

Elektrochemische Untersuchungen am Ninhydrin

Bildung und Stabilitätsbereiche von zweielektronigen Reduktionsprodukten

Von

L. Holleck und **O. Lehmann**

Aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Hamburg

Mit 8 Abbildungen

(Eingegangen am 15. Februar 1961)

Bei der potentiostatischen zweielektronigen Reduktion des Ninhydrins wird eine der beiden nicht hydratisierten Ketogruppen durchreduziert. Bei pH-Werten oberhalb 4,5 lagert sich dieses benzoide Reduktionsprodukt in eine tautomere chinoide Verbindung um, die im pH-Bereich 4,5—8 ein Proton und ein Molekül Wasser, bei pH-Werten oberhalb 11 zwei Protonen abspaltet. Im Gegensatz zum farblosen benzoiden 2e-Reduktionsprodukt hat die einfach ionisierte chinoide Verbindung eine rote, die zweifach ionisierte chinoide eine blaue Farbe. Die elektroneutrale chinoide Verbindung unterhalb pH 4,5 ist farblos und dehydratisiert.

Oberhalb pH 9 dissoziiert von der hydratisierten mittleren Ketogruppe des Ninhydrins ein Proton ab ($pK_s = 8,6$), was bei hohen pH-Werten zur raschen Umwandlung in o-Carboxymandelsäure führt. Ninhydrin läßt sich zweielektronig oxydieren zur o-Carboxy-phenylglyoxylsäure.

Polarographische Untersuchungen des Ninhydrins¹ ließen auf Besonderheiten im Reduktions-Chemismus schließen. Während im sauren Gebiet unterhalb pH 2,5 nur eine 4-elektronige Reduktionsstufe auftritt, entsprechend der Reduktion der beiden Carbonylgruppen im hydratisierten Ninhydrin, bildet sich mit steigendem pH eine Doppelstufe aus, wobei jede der Einzelstufen einem zweielektronigen Prozeß entspricht. Die unterschiedliche pH-Abhängigkeit, die ein Auseinander-

¹ L. Holleck, S. E. Khalafalla und A. M. Shams el Din, Naturwiss. **42**, 558 (1955).

rücken der Halbstufenpotentiale mit steigendem pH bewirkt, gab seinerzeit bereits Anlaß zur Annahme, daß in einem mittleren pH-Bereich der erste Reduktionsschritt ein chinoides Zwischenprodukt ergibt. Wir haben in der Folge präparative Elektrolysen bei konstantem Kathodenpotential in verschiedenen pH-Gebieten durchgeführt, um das Zwischenprodukt in faßbarer Menge darzustellen und um genauere Aussagen über den Reduktions-Chemismus machen zu können. Über erste experimentelle Ergebnisse wurde bereits kurz berichtet². Der elektrochemischen Reduktion und damit der Verfolgung der Reduktionsreaktionen wird im Alkalischen eine Grenze durch die Zersetzung des Ninhydrins gesetzt, d. h. durch die Umwandlung in o-Carboxy-mandelsäure, die als eine innere *Cannizzaro*-Reaktion angesprochen werden kann³.

I. Polarographische Stromspannungskurven

In den in Abb. 1 wiedergegebenen Polarogrammen zwischen pH 1,1 und 11,6 sind verschiedenartige Veränderungen zu erkennen, und zwar hinsichtlich a) der Grenzstromstärke (Gesamtstufenhöhe), b) der pH-Abhängigkeit der einzelnen Halbstufenpotentiale und c) der Zahl und Potentiallage der polarographischen Stufen.

a) Die Grenzstromstärke

Die Gesamtstufenhöhe fällt im sauren Gebiet bis pH 5 zunächst ab und steigt bei pH-Werten oberhalb 8 unter Ausbildung einer Vorstufe wieder an. Da sowohl aus dem polarographischen Diffusionsstrom als auch nach der im folgenden beschriebenen potentiostatischen Reduktion für die Gesamtreaktion im pH-Bereich 5 bis 7 eine Beteiligung von 4 Elektronen resultiert, folgt, daß im sauren und im alkalischen Bereich eine weitergehende Reduktion stattfindet. Für das saure Gebiet, in dem noch keine Veränderung der Struktur des Ninhydrins erfolgt, ist die Erhöhung der Gesamtreaktionsstufe auf die Ausbildung einer kinetisch begrenzten Stufe zurückzuführen, welche auf der Dehydratation der Ketogruppe am C-Atom-2 des 4-elektronig reduzierten Ninhydrins beruht. Daß die Erhöhung der Gesamtreaktionsstufe nicht von einer teilweisen Dehydratation der Ausgangssubstanz, Ninhydrin, herrührt, ergibt sich aus der Lage der ersten Reduktionsstufe, für die bei Vorliegen dreier nichthydratisierter benachbarter Ketogruppen ein wesentlich positiveres Halbstufenpotential zu erwarten wäre. Die Erhöhung der Gesamtreaktionsstufe im pH-Bereich oberhalb 8 ist begleitet von der Ausbildung einer derartigen Vorstufe, was auf eine Erleichterung der

² L. Holleck, O. Lehmann und A. Mannl, Naturwiss. 47, 108 (1960).

