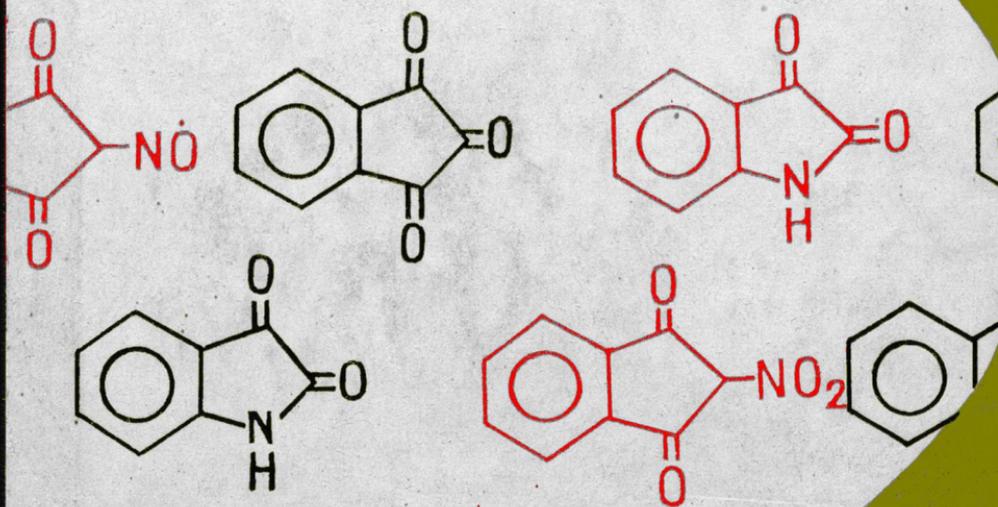


# В. П. Ошкая НИНГИДРИНОВЫЕ РЕАКЦИИ



АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР  
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ  
ИМ. АВГУСТА КИРХЕНШТЕЙНА

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР  
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ  
ИМ. АВГУСТА КИРХЕНШТЕЙНА

В. П. ОШКАЯ

# НИНГИДРИНОВЫЕ РЕАКЦИИ

ИЗДАТЕЛЬСТВО «ЗИНАТНЕ»  
РИГА 1974

**Нингидриновые реакции.** Ошкая В. П. Рига, «Зинатне», 1974, 176 с.

В монографии рассматриваются получение, реакционная способность, биологическая активность и аналитическое использование нингидрина и его аналогов: гидрата перинафтиндантриона-1,2,3, производных нингидрина, аллоксана, изатина, хинизатина. Особое внимание уделено обсуждению нингидриновой реакции аминов и аминокислот и сравнению ее с мурексидной реакцией аллоксана, реакциями изатина и хинизатина и их производных с аминосоединениями.

Работа может дать некоторое теоретическое представление о реакциях циклических кетонов с аминосоединениями, облегчить выбор реагента и, в известной степени, методики анализа для решения конкретной аналитической задачи.

Книга предназначена для широкого круга химиков-органиков, биохимиков и физиологов, занимающихся изучением аминов, аминокислот и других органических соединений.

Табл. 7, библ. 684 назв.

*Печатается по решению  
Редакционно-издательского совета Академии наук  
Латвийской ССР от 22 февраля 1973 года*

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Нингидрин является одним из наиболее известных и часто применяемых реагентов органического анализа. Высокая реакционная способность нингидрина позволяет использовать его для синтеза различных производных индандиона-1,3 и гетероциклических систем.

Нингидриновая реакция аминокислот и аминов широко используется в биохимическом анализе. Для решения конкретной аналитической задачи иногда применяют родственные нингидрину соединения: гидрат перинафтиндантриона-1,2,3, аллоксан, изатин, хинизатин. В книге сделана попытка рассмотреть совместно названные реагенты как соединения, которые по принципиально одинаковой схеме — схеме собственно нингидриновой реакции — реагируют с аминосоединениями. В то же время каждый из этих аналогов нингидрина в реакциях с аминами и аминокислотами проявляет свои особенности, изучение которых позволит нагляднее и основательнее изобразить сложный механизм собственно нингидриновой реакции.

Для более глубокого понимания реакционной способности нингидрина в нингидриновой реакции и родственных ему соединений в аналогичных реакциях перед рассмотрением механизмов нингидриновых реакций в работе пришлось коротко остановиться на реакциях этих циклических поликарбонильных соединений, в которых участвуют соединения, не содержащие аминогруппы. Это тем более важно, что отдельные стадии последних реакций,

например альдольного присоединения, окисления—восстановления, расщепления цикла и др., имеют место при протекании нингидриновой реакции как таковой.

Нингидриновая реакция представляет собой очень сложную, многостадийную цепь последовательно протекающих реакций. На ход ее отдельных стадий и на реакцию в целом большое влияние оказывают условия проведения реакции: среда, рН, температура, присутствие посторонних компонентов и т. п. Думается, что рассмотрение именно механизма нингидриновой реакции и связанных с ним вопросов позволит более правильно подойти к решению практических вопросов анализа аминосоединений с использованием нингидрина и его аналогов. Совместное сравнительное рассмотрение нингидрина и его аналогов может послужить тому, что при решении конкретной аналитической задачи будет выбран наиболее подходящий нингидриновый реактив.

Объем работы не позволил использовать весь литературный материал и более детально разработать затронутые вопросы.

Выражаю глубокую признательность Дз. Муцениеце за помощь в подготовке этой книги.

*Автор*

## Глава I

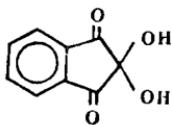
# ХИМИЯ НИНГИДРИНА И НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

### ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

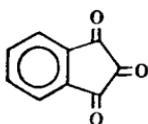
Органическая химия поражает красотой реакций, многообразием свойств соединений. Ее разделы развиваются неравномерно. Существуют органические соединения, о которых со временем накапливается столько фактического и теоретического материала, что вырастают крупные разделы химии этих соединений. Так, о циклическом трикетоне — нингидрине в течение 60 лет, прошедших со времени его синтеза, проведено такое количество исследований, что в настоящее время можно говорить о химии нингидрина.

Синтез нингидрина, а также открытие и первое изучение нингидриновой реакции связаны с именем Зигфрида Руэмана (1859—1943), изучавшего азотсодержащие гетероциклы,  $\beta$ -кетокислоты и циклические дикарбонильные соединения [1, 2].

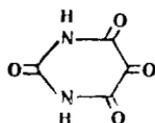
При изучении вопросов енолизации дикарбонильных соединений Руэман завершил синтез гидрата дикетогидриндена, или нингидрина, (1), установил его структуру, открыл цветную реакцию нингидрина с аминокислотами и создал первую теорию нингидриновой реакции.



1



2



3

Для выяснения механизма нингидриновой реакции Руэман синтезировал гидриндантин и ряд других промежуточных продуктов нингидриновой реакции.

Первые образцы гидрата трикетогидриндена, или индантриона-1,2,3, Руэман прислал знаменитому биохимику того времени Абдергальдену, который и назвал гидрат индантриона-1,2,3 нингидрином [3]. С тех пор названия «нингидрин» и «нингидриновая

реакция» прочно вошли в химическую литературу. Следует отметить, что Руэман в своих работах этими названиями не пользовался.

С 1910 г., когда был синтезирован нингидрин [4] и открыта цветная реакция нингидрина с  $\alpha$ -аминокислотами [5], о цветных реакциях нингидрина с различными соединениями опубликовано большое число работ прикладного и теоретического характера. Нингидриновая реакция стала одной из наиболее часто применяемых биохимических реакций. Она используется для колориметрического и хроматографического определения аминокислот, аминов, витаминов и ряда других соединений. Нингидриновая реакция положена в основу принципа работы автоматических анализаторов аминокислот.

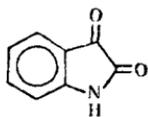
Несмотря на столь широкое практическое применение нингидриновой реакции, ее механизм до сих пор нельзя считать полностью установленным [6, 7]. Это объясняется, очевидно, исключительной сложностью нингидриновой реакции. В зависимости от условий выполнения реакции, как сообщается в работах последних лет, может образоваться несколько окрашенных продуктов реакции. Протеиновые аминокислоты объединяют соединения, принадлежащие по структуре к различным химическим группам и требующие различных условий проведения реакции для достижения оптимального выхода однородного красящего вещества.

Нингидрин обладает высокой реакционной способностью. Он активно реагирует с аминосоединениями, которым уделялось главное внимание в большинстве работ о нингидриновой реакции. Однако, как свидетельствуют работы последних лет, нингидрин легко взаимодействует с реактивом Гриньяра, диазосоединениями, серо- и фосфорсодержащими соединениями, диенами, соединениями ароматического характера и содержащими активную метиленовую группу и др.

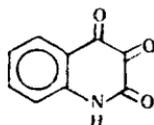
Химия нингидрина в настоящее время выросла в самостоятельный и весьма своеобразный раздел циклических карбонильных соединений. Уже в первых работах о нингидрине и нингидриновой реакции проводилось их сравнение соответственно с аллоксаном (3) и мурексидной реакцией. Действительно, в химическом поведении нингидрина и аллоксана много общего, что особенно заметно при совместном рассмотрении аналитических и синтетических реакций этих двух циклических трикарбонильных соединений.

О нингидрине [6] и нингидриновой реакции [6, 7] имеются небольшие обобщающие работы, но в них не рассматриваются реакции, не имеющие аналитического значения. Однако чем полнее будут изучены химический характер и реакционная способность нингидрина, тем успешнее можно будет использовать его и в аналитических целях.

Исходя из этих соображений была предпринята попытка рассмотреть совместно основные реакции нингидрина. Для более полного раскрытия химического характера нингидрина в этой работе рассматриваются также реакции аллоксана и его структурных аналогов — изатина (4) и хинизатина (5).

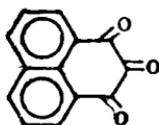


4

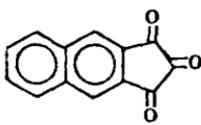


5

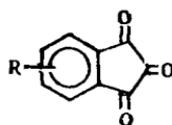
Цветную нингидриновую реакцию с аминокислотами дают также аналоги и производные нингидрина: перинафтиндантрион-1,2,3 (6), 5,6-бензиндантрион-1,2,3 (7) и замещенные во фталоильном кольце нингидрины (8).



6



7



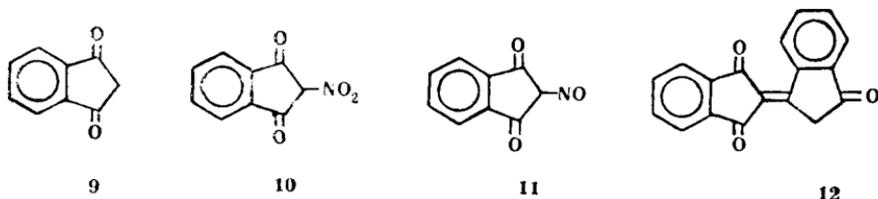
8

Понятие «нингидриновая реакция» в настоящее время охватывает, по сути дела, целую группу органических реакций. Нингидриновыми именуют несколько различающихся между собой реакций нингидрина с аминокислотами, а также цветные реакции аналогов и производных нингидрина.

В настоящей работе выражение «нингидриновая реакция» предлагается дифференцировать, т. е. употреблять его как в более узком, так и в более широком смысле. Название «нингидриновая реакция» в узком смысле следует употреблять для обозначения исторической реакции нингидрина с аминокислотами и другими соединениями, в результате которых образуется пурпур Руэмана, подобно мурексиду в мурексидной реакции аллоксана. Тогда более общим понятием «нингидриновые реакции» можно будет обозначать остальные цветные реакции нингидрина, которые часто сопутствуют собственно нингидриновой реакции. Такой подход к цветным реакциям аминокислот, аминов и других соединений с нингидрином и его аналогами применен в данной книге и при выборе ее названия.

Кроме упомянутых циклических кетонов: аллоксана (3), изатина (4), хинизатина (5), перинафтиндантриона-1,2,3 (6), бензиндантриона-1,2,3 (7) и производных нингидрина (8) — в данном обзоре некоторое место уделено рассмотрению цветных

аналитических реакций индандиона-1,3 (9) и его производных: 2-нитроиндандиона-1,3 (10), 2-нитрозоиндандиона-1,3 (11) и биндона (12). Это делалось с целью наиболее полно охарактери-



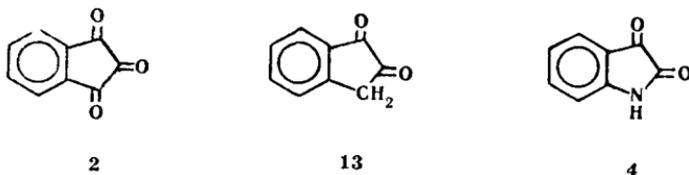
зовать нингидрин — очень ценный и широко используемый аналитический реагент класса циклических кетонов.

Высокая реакционная способность нингидрина и его аналогов используется не только для аналитических и синтетических целей, но и для химической модификации нуклеиновых кислот, полипептидов и других макромолекул. Последние реакции и особенно их изучение на модельных соединениях условно можно рассматривать как переходный этап к изучению нингидриновых реагентов на живых организмах.

Хотя биологической активности нингидрина и его аналогов в данном обзоре уделено сравнительно мало места, можно, однако, утверждать, что более полное изучение химической природы этих соединений углубит наши представления о их биологической активности, так как последняя есть результат химического воздействия на молекулярном уровне.

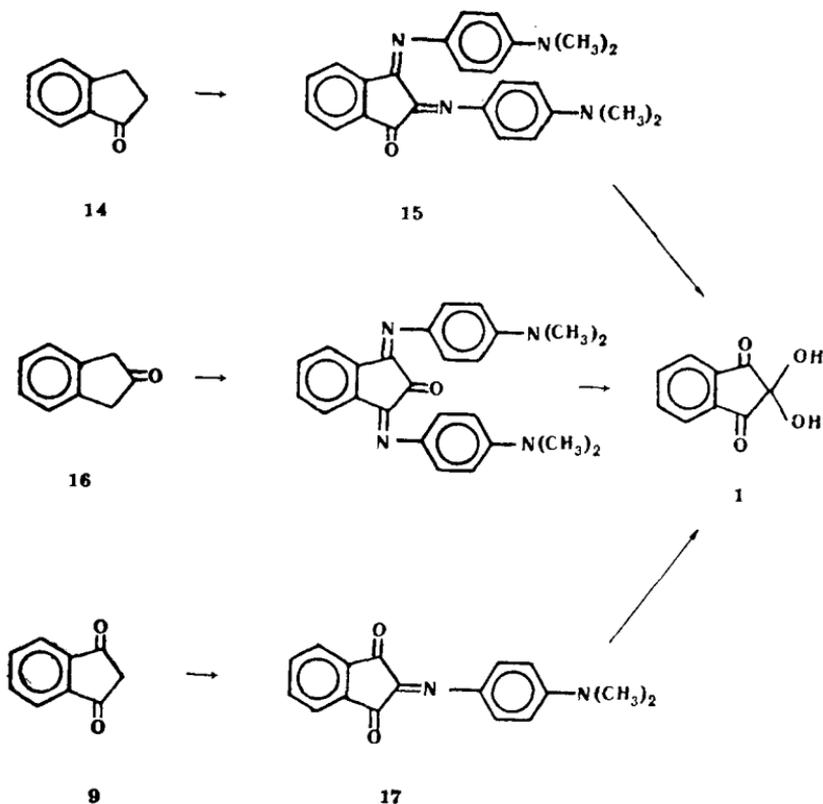
### ОБРАЗОВАНИЕ И ПОЛУЧЕНИЕ НИНГИДРИНА

В 1910 г. Руэман, заинтересовавшийся циклическими *o*-дикарбонильными системами, задался целью получить аналог изатина (4) — 1,2-дикетогидринден, или индандион-1,2, (13) для сравнительного изучения [4].



Исходным продуктом синтеза был выбран  $\alpha$ -гидриндон (14). Для введения второй кетогруппы  $\alpha$ -гидриндон конденсировался

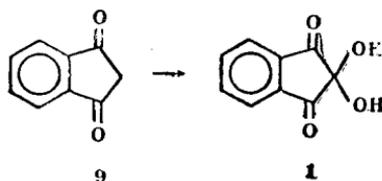
с *p*-нитрозодиметиланилином, полученный продукт подвергался гидролизу кислотой. Неожиданно химически активными оказались обе метиленовые группы  $\alpha$ -гидриндона, и образовался ди(*p*-диметиламинофенилимино)- $\alpha$ -гидриндон (15). После гидролиза выделился гидрат трикетогидриндена, или нингидрин (1) [4]. Открытый метод получения нингидрина не удовлетворял Руэмана, и он предложил новые исходные продукты для конденсации с *p*-нитрозодиметиланилином:  $\beta$ -гидриндон (16) и сравнительно легко доступный  $\alpha,\gamma$ -дикетогидринден, или индандион-1,3 (9)



[8], которые, однако, не позволили повысить выход синтеза нингидрина. В дальнейшем, несмотря на все возрастающий интерес к химическим и аналитическим свойствам нингидрина, способ его получения оставался неизменным на протяжении более 20 лет.

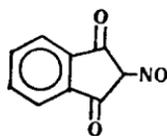
К 1933 г. относятся неудачные попытки Титерса и Шрайнера синтезировать нингидрин путем омыления  $\beta$ -оксима индандиона-

1,3, или 2-нитрозоиндандиона, (11) [9]. Эти авторы не добились положительных результатов и при использовании омыления 2-(*n*-диметиламинофенилимино)индандиона-1,3 (17). Только после проверки ряда окислителей им удалось разработать первый сравнительно удобный лабораторный метод получения нингидрина путем окисления индандиона-1,3 (9) двуокисью селена [9]. Выходы нингидрина колебались в пределах от 31 до 35% от теоретического.

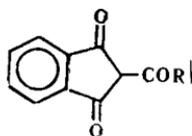


Получение нингидрина методом окисления индандиона-1,3 в дальнейшем изменялось некоторыми авторами [10—12]. Много лет спустя после появления работы [9] расщепление 2-нитрозоиндандиона-1,3 (11) до нингидрина при соблюдении специальных условий реакции (в присутствии формальдегида или двуокиси серы) было проведено с весьма хорошими выходами [13, 14].

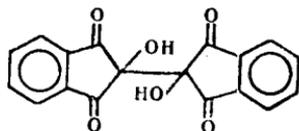
Образование небольших количеств нингидрина отмечалось при озонировании [15] и окислении [16] 2-ацетилиндандиона-1,3 (18; R=CH<sub>3</sub>). В патентной литературе описано окисление различных 2-ацилиндандионов-1,3 (18) азотной кислотой, дающее средние выходы нингидрина [17, 18]. Следует отметить, что окисление гидриндантина (19) азотной кислотой дает нингидрин с 90%-ным выходом [19], однако на практике гидриндантин получают из нингидрина.



11

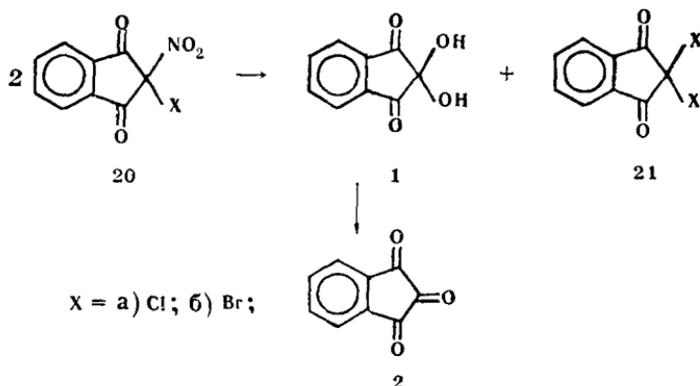


18



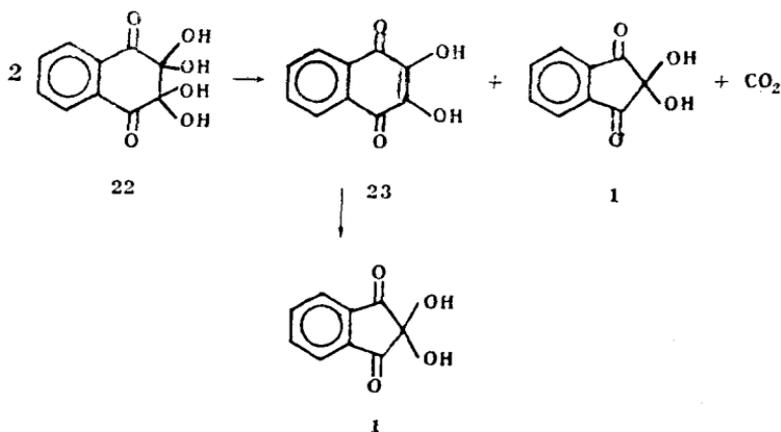
19

Г. Ванг и А. Лоде, исследуя свойства 2-нитроиндандиона-1,3 (10), в 1938 г. установили, что нингидрин с 31—42,7%-ным выходом может быть получен при термическом разложении 2-галоген-2-нитроиндандионов-1,3 (20) в нитробензоле [20, 21]. Было

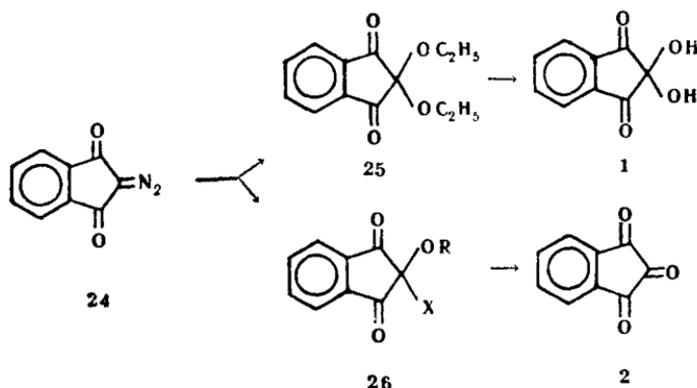


показано, что побочными продуктами этой реакции являются 2,2-дигалогениндандионы-1,3 (21) [20]. Вследствие диспропорционирования 2-галоген-2-нитроиндандионов-1,3 (20) выход нингидрина не может превышать 50% от теоретического при пересчете на исходный продукт (20) [22—24]. Механизм термического разложения 2-бром-2-нитроиндандиона-1,3 (206) затем вызвал большой теоретический интерес; в частности, предлагался радикальный механизм реакции [25—28].

Так же сложно, но интересно протекают реакции сужения циклов 2,3-диокси-1,4-нафтохинона (23) [29] и дигидрата 1,2,3,4-тетраоксо-1,2,3,4-тетрагидронафталина (22) [30] с образованием нингидрина. В последнем случае кроме нингидрина (1) и углекислого газа образуется также 2,3-диокси-1,4-нафтохинон (23).



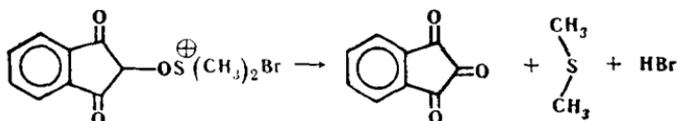
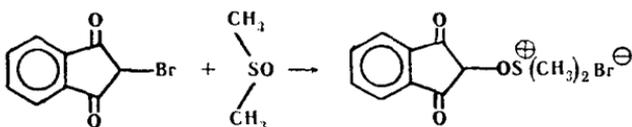
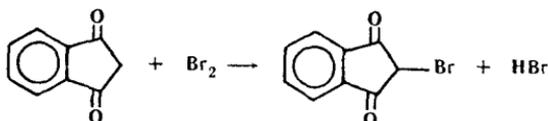
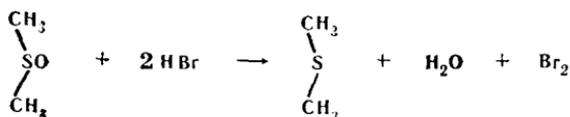
С тех пор как препаративно доступным стал 2-диазоиндандион-1,3 (24) [31, 32], большое практическое значение для синтеза нингидрина и его производных приобрела реакция превращения 2-диазоиндандиона-1,3 в индантрион-1,2,3 (2), или его гидрат — нингидрин [33, 34].



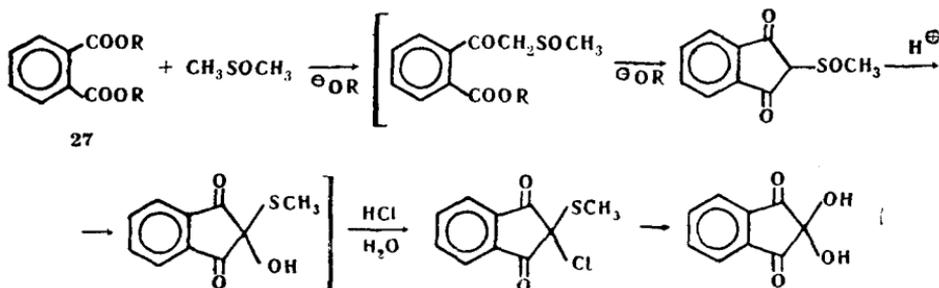
В этанольном растворе при комнатной температуре 2-диазоиндандион (24) легко реагирует с третичным бутилгипохлоритом и с 71—75%-ным выходом дает 2,2-диэтоксиндандион-1,3 (25), который под влиянием разбавленной серной кислоты с 86%-ным выходом омыляется в нингидрин. Превращение 2-диазоиндандиона-1,3 в нингидрин может протекать также через образование ряда других промежуточных продуктов (26; X=Cl; R=CHO; C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; COCH<sub>3</sub>; COCF<sub>3</sub>).

Индандион-1,3 (9) в настоящее время является доступным продажным препаратом и используется в качестве исходного продукта для синтеза многих соединений. В последнее время путем замены двуокиси селена как окислителя диметилсульфоксидом [35, 36] удалось упростить метод окисления индандиона-1,3 в нингидрин и значительно повысить выход [37, 38]. Вообще окисление диметилсульфоксидом дает хорошие выходы и отличается простотой выполнения [36]. Таким образом, доступность индандиона-1,3, простота методики окисления и высокий выход нингидрина позволяют считать данную реакцию одним из наиболее выгодных методов получения нингидрина.

Окисление протекает в присутствии небольших количеств галогеноводородов, которые в ходе реакции окисляются до свободных галогенов. Далее свободный галоген реагирует с активной метиленовой группой индандиона-1,3. Весь цикл последовательных реакций изображается схемой [39].



Вероятно, наиболее удобным и дешевым является метод двухстадийного синтеза нингидрина, предложенный Беккером и Расселом [40]. Первый этап синтеза — конденсация диалкильного эфира фталевой кислоты (27) с диметилсульфоксидом как компонентом активной метиленовой группы в присутствии алкоголята натрия в атмосфере азота, в результате чего образуется натриевая соль 2-хлор-2-метилмеркаптоиндандиона-1,3 (28). При подкислении 2-хлор-2-метилмеркаптоиндандион-1,3 (28) выделяется в чистом виде с 80%-ным выходом [40].



Гидролиз последнего продукта (28) в нингидрин при нагревании протекает почти с количественным выходом. Образованию гемимеркапталя (29) и других побочных продуктов этого синтеза посвящена работа [41].

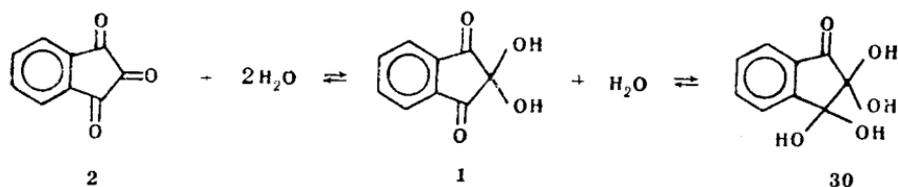
В патентной литературе описаны некоторые модификации этого синтеза [42—44] и вариант, предназначенный для промышленного получения нингидрина [45].

### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНДАНТРИОНА-1,2,3 И ЕГО ГИДРАТА

По описанию Руэмана, индантрион-1,2,3 — бесцветное вещество, кристаллизующееся из воды или спирта в виде кристаллогидрата. При нагревании индантрион-1,2,3 теряет воду, окрашиваясь в красный цвет, и плавится с разложением при температуре 239—240° [4].

Безводный индантрион-1,2,3 для кристаллографического анализа приготавливался сублимированием нингидрина в вакууме при 120°. Образовывались кристаллы двух систем — ромбической и тетрагональной [46]. Препаративно безводный индантрион-1,2,3 был получен сублимированием в вакууме при температуре до 190° или действием на него хлористого тионила [47] и имел красно-фиолетовый, а в расплавленном состоянии — зеленый цвет; т. пл. 255° [47]. Вещество хорошо растворялось в бензонитриле, плохо — в бензоле, нитробензоле и уксусном ангидриде. Цвета этих растворов разные — от красно-фиолетового до синезеленого.

Индантрион-1,2,3 практически нерастворим в четыреххлористом углероде и петролейном эфире. Раствор индантриона-1,2,3 в ледяной уксусной кислоте при комнатной температуре бесцветен, но при нагревании окрашивается в сине-фиолетовый цвет. В концентрированной серной кислоте трикетон растворяется, приобретая фиолетовую окраску [47].



Гидратация индантриона-1,2,3 (2) в водных растворах протекает в две стадии и катализируется основаниями [48]. Нингидрин

(1) является очень слабой кислотой ( $K_a = 10^{-8,6}$ ), а гидратированный нингидрин (30) — еще более слабокислое соединение [48].

Имеются указания, что водные растворы и чистые кристаллы нингидрина желтовато-зеленоватого цвета [49]. Перекристаллизованный из воды нингидрин имеет т. пл.  $239^\circ$  [47] или при другом способе определения  $241^\circ$  [49]. Температура плавления нингидрина с учетом коррекции  $247^\circ$  [49].

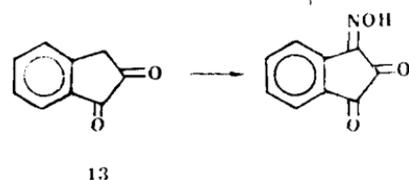
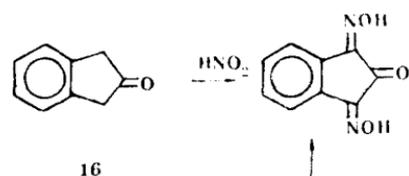
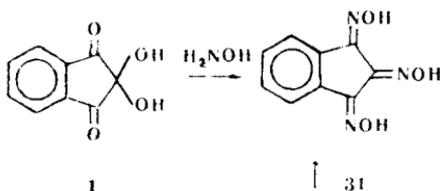
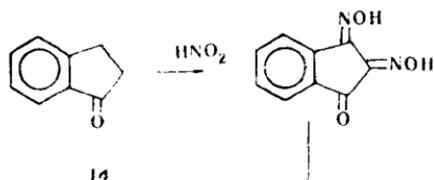
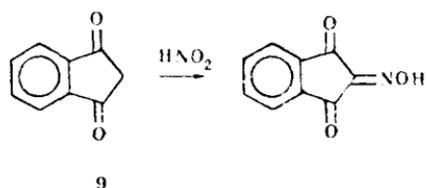
Для аналитического использования продажные препараты нингидрина обычно перекристаллизовываются из 2 н. раствора соляной кислоты; т. пл.  $241^\circ$  [50, 51]. Безводный индантрион-1,2,3 для синтетического применения очень удобно получать с помощью молекулярных сит [52—54].

Об электронных спектрах нингидрина опубликовано много работ [55—58]. Максимумы абсорбции УФ-спектров спиртовых растворов нингидрина наблюдаются при 362, 247, 226 *нм* и три полосы — между 305 и 270 *нм*.

### ПРОИЗВОДНЫЕ КАРБОНИЛЬНЫХ ГРУПП НИНГИДРИНА И ДРУГИЕ КЕТОНЫ ИНДАНА

Для подтверждения структуры синтезированного гидрата индантриона-1,2,3 Руэманом были приготовлены некоторые производные карбонильных групп. С фенилгидразином и семикарбазидом нингидрин образовывал соответственно желтые кристаллические дифенилгидразон и дисемикарбазон [4], с гидроксил-амном — триоксим, полученный из индандиона-1,3 (9) и описанный в литературе [59]. В щелочной среде индандион-1,3 реагирует с азотистой кислотой, образуя 2-нитрозоиндандион-1,3, который одновременно может рассматриваться как таутомерная форма —  $\beta$ -оксим индантриона-1,2,3 (11). Таким же образом диоксим 2-нитрозоиндандиона-1,3 можно считать триоксимом индантриона-1,2,3 (31). Здесь, конечно, не учитываются тонкие структуры оксиминных групп, или нитрозо-изонитрозо-таутомерные формы. Возможность получения одного и того же производного как из дикетона, так и из трикетона указывает на тесное родство этих соединений.

Из пяти возможных оксимов индантриона-1,2,3 известны четыре. Нижеприведенная схема их получения иллюстрирует тесную связь нингидрина с другими кетонами группы индана: индандионом-1,3 (9), индандионом-1,2 (13), инданомом-1 (14), инданомом-2 (16).



Последняя реакция — нитрозирование индандиона-1,2 (13) не осуществлена, а остальные превращения описаны в работах [59—61], из которых [61] посвящена изучению свойств оксимов, их солей и реакциям ацилирования.

Воздействие пятихлористого фосфора на нингидрин приводит к образованию 2,2-дихлориндандиона-1,3 [5]. В дальнейшем часто придется встречаться с аналогичными реакциями нингидрина, продуктами которых являются производные индандиона-1,3. Поэтому при рассмотрении реакций и производных нингидрина нельзя не коснуться некоторых производных индандиона-1,3 и их реакций.

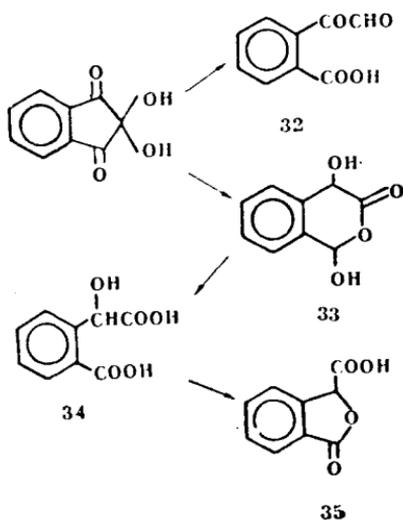
### РАСЩЕПЛЕНИЕ, ОКИСЛЕНИЕ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ НИНГИДРИНА

При взаимодействии нингидрина со щелочами Руэман наблюдал ряд цветных реакций [5]. Так, при обливании разбавленными щелочами нингидрин переходит в раствор желтого цвета. С разбавлением раствора водой желтая окраска исчезает. При растворении нингидрина в концентрированных или при нагревании

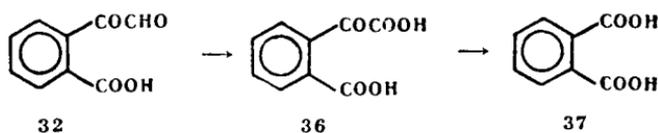
в разбавленных щелочах реакционный раствор окрашивается в ярко-синий цвет [5]. Подкисление таких щелочных растворов нингидрина кислотой вызывает осаждение бесцветной фталидкарбоновой-3 кислоты (35) — лактона *o*-карбоксиминдальной кислоты (34). Описанные явления Руэман [5] объяснял тем, что в слабощелочной среде нингидрин расщепляется с образованием *o*-карбоксифенилглиоксаля (32), калиевая соль которого имеет желтый цвет. В более концентрированных растворах щелочей *o*-карбоксифенилглиоксаль превращается в *o*-карбоксиминдальную кислоту (34), которая при обработке раствора кислотой лак-

тонизируется во фталидкарбоную-3 кислоту. По мнению Руэмана, появление ярко-синей окраски нингидрина в щелочной среде объясняется образованием шестичленного лактона (33). Все упомянутые превращения нингидрина в щелочной среде можно изобразить следующей схемой:

Уже в первой работе о нингидрине [4] Руэман указывал, что водные растворы нингидрина восстанавливают раствор Фелинга и аммиачный раствор нитрата серебра. Восстановление упомянутых растворов нингидрином, который сам является окислителем, в данном случае связано с расщеплением пятичленного цикла в сильнощелочных растворах этих реактивов, в результате чего образуется *o*-карбоксифенилглиоксаль, или полуальдегид фталоновой кислоты. Последний и является восстановителем в щелочных растворах нингидрина. Неизвестно, останавливается ли окисление *o*-карбоксифенилглиоксаля в этих условиях на стадии образования фталоновой кислоты (36) или идет дальше до образования фталевой кислоты (37).

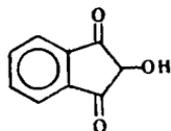


Окисление нингидрина в этих условиях на стадии образования фталоновой кислоты (36) или идет дальше до образования фталевой кислоты (37).

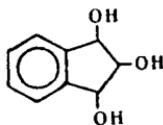


Окисление нингидрина во фталевую кислоту, вернее в ее ангидрид, наблюдается при нагревании нингидрина в токе кислорода до 190° [47].

Амальгама натрия восстанавливает нингидрин, однако продукт восстановления — 2-оксииндандион-1,3 (38) вследствие его высокой химической активности не удалось выделить в аналитически чистом состоянии [62]. 2-Оксииндандион-1,3 образуется также при восстановлении нингидрина аскорбиновой кислотой или сероводородом [63]. Химические свойства этого важного промежуточного продукта нингидриновой реакции будут рассмотрены совместно со свойствами гидриндантина.



38

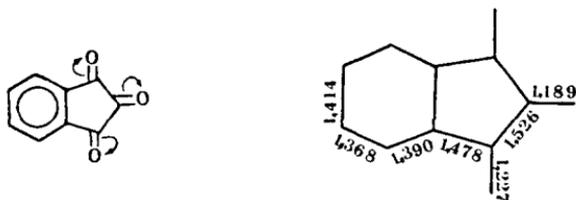


39

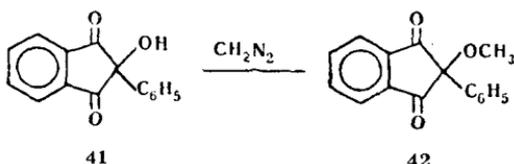
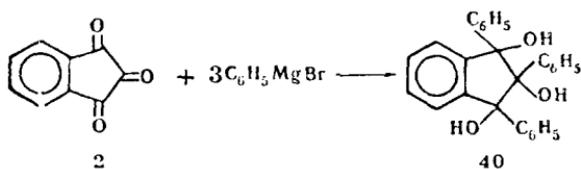
Электрохимическое восстановление нингидрина, как гидратированного трикетона, протекает весьма сложно и включает двух-, четырех- и шестиэлектронное восстановление и взаимные переходы промежуточных продуктов [64]. Стабильным конечным продуктом электровосстановления является индантриол-1,2,3 (39). Хорошо исследованы процессы полярографического восстановления нингидрина как в водном [64—70], так и в безводном метанольном растворах [71].

#### РЕАКЦИИ ИНДАНТРИОНА-1,2,3 С РЕАКТИВОМ ГРИНЬЯРА, ДИАЗОСОЕДИНЕНИЯМИ, СЕРО- И ФОСФОРСОДЕРЖАЩИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

В химических реакциях индантриона-1,2,3 средняя карбонильная группа вследствие влияния окружающих карбонильных групп часто проявляет повышенную реакционную способность по сравнению с последней. Более высокая  $\pi$ -электронная плотность  $C=O$ -связи экспериментально подтверждается данными рентгеноструктурного анализа [46]. Молекула индантриона-1,2,3 планарна, и если  $C_1=O$ -связь имеет длину 1,227 Å, то длина  $C_2=O$ -связи только 1,189 Å [46]. Валентные углы и длины  $C-C$ -связей индантриона-1,2,3 представлены на рисунке, взятом из работы [46].

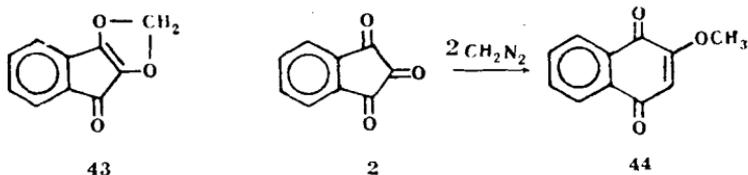


Вышеупомянутое отличие реакционной способности индантриона-1,2,3 проявляется, например, в его реакциях с реактивом Гриньяра. Индантрион-1,2,3 в эфирном растворе очень активно реагирует с избытком фенолмагнийбромида, образуя бесцветный 1,2,3-триокси-1,2,3-трифенилиндан (40), структура которого до-

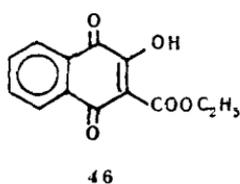
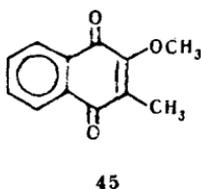


казана окислением его в *o*-дibenzoилбензол [72, 73]. Но если индантрион и фенолмагнийбромид реагируют в эквимольных отношениях, протекает моноприсоединение ко второму карбонилу и образуется 2-окси-2-фенилиндандион-1,3 (41), который с диазометаном дает 2-метокси-2-фенилиндандион-1,3 (42) [72].

В 1950 г. появилось сообщение о том, что диазометан, присоединяясь к индантриону-1,2,3, образует желтое кристаллическое вещество, которому была приписана структура 2,3-метилendioксиинденона-1 (43) [73].

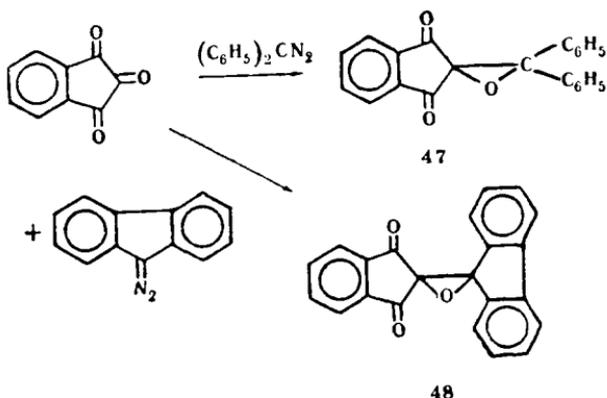


Однако, как выяснилось позже [74], эти данные оказались неверными. На самом деле индантрион-1,2,3 реагирует с 2 мол диазометана, а желтый продукт, изолируемый с хорошими выходами, — производное нафтохинона (44) [74]. Аналогичное расширение пятичленного цикла индантриона-1,2,3 и образование соответствующих продуктов (45, 46) наблюдалось и в его реакциях с тщательно высушенным диазометаном и этиловым эфиром диазоуксусной кислоты [74].



Хотя в реакции с диазометаном выход соответствующего производного нафтохинона-1,4 небольшой, авторы работы [74] считают, что реакция индантриона-1,2,3 с диазосоединениями имеет большое синтетическое и теоретическое значение в биологическом аспекте.

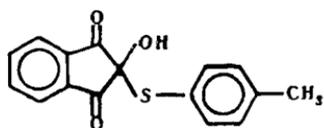
Реакция безводного нингидрина с дифенилдиазометаном в абсолютном бензоле протекает по другой схеме. Продуктом ее является бесцветный 2,2'-эпокси-2-(дифенилметил)индандион-1,3 (47), образующийся с очень хорошим выходом (92%) [75]. Если для производных нафтохинона-1,4 структура доказана встречным синтезом [74], то в последнем случае принадлежность продукта реакции к ряду индандиона-1,3 (47) основывается на изучении ИК- и УФ-спектров [75].



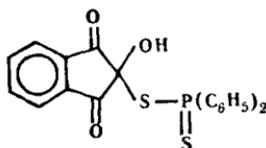
Взаимодействие индантриона-1,2,3 с 9-диазофлюореном в абсолютном 1,2-диметоксиэтановом растворе при комнатной температуре протекает слишком бурно, и только при температуре  $-50^\circ$  удается получить однородный продукт реакции — 9,9'-эпокси-9-[индандион-1,3-ил-(2)]флюорен (48) [54]. 2,2'-Эпокси-2-(дифенилметил)индандион-1,3 образуется и в том случае, если реакцию индантриона-1,2,3 с дифенилдиазометаном проводить в абсолютном 1,2-диметоксиэтаноле [54]. Но если в этом растворителе с дифенилдиазометаном или 9-диазофлюореном использовать вместо индантриона-1,2,3 его гидрат, то в обоих случаях образуется гидриндантин со средними выходами [54].

В литературе описаны примеры присоединения к индантриону-1,2,3 тиофенола [77] и дифенилтиофосфиновой кислоты. Так, если к суспензии индантриона-1,2,3 в бензоле при охлаждении прибавлять *n*-тиокрезол, то с 75%-ным выходом можно получить бесцветный кристаллический 2-окси-2-*n*-толилмеркаптоиндандион-1,3 (49). Аналогично реагирует дифенилтиофосфиновая кис-

лота, и в последнем случае образуется 2-окси-2-(дифенилфосфинилмеркапто)индандион-1,3 (50) [76].

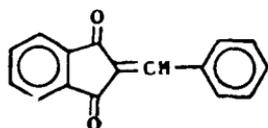


49

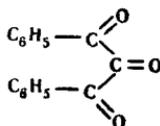


50

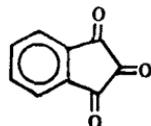
Триалкилфосфиты присоединяются к двойной связи 2-бензилидениндандиона-1,3 (51) [78] и к карбонильной группе дифенилпропантриона (52) [79]. 2-Бензилидениндандион-1,3 образует кристаллический продукт присоединения с три(дифениламино)-фосфином [80].



51

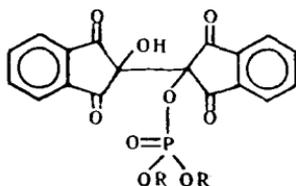


52



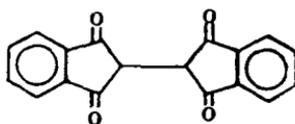
2

Учитывая структурную аналогию индантриона-1,2,3 (2) с дифенилпропантрионом (52) и с 2-бензилидениндандионом-1,3 (51), следовало бы ожидать образования аддуктов индантриона-1,2,3 с эфирами и амидами фосфористой кислоты. И действительно, если индантрион-1,2,3 суспендировать в сухом бензоле, он легко реагирует с диметил-, диэтил- и диизопропилфосфитами, продукты присоединения образуются с хорошими выходами [81]. На основе состава веществ, их ИК- и УФ-спектров и того факта, что при обработке аддукта (53б) сероводородом или уксусной кислотой образуется бис-индандион-1,3 (54), был сделан вывод, что продукты взаимодействия имеют структуру производных гидриндантина (53) [81].



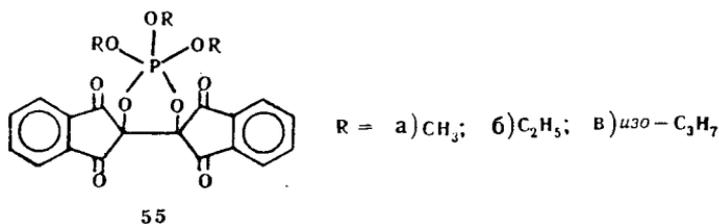
53

R = а)  $\text{CH}_3$ ; б)  $\text{C}_2\text{H}_5$ ; в) *изо*- $\text{C}_3\text{H}_7$

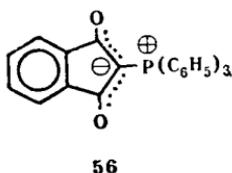


54

Индантрион-1,2,3, суспендированный в безводном хлористом метиле, реагирует с триметил-, триэтил- и триизопропилфосфитами [76]. Образующиеся бесцветные аддукты относительно стабильны, и им приписали структуры 2,2,2-триалкокси-4,5-дифталоил-1,3,2-диоксифосфанов (55) [76].



Триизопропилоксипроизводное диоксифосфолана (53в) при его обработке сероводородом дает *бис*-индандион-1,3, а трифторуксусная кислота расщепляет гетероциклическое кольцо, в результате чего образуется продукт присоединения диизопропилфосфита к индантриону-1,2,3 (55в) [76]. Таким образом, в реакциях ди- и триалкилфосфитов с индантрионом-1,2,3 одновременно происходит связывание двух остатков индантриона-1,2,3 в *бис*-индандионовую систему.

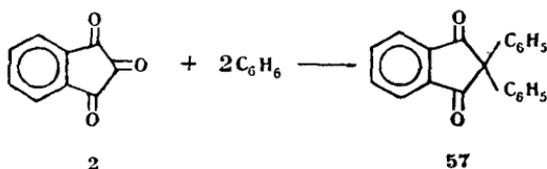


По иной схеме протекает взаимодействие индантриона-1,2,3 с трифенилфосфином. При взаимодействии 1 *мол* индантриона-1,2,3 с 2 *мол* трифенилфосфина в эфире или бензоле при комнатной температуре с 50%-ным выходом образуются бесцветные кристаллы трифенилфосфониевого бетаина индандиона-1,3 (56) [76].

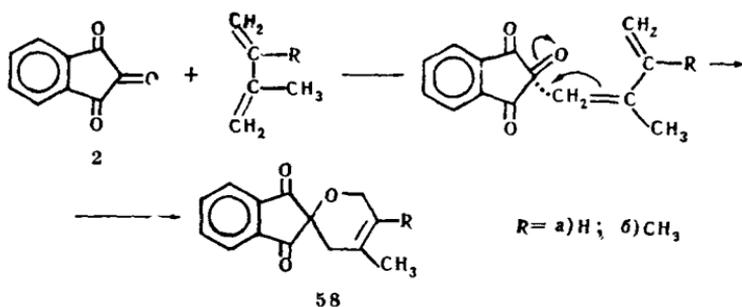
### РЕАКЦИИ КОНДЕНСАЦИИ НИНГИДРИНА

В предыдущих разделах при рассмотрении некоторых реакций нингидрина уже отмечались случаи образования С—С-связей; в этих реакциях к остатку индантриона-1,2,3 присоединялись различные углеродные радикалы и образовывались производные индандиона-1,3. Но этот раздел посвящен именно реакциям конденсации, в которых образуются С—С-связи. Так, индантрион-1,2,3 в присутствии 20%-ного олеума легко реагирует с бензо-

лом; таким путем впервые был синтезирован 2,2-дифенилиндандион-1,3 (57) [72].

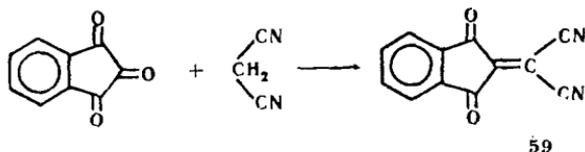


Недавно было установлено, что индантрион-1,2,3 реагирует с изопреном и диметилбутадиеном по общей схеме, согласно которой карбонильные диенофилы участвуют в реакции Дильса—Алдера, т. е. с образованием производных дигидропирана [53]. В растворе 1,2-диметоксиэтана или толуола (индандион-1,3)-2-спиро-2'-(4'-метил-3',6'-дигидро-2H-пиран) (58a) и (индандион-1,3)-2-спиро-2'-(4',5'-диметил-3',6'-дигидро-2H-пиран) (58б) образовались с выходами 76 и 70% от теоретического [72].



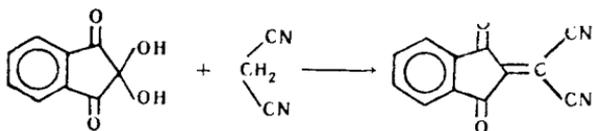
Продукты реакции присоединения представляют собой бесцветные низкоплавкие вещества, структура которых подтверждается ИК-спектрами и масс-спектроскопическими данными.

При взаимодействии индантриона-1,2,3 с малонитрилом в сухом бензоле легко протекает реакция, в результате которой с 60%-ным выходом образуются желтые кристаллы 2-дицианометилениндандиона (59) [82].

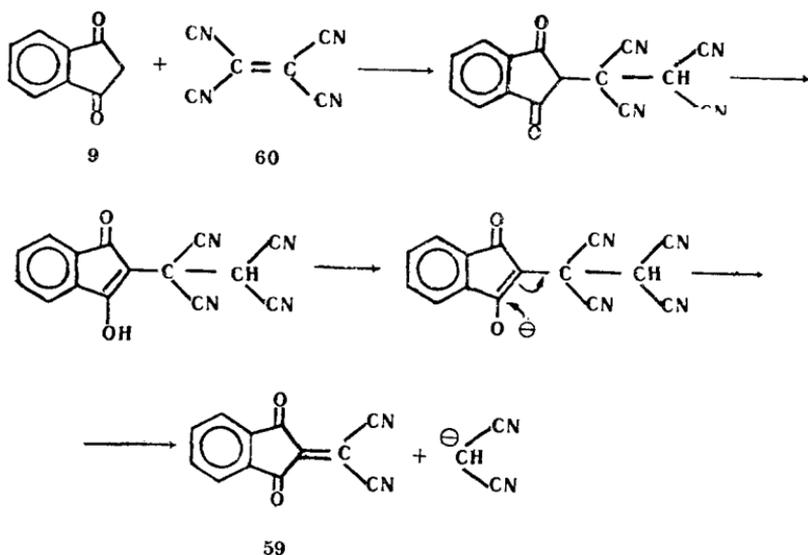


Несколько позже было показано, что 2-дицианометилениндандион-1,3 из малонитрила может быть получен также при вза-

взаимодействии последнего с нингидрином в растворе 1,2-диметоксиэтана как растворителя [83].

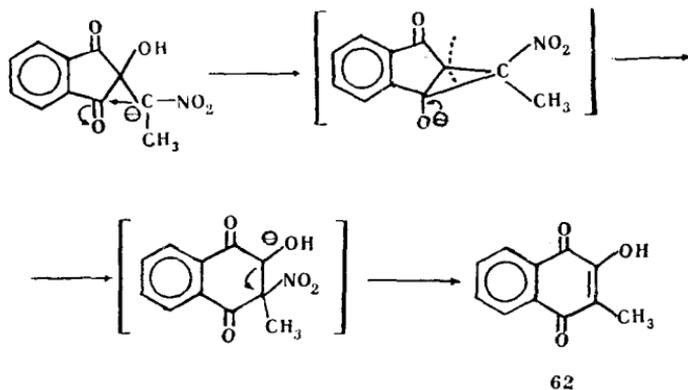
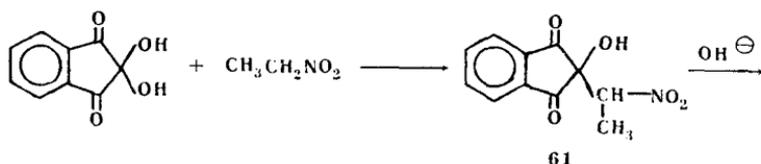


Реакция конденсации протекает легко уже при комнатной температуре, и выход 2-дицианометилениндандиона-1,3 достигает 86%. Индантрион-1,2,3 в этих условиях, т. е. в 1,2-диметоксиэтана, дает только 58% 2-дицианометилениндандиона-1,3 [83]. Считают, что реакция протекает по обычному карбанионному механизму альдольного присоединения.  $\pi$ -Электронная плотность двойной связи 2-дицианометилениндандиона-1,3 в значительной мере сдвинута с одной стороны к индандионому остатку, с другой — к остатку тетрацианоэтилена (60) [84]. Поэтому сильные электроноакцепторные свойства 2-дицианометилениндандиона-1,3 (59), подобно электрофильности тетрацианоэтилена, используются в реакциях с электронодонорными соединениями для образования комплексов с переносом заряда [58, 84]. В этой связи интересно отметить, что 2-дицианометилениндандион-1,3 образуется уже при комнатной температуре в реакции взаимодействия тетрацианоэтилена (60) с индандионом-1,3 (9) в растворе этанола [83]. По мнению авторов, реакция протекает по следующей схеме:



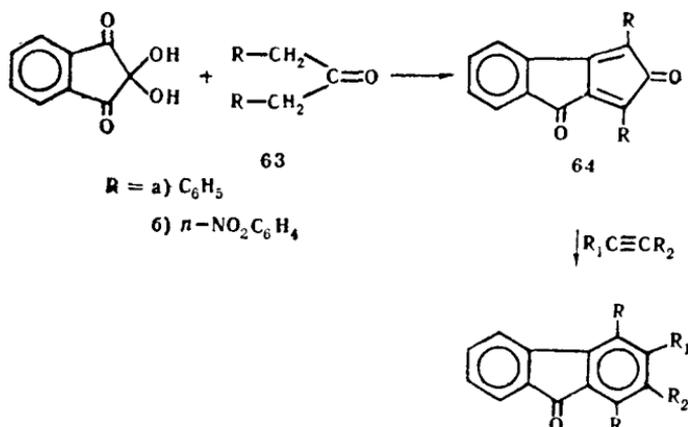
2-Дицианометилениндандион-1,3 в толуольном растворе легко реагирует с дифенилдиазометаном и 9-диазофлуореном, давая спиросоединения — производные циклопропана и индандиона-1,3 [52]. Можно ожидать, что в будущем реакции 2-дицианометилениндандиона-1,3, легкоготавливаемого из нингидрина или индандиона-1,3, найдут большое синтетическое применение [85].

Интересно реагирует нингидрин при нагревании с нитроэтаном. Сначала образуется продукт замещения — 2-(1'-нитроэтил)-2-оксииндандион-1,3 (61), который при нагревании в щелочной среде расширяет пятичленное кольцо с образованием 2-метил-3-оксинафтохинона-1,4 (62) [86]. Реакция начинается с элиминирования протона от нитроэтильной группы, затем следует взаимодействие с соседней карбонильной группой. Стабилизация промежуточного продукта наступает в результате отщепления нитрогруппы в виде нитритиона [86].



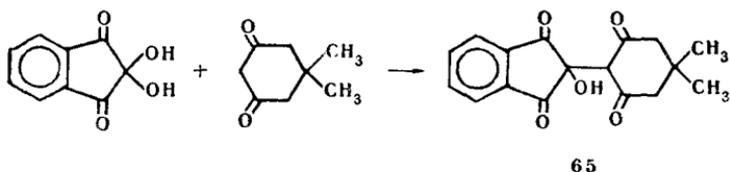
Аценафтенхинон, фенантренхинон и другие дикарбонильные соединения легко реагируют с дибензилкетонем, образуя интенсивно окрашенные соединения — производные циклопентадиенона, сокращенно называемые циклонами [87]. Если к спиртовому раствору нингидрина прибавить дибензилкетон (63а) или *n,n'*-динитродибензилкетон (63б), то в присутствии едкого натра

с хорошими выходами образуются фиолетовые кристаллы бензоинденциклопентадиенонов (64) [88].



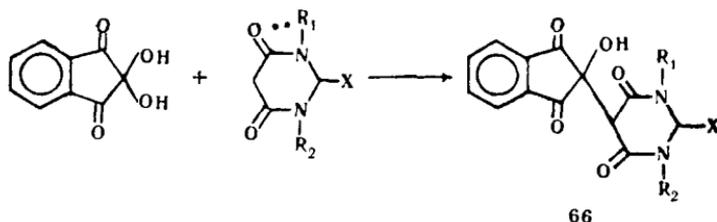
При нагревании 2,8-диоксо-1,3-дифенил-2,8-дигидроциклопент[*a*]индена (64а) с толаном и другими производными ацетилена были получены интересные производные флюоренона [88]. Инданциклоны (64) нашли применение в качестве исходных соединений для синтеза других циклических систем [89, 90].

Гидрат индантриона-1,2,3 при нагревании в разбавленной серной кислоте по общей схеме альдольной конденсации присоединяет димедон, образуя бесцветные кристаллы димедонильного производного индандиона-1,3 (65) [57].



Но после 2-часового кипячения индантриона-1,2,3 и индандиона-1,3 (9) в ледяной уксусной кислоте был изолирован *бис*-индандион-1,3 [73].

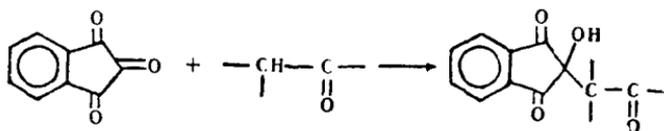
В 1965 г. Ю. Пелчер и Г. Ванг установили, что в водном растворе нингидрин реагирует с барбитуровой, тиобарбитуровой, 1-метилбарбитуровой, 1-фенилбарбитуровой и 1,3-дифенилбарбитуровой кислотами в отсутствие катализаторов [91]. На основе состава, полученных производных и интерпретации ИК- и УФ-спектров продуктам конденсации приписаны структуры 5-[2-оксиндандион-1,3-ил(2)]барбитуровых кислот (66). Эти 2,2-дизамещенные индандионы-1,3 (66) имеют желтый цвет.



Интересно, что 5-этил- и 5,5-диэтилбарбитуровые кислоты не реагируют с нингидрином [91]. Так как заместители у азота не оказывают существенного влияния на ход реакции, то можно считать, что для некоторых соединений активной метиленовой группы она имеет общий характер.

Несколько лет спустя после появления работы [91] Шенберг и Зингер на большом числе примеров показали, что индантрион-1,2,3 в растворе 1,2-диметоксиэтана при комнатной температуре и в отсутствие катализаторов очень легко реагирует с соединениями, содержащими  $\alpha$ -кетометиленовую группировку [52, 92].

Как видно из данных табл. 1, присоединение к индантриону-1,2,3 алифатических, ароматических и циклических  $\beta$ -дикетонных, ацетоуксусного, малонового и цианоуксусного эфиров протекает с очень хорошими выходами [52, 92].

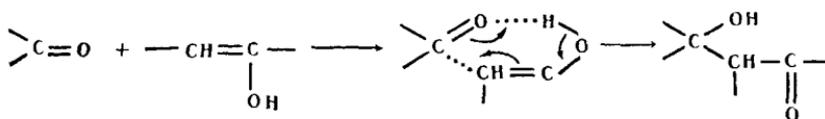


В этой реакции альдольного присоединения, как показали авторы работы [52],  $\text{CH}$ -кислотность метиленового компонента не имеет значения. Так, ацетоуксусный эфир и нитрометан имеют практически одинаковые значения  $\text{pK}_\text{A}$  — соответственно 10,7 и 10,2, но в противоположность ацетоуксусному эфиру нитрометан с индантрионом-1,2,3 не реагирует. В реакцию некаталитического альдольного присоединения не вступают флюорен,  $\alpha$ -пиколин, 2-метилхромон, трифенилметан, фенилацетилен и бис-фенилсульфонметан. Ни одно из только что перечисленных соединений не содержит  $\alpha$ -карбонильную группу. На основании этих фактов Шенберг и Зингер считают, что ход реакции присоединения енольной формы метиленового компонента к карбонильной группе является синхронным [52].

Таблица I

Выходы продуктов некаталитического альдольного присоединения к индантриону-1,2,3 [52] и его гидрату [91]

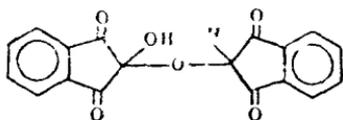
Структура продукта присоединения R	Выход, %	Структура продукта присоединения R	Выход, %
	79		36
	75		90
	51		42
	78		85
	77		86
	79		85
	77		



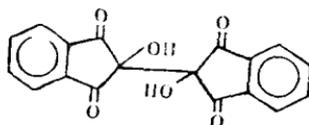
Выше при рассмотрении многих реакций упоминались такие продукты конденсации нингидрина, как *бис-индандион-1,3* и гидриндантин. В начале этой работы было отмечено, что гидриндантин является очень важным промежуточным продуктом нингидриновой реакции. Поэтому гидриндантину, реакциям его образования и распада посвящен следующий раздел.

### ГИДРИНДАНТИН И РОДСТВЕННЫЕ ЕМУ СТРУКТУРЫ

При действии сероводородом на нингидрин Руэман получил бесцветный высокоплавкий продукт, кристаллизовавшийся с двумя молекулами кристаллизационной воды [8]. Полученное вещество обладало весьма интересными свойствами: растворялось в растворах карбонатов, окрашивая их в красный цвет, но при подкислении разбавленной кислотой выпадало в осадок без каких-либо изменений. Под действием растворов щелочей продукт реакции окрашивался в темно-синий цвет. Такая же окраска появлялась и при взаимодействии его с  $\alpha$ -аминокислотами. Все эти свойства полученного при восстановлении нингидрина вещества напоминали свойства аллоксантина. Основываясь на этом, Руэман назвал синтезированное соединение гидриндантинном и приписал ему, аналогично аллоксантину, структуру полукетала (67) [8].



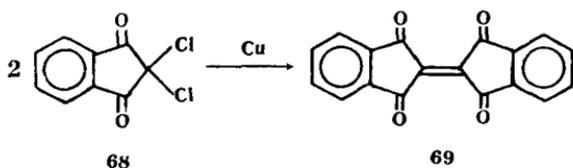
67



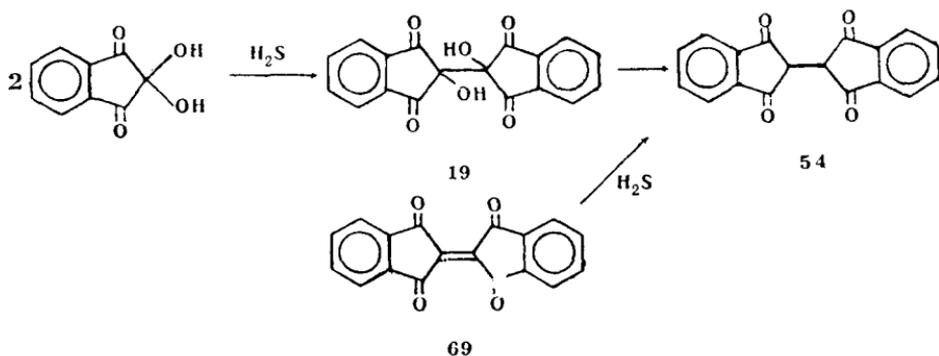
19

Несмотря на то что Ретингер [93] и Гантч [94] высказались в пользу пинаколиновой формы (19), после появления их работ большинство авторов все же продолжали считать гидриндантин полукеталом [16, 20, 95, 96]. Последняя структура приводится в фундаментальных руководствах по органической химии [97, 98].

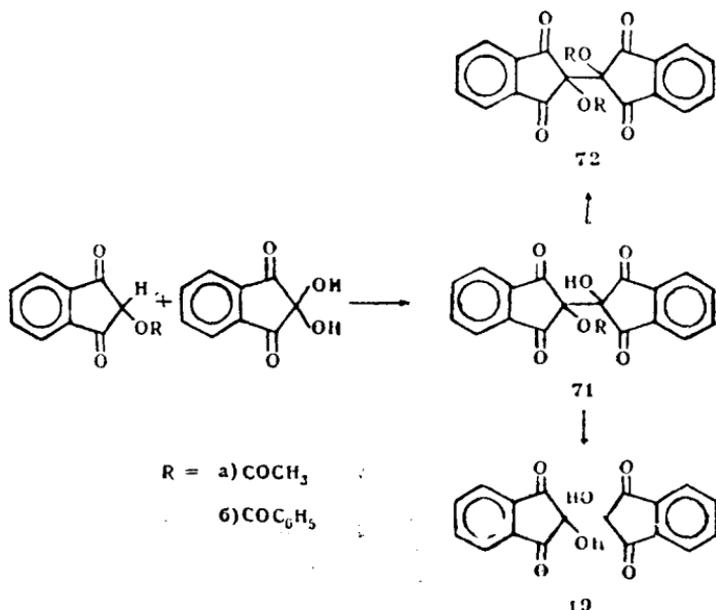
В 1949 г. Шенберг и Маубашер впервые получили 2-[индандион-1,3-илиден-(2')]индандион-1,3 (69) [96], ошибочные данные о синтезе которого были опубликованы ранее [99, 100]. Соединение 69 синтезировалось из 2,2-дихлориндандиона-1,3 (68).



При восстановлении 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]индандиона-1,3 был получен бис-индандион-1,3 (54) [96]. Тот же продукт реакции с 90%-ным выходом образовался при восстановлении нингидрина и гидриндантина (19), и, таким образом, все три соединения — 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]индандион-1,3 (69), бис-индандион-1,3 (54) и гидриндантин (19) — имеют один и тот же углеродный скелет.

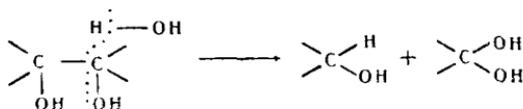


Исходя из экспериментальных данных и теоретических соображений об образовании пинаколинов, Шенберг и Маубашер приписали гидриндантину структурную формулу двутретичного гликоля (19) [96]. Окончательно структуру гидриндантина доказали Регитц с соавторами только в 1965 г. [32]. Для этого из 2-диазоиндандиона-1,3 (24) были приготовлены 2-ацилоксииндандионы-1,3 (70), которые при небольшом нагревании реагировали с нингидрином и давали 2-ацилокси-2'-окси-1,3,1',3'-тетракетодиинданилы-2,2' (71).



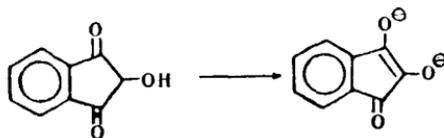
При ацилировании продукта конденсации (71) образовался диацилгидриндантин (72), а при омылении моноацилпроизводного (71) — гидриндантин [32]. В упомянутой работе приводится целый ряд химических и спектроскопических доказательств, не оставляющих сомнения в том, что гидриндантин имеет структуру гликоля *бис*-индандиона-1,3 (19).

Как видно из схемы, производные 2-оксииндандиона-1,3 в реакции с нингидрином вообще не могут давать продукты полуцетального строения (67). Таким образом, гидриндантин образуется в результате присоединения 2-оксииндандиона-1,3 (38) или его производных (70) к гидратированной карбонильной группе индантриона-1,2,3. Обратимый характер альдольной конденсации позволяет понять сравнительную неустойчивость гидриндантина. Кроме того, расщепление гидриндантина можно рассматривать как своеобразную пинаколиновую перегруппировку с разрывом С—С-связи между индандионовыми остатками.



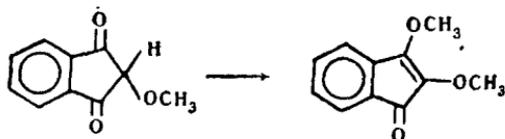
Гидриндантин легко расщепляется на исходные компоненты уже при перекристаллизации из спирта и других растворителей. При взаимодействии гидриндантина со щелочами появляется

темно-синяя окраска — цвет двухосновного аниона ендиола 2-оксииндандиона-1,3 (38) [6].



38

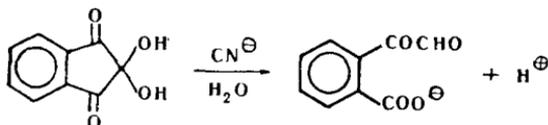
2-Оксииндандион-1,3 — неустойчивое соединение [62], он очень легко окисляется в нингидрин. С соблюдением осторожности, кроме упомянутых производных 2-оксииндандиона-1,3, были приготовлены также его простые эфиры (73, 74) и другие родственные структуры [54, 104].



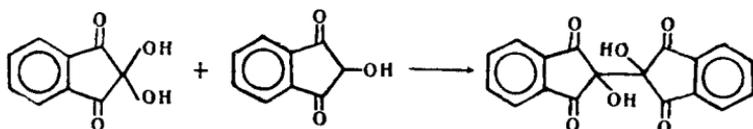
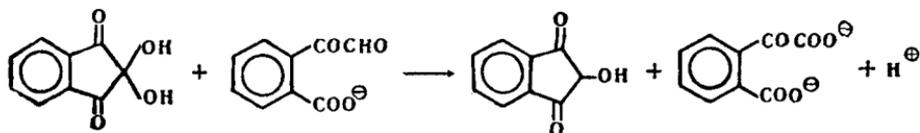
73

74

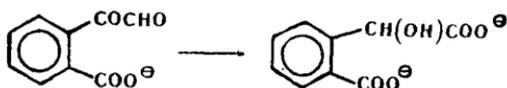
В поисках более стабильных и растворимых восстанавливающих агентов выяснилось, что цианистый калий способствует более полному развитию окраски в реакции нингидрина с аминокислотами [102]. Небольшие количества цианида калия специфически катализируют образование гидриндантина. Как видно будет из дальнейшего изложения, гидриндантин является важнейшим промежуточным продуктом в реакции взаимодействия нингидрина с аминокислотами. Подробное изучение каталитического действия цианида калия выявило сложный механизм, лежащий в основе влияния цианида на цветную реакцию нингидрина [103]. Небольшие количества цианида, прибавленные к раствору нингидрина, вызывают образование гораздо больших количеств гидриндантина, чем следовало бы ожидать исходя из стехиометрических расчетов реакции простого восстановления нингидрина цианистым калием. При изучении кинетики реакций, протекающих в разных условиях, выяснилось, что очень небольшие количества цианида катализируют расщепление пятичленного кольца нингидрина [103].



Во второй стадии *o*-карбокситефенилглиоксаль восстанавливает нингидрин в 2-оксииндандион-1,3 (38), который участвует в образовании гидриндантина.



При высоких концентрациях цианида образующийся *o*-карбокситефенилглиоксаль не успевает израсходоваться на взаимодействие с нингидрином и так же, как при высоких концентрациях гидроксильных ионов, превращается в *o*-карбоксиминдальную кислоту (34), вследствие чего образование гидриндантина прекращается.



34

### ОТКРЫТИЕ НИНГИДРИНОВОЙ РЕАКЦИИ И ПЕРВЫЙ ЭТАП ВЫЯСНЕНИЯ ЕЕ МЕХАНИЗМА

После опубликования статьи о синтезе нингидрина [5] уже в 1910 г. Руэман описывал цветные реакции гидрата трикетогидриндена с аминокислотами [4]. В первой работе о нингидриновой реакции [4] сообщалось, что даже весьма разбавленные водные растворы нингидрина при небольшом нагревании дают интенсивное синее окрашивание с аланином, валином, лейцином, тирозином, триптофаном, цистеином, а также с  $\alpha$ -амино- $\beta$ -фенилпропионовой, аспарагиновой и глутаминовой кислотами [4]. Из-за труднодоступности аминокислотных препаратов в то время Руэман мог проводить нингидриновую реакцию только с двумя  $\beta$ -аминокислотами —  $\beta$ -аминопропионовой и  $\beta$ -амино- $\beta$ -фенилпропионовой, которые после продолжительного нагревания давали лишь слабое окрашивание. В этой работе вопрос о цветной реакции нингидрина с  $\beta$ -аминокислотами Руэман оставляет открытым.

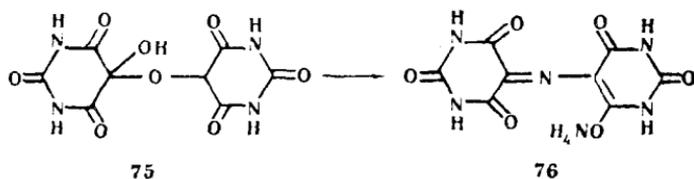
В следующей работе [8] Руэман сообщает, что водные растворы гидрата трикетогидриндена дают синее окрашивание с кислотами, содержащими аминогруппы не только в  $\alpha$ -, но и в  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -положениях [8]. Нингидриновая реакция с большинством аминокислот протекала уже при небольшом нагревании, но растворы  $\beta$ -амино- $\beta$ -фенилпропионовой,  $\alpha$ -аминоизомасляной и  $\alpha$ -амино- $\alpha$ -этилмасляной кислот окрашивались только при кипячении. Положительную нингидриновую реакцию давали полипептиды, протенны и продукты их гидролиза.

Руэман установил, что для положительной нингидриновой реакции как аминио-, так и карбоксильная группы должны быть свободными; N-фенилглицин, гиппуровая кислота [5] и этиловый эфир глицина [8] не давали окрашивания с нингидрином.

Вскоре цветной реакцией гидрата индантриона-1,2,3 заинтересовался Абдергальден. Он широко использовал нингидрин при анализе не только аминокислот и пептидов, но и молока, мочи и других биологических жидкостей [3, 63, 104—109]. Кроме Абдергальдена в то время изучением нингидриновой реакции занимались и другие химики [110—112].

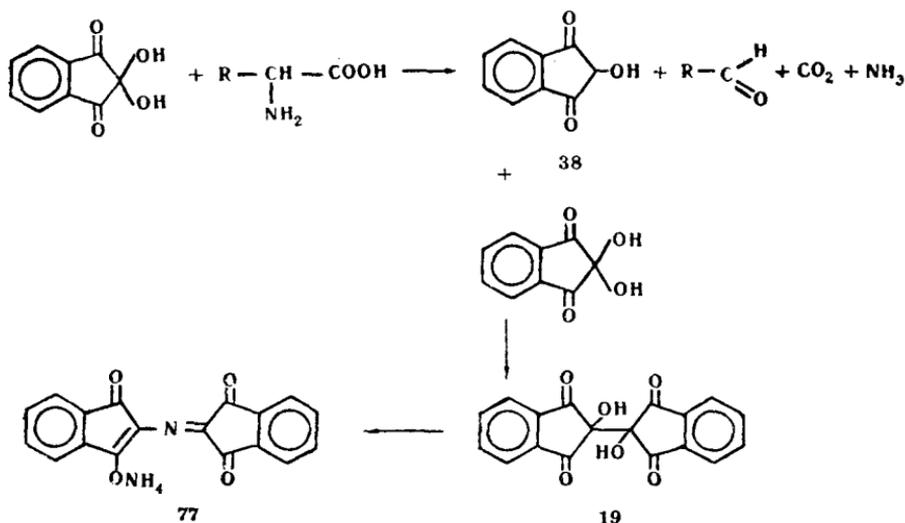
Исключительный интерес проявлял Руэман к выяснению химизма нингидриновой реакции, но изолирование окрашенных веществ, образовавшихся при взаимодействии нингидрина с аминокислотами, представляло значительные трудности [8].

В 1862 г. Штреккер установил, что при взаимодействии аллоксана (3) с аланином и лейцином выделяются аммиак и углекислота и образуется соответствующий альдегид, содержащий на один углеродный атом меньше, чем исходная аминокислота [113]. Аллоксан в этой реакции восстанавливается до аллоксантина (75), который с аммиаком образует темно-красный краситель мурексид (76). Структура мурексида в то время уже была установлена, но аллоксантин изображался в виде полукетала (75).



По наблюдениям Руэмана, синее окрашивание при взаимодействии нингидрина с аминокислотами, так же как при деградации аминокислот по Штреккеру, сопровождается образованием соответствующего альдегида из аминокислоты [8]. Исходя из близкой структурной аналогии трикетогидриндена и аллоксана и цветных реакций этих циклических трикарбонильных соединений с  $\alpha$ -аминокислотами, Руэман установил, что механизм нингидри-

новой реакции аналогичен механизму реакции аллоксана с аминокислотами [8]. Он полагал, что нингидрин, окисляя аминокислоту, восстанавливается до гидриндантина, который, по его наблюдению, давал окрашивание с аминокислотами. Гидриндантин действительно как по химическим, так и по физическим свойствам очень похож на аллоксантин [8]. Таким образом, первые предположения о механизме нингидриновой реакции, высказанные Руэманом в 1911 г., можно проиллюстрировать следующей схемой [8, 62, 114]:



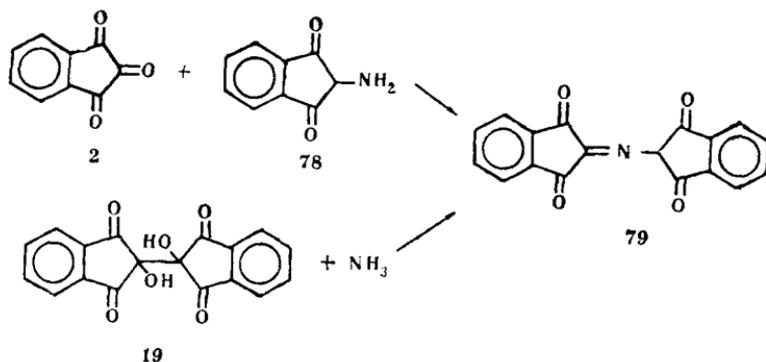
Для экспериментального подтверждения вышеприведенной схемы нингидриновой реакции Руэман подробно изучил свойства гидриндантина (19) и 2-оксииндандиона-1,3 (38) [62] и синтезировал аналог мурексида — аммониевую соль дикетогидриндидилидендикетогидриндамина (77) [114], которая имела синий цвет и впоследствии получила название «пурпур Руэмана».

Руэман, будучи наблюдательным экспериментатором, отметил, например, что в противоположность глутамину, который с нингидрином дает такую же окраску, как и глутаминовая кислота, аспарагин давал красную окраску в отличие от синего окрашивания аспарагиновой кислоты [9]. Руэманом была описана цветная реакция аммиака с нингидрином [5], и можно предположить, что ему были известны и другие факты, противоречащие его представлениям о нингидриновой реакции [2]. Теория Руэмана не могла объяснить различия в оттенках окрашенных продуктов взаимодействия протеиновых аминокислот с нингидрином, так как из всех аминокислот в пурпур Руэмана входит только азот

аминогруппы. Если нингидриновая реакция связана с окислением аминокислот до выделения свободного аммиака и восстановлением нингидрина до гидриндантина, то не понятно, почему нингидрин дает окрашивание с аммиаком. Неясно было, каким образом нингидрин и гидриндантин с аминокислотами образуют цветной продукт реакции быстрее, чем нингидрин с аминами и солями аммония [115]. Однако, несмотря на эти и другие противоречия, механизм нингидриновой реакции, данный Руэманом, на долгое время прочно вошел в химическую литературу.

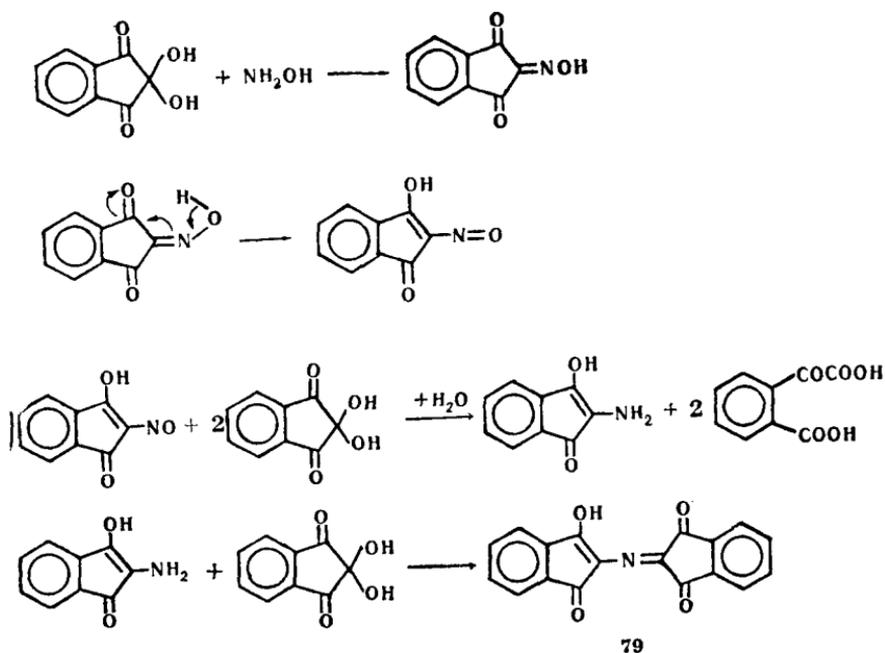
### 2-[ИНДАНДИОН-1',3'-ИЛИДЕН-(2')]АМИНОИНДАНДИОН-1,3, ИЛИ ПУРПУР РУЭМАНА

В той же работе, в которой Руэман сообщал о синтезе гидрата трикетогидриндена, описывалась и реакция последнего с аммиаком [4]. В результате реакции образовалось красно-фиолетовое вещество. Сам того не подозревая, Руэман здесь впервые описал образование и некоторые свойства аммониевой соли дикетогидриндилидендикетогидриндамина (77). Как отмечалось выше, синтез 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 (по старой номенклатуре, дикетогидриндилидендикетогидриндамина) Руэманом был предпринят с целью получить окрашенный аналог пурпуровой кислоты, образовавшийся при реакции гидрата трикетогидриндена с аминокислотами [114]. Руэман указывал на то, что дикетогидриндилидендикетогидриндамин может быть получен из 2-аминоиндандиона-1,3 (78) и трикетогидриндена (2); в экспериментальной части работы [114] как более выгодный способ получения описывается синтез из гидриндантина и аммиака.



Дикетогидриндилидендикетогидриндамин (79) в противоположность его аналогу — пурпуровой кислоте — оказался очень

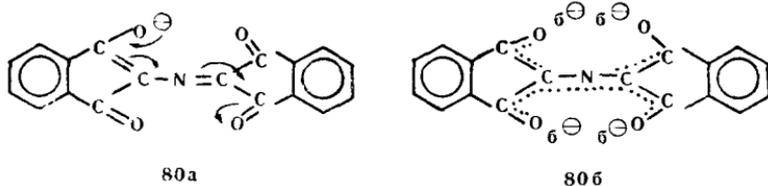
неустойчивым и был выделен в виде аммониевой соли [114]. Натриевая соль дикетогидриндилидендикетогидриндамина, или пурпура Руэмана, высокой чистоты для спектроскопического изучения была получена из глицина по стандартной нингидриновой реакции в буферном растворе при pH 5 [116]. Выход синтеза 40%. С таким же выходом натриевая соль пурпура Руэмана была получена из нингидрина и лейцилглицина [116]. По аналогичной методике натриевая и калиевая соли были получены из аланина [57]. Свободный 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандион-1,3 был получен в виде неустойчивого красного вещества при экстрагировании бензолом подкисленных растворов его натриевой соли [57]. Интересно, что в буферном растворе с pH 6,8 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандион-1,3 (79) образуется из нингидрина и гидроксиламина [117]. Как показано авторами работы [117], образование пурпура Руэмана в этой реакции протекает с возникновением 2-оксининоиндандиона-1,3 (11) как промежуточного продукта.



79

Первое спектроскопическое изучение дикетогидриндилидендикетогидриндамина и его аммониевой соли было выполнено еще в 1911 г. [55]. В последующих работах [116, 117] было показано, что аммониевая соль дикетогидриндилидендикетогидриндамина имеет такие же цвет и спектр, как и его натриевая соль.

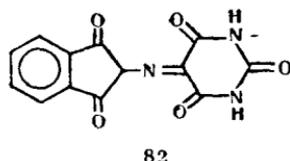
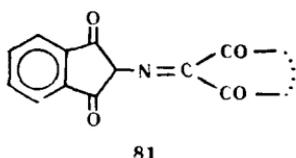
В 1950 г. Мак-Фадиеном выполнена большая спектроскопическая работа о 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3, его солях и ряде модельных соединений [57]. Электронные спектры этих соединений снимались в различных растворителях и при разных значениях pH [57]. В результате еще раз подтвердилось, что в реакциях нингидрина с аминокислотами, протеинами и первичными аминами образуется дикетогидриндилиден-дикетогидриндамин, или пурпур Руэмана. В [57] было показано, что истинным сине-фиолетовым красителем нингидриновой реакции является анионная форма 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 (80а,б).



Анион пурпура Руэмана имеет максимум абсорбции при 570 нм [57, 119]. Специально изучено влияние неводных растворителей и органических растворителей, прибавленных к водным растворам пурпура Руэмана, на его электронные спектры [119]. Если, например, максимум абсорбции пурпура Руэмана в диметилсульфоксиде, диметилформамиде и других неводных апротических растворителях находится около 605 и 420 нм, то в неводных апротических растворителях, способных вступать в донорно-акцепторные взаимоотношения с красителем, например в пиридине, максимумы наблюдаются соответственно около 550 и 420 нм [119]. На измерении интенсивности окраски аниона пурпура Руэмана основываются колориметрические аналитические методы, использующие нингидриновую реакцию.

2-[Индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандион-1,3 нашел также применение в неорганическом анализе. Свойство этого соединения, иногда называемого азин-бис-индандионом-1,3, изменять свою окраску от прибавления растворов, содержащих ионы кальция, используется в комплексометрическом титровании, где он применяется в качестве индикатора [120]. Упомянутое изменение окраски раствора связано с образованием прочного внутрикомплексного соединения [120].

Натриевая соль 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 применяется для фотометрического определения ионов свинца, ртути и висмута [121].

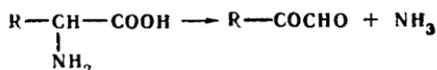


В заключение следует отметить, что для азин-*бис*-индандиона-1,3 синтезированы аналоги типа (81) [120], первый из которых — индандион-1,3-илиден-2-урамил (82) — был получен уже Руэманом [114].

### РАЗВИТИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О МЕХАНИЗМЕ НИНГИДРИНОВОЙ РЕАКЦИИ

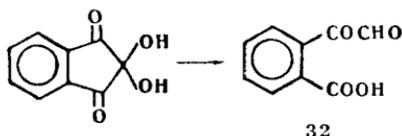
После появления первых работ Руэмана о реакции гидрата трикетогидриндена с  $\alpha$ -аминокислотами начали исследовать цветную реакцию нингидрина с другими аминокислотами, аминами и солями аммония [110]. Во многих работах этого периода отмечалась тесная аналогия между аллоксантином и гидриндантином, между мурексидом и дикетогидриндилидендикетогидриндамином [112]. Снова было подтверждено, что при взаимодействии нингидрина или гидриндантина с аминокислотами образуется тот же краситель, что и в реакции аммиака и солей аммония [112]. При систематическом изучении большого числа солей аммония, полученных как из неорганических, так и из органических кислот, было замечено, что цветную реакцию с нингидрином не дают водные растворы солей аммония, содержащие остатки сильных минеральных кислот. В щелочной среде все соли аммония давали положительную нингидриновую реакцию. Было установлено также, что присутствие пиридина значительно ускоряет образование окрашенного соединения [112].

В 1913 г. Дакин и Дадли опубликовали работу [122], в которой выдвинули предположение о том, что при распаде  $\alpha$ -аминокислоты первыми продуктами превращения являются аммиак и соответствующий замещенный глиоксаль.



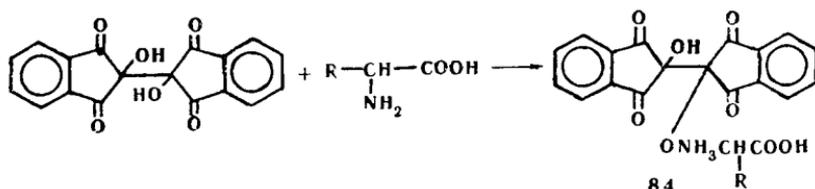
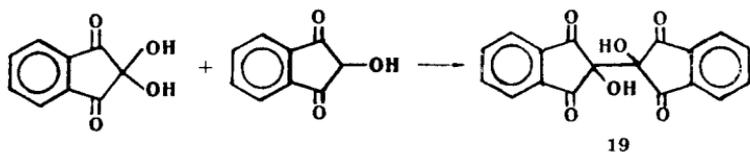
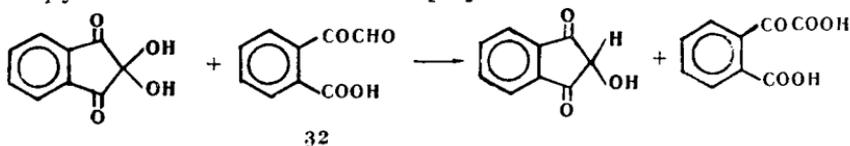
Исходя из этого и учитывая, что глиоксаль и замещенные глиоксали являются сильными восстановителями, Хардинг с соавторами внесли первые изменения в теорию механизма нингидриновой реакции, предложенной Руэманом [112, 115]. Они присоединялись к мнению Руэмана о том, что синим красителем





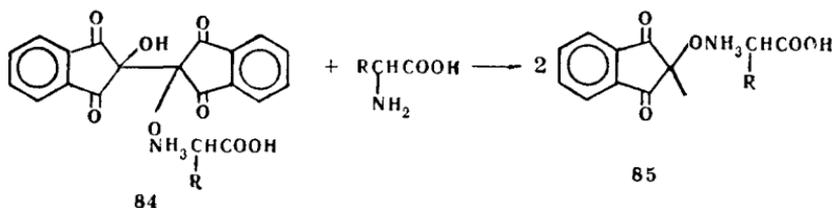
Кроме того, упомянутые авторы разработали достаточно хороший для своего времени колориметрический метод определения аминокислот, основанный на нингидриновой реакции [124].

Следующий вариант теории механизма нингидриновой реакции был разработан Ретингером уже в 1913 г., т. е. в начальный период изучения нингидриновой реакции. В 1915 г. Ретингер защитил диссертацию о механизме нингидриновой реакции, но основная работа на эту тему была опубликована лишь в 1917 г. [93]. Критике Ретингера подверглась стадия образования дикетогидриндилендикетогидриндамина. Основываясь на своих наблюдениях о том, что в отсутствие кислорода воздуха гидриндантин с аминокислотами дает бесцветные продукты, Ретингер приписал им структуру солей гидриндантина (84). Химизм остальных стадий нингидриновой реакции до образования этих солей следующий: при кипячении реакционной смеси часть нингидрина расщепляется с образованием *o*-карбоксофенилглиоксала (32), который восстанавливает вторую молекулу нингидрина до 2-оксииндандиона-1,3 (38). 2-Оксииндандион-1,3 конденсируется с нингидрином в гидриндантин (19), а последний реагирует с аминокислотами [93].

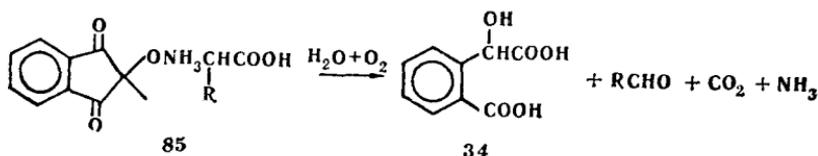


В связи с обнаружением устойчивых свободных радикалов типа трифенилметильных в этот период широкое распространение

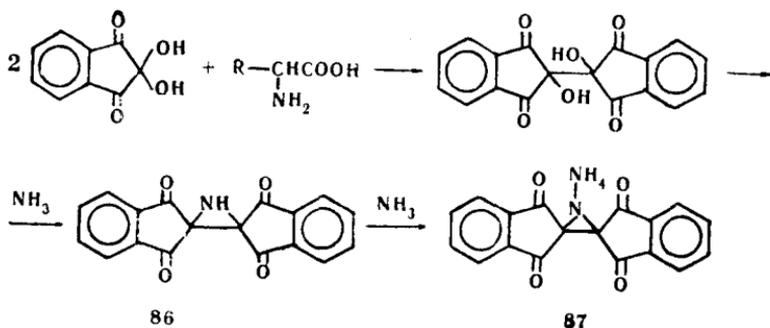
получили представления о трехвалентном углероде. Ретингер полагал, что соль гидриндантина (84) распадается по С—С-связи на две частицы, содержащие трехвалентный углерод (85).



Разрыв С—С-связи между остатками индандионов-1,3 Ретингер сравнивает с распадом гексафенилэтана на трифенилметильные радикалы и указывает, что в данном случае реакция распада облегчается присутствием четырех карбонильных групп в гидриндантине [93]. Глубокое окрашивание реакционного раствора нингидриновой реакции, по мнению Ретингера, объясняется появлением соединений трехвалентного углерода, окрашенных подобно трифенилметильным радикалам или продуктам реакции взаимодействия металлов с кетонами и хинонами в органических растворителях [93, 125]. Ретингер считает, что окрашенный продукт нингидриновой реакции с кислородом воздуха разлагается по следующей схеме:

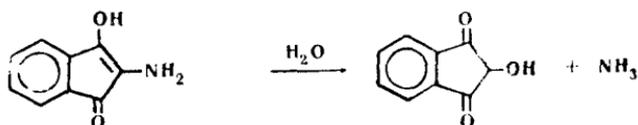
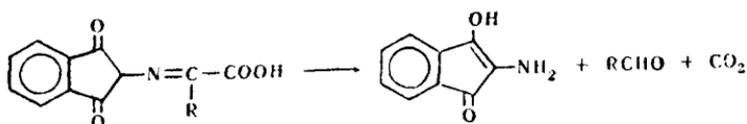
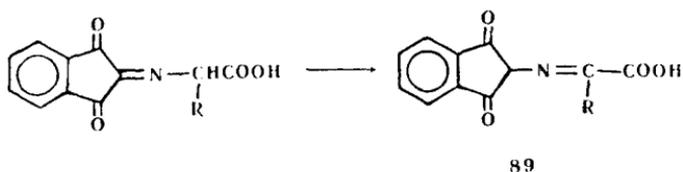
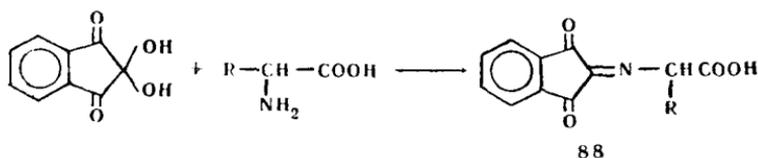


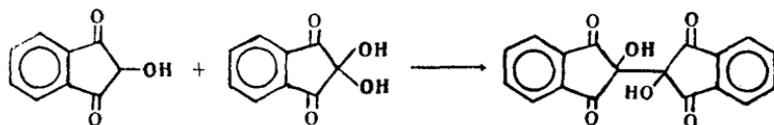
О сложном, зачастую противоречивом, процессе развития теоретических представлений о механизме нингидриновой реакции свидетельствует публикация 1937 г. [126]. По мнению авторов, при взаимодействии нингидрина и аминокислот образуются гидриндантин и иминокислота. При распаде последней получается аммиак, который с гидриндантином дает пурпур Руэмана и его аммониевое производное [126].



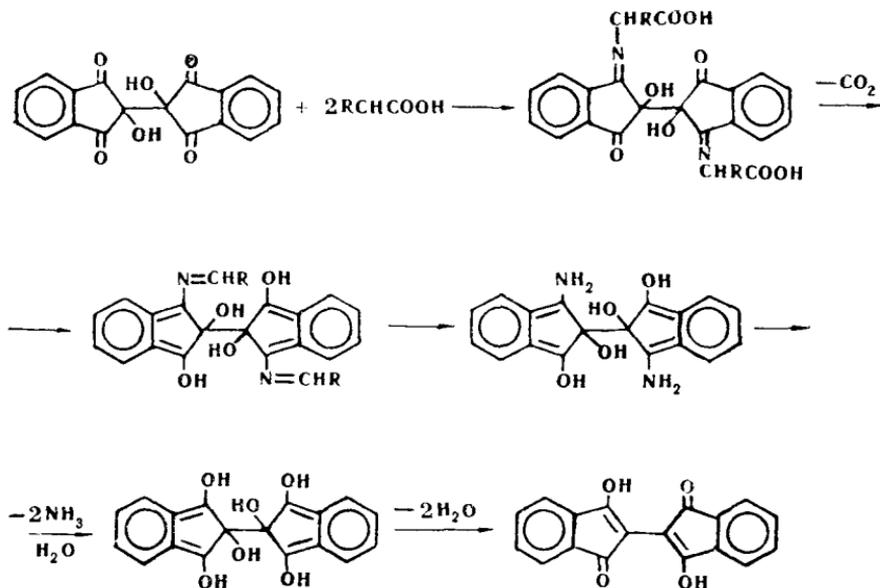
Пурпuru Руэмана и его аммониевому производному авторы [126] приписывают структуру, которой изображался мурексид в конце прошлого столетия (86 и 87) [127].

В 20—30-х годах усиленно исследовался окислительный распад аминокислот. Акабори [128] обобщил литературные данные и показал, что окислительный распад аминокислот может протекать под влиянием  $\alpha$ -дикарбонильных соединений и соединений, содержащих  $\alpha$ -дикарбонильную группировку  $[-CO-CO-]$ , разделенную этиленовой связью  $-CO-CH=CH-CO-$ . Очень подробно деградация аминокислот карбонильными соединениями рассмотрена в обзоре Шенберга и Маубашера [129]. По их мнению, нингидриновая реакция может быть рассмотрена как частный случай более общей реакции — деградации аминокислот по Штреккеру, а кетоны, содержащие группировку атомов  $-CO-[CH=CH]-CO-$ , в этой реакции являются активными и дают окрашенные соединения [93]. Нингидрин содержит карбонильную группировку  $[-CO(CH=CH)_nCO-; n=0]$ , необходимую для деградации аминокислот, и, по мнению Шенберга и Маубашера, нингидриновая реакция начинается с образования соединений типа оснований Шиффа (88) [130].





2-Иминопроизводное индандиона-1,3 (88) изомеризуется в производное 2-аминоиндандиона-1,3 (89), расщепляется в 2-аминоиндандион-1,3 (83), и последний превращается в 2-оксииндандион-1,3 (38), который с нингидрином дает гидриндантин [130]. Все перечисленные соединения, за исключением гидриндантина, могут участвовать в образовании окрашенного комплекса. Маубашер и Ибрахим [130] в результате реакции взаимодействия нингидрина с аланином изолировали бис-индандион-1,3 (54) [130]. Его образование они изобразили следующей схемой:



54

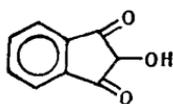
Как видно из схемы, 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандион-1,3, или пурпур Руэмана, отсутствует, хотя в то время изучению цветности этого соединения было посвящено несколько тщательно выполненных работ [118, 131].

Причисление бис-индандиона-1,3 и непричисление пурпура Руэмана к окрашенным продуктам нингидриновой реакции вызывало особый интерес у авторов [132], которые показали, что бис-индандион-1,3 (54) действительно может присутствовать в

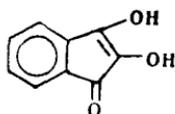
продуктах нингидриновой реакции, но тогда он образуется из 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3.

Вскоре в результате спектроскопического изучения цветных продуктов реакции нингидрина с различными аминокислотами и аминами было установлено, что окрашенным продуктом этих реакций является анионная форма 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 (80а,б) [57, 116].

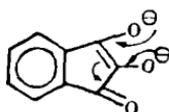
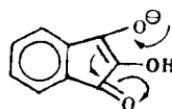
В очень важной для выяснения механизма нингидриновой реакции работе, опубликованной в 1950 г. [133], Мак-Фадием и Фаулер критически рассматривают все важнейшие концепции прежних исследователей. При контролируемых рН, температуре и содержании кислорода реакционных растворов спектрофотометрическим методом было выяснено, почему гидриндантин в разбавленных щелочах имеет красный цвет, а в концентрированных — синий. Ими было показано, что если сульфат аммония или  $\alpha$ -аланин реагируют с гидриндантином в ацетатном буфере при рН 7, то красный цвет продукта реакции гидриндантина исчезает с такой же скоростью, с какой появляется характерный цвет пурпура Руэмана [133]. Было показано, что красное окрашивание раствора объясняется присутствием моноенола 2-оксииндандиона-1,3 (38а), а синее — присутствием двухвалентного аниона (38б) [133]. Енольная форма 2-оксииндандиона-1,3 (38а) имеет, подобно кетоформе (38), желтый цвет.



38

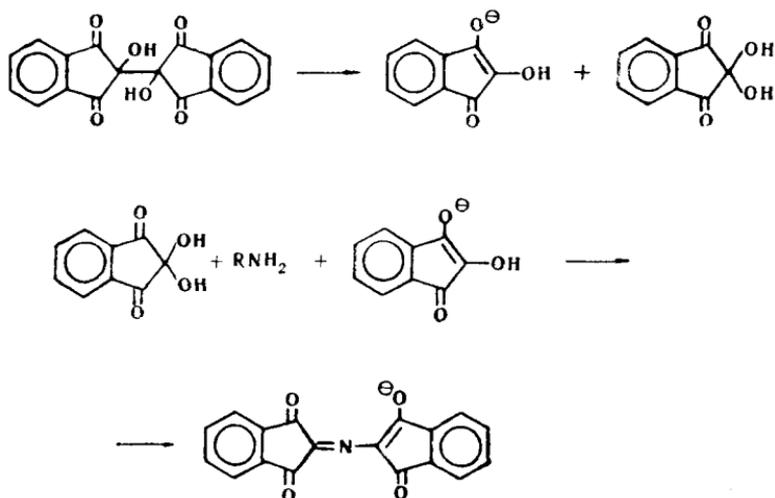


38а



38б

Учитывая, что скорость реакции аминсоединений с гидриндантином больше, чем с нингидрином, и что аммиак не является промежуточным продуктом формирования пурпура Руэмана, и ряд других установленных фактов, Мак-Фадием и Фаулер [133] предложили следующую схему нингидриновой реакции:



Гидриндантин распадается на нингидрин и 2-оксииндандион-1,3, которые, реагируя с аминосоединением, образуют пурпур Руэмана.

В концепции нингидриновой реакции по Мак-Фадиену и Фаулеру не разработаны вопросы образования гидриндантина и ход превращения аминокислоты. Эта схема механизма нингидриновой реакции по некоторым моментам, например по образованию и превращению гидриндантина, не отличается от первой схемы механизма реакции, данной Руэманом.

Сегодняшние представления о механизме нингидриновой реакции включают в себя многие моменты ранее рассмотренных теорий и концепций. Нет сомнений в том, что с нингидрином по одному механизму реагируют аммиак, амины, amino-, иминокислоты и другие аминосоединения. Окрашенным продуктом реакции в обычных условиях является анион пурпура Руэмана, получаемый из гидриндантина. При взаимодействии нингидрина с аминокислотой или аминами образуются соединения типа оснований Шиффа. В деталях нингидриновые реакции с различными типами аминосоединений немного различаются между собой. Так, реакции аминокислот включают декарбоксилирование в стадии енаминового соединения и имеют свои особенности. На основании изложенного можно представить, что нингидриновая реакция сопровождается множеством побочных реакций, также зачастую протекающих с образованием темноокрашенных продуктов. Поэтому сегодняшние представления о механизме нингидриновой реакции целесообразнее рассмотреть по отдельным группам нингидринположительных соединений: аминов, аминокислот и др.

## НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ АММИАКА И АМИНОВ

Красно-фиолетовое окрашивание в реакции нингидрина с аммиаком впервые наблюдалось Руэманом [4, 8, 62]. Затем выяснилось, что положительную нингидриновую реакцию дают все соли аммония, если реакция проводится в щелочной среде, причем присутствие пиридина и восстанавливающих веществ повышает чувствительность реакции [112]. Аммиак с гидриндантинном реагирует непосредственно, а с нингидрином — после расщепления последнего в щелочной среде или после восстановления.

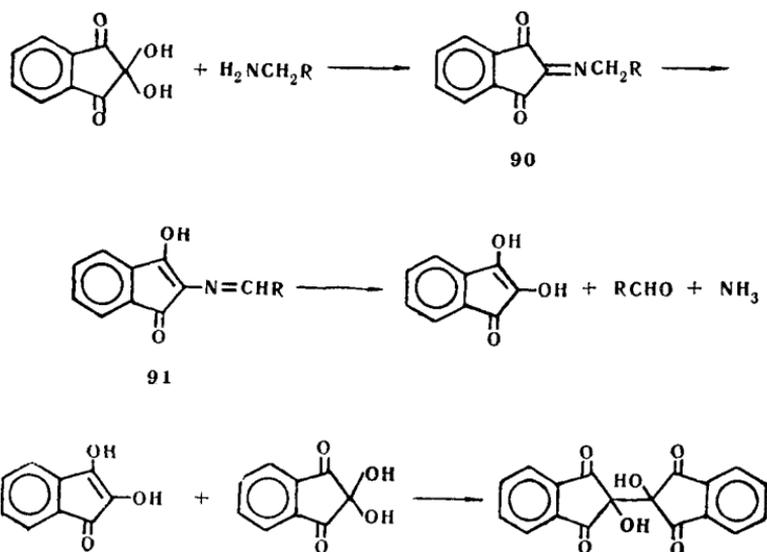
Для количественного определения аммиака используется образование окрашенной аммониевой соли 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 [134] и измерение его максимума абсорбции при 570 *нм* [135]. Нингидриновая реакция аммиака очень чувствительна: она позволяет определить содержание аммиака в крови до 0,5 *мкг/мл* [136] и гаммовые количества аммиака на бумажных хроматограммах [137]. Большая чувствительность нингидриновой реакции к аммиаку иногда является помехой для применения этой реакции при анализе сложных биологических объектов [138, 139].

Первые работы о нингидриновой реакции аминов предпринимались с целью уточнения специфичности реакции нингидрина на аминокислоты при анализе материала биологического происхождения [104, 114]. Было установлено, что первичные алифатические амины в присутствии пиридина легко дают положительную реакцию в противоположность амидам, гуанину и его производным [115]. В последней работе проверялась реакция нингидрина с обычными алифатическими аминами и имеющими структуру  $\text{RCH}_2\text{NH}_2$  или  $\text{RRCNH}_2$ . Из старых работ следует отметить статью Риффарта [140], который исследовал амины, принадлежащие к различным структурным группам, на способность давать цветную реакцию с нингидрином.

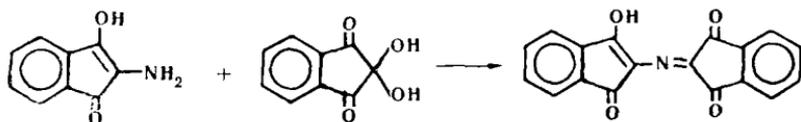
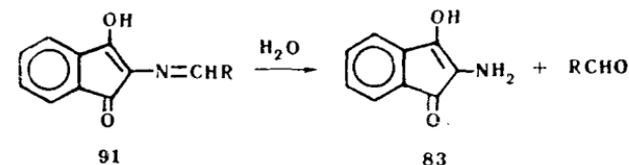
Из-за существовавших в то время представлений о механизме нингидриновой реакции цветная реакция нингидрина с аминами была труднообъяснима. Действительно, образование пурпура Руэмана, согласно принятому механизму реакции, должно было сопровождаться появлением свободного аммиака в среде, но отщепление аммиака от весьма устойчивых аминов казалось маловероятным [112].

Существенный вклад в развитие сегодняшних представлений о механизме нингидриновой реакции вообще и о реакции нингидрина с аминами в частности был внесен Маубашером и Отманом [141]. После нагревания этиламина, бутиламина и бензиламина с нингидрином на водяной бане в специальной аппаратуре в атмосфере углекислого газа были идентифицированы соответственно ацетальдегид, альдегид масляной кислоты и

бензальдегид. После подкисления окрашенного реакционного раствора был выделен гидриндантин. На основе этих фактов авторы [141] предложили следующую схему реакции первичных аминов с нингидрином:

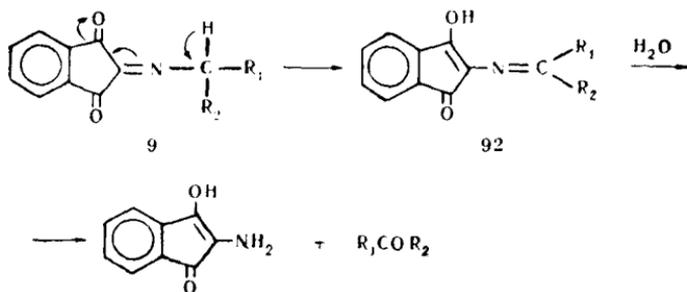


Появление характерной окраски Маубашер и Отман объясняли образованием двойной аммониевой соли 2-оксииндандиона-1,3 (38), которая в схеме не указана [141]. В приведенной реакции существенно новыми и, как выяснилось позже, верными оказались первые две стадии: нуклеофильное замещение гидратированного индантриона-1,2,3 (1) амином и изомеризация образовавшегося продукта типа оснований Шиффа (90) в производное 2-аминоиндандиона-1,3 (91) [141]. Хотя одноосновный и двухосновный анионы 2-оксииндандиона-1,3 ярко окрашены, в данной реакции они являются только промежуточными продуктами побочной реакции образования гидриндантина. Расщепление енамина (91) в основном идет не по связи  $\text{>C=N}<$  с образованием 2-оксииндандиона-1,3 (38), а по двойной связи  $\text{—N=C}<$  с появлением 2-аминоиндандиона-1,3 (83), который со второй молекулой нингидрина дает пурпур Руэмана.



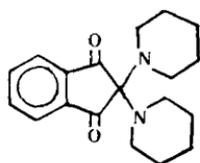
В соответствии с вышерассмотренным механизмом нингидриновой реакции нуклеофильное замещение у нингидрина будет протекать тем легче, чем больше нуклеофильность амина. Это подтверждается экспериментальными данными: наиболее легко реагируют алифатические амины [115, 140—144], удлинение алифатической цепи способствует протеканию реакции [144]. Сравнительно большой основностью и, следовательно, высокой реакционной способностью в реакциях с нингидрином обладают бензиламин, замещенные бензиламины [77, 145] и гетерилметиламины [146].

Кроме рассмотренных первичных алифатических аминов с нингидрином реагируют и вторичные алифатические амины, но реакция протекает труднее [142, 147—153]. Если исходить из нуклеофильности аминов, то вторичные амины должны были бы реагировать легче. Кажущиеся противоречия могут быть объяснены стерическими факторами и тонкостями отдельных стадий механизма нингидриновой реакции. Аминогруппа вторичных аминов в некоторой степени экранирована; наличие второго углеродного атома вместо водородного рядом с  $\alpha$ -углеродным атомом амина не способствует изомеризации продукта присоединения типа оснований Шиффа (92) и дальнейшему разрыву двойной связи  $-\text{N}=\text{C}=\text{}$ .

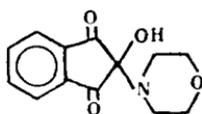


Поэтому часто после первого акта — нуклеофильного замещения — нингидриновая реакция в зависимости от структуры аминного компонента может протекать в различных направлениях и давать продукты разных структур.

Особую группу вторичных аминов, оказывающих большое влияние на строение продукта реакции с нингидрином, представляют циклические амины. Нингидрин с пиперидином при небольшом нагревании в спиртовой среде образует бесцветный продукт, которому Грасман и Арним [154] приписали структуру 2,2-дипиперидилиндандиона-1,3 (93). Джонсон и Мак-Колдин [155] подтвердили ее.



93



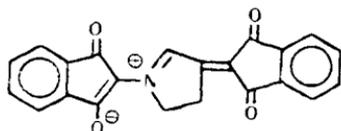
94

Если 2,2-дипиперидилиндандион-1,3 в толуольном растворе нагревать с уксусным ангидридом или реакцию нингидрина с пиперидином проводить в уксусной кислоте, то образуются фиолетовые кристаллы красителя [154, 155].

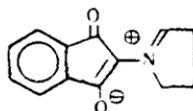
$\Delta'$ -2-Алкилпиперидены после их разделения хроматографией на бумаге с нингидриновым реагентом в уксусной кислоте окрашиваются в желтый цвет. Обработка желтых соединений щелочными растворами приводит к углублению окраски [156].

Структурный аналог пиперидина — морфолин при нагревании в спиртовой среде дает бесцветные кристаллы 2-окси-2-морфолиноиндандиона-1,3 (94) [55].

Нагревание пятичленного имина пирролидина с нингидрином в уксусной кислоте приводит к получению красного красителя, в образовании которого участвуют две молекулы нингидрина (95) [155].



95

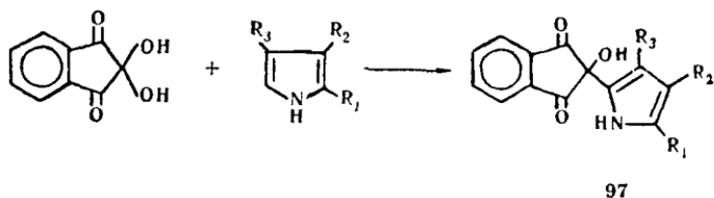


96

В спиртовой среде в более мягких условиях образуется желтый енолятбетаин пирролиния (96).

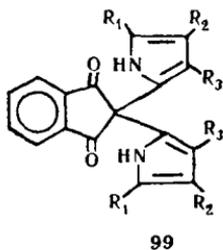
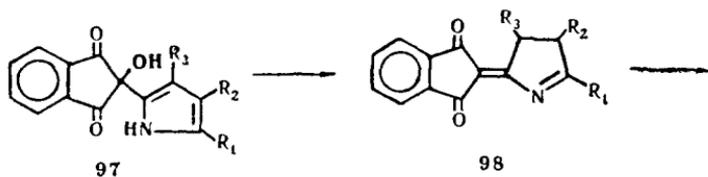
Производные вторичного амина пиррола, одновременно представляющие также ароматические системы, с нингидрином по

общей схеме нуклеофильного замещения не реагируют. Если производные пиррола, имеющие по крайней мере один свободный  $\alpha$ -водородный атом, нагревать в уксусной кислоте, то образуются желтые продукты С—С-конденсации — 2-окси-2-( $\alpha$ -пиррол)индандионы-1,3 (97) [157].

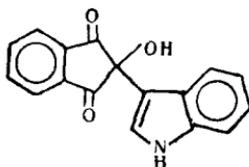


При обработке этого продукта минеральной кислотой отщепляется вода и образуется синий краситель, имеющий структуру 98. Синий краситель в алкогольном растворе способен присоединять вторую молекулу производного пиррола и давать желтое вещество — дипиррилпроизводное индандиона-1,3 (99) [157].

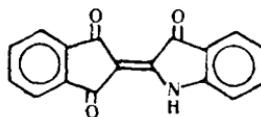
Незамещенный пиррол в различных условиях реакции с нингидрином дает зелено-фиолетовый [154, 157] или синий краситель, структура которого не установлена [158].



Нингидрин с индолом в водных растворах образует желтый продукт, а в растворах уксусной кислоты — темно-красный. Первому из них была приписана структура 100, второму — структура индигоидного красителя (101) [159].



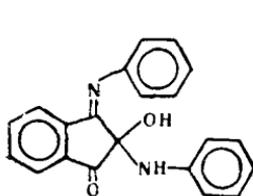
100



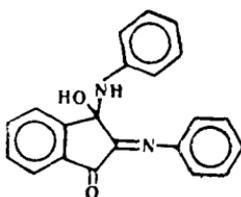
101

2-Метилиндол с нингидрином дает 2-окси-2-(2'-метилиндолил-3')индандион-1,3, который при обработке бромистым водородом отщепляет воду и переходит в синий краситель — 2-(2'-метилиндолилиден-3')индандион-1,3 [157]. Можно предположить, что аналогичная реакция протекает и при взаимодействии нингидрина с индиканом. Окрашивание продукта реакции в темно-красный цвет используется для определения индикана в моче [160] и крови [161].

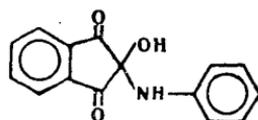
Следует отметить, что в зависимости от условий проведения реакции нингидрина с производными пиррола и индола могут быть получены и другие соединения [157]. Особенности наблюдаются и в реакциях нингидрина с ароматическими аминами, из которых лучше всего изучены анилин и его производные. При взаимодействии нингидрина с анилином Руэман получил оранжевый продукт, который не подвергал элементарному анализу [4]. Тот же продукт, содержащий два остатка анилина на один остаток нингидрина, был получен Маубашером [134]. Реакция проводилась в водном растворе при комнатной температуре; обсуждались две структурные формулы продукта реакции (102, 103) [134].



102



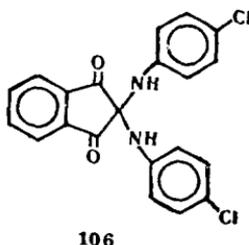
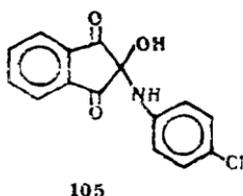
103



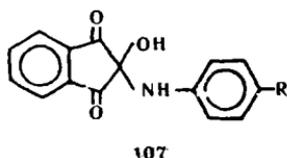
104

В реакции нингидрина и анилина в водном растворе в молярных отношениях 1:1 был получен 2-окси-2-анилиноиндандион-1,3 (104) [162]. Моно- и дизамещенные продукты нингидрина, только другой структуры, в зависимости от условий реакции, можно получить из *n*-хлоранилина. В водном растворе образуется желтый 2-окси-2-(*n*-хлоранилино)индандион-1,3 [162], а в более концентрированном растворе, содержащем 2 мол хлор-

анилина на 1 мол нингидрина, — 2,2-ди(*n*-хлоранилино)индан-дион-1,3 (106) также желтого цвета [163].



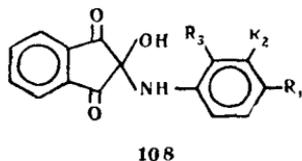
Нагревание нингидрина с *n*-аминофенолом и *n*-аминобензойной кислотой в бензоле дало только монозамещенные продукты (107) соответственно ярко-красного и оранжевого цвета [134].



R = OH; COOH

Продукты реакции нингидрина с *n*-аминофенолом [134] и *n*-фенилендиамином [164] способны отщеплять воду и давать густо окрашенные соединения, имеющие, очевидно, хиноидную структуру [164].

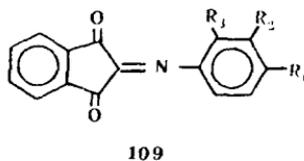
Подробно реакцию нингидрина с производными анилина изучал Фридман [162]. С анилином, *m*-хлор-, *m*-оксианилинами были получены 2-окси-2-анилиноиндандионы-1,3 (108), в то время как приблизительно в таких же условиях нингидрин с *o*-окси-, *n*-окси- и *n*-аминоанилинами давал более глубоко окрашенные 2-арилиминоиндандионы-1,3 (109) [162].



а) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H

б) R<sub>1</sub> = Cl; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H

в) R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH



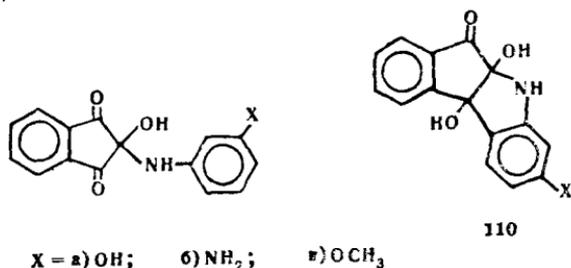
а) R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H

б) R<sub>1</sub> = NH<sub>2</sub>; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H

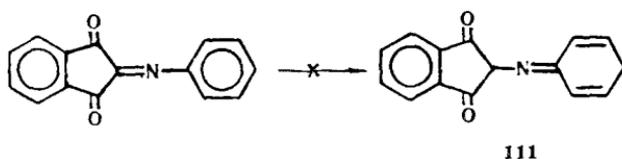
в) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = OH

Если анилин имеет электронодонорные заместители в *m*-положении, то продукты реакции с нингидрином — 2-окси-2-анилиноиндандионы-1,3 при нагревании в вакууме циклизуются [163].

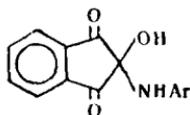
Таким образом был синтезирован ряд производных индено[2,1-*b*]-индола (110).



Хотя продукты взаимодействия нингидрина и производных анилина общей структуры (109) теоретически могут изолироваться, как это наблюдается в нингидриновой реакции ароматических аминов, приведенное ниже превращение, как энергетически невыгодное, не протекает.



Так как соединение 111 с разрушенной ароматичностью не образуется, не протекает и его расщепление до 2-аминоиндандиона-1,3, а следовательно, не может синтезироваться пурпур Руэмана. Таким образом, с анилином и другими ароматическими аминами нингидриновая реакция не протекает, точнее, протекает только первый этап этой реакции — нуклеофильное замещение и образование 2-окси-2-ариламиноиндандионов-1,3 (112).



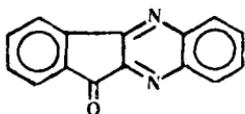
**112**

Аналогично анилину с нингидрином реагирует 2-аминопиридин; образуется 2-окси-2-( $\alpha$ -пиридил)индандион-1,3 [162].

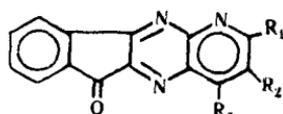
Нингидриновая реакция очень подробно на примерах нескольких сотен аминов, принадлежащих к различным классам, изучена в работах Неузила с соавторами [114, 148—152, 165—168]. Эти и другие их труднодоступные работы представляют громадный необобщенный материал. Данные о реакциях нингидрина трудно обобщить потому, что часто амины одного и того же ряда и группы реагируют по-разному в зависимости от неболь-

ших изменений в замещающих радикалах и условиях проведения реакции. Так, например, в хорошо изученном ряде циклопропиламина фенолциклопропиламина с нингидрином реагируют с образованием пурпура Руэмана, но циклопропиламин и его 2-амил- и 2-гексилпроизводные дают желтый продукт типа оснований Шиффа [165].

Во взаимодействии *o*-фенилендиамин с нингидрином участвуют обе аминогруппы, образуя гетероциклическую систему — 11-оксоиндено[1,2-*b*]хиноксалин (113) [4, 162, 169].



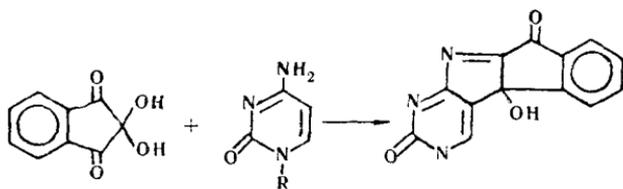
113



114

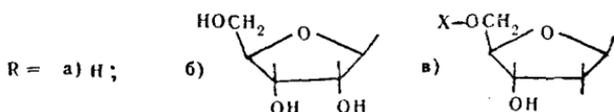
В последнее время нингидрин конденсирован с рядом производных 2,3-диаминопиридинов. Таким путем синтезировано большое число 6H-6-кетоиндено[1,2-*b*]пиридо[3,2-*e*]пирозинов (114), где R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> и R<sub>3</sub> соответственно равны H; CH<sub>3</sub>; Cl; Br; OH; SH [170]. В работе [170] подробно изучены физические и химические свойства бензоиленипиридопирозинов и их способность ингибировать рост злокачественных опухолей.

В результате нагревания водного раствора нингидрина с цитозином протекает реакция замыкания нового пятичленного цикла (116) [171].



115

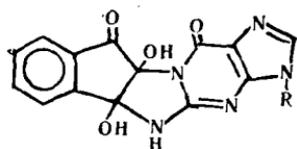
116



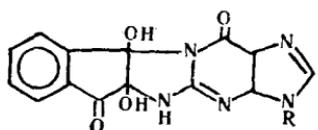
По этой схеме с нингидрином реагируют цитидин (115б) и нуклеотиды цитидина (115в, где X — фосфат или 2',3'-циклофосфат рибофуранозила). Реакция протекает уже при комнатной температуре или при небольшом нагревании в нейтральной среде. Продукты реакции (116), структура которых доказана, сравнительно устойчивы даже в щелочной среде. Авторы предлагают

нингидрин для модификации остатков цитозина, цитидина и цитидинфосфатов в нуклеиновых кислотах [171].

С целью изучения возможностей применения нингидрина для модификации пуриновых компонентов нуклеиновых кислот была проведена реакция нингидрина с гуанином, гуанозином и дезоксигуанозином [172]. В результате продолжительного нагревания упомянутых компонентов при 60° с почти количественным выходом был изолирован аддукт нингидрина и гуанина (117, 118).

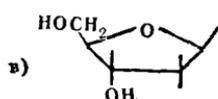
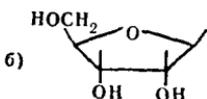


117



118

R = а) H



Структура этих интересных производных пурина тщательно доказана с помощью химических реакций и данных УФ-, ИК- и ЯМР-спектров [172]. Невыясненным осталось расположение бензоилового радикала по отношению к пуриновому циклу — формы 117 и 118 соответственно.

Как видно из работ [170—172], производными 2,3-диаминопиридина, цитозина и гуанина исчерпываются все гетероциклические диаминны, которые в результате конденсации с нингидрином образуют новые гетероциклические системы.

В реакциях нингидрина с первичными и вторичными алифатическими аминами, бензиламинами и другими аминсоединениями образуется пурпур Руэмана, что используется для колориметрического определения аминов. Как видно из вышеизложенного, циклические ароматические и ряд других аминов образуют другие хромофоры, которые также могут быть использованы для аналитических целей [164]. Кроме колориметрического определения отдельных аминов можно отметить идентифицирование аминов смесей после их хроматографического разделения [142, 147, 173, 174]. Некоторые авторы [175] предлагают шире использовать цветные реакции, которые нингидрин дает в безводных растворителях, таких, как ледяная уксусная кислота и др. Нингидрин в реакции с креатином [176] и 5-окситриптамином или серотонином и некоторыми другими производными индола образует флюоресцирующие соединения [177, 178]. Эти реакции используются для определения небольших количеств креатина, серото-

нина и других соединений в биохимическом анализе. Чувствительность этих методов очень высока [179, 180].

Третичные амины с нингидрином не реагируют [6] и теоретически не могут давать даже продуктов первых стадий собственно нингидриновой реакции. Но в условиях, отличных от обычных условий нингидриновой реакции, они могут реагировать с нингидрином и давать более или менее ярко окрашенные продукты реакции [153, 174, 181—183].

Реакции нингидрина с аминами дают много типов продуктов реакции. Образование пурпура Руэмана и других хромофоров в реакциях нингидрина позволяет использовать их для аналитического определения отдельных аминов. Реакциям нингидрина с соединениями, содержащими другие функциональные группы, посвящен специальный раздел.

В заключение следует отметить, что реакции нингидрина с аминосоединениями по сравнению с нингидриновой реакцией аминокислот мало изучены. Однако полученные результаты аналитического использования нингидриновой реакции аминов позволяют надеяться на перспективность таких исследований.

### НИНГИДРИНОВЫЕ РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

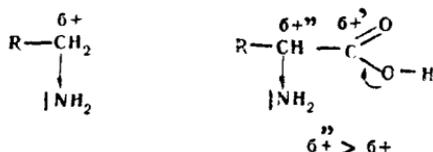
Несмотря на большое число работ о реакциях нингидрина, с каждым годом появляются все новые публикации о механизме нингидриновой реакции и побочных реакциях. Механизм собственно реакции нингидрина, в которой цветным пигментом реакции является пурпур Руэмана, в общих чертах установлен, хотя для подробного выяснения отдельных стадий и изучения их тонкого механизма предстоит еще большая и кропотливая работа.

Нингидриновая реакция с аммиаком, аминокислотами, иминокислотами и др. в принципе протекает одинаково. Но из-за структурных особенностей различных групп аминосоединений отдельные стадии нингидриновой реакции различных типов соединений различаются между собой. Кроме того, собственно нингидриновая реакция — нингидрина с аминосоединениями — сопровождается множеством побочных реакций, объединяемых под названием «нингидриновые». Характер побочных реакций, разумеется, также различен в зависимости от типа аминокомпонента нингидриновой реакции.

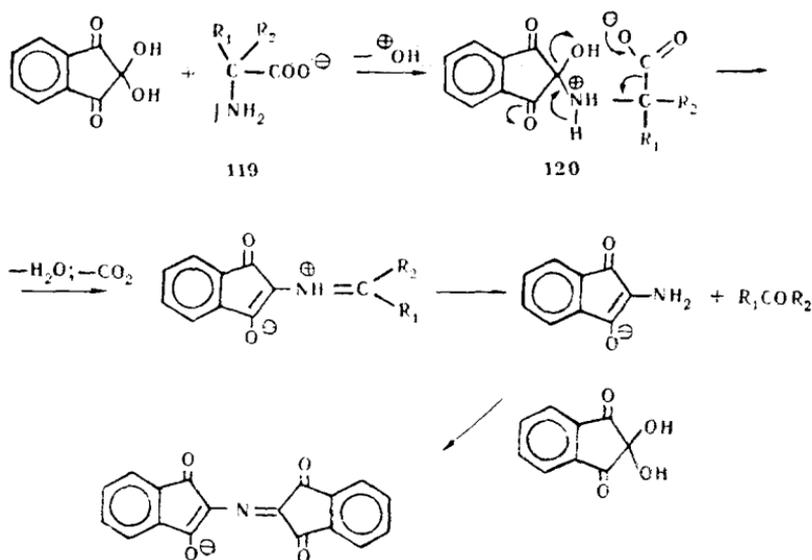
Нингидриновая реакция амино- и иминокислот отличается от нингидриновой реакции аминов стадией декарбоксилирования. В историческом аспекте механизма нингидриновой реакции стадия декарбоксилирования рассматривалась по-разному, часто совместно с отщеплением аминогруппы. Теперь считается

доказанным, что первой стадией нингидриновой реакции является не декарбоксилирование аминокислот, а нуклеофильная атака второго углеродного атома нингидрина аминогруппой аминокислоты.

Если представить, что при переходе от амина на аминокислоту  $\alpha$ -водород амина замещается карбоксильной группой, то этим уменьшается электронная плотность на азоте аминогруппы; нуклеофильность аминогруппы аминокислоты меньше нуклеофильности амина.

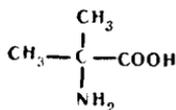


Нуклеофильное замещение у нингидрина аминокислотами протекает не труднее, чем аминами или аммиаком [184]. Это, очевидно, объясняется тем, что последующие стадии — отщепление воды и декарбоксилирование — протекают легко.

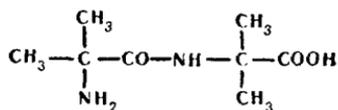


На основании данных кинетических измерений был сделан вывод, что аминокислота вступает в реакцию в анионной форме (119) [185]. Стадия декарбоксилирования аминокислоты соответствует отщеплению протона от  $\alpha$ -углерода продукта присоединения амина к нингидрину (120) в случае нингидриновой реакции аминов. В дальнейшем ход нингидриновой реакции ами-

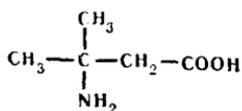
ноксидот после стадии декарбоксилирования не отличается от такового у нингидриновой реакции аминов. Исключительное значение возможности отщепления водородного атома от  $\alpha$ -углеродного атома по отношению к аминогруппе или карбоксильной группе или отщепления протона было показано на модельных соединениях [185].



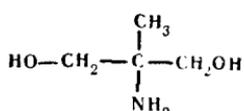
121



122



123

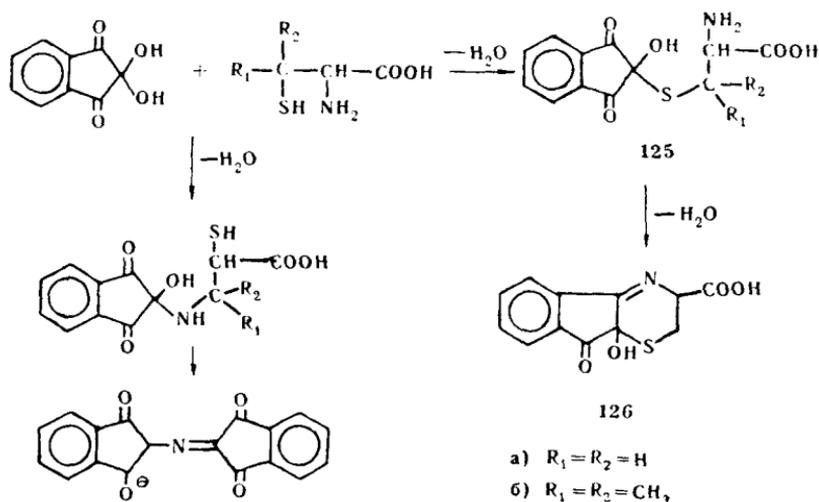


124

$\alpha$ -Метилаланин (121), у которого аминогруппа связана с третичным углеродом, дает положительную нингидриновую реакцию, так как возможно отщепление  $\alpha$ -карбоксильной группы. Если карбоксильная группа связана амидной связью и поэтому неспособна декарбоксилироваться, как это имеет место в дипептиде (122), нингидриновая реакция не удастся. По этой же причине нингидриновая реакция не протекает с  $\beta$ -метил- $\beta$ -аминомасляной кислотой (123) с амином, имеющим третичный радикал (124) [185]. Ряд примеров аминокислот, которые не дают положительную нингидриновую реакцию, приведены в работе [186]. Аминокислоты, в которых аминогруппа удалена от карбоксильной группы в  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - и других положениях, реагируют с нингидрином [187, 188]. Разумеется, нингидриновая реакция с такими аминокислотами протекает по вышерассмотренному механизму нингидриновой реакции аминов.

Серосодержащая алифатическая аминокислота цистеин в обычных условиях выполнения нингидриновой реакции дает только около пятой части того количества пурпура Руэмана, которое должно было образоваться в данном случае при пересчете на аминогруппу [116]. Если сульфгидрильную группу окислять до сульфогруппы или алкилировать ее, то полученные цистеиновая и  $\alpha$ -амино- $\beta$ -алкилмеркаптопропионовые кислоты дают нормальный «цветовой выход» нингидриновой реакции [185]. Уже ранее было установлено, что в водных растворах цистеин и нингидрин при комнатной температуре с хорошими выходами конденсируются в производное тиазина (126) [189]. Цистеин, так же как и

другие меркаптоаминокислоты, имеющие две нуклеофильные группы в молекуле, с нингидрином реагирует по двум схемам — по amino- и сульфгидрильной группам. Так как в реакциях нуклеофильного замещения сульфгидрильная группа реагирует примерно в 300 раз быстрее аминогруппы, то реакция протекает главным образом в сторону образования производного тиазина (126) [185].



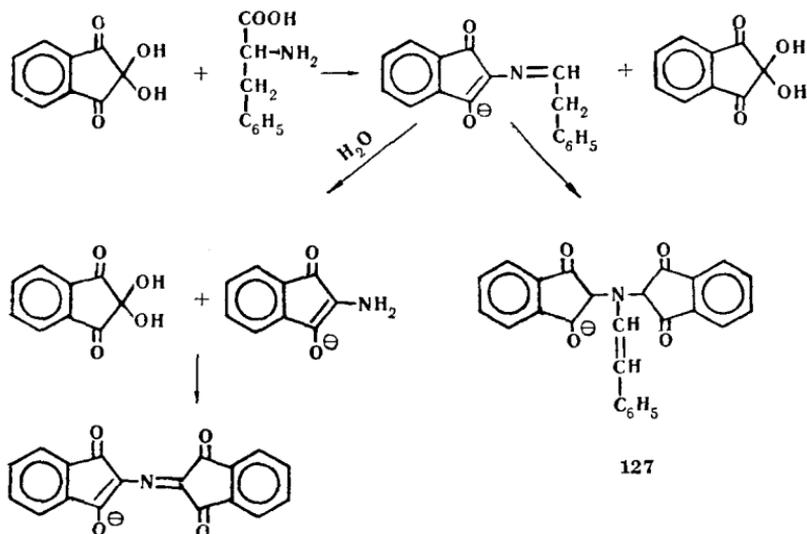
Аминогруппа промежуточного продукта (125), образовавшегося по схеме замещения с сульфгидрильной группой, взаимодействует со вторым карбонилем нингидрина, и выделяется производное тиазинкарбоновой кислоты (126) [185]. Промежуточный гемимеркаптал индантриона-1,2,3 (125) в отличие от 2-аминопроизводного 2-оксииндандиона-1,3 не способен отщеплять воду и образовывать основание Шиффа, вследствие чего карбоксильная группа в конечном продукте сохраняется. Структура побочного продукта нингидриновой реакции с цистеином как производного тиазина не вызывает сомнений; она подтверждена ЯМР-спектрами [185] и приготовлением производных [189].

Интересно отметить, что пенициллинамин, или  $\beta, \beta$ -диметилцистеин, сульфгидрильная группа которого в значительной мере экранирована метильными группами, реагирует только в 7 раз быстрее соответствующей аминогруппы, и поэтому выход пурпура Руэмана с пенициллинамином выше, чем с цистеином в таких же условиях проведения нингидриновой реакции [185].

Нингидрин очень активно реагирует и с другими соединениями, содержащими меркаптогруппы [190, 191], что используется для модификации белков нингидрином [192, 193].

Если реакция нингидрина с цистеином проводится при pH 6,5, главным продуктом реакции является оранжевое вещество неустановленной структуры [194].

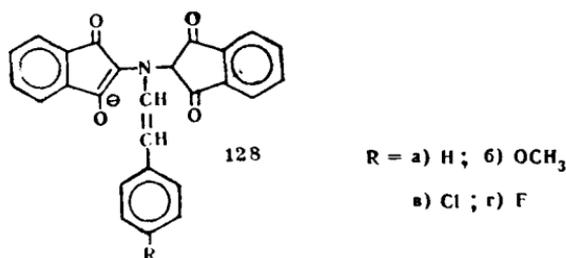
В последнее десятилетие появилось много работ, касающихся побочных реакций, которые в определенных условиях могут протекать наряду с нингидриновой реакцией фенилаланина и других ароматических аминокислот. Начиная с 1961 г. Томинага опубликовал ряд работ [195—197], в которых показал, что при реакции фенилаланина с нингидрином в водно-спиртовой среде наряду с дикетогидриндилидендикетогидриндаминоном в качестве побочного продукта образуется синий пигмент с максимумом поглощения при 608—610 нм. Если нингидриновую реакцию фенилаланина проводить в водно-спиртовой среде с pH ниже 6,4 и продукты реакции хроматографировать на бумаге, то кроме пурпура Руэмана обнаруживается синее вещество [198]. Этот же пигмент в подобных условиях образуется из β-фенилэтиламина и замещенных в фенильном кольце фенилаланинов. Спектр поглощения синего вещества имеет максимум при 603 нм [198]. Синий побочный продукт был выделен в чистом виде, на основе ИК-спектров ему приписывалась структура N,N-бис-[индандион-1,3-ил-(2)]стириламина (127) [197]. Томинага приводит следующую схему побочной реакции собственно нингидриновой реакции с фенилаланином:



Он полагал, что аналогичный механизм имеет место и при реакциях нингидрина с другими аминокислотами. Так как в побочных продуктах типа 127 содержатся остатки аминокислот, то

образованием этих побочных продуктов можно объяснить различные оттенки реакционных растворов нингидриновых реакций различных аминокислот.

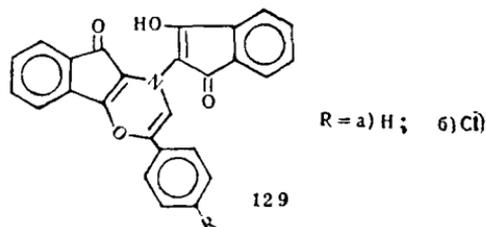
Производные *N,N*-бис-[индандион-1,3-ил-(2)]фенилэтиленамина (128) были изолированы при проведении реакции нингидрина в спиртовой среде с *p*-метокси-, *p*-хлор- и *p*-фторфениламинами [199].



Эти продукты представляют собой высокоплавкие темно-зеленые кристаллы.

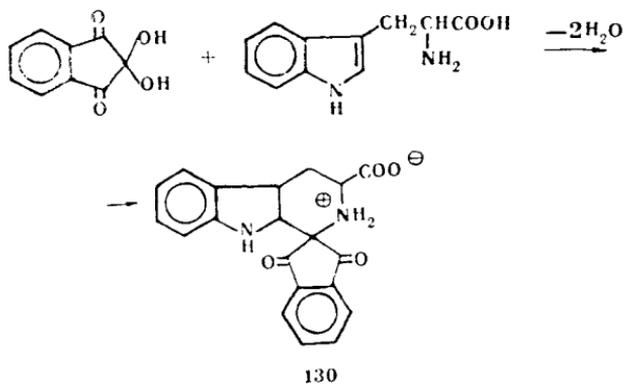
Судя по обстоятельной работе [198], побочные продукты, содержащие аминокислотные остатки (128), образуются в реакциях нингидрина с рядом аминокислот. Их образование ускоряется при избытке аминокислоты, а замедляется в водной среде и при pH выше 6,3. Так как в состав нингидриновых реагентов аминокислот часто входят органические растворители — ацетон, метилцеллосольв, спирты, пиридин и др., то с образованием побочных продуктов вышеуказанного типа приходится, очевидно, часто встречаться.

Однако совсем недавно появилась работа [200], в которой спектроскопические данные относительно соединения 128, опубликованные ранее [197, 199], используются для доказательства индено-оксазиновой структуры (129) побочного продукта нингидриновой реакции фенилаланина, образующегося в спиртовой среде.



Доказательства авторов [200] в пользу оксазиновой структуры (129) побочного продукта убедительны, и, таким образом, *N,N*-бис-[индандион-1,3-ил-(2)]стириламин может рассматриваться только как промежуточный продукт этой побочной реакции.

Побочная реакция триптофана — аминокислоты, имеющей гетероциклический радикал ароматического характера, протекает иначе, чем у фенилаланина и его производных [201]. Нингидрин с триптофаном при pH ниже 2,5 реагирует таким образом, что пурпур Руэмана практически не образуется и выделяется только желтое кристаллическое вещество — 4-карбоксо-2,3,4,5-тетрагидро-спиро-[β-карболин-2,2'-индандион-(1',3')] (130) [201].



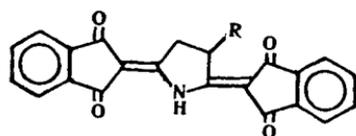
При комнатной температуре и pH раствора около 1 желтое вещество образуется с хорошим выходом. Действие избытка нингидрина на производное карболина (130) не приводит к образованию пурпура Руэмана, и, таким образом, желтый продукт не является промежуточным продуктом нингидриновой реакции [201]. Структура желтого побочного продукта нингидриновой реакции триптофана установлена на основе изучения его химических свойств, приготовления производных и обсуждения данных ЯМР- и масс-спектров.

Из протеиновых аминокислот наиболее отличаются от всех остальных пролин и оксипролин. Они не содержат свободную первичную аминогруппу и являются карбоновыми кислотами циклических аминов. Поэтому при рассмотрении реакции аминокислот с нингидрином должна проводиться аналогия между ними и вторичными аминами, подобно тому, как выше сравнивалась нингидриновая реакция α-аминокислот и первичных аминов.

Пролин и оксипролин в обычных условиях выполнения нингидриновой реакции не образуют пурпур Руэмана, а дают желтое окрашивание [8, 104]. Если реакцию проводить в водном буферном растворе при pH 7, то появляющаяся вначале желтая окраска при дальнейшем нагревании переходит в темно-красную

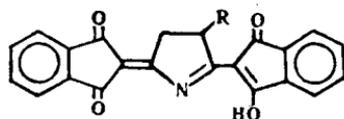
и продукт реакции выпадает в осадок [154]. Подобным образом реагирует также  $\alpha$ -пиперидинкарбоновая, или  $\alpha$ -пипеколиновая, кислота [154]. Красная окраска в реакции аминокислот с нингидрином появляется также при нагревании их в уксусной кислоте. Продукт реакции окрашивается в красный цвет и в том случае, если после хроматографического разделения на бумаге пролин и оксипролин идентифицировать с нингидриновым реагентом и хроматограммы высушивать при повышенной температуре. При постепенном повышении температуры высушивания хроматограмм можно наблюдать превращение желтого пятна в красное [155].

В работе [154] было установлено, что образование окрашенных продуктов реакции нингидрина с иминокислотами сопровождается декарбоксилированием иминокислот. В водной среде иминокислоты реагировали с двумя молекулами нингидрина, продуктам реакции приписывалась одна из двух таутомерных структур (131 или 132) [154].



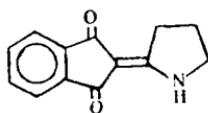
131

R = а) H; б) OH

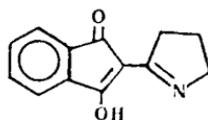


132

Если реакцию нингидрина с пролином и оксипролином проводить в спиртовом растворе, то декарбоксилирование иминокислот происходит уже при комнатной температуре: с 82%-ным выходом образуются желтые кристаллы, содержащие один остаток нингидрина и имеющие, по мнению авторов [154], структуру 133 или 134.



133



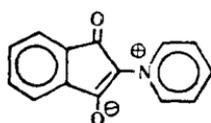
134

Было также установлено, что нагревание желтого монопирролинпроизводного индандиона-1,3 (133 или 134) с нингидрином в буферном растворе с pH 7 при температуре 60—70° дает уже описанный красный продукт реакции (131 или 132) [154]. Образование красного красителя из желтого продукта (133 или 134)

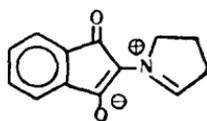
также наблюдается, если в последней реакции конденсации нингидрин заменить изатинном, хинонами или другими карбонильными соединениями [202]. Прибавление восстановителей к реакционной смеси пролина и нингидрина при получении желтого продукта не влияет на их взаимодействие. Образование желтого соединения из оксипролина и нингидрина в водных растворах, содержащих смешивающиеся с водой органические растворители, при pH 4—8 протекает через стадию образования какого-то красного промежуточного продукта [102].

Как видно из предложенных в [154] структурных формул продуктов (133, 134), взаимодействие нингидрина с иминокислотами рассматривалось как альдольно-кетоновая конденсация, не затрагивающая иминогруппу, что оказалось неверным. Правильные структуры продуктов реакции нингидрина с иминокислотами установили другие авторы [155]. В ИК-спектрах желтого продукта, полученного из пролина, отсутствовала полоса поглощения иминогруппы, необходимая согласно формулам 133 и 134.

Физические и химические свойства продукта оказались близкими свойствам хорошо изученного [203] енолятбетaina 2-пирролинийиндандиона-1,3 (135).

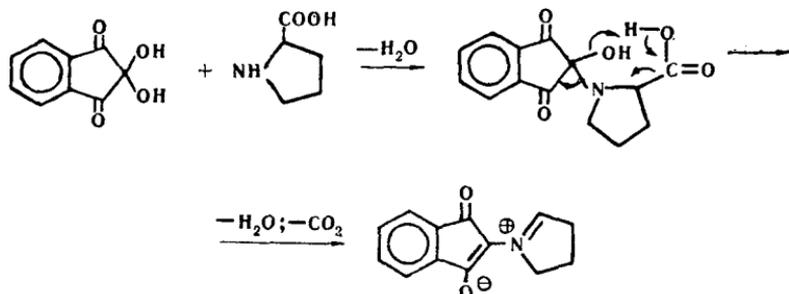


135



136

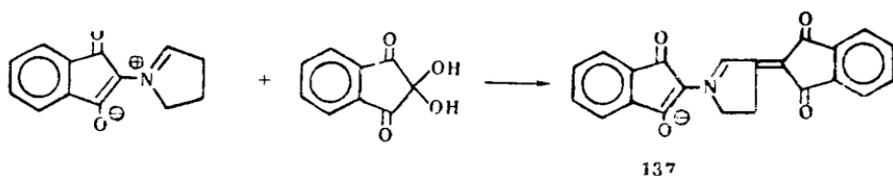
Было установлено [155], что желтый продукт реакции нингидрина с пролином, подобно 135, имеет структуру енолятбетaina 2-пирролийиндандиона-1,3 (136). Первый этап реакции протекает по общей схеме нингидриновой реакции:



136

Предполагаемое расщепление  $\text{—N=C}<$ -связи благодаря структурным особенностям енолятбетаина не происходит, поэтому пурпур Руэмана не образуется.

Если желтый продукт реакции (136) нагревать с избытком нингидрина, то легко протекает альдольно-кетоновая конденсация по метиленовой группе пирролиния и образуется красный продукт реакции (137), имеющий конъюгированную систему двойных связей. Методом ЯМР получены данные, подтверждающие правильность рассматриваемых структур желтого и красного продуктов [204].

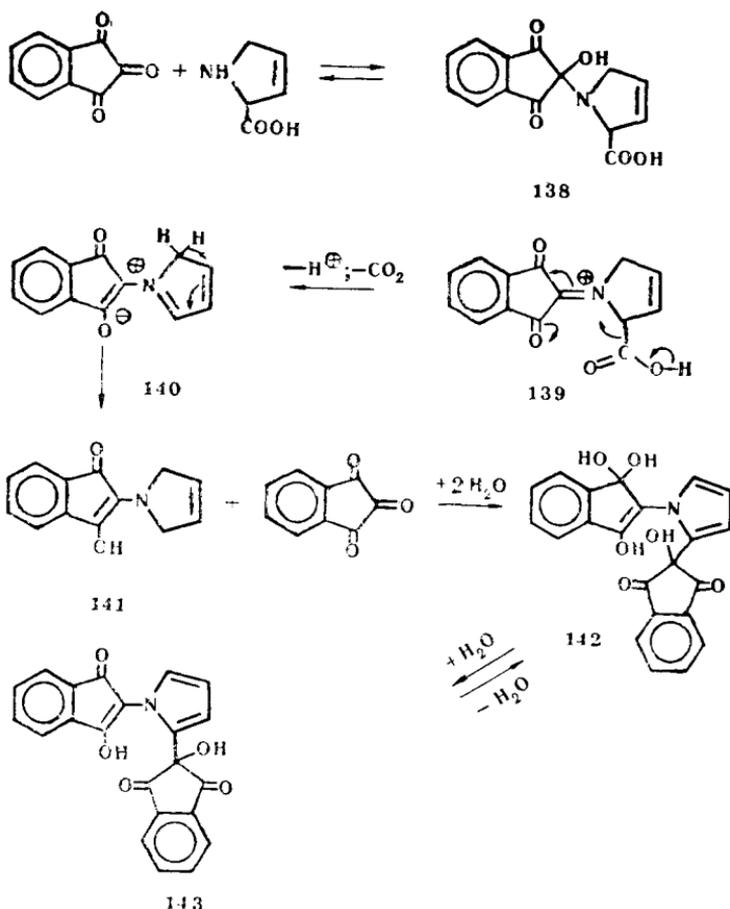


137

Аналогично протекают реакции нингидрина с другими аминокислотами, имеющими иминогруппу в пятичленном цикле [205].  $\alpha$ -Пиперидинкарбоновая и другие шестичленные аминокислоты с нингидрином реагируют подобно вышеупомянутым кислотам, но в этом ряду первые продукты реакции, имеющие желтый цвет, малостабильны, поэтому удается выделить только продукты красного цвета [155]. Четырехчленная аминокислота —  $\alpha$ -азетидинкарбоновая кислота — в реакции с нингидрином дает соответственно коричневый и синий продукты реакции, но в этом случае реакция, очевидно, протекает иначе [155, 206].

Высказано предположение, что реакции орнитина, лизина и оксализина с нингидрином протекают с одновременной циклизацией аминокислот [207]. В таком случае имеет место реакция нингидрина с циклическими аминокислотами.

3,4-Дегидропролин в противоположность пролину дает только желтое окрашивание при обработке его пятен на бумажных хроматограммах. В реакции 3,4-дегидропролина с нингидрином в водном растворе при pH 7 и небольшом нагревании интенсивно выделяется углекислый газ и осаждается бесцветный продукт [204]. Реакция нингидрина с 3,4-дегидропролином протекает следующим образом:

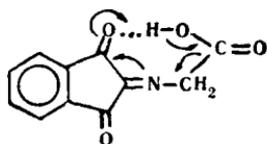


После нуклеофильного присоединения 3,4-дегидропролина к нингидрину следуют отщепление углекислоты, перегруппировка и присоединение второй молекулы нингидрина к пиррольному циклу. Бесцветный продукт реакции (142) при нагревании теряет молекулу воды и окрашивается в желтый цвет [204].

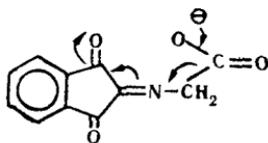
При сравнении продуктов реакции нингидрина с пролином (136, 137) и 3,4-дегидропролином (141—143) видно, какое большое значение на ход реакции оказывает наличие двойной  $\text{>C=C<}$ -связи в цикле аминок компонента.

При рассмотрении механизма нингидриновой реакции было отмечено, что эфиры  $\alpha$ -аминокарбоновых кислот не дают характерную нингидриновую реакцию. Более подробное изучение этого вопроса на примерах метилового, этилового, пропилового, изопропилового и *n*-бутилового эфиров и глицина позволило

обнаружить интересные факты. Оказалось, что *n*-бутиловый эфир глицина в водно-бутанольном растворе дает пурпур Руэмана быстрее, чем неэтерифицированный глицин. Авторы [208] объясняют это гидролизом *n*-бутилового эфира и образованием неионизированной аминокислоты со свободной карбоксильной группой, которая необходима для распада кетимина (144). Кетимин с неионизированной карбоксильной группой (144) распадается быстрее, чем кетимин с ионизированной карбоксильной группой (145).



144

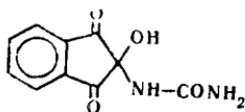


145

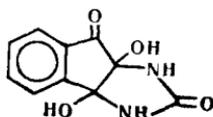
Таким образом, экспериментальные условия нингидриновой реакции здесь таковы, что скорость гидролиза *n*-бутилового эфира глицина и нуклеофильной атаки глицина на нингидрин выше скорости установления равновесия между ионизированной и неионизированной по карбоксильной группе молекулами глицина. В таких условиях перенос электронов по промежуточной форме (144) протекает легче, чем по форме 145, и, следовательно, скорость образования пурпура Руэмана больше при использовании *n*-бутилового эфира глицина, чем при использовании глицина.

В литературе [209] имеются указания, что гидразиды  $\alpha$ -аминокислот при нагревании с нингидрином в присутствии пиридина или аскорбиновой кислоты дают цветную реакцию с образованием пурпура Руэмана. Гидразид изоникотиновой кислоты при комнатной температуре образует желтые кристаллы продукта присоединения, пригодного для микрокристаллоскопической идентификации гидразида [210].

С нингидрином реагируют амиды кислот, несмотря на низкую нуклеофильность аминогрупп. Так, Ван Слайком с соавторами было замечено, что гидролиз мочевины при нагревании ее слабых водных растворов заметно замедляется в присутствии нингидрина [211]. Влияние нингидрина на выделение углекислого газа при гидролизе мочевины исследовалось количественно [212]. Выделением стабильного продукта присоединения мочевины к нингидрину удалось объяснить задержку гидролиза мочевины в присутствии нингидрина. Структура продукта присоединения, кристаллизующегося с одной молекулой воды, изучалась спектроскопически [56, 57]; продукту было приписано строение уреида нингидрина, вернее индандиона-1,3 (146).



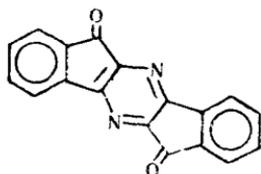
146



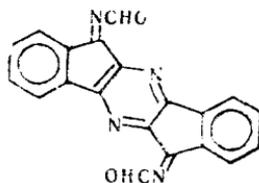
147

На основе УФ- и ИК-спектров продукта присоединения и встречным синтезом удалось установить его истинную структуру [213]. Продукт взаимодействия нингидрина и мочевины имеет инденонимидазолоную — 1-оксо-2,3-диоксииндано[2,3,4',5']-2'-оксоимидазольную структуру (147).

При нагревании формамида с нингидрином при 150° в зависимости от условий реакции образуются два продукта конденсации. Нагревание без добавления муравьиной кислоты приводит к образованию дибензоиленпроизводного пиазина (148), а в присутствии муравьиной кислоты — к образованию производных карбонильных групп соединения 148 [214].

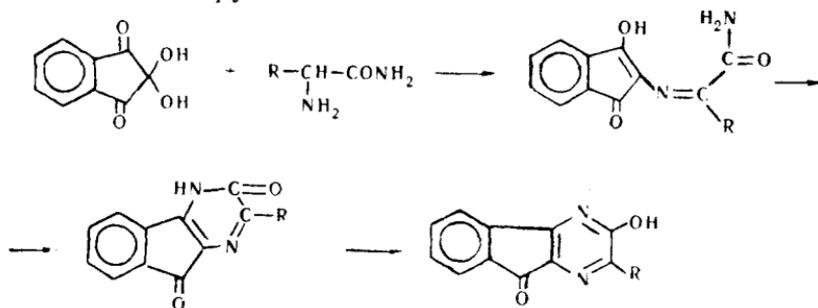


148



149

Интересно протекает реакция нингидрина с амидной группой кислоты в тех случаях, когда последняя входит в состав аминокислоты; амиды глицина и аланина образуют желтые кристаллические вещества (150) [169]. Их образование можно представить, если допустить, что после стадии нуклеофильного замещения нингидриновой реакции енамин не расщепляется, а циклизуется по амидогруппе.

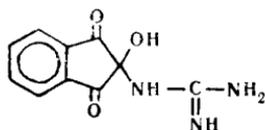


а) H ≠

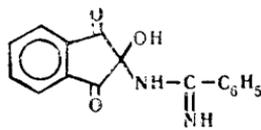
150

б) CH<sub>3</sub>

Нингидрин в водном растворе легко реагирует с гуанидином [5, 57] и бензамидином [5]. Бесцветным продуктам этих реакций Руэман приписал структуру 2-замещенных 2-оксииндандионов-1,3 (151 и 152) [5].



151



152

Нингидрин с гуанидином в сильнощелочной среде образует соединение, флюоресцирующее зеленым цветом [215]. Предполагают, что нингидрин перед взаимодействием с гуанидином расщепляется в *o*-карбокисфенилглиоксаль, и флюоресцирующие соединения дают *N*-моно- и *N,N*-дизамещенные гуанидины, но не дают близкие по структуре креатин и гуанин. На основе этой реакции разработан метод анализа, позволяющий определить 0,07 мкг/мл гуанидина [215].

Начиная с 1963 г. опубликовано много работ об образовании свободнорадикальных продуктов в нингидриновой реакции аминокислот [7, 216—221]. Установлено [216], что много свободных радикалов можно обнаружить, если реакцию проводить в водном буферном растворе при рН выше 7. Спектры ЭПР свободнорадикальных продуктов реакции нингидрина с различными аминокислотами в водно-спиртовой среде различаются между собой [7, 218, 221], т. е. образующиеся в результате реакции молекулы, на которых локализованы неспаренные электроны, имеют различную химическую структуру. Это дает основание полагать, что в таких условиях протекают несколько конкурирующих с собственно нингидриновой реакцией процессов [220]. Применение метода ЭПР открывает новые возможности изучения нингидриновой реакции. Особенно полезные результаты метод ЭПР может дать при исследовании взаимодействия нингидрина с пептидами [222] и белками и выяснении роли растворителей в этих реакциях.

### НИНГИДРИН В АНАЛИЗЕ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

Нингидриновые реакции на практике используются для синтетических и аналитических целей, однако в настоящее время использование нингидрина для решения синтетических задач не имеет еще того значения, которое имело аналитическое использование нингидриновой реакции уже через некоторое время после ее открытия.

Аналитическое использование нингидриновых реакций очень широко и многообразно. Практическое применение нингидриновых реакций тесно связано со спецификой разделения и очистки веществ, характером аналитического метода определения и особенностями его технического и аппаратного выполнения.

В собственно нингидриновой реакции аминокислот образуется несколько продуктов реакции, на использовании которых могут быть основаны аналитические методы количественного определения аминокислот: пурпур Руэмана, углекислый газ, альдегид деградации аминокислоты и в некоторых случаях — аммиак.

При нагревании  $\alpha$ -аминокислот с нингидрином при pH от 1 до 5 выделяется углекислый газ в количестве, эквивалентном количеству аминокислоты [211]. На основании этого факта была разработана методика газометрического определения свободных аминокислот [211].

Определение образующихся альдегидов в нингидриновой реакции из соответствующих аминокислот легло в основу старых методов определения аланина [223], валина, лейцина, изолейцина и фенилаланина [224].

Если  $\alpha$ -аминокислоты нагревать с избытком нингидрина в кислой среде при pH от 1 до 2,5, то весь азот  $\alpha$ -аминокислоты выделяется в виде аммиака [131, 225]. Для количественного выделения аммиака необходимо соблюдать определенные условия проведения реакции. Некоторые аминокислоты, например, триптофан, дают лишь около третьей части от теоретического выхода [131]. Описанные в литературе методики значительно различаются между собой [131, 226—228]. Подавляющее большинство количественных методов определения аминокислот основано на колориметрировании пурпура Руэмана нингидриновой реакции.

Со времени появления первых работ [124, 140, 229] о колориметрическом определении аминокислот на основе нингидриновой реакции накопился очень обширный материал, касающийся всех возможных практических вопросов анализа [230]. Подробно изучены оптимальные условия образования анионной формы 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3, влияние температуры, pH, растворителей и других факторов на нингидриновую реакцию.

Использование нингидриновой реакции для колориметрического определения аминокислот осложняется тем, что во время реакции часть гидриндантина окисляется кислородом воздуха, вследствие чего образование аниона 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 не достигает стехиометрических количеств. Кроме того, протекает ряд побочных реакций, и выход окрашенного продукта в значительной мере зависит от температуры, pH среды, времени реакции и т. п. Для обеспече-

ния максимальной и воспроизводимой окраски реакции было предложено применять восстановители [109, 116, 231] или небольшие количества гидриндантина [232, 233]. При этом повышается также чувствительность реакции [234].

На количественный выход и стабильность пурпура Руэмана большое влияние оказывает присутствие ионов металлов в реакционном растворе. Ионы меди, никеля, кадмия, цинка, кобальта и др. образуют внутрикомплексные соединения с 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандионом-1,3 [235, 236], что используется при колориметрическом определении аминокислот [237, 238].

Составлен прекрасный обзор колориметрических методов определения аминокислот с использованием нингидриновой реакции [230], который охватывает 195 работ, появившихся в печати до 1962—1963 гг. В этом обзоре для определения отдельных аминокислот предлагаются колориметрические методы, основанные на образовании окрашенных продуктов не только в нингидриновой, но и в других реакциях. Работа дает возможность сравнивать аналитическое значение нингидриновой и других реакций.

После выхода упомянутого обзора [230] уточнение и выяснение отдельных моментов колориметрического метода нингидриновой реакции определения аминокислот продолжается с неослабевающей интенсивностью. Изучаются вопросы окисления реагента [239—241], влияние pH [242, 243], органических растворителей [244—246] и других условий реакции [201, 242, 247—251]. Много работ относится к изучению стабильности и характера комплексов металл-2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 [252—256].

Быстрому развитию колориметрических методов определения аминокислот нингидрином способствовало и то обстоятельство, что нингидриновая реакция была использована совместно с различными способами хроматографического анализа. Развитие метода ионообменной хроматографии протеиновых аминокислот [116, 257—261] и использование нингидриновой реакции для их разделения послужили основой для разработки автоматических анализаторов аминокислот [262—264].

Дальнейшее развитие автоматического метода анализа аминокислот вызвало необходимость изучения и таких вопросов, которые только отдаленно связаны с химизмом нингидриновой реакции, например стабильность, хранение и консервирование растворов нингидрина и др. [250, 265—269]. При автоматическом анализе аминокислот биологического происхождения особенно актуальным стал вопрос о «нингидринположительных» веществах. Эти соединения, часто не содержащие азота и не имеющие установленной структуры, реагируют с нингидрином [270—278].

и продукты реакции в автоматическом анализаторе искажают результаты анализов аминокислот. Проверено очень большое количество таких веществ [270] и установлена структура отдельных продуктов реакции [272, 273].

Считают [279], что нингидрин является наиболее подходящим из реагентов, используемых в ионообменной хроматографии и автоматических анализаторах аминокислот.

Развитие хроматографического метода разделения аминокислот на бумаге тесно связано с практическим использованием нингидриновой реакции. С самого начала внедрения этого метода в биохимический анализ нингидрин оказался ценнейшим реагентом для обнаружения аминокислот на бумаге [187, 280—282] и их количественного определения [232, 283—289]. Нингидрин применяется в различных модификациях метода хроматографии на бумаге [290—295]. Известно, что химические реакции, проводимые на хроматографической бумаге, могут протекать иначе и при других условиях, чем те же реакции, осуществляемые в растворах. Поэтому неудивительно, что большая часть всех работ о проявлении аминокислот нингидрином на хроматографической бумаге относится к чисто эмпирическому установлению оптимальных условий реакции. На нингидриновую реакцию, выполняемую на бумаге, большое влияние оказывает характер применяющихся разделительных систем растворителей хроматограмм [296, 297]. Предложено много вариантов составов нингидриновых реагентов [225, 241, 256, 298—309].

Протеиновые аминокислоты дают различные окраски, если их после хроматографирования обработать реагентом, состоящим из нингидрина, изатина и триэтиламина [310]. Изменение цвета окрашенных нингидрином пятен аминокислот на хроматограммах наблюдается при их обработке парами диэтиламина [311] или спиртовым раствором едкого кали [300]. Для обнаружения аминокислот и пептидов предложено комбинировать нингидрин с раствором перманганата калия [312] или реактивом Драгендорфа [313]. Многие из описанных методик количественного определения аминокислот нингидрином на бумаге являются измененными вариантами работы Боде [309].

В работе [314] сделана попытка стандартизировать условия проведения нингидриновой реакции на бумаге. В литературе на русском языке имеется довольно много хороших методик обнаружения и определения аминокислот нингидрином способом хроматографии на бумаге. Здесь в первую очередь следует отметить перевод книги Хайса и Мацека, где обобщены литературные данные до 1955—1956 гг. [314]. Практичную и удобную методику, дающую легко репродуцируемые результаты, разработала Т. С. Пасхина [51, 288].

Важнейшим критерием целесообразности применения нингидриновой реакции на хроматографической бумаге для решения той или иной задачи является чувствительность реакции, определение которой по ряду специфических причин составляет большие трудности [315, 316]. Легко понять, что при использовании различных методик могут иметь место значительные расхождения результатов определения чувствительности [291, 305, 317—320]. Некоторое представление об открываемых минимумах отдельных аминокислот с нингидрином на бумажных хроматограммах можно получить из табл. 2, взятой из работы [319]. Для сравнения чувствительности нингидриновой реакции приводятся открываемые минимумы соответствующих реакций изатина и аллоксана. Условия применяемого хроматографического разделения и проведения цветных реакций приведены в той же работе [319]. Как видно из данных табл. 2, наиболее чувствительным реагентом для аминокислот можно считать нингидрин.

В ряде методик учитываются индивидуальные особенности отдельных аминокислот, например орнитина [321], фенилаланина [322], триптофана [323], тирозина, цистина [324], иминокислот [310, 325, 326] и др. [327—331], а также сложность анализируемых материалов биологического происхождения [286, 287, 317, 332, 333].

Электрофорез аминокислот является вполне самостоятельным и своеобразным аналитическим методом, но обнаружение и определение аминокислот на электрофореграммах нингидриновыми реагентами не отличается от обработки обычных хроматограмм [334]. Нингидрин в электрофоретическом анализе имеет такое же важное значение, как и при методе анализа хроматографией на бумаге [335]. Нингидрин является самым распространенным реагентом на аминокислоты также при использовании метода хроматографии в тонких слоях [336] и при других способах [337—339]. Проведены многочисленные исследования о нингидриновой реакции  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - и других аминокислот в водной и безводной средах [175]. Обычное розовое окрашивание этих аминокислот с нингидрином в безводной уксуснокислой среде от прибавления воды меняется на синее. Однако такое изменение окраски наблюдается не у всех аминокислот [175].

По реактивности  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -аминогруппы лизина в нингидриновой реакции различаются между собой. На этой основе разработаны специальные методики определения  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -аминогрупп [247, 340] лизина и способ его связывания с  $\alpha$ - или  $\epsilon$ -аминогруппой в пептидах [340].

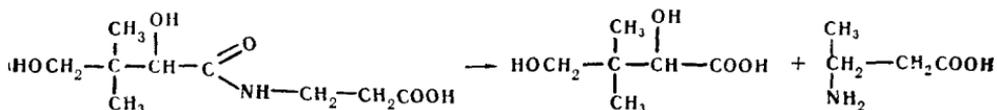
Своеобразное использование способности нингидрина реагировать с  $\beta$ -аминокислотами нашло применение при анализе пантотеновой кислоты и ее препаратов. Для этого пантотеновая

Таблица 2

**Чувствительность цветных реакций нингидрина,  
аллоксана и изатина с аминокислотами на бумажных хроматограммах [319]**

Аминокислота	Открываемый минимум, мкг		
	нингид- рин	изатин	аллоксан
Аланин	0,2	5	0,4
$\alpha$ -Аланин	0,4	—	0,4
$\beta$ -Аминоизомасляная кислота	2,6	10,0	0,2
$\alpha$ -Аминомасляная кислота	0,1	0,1	0,4
$\gamma$ -Аминомасляная кислота	0,5	0,5	0,5
Аргинин	0,2	2,0	1,0
Аспарагин	0,7	—	1,3
Аспарагиновая кислота	0,3	3,0	0,7
Валин	0,1	10,0	0,6
Гистидин	0,4	2,0	1,0
Глицин	0,2	4,0	0,4
Глютамин	1,5	—	3,0
Глютаминовая кислота	0,3	4,0	0,8
Глютатион (восст.)	1,5	6,2	1,4
Глютатион (окисл.)	0,1	5,0	4,0
Гомосерин	0,04	10,0	0,8
Гомоцистеин	0,3	1,0	0,3
Гомоцистеин (тиолактон)	15,0	3,8	0,2
Дженколовая кислота	1,3	2,5	0,8
3,5-Дийодтирозин	2,0	2,0	2,2
3,4-Диоксифенилаланин	4,9	0,2	0,3
Изолейцин	0,1	10,0	0,7
Канаванин	0,3	13,0	0,4
Карнозин	5,7	20,0	0,7
Лактионин	0,2	0,4	0,2
Лейцин	0,1	10,0	0,7
Лизин	0,1	2,0	0,5
Метилгистидин	0,04	2,0	0,6
Метионин	0,1	0,7	0,8
Метионинсульфоксид	0,08	4,0	0,4
Норвалин	0,1	2,0	0,6
Норлейцин	0,1	2,0	0,7
Оксиллизин	0,2	0,8	0,4
Оксипролин	0,6	1,3	—
Орнитин	0,3	0,3	0,6
Пролин	0,5	0,2	—
Серин	0,2	3,0	0,5
Таурин	0,6	—	0,6
Тиогистидин	0,8	1,9	0,4
Тирозин	0,2	0,9	2,0
Треонин	0,1	3,0	0,6
Триптофан	0,2	0,8	1,0
Фенилаланин	0,7	0,7	0,8
Фенилсерин	0,04	10,0	0,6
Цистатионин	0,4	1,9	0,2
Цистеин	2,7	3,6	0,8
Цистеиновая кислота	0,6	0,8	0,8
Цистин	0,5	1,2	0,8
Цитруллин	0,9	3,5	0,8
Этионин	0,2	1,6	0,2

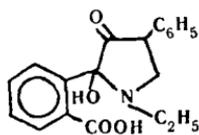
кислота гидролизуется до полного освобождения  $\beta$ -аланина, который определяется нингидрином [341, 342].



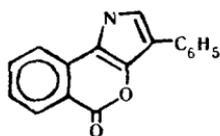
С нингидрином в реакцию вступают дипептиды [343, 344], олигопептиды и полипептиды [345—350]. В щелочной среде протеины, а также отдельные аминокислоты (цистеин, пролин, оксипролин, триптофан, гистидин и лизин) флюоресцируют [351].

В присутствии некоторых альдегидов первичные амины конденсируются в флюоресцирующие соединения. Особенно сильно флюоресцируют продукты реакций, если конденсацию  $\alpha$ -аминокислот и пептидов осуществлять в присутствии фенолацетальдегида [179]. Для установления структуры этих сложных продуктов реакции проведена конденсация модельного соединения из нингидрина, фенолацетальдегида и этиламина. С помощью меченых индикаторов установлено, что соотношение исходных компонентов в продукте синтеза равно 1:1:1 [180].

На основе данных УФ-, ИК-, ЯМР-, масс-спектрометрии и рентгеноструктурного анализа установлено, что флюоресцирующие продукты, синтезированные из нингидрина, фенолацетальдегида и этиламина, имеют структуру пирролинона (153) и изокумарина (154) [352].



153



154

Способность аминокислот и пептидов вступать в трехкомпонентную конденсацию с нингидрином и альдегидами используется для разработки флюоресцентного метода анализа аминокислот, который в 10—100 раз чувствительнее колориметрических методов анализа с нингидрином [180].

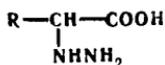
В упомянутых работах [179, 180] изучено большое число аминокислот на их способность вступать в реакцию конденсации с нингидрином и альдегидом с образованием флюоресцирующих соединений.

Нингидриновая реакция применяется не только в анализе смеси продуктов биологического происхождения, но и с успехом может быть использована в цитохимическом анализе аминокислот [353, 354].

Как видно из этого далеко не полного перечня главных объектов анализа и аналитических приемов и методов, нингидриновые реакции находят очень широкое практическое применение в анализе аминокислот, пептидов и протеинов.

### РЕАКЦИИ НИНГИДРИНА С АНАЛОГАМИ АМИНОКИСЛОТ, ПРОИЗВОДНЫМИ АМИНОВ И БЕЗАЗОТИСТЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Гидразинокарбоновые кислоты (155) являются интересными аналогами аминокислот по аминогруппе. Свободный гидразин как в водном, так и в 1,2-диметоксиэтановом растворах реагирует с нингидрином [355]. Реакционные растворы имеют красноватый цвет. Основные максимумы абсорбции в УФ-спектре продукта реакции наблюдаются при 333 и 440 *нм*. В пределах около 500 *нм* максимум абсорбции отсутствует, и, таким образом, пурпур Руэмана, или 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандион-1,3, в этой реакции не выделяется. Авторы работы [355] высказывают предположение, что при реакции нингидрина с гидразином образуется β-гидразон нингидрина, который реагирует со второй молекулой нингидрина, переходя в азосоединение. Хотя реакция проводилась в присутствии хлористого олова, синтез 2-аминоиндандиона-1,3 восстановлением предполагаемых промежуточных продуктов не происходил. В противоположном случае должен был бы образоваться пурпур Руэмана [355].

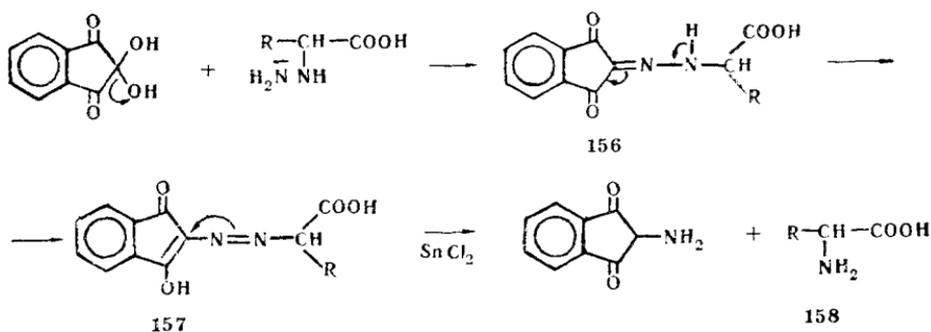


155

Изучена реакция нингидрина с α-гидразино-*n*-масляной, α-гидразино-3-метил-*n*-масляной, α-гидразиновалериановой, α-гидразинофенилуксусной и рядом других гидразинокарбоновых кислот [355]. Реакция выполнялась почти в таких же условиях, как с аминокарбоновыми кислотами: в цитратном буферном растворе при pH 5 и в присутствии хлористого олова. С α-гидразинокарбоновыми кислотами реакция проводилась в водном растворе при 100° и водно-метилцеллосольвном (1:1) растворе при 124°. В зависимости от условий выполнения реакции и характера α-гидразинокарбоновой кислоты, подобно соответствующим α-аминокислотам, во всех проверенных случаях наблюдалось образование пурпура Руэмана с различными цветовыми выходами [355]. Идентификация 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 основывалась на данных УФ-спектров продуктов реакции.

По мнению авторов [355], нингидриновая реакция α-гидразинокарбоновых кислот начинается нуклеофильной атакой β-азота

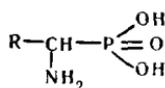
$\alpha$ -гидразиногруппы. Гидразон нингидрина (156) изомеризуется в азосоединение (157), которое под влиянием хлористого олова претерпевает восстановительное расщепление, и образуется 2-аминоиндандион, далее дающий пурпур Руэмана.



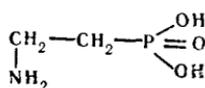
По сравнению с нингидриновой реакцией аминокислот вместо гидролитического расщепления соответствующего кетимина в случае гидразинокарбоновых кислот протекает восстановительное расщепление. При этом декарбоксилирования, очевидно, не происходит, и отщепляется аминокислота (158).

Хотя детали механизма реакции нингидрина с гидразинокарбоновыми кислотами неизвестны и структура промежуточных продуктов не доказана, тем не менее эту реакцию можно отнести к собственно нингидриновой.

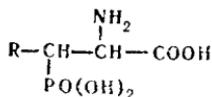
Наличие фосфиновой группировки в  $\beta$ - и  $\gamma$ -положениях  $\alpha$ -аминокислот не влияет на положительную нингидриновую реакцию таких аминокислот [356]. Однако очень любопытно то, что как  $\alpha$ - (159), так и  $\beta$ - (160) аминокислоты, подобно соответствующим аминокарбоновым кислотам, также дают цветную реакцию с нингидрином.



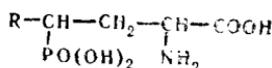
159



160



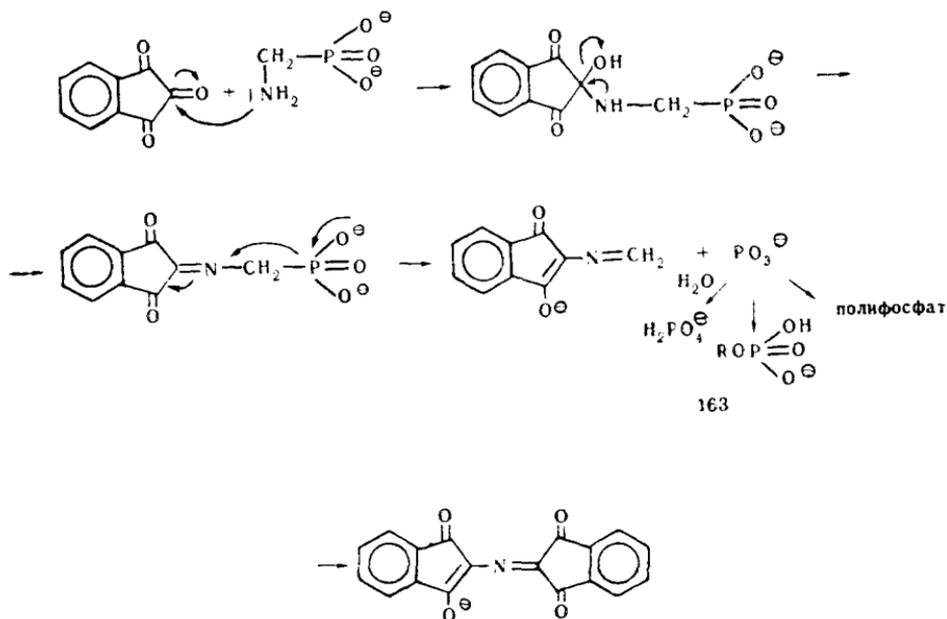
161



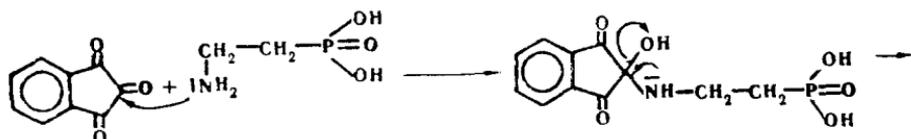
162

P = а) H; б)  $CH_3$ ; в)  $C_6H_5$

В реакции аминотилфосфиновой кислоты (**159a**) с нингидрином в этиленгликоле и триэтилаmine при комнатной температуре наряду с 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандион-1,3 (**79**) образуются метафосфат и 2-оксиалкилфосфиновая кислота (**163**) [357]. Реакция нингидрина с аминотилфосфиновой кислотой протекает согласно механизму нингидриновой реакции  $\alpha$ -аминокислот с единственным отличием в том, что вместо углекислоты выделяется метафосфат [357]. Дальнейшее превращение метафосфата зависит от состава среды, в которой проводится реакция.



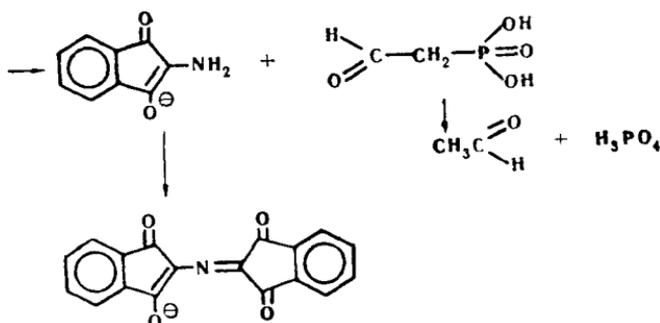
2-Аминоэтилфосфиновая кислота (**164**) обнаружена в липидных и белковых фракциях различных биологических объектов, ее реакция с нингидрином исследована более подробно [358]. 2-Аминоэтилфосфиновую кислоту (**164**) можно рассматривать как аналог  $\beta$ -аминокислот, следовательно, аналогичны и механизмы реакций этих кислот с нингидрином. Поскольку в электронных передачах продукта нуклеофильного замещения нингидрина с  $\beta$ -аминофосфиновой кислотой (**165**) участвуют электроны  $\alpha$ -углеродной С—Н-связи, то в данном случае отщепляется не метафосфат, а ортофосфат.



164



165



Нингидриновая реакция аминоалкилфосфиновых кислот применяется в аналитической химии. Отщепление ортофосфатов в этой реакции было использовано при разработке специального нингидрин-молибденового реагента для обнаружения аминоалкилфосфиновых кислот биологического происхождения на бумажных хроматограммах [359].

В определенных условиях при обработке нингидриновым реагентом разделенных хроматографией на тонких слоях фенилтиогидантоинов аминокислот можно наблюдать характерную окраску пятен [360]. D,L-2-аминобутанол [168], так же как и оксизин [361], реагирует с нингидрином, образуя пурпур Руэмана. Амины, содержащие гидроксильные группы в  $\beta$ -,  $\gamma$ - и других положениях относительно аминогруппы, дают цветную реакцию нингидрина [149].

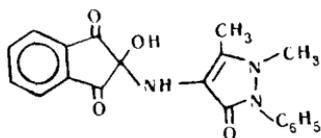
Нингидрин реагирует с аминогексозами [362, 363] и их полимерами [363]. При нагревании 2%-ного водного раствора нингидрина, содержащего 4% пиридина, реакция с 2-амино-2-дезокси-D-глюкозой и с 3-амино-2-дезокси-D-глюкозой протекает

количественно. Эта реакция, называемая нингидриновым окислением, сопровождается образованием пурпура Рузмана, и, следовательно, можно допустить, что она протекает по механизму собственно нингидриновой реакции.

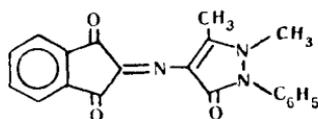
В присутствии пиридина с нингидрином реагирует 3-амино-3-дезоксиг-6-О-тринилцеллюлоза [363]. Можно предполагать, что малораспространенный до сих пор метод нингидринового окисления в будущем найдет более широкое применение в химии аминокислот.

Методу нингидринового окисления посвящена работа о получении полуальдегида янтарной кислоты в реакции нингидрина с глютаминовой кислотой [364].

Обработка бумажных хроматограмм, на которых разделялись бесцветные N-глюкозиды, нингидриновыми реактивами позволяет обнаружить N-глюкозиды в виде коричневых пятен [365].



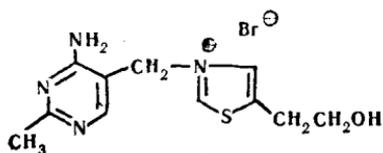
166



167

4-Аминоантипирин в метанольно-фосфатном буферном растворе с рН 6,6 образует бесцветные кристаллы 2-аминопроизводного 2-оксиинданона-1,3 (166), который при нагревании в уксусной кислоте переходит в основание Шиффа (167), окрашиваясь при этом в фиолетово-красный цвет [366].

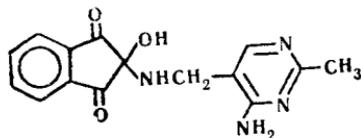
При нагревании тиамин с нингидрином в слабокислой среде (фосфатный буфер с рН 6,8) образуется желтое соединение, пригодное для колориметрического определения тиамин [367]. Тиамин (168) содержит остатки 2-метил-6-аминопиридина и 4-метил-5-оксиэтилтиазола, связанные с метиленовой группой. В образовании окрашенного соединения, по мнению авторов, участвует тиазольный остаток. Данный вывод был сделан на основе того, что тиамин, обработанный формальдегидом, который должен был бы реагировать с аминогруппой пиридинового остатка, также вызывает желтое окрашивание [368].



168

Нингидрин может быть использован для определения ряда медицинских препаратов, содержащих тиазольные остатки, таких, как сульфазол, норсульфазол и др., которые при взаимодействии с нингидрином образуют желтые продукты реакции [368].

2-Метил-4-амино-5-(аминометил)пиримидин при продолжительном нагревании в 1 н. соляной кислоте дает несколько продуктов реакции, в том числе 2-окси-2-(2'-метил-4'-амино-5'-пиримидометиленамино)индандион-1,3 (169) [369].

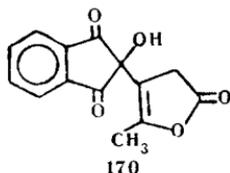


169

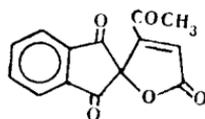
При нагревании в щелочной среде нингидрин реагирует с рибофлавином, образуя зеленый продукт реакции [370]. Раствор нингидрина в серной кислоте предложен как реактив на алкалоиды [371, 372] и ряд других соединений [372]. Химизм этих реакций не изучен.

Нингидрин реагирует со многими безазотистыми соединениями. Так, с нингидрином и пропионовым альдегидом в серной кислоте образуется красно-фиолетовое вещество, структура которого не установлена [373]. Чувствительность реакции 1—3 мкг. Реакция использована при разработке спектрофотометрического метода определения пропионового альдегида [373].

Описаны цветные реакции и образование бесцветных продуктов в реакциях нингидрина с лимонной, пировиноградной и другими окси- и кетокислотами и моносахаридами [273, 274, 374]. Более подробно изучена реакция нингидрина с левулиновой кислотой [273, 274]. Если растворы нингидрина и левулиновой кислоты нагревать в водном буферном растворе с pH 5,2, то из реакционного раствора в эфир как растворитель переходит бесцветный продукт с т. пл. 148—149°. На основе данных ИК-спектров соединению с т. пл. 148—149° была приписана структура производного 2-оксиндандиона-1,3 (170) [274].



170



171

По данным ЯМР, продукт конденсации нингидрина и левулиновой кислоты имеет спироструктуру (171) [273].

Нингидрин реагирует с уроновыми кислотами [276] и другими продуктами класса углеводов [272, 375]. Большинство из этих

соединений абсорбируют свет в районе 440—570 *нм* и, таким образом, могут помешать нингидриновой реакции при ее использовании в анализе аминокислот. Установление структур индивидуальных продуктов реакции нингидрина представляет значительные трудности.

### БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НИНГИДРИНА

Первые данные о биологической активности гидрата трикетогидриндена были опубликованы Руэманом [8]. Была проверена токсичность нингидрина на лягушках и микроорганизмах. Инъекция 2—5 *мг* нингидрина лягушке вызвала паралич сердца, но препарат вскоре разрушился в организме. Нингидрин задерживал рост дрожжей. Для проявления бактериостатического эффекта нингидрина необходимо присутствие цистеина (0,1% от веса нингидрина) [376]. Растворы нингидрина вызывали гибель амёб. В этом случае действие нингидрина рассматривалось как дезаминирование белков [377].

Нингидрин, введенный мышам, снижает активность их жизненных функций, доза 3 *мг* на организм является смертельной [378]. Нингидрин снижает устойчивость мышей к радиационному облучению [379]; в концентрациях выше  $10^{-5}$  *М* повышает *in vitro* чувствительность асцитных опухолевых клеток к воздействию радиации [380]. По имеющимся данным [381],  $8 \cdot 10^{-4}$  *М* растворы нингидрина ингибируют деградацию дезоксирибонуклеиновых кислот *Escherichia coli* после их облучения. Открытие этих свойств послужило причиной того, что он был предложен в качестве радиосенсибилизатора для клинического испытания [382]. Радиосенсибилизирующее действие нингидрина проверялось также на растительном материале — на меристемной ткани корней *Vicia faba* [383].

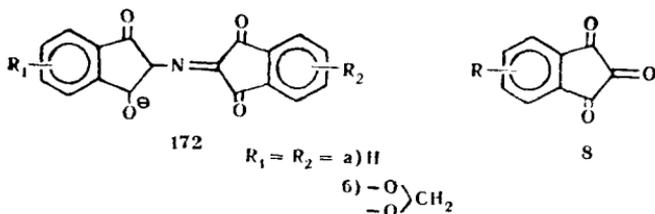
Нингидрин проявляет к некоторым штаммам вируса гриппа антивиральную активность [384, 385] и ингибирует включение уридина лимфоцитов [386], а также действие ряда ферментов. Лучше всего изучено его влияние на энзиматическое фосфорилирование [347, 387]. Имеются данные об ингибировании оксидаз: ксантинооксидазы [388] и оксидазы бензойной кислоты [389]. Нингидрин ингибирует действие папаина, активированного присутствием цианидов [390]. Изучение взаимодействия папаина с нингидрином и другими кетонами ряда индена [391] имело большое значение для выяснения структуры активных центров папаина. Ингибирование нингидрином фосфорилирующих и протеолитических процессов, осуществляемых некоторыми ферментами, связано с эффектом взаимодействия сульфгидрильных групп этих ферментов с нингидрином.

## Глава II

### ПРОИЗВОДНЫЕ И АНАЛОГИ НИНГИДРИНА

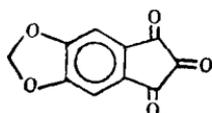
#### ЗАМЕЩЕННЫЕ В БЕНЗОЛЬНОМ КОЛЬЦЕ НИНГИДРИНЫ

Деградация аминокислот по Штреккеру с ди-, три- и поликарбонильными соединениями является общей реакцией. Циклический трикетон — индантрион-1,2,3 по своему действию на аминокислоты отличается от нециклических трикетонов тем, что в ходе реакции азот аминокислоты включается в яркоокрашенный продукт реакции — пурпур Руэмана [129].

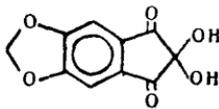


Введение заместителей в бензольное кольцо нингидрина (8) должно было бы изменять скорость и характер нингидриновой реакции и цвет замещенного 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 (172). Таким образом, наряду с нингидриновыми реакциями незамещенного нингидрина некоторый интерес представляют замещенные нингидрины (8).

Первый представитель этого класса был получен Руэманом еще в 1912 г. [392]. При гидролизе продукта конденсации 5,6-метилendioксигидриндона-1 и *n*-нитрозодиметиланилина серной кислотой был выделен 5,6-метилendioкситрикетогидринден (173) с лучшим по сравнению с незамещенным трикетогидринденом выходом [392].



173

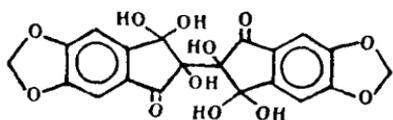


174

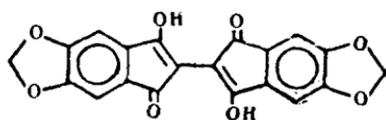
Из 5,6-метилendioкситрикетогидриндена по аналогии с нингидрином был получен *бис*-метилendioксигидриндантин (175). Последний растворяется в растворе едкого натра с красным, а в растворе едкого кали — с синим окрашиванием. С  $\alpha$ -аминокислотами *бис*-метилendioксигидриндантин реагировал с появлением синей окраски, но, как отмечено Руэманом, реакция протекала намного медленнее, чем в случае с незамещенным нингидрином [392].

Гидрат 5,6-метилendioкситрикетогидриндена (174) хуже растворяется в воде и спирте по сравнению с нингидрином. Изолированный продукт взаимодействия 5,6-метилendioкситрикетогидриндена с аммиаком по своему составу не соответствовал аналогичному продукту, полученному из нингидрина и аммиака [382].

В 1950 г. к исследованию гидрата 5,6-метилendioксииндантриона-1,2,3 обратился Маубашер [393]. Нагреванием гидрата 5,6-метилendioксииндантриона-1,2,3 с хлористым тиоилом были получены красные кристаллы 5,6-метилendioксииндантриона-1,2,3 (173) [393]. В растворе изопропилового спирта на солнечном свете трикетон превращается в *бис*-метилendioксигидриндантин (175), который, подобно гидриндантину, кристаллизуется с двумя молекулами кристаллизационной воды. При продолжительном нагревании 5,6-метилendioксииндантриона-1,2,3 с сероводородом был получен *бис*-5,6-метилendioксииндандион-1,3 (176).



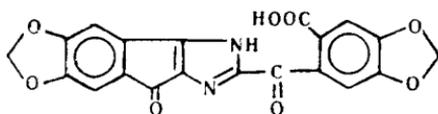
175



176

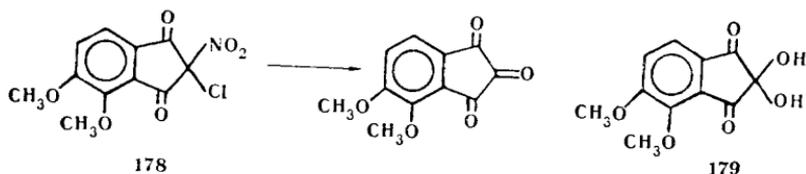
Автором [393] довольно подробно изучено взаимодействие гидрата 5,6-метилendioксииндантриона-1,2,3 с  $\alpha$ -аланином. При проведении реакции в водном растворе были идентифицированы углекислый газ, ацетальдегид и при нагревании — аммиак. В реакционной колбе остался красно-фиолетовый осадок, кристаллизовавшийся из 2-метилнафталина. Это вещество, по мнению автора, имеет структуру *бис*-5,6-метилendioксииндандиона-1,3 (176), а не 5,6-метилendioкси-2-[5',6'-метилendioксииндандион-1',3'-илиден(2')]аминоиндандиона-1,3, который совсем не упоминается [393]. В свете изложенного о механизме нингидриновой реакции вопрос о структуре окрашенного продукта, образующегося в реакции 5,6-метилendioксинингидрина с  $\alpha$ -аланином, нельзя считать решенным.

Продукту реакции 5,6-метилendioксинингидрина с аммиаком, впервые полученному Руэманом [392], в работе [393] приписывалась структура конденсированной системы имидазола (177).



177

Аналогично получению нингидрина из 2-хлор-2-нитроиндандиона-1,3 Г. Ванга и И. Стунда нагреванием 2-хлор-2-нитро-4,5-диметоксииндандиона-1,3 (178) в высококипящих растворителях синтезировали гидрат 4,5-диметоксииндантриона-1,2,3 (179) [394].

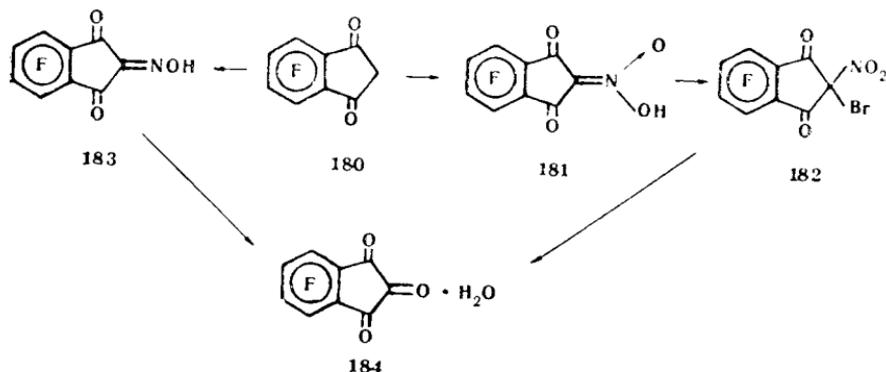


178

179

Отмечено, что 4,5-диметоксинингидрин, подобно незамещенному нингидрину, с  $\alpha$ -аминокислотами в водном растворе дает синее окрашивание [394].

Несколько способов синтеза индантриона проверено при получении гидрата 4,5,6,7-тетрафториндантриона-1,2,3 (184) [395]. Окисление тетрафториндандиона-1,3 (180) суспензией двуокиси селена в бензоле привело к изолированию бис-4,5,6,7-тетрафториндандиона-1,3. Тетрафториндантрион-1,2,3 образуется при окислении дикетона двуокисью селена во влажном диоксане. Выход 24,2% [395].



183

180

181

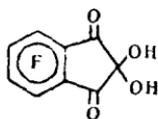
182

184

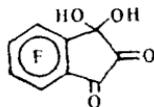
Разложение 2-нитро-2-бром-4,5,6,7-тетрафториндандиона-1,3 (182) его кипячением в нитробензоле дало 11%, а омыление

2-нитрозо-4,5,6,7-тетрафториндандиона-1,3 (183) разбавленной серной кислотой в присутствии формальдегида — 31% выхода тетрафторнингидрина [395].

4,5,6,7-Тetraфториндантрион-1,2,3 с бензолом образует устойчивый сольват, разрушающийся только при кипячении с водой. По данным ЯМР  $F^{19}$ , в водном растворе присутствуют две гидратные формы (184а, б) с соотношением примерно 1 : 2 [395].



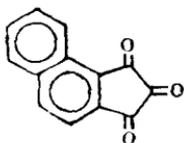
184а



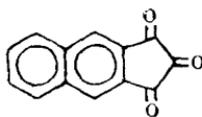
184б

Существование двух гидратных форм тетрафторнингидрина свидетельствует о сильном влиянии перфторированного бензольного кольца на присоединенную к нему циклическую трикетогруппу. Интересно было бы исследовать реакции тетрафторнингидрина с аминокислотами, однако таких данных в литературе не имеется.

Описана попытка изменить реакционную способность нингидрина в реакциях с аминокислотами, а также цветную характеристику пурпура Рузмана путем перехода на конденсированные бензольные системы [396]. Исходными продуктами для синтеза 4,5-бензиндантриона-1,2,3 (185) и 5,6-бензиндантриона-1,2,3 (7) послужили соответствующие бензиндандионы-1,3. Необходимые для термического разложения 2-нитро-2-бромбензиндандионы-1,3 приготовить не удалось, так же как не удалось омылить легко доступные 2,2-дибром- и 2-нитрозобензиндандионы-1,3. Окисление 4,5-бензиндандиона-1,3 двуокисью селена в нитробензоле при  $150^\circ$  дало 4,5-бензиндантрион-1,2,3 (185) с 53%-ным, а 5,6-бензиндантрион-1,2,3 (7) из 5,6-бензиндандиона-1,3 с 23%-ным выходом [396].



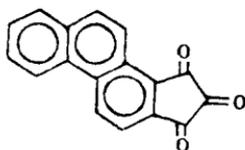
185



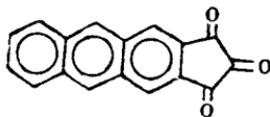
7

Оба бензиндантриона-1,2,3 кристаллизуются в виде желтоватых моногидратов, дающих цветные реакции с  $\alpha$ -аминокислотами. На примере  $\alpha$ -аланина было показано, что реакции с 4,5-бензиндантрионом-1,2,3 и 5,6-бензиндантрионом-1,2,3 протекают аналогично нингидриновой; были идентифицированы углекислый газ, ацетальдегид и красители: в первом случае темно-фиолетовый, во втором — сине-зеленый [396].

Бензонингидрин (7, 185), так же как и нингидрин, является групповым реактивом: специфических реакций для аминокислот не обнаружено. Чувствительность бензонингидриновых реакций с аминокислотами немного меньше, чем нингидриновой: бензонингидринами на хроматографической бумаге можно обнаружить 0,2 мкг лейцина, нингидрином — 0,1 мкг. Как следует из спектроскопической характеристики бензоаналогов пурпура Руэмана, эти соединения не будут иметь преимущества по сравнению с пурпуром Руэмана при их практическом использовании [396].



186



187

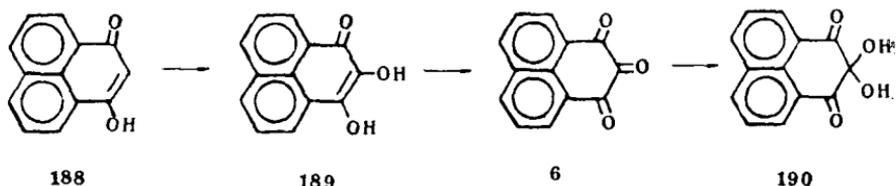
Получение изомерных нафтиндантрионов-1,2,3 (186, 187) из соответствующих нафтиндандионов-1,3 путем их окисления или превращения в 2-нитро-2-бромпроизводные не имело успеха.

Немногочисленные литературные данные о синтезе производных и аналогов нингидрина, о их реакциях с аминокислотами не позволяют сделать каких-либо обобщений. Очевидно только то, что в нингидриновую реакцию с аминокислотами вступают также производные и аналоги нингидрина.

### ПЕРИНАФТИНДАНТРИОН-1,2,3 И ЕГО ГИДРАТ

Из аналогов нингидрина наиболее хорошо изучен перинафтиндантрион-1,2,3, или 1,2,3-триоксо-2,3-дигидрофенален, (6) и его гидрат (190). В 1913 г. синтез соединений осуществил Эррера [397, 398]. Им с соавторами [399, 400] и Кальдераро [401] исследована реакционная способность перинафтиндантриона-1,2,3 и его гидрата и приготовлен ряд производных. Несмотря на то что работы [397—401] появились в период, когда цветная реакция нингидрина с аминокислотами обратила на себя внимание многих химиков, реакция гидрата перинафтиндантриона-1,2,3 с аминокислотами в тот период не изучалась.

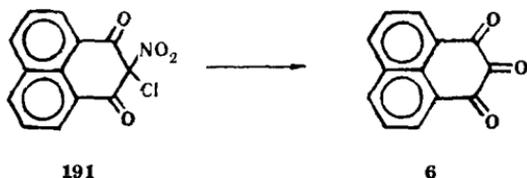
Эррера получил перинафтиндантрион-1,2,3 окислением бромной водой окси- и аминопроизводных перинафтинденона-1 [397, 398]. Последние соединения, например 2,3-диоксиперинафтинденон-1 (189), были получены при взаимодействии перинафтиндандиона-1,3 (188) с фенилгидразином, который в данном случае действовал как окислитель [398].



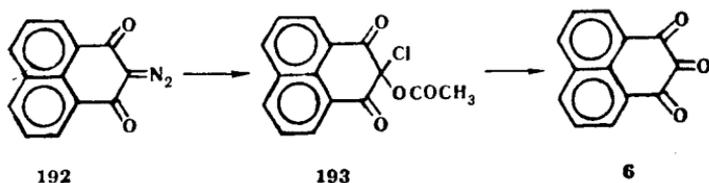
Перинафтиндантрион-1,2,3 был получен в виде кристаллогидрата. Желтые призмы последнего образовались при перекристаллизации продукта реакции из разбавленной уксусной кислоты. Перинафтиндантрион-1,2,3 не имеет четкой температуры плавления: при температурах выше 110° он теряет воду и образует красные кристаллы перинафтиндантриона-1,2,3 (6), которые после перекристаллизации из ксилола или бензола имеют т. пл. 273° [397]. Гидрат перинафтиндантриона-1,2,3 растворяется в спирте и уксусной кислоте лучше, чем в воде.

Маубашер [402] указывает, что двухстадийное окисление перинафтиндандиона-1,3 (188) (фенилгидразином и бромной водой) является удобным способом получения гидрата перинафтиндантриона-1,2,3. Этот метод предложен и в работе [403]. Получение перинафтиндантриона-1,2,3 из его гидрата производится обработкой хлористым тионилом [404].

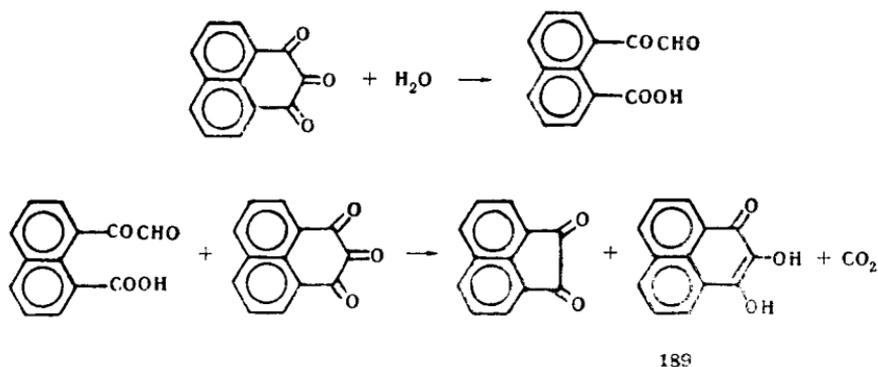
Перинафтиндантрион-1,2,3 с 81%-ным выходом образуется при пиролизе 2-нитро-2-хлорперинафтиндандиона-1,2 (191) [405] или непосредственно из нафталевого ангидрида [408]. Пиролиз [191] проводится в нитробензоле при температуре 140°.



2-Диазопроизводные циклических β-дикетон в настоящее время стали доступными соединениями. Предложено несколько методов получения перинафтиндантриона-1,2,3 из 2-дiazоперинафтиндандиона-1,3 (192). Эти методы отличаются реагентом, которым действуют на diaзосоединение, и промежуточным продуктом, через синтез которого протекает реакция [33, 409]. Так, в уксуснокислом растворе 2-дiazоперинафтиндандион-1,3 реагирует с *трет*-бутилгипохлоритом с образованием 2-хлор-2-ацетоксиперинафтиндандиона-1,3 (193), который при пиролизе почти с количественным выходом превращается в перинафтиндантрион-1,2,3 [404].

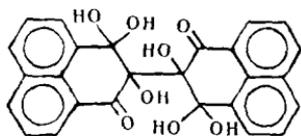


Гидрат перинафтиндантриона-1,2,3 с гидроксиламином не дает оксим, и фенилгидразон образуется из безводного трикетона [397]. Если к спиртовому раствору гидрата перинафтиндантриона-1,2,3 прибавить 2 н. раствор соды, реакционный раствор окрашивается в синий цвет, исчезающий через некоторое время. При нагревании такого раствора можно изолировать аценафтенхинон. Предполагалось [400], что образование аценафтенхинона протекает по следующей схеме:

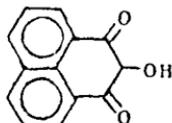


Ярко-красный 2,3-диоксиперинафтинденон-1 (**189**), или енольная форма 2-оксиперинафтиндантриона-1,3, образуется также при восстановлении перинафтиндантриона-1,2,3 сернистым газом, сероводородом, гидроксиламином и другими восстановителями [397, 404]. Темно-фиолетовая с металлическим блеском калиевая соль 2,3-диоксиперинафтинденона-1 является сильным восстановителем, не реагирует с гидроксиламином и фенилгидразином, но при взаимодействии с диметилсульфатом может давать как моно-, так и диметилвые эфиры [397]. Подобно нингидрину раствор Фелинга и аммиачный раствор нитрата серебра восстанавливают 2,3-диоксиперинафтинденон-1 и перинафтиндантрион-1,2,3 [397].

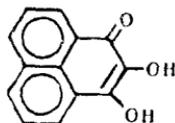
Если перинафтиндантрион-1,2,3 в атмосфере углекислого газа суспендировать в изоамиловом спирте и смесь подвергнуть продолжительному воздействию солнечного света, то в результате фотохимического восстановления образуются желтые кристаллы аналога гидриндантина (**194**) [410].



194



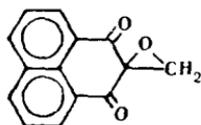
189a



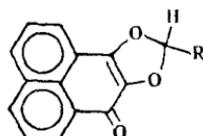
189

Продукт фотохимической реакции при нагревании в концентрированном растворе едкого натра окрашивается в темно-синий цвет [410]. Можно предполагать, что при этом протекает его расщепление (194) с образованием 2-оксиперинафтиндандиона-1,3 (189a), енольная форма которого (189) имеет синий цвет [73].

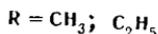
Перинафтиндантрион-1,2,3 легко реагирует с диазосоединениями [54, 73, 75], но реакции протекают иначе, чем с индантрионом-1,2,3. С диазометаном перинафтиндантрион-1,2,3 образует эпокисоединение (195) [54, 411], а с диазоэтаном и фенилдиазометаном — производные 1,3-диоксола (196) [54].



195

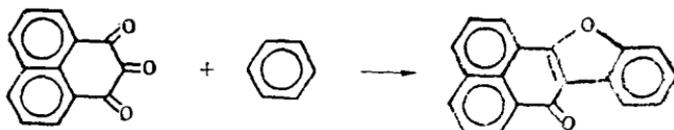


196



Диоксоловые производные, имеющие аналогичные структуры (196), можно получить также при взаимодействии перинафтиндантриона-1,2,3 или его гидрата с фенилдиазометаном и диазофлюореном [54].

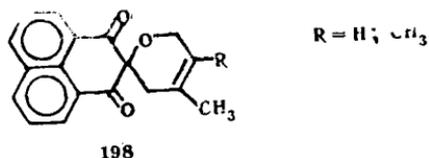
Конденсация перинафтиндантриона-1,2,3 с бензолом в присутствии дымящейся серной кислоты дала желтый продукт неожиданной по сравнению с аналогичной реакцией у нингидрина структуры — 7-оксо-7Н-бензо[*b*]-феналено[2,1-*d*]фуран (197) [412]. Структура продукта конденсации доказана химическими и физическими методами определения строения соединений.



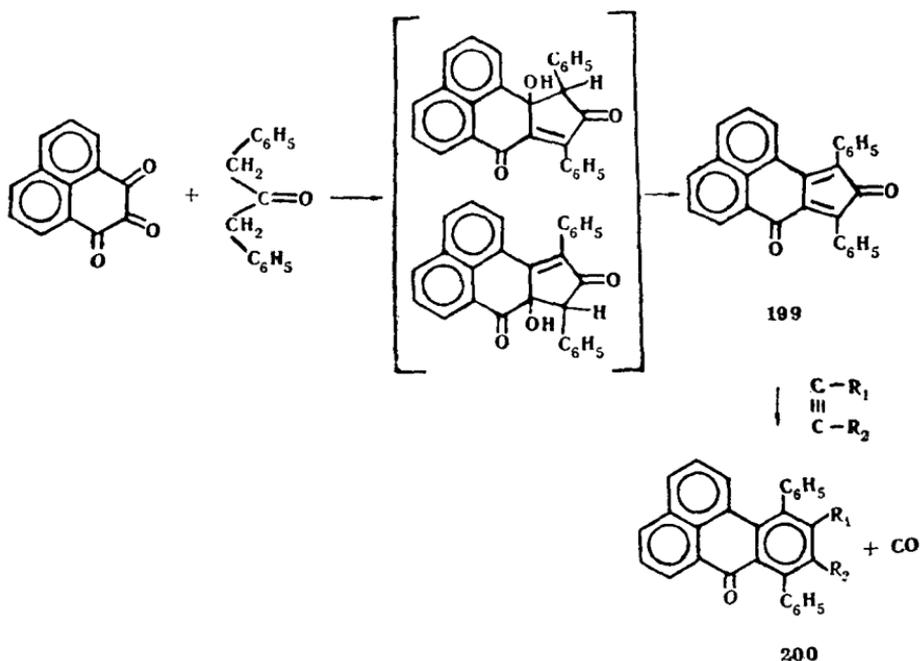
197

Перинафтиндантрион-1,2,3, подобно индантриону-1,2,3, в качестве диенофила реагирует с изолпреном и 2,3-диметилбутадиен-

ном-1,3. В результате присоединения образуются желтые кристаллические вещества, имеющие спироструктуру (198) [53].

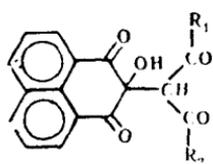


Интересная циклопентадиеновая, или «кетоциклоновая», система (199) получена при нагревании перинафтиндантриона-1,2,3 и дибензилкетона в спиртовом растворе в присутствии триэтиламина [408]. 7,8-Диоксо-8,10-дифенил-7,9-дигидроциклопента[а]-фенален (199) вступает в реакции с диенофилами; после отщепления окиси углерода образуются многоядерные конденсированные системы (200) [408].

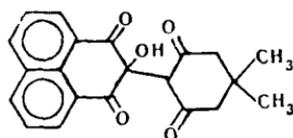
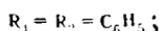
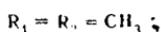


Перинафтиндантрион-1,2,3 в очень мягких условиях реагирует с соединениями, содержащими активные метиленовые группы. В реакцию вводится гидрат перинафтиндантриона-1,2,3; последний обезвоживается с помощью молекулярных сит  $3 \text{ \AA}$ , прибавленных к метилцеллозольву, в котором затем проводится реакция [52]. Из соответствующих метиленовых компонентов с хоро-

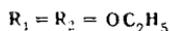
шими выходами были получены продукты некаталитического альдольного присоединения, имеющие структуры **201** и **202** [52].



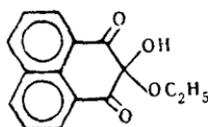
**201**



**202**

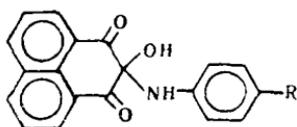


Тенденция перинафтиндантриона-1,2,3 вступать в реакции нуклеофильного присоединения наблюдается даже при его перекристаллизации или кипячении в спирте — образуются желтые кристаллы полукетала (**203**) [397].

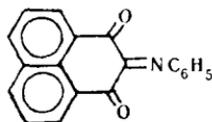
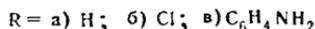


**203**

При комнатной температуре в водно-спиртовом растворе анилин и его производные легко реагируют с перинафтиндантрионом-1,2,3 и его гидратом, образуя желтые 2-окси-2-анилиноперинафтиндантрионы-1,3 (**204**) [399, 410].

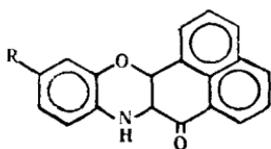


**204**



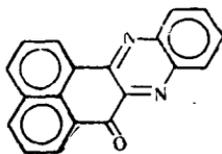
**205**

При нагревании 2-окси-2-анилиноперинафтиндантриона-1,3 (**204a**) отщепляется вода и получают темно-синие кристаллы [399]. Для продукта дегидратации предлагалась структура с азометиновой связью (**205**), но затем было установлено, что это и подобные ему соединения являются 7H,8H-нафта[1,8-*bc*]феноксазинонами-7 (**206**) [413].



206

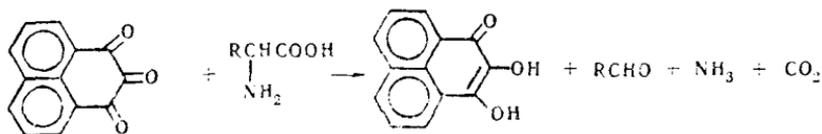
R = а) H; б) Cl



Гидрат перинафтиндантриона-1,2,3 реагирует с пирролом, пиперидином, *n*-аминнобензойной кислотой и формамидом. Продукты реакции желтого цвета, им была приписана структура 2-замещенных 2-оксиперинафтиндандионон-1,3 [404, 414].

С первичными аминами: этиламинном, бутиламинном и бензиламинном — гидрат перинафтиндантриона-1,2,3 реагирует подобно нингидрину с образованием соответственно ацетальдегида, альдегида масляной кислоты и бензальдегида и выделением восстановленного 2,3-диоксиперинафтинденона-1 [141]. Цветные реакции гидрата перинафтиндантриона-1,2,3 наблюдались в его реакциях с 1,3-диаминопропаном, путресцином, кадаверином, гистамином, глюкозаминном и инсулином [141].

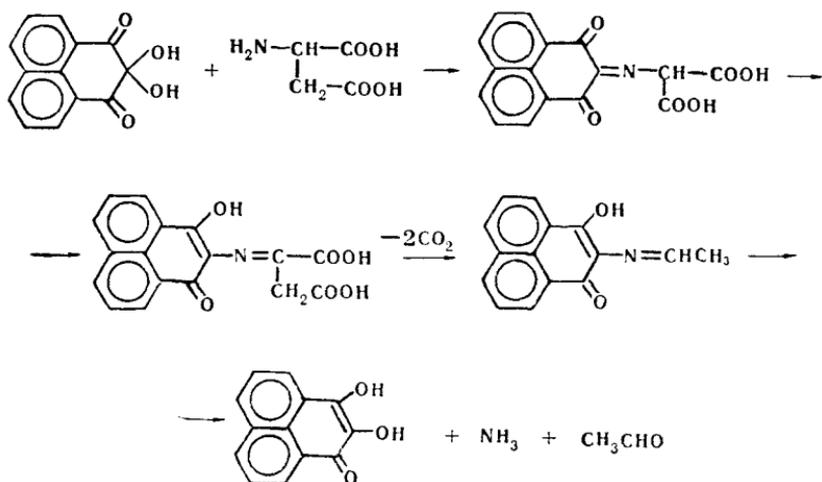
В 1948 г. было показано, что при нагревании перинафтиндантриона и  $\alpha$ -аминокислот протекает деградация последних [415]. Реакция проводилась в атмосфере углекислого газа. Было доказано, что фениламиноуксусная кислота, валин, изолейцин и фенилаланин в этой реакции переходят в соответствующие альдегиды, содержащие на один углеродный атом меньше, чем исходная аминокислота. Альдегиды были идентифицированы в виде их 2,4-динитрофенилгидразонов. В работе [415] указывается, что азот аминогрупп отщепляется в виде аммиака, а перинафтиндантрион-1,2,3 восстанавливается до 2,3-диоксиперинафтинденона-1 (189). Таким образом, реакция перинафтиндантриона-1,2,3 с  $\alpha$ -аминокислотами изображается следующей схемой:



189

На основе этой реакции был разработан количественный метод определения аланина, лейцина, изолейцина, валина, серина, фенилуксусной и аспарагиновой кислот [402]. Было отмечено, что из аспарагиновой кислоты выделяется ацетальдегид. Образующийся в ходе определения аминокислот альдегид перегоняется и связывается с бисульфитом натрия, количество которого затем

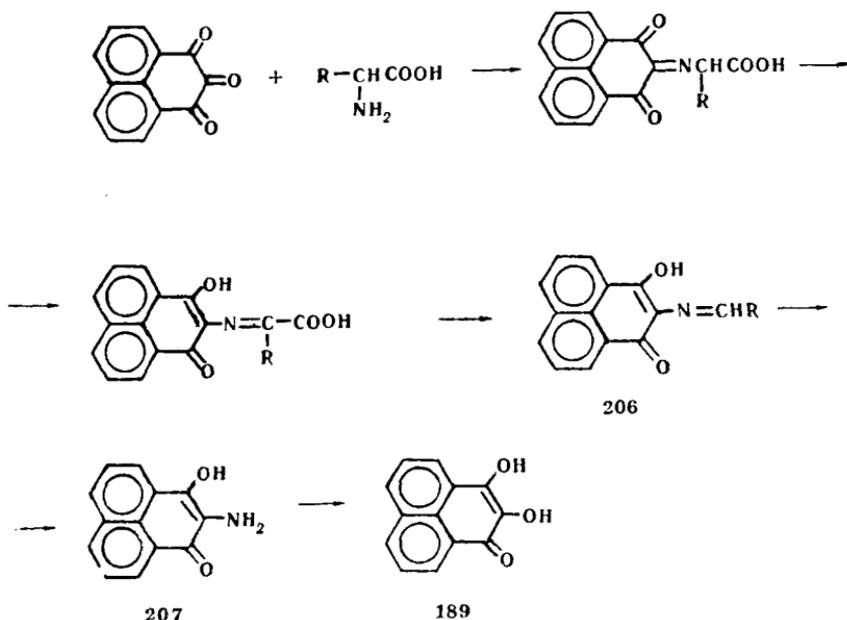
определяется йодометрически [402]. В несколько измененном виде этот метод был рекомендован для микроопределения перечисленных аминокислот [416]. Предложены специальная аппаратура и методика количественного определения аминокислот с перинафтиндантрионом-1,2,3 на основе измерения количества отщепляющегося от аминокислоты углекислого газа [417]. Аспарагиновая и глутаминовая кислоты выделяют из 1 мол кислоты 2 мол углекислого газа [417].



Предложенный метод количественного микроопределения 1—2 мг аминокислоты основан на измерениях количества аммиака, выделяемого в реакции с перинафтиндантрионом-1,2,3 [418]. Реакция проводится при pH 4,7. Аммиак отгоняется из реакционной смеси и затем определяется ацидиметрически [418]. Однако в работе [419] показано, что выход аммиака из аминокислоты по вышеописанной методике [418] достигает только 70% от теоретического.

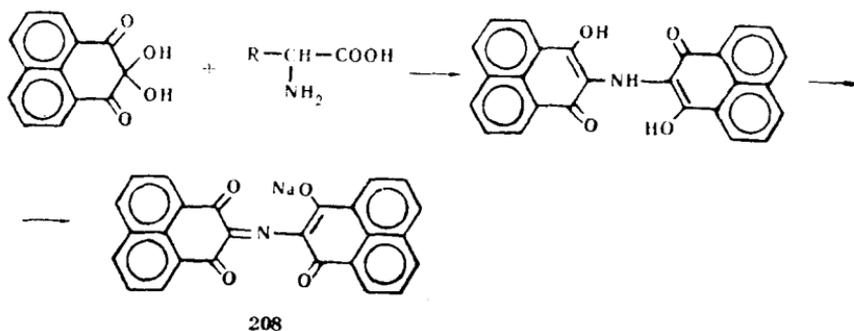
Установлено, что с перинафтиндантрионом-1,2,3 не реагируют  $\beta$ -аминокислоты [404] и аминокислоты, имеющие алкилированные и ацилированные аминогруппы и этерифицированные карбоксильные группы [415, 417].

Согласно схеме реакции перинафтиндантриона-1,2,3 с  $\alpha$ -аминокислотами, приведенной Маубашером и Авадом [404], окрашенным продуктом реакции является 2,3-диоксиперинафтинденон-1 (189), а промежуточным — 2-амино-3-оксиперинафтинденон-1 (207).



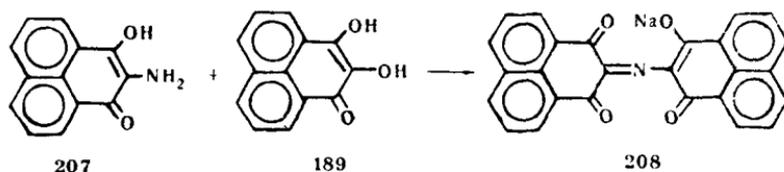
Чувствительность цветной реакции перинафтиндантриона-1,2,3 с аминокислотами при ее использовании на хроматографической бумаге выше, чем соответствующих реакций изатина и аллоксана [403, 420].

В работе [420] утверждается, что цветная реакция перинафтиндантриона-1,2,3 с аминокислотами на хроматографической бумаге протекает аналогично нингидриновой реакции аминокислот с образованием аналога пурпура Руэмана (208).

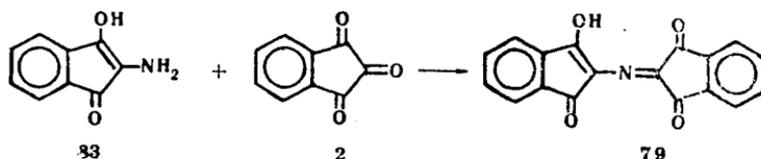


Этот краситель феноленового ряда (208) в кислотной форме неустойчив, поэтому он был приготовлен в виде натриевой соли при взаимодействии 2-амино-3-оксиперинафтинденона-1 (207) с

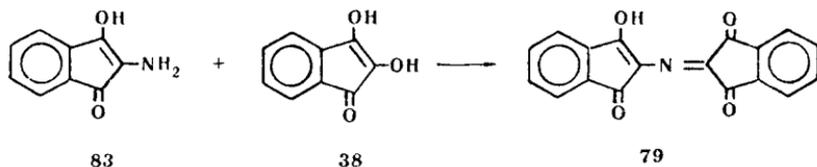
2,3-диоксиперинафтинденоном-1 (189) в метанольном растворе в присутствии едкого натра [420].



Аналогичное 2-амино-3-оксиперинафтинденону-1 (207) 2-аминосоединение в нингидриновом ряду — 2-амино-3-оксиинденон (83) неустойчиво, и поэтому невозможно экспериментально доказать последний акт реакции образования пурпура Руэмана — взаимодействие 2-амино-3-оксиинденона-1 (83) с индантрионом-1,2,3 (2).

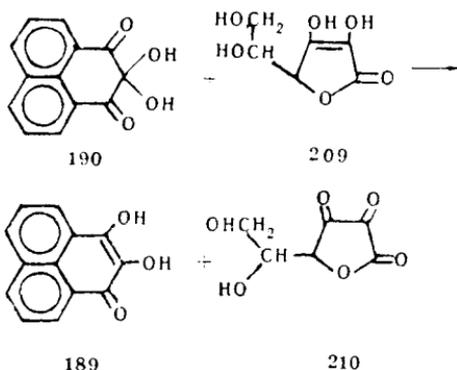


Оказалось, что 2-амино-3-оксиперинафтинденон-1 в условиях реакции образования окрашенного соединения — аналога пурпура Руэмана не реагирует с перинафтиндантрионом-1,2,3 и не вступает в реакции самоконденсации с отщеплением аммиака из двух молекул, но легко взаимодействует с 2,3-диоксиперинафтинденоном-1 (189) [420]. Исходя из этого был сделан вывод, что в последней стадии нингидриновой реакции аминокислот 2-амино-3-оксиинденон-1 (83) реагирует не с индантрионом-1,2,3 (2), а с 2,3-диоксиинденоном-1 (38) [420].



Образование 2,3-диоксиперинафтинденона-1 в реакции перинафтиндантриона-1,2,3 с аскорбиновой кислотой [421] лежит в основе спектрофотометрического метода определения аскорбино-

вой кислоты в биологических материалах: крови, моче и т. п. [422].



Последняя реакция окисления—восстановления с теоретической точки зрения интересна тем, что трикетон (190) окисляет ендиол (209) в трикетон (210), восстанавливаясь при этом до ендиола (189).

Как видно из вышеизложенного, перинафтиндантрион-1,2,3 во многих реакциях ведет себя аналогично индантриону-1,2,3, но некоторые реакции обоих трикетонов с одними и теми же соединениями существенно различаются. Экспериментальные работы по изучению реакции перинафтиндантриона-1,2,3 с различными соединениями еще далеки от того состояния, чтобы на их основе можно было провести обобщающее сравнение реакций индантриона-1,2,3 и перинафтиндантриона-1,2,3.

### НИТРОПