolgend soll das einfachste System betrachtet werden, in dem nur zwei einwertige gleichnamige Ionen, A und B, vorhanden sind. Im Gleichgewicht verteilen sich diese Ionen zwischen der festen und der flüssigen Phase; wenn die Bedingungen identisch sind, so stellt sich immer dasselbe Gleichgewicht ein. A und B können beide Kationen oder beide Anionen sein.

In einem Kationenaustausch findet folgende Reaktion statt:



wo A und B einwertige Kationen (Gegenionen**),
Y ein einwertiges Anion in der flüssigen Phase (Co-Ion),
R₁ das Anion der festen Phase (Festion) sind.

Handelt es sich um einen Anionenaustausch, so läßt sich die Reaktion wie folgt beschreiben:



wo A und B einwertige Anionen (Gegenionen),
M ein einwertiges Kation in der flüssigen Phase (Co-Ion),
R₂ das Kation der festen Phase (Festion) sind.

Die nachfolgenden Betrachtungen beziehen sich auf praktisch vollständig dissoziierte Ionenaustauscher, die man als «stark» zu bezeichnen pflegt. Ihre Totalkapazität ist von der Konzentration der Lösung, vom pH und von anderen Versuchsbedingungen unabhängig. Weiterhin soll die Konzentration der Lösung so niedrig sein, daß die Menge der in die feste Phase eindiffundierenden Co-Ionen vernachlässigbar ist.

In dem sich einstellenden Gleichgewicht sind in der festen Phase \bar{m}_A -A-Ionen und \bar{m}_B -B-Ionen, in der flüssigen Phase m_A - und m_B -Ionen enthalten, alle in Äquivalenten gemessen. Da nur die beiden Ionen zugegen sind, gilt für die feste Phase:

$$\bar{m}_A + \bar{m}_B = RC_R, \quad (3)$$

wo R die Menge des wasserfrei getrockneten Kationenaustauschers in kg, beim Kationenaustauscher mit H-Ionen, beim Anionenaustauscher mit OH-Ionen beladen und

C_R die Gesamtkapazität des Austauschers in Äquivalenten pro kg getrockneten Ionenaustauscher

und für die flüssige Phase:

$$m_A + m_B = LC_L, \quad (4)$$

wo L die Menge des Lösungsmittels in kg,

C_L ihre Konzentration in Äquivalenten pro kg Lösungsmittel angeben.

Mit γ soll der Äquivalentanteil eines Ions bezeichnet werden, wobei für die Lösung folgendes gilt:

$$\gamma_A = \frac{m_A}{m_A + m_B} \quad \text{und} \quad \gamma_B = \frac{m_B}{m_A + m_B}. \quad (5)$$

* Eingegangen am 25. August 1971.

** Definitionen und Bezeichnungen entsprechen weitgehend denen von HELFFERICH, *Ionenaustauscher*, Verlag Chemie, Weinheim 1959.

Analoge Beziehungen bestehen für den Ionenaustauscher.

Daraus folgt folgendes:

$$\gamma_A + \gamma_B = 1 \quad \text{und} \quad \bar{\gamma}_A + \bar{\gamma}_B = 1. \quad (6)$$

Das Gleichgewicht ist charakterisiert durch folgenden Zusammenhang

$$T_B^A = \frac{\bar{\gamma}_A \cdot \gamma_B}{\bar{\gamma}_B \cdot \gamma_A}. \quad (7)$$

T_B^A ist die Trennkonstante, die nur innerhalb eines bestimmten Bereichs konstant ist. Ihr Wert hängt von $\bar{\gamma}_A$ ab. Die experimentell bestimmten Werte von T_B^A werden deshalb anhand der Austauschisotherme benutzt, die auf der Figur dargestellt ist. Als Abszisse gilt γ_A , als Ordinate $\bar{\gamma}_A$.

Oft steht man vor der Aufgabe, in einem durch den Anfangszustand charakterisierten System die Zusammensetzung der Phasen im Gleichgewicht berechnen zu müssen. Man geht dabei von den Gleichungen (6) und (7) aus und erhält:

$$T_B^A = \frac{\bar{\gamma}_A (1 - \gamma_A)}{(1 - \bar{\gamma}_A) \cdot \gamma_A}. \quad (8)$$

Da in dieser Gleichung zwei Unbekannte, γ_A und $\bar{\gamma}_A$, enthalten sind, braucht man noch eine zweite Gleichung. Dies ergibt sich aus der Tatsache, daß die Abnahme der absoluten Menge des einen Ions in der einen Phase mit der Zunahme der absoluten Menge desselben Ions in der anderen Phase gleich ist.

Die Menge der von einer in die andere Phase überwechselnden Ionenart A soll mit g'_A bezeichnet werden, so daß für ihre absoluten Werte gilt:

$$[g'_A] = [\bar{g}'_A]. \quad (9)$$

Beide Werte sind in Äquivalenten gemessen. Wenn man sie in Äquivalentanteilen ausdrücken will, so erhält man

$$g_A = \frac{g'_A}{LC_L} \quad \text{und} \quad \bar{g}_A = \frac{\bar{g}'_A}{RC_R}. \quad (10)$$

Daraus ergibt sich folgendes:

$$g_A LC_L = \bar{g}_A RC_R. \quad (11)$$

Der Anfangszustand ist durch die Werte $\bar{\gamma}_{A,0}$ und $\gamma_{A,0}$ in der festen bzw. in der flüssigen Phase ausreichend charakterisiert. Im Gleichgewicht wird also die Zusammensetzung der Phasen sein:

$$\bar{\gamma}_A = \bar{\gamma}_{A,0} - \bar{g}_A \quad \text{und} \quad \gamma_A = \gamma_{A,0} - g_A. \quad (12)$$

Durch Benützung der Gleichungen (8), (11) und (12) ergibt sich eine Gleichung zweiten Grades mit einer Unbekannten, die sich leicht lösen läßt.

Wenn T_B^A konstant ist, so erhält man zwar in einer relativ einfachen Rechnung die Zusammensetzung der Phasen im Gleichgewicht. Muß man aber in einer speziellen Aufgabe diese Zusammensetzung nacheinander mehrmals berechnen, so wird sie doch zeitraubend. Natürlich kann man mit Hilfe eines Computers schnell vorkommen. Ist aber T_B^A nicht konstant, so geht man von einem wahrscheinlichen Wert aus, führt die Rechnung durch und vergleicht die erhaltenen Werte der Zusammensetzung der Phasen mit der Isothermen, ob für sie der angenommene Wert noch gilt. Wenn nicht, so kann man durch Iteration den endgültigen Wert erhalten. Man kann auch so vorgehen, daß man die Austauschisotherme durch eine Annäherungsfunktion ersetzt, die dann, vor allem mit Hilfe eines Computers, direkt zum Endergebnis führt.

Viel einfacher gelangt man zum Endergebnis graphisch, unbeachtet dessen, ob T_B^A konstant oder variabel ist. Der Zusammenhang (11) gilt in jedem Zeitpunkt, da er nichts anderes darstellt als die Erhaltung der Masse während der Austauschreaktion. Nach einer Umformung erhält man:

$$\bar{g}_A = g_A \frac{LC_L}{RC_R}. \quad (13)$$

Gl. (13) stellt eine Gerade mit einem Neigungswinkel zu der Abszissenachse dar, dessen Tangens $\frac{LC_L}{RC_R}$ ist. Man trägt in das Phasendiagramm den Anfangszustand als einen Punkt ein, dessen Ordinaten $\gamma_{A,0}$ und $\bar{\gamma}_{A,0}$ sind. Aus diesem zieht man die Gerade mit dem bestimmten Neigungswinkel bis zur Austauschisothermen durch. Der Schnittpunkt beider Linien ergibt mit seinen Ordinaten die Zusammensetzung der Phasen im Gleichgewicht.

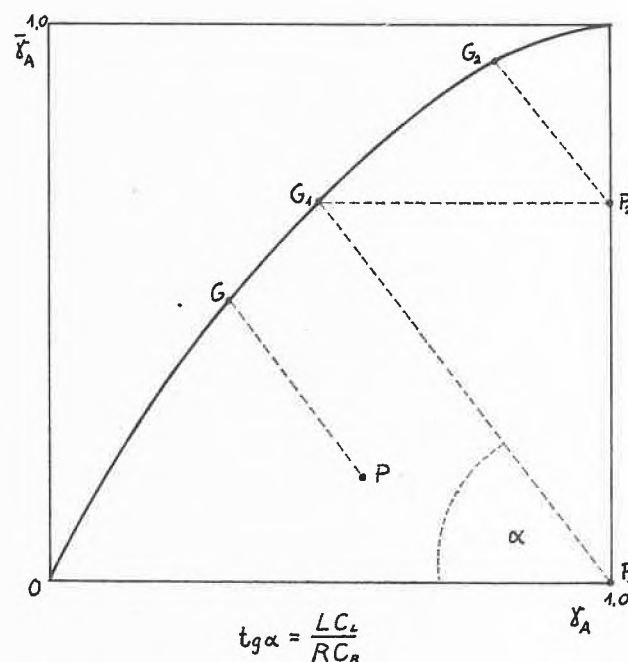


Abb. 1

Das Verfahren läßt sich dann vorteilhaft anwenden, wenn man in einem System mit einem konstanten Verhältnis zwischen RC_R und LC_L mehrmals hintereinander Gleichgewichtszusammensetzungen bestimmen will. Die die Anfangszustände charakterisierenden Punkte werden in das Diagramm eingetragen und die Geraden parallel zueinander gezogen.

In Abb. 1 sind drei Beispiele dargestellt. Im ersten betragen die Werte von $\bar{\gamma}_{A,0}^0$, von $\gamma_{A,0}^1$. P_1 entspricht dem Anfangszustand. G_1 gibt die Gleichgewichtszusammensetzung bei dem angenommenen Verhältnis zwischen RC_R und LC_L an. Wenn Lösung und Austauscher nach Einstellung dieses Gleichgewichtes getrennt und der Austauscher mit frischer Lösung derselben Menge und Zusammensetzung versetzt werden, so wird die Zu-

sammensetzung des neuen Systems zu Beginn durch den Punkt P_2 gegeben. Daraus erhält man die Gleichgewichtszusammensetzung mit Hilfe des Punktes G_2 . Auf diese Weise kann man die analog aufgebauten nacheinanderfolgenden Systeme behandeln, ohne daß dazu viel Zeit notwendig wäre. Ein drittes System mit einem beliebig liegenden Anfangspunkt P ergibt im Gleichgewicht anhand des Punktes G die Zusammensetzung der Phasen.

Es soll versucht werden, mit Hilfe dieses Verfahrens verschiedene Fragen des technischen Ionenaustausches zu klären.

SANDOR VAJNA

Chemisches Forschungslaboratorium, 534 Bad Honnef (BRD)

Cycloadditionen eines intermediären Trimethylen-diradikals*

Summary

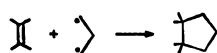
It has been shown possible to trap the intermediate in cyclopropane thermolysis, the ring-opened form or trimethylene diradical, in an intramolecular formal $[2\pi + 2\sigma]$ -cycloaddition reaction. The resulting bishomocyclopentadienes have been characterized by their behaviour towards strong bases. A forbidden thermal disrotatory opening of a cyclopropyl anion is also described. In case of the DIELS-ALDER adducts of cyclopropenes with fulvenes the $[2\pi + 2\sigma]$ -cycloaddition has not been realized. However, when the adducts of cyclopropenes and cyclopentadienone ketals are submitted to this intramolecular valence isomerization, tetracyclooctanones are available in high yields. The mechanistic aspects are discussed, and on the basis of extended HÜCKEL calculations a stepwise cycloaddition has been shown to be the most probable pathway.

Für die geometrische und strukturelle Isomerisierung des Cyclopropans wird heute der folgende Mechanismus allgemein akzeptiert.



Das Auftreten des Trimethylen-diradikals 1 als Zwischenstufe wird durch zahlreiche experimentelle und theoretische Untersuchungen gestützt¹. Jedoch ist die Frage nach der Natur dieses geöffneten Cyclopropans bis jetzt noch nicht geklärt².

Versuche, das intermediäre Trimethylen-diradikal 1 durch Abfangreaktionen im Sinne einer – möglicherweise konzertierten³ – Cycloaddition



nachzuweisen, hatten bisher keinen Erfolg⁴. Die geringe Lebensdauer dieses Diradikals, seine niedrige stationäre Konzentration⁵ und seine Instabilität, die aus Berechnungen des Diradikalcharakters folgt⁶, lassen dieses Verhalten nicht ungewöhnlich erscheinen.

Die Wahrscheinlichkeit, Cycloadditionen des Trimethylen-diradikals zu beobachten, sollte sich durch Berücksichtigung der folgenden zwei Punkte erhöhen lassen:

- Beide Reaktionspartner befinden sich in ein und derselben Molekel. Man wählt also den intramolekularen Reaktionsweg und gewährleistet so «äquimolare» Mengen der reagierenden Zentren.
- Der Abstand der zu verknüpfenden Atome wird relativ klein gehalten, um auch sehr kurzlebige Gebilde abfangen zu können.

Aus diesen Gründen untersuchten wir das thermische Verhalten geeigneter substituierter Derivate des Tricyclo[3.2.1.0^{2,4}]oct-6-ens,



eines Systems, das die oben gestellten Forderungen in nahezu idealer Weise erfüllen sollte.

* Vorläufige Mitteilung. Vorgetragen auf der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft am 9. Oktober 1971 in Freiburg.

¹ a) H. E. O'NEAL und S. W. BENSON, *J. Physic. Chem.* 72 (1968) 1866; b) R. G. BERGMAN und W. L. CARTER, *J. Amer. Chem. Soc.* 91 (1969) 7411; dort weitere Literatur.

² a) R. HOFFMANN, *Theory of the Structure and Reactivity of Small Rings*, in Vorbereitung; b) E. F. HAYES und A. K. Q. SIU, *J. Amer. Chem. Soc.* 93 (1971) 2090; c) L. SALEM, *Chem. Comm.* 1970, 981; Y. JEAN und L. SALEM, *Chem. Comm.* 1971, 382.

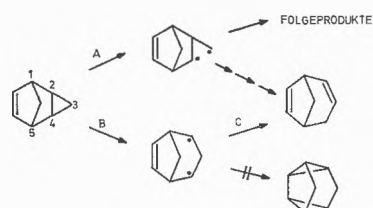
³ R. HOFFMANN, *J. Amer. Chem. Soc.* 90 (1968) 1475.

⁴ a) R. J. CRAWFORD und A. MISHRA, ebenda 88 (1966) 3963; b) M. C. FLOWERS und H. M. FREY, *J. Chem. Soc. (London)* 1960, 2758.

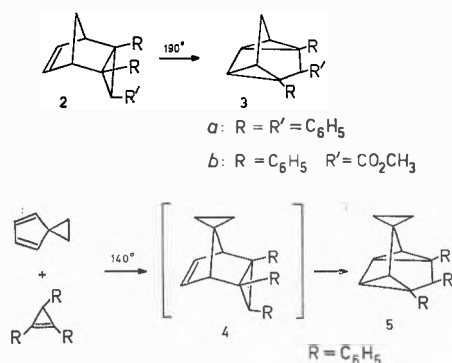
⁵ S. W. BENSON, *J. Chem. Physics* 34 (1961) 521.

⁶ Siehe Zitat 2b und 2c.

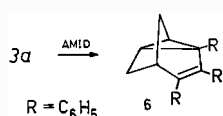
Thermische Umwandlungen sind an diesen Trizyklen beschrieben worden⁷, in keinem Fall jedoch wurde Valenzisomerisierung zum Tetracyclus beobachtet. Vielmehr scheint der Primärschritt der Thermolyse in einer Öffnung einer äußeren Dreiringbindung (Weg A) zu bestehen, bzw. Wasserstoffwanderung (Weg C) konkurriert erfolgreich mit der Cycloaddition.



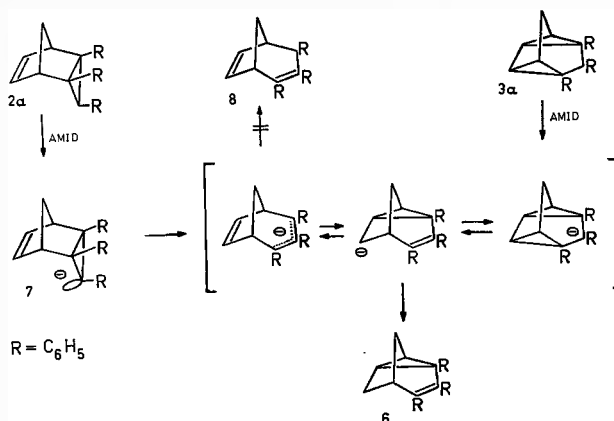
Die Voraussage, mit Hilfe aktivierender Substituenten in 2,4-Position eine Spaltung nach B begünstigen zu können, wurde von uns am Beispiel der Triphenyltricyclooctene 2 bzw. 4 bestätigt und somit eine intramolekulare $[2\pi + 2\sigma]$ -Cycloaddition realisiert⁸.



Die Strukturen 3 bzw. 5 sind durch zahlreiche spektrale Daten gesichert. Jedoch erschien es wünschenswert, zusätzliche Information aufgrund charakteristischer Reaktionen zu gewinnen. Setzt man 3a mit Lithium-Äthylen-diamid⁹ um, so tritt augenblicklich eine tiefviolette Farbe auf. Als einziges Produkt wird 6 isoliert.



