

ZUR METHODIK DER NINHYDRINREAKTION
UND PAPIERCHROMATOGRAPHIE IM ZUSAMMENHANG MIT
UNTERSUCHUNGEN ÜBER GERINNUNGSPHYSIOLOGISCH
INTERESSIERENDE PHOSPHATIDE

von

E. HECHT UND CHR. MINK*

Physiologisch-chemisches Institut der Reichsuniversität, Utrecht (Holland)

Im Zusammenhang mit unseren systematischen Untersuchungen über die Bedeutung der Lipide für die Blutgerinnung bemühten wir uns um eine geeignete Methode zum Nachweis freien Aminostickstoffs, die uns instandsetzen sollte, die Abhängigkeit der Gerinnungsaktivität von Kephalingemischen von der Anwesenheit freien Aminostickstoffs zu studieren^{1,2}. Die vorliegende Untersuchung bildete die Grundlage für ein eingehenderes Studium aminostickstoffhaltiger Lipide mithilfe der Papierchromatographie, dem wir eine Anzahl gerinnungsphysiologische Funde, wie die Kenntnis neuer gerinnungshemmender Substanzen der 1. Phase der Blutgerinnung³ und die des Antithromboplastins von Tocantins⁴, aber auch einen tieferen Einblick in die Zusammensetzung gerinnungsaktiver Kephalingemische verdanken. Unsere methodische Mitteilung erscheint uns umso mehr berechtigt als die Aminostickstoff besitzenden Lipide bis jetzt noch nicht Gegenstand einer eingehenderen papierchromatographischen Untersuchung waren.

An erster Stelle interessierten wir uns für den Nachweis von freiem Aminostickstoff, wofür, wie wir feststellten, die Reaktionen von Agulhon-Thomas, Rimini, Sivadjan und Cornelius nicht geeignet waren. Mit der Ninhydrinreaktion zum Nachweis der aminostickstoffhaltigen Phosphatidbausteine und auch der intakten Kephaline selbst erhielten wir hingegen befriedigende Resultate.

Wir teilen in der Folge sub A zwei zweckdienliche Ausführungen der Ninhydrinreaktion mit und berichten gleichzeitig über die Empfindlichkeit dieser Reaktionen, über störende Faktoren und soweit möglich über deren Beseitigung. In Abschnitt B werden einige technische Besonderheiten unserer papierchromatographischen Untersuchungen NH_2 -haltiger Lipide insbes. der Kephaline mitgeteilt. Abschnitt C referiert über den Tatbestand anlässlich der papierchromatographischen Untersuchung von rohen und durch Umfällen oder Dialyse gereinigten, teils auch desaminierten Kephalin vor und nach Hydrolyse, während in D auf die Identifizierung der NH_2 -haltigen Hydrolyseprodukte näher eingegangen wird. Im letzten Kapitel werden die erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

* Diese Arbeit wurde mit dankenswerter Unterstützung der Niederländischen Organisation für rein wissenschaftliche Forschung ("Z.W.O.") ausgeführt.

A. Die Ninhydrinreaktion (NR)

Ausführung und Empfindlichkeit der Reaktion

SCHOORL⁵ beschrieb 1941 zwei Ausführungen der Ninhydrinreaktion: NR I und NR II, die uns weiter modifiziert, gute Dienste leisteten.

NR I. 2 ml einer neutralen (!) Lösung der auf freien Aminostickstoff zu untersuchenden Substanz werden mit drei Tropfen einer wässrigen 1%igen Ninhydrinlösung im Reagenrohr erhitzt. Dabei tritt eine deutliche Färbung auf, die bzgl. ihres Farbcharakters von der untersuchten Substanz abhängt. So gibt z.B. Glutaminsäure eine ausgesprochen violette, Serin hingegen eine rein blaue Färbung. Im Interesse einer mengenmässig vergleichenden Schätzung sei darauf hingewiesen, dass die Intensität des Erhitzens ebenso von bestimmendem Einfluss auf die Empfindlichkeit der NR I ist, wie die Gleichmässigkeit des Erhitzens der miteinander zu vergleichenden Proben. Während nach 4 Minuten Erhitzen im kochenden Wasserbad 35–40 γ Aminostickstoff für den Nachweis erforderlich sind, gelingt dieser nach 2½ Minuten starken Erhitzens über der freien Flamme bereits mit weniger als dem 10. Teil dieser Menge. Ninhydrin analog zur Kontrolle mit Wasser allein erhitzt, zeigt keine Färbung.

NR II. 2 ml des neutralen, salzfreien Substrates werden in einem kleinen Porzellanschälchen auf dem kochenden Wasserbad auf ungefähr ein Drittel des ursprünglichen Volumens und nach Zufügen von 3 Tropfen einer 1%igen Ninhydrinlösung zur Trockene eingedampft wobei tiefblaue bis violett gefärbte konzentrische Ringe zurückbleiben, deren Farbe bei positivem Ausschlag, auch nach Zufügen von 1 Tropfen Wasser und 2–3 Tropfen Alkohol, bestehen bleiben muss. Auch bei dieser Reaktion wird die Empfindlichkeit gesteigert, falls nach Eindampfen zur Trockene noch einige Minuten weiter erhitzt wird. Mengen Aminostickstoff von 0.05 γ sind einwandfrei nachweisbar.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der NR II ist es verständlich, dass fast alle Lezithinpräparate mit dieser positive Reaktionen geben, die vermutlich schwer abtrennbaren Verunreinigungen, u.a. Kephalin zugeschrieben werden müssen. Weiter werden mit rohen, nicht wiederholt umkristallisierten Sphingomyelinen bereits in kleinen Mengen gleichfalls positive Reaktionen erhalten, die wie spätere Untersuchungen zeigten, auf einer Verunreinigung mit Sphingosin beruhen und nach wiederholtem Umfällen der Sphingomyeline aus ätherischer Lösung mit Pyridin-Chloroform zu gleichen Teilen bzw. aus methyl-alkoholischer Lösung mit Pyridin nicht mehr beobachtet werden. Neben der analytischen Untersuchung war der negative Ausfall der NR für uns eines der Kriterien reiner Sphingomyeline.

Störende Faktoren

a. Zum Erhalt höchster Empfindlichkeit der Reaktion ist nötig, dass diese in neutraler, keineswegs in alkalischer Lösung und in Abwesenheit von Salzen insbes. von Natriumsalzen ausgeführt wird. Aus diesem Grund erschien uns die Verwendung von NaOH oder HCl zur Hydrolyse wegen der durch die nachfolgende Neutralisation entstehenden störenden Salze ungeeignet. Aus später noch anzuführenden Gründen bevorzugen wir auch gegenüber der von MARTIN⁶ angegebenen Modifikation die nachfolgend beschriebene *Hydrolysiermethode*.

