

Aminosäuren, 4. Mitt.:¹

Farbreaktionen von Aminosäuren mit 4,5-Diacetyl-cyclohexen-(1)²

Von

R. Riemschneider und K. Preuß³

Aus der Freien Universität Berlin-Dahlem

(Eingegangen am 1. Oktober 1959)

4,5-Diacetyl-cyclohexen-(1) (I) reagiert unter geeigneten Bedingungen mit Aminosäuren unter Farbstoffbildung.

Bei Versuchen, das zuerst von *G. O. Schenk*⁴ beschriebene 4,5-Diacetyl-cyclohexen-(1) (I) als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von o-Diacetyl-benzol (II) zu verwenden (1952), fiel auf, daß auch I mit Aminosäuren Farbreaktionen eingeht⁵. Für eine Reihe von Aminosäuren beobachteten wir im *Lange*-Kolorimeter die in Tab. 1 angegebenen Absorptionswerte⁶, wenn je 10 ml Aminosäurelösung vom pH 9,0 (*Kolthoff*-Puffer), enthaltend 1000 γ N/ml⁷, ca. 30 Min. auf 80° vorgewärmt, dann mit 0,5 ml 2proz. alkohol. I-Lösung versetzt, 2 Stdn. im Trockenschrank auf 80 \pm 5° erwärmt und dann nach 4,5 bis 194 Stdn.⁸ vermessen wurden. In Tab. 2

¹ 3. Mitt., Mh. Chem. **84**, 522 (1953); 1. Mitt. Mh. Chem. **86**, 201, 680 (1955).

² Gleichzeitig 11. Mitt. der Reihe „Acylderivate cyclischer Verbindungen“, 10. Mitt., Mh. Chem. **90**, 658 (1959); 9. Mitt., Mh. Chem. **90**, 579 (1959); 5. Mitt., Chem. Ber. **92**, 1706 (1959).

³ Anschrift für den Schriftverkehr: Prof. Dr. *R. Riemschneider*, Berlin-Charlottenburg 9, Bolivarallee 8.

⁴ *G. O. Schenk*, Ber. dtsch. chem. Ges. **77**, 741 (1944).

⁵ 5. Mitt., l. c. Fußnote 2, 16.

⁶ Zur besseren Übersicht wurden nicht die Extinktions-, sondern die abgelesenen Absorptionswerte gegeben.

⁷ Aminosäure-Konzentration: 1000 γ N/ml (bezogen auf Gesamtstickstoff).

⁸ Vom Zeitpunkt des Herausnehmens aus dem Trockenschrank gerechnet.

sind die in essigsaurer Lösung (pH 2,1) nach 3stdg. Erwärmen auf 80°⁹ erhaltenen Versuchsergebnisse zusammengestellt.

Zu Tab. 1: Gly und Lys zeigen schon nach relativ kurzer Zeit eine intensive Färbung. Es folgen: Ala mit etwas schwächerer Reaktion, in großem Abstand die anderen untersuchten Aminosäuren, die aber nach ca. 100 bis 150 Stdn. ebenfalls gut wahrnehmbare Färbungen zeigten. Es besteht also eine gewisse Parallele zu II¹⁰, allerdings ist die Empfindlichkeit der Farbreaktion von I mit Aminosäuren geringer, überdies bei längeren Versuchszeiten. Die Färbungen der Lösungen von Gly und Lys mit I erinnern an Permanganatlösungen (nach 194 Stdn. allerdings Übergang in tief dunkelrotbraun). Für folgende Aminosäuren beobachteten wir nach 75 bzw. 194 Stdn. die Färbungen: rosarot-dunkelrot für Ala; rosa-blaurosa für Phen; rosa-blaurosa für Meth; hellrosa-rosa für Leu; hellbraunorange-braunorange für Hist; gelb für Cyst; rosaorange-braunorange für Asp.