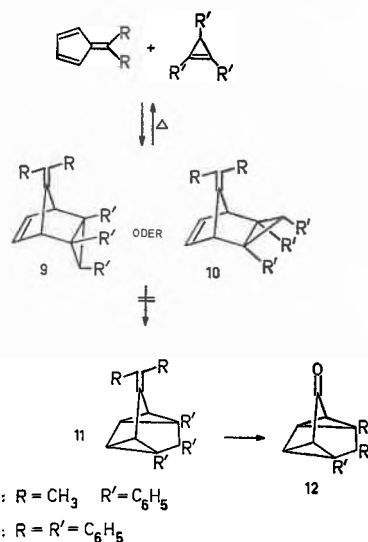
Die bevorzugte Bildung von 6 bei Baseneinwirkung auf 3a ist nicht unerwartet¹⁰. Überraschend jedoch ist, daß sich auch Trizyklus 2a unter den gleichen Bedingungen zu 6 isomerisiert. Dies ist nur möglich über eine disrotatorische Öffnung des Cyclopropylanions 7¹¹, die durch die relativ hohe Reaktionstemperatur (100°C) begünstigt sein kann. 2 fügt sich somit in die Reihe der basisch ineinander überführbaren Kohlenwasserstoffe vom Typ 3, 6 und 8 ein. Formelschema 1 könnte einen möglichen Reaktionsweg repräsentieren. Einen Hinweis für das Auftreten nichtklassischer Ionen haben wir im Augenblick nicht.



Formelschema 1

Eine wichtige synthetische Anwendung dieser intramolekularen Cycloaddition erhofften wir uns von den Diels-Alder-Addukten des Triphenylcyclopropens an Fulvene. Über diese Valenzisomerisierung würde ein bequemer Weg zu 3-Methylen-tetracyclo[3.3.0.0^{2,8}.0^{4,6}]octanen 11 eröffnet und somit, durch anschließende Ozonolyse, zu Tetracyclo[3.3.0.0^{2,8}.0^{4,6}]octan-3-onen 12.

Triphenylcyclopropen vereinigt sich mit Dimethyl- und Diphenylfulven zu 1:1-Addukten, für die sich die



Formelschema 2

⁷ z. B. H. PRINZBACH, W. EBERBACH, M. KLAUS und G. V. VEH, *Chem. Ber.* 101 (1968) 4066.

⁸ a) H. PRINZBACH und H.-D. MARTIN, *Helv. Chim. Acta* 51 (1968) 438; auch in allen später aufgefundenen Reaktionen dieser Art ist der Substituenteneinfluß zu erkennen^{8b-8d}; b) P. B. SARGEANT, *J. Amer. Chem. Soc.* 91 (1969) 3061; c) D. T. LONGONE und D. M. STEROUWER, *Tetrahedron Letters* 1970, 1017; d) L. A. PAQUETTE und L. M. LEICHTER, *J. Amer. Chem. Soc.* 92 (1970) 1765.

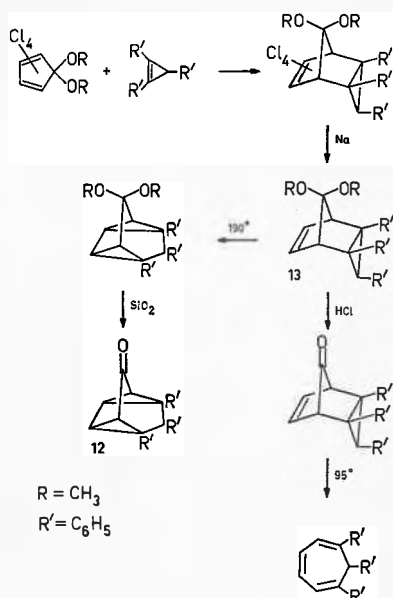
⁹ L. REGGEL, S. FRIEDMAN und I. WENDER, *J. Org. Chemistry* 23 (1958) 1136.

¹⁰ a) S. WINSTEIN in *Nonclassical Ions and Homoaromaticity*, Chemical Society Special Publ. No. 21 (1967) 5; b) W. EBERBACH und H. PRINZBACH, *Chem. Ber.* 102 (1969) 4164.

¹¹ a) G. WITTIG, V. RAUTENSTRAUCH und F. WINGLER, *Tetrahedron Suppl.* 7 (1966) 189. b) Die in Zitat 10b durch H/D-Austausch nachgewiesenen Cyclopropylanionen sind nicht zur disrotatorischen Öffnung befähigt.

Strukturen 9 bzw. 10 anbieten. Die thermische Behandlung führt jedoch nicht in der gewünschten Weise zu 11 (und somit auch zu 12), sondern ergibt unter Retro-Dien-Zerfall lediglich die Ausgangsprodukte (Formelschema 2).

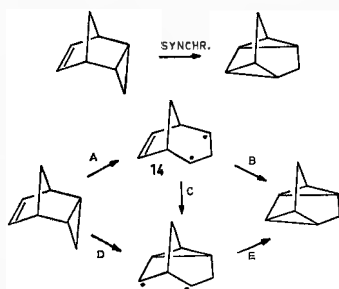
Carbonylverbindungen vom Typ 12 beanspruchen erhebliches Interesse, gestatten sie es doch, Cyclopropylkonjugation unter nahezu idealen Verhältnissen zu studieren¹². Während für das unsubstituierte Keton ein bequemer Zugang eröffnet wurde^{12a}, mangelte es an vergleichbar einfachen Synthesen für spezifisch substituierte Derivate. Über eine $[2\pi + 2\sigma]$ -Thermocycloaddition, ausgehend vom Ketal 13, wird 12 in sehr guten Ausbeuten zugänglich (Formelschema 3).



Formelschema 3

Unsere Spekulationen über den Reaktionsverlauf dieser Cycloaddition haben zu folgender Hypothese geführt. *A priori* sind die Wege A-B, D-E bzw. A-C-E denkbar. Ein konzertierter Mechanismus steht im Widerspruch zu gängigen Vorstellungen (siehe auch Abb. 2)¹³.

Weg A-B beinhaltet die konzertierte Cycloaddition eines Trimethyldiradikals 14, A-C-E wäre die schrittweise Addition desselben, und D-E stellt den tany-cyclophilen¹⁴ Angriff der Doppelbindung dar. Nach Berechnungen von HOFFMANN³ wird die synchrone Cyclo-



addition von 1 aufgrund eines Niveau-Kreuzens möglich, durch welches das antisymmetrische Orbital A bei Winkeln $\alpha > 100^\circ$ unterhalb des symmetrischen S zu liegen kommt.



Jedoch lassen zwei Gesichtspunkte Zweifel daran aufkommen, ob es sich bei 14 um ein Hoffmannsches π -Cyclopropan handelt. Zum einen scheint es sicher, daß die bei der Cyclopropanthermolyse entstehende Zwischenstufe sich in wesentlichen Punkten von der Spezies unterscheidet, die intermediär bei der Pyrolyse von Pyrazolinen auftritt und auf die sich die Hoffmannschen Berechnungen zwanglos anwenden lassen¹⁵. Zum andern zeigen von uns durchgeführte erweiterte Hückel-Rechnungen, daß die Verhältnisse bei 14 gegenüber 1 etwas zu modifizieren sind (Abb. 1). 14 kann, im Gegensatz zu 1, nur durch disrotatorische Dreiringöffnung gebildet werden.

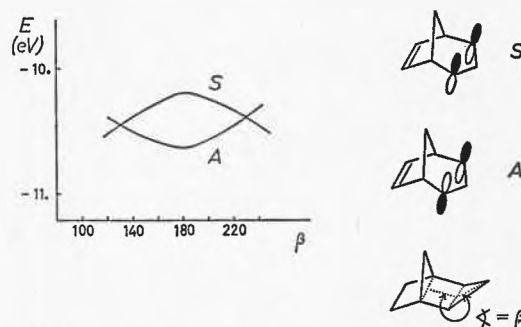


Abb. 1

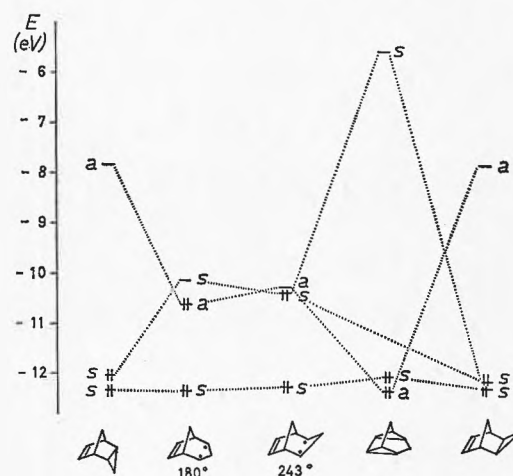


Abb. 2

¹³ a) N. A. LE BEL und R. N. LIESEMER, *J. Amer. Chem. Soc.* 87 (1965) 4301; b) W. LOTSCH und A. S. KENDE, *Angew. Chem.* 83 (1971) 581.

¹⁴ R. B. WOODWARD und R. HOFFMANN, *Angew. Chem.* 81 (1969) 797.

¹⁵ P. C. GASSMAN, *Accounts Chem. Res.* 4 (1971) 128.

¹⁶ a) P. B. CONDIT und R. G. BERGMAN, *Chem. Comm.* 1971, 4; dort weitere Literatur; b) L. M. STEPHENSON und J. I. BRAUMAN, *J. Amer. Chem. Soc.* 93 (1971) 1988.

In Abb. 2 haben wir die obersten besetzten Orbitale einiger repräsentativer Zwischenstufen mit denen der Edukte und Produkte korreliert. Die zum Ringschluß befähigte Spezies sollte einen Winkel $\beta > 180^\circ$ aufweisen. Eine konzertierte Addition von I₄ ist im Rahmen dieses Modells möglich, die Frage aber aufgrund der geringen Energiedifferenz zwischen S- und A-Orbital bei höheren Winkeln β nicht mehr relevant ^{2b,c}.

Zusammenfassend sei gesagt, daß wir Mechanismus A-B bzw. A-C-E den Vorzug geben gegenüber D-E. Jedoch spricht die offensichtlich notwendige Substitu-

tion mit radikalstabilisierenden Gruppen nicht gegen Weg D-E.

Mit Methoden zur Differenzierung zwischen diesen A-priori-Möglichkeiten haben wir begonnen.

Herrn Professor H. PRINZBACH möchte ich für die Unterstützung dieser Arbeiten und Herrn R. GLEITER, Basel, für viele Diskussionen sehr herzlich danken.

HANS-DIETER MARTIN

Chemisches Laboratorium der Universität, Albertstraße 21,
78 Freiburg im Breisgau (BRD)

Oxydation de solutions d'acide iodhydrique par l'air en présence de lumière*

Summary

The reaction $4\text{HI} + \text{O}_2 \xrightarrow{h\nu} 2\text{H}_2\text{O} + \text{I}_2$ has been studied as a possibility of regeneration of the cathodic fuel in a cell using the cathodic reaction $\text{I}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{I}^-$. The influence on the rate of reaction of the following factors has been quantitatively investigated:

- iodide, oxygen, and acid concentrations,
- light intensity,
- ratio $\frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ of the cylindrical reactor.

An equation allowing the computation of the rate of iodine formation under various conditions is proposed. - Wave length of the incident light and temperature are other parameters influencing the rate of oxydation.

1. Approche du problème

Les solutions aqueuses de KI sont oxydées par l'oxygène (formation d'une coloration brune) très lentement dans l'obscurité, plus rapidement si elles sont exposées à la lumière. La recherche bibliographique nous a menés à quelques publications datant d'avant 1927^{3,4}, dont tous les résultats ont été repris et discutés par BERTHOUD et NICOLET^{1,2}. Pour eux la vitesse de la réaction photochimique en lumière rouge est exprimée par la relation:

$$\frac{d[\text{I}_3]}{dt} = k \Phi^{0,5} [\text{I}_2]^{0,5} [\text{H}_2\text{SO}_4]^{0,5} [\text{KI}]^x [\text{O}_2]^{**}$$

Ces auteurs cherchaient une cinétique de réaction, et certaines de leurs conditions de mesure (p.ex. la source de lumière) sont insuffisamment précisées pour le but que nous voulions atteindre.

Notre but était de déterminer les conditions expérimentales sous lesquelles la quantité d'iode - combustible cathodique - la plus élevée pourra être obtenue. Pour cette détermination, il nous fallait étendre les conditions expérimentales de ¹, car ce maximum de la vitesse de formation ne se trouve pas à l'intérieur des domaines que ces auteurs ont pris en considération.

2. Appareillage

La source de lumière est un tube Philips TLD 55, 15 W, «lumière du jour», \varnothing 26 mm.

Le réacteur photochimique (fig. 1) est formé par deux tubes concentriques 1 et 2, en Pyrex, \varnothing extérieur du tube intérieur 65 mm, \varnothing intérieur du tube extérieur 142 mm, placés autour du tube fluorescent 3. Le fond 4 et le couvercle 5 sont en verre acrylique. L'étanchéité est assurée par des joints toriques. L'air (ou l'oxygène) est introduit par un tuyau PVC 6, percé de petits trous, placé au fond du réacteur.

L'espace entre le tube fluorescent et le tube de verre intérieur peut recevoir une solution colorée fonctionnant comme filtre optique. Un tube en aluminium, dont on a enlevé un secteur de 90° resp. 180° , peut être placé autour du tube fluorescent pour supprimer 75% resp. 50% de l'énergie lumineuse. Ces tubes aluminium sont montés sur le mandrin creux d'un moteur (pour laisser passer les fils d'alimentation du tube fluorescent), ce qui permet leur rotation et la répartition d'une fraction déterminée de la lumière dans la totalité du milieu réactionnel.

3. Conditions de mesure

Les mesures ont été faites à la température ambiante. La quantité d'iode formée a été déterminée par titrage avec $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Le pH est mesuré avec une électrode de verre.

L'air (ou l'oxygène) a toujours été introduit en grand excès (au moins 100 fois plus) pour saturer le milieu réactionnel.

Nous avons préparé nos solutions avec KI Ph.H.V., puis acidifié avec H_2SO_4 .

* Reçu le 8 novembre 1971.

** Symboles et unités utilisés

k_T	vitesse de formation de l'iode	méq I ₂ /l · h
T	température	°C
Φ	intensité lumineuse	W/m ²
Φ_0	intensité lumineuse en lumière blanche	W/m ²
P_{O_2}	pression d'oxygène	atm
G	facteur de forme	m ⁻¹
$[\text{H}_2\text{SO}_4]$	concentration en acide	a _H ⁺ ou éq/l
$[\text{KI}]$	concentration en KI	$[\text{KI}]^x$ (voir fig. 2)
k, k', k''	constantes de proportionnalité entre vitesse de formation et diverses concentrations. Les dimensions de ces constantes ne sont pas données ici, elles dépendent des termes présents dans les équations.	

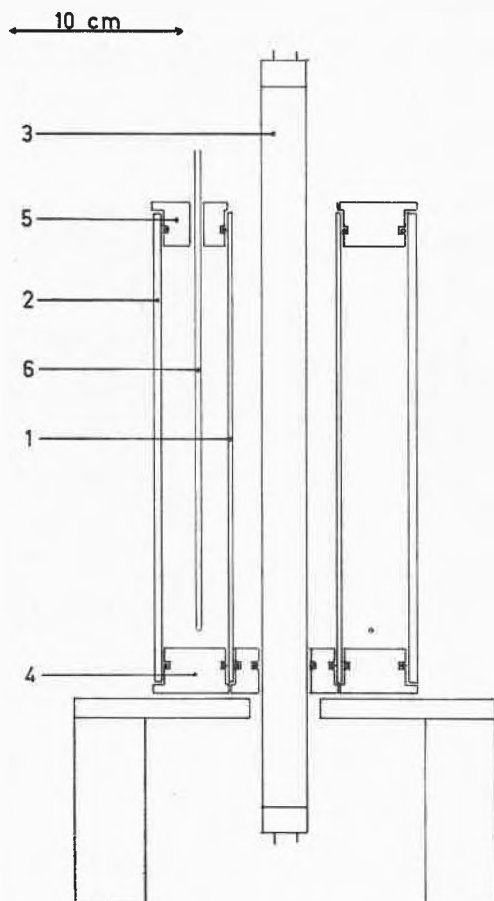


Fig. 1. Coupe du réacteur photochimique

4. Résultats

4.1. Réaction thermique

Cette réaction sans lumière a été étudiée par ¹. Nous avons vérifié que la vitesse de la réaction thermique est environ 10^2 fois plus petite que celle de la réaction photochimique.

Avec une solution KI 2N, H₂SO₄ 2N, de l'air on forme environ 0,1 méq I₂/l·h dans l'obscurité, et environ 9 m éq I₂/l·h avec une intensité lumineuse de 20 W/m². (Pour notre tube, ⁵ donne 4,1 m W/lumen et 580 lumen. Ceci correspond donc à 2,38 W, répartis sur un cylindre de hauteur 41 cm et de rayon moyen 9,74 cm.)

Tableau 1. Influence de la géométrie du réacteur (dimensions en m)

Réacteur	∅ intérieur	∅ extérieur	Moyenne log. des ∅	$\frac{dI_2}{dt}$ méq/l·h	$\frac{dI_2}{dt} r_{\text{moyen}}$	G	$\zeta^{0,5}$	$\frac{dI_2}{dt} \frac{r_{\text{moyen}}}{G^{0,5}}$
1	0,130	0,142	0,136	6,8	0,46	384	19,6	0,023
2	0,026	0,059	0,040	9,9	0,20	58	7,6	0,026
3	0,065	0,142	0,099	2,3	0,12	25	5,0	0,023
4	0,026	0,142	0,068	2,4	0,08	14	3,8	0,022

4.2. Réaction photochimique à pH voisin de 1

L'équation cinétique que nous proposons correspond à

$$\frac{dI_2}{dt} = k \Phi^{0,5} G^{0,5} [a_{H^+}]^{0,5} P_{O_2}^{0,9} [KI]^x. \quad (1)$$

Nous arrivons aux mêmes résultats que ¹ pour l'influence des paramètres suivants:

- Intensité lumineuse Φ
- Concentration en oxygène
- Concentration en KI de 0,5 à 2N
- Influence de la température
- Concentration en H₂SO₄ de 0,5 à 2N

Pour ce dernier paramètre nous avons pris comme facteur l'activité de H⁺ et non comme ¹ la concentration en éq/l.

