

Mitteilung aus dem Institut für Allgemeine und Pharmazeutische Chemie
der Deutschen Karls-Universität in Prag

Verfahren der Trennung von Peptidgemischen

Von **Ernst Waldschmidt-Leitz** und **Fritz Turba**¹⁾

(Eingegangen am 7. Mai 1940)

Die Strukturermittlung der Eiweißkörper, die sich der Wege des hydrolytischen Abbaus, z. B. des stufenweisen Abbaus bedient, stellt die Aufgabe, die anfallenden Gemische der Spaltprodukte, sei es von Peptiden, sei es von Aminosäuren, in ihre Bestandteile zu trennen. Für die Trennung von Peptidgemischen gibt es noch kein allgemein anwendbares Verfahren; sie ist schwieriger als die der Aminosäuren, denn die Peptide sind einander in ihren Eigenschaften noch ähnlicher, ihre Ester z. B. nicht mehr unzersetzt destillierbar. Es kommt hinzu, daß ein Verfahren zu ihrer Trennung jeden Eingriff zu vermeiden hat, bei welchem die Gefahr einer weiteren hydrolytischen Veränderung besteht.

Die Auslese einzelner Peptide aus Gemischen ist nur dann begünstigt, wenn diese durch die Beteiligung bestimmter Bausteine, namentlich von basischer Natur, ausgezeichnet sind: so gelang die Isolierung der Protone und der Kyrine. Die Versuche zur Trennung sowohl der basischen Peptide voneinander wie der aus Monoaminosäuren aufgebauten sind dagegen spärlich und unvollkommen. Denn die Unterschiede beispielsweise in der Löslichkeit²⁾ und im Adsorptionsverhalten³⁾, die man dazu

¹⁾ Die zu dieser Arbeit führenden Vorversuche wurden gemeinsam mit Herrn Dr. E. Kofrányi ausgeführt.

²⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. E. Kofrányi, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **236**, 181 (1935).

³⁾ E. Waldschmidt-Leitz u. A. Schäffner, Ber. dtsch. chem. Ges. **60**, 1147 (1927).

herangezogen hat, sind nicht ausgesprochen genug. Es scheinen den Peptiden die spezifischen Adsorptionsaffinitäten zu mangeln, die die Trennung von Enzymgemischen erleichtern.

Das Verfahren der chromatographischen Adsorption hat für die Trennung von Eiweiß- und Peptidgemischen noch keine Anwendung gefunden. Es sollte aussichtsreich sein. Denn bei der chromatographischen Ausführungsart der Adsorption vollzieht sich eine „fraktionierte Adsorption“ innerhalb der Adsorptionssäule, die geringe Unterschiede in den Adsorptionsaffinitäten zu verstärken erlaubt. Bei den farblosen und auch im Ultraviolett meist nicht fluoreszierenden Peptiden besteht aber die Schwierigkeit einer eindeutigen Kennzeichnung entstehender Adsorptionsschichten; daher hat dieses Verfahren bisher nur in einigen Ausnahmefällen zur Trennung farbloser organischer Naturstoffe Anwendung gefunden, so für die Trennung der β -Glucosidase von α -Galaktosidase und Chitinase¹⁾ oder für die von Cozymase und Codehydrase I in den Versuchen von H. v. Euler und E. Adler²⁾.

Für die Eignung eines Adsorbens zur Trennung farbloser und auch nicht fluoreszierender Stoffe hat man die Forderung zu stellen, daß das Adsorbens nicht nur ein ausreichendes Auslesevermögen besitzt, sondern daß in ihm auch das Auftreten von Adsorptionsschichten irgendwie äußerlich erkennbar wird. Diese Forderung fanden wir unter einer großen Anzahl geprüfter Adsorbentien bei einigen Bleicherden verwirklicht, bei welchen bei der chromatographischen Adsorption von Peptiden diese an einer Aufhellung des Adsorbens erkennbar wird. Wir beschreiben nachstehend im Versuchsteil die Trennung eines aus mindestens vier verschiedenen Komponenten bestehenden Peptidgemisches, wie es nach dem Abbau eines basischen Protaminabkömmlings, des Clupeans³⁾, durch Pankreasproteinase erhalten wird, und zwar unter Anwendung der Bleicherde

¹⁾ Vgl. L. Zechmeister u. L. v. Cholnoky, Die chromatographische Adsorptionsanalyse, 2. Aufl., Wien 1938, und zwar S. 264.

²⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 238, 233 (1936); vgl. ferner H. v. Euler u. F. Schlenk, ebenda 246, 64 (1937).

³⁾ Vgl. E. Waldschmidt-Leitz, Fr. Ziegler, A. Schöffner u. L. Weil, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 197, 219, und zwar S. 233 (1931).

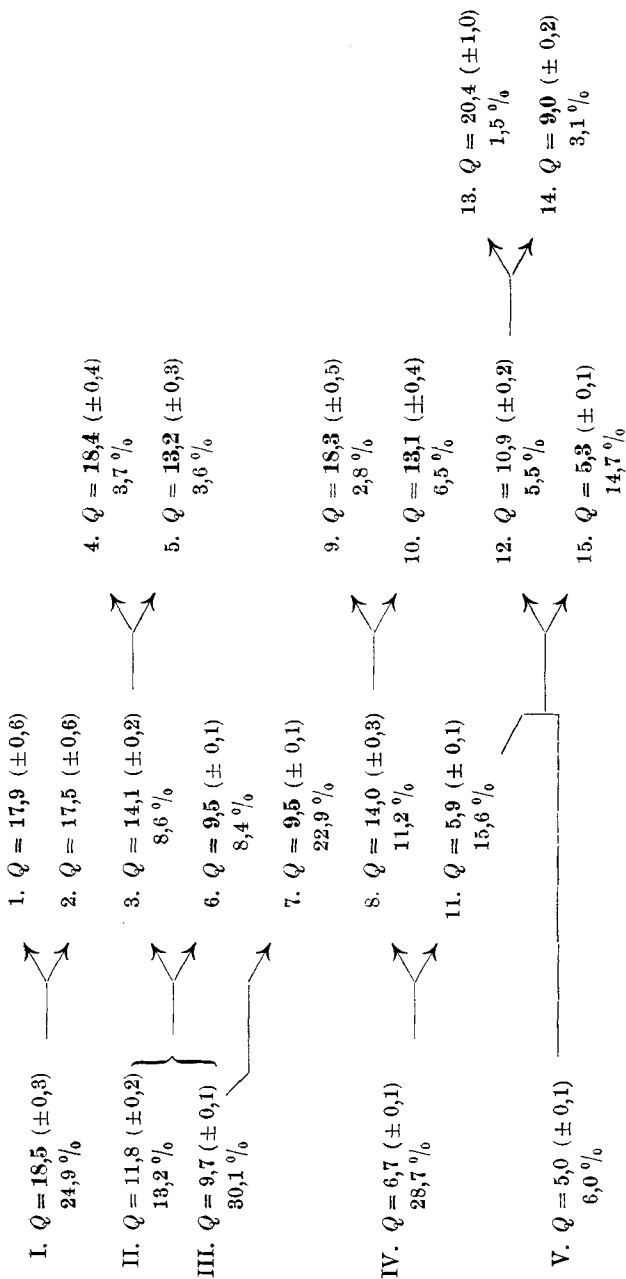
Filtrol-Neutrol¹⁾. Die Adsorptionsschichten fanden wir hier nach der in der Chromatographie üblichen Entwicklung als aufgehellte Zonen deutlich gegeneinander und gegen das unbeladene Adsorbens abgegrenzt. Die Analyse der einzelnen Adsorptionsschichten ergab, daß die in ihnen adsorbierten Peptide sich durch ihren Gehalt an freiem Aminostickstoff, durch den Quotienten $N:NH_2$, unterschieden. Zur Vervollständigung der Trennung in die nach ihrem Quotienten einheitlichen Fraktionen wurde die chromatographische Adsorption wiederholt und jeweils bis zur Konstanz des Quotienten in den einzelnen Fraktionen geführt. Eine quantitative Ablösung der einzelnen Peptide aus den Adsorbaten erreichten wir in jedem Falle durch Pyridin.

