

Steroide vom Start in verschiedenen Lösungsmittelsystemen – gemessen und ausgerechnet – sind in den Tabellen I und II angeführt.

*Tabelle I*  
*R<sub>f</sub> einiger Steroide auf mit 30% Formamid imprägniertem Papier*

Mobile Phase	<i>R<sub>f</sub></i>				
	Cortisol	Cortison	Östradiol	Östron	Östriol
Chloroform . . .	0,44	0,76	0,81	0,93	0,13
Tetrachlormethan	0,01	0,05	0,11	0,41	0,00
Toluen . . . . .	0,02	0,05	0,41	0,78	0,00
Äthylenchlorid. .	0,24	0,54	0,75	0,88	0,07

Kleine Abweichungen werden durch alle Faktoren, welche *R<sub>f</sub>*-Werte bei der gewöhnlichen Chromatographie-Au führung bedingen, beeinflusst (Temperaturschwankungen, ungleichmässige Imprägnierung u. a.).

*Tabelle II*  
*Distanzen der Steroide vom Start nach wiederholter Entwicklung auf dem mit 30% Formamid imprägnierten Papier*  
*Das Chromatogramm wurde zuerst mit Chloroform bis zu der Distanz von 20 cm entwickelt.*

Steroid	Distanz Steroid-Start nach der zweiten Entwicklung in cm					
	mit Äthylenchlorid 37,5 cm		mit Toluen 40 cm		mit Tetrachlormethan 29 cm	
	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
Cortisol . . .	15,7	16,0	9,4	9,5	9,0	9,5
Cortison . . .	27,7	25,0	16,4	15,5	15,8	15,6
Östradiol-17-β .	32,2	28,6	26,0	23,0	17,6	18,1
Östron . . . .	35,5	32,5	35,3	30,7	22,9	20,9
Östriol . . . .	5,0	4,5	2,6	2,6	2,6	2,5

Die Methode wurde zur Trennung der Steroide aus Harn und zur quantitativen Bestimmung nach der Elution aus Papier verwendet. Sie hat sich besonders bei der Trennung von Östriol, Östradiol-17-beta und Östron bewährt. Östriol ist viel polarer als die zwei anderen genannten Östrogene; in den Lösungsmittelsystemen mit der mehr polaren mobilen Phase (zum Beispiel Formamid/Chloroform) wandert es weg vom Start, aber Östron und Östradiol haben sehr hohe *R<sub>f</sub>*-Werte (Tab. I). Dagegen bleibt Östriol in den Lösungsmittelsystemen mit guter Trennung von Östron und Östradiol (Formamid/Toluen) am Start zurück. Bei der Vereinigung zweier solcher Systeme mit derselben stationären Phase erzielen wir die Trennung von allen drei Östrogenen auf einem Papier (Fig. 1).

M. PRUSÍKOVÁ

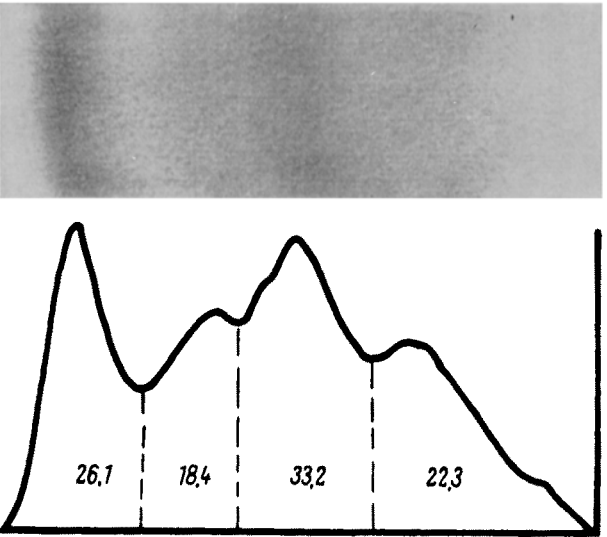
*Forschungsinstitut für Endokrinologie, Prag, 18. Juni 1959.*

Summary

A method of repeated development with use of different solvents on paper impregnated with formamid was used for the separation of certain steroids. Steroids of very different polarity as estrogens were well separated with one single chromatogram.

