

Neue Reagentien zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren, 4. Mitt.:

Zur Chemie der „Ninhydrin-Reaktion“

Von

Helga Wittmann, W. Dreveny und E. Ziegler

Aus dem Institut für Organische und Pharmazeutische Chemie
der Universität Graz

(Eingegangen am 14. März 1968)

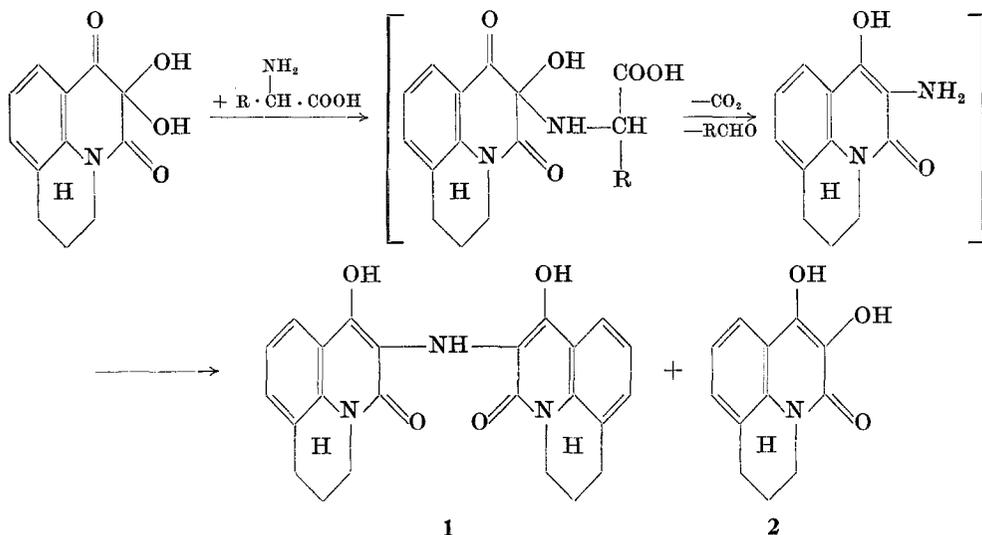
Es wird gezeigt, daß bei der Umsetzung von vic. Triketoverbindungen mit Aminosäuren („Ninhydrin-Reaktion“) intermediär die entsprechende Aminoverbindung, als wichtige Komponente für die Farbstoffbildung, entsteht. Die Reaktion von Aminosäuren mit 1,8-Trimethylen-chinisatinhydrat (*TMCH*) in Gegenwart von Eisessig/*Ac*₂O führt zum 3-Acetamido-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl (5).

A study of the reaction of vic. trioxo compounds with amino acids (ninhydrin reaction) shows that the corresponding amino compound is the important intermediate of dye formation. The reaction of amino acids with 1,8-trimethylene-quinisatinhydrate (*TMCH*) in the presence of acetic acid and acetic anhydride yields 3-acetamido-4-hydroxy-1,8-trimethylene-carbostyryl (5).

Von *McCaldin*¹ ist vor einigen Jahren ein Reaktionsmechanismus für die „Ninhydrin-Reaktion“ aufgezeigt worden, der als ersten Schritt bei der Umsetzung von Ninhydrin mit Aminosäuren die Bildung eines Halbaminals aus den Ausgangsverbindungen vorschlägt. In weiterer Folge soll ein durch CO₂- und H₂O-Abspaltung aus diesem Halbaminale gebildetes Azomethin schließlich in 1-Hydroxy-2-amino-3-oxoinden übergehen, welches die eigentliche Schlüsselsubstanz für die Farbstoffbildung darstellt.

¹ *D. J. McCaldin*, Chem. Reviews **60**, 39 (1960).

Wie in der 3. Mitt. dieser Serie² gezeigt werden konnte, kommt auf Grund eigener Untersuchungen über das Verhalten von 1,8-Trimethylenchinisatin-hydrat (*TMCH*) gegenüber Aminosäuren diesem von *McCaldin*¹ postulierten Reaktionsablauf große Wahrscheinlichkeit zu. Die Umsetzung von *TMCH* mit Aminosäuren führt im neutralen Milieu in jedem Fall zum farblosen Bis-(2-oxo-4-hydroxy-1,8-trimethylen-1,2-dihydro-3-chinolinyl)-amin (**1**), welches nach unseren Beobachtungen als Vorstufe der dem „Ninhydrinfarbstoff“ analogen farbigen Verbindung angesehen werden kann. Die Auffindung von **1** ergäbe sich zwanglos aus einem zwischenzeitlich gebildeten 2-Oxo-3-amino-4-hydroxy-1,8-trimethylen-1,2-dihydrochinolin, welches über das entsprechende Halbaminale bei der Reaktion von *TMCH* mit Aminosäure entstehen müßte. Als letzte experimentelle Stütze wäre es daher wichtig, die Existenz der genannten 3-Aminoverbindung zu beweisen.