Wie das nachstehende Schema veranschaulicht, gelingt es so, das Gemisch der aus dem Clupean gebildeten Peptide mit wenigen Schritten und in nahezu quantitativer Ausbeute in Bestandteile zu zerlegen, die einen verschiedenen und gleichbleibenden Gehalt an Aminostickstoff aufweisen. Wie die chemische Analyse der isolierten Komponenten gezeigt hat, ist dabei für die Auslese einerseits die Molekulargröße der Peptide, die Anzahl der sie aufbauenden Aminosäuren, andererseits die chemische Natur der Aminosäuren in ihnen maßgebend, z. B. ihr Arginingehalt. Die am schwersten adsorbierbare Fraktion (mit dem Quotienten $N:NH_2 = 5,0$) ist die argininärmste.

Die eingehendere chemische Analyse der gewonnenen Peptidfraktionen, die wir in Angriff genommen haben, wird erweisen, ob sie bereits einheitliche chemische Individuen enthalten oder ob sie noch aus Gemischen ähnlich aufgebauter Peptide bestehen. Die Bildung gut kristallisierender Salze, die wir mit den getrennten Fraktionen beobachtet haben, spricht für ihre Einheitlichkeit. Das chromatographische Verfahren, dessen Eignung wir hier an einem ersten Beispiel beschrieben haben, verspricht jedenfalls für die Ermittlung des Aufbaus der Eiweißstoffe, der es dienen soll, ein wertvolles Hilfsmittel zu werden. Denn es ist bemerkenswert, daß es wie im vorliegenden Falle und in anderen bereits von uns durchgeführten Beispielen erlaubt, eine Trennung selbst der in ihrem chemischen Charakter so ähnlichen argininreichen Peptide aus Protaminen durchzuführen.

¹⁾ Bezogen von Hermann Bensmann, Bremen.

Trennungsschema



(Angaben bedeuten: $Q = \text{Quotient } N:NH_2$, % = Ausbeuten an Gesamtstickstoff, bezogen auf die im ursprünglichen Peptidgemisch vorhandene Menge)

Versuche

Spaltung des Clupeans durch Pankreasproteinase. Das Clupean gewannen wir, wie früher beschrieben¹⁾, durch Abbau gereinigten Clupeinsulfats mit Protaminase und reinigten es durch wiederholte Umscheidung aus konz. wäßriger Lösung in der Kälte bis zu konstantem Quotienten $N:NH_2 = 100$.

9,93 g Clupeansulfat (mit einem Stickstoffgehalt entsprechend 20,0%) im Wasser gelöst, wurden mit protaminase- und peptidase-freier Pankreasproteinase [enth. 40 T.-(e.)] nach Einstellung des $p_H = 8,0$ mittels *n*-NaOH und Verdünnen mit Wasser auf 570 ccm bei 30° der Spaltung überlassen. Diese kam nach 4½ Stunden zum Stillstand und schritt auch nach Zugabe einer weiteren Menge Proteinase nicht weiter. In 5,0 ccm der Lösung maß man einen Zuwachs an Aminostickstoff nach van Slyke, entsprechend 1,62 mg (2,80 ccm N_2 bei 17° und 748 mm). Die mit verd. Schwefelsäure neutralisierte Lösung wurde zur Inaktivierung des Enzyms 1 Stunde im siedenden Wasserbad erhitzt und nach Abtrennung einer geringen Menge abgeschiedener Flocken durch Filtration i. V. bei 20° auf ein Volumen von 250 ccm eingeengt.

Fraktionierte Adsorption der Spaltprodukte. Als geeignetes Adsorptionsmittel erwies sich die neutrale, säure-aktivierte Bleicherde Filtrol-Neutrol, welche in wäßriger Suspension unter schwachem Saugen in die Adsorptionsröhre eingefüllt und festgesaugt wurde. Hierauf saugte man das Gemisch der Spaltprodukte durch die Säule, wobei das Fortschreiten der Adsorption sich an der Aufhellung des Adsorptionsmittels vom oberen Rande der Säule her erkennen ließ. Eine deutliche Schichtung des Adsorbats wurde dann durch Entwickeln mit schwachen Elutionsmitteln (Phosphatpuffer von $p_H = 5,6$, bzw. verd. Pyridinlösung) hervorgerufen, wobei auftretende hellere Ringe den einzelnen Adsorptionsschichten entsprachen. Nach dem Herausstoßen der Säule aus dem Adsorptionsrohr wurde nach Zonen zerteilt und die einzelnen Teile eluiert; als Elutionsmittel verwendeten wir eine Lösung von 3 Teilen Pyridin und 7 Teilen 2*n*- H_2SO_4 (Lösung A) für

¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, Fr. Ziegler, A. Schöffner und L. Weil, a. a. O.

die schwerer, bzw. von 1 Teil Pyridin und 9 Teilen $\frac{2}{3}$ n-H₂SO₄ (Lösung B) für die leichter eluierbaren Adsorbate (p_H der Elutionsmittel = etwa 4). Die Elution wurde jeweils bis zum Verschwinden der Ninhydrinreaktion und der Reaktion auf Arginin nach Sakaguchi fortgesetzt (mit 1 ccm der Elution angestellt). Zur Entfernung des Pyridins wurden die Elutionen unter starker Kühlung mit 10%-iger Natronlauge neutralisiert und bei 20° i. V. stark eingeengt; nach 2-maligem Verdünnen mit Wasser und Wiedereinengen waren die Lösungen so frei von Pyridin¹⁾.

Beispiel. 64 ccm einer nach dem oben beschriebenen Verfahren bereiteten Lösung der Spaltprodukte des Clupeans (enthaltend 510,8 mg Stickstoff) wurden durch eine Säule von Filtrol-Neutrol (Höhe 60 mm, Durchmesser 24 mm) absorbiert, das Adsorbat in der Säule dann 3-mal mit Wasser nachgespült (Adsorptionsrestlösung und Waschwässer vereint = Fraktion V). Durch die Säule wurden dann zur Entwicklung zuerst 100 ccm m/15-Phosphatpuffer von $p_H = 5,6$ (= Fraktion IV), sodann 200 ccm m/3-Phosphatpuffer von $p_H = 5,6$ gesaugt (= Fraktion III). Die danach in der Säule verbliebene Substanz war zu zwei deutlich unterscheidbaren, durch eine scharf abgegrenzte Leerzone getrennten Schichten entwickelt. Diese wurden nach dem Herausstoßen der Säule aus der Röhre in einen oberen (= Fraktion I) und unteren Anteil (= Fraktion II) zerteilt.

Fraktion I. Quotient N:NH₂ [im Adsorbat (= 6,6819 g) bestimmt] = 18,5; Gesamtstickstoff: 127,3 mg = 24,9% (zu den Bestimmungen verbraucht insgesamt 8,4 mg Stickstoff).

0,0552 g nach Kjeldahl: 5,26 ccm n/70-Säure, 1,052 mg Stickstoff.
— 0,5056 g nach van Slyke: 0,93 ccm N₂ (19°, 734 mm), 0,529 mg Aminostickstoff.

Eluiert mit 250 ccm Elutionslösung A; Gesamtstickstoff in der Elution: 119,3 mg in 132,2 ccm.

1,00 ccm nach Kjeldahl: 4,51 ccm n/70-Säure, 0,902 mg Stickstoff.

10 ccm der Elution zur Prüfung auf Einheitlichkeit abermals an Filtrol-Neutrol absorbiert (Höhe der Adsorptionssäule = 10 mm, Durchmesser = 6 mm), die Säule darauf in eine obere (= Fraktion 1) und untere Hälfte (= Fraktion 2) zerteilt.

¹⁾ Geprüft nach A. Brüning u. M. Schmetka, Chemiker-Ztg. 58, 156 (1934).

Fraktion 1. Quotient $N:NH_2$ (im Adsorbat bestimmt) = 17,9.

0,0431 g nach Kjeldahl: 3,49 ccm n/70-Säure, 0,699 mg Stickstoff. — 0,3367 g nach van Slyke: 0,53 ccm N_2 (21°, 748 mm), 0,302 mg Aminostickstoff.

Fraktion 2. Quotient $N:NH_2$ (im Adsorbat bestimmt) = 17,5.

0,0422 g nach Kjeldahl: 1,93 ccm n/70-Säure, 0,386 mg Stickstoff. — 0,4140 g nach van Slyke: 0,38 ccm N_2 (21°, 748 mm), 0,217 mg Aminostickstoff.

Fraktion II. Quotient $N:NH_2$ [im Adsorbat (= 5,5401 g bestimmt)] = 11,8; Gesamtstickstoff: 67,5 mg = 13,2% (zu den Bestimmungen verbraucht insgesamt 7,2 mg Stickstoff).

