

## Neue Reagentien zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren, 5. Mitt.:

Reaktionen des 1,2,3-Trioxo-2,3-dihydrophenalens mit primären Aminoverbindungen

Von

Helga Wittmann, Alfred K. Müller und E. Ziegler

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Graz

(Eingegangen am 14. Oktober 1968)

Es ist gelungen, mit dem, dem Ninhydrin analog gebauten 1,2,3-Trioxo-2,3-dihydrophenalen (**1**), den Mechanismus der „Ninhydrinreaktion“ aufzuklären.

*New Reagents for the Detection of Amino Acids by Paper Chromatography, V.: Reaction of 1.2.3-Trioxo-2.3-dihydrophenalene with Primary Amines*

The mechanism of the „ninhydrin reaction“ has been established using 1.2.3-trioxo-2.3-dihydro-phenalen (**1**) as a model compound.

Wie in den beiden vorangegangenen Mitteilungen dieser Serie<sup>1, 2</sup> gezeigt worden ist, läßt sich mit Hilfe von „1,8-Trimethylenchinasatinyhydrat“ (*TMCH*) als Modellsubstanz der von *McCaldin*<sup>3</sup> vorgeschlagene Mechanismus für die „Ninhydrinreaktion“ weitgehend beweisen. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß als wichtige Komponente intermediär eine nicht faßbare Aminoverbindung entsteht, welche als wesentliches Zwischenprodukt der Farbstoffbildung erkannt worden ist. Allerdings war es nicht möglich, den letzten Schritt der Reaktion klarzustellen. *McCaldin*<sup>3</sup> ist der Ansicht, daß im Falle des Ninhydrins intermediär ge-

<sup>1</sup> Helga Wittmann, W. Dreveny und E. Ziegler, *Mh. Chem.* **99**, 1205 (1968).

<sup>2</sup> Helga Wittmann, W. Dreveny und E. Ziegler, *Mh. Chem.* **99**, 1543 (1968).

<sup>3</sup> D. J. McCaldin, *Chem. Rev.* **60**, 39 (1960).

bildetes 1-Hydroxy-2-amino-3-oxo-inden mit noch nicht umgesetzter Triketoverbindung unter Wasserabspaltung den Farbstoff ergibt.

Auf Grund der erwähnten experimentellen Befunde<sup>1, 2</sup> am *TMCH* lassen sich für die Bildung des eigentlichen „Ninhydrinfarbstoffes“, vom hypothetischen „2-Oxo-3-amino-4-hydroxy-1,8-trimethylen-1,2-dihydrochinolin“ ausgehend, 3 Reaktionswege vorschlagen:

1. Die Aminzwischenstufe kondensiert sich mit nicht umgesetzter Triketoverbindung zum Farbstoff.

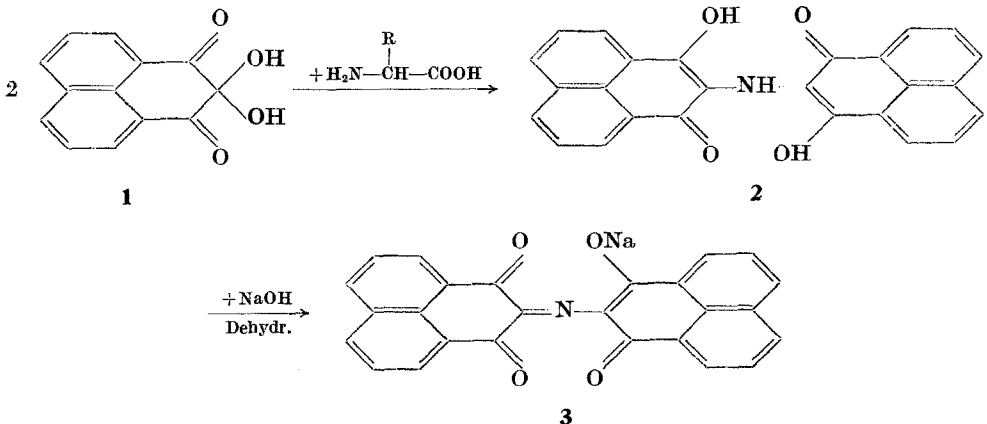
2. Die Aminzwischenstufe bildet mit sich selbst unter  $\text{NH}_3$ -Austritt und nachfolgender Dehydrierung den Farbstoff.