Der einfachste Weg, zu der gesuchten Aminoverbindung zu gelangen, wäre die katal. Hydrierung geeigneter Ausgangssubstanzen. Versuche, durch Reduktion des 3-Nitro- bzw. 3-Phenylazoderivates von 4-Hydroxy-1,8-trimethylen-carbostyryl (**3** bzw. **4**) die gewünschte 3-Aminoverbindung zu synthetisieren, schlugen allerdings fehl.

Schon *Gabriel*³ sowie *v. Baeyer* und *Homolka*⁴ haben am 3-Nitro-2,4-dioxochinolin bzw. am entsprechenden Oxim Reduktionsversuche angestellt,

² H. Wittmann, W. Dreveny und E. Ziegler, Mh. Chem. **99**, 1205 (1968).

³ S. Gabriel, Ber. dtsch. chem. Ges. **51**, 1500 (1918).

⁴ A. v. Baeyer und B. Homolka, Ber. dtsch. chem. Ges. **16**, 2218 (1883).

dabei aber in keinem Fall die 3-Aminoverbindung, sondern immer nur das Redukton erhalten können. Ähnliche Beobachtungen sind auch von anderen Forschern⁵ bei analogen Versuchen gemacht worden.

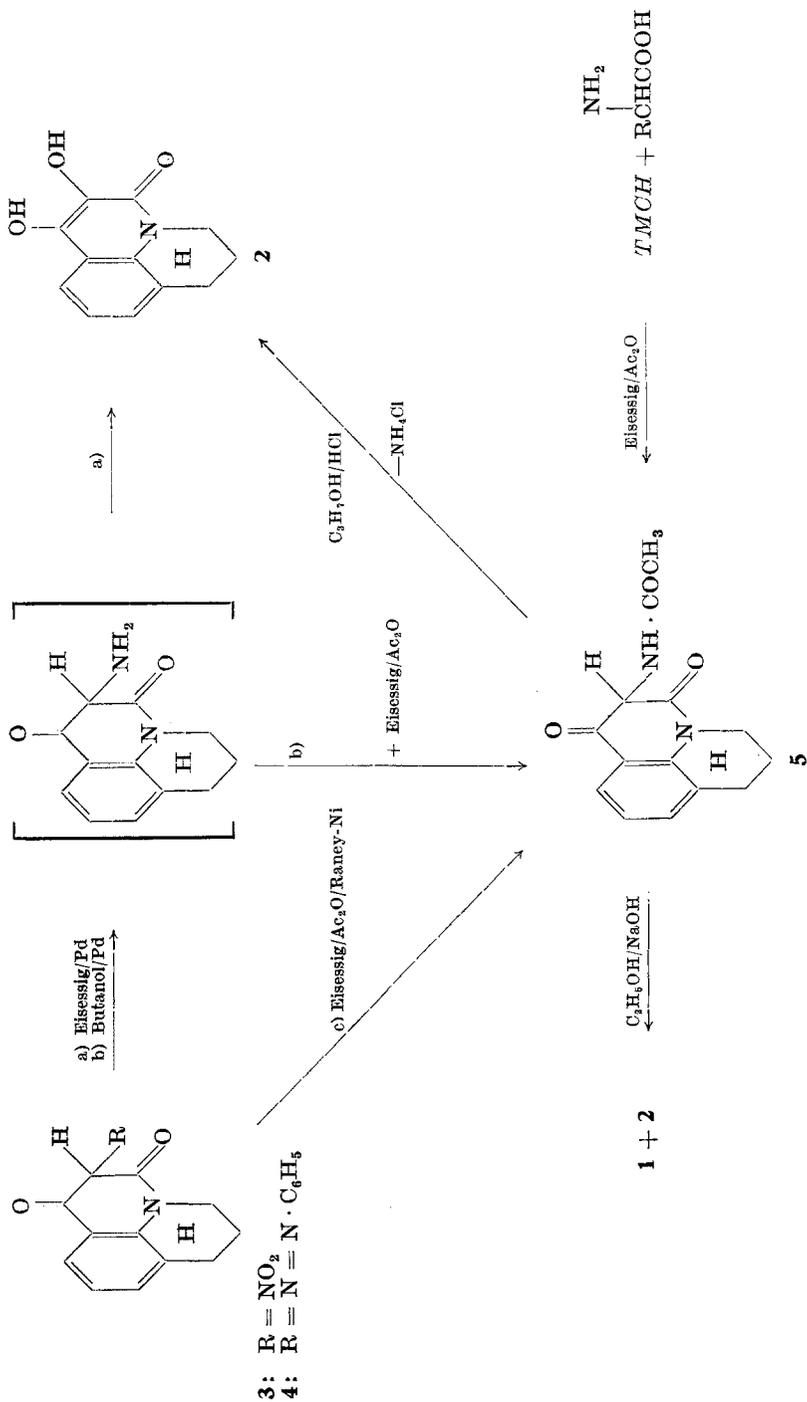
Auch bei der Hydrierung von 3-Nitro-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl⁶ (3) in Eisessig mit Pd/Kohle als Katalysator resultiert in guten Ausbeuten (79% d. Th.) 3,4-Dihydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl² (2). Ebenfalls zum Redukton 2 (96% d. Th.) gelangt man beim Einsatz von 3-Phenylazo-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl (4).

