

H.J. Roth und W. Kok*)

Zur Kenntnis der Ninhydrin-Reaktion, 1. Mitt.

Reaktionen mit 2- und 4-Methoxyanilin

Aus dem Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn
(Eingegangen am 22. Juli 1974).

Die Umsetzung von Ninhydrin (1) mit 4-Methoxyanilin führt zu einem farbigen, isolierbaren Ketimin 5. Mit 2-Methoxyanilin entstehen mehrere Reaktionsprodukte. Das entsprechende Ketimin 10a ist instabil, kann aber zu stabilen Folgeprodukten umgesetzt werden.

Investigation of the Ninhydrin-Reaction

Reaction of ninhydrin (1) with 4-methoxyaniline yields the stable ketimine 5. 2-Methoxyaniline reacts to different products. The analogous ketimine 10a is unstable but it is possible to isolate stable subsequent products.

Nachdem *Ruhemann*¹⁻³⁾ das Triketohydrindenhydrat 1 erstmals beschrieben hatte, erlangte die Verbindung unter der Bezeichnung Ninhydrin große Bedeutung als Nachweisreagens für Aminosäuren. Auch bei der quantitativen Bestimmung von Aminosäuren im Routinebetrieb mit Hilfe automatischer Analysegeräte spielt Ninhydrin heute eine wesentliche Rolle. Während die Farbreaktionen von 1 mit Aminosäuren und aliphatischen Aminen bereits intensiv bearbeitet wurden⁴⁻⁷⁾, gibt es

*) Auszug der Dissertation *W. Kok*, Bonn, 1973.

1 S. Ruhemann, J. chem. Soc. (London), 97, 1438 (1910).

2 S. Ruhemann, J. chem. Soc. (London), 97, 2025 (1910).

3 S. Ruhemann, J. chem. Soc. (London), 99, 792 (1911).

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

5 M. Friedmann u. C.W. Sigel, Biochemistry 5, 478 (1966).

6 J.G. Kay u. F.S. Rowland, J. Org. Chemistry 24, 1800 (1959).

7 P.B. Hamilton in: Advances in Chromatography, Vol. 2, Giddings und Keller, Hrsg., Decker, New York 1966.

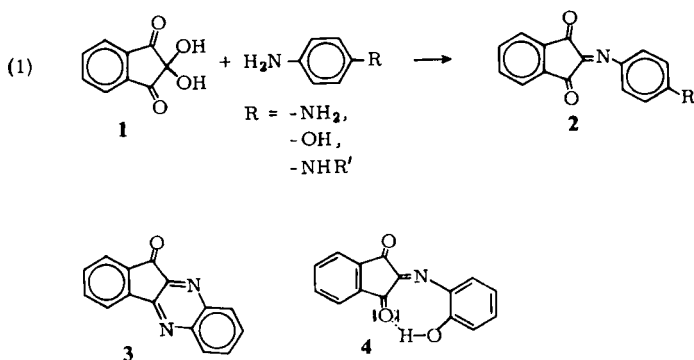
bisher nur wenige Arbeiten über Farbreaktionen mit aromatischen Aminen, so daß dieses Gebiet weder vollständig noch eindeutig geklärt ist.

Eine möglichst vollständige Aufklärung aller Farbreaktionen des Ninhydrins ist aus zwei Gründen wichtig:

1. Bei der Analyse von Naturstoffhydrolysaten in automatischen Eiweißanalysegeräten, sog. Autoanalysern, werden „fremde“ Peaks beobachtet, die nicht von Aminosäuren stammen können, deren Ursache nicht immer bekannt ist und die zu Fehldeutungen führen können.
2. Die Kenntnis aller Reaktionsprodukte von **1** ist Voraussetzung für die Ermittlung seiner Spezifität und erlaubt die Nutzung seiner Vielseitigkeit.

Die bisher in der Literatur bekannten Ergebnisse über Farbreaktionen von **1** mit aromatischen Aminen⁸⁻¹⁰) lassen sich wie folgt zusammenfassen: 4-Hydroxy- oder 4-amino-substituierte Aniline geben Farbreaktionen mit Ninhydrin. Ursache für die Farbigekeit sind Schiffsche Basen der Struktur **2** mit konjugiertem π -Elektronensystem^{9,10}).

Mit den entsprechenden metasubstituierten Anilinen gibt **1** keine Farbreaktion, da keine Konjugation zwischen den Substituenten möglich ist¹⁰). Mit den o-substituierten Anilinen gibt **1** wider Erwarten ebenfalls keine Farbreaktion, obwohl hier die Ausbildung eines konjugierten π -Elektronensystems möglich wäre. Der Grund hierfür ist im Falle des o-Phenylendiamins der Ringschluß zum Chinoxalin **3**. Beim 2-Aminophenol wird dagegen die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke **4** diskutiert¹⁰), die die Lichtabsorption im sichtbaren Bereich verhindern soll.



8 M.-Z. Barakat, N. Wahba u. M.M. El-Sadr, *Analyst* **79**, 715 (1954).

9 R. Suffis, A. Levy u. D.E. Dean, *Analytic. Chem.* **36**, 636 (1964).

10 M. Friedmann, *Canad. J. Chem.* **45**, 2271 (1967).

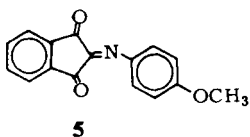
Trifft diese Annahme tatsächlich zu, so sollte die Umsetzung mit 2-Methoxyanilin wiederum zu einem farbigen Produkt führen, da hier eine Wasserstoffbrücke nicht ausgebildet werden kann. Um die Farbreaktion von Ninhydrin mit vergleichbaren Anilinderivaten zu untersuchen, wird deshalb zunächst die Reaktion mit 2- und 4-Methoxyanilin durchgeführt. Vorversuche zeigen, daß mit beiden Methoxyanilinen Farbreaktionen auftreten. Es wurden Versuche zur Abhängigkeit der Farbintensität von der Art des Lösungsmittels, von der Reaktionszeit, vom Konzentrationsverhältnis der Reaktionspartner und von der Reaktionstemperatur durchgeführt¹¹⁾. In allen untersuchten Lösungsmitteln war die Stabilität der Farbprodukte nicht befriedigend, d.h. mit Hilfe der Ninhydrin-Reaktion dürften in diesem Falle, verglichen mit anderen Bestimmungsmöglichkeiten, keine Idealergebnisse zu erzielen sein. Die Absorptionskurven der entsprechenden Farblösungen ergaben für das farbige Umsetzungsprodukt mit 2-Anisidin Maxima bei 558 und 409 nm, für 4-Anisidin Maxima bei 543 und 422 nm.