Bei Verlängerung der Zeit des Erhitzens von Aminosäure-I-Gemischen bei pH 9,0 auf 3 Stdn. resultierten etwas stärkere Farbeffekte, und zwar nach 1 Stde. bzw. 144 Stdn.:

Gly: blauviolett (65,0) — tief dunkelrotbraun (97,5); Lys: blauviolett (Rotstich, 53,3) — tief dunkelrotbraun (98,3); Ala: hellrotviolett (34,0) — rot (65,6); Phen: hell rotviolett (21,2) — blaurosa (54,1); Meth: hellblau (Violettstich, 19,2) — blaurosa (35,9); Leu: hellrosa (13,0) — rosa (47,0); Hist*: hellgelb (13,3) — braunorange (36,5); Cyst*: gelb (12,1) — gelb (25,9); Asp nach 144 Stdn.: braunorange.

Tabelle 1. Absorption⁶ von Aminosäure⁷-4,5-Diacetyl-cyclohexen-(1)-Lösungen bei pH 9,0 (Reaktionszeit bei 80°: 2 Stdn.)⁹ nach verschiedenen Zeiten⁸

	4.5 Stdn.	75 Stdn.	194 Stdn.		4.5 Stdn.	75 Stdn.	194 Stdn.
Gly	55,0	90,4	97,5	Asp	2,9	15,1	31,3
Lys	55,1	95,5	94,1	Leu		16,7	41,9
Ala	14,1	46,7	55,0	Hist*	8,2	22,1	31,6
Phen	8,9	27,3	36,4	Cyst*	7,0	13,1	15,2
Meth	3,2	20,2	34,6				

Tabelle 2. Absorption von Aminosäure⁷-4,5-Diacetyl-cyclohexen-(1)-Lösungen bei pH 2,1 (Reaktionszeit bei 80°: 3 Stdn.)⁹ nach verschiedenen Zeiten⁸

	1 Stde.	120 Stdn.		1 Stde.	120 Stdn.
Gly	49,1	85,5	Asp	5,9	9,7
Lys	7,2	8,0	Leu	8,9	12,2
Ala	5,0	6,8	Cyst*	8,4	34,1
Phen	15,8	17,8	Glu	4,3	14,6
Meth	15,1	22,9			

⁹ Trockenschranktemperatur.

¹⁰ Vgl. 1. Mitt., 1. c. Fußnote 1.

Zu Tab. 2: Bei 3stdg. Erhitzen der ca. 10% Essigsäure enthaltenden Aminosäure-I-Lösungen (pH 2,1) wurde nach 120 Stdn. nur bei Gly eine intensive Färbung (dunkelrot) beobachtet. Lys, Ala, Leu, Asp, Glu zeigten nach der genannten Zeit Rosa-, Cyst Gelb-, Phen und Meth Blaurosfärbung.

Die Farbstoffmessungen erfolgten in einem lichtelektrischen Kolorimeter nach *B. Lange* unter Verwendung eines Grün- (VG 9) bzw. dunklen Blaufilters (BG 12). Das Blaufilter wurde zur Messung der mit einem * bezeichneten Aminosäuren benutzt. Die Messungen haben wir nicht in planparallelen Küvetten, sondern in sogenannten Reagensglasküvetten mit einem Durchmesser von 1 cm und einem Fassungsvermögen von 10 ml durchgeführt (grobquantitativ).

Die verwendeten Aminosäuren: Glycin, dl-Lysin-HCl, l-Leucin, dl- α -Alanin, dl-Phenylalanin, dl-Methionin, dl-Valin, dl-Histidin, l-Cystein-HCl, Glutaminsäure, Asparagin.

Für die mit I intensiver färbenden Aminosäuren Gly und Lys wurde die Abhängigkeit ihrer Färbung von der Aminosäure-Konzentration untersucht. Einige Meßwerte:

γ N/ml	Gly ^{11, 12}		γ N/ml	Lys ^{11, 13}	
	nach 24 Stdn.	nach 48 Stdn.		nach 24 Stdn.	nach 48 Stdn.
10	24,8	28,3	10	17,0	16,8
100	29,4	35,5	100	66,2	72,1
1000	50,5	76,1	1000	90,9	96,0

Gly bzw. Lys wurden auch bei Zimmertemp. mit I zusammengebracht. Gly: 1000 γ N/ml zeigten im *Kolthoff*-Puffer nach 4 Stdn. die Absorption 11,0, nach 122 Stdn.: 95,0; nach 122 Stdn. 100 γ N/ml: 68,8, 10 γ N/ml: 55,3. In essigsaurer Lösung: 1000 γ N/ml nach 4 Stdn.: 5,4, nach 122 Stdn.: 56,1; 100 γ N/ml nach 122 Stdn.: 7,9. Die entsprechenden Werte für Lys im *Kolthoff*-Puffer pH 9,0 liegen nach 122 Stdn. bei 63,9 für 1000 γ N/ml, 40,0 für 100 γ N/ml und 10,1 für 10 γ N/ml.

