

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 Phenothiazinen<sup>1</sup> 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 Arbeiten<sup>2-15</sup>, die sich mit der dünnschichtchromatographischen Trennung von Phenothiazinen befassen. In den angeführten Publikationen<sup>2-15</sup> 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

$hR_F$ -Unterschiede  $\geq 5$  sind. Die Tatsache, dass die Phenothiazine Basen darstellen und die Feststellung, dass die in der Literatur referierten besten Trennergebnisse<sup>14, 15</sup> mit alkalischen Fließmitteln erzielt wurden, veranlasste uns — wie schon bei früheren Arbeiten, z.B. bei Xanthinen<sup>16, 17</sup>, Alkaloiden<sup>25</sup>, Saponinen<sup>25</sup>, Anthrachinonen und Indolderivaten<sup>26</sup> — das Verhalten der Phenothiazine auf pH-Gradient-Schichten<sup>18–23</sup> zu untersuchen.

Zu orientierenden Versuchen benutzten wir drei einfache mobile Phasen und zwar Benzol-Äthanol 96 %ig (95:5), Chloroform-Äthanol 96 %ig (95:5) und Äther-Äthanol 96 %ig (95:5). Dabei erwies sich das erste Fließmittel für eine Trennung der Phenothiazine im alkalischen Gebiet der pH-Gradient-Schicht schon als gut geeignet. Noch grössere Unterschiede in den  $hR_F$ -Werten erhält man bei Einsatz der mobilen Phase Benzol-Aceton (70:30). Wie die Fig. 1 und 2 zeigen, wird, wie wir schon in einer Kurzmitteilung<sup>24</sup> berichtet haben, bei einer Entwicklung quer zum Gradientenverlauf im Gebiet um pH 8.5 eine sehr gute Auftrennung der sieben Phenothiazine erreicht. Das gleiche Fließmittel ist, wie die Fig. 3 zeigt, auch für die Trennung bei einer Entwicklung in Richtung des Gradienten geeignet.