DC-Untersuchungen zeigen, daß bei der Umsetzung mit 4-Anisidin ein farbiges Hauptprodukt entsteht, während bei der Umsetzung mit 2-Anisidin nebeneinander mehrere Produkte resultieren, wobei zwei mengenmäßig dominieren.

Isolierung und Strukturaufklärung der Reaktionsprodukte aus Ninhydrin und Anisidinen

Reaktion mit 4-Anisidin

Äquimolare Mengen von 4-Anisidin (4-Methoxyanilin) und Ninhydrin reagieren in wässriger Lösung in der Wärme und unter Stickstoff als Oxidationsschutz zum Azomethin **5**. 4-Anisidin verhält sich bei dieser Reaktion analog den von *Friedmann*¹⁰⁾ untersuchten Verbindungen.



Reaktion mit 2-Anisidin

Nach den Ergebnissen der DC und der Spektrophotometrie erwartet man ein entsprechendes Reaktionsprodukt auch aus der Umsetzung von Ninhydrin mit 2-Anisidin.

11 Dissertation W. Kok, Bonn 1973.

Es gelingt jedoch nicht, eine entsprechende Verbindung zu isolieren. Während der Farbstoff in stark verdünnten Lösungen, wie sie bei der Spektrophotometrie vorliegen, wenigstens einige Stunden stabil bleibt, ist er in konzentrierteren Lösungen, wie sie für die präparative Darstellung benötigt werden, extrem instabil. Man erhält stets nur braune, teerartige Massen, die, wie der Versuch einer osmometrischen Molekulargewichtsbestimmung ergibt, polymeren Charakter haben. Bringt man dagegen Ninhydrin mit der äquimolaren Menge 2-Anisidin in absol. Äthanol zur Reaktion, so erhält man in sehr guter Ausbeute das Halbaminal 6 als hellgelbe, kristalline Verbindung, die sich jedoch sehr leicht unter Verfärbung nach Schwarzgrün zersetzt.

Sehr leicht läßt sich auch ein Nebenprodukt 7 der Farbreaktion isolieren. Setzt man Ninhydrin mit einem Überschuß von o-Anisidin in Eisessig um, so erhält man Verbindung 7 in Form orangefarbener Kristalle. Die Struktur von 7 wird durch Elementaranalyse, IR- und NMR-Spektroskopie ermittelt und zusätzlich abgesichert durch die Darstellung des Diazetylderivates 8 und dessen spektroskopische Daten.

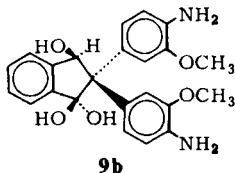
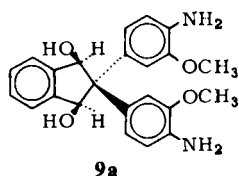
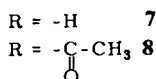
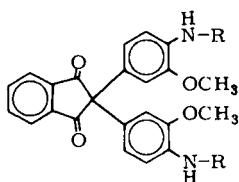
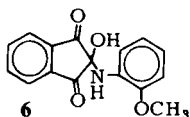
Außerdem wird 7 mit Natriumborhydrid zum Diol reduziert. Dabei entsteht ein Öl, das nicht kristallisiert und deshalb durch Säulenchromatographie an Kieselgel aufgetrennt wird. Man erhält als einziges Reduktionsprodukt das Diol 9a, nicht jedoch die stereomere Verbindung 9b. Die Zuordnung der Struktur erfolgt wieder mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Das Spektrum von 9a zeigt zwei Singulett mit der Intensität 3 H bei $\delta = 3,49$ und $3,91$ ppm, die den Methoxygruppen zuzuordnen sind. Bei $\delta = 4,45$ ppm erscheint ein breites Singulett mit der Intensität 4H, das nach dem Austausch mit D_2O verschwindet und den beiden aromatischen Aminogruppen entspricht. Bei $\delta = 5,48$ ppm sieht man ein Quartett mit der Intensität 4H, das nach dem Austausch zu einem Singulett mit der Intensität 2H wird. In diesem komplexen Signal finden sich sowohl die Resonanzen der OH-Gruppe als auch die der dazu geminalen Wasserstoffatome. Die restlichen Signale oberhalb $\delta = 5,8$ ppm entsprechen in ihrer Integration den 10 Aromatenprotonen. Vergleicht man die beiden Formeln 9a und 9b, so sind unterschiedliche Symmetrieverhältnisse zu erkennen. Bei 9b hat jeder der beiden aromatischen Ringe am C-2 des Indangerüsts eine Hydroxylgruppe und ein H-Atom als räumliche Nachbarn. Folglich müßten sie wie auch ihre Methoxylsubstituenten im NMR-Spektrum die gleichen Signale geben. Das ist jedoch nicht der Fall. Bei der Struktur 9a liegt dagegen der eine Aromat am C-2 zwischen zwei Hydroxylgruppen, der andere zwischen zwei H-Atomen. Die unterschiedliche Umgebung erklärt die unterschiedliche chemische Verschiebung.

Eine derartige Stereospezifität der Borhydridreduktion von Indan-1,3-dionen wurde auch schon von Kametami und Mitarb.¹²⁾ sowie von Manske und Mitarb.¹³⁾ festgestellt. Als Grund für diese Stereospezifität wird vermutet, daß nach dem Angriff des komplexen Hydrid-Ions am C-Atom einer Ketogruppe die zweite Carbonylgruppe sehr viel schneller durch einen intramolekularen Hydridtransfer reduziert wird, als es durch ein zweites Borhydridion aus der Lösung erfolgen könnte.

