

EIN NEUES SYSTEM ZUR ZWEIDIMENSIONALEN DÜNNSCICHT- CHROMATOGRAPHISCHEN TRENNUNG EINFACHER INDOLDERIVATE

KARL-WERNER GLOMBITZA

Pharmakognostisches Institut, Universität Bonn (Deutschland)

(Eingegangen den 15. März 1966)

Zur Trennung und Identifizierung einfacher Indolderivate hat sich neben der Papierchromatographie¹⁻⁴ besonders die Dünnschichtchromatographie⁵⁻¹² bewährt. Bei der Zersetzlichkeit vieler Indolderivate in alkalischen und sauren Fließmitteln sind die meisten bisher vorgeschlagenen Fließmittelsysteme nur beschränkt anwendbar, worauf bereits BALLIN¹¹ hinwies. Selbst bei der Chromatographie in neutralen Fließmitteln ist die freie IGlykS* wegen oxidativer Zerstörung nicht sicher nachweisbar. Es lag deshalb nahe, in Analogie zu einem von uns früher angegebenen Nachweis der IBS¹³ die Indolderivate in eine alkalische bzw. neutrale und eine saure Fraktion zu trennen und anschliessend die Indolcarbonsäuren mit Diazomethan zu verestern. Beide Fraktionen können dann gesondert in neutralen Fließmitteln chromatographiert werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

Isolierung

Die auf Indolderivate zu untersuchenden Lösungen werden möglichst unter N₂ bei 0° mit 1 N NaOH auf pH 10 gebracht und 2-3 mal mit dem 2-3 fachen Volumen peroxydfreien Äthers extrahiert (Alkalische Fraktion). Die wässrige Phase und das Waschwasser des alkalischen Auszuges werden mit 1 N H₂SO₄ auf pH 2 angesäuert und ebenfalls 2-3 mal mit Äther ausgeschüttelt (Saure Fraktion). Man wäscht beide ätherische Lösungen mit 10-20 ml Wasser und trocknet wenigstens 20 Min. über Na₂SO₄. Man gibt zu der sauren Fraktion bis zur schwachen bleibenden Gelbfärbung eine ätherische Diazomethanlösung¹⁶, lässt 10-20 Min. stehen, erwärmt einige Minuten im Wasserbad auf ca. 30° und dampft beide Fraktionen am Rotationsverdampfer im Vakuum bei ≤ 30° bis auf wenige ml ein. Um mit Sicherheit eine quantitative Veresterung zu erzielen, kann man jetzt noch einmal einige Tropfen Diazomethanlösung zugeben, kurz auf dem Wasserbad erwärmen und das überschüssige Diazomethan im

* Abkürzungen: Ac-Try = N^α-Acetyltryptophan; β-IÄ = β-(Indolyl-3)-äthanol (Tryptophol); 5-HO-IES = 5-Hydroxyindolyl-3-essigsäure; 2-HO-In = 2-Hydroxindol (Oxindol); 5-HO-In = 5-Hydroxindol; IAAlc = Indolyl-3-acetaldehyd; IAAM = Indolyl-3-acetamid; IA-Asp = Indolyl-3-acetylasparaginsäure; IAcrS = β-(Indolyl-3)-acrylsäure; IAld = Indol-3-aldehyd; IAN = Indolyl-3-acetonitril; IBS = β-(Indolyl-3)-brenztraubensäure; IBuS = γ-(Indolyl-3)-buttersäure; IC = Indol-3-carbinol; ICS = Indolyl-3-carbonsäure; IES = Indolyl-3-essigsäure; IGlykS = Indolyl-3-glykolsäure; IGlyox-NH₂ = Indolyl-3-glyoxylamid; IGlyoxS = Indolyl-3-glyoxylsäure; IMS = β-(Indolyl-3)-milchsäure; IN = Indol; IPS = β-(Indolyl-3)-propionsäure; SK = Skatol; TrA = Tryptamin. Der Zusatz -CH₃, z.B. IES-CH₃, bedeutet, dass es sich um die Methyl ester handelt.

Vakuum abziehen. Man dampft entweder sofort bis zur Trockne eine und nimmt wieder in 0.1–2 ml Äthanol auf oder man setzt die notwendige Äthanolmenge vor dem endgültigen Eindampfen zu und dampft bis zum gewünschten Punkt ein (schonendere Methode).