3. Die Aminzwischenstufe reagiert mit dem entsprechenden Redukton unter Wasserabspaltung.

Weitere Untersuchungen über die Eignung von vic. Triketoverbindungen zur „Ninhydrinreaktion“ haben gezeigt, daß sich auch das 1,2,3-Trioxo-2,3-dihydro-phenalen (Perinaphthindantrion) (**1**) zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren eignet. Alanin läßt sich z. B. noch in Mengen unter 1  $\gamma$  durch Besprühen mit einer 0,2proz. alkohol. Lösung von **1** deutlich am Papierchromatogramm nachweisen.

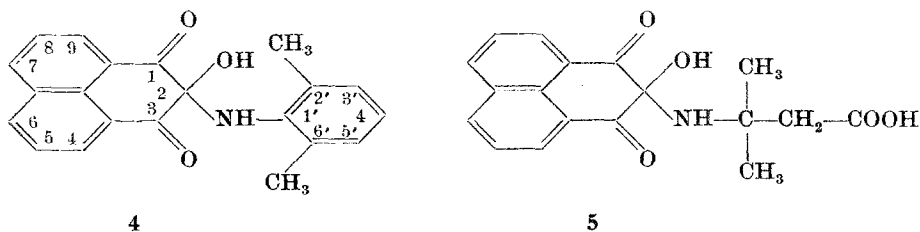
Bei der Umsetzung von Perinaphthindantrion-hydrat (**1**) mit  $\alpha$ -Aminosäuren kann man ebenso wie bei *TMCH*<sup>1</sup> die Vorstufe des eigentlichen Farbstoffes, das Bis-(3-hydroxy-1-oxo-phenalen-2-yl)-amin (**2**) isolieren. Durch Behandeln mit methanolischem Alkali läßt sich auch hier das Bisamin **2** in das Farbsalz **3** überführen. Dieses hat, wie schon beim *TMCH*<sup>1</sup> gezeigt worden ist, eine dem „Ruhemann-Purpur“ analoge Konstitution und ist identisch mit jenem Farbstoff, der am Papierchromatogramm durch Besprühen mit **1** aus Aminosäuren entsteht.

Genauso wie beim Murexid und allen anderen analog gebauten Farbsalzen, ist auch die freie Säure von **3** nicht isolierbar. Schon beim vorsichtigen Be-



handeln einer wäßr. Lösung des Na-Salzes **3** mit verd. Säuren tritt Zersetzung ein.

Obwohl die Bildung des Bisamins **2** über ein Halbaminale als erste Zwischenstufe durch frühere Untersuchungen<sup>1</sup> gesichert werden konnte, ist dies auch noch am 1,2,3-Trioxo-2,3-dihydro-phenalen-hydrat (**1**) durch Umsetzung mit 2,6-Dimethylanilin und vor allem mit  $\beta$ -Aminoisovaleriansäure gezeigt worden. Bei beiden genannten Verbindungen ist die Bildung eines Azomethins aus dem primär entstehenden Halbaminale infolge des Fehlens eines Protons in  $\alpha$ -Stellung zur  $\text{NH}_2$ -Gruppe nicht mehr möglich. Die Reaktion bleibt daher auf der Stufe des Halbaminale stehen, wie die Isolierung von **4** und **5** beweist.



Wie die experimentellen Befunde zeigen, reagiert **1** mit Aminoverbindungen weitgehend analog dem *TMCH*. Besonders wertvoll ist uns **1** aber deshalb, weil das bereits bekannte 2-Amino-3-hydroxy-1-oxo-phenalen<sup>4</sup> (**6**) die für die „Ninhydrinreaktion“ postulierte Aminzwischenstufe darstellt.

Die Struktur von **6**, welche aus der Bildungsweise<sup>4</sup> nicht unbedingt bewiesen scheint, konnte in einer jüngst erschienenen Arbeit von *Eistert*<sup>5</sup> durch eine neue Synthese sowie auf Grund der IR-spektroskopischen Daten gesichert werden.

Um nun aber eine Entscheidung darüber zu treffen, auf welchem der drei vorgeschlagenen Wege<sup>2</sup> die Farbstoff-(**3**)- bzw. Bisamin-(**2**)-bildung, ausgehend von **6**, tatsächlich vor sich geht, sind die drei Möglichkeiten experimentell nachgeprüft worden. Dabei wurden dieselben Reaktionsbedingungen eingehalten, unter denen auch sonst die Farbstoffbildung erfolgt ist.