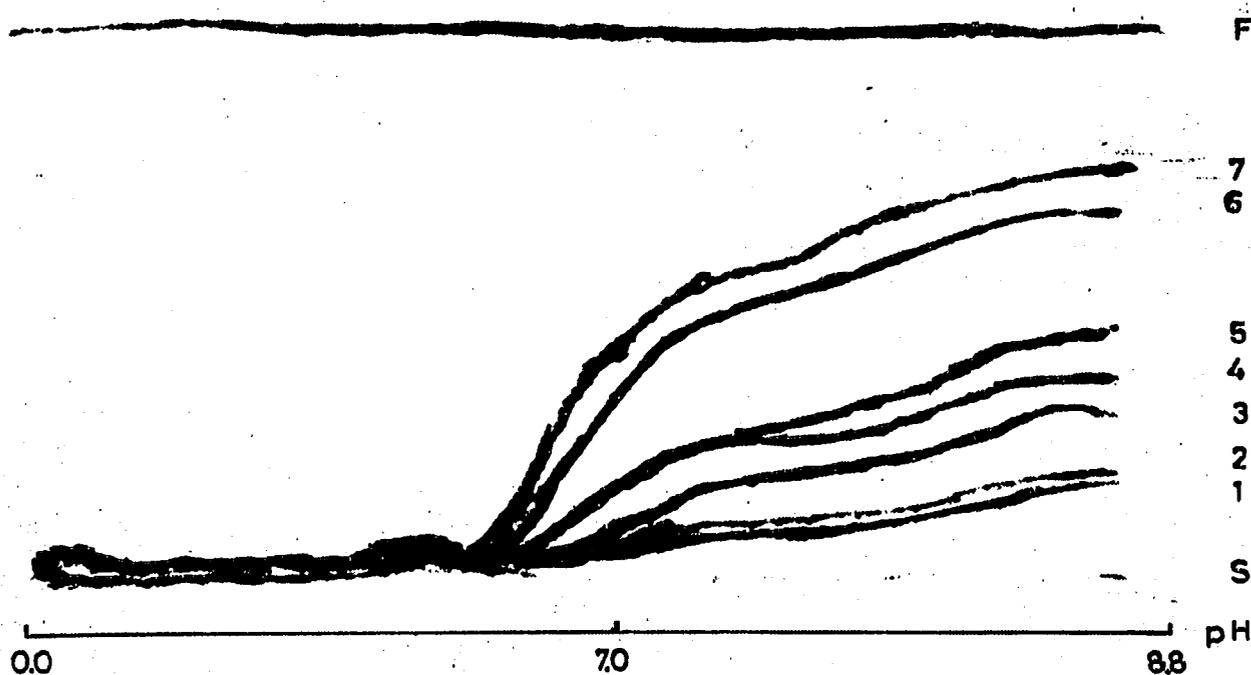


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm von sieben Phenothiazinen. S = Start, 1 = Trifluoperazin, 2 = Prochlorperazin, 3 = Thioridazin, 4 = Chlorpromazin, 5 = Promethazin, 6 = Levomepromazin, 7 = Diethazin, F = Front. Schicht: pH-Gradient. Mobile Phase: Benzol-Aceton (70:30). Laufstrecke:  $2 \times 10$  cm, 50 % relative Feuchte. Sichtbarmachung: Schwefelsäure-Formaldehyd-Reagenz oder Fluoreszenzminderung im UV<sub>254</sub>. Aufgetragen mit dem "Autoliner" quer zum Gradientenverlauf.

#### Experimenteller Teil

Es wurde unter den sog. Standardbedingungen (50 % relative Feuchte, Temperatur 20°, 10 cm Laufstrecke) zweifach entwickelt. Als stationäre Phase dienten pH-Gradient-Schichten, die mit Kieselgel GF<sub>254</sub> unter Verwendung von 0.5 N Schwefelsäure bzw. Natriumhydroxid-Lösung hergestellt wurden. Mobile Phase: Benzol-Aceton (70:30).

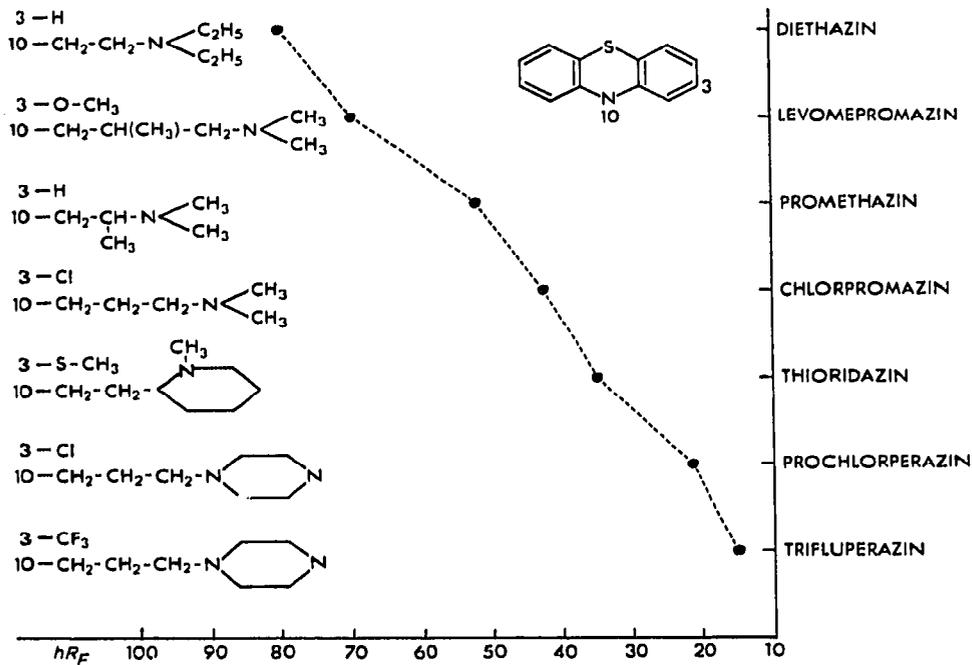


Fig. 2. Graphische Darstellung der Abhängigkeit der  $hR_F$ -Werte von der chemischen Struktur der Phenothiazine auf der pH-Gradient-Schicht.