0,0768 g nach Kjeldahl: 4,68 ccm n/70-Säure, 0,935 mg Stickstoff. — 0,5062 g nach van Slyke: 0,92 ccm N_2 (18°, 734 mm), 0,521 mg Aminostickstoff.

Eluiert mit 150 ccm Elutionslösung A, Elution vereinigt mit der des oberen Anteils von Fraktion III (vgl. diese) und adsorbiert an Filtrol-Neutrol (Höhe der Adsorptionssäule = 50 mm, Durchmesser = 19 mm); darauf entwickelt mittels 50 ccm 3%-iger Pyridinlösung, das Adsorbat an der scharf ausgeprägten Grenzschicht zerteilt in oberen (= Fraktion 3) und unteren Anteil (= Fraktion 6).

Fraktion 3. Adsorbat eluiert mit 100 ccm der Elutionslösung A; Gesamtstickstoff in der Elution: 39,8 mg in 100 ccm = 7,79% bzw. unter Einrechnung der für Bestimmungen verbrauchten Menge theoretische Ausbeute ber. 43,9 mg Gesamtstickstoff = 8,6% (zu den Bestimmungen verbraucht 4,8 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_2$ = 14,1.

2,00 ccm nach Kjeldahl: 3,98 ccm n/70-Säure, 0,796 mg Stickstoff. — 10,00 ccm nach van Slyke: 0,49 ccm N_2 (18°, 747 mm), 0,282 mg Aminostickstoff.

Elution der Fraktion 3 adsorbiert an Filtrol-Neutrol (Höhe der Adsorptionssäule = 30 mm, Durchmesser = 19 mm); darauf entwickelt mittels 50 ccm 2%-iger Pyridinlösung, das Adsorbat an scharfer Trennungsschicht zerteilt in oberen (= Fraktion 4) und unteren Anteil (= Fraktion 5).

Fraktion 4. Adsorbat eluiert mit 60 ccm der Elutionslösung A; Gesamtstickstoff in der Elution (in 137 ccm): 15,2 mg = 3,0% bzw. theoretische Ausbeute 18,7 mg = 3,7% (zu den Bestimmungen verbraucht 4,6 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_2$ = 18,4.

3,00 ccm nach Kjeldahl: 1,68 ccm n/70-Säure, 0,336 mg Stickstoff. — 17,50 ccm nach van Slyke: 0,19 ccm N_2 (21°, 727 mm), 0,106 mg Aminostickstoff.

Fraktion 5. Adsorbat eluiert mit 50 ccm der Elutionslösung A; Gesamtstickstoff in der Elution (in 50 ccm): 14,7 mg = 2,9% bzw. theoretische Ausbeute 18,2 mg = 3,6% (zu den Bestimmungen verbraucht 3,8 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_2$ = 13,2.

3,00 ccm nach Kjeldahl: 4,42 ccm n/70-Säure, 0,884 mg Stickstoff. — 10,00 ccm nach van Slyke: 0,40 ccm N_2 (21°, 727 mm), 0,222 mg Aminostickstoff.

Fraktion 6. Adsorbat eluiert mit 100 ccm der Elutionslösung A; Gesamtstickstoff in der Elution (in 59 ccm): 39,6 mg = 7,8% bzw. theoretische Ausbeute 43,0 mg = 8,4% (zu den Bestimmungen verbraucht 4,8 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_2 = 9,5$.

2,00 ccm nach Kjeldahl: 6,76 ccm n/70-Säure, 1,352 mg Stickstoff.
— 5,00 ccm nach van Slyke: 0,62 ccm N_2 (19°, 747 mm), 0,356 mg Aminostickstoff.

Fraktion III. Quotient $N:NH_2$ (in der Elution von 200 ccm bestimmt) = 9,7 (zu den Bestimmungen verbraucht 8,7 mg Stickstoff); Gesamtstickstoff: 157,7 mg = 30,1%.

1,00 ccm nach Kjeldahl: 3,94 ccm n/70-Säure, 0,788 mg Stickstoff.
— 10,00 ccm nach van Slyke: 1,44 ccm N_2 (20°, 738 mm), 0,815 mg Aminostickstoff.