12 T. Kametami, S. Hibino u. S. Takano, J. chem. Soc. (London), Perkin Trans. I, 1972, 391.

13 R.H.F. Manske u. Q.A. Ahmed, Canad. J. Chem. 48, 1280 (1970).

Bei der ebenfalls NMR-spektroskopisch erfolgten Strukturzuordnung fanden *Manske und Mitarb.*¹⁴⁾ eine bevorzugte Ausbildung eines trans-Diols, während die Reduktion von 7 hier spezifisch zum cis-Diol 9a führt.



Die Bildung von 7 erfolgt überraschend, da man unter den angewandten Bedingungen nur die Bildung von Ketiminen aus Amino- und Ketogruppe erwartet. Es erscheint daher von Interesse, Untersuchungen über den Verlauf der Reaktion zu machen. Dabei stehen zwei Fragen im Vordergrund:

1. Ist die farbige Verbindung, die zu einer kurzzeitigen, intensiven Rotfärbung des Reaktionsansatzes führt und für die eine der beiden Formeln 10 als Struktur vermutet wird, ein echtes Zwischenprodukt auf dem Wege zur Bildung von 7 oder nur ein Nebenprodukt?

2. Welche der beiden Strukturformeln entspricht wirklich dem Farbstoff 10?

Dazu werden folgende Untersuchungen angestellt:

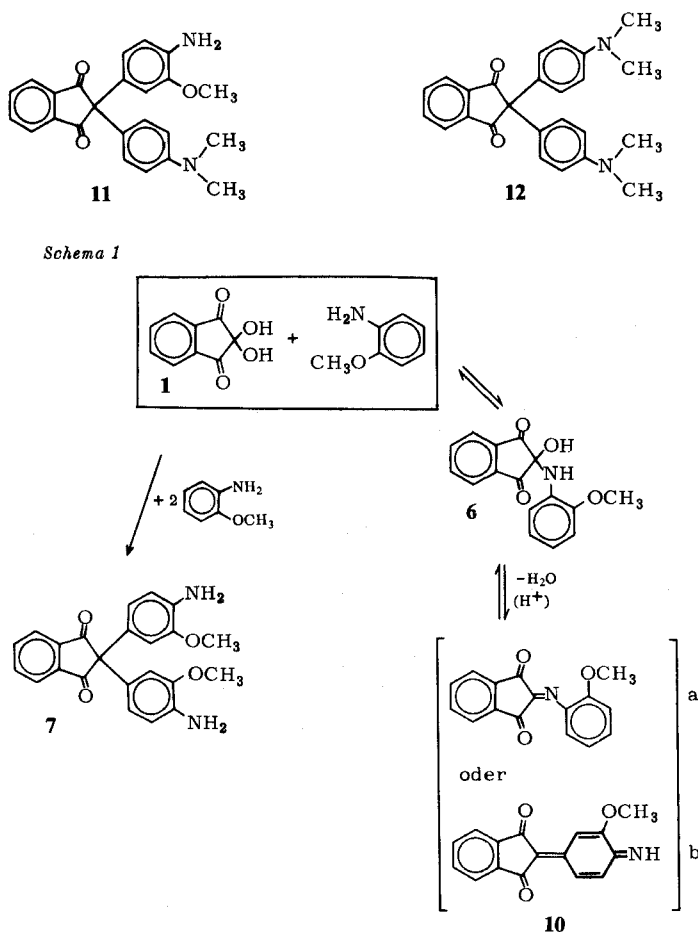
Zu 1) Es wird ein Reaktionsansatz durchgeführt, indem man zunächst äquimolare Mengen von Ninhydrin und 2-Ansidin in Eisessig zusammengibt und nach Auftreten der Rotfärbung eine äquimolare Menge N,N-Dimethylanilin zusetzt. Der Reaktionsansatz liefert nach der Aufarbeitung und säulenchromatographischen Auftrennung des Endproduktes die drei Verbindungen 7, 11 und 12. Danach scheiden 6 und 10

14 R.H.F. Manske, R.G.A. Rodrigo, D.B. Mac Lean, D.E.F. Gracey u. J.K. Saunders, *Canad. J. Chem.* 47, 3589 (1969).

als Zwischenprodukte bei der Bildung von **7** aus. Die beiden Reaktionswege laufen, wie in *Schema 1* gezeigt, parallel. Dabei ist aber die Bildung von **7** wohl irreversibel, die von **6** und **10** dagegen reversibel, da schließlich nur **7** bei der Reaktion übrigbleibt und isoliert werden kann.

Daß **6** und **10** stets im Gleichgewicht mit ihren Ausgangsstoffen stehen, läßt sich beweisen. Dazu setzt man eine alkoholische Lösung von **6** mit einer wässrigen Lösung einer Aminosäure um. Es bildet sich *Ruhemann's Purpur* (**13**), wie man es auch mit reinem Ninhydrin erhält (*Gleichung 2*, S. 408).