Auf Grund der Versuchsanordnung und der bisherigen experimentellen Befunde² ist wohl der Schluß zulässig, daß 2 nur aus der gesuchten 3-Aminoverbindung entstanden sein kann, welche in Substanz nicht faßbar ist. Einen deutlichen Hinweis auf die Unbeständigkeit des 3-Amino-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyryls geben Hydrierungsversuche von 3 und 4 in butanolischer Lösung an Pd/Kohle. Hier zeigt sich, daß nach Aufnahme der zur Bildung der Aminoverbindung nötigen H₂-Menge ein farbloses Produkt anfällt, welches sich beim Absaugen an der Luft, wie auch das Filtrat, alsbald blau färbt. Diese Tatsache ließe den Schluß zu, daß wohl die gewünschte Zwischenstufe vorgelegen sein muß, welche aber sofort zum Farbstoff weiterreagiert, wie nachstehende Beobachtung erhärtet. Trägt man die bei der Hydrierung in Butanol isolierte Verbindung sofort in eine Mischung von Eisessig und Acetanhydrid ein und beläßt einige Zeit bei 20°, so erhält man ein Produkt, welches auf Grund der Elementaranalyse sowie des IR-Spektrums als 3-Acetamido-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl (5) erkannt worden ist. Ebenfalls zu 5 gelangt man, wenn die Hydrierung von 3 bzw. 4 von vornherein in Essigsäureanhydrid/Eisessig mit Raney-Ni als Katalysator vorgenommen wird.

Wie diese Versuchsergebnisse zeigen, ist die Erbringung des Beweises für das intermediäre Entstehen der 3-Aminoverbindung bei der „Ninhydrin-Reaktion“ auf Grund ihrer Unbeständigkeit nur indirekt möglich. Die Verseifung des 3-Acetylamids 5 in Äthanol/NaOH führt in 39proz. Ausb. zum Bis-amin 1, daneben isoliert man 60% d. Th. an Redukton 2. Mit verd. HCl in Propanol entsteht aus 5 quantitativ 2, neben NH₄Cl. Das Auftreten des Amins als Zwischenprodukt bei der „Ninhydrin-Reaktion“ wird noch durch einen weiteren Befund erhärtet. Nimmt man die Umsetzung von Aminosäuren mit *TMCH* in einem Gemisch von Eisessig/Essigsäureanhydrid vor, beobachtet man zunächst CO₂-Entwicklung. Bringt man die Reaktionslösung auf eine Dünnschichtplatte und läßt parallel dazu das N-Acetylderivat 5 laufen, so ist 3-Acetamido-4-

