

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON INDOL- DERIVATEN IN NEUTRALEN FLIESSMITTELN

GÜNTER BALLIN

Botanisches Institut der Universität Rostock (Deutschland)

(Eingegangen den 21. Januar 1964)

Die Anwendung papierchromatographischer und -elektrophoretischer Methoden in der Auxinforschung ermöglichte die Isolierung und Identifizierung zahlreicher Indolverbindungen in den Extrakten aus pflanzlichen Geweben. In der Literatur häufen sich aber die Angaben über die Instabilität von Indolderivaten und besonders von nativen Komplexen mit einer indolischen Komponente¹.

Die bis jetzt publizierten Ergebnisse zur Dünnschichtchromatographie (DC) beweisen die gute Eignung dieser Methode zur Trennung indolischer Verbindungen²⁻⁶. Verwendet werden jedoch vorwiegend saure oder alkalische Fließmittel, obwohl auch von der DC bekannt ist, dass z.B. Indol-3-essigsäure in sauren und Indol-3-acetonitril in alkalischen Fließmitteln zersetzlich sind³. Hingewiesen sei auch auf die bei DC mögliche Bildung von Indol-3-acetamid als Artefakt, wie es bei papierchromatographischer Trennung in ammoniakalischen Laufmitteln der Fall ist⁷.

Diese Befunde liessen uns nach geeigneten neutralen Fließmitteln mit guten Trenneigenschaften suchen. Es sollten Fließmittel entwickelt werden, die 1. eine Trennung saurer und nichtsaurer Indolderivate im gleichen Gemisch, 2. eine Trennung nichtsaurer Indolderivate und 3. eine Trennung saurer Indolderivate ermöglichen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Als Trägerplatten dienten 9 × 12 cm grosse Photoplatten, auf welche die Sorptionschicht in einer Dicke von 250 µm mit einem Streichgerät* unter Verwendung von "Kieselgel G für Dünnschichtchromatographie"*** nach der Vorschrift von STAHL⁸ aufgebracht wurde. Die vorgetrockneten Platten wurden 30 Min. bei 110° getrocknet und bis zur Verwendung in einem Exsikkator über Blaugel aufbewahrt.

Die Entfernung der Startpunkte von der Unterkante der Platte betrug 15 mm. Chromatographiert wurde aufsteigend in abgedunkelten Trennkammern mit 50 ml eines frisch bereiteten Fließmittels bei Kammersättigung. Die Trennstrecke wurde stets auf 10 cm begrenzt.

Folgende Indolderivate wurden in Methanol gelöst und je 0.5 µg einzeln oder als Gemisch mit einer Mikropipette aufgetragen:

1. Saure Indolderivate: Indol-3-carboxylsäure (ICS), Indol-3-essigsäure (IES), Indol-3-propionsäure (IPS), Indol-3-buttersäure (IBS).

2. Nichtsaure Indolderivate: Indol-3-acetamid (IAAm), Indol-3-äthanol =

* Hersteller: CAMAG, Muttenz/Schweiz.

** E. Merck AG, Darmstadt.

Tryptophol (Try), Indol-3-aldehyd (IA), Indol-3-acetonitril (IAN), Indol-3-essigsäureäthylester (IES-äth).

Der Nachweis der Indolverbindungen erfolgte auf der trockenen Platte durch Besprühen mit dem Reagens nach VAN URK und anschließender Oxydation mit Königswasserdämpfen³. IA wurde mit dem Reagens nach VAN ECK⁸ sichtbar gemacht.

Die Fließmittel setzten sich aus Komponenten zusammen, die sich ohne Anwendung höherer Temperaturen durch Trocknen der entwickelten Platten an der Luft entfernen liessen. Untersucht wurden 2 Fließmittelsysteme in abgestuft veränderter Zusammensetzung:

System A: Chloroform–Tetrachlorkohlenstoff–Methanol.

System B: Chloroform–Äthanol.

Als drittes Fließmittel wurde Äthylacetat–Isopropylalkohol–Wasser (65:24:11) verwendet.

Die Ergebnisse mit System A und B sind in den Fig. 1 und 2 graphisch dargestellt. Farbreaktionen der Indolderivate sowie deren Laufzeiten und R_F -Werte in den geeignetsten Fließmitteln und in Äthylacetat–Isopropylalkohol–Wasser (65:24:11) können der Tabelle I entnommen werden. Alle Werte sind Mittelwerte aus 4–6 Versuchen.

