

168. Über den Nachweis und die Bestimmung von Indolverbindungen auf Papier und in Lösung

2. Mitteilung über quantitative, spektrophotometrische Bestimmungsmethoden¹⁾

von **H. G. Leemann** und **H. Weller**

(4. VI. 60)

Das häufige Vorkommen der Indolverbindungen in der Pflanzenwelt und die Erkenntnis, dass zahlreiche Indolverbindungen im Organismus der Lebewesen eine bedeutende Rolle spielen, haben dazu geführt, dass im Laufe der Zeit eine ganze Reihe von Nachweismethoden ausgearbeitet und veröffentlicht worden sind²⁾, die, sei es mittels der Papierchromatographie oder als Farbreaktion in Lösung, die qualitative und quantitative Bestimmung von Indolderivaten ermöglichen.

Bei Verwendung des papierchromatographischen Nachweises dürfte wohl die Methode nach VAN URK³⁾ für Routinemessungen die am häufigsten verwendete sein, während zum Nachweis von Indolverbindungen in Lösung sehr häufig die Farbreaktion nach KELLER⁴⁾ zur Anwendung gelangt.

Beiden Methoden haftet ein gewisser Nachteil an, indem ihre Empfindlichkeit gegenüber Unterschieden im strukturellen Aufbau der Indolverbindungen bescheiden ist, so dass sehr oft Farbkomplexe erhalten werden, deren grösste Lichtabsorption im Blauegebiet liegt.

Bei sehr zahlreich durchzuführenden quantitativen Analysen von Papierchromatogrammen wirkt sich die Farbreaktion nach der Methode von VAN URK besonders deshalb unangenehm aus, weil zur Entwicklung des Farbkomplexes, den die Indolverbindungen mit p-Dimethyl-aminobenzaldehyd eingehen, Salzsäuregas verwendet wird, das nach sehr kurzer Zeit zu schwerwiegenden Korrosionsschäden an den zur Auswertung der Papierchromatogramme verwendeten Densitometern führt.

Es war besonders dieser Nachteil, der uns veranlasste, nach einer qualitativen und quantitativen Analysenmethode für Indolkörper zu suchen, bei der keine flüchtige Säure verwendet werden muss. Gleichzeitig wurde angestrebt, ein Reagens zu finden, das sowohl auf Papier als auch in Lösung auf Strukturunterschiede möglichst differenziert anspricht und das damit ermöglicht, weitere Anhaltspunkte über den strukturellen Aufbau der untersuchten Indolverbindung zu erhalten.

Die Verwendung von p-Toluolsulfosäure als Farbbildner, wie sie PATCH²⁾ zur Bestimmung von Tryptophan und von Tryptophan enthaltenden Seren benützt hat,

¹⁾ 1. Mitteilung: L. MATHIES & H. G. LEEMANN, *Z. anal. Chem.* **172**, 430 (1960).

²⁾ B. STOWE & K. V. THIMANN, *Arch. Biochem.* **57**, 499 (1954); P. FORMIJNE & N. J. POULIE, *Proc., Kon. nederl. Akad. Wetensch.* **57 C**, 57 (1954); A. J. VILTOS, W. MENDT & R. BEIMLER, *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **18**, 283 (1956); C. T. PATCH, *Arch. Biochem.* **81**, 275 (1959); A. CARCASONA, J. CERVOS-NAVARRO & F. UNTERHARNSCHEIDT, *Klin. Wschr.* **37**, 253, 761 (1959); T. VITALI & A. M. COSTA FINZI, *Ric. Sci.* **29**, 311 (1959); H. P. RIEDER & M. BOEHMER, *Helv.* **42**, 1793 (1959); **43**, 638 (1960).

³⁾ H. W. VAN URK, *Pharmac. Weekbl.* **66**, 473 (1929).

⁴⁾ A. HOFMANN, *Helv.* **37**, 317 (1954).

