

Fluorometrische Harmanbestimmung nach dünn-schichtchromatographischer Abtrennung

Harman (3-Methyl-4-carbolin) ist ein Hauptalkaloid mehrerer Passifloren¹, das unter dem U.V.-Licht eine starke Fluoreszenz aufweist. Dadurch ist es möglich, geringste Mengen in Pflanzenmaterial und daraus hergestellten Zubereitungen nachzuweisen. Von uns durchgeführte Messungen ergaben, dass die Base in alkoholischer Lösung ihre stärkste Emission bei 378 nm besitzt, während das Maximum der Anregung bei 360 nm liegt (Fig. 1). Es gelang nun, diese Fluoreszenz für eine routinemässige quantitative Bestimmung des Harmans in einem standardisierten Gemisch alkoholischer Auszüge aus *Passiflora incarnata*, *Avena sativa*, *Humulus lupulus*, *Valeriana officinalis* und *Cannabis sativa* heranzuziehen. Voraussetzung war die Abtrennung anderer Carbolinverbindungen² (Harmin, Harmol, Harmalin, Harmalol) und sonstiger störender Begleitstoffe. Sie lässt sich dünn-schichtchromatographisch mit dem Laufmittel Benzol-Chloroform-abs. Äthanol (4:1:1) durchführen und ermöglicht die direkte fluorometrische Auswertung auf dem Chromatogramm.

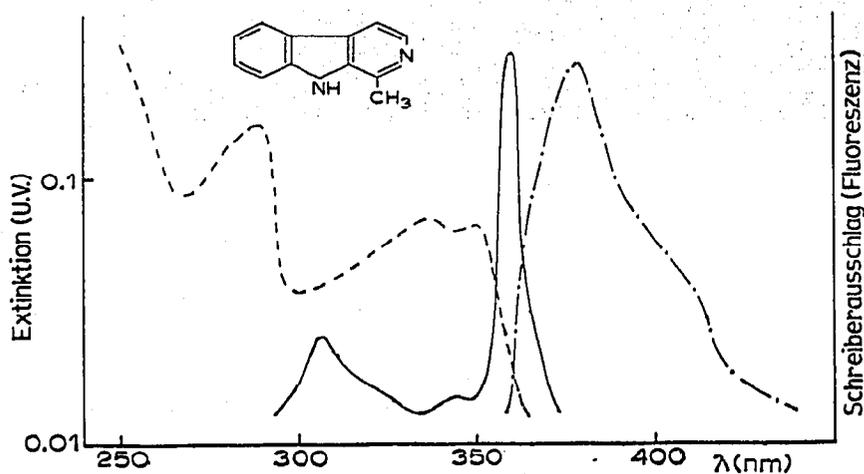


Fig. 1. Fluoreszenzemissionsspektrum (— · — · —) (angeregt bei 307 nm, identisch mit der Anregung bei 360 nm). Fluoreszenzanregungsspektrum (—) (gemessen bei 380 nm in Äthanol, Gerät: Spektralfluorimeter mit zwei Monochromatoren ZFM 4 C, Zeiss). U.V.-Spektrum (- - -) (in Äthanol, Gerät: PMQ II, Zeiss).

In dem aufgeführten Tinkturengemisch ist ein Harmangehalt von 0.005–0.006 % zu erwarten. Nach dem Verdünnen mit 60 %igem Äthanol (10 g/25 ml) werden mit einer Agla-Mikrometerspritze zweimal je 0.01 ml neben Vergleichsmengen von 100, 200 und 300 ng Harman auf eine Kieselgelfertigplatte Merck aufgetragen. Für die quantitative Auswertung nach dem Chromatographieren wurde das Turner-Fluorometer, Modell 111, mit DC-Messtür (Camag) unter folgenden Bedingungen eingesetzt:

Strahlungsquelle	General Electric G ₄ T ₄ /1
Blendeneinstellung	10 ×
Primärfilter	110-811
Spaltbreite	4 mm
Sekundärfilter	110-813
Laufgeschwindigkeit der Plattenkassette	20 mm/min
Schreiber	Servogor (Metrawatt)
Papiervorschub	30 mm/min.