³ G. A. Melkonian und L. Holleck, Z. Elektrochem.-Ber. Bunsenges. Physikal. Chemie 64, 1210 (1960).

Dehydratation der Ketogruppe des C-Atoms-2 des Ninhydrins infolge Abspaltung eines Protons hinweist.

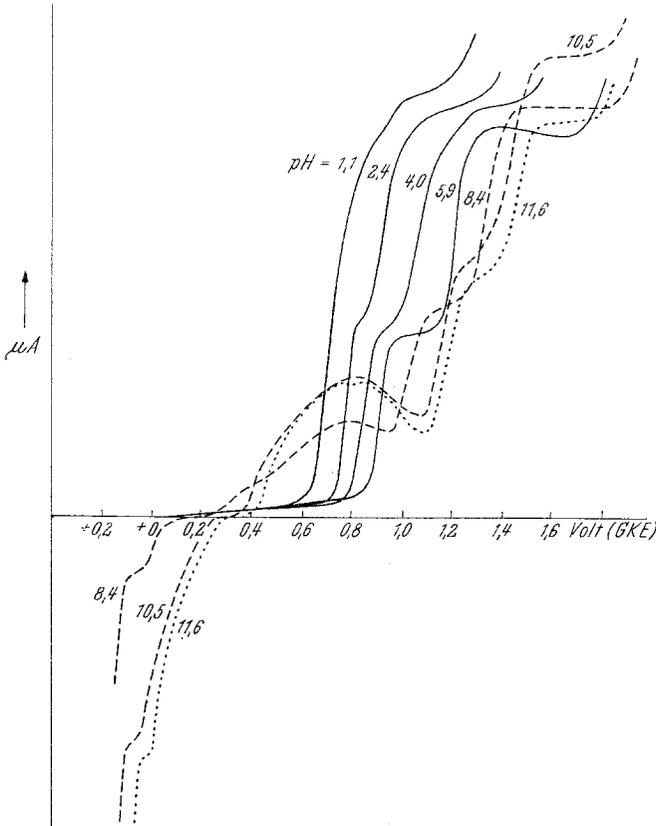


Abb. 1. Polarogramme des Ninhydrins

Der zeitliche Abfall der Grenzstromstärke bei pH-Werten oberhalb 10 beruht auf der Umwandlung des Ninhydrins in o-Carboxy-mandelsäure, die polarographisch inaktiv ist^{1, 3}.

b) pH-Abhängigkeit der Halbstufenpotentiale

Die pH-Abhängigkeit der Halbstufenpotentiale des Ninhydrins (Abb. 2) zeigt, daß sowohl bei der 4-elektronigen als auch bei der 2-elektronigen Reduktion Wasserstoffionen nicht reversibel, d. h. in schneller Reaktion beteiligt sind. Für die 4-elektronige Reduktion, die zum Indandiol-(1,3)-on-(2) führt, ist keine reversible Anlagerung von Protonen zu erwarten, da zwei Protonen an C-Atome gebunden werden. Die pH-Abhängigkeit des Halbstufenpotentials der 2e-Reduktionsstufe von

etwa 45 mV/pH bei pH-Werten unterhalb 5 und 35 mV/pH bei Werten zwischen 5 und 8 läßt darauf schließen, daß nur ein Proton reversibel angelagert wird (an ein O-Atom), während das zweite irreversibel an ein C-Atom gebunden wird. Als primäres 2e-Reduktionsprodukt ist daher nicht, wie ursprünglich vermutet, bereits die chinoid Form anzunehmen, sondern das Indanol-(1)-dion-(2,3)-hydrat-(2). Das Auseinanderrücken der Halbstufenpotentiale der zwei- und vierelektronigen Reduktions-

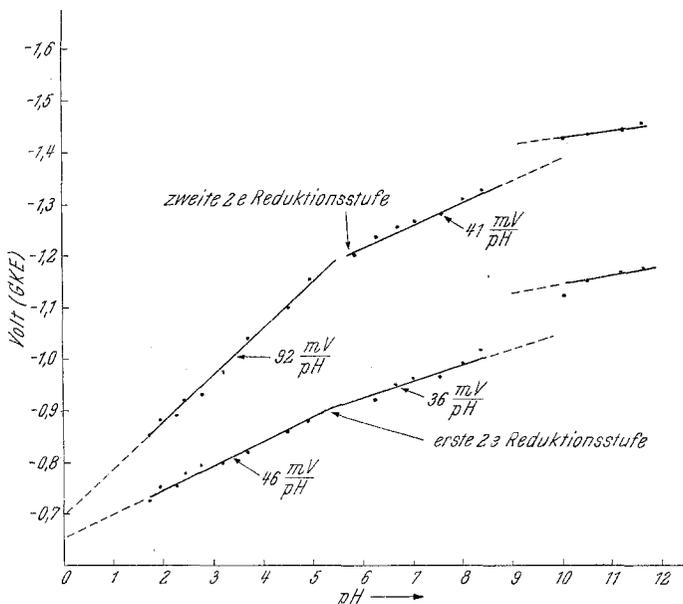


Abb. 2. pH-Abhängigkeit der Halbstufenpotentiale

stufen mit steigendem pH ist durch die zunehmende Irreversibilität der Protonenanlagerung, die sich besonders bei der 4e-Reduktion auswirkt, zu erklären.

