

Über Farbreaktionen mehrfach acylierter Aromaten mit Aminosäuren*

Randolph Riemschneider, Klaus Hennig und Thomas Wons

Institut für Biochemie, Freie Universität Berlin, D-1000 Berlin 45

(Eingegangen 24. Juni 1986. Angenommen 29. Juli 1986)

On Colour Reactions of Ortho-Acylated Benzene Derivatives with Amino Acids

The colour reactions of 10 *ortho*-acylated benzene derivatives with amino acids are described and compared with ninhydrin. The preparation of the new compounds: 1-ethyl-2,3,5-triacetyl- resp. 1,3-diethyl-2,4,5-triacetyl-benzene and 1-acetyl-2-propionylbenzene is given, including the NMR and MS data.

(Keywords: Acetyl-benzenes; Amino acid analysis)

In den letzten Jahren haben wir weitere mehrfach acylierte Aromaten hergestellt (Tabelle 1). Verbindungen mit *o*-ständigen Acylgruppen wurden bevorzugt angestrebt; *o*-Diacetylbenzol ist auf seine Eigenschaften als Reagenz auf Aminosäuren und Amine eingehend geprüft worden [1—3].

Die in Tabelle 1 aufgeführten Verbindungen sind auf ihre Nachweisempfindlichkeit und auf ihre Farbspezifität gegenüber Aminosäuren untersucht worden. Um die neuen Untersuchungsergebnisse mit früheren vergleichen zu können, brachten wir auch hier alle Aminosäuren bei *pH* 8.0 in *Kolthoff*-Puffer mit den in 96%igem Ethanol gelösten Acylverbindungen zur Reaktion [1, 2]. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengestellt. Hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit erscheinen das 1-Ethyl-2,3,5-triacetyl- und das 1,2,4-Triacetylbenzol (**5** und **4**) von besonderem Interesse.

Der Vollständigkeit halber geben wir im experimentellen Teil die Darstellungsvorschriften und Analytik der bisher unveröffentlichten Verbindungen **5** und **6** und nähere Hinweise auf die erstmals kristallin erhaltene Substanz **2** bekannt.

* 28. Mitt.: Acylverbindungen isocyclischer Verbindungen.

Tabelle 1. Farbreaktionen der *o*-Acylverbindungen

Aminosäure	1	2	3	4	5
	Geprüfte <i>o</i> -Acylver				
<i>L</i> -Ala	$10^{-3} M_v$	$10^{-3} M_{bl}$	$10^{-3} M_v$	$10^{-5} M_{rs}$	$10^{-5} M_v$
<i>L</i> -Arg	$10^{-2} M_v$	$10^{-2} M_{hbl}$	$10^{-3} M_v$	$10^{-3} M_v$	$10^{-5} M_v$
<i>L</i> -Gln	$10^{-3} M_{blv}$	$10^{-2} M_{grbl}$	$10^{-3} M_v$	$10^{-3} M_v$	$10^{-5} M_{rs}$
Gly	$10^{-4} M_v$	$10^{-4} M_{bl}$	$10^{-4} M_v$	$10^{-5} M_{hv}$	$10^{-5} M_v$
<i>L</i> -His	$10^{-3} M_{dv}$	$10^{-1} M_{rv}$	$10^{-3} M_o$	$10^{-3} M_{grbl}$	$10^{-4} M_v$
<i>L</i> -Hyp	$10^{-1} M_{hg}$	$10^{-1} M_{hv}$	$10^{-3} M_v$	$10^{-6} M_v$	$10^{-3} M_v$
<i>L</i> -Ile	$10^{-3} M_v$	$10^{-4} M_{grbl}$	$10^{-4} M_v$	$10^{-4} M_v$	$10^{-4} M_v$
<i>L</i> -Leu	$10^{-4} M_{rv}$	$10^{-2} M_{hbl}$	$10^{-4} M_v$	$10^{-4} M_v$	$10^{-5} M_{rs}$
<i>L</i> -Lys	$10^{-4} M_v$	$10^{-4} M_{grbl}$	$10^{-5} M_v$	$10^{-5} M_v$	$10^{-5} M_v$
<i>DL</i> -Met	$10^{-4} M_v$	$10^{-4} M_{bl}$	$10^{-4} M_v$	$10^{-6} M_v$	$10^{-4} M_{rs}$
<i>L</i> -Pro	$10^{-1} M_g$	$10^{-2} M_g$	$10^{-1} M_g$	$10^{-2} M_g$	$10^{-2} M_g$
<i>L</i> -Ser	$10^{-2} M_v$	$10^{-2} M_v$	$10^{-5} M_{grv}$	$10^{-5} M_v$	$10^{-5} M_v$
<i>DL</i> -Thr	$10^{-2} M_v$	$> 10^{-1} M_v$	$10^{-3} M_v$	$10^{-1} M_{rs}$	$10^{-3} M_{or}$
<i>L</i> -Val	$10^{-2} M_v$	$10^{-1} M_{hbl}$	$10^{-3} M_v$	$10^{-3} M_v$	$10^{-4} M_v$

Farblgende (bei *pH* 8.0): *bl* blau, *gr* grau, *or* orange, *br* braun, *gn* grün, *r* rot, *d* dunkel,

Experimenteller Teil

Farbreaktionen auf Tüpfelplatten

14 Aminosäuren (AS) wurden in Konzentrationen von 10^{-1} bis $10^{-6} M$ in *Kolthoff*-Puffer *pH* 8.0 (10.1 g Borax/l (a); 13.62 g KH_2PO_4 /l (b); Pufferlösung: 53.5 ml a und 46.5 ml b) gelöst. Aus Gründen der z. T. sehr geringen Verfügbarkeit einzelner Testreagenzien wurde durchweg mit 0.01 *M* Lösungen in 96%igem Ethanol gearbeitet.

In Probengläschen wurden je 100 μ l AS-Lösung und Reagenzlösung pipettiert, wobei es bei den konzentrierteren AS-Lösungen z. T. schon nach wenigen min zur Farbauscheidung kam. Die nach 30 min Stehen noch ungefärbten Mischungen wurden über kleiner Flamme zum Sieden erhitzt, um das Ethanol zu verflüchtigen, wobei es bei weiteren Mischungen zur Farbauscheidung kam. Die Grenzkonzentration der AS wurde durch Überführen von noch ungefärbten bzw. sehr schwach gefärbten Lösungen auf eine Tüpfelplatte und Erhitzen im Trockenschrank auf 80 °C bis zur Trockne (ca. 30 min) ermittelt. In Tabelle 1 sind die Grenzkonzentrationen nebst Färbungen zusammengestellt. In Tabelle 2 sind noch einmal diejenigen Substanzen aufgeführt, die für die jeweilige AS eine höhere Nachweisempfindlichkeit besitzen als die Standardreagenzien 1 und 11.

Bei von *pH* 8.0 abweichenden Werten werden teilweise andere Färbungen beobachtet.

1-Acetyl-2-propionylbenzol (2) aus 1-Methyl-4-ethylnaphthalin (12)

In 100 ml 90%iger Essigsäure wurden 6.68 g (0.04 mol) **12**, Kp._{16mbar} 138–140 °C (durch *Wolff-Kizner*-Reduktion von 1-Methyl-4-acetylnaphthalin) bei 50 bis 52 °C innerhalb von 30 min mit einer Lösung von 16 g (0.16 mol) CrO_3 in 50 ml

mit Aminosäuren: Grenzkonzentration und Färbung

bindungen (Exp. Teil)