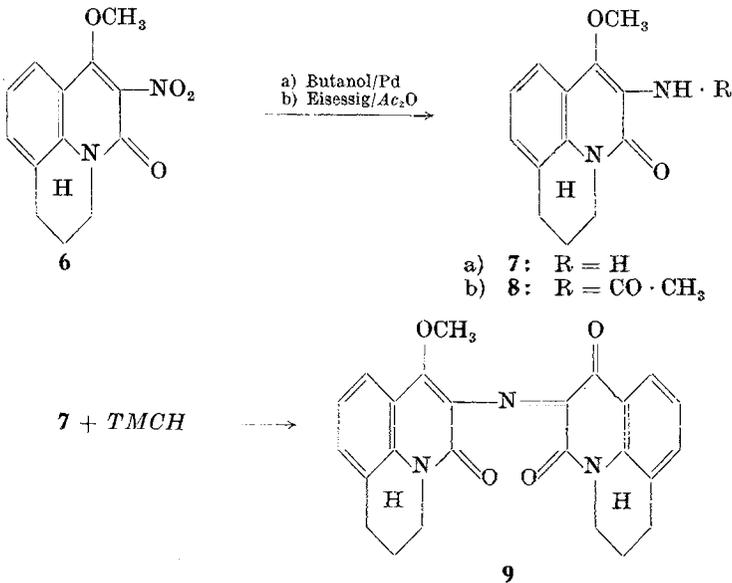
⁵ O. Piloty und K. Finckh, Ann. Chem. **333**, 22 (1904); S. Ruhemann, J. Chem. Soc. [London] **99**, 1486 (1911).

⁶ E. Ziegler und Th. Kappe, Mh. Chem. **95**, 59 (1964).

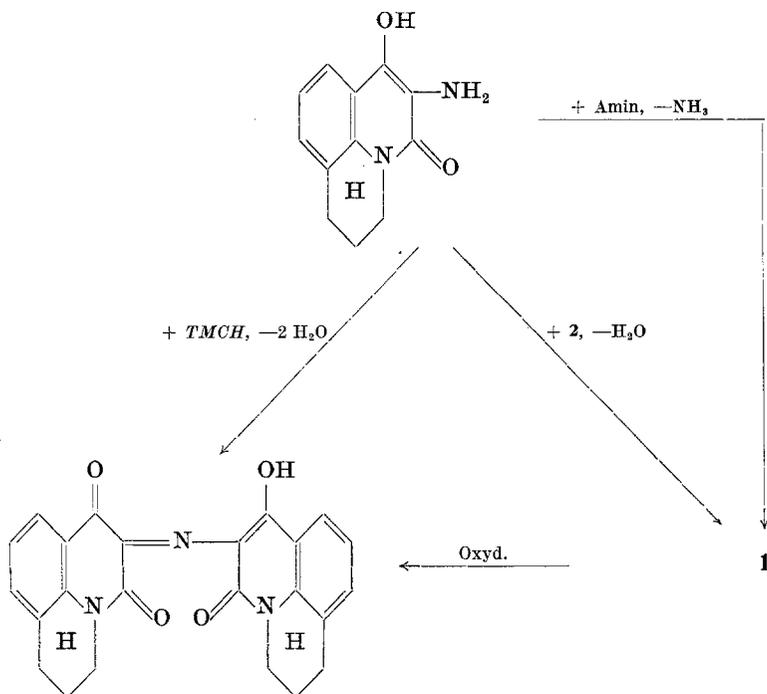


hydroxy-1,8-trimethylen carbostyryl (5) eindeutig im Reaktionsgemisch nachweisbar. Als Aminosäuren sind Alanin, Phenylalanin, Glycin und Leucin eingesetzt worden.

Da die Reaktivität der freien Aminoverbindung sicherlich weitgehend auf den Einfluß der beiden benachbarten Carbonylgruppen und auf die Tautomeriemöglichkeit des Protons in 3-Stellung zurückzuführen ist, sind weitere Untersuchungen mit dem O-Methyläther des 3-Nitro-4-hydroxy-1,8-trimethylen carbostyryls 6 vorgenommen worden. Hier war zu erwarten, daß die entsprechende Aminoverbindung hinlänglich beständig sein müßte, weil in 6 die Enolstruktur fixiert ist. Tatsächlich erhält man bei der Hydrierung von 6 in Butanol mit Pd/Kohle als Katalysator einerseits in 86proz. Ausb. 4-Methoxy-3-amino-1,8-trimethylen carbostyryl (7) und andererseits in Essigsäureanhydrid/Eisessig die 3-Acetamido-Verbindung 8.