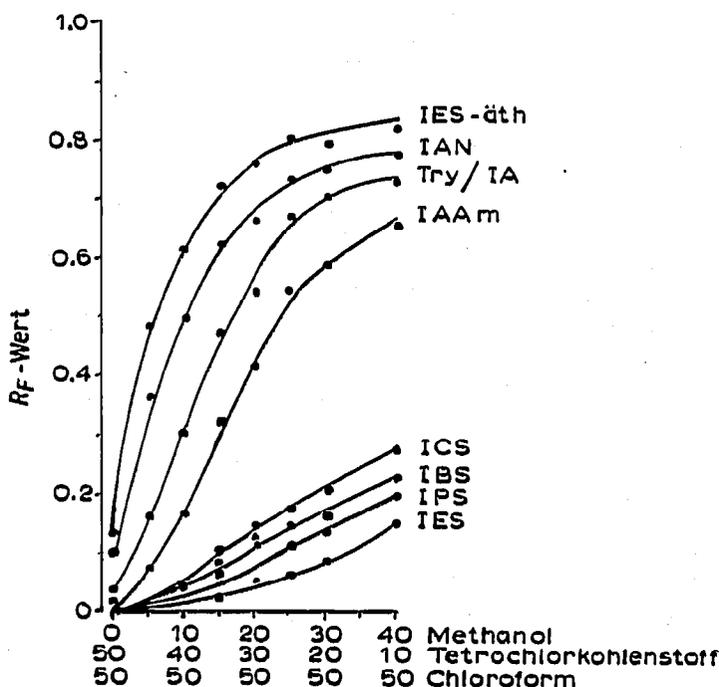


Fig. 1. Abhängigkeit der R_F -Werte von 9 Indolderivaten vom Verhältnis Tetrachlorkohlenstoff: Methanol in Fließmitteln mit konstantem Gehalt an Chloroform (Abkürzungen siehe S. 152–3).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Fließmittelsystem A: Chloroform–Tetrachlorkohlenstoff–Methanol (Fig. 1)

Mit geringem Methanol-Anteil eignet sich dieses Gemisch gut zur Ab- und Auftrennung nichtsaurer Indolderivate, besonders in folgender Zusammensetzung: Chloroform–Tetrachlorkohlenstoff–Methanol (50:40:10). In diesem Fließmittel bleiben die sauren Indolverbindungen am Startpunkt, die nichtsauren werden gut getrennt. Eine Ver-

ringerung des Gehaltes an Tetrachlorkohlenstoff zugunsten von Methanol vermindert die guten Trenneigenschaften dieses Systems für nichtsaure Verbindungen und schränkt die effektive Trennstrecke ein.

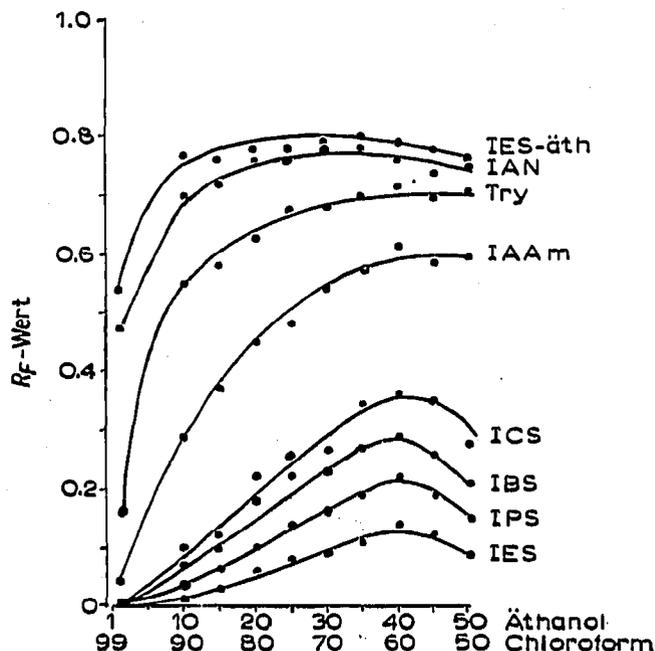


Fig. 2. Abhängigkeit der R_F -Werte von 8 Indolderivaten vom Verhältnis Chloroform: Äthanol (96% ig) (Abkürzungen siehe S. 152-3).

In der Zusammensetzung 50:25:25 trennt dieses Gemisch saure und nichtsaure Indolderivate noch befriedigend von- und untereinander. Eine weitere Erhöhung des Methanolgehalts führt zwar zu höheren R_F -Werten der sauren Verbindungen, gleichzeitig aber zu grösseren diffusen Flecken. Damit verschlechtern sich Trennung und untere Nachweisgrenze.

In diesem Fließmittelsystem verhalten sich IA und Try chromatographisch gleich, lassen sich aber durch geeigneten Nachweis (IA färbt sich mit VAN ECK-Reagens sofort intensiv gelb) identifizieren.

Fließmittelsystem B: Chloroform-Äthanol (Fig. 2)

Über die Einsatzmöglichkeiten dieses Systems für bestimmte Trennungsaufgaben entscheidet der Äthanolgehalt. GMELIN UND VIRTANEN² verwendeten zur Identifizierung der Spaltprodukte des Glucobrassicins die Kombination 99:1.

Davon ausgehend wurde in eigenen Versuchen die Polarität des Systems durch Erhöhung des Äthanolgehalts gesteigert und versucht, es zur Trennung sowohl der sauren als auch der nichtsauren Verbindungen heranzuziehen.