Die zu hydrolysierende Substanz (20–30 mg Kephalin) wird auf dem kochenden Wasserbad mit 17 ml 2 n H₂SO₄ während 5 Stunden erhitzt, nach Abkühlen filtriert und das Filtrat in der Hitze mit festem Ba(OH)₂ bis zur alkalischen Reaktion gegen Lackmus gebracht. Der entstandene BaSO₄-niederschlag wird abzentrifugiert und zwei Mal an der Zentrifuge mit dest. Wasser gewaschen. In die mit den Waschflüssigkeiten vereinigte, trübe Zentrifugierflüssigkeit wird während 15–20 Minuten CO₂ eingeleitet und anschliessend ohne weiter CO₂ einzuleiten auf Kochtemperatur erhitzt, worauf durch Filtrieren eine wasserklare Flüssigkeit erhalten wird. Zur Kontrolle auf die quantitative Entfernung des Ba kann nochmals in der Kälte CO₂ eingeleitet, anschliessend erhitzt und nötigenfalls filtriert werden. Je nach Notwendigkeit wird die Hydrolysierflüssigkeit im Vakuumdestillations-

apparat konzentriert, bzw. anschliessend im Exsikkator zur Trockene gebracht, um den Rückstand in einem bestimmten Volumen Wasser aufzunehmen.

Ein Vorteil dieser Methode ist, dass für Hydrolysestudien ganz bestimmte Säurekonzentrationen von Beginn an bis zum Ende eingehalten werden können. Wir hydrolysierten nötigenfalls vor der beschriebenen Bariumbehandlung in zugeschmolzenen Röhrchen von 8 cm Länge und 1 cm Durchmesser. Bei der von CONSDEN, GORDON UND MARTIN⁷ angegebenen Hydrolysiermethode mit HCl werden hingegen während des Trockenprozesses verschiedene Säurekonzentrationen durchlaufen.

b. Bei Verwendung von Dialysiermembranen industrieller Herkunft beobachteten wir häufig Störungen der NR. Diese geben zuweilen an Wasser bzw. an das Dialysat Stoffe ab, die entweder selbst eine positive Reaktion mit Ninhydrin vortäuschen (blauer Rückstand nach Eindampfen), oder den positiven Ausschlag der Reaktion von nachträglich zugefügten ninhydrinpositiven Substanzen unterdrücken. Unsere selbst bereiteten Kollodiumhülsen zeigten diese Eigenschaft nie.

c. In Gegenwart des Rückstandes von Kephalin nach der van Slyke-Desamination entstehen Substanzen, welche die NR stören und durch Dialyse nicht entfernt werden können. Nach Hydrolyse der Dialysate verringert sich der störende Einfluss, kann jedoch nicht vollständig beseitigt werden. Aus diesem Grund war es leider nicht möglich, mithilfe der angegebenen Reaktionen den quantitativen Verlauf der van Slyke-Desamination von Kephalinpräparaten zu kontrollieren. Der gleichfalls störende Einfluss der Reaktionsflüssigkeit eines Blindversuches der van Slyke-Reaktion ist hingegen nach Dialyse nicht mehr festzustellen.

B. Zur Methodik der Papierchromatographie

Wir bedienen uns hauptsächlich der von CONSDEN, GORDON UND MARTIN⁷ beschriebenen fallenden Methode und beschränken uns daher lediglich auf die Vermeldung einiger uns praktisch erschienenen Aenderungen.

Da wir häufig ganze Filtrierpapierbögen (Whatman I) und meistens mehrere solche gleichzeitig verwendeten, chromatographierten wir in einem entsprechend grossen, von allen Seiten durchsichtigen Glaskasten (70 × 70 × 30 cm) in Metallrahmen auf Füßen. Das Einbringen der Behälter für die Laufflüssigkeiten und der zu chromatographierenden Bögen erfolgt nach Abnehmen der mit Filzdichtung versehenen gläsernen Deckplatte.

Als praktische Neuerung gegenüber den gebräuchlichen Glas- oder Porzellanbehältern zur Aufnahme der Chromatographierflüssigkeit erachten wir die Verwendung von ungefähr 69 cm langen Stücken von Winkeleisen, dessen 3 cm hohe Seitenflächen einen Winkel von 90° einschliessen. Die beiden offenen Enden wurden mit einer rechteckigen Metallplatte (4,5 × 3 cm) zugeschweisst — wobei die Winkelspitze die längere Seite der Metallplatte halbiert — und die eisernen Behälter als Ganzes emailliert. Letztere ruhen mit der breiteren Basis der beiden seitlichen Metallplatten in den Aussparungen der beiden Glasleisten, die an den seitlichen Innenwänden des Chromatographierschranks festgekittet sind. Die gleichen Leisten besitzen auch die Aussparungen für die Glasstäbe, über welche die Filtrierpapierstreifen bzw. —bögen hängen. Die Glasstäbe können in den Aussparungen höher oder niedriger gelagert und damit die Chromatographiergeschwindigkeit beeinflusst werden. In dem Schrank von den oben angegebenen Massen können zwei Schiffchen mit vier Bögen eingesetzt werden, die wir vorteilhaft mit einer Reihe Glasschusser fixieren. Dies gelingt mit diesen infolge der vielen Kontaktpunkte

und des grösseren Gesamtgewichtes derselben viel besser als mit dem üblichen langen Glasstab. Ausserdem führt das grössere Volumen der Schusser (Durchmesser ca. 1.7 cm) infolge der relativ grossen Flüssigkeitsverdrängung zu einer Einsparung der Menge Laufflüssigkeit.

Die gleichen emaillierten Behälter verwenden wir nötigenfalls auch zum Eluieren der Streifen. Mithilfe quadratischer Glasplatten, die in das Schiffchen stehend mit Paraffin eingebettet werden, können beliebig viele Kammern zum Auswaschen verschiedener Papierstreifen voneinander abgegrenzt werden. Zum raschen Auswaschen führten wir die Papierstreifen meistens nicht über Glasstäbe. Diese Methode arbeitet rasch und gleichmässiger wie die bis jetzt bekannt gewordenen, was sich bei einem Vergleich der aufgefangenen Waschflüssigkeiten gleich breiter Papierstreifen zeigt.

An Laufflüssigkeiten verwendeten wir Phenol-Wasser, Phenol-Ammoniak, Butanol-Wasser, Butanol-Pyridin und Isobuttersäure.

Neben der fallenden Chromatographiermethode bedienten wir uns zum Zweck einer raschen Identifizierung einer Substanz auch der steigenden Methode in Reagensgläsern nach ROCKLAND UND DUNN⁸; mit dieser können in einem Fünftel der für die fallende Methode benötigten Zeit bereits Resultate erhalten werden.

