

Neue Reagentien zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren, 6. Mitt.:

Zur Kenntnis der „Ninhydrinreaktion“

Von

Helga Wittmann*, Alfred K. Müller und E. Ziegler

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Graz

(Eingegangen am 24. April 1970)

Es wird gezeigt, daß das 3,3'-Dihydroxy-2,2'-bi-1-indenon (1), welches *Moubasher* und *Ibrahim* für den Ninhydrinfarbstoff halten, ein Sekundärprodukt desselben ist. Bei der katalytischen Hydrierung von 2-Nitro-1,3-indandion in Äthanol entsteht 6,12-Dioxo-6,12-dihydro-diindeno-pyrazin (3), während die Hydrolyse von *Ruhemann*purpur (2) in ammoniakal. Lösung zum isomeren 5,7-Dioxo-5,7-dihydro-diindeno-pyrazin (5) führt.

New Reagents for the Detection of Amino Acids by Paper Chromatography, VI: Concerning the "Ninhydrin Reaction"

It can be shown that 3,3'-dihydroxy-2,2'-bi-1-indenone (1), regarded by *Moubasher* and *Ibrahim* as the "ninhydrin dye", is in fact a consecutive product of the latter. The catalytic hydrogenation of 2-nitro-1,3-indandione in ethanol gives 6,12-dioxo-6,12-dihydro-diindeno-pyrazine (3), whereas the hydrolysis of "*Ruhemann's* purple" (2) in aqueous ammonia yields the isomeric 5,7-dioxo-5,7-dihydro-diindeno-pyrazine (5).

Von den mannigfachen Publikationen zum Mechanismus der „Ninhydrinreaktion“ verdient neben jener von *McCaldin*¹ eine von *Moubasher* und *Ibrahim*² insofern Beachtung, als hier im Gegensatz zu allen anderen Autoren behauptet wird, daß der Ninhydrinfarbstoff eine stickstofffreie Verbindung (1) ist.

Dieser Ansicht von *Moubasher* und Mitarb. kann aus den nachstehend dargelegten Gründen von vorneherein widersprochen werden.

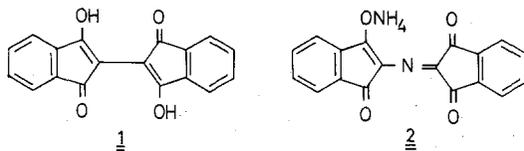
Der Ninhydrinfarbstoff 2 wird stets als äußerst leicht wasserlösliches, salzartiges Produkt beschrieben, welches ein Absorptionsmaximum¹ im

* Herrn Prof. Dr. O. Hromatka, Techn. Hochschule Wien, zum 65. Geburtstag gewidmet.

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

² R. Moubasher und M. Ibrahim, J. chem. Soc. [London] 1949, 702.

UV bei 570 nm (in Wasser) aufweist. **1** fällt aber bei der Umsetzung von Ninhydrin mit Aminosäuren in Wasser schon in der Hitze als unlöslicher Niederschlag an, und erst aus dem verbleibenden dunkelblauen Filtrat



läßt sich **2** mit Hilfe von Ammoniumcarbonat ausfällen. Es ist daher sehr verwunderlich, daß die genannten Autoren² es unterlassen haben, die nach Isolierung von **1** noch immer stark gefärbte Mutterlauge weiter zu untersuchen.

Für uns war zunächst die Frage, wie es zur Bildung von **1** bei der „Ninhydrinreaktion“ kommt, deshalb interessant, da bei anderen im Rahmen dieser Reihe^{3, 4} untersuchten vic. Triketoverbindungen analoge Produkte nicht gefunden worden sind.

Einen ersten Hinweis auf die mögliche Entstehung von **1** gibt die Untersuchung von mit Ninhydrin am Papierchromatogramm erzeugten Farbflecken mit Aminosäuren. Eluiert man solche Farbflecke sofort nach deren Entwicklung und untersucht das Eluat dünn-schichtchromatographisch, so läßt sich **1** nicht nachweisen, während Farbflecke, die mehrere Tage dem Licht ausgesetzt worden sind, bereits geringe Mengen an **1** enthalten. Dieser experimentelle Befund deutet darauf hin, daß **1** erst nachträglich aus dem *Ruhemann*purpur (**2**) entsteht, was durch folgenden Versuch noch erhärtet wird:

Führt man die „Ninhydrinreaktion“ in präparativem Maßstab in wäbr. Lösung durch, filtriert nach 1stdg. Erwärmen auf 70–80° die erkaltete Lösung von ausgefallenem **1** und erwärmt die nur mehr **2** enthaltende Mutterlauge weitere 24 Stdn., so bildet sich erneut ein Niederschlag von **1**. Nach 48 Stdn. ist das gesamte **2** verschwunden und in der Reaktionslösung läßt sich nur mehr **1** neben Zersetzungsprodukten nachweisen. Die Bildung von **1** wird durch UV-Licht beschleunigt. Damit ist eindeutig gezeigt, daß **1** ein Umwandlungsprodukt des Ninhydrin-farbstoffes **2** ist, über dessen Bildungsmechanismus später berichtet werden wird.

Die vorstehend beschriebene Beobachtung läßt ferner den Schluß zu, daß auch die Bildung des Ninhydrin-farbstoffes **2** nach demselben Reaktionsschema wie es für 1,8-Trimethylenchinasatinhydrat^{3, 5} und Perinaphthindan-

³ H. Wittmann, W. Dreveny und E. Ziegler, Mh. Chem. **99**, 1205 (1968).

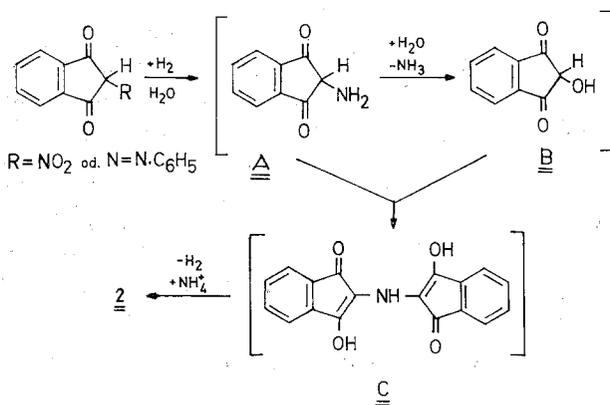
⁴ H. Wittmann, A. K. Müller und E. Ziegler, Mh. Chem. **100**, 497 (1969).

⁵ H. Wittmann, W. Dreveny und E. Ziegler, Mh. Chem. **99**, 1543 (1968).

trionhydrat⁴ in allen Einzelheiten bereits aufgeklärt worden ist, vor sich geht. Bei den genannten Triketonen ist allerdings als unmittelbare Vorstufe zum Farbsalz die Entstehung eines entsprechenden sekundären Amins sichergestellt worden, was beim Ninhydrin auf Grund des analogen Reaktionsablaufes ebenfalls anzunehmen wäre. Der Nachweis der Entstehung einer solchen Dihydrostufe **C** steht jedoch bislang aus.

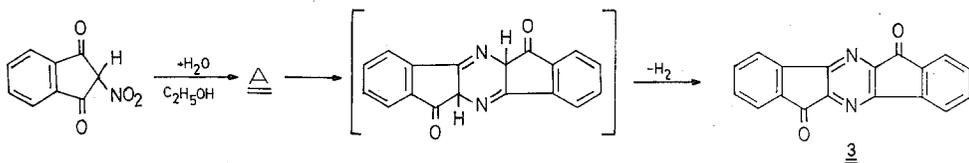
Durch folgenden Versuch kann aber gezeigt werden, daß ein solches sec. Amin **C** intermediär auftritt. Bei der katalytischen Hydrierung von 2-Nitro-1,3-indandion bzw. 2-Phenylazo-1,3-indandion in Wasser erhält man im Hydriergefäß einen hellgelben Niederschlag, der außerhalb der Wasserstoffatmosphäre nicht beständig ist. Vielmehr tritt bei Luftzutritt innerhalb weniger Minuten eine intensive Blaufärbung auf, wobei der zunächst wasserunlösliche Körper mit tiefblauer Farbe in Lösung geht. Der auf diesem Weg erhaltene blaue Farbstoff ist mit dem bei der Umsetzung von Ninhydrin mit Aminosäuren gebildeten *Ruhemann*-purpur **2** identisch.