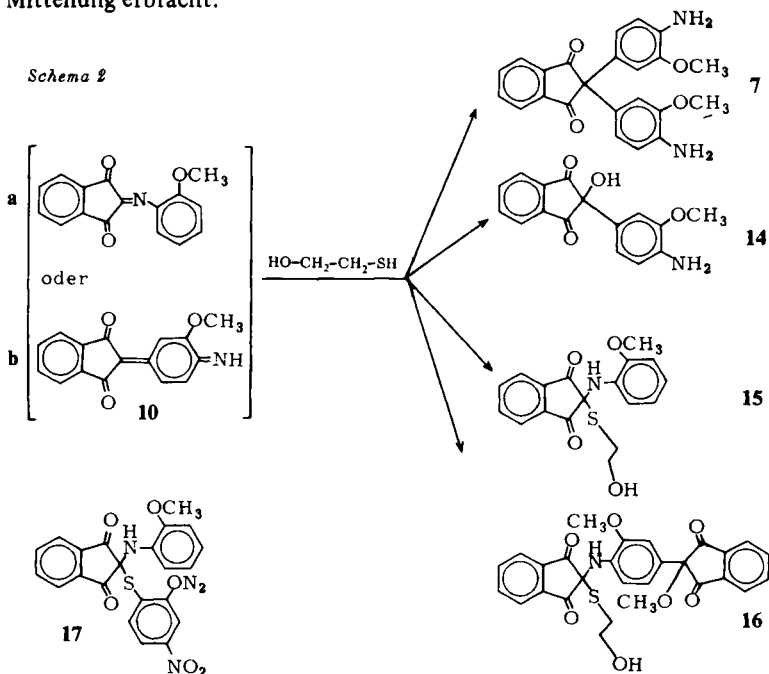
Das DC von **6** zeigt stets zwei Flecke, einen gelben, der der aufgetragenen Substanz entspricht und einen roten Fleck, den man der Verbindung **10** zuschreiben kann. Auch bei zweidimensionaler DC erfolgt stets wieder eine Auftrennung in zwei Flecke, was deutlich das bestehende Gleichgewicht beweist.



Zu 2) Um die Struktur von **10** festzulegen, werden die intermediär auftretenden roten Farblösungen mit verschiedenen Reagenzien umgesetzt, die mit C=C- oder C=N-Doppelbindungen charakteristische Reaktionen geben.

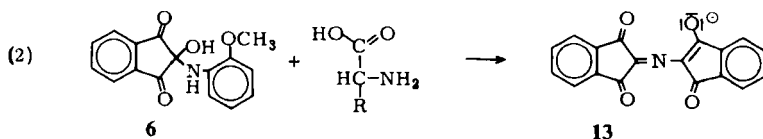
Die Umsetzung von **10** mit Kaliumcyanid, Thioglykolsäureester, Diäthylphosphit, Resorcin oder 8-Hydroxychinolin führt nicht zur Isolierung von definierten Verbindungen, wie sie in der Literatur beschrieben wurden.

Erfolgreicher verläuft die Umsetzung mit 2-Mercaptoäthanol. Nach einer säulen-chromatographischen Auftrennung des komplexen Reaktionsgemisches werden die im *Schema 2* aufgeführten Verbindungen erhalten. Dabei werden sowohl Reaktionsprodukte erhalten, die einer Substitution des aromatischen Ringes entsprechen (**7**, **14**, **16**), als auch solche, bei denen das Ninhydrin die Aminogruppe substituiert (**15**, **16**). Eine Entscheidung über die Struktur von **10** kann daher noch nicht erfolgen. Eine Umsetzung von **10** mit 2,4-Dinitrosulfonylchlorid, das als Reagens auf C=C-Doppelbindungen verwandt wird^{15, 16}), ergibt die Verbindung **17**. Dieses Ergebnis weist deutlich auf ein Ketonimin **10a** als farbiges Zwischenprodukt hin. Doch entstehen auch hier, wie das DC zeigt, noch weitere Produkte, die nicht isoliert werden konnten. Der endgültige Beweis für **10a** als „Chromophor“ wird in einer weiteren Mitteilung erbracht.



15 H. Lecher u. P. Stöcklin, Ber. dtsch. chem. Ges. 58, 409 (1925).

16 N. Karasch, H.L. Weber u. H. Tigermann, J. Amer. chem. Soc. 69, 1612 (1947).



Dem Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt, danken wir für eine Sachbeihilfe.

Beschreibung der Versuche

2-(4-Methoxyphenylimino)-indan-1,3-dion (5)

2,46 g (0,02 Mol) 4-Methoxyanilin werden unter Zusatz von etwas Natriumdithionit (Oxydationsschutz) und unter Einleiten von N_2 in 100 ml H_2O gelöst. Zu der siedenden Lösung wird langsam eine Lösung von 3,56 g (0,02 Mol) Ninhydrin in Wasser getropft. Anschließend wird noch 10 Min. zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten werden die ausgefallenen Kristalle abgesaugt und aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 4,1 g (78 %). Feine, metallisch glänzende Kristallnadeln, löslich in Alkoholen und Chloroform, schwer löslich in Wasser, CCl_4 und Petroläther. Schmp.: 134° (Äthanol).

$C_{16}H_{11}NO_3$ (265,26) Ber.: C 72,44 H 4,18 N 5,28; Gef.: C 72,65 H 4,47 N 5,74. UV-Spektrum (Methanol): $\lambda_{max} = 229,5$ nm ($\epsilon = 20500$); 249 nm (19300); 300,5 nm Sch.; 407,5 nm (8230); 543 nm (2030). IR-Spektrum: Banden bei 1674 und 1715 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$), keine Banden über 3000 cm^{-1} . NMR-Spektrum ($CDCl_3$): Die 8 aromatischen Protonen geben ein kompliziertes Multiplett im Bereich von $\delta = 6,6$ bis 8,4 ppm. Die 3 H der Methoxygruppe geben ein Singulett bei $\delta = 3,82$ ppm.

2-Hydroxy-2-(2-methoxyphenylamino)-indan-1,3-dion (6)

3,56 Ninhydrin (0,02 Mol) werden in Äthanol gelöst, mit 2,25 ml 2-Methoxyanilin (0,02 Mol) versetzt und auf dem Wasserbad kurz auf 70° erwärmt. Nach dem Erkalten wird das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen, bis die Lösung Sirupkonsistenz hat. Bei 0° kristallisiert 6 nach 24 Std. aus. Das Umkristallisieren gelingt durch Auflösen in Dichlormethan in der Kälte, Zufügen von Petroläther im Überschuß und vorsichtigem Einengen in der Kälte. Rohausbeute: 3,6 g (64 %). Hellgelbe Kristalle, sehr leicht löslich in allen organischen Lösungsmitteln außer Kohlenwasserstoffen. Sie sind sehr leicht zersetzlich und verfärben sich bei der Aufbewahrung. Schmelzverhalten: (Äthanol/Petroläther): Ab 100° Mikrodestillat, Schmp. 106 bis 108° (Zers.).