Elution adsorbiert an Filtrol-Neutrol (Höhe der Adsorptionssäule = 60 mm, Durchmesser = 19 mm) und mittels 70 ccm 3%-iger Pyridinlösung entwickelt; darauf etwa 10 mm der Adsorptionssäule (vom oberen Rande her) abgeteilt und mit 75 ccm der Elutionslösung A eluiert und mit der Elution der Fraktion II vereinigt; der restliche, untere Anteil des Adsorbats mit 150 ccm der Elutionslösung A eluiert (= Fraktion 7).

Fraktion 7. Gesamtstickstoff (in 100 ccm): 110,7 mg = 21,7% bzw. theoretische Ausbeute 116,7 mg = 22,9% (zu den Bestimmungen verbraucht 6,6 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_2 = 9,5$.

1,00 ccm nach Kjeldahl: 5,53 ccm n/70-Säure, 1,106 mg Stickstoff.
— 5,00 ccm nach van Slyke: 1,00 ccm N_2 (20°, 757 mm), 0,580 mg Aminostickstoff.

Fraktion IV. Quotient $N:NH_2$ (in der Elution von 100 ccm bestimmt) = 6,7 (zu den Bestimmungen verbraucht 9,9 mg Stickstoff); Gesamtstickstoff: 146,5 mg = 28,7%.

1,00 ccm nach Kjeldahl: 7,33 ccm n/70-Säure, 1,466 mg Stickstoff.
— 5,00 ccm nach van Slyke: 1,94 ccm N_2 (21°, 738 mm), 1,094 mg Aminostickstoff.

Elution adsorbiert an Filtrol-Neutrol (Höhe der Adsorptionssäule = 50 mm, Durchmesser = 19 mm) und mittels 20 ccm 0,5%-iger Pyridinlösung entwickelt; Adsorbat an der Grenzschicht zerteilt in oberen (= Fraktion 8) und unteren Anteil (= Fraktion 11).

Fraktion 8. Adsorbat eluiert mit 150 ccm der Elutionslösung B; Gesamtstickstoff in der Elution (in 100 ccm): 53,6 mg = 10,5% bzw. theoretische Ausbeute 57,2 mg = 11,2% (zu den Bestimmungen verbraucht 9,7 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_2 = 14,0$.

2,00 ccm nach Kjeldahl: 5,36 ccm n/70-Säure, 1,073 mg Stickstoff.
— 5,00 ccm nach van Slyke: 0,34 ccm N_2 (20°, 738 mm), 0,192 mg Aminostickstoff.

Elution adsorbiert an Filtrol-Neutrol (Höhe der Adsorptionssäule = 40 mm, Durchmesser = 19 mm) und mittels 30 ccm 2%-iger Pyridinlösung entwickelt; Adsorbat an der Grenzschicht zerteilt in oberen (= Fraktion 9) und unteren Anteil (= Fraktion 10).

Fraktion 9. Adsorbat eluiert mit 50 ccm der Elutionslösung A; Gesamtstickstoff in der Elution (in 50 ccm): 11,3 mg = 2,2% bzw. theoretische Ausbeute 14,3 mg = 2,8% (zu den Bestimmungen verbraucht 4,1 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_3 = 18,3$.

3,00 ccm nach Kjeldahl: 3,40 ccm n/70-Säure, 0,680 mg Stickstoff. — 15,00 ccm nach van Slyke: 0,32 ccm N_2 (18°, 751 mm), 0,186 mg Aminostickstoff.

Fraktion 10. Adsorbat eluiert mit 100 ccm der Elutionslösung B; Gesamtstickstoff in der Elution (in 100 ccm): 26,5 mg = 5,1% bzw. theoretische Ausbeute 33,4 mg = 6,5% (zu den Bestimmungen verbraucht 5,6 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_3 = 13,1$.

3,00 ccm nach Kjeldahl: 3,98 ccm n/70-Säure, 0,796 mg Stickstoff. — 10,00 ccm nach van Slyke: 0,35 ccm N_2 (18°, 747 mm), 0,202 mg Aminostickstoff.

