

so that the test-piece is left adhering to the (now) uppermost inner surface of the dish. The nitrate, if present, will be shown by a dark blue spot. The position of the spot can be reproduced by free-hand drawing or tracing on the facsimile, which can then be fitted into the original chromatogram and fixed there with cellulose tape. This is made easier if the test-piece and facsimile are cut out with pinking shears.

The limit of detection of this procedure is $1 \mu\text{g}$ potassium nitrate, when applied to Whatman No. 1 paper in $5 \mu\text{l}$ water and developed with pyridine-ethanol-water-concentrated ammonium hydroxide (60:20:16:4). The reagent is more sensitive and specific than brucine², Laurent's acid-ammoniacal silver nitrate-fluorescein reagent², aniline-glucose reagent³, or alkaline 2% phenolphthalein. These reagents give no reaction with $10 \mu\text{g}$ potassium nitrate.

The procedure could be adapted to the examination of whole chromatograms by the use of glass strips or sheets in place of petri dishes. It could also be adapted to the use of other corrosive reagents which could not be used on paper in the normal way.

This work was supported jointly by the Australian Mining Industry Research Association, the Commonwealth Bureau of Mineral Resources, and the C.S.I.R.O.

*Commonwealth Scientific and Industrial
Research Organisation,
Division of Plant Industry,
Black Mountain, Canberra, A.C.T. (Australia)*

K. W. LOACH

¹ F. FEIGL, *Spot Tests in Inorganic Analysis*, 5th Ed., Elsevier, Amsterdam, 1958, p. 327.

² I. I. M. ELBEIH AND M. A. ABOU-ELNAGA, *Anal. Chim. Acta*, 23 (1960) 30.

³ H. WOLFFGANG, *Naturwiss.*, 44 (1957) 538.

Received May 4th, 1961

J. Chromatog., 6 (1961) 367-368

Über die Reinigung von Urease mittels Chromatographie

Bei der chromatographischen Reinigung von Trypsin hat sich CAM-Pulver (Schleicher und Schüll) als Säulenfüllung bewährt¹. Weiterhin ist versucht worden, handelsübliche Urease-Präparate (Merck, Darmstadt) zu reinigen bzw. die Enzymaktivität anzureichern. Hierfür zeigte sich ebenfalls CAM-Pulver* als am besten geeignet. Als brauchbares Eluierungsmittel erwies sich eine 0.2 N Na-Phosphatlösung².

Zur Vorbehandlung der stationären Phase ist das CAM-Pulver nacheinander mit 0.2 N HCl, aqua dest., 0.2 N NaOH und wieder mit aqua dest. gewaschen worden. Hierbei kamen auf je 10 g CAM-Pulver 100 ml 0.2 N HCl und 100 ml 0.2 N NaOH. Es ist bis zur Cl-Freiheit bzw. zur Neutralität mit aqua dest. gespült worden. Die nach der NaOH-Behandlung neutral gewaschenen Pulver konnten bei 4° bis zur weiteren

* CAM-Pulver wurde uns freundlicherweise von der Firma Schleicher und Schüll, Dassel Kr. Einbeck, zur Verfügung gestellt.

J. Chromatog., 6 (1961) 368-369

Verwendung aufbewahrt werden. Vor dem Einfüllen in die Säulen sind entsprechende Mengen an CAM mit der genannten Pufferlösung solange vorbehandelt worden, bis pH 6.8 erreicht wurde.

Eine Säulenlänge von 15 cm hat nicht ausgereicht, alle vorhandenen Komponenten, vor allem die Position mit Urease-Aktivität, von anderen ninhydrin-positivem Material abzutrennen. Demzufolge ist die Länge der Kolonnen auf 50 cm erweitert worden.

In einem typischen Versuch wurde eine 50 × 1 cm CAM-Säule mit der genannten Pufferlösung auf pH 6.8 eingestellt und mit *ca.* 40 mg Urease beschickt. Die Ureaseprobe wurde in der Pufferlösung pH 6.8 aufgelöst. Die Chromatographie erfolgte bei Raumtemperatur. Die Durchlaufgeschwindigkeit betrug 5 ml/h.

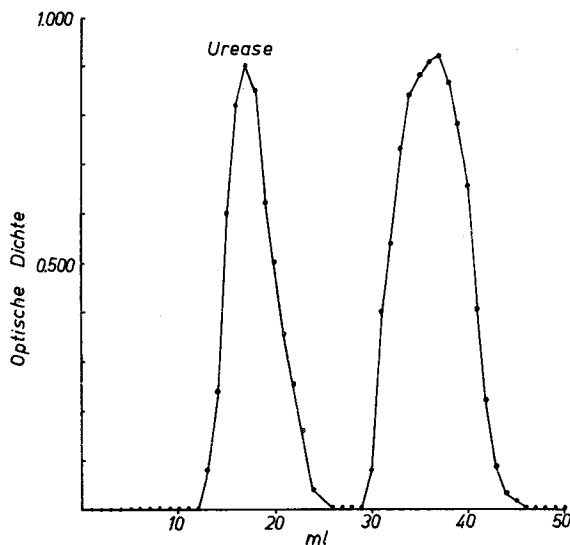


Fig. 1. Elutionsdiagramm von Urease (Merck) an 50 cm CAM-Säulen, Puffer: 0,2 N Na-Phosphatlösung, pH 6.8.

Das Eluat der Säulen wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in 1 ml-Portionen aufgefangen. Von jeder 1 ml-Fraktion sind 0.5 ml zur Ninhydrin-Reaktion³ und 0.5 ml zur Feststellung der Urease-Aktivität verwendet worden.

Die Fermentaktivität wurde in folgender Weise bestimmt. Zu jeder 0.5 ml Portion einer 1 ml Eluatfraktion sind 0.5 ml 1 M Harnstofflösung zugesetzt worden. Diese Proben wurden 1 Stunde lang bei 37° gehalten und anschliessend nesslerisiert.

*Institut für Anatomie und Physiologie
der Haustiere* der Rheinischen Friedrich
Wilhelms-Universität, Bonn (Deutschland)*

F. KNAPPEN
G. KRAMPITZ

¹ G. KRAMPITZ UND F. KNAPPEN, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 174.

² S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 152 (1951) 663.

³ R. MÜLLER UND G. KRAMPITZ, *Z. Tierphysiol. Tierernährung u. Futtermittelkunde*, 11 (1956) 227.

Eingegangen den 15. Mai 1961

* Direktor: Prof. Dr. E. SCHÜRMANN