$C_{16}H_{13}NO_4$ (283,3) Ber.: C 67,84 H 4,63; Gef.: C 67,06 H 4,64. UV-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{max} = 227,5$ nm ($\epsilon = 51300$); 283 nm (4200). IR-Spektrum: Banden bei 3390 (Sch) und 3305 cm^{-1} ($\nu_{OH, NH}$); 1710 und 1740 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$). NMR-Spektrum ($CDCl_3$): Signale bei $\delta = 3,78$ ppm und Singulett mit Schulter (4 H, OCH_3 und NH), 6,84 ppm Multiplett (4 H, Aromatische Protonen des Anisidins); 7,98 ppm Multiplett (4 H, aromatische Protonen des Indandions).

Umsetzung von 6 mit Aminosäuren

Zu einer 0,1 proz. Lösung von L-Alanin in einem wässrigen Phosphatpuffer von pH 5,8 wird eine äquivalente Menge einer 1 proz. Lösung von 6 in Äthanol getropft. Innerhalb weniger Min. entwickelt sich bei Raumtemp. eine violette Färbung. Das UV-Spektrum zeigt zwei gleich hohe Maxima bei 540 und 400 nm, wie sie für Ruhemann's Purpur charakteristisch sind.

2,2-Bis-(4-amino-3-methoxyphenyl)-indan-1,3-dion (7)

A: 3,56 g Ninhydrin (0,02 Mol) werden in 100 ml Eisessig heiß gelöst. Die noch 80° heiße Lösung wird zu einer ca. 50° warmen Lösung von 6,75 ml 2-Methoxyanilin (0,06 Mol) in Eisessig getropft. Die Mischung wird 10 Min. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Die kalte Lösung wird durch Eingießen in eine gesättigte NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Das Rohprodukt wird zweimal aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 4,8 g (54 %).

B: Darstellung aus 6:

2,83 g 6 (0,01 Mol) werden ohne Erwärmen in Chloroform gelöst. Diese Lösung wird langsam und unter kräftigem Rühren in eine auf 70° erwärmte Lösung von 2,25 ml 2-Methoxyanilin (0,02 Mol) in Eisessig getropft. Anschließend wird der Eisessig i. Vak. entfernt und der Rückstand zweimal aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 0,8 g (20 %). Tieforangefarbene Kristalle, löslich in Eisessig, Chloroform, Mineralsäuren, wenig löslich in Äthanol und Methanol, praktisch unlöslich in Wasser und Kohlenwasserstoffen. Schmp.: 163 bis 164° (Äthanol).

C₂₃H₂₀N₂O₄ (388,4) Ber.: C 71,12 H 5,19 N 7,21; Gef.: C 71,10 H 5,35 N 6,96. UV-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{\max}$ = 214,5 nm (ϵ = 56000); 227,5 nm (62300); 248,5 nm (33500); 293,5 (9000). Azoreaktion: 10 mg Substanz werden in 3 ml Eisessig gelöst, die Lösung wird im Eisbad bis zur beginnenden Kristallisation des Lösungsmittels abgekühlt. Dann wird eine ebenso kalte Lösung von NaNO₂ in Eisessig zugegetropft, bis ca. die dreifache äquivalente Menge erreicht ist. Die tiefgrüne Lösung wird zu einer Lösung von 20 mg β -Naphthol in Äthanol gegeben. Nach kurzer Zeit entsteht eine tiefrote Färbung. Im DC ist ein roter Fleck zu sehen neben mehreren farblosen Nebenprodukten.

2,2-Bis-(4-acetylamino-3-methoxyphenyl)-indan-1,3-dion (8)

400 mg 7 werden in 10 ml Pyridin gelöst. Man gibt 3 ml Acetanhydrid zu und hält die Mischung 20 Min. unter Rückfluß am Sieden, dann werden 10 ml Methanol zugegeben und weitere 10 Min. erhitzt. Danach wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Ausbeute: 320 mg (62 %). Bläßgelbe Kristalle, gut löslich in Chloroform, löslich in Äthanol und Methanol, wenig löslich in Äther und Benzol. Schmp. 239–241° (Äthanol). UV-Spektrum (Methanol): $\lambda_{\max}$ = 226 nm (ϵ = 63600); 249,5 nm (37400); 289 nm (12900). IR-Spektrum: Banden bei 3170 cm⁻¹ (ν_{NH}); 1745 und 1703 cm⁻¹ ($\nu_{\text{C=O}}$); 1650 cm⁻¹ (Amid I). NMR-Spektrum (CDCl₃): Signale bei δ = 8,0 ppm Multiplett (8 H), nach Austausch mit D₂O noch 6 H Intensität; δ = 6,9 ppm Multiplett (4 H); 3,78 ppm Singulett (6 H, OCH₃); 2,16 ppm Singulett (6 H, Acetyl-H).

1,3-Dihydroxy-2,2-bis-(4-amino-3-methoxyphenyl)-indan (9a)

2 g 7 (5 mMol) werden in 500 ml Äthanol in der Wärme gelöst. Diese Lösung wird unter intensivem Rühren während 30 Min. zu einer Suspension von 1 g NaBH₄ in 200 ml Äthanol getropft; anschließend fügt man im Abstand von 10 Min. noch zweimal 0,2 g NaBH₄ hinzu. Die orangefarbene Lösung wird dabei hellgelb. Der Überschuss an NaBH₄ wird durch vorsichtiges Zutropfen von Aceton zerstört; anschließend wird die Lösung mit verdünnter HCl neutralisiert und i. Vak. bei 20° auf 50 ml eingengt. Nach Zugabe von 250 ml Äther wird dreimal mit einer alkalischen Sorbitlösung (10 % Sorbit und 2 % NaOH in Wasser) und noch zweimal mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Es kann weder mit diesem noch mit einem anderen Lösungsmittel Kristallisation erreicht werden. Daher wird eine Auftrennung durch SC vorgenommen. Nach Entfernen aller Reste anderer Lösungsmittel i. Vak. wird der ölige, braune Rückstand in 5 ml Chloroform aufgenommen und an einer Säule (ϕ 50 mm, l = 140 cm) mit 300 g Kieselgel chromatographiert. Zunächst wird mit reinem

