

Aminosäuren, 9. Mitt.:^{1,2}

Farbreaktionen mit cyclischen Di- und Triacetylverbindungen

Von

R. Riemschneider und **P. Claus**

Aus dem Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin-Dahlem*

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 17. April 1962)

In früheren Arbeiten^{1, 3} haben wir über das Verhalten von *o*-Diacetylbenzol (I) und einer größeren Anzahl cyclischer Verbindungen mit zwei oder drei analogen Carbonylfunktionen gegenüber Aminosäuren berichtet, wobei außer I und Homologen das vicinale Triacetylbenzol (II) und ein Diacetylcyclohexen-Isomers (*trans*-IV)¹ Farbstoffbildung zeigten. Diese und einige weitere, aus *cis*- und *trans*-Diacetyläthylen und entsprechenden Dienen synthetisierten cyclischen *o*-Diacetylverbindungen (Tab. 1) werden im folgenden in ihrem Verhalten gegenüber den 6 Aminosäuren Gly, Lys, His, Met, Asp, Cys quantitativ geprüft.

Von allen bis jetzt bekannten *o*-Diacetylverbindungen färben I und II die untersuchten Aminosäuren am besten: Abb. 1. Cys, das von den geprüften Aminosäuren mit Diacetylderivaten am schlechtesten reagiert, bildet nur mit II einen charakteristischen orange Farbton. Substituenten in *o*-Stellung zu den Diacetylgruppen setzen die Farbstoffbildung im allgemeinen herab, z. B. VII: Abb. 1. Die Addukte aus 1,4-Diphenylbutadien-(1,3) oder Anthracen und Diacetyläthylen reagieren nicht mehr

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

¹ Fortsetzung der 4. Mitt., Mh. Chem. **90**, 924 (1959); 8. Mitt.: Mh. Chem. **93**, 841 (1962).

² Gleichzeitig 21. Mitt. der Reihe „Acylderivate cyclischer Verbindungen“; 20. Mitt.: Mh. Chem. **93**, 616 (1962).

³ Mh. Chem. **91**, 1034 (1960), ebenda weitere Literatur.