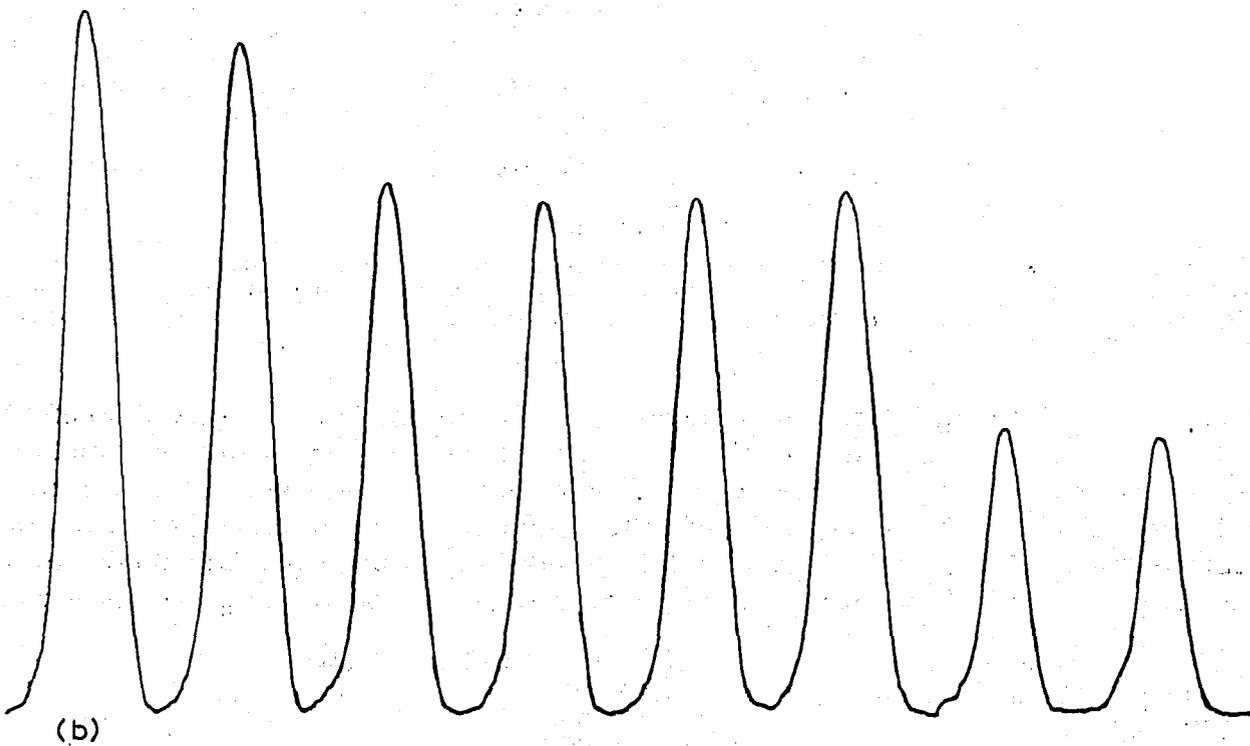
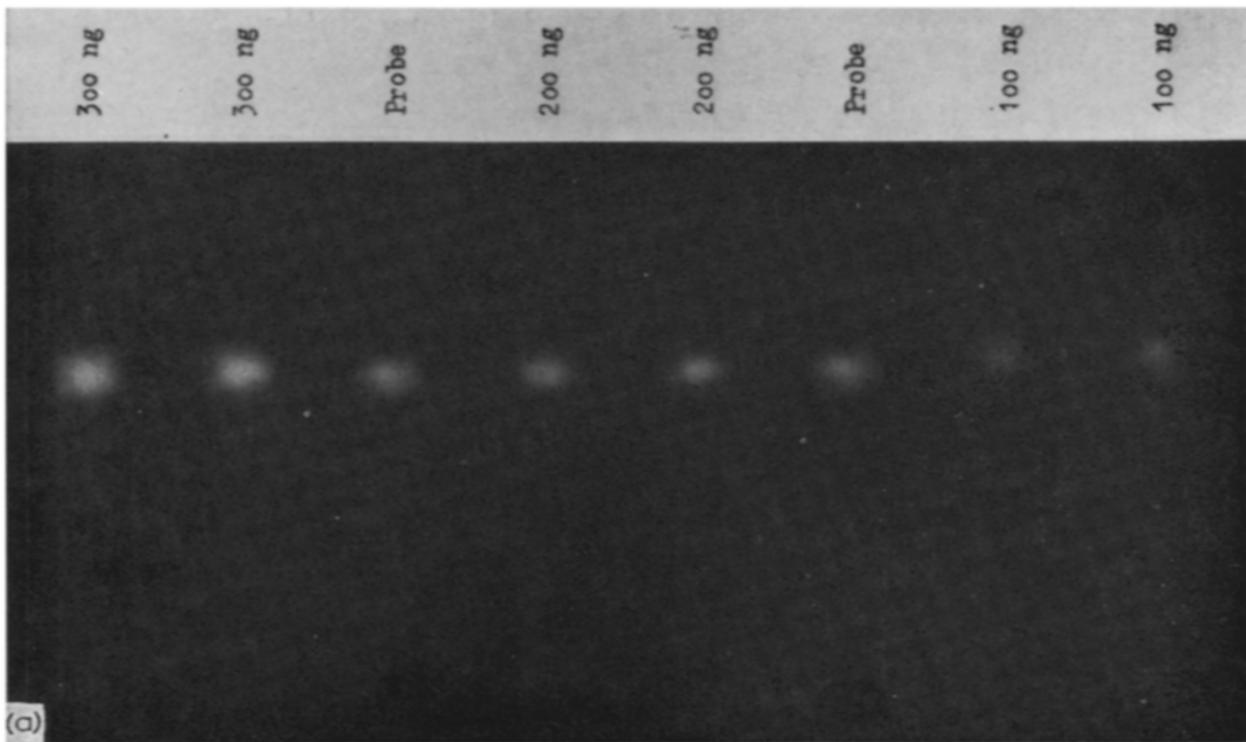