Orientierungsversuche mit weiteren Aminosäuren: Ein bis zwei Spatelspitzen Aminosäure wurden in ca. 5 ml *Kolthoff*-Puffer vom pH 9,0 gelöst, mit 0,5 ml einer 2proz. alkohol. Lösung von I versetzt und 1 bis 3 Stdn. im Trockenschrank auf $80 \pm 5^\circ$ erwärmt. Nach 1stdg. Erhitzen zeigten β -Alanin und Taurin einen rosavioletten Farbton, nach 3stdg. Erhitzen war β -Alanin dunkelblauviolett, Taurin dunkelrotviolett, α -Aminobuttersäure hellblauviolett, Glutaminsäure sehr schwach rosa, Tyrosin schwach bräunlich. Nach 24 Stdn. waren die Färbungen entsprechend intensiver. Peptide wie Gly-gly, Gyl-ala und andere gaben ebenfalls violette Färbungen.

Zur Herstellung eines Papierchromatogramms verschiedener Amino-

¹¹ pH 9,0 (*Kolthoff*-Puffer).

¹² Reaktionszeit: 45 Min. bei 80° .

¹³ Reaktionszeit: 2,5 Stdn. bei 80° .

säuren durch Entwicklung mit I haben wir jeweils 0,1 ml (enthaltend ca. 100 γ N) einer Reihe von Aminosäure-Lösungen (*Kolthoff*-Puffer) aufgetragen (Flecken), an der Luft getrocknet, mit I besprüht, getrocknet und 2 Stdn. im Trockenschrank auf 80° erwärmt: Gly zeigte schon nach $\frac{1}{2}$ Stde. einen blauroten Fleck, während die anderen unten genannten Aminosäuren nach dieser Zeit kaum wahrnehmbar waren. Nach 2 Stdn. beobachteten wir blaurote bzw. rotviolette Flecken unterschiedlicher Intensität für Gly, Phen, Leu, Meth, Lys, Val, Ala. Nach 20stdg. Aufbewahren bei Zimmertemperatur waren die Färbungen noch intensiver. Auch Asp zeigte jetzt einen schwachen rosafarbenen und Cyst einen bräunlichen Fleck, während Hist nicht wahrnehmbar war. — Gly in essigsaurer Lösung der gleichen Konz. zeigte einen hellen blaurosfarbenen Fleck. Erst nach mehreren Wochen hatte die Farbintensität der Flecken abgenommen.

Experimenteller Teil²

4,5-Diacetyl-cyclohexen-(1) (I)

34 g Acetylacetone wurden mit 20,5 g seleniger Säure (krist.) in 600 ml Wasser 8 Stdn. unter Rühren auf 70—75° (Wasserbad) erwärmt. Schon nach kurzer Zeit begann Se-Ausscheidung. Nach Beendigung der Reaktion und Stehen über Nacht hatte sich der größte Teil des Se als fester Klumpen am Boden abgesetzt. Der restliche Teil des Se war von so feiner Beschaffenheit, daß sich durch Absaugen keine gute Trennung erzielen ließ. Das Filtrat wurde mit Ammoniumsulfat gesättigt, wobei Diacetyläthylen in brauner (Se-haltiger) fester Form ausfiel. Die Suspension wurde fünfmal mit ca. 100 ml Äther extrahiert, die äther. Lösung über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und der Äther im Vak. abgezogen. Der ölige Rückstand wurde achtmal mit 50 bis 100 ml Petroläther (Sdp. 40—70°) ausgekocht. Aus Petroläther kristallisierte Diacetyläthylen in gelben feinen Nadeln (das Filtrat wurde jeweils wieder zum Auskochen verwendet). Es wurde noch zweimal aus Petroläther umkristallisiert: 8,0 g vom Schmp. 75—79°¹⁴.

4,5 g Diacetyläthylen wurden in 25 ml n-Propanol/n-Butanol mit ca. 15—20 g Butadien (wegen der schlechten Handhabung wurde das Butadien nicht abgewogen, sondern in großem Überschuß zugesetzt) unter Zugabe von ca. 0,1 g Hydrochinon im Bombenrohr (auf 2 Rohre verteilt) 11 Stdn. auf 100° erhitzt und anschließend 1 Woche bei Zimmertemperatur liegen gelassen (im Rohr hatte sich schon nach Herausnahme aus dem Ofen eine homogene gelbe Lösung gebildet). Nach Abtrennen des überschüssigen Butadiens und Abziehen des Lösungsmittels im Vak. wurde zur Isolierung von I der Rückstand zweimal im Vak. destilliert: 5,8 g I vom Sdp._{14,5} 123 bis 126°¹⁵.

Das orangefarbene *Bis-(2,4-dinitrophenyl-hydraxon)* von I schmilzt bei 212°.

C₂₂H₂₂N₈O₈ (526,5). Ber. C 50,2, H 4,22, N 21,3.

Gef. C 50,5, H 4,40, N 21,2.

¹⁴ Schmp. 78° nach *M. W. Goldberg* und *P. Müller*, *Helv. chim. Acta* **21**, 1701 (1938).

¹⁵ Sdp.₁₄ 123° nach *G. O. Schenk*, l. c. Fußnote 4 — Vgl. auch Tab 1, E in *Mh. Chem.* **90**, 580 (1959).

Das I-*Dioxim* schmilzt bei 152°.

$C_{10}H_{16}N_2O_2$ (196,2). Ber. C 61,2, H 8,20, N 14,3.
Gef. C 61,5, H 8,04, N 14,7.

Über Analoge des Diacetyläthylens wie z. B. Diacetylbutadiene und Diacetylacetylen (III) berichten wir an anderer Stelle. Das nicht kristallisierende III konnte als *Bis-(2,4-dinitrophenyl-hydrason)* vom Schmp. 235—238° (aus Toluol) charakterisiert werden. Mit III behandelte Aminosäureflecken fluorescierten im UV-Licht, z. B. Gly, Lys und Meth: blau; Phen, Arg: gelb; Cyst, Hist: grüngelb.

o-Diacetylbenzol (II) aus I^{5, 16}:

Die Dehydrierung von 6 g I mit 1 g Pd-Kohle erfolgte unter Turbinieren in N-Atmosphäre durch 20stdg. Erhitzen in siedendem Toluol-Xylol. Vakuumdestillation des nach üblicher Aufarbeitung erhaltenen Reaktionsproduktes gab ca. 3 g I und eine bei 0,1 mm zwischen 75 und 110° übergehende Fraktion (ca. 1 g), die weitgehend zur Kristallisation gebracht werden konnte: 0,8 g II vom Schmp. 38°. — II wurde zur Charakterisierung in das *Bis-(2,4-dinitrophenyl-hydrason)* vom Schmp. 211° und in *1,4-Dimethyl-phthalazin* vom Schmp. 108° übergeführt. Über Farbreaktionen von II mit Aminosäuren vgl. 1. Mitt. dieser Reihe¹.

Zur präparativen Gewinnung von II empfehlen wir nicht den oben angegebenen Weg, sondern z. B. die Oxydation von *o*-Äthylacetophenon¹⁷.

Während bei Berührung mit *o*-Diacetylbenzol mit der Haut schon nach ca. 1/2 Stde. eine erste Wirkung in Form einer leichten Rosafärbung der Haut bemerkbar wird, die dann nach 2—3 Stdn. in ein tiefdunkles Blau bzw. Blauviolett übergeht, sind bei Berührung mit 4,5-Diacetyl-cyclohexen-(1) erste Anzeichen erst nach ca. 3—6 Stdn. sichtbar und maximale Farbtiefe wird erst nach 10—20 Stdn. erreicht.

Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* sei für die Förderung dieser Arbeit bestens gedankt.

¹⁶ R. Riemschneider und B. Böttcher (1952). Auszugsweise veröffentlicht in Chem. Ber. **92**, 1706 (1959).

¹⁷ Vgl. 5. und 9. Mitt., l. c. Fußnote 2.