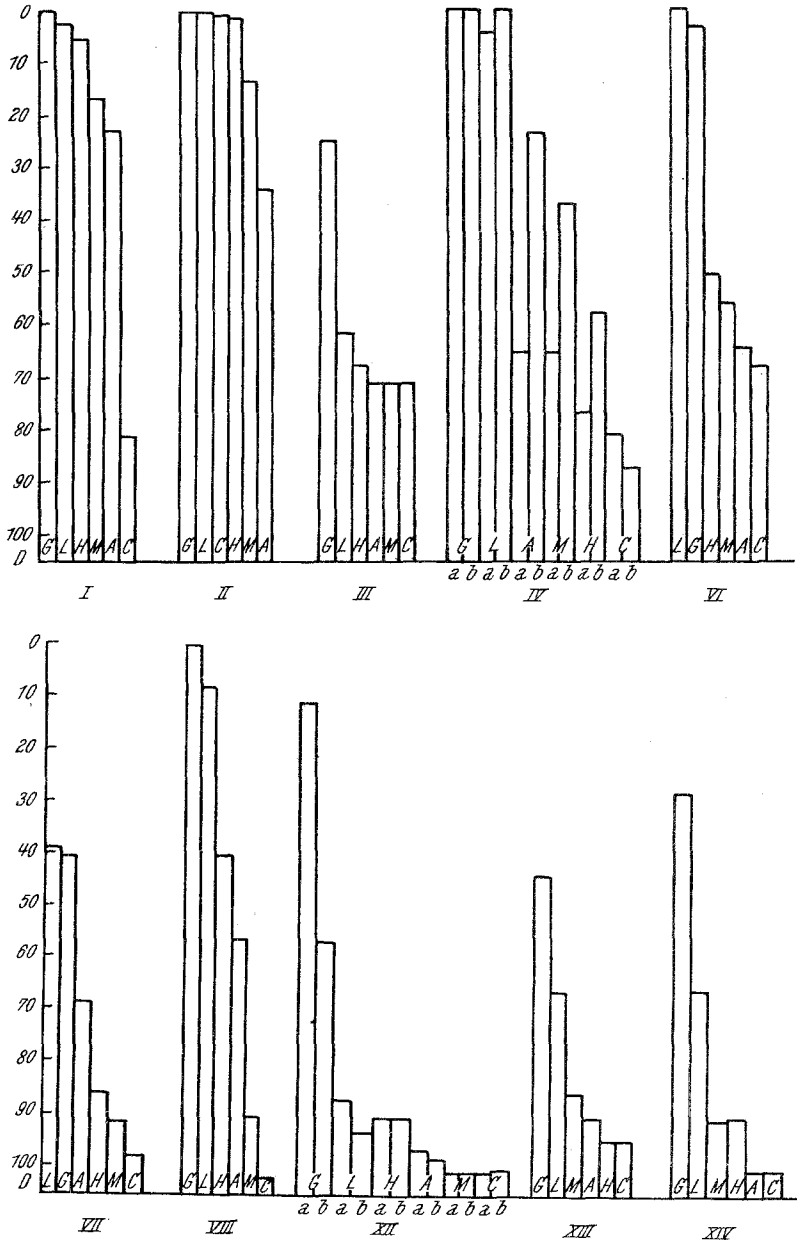
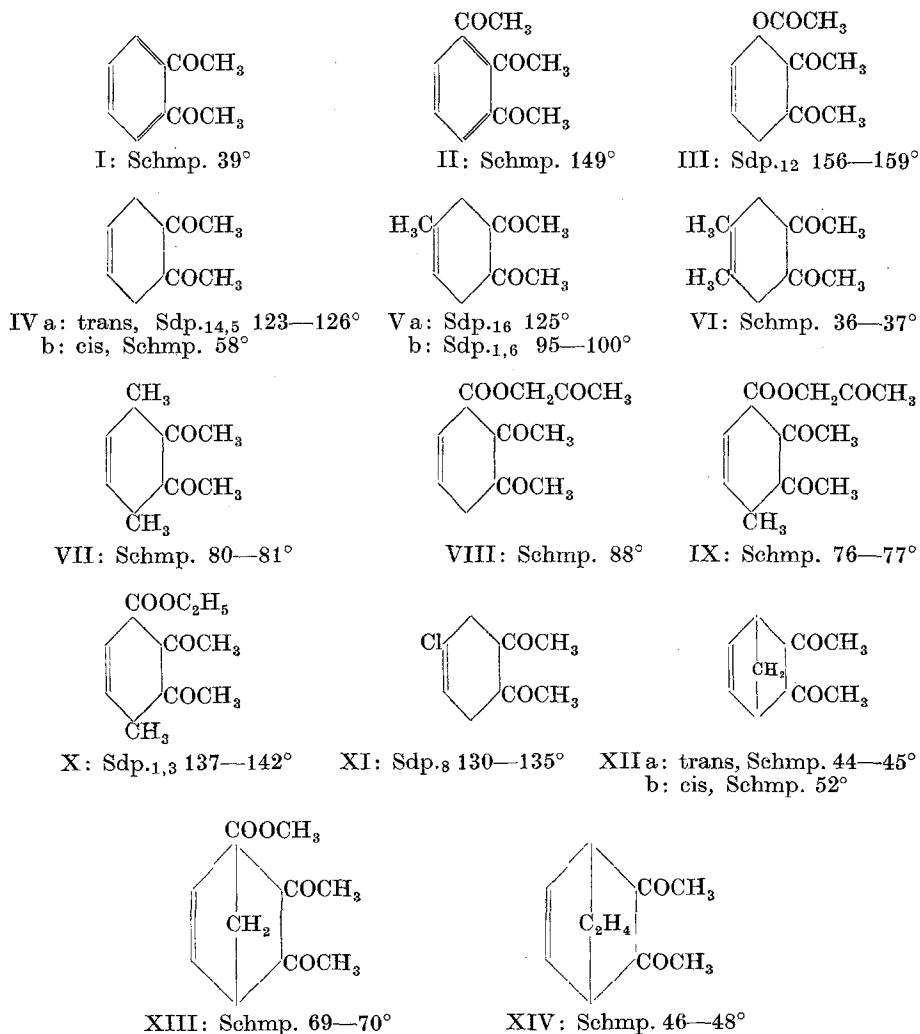


Abb. 1. Lichtdurchlässigkeit der Farbstofflösungen

G = Glycin, L = Lysin, H = Histidin, M = Methionin, A = Asparaginsäure, C = Cystein
 Aminosäure-Konz.: Reagentien I bis VIII 1 mg/ml; XII bis XIV 2 mg/ml
 Reagens-Konz.: Reagentien I bis III 0,05 mol; IV, VI, VII 0,1 mol; VIII und XII bis XIV 0,2 mol.
 Reaktionszeiten: Reagentien I bis III 3 Stdn. (Cystein 6,5 Stdn.); IV bis XIV 21,5 Stdn.