c) Zahl und Potentiallage der polarographischen Stufen

Bei einer pH-Steigerung über 8 treten in den Polarogrammen des Ninhydrins weitgehende Veränderungen auf. Es erfolgt die Ausbildung einer Vorstufe und einer Oxydationsstufe, verbunden mit einer Versetzung des Halbstufenpotentials der verbliebenen 2e-Reduktionsstufe um etwa einhundert mV und einer Gelbfärbung der Lösung. Diese Erscheinungen erklären sich durch das Abdissoziieren eines Protons von der hydratisierten mittleren Ketogruppe. Die potentiometrische Titration des Ninhydrins (Abb. 3) ergab einen pKs-Wert von 8,6. Die von *Ruhemann*⁴

⁴ S. *Ruhemann*, J. Chem. Soc. **97**, 2025 (1910).

bei der Untersuchung des alkalischen Zerfalls des Ninhydrins als erster Schritt angenommene Abspaltung eines Protons ist damit gesichert.

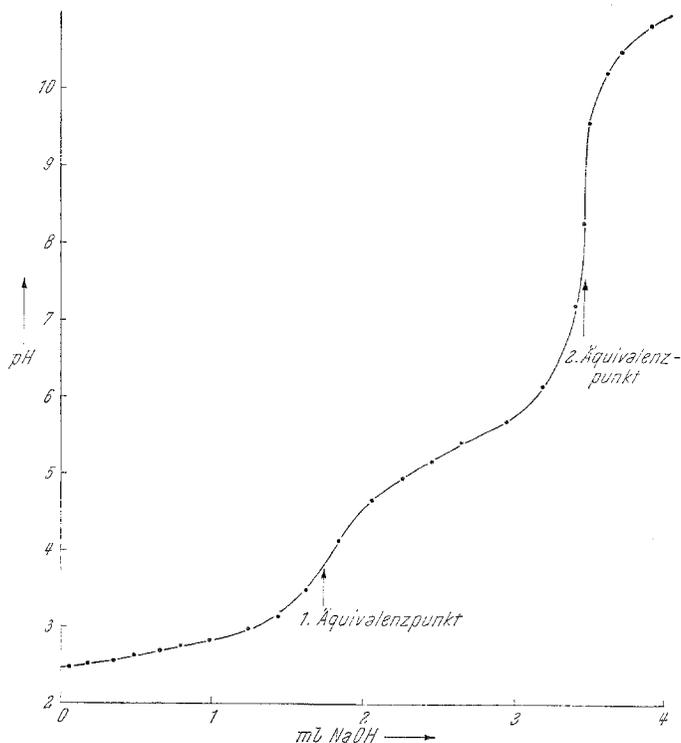


Abb. 3. Titrationskurve der o-Carboxy-phenylglyoxylsäure

II. Potentiostatische Elektrolysen

a) Das Auftreten farbiger Reduktionsprodukte; pH-Bereiche, zeitliche Farbvertiefung

Um über die Natur des primären Reduktionsproduktes etwas aussagen zu können, wurden zunächst zweielektronige Reduktionen bei konstantem Kathodenpotential vorgenommen. Hierbei zeigte sich, daß bei einer Reduktion unterhalb pH 4,5 das 2e-Reduktionsprodukt farblos ist, während die 2e-Reduktion im pH-Gebiet 5 bis 8 zu einem roten und oberhalb pH 10 zu einem blauen Produkt führt, außerdem war auffallend, daß die Intensität der roten und der blauen Farbe nach Beendigung der Reduktion weiter zunimmt. Eine weitere 2-elektronige Reduktion der farbigen 2e-Reduktionsprodukte führt zu einem farblosen 4e-Reduktionsprodukt.

b) Verlauf der Strom-Zeitkurven

Die bei der Elektrolyse aufgenommenen $i-t$ -Kurven wurden auf einen bei einer einfachen Reduktion zu erwartenden exponentiellen Verlauf hin untersucht. Während unterhalb pH 5 eine gute Übereinstimmung mit der e -Funktion vorliegt, werden die $\log i_0/i$ -Werte bei pH-Werten oberhalb 5 mit zunehmender Zeit merklich zu klein, was darauf schließen läßt, daß in diesem pH-Gebiet eine langsame Weiterreduktion stattfindet.