6	7	8	9	10	11
$10^{-3} M v$	$10^{-2} M v$	$10^{-3} M brv$	$10^{-3} M blv$	$10^{-3} M brv$	$10^{-3} M vbr$
$10^{-1} M vbr$	$10^{-3} M v$	$10^{-3} M v$	$10^{-2} M blv$	$10^{-2} M gbr$	$10^{-2} M v$
$10^{-2} M rv$	$10^{-3} M v$	$10^{-5} M rs$	$10^{-3} M rv$	$10^{-2} M brv$	$10^{-2} M vbr$
$10^{-5} M blv$	$10^{-4} M v$	$10^{-4} M v$	$10^{-5} M hv$	$10^{-5} M brv$	$10^{-4} M blv$
$10^{-2} M o$	$10^{-3} M ggn$	$10^{-3} M o$	$10^{-3} M o$	$10^{-3} M gbr$	$10^{-3} M v$
$10^{-1} M rv$	$10^{-1} M v$	$10^{-5} M v$	$10^{-1} M v$	$10^{-1} M org$	$10^{-2} M or$
$10^{-2} M v$	$10^{-3} M v$	$10^{-3} M v$	$10^{-2} M v$	$10^{-3} M vbl$	$10^{-2} M v$
$10^{-3} M v$	$10^{-2} M blv$	$10^{-6} M rs$	$10^{-3} M blv$	$10^{-4} M blv$	$10^{-3} M v$
$10^{-4} M blv$	$10^{-4} M brv$	$10^{-4} M v$	$10^{-4} M v$	$10^{-4} M br$	$10^{-3} M or$
$10^{-4} M v$	$10^{-4} M rv$	$10^{-4} M rs$	$10^{-4} M v$	$10^{-3} M brv$	$10^{-3} M v$
$10^{-1} M hg$	$> 10^{-1} M hg$	$10^{-2} M g$	$10^{-1} M g$	$10^{-1} M g$	$10^{-2} M gbr$
$10^{-2} M v$	$10^{-3} M v$	$10^{-3} M v$	$10^{-3} M v$	$10^{-2} M obr$	$10^{-2} M v$
$10^{-2} M rs$	$10^{-2} M rv$	$10^{-3} M or$	$10^{-2} M v$	$10^{-2} M rbr$	$10^{-2} M blv$
$10^{-1} M grbl$	$10^{-3} M v$	$10^{-3} M v$	$10^{-2} M v$	$10^{-2} M br$	$10^{-3} M v$

h hell, *rs* rosa, *g* gelb, *o* oliv, *v* violettTabelle 2. Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit von Aminosäuren gegenüber den Standard-Reagenzien *o*-Diacetylbenzol (1) und Ninhydrin (11)

Amino- säure	Grenzkonz. mit 1	Grenzkonz. mit 11	Niedrigere festgestellte Grenzkonz. mit den Verbindungen 3—10
<i>L</i> -Ala	$10^{-3} M$	$10^{-3} M$	$10^{-5} M$ (4, 5)
<i>L</i> -Arg	$10^{-2} M$	$10^{-2} M$	$10^{-3} M$ (3, 4, 7, 8)
			$10^{-5} M$ (5)
<i>L</i> -Gln	$10^{-3} M$	$10^{-2} M$	$10^{-5} M$ (5, 8)
Gly	$10^{-4} M$	$10^{-4} M$	$10^{-5} M$ (4—6, 9, 10)
<i>L</i> -His	$10^{-3} M$	$10^{-3} M$	$10^{-4} M$ (5)
<i>L</i> -Hyp	$10^{-1} M$	$10^{-2} M$	$10^{-3} M$ (3, 5)
			$10^{-5} M$ (8)
			$10^{-6} M$ (4)
<i>L</i> -Ile	$10^{-3} M$	$10^{-2} M$	$10^{-4} M$ (2—5)
<i>L</i> -Leu	$10^{-4} M$	$10^{-3} M$	$10^{-5} M$ (5)
			$10^{-6} M$ (8)
<i>L</i> -Lys	$10^{-4} M$	$10^{-3} M$	$10^{-5} M$ (3—5)
<i>DL</i> -Met	$10^{-4} M$	$10^{-3} M$	$10^{-6} M$ (4)
<i>L</i> -Pro	$10^{-1} M$	$10^{-2} M$	—
<i>L</i> -Ser	$10^{-2} M$	$10^{-2} M$	$10^{-3} M$ (7—9)
			$10^{-5} M$ (3—5)
<i>DL</i> -Thr	$10^{-2} M$	$10^{-2} M$	$10^{-3} M$ (3, 5, 8)

80%iger Essigsäure versetzt. Nach 24 h Rühren bei 25 °C wurde das überschüssige CrO_3 mit Methanol reduziert und die Essigsäure im Vakuum abgezogen. Der grünbraune Rückstand wurde in 40 ml Wasser aufgenommen und mit Ether im Perforator erschöpfend extrahiert. Die neutralisierte und getrocknete etherische Phase wurde vom Lösungsmittel befreit, mit 5 ml CH_2Cl_2 versetzt und einer chromatographischen Trennung über Kieselgel (mobile Phase Methylenchlorid) unterworfen. Es konnten neben einem g nicht umgesetzten Ausgangsmaterials 3 g **2** (aus Ligroin) erhalten werden. Ausbeute: 3 g farblose Kristalle = 50% d. Th. bezogen auf Umsatz. — Bisher nur als Öl erhalten [1].

Fp. = 49–50 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 270 MHz): δ = 7.64 (quint, 1 H, J = 7 and 3 Hz, *Ar-H* 3), 7.56 (quint, 2 H, J = 7 and 3 Hz, *Ar-H* 4 and 5), 7.46 (quint, 1 H, J = 7 and 3 Hz, *Ar-H* 6), 2.81 (q, 2 H, J = 8 Hz, Propionyl- CH_2), 2.56 (s, 3 H, Acetyl- CH_3), 1.24 (s, 3 H, Propionyl- CH_3). MS (80 eV, 40 °C): m/e = 176 (M^+), 161 ($M-\text{CH}_3$), 148 ($M-\text{C}_2\text{H}_4$), 147 ($M-\text{C}_2\text{H}_5$), 133 ($M-\text{CH}_3\text{CO}$).

1-Ethyl-2,3,5-triacetylbenzol (5) durch Permanganatoxydation von 2,4,6-Triethylacetophenon (13)

20.4 g (0.1 mol) **13** (Kp.- $_{5\text{mbar}}$ 115–118 °C) wurden in 100 ml Wasser und 1 g Trioctylmethylammoniumchlorid unter starkem Rühren suspendiert und bei 85 °C innerhalb von 8 h mit einer Verreibung von 63.2 g (0.4 mol) KMnO_4 und 98.6 g (0.4 mol) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oxidiert. Nach vollständiger Umsetzung des Permanganats wurde vom entstandenen MnO_2 abgesaugt, MnO_2 und Filtrat erschöpfend mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden vom Lösungsmittel befreit und über Kieselgel 60 mit CHCl_3 /Essigester (99:1) chromatographisch getrennt. Neben 10.4 g unumgesetztem **13** wurden 3.2 g **5** (aus Aceton) isoliert. Ausbeute: 3.2 g farblose Nadeln = 30% d. Th. bezogen auf Umsatz.

Fp. 105–106 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 270 MHz): δ = 8.3 (s, 1 H, *Ar-H* 4), 8.03 (s, 1 H, *Ar-H* 6), 2.69 (s, 3 H, 2-Acetyl- CH_3), 2.68 (s, 3 H, 4-Acetyl- CH_3), 2.62 (q, 2 H, J = 6.4 Hz, *Et-CH}_2), 2.49 (t, 3 H, J = 6.4 Hz, *Et-CH}_3). MS (80 eV, 80 °C): m/e = 232 (M^+), 218 ($M-\text{CH}_2$), 217 ($M-\text{CH}_3$), 189 ($M-\text{COCH}_3$), 175 ($M-\text{COCH}_3-\text{CH}_2$), 77 ($M-\text{COCH}_3-2\text{COCH}_2-\text{C}_2\text{H}_4$), 43 (COCH_3).**

1,3-Diethyl-2,4,5-triacetylbenzol (6) aus 1,3,5-Triethyl-2,4-diacetylbenzol (14)

Analog zur vorstehenden Vorschrift wurden 24.6 g (0.1 mol) **14** (Fp. 77.5 °C) eingesetzt. Nach erfolgter Umsetzung (Dauer 48 h) wurde wie oben beschrieben aufgearbeitet. Neben 20 g **14** wurden 2.43 g **6** isoliert. Ausbeute: 2.43 g farblose Nadeln = 50% d. Th. bezogen auf Umsatz.