Tabelle I. *Optische Eigenschaften der Farbkomplexe von Indolverbindungen mit p-Toluolsulfonsäure*

Substanzen	auf Papier		in Lösung				Farbton
	λ_{\max} in $m\mu$	Rf	nach 1 Stunde		nach 2 Tagen		
			λ_{\max} in $m\mu$	log E**)	λ_{\max} in $m\mu$	log E**)	
Indol	480	0,94	531	2,69	531	2,99	weinrot
2-Methylindol	531, (497)	0,94	531, (497)	2,30/2,21	527, 376	2,77/2,67	rotlila
3-Methylindol	530, 432	0,96	552, 415	2,88/2,53	559, 413	3,04/2,71	blauviolett
4-Hydroxyindol*)	514	0,79	572	2,67	572	2,71	grau
5-Hydroxyindol	470	0,87	513	2,52	516	2,86	rotviolett
6-Hydroxyindol	584, 446	0,90	614, 366	3,22/3,28	614, 368	3,23/3,30	dunkelgrün
7-Hydroxyindol*)	587	0,74	576, 404	2,64/2,81	576, 404	2,50/2,69	braun
5-Methoxyindol	480	0,91	528	2,67	528	2,91	dunkelrot
6-Methoxyindol-2-carbonsäure	498	0,42	585, 412	3,43/3,18	587, 412	3,45/3,20	graublau
Gramin	483	0,95	529, 497	2,35/2,36	529, 500	2,42/2,43	lachsfarben
Tryptamin	542, 425	0,84	580, 429	2,37/1,21	584, 429	2,67/1,30	indigo
Tryptophan	509	0,32	550	1,75	553	1,99	graublau
Psilocin	470, 382	0,91	640, 530, 433	2,60/2,74/2,83	647, 529, 453	2,80/3,01/3,06	braunviolett
Psilocybin	506	0,06	535	1,91	533	2,11	schwach violett
Serotonin	550, 524	0,65	549, (430)	2,69/2,08	594, 435	2,99/2,55	lila nach blau
Bufotenin	566	0,87	592, 428	2,65/2,12	593, 430	2,84/2,25	azurblau
O-Phosphoryl-bufotenin	506	0,03	556	2,38	564	2,47	hellblau
5-Benzoyloxytryptamin	522	0,84	595, 440	2,88/2,00	603, 439	3,12/2,57	türkis
6-Methoxytryptamin	620, 520	0,75	670, 613, 566, 395	3,15/3,45/3,06/2,84	672, 615, 565, 395	3,31/3,54/3,27/2,97	malachitgrün
6-Methylmercaptotryptamin	610, 419	0,82	677, 499	3,33/3,26	680, 500	3,40/3,46	ocker
7-Methoxytryptamin	575	0,75	552, 430	2,22/2,04	552, 432	2,32/2,12	lila
5,6-Methylenedioxy-tryptamin	632, 513	0,73	630, 412	3,89/3,06	630, 414	3,95/3,09	blaugrün
Indolylessigsäure	535, 438	0,50	535, 419	2,59/2,47	540, 422	2,67/2,51	mauve
Indolylpropionsäure	574, 438	0,50	537, 413	3,01/2,52	537, 411	3,20/2,69	violett
Indolylpropionsäurenitril	571, 440	0,90	558, 429	2,46/2,09	557, 431	2,69/2,25	hellblau

*) Lösungsmittel des Chromatogramms: Isopropanol: konz. Ammoniak 9:1

**) Der Berechnung von log E wurden die Molekulargewichte der jeweiligen Indolverbindungen zugrunde gelegt; $c = 200 \mu\text{g/ml}$

Tabelle II. Fortsetzung von Tabelle I

Substanzen	auf Papier		in Lösung				Farbton
	λ_{\max} in $m\mu$	Rf	nach 1 Stunde		nach 2 Tagen		
			λ_{\max} in $m\mu$	log E	λ_{\max} in $m\mu$	log E	
D-Lysergsäure	519	0,42	653, 600, 532, (408)	2,84/2,88/2,89/2,70	(649), 530 , 407	3,19/3,27/3,33/3,06	violett
D-Lysergsäure-methylester	532	0,87	650, (600), 538 , (408)	2,93/3,00/3,03/2,83	(650), (600), 534 , 406	3,20/3,28/3,34/3,08	graublau
D-Lysergsäure-diäthylamid	530	0,88	652, 600, 523, (408)	2,98/2,98/2,97/2,77	650, (600), 529 , 408	3,15/3,24/3,28/3,25	tief ultramarin
Lumi-lysergsäure- diäthylamid (I)	660, 610	0,83	652, 595, 555	3,42/3,53/3,53	652, 595, 557	3,60/3,72/3,73	lila
Ergotamin	529	0,81	653 , 603, (530)	3,23/3,17/3,08	635 , 602, 537	3,53/3,49/3,46	mattblau
Lumi-Ergotamin (I)	662, 610	0,75	651 , 598, (558)	3,70/3,63/3,51	654 , 601, 558	3,80/3,75/3,69	mattblau
Dihydroergokryptin	529	0,89	590, (406)	3,39/2,70	590 , 407	3,67/3,07	leuchtend blau
Penicillin	351	0,71	630, 366	3,47/3,94	626, 365	3,51/3,93	olivgrün
Agroclavin	522	0,89	590 , 410	2,97/2,55	590 , 410	3,12/2,47	ultramarin
Elymoclavin	579	0,80	590 , 410	2,87/2,51	590 , 410	3,00/2,37	ultramarin
Setoclavin	371	0,84	595, 367	3,21/3,90	595, 369	3,30/3,90	braungrün
Iso-setoclavin	371	0,85	593, 366	3,23/3,88	591, 366	3,35/3,90	braungrün
Chanoclavin	517	0,90	590 , 410	2,96/2,50	586 , 410	3,14/2,37	ultramarin
Festoclavin	523	0,94	591 , 410	3,43/2,68	591 , 409	3,41/2,80	ultramarin
D-Lysergen	369	0,89	720, 370	3,32/3,92	720, 370	3,36/3,90	dunkeloliv
D-Lysergin	521	0,91	534 , 408	3,48/3,08	536 , 408	3,53/3,21	tiefviolett
Reserpin	497	0,92	482	3,30	482	3,26	gelborange

entspricht den gestellten Anforderungen weitgehend und zeichnet sich sowohl bei einer papierchromatographischen Auswertung wie auch bei einer solchen von Lösungen durch ihre Einfachheit in der Durchführung aus.

Es ist auffallend, dass in der Literatur, die sich mit Farbreaktionen befasst, recht selten genaue Angaben über die spektrale Lage der Absorptionsmaxima von Farbkomplexen gemacht werden. Wohl finden sich zahlreiche Angaben über den visuellen Farbeindruck einer Farbreaktion; es dürfte jedoch auch für ein geübtes Auge schwierig sein, zwischen der Blaufärbung von Bufotenin und jener von O-Phosphorylbufotenin mit *p*-Toluolsulfosäure zu unterscheiden. Trotzdem sind die entsprechenden Absorptionsmaxima um $36\text{ m}\mu$, und somit spektrophotometrisch eindeutig definierbar, voneinander getrennt.

Absorptionsspektren von Farbkomplexen mit p-Toluolsulfosäure in Eisessig

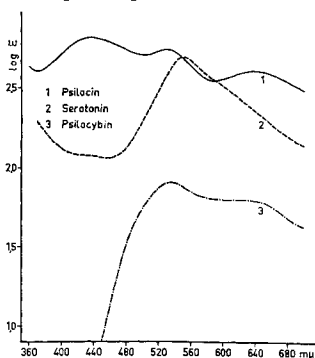


Fig. 1

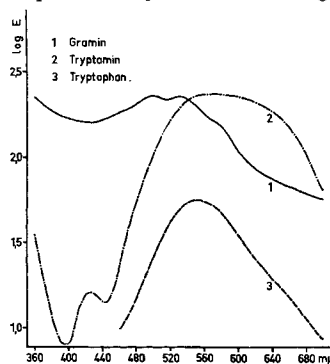


Fig. 2

Absorptionsspektren von Farbkomplexen mit p-Toluolsulfosäure auf Papier

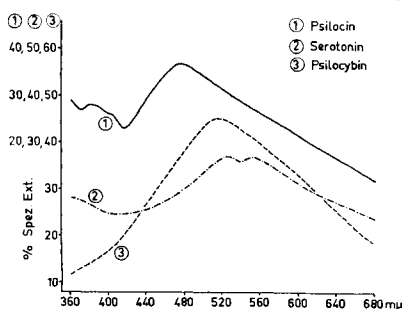


Fig. 3

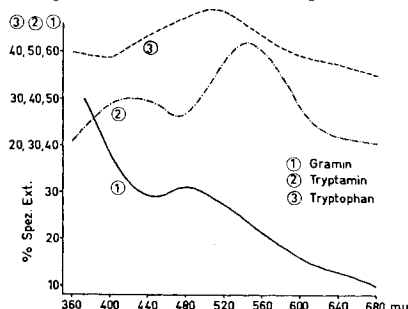


Fig. 4

Auch aus diesem Grunde wurden zahlreiche Indolverbindungen auf ihr Verhalten mit *p*-Toluolsulfosäure hin untersucht und in Tab. I und II die Lage der Absorptionsmaxima auf Papier einerseits und andererseits in Lösung sofort nach Beendigung der Farbstoffentwicklung und nach zweitägigem Stehen zusammengefasst.

Obwohl aus diesen Tabellen keine augenfälligen Gesetzmässigkeiten über den Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und Wellenlänge der Farbkomplexes hergeleitet werden kann, so kommt daraus doch die teilweise sehr grosse Differenzierbarkeit zwischen den einzelnen Indolverbindungen zum Ausdruck.

Die Figuren 1 und 2 zeigen die Absorptionskurven von Farbkomplexen biologisch interessanter Indolverbindungen in Lösung und die Figuren 3 und 4 solche von Farbkomplexen der gleichen Verbindung auf Papier.

Die Extinktionshöhe der Maxima der Farbkomplexe in Lösung ist einerseits abhängig von der Reaktionszeit und der Konzentration der Reaktionslösung und andererseits von der Reinheit der verwendeten *p*-Toluolsulfosäure.

Bereits aus den Tab. I und II ist ersichtlich, dass die Farbreaktion nach zwei Tagen gegenüber jener nach einer Stunde (Standard-Bedingungen) merklich nachgedunkelt hat. Die Farbintensivierung entspricht einer durchschnittlichen Zunahme der Extinktion von $\log E$ um 0,2 bis 0,3 Einheiten.

Um Klarheit über die Beziehung zwischen der Konzentration der Reaktionslösung und der Extinktionshöhe zu erhalten, wurden die Extinktionswerte von drei Indolverbindungen innerhalb eines weiten Konzentrationsbereiches unter Standard-Bedingungen gemessen und in Figur 5 graphisch zusammengestellt.

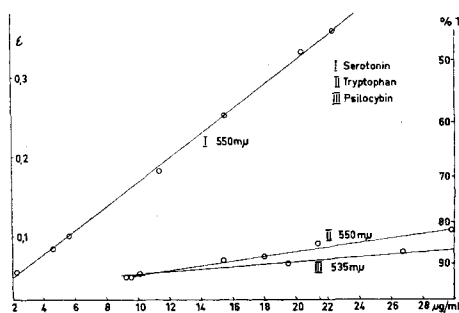


Fig. 5. Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration einiger Farbkomplexe von Indolverbindungen mit *p*-Toluolsulfosäure in Lösung

Aus dem Kurvenverlauf der drei Konzentrationsreihen ist ersichtlich, dass die Extinktionswerte bei Konzentrationen zwischen 2 und 30 $\mu\text{g/ml}$ auf Geraden liegen. Somit kann dieser Konzentrationsbereich für eine quantitative Auswertung der Farbkomplexbildung zwischen Indolverbindungen und *p*-Toluolsulfosäure, und damit auch für eine quantitative Bestimmung der Indolverbindungen verwendet werden. Dagegen verliert das BEER'sche Gesetz bei Konzentrationen von $c \geq 50 \mu\text{g/ml}$ seine Gültigkeit.

Für quantitative Bestimmungen sollten diese Extinktionswerte jedoch auch innerhalb der üblichen spektrophotometrischen Fehlergrenze reproduzierbar sein. Zu diesem Zweck wurden von den drei Indolverbindungen Stammlösungen hergestellt und die Extinktionshöhen der unter Standard-Bedingungen hergestellten Farbkomplexe serienmässig gemessen. Diese Werte werden in Tab. III wiedergegeben.

Tabelle III zeigt, dass die Reproduzierbarkeit der Farbkomplexbildung mit einem Fehler von $\pm 0,02 \log E$ -Einheiten durchaus den Ansprüchen, die an eine quantitative Analysenmethode gestellt werden dürfen, entspricht.