Da die Halbstufenpotentiale für die 2- und 4-elektronige Reduktion mit steigendem pH auseinanderrücken, ist die Weiterreduktion nur durch das Vorhandensein einer Verbindung zu erklären, die bei der zweielektronigen potentiostatischen Reduktion mitentsteht und deren Reduktionspotential positiver liegt als das im Polarogramm des Ninhydrins auftretende. Diese Weiterreduktion tritt oberhalb pH 7 so stark in Erscheinung, daß innerhalb normaler Elektrolysezeiten kein konstanter Reststrom erreichbar ist. Infolgedessen führt die Bestimmung der Zahl der an der Elektrolyse beteiligten Elektronen zu $z > 2$.

c) Potentiostatische Oxydation des Ninhydrins

Ninhydrin läßt sich bei pH-Werten oberhalb 8 sowohl potentiostatisch bei einem Potential, bei welchem die Oxydationsstufe auftritt, als auch chemisch, z. B. mit Brom, zweielektronig oxydieren. Das Oxydationsprodukt weist je nach dem pH eine oder zwei insgesamt zweielektronige Reduktionsstufen auf. Außerdem sind zwei Carboxylgruppen feststellbar, deren eine für eine organische Säure relativ stark sauer ist, wie aus der potentiometrischen Titration hervorgeht. Durch zweielektronige Reduktion erhält man daraus eine Verbindung, die polarographisch inaktiv ist und die das gleiche Spektrogramm aufweist wie *o*-Carboxy-mandelsäure. Die durch Oxydation aus Ninhydrin erhaltene Verbindung kann somit nur *o*-Carboxy-phenylglyoxylsäure sein. Eine Bestimmung des pKs-Wertes für die Titration der ersten Stufe ergab einen Wert von etwa 2,2, was mit der Annahme einer α -Ketosäure gut übereinstimmt. Der pKs-Wert der zweiten Stufe liegt bei 5,0 (Benzoesäure 4,19).

Im Polarogramm tritt bis pH 2,8 nur eine zweielektronige Reduktionsstufe auf (Abb. 4); mit steigendem pH sinkt deren Höhe ab, während sich eine zweite Stufe ausbildet, die um etwa 200 mV nach negativeren Potentialen verschoben ist, wobei die Gesamtstufenhöhe konstant bleibt. Bei pH-Werten oberhalb 5 bildet sich eine weitere Stufe aus, deren Potentiallage abermals etwa 200 mV negativer ist und deren Höhe im selben Maße ansteigt, wie die zweite Stufe absinkt (Abb. 5). Es handelt sich hierbei um kinetisch begrenzte Säurestufen, wie sie von *R. Brdička*

und *K. Wiesner*⁵ sowie von *K. H. Henke*⁶ bei Brenztraubensäure und Phenylglyoxyssäure aufgezeigt wurden.

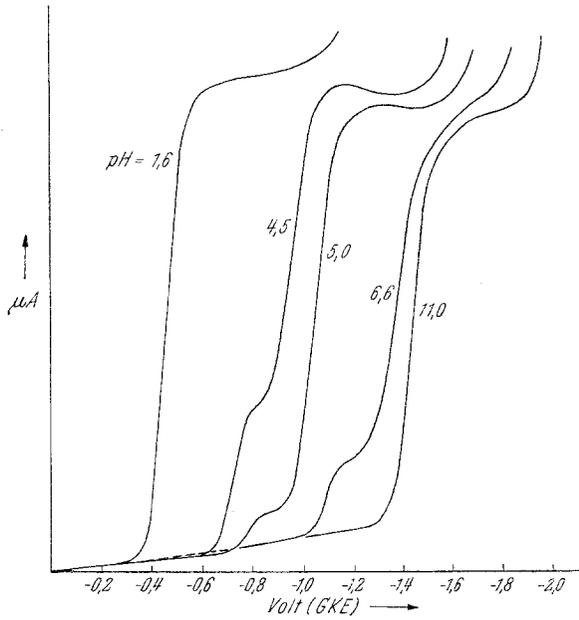


Abb. 4. Polarogramme der o-Carboxy-phenylglyoxyssäure

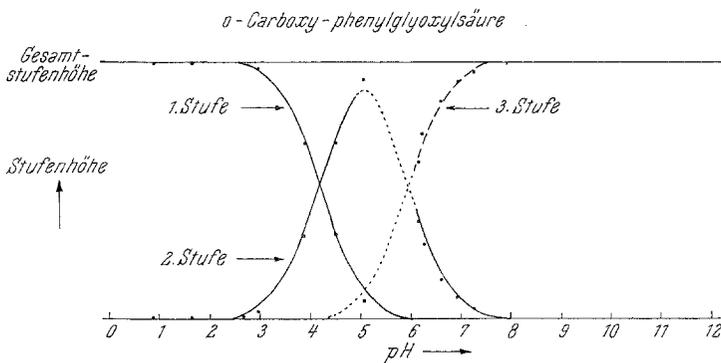


Abb. 5. pH-Abhängigkeit der Stufenhöhen der o-Carboxy-phenylglyoxyssäure

⁵ *R. Brdička* und *K. Wiesner*, Collect. czechoslov. chem. Commun. **12**, 138 (1947).

