

CHROM. 5205

Eine einfache Methode zum säulenchromatographischen Nachweis der Peroxydase

Bei Untersuchungen über die säulenchromatographische Trennung der Isoenzyme der Peroxydase aus partiell gereinigten Homogenaten von Rebenblättern stellte sich heraus, dass die bisher angegebenen Bestimmungsverfahren nicht befriedigten. Bei einer grösseren Zahl von Fraktionen ist der Nachweis nach CHANCE UND MAEHLY¹, wie er von manchen Autoren, zum Teil modifiziert, verwendet wurde²⁻⁴, zu langwierig. Ähnliches gilt für die von anderer Seite⁵⁻⁷ benutzten Methoden, da die exakte Einhaltung bestimmter Zeiten bei langen Reihenuntersuchungen sehr störend ist.

Die Absorption der Säuleneeluat wurde ferner bei 401–405 nm gemessen⁸⁻¹¹. Die so erhaltenen Gipfel sollen mit der Peroxydaseaktivität, nachgewiesen durch Oxydation von *o*-Dianisidin in Gegenwart von H₂O₂, übereinstimmen^{9,10}. Dieses Verfahren eignet sich normalerweise vorzüglich für die Säulenchromatographie, da ohne weiteres in der Durchflussküvette gemessen werden kann. Jedoch traten bei unseren Untersuchungen mit Rebenblatthomogenaten mehrere Nachteile auf: Die Extinktionswerte liegen bei grösseren Elutionsvolumina meist zu niedrig, so dass die Gipfel nur schwierig erkennbar sind. Bei nur partieller Reinigung des Homogenates stört auch zuweilen die austretende Eigenfarbe und führt zu irrigen Ergebnissen. Die bei 401–405 nm angezeigten Kurven waren nicht in allen Fraktionen mit denen der Peroxydase-Isoenzyme, nachgewiesen durch Polyacrylamid-Elektrophorese, identisch.

Bei der elektrophoretischen Analyse der Peroxydasen aus Rebenblättern^{12,13} hatte sich bei uns die von SCHRAUWEN¹⁴ vorgeschlagene Methode bestens bewährt. Wir prüften daher, ob diese Reaktion auch für den säulenchromatographischen Nachweis brauchbar wäre. Dabei erwies sich folgendes Verfahren als sehr vorteilhaft:

0.5 ml Eluat (pH 7.0–7.5) wird mit 0.5 ml einer frisch zubereiteten Lösung nach SCHRAUWEN versetzt. Man inkubiert 1–2 h bei Zimmertemperatur und vermischt dann die Lösung mit 5 ml 70 %igem Äthanol. Dadurch wird die Reaktion gestoppt und ein eventuell auftretender Niederschlag gelöst. Die Messung kann nun sofort oder innerhalb von 6 h bei 500–510 nm erfolgen. In dieser Zeitspanne wurde keine Veränderung der Extinktion beobachtet. In den folgenden 12 h vermindert sich die Extinktion nur sehr unwesentlich um *ca.* 0.01. Die aufgetretene Färbung ist also sehr haltbar.

Die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse stimmen mit denen der elektrophoretischen Analysen überein.

Die in der Vorschrift von SCHRAUWEN¹⁴ angegebene H₂O₂-Menge steht im richtigen Verhältnis zu den Substratkonzentrationen, sie kann aber noch um 100 % erhöht werden, wobei die Extinktion ansteigt. Sie darf aber nicht niedriger angesetzt werden. Liegt das pH-Optimum der Peroxydase nicht im Bereich von 7.0 bis 7.5, dann muss die Inkubationslösung entsprechend eingestellt werden. Bei extremer Verdünnung der Peroxydasekonzentration kann die Eluatmenge im Reaktionsansatz erhöht werden, jedoch muss eine zu starke Verdünnung des zugesetzten Alkohols vermieden werden. Vergällung des Alkohols mit Petroläther stört nicht die Reaktion.

Die Inkubationsdauer und der Messtermin sind innerhalb der angegebenen Zeiten nicht kritisch. Die besonderen Vorteile der Methode liegen also darin, dass die Messung nicht von der exakten Einhaltung bestimmter Zeiten abhängig ist und dass tatsächlich die Peroxydasen nachgewiesen werden. Da es sich bei der Peroxydase um ein recht stabiles Ferment handelt, kann man eine grössere Zahl von Fraktionen sammeln und sie zu einem passenden Zeitpunkt analysieren.

Frau JOHANN danke ich für ihre sorgfältige Mitarbeit.

Landes Lehr- und Forschungsanstalt für Wein- und Gartenbau,
673 Neustadt/Weinstrasse (B.R.D.)

H. SCHAEFER

- 1 B. CHANCE UND A. G. MAEHLY, in S. P. COLOWICK AND N. O. KAPLAN (Herausgeber), *Methods in Enzymology*, Vol. II, Academic Press, New York, 1957, p. 784.
- 2 L. SEQUEIRA UND L. MINEO, *Plant Physiol.*, 41 (1966) 1200.
- 3 G. A. LANZANI UND E. GALANTE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 106 (1964) 20.
- 4 G. A. LANZANI, A. MARCHESINI, E. GALANTE, L. A. MANZOCCHI UND P. SEQUI, *Enzymologia*, 33 (1967) 361.
- 5 D. C. McCUNE, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94 (1961) 723.
- 6 D. RACUSEN UND M. FOOTE, *Can. J. Bot.*, 43 (1965) 817.
- 7 K. K. ADATHODY UND D. RACUSEN, *Can. J. Bot.*, 45 (1967) 2237.
- 8 K. G. PAUL, *Acta Chem. Scand.*, 12 (1958) 1312.
- 9 L. M. SHANNON, E. KAY UND J. Y. LEW, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 2166.
- 10 H. E. KASINSKY UND D. P. HACKETT, *Phytochemistry*, 7 (1968) 1147.
- 11 G. MAZZA, C. CHARLES, M. BOUCHET, J. RICARD UND J. RAYNAUD, *Biochim. Biophys. Acta*, 167 (1968) 89.
- 12 H. SCHAEFER, *Wein-Wiss.*, 25 (1970) 277.
- 13 H. SCHAEFER, *Wein-Wiss.*, 26 (1971) im Druck.
- 14 J. SCHRAUWEN, *J. Chromatogr.*, 23 (1966) 177.

Eingegangen am 22. Dezember 1970

J. Chromatogr., 56 (1971) 158-159

CHROM. 5193

Trennung von Phenothiazinen auf pH-Gradient-Schichten

Die Prüfung der Einsatzmöglichkeiten des TAS-Verfahrens zur Analyse von Phenothiazinen¹ erfolgte an einem Modellgemisch von sieben Substanzen, die sich untereinander entweder durch den Substituenten in der 3-Stellung oder am N-Atom (in der 10-Stellung) unterscheiden. Um auf diese Weise von den verschiedenen Phenothiazin-Strukturtypen jeweils einen Vertreter zu erfassen, wurden folgende Verbindungen ausgewählt: Diethazin, Levomepromazin, Promethazin, Chlorpromazin, Thioridazin, Prochlorperazin und Trifluperazin. Es gibt in der Literatur eine ganze Reihe von Arbeiten²⁻¹⁵, die sich mit der dünnschichtchromatographischen Trennung von Phenothiazinen befassen. In den angeführten Publikationen²⁻¹⁵ wurden insgesamt ca. 34 verschiedene mobile Phasen auf Kieselgel- bzw. Aluminiumoxid-Schichten eingesetzt. Dennoch ist keine wirklich gute Trennung gelungen, bei der fast alle

J. Chromatogr., 56 (1971) 159-162