

Die beschriebene Methode erlaubt eine semiquantitative Beurteilung der Hydrolysegeschwindigkeit einer grossen Zahl von Verbindungen bei geringem Material- und Zeitaufwand. Die chromatographische Trennung der Hydrolyseprodukte ermöglicht die qualitative Kontrolle des Reaktionsablaufs im selben Arbeitsgang. Andererseits kann die chromatographische Analyse der Spaltprodukte beim Nachweis unbekannter Ausgangsverbindungen von Nutzen sein. Da Ausgangssubstanz und Hydrolyseprodukte meist leicht zu trennen sind, kann die Hydrolysegeschwindigkeit verschiedener Verbindungen auf derselben Chromatographieplatte untersucht werden. Bei Hydrolysezeiten bis zu 45 min beeinflusst die Säurebehandlung die nachfolgende chromatographische Trennung nicht: Laufzeit und R_F -Werte sind mit und ohne Säurebehandlung gleich. Bei Substanzen, die sehr leicht hydrolysierbar sind, erhält man ähnliche Resultate durch direktes Besprühen der aufgetragenen Proben mit konzentrierter Salzsäure und Erhitzen der Platte auf 100° . Dieses Vorgehen kann jedoch die chromatographische Trennung stören. Es hat zudem den Nachteil, dass die hydrolytische Spaltung nicht kontrollierbar ist, da einerseits die Säurekonzentration während der Hydrolyse nicht konstant bleibt und andererseits die Einwirkung der Säure nach der gewünschten Reaktionszeit nicht sofort unterbrochen werden kann. Die Anwendung der beschriebenen Methode macht den Nachweis von Substanzen mit den üblichen, dem Sorptionsmaterial beigemischten U.V.-Indikatoren unmöglich, da deren Fluoreszenz durch die Säure irreversibel gelöscht wird. Nach dem Abbrauchen der Säure gelingt es jedoch, die U.V.-absorbierenden Stoffe durch Besprühen mit einer Fluoresceinlösung wieder sichtbar zu machen.

*Medizinisch-Chemisches Institut der
Universität Bern (Schweiz)*

MARCO BAGGIOLINI
BEATRICE DEWALD

Eingegangen den 24. Februar 1967

J. Chromatog., 30 (1967) 256-259

***o*-Diphenoloxidase als Sprühmittel zum Nachweis von Substratphenolen auf Dünnschichtplatten**

Die Untersuchung von phenolischen Verbindungen in pflanzlichem Material, in welchem sie in grosser Zahl und in beträchtlichen Mengen vorkommen, gewinnt zunehmend an Bedeutung. Sie lassen sich mit Dünnschichtchromatographie-Methoden befriedigend auftrennen und mit einer Reihe chemischer Reagenzien nachweisen.

Nun ist es aber gerade bei phenolischen Verbindungen aus pflanzlichem Material häufig von Interesse, die chromatographisch getrennten Verbindungen in ihren Substrateigenschaften gegenüber den Phenoloxidasen zu kennzeichnen. Die Substratspezifität von Phenoloxidase-Aufarbeitungen aus Kultur-Champignons, Kartoffelknollen, Löwenzahnwurzeln und Beerenhülsen von Reben konnten wir mit Hilfe eines einfachen Sprühtests charakterisieren¹. Dabei zeigte sich, dass diese Enzympräparate *o*-Diphenoloxidase (*o*-Diphenol: O_2 -Oxidoreductase 1.10.3.1) enthielten.

Enzymaufarbeitung: Homogenisieren in 0.1-0.5 M Phosphatpuffer (pH 6.5), evtl. unter Zusatz von Coffein zur Ablösung²; Zentrifugieren; zweimalige Aceton-

TABELLE I

FARBEN DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHISCH GETRENNTER SUBSTRATPHENOLE NACH BESPRÜHEN MIT *o*-DIPHENOLOXIDASE (PPO)