Chromatographie

Die Dünnschichtplatten werden in gewohnter Weise^{5,6} mit Kieselgel H "Merck" (0.25 mm dick) beschichtet und 1 St. bei 110° aktiviert. Man entwickelt in der 1. Dimension mit A₁ (Benzol–Dioxan, 65:35) aufsteigend bis 10 cm über den Startpunkt mit Kammersättigung und trocknet in einem N₂-Strom. In der 2. Dimension entwickelt man mit A₂ (Diisopropyläther–Dimethylformamid (DMF), 80:20) bis zur Trennstrecke von 10 cm (4-kantige Chromatographiekammer, Desaga, Heidelberg, für Platten von 200 × 200 mm). Die Entwicklung kann ohne Kammersättigung erfolgen. Um ein leichtes U-förmiges Zurückbleiben der Front der 2. Phase zu vermeiden, empfiehlt es sich jedoch 2 ca. 5–8 cm breite, mit Lösungsmittel benetzte Papiertreifen an die Schmalseiten der Trennkammer zu legen. Man trocknet an der Luft oder in einem Trockenschrank mit Gebläse bei $\leq 60^\circ$.

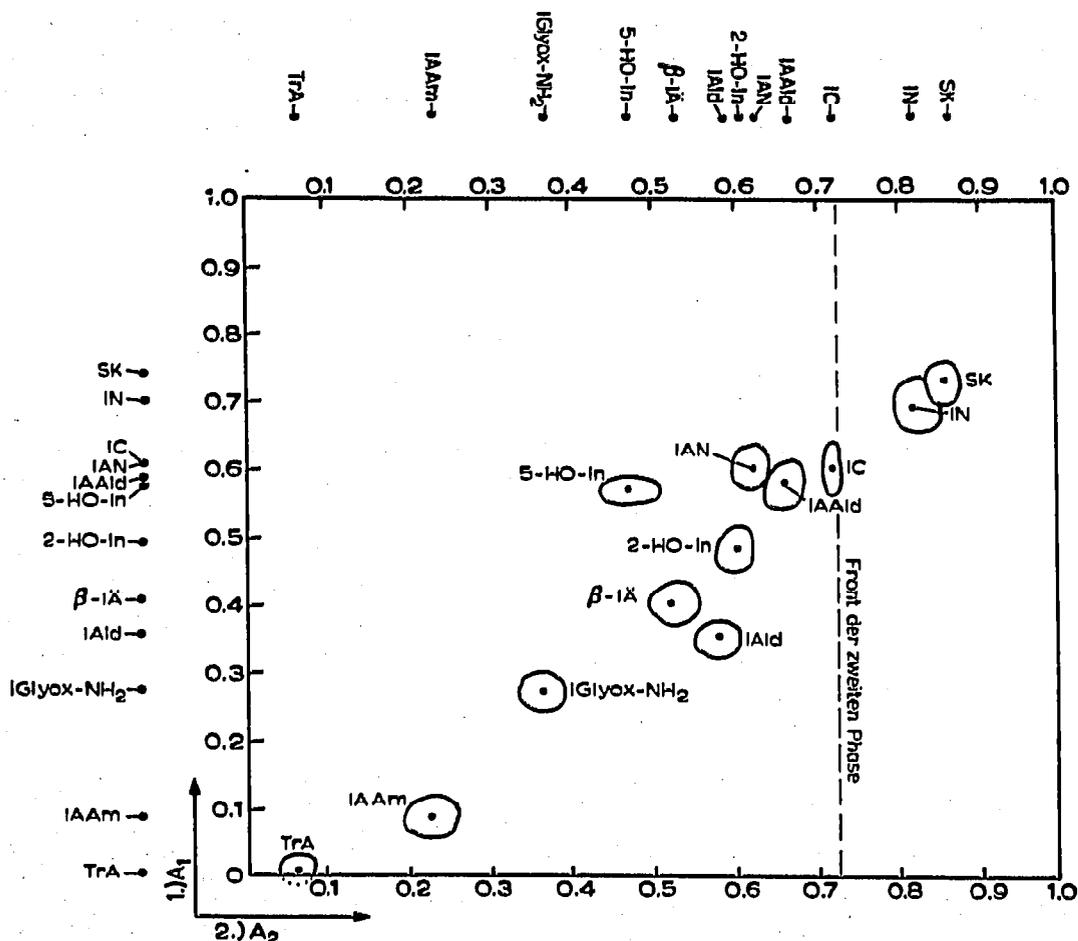


Fig. 1. Zweidimensionales Dünnschicht-Chromatogramm von 12 Indolderivaten der alkalischen Fraktion.

TABELLE I

FARBREAKTIONEN BEI 5 µg SUBSTANZ UND UNTERE NACHWEISGRENZE IN µg BEI 10 CM LAUFSTRECKE IN A₁

Verbindung	Formaldehydreagenz Fluoreszenz im UV		Formaldehydreagenz im Tageslicht		Millons-Reagenz ^a im Tageslicht		Millons Reagenz Fluoreszenz im UV	
Ac-Try-CH ₃	orange	0.1	graugelb	1	gelb	1	Löschung	1
β-IÄ	gelb	0.1	gelb	1	gelb	1	Löschung	1
5-HO-IES-CH ₃	Löschung	0.5	graugelb	1	gelb	1	Löschung	0.5
2-HO-In	—	—	—	—	braun	0.1	Löschung	0.1
5-HO-In	Löschung	0.5	grauviolett	0.5	braungelb	0.5	Löschung	0.5
IAAld	graugelb	1	graubraun	5	gelb	5	Dunkelrot- Löschung	1
IAAm	gelb	0.05	graugelb	1	gelb	1	Löschung	1
IA-Asp-CH ₃	gelb	0.1	blassrot	1	blassgelb	1	Löschung	1
IAcrS-CH ₃	gelb	0.05	gelb	0.5	gelbrot	0.5	Löschung	0.5
IAld	schwache Fl.	1	rosa	5	blassgelb	1	Löschung	1
IAN	gelb	0.1	graugelb	1.0	blassbraun	0.5	Löschung	0.5
IBS-CH ₃	gelb	0.2	blassgelb	5	gelb	5	geringe Löschung	1
IBuS-CH ₃	graugelb	0.1	gelblich	1	gelb	1	Löschung	1
IC	schwache Fl.	0.1	rosa	0.5	braungelb	1	Löschung	1
ICS-CH ₃	—	—	—	—	direkt braun	1	Löschung	1
IES-CH ₃	gelb	0.1	gelb	1	blassgelb	1	Löschung	1
IGlykS-CH ₃	blassgrau	0.1	blassrot	1	gelb	1	Löschung	1
IGlyox-NH ₂	schwache Fl.	0.5	blassrot	5	blassgelb	5	Löschung	1
IGlyoxS-CH ₃	—	—	—	—	blassgelb	1	Löschung	1
IMS-CH ₃	gelb	0.02	gelb	0.5	blassgelb	1	Löschung	1
IN	blassblau	0.05	blassrot	1	rotbraun	1	Löschung	1
IPS-CH ₃	graugelb	0.02	gelb	0.5	gelb	1	Löschung	1
SK	gelb	0.05	gelb	1	blassgelb	1	schwache Löschung	2
TrA	gelb	0.05	gelb	0.5	gelbgrün	0.5	Löschung	0.5

^a Die Färbungen mit Millons Reagenz sind meistens nicht sehr farbintensiv, analytisch verwertbar sind besonders die von gelb abweichenden Farbtöne. Bei Farb- und Konzentrationsangaben in (· ·) handelt es sich um farbschwache Töne, die wegen ihrer geringen Intensität von untergeordneter Bedeutung sind.

der sauren, und IAAld, β-IÄ und IAld in der alkalischen Fraktion bereits im eindimensionalen Chromatogramm trennbar sind. Einige im Fließmittel A₁ dicht beieinander liegende Substanzpaare können u.U. durch Mehrfachchromatographie mit demselben Fließmittel getrennt werden¹⁵.

Im zweidimensionalen System sind lediglich IBuS-CH₃ und IPS-CH₃ nicht trennbar.

Zum Nachweis der IBS darf die Lösung nicht alkalisch sondern nur sauer ausgeschüttelt werden¹³. In diesem Fall treten sowohl die Flecken der sauren wie auch die der alkalischen Fraktion ausser TrA im selben Chromatogramm auf. Unter diesen Umständen sind IC und ICS-CH₃ nicht mehr trennbar. Liegen beide Substanzen nebeneinander vor, so ist IC durch Besprühen mit Ehrlichs-Reagenz auffindbar. ICS-CH₃ reagiert jedoch nicht mit Ehrlichs-Reagenz und erst in Konzentration > 5 µg/Fleck mit dem Formaldehydreagenz nach Prochazka. Es kann nur durch eine bereits beim Besprühen mit Millons-Reagenz auftretende Braunfärbung nach-

VON EINFACHEN INDOLDERIVATEN

<i>Echiblausalz B</i>	<i>Ammoniakalische AgNO₃-Lösung</i>	<i>DNPH</i>	<i>Ehrlichs Reagenz</i>				
— (graugelb)	— (5)	(nach 24 St. braungrau) (langsam graubraun)	(5) (1)	(blassgelb) intensiv gelb	(5) 5	grauviolett violett mit gelbem Rand	1 0.5
purpurrot	0.5	schwarz mit gelbem Rand	0.5	(blassgelb)	(1)	violett	0.5
braun tief violett schwarz (hellbraun)	0.5 0.1 (5)	— langsam schwarz langsam braun-schwarz	— 0.5 1-2	(blassgelb) braungelb gelbbraun	(2) 0.2 1	gelb tief violett schmutzig violett	5 0.05 1
gelb	0.5	—	—	—	—	blauviolett	0.05
—	—	—	—	—	—	blauviolett	0.1
—	—	(langsam braun)	(1)	(blassorange)	(1)	rot	0.5
—	—	(nach 24 St. braun)	(>10)	orange	0.5	—	—
(braungelb)	(5)	sofort schwarz	0.5	blass orange	1	graugrün blassbraun	0.1 5
—	—	—	—	(langsam gelb)	(5)	blauviolett	0.05
(blassorange)	(1)	(langsam braun)	(1)	rötlich	0.5	schmutzig rot	0.1
—	—	(langsam braun)	(1)	—	—	violett	0.1
orange	0.5	(nach 24 St. braun)	1	blassgelb	1	grauviolett	0.5
—	—	—	—	langsam orange	1	(blassgelb)	(5)
—	—	(nach 24 St. braun)	(5)	orange	1	—	—
(gelb)	(5)	—	—	(blassgelb)	(5)	grauviolett	0.5
(hellgelb)	(5)	(nach 24 St. braun)	(1)	orange	0.5	rot	0.02
—	—	—	—	(blassgelb)	(1)	blauviolett	0.05
—	—	(langsam braun)	(5)	braungelb	0.5	tief blauviolett	0.1
—	—	—	—	blass orange	0.5	blaugrün	0.1

gewiesen werden (Tabelle I), die allerdings bei gleichzeitiger Anwesenheit von IC und IPS-CH₃ bei geringen Mengen ICS-CH₃ nicht mehr sicher differenzierbar ist. Unter den beschriebenen Umständen sind auch IAcrS-CH₃ und IAald nur durch ihr unterschiedliches Verhalten gegenüber verschiedenen Sprühmitteln nachweisbar.

Grössere Mengen IAald und IBS-CH₃ können im zweidimensionalen Chromatogramm getrennt und nachgewiesen werden. Zur Auffindung geringer Mengen empfehlen wir jedoch die eindimensionale Chromatographie mit A₂ oder die Trennung mit Benzol-Dioxan (85:15) auf Kieselgel H-Al₂O₃ G (3:1)¹³. IBS-CH₃ gibt im zweidimensionalen Chromatogramm 4 verschiedene Flecken (Abb. 3), von denen der Stammfleck IBS-CH₃ am stärksten ist, während die Intensität der Sekundärflecke erheblich schwächer ist und in der Reihenfolge C' ≫ C'' > C''' abnimmt.

Diazomethan reagiert nicht nur mit den freien Carboxylgruppen der Carbonsäuren sondern auch mit anderen enolisierbaren OH-Gruppen. Deshalb ist bei Anwesenheit von 5-HO-IES neben 5-HO-IES-CH₃ ein weiterer Fleck D (Fig. 3) nach-

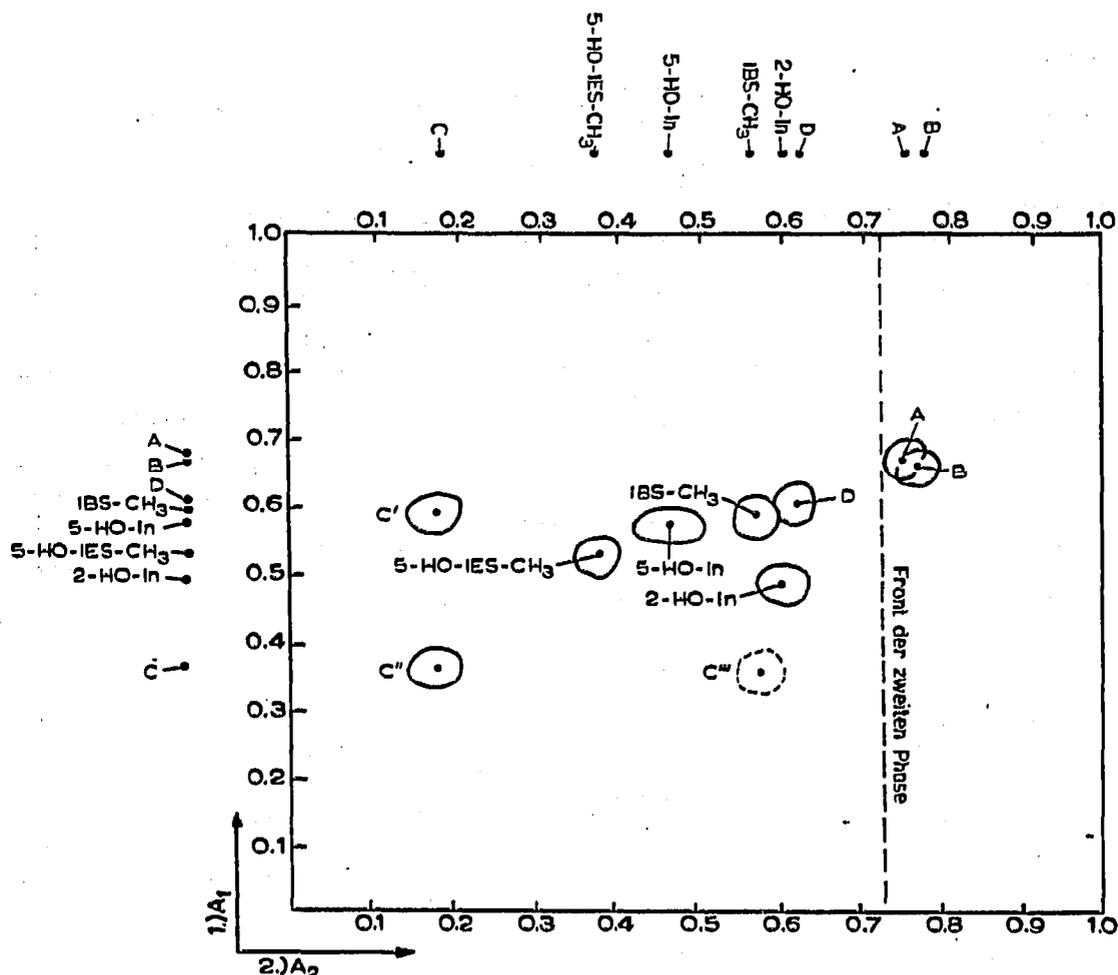


Fig. 3. Zweidimensionales Dünnschicht-Chromatogramm von IBS-CH₃ und anderen Indolderivaten, die mit Diazomethan zwei Reaktionsprodukte geben (Erläuterung siehe Text).

weisbar, bei dem es sich um den entsprechenden Methyläther handelt. Die methylierende Wirkung des Diazomethans muss auch dann in Betracht gezogen werden, wenn die in der neutralen Fraktion auftretenden Indolderivate damit behandelt werden. Bei Anwesenheit von 2-HO-In bildet sich ein weiterer mit Ehrlichs-Reagenz zuerst rot und dann gelb werdender Fleck A und in Gegenwart von 5-HO-In ein mit Ehrlichs-Reagenz blau werdender Fleck B (Fig. 3).

Das Laufmittel A₂ bildet zwei Fronten. Die Front der 2. Phase entspricht der Laufstrecke des DMF. Die Höhe dieser Front beeinflusst die Güte der Trennung der einzelnen Indole. Ihre Lage wird einmal von der Temperatur beeinflusst (Fig. 4) und zum anderen von der Zusammensetzung des Dampfgemisches in der Trennkammer. In Gegenwart von Befeuchtungstreifen liegt die Front erheblich tiefer (Fig. 4, Ib, IIb, IIIb) als beim Fehlen der Kammersättigung (Fig. 4, Ia, IIa, IIIa). Eine optimale Trennung ergibt sich bei einer Laufstrecke der zweiten Front von R_F 0.70–0.80.

Die R_F -Werte sind wie meist bei der Dünnschichtchromatographie nur annähernd reproduzierbar. Es empfiehlt sich deshalb, auf dem für die zweidimensionale

Chromatographie nicht benötigten Feld der Platte authentische Vergleichssubstanzen mitlaufen zu lassen.

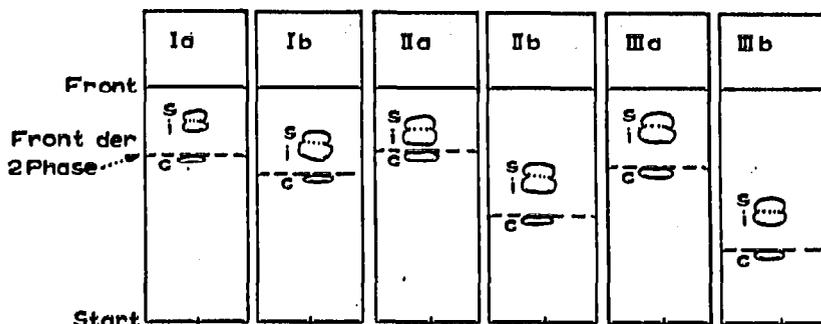


Fig. 4. Eindimensionale Dünnschicht-Chromatogramme mit A_2 bei unterschiedlichen Bedingungen. s = Skatol; i = Indol; c = Indol-3-carbinol. Chromatogramme a ohne Kammersättigung. Chromatogramme b mit Kammersättigung. Chromatogramme Ia und Ib bei 4° , IIa und IIb bei 15° , IIIa und IIIb bei 22° .

DANK

Ich danke Herrn Professor Dr. M. STEINER für die Unterstützung dieser Arbeit durch Sachmittel des Institutes und Fräulein A. WAGNER sowie Fräulein S. RITTER für die technische Mitarbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Indolderivate einer Testlösung werden durch Ausschütteln bei pH 10 und pH 2 mit Äther in eine alkalische und eine saure Fraktion aufgetrennt. Die Indolcarbonsäuren der sauren Fraktion werden mit Diazomethan verestert und z.T. auch veräthert. Die Indole (24) beider Fraktionen werden getrennt an Kieselgel H mit Benzol-Dioxan (65:35) in der 1. und Diisopropyläther-N,N-Dimethylformamid (80:20) in der 2. Dimension chromatographiert und durch Besprühen mit 6 verschiedenen Reagenzien spezifisch nachgewiesen.

SUMMARY

A test solution containing 24 authentic indole compounds was separated into an alkaline fraction and an acid fraction by ether extraction at pH 10 and pH 2, respectively. The indolecarboxylic acids of the acid fraction were esterified and partly etherified with diazomethane. Chromatographic separation of the indole compounds of both fractions was achieved on silica gel plates (Kieselgel H) with benzene-dioxane (65:35) as solvent for the first dimension and diisopropyl ether-N,N-dimethylformamide (80:20) for the second dimension. The individual compounds were identified specifically using six different spray reagents.

LITERATUR

- 1 M. KUTÁČEK, J. NOVÁKOVÁ UND M. VALENTA, *Flora*, 153 (1963) 54.
- 2 A. B. DURKEE UND J. C. SIROIS, *J. Chromatog.*, 13 (1964) 173.
- 3 Ž. PROCHAŽKA, V. ŠANDA UND K. MACEK, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 24 (1959) 2928.

- 4 L. REIO, *J. Chromatog.*, 4 (1960) 458.
- 5 K. RANDEKATH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 2. Aufl., 1965.
- 6 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962.
- 7 E. STAHL UND H. KALDEWEY, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 323 (1961) 182.
- 8 A. Y. LEUNG, A. H. SMITH UND A. G. PAUL, *J. Pharm. Sci.*, 54 (1965) 1576.
- 9 J. COTTE, M. CHETAILE, F. POULET UND J. CHRISTIANSEN, *J. Chromatog.*, 19 (1965) 312.
- 10 J. B. OBREITER UND B. B. STOWE, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 226.
- 11 G. BALLIN, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 152.
- 12 N. NOVAT, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 158 (1964) 148.
- 13 K.-W. GLOMBITZA, *J. Chromatog.*, 19 (1965) 320.
- 14 Ž. PROCHAŽKA, *Chem. Listy*, 47 (1953) 1643.
- 15 K.-W. GLOMBITZA UND T. HARTMANN, *Planta*, 69 (1966) 135.
- 16 GATTERMANN-WIELAND, *Die Praxis des organischen Chemikers*, Walter de Gruyter, Berlin, 1952; oder *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1965.

J. Chromatog., 25 (1966) 87-94