Fig. 2. Dünnschichtchromatographische Auftrennung (a) und registrierte Fluoreszenzintensitäten (b) (von rechts: 100 ng Harman = 5.45 cm², 100 ng = 5.60 cm², Probe = 13.45 cm², 200 ng = 11.80 cm², 200 ng = 12.05 cm², Probe = 13.05 cm², 300 ng = 17.45 cm², 300 ng = 18.25 cm²).

Die Fig. 2 zeigt das chromatographische Bild bei U.V.-Betrachtung und die gemessenen Fluoreszenzintensitäten im R_F -Bereich des Harmans. Die Flächenwerte der Vergleichspeaks, die wir durch Multiplikation der Höhe und ihrer Breite in halber Höhe erhalten haben, führen in bekannter Weise zu einer für jedes Chromatogramm neuen Eichkurve, die nach unseren Erfahrungen bei Verwendung von Fertigplatten bis 300 ng geradlinig verläuft. Für die zu messenden Proben ergeben sich aufgrund der ermittelten Flächenwerte im vorliegenden Fall 221 und 227 ng Harman/0.01 ml Auftragslösung. Das entspricht einem durchschnittlichen Gehalt von 5.6 mg % Harman in der zu untersuchenden Lösung. Die relative Standardabweichung beträgt $\pm 1.9\%$.

In schwächeren Harmanlösungen sind bei entsprechenden Lichtintensitäten des Fluorometers und reduzierten Vergleichsmengen Messungen bis zu 10 ng mit einer relativen Standardabweichung von etwa 10 % bei zwei Werten durchführbar. In harmanarmen Passiflorendrogen ist erst nach Anreicherung der Base in den durch Kaltextraktion mit 1 %iger Salzsäure erhaltenen Auszügen eine Bestimmung in der oben beschriebenen Weise durchführbar.

Frau E. M. Hoernes danke ich für bewährte experimentelle Mitarbeit.

Kontroll-Laboratorium der Dr. Willmar Schwabe GmbH,
75 Karlsruhe-Durlach (Deutschland)

W. MESSERSCHMIDT

1 R. NEU, *Arzneimittel-Forsch.*, 6 (1956) 94.

2 J. LUTOMSKI, Z. KOWALEWSKI, K. DROST UND K. SCHMIDT, *Herba Polonica*, 13 (1967) 44.

Eingegangen den 26. Oktober 1967

J. Chromatog., 33 (1968) 551-553

Visualization of acyl phosphatase after zone electrophoresis and thin-layer gel filtration*

A variety of techniques is currently available for the visualization of proteins after zone electrophoresis and thin-layer gel filtration. The method reported here for the specific detection of fractions with acyl phosphatase activity is based on the use of *p*-nitrobenzoyl phosphate as substrate for the enzyme¹, and on the staining of the residual substrate, after a suitable time, by the hydroxylamine-ferric chloride reaction according to LIPMANN AND TUTTLE². In our laboratory this procedure was used in order to localize the fractions with acyl phosphatase activity in crude extracts of tissues, and during the purification of the enzyme from horse muscle.

* This research was supported by a grant from the "Impresa Enzimologia" of the Italian Consiglio Nazionale delle Ricerche.