Soweit nötig werden weitere technische Einzelheiten in dem folgenden Abschnitt vermeldet.

C. Papierchromatographische Versuche

Zum Versuch gelangten, soweit nicht anders angegeben, Gemische gerinnungsaktiver Phosphatide (Kephaline), die nach einer früher mitgeteilten Vorschrift bereitet wurden¹.

Wir beschreiben nunmehr eine Reihe reproduzierbarer Beobachtungen, an deren weitgehendster Aufklärung wir nicht in erster Linie interessiert waren. Wie die folgenden Mitteilungen zeigen werden, sind diese Beobachtungen jedoch für unsere Gerinnungsstudien methodisch von grundlegender Bedeutung und da sie zudem eine Reihe Suggestionen geben können für Untersucher, die an phosphatidchemischen Fragen interessiert sind, halten wir die vorliegende Mitteilung für berechtigt. Zudem scheint das Problem der Gerinnungsaktivatoren noch stets engstens mit den Phosphatiden verknüpft und eine weiter vertiefte Kenntnis der Phosphatide wird fraglos auch der Aufklärung einer Reihe von gerinnungsphysiologischen Problemen zugute kommen.

In unserer Abbildung geben wir zu den nachfolgend beschriebenen Versuchen die jeweils erhaltenen Ninhydrinreaktionen der Chromatogramme übersichtlich an richtiger Stelle wieder. Wir beschränken uns dabei absichtlich nicht auf die ausschliessliche zahlenmässige Angabe der R_F — werte, da diese durch Schwankungen der Temperatur und der Zusammensetzung der Chromatographierflüssigkeiten Aenderungen unterworfen sind. Auch unterliegen die R_F — werte z.B. für Colamin und Sphingosin einem gewissen Einfluss der Konzentration. Während z.B. in ein und demselben Versuch der R_F — wert für 0.4 γ und 40 γ Colamin von 67 auf 73 steigt, bleibt der R_F — wert für 0.08 — 38 γ Serin konstant 33. Da es uns besonders darauf ankam, die aminostickstoffhaltigen Hydrolyseprodukte mit bekannten Substanzen zu identifizieren indem wir jeweils beide Substanzen nebeneinander unter gleichen Bedingungen chromatographierten, erachteten wir im allgemeinen übereinstimmende R_F — werte der jeweils miteinander zu identifizierenden Substanzen für genügend beweiskräftig.

1. Versuch

Von einer wässrigen, nicht weiter gereinigten Kephalinemulsion (30 mg/1 ml) werden 4×3 ml aufgetragen, mit Phenol-Wasser als Laufflüssigkeit chromatographiert und mit Ninhydrin in Butanol (1 mg/1 ml) entwickelt. Dabei werden entsprechend der Abbildung vier Reaktionen A_1 , A_2 , A_3 und A_4 erhalten.

2. Versuch

Kephalinpräparate, die erst noch durch wiederholtes (6–7 maliges) Umfällen ihrer ätherischen Lösung mit Alkohol gereinigt werden, zeigen in dem analog erhaltenen Chromatogramm die Reaktionen A_1 , A_2 und A_3 , während A_4 nicht mehr erscheint.

3. Versuch

Von den gleichen Präparaten, die in nicht hydrolysiertem Zustand die vier Reaktionen des ersten Versuches mit Ninhydrin geben, wird 1 ml, wie beschrieben, mit Schwefelsäure hydrolysiert und der Rückstand der Hydrolyseflüssigkeit in 0.3 ml Wasser aufgenommen.

Hier von 3–6 ml mit Phenol-Wasser als Laufflüssigkeit chromatographiert, ergeben nunmehr die in B der Abbildung angegebenen ninhydrinpositiven Reaktionen B_1 , B_2 und B_3 . Wie unsere weiteren Versuche zeigten, müssen diese an Glutaminsäure, Serin und Colamin zugeschrieben werden. Im unlöslichen Hydrolyseteil konnte nach Behandlung mit NaOH eine weitere ninhydrinpositive Substanz gefunden werden, die mit Phenol-Wasser chromatographiert nach Entwickeln mit Ninhydrin einen Platz entsprechend A_4 einnimmt und mit Sphingosin identifiziert wurde. Da diese Base ein unlösliches Sulfat bildet, dürfte sie sich in dem Chromatogramm (Teil B der Abb.) nach Hydrolyse mit Schwefelsäure dem Nachweis entzogen haben.

4. Versuch

Von der Emulsion des 1. Versuches (30 mg/ml) wurden auf einem ganzen Bogen Whatman I — Filtrierpapier 40 Punkte mit je 4×3 ml, in total also 14.4 mg des Präparates aufgetragen. Der Abstand der einzelnen Punkte voneinander beträgt 1 cm mit Ausnahme der Punkte 1, 20 und 40, die von den benachbarten Punkten 2 cm entfernt waren. Nach Chromatographieren mit Phenol-Wasser und Trocknen der Bögen werden 3 Kontrollstreifen, die der Punkte 1, 20 und 40, abgetrennt und mit Ninhydrin entwickelt. Die dabei erhaltenen Reaktionen A_1 , A_2 , A_3 und A_4 geben die Lage an für die zur Eluierung der Fraktionen horizontal abzutrennenden Streifen, die entsprechend Abschnitt B mit Wasser eluiert als Eluate A_1 , A_2 , A_3 und A_4 weiteren Versuchen dienen.

Ausserdem wurden von den Bögen nach Chromatographieren des ursprünglichen Präparates auch noch horizontale Streifen an den Stellen abgetrennt, die entsprechend den mit Ninhydrin entwickelten Kontrollstreifen keine positive Reaktion zeigten (z.B. E zwischen A_2 und A_3) und gleichfalls eluiert.

Literatur S. 653.

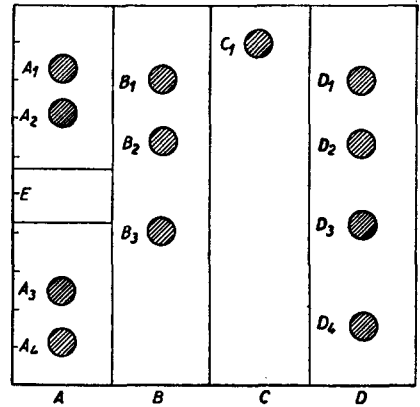


Abb. 1. Schematische Chromatogramme eines Kephalinpräparates mit Phenol-Wasser als Laufflüssigkeit und Ninhydrin als Entwickler vor (A) und nach Hydrolyse (B) und des Teileluates A_1 vor (C) und nach Hydrolyse (D). Erläuterungen zu der Abbildung siehe Abschnitt C.