Chloroform eine gelbe Substanz isoliert (ca. 10 mg = 0,5 %), die bisher nicht identifiziert werden kann. Anschließend wird **9a** durch Chloroform : Aceton = 9 : 1 eluiert. Der Rest waren polymere Substanzen. Ausbeute: 110 mg (5 %). Fast weiße Kristalle, löslich in DMSO, wenig löslich in Methanol, Äthanol, unlöslich in unpolaren Lösungsmitteln (Chloroform, Äther, Petroläther). Schmp.: 185–187° (Äthanol). UV-Spektrum (Äthanol): $\lambda_{\max}$ = 243 nm (ϵ = 18800); 290 nm (5000).

Reaktion von Ninhydrin mit 2-Methoxyanilin und N,N-Dimethylanilin zu 7, 11 und 12

3,56 g Ninhydrin (0,02 Mol) werden in 150 ml Eisessig in der Hitze gelöst, dazu wird eine Lösung von 2,25 ml (0,02 Mol) 2-Methoxyanilin gegeben. Der Reaktionsansatz färbt sich sofort tiefrot und wird nach 1 Min. mit einer Lösung von 2,42 g N,N-Dimethylanilin (0,02 Mol) in 50 ml Eisessig versetzt. Nach 15 Min. ist die rote Färbung verschwunden und die Lösung gelborange. Sie wird mit 300 ml Benzol und 1000 ml Wasser versetzt. Die organische Phase wird abgetrennt, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, zweimal mit Wasser gewaschen, abgetrennt, mit Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingengt. Eine Chromatographiesäule (l = 1 m, ϕ 5 cm) wird mit 700 g Kieselgel, Aktivitätsstufe 2 bis 3 beschickt. Die Säule wird so lange mit wasserfreiem Benzol gewaschen, bis das Eluat mit Natriumdraht keinen Wasserstoff mehr entwickelt. Dann wird das Reaktionsgemisch in der kleinstmöglichen Menge Benzol gelöst und auf die Säule gegeben. Man eluiert mit reinem Benzol die Verbindung **11**. Anschließend wird **12** durch Benzol : Aceton = 95 : 5 (Vol. T.) und zuletzt **7** mit Benzol : Aceton = 9 : 1 (Vol. T.) eluiert. Die Eluate werden eingengt und der Rückstand umkristallisiert.

2,2-Bis-(4-amino-3-methoxyphenyl)-indan-1,3-dion (7)

Ausbeute: 1,4 g (18 %). Die hier gewonnene Substanz ist in allen Eigenschaften identisch mit der oben beschriebenen Substanz **7**,

2-(4-Dimethylaminophenyl)-2-(4-amino-3-methoxyphenyl)-indan-1,3-dion (11)

Ausbeute: 0,4 g (5,2 %). Nach Umkristallisieren aus Methanol orangefarbene Kristalle, leicht löslich in Chloroform, Dichlormethan und Aceton, wenig löslich in Methanol und Äthanol, unlöslich in Petroläther. Schmp.: 163–165° (Methanol).

$C_{24}H_{22}N_2O_3$ (386,4) Ber.: C 74,59 H 5,74 N 7,25; Gef.: C 74,77 H 5,84 N 7,34. UV-Spektrum (Methanol): $\lambda_{\max}$ = 225 nm (ϵ = 58400); 252 nm (34500); 293 nm (8530). IR-Spektrum: Banden bei 3340 und 3420 cm^{-1} ($\nu_{\text{N-H}}$); 1700 und 1725 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$). NMR-Spektrum (Aceton- d_6): Signale bei δ = 8,24 ppm Singulett (4 H, aromatische Protonen des Indandions); 7,0 ppm Multipllett (8 H, aromatische Protonen der beiden Aminreste); 4,47 ppm breites Singulett, verschwindet nach Austausch mit D_2O (2 H, NH_2 -Gruppe); 3,73 ppm Singulett (3 H, OCH_3 -Gruppe); 2,93 ppm Singulett (6 H, NCH_3 -Gruppen).

2,2-Bis-(4-dimethylaminophenyl)-indan-1,3-dion (12)

Ausbeute: 1,6 g (21 %). Aus Benzol oder Dichlormethan/Petroläther gelbgrüne Kristallnadeln, aus Methanol orangefarbene Kristalle. Gut löslich in Chloroform, Dichlormethan, wenig löslich in Methanol, Äthanol, Benzol, unlöslich in Petroläther. Schmp. (Benzol): Schmilzt unter Aufsieden bei 110–112°, anschließend Rekristallisation, schmilzt wieder bei 169–171°. Schmp. (Methanol): 168–169°. Die gelbgrünen Kristalle enthalten, wie das NMR-Spektrum zeigt, jeweils 1/2 Mol Benzol bzw. 1 Mol CH_2Cl_2 als Kristalllösungsmittel.

$C_{25}H_{24}N_6O_2 \cdot 1/2 C_6H_6 = 2 C_{25}H_{24}N_2O_2 \cdot 1 C_6H_6 = C_{56}H_{54}N_4O_4$ (847,11). Ber.: C 79,41 H 6,43 N 6,61; Gef.: C 78,98 H 6,37 N 6,67. UV-Spektrum (Methanol): $\lambda_{\max} = 224,5 \text{ nm}$ ($\epsilon = 56100$); 257 nm (43800); 301 nm (8790). IR-Spektrum: Keine Bande über 3100 cm^{-1} , Banden bei 1695 und 1750 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$). NMR-Spektrum (Aceton- d_6): Signale bei $\delta = 8,18$ ppm Singulett (4 H, Protonen des Indanions); 6,95 ppm Multiplett, symmetrisch (8 H, aromatische Protonen des Amins); 2,93 ppm Singulett (12 H, $N-CH_3$ -Gruppen).

