

C. H. Brieskorn und G. Mechtold<sup>1)</sup>

## Struktur der Seitenkette 3-substituierter Indole und Farbintensität bei der Reaktion mit Glyoxylsäure/Schwefelsäure

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg  
(Eingegangen am 23. Februar 1972)

Die geringere Farbdichte der Reaktionsprodukte aus Indolyl-3-essigsäure (5) und Tryptophan (2) mit Glyoxylsäure/Schwefelsäure im Vergleich zum Farbprodukt aus Indolyl-3-propionsäure (1) beruht bei 5 auf Protonierung des Säurecarbonyls und bei 2 auf Protonierung der Aminogruppe.

### The Structure of the Side Chain of 3-Substituted Indoles and the Colour Intensity of their Reaction Products with Glyoxylic Acid

The reaction-products from indolyl-3-acetic acid (5) and tryptophane (2) with glyoxylic acid/sulfuric acid have a smaller colour intensity than the product of indolyl-3-propionic acid (1). This is caused by protonation of the carbonyl group of 5 and of the amino group of 2.

Wie bereits ausgeführt<sup>2)</sup>, setzen sich alle in 3-Stellung substituierten Indole mit Glyoxylsäure bzw. Formaldehyd in stark schwefelsaurer Lösung nach Zugabe eines geeigneten Oxidationsmittels zu Farbprodukten mit dem gemeinsamen Grundgerüst eines 2,2'-Methendiindolchromophors um. Indolyl-3-propionsäure (1) weist bei einer geringen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 570 auf 560 nm eine mehr als doppelt so hohe Extinktion wie die äquimolare Menge an Tryptophan (2) auf. 1 und 2 unterscheiden sich nur durch das Fehlen der  $\alpha$ -ständigen Aminogruppe in der Seitenkette. Die durch die Aminogruppe bedingte Verzweigung könnte eine sterische Hinderung der Umsetzung von 2 zum 2,2'-Methendiindolchromophor bewirken. Trifft diese Annahme zu, so müßte eine Verbindung, in der die Aminogruppe durch einen Substituenten in vergleichbarer Größe und gleichem räumlichen Bau ersetzt ist, bei der Farbreaktion eine 2 entsprechende niedrige Extinktion ergeben.  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -indolyl-3-propionsäure (3) schien uns als Modellsubstanz geeignet. Die an die Stelle der Aminogruppe getretene Methylgruppe hat als  $sp^3$ -Hybrid wie die – unter den stark sauren Reaktionsbedingungen – protonierte Aminogruppe die Form eines Tetraeders. Beide Substituenten sind auch nahezu gleich groß. Bei der Farbreaktion zeigt 3 bei gleichem  $\lambda_{max}$  nahezu gleiche Extinktion wie 1 (Tab. 1).

1 Teil der Dissertation, G. Mechtold, Univ. Würzburg 1971.

2 C. H. Brieskorn und G. Mechtold, Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. 147, 337 (1972).

Tabelle 1:

Verbindung	c, Mol/l	E	$\lambda_{\max}$
1 Indolyl-3-propionsäure	$1.470 \times 10^{-4}$	0,790	562,5
2 Tryptophan	$1.470 \times 10^{-4}$	0,330	570
3 $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -indolyl-3-propionsäure	$1.470 \times 10^{-4}$	0,770	560

Sterische Hinderung ist demnach nicht die Ursache für die niedrige Intensität bei der Reaktion von 2. Die sehr viel geringere Extinktion muß auf die Wirkung der protonierten Aminogruppe zurückzuführen sein. Somit bleibt zu klären, ob die Aminogruppe den Reaktionsablauf zum 2,2'-Methendiindolderivat hemmt oder ob die molare Extinktion des Farbproduktes durch sie erniedrigt wird. Dies hätte nur an den 2,2'-Methendiindolderivaten entschieden werden können. Eine Isolierung dieser Verbindungen gelang jedoch nicht. Wir gingen daher von den 2,2'-Methylendiindolderivaten aus, den Vorstufen der Farbprodukte. 2,2'-Methylendiindolyl-3-propionsäure (1a) erhielten wir nach<sup>2)</sup>. Alle Bemühungen, auch 2,2'-Methylenditryptophan bzw. -tryptamin zu synthetisieren, mißglückten. Die Modellsubstanz für ein 2,2'-Methylendiindolderivat mit einem – entsprechend 2 – protonierbaren Stickstoff in der Seitenkette lieferte uns das aus Indolyl-3-essigsäure-hydrazid (4) hergestellte 2,2'-Methylenderivat 4a. Das Ausmaß der Hydrolyse des Hydrazids zu 2,2'-Methylendiindolyl-3-essigsäure (5a) ist unter den Reaktionsbedingungen nur unbedeutend.

1 hat eine um ein C-Atom längere Seitenkette als 4. Treten Unterschiede in den Farbintensitäten bei der Umsetzung beider Verbindungen auf, so sind diese nicht allein dem Einfluß des protonierbaren Stickstoffs des Hydrazids zuzuschreiben. Als Vergleichssubstanzen wurden daher Indolyl-3-essigsäure 5 und ihr Methylendiindolderivat 5a gewählt.

4a und 5a müssen vor der photometrischen Messung zunächst oxidiert werden. Die sich ergebenden Werte für die molaren Absorptionen können daher nicht auf die Farbprodukte selbst, sondern müssen auf die ihnen zugrunde liegenden Methylendiindolderivate bezogen werden (Tab. 2).

Nach Tab. 2 liegt die Extinktion von 5 bei der Farbreaktion um fast 20 % höher als die äquimolarer Mengen von 4. Die Werte der molaren Absorptionen der 2,2'-Methylendiindolderivate 4a und 5a weichen nur um etwa 5 % voneinander ab. Werden die Extinktionen, die sich bei der Farbreaktion mit den entsprechenden Ausgangsindolen ergeben, ins Verhältnis mit den Extinktionen der oxidierten Methylendiindolderivate gesetzt, so berechnet sich die Umsetzung von 5 zu 5a zu 32 %, die von 4 zu 4a zu 26 %. Von 4 hat sich demnach deutlich weniger zum Methylendiindolderivat umgesetzt als von 5. Dem protonierten Stickstoff in der Seitenkette des Hydrazids ist demnach eine hemmende Wirkung auf die Entstehung des Methylendiindols zuzuschreiben.

Tabelle 2:

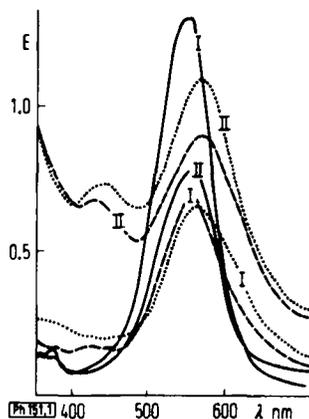
Verbindung	c, Mol/l	E	$\epsilon$	$\lambda_{\max}$
1 Indolyl-3-propion- säure	$1,470 \times 10^{-4}$	0,790	—	562
1a 2,2'-Methylendi- indolyl-3-propion- säure	$0,735 \times 10^{-4}$	1,300	17670	552
4 Indolyl-3-essig-säure- hydrazid	$1,470 \times 10^{-4}$	0,180	—	572
4a 2,2'-Methylen-diin- dolyl-3-essigsäure- hydrazid	$0,735 \times 10^{-4}$	0,695	9460	560
5 Indolyl-3-essigsäure	$1,470 \times 10^{-4}$	0,212	—	572
5a 2,2'-Methylendiindo- lyl-3-essigsäure	$0,735 \times 10^{-4}$	0,660	8990	562

Die bei der Farbreaktion von **1** und **1a** erhaltenen Extinktionswerte liegen ungleich höher als die von **4** und **5** sowie **4a** und **5a** (Tab. 2). Die molare Absorption von **1a** ist etwa doppelt so hoch wie die von **4a** und **5a**. Aus dem Verhältnis der Extinktionswerte der Methylendiindolderivate und der ihnen zugrunde liegenden Ausgangsindole kann man die Umsetzung zu den Methylendiindolverbindungen berechnen. Diese ergibt sich danach bei der Reaktion von **1** zu **1a** zu etwa 60 %. Die ungleich höhere Extinktion von **1** bei der Farbreaktion mit Glyoxylsäure ist demnach sowohl auf eine höhere molare Absorption ihres Methylendiindolderivates als auch auf eine erheblich größere Umsetzung zu dieser Verbindung zurückzuführen.

Bei **1** stehen zwischen Carboxylgruppe und Indolring 2 C-Atome. Die Carbonylgruppen von **4** und **5** sind jeweils nur durch einen Kohlenstoff vom Indolring getrennt. Unter den Bedingungen der Farbreaktion liegen die Carboxylgruppen — das gleiche gilt für die Carbonylgruppe des Hydrazids — in protonierter Form vor, wodurch ein starker  $-I$  Effekt auf die benachbarten C-Atome ausgeübt wird. Der  $-I$  Effekt pflanzt sich über die 2 C-Atome in der Seitenkette von **1** zum Indolring hin nur schwach fort. Der Indolring von **5**, der von der positiv geladenen Carboxylgruppe nur durch einen Kohlenstoff getrennt ist, wird hingegen beträchtlich desaktiviert. Ein elektrophiler Angriff des protonierten Aldehyds wird dadurch erschwert.

Indol und Formaldehyd (Glyoxylsäure) reagieren zunächst zu 2-Hydroxymethylenindol und dann über Indolyl-2-methen (**6**) sehr schnell mit einer weiteren Molekel Indol zu 2,2'-Methylendiindol<sup>2)</sup>. In Abb. 1 sind Absorptionsspektren der Farbprodukte von **1**, **4**, **5** sowie ihrer Methylendiindolderivate wiedergegeben. Zur besseren Übersicht sind die Kurven der Farbprodukte der Methylendiindolderivate mit **1**, die

Absorptionsspektren nach der Farbreaktion von  
 Indolyl-3-propionsäure —————  
 Indolyl-3-essigsäure .....  
 Indolyl-3-essigsäurehydrazid - - - - -  
 und ihrer zugehörigen Diindolylmethanderivate



der Ausgangsindole nach der Farbreaktion mit II bezeichnet. Der Kurvenverlauf I von 1 ist bis auf die unterschiedliche Intensität völlig identisch mit II. Kurve I von 5 verläuft symmetrisch um ein Maximum bei 570 nm, während Kurve II – zur besseren Auflösung in der fünffachen Konzentration aufgenommen – bei 430 nm ein weiteres Maximum zeigt. Die beiden Kurven I und II von 4 verlaufen analog.

Aus 1 entsteht, wie der symmetrische Verlauf der Kurve um nur ein Maximum zeigt, nur 2,2'-Methendiindolyl-propionsäure. Das zusätzliche Maximum bei 4 und 5 weist auf die Gegenwart einer Verbindung mit einem kürzeren konjugierten System hin. Diese Verbindung dürfte das aus 2-Hydroxymethylenindol durch Dehydratation entstandene 6 sein. Dibbern und Rochelmeyer<sup>3)</sup> haben bei der Umsetzung von Skatol mit p-Dimethylaminobenzaldehyd das analoge [3-Methylindolyl-2-p-dimethylaminophenyl]-methen als Perchlorat isoliert. Der Indolkern von 5 – das gleiche gilt für den von 4 – ist deaktiviert. Dadurch wird der Angriff von 6 an den Indolring von 4 oder 5 erschwert. Dies erklärt, warum 1.) bei 4 und 5, nicht aber bei 1, 6 im Reaktionsgemisch auftritt, und 2.) 4 und 5 sich bei der Farbreaktion in einem erheblich geringeren Ausmaß als 1 umsetzen.

Wir haben zu danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die Überlassung von Sachmitteln.

## Beschreibung der Versuche

### Indolyl-3-propionsäure (1).

Indolyl-3-propionsäure (Fluka, 95 % Reinheit), zweimal aus heißem Wasser umkristallisiert.

3 H. W. Dibbern und H. Rochelmeyer, *Arzneimittel-Forsch.* 13, 7 (1963).

*$\alpha$ -Methyl- $\beta$ -indolyl-3-propionsäure (3).*

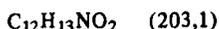
2,5 g Gramin und 3,0 g Methylmalonsäurediäthylester werden 13 ml wasserfreiem Toluol, in dem sich 0,18 g gepulvertes Natriumhydroxid befinden, zugesetzt. Die Mischung wird unter Rückfluß bei 125 – 135° (Ölbad) erhitzt. Freiwerdendes Dimethylamin wird durch Stickstoff verdrängt. Mitgerissenes Toluol ist zu ergänzen.

Die Umsetzung wird dc verfolgt. Adsorbens: Kieselgel G; Fließmittel: Petroläther/Äthylacetat 6 : 4; Sprühreagens: 1proz. Vanillin-Schwefelsäure.

Nach 3 bis 4 Std. wird das Reaktionsgemisch mit 50 ml Wasser aufgenommen und dieses dreimal mit der gleichen Menge Äther ausgeschüttelt. Die vereinigten Äther-Auszüge werden mit Wasser, mit verd. Schwefelsäure, anschließend wieder mit Wasser gewaschen. Der über Natriumsulfat getrocknete Äther wird abgedampft und der Rückstand über 200 g Kieselgel chromatographiert. Elutionsmittel Petroläther/Äther 8 : 2. Skatyl-methylmalonsäurediäthylester (7) kommt als erste Substanz von der Säule. Zähflüssiges, farbloses Öl (79 %).

1,0 g 7 wird mit 700,0 mg Kaliumhydroxid in 3 ml Wasser und 6 ml Alkohol 4 Std. unter Rückfluß erhitzt. Im DC ist neben 5 – 10 % Skatyl-methyl-malonsäure hauptsächlich Skatyl-methylmalonsäure-monoäthylester (8) erkennbar. Adsorbens: Kieselgel G; Fließmittel: n-Butanol/Ammoniak/Wasser 7 : 2 : 1, Oberphase; Sprühreagens: 1proz. Vanillin-Schwefelsäure.

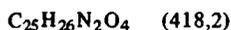
Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch mit verd. Schwefelsäure angesäuert, mit 50 ml Wasser versetzt und mit Äther ausgeschüttelt. Die organische Phase wird neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das nach dem Abdampfen des Lösungsmittels erhaltene Rohprodukt wird bei 130 – 140° und 30 Torr 45 Min. erhitzt, der Rückstand in Äther aufgenommen und mit Lauge ausgeschüttelt. Nach dem Neutralwaschen der Ätherphase wird über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Der unreine  $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -indolyl-3-propionsäureäthylester wird unter Rückfluß verseift, dann das Reaktionsgemisch mit verd. Schwefelsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Neutralwaschen und Trocknen wird das Lösungsmittel abdestilliert (Ausbeute unreines Produkt 70 %). 3 wird durch mehrfaches Umkristallisieren aus heißem Wasser rein erhalten, Schmp. 126 – 128°.



Ber.:	C 70,9	H 6,46	N 6,89
Gef.:	C 70,9	H 6,50	N 6,77

*2,2'-Methylendiindolylpropionsäure (1a)*

Zu 1 g 1 und 0,4 g 37proz. Formaldehyd, beides in Methanol gelöst, werden unter Kühlung 5 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugetropft. Nach dem Stehenlassen über Nacht wird mit Wasser verdünnt und dreimal mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die vereinten organischen Auszüge werden mit Wasser gewaschen und mit Na-sulfat getrocknet. Der Destillationsrückstand wird über eine  $\text{SiO}_2$ -Säule aufgetrennt. 1a-Dimethylester wird aus Alkohol umkristallisiert. Farblose Nadeln (20 %). Schmp. 161 – 162°.

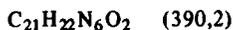


Ber.:	C 71,7	H 6,27	N 6,69
Gef.:	C 71,6	H 6,25	N 6,65

1a-Dimethylester wird unter Rückfluß verseift. Farblose Nadeln.

*2,2'-Methylendiindolyl-3-essigsäurehydrazid (4a)*

150 mg 2,2'-Methylendiindolyl-3-essigsäuremethylester (Synthese wie bei 1a) werden mit 5 ml 80proz. Hydrazinhydrat in 10 ml eines Gemisches aus gleichen T. Methanol und Äthylenglykol 3 Std. unter Rückfluß erhitzt. Danach wird bis auf ein Viertel eingengt. Nach Zugabe von 5 ml heißen Wassers und Abkühlen kristallisiert das Hydrazid in feinen, farblosen Nadeln (50 %). Schmp. 264 – 268°.



Ber.: C 65,60    H 5,68    N 21,50  
 Gef.: C 64,32    H 5,77    N 21,00

#### Farbreaktion an Indolderivaten.

Reagens: 0,4proz. Lösung von Glyoxylsäure-Monohydrat und 0,5 ml Kupfer(II)-sulfat zu gleichen T.<sup>4)</sup>

Die Indolderivate werden zu  $1,470 \times 10^{-4}$  m in Wasser gelöst. 2,5 ml jeder Lösung werden in ein Schliffreagenzglas überführt, mit 0,5 ml Reagens und tropfenweise unter Kühlung mit 5 ml konz. Schwefelsäure p. a. versetzt. Als Vergleich dient eine Lösung aus 2,5 ml Wasser und den gleichen Zusätzen. Die verschlossenen Reagenzgläser werden bis zur Entwicklung der maximalen Farbdichte in siedendem Wasser erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird gegen die Vergleichslösung photometriert.

#### Farbreaktion an 2,2'-Diindolmethanderivaten

Die 2,2'-Diindolymethanderivate werden in 4 ml heißem Äthylenglykol gelöst und mit Wasser zu einer  $0,735 \times 10^{-4}$  m Lösung aufgefüllt. Vergleichslösung: 4 ml Äthylenglykol in 1000 ml Wasser. Von jeder Lösung werden 2,5 ml in ein Schliffreagenzglas überführt, mit 0,5 ml 0,25 m  $\text{CuSO}_4$  und tropfenweise unter Eiskühlung mit 5 ml konz. Schwefelsäure p. a. versetzt. Weitere Behandlung w. o.

Verbindung	Erhitzungszeit in Min.
2 Tryptophan	8
1 Indolyl-3-propionsäure	8
3 $\alpha$ -Methyl- $\beta$ -indolyl-3-propionsäure	8
4 Indolyl-3-essigsäurehydrazid	3
5 Indolyl-3-essigsäure	3
1a 2,2'-Methylendiindolyl-3-propionsäure	8
4a 2,2'-Methylendiindolyl-3-essigsäurehydrazid	3
5a 2,2'-Methylendiindolyl-3-essigsäure	2

4 C. H. Brieskorn und K. Danziger, Z. Lebensmittel-Untersuch. u. Forsch. 137, 362 (1968).

Anschrift: Prof. Dr. C. H. Brieskorn, 87 Würzburg, Landwehr

[Ph 151]

## Buchbesprechungen

**Statistische Auswertungsmethoden.** Von L. Sachs. Dritte, neubearbeitete und erweiterte Auflage mit neuer Bibliographie. 59 Abb., XX, 548 Seiten. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York 1972. Preis: DM 58,—.

Das gut eingeführte Lehr- und Nachschlagebuch der Statistik von Sachs aus dem Grierserschen Institut in Kiel liegt in einer neuen Auflage vor. Das Buch ist in bewährter Weise aufgebaut. Ein einleitendes Kapitel bringt die mathematischen Grundlagen der Statistik. Das folgende Kapitel