⁶ *K. H. Henke* und *W. Hans*, Z. Elektrochem.-Ber. Bunsenges. Physikal. Chemie **57**, 591 (1953).

III. Das zweielektronige Reduktionsprodukt

a) pH-Bereich unterhalb 4,5

Wird Ninhydrin unterhalb pH 4,5 zweielektronig reduziert, so erhält man eine Verbindung, die eine zweielektronige Reduktionsstufe aufweist, und zwar an derselben Stelle, wo die zweite Stufe beim Ninhydrin liegt. Diese Verbindung ist vollkommen beständig auch gegen Luftsauerstoff und zeigt im Polarogramm wie auch im Spektrogramm keine zeitliche Veränderung.

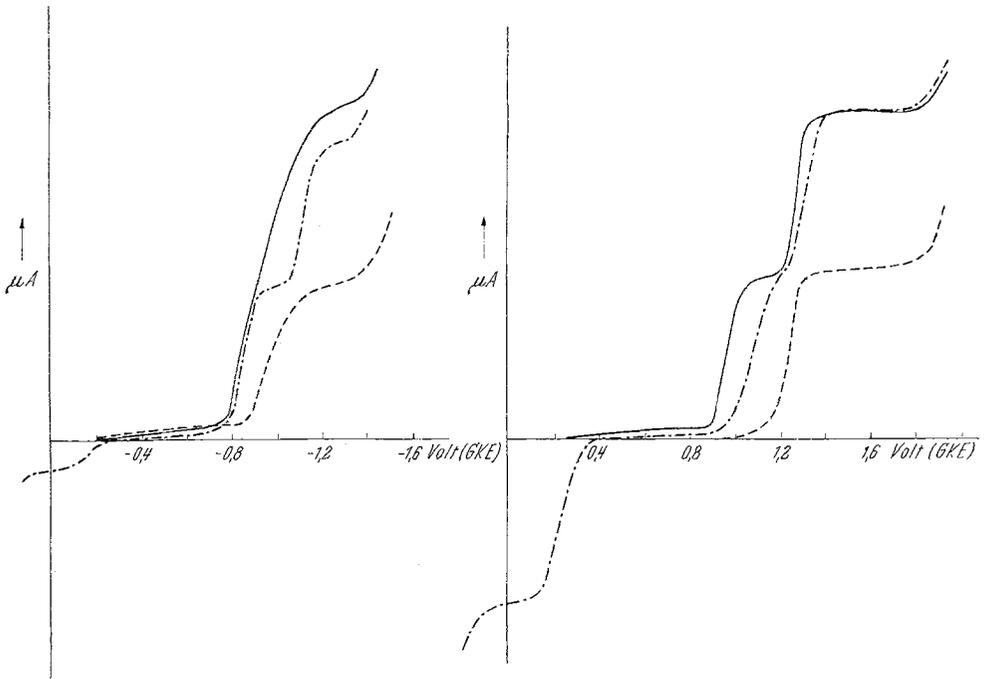


Abb. 6. Polarogramme von verschiedenen Formen des 2e-reduzierten Ninhydrins im sauren und neutralen Gebiet

- | | |
|---|---|
| <p>a) <u>pH = 3,1</u> <u>24° C</u></p> <p>Ninhydrin: ————</p> <p>direktes 2e-Reduktionsprodukt: - - - - -</p> <p>2e-Reduktionsprodukt nach der im Alkalischen erfolgten Umwandlung: ······</p> | <p>b) <u>pH = 6,8</u> <u>5° C</u></p> <p>Ninhydrin: ————</p> <p>primäres 2e-Reduktionsprodukt: - - - - -</p> <p>2e-Reduktionsprodukt nach der Umwandlung: ······</p> |
|---|---|

Zu einer anderen Form des 2e-Reduktionsproduktes des Ninhydrins in diesem pH-Gebiet gelangt man jedoch, wenn man das oben erhaltene Produkt in einem pH-Bereich größer als 6 in das bereits erwähnte und im nächsten Kapitel näher behandelte rote bzw. blaue 2e-Reduktionsprodukt überführt und den pH-Wert der Lösung dann wieder unter 4,5 bringt. Die Lösung ist dann wieder farblos, zeigt aber ein anderes Polarogramm als die ursprüngliche farblose Lösung (Abb. 6a).