Fp. 102 °C. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 270 MHz): δ = 7.62 (s, 1 H, *Ar-H*), 2.61 (s, 3 H, 1-Acetyl- CH_3), 2.59 (q, 2 H, J = 8 Hz, 3-*Et-CH}_2), 2.54 (s, 3 H, 2-Acetyl- CH_3), 2.50 (s, 3 H, 4-Acetyl- CH_3), 2.45 (q, 2 H, J = 8 Hz, 5-*Et-CH}_2), 1.27 (t, 3 H, J = 8 Hz, 3-*Et-CH}_3), 1.12 (t, 3 H, J = 8 Hz, 5-*Et-CH}_3). MS (80 eV, 80 °C): m/e = 260 (M^+), 245 ($M-\text{CH}_3$), 231 ($M-\text{C}_2\text{H}_5$), 227 ($M-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}$), 217 ($M-\text{CH}_3\text{CO}$), 175 ($M-\text{CH}_3\text{CO}-\text{COCH}_2$), 161 ($M-\text{CH}_3\text{CO}-\text{COCH}_2-\text{CH}_2$), 128 ($M-\text{CH}_3\text{CO}-2\text{COCH}_2-\text{CH}_2$), 115, 91 ($M-\text{COCH}_3-2\text{COCH}_2-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}_2$), 77, 43 (COCH_3).****

Weitere getestete *o*-acylierte Benzole:

1,2-Diacetylbenzol (**1**): Fp. 40 °C [1, 4, 5].

1-Acetyl-2-propionylbenzol (**2**): Fp. 49–50 °C [1].

1,2,3-Triacetylbenzol (**3**): Fp. 149 °C [6].

1,2,4-Triacetylbenzol (**4**): Fp. 75 °C [7, 8].

1-Methyl-3-ethyl-5,6-diacetylbenzol (7) (nur im Gemisch mit 96% 1-Methyl-3-ethyl-2,5-diacetylbenzol): $Kp_{0,4\text{ mbar}}$ 117 °C, n_D^{20} 1.5350 [9].

1-Methyl-2,3,5-triacetylbenzol (8): Fp. 106.5 °C [9].

1-Methyl-3-ethyl-2,5,6-triacetylbenzol (9): Fp. 149.5 °C [10].

1-Methyl-2,3,5,6-tetraacetylbenzol (10): Fp. 183.6 °C [10].

Und zum Vergleich Ninhydrin (11): Fp. 241.3 °C [11, 12].

Literatur

- [1] *Riemschneider R, Weygand C* (1955) *Monatsh Chem* 86: 201–209
- [2] *Riemschneider R, Wierer J* (1963) *Z Anal Chem* 193: 186–189
- [3] *Weygand F, Weber H, Maekawa E, Eberhardt G* (1956) *Chem Ber* 89: 1994
- [4] *Riemschneider R, Förster S* (1962) *Monatsh Chem* 93: 616–617
- [5] *Riemschneider R, Nolde K, Hennig K* (1973) *Monatsh Chem* 104: 987–989
- [6] *Riemschneider R, Diedrich B* (1960) *Naturwiss* 12: 279
- [7] *Hopft H, Grasshoff J* (1964) *Helv Chem Acta* 47: 1333–1335
- [8] *Riemschneider R, Wons T* (1983) *Monatsh Chem* 114: 1267–1268
- [9] *Riemschneider R, Hennig K* (1985) *Monatsh Chem* 116: 873–876
- [10] *Riemschneider R, Hennig K* (1984) *Z Naturforsch* 39 b: 835–838
- [11] *Ruhemann S* (1910) *Soc* 97: 1446, 2028
- [12] *Houben-Weyl* (1973) *Methoden Org Chem* 7/2 a: 547