Für sämtliche Farbreaktionen wurde *p*-Toluolsulfosäure krist. *purum* der Firma FLUKA AG., Buchs/St. Gallen, verwendet, die einen Erweichungspunkt von ca. 65° aufweist (KOFLER-Block). Es hat sich im Laufe der Arbeit jedoch gezeigt, dass die Extinktionswerte des Farbkomplexes je nach Provenienz und Qualität der *p*-Toluolsulfosäure stark variieren, so dass es gerade für

Tabelle III. Reproduzierbarkeit der Farbkomplexbildung

Substanz	c µg/ml	nach 1 Stunde		Substanz	c µg/ml	nach 1 Stunde	
		λ _{max}	log E			λ _{max}	log E
Serotonin	29,4	549	3,11	Psilocybin	30,3	532	2,01
	29,4	549	3,09		30,3	532	1,99
	29,4	548	3,11		29,6	532	2,03
Tryptophan	29,8	550	2,25		29,6	532	2,02
	29,8	550	2,27				
	29,8	550	2,28				

quantitative Bestimmungen als angezeigt erscheint, die Farbreaktion mit gereinigter, wasserfreier p-Toluolsulfosäure vom Smp. 106–107° durchzuführen. Die auf diese Art erhaltenen Extinktionswerte sind durchschnittlich um 0,5 log E-Einheiten höher als die hier veröffentlichten.

Experimentelles⁵⁾. – 1) *Papierchromatographie und Farbreaktion auf Papier.* 2–10 µg Substanz werden auf WHATMAN-Nr. 3-Papier aufgetragen und nach 8-stdg. Klimatisierung mit dem Lösungsmittelgemisch Isopropanol – konz. Ammoniak – Wasser 8:1:1 aufsteigend chromatographiert. Nach Beendigung des Chromatogramms wird der Papierstreifen während 30 Minuten bei 60° im Luftstrom getrocknet.

1a) *Entwicklung des Farbkomplexes.* Der getrocknete Papierstreifen wird durch eine 20-proz. Lösung von p-Toluolsulfosäure in Methanol gezogen und anschliessend 10 Minuten im Trockenschrank auf 60° erwärmt. Die beladenen Stellen erscheinen als kräftige Farbflecke, während die übrige Papierfläche bei genauer Einhaltung der Vorschrift farblos bleibt.

1b) *Spektrophotometrische Auswertung.* Die Bestimmung der Wellenlängen grösster Absorption erfolgt durch Ausschneiden eines rechteckigen Papierstreifens, auf dem der Farbfleck derart liegt, dass dieser vor den Probenkanal des Spektrophotometers zu liegen kommt⁶⁾. In den Vergleichskanal wird ein unbelasteter Papierstreifen des gleichen Chromatogramms gebracht.

1c) *Densitometrische Auswertung.* Die quantitative Auswertung der Farbflecke wird mit Hilfe des *Spinco Analytrols* der Firma BECKMAN mit automatischem Flächenintegrator und geeigneten Interferenzfiltern durchgeführt.

2) *Farbreaktion in Lösung.* 2–100 µg/ml Substanz werden in 12-proz. p-Toluolsulfosäure in Eisessig gelöst, worauf die Lösung 1 Stunde im Ölbad auf 70° erwärmt wird. Die spektrophotometrische Ausmessung erfolgt gegen eine 12-proz. Lösung von p-Toluolsulfosäure in Eisessig als Blindwert-Lösung (Standard-Bedingungen).

Bei allen Farbreaktionen in Lösung wurde Eisessig 99–100-proz. (1,055–1,058), *pro analysi* und für Chromatographie, der Fa. E. MERCK, Darmstadt, verwendet.

SUMMARY

Paper chromatograms which have been treated according to the VAN URK colour reaction give rise to corrosion in the densitometers. This can be avoided by the use of p-toluenesulphonic acid, which has proved a suitable, sensitive and fairly selective colour reagent for indole compounds. The colour reaction can also be employed for the quantitative estimation of indole compounds in solution. The way in which the colour reaction depends upon the reaction time, concentration of the indole compound and the degree of purity of the p-toluenesulphonic acid is discussed.

Physikalisch-chemisches Laboratorium
der pharmazeutischen Abteilung SANDOZ, Basel

⁵⁾ Frä. KARIN M. JERNBERG danken wir auch an dieser Stelle für ihre geschickte experimentelle Arbeit.

⁶⁾ Alle spektrophotometrischen Messungen wurden auf einem BECKMAN-Spektrophotometer, Modell DU resp. DK-2, ausgeführt.