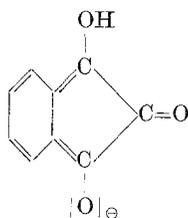
Das Polarogramm weist eine zweite Reduktionsstufe und eine kinetisch begrenzte Oxydationsstufe auf. Die diesem Polarogramm zugrunde liegende Verbindung ist gegen Oxydationsmittel empfindlich und liefert bei der Oxydation Ninhydrin. Eine Umwandlung in das primär erhaltene farblose 2e-Reduktionsprodukt ist nicht festzustellen.

b) *pH-Bereich 4,5 bis 8*

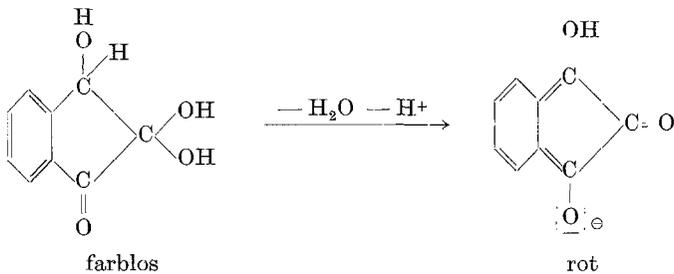
Die 2-elektronige Reduktion im pH-Bereich 4,5 bis 8 führt, wenn sie bei Temperaturen unterhalb 10° C ausgeführt wird, zu einem farblosen Produkt, welches sich langsam in eine rote Verbindung umwandelt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist temperatur- und pH-abhängig. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k beträgt $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ bei pH 7,17 und 18° C, die Aktivierungsenergie etwa 18 kcal.

Während die farblose Verbindung im Polarogramm nur eine zwei-elektronige Reduktionsstufe aufweist, liegen im Polarogramm der roten Verbindung zwei zweielektronige Reduktionsstufen, die je nach dem pH-Wert auch zu einer vierelektronigen verschmelzen können, und eine zweielektronige Oxydationsstufe vor (Abb. 6 b).

Die rote Verbindung ist gegen Luftsauerstoff außerordentlich empfindlich und liefert ebenso wie bei der potentiostatischen Oxydation als Oxydationsprodukt Ninhydrin. Da für die Oxydation der roten Verbindung zum Ninhydrin eine Oxydation einer Alkoholgruppe nicht in Frage kommt, scheidet das Indanol-(1)-dion-(2,3) als mögliche Struktur aus. Es ist vielmehr anzunehmen, daß eine chinoider Struktur vorliegt, bei der außerdem die Ketogruppe am C-Atom-2 dehydratisiert ist:



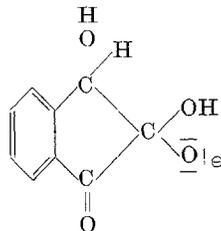
Infolge Fehlens der Oxydationsstufe bzw. der damit verbundenen Oxydierbarkeit kann die bei der potentiostatischen Reduktion des Ninhydrins zunächst erhaltene farblose Verbindung nicht als am C-Atom-2 hydratisierte obige chinoider Verbindung erklärt werden. Es muß daher gefolgert werden, daß die zweielektronige Reduktion zunächst zum Indanol-(1)-dion-(2,3)-hydrat-(2) führt. Diese Verbindung lagert sich unter Dehydratation und Abspaltung eines Protons in die obige chinoider um:



c) *pH-Bereich oberhalb 10*

Wird die unmittelbar nach der 2e-Reduktion im pH-Bereich 4,5 bis 8 erhaltene farblose Lösung auf pH-Werte $> 10,5$ gebracht, so tritt im Laufe der Zeit Blaufärbung ein. Es liegen somit auch in diesem pH-Gebiet zwei Formen des 2e-Reduktionsproduktes vor, von denen die eine farblos und die andere blau ist. Die farblose Verbindung zeigt im Polarogramm weitgehende Ähnlichkeit mit den Polarogrammen des Phenylglyoxals und des Ninhydrins in diesem pH-Gebiet. Neben der Ausbildung einer Oxydationsstufe ist das Erscheinen einer Vorstufe mit ausgeprägtem Maximum, dessen Halbstufenpotential um etwa 700 mV positiver ist als das Halbstufenpotential der 2e-Reduktionsstufe, charakteristisch. Sie weist darauf hin, daß ein Nachlieferungsprozeß zur sehr leicht reduzierbaren nichthydratisierten Diketoverbindung aus dem nach Abspaltung eines Protons erhaltenen Anion der einfach hydratisierten Verbindung einsetzen kann.

Die farblose Form des 2e-Reduktionsproduktes des Ninhydrins in diesem pH-Gebiet hat somit eine benzoide Struktur mit zwei Keto- und einer Alkoholgruppe:



Dies einfach ionisierte Indanol-(1)-dion-(2,3)-hydrat-(2) erleidet eine Umlagerung in die blaue Verbindung. Im Polarogramm der blauen Verbindung tritt eine ausgeprägte Oxydationsstufe auf, deren Halbstufenpotential um etwa 230 mV negativer liegt als dasjenige der Oxydationsstufe der farblosen benzoide Verbindung (Abb. 7). Entsprechend der ziemlich negativ liegenden Oxydationsstufe ist die Verbindung außerordentlich leicht oxydierbar und ergibt bei der Oxydation Nin-

hydrin. Da die benzoide Struktur der farblosen Verbindung außer Zweifel steht, muß für die blaue ebenso wie für die rote Verbindung im neutralen pH-Gebiet eine chinoid Form angenommen werden, die sich von der-

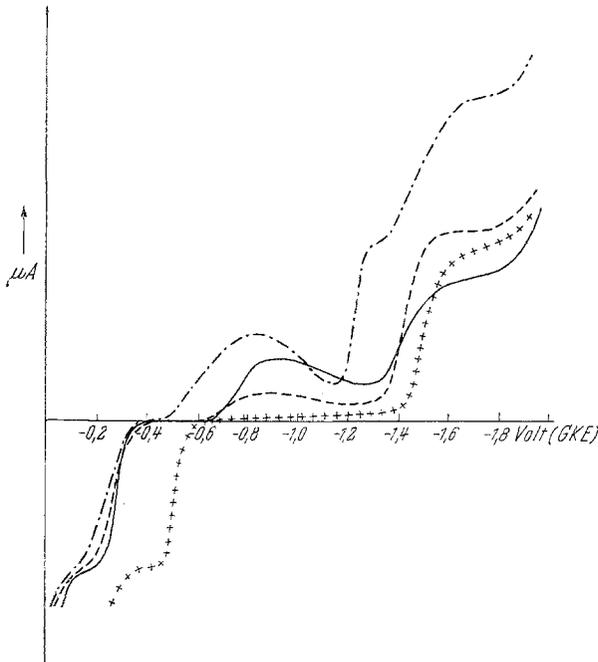
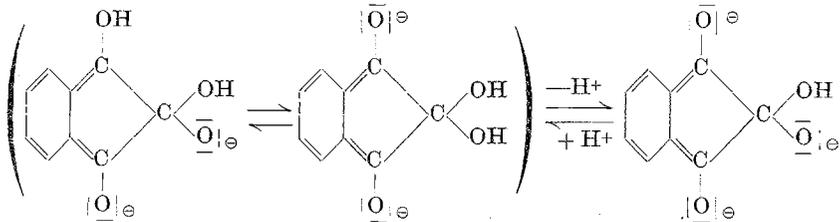


Abb. 7. Polarogramme im alkalischen Gebiet

pH = 12,2; 0° C

Ninhydrin: - - - - -
 2 e-Reduktionsprodukt vor der Umwandlung: —————
 2 e-Reduktionsprodukt nach der Umwandlung: + + + +
 Phenylglyoxal: - · - · - ·

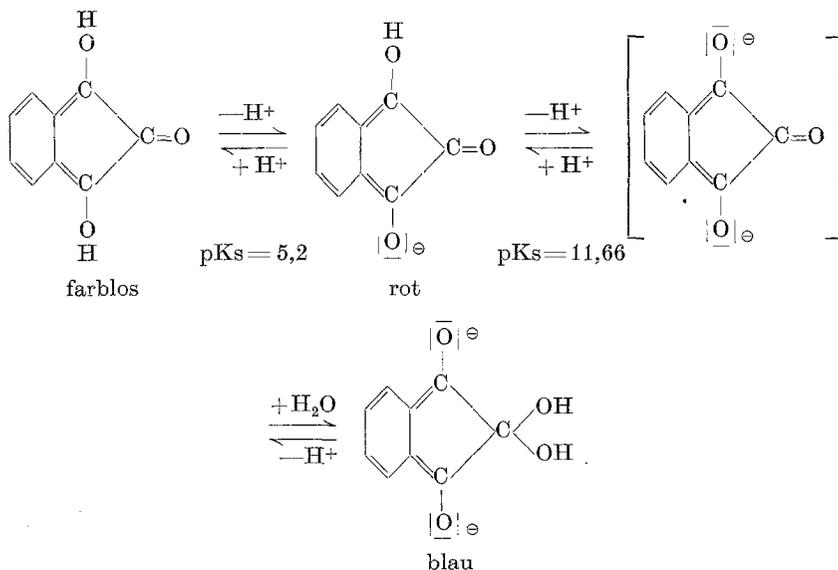
jenigen der roten einerseits durch Hydratation der mittleren Keto-
 gruppe, andererseits durch die Abdissoziation eines weiteren Protons unter-
 scheidet. Folgende Strukturen stehen daher zur Diskussion:



Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Umlagerung der farblosen benzoiden in die blaue chinoid Verbindung beträgt bei pH = 12,0 und einer Temperatur von 18° C $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$.

d) *Stabilitätsbereiche*

Während die Umwandlung der bei der 2e-Reduktion zunächst entstehenden benzoiden Verbindung in die rote und blaue chinoiden als langsame Zeitreaktion erfolgt und eine Umlagerung der benzoiden in die farblose chinoiden Verbindung unterhalb pH 4,5 überhaupt nicht beobachtet werden konnte, lassen sich die chinoiden Formen des 2e-Reduktionsproduktes unmittelbar in schneller Ionenreaktion ineinander überführen. Durch potentiometrische Titration ließ sich der pKs-Wert für die Abspaltung des ersten Protons bestimmen, er liegt bei 5,2. Die Abdissoziation des zweiten Protons erfolgt sehr weit im Alkalischen, so daß die Bestimmung des pKs-Wertes aus der Titrationskurve infolge der geringen Konzentration (10^{-3} m) der chinoiden Verbindung nicht mehr möglich ist. Durch spektroskopische Messungen wurde unter der Voraussetzung, daß von der roten chinoiden Verbindung nur ein weiteres Proton abgespalten wird, ein Wert von $2,2 \cdot 10^{-12}$ für die Dissoziationskonstante der zweiten Stufe gefunden. Die farblose chinoiden Verbindung hat somit die Funktion einer zweibasischen Säure:



Die chinoiden 2e-Reduktionsprodukte des Ninhydrins sind offenbar mit den bei der Auflösung von Hydrindantin in Wasser entstehenden farbigen Verbindungen identisch, für die nach *McCaldin*⁷ ganz ähnliche Strukturen vorgeschlagen sind, die sich von den von uns angenommenen z. T. nur durch Mindergehalt von Hydratwasser oder die Lage eines Protons

⁷ D. J. McCaldin, Chem. Reviews **60**, 39 (1960).

unterscheiden. Durch die von uns in den verschiedenen pH-Bereichen formulierten Strukturen läßt sich das polarographische Verhalten widerspruchsfrei erklären.

Experimentelles

Für unsere Untersuchungen wurde *Mercksches* Ninhydrin (p. a.) verwendet. Als Puffersubstanz dienten Ortho-Phosphat, Pyrophosphat, Phenol und Citronensäure.

Zur Konstanthaltung des Kathodenpotentials wurde der Standard-Potentiostat 300/0,01/-5 der Elektronischen Werkstätten, Göttingen, benutzt.

Für die Elektrolysen an der gerührten Hg-Elektrode haben wir eine Zelle (Abb. 8) konstruiert, die es gestattet, alle anfallenden Untersuchungen in dem Elektrolysengefäß durchzuführen, ohne Gefahr zu laufen, daß durch etwaige Luftoxydation bei Gefäßwechsel Veränderungen in den Elektrolysenprodukten eintreten. Sie besteht aus einem großen Elektrodenraum (a), in den von oben Gegenelektrode (b), Rührer (c), Kalomelektrode (d) und durch weitere Ansatzstutzen Thermometer, Gasdurchleitungsrohre, Einfülltrichter und zusätzlich eine Tropfelektrode eingesetzt werden. Alle Ansätze sind mit Glasschliffen versehen. Die Tropfelektrode gestattet, polarographische Aufnahmen im Elektrolysengefäß durchzuführen, was vor allem für die Untersuchungen der luftempfindlichen blauen und roten Teilreduktionsprodukte von Vorteil war. Nach Beendigung der Elektrolyse ließen sich in dem Gefäß weitere Reaktionen verfolgen. Die Elektrolysen wurden bei einer Temperatur von 20° C und zum Teil 0° C durchgeführt. Die Depolarisatorkonzentration betrug 10^{-3} m, die Pufferkonzentration 10^{-1} m. Die Polarogramme wurden mit einem Polarographen der Institutsbauart nach *Nann-Holleck*, NH 2, aufgenommen. Die Potentiale beziehen sich auf die gesättigte Kalomelektrode (GKE).

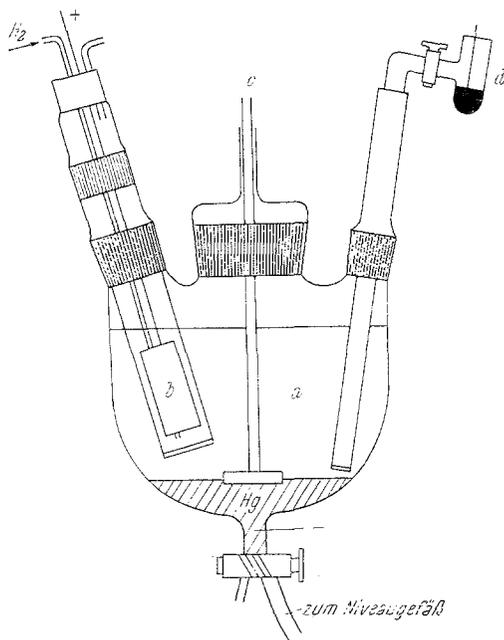


Abb. 8. Elektrolysengefäß für potentiostatische Untersuchungen an gerührter Quecksilberelektrode

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die zur Verfügung gestellten Mittel.