Le pH est plus représentatif de l'acidité que la concentration en acide. En effet, pour une même quantité d'acide, une solution fortement saline présente un pH plus bas qu'une solution faiblement saline (DEBYE-HÜCKEL).

Pour le domaine plus étendu de pH 6 à 0, la formation d'iode est proportionnelle à $[a_{H^+}]^{0,5}$.

Les mesures nouvelles, où nous n'avons pas de correspondance avec ¹, ou des compléments à donner, sont les suivantes:

4.2.1. Facteur de géométrie G

Nos essais portant sur quatre réacteurs cylindriques différents ont fait apparaître une dépendance très claire entre la vitesse de réaction et le rapport $G = \frac{\text{surface}}{\text{volume}}$ du réacteur photochimique.

La solution utilisée était 2N KI, environ 1N H₂SO₄.

Dans le tableau 1 nous avons reporté toutes les valeurs utiles.

L'intensité lumineuse varie proportionnellement à $1/r^2$. La vitesse de réaction est proportionnelle à $\Phi^{0,5}$. Pour ne faire varier qu'un seul paramètre, c'est-à-dire G, il faut multiplier les vitesses de réaction obtenues expérimentalement par le r_{moyen} du réacteur correspondant. Ainsi les différences d'intensité lumineuse sont éliminées.

Le rapport G est calculé comme suit:

$$G = \frac{2\pi r_{\text{moyen}} h}{\pi (r_e^2 - r_i^2) h} \quad \text{avec } r_{\text{moyen}} = \frac{r_1 - r_2}{\ln r_1 - \ln r_2}$$

Toutes les mesures pour déterminer l'influence des autres facteurs que G ont été faites avec le réacteur 3.

4.2.2 Concentration en iodure

Pour un domaine de mesure allant de $[I^-]$ 0,05 N à 8 N (saturation) nous avons représenté directement $[KI]^x$ en fonction de $[KI]$ (fig. 2).

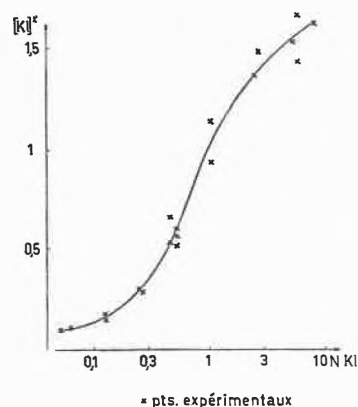


Fig. 2. Terme $[KI]^x$ de l'équation (1)

4.3. Réaction photochimique en présence de H_2SO_4 de 1 N à 18 N

L'équation cinétique proposée est la suivante:

$$\frac{dI_2}{dt} = k' \Phi^{0.5} G^{0.5} (1 + k'' [H_2SO_4]^{0.5}) P_{O_2}^{0.9} \quad (2)$$

La concentration en iodure n'intervient plus si elle est supérieure à 0,5 N.

La concentration en acide est exprimé en éq/l.

La vitesse de formation d'iode n'augmente plus que faiblement avec la concentration en acide.

4.4. Influence de la longueur d'onde

Avec une solution KI 1 N, H_2SO_4 2 N, de l'air et $\Phi = 18 \text{ W/m}^2$, nous avons obtenu les résultats reportés au tableau 2.

On a constaté qu'à énergie incidente égale, la réaction en lumière bleue est plus rapide.

Tableau 2. Influence de la longueur d'onde sur le taux de formation d'iode

Filtre	Lumière	$\frac{\Phi}{\Phi_0}$ %	$\frac{dI_2}{dt}$ méq/l·h	$\frac{dI_2}{dt} \cdot \left(\frac{\Phi_0}{\Phi}\right)^{0.5}$
-	blanche	100	5,0	0,58
$CuSO_4$ 0,5 M	bleue	61	5,2	0,67
I_2 0,1 N	rouge	11	1,2	0,36
I_2 0,01 N	rouge	36	2,6	0,43

4.5. Influence de l'iode

Contrairement à ¹ qui mentionnent le facteur $[I_2]^{0.5}$ (pour $[I_2]$ de 0 à 0,03 N), correspondant à une réaction autocatalytique, nous avons constaté que la réaction est pratiquement indépendante de $[I_2]$.

Pour un réacteur mince (tableau 1, réacteurs 1 et 3) la formation d' I_2 est proportionnelle au temps, jusqu'à I_2 environ 0,04 N. Pour un réacteur épais (tableau 1, réacteurs 2 et 4) jusqu'à environ 0,02 N.

Si la concentration en iode augmente au-delà de cette limite la vitesse apparente de la réaction diminue. Ceci est dû à l'absorption de la lumière par les premières couches de la solution, ce qui diminue l'intensité lumineuse réellement disponible pour la réaction.

4.6. Influence de la température

L'énergie d'activation moyenne pour l'ensemble des réactions thermique et photochimique peut être calculée selon:

$$E_A = \frac{\ln k_{T_1} - \ln k_{T_2}}{\frac{1}{RT_1} - \frac{1}{RT_2}}, \quad \text{ce qui donne } E_A = 4 \text{ kcal/mole.}$$

L'augmentation des taux de formation de l'iode ne peut pas être expliqué uniquement par l'élévation de la vitesse de la réaction thermique (10 à 15% pour une élévation de température de 10°C). On doit donc supposer que la réaction photochimique procède par plusieurs étapes, dont au moins une est une réaction chimique, influencée par la température.

5. Discussion

Nous avons déjà comparé les exposants obtenus par ¹ et les nôtres. Nous pouvons maintenant comparer les quantités d'iode obtenues.

Solution utilisée: KI 1 N, H_2SO_4 2 N, air, en lumière blanche: ¹ tableau XII, série 2: en moyenne 5,9 méq I_2 /l·h.

Après correction, pour adapter ce résultat à nos conditions d'expérience: 8 méq I_2 /l·h*.

Notre résultat: 5,8 méq I_2 /l·h.

En lumière rouge (filtre I_2 0,1 N sur 1 cm):

¹ tableau VI, série 1: en moyenne 1 méq I_2 /l·h.

Après correction: 1,1 méq I_2 /l·h.

Notre résultat: 1,2 méq I_2 /l·h.

* Corrections à effectuer:

a) Température: ¹ à 15°C, nous: à 20°C (voir 4.6).

b) Facteur de forme: ¹ cuve à faces parallèles, épaisseur de la couche 2,5 cm. Nous réacteur cylindrique, épaisseur de la couche 3,8 cm (voir 4.2.1).

c) Flux lumineux: ¹: 2000 bougies à 30 cm, soit

$$\frac{2000}{4\pi \cdot 30^2} = 0,177 \text{ lumen/cm}^2.$$

Nous: 580 lumen pour le tube de 41 cm de longueur, rayon moyen 4,95 cm soit $\frac{580}{2\pi \cdot 4,95 \cdot 41} = 0,455 \text{ lumen/cm}^2$.

Les résultats sont donc du même ordre de grandeur. Les différences proviennent probablement du fait que nous n'avons aucune indication sur le spectre utilisée par ¹. Nos résultats sembleraient indiquer que leur lampe émette une proportion d'énergie plus grande dans le bleu que la nôtre.

Une vérification de cette hypothèse n'est pas possible par comparaison des résultats en lumière bleue, car ¹ n'indiquent pas la composition de leurs filtres bleus.

6. Valeur des coefficients

Au pH voisin de 1, on trouve pour l'équation 1 :

$$k = 1,4.$$

En milieu très acide, on obtient pour l'équation 2 :

$$k' = 1,2,$$

$$k'' = 0,3.$$

7. Conclusions

A l'aide des données fournies par ^{6,7,8} on peut estimer la quantité de lumière naturelle reçue en Suisse par une surface horizontale. Elle est de l'ordre de 80 W/m² (moyenne sur les heures de jour) dans le domaine correspondant à celui du tube fluorescent (3100 Å à 7800 Å).

Si nous prenons un réacteur photochimique qui travaille dans ces conditions d'éclairage, d'une épaisseur de 1 cm, et avec des concentrations élevées en KI et H₂SO₄, les équations données ci-dessus permettent de calculer qu'il produit 20 méq I₂/l·h (moyenne sur 24 heures), ce qui correspondrait à une densité de courant à la cathode de la pile à combustible de 0,5 mA/cm².

Nos premiers essais de pile à combustible utilisant une cathode à iode ont permis d'atteindre des densités de courant d'un ordre de grandeur supérieures, ce qui indiquerait que le réacteur photochimique nécessaire pour régénérer la solution d'alimentation de la pile serait trop important pour arriver à des densités de puissance du système total comparables à celles de réalisations existantes.

Du point de vue économique, un système de production d'électricité associant un réacteur photochimique de grandes dimensions à une cellule à combustible ne semble donc pas être économiquement compétitif.

Il reste la solution d'étudier l'oxydation de iodures sous d'autres conditions que celles de cette publication, telles que par exemple oxydation avec O₂ sous pression, oxydation catalysée, oxydation en phase gazeuse, etc.