Umsetzung von Ninhydrin mit 2-Methoxyanilin und 2-Mercaptoäthanol zu 7, 14, 15 und 16

3,56 g Ninhydrin (0,02 Mol) werden in 250 ml Eisessig gelöst. Zu der 60° warmen Lösung wird schnell eine Lösung von 2,25 ml 2-Methoxyanilin (0,02 Mol) in 50 ml Dioxan gegeben. Nach Ausbildung der intensiven Rotfärbung (ca. 2 Min.) wird eine Lösung von 1,5 ml 2-Mercaptoäthanol zugegeben. Die Mischung wird 2 Std. unter Lichtausschluß aufbewahrt, dann ist die rote Farbe völlig verschwunden. Die braune Lösung wird bei Raumtemp. i. Vak. eingengt, der ölige Rückstand mit 300 ml Benzol aufgenommen und die Lösung durch Ausschütteln mit Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert. Anschließend wird die organische Phase mit Wasser gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wird dann wieder i. Vak. bis zur beginnenden Trübung eingengt. Die so vorbereitete Lösung wird auf eine Säule mit 700 g Kieselgel gegeben, die, wie bei der Isolierung von 7, 11 und 12 beschrieben, vorbereitet ist. Zunächst wird mit Benzol : Aceton = 9 : 1 (Vol. T.) eluiert. Es werden 10 Fraktionen je 1 l aufgefangen. Anschließend wird mit Benzol : Aceton = 8 : 2 (Vol. T.) eluiert; es werden weitere 15 Fraktionen aufgefangen. Durch Einengen und anschließendes Umkristallisieren können aus den Fraktionen 3–5 Substanz 15, aus der Fraktion 7 kann Substanz 7, aus Fraktion 10 Substanz 14 und aus den Fraktionen 16–18 Substanz 16 rein erhalten werden. Die übrigen Fraktionen können entweder nicht zur Kristallisation gebracht werden oder die Substanzen zersetzen sich beim Umkristallisieren.

2,2-Bis-(4-amino-3-methoxyphenyl)-indan-1,3-dion (7)

Ausbeute: 620 mg (8 %, berechnet auf eingesetztes Ninhydrin). Die so isolierte Substanz ist mit der weiter oben beschriebenen Substanz 7 identisch.

2-Hydroxy-2-(4-amino-3-methoxyphenyl)-indan-1,3-dion (14)

Ausbeute: 185 mg (3,3 %). Fast weißes, kristallines Pulver (aus Methanol), löslich in DMSO, wenig löslich in Methanol und Äthanol, sehr schwer löslich in Benzol und Chloroform, unlöslich in Petroläther. Schmelzverhalten: Mikrosublimat ab 200° , Mikrodestillat ab 210° , schmilzt bei 220° u. Zers..

$C_{16}H_{13}NO_4$ (283,24) Ber.: C 67,84 H 4,63 N 4,95; Gef.: C 66,76 H 4,77 N 4,78. IR-Spektrum: Banden bei 3395, 3310 und 3175 cm^{-1} (ν_{OH} , ν_{NH_2}); 1731 und 1758 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$). NMR-Spektrum (DMSO- d_6): $\delta = 8,04$ ppm Singulett (4 H, Ninhydrinprotonen), 6,4 und 6,95 ppm Multiplett (3 H, aromatische Protonen des 2-Methoxyanilins); 6,62 ppm Singulett, verschwindet nach Austausch mit D_2O (1 H, OH); 4,83 ppm breites Singulett, verschwindet nach Austausch mit D_2O (2 H, NH_2); 3,74 ppm Singulett (3 H, OCH_3).

2-(2-Methoxyphenylamino)-2-(2-hydroxyäthylmercapto)-indan-1,3-dion (15)

Ausbeute: 680 mg (9,9 %). Umkristallisiert aus Dichlormethan-Petroläther dunkel orangefarbene Kristalle, die 0,5 Mol Dichlormethan enthalten. Aus Methanol orangefarbene Kristalle, lösungsmittelfrei, löslich in Chloroform, Dichlormethan, Methanol und Äthanol, gut löslich in DMSO,

sehr schwer löslich in Tetrachlormethan, unlöslich in Petroläther. Schmp.: 50–52° (Dichlormethan-Petroläther) u. Zers. und Gasentwicklung, 83–84° (Methanol).

$C_{18}H_{17}NO_4S$ (343,32). Ber.: C 62,97 H 4,99 N 4,08 S 9,32; Gef.: C 63,06 H 4,40 N 3,75 S 9,14. IR-Spektrum: Banden bei 3485 und 3260 cm^{-1} (ν_{OH} , ν_{NH}), bei 1702, 1731 und 1746 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$). NMR-Spektrum ($CDCl_3$): δ = 7,97 ppm symm. Multiplett (4 H, Ninhydrin); 6,85 und 7,3 ppm Multiplett 4 H, 2-Methoxyanilin); 5,32 ppm Singulett (1 H, Kristall- CH_2Cl_2); 3,83 ppm Singulett (3 H, OCH_3); 3,74 ppm Singulett (1 H, OH); 3,58 ppm Triplet (2 H, CH_2 neben OH); 2,82 ppm Triplet (2 H, CH_2 neben S); 2,0 ppm breites Singulett (1 H, NH). Die Zuordnung der beiden CH_2 -Gruppen erfolgt mit Hilfe eines zweiten, in $DMSO-d_6$ aufgenommenen Spektrums. Hier ist eine Kopplung zwischen dem Proton der OH-Gruppe und den Protonen der benachbarten CH_2 -Gruppe zu beobachten. Auch die Integrationen der Signale für die OH- und NH-Gruppe lassen sich hier besser bestimmen.