Alle Eluate wurden zunächst durch Destillation unter vermindertem Druck stark eingengt und von jedem einzelnen derselben je 1/4 nach Trocknen im Vakuumexsikkator in 0.1 ccm Wasser aufgenommen. Der restliche Teil der Eluate wurde mit Schwefelsäure hydrolysiert, der Rückstand der Hydrolysisflüssigkeiten in 0.1 ccm Wasser aufgenommen und zum Vergleich daneben mit dem jeweils zugehörigen nicht hydrolysierten Anteil neuerdings der Chromatographie mit Phenol-Wasser unterworfen.

Zum Erhalt grösserer Mengen wurden die entsprechenden Fraktionen häufig von mehreren analog behandelten Filtrierpapierbögen miteinander vereinigt.

Von dem nicht hydrolysierten Eluat der Fraktion A₁ wurde nach nochmaliger Chromatographie mit Phenol-Wasser, wie zu erwarten, lediglich *eine* ninhydrinpositive Reaktion (C₁ der Abb.) erhalten. Auch mit den entsprechenden Eluaten der anderen Fraktionen (A₂, A₃ und A₄) wurde jeweils *eine* ninhydrinpositive Reaktion zurückerhalten. Was die genaue Lage dieser Reaktionen betrifft, so sind diese nunmehr etwas nach den niedrigeren R_F-Werten hin, in der Abb. also etwas nach oben, verschoben. Die Eluate von A₁ (R_F: 15.8–18.2), A₂ (R_F: 28.6–30.0), A₃ (R_F: 70–73) und A₄ (R_F: 90–91) geben nochmals einzeln der Chromatographie unterworfen, ninhydrinpositive Reaktionen bei C₁ (R_F: 9.4–11.0), C₂ (R_F: 20–25), C₃ (R_F: 69.3) und C₄ (R_F: 76–83). Die A₂, A₃ und A₄ entsprechenden Werte C₂, C₃ und C₄ wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in der Abb. nicht aufgenommen.

Werden die Eluate A₁, A₂, A₃ oder A₄ hingegen jedes für sich nach vorhergehender Hydrolyse chromatographiert, so ergeben diese nach Entwickeln mit Ninhydrin überraschenderweise alle wieder vier Reaktionen (D₁, D₂, D₃ und D₄ der Abb.). D₁, D₂ und D₃ konnten mit Glutaminsäure, Serin und Colamin identifiziert werden. Merkwürdigerweise geben die Eluate von allen untersuchten Teilen des Chromatogramms A, die vor Hydrolyse keine positive NR zeigten (z.B. E der Abb.), nach Hydrolyse gleichfalls die 4 Flecken des Chromatogramms D der Abb.

5. Versuch

Weiter wurden die wässrigen Kephalemulsionen auch noch nach 5 tägiger Dialyse gegen Leitungswasser und destilliertem Wasser vor und nach Hydrolyse chromatographisch untersucht. Damit sollte mit einer gelegentlich zur Entfernung wasserlöslicher Verunreinigungen angewandten Reinigungsmethode der Phosphatide durch Dialyse Rechnung getragen werden.

Die dialysierten Präparate zeigten in nicht hydrolysiertem Zustand chromatographiert, von schwächeren Reaktionen A₁ und A₂ abgesehen, das bekannte Bild der nicht dialysierten Präparate. In den Chromatogrammen der dialysierten Präparate nach Hydrolyse fehlt wie in den analogen nicht dialysierten Präparaten der unterste Fleck, entsprechend dem R_F-Wert von A₄ und ausserdem tritt die Reaktion B₁ (Glutaminsäure), auch nach Auftragen hoher Konzentrationen, nicht mehr auf. Die Flecken B₂ und B₃ konnten an Serin und Colamin zugeschrieben werden. Der Gehalt an Kjeldahlstickstoff (1.91%) und Phosphor (3.66%) wurde durch die Dialyse nicht verändert (1.90 bzw. 3.41%) falls die dialysierten Präparate vor dem Analysieren gut homogenisiert wurden.

6. Versuch

Während der 5. Versuch eine Reinigung der Präparate durch Dialyse zum Gegenstand hatte, sollte diese auch noch durch wiederholte Umfällung derselben angestrebt

werden. Die Präparate wurden 6 mal aus petrolätherischer Lösung nach jeweiligem Stehen über Nacht bei 0° C und Abfiltrieren eventueller Ausscheidungen durch Eintragen in die vierfache Menge Alkohol (96%) umgefällt. Nach Trocknen des zuletzt erhaltenen Niederschlages im Vakuumexsikkator und Aufnehmen in absolutem Aether wurde analog noch zweimal mit absolutem Alkohol umgefällt und das so erhaltene Präparat vor und nach Hydrolyse mit Schwefelsäure chromatographisch untersucht. Das Chromatogramm des gereinigten, nicht hydrolysierten Präparates unterschied sich von dem analogen nicht gereinigten, wie in dem 2. Versuch bereits ausgeführt wurde, lediglich durch das Fehlen der ninhydrinpositiven Reaktion A₄. Die hydrolysierten Präparate vor und nach Reinigung zeigten hingegen keinerlei Unterschied. In beiden Chromatogrammen fehlt das A₄ entsprechende Sphingosin, während B₁ (Glutaminsäure) neben B₂ und B₃ (Serin und Colamin) unverändert anwesend bleiben.

Die Versuche 5 und 6 zeigen, dass nach Reinigung durch *Dialyse* gegen Wasser im Hydrolysat Glutaminsäure, nicht hingegen im Chromatogramm des nicht hydrolysierten Präparates Sphingosin fehlt, nach Reinigung durch *Umfällen* jedoch im Chromatogramm des nicht hydrolysierten Präparates Sphingosin nicht mehr nachweisbar ist, wohl aber Glutaminsäure im Chromatogramm des hydrolysierten Präparates.

Die Stickstoff- und Phosphoranalysenwerte des durch Umfällen gereinigten Präparates mit 1.89 bzw. 4.01% zeigen gegenüber den Werten des nicht weiter gereinigten Präparates bzgl. des Phosphorwertes eine Verbesserung (1.91 bzw. 3.66%).