8. Bibliographie

- ¹ A. BERTHOUD et G. NICOLET, *Helv. Chim. Acta* 10 (1927) 475.
- ² A. BERTHOUD et G. NICOLET, *J. Chim. Physique* 25 (1928) 163.
- ³ CH. WINTER, *Z. physik. Chem.* 108 (1924) 236, 113 (1926) 275.
- ⁴ J. PLOTNIKOW, *Lehrbuch der Photochemie*, p. 210, 298, 388 (1920).
- ⁵ Philips S. A., CH-1196 Gland, Fiche technique sur les tubes TLD 55.
- ⁶ Institut Suisse de Météorologie, Krähbühlstrasse 58, 8044 Zürich.
- ⁷ F. KREITH, *Transmission de la chaleur et Thermodynamique*, Masson, Paris 1967.
- ⁸ M. SCHÜEPP, *Klimatologie der Schweiz*, Heft I (1962).

A. SCHLATTER, E. PLATNER et PH. JAVET
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne
Institut de Génie chimique
CH-1025 St-Sulpice

Zum Vorkommen von Cholesterin in *Hosta undulata* (Liliaceen)*

Summary

The free sterols from leaves of *Hosta undulata* (Liliaceae) contain cholesterol, stigmasterol, and sitosterol in a ratio of approximately 16:51:33. Traces of campesterol are probably also present. The identification was accomplished by gas-liquid chromatography and mass spectrometry.

Seit TSUDA¹ 1958 erstmals Cholesterin in Rotalgen nachweisen konnte, ist dieses früher als ausschließlich tierisches Produkt betrachtete Sterin in vielen Pflanzen gefunden worden². Bereits existieren in der Literatur mehr als 80 Angaben über die Anwesenheit dieser Verbindung in Bakterien, Algen, Pilzen, Farnen und Blütenpflanzen. Innerhalb der Blütenpflanzen wurde Cholesterin in Vertretern von mehr als zwanzig Familien nachgewiesen. Da sich bis jetzt keine Korrelation zwischen dem Vorkommen von Cholesterin und der systematischen Stellung der Pflanzen abzeichnet, ist anzunehmen, daß die meisten Pflanzen zu dessen Bildung befähigt sind. In diesen tritt Cholesterin – im Gegensatz

zur tierischen Zelle – mengenmäßig nur als Nebenkomponente in Erscheinung. Ausnahmen bilden gewisse Rotalgen, die fast ausschließlich Cholesterin produzieren⁴. In Blütenpflanzen treten größere Mengen nur selten, z. B. in *Cheiranthus cheiri*⁵ (Cruciferen) und *Nicotiana langsdorffii*⁶ (Solanaceen) auf.

Wir berichten im folgenden über die Isolierung und Identifizierung von Cholesterin in den freien Sterinen von *Hosta undulata* (OTTO und DIETR.) BAILEY (Liliaceen)**, einer Zierpflanze mit genetisch bedingter Blattscheckung.

Die Gewinnung der freien Sterine aus gefriergetrockneten Blättern erfolgte nach früher beschriebenen Verfahren durch Fraktionierung der ätherlöslichen Lipide

* Eingegangen am 29. November 1971.

** Das Pflanzenmaterial wurde freundlicherweise vom Botanischen Garten zur Verfügung gestellt.

an Kieselsäure⁷, anschließende alkalische Verseifung der Sterinfraktion und Fällung der Sterine aus dem Unverseifbaren als Digitonide⁸. Das Steringemisch wurde mit Hexamethyldisilazan und Chlortrimethylsilan in Trimethylsilyläther übergeführt⁹ und gaschromatographisch getrennt (Perkin-Elmer Modell 990 mit FID, Glaskolonne 6 ft., 1/8 in., 2 1/2% E-301 auf Chromosorb G, 227°C, 75 ml N₂/min). Als Referenzsubstanzen wurden Cholesterin (Merck), Stigmasterin [24(R)-24-Äthylcholesta-5,*trans*-22-dien-3 β -ol] (Fluka) und Sitosterin [24(R)-24-Äthylcholest-5-en-3 β -ol] (Fluka) verwendet.

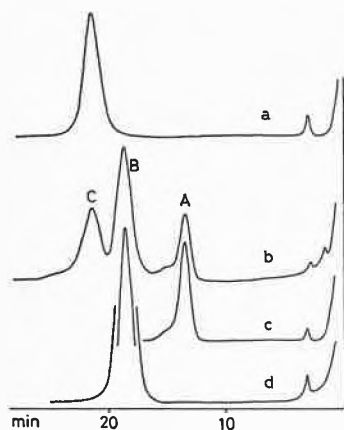


Abb. 1. Gaschromatogramm der freien Sterine (als TMS-Verbindungen) aus Blättern von *Hosta undulata* (Bedingungen siehe Text). a) Sitosterin, b) Steringemisch aus *H. undulata*, c) Cholesterin, d) Stigmasterin

Die gaschromatographische Auftrennung des Gemisches, die in Abb. 1 dargestellt ist, führt zu den drei Komponenten A, B und C, deren Retentionsdaten mit denen von Cholesterin, Stigmasterin und Sitosterin übereinstimmen. Eine gleichwertige Übereinstimmung wurde erzielt, wenn anstelle der Trimethylsilyläther die freien Sterinalkohole chromatographiert wurden. Die zur weiteren Identifizierung der einzelnen Komponenten erforderliche Zerlegung des Gemisches gelang durch Phasenumkehrchromatographie auf Kieselgel-G-Platten^{10,11}. Die isolierten und gaschromatographisch nahezu einheitlichen Verbindungen wurden massenspektrometrisch untersucht*. Die Ergebnisse sind in Abb. 2 dargestellt.

Daraus geht hervor, daß das Spektrum von Komponente A (b) in jeder Beziehung mit dem von Cholesterin (a) übereinstimmt. Ebenso steht das Spektrum von Komponente B (d) mit dem von Stigmasterin (c) und das von Komponente C (f) mit dem von Sitosterin (e) in gutem Einklang. Eine Zuordnung der wichtigsten Bruchstücke ist durch die in Abb. 3 dargestellte Fragmentierung der Sterinmolekel möglich^{12,26}.

Die Masse des Moleküliions ist für Cholesterin m/e 386, für Stigmasterin m/e 412 und für Sitosterin m/e 414. Bei Cholesterin lassen sich die Massen m/e 371 durch Abspaltung einer Methylgruppe (a), m/e 368 durch

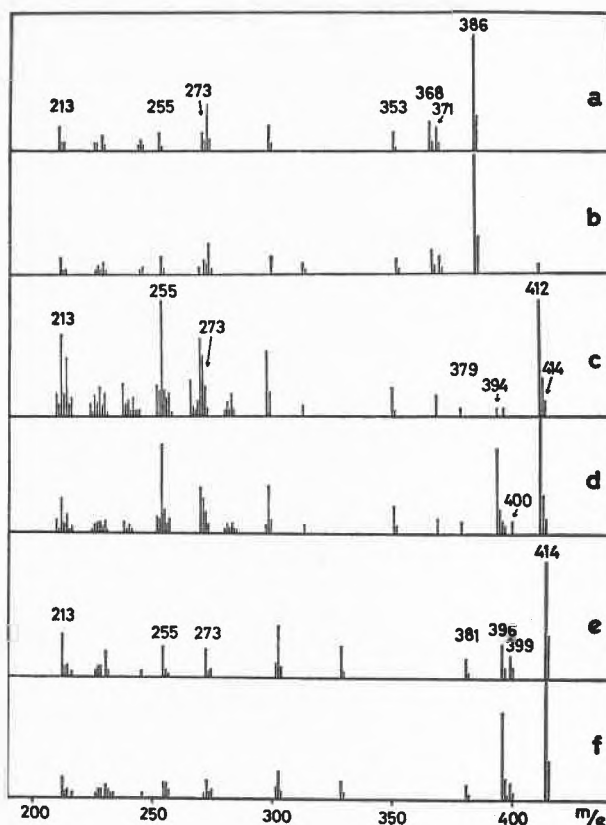


Abb. 2. Massenspektren der freien Sterine aus *H. undulata* a) Cholesterin, b) Komponente A, c) Stigmasterin, d) Komponente B, e) Sitosterin, f) Komponente C

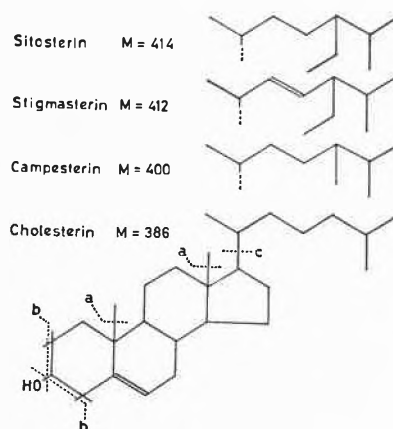


Abb. 3. Möglichkeiten der Fragmentierung am Steringerüst

Dehydratisierung (b) und m/e 353 durch beide Vorgänge zusammen (a + b) erklären. Die entsprechenden Bruchstücke sind bei Stigmasterin um m/e 26 und bei Sitosterin um m/e 28 höher. Da sich die drei Sterine nur durch den Aufbau ihrer Seitenkette unterscheiden, entstehen bei deren vollständigen Abspaltung (c) typische

* Die Massenspektren wurden durch PD Dr. U. SCHLUNEGGER vom Gerichtlich-Medizinischen Institut auf einem Varian MAT CH-5 aufgenommen.