mit Gly und Lys, die besonders leicht Farbstoffe mit *o*-Diacetylderivaten bilden können. Der negative Einfluß der Substituenten in *o*-Stellung zu den Diacetylgruppen kann aufgehoben oder die Farbstoffe sogar noch

Tabelle 1. Die untersuchten *o*-Diacetylverbindungen I—XIV



verstärkt werden, wenn die betreffenden Substituenten Estergruppen sind. So färbt III etwa wie I und II, VIII und IV a unterscheiden sich in der Färbung fast gar nicht: Abb. 1. IX⁴ reagiert mit Aminosäuren bedeutend besser als der entsprechende Äthylester X. Methylgruppen

⁴ Meßwerte meist ähnlich VIII.

an der Doppelbindung beeinflussen die Farbstoffbildung nicht negativ. Verbindung V färbt wie IV b und VI wie IV a. Dagegen verringern negative Substituenten, wie Chlor, in m-Stellung zu den Acetylgruppen die Geschwindigkeit der Farbstoffbildung.

Die Diacetylverbindungen mit Brückengliedern färben nur noch Gly und Lys deutlich. Es ist auffallend, daß XII a schlechter mit Aminosäuren reagiert als XIV.

Die dargestellten *cis*-Diacetylderivate färben Asp, Met, His und Lys stärker als die entsprechenden *trans*-Isomeren. Die Intensitätsunterschiede nehmen in der Reihenfolge der genannten Aminosäuren ab.

Als Aminosäurereagentien möchten wir auf Grund dieser Untersuchungen nur *o*-Diacetylbenzol (I) und *vic.*-Triacetylbenzol (II) bezeichnen.

Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Verband der Chemischen Industrie* sei für die Förderung dieser Untersuchungen besten gedankt.

Experimenteller Teil

Farbmessung: Die Farbintensitäten der Aminosäurelösungen, deren pH auf 8,8 bis 8,9 eingestellt wurde, haben wir mit dem Colorimeter Elko III der Firma Carl Zeiß gemessen. Als Puffer diente Boraxlösung (10,1 g Borax auf 1 Liter Wasser). Der pH-Wert fällt in den meisten Fällen beim Auflösen der Aminosäuren unter 8,8 und wird durch KOH-Zugabe korrigiert. pH-Messungen mit dem pH-Meter 11/12 der Firma L. Pusl. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren: Zu 10 ml Aminosäurelösung, die zwischen 1 und 2 mg N/ml — bezogen auf die Aminogruppe — enthielten, wurde 1 ml methanol. Lösung der *o*-Diacetylverbindung, die zwischen 0,05 bis 0,2 molar sein konnte, gegeben. Nach Messen der Blindwerte wurde die Lösung 3 Stdn. bei 60° aufbewahrt. Nach einer Wartezeit von 1 Stde. bei Zimmertemp. wurden die Absorptionswerte das erste Mal gemessen. Nach weiteren 2, 1,5 und 15 Stdn. Reaktionszeit bei 60° wurden nach je halbstdg. Stehen bei Zimmertemp. wieder die Absorptionswerte gemessen. Die Reaktionszeit betrug dann insgesamt 21,5 Stdn.

Die auftretenden Farben variieren zwischen blau, violett, orange, gelb, braun und grün. Weitere Einzelheiten in den Aminosäure-Tabellen der 10. Mitt.⁵; ebenda auch die IR-Spektren der für diese Untersuchungen synthetisierten 20 *o*-Diacetylverbindungen.

cis-Diacetyläthylen

2,5-Dimethyl-2,5-dimethoxy-2,5-dihydrofuran: 21,5 ml (0,2 Mol) Dimethylfuran vom Sdp. 93—94° und 60 g Na₂CO₃ in 400 ml CH₃OH wurden unter Rühren bei —10° mit 10 ml (0,2 Mol) Brom, die in 50 ml CH₃OH gelöst waren, versetzt, dann 1 l gesätt. NaCl-Lösung hinzugegeben und mit Benzol extrahiert. Ausb. 65%, Sdp.₁₆ 59°, Sdp.₇: 35—37°.