7. Versuch

Schliesslich wurde noch das nach van Slyke desaminierte Präparat vor und nach Hydrolyse chromatographisch untersucht. Der Inhalt des Desaminationsgefässes wurde nach octylalkoholfreiem Desaminieren von 30 mg Substanz in einer Collodiumhülle aufgefangen und gegen Leitungswasser dialysiert. Nach einigen Stunden wurde die Hülle erneuert um Fehlerquellen durch eventuelle Membranschäden infolge des anfänglichen Kontaktes der Membran mit Eisessig auszuschalten. Die Dialyse wurde nunmehr bis zum Erhalt negativer Reaktionen auf Nitrit (Reaktion nach Romijn und Diphenylaminreaktion) gegen Leitungswasser und zuletzt gegen destilliertes Wasser fortgesetzt. Die aus 3 Versuchen vereinigten Dialysierflüssigkeiten wurden eingeeengt und von einem Teil derselben der Rückstand (3 mg) in petrolätherischer Lösung in nicht hydrolysiertem Zustand aufgetragen und der Chromatographie mit Phenol-Wasser unterworfen. Die genannten 3 mg entsprechen ungefähr der zehnfachen Menge, die gewöhnlich von nicht hydrolysierten Präparaten zum Versuch gebracht wurde. Der verbleibende Rest der Hydrolysierflüssigkeit wurde, wie üblich, mit Schwefelsäure hydrolysiert und der gesamte Rückstand der zur Trockene eingedampften Hydrolysierflüssigkeit (2 mg) in der kleinstmöglichen Menge Wasser aufgenommen und gleichzeitig mit dem nicht hydrolysierten Präparat chromatographiert.

Das Chromatogramm des nicht hydrolysierten desaminierten Präparates zeigte keine Spur einer positiven Ninhydrinreaktion, das hydrolysierte Präparat hingegen wiederum alle vier Komponenten, einschliesslich der Glutaminsäure. Letztere wurde durch gleichzeitiges Mitschromatographieren reiner Glutaminsäure identifiziert. Da bei Auftragen geringerer Mengen des desaminierten und hydrolysierten Präparates allein Colamin im Chromatogramm erscheint, nehmen wir an, dass Colamin in grösseren Mengen wie die übrigen Aminostickstoffträger anwesend ist.

Die genannten NH₂-haltigen Komponenten müssen sich in gebundener Form der

Desamination nach van Slyke entzogen haben und werden erst nach Hydrolyse nachweisbar. Dieser Befund spricht für die Anwesenheit von gebundenem Aminostickstoff in Kephalinpräparaten und könnte die Beobachtung von FOLCH⁹ und anderer erklären, dass die Aminostickstoffbestimmung von Kephalin nach Hydrolyse jeweils höhere Werte ergibt, wie die Bestimmung in gleichen Mengen desselben, jedoch nicht hydrolysierten Präparates.

Identifizierung der ninhydrinpositiven Reaktionen des Kephalinhydrolysates (siehe Tab. I) mit verschiedenen Chromatographierflüssigkeiten

Die in Klammern vermeldeten R_F -werte der letzten Spalte entsprechen den gleichzeitig ausgeführten Kontrollbestimmungen mit den in der 2. Spalte angegebenen chemisch reinen Substanzen.

D. Identifizierung der ninhydrinpositiven Hydrolyseprodukte

Da die Temperatur während des Chromatographierprozesses und die Zusammensetzung der Laufflüssigkeiten auf die erhaltenen R_F -werte von Einfluss sind, wurden jeweils gleichzeitig in ein — und demselben Versuch — also unter gleichen Bedingungen — neben den zu untersuchenden Hydrolysaten auch die reine aminostickstoffhaltige Substanz, deren Anwesenheit vermutet wurde, als Kontrolle mituntersucht.

In der nachfolgenden Tabelle enthält die letzte Spalte die jeweils erhaltenen R_F -werte und in Klammer, die der in der zweiten Rubrik genannten, chemisch reinen Substanz.

TABELLE I

NR der Abb.	Identifiziert mit:	Chromatographierflüssigkeit	Methode	R_F -werte
B ₁	Glutaminsäure	Phenol-Wasser	fallend	18.5 (18.5)
B ₁	Glutaminsäure	Phenol-NH ₃	fallend	25.0 (25.0)
B ₁	Glutaminsäure	Phenol-NH ₃	fallend	26.0 (27.0)
B ₁	Glutaminsäure	Butanol-Wasser	fallend	0.8 (1.1)
B ₁	Glutaminsäure	Butanol-Pyridin	fallend	2.4 (2.7)
B ₁	Glutaminsäure	n Buttersäure-H ₂ O	fallend	16.0 (16.0)
B ₁	Glutaminsäure	Phenol-Wasser	steigend	42.0 (42.7)
B ₁	Glutaminsäure	Phenol-Wasser	steigend	43.0 (44.7)
B ₂	Serin	Phenol-Wasser	fallend	37.0 (36.0)
B ₂	Serin	Butanol-Wasser	fallend	4.3 (4.5)
B ₂	Serin	Butanol-Pyridin	fallend	8.6 (9.0)
B ₂	Serin	n Buttersäure-H ₂ O	fallend	36.0 (31.0)
B ₂	Serin	Phenol-Wasser	steigend	33.0 (35.5)
B ₂	Serin	Phenol-Wasser	steigend	34.0 (35.5)
B ₃	Colamin	Phenol-Wasser	fallend	66.0 (61.0)
B ₃	Colamin	Butanol-Wasser	fallend	9.2 (8.4)
B ₃	Colamin	Butanol-Pyridin	fallend	19.0 (16.0)
B ₃	Colamin	Phenol-Wasser	steigend	71.0 (71.0)
B ₃	Colamin	Phenol-Wasser	steigend	72.2 (75.5)

Bezüglich des Nachweises von Sphingosin, das der Urheber der Reaktion A_4 zu sein scheint, sei mitgeteilt, dass die R_F -werte von reinem Sphingosin, das durch Hydrolyse aus Sphingomyelin oder Cerebron erhalten wurde, ferner von nicht weiter gereinigtem Sphingomyelin als solchem und von Fraktion A_4 mit Phenol-Wasser chromatographiert übereinstimmen (R_F : 88, 87 bzw. 86). Fraktion A_4 und Sphingosin in weiteren Versuchen nebeneinander mit Phenol-Wasser, Butanol-Wasser und Buttersäure-Wasser chromatographiert, geben ninhydrinpositive Reaktionen mit den R_F -werten 85 und 86, 87 und 91 und 93 und 94. Endlich ist auch aus dem unlöslichen Hydrolyserückstand der untersuchten Kephalinpräparate nach Behandlung mit NaOH eine mit Sphingosin zu identifizierende ninhydrinpositive Substanz erhältlich. Weitere Einzelheiten sollen anlässlich unserer systematischen Untersuchung über die Bedeutung der Lipide für die Blutgerinnung in der 2. Mitteilung über die Diaminophosphatide beschrieben werden.

E. Diskussion der Ergebnisse

Die Tatsache, dass bei der papierchromatographischen Untersuchung von Kephalingemischen mit Phenol stets vier Fraktionen (A_1 , A_2 , A_3 und A_4) mit reproduzierbaren R_F -werten ihrer Reaktion mit Ninhydrin erhalten werden, spricht für die Anwesenheit besonders charakterisierter Verbindungen. Dies um so mehr als nach Hydrolyse dieser Kephalingemische mit Schwefelsäure auch zwei bereits bekannte Aminostickstoff besitzende Bausteine, Serin (B_2) und Colamin (B_3), identifiziert werden konnten und in der Literatur Colaminkephalin längst und Serinkephalin seit den Untersuchungen von FOLCH¹⁰ bekannt geworden sind.

Der strukturelle Einbau des Serins und des Colamins in das Molekül des klassischen Kephalingemisches ist bekannt und ohne weiteres verständlich. Wollte man hingegen die erstmals durch uns unter den Hydrolyseprodukten identifizierte Glutaminsäure (B_1), die von CHARGAFF und Mit.¹¹ in den Chromatogrammen lediglich als über dem Serin gelegene ninhydrinpositive Reaktion bereits beobachtet und von GORDON¹² für Oxylysin gehalten wurde, dem Kephalinmolekül als Bestandteil eingliedern, so ergäben sich besondere Schwierigkeiten.

An dem Vorliegen von Glutaminsäure kann nicht gezweifelt werden, da die fragliche Substanz mit fünf verschiedenen Laufflüssigkeiten mit der fallenden und der steigenden Methode⁸ chromatographiert und mit Ninhydrin entwickelt Reaktionen mit den gleichen R_F -werten wie die jeweils gleichzeitig ausgeführten Kontrollen mit chemisch reiner Glutaminsäure zeigt. Die einzige Möglichkeit einer chemischen Bindung der Glutaminsäure im Kephalinmolekül scheint uns ähnlich der der Fettsäuren mit einer ihrer Carboxylgruppen zu sein.

Über A_4 können wir lediglich aussagen, dass die positive Reaktion mit Ninhydrin Sphingosin zuzuschreiben ist. Damit wird auch verständlich, dass die Reaktion A_4 nach Hydrolyse mit Schwefelsäure nicht mehr wahrgenommen werden kann, da sich Sphingosin nach dieser Behandlung als unlösliches Sulfat dem Nachweis mit Ninhydrin entzieht. Sphingosin ist in dem Hydrolyserückstand des Kephalingemisches in der Tat als Sulfat vorhanden und kann nach Freimachen der Base mit NaOH chromatographisch an der gleichen Stelle wieder nachgewiesen werden. Ob das Sphingosin nur der regelmässig anwesende Begleiter unreiner Sphingomyeline ist, die ihrerseits in nicht weitgehend gereinigten Kephalinpräparaten stets in beachtlichen Mengen vorkommen, wissen wir nicht.

Überraschend war für uns die Tatsache, dass die einzelnen Eluate der chromatographisch erhaltenen Fraktionen A_1 , A_2 , A_3 und A_4 nach Hydrolyse mit Schwefelsäure jeweils wieder 4 ninhydrinpositive Reaktionen D_1 , D_2 , D_3 und D_4 geben, während sie in nicht hydrolysiertem Zustand nochmals chromatographiert, von einer geringen Verschiebung in Richtung der niedrigen R_F -werte abgesehen, annähernd wieder ihren ursprünglichen Platz einnehmen (z.B. $A_1 \rightarrow C_1$). Dieser Befund müsste, falls wir zunächst von einer kephalinfremden Verunreinigung absehen wollen, das Vorliegen von kettenförmig aneinander gebundenen Kephalinmolekülen suggerieren. Ein Colaminkephalin könnte mit seiner freien NH_2 -gruppe eine Bindung eingehen mit der noch freien $COOH$ -gruppe eines Serinkephalins und dieses wiederum mit seiner freien NH_2 -gruppe mit der noch gleichfalls freien $COOH$ -gruppe der Glutaminsäure. Letztere könnte mit ihrer zweiten $COOH$ -gruppe nach Art der Fettsäuren im Kephalinmolekül gebunden sein. Für derartige Kettenbildungen ergeben sich eine Reihe von Kombinationsmöglichkeiten, wobei sich der N — und P — gehalt dieser Verbindungen, verglichen mit den entsprechenden Werten für das klassische Kephalin, kaum zu ändern braucht.

Noch überraschender als der soeben mitgeteilte Befund war für uns die Tatsache, dass auch die Eluate der ninhydrinnegativen Teile des Chromatogramms von dem ursprünglichen Kephalinpräparat (z.B. E), die neuerdings chromatographiert erwartungsgemäss keine positive Reaktion mit Ninhydrin geben, nach Hydrolyse ebenfalls alle vier bei D schematisch angegebenen Reaktionen mit Ninhydrin zeigen. Wie wir feststellten, beruhen diese auf der Anwesenheit von Glutaminsäure, Serin, Colamin und Sphingosin. Eine Erklärung hiefür wäre, dass sich von zwei Glutaminsäuren enthaltenden Kephalin, welche die Endstücke der Kette bilden, die beiden Glutaminsäuren gegenseitig mit ihren noch freien $COOH$ - und NH_2 -gruppen zu einem Ring betainartig schliessen. Das dabei entstehende Molekül besitzt keine freie Aminogruppe und gibt erst nach Hydrolyse diese frei und damit positive Ninhydrinreaktionen. Es würden somit ähnliche Verhältnisse vorliegen, wie bei dem durch SANGER¹³ beschriebenen cyclischen Peptid, dem Antibioticum Gramicidin S und dem Tyrocidin von CHRISTENSEN¹⁴, die gleichfalls erst nach Hydrolyse die Ninhydrinreaktionen ihrer Aminosäuren geben. Auch Ovalbumin besitzt erst nach Hydrolyse freie Aminogruppen.

Es wäre aber auch denkbar, dass neben Colamin- und Serinkephalinen Monoaminophosphatide vorkommen, die als Aminostickstoffkomponente einen der anderen gefundenen NH_2 -träger enthalten. Alle diese Verbindungen müssten dann nach Hydrolyse jedoch jeweils einen Aminostickstoffträger allein im Chromatogramm nachweisen lassen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass Eikephalin nach einer Untersuchung von CHARGAFF¹⁵ wohl Colamin, aber keine Aminosäuren enthalten soll. Unsere orientierenden Versuche mit Eikephalin zeigten, dass in diesem eine ganze Reihe Aminostickstoff enthaltende Verbindungen vorkommen, die mit früheren, weniger empfindlichen Methoden untersucht, dem Nachweis entgingen. Ihre Anzahl scheint, unseren Beobachtungen zufolge, von der Konzentration der hierzu verwendeten Säure abhängig zu sein.