Das freie Amin 7 erweist sich als sehr beständig gegen verdünnte Säuren und Alkalien. Ein Austausch der NH₂- gegen die OH-Gruppe kann hier nicht mehr beobachtet werden. Beim Erhitzen von 7 mit *TMCH* in Toluol entsteht, wie Analyse und IR-Spektrum beweisen, der dem „Ninhydrinfarbstoff“ analoge O-Methyläther, nämlich 2-Oxo-4-methoxy-1,8-trimethylen-3-(2,4-dioxo-1,8-trimethylen-chinolylden)-aminochinolin (9), in 60proz. Ausbeute. Versuche, den Amino-O-methyläther 7 mit Redukton 2 zu kondensieren, sind erfolglos verlaufen, was aber nicht besagt, daß diese Reaktion mit dem hypothetischen 3-Amino-4-hydroxy-1,8-trimethylen carbostyryl nicht doch möglich wäre.



Auf Grund der vorliegenden experimentellen Befunde ist das Auftreten einer Amin-Zwischenstufe bei der „Ninhydrin-Reaktion“ wohl hinlänglich bewiesen. Weiteren Untersuchungen bleibt es vorbehalten zu zeigen, welcher der drei vorgeschlagenen Wege von dieser Aminverbindung aus zum Farbstoff führt.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der J. R. Geigy AG, Basel, durchgeführt, für die wir danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Sterk, am hiesigen Institut, für die Aufnahme und Interpretation der IR-Spektren.

Experimenteller Teil

1. 3-Phenylazo-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyril (4)

2 g α -Oxo- γ -hydroxy-julolin werden in 100 ml 10proz. Na_2CO_3 -Lösung mit der äquivalenten Menge Benzoldiazoniumchlorid-Lösung bei 0° gekuppelt. Orange Spieße aus Propanol vom Schmp. 228°. Ausb. 2,1 g (70% d. Th.).

$C_{18}H_{15}N_3O_2$. Ber. N 13,76. Gef. N 13,32.

2. 3-Acetamido-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyril (5)

a) Aus 3-Nitro-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyril⁶ (3)

Man löst 1 g 3 in einem Gemisch von 50 ml Ac_2O und 70 ml Eisessig bei etwa 50° und hydriert unter Zugabe von 0,3 g Raney-Ni bis zur Beendigung

der H₂-Aufnahme. Aus dem eingeengten Filtrat resultieren farblose Kristalle, die aus Butanol umkristallisiert werden. Schmp. 216°. Ausb. 1 g (84% d. Th.).

C₁₄H₁₄N₂O₃. Ber. N 10,85. Gef. N 11,09.

b) *Aus 3-Phenylazo-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl (4)*

Analog a). 1 g **4** in 40 ml Ac₂O und 60 ml Eisessig. Ausb. 0,85 g (94% d. Th.).

c) *Aus 3-Amino-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl*

0,5 g **3** bzw. 0,5 g **4** werden in 150 ml Butanol heiß gelöst und nach dem Erkalten unter Zugabe von 0,4 g 5proz. Pd auf Aktivkohle bis zur beendeten H₂-Aufnahme hydriert. Man saugt rasch ab, trägt, ohne vom Katalysator zu trennen, das erhaltene 3-Amino-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl in eine Mischung von 5 ml Eisessig mit 5 ml Ac₂O ein und beläßt 12 Stdn. bei 20°. Danach erhitzt man kurz zum Sieden und filtriert vom Katalysator ab. Die Reinigung erfolgt wie unter a). Ausb. 0,4 g (78% d. Th.) aus **3** bzw. 0,35 g (98% d. Th.) aus **4**.

d) *Nachweis von 5 im Reaktionsgemisch aus TMCH und Aminosäuren*

Zu einer heißen Lösung von 0,2 g *TMCH* in 5 ml Eisessig und 5 ml Ac₂O fügt man 0,2 g Aminosäure und erhitzt 1—2 Min., bis unter CO₂-Entwicklung Entfärbung eintritt. Eine Probe aus dem Reaktionsgemisch und 3-Acetamido-4-hydroxy-carbostyryl (**5**) als Standard werden in 3 verschiedenen Laufmitteln dünn-schichtchromatographisch an Kieselgel G nach *Stahl* geprüft (Benzol/Eisessig = 3 : 1, Essigester/Methanol = 98 : 2 und CHCl₃/Aceton = 7 : 3). In allen drei Fällen ist **5** eindeutig im Reaktionsgemisch aus *TMCH* und Aminosäure nachweisbar.