Auf Grund des von *McCaldin*<sup>3</sup> postulierten Reaktionsmechanismus ist zunächst versucht worden, das Amin **6** mit der Triketoverbindung **1** in wäßrig-alkohol. Lösung zur Reaktion zu bringen. Dabei hat sich gezeigt, daß auch nach mehrstündigem Erhitzen keine Reaktion eintritt; man erhält vielmehr die Ausgangsverbindungen zurück. Auch bei Anwendung höhersiedender Lösungs-

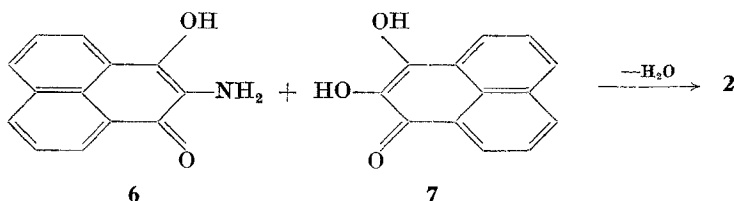
<sup>4</sup> G. Errera, Gazz. chim. ital. **43**, I, 583 (1913), **44**, II, 18 (1914).

<sup>5</sup> B. Eistert, W. Eifler und H. Göth, Chem. Ber. **101**, 2162 (1968).

mittel, wie z. B. Toluol oder Xylol, führt die Umsetzung nicht zum erwarteten Farbstoff **3**; es läßt sich lediglich eine Verbindung der Bruttoformel  $C_{39}H_{19}NO_7$  isolieren, deren Struktur noch nicht genau ermittelt werden konnte.

Ebenso ist der unter 2. postulierte Reaktionsweg, die Bildung des Bisamins **2** durch Kondensation der Aminoverbindung **6** zu bewirken, selbst bei Anwendung hochsiedender Lösungsmittel nicht realisierbar. Auch hier wird unverändertes **6** zurückerhalten.

Dagegen reagiert **6** mit dem Redukton **7** schon in 70proz. Äthanol in guten Ausbeuten (63% d. Th.) zum Bisamin **2**.



Damit ist eindeutig gezeigt, daß der letzte Schritt der „Ninhydrinreaktion“ in der Kondensation der intermediär entstehenden Aminoverbindung **6** mit gleichzeitig gebildetem Redukton **7**<sup>1, 2</sup> und nicht, wie *McCaldin*<sup>3</sup> vorschlägt, mit unveränderter Triketoverbindung besteht.

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

Ferner danken wir Herrn Dr. *H. Sterk* vom hiesigen Institut für Aufnahme und Interpretation der IR- und NMR-Spektren.

### Experimenteller Teil

#### 1. 1,2,3-Trioxo-2,3-dihydro-phenalen-hydrat (**1**) (verbesserte Methode<sup>6, 7</sup>)

##### a) 2,2-Dimorpholino-1,3-dioxo-2,3-dihydro-phenalen

15 g 2,2-Dichlor-1,3-dioxo-2,3-dihydro-phenalen<sup>5</sup> werden in 70 ml Dimethylformamid gelöst, auf 0° gekühlt und 30 ml Morpholin zugefügt. Die Temperatur steigt dabei auf ungefähr 40° an und Morpholin · HCl scheidet sich in Form langer Nadeln ab. Nach etwa 2 Stdn. tropft man unter Rühren bei 0° 200 ml H<sub>2</sub>O zu, wobei das gelbe 2,2-Dimorpholino-1,3-dioxo-2,3-dihydro-phenalen kristallin anfällt, welches zur Weiterverarbeitung bereits genügend rein ist. Nadeln aus Methanol, die bei etwa 154° schmelzen (u. Zers.). Ausb. 19 g (92% d. Th.).



##### b) 1,2,3-Trioxo-2,3-dihydro-phenalen-hydrat (**1**)

Man löst 15 g 2,2-Dimorpholino-1,3-dioxo-2,3-dihydro-phenalen in 200 ml H<sub>2</sub>O und 70 ml konz. HCl und erwärmt 2—3 Min. auf 80°. Das beim Ab-

<sup>6</sup> *Th. Kappe, Erika Lender und E. Ziegler*, Mh. Chem. **99**, 990 (1968).

<sup>7</sup> *Th. Kappe, Erika Lender und E. Ziegler*, Mh. Chem. **99**, 2157 (1968).

kühlen ausfallende **1** wird aus sehr verd. Essigsäure umkristallisiert. Ausb. 7,6 g (81% d. Th.) hellrote Prismen, die bei 130° unter Dunkelrotfärbung Wasser abspalten und bei 270—273° (u. Zers.) schmelzen; (Lit.<sup>4</sup> 273°).

## 2. *Bis-(3-hydroxy-1-oxo-phenalen-2-yl)-amin (2)*

### a) *Aus 1 und Aminosäuren*

3 g **1** werden in 120 ml Äthanol in der Wärme gelöst und 1,2 g Alanin in 50 ml H<sub>2</sub>O zugegeben. Man erhitzt 2 Stdn. am sied. Wasserbad und saugt nach dem Erkalten **2** ab. Hellbraune Nadeln aus Chlorbenzol—Äthanol (1 : 1), Schmp. > 310°; Ausb. 1,5 g (56% d. Th.).