Wollen wir die Existenz von Kephalin annehmen, die entsprechend der herkömmlichen Nomenklatur ausschliesslich Colamin oder Serin u.s.w. enthalten, so könnte unser Befund, demzufolge die eluierten "Kephaline" (z.B. A_1 bzw. C_1) nach Hydrolyse nicht einen, sondern vier ninhydrinpositive Stoffe geben, damit erklärt werden, dass sich über den ganzen Filtrierpapierbogen ein zyklisches Phosphatid gleichmässig verteilt, das lediglich nach Hydrolyse die Ninhydrinreaktionen sämtlicher Aminostickstoff-

komponenten zeigt. Damit könnte aber der einzige, dem jeweils untersuchten Kephalin zugehörige Aminostickstoffträger nicht mehr allein beobachtet werden. Wir haben keinen Teil des Filtrierpapierbogens entdecken können, dessen Eluat nach Hydrolyse chromatographiert nicht stereotyp die genannten vier Flecken gab. Die Reaktion D_4 ist uns jedoch unerklärlich; sie kann kaum dem Sphingosin allein zugeschrieben werden. Wir wagen den stets wieder beobachteten merkwürdigen Befund, dass nach Hydrolyse des ursprünglichen Kephalinpräparates an der A_4 entsprechenden Stelle keine ninhydrinpositive Reaktion gesehen wird, bei Untersuchung der Eluate A_1 , A_2 , A_3 und A_4 nach nochmaliger Hydrolyse hingegen wohl (D_4), nicht zu diskutieren.

Den sicheren Beweis für die Existenz kettenförmiger und zyklischer Kephaline können wir nicht erbringen. Es unterliegt keinem Zweifel, dass aus Kephalinpräparaten, entsprechend unseren Befunden, verschiedene Typen papierchromatographisch unterschieden und unter deren Hydrolyseprodukten vier verschiedene Substanzen mit freiem, vor Hydrolyse gebundenem Aminostickstoff identifiziert werden können.

Aufgrund der Darstellungsweise unserer Präparate ist es nicht wahrscheinlich, dass diese von Verunreinigungen mit nicht lipidartigen, stickstoffhaltigen Substanzen herrühren. Zudem müsste dies vermutlich auch in dem Analysenergebnis unseres Ausgangsmaterials zum Ausdruck kommen. Das Resultat der analytischen Untersuchung genügt im Gegenteil in hohem Masse den für Monoaminophosphatide typischen Forderungen.

In weiteren chromatographischen Versuchen wurde getrachtet nach Reinigung der Präparate sowohl durch Dialyse als auch durch wiederholtes Umfällen derselben einen Einblick bzgl. der Herkunft der stickstoffhaltigen Verbindungen zu erhalten. Dabei zeigten die Chromatogramme der nicht hydrolysierten, mithilfe der Dialyse gereinigten Präparate, von schwächeren Reaktionen A_1 und A_2 abgesehen, das gewöhnliche Bild der nicht weiter gereinigten Präparate (Versuch 5). Die Chromatogramme der durch Umkristallisieren gereinigten, nicht hydrolysierten Präparate zeigten die an Sphingosin zuzuschreibende Reaktion A_4 nicht mehr. Nach Hydrolyse war das Chromatogramm des durch Dialyse gereinigten Präparates im Gegensatz zu den durch Umfällen vorbehandelten Präparaten frei von Glutaminsäure. Das Resultat der beiden in der Praxis gebräuchlichen Reinigungsmethoden scheint demnach nicht gleichlautend zu sein. Der analytischen Untersuchung zufolge, ist die Reinigung durch Umfällen wirksamer.

Dass die Glutaminsäure, ebenso wie die anderen Aminostickstoffträger in einer mit ihrer Aminogruppe gebundenen Form vorliegt, steht ausser Zweifel.

Aufgrund eines weiteren Versuches scheint uns auch bewiesen, dass alle in Kephalinhydrolysaten angetroffenen Aminostickstoff enthaltenden Komponenten auch in einer mit ihren NH_2 -gruppen gebundenen Form vorliegen können. Versuch 7 zufolge enthält, wie zu erwarten, nach van Slyke desaminiertes Kephalin papierchromatographisch untersucht, keinen freien Aminostickstoff mehr, während in dem desaminierten Produkt nach Hydrolyse wiederum alle NH_2 -komponenten nachgewiesen werden können. Damit erklärt sich auch die von FOLCH⁹ bereits mitgeteilte Tatsache, dass der nach van Slyke bestimmte Aminostickstoffgehalt für ein und dasselbe Kephalin nach Hydrolyse, stets höher ist wie für das nicht hydrolysierte Präparat. In diesem Zusammenhang erinnern wir an die Feststellung von CHARGAFF, ZIFF UND RITTENBERG¹⁵, dass in Phosphatiden aus Schweineherz nur 49,3% des Nichtaminostickstoffes als Cholin identifiziert werden konnte. Für den verbleibenden Rest wurde ein eventuelles Vorliegen des Stickstoffes in gebundener Form in Erwägung genommen. Dabei könne den Untersuchern zufolge z.B. die Aminogruppe des Colamins oder einer Oxyaminosäure an irgendeine organische

Säure, oder an die OH-gruppe der Phosphorsäure gebunden sein. Auf diese Weise wäre nach CHARGAFF *und Mit.* ein Vortäuschen der Anwesenheit von Nichtaminostickstoff möglich und das Anwachsen des Aminostickstoffgehaltes nach Hydrolyse erklärbar. Bei diesen Versuchen wurde die Stickstoffverteilung in den verschiedenen Phosphatiden mithilfe der Isotopen-Verdünnungsmethode von RITTENBERG UND FOSTER¹⁶ ermittelt.

Es kann jedoch nicht bewiesen werden, dass die besprochenen aminostickstoffhaltigen Komponenten, einzeln oder mehrere derselben zusammen, Bestandteile des Kephalinmoleküles sind, welche Annahme der Ausgangspunkt unserer Diskussion war. Die Möglichkeit der Vorliegens anders gearteter, kephalinfremder Verbindungen mit eben diesen Aminostickstoffträgern als Bestandteile bleibt immerhin bestehen.

Eine wie oben bereits erörterte Aneinanderfügung von Kephalinmolekülen würde die Anwesenheit mehrerer — CO-NH — gruppen zur Folge haben. Unser Material gibt jedoch keine positive Biuretreaktion.