Mit geringem Äthanolgehalt (bis 10%) eignet es sich gut zur Trennung der nichtsauren Indolderivate, wobei auch IAN und IES-äth recht gut getrennt vorliegen. Mit zunehmender Polarität des Gemisches verschlechtert sich wie bei Fließmittelsystem A die Trennung der nichtsauren Verbindungen und verbessert sich die der sauren. Letztere werden am besten durch das Fließmittel Chloroform-Äthanol (60:40) getrennt. Weiterer Zusatz von Äthanol verursacht niedrigere R_F -Werte.

Fliessmittel: Äthylacetat-Isopropylalkohol-Wasser (65:24:11)

Die Trennung der Indolsäuren war in den bisher beschriebenen Fliessmitteln unbefriedigend, besonders wegen der relativ niedrigen R_F -Werte von IES. Bei der DC pflanzlicher Extrakte verbleiben Verunreinigungen vorwiegend in der Nähe des Startpunktes und können den IES-Nachweis stören.

Aus zahlreichen, weniger geeigneten Gemischen wurde das bereits für die Trennung von Phenolcarbonsäuren⁹ verwendete Fliessmittel Äthylacetat-Isopropylalkohol-Wasser (65:24:11) ausgewählt (Tabelle I).

Von den in der Tabelle I angeführten Fliessmitteln eignen sich die Gemische I und II nur zur Trennung der nichtsauren Indolderivate. Zur Trennung der sauren Verbindungen kann Fliessmittel III eingesetzt werden. Die Fliessmittel IV und V ermöglichen die gleichzeitige Trennung saurer und nichtsaurer Indolstoffe. In allen untersuchten Fliessmitteln bleibt das Fleckenmuster, d.h. die Reihenfolge der Flecken, der Indolderivate gleich (Fig. 1, 2; Tabelle I).

TABELLE I

R_F -WERTE VON INDOLDERIVATEN IN 5 FLIESSMITTELN, DURCHSCHNITTliche LAUFZEITEN UND FARBREAKTIONEN MIT VAN URK- BZW. VAN ECK-REAGENS
(Aufgetragene Menge: 0.5 μ g; Adsorptionsschicht: Kieselgel G, 250 μ m; Kammersättigung; Trennstrecke: 10 cm)

Substanz	Fliessmittel*					Farbreaktionen Van Urk
	I	II	III	IV	V	
IES	0.00	0.01	0.29	0.06	0.11	blau-violett
IPS	0.01	0.03	0.37	0.10	0.19	blau
IBS	0.02	0.07	0.44	0.14	0.27	blau
ICS	0.04	0.10	0.57	0.17	0.34	rot
IAAm	0.16	0.29	0.59	0.54	0.57	blau-violett
Try	0.30	0.55	0.70	0.67	0.70	blau-grau (gelber Rand)
IA	0.29			0.68		gelb**
IAN	0.49	0.70	0.75	0.73	0.78	grau
IES-äth	0.61	0.77	0.75	0.80	0.80	violett
Laufzeit (Min.)	25	30	50	30	35	

* Fliessmittel I: Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff-Methanol (50:40:10).

II: Chloroform-Äthanol (96%ig) (90:10).

III: Äthylacetat-Isopropanol-Wasser (65:24:11).

IV: Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff-Methanol (50:25:25).

V: Chloroform-Äthanol (96%ig) (65:35).

** Sofort erscheinender, intensiver Fleck mit VAN ECK-Reagens.

Durch geeignete Kombination ihrer Bestandteile lassen sich mit diesen neutralen Fliessmitteln spezielle Trennaufgaben lösen. In vielen Fällen wird sich bei Anwendung geeigneter Gemische die in der Auxinforschung übliche Fraktionierung der pflanzlichen Extrakte erübrigen.

In einer weiteren Arbeit wird über den Nachweis und die quantitative Bestimmung zellstreckungsfördernder Indolverbindungen mittels biologischer Testverfahren im Anschluss an die DC berichtet werden¹⁰.

ZUSAMMENFASSUNG

Saure und nichtsaure Indolderivate wurden dünnschichtchromatographisch getrennt unter Verwendung neutraler Fließmittel. Die R_F -Werte verschiedener Verbindungen in 5 Fließmitteln werden angegeben.

SUMMARY

Acidic and non-acidic indole derivatives have been separated by means of thin-layer chromatography using neutral solvents. The R_F values of various compounds in 5 solvents are summarized.

LITERATUR

- ¹ M. KUTÁČEK, J. NOVÁKOVÁ UND M. VALENTA, *Flora (Jena)*, 153 (1963) 54.
- ² R. GMELIN UND A. I. VIRTANEN, *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A II*, Nr. 107 (1961).
- ³ E. STAHL UND H. KALDEWEY, *Z. Physiol. Chem.*, 323 (1961) 182.
- ⁴ T. DIAMANTSTEIN UND H. EHRHART, *Z. Physiol. Chem.*, 326 (1961) 131.
- ⁵ H. KALDEWEY, persönliche Mitteilung.
- ⁶ E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962.
- ⁷ M. H. ZENK, *Planta*, 58 (1962) 668.
- ⁸ H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer, 2. Aufl., Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1959.
- ⁹ J. HALMEKOSKI, *Suomen Kemistilehti*, 35 (1962) 39 (zit. bei ⁶).
- ¹⁰ G. BALLIN, in Vorbereitung.