Paper Electrophoresis Separation of the Soluble Proteins of Rat Muscle Sarcosomes

The study of the soluble proteins of mitochondria may be interesting, not only to know their normal chemical composition, but also to investigate the nature of the changes occurring in pathological conditions. HOGEBOOM and SCHNEIDER<sup>1</sup> made an ultracentrifugal separation of the soluble proteins of liver mitochondria disrupted by sonic vibration and succeeded in separating at least 4 components. 5 components were detected by DE LAMIRANDE *et al.*<sup>2</sup> by electrophoresis in a Tiselius apparatus. Extraction of the proteins was obtained by suspending liver mitochondria in diethylbarbiturate buffer, pH 8.6 at 4°C for 3–4 days.



Pherogram of the soluble proteins of rat muscle sarcosomes

In this short communication, the results of paper electrophoretical separation of the soluble proteins of rat muscle sarcosomes are described.

Albine rats weighing 150–180 g were killed by bleeding. Weighed amounts of the leg muscles were finely minced with scissors and then homogenized with 10 volumes of 0.25 M sucrose, containing 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, in a Potter-Elvehjem type apparatus. Tissue debris, nuclei, and myofibrils were discarded by centrifugation at 1000 g for 10 min. Sarcosomes were then sedimented at 12000 g for 30 min. 3 washings of the sediment were made by resuspending in buffered 0.25 M sucrose. The last sediment was then frozen with rapidly expanding gaseous CO<sub>2</sub>; the frozen material was first mechanically disrupted by grinding in a mortar previously placed in the ice-box at – 20°C, then put to thaw in a thermostat at 37°C. The entire procedure was repeated 10 times. After the last thawing, the material was resuspended in 2 ml of sodium diethylbarbiturate buffer, pH 8.6, and centrifuged at 20000 g for 1 h. 0.1 ml of the supernatant fluid was then put on Whatman No. 1 paper strips and submitted to electrophoresis in a Jouan apparatus. Best conditions to obtain a good separation were encountered by applying a current of 110 Volts, with

<sup>1</sup> G. H. HOGEBOOM and W. C. SCHNEIDER, *Science* 113, 355 (1951).  
<sup>2</sup> G. DE LAMIRANDE, C. ALLARD, and A. CANTERO, *Cancer* 6, 179 (1953).

sodium diethylbarbiturate buffer, pH 8.6, ionic strength 0.1, for 12 h. The strips were then stained with amylo-schwarz. Under the present conditions, 4 protein components were seen (Fig.). Their percentage distribution (average of 10 determinations) was respectively 26.1, 18.4, 33.2, and 22.3.

MARIA ASSUNTA DIANZANI MOR

*Istituto di Patologia generale della Università di Genova (Italia), July 26, 1959.*

#### Riassunto

Viene descritta la presenza, nel succo dei sarcosomi del muscolo di ratto, di 4 componenti proteici separabili mediante elettroforesi su carta. I 4 componenti sono rappresentati nella misura di rispettivamente 26.1, 18.4, 33.2 e 22.3 per 100 delle proteine totali.

### Über die Aktivität der Tyrosinase in Tabaksamen

Bei Untersuchungen über die Verbräunung des Tabaks wird oft auf die Rolle der Tyrosinase hingewiesen. BÄBLER<sup>1</sup> konnte zeigen, dass die Tyrosinase der Tabakblätter die Chlorogensäure zu oxydieren vermag, wobei braune oder unter Einwirkung anderer Stoffkomponenten rotbraune bis schwarze Pigmente entstehen. Er erklärte die Chlorogensäure neben Rutin als das für die Verbräunung wichtigste Substrat. Diese war bei unter Glas gezogenen Tabakpflanzen in viel geringerer Menge vorhanden als bei Freilandtabak, und die Blätter verbräunten in der Folge sehr unvollständig oder überhaupt nicht. Die geringe Chlorogensäurekonzentration konnte durch künstliche Belichtung auf den normalen Wert gebracht werden<sup>2</sup>. EICHENBERGER<sup>3</sup> stellte fest, dass die Aktivität der Tyrosinase stark von der Insertionshöhe und vom Alter der Blätter abhängt. Eine Bedeutung für die Terminaloxydase-tätigkeit spricht er ihr bei Tabakblättern ab, weist jedoch auf die Rolle bei der Pigmentbildung hin.

Da in den genannten Arbeiten unseres Institutes die Wichtigkeit des Systems Tyrosinase-Chlorogensäure immer wieder in Erscheinung trat, war es von Interesse, die Tyrosinase in Tabaksamen nachzuweisen und ihr Verhalten gegenüber Chlorogensäure und anderen Phenolen zu charakterisieren, sowie Auskunft über die Lebensdauer zu erhalten. Es wurde daher ein Vergleich der Tyrosinaseaktivität in frischen (Ernte 1958) und gelagerten (Ernte 1955) Samen angestellt.