C<sub>26</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>. Ber. N 3,45. Gef. N 3,52.

IR-Spektrum in KBr: 3000—2600/cm ..... NH, OH  
 1630/cm ..... CO  
 1570/cm, 1540/cm ..... CO—HO assoz. und  
 C=C

Beim Ansäuern der Mutterlauge erhält man 0,6 g Redukton **7**.

### b) *Aus der Aminoverbindung 6 und Redukton 7*

Man suspendiert 0,5 g fein gepulv. **6** in 150 ml 70proz. Äthanol und setzt eine heiße Lösung von 0,5 g **7** in 100 ml 70proz. Äthanol zu. Es wird 3 Stdn. am Rückfluß erhitzt, wobei **2** in 63proz. Ausbeute anfällt.

## 3. *Farbsalz 3*

0,2 g **2** werden mit 40 ml Methanol und 2 ml *n*-NaOH versetzt, wobei nach kurzem Schütteln intensive Blaufärbung auftritt. Man bringt in einer Porzellanschale am Wasserbad zur Trockene und wäscht den Rückstand mit warmem Methanol und H<sub>2</sub>O; Ausb. 0,1 g (48% d. Th.).

C<sub>26</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub>Na. Ber. Na 5,41. Gef. Na 5,89.

IR-Spektrum in KBr: 1630/cm ..... CO  
 1600/cm }  
 1570/cm } ..... C=C und Aromat  
 1520/cm }  
 1280/cm ..... O—Na

## 4. *2-(2',6'-Dimethylanilino)-2-hydroxy-1,3-dioxo-2,3-dihydro-phenalen (4)*

Zu einer heißen Lösung von 1 g **1** in 50 ml Äthanol fügt man 0,7 ml 2,6-Dimethylanilin und erhitzt 2 Stdn. am sied. Wasserbad, wobei Dunkelfärbung auftritt. Nach dem Einengen des Reaktionsgemisches erhält man 0,8 g (55% d. Th.) **4**, welches vorsichtig mit Alkohol gewaschen wird. Aus Chlorbenzol gelbbraune Prismen vom Schmp. 248—250° (u. Zers.).

C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>. Ber. C 76,12, H 5,17, N 4,23.  
 Gef. C 75,91, H 5,27, N 4,36.

IR-Spektrum in KBr: 3200/cm ..... NH, OH  
 1710/cm ..... } C=O  
 1680/cm ..... } C=O  
 1630/cm ..... } C=O—HO  
 1610/cm ..... } C=O—HN assoz.

NMR in  $\text{CF}_3\text{COOH}$  ( $\delta$  in ppm):

2,2	.....	— $\text{CH}_3$
7,0 (M)	.....	$\text{H}_{3',4',5'}$
7,8 (M)	.....	$\text{H}_{5,8}$
8,3 (M)	.....	$\text{H}_{4,6,7,9}$

5. *N*-2-(2-Hydroxy-1,3-dioxo-2,3-dihydro-phenalenyl)- $\beta$ -amino-isovaleriansäure (5)

1 g **1** wird in 30 ml heißem Äthanol gelöst und mit einer ebenfalls heißen Lösung von 0,6 g  $\beta$ -Amino-isovaleriansäure in 60 ml Äthanol versetzt. Man rührt noch 2 Stdn. bei 20° und erhält 1,3 g (90% d. Th.) an **5**. Das Produkt kann nicht umkristallisiert werden und wird zur Reinigung nur mit warmem Äthanol gewaschen. Schmp. 177—180° (u. Zers.).

$\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ . Ber. N 4,28. Gef. N 4,60.

IR-Spektrum in KBr: 3200—2500/cm ..... OH, NH assoz., COOH  
1715/cm; 1690/cm ... C=O, C=O, COOH

NMR in DMSO ( $\delta$ in ppm):	1,2	— $\text{CH}_3$
	2,1	— $\text{CH}_2$ —
	8,0 (M)	$\text{H}_{5,8}$
	8,5 (M)	$\text{H}_{4,6,7,9}$

6. 2,3-Dihydroxy-1-oxo-phenalen<sup>4</sup> (Redukton) (7)

0,5 g **6** werden in einem Gemisch von 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 2 ml konz. HCl 2—3 Min. erhitzt, wobei Rotfärbung auftritt. Nach dem Erkalten gewinnt man 0,4 g (80% d. Th.) **7**, welches aus Xylol umkristallisiert werden kann und mit einem auf anderem Weg hergestellten Produkt<sup>4</sup> in Schmp. und Mischschmp. identisch ist.