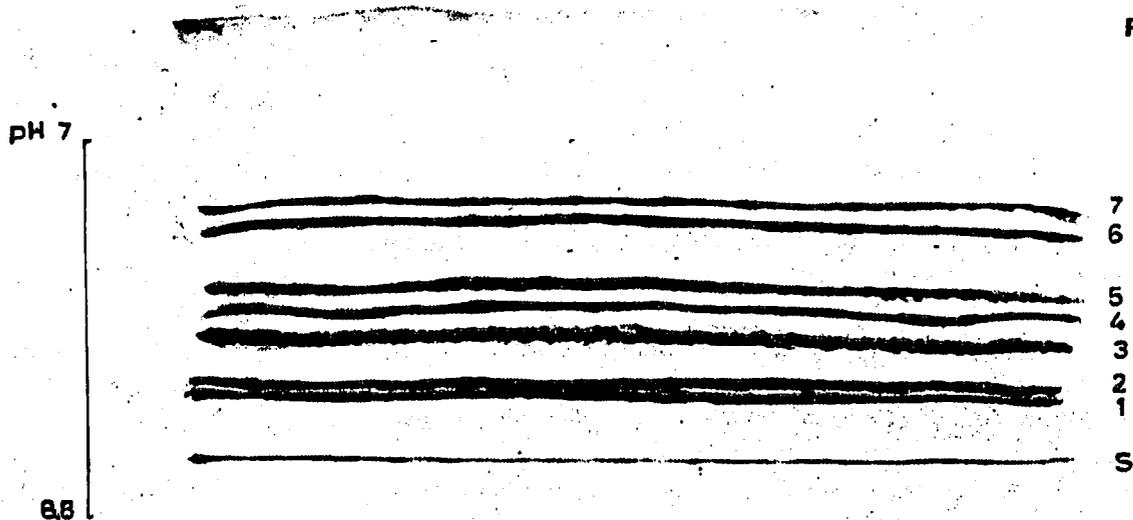


Fig. 3. Dünnschichtchromatogramm von sieben Phenothiazinen. Aufgetragen mit "Autoliner" im pH-Gradient. Sonst wie zu Fig. 1.

Zum Nachweis wurden eingesetzt: (1) Fluoreszenzminderung im UV<sub>214</sub> oder (2) Schwefelsäure-Formaldehyd-Reagenz (0.25 ml Formaldehyd + 20 ml 25%iger Schwefelsäure), wobei die einzelnen Substanzen sich unterschiedlich färben.

Alle Phenothiazine wurden in Methanol gelöst (0.1%ige Lösung). Die Lösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt und vom resultierenden Gemisch etwa 60–80  $\mu$ l strichförmig mit dem "Autoliner" (Desaga, Heidelberg)<sup>20, 22</sup> aufgetragen.

*Ergebnisse und Diskussion*

Mit Hilfe der pH-T-Gradient-Methode lässt sich das chromatographische Verhalten in Abhängigkeit vom pH-Wert der stationären Phase untersuchen. Auf diese Weise lässt sich oft ein für die Trennung optimaler pH-Bereich der stationären Phase erkennen und mit wenigen Versuchen lassen sich entsprechend imprägnierte uniforme Schichten herstellen. Im vorliegenden Fall wird für 7 strukturell verschiedene Phenothiazine beim Schicht-pH-Wert von etwa 8.5 mit dem Fließmittel Benzol-Aceton (70:30) eine sehr gute Trennung erhalten. Wie wir zeigen konnten (mit einfachen, neutralen Fließmitteln), erwies sich die Methode auch für andere Stoffgruppen, z.B. Xanthine<sup>16, 17</sup>, Alkaloide<sup>25</sup>, Saponine<sup>25</sup> und Anthrachinone<sup>26</sup> als sehr nützlich.