Auf Grund früherer Versuchsergebnisse^{3, 4} ist die Annahme wohl zulässig, daß es sich bei der gelben, wasserunlöslichen Verbindung, die man im Hydriergefäß vor dem Zutritt von Luftsauerstoff beobachten kann, um das unbeständige sec. Amin **C** handelt. Gestützt wird diese Annahme noch dadurch, daß auch die relativ stabilen sec. Amine aus 1,8-Trimethylenchinisatin³ bzw. Perinaphthindantrion⁴ sehr leicht zum eigentlichen Farbstoff dehydrierbar sind. Beim Bis(3-hydroxy-1-oxo-2-indenyl)-amin (**C**) genügt aber offensichtlich schon Luftsauerstoff, um diese Oxydation zu bewerkstelligen.



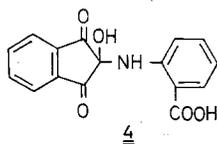
Ein völlig anderes Produkt erhält man allerdings, wenn man die katalytische Hydrierung von z. B. 2-Nitro-1,3-indandion in organischen Lösungsmitteln, wie Äthanol, vornimmt. Hier scheint die Hydrolyse des

2-Amino-3-hydroxy-1-indenons **A** zum Redukton **B** nicht zu erfolgen und man erhält als Kondensationsprodukt aus zwei Molekülen **A** 6,12-Dioxo-6,12-dihydro-diindeno-pyrazin (**3**), was ebenfalls als indirekter Beweis für das zwischenzeitliche Entstehen von **A** anzusehen ist.



*McCaldin*¹ postuliert bei seinem Mechanismus bezüglich der Ninhydrinreaktion als ersten Schritt die Bildung eines Halbaminals aus vic. Triketo- und Aminoverbindung. Danach wird die Entstehung eines Azomethins gefordert, wobei *McCaldin* feststellt, daß bei Verbindungen, die wegen des Fehlens eines Protons in α -Stellung zur NH_2 -Gruppe kein Azomethin geben können, auch die Farbstoffbildung unterbleiben muß.

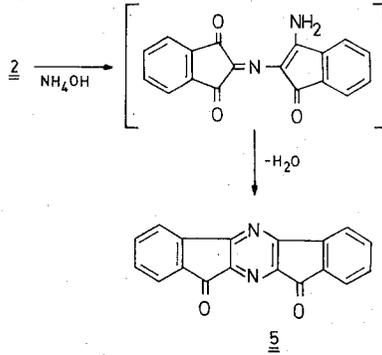
Dieser Sachverhalt ist von uns an anderen Triketonen^{3, 4} experimentell nachgeprüft und bestätigt worden. Ebenso gibt auch Ninhydrin weder mit Anilin oder β -Aminoisovaleriansäure noch mit Anthranilsäure *Ruhemannpurpur* (2). Die Isolierung der entsprechenden Halbaminale ist wegen ihrer großen Zersetzlichkeit äußerst schwierig. Nur das Halbaminale **4** aus Ninhydrin und Anthranilsäure ist in Substanz faßbar.



Abschließend soll noch auf einen wesentlichen Unterschied zwischen Ninhydrin, dem ältesten Aminosäurereagens, und N-subst. Chinisatinen^{3, 6} bzw. Perinaphthindantrion⁴ hingewiesen werden. Die Haltbarkeit der Farbflecken auf einem Aminosäurechromatogramm ist nämlich bei Verwendung von Ninhydrin als Sprühreagens wesentlich geringer als bei den anderen genannten Triketonen. Besonders in Gegenwart von Ammoniak verblassen die Ninhydrin-Farbflecke sehr schnell und sind bald nur mehr schwer zu erkennen. Dieselbe Beobachtung macht man beim Versetzen einer wäßrigen Lösung des Farbsalzes **2** mit Ammoniak. Die vorerst tiefblaue Lösung wird allmählich gelb und nach etwa 48 Stdn. hat sich eine gelbe kristalline Verbindung **5** abgeschieden, welche auf

⁶ H. Wittmann, Mh. Chem. **96**, 523 (1965).

Grund der analytischen Daten mit dem Pyrazin **3** isomer ist. Für die Bildung von **5** wäre folgender Reaktionsweg denkbar:



Aus einem längere Zeit unter NH_3 -Atmosphäre aufbewahrten Ninhydrinfarbfleck am Papier läßt sich mit Butanol **5** ebenfalls eluieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß zwischen den einzelnen im Rahmen dieser Reihe behandelten vic. Triketoverbindungen bezüglich ihres Verhaltens gegenüber Aminosäuren und prim. Aminen keine prinzipiellen, sondern lediglich graduelle Unterschiede bestehen, die sich — wie gezeigt werden konnte — vor allem in der unterschiedlichen Beständigkeit der bei der Farbstoffbildung auftretenden Zwischenprodukte äußern.