Fraktion 11. Adsorbat eluiert mit 150 ccm der Elutionslösung A; Gesamtstickstoff in der Elution (in 100 ccm): 74,6 mg = 14,6% bzw. theoretische Ausbeute 79,6 mg = 15,6% (zu den Bestimmungen verbraucht 6,0 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_3 = 5,9$.

3,00 ccm nach Kjeldahl: 11,20 ccm n/70-Säure, 2,239 mg Stickstoff. — 5,00 ccm nach van Slyke: 1,10 ccm N_2 (19°, 747 mm), 0,632 mg Aminostickstoff.

Elution nach Ermittlung des Quotienten vereinigt mit Fraktion V.

Fraktion V. Quotient $N:NH_3$ in der Lösung (100 ccm) = 5,0 (zu den Bestimmungen verbraucht 7,9 mg Stickstoff); Gesamtstickstoff: 30,5 mg = 6,0%. Nach Ermittlung des Quotienten vereinigt mit Fraktion 11.

2,00 ccm nach Kjeldahl: 3,05 ccm n/70-Säure, 0,610 mg Stickstoff. — 15,00 ccm nach van Slyke: 1,64 ccm N_2 (22°, 743 mm), 0,928 mg Aminostickstoff.

Vereinigte Fraktionen V und 11 adsorbiert an Filtrol-Neutrol (Höhe der Adsorptionssäule = 80 mm, Durchmesser = 19 mm) und mittels 30 ccm 0,5%-iger Pyridinlösung entwickelt: Adsorbat = Fraktion 12, Filtrat = Fraktion 15.

Fraktion 12. Adsorbat eluiert mit 80 ccm der Elutionslösung B; Gesamtstickstoff in der Elution (in 106 ccm): 24,3 mg = 4,8% bzw. theoretische Ausbeute 28,1 mg = 5,5% (zu den Bestimmungen verbraucht 4,8 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_3 = 10,9$.

2,00 ccm nach Kjeldahl: 2,29 ccm n/70-Säure, 0,459 mg Stickstoff. — 15,00 ccm nach van Slyke: 0,55 ccm N_2 (19°, 741 mm), 0,317 mg Aminostickstoff.

Elution adsorbiert an Filtrol-Neutrol (Höhe der Adsorptionssäule = 40 mm, Durchmesser = 19 mm) und mittels 50 ccm 0,5%-iger Pyridinlösung entwickelt; Adsorbat an der Grenzschicht zerteilt in oberen (= Fraktion 13) und unteren Anteil (= Fraktion 14).

Fraktion 13. Adsorbat eluiert mit 50 ccm der Elutionslösung B; Gesamtstickstoff in der Elution (in 39 ccm): 5,5 mg = 1,1% bzw. theo-

retische Ausbeute 7,7 mg = 1,5% (zu den Bestimmungen verbraucht 2,5 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_2 = 20,4$.

3,00 ccm nach Kjeldahl: 2,12 ccm n/70-Säure, 0,425 mg Stickstoff.
— 15,00 ccm nach van Slyke: 0,19 ccm N_2 (21°, 727 mm), 0,105 mg Aminostickstoff.

Fraktion 14. Adsorbat eluiert mit 45 ccm der Elutionslösung B; Gesamtstickstoff in der Elution (in 53 ccm): 11,2 mg = 2,2% bzw. theoretische Ausbeute 15,5 mg = 3,1% (zu den Bestimmungen verbraucht 2,1 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_2 = 9,0$.

3,00 ccm nach Kjeldahl: 3,16 ccm n/70-Säure, 0,632 mg Stickstoff. — 10,00 ccm nach van Slyke: 0,51 ccm N_2 (21°, 727 mm), 0,236 mg Aminostickstoff.

Fraktion 15. Gesamtstickstoff in der Fraktion (in 113 ccm): 64,9 mg = 12,7% bzw. theoretische Ausbeute 75,1 mg = 14,7% (zu den Bestimmungen verbraucht 4,5 mg Stickstoff). Quotient $N:NH_2 = 5,3$.

2,00 ccm nach Kjeldahl: 5,75 ccm n/70-Säure, 1,149 mg Stickstoff. — 5,00 ccm nach van Slyke: 0,97 ccm N_2 (20°, 733 mm), 0,545 mg Aminostickstoff.

Die Farbreaktion auf Arginin nach Sakaguchi fiel mit dieser Fraktion negativ aus.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.