Bruchstücke der Massen m/e 273, 255 und 213, die für alle Komponenten identisch sind.

Die ungleiche Intensität der Massen m/e 394 (Abb. 2 c + d) und m/e 396 (Abb. 2 e + f) ist auf unterschiedliche Dehydratisierung zurückzuführen. Die Masse m/e 400 in Abb. 2 d deutet darauf hin, daß das Gemisch geringe Mengen Campesterin [24 (R)-24-Methylcholest-5-en-3 β -ol] enthält, das sich von Stigmasterin schlecht abtrennen läßt.

Aus den Peakflächen verschiedener Gaschromatogramme wurde ein durchschnittliches Mengenverhältnis von Cholesterin – Stigmasterin – Sitosterin von näherungsweise 16:51:33 errechnet.

Ein Anteil von 16% Cholesterin, bezogen auf die Gesamtsterine, ist für eine höhere Pflanze ungewöhnlich. HEFTMANN³ vermutet, daß Phytosterine, darunter auch Cholesterin, biologisch inaktive Vorstufen darstellen, aus denen bei Bedarf weitere Steroide gebildet werden können. Solche Umwandlungen von Cholesterin in Pregnenolon^{13, 14}, Sapogenine^{15, 16}, Steroidalkaloide^{17, 18}, Ecdyson¹⁹ und Cardenolide²⁰ sind in verschiedenen Pflanzen beobachtet worden. Ob Cholesterin auch in *H. undulata* eine Vorstufe für weitere Steroide darstellt, ist noch nicht untersucht worden. Da in nahe verwandten Arten (*H. montana* und *H. kiyosumiensis*) Saponine gefunden wurden^{21, 22}, ist zu erwarten, daß solche auch in *H. undulata* gebildet werden.

Nach Untersuchungen von MERCER²³ et al. an *Phaseolus vulgaris* ist Cholesterin in den Chloroplasten konzentriert. Da sich diese Befunde an 8 weiteren Pflanzen bestätigen ließen²⁴, wurde die Vermutung ausgesprochen, Cholesterin könnte bei der Entwicklung und Funktion der Chloroplasten eine spezifische Rolle spielen. Andererseits sind die in Chloroplastenpräparaten gefundenen Sterinmengen, verglichen mit den Mengen in der gesamten Zelle, so gering, daß sie auch mit anderen Zellbestandteilen eingeschleppt worden sein könnten^{8, 25}. Die Frage, ob Cholesterin in der Zelle an besonderen Stellen lokalisiert ist und außer seiner Rolle als biogenetische Vorstufe noch weitere Funktionen besitzt, kann somit noch nicht endgültig beantwortet werden. Wir sind im Begriffe, an *Hosta undulata*, die gleichzeitig photosynthetisch aktive und inaktive Blattbezirke aufweist, den Zusammenhang zwischen Cholesterin und der Steroidbiogenese einerseits und Cholesterin und der Funktion der Chloroplasten andererseits weiter zu untersuchen.

Die Arbeiten wurden durch den Schweizerischen Nationalfonds unterstützt.

Literatur

1. K. TSUDA, S. AOKI, Y. KISHIDA, R. HAIATSU und K. SAKAI, *Chem. Pharm. Bull.* 6 (1958) 724.
2. E. HEFTMANN, *Lloydia* 31 (1968) 293.
3. E. HEFTMANN, *Lipids* 6 (1971) 128.
4. D. R. IDLER, A. SAITO und P. WISEMAN, *Steroids* 11 (1968) 465.
5. D. S. INGRAM, B. A. KNIGHTS, I. J. MCEVOY und P. MCKAY, *Phytochemistry* 7 (1968) 1241.
6. A. L. S. CHENG, M. J. KASPERBAUER und L. G. RICE, *Phytochemistry* 10 (1971) 1481.
7. W. EICHENBERGER und E. C. GROB, *FEBS Letters*, im Druck.
8. W. EICHENBERGER und W. MENKE, *Z. Naturforsch.* 21 b (1966) 859.
9. C. C. SWEETLEY, R. BENTLEY, M. MAKITA und W. W. WELLS, *J. Amer. Chem. Soc.* 85 (1963) 2497.
10. B. FÜRST, Lizentiatsarbeit 1971.
11. N. J. DE SOUZA und W. R. NES, *J. Lipid Res.* 10 (1969) 240.
12. B. A. KNIGHTS, *J. Gas Chromatography* 5 (1967) 273.
13. E. CASPI, D. O. LEWIS, D. M. PIATAK, K. V. THIMANN und A. WINTER, *Experientia* 22 (1966) 506.
14. R. D. BENNETT und E. HEFTMANN, *Phytochemistry* 5 (1966) 747.
15. R. D. BENNETT und E. HEFTMANN, *Phytochemistry* 4 (1965) 577.
16. K. R. VARMA, J. A. F. WICKRAMASINGHE und E. CASPI, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 3951.
17. R. D. BENNETT und E. HEFTMANN, *Arch. Biochem. Biophys.* 112 (1965) 616.
18. E. HEFTMANN, E. R. LIEBER und R. D. BENNETT, *Phytochemistry* 6 (1967) 225.
19. E. HEFTMANN, H. H. SAUER und R. D. BENNETT, *Naturwiss.* 55 (1968) 37.
20. J. A. F. WICKRAMASINGHE, P. C. HIRSCH, S. M. MUNAVALLI und E. CASPI, *Biochemistry* 7 (1968) 3248.
21. K. TAKEDA, T. OKANISHI, H. MINATO und A. SHIMAOKA, *Chem. Pharm. Bull.* 12 (1964) 779.
22. K. TAKEDA, T. OKANISHI, H. MINATO und A. SHIMAOKA, *Tetrahedron* 21 (1965) 2089.
23. E. I. MERCER und K. J. TREHARNE, in *Biochemistry of Chloroplasts*, Vol. 1, edited by T. W. GOODWIN, Academic Press, London 1966, S. 181.
24. B. A. KNIGHTS, *Lipids* 6 (1971) 215.
25. W. EICHENBERGER und E. C. GROB, in *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. 1, edited by H. METZNER, Tübingen 1969, S. 338.
26. M.-F. HÜGEL, W. VETTER, H. AUDIER, M. BARBIER und E. LEDERER, *Phytochemistry* 3 (1964) 7.

W. EICHENBERGER, B. FÜRST und E. C. GROB
Institut für Organische Chemie, Universität Bern,
Länggäßstraße 7, CH-3012 Bern

Removal of Ethanol from Albumin by Gel Filtration in the Manufacturing of Human Serum Albumin Solutions for Clinical Use*

Summary: By the use of gel filtration combined with reversed osmosis for water supply an efficient system for removal of ethanol from albumin solutions was obtained. The method is very economical since it does not require energy for freezing, evaporation or sublimation. It is well suited to automation for large-scale production of albumin solution for clinical use. The product is a clear, easily-filtered salt-poor albumin solution.

Until recently, lyophilization appeared to be the only safe method for removal of ethanol from proteins obtained by ethanol fractionation of plasma.^{1,2} The expense of this process prompted the search for more economic methods for large-scale preparations.

A procedure for removal of ethanol from albumin solutions by evaporation in thin layer under reduced pressure was developed by SMITH *et al.*³ In addition, the availability of large-scale gel filtration systems offers another possibility to adapt methods previously used only in experimental scale. In the past, gel filtration has been used successfully for salt removal. Its application for removal of ethanol from proteins to be used intravenously poses various problems. On one hand the use of gel filtration on a commercial scale is in question because it requires large amounts of very pure water. In addition there is the danger of introducing bacteria and pyrogens into the end product. We attempted to answer the questions of economic feasibility and end product safety by means of pilot experiments with a small-scale system.

For charge solutions we dissolved albumin paste (Precipitate C) obtained by the plasma fractionation method of KISTLER and NITSCHMANN.² This paste consists of approximately 25% albumin and 40% ethanol. After filtration and sterile-filtration the solutions contained 7 to 8% albumin and 8 to 10% ethanol.

Gel filtration was carried out in 10×100 cm columns⁴ filled with 7 l of Sephadex G-25, coarse. Flow rates were regulated with a peristaltic pump.

Protein concentrations were determined by the KJELDAHL method. Gas-liquid chromatography was used to measure ethanol content.⁵ The proportion of albumin monomers and polymers⁶ was determined by gel filtration of 5 ml samples through 5×90 cm columns of Sephadex G-150 in pH 8.0 Tris buffer, and by disc gel electrophoresis in polyacrylamide gels.

The experiments were designed to achieve an optimal capacity. The maximum input of albumin was limited by the fact that the alcohol content of the end product should be no higher than in solutions of carefully lyophilized material. About 15 mg of ethanol per g of protein was considered acceptable. If the experiments were run at less than maximum column capacity, the alcohol could be almost completely removed. To allow for ad-

dition of stabilizer to the end product, the solution should contain at least 4.5% albumin after passage through the gel.