3. *Hydrolyse von 3-Acetamido-4-hydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl (5)*

a) *Sauer*

Man löst 0,5 g **5** in 35 ml Propanol, versetzt mit 6 ml konz. HCl und erhitzt 1 Stde. am Rückfluß. Beim Erkalten fällt nach Zugabe von 10 ml H₂O 2-Oxo-3,4-dihydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl² (**2**) in 91proz. Ausb. an und wird aus Eisessig gereinigt. Schmp. 228°. Im Filtrat ist NH₄Cl nachweisbar.

b) *Alkalisch*

0,5 g **5** werden in einem Gemisch von 10 ml Äthanol und 20 ml 20proz. NaOH 3 Stdn. im Sieden gehalten, hierauf mit 10 ml H₂O versetzt und mit verd. H₂SO₄ neutralisiert. Man saugt nach 1 Stde. ab und kocht das Produkt mit ca. 5 ml Eisessig aus. Als Rückstand verbleibt 0,1 g (39% d. Th.) Bisamin² **1** vom Schmp. 265°. Aus dem eingeengten Filtrat werden noch 0,3 g (60% d. Th.) an Redukton² **2** isoliert.

4. *3,4-Dihydroxy-1,8-trimethylencarbostyryl² (2)*

0,5 g **3** bzw. 0,5 g **4** werden in 50—70 ml heißem Eisessig gelöst und nach dem Erkalten mit 0,3 g 5proz. Pd auf Aktivkohle bis zur beendeten H₂-Aufnahme hydriert. Aus dem eingeengten Filtrat resultieren 0,4 g (79% d. Th.) **2** aus **3** bzw. 0,35 g (96% d. Th.) **2** aus **4** vom Schmp. 228°.

5. 3-Nitro-4-methoxy-1,8-trimethylencarbostyryl (6)

Man löst 4 g **3** in 500 ml heißem Toluol, fügt nach dem Erkalten eine benzol. Diazomethanlösung (aus 7 g Nitrosomethylharnstoff) hinzu und beläßt bis zur Beendigung der N₂-Entwicklung. **6** fällt beim Einengen aus und wird aus Butanol in blaßgelben Platten vom Schmp. 207° gewonnen. Ausb. 4 g (94% d. Th.).

C₁₃H₁₂N₂O₄. Ber. N 10,77. Gef. N 10,71.

6. 3-Amino-4-methoxy-1,8-trimethylencarbostyryl (7)

1 g **6** wird in 100 ml heißem Butanol gelöst, nach dem Erkalten mit 5proz. Pd auf Aktivkohle hydriert, nach beendeter H₂-Aufnahme filtriert und zur Trockene gebracht. Aus wenig Äthanol blaßgelbe Blättchen vom Schmp. 151°. Ausb. 0,8 g (86% d. Th.).

C₁₃H₁₄N₂O₂. Ber. N 12,17. Gef. N 12,06.

7. 3-Acetamido-4-methoxy-1,8-trimethylencarbostyryl (8)

Man löst 1 g **6** in der Hitze in einem Gemisch von 35 ml Ac₂O und 40 ml Eisessig und hydriert die erkaltete Lösung mit 0,4 g Raney-Ni bis zur Beendigung der H₂-Aufnahme. Das Filtrat wird zur Trockene gebracht und mit Äthanol angerieben. Farblose Prismen aus Wasser vom Schmp. 185—186°. Ausb. 1 g (94% d. Th.).

C₁₅H₁₆N₂O₃. Ber. N 10,29. Gef. N 10,26.

8. 2-Oxo-4-methoxy-1,8-trimethylen-3-(2,4-dioxo-1,8-trimethylen-chinoliden)-aminochinolin (9)

Zu einer heißen Lösung von 1 g *TMCH* in 100 ml Toluol und 3 Tr. Eisessig fügt man 1 g **7** hinzu, erhitzt 2 Stdn. am Rückfluß und entfernt dabei das bei der Reaktion gebildete H₂O mittels Wasserabscheider. **9** wird abgeseugt, zur Reinigung in warmem *DMF* gelöst und am Wasserbad langsam eindunsten gelassen, wobei sich gelbe Kristalle vom Schmp. 216° (u. Zers.) abscheiden. Ausb. 1,1 g (60% d. Th.).

C₂₅H₂₁N₃O₄. Ber. C 70,25, H 4,95, N 9,83.
Gef. C 69,75, H 4,95, N 9,87.

IR-Spektrum in KBr: 1660/cm C=O
1640/cm C=O, C=N gekopp.