Die wässrigen und gepufferten Enzymextrakte erhielten wir nach einer für Samen von *Secale cereale* beschriebenen Methode<sup>4,5</sup>. 4 g Samen der Varietät *Mont Calme brun* wurden mit Wasser oder 1/15 M Phosphatpuffer pH 5,6 während 3 min im Homogenisator «Bühler» zerschlagen und in der «Wifug»-Zentrifuge bei 6000 Touren/min während 5 min zentrifugiert. Die überstehende Lösung filtrierte man durch einen Seitzfilter, und das klare, farblose Filtrat wurde mit Wasser bzw. Puffer auf 200 ml verdünnt.

Zur Bestimmung der Cresolaseaktivität verwendeten wir *p*-Cresol, für die Catecholaseaktivität L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) oder Chlorogensäure. Die Inkubation erfolgte bei 30 oder 37°C. Die Aktivität des Enzymextraktes wurde durch periodische Extinktionsmessung mit Hilfe eines Pulfrich-Photometers (Filter S47, Wellenlänge 463 mμ) ermittelt. Die letzte Ablesung wurde bei *p*-Cresol nach 24 h, bei DOPA nach 1 h gemacht. Die Zunahme der Extinktion mit der Zeit zeigen die Diagramme der Abbildungen 1 und 2.

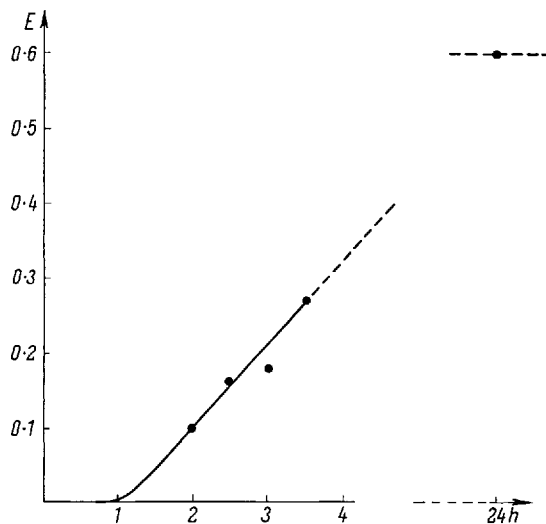


Abb. 1. Cresolaseaktivität. 10 ml gepufferter Enzymextrakt, 8 ml 1/15 M Phosphatpuffer, 10 mg *p*-Cresol, pH 5,6, Temperatur 30°C. Küvettentiefe 5 cm

Ausserdem haben wir den Einfluss des Thioharnstoffs – ein mit Kupfer stabile Komplexe bildendes Reagens – als Inhibitor der Tyrosinase<sup>6</sup> auf die Aktivität des Enzymextraktes untersucht. Die Resultate sind in Tabelle I zusammengefasst.

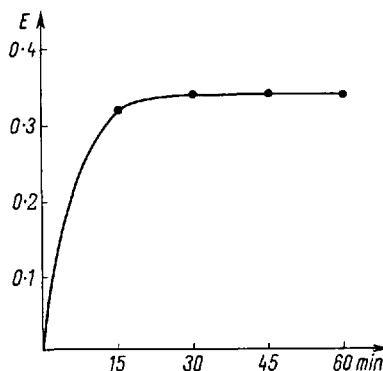


Abb. 2. Catecholaseaktivität. 15 ml gepufferter Enzymextrakt, 5 ml 1/15 M Phosphatpuffer, 15 mg DOPA, pH 5,6, Temperatur 30°C. Küvettentiefe 5 cm

Da Tabaksamen sehr lange keimfähig bleiben, war es von besonderer Bedeutung festzustellen, ob 3½ Jahre alte Samen durch die Lagerung eine Einbusse ihrer Tyrosinaseaktivität, verglichen mit frischem Saatgut, erlitten

<sup>1</sup> S. BÄBLER, Diss. ETH, Zürich 1957.

<sup>2</sup> A. FREY-WYSSLING und S. BÄBLER, Exper. 13, 399 (1957).

<sup>3</sup> E. EICHENBERGER, Diss. ETH, Zürich 1952.

<sup>4</sup> J. W. SZARKOWSKI, Acta biochim. Polon. 4, 129 (1957).

<sup>5</sup> J. W. SZARKOWSKI, Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II, 5, 1 (1957).

<sup>6</sup> C. R. DAWSON und W. B. TAPLEY, The Enzymes, Vol. II, P. I (J. B. SUMNER and K. MYRBÄCK, Academic Press, New York 1951), p. 454.