Wir danken Herrn Doz. Dr. *H. Sterk*, am hiesigen Institut, für Aufnahme und Interpretation der IR-Spektren und der Firma *J. R. Geigy AG*, Basel, für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

1. 3,3'-Dihydroxy-2,2'-bi-1-indenon (**1**)

a) Aus Ruhemannpurpur (**2**)

Eine Lösung von 4 g Ninhydrin in 250 ml Wasser wird mit 2 g Alanin in 40 ml Wasser unter oftmaligem Umschütteln 1 Stde. auf 70—80° erwärmt. Nach dem Erkalten saugt man **1** (0,7 g) ab und erwärmt das Filtrat weitere 48 Stdn., wobei die zunächst tiefblaue Farbe in Braun übergeht. Nach Filtration läßt sich nur mehr **1** neben Zersetzungsprodukten nachweisen.

b) Aus einem mit Ninhydrin entwickelten Aminosäurechromatogramm

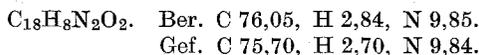
Ein mit einer 1proz. alkohol. Ninhydrinlösung entwickeltes Papierchromatogramm von Alanin wird mehrere Tage am Licht aufbewahrt und danach die Farbflecke mit Benzol eluiert. Im Eluat ist **1** dünnschichtchromatographisch — Laufmittel: Benzol/Eisessig = 5 : 1 — nachweisbar.

2. *Katalytische Hydrierung von 2-Nitro-1,3-indandion bzw. 2-Phenyl-azo-1,3-indandion*

Reaktionsansatz a) 1 g 2-Nitro-1,3-indandion in 100 ml Wasser; b) 1 g 2-Phenylazo-1,3-indandion in 350 ml Wasser. Man hydriert mit 0,3 g 5proz. Pt-Aktivkohle bis zur Beendigung der H₂-Aufnahme, wobei sich im Hydrierkolben ein gelber Niederschlag bildet, der an der Luft rasch mit dunkelblauer Farbe in Lösung geht. Nach Filtration wird **2** mit Ammoniumcarbonat ausgefällt. Ausb. a) 0,2 g (24% d. Th.); b) 0,15 g (23,5% d. Th.).

3. *6,12-Dioxo-6,12-dihydro-diindeno-pyrazin (3)*

Eine Lösung von 1 g 2-Nitro-1,3-indandion in 70 ml Äthanol wird mit Raney-Nickel bzw. 5proz. Pt-Aktivkohle bis zur Beendigung der H₂-Aufnahme hydriert. Braune Nadeln aus Butanol, Schmp. 396—398°, Ausb. 0,15 g (20% d. Th.).



IR-Spektrum in KBr: 1720/cm CO.

4. *N-(2-Hydroxy-1,3-dioxo-2-indenyl)-anthranilsäure (4)*

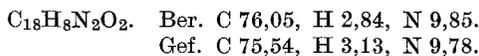
Man löst 4 g Ninhydrin in der Wärme in 60 ml Äthanol, fügt eine ebenfalls warme alkohol. Lösung von 3,2 g Anthranilsäure hinzu und erhitzt das Reaktionsgemisch 4 Stdn. am Rückfluß. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vak. wird der Rückstand mit Äthanol: Äther = 1:1 angerieben. Gelbe Nadeln, Schmp. 193°; Ausb. 2 g (32% d. Th.).



IR-Spektrum in KBr: 3240/cm NH und OH, 3100—2800/cm COOH, 1760 und 1720/cm CO, 1660/cm COOH.

5. *5,7-Dioxo-5,7-dihydro-diindeno-pyrazin (5)*

0,4 g **2** werden in 250 ml Wasser gelöst, mit 75 ml verd. Ammoniaklösung versetzt und 48 Stdn. unter Rühren bei 20° belassen. Dabei entfärbt sich die anfangs blaue Lösung und es bilden sich gelbe Kristalle, die aus viel Butanol umkristallisiert werden. Gelbe Nadeln, Schmp. 343—345°; Ausb. 0,2 g (57% d. Th.).



IR-Spektrum in KBr: 1730/cm CO.

Zum dünn-schichtchromatographischen Nachweis von **5** aus einem unter NH₃-Atmosphäre aufbewahrten Ninhydrinfarbfleck am Papier wird Benzol: Essigester = 9:1 verwendet.