Herrn H. ROHNERT danken wir für die technische Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Staatliches Institut für Arzneimittelkontrolle\*\*,  
Prag (Tschechoslowakei)

LJ. KRAUS\*

Institut für Pharmakognosie und Analytische Phytochemie  
der Universität des Saarlandes\*\*\*,  
66 Saarbrücken 11 (B.R.D.)

E. DUMONT

- 1 LJ. KRAUS UND E. STAHL, *Arzneimittelforsch.*, 20 (1970) 1814.
- 2 F. EIDEN UND H. D. STACHEL, *Deut. Apoth. Ztg.*, 103 (1963) 121.
- 3 W. AWE UND W. SCHULZE, *Pharm. Ztg. Ver. Apoth. Ztg.*, 107 (1962) 1333.
- 4 D. WALDI, *Naturwiss.*, 50 (1963) 614.
- 5 T. I. BULENKOV, *Farm. J. (Kiev)*, 19 (1964) 32.
- 6 M. N. SCHERBAKOVA, *Aptech. Delo*, 13 (1964) 41.
- 7 V. M. SVETLAJEVA UND S. V. SHURAVLEV, *Med. Ind. (UdSSR)*, 18 (1964) 38.
- 8 Z. MARGASINSKI, R. DANIELAK, T. POMAZANSKA UND H. RAFALOWSKA, *Acta Pol. Pharm.*, 21 (1964) 5.
- 9 A. NOIRFALISE, *Acta Clin. Belg.*, 20 (1965) 273.
- 10 A. HEYNDRICKY, M. SCHAUVLIEGE UND A. BLOMME, *J. Pharm. Belg.*, 20 (1965) 117.
- 11 J. J. THOMAS UND L. DRYON, *J. Pharm. Belg.*, 19 (1964) 481.
- 12 W. PAULUS, W. HOCH UND R. KEYMER, *Arzneimittelforsch.*, 13 (1963) 609.
- 13 E. RÖDER, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *Pharmazie*, 24 (1969) 238.
- 14 J. BLAŽEK, *Pharmazie*, 22 (1967) 129.
- 15 J. BLAŽEK, *Stručná Sdělení (Staatliches Institut f. Arzneimittelkontrolle, Prag)*, 18 (1970) 73
- 16 LJ. KRAUS UND E. DUMONT, *J. Chromatogr.*, 48 (1970) 96.
- 17 E. DUMONT UND LJ. KRAUS, *J. Chromatogr.*, 48 (1970) 106.
- 18 E. STAHL, *Chem. Ing. Tech.*, 36 (1964) 941.
- 19 E. STAHL, *Z. Anal. Chem.*, 221 (1966) 3.
- 20 E. DUMONT, *Dissertation*, Universität Saarbrücken, 1968.
- 21 E. STAHL UND E. DUMONT, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 517.
- 22 E. STAHL UND E. DUMONT, *J. Chromatogr.*, 39 (1969) 157.
- 23 E. STAHL UND E. DUMONT, *Talanta*, 16 (1969) 657.
- 24 LJ. KRAUS UND E. DUMONT, *Z. Anal. Chem.*, 252 (1970) 380.
- 25 LJ. KRAUS UND E. STAHL, *Vortrag Int. Tagung Arzneipflanzenforsch., Wien, Juli 1970.*
- 26 LJ. KRAUS UND E. DUMONT, unveröffentlicht.

Eingegangen am 29. Oktober 1970

\* z.Z. Studienaufenthalt an der Universität des Saarlandes.

\*\* Direktor: Dipl. Ing. J. BURIÁNEK.

\*\*\* Direktor: Prof. Dr. E. STAHL.