Substratphenole	R_F -Werte $\times 100$	Farben im U.V. (350 nm)		Farben im Sichtbaren nach Besprühen mit	
		Vor Besprühen mit Trauben-PPO	Nach Besprühen mit Trauben-PPO	Trauben-PPO	Trauben-PPO + Prolin
Brenzcatechin	70	braun	dunkelbraun	rotbraun	violett
<i>p</i> -Cumarsäure	49	dunkelblau	hellbraun	braun	violett
Pyrogallol	38	graubraun	graubraun	graubraun	braun
Dihydrokaffeesäure	37	gelb	graubraun	rotbraun	violett
3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure	37	graubraun	hellbraun	braun	
Kaffeesäure	24 (31)	hellblau	hellbraun	braun	oliv
Protocatechusäure	23	blau	graubraun	rotbraun	braun
Gallussäure	11	blau	grau	hellbraun	grau
Chlorogensäure	6	hellblau	hellbraun	hellbraun	violett
<i>D</i> -Catechin	5	graubraun	gelb	ocker	ocker
<i>L</i> -Epicatechin	4	graubraun	ocker	ocker	ocker
Dopa	1	grau	grau	blauschwarz	blauschwarz
Rutin	1	dunkelbraun	dunkelbraun	dunkelbraun	gelb
Adrenalin	1	gelb	gelbgrün (leuchtend)	rotbraun	

fällung; Reinigung über Sephadex G-25; Nachreinigung über DEAE-Sephadex A 25³.

Diese *o*-Diphenoloxidase-Präparate benutzten wir zum strukturspezifischen Nachweis von dünn-schichtchromatographisch getrennten *o*-Diphenolen. Dünn-schichtchromatographie-Platten (20 × 20 cm) mit Polyamid (Woelm) beschichtet (0.25 mm) werden nach Trennung der Phenole mit dem Fließmittel Benzol-Dioxan-Ameisensäure (70:25:5) im Exsikkator über festem Natriumhydroxyd säure-frei getrocknet, anschliessend zuerst mit einem 0.1M-Phosphatpuffer vom pH 6.5 und dann mit der Enzymlösung gleichmässig übersprüht. Man kann das Enzym auch im Puffer gelöst anwenden.

Durch Besprühen mit *o*-Diphenoloxidase-Lösung werden *o*-Diphenole in charakteristisch gefärbte chinoide Verbindungen umgewandelt. Dabei ist die Sprühmethode deshalb von Vorteil, weil bei Trocknen der Schicht an der Luft der Acceptor O₂ gleichmässig und schnell einwirken kann. Damit ist auch die Möglichkeit gegeben unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Substrate an der zeitlichen Ausbildung der Farbe vergleichend zu beurteilen.

Wie aus Tabelle I hervorgeht, lassen sich im U.V. wie im sichtbaren Bereich die einzelnen Substrate farblich differenzieren. Eine zusätzliche Farbvariation ergibt sich durch das Nachbesprühen mit Prolinlösung (1 %-ig in Phosphatpuffer vom pH 6.5) unmittelbar nach Behandeln der Schicht mit dem Enzym. Die Kombination Brenzcatechin-Prolin wird von uns als Schnelltest auf *o*-Diphenoloxidase benutzt⁴.

Wir verwendeten den Sprühtest in anderer Form (Brenzcatechin als Sprühmittel) schon früher zum Nachweis von *o*-Diphenoloxidase nach Elektrophorese, wie dies neuerdings von HAREL, MAYER UND SHAIN^{5,6} zum Enzymnachweis auf Dünn-schicht-Platten beschrieben wurde.

*Bundeforschungsanstalt für Rebenzüchtung Geilweilerhof,
Abteilung Biochemie und Physiologie,
Siebeldingen/Pfalz (Deutschland)*

F. DRAWERT
H. GEBBING
A. ZIEGLER

1 F. DRAWERT UND H. GEBBING, *Z. Naturforsch.*, im Druck.

2 F. DRAWERT UND H. GEBBING, *Naturwiss.*, im Druck.

3 F. DRAWERT UND H. GEBBING, in Vorbereitung.

4 F. DRAWERT UND H. GEBBING, *Naturwiss.*, 50 (1963) 522.

5 E. HAREL, A. M. MAYER UND Y. SHAIN, *Phytochem.*, 4 (1965) 783.

6 A. M. MAYER, *Phytochem.*, 5 (1966) 1297.

Eingegangen den 23. Februar 1967

J. Chromatog., 30 (1967) 259-261

Méthode rapide pour détecter de faibles quantités de phénol dans le salicylate de benzyle

Le salicylate de benzyle peut contenir de faibles quantités de phénol libre nuisible, en particulier en cosmétique, par suite de ses propriétés irritantes vis-à-vis de la peau.

J. Chromatog., 30 (1967) 261-262