15,8 g (0,1 Mol) 2,5-Dimethyl-2,5-dimethoxy-2,5-dihydrofuran vom Sdp.₁₆: 59° und 20 ml 1proz. Essigsäure wurden 20 Min. am Rückfluß ge-

⁵ Unveröffentlichtes Manuskript 1961, 80 Seiten.

kocht, anschließend sofort gekühlt, mit NaHCO_3 neutralisiert, mit NaCl gesättigt und mit CHCl_3 extrahiert: 9 g *cis*-Diacetyläthylen (80% d. Th.) vom Sdp._{0,6} 56—57°⁶.

cis-Diacetyläthylen ist eine äußerst empfindliche Substanz. Schon Spuren Säure lagern es in das *trans*-Isomere um. Auch beim Trocknen mit CaCl_2 und bei der Destillation im Wasserstrahlvak. bildet sich *trans*-Diacetyläthylen. Frisch hergestelltes *cis*-Isomeres wird am besten sofort zur Synthese verwendet, da es sich auch bei -20° nach mehreren Tagen umlagert. Obgleich *cis*-Diacetyläthylen, auf die Haut gebracht, diese schon nach wenigen Stdn. intensiv bräunt, färbt es bei 60—80° Aminosäuren nicht stärker als *trans*-Diacetyläthylen. Es ist anzunehmen, daß sich infolge der rel. hohen Reaktionstemp. das *cis*- in sein *trans*-Isomeres umgelagert hat. Für Farbreaktionen kommt Diacetyläthylen allerdings gar nicht in Betracht, da es eine alkalische Lösung schon ohne Aminosäuren merklich färbt.

Addukte aus *cis*-Diacetyläthylen und

a) Isopren: Vb

Molare Mengen wurden in Gegenwart von Tetrahydrofuran (THF) und wenig Hydrochinon im Bombenrohr 12 Stdn. auf 90° erhitzt: Ausb. 72% d. Th. Vb vom Sdp._{1,6} 95—100°, n_D^{20} : 1,527, beginnt sich schon nach einigen Stdn. zu zersetzen. Zum Vergleich Va: n_D^{20} : 1,501.

b) Cyclopentadien: *cis*-XII

Molare Mengen der Komponenten reagieren unter Erwärmung miteinander. Durch Kühlen wurde die Temp. unter 50° gehalten. Nach 4 Stdn. wurde der Kristallbrei in Petroläther aufgenommen. Ausb.: 90%. *cis*-XII schmilzt nach Umkristallisieren aus Petroläther bei 52°.

$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$ (178,2). Ber. C 74,1, H 7,9. Gef. C 73,9, H 8,1.

cis-XII ist bedeutend schwerer in Petroläther löslich als *trans*-XII.

trans-Diacetyläthylen¹

34 g (0,3 Mol) Acetylaceton wurden mit 20,5 g SeO_2 (krist.) in 600 ml Wasser 8 Stdn. unter Rühren auf 70—80° (Wasserbad) erwärmt. Schon nach kurzer Zeit begann die Selenausscheidung. Nach 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 braunes Diacetyläthylen in fester Form ausfiel. Die Suspension wurde mehrmals mit Äther extrahiert, die äther. Lösung mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und der Äther im Vak. abgezogen. Der ölige Rückstand wurde etwa eine Stde. in den Eisschrank gestellt, anschließend abgesaugt und aus Petroläther zweimal umkristallisiert. *trans*-Diacetyläthylen konnte in dieser Form gleich zur Synthese verwendet werden. Zur Reinigung wurden die gelben Nadeln in wenig Essigester gelöst und mit Petroläther bis zur eintretenden Kristallisation versetzt (weiße Nadeln): 7 g (22% d. Th.) vom Schmp. 79—80°.

Über die Umsetzung mit Butadien und Charakterisierung von *trans*-IV vgl. 4. Mitt. dieser Reihe¹.

⁶ Sdp.₁₆: 92° nach J. Levisalles, Bull. Soc. chim. France 1957, 997.

Addukte aus *trans*-Diacetyläthylen unda) *Hexadien-(2,4)*⁷: VII

Molare Mengen der Komponenten wurden in THF mit etwas Hydrochinon 20 Stdn. im Bombenrohr auf 110° erhitzt. Aus Essigester oder Petroläther farblose Nadeln vom Schmp. 80—81°. Ausb.: 75%.

C₁₂H₁₈O₂ (194,3). Ber. C 74,2, H 9,3. Gef. C 74,2, H 9,6.

b) *Butadien-(1,3)-1-carbonsäure-β-oxopropylester*: VIII

Im molaren Verhältnis 1:1 mit wenig Hydrochinon in THF im Bombenrohr bei 80°, 22 Stdn. Aus Essigester schieden sich nach längerer Zeit weiße Kristalle vom Schmp. 88° aus.