To reduce the danger of bacterial growth, the first experiments were conducted at 2°C. However, the increased viscosity resulted in poorer separation at this temperature. After the sterility problem was solved, all gel filtrations were carried out at 17°C.

It is known that the maximum flow rate for highly crosslinked gels such as Sephadex G-25 is limited by the resistance of the gel bed. With G-25 coarse it is possible to use a flow rate of up to 5 ml/cm² min, which corresponds to 400 ml/min in a column of 10 cm diameter. When higher flow rates are used and the other conditions held constant, the resolution is decreased, as evidenced by higher concentrations of ethanol in the end product. In our experiments we were eventually able to obtain acceptably low alcohol content in the eluates even with maximum flow rates, thereby arriving at a very efficient system.

For group separations, i.e., separations of materials with molecular weights lying on the opposite sides of the fractionation range of the gel, the amount of charge solution to be applied may approach maximal volumes of up to 0.4 times the bed volume (V_i). In our system we obtained good separation with charge volumes of 1.21 or $0.2 \cdot V_i$.

For continuous operation of the column with serial sample application, a volume of 7 l in each cycle, consisting of 1.2 l of charge solution and 5.8 l of elution water, gave sufficient separation of the alcohol. Table 1 illustrates the separation efficiency obtained in our system with serial experiments.

The capacity of the 10×100 cm column permitted application of four liters of alcohol-albumin solution per hour, which corresponds to an end product of 8 l of 4% albumin solution. 20 l of water were required for elution. Using a large scale gel filtration apparatus with a diameter of 40 cm⁷ it should be possible to obtain about

* Received december 6, 1971.

¹ E. J. COHN, L. E. STRONG, W. L. HUGHES, D. J. MULFORD, N. J. ASHWORTH, M. MELIN and H. L. TAYLOR *J. Amer. Chem. Soc.* 68 (1946) 459.

² Hs. NITSCHMANN, P. KISTLER and W. LERCIER, *Helv. Chim. Acta* 37 (1954) 867; P. KISTLER and Hs. NITSCHMANN, *Vox Sang.* 7 (1962) 414.

³ J. K. SMITH, J. G. WATT, C. N. WATSON and G. G. A. MASTENBROEK, in press.

⁴ Column K 100/100, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Sweden).

⁵ We are indebted to Dr. U. SCHLUNEGGER of the Gerichtlich-Medizinisches Institut, Universität Bern (Dir. Professor E. LÄUPPI) for determination of the alcohol contents.

⁶ H. FRIEDLI and P. KISTLER, *Vox Sang.* 18 (1970) 542.

⁷ For instance gel filter GF 04-10, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Sweden).

Table 1. Separation with serial sample applications in continuous operation

Gel type		G-25 coarse
Bed dimensions	diameter	10 cm
	height	90 cm
	volume	6.4 l
Flow rate		400 ml/min
Temperature		17°C
Cycle	volume	7 l
	time	17.5 min
Charge solution	protein content	8.00% albumin
	ethanol content	9.55% = 1.2 g/g albumin
	volume	1175 ml per cycle
Output solution*	protein content	4.63% albumin
	ethanol content	0.048% = 10.4 mg/g albumin
	volume	2030 ml per cycle
	dilution factor	1.7
	sterility	sterile
	pyrogenicity	non-pyrogenic

* Mean values for 17 cycles.

125 l of 4% albumin solution per hour with a water utilization of 320 l/hour.

After addition of caprylate as stabilizer, the eluates were processed as usual for pasteurized protein solution. They were then tested for stability (50 hours at 57°, 10 days at 50°, and 6 hours shaking at 57°), for viscosity and for turbidity, as well as by acetate- and immunoelectrophoresis. No differences were found between the processed eluates and the equivalent solutions of lyophilized albumin. Disc electrophoresis and gel filtration revealed somewhat lower proportions of albumin dimers. The products were pyrogen-free and non-toxic.

As mentioned earlier, sterilization and inhibition of bacterial growth in the apparatus present a main problem. A solution of 0.5% formalin is an effective sterilizer, but large quantities of pure water are needed to remove the last traces of this reagent. Therefore this method is unsatisfactory if the time interval between runs is limited. Maintaining a continuous flow of sterile water through the system is also effective in preventing bacterial growth. In fact when sterile water was used as the washing medium, we observed a continuous decrease in bacterial count in a series of albumin eluates from a column which had been accidentally contaminated:

Eluate No.	1	2	3	4	5
Germs/ml	1600	150	31	22	13

For maintenance of a flow of sterile water between runs, the installation of a circulation system fitted with a sterile filter allows significant reduction in water consumption. If possible, the circulation system should be arranged to include all connecting tubing to avoid the

possibility of bacterial growth in "dead spaces". Although we used an improvised arrangement, we found no bacterial growth in such a system after 54 hours of circulation.

A second problem concerns the expense of gel filtration due to the use of large amounts of water. Since part of the water arrives in the end product, it is necessary to use water of the highest quality with respect to non-pyrogenicity and sterility. In our experience, five volumes of elution water are required per volume of sample. Since a diluted albumin solution is obtained, the water ordinarily required for dilution is saved. This reduces the water required for gel filtration to four times that needed with lyophilized preparations. Water used for column preparation and washing between runs is not included in this calculation. The quantities required for the latter depend largely on the frequency of gel filtration operations.

From these observations it is evident that the gel filtration method is quite feasible economically if large quantities of pure water can be obtained at low cost. One solution which is distinctly more economic than the usual vacuum distillation apparatus is the so-called permeator.⁸ This works by the principle of reversed osmosis: water is forced under high pressure through semi-permeable membranes made of porous polyamide fibers. Spores, bacteria and a large part of the salts are removed and drawn off as the "concentrate". A low-salt, pyrogen-free sterile water ("permeate") is obtained in yields of up to 90% of the water input. One permeator unit supplies about 340 l of permeate per hour. The only energy required is that needed for pumping.

We had the opportunity to carry out experiments with a transportable permeator.⁹ When deionized water was fed into the permeator input, sterile, pyrogen-free water containing no reducing impurities was obtained in 90% yield. Utilization of this water in gel filtration of albumin solutions gave an excellent end product.

The use of a permeator offers an inexpensive solution to the problem of water circulation for maintenance of sterility between experiments. The wash water can be returned to the input of the permeator, thereby allowing continuous sterile filtration and removal of pyrogens and other impurities. The water needed for washing between runs is thus re-used and the only water lost is the outflow "concentrate" from the permeator. Maximum permeator efficiency of 340 l per hour in the circulating system requires an hourly input of approximately 30 l of ion-free water. A possible arrangement for this system is presented in figure 1.

⁸ «Permasep», E. I. DuPont de Nemours & Company, Wilmington (U.S.A.).

⁹ Reverse Osmosis apparatus, System DuPont, assembled by Pfaudler (U.S.A.). The apparatus was kindly loaned to us for trial experiments by Sybron (Europe) AG, Basle (Switzerland).

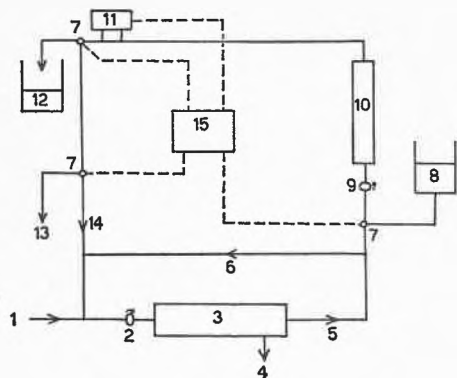


Fig. 1. Schematic set-up for large-scale gel filtration process

- 1 Water input
- 2 High pressure pump
- 3 Permeator
- 4 Concentrate
- 5 Permeate
- 6 Permeate overflow
- 7 Three-way stopcocks
- 8 Albumin charge solution
- 9 Pump
- 10 Gel filter
- 11 UV detector
- 12 Albumin eluate
- 13 Alcohol eluate
- 14 Return flow of water between experiments
- 15 Automator

A disadvantage of the gel filtration method is that it cannot be used for preparing albumin solutions of more than five percent concentration. If higher albumin concentrations are required, lyophilization or thin-layer evaporation must also be used. However, this drawback applies to only a minor fraction of the total albumin production.

By the use of gel filtration combined with reversed osmosis for water supply, we obtained an efficient system for removal of ethanol from albumin solutions. The method seems to be very economical since it does not require energy for freezing, evaporation or sublimation. It is well suited to automation for large-scale production of albumin solutions.¹⁰ The production of one volume of four percent albumin solution from alcohol-albumin paste requires about 4.5 volumes of ion-free water. The product is a clear, easily-filtered albumin solution. Moreover, since salts are removed as well as ethanol, the preparation is also salt-poor.

H. FRIEDLI¹¹ and P. KISTLER¹¹

¹⁰ Accurate costs for the process can not yet be given.

¹¹ Adresse: Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes, Wankdorfstraße 10, CH-3000 Bern 22.