Es war naheliegend, in den eluierten Fraktionen unseres Kephalinchromatogrammes (A_1 , A_2 , A_3 und A_4) in aliquoten Teilen den Stickstoff- und Phosphorgehalt zu bestimmen um nach Teilen des Prozentgehaltes durch die zugehörigen Atomgewichte die Anwesenheit des für Monoaminophosphatide typischen Verhältnisses $N:P = 1:1$ zu kontrollieren. Wir haben diese Bestimmungen wiederholt mit allen Fraktionen durchgeführt, ebenso in dem Eluat von vollkommen analog behandelten Kontrollstreifen ohne Substanz. Dabei zeigte sich, dass die Abgabe grosser Mengen von Stickstoff aus dem Papier jede quantitative Stickstoffbestimmung verunmöglicht. Unsere Bemühungen, diese Tatsache durch verschiedentliche Vorbehandlung des Papiers zu ändern, waren erfolglos. Im Hinblick auf die analogen grossen Schwierigkeiten, die MARTIN UND MITTELMANN¹⁷ bei der quantitativen Bestimmung stickstoffhaltiger Substanzen in Papiereluat beschreiben, wobei sich gleichfalls zeigte, dass die Kjeldahlmethode hierfür nicht infragekommt, muss vorgezogen werden, diese Untersuchung so lange aufzuschieben, bis die Papierchromatographie der Kephaline zugunsten einer Säulenchromatographie mit geeigneten Adsorbentien verlassen werden kann.

Molekulargewichtsbestimmungen um fest zu stellen, ob unsere Präparate eventuell Werte ergeben, die höher liegen wie die für das einfache Kephalinmolekül zu erwartenden, haben wir aus ähnlichen Gründen unterlassen, zumal wir uns des sehr beschränkten Wertes dieser Bestimmungen mit unreinen Substanzen wohl bewusst waren.

Da uns die Papierchromatographie stickstoffhaltiger Lipide, insbes. der Kephaline lediglich im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen über die Blutgerinnung interessierte, begnügen wir uns mit der vorliegenden Mitteilung.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Interesse anderer Untersuchungen wird die Ninhydrin-reaktion zum Nachweis freien Aminostickstoffes von Phosphatiden und deren Spaltungsprodukten studiert. Ausserdem werden neben der papierchromatographischen Untersuchung stickstoffhaltiger Lipide noch methodisch allgemein interessierende Besonderheiten unserer papierchromatographischen Technik mitgeteilt.

Es werden eine Reihe papierchromatographische Versuche mit mehr oder weniger durch Umfällen bzw. Dialyse gereinigten Kephalin und mit Präparaten, die nach VAN SLUYKE desaminiert waren, vor und nach Hydrolyse beschrieben, wobei abhängig von der Arbeitsweise in den Hydrolysaten neben Colamin und Serin Glutaminsäure und Sphingosin gefunden und identifiziert wurden. Die hier nicht weiter zu erörternden Ergebnisse könnten entsprechend der Diskussion durch die Annahme von kettenförmig und ringförmig angeordneten Phosphatiden erklärt werden.

Weiter wird in Phosphatiden gebundener, mithilfe der VAN SLYKE-Reaktion nicht entfernbarer Aminostickstoff nachgewiesen und somit eine Erklärung gegeben für die bereits beobachtete Tatsache, dass die VAN SLYKE'sche Aminostickstoffbestimmung in Phosphatiden nach Hydrolyse höhere Werte ergibt wie vor der Hydrolyse.

SUMMARY

In view of other researches, the authors have studied the ninhydrin reaction in order to obtain evidence of free amino-N of phosphatides and their fission products.

Apart from the study of paper chromatography of nitrogenated lipoids, the details of general interest are given of the technique used by the authors. Description is given of a series of experiments of paper chromatography with cephaline, more or less purified by precipitation or dialysis, and with preparations made amino-free by the method of VAN SLYKE, before and after hydrolysis. Glutamic acid and sphingosine have been found in the hydrolysates along with cholamine and serine.

The results could be explained, according to the Discussion, by the hypothesis of disposed phosphatides in chain or ring form. The authors have also proved the presence in the phosphatides of bound amino-N which cannot be eliminated by VAN SLYKE's method; and thus they have given an explanation of the fact observed previously that the determination of amino-N by VAN SLYKE gives higher values in the phosphatides before hydrolysis than after hydrolysis.

RÉSUMÉ

En vue d'autres recherches nous avons étudié la réaction à la ninhydrine pour la mise en évidence d'amino-N libre de phosphatides et de leur produits de scission. A part l'étude par chromatographie sur papier des lipo des azotés nous rapportons également des détails d'intérêt général de notre technique de chromatographie sur papier.

Nous décrivons une série d'essais de chromatographie sur papier avec des céphalines plus ou moins purifiées par précipitation ou dialyse et avec des préparations désaminées selon VAN SLYKE avant et après hydrolyse. Suivant la technique employée, nous avons trouvé et identifié dans les hydrolysats à côté de cholamine et de sérine, de l'acide glutamique et de la sphingosine. Les résultats pourraient s'expliquer, suivant la Discussion, par l'hypothèse de phosphatides disposés en forme de chaîne ou de cycle.

Nous avons également démontré la présence dans les phosphatides d'amino-N lié qui ne peut pas être éliminé à l'aide de la réaction de VAN SLYKE; nous avons ainsi fourni une explication du fait observé précédemment que la détermination d'amino-N de VAN SLYKE donne dans les phosphatides des valeurs plus élevées avant hydrolyse qu'après hydrolyse.

LITERATUR

- ¹ A. FISCHER UND E. HECHT, *Bioch. Z.*, 269 (1934) 115.
- ² E. HECHT, *Sang*, 21 (1950) 486.
- ³ E. HECHT, *Nature*, 167 (1951) 279 und 633; *Nederl. Tijdschr. v. Geneesk.*, im Druck.
- ⁴ E. HECHT, *Acta Physiol. et Pharmacol. Neerl.*, 2 (1951) 134.
- ⁵ N. SCHOORL, *Organische Analyse III*, S. 200 (1941).
- ⁶ R. CONSDEN, A. H. GORDON, UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- ⁷ R. CONSDEN, A. H. GORDON, UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 41 (1947) 590.
- ⁸ L. B. ROCKLAND UND M. S. DUNN, *Science*, 109 (1949) 539.
- ⁹ J. FOLCH, *J. biol. Chem.*, 146 (1942) 35 und zwar S. 41.
- ¹⁰ J. FOLCH, *J. biol. Chem.*, 139 (1941) 973 und 174 (1948) 439.
- ¹¹ E. CHARGAFF, C. LEVINE, UND CH. GREEN, *J. biol. Chem.*, 175 (1948) 67.
- ¹² A. H. GORDON, *Nature*, 162 (1948) 778.
- ¹³ F. SANGER, *Biochem. J.*, 40 (1946) 261.
- ¹⁴ H. N. CHRISTENSEN, *J. biol. Chem.*, 160 (1945) 75.
- ¹⁵ E. CHARGAFF, M. ZIFF, UND D. RITTENBERG, *J. biol. Chem.*, 144 (1942) 343.
- ¹⁶ D. RITTENBERG UND G. L. FOSTER, *J. biol. Chem.*, 133 (1940) 737.
- ¹⁷ A. J. P. MARTIN UND R. MITTELMANN, *Biochem. J.*, 43 (1948) 353.

Eingegangen am 27. Juli 1951