2-[2-Methoxy-4-(2'-methoxy-1',3'-diketoindanyl-2')-phenylamino]-2-(2-hydroxy-äthylmercapto)-indan-1,3-dion (16)

Ausbeute: 220 mg (2,3 %). Nach Umkristallisieren aus Methanol orangebraunes, mikrokristallines Pulver, wenig löslich in $DMSO$, schwer löslich in Methanol und Äthanol, sehr schwer löslich in Chloroform und Benzol, unlöslich in Petroläther. Schmp.: 200 bis 203° (Methanol) u. Zers.

$C_{28}H_{23}NO_7S$ (517,41) Ber.: C 64,99 H 4,48 N 2,71 S 6,18; Gef.: C 65,18 H 4,55 N 3,25 S 7,04. IR-Spektrum: Banden bei 3400 cm^{-1} und 3260 cm^{-1} (beide breit) (ν_{OH} , ν_{NH}); 1690, 1703, 1722, 1731 und 1746 cm^{-1} ($\nu_{C=O}$). NMR-Spektrum: In $DMSO-d_6$ geben die aromatischen Protonen der beiden Indandionreste ein gemeinsames Signal (scharfes Singulett) bei δ = 8,02 ppm mit der Integration 8 H. Die drei Ringprotonen des Amins geben ein wenig aufgelöstes Signal bei δ = 6,5 ppm. Bei δ = 6,3 ppm erscheint das Singulett der Hydroxylgruppe am C 2' des Indandions. Das Signal verschwindet beim Austausch mit D_2O - ebenso das Triplet bei δ = 5,2 ppm, das der Hydroxylgruppe der 2-Hydroxyäthylmercapto-Gruppe zuzuordnen ist. In $CDCl_3$ beobachtet man bei δ = 3,75 ppm das Singulett der Methoxygruppe am aromatischen Amin. Es verdeckt teilweise das Triplet bei δ = 3,6 ppm mit der Integration 3 H, das der β -ständigen Methylengruppe der 2-Hydroxyäthylmercapto-Gruppe entspricht. Die α -ständige Methylengruppe erzeugt ein Triplet bei δ = 2,85 ppm.

2-[2-Methoxyphenylamino]-2-(2,4-dinitrophenylmercapto)-indan-1,3-dion (17)

1,78 g Ninhydrin (0,01 Mol) werden in Eisessig gelöst. Dazu wird eine Lösung von 1,23 g 2-Methoxyanilin (0,01 Mol) in Eisessig gegeben. Die Lösung wird kurz auf 70° erwärmt. Nachdem die Lösung tief violettrot gefärbt ist, wird eine Lösung von 2,35 g 2,4-Dinitrobenzolsulfenylchlorid (0,01 Mol) in Eisessig zugegeben. Nach mehrstündigem Stehen bei Raumtemp. ist die Lösung klar und braun geworden. Das Lösungsmittel wird bei Raumtemp. i. Vak. entfernt, der ölige Rückstand mit Chloroform aufgenommen und mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutral gewaschen. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Der ölige Rückstand wird mit wenig Methanol versetzt, wonach 17 auskristallisiert, das aus Äthanol umkristallisiert wird. Ausbeute: 0,6 g (8,6 %). Gelbes Kristallpulver, löslich in $DMSO$, wenig löslich in Methanol und Äthanol, schwer löslich in Chloroform und Dichlormethan, unlöslich in Petroläther. Schmp.: 267–269° (Äthanol) u. Zers. NMR-Spektrum ($DMSO-d_6$): Bei δ = 8,98 ppm befindet sich ein Dublett, das dem Proton in Stellung 3 des Nitroaromaten entspricht. Es zeigt nur eine Kopplung mit dem H 5 in Metastellung, J = 2,5 Hz. Bei δ = 8,45 ppm ist das Signal des H 5 am Nitroaromaten. Es wird einmal durch die Metakopplung mit dem H 3

($J = 2,5$ Hz.) und zusätzlich durch die Orthokopplung mit dem H 2 des gleichen Ringes ($J = 9$ Hz.) in etwa 4 gleich intensive Linien aufgespalten. Das Signal des H 2 am gleichen Ring befindet sich zusammen mit den Signalen der aromatischen Protonen am Indandion im Bereich von $\delta = 7,2$ bis $8,2$ ppm. Die Signale der Protonen am aromatischen Amin liegen im Bereich von $6,3$ bis $7,0$ ppm. Das Signal des Protons am Stickstoff wird durch das intensive Singulett der Methoxygruppe verdeckt, wie es auch schon bei den Verbindungen 7 und 11 der Fall war. Ein Austausch mit D_2O ist hier nicht möglich, da die Substanz dann ausfällt.

Anschrift: Prof. Dr. H.J. Roth, 53 Bonn-Endenich, An der Immenburg.

[Ph 466]

E. Lebenstedt[†] und W. Schunack

Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Histaminanaloga¹⁾, 5. Mitt.

Imidazo[4,5-h]isochinoline

Aus dem Fachbereich Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
(Eingegangen am 5. August 1974).

Es werden zwei Wege zur Darstellung des neuen Heterotricyclus Imidazo[4,5-h]isochinolin (7a) sowie zwei seiner partiell hydrierten Derivate 6, 7, 8, 9-Tetrahydro-imidazo[4,5-h]isochinolin (7b) und 4,5,5a,6,7,8,9,9a-Octahydro-imidazo-[4,5-h]isochinolin (7c) beschrieben.

Imidazo[4,5-h]isoquinolines

Two ways for the preparation of the new heterotricycle imidazo[4,5-h]isoquinoline (7a) and two of its partially reduced derivatives, 6, 7, 8, 9-tetrahydro-imidazo[4,5-h]isoquinoline (7b) and 4,5,5a,6,7,8,9,9a-octahydro-imidazo[4,5-h]isoquinoline (7c), are described.

[†] Teilergebnisse der Dissertation E. Lebenstedt.

1 4. Mitt.: W. Schunack, Arch. Pharmaz. 307, 517 (1974).