

Neue Reagentien zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren, 2. Mitt.¹

Von

Helga Wittmann *

Aus dem Institut für Organische und Pharmazeutische Chemie
der Universität Graz

(Eingegangen am 29. Januar 1965)

Es wird über eine Synthese von Derivaten des Chinisatins, in denen der Wasserstoff in 1-Stellung durch einen Alkyl-, Aryl- bzw. Aralkylrest ersetzt ist, berichtet. N-Methyl- (I), N-Phenyl- (II) und N-Benzyl-Chinisatin (III) eignen sich vortrefflich zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren, wobei sich N-Methylchinisatin (I) als besonders empfindliches Sprühreagens erweist.

The syntheses of N-alkyl and N-aryl substituted quinisatines is described. N-methyl- (I), N-phenyl- (II), and N-benzylquinisatin (III) are excellent spray reagents for the detection of amino acids on paper chromatograms; N-methylquinisatin (I) proved to be the most sensitive.

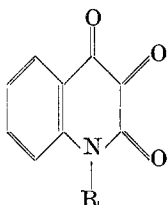
Versuche, neue o-Diketoverbindungen¹ als Farbreagentien auf Aminosäuren zu verwenden, haben gezeigt, daß Chinisatin als Sprühreagens zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren nicht geeignet ist, während 1,8-Trimethylenchinisatin¹ und 1,9-Mesoxalylcarbazol¹ noch mit 1 µg der meisten Aminosäuren deutliche Farbflecke geben. Es lag daher nahe, anzunehmen, daß im Chinisatin durch eine tautomere Verschiebung des am Stickstoff gebundenen Wasserstoffes keine echte o-Dicarbonylverbindung vorliegt und die Farbreaktion daher unterbleiben muß.

In Weiterführung dieser Untersuchungen wurden nun Derivate des Chinisatins synthetisiert, in denen das bewegliche Wasserstoffatom durch einen Alkyl-, Aryl- bzw. Aralkylrest ersetzt wurde, um sie auf ihre Verwendbarkeit zum papierchromatographischen Nachweis von Amino-

* Herrn Prof. Dr. F. Kuffner zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ Als 1. Mitt. dieser Reihe gilt: Mh. Chem. **95**, 1198 (1964).

säuren zu prüfen. Es sind dies das N-Methyl- (I), N-Phenyl- (II) und N-Benzylchinisatin (III).



- I: R = CH₃
 II: R = C₆H₅
 III: R = CH₂ · C₆H₅

Da diese Verbindungen keine Enolform ausbilden können, war zu erwarten, daß sie sich gegenüber Aminosäuren so wie 1,8-Trimethylenchinisatin¹ verhalten sollten. Diese Annahme wurde durch die experimentellen Ergebnisse vollkommen bestätigt. Alle drei Verbindungen stellen sehr brauchbare Reagentien zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren dar. Doch ist aus Tab. 1 ersichtlich, daß die Empfindlichkeit der Farbreaktion beim N-Methylchinisatin (I) am größten ist, denn mit diesem lassen sich eine Reihe von Aminosäuren noch unter 1 µg deutlich sichtbar machen. II und III dagegen zeigen erst mit 1–5 µg Aminosäure eine ausgeprägte Farbreaktion, ausgenommen Glycin (0,25 µg). Diese Befunde lassen erkennen, daß es nicht gleichgültig ist, durch welchen Substituenten der Wasserstoff am Stickstoff des Chinisatinmoleküls ersetzt ist.

In diesem Zusammenhang sind auch Untersuchungen von *R. Riemschneider*² interessant, die durch Abwandlung des o-Diacetylbenzolmoleküls den Einfluß von Substituenten auf die Farbstoffbildung mit Aminosäuren zeigen konnten. Während o-Diacetylbenzol und o-Dipropionylbenzol zum Nachweis von Aminosäuren geeignet sind, reagieren die entsprechenden m-Verbindungen sowie o-Acetylbenzophenon nicht. Auch o-Acetylbenzamid und seine N-Substitutionsprodukte geben keine Farbreaktionen. Der Benzolkern läßt sich durch eine Reihe anderer Ringsysteme ersetzen, die jedoch mindestens eine Doppelbindung enthalten müssen, wie am 1,2-Diacetylcyclohexan (keine Farbreaktion) und am *cis*- und *trans*-4,5-Diacetylcyclohexen-(1) (positive Farbreaktion) gezeigt werden konnte. 1,2-Diacetylcyclopentadien kann eine Enolform ausbilden und gibt daher mit Aminosäuren keinen Farbstoff.

Alle diese Beobachtungen zeigen deutlich, daß die o-Dicarbonylfunktion wohl eine wichtige Voraussetzung für die Farbstoffbildung mit Aminosäuren darstellt, jedoch auch andere Substituenten ihren Einfluß bei dieser Reaktion geltend machen. Von den bisher bekannten Reagentien auf Aminosäuren scheint das N-Methylchinisatin (I) wohl eines der empfindlichsten zu sein.

² *R. Riemschneider, H. G. Kaahn und L. Hörner, Mh. Chem.* **91**, 1034 (1960).

Tabelle 1. μg Aminosäure, die sich beim Besprühen der Papierchromatogramme mit 0,2proz. alkohol. Lösungen von I, II und III deutlich nachweisen lassen

	I	II	III
Alanin	0,5	1	1
Arginin	0,5	2	1
Asparaginsäure	0,5	1	2
Asparagin	0,5	1	1
Cystin	0,5	2	1
Cystein	1	2	2
Glutaminsäure	1	1	2
Glutamin	0,25	1	2
Glycin	0,25	0,25	0,25
Histidin	1	2	1
Hydroxyprolin	5	—*	—*
Leucin	2	2	2
Lysin	0,5	0,5	1
Methionin	1	2	2
Ornithin	0,25	2	2
Phenylalanin	2	2	2
Prolin	5	—*	—*
Serin	0,5	1	1
Tryptophan	2	2	2
Tyrosin	1	5	5
Valin	1	5	2

* Prolin und Hydroxyprolin geben bis zu 5 μg keine Farbreaktion mit II und III.

Experimenteller Teil

1. 1-Methyl-3,3-dichlor-4-hydroxycarbostyryl

4,5 g N-Methyl-4-hydroxycarbostyryl³ werden in 20 ml Dioxan analog dem Verfahren von E. Ziegler⁴ und Mitarb. mit 7 ml SO_2Cl_2 chloriert. Nach dem Abkühlen versetzt man mit der doppelten Menge Eiswasser und erhält so 6,1 g (96% d. Th.) der Dichlorverbindung. Aus Äthanol gelbe Prismen vom Schmp. 147°.

$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{NO}_2$. Ber. Cl 29,05. Gef. Cl 29,02.

2. 1-Methyl-3-chlor-4-hydroxycarbostyryl

5 g 1-Methyl-3,3-dichlor-4-hydroxycarbostyryl werden in 80 ml Äthanol und 10 ml Eisessig in der Siedehitze durch portionsweise Zugabe von Zn-Staub reduziert⁴. Aus der farblosen Lösung fallen beim Verdünnen mit Wasser Kristalle an. Aus Äthanol farblose Nadeln, 3 g (75% d. Th.).

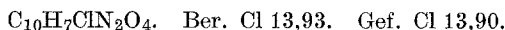
$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClNO}_2$. Ber. Cl 16,92. Gef. Cl 16,76.

³ E. Ziegler und H. Junek, Mh. Chem. **90**, 762 (1959).

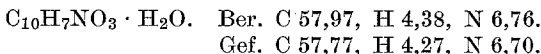
⁴ E. Ziegler, R. Salvador und Th. Kappe, Mh. Chem. **93**, 1376 (1962).

3. *1-Methyl-3-chlor-3-nitro-4-hydroxycarbostyryl*

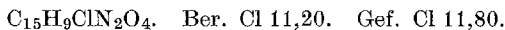
Man löst 1 g 1-Methyl-3-chlor-4-hydroxycarbostyryl in 12 ml sied. Eisessig, kühlt auf 50° ab und versetzt mit 0,5 ml HNO₃ (*D* 1,4)⁵. Aus der dunkelroten Lösung kristallisieren beim Abkühlen 0,6 g (50% d. Th.) der Chlor-nitroverbindung. Zur Reinigung wird mit Alkohol angerieben. Gelbe Balken, die beim Erhitzen über 120° in 1-Methylchinoisatin (I) übergehen und bei 234—235° schmelzen.

4. *N-Methylchinoisatin (I)*

0,6 g 1-Methyl-3-chlor-3-nitro-4-hydroxycarbostyryl werden in 2 ml Xylol zum Sieden erhitzt⁵. Nach beendeter Gasentwicklung läßt man erkalten und isoliert I in Form von dunkelroten Prismen. Ausb. 0,4 g (91% d. Th.). Schmp. 234—235°. Aus wenig Wasser kristallisiert das hellgelbe Hydrat von I.

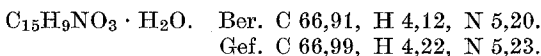
5. *1-Phenyl-3-chlor-3-nitro-4-hydroxycarbostyryl*

2 g 1-Phenyl-3-chlor-4-hydroxycarbostyryl⁴ werden in 30 ml Eisessig mit 1 ml HNO₃ (*D* 1,4) analog Vers. 3 nitriert. Es resultieren gelbe Plättchen, die nach Anreiben mit Alkohol bei 213—215° schmelzen. Ausb. 1,3 g (57% d. Th.).

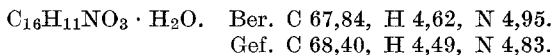
6. *N-Phenylchinoisatin (II)*

1,3 g 1-Phenyl-3-chlor-3-nitro-4-hydroxycarbostyryl ergeben nach der thermischen Spaltung in Xylol analog Vers. 4 1 g II (77% d. Th.) vom Schmp. 215°.

Nach dem Umkristallisieren aus Wasser resultiert das gelbe Hydrat von II.

7. *N-Benzylchinoisatin (III)*

2,5 g 1-Benzyl-3-chlor-4-hydroxycarbostyryl⁶ werden in 10 ml Eisessig und 1 ml konz. HNO₃ analog Vers. 3 nitriert und die Chlornitroverbindung nach Anreiben mit Alkohol sofort der thermischen Zersetzung, wie unter Vers. 4 beschrieben, zugeführt. Es resultieren 1,3 g III (68% d. Th.) vom Schmp. 135°, welches beim Umkristallisieren aus Wasser das Hydrat von III in Form gelber Blättchen gibt.



⁵ E. Ziegler und Th. Kappe, Mh. Chem. **95**, 59 (1964).

⁶ E. Ziegler und Th. Kappe, Mh. Chem. **94**, 736 (1963).