C₁₄H₁₈O₅ (266,3). Ber. C 63,1, H 6,8. Gef. C 62,8, H 6,9.

Butadien-(1,3)-1-carbonsäure-β-oxopropylester: 0,1 Mol butadiencarbonsaures Kalium⁸, etwa 0,1 g Hydrochinon und 100 ml Äthanol wurden in der Siedehitze mit 0,08 Mol 1-Chlor-aceton versetzt und 2 Stdn. auf dem Wasserbade gekocht. Das Lösungsmittel wurde im Vak. abgezogen und der Rückstand mit Äther extrahiert. Ausb.: 55%, Sdp.₁ 91—96°.

C₈H₁₀O₃ (154,2). Ber. C 62,3, H 6,5. Gef. H 62,1, H 6,4.

c) *Sorbinsäure-β-oxopropylester*: IX

Molare Mengen in THF im Rohr 12 Stdn. bei 115°. Das entstandene bräunliche Öl wurde mit Lignoïn mehrfach gekocht und nach Abziehen des Lignoïns aus Essigester z. T. kristallin erhalten: Schmp. 76—77°.

C₁₅H₂₀O₅ (280,3). Ber. C 64,3, H 7,2. Gef. C 63,7, H 7,1.

Sorbinsäure-β-oxopropylester: 0,1 Mol sorbinsaures K, 0,08 Mol 1-Chlor-aceton und 100 ml Äthanol wurden 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde mit Äther extrahiert und aus Petroläther umkristallisiert: 9,5 g farbloser Nadeln vom Schmp. 55°.

C₉H₁₂O₃ (168,2). Ber. C 64,3, H 7,2. Gef. C 63,9, H 7,1.

d) *Sorbinsäureäthylester*⁹: X

Molare Mengen wurden in THF 20 Stdn. auf 120° im Bombenrohr erhitzt. Ausb. 63,5%, Sdp._{1,3} 137—142°, *n*_D²⁰ 1,483.

C₁₄H₂₀O₄ (252,3). Ber. C 66,6, H 8,0. Gef. C 66,8, H 8,0.

e) *Chloropren*: XI

In THF mit wenig Hydrochinon im Bombenrohr bei 90° 20 Stdn. XI siedet bei 8 mm zwischen 130 und 135°. Ausb.: 70%.

C₁₀H₁₃ClO₂ (200,7). Ber. C 59,9, H 6,5, Cl 17,7.
Gef. C 59,4, H 6,1, Cl 18,6.

⁷ K. Alder und W. Vogt, Ann. Chem. **571**, 144 (1951).

⁸ H. Burton und Ch. K. Ingold, J. chem. Soc. [London] **1929**, 2028.

⁹ K. v. Auwers, J. prakt. Chem. [2] **105**, 375 (1910).

Analoge Versuche mit Benzol als Lösungsmittel verliefen negativ. Die wasserklare Flüssigkeit polymerisierte sich innerhalb weniger Wochen, auch im Eisschrank.

f) *Cyclopentadien*

In spontaner Reaktion: *trans*-XII. Ausb.: 91%, Sdp.₁₂ 130—135°, Schmp. 44—45°¹⁰.

g) *Cyclopentadien-1-carbonsäuremethylester im Rohr bei 130°: XIII*

Reaktionszeit 20 Stdn. Das gelbe Öl konnte unter teilweiser Zersetzung destilliert werden und kristallisierte erst nach längerer Zeit aus Essigester bei —20°. Ausb.: 80% Öl vom Sdp.₁ 143—150°; Schmp. 69—70°.

C₁₃H₁₆O₄ (236,3). Ber. C 66,1, H 6,8. Gef. C 65,8, H 7,0.

h) *Acetoxybutadien: III*

24stdg. Erhitzen der Komponenten in Alkohol auf 85°. Nach Vakuumdestillation: n_D^{20} 1,4855.

Die Umsetzung von Acetoxybutadien vom Sdp.₁₄ 44—47° mit *cis*-Diäcetyläthylen liefert ebenfalls III. Die IR-Spektren der beiden III-Präparate sind identisch: *trans*-III.

Weitere Versuchsbeschreibungen in der 10. Mitt. dieser Reihe⁵.

¹⁰ 52° nach G. O. Schenk, Ber. dtsh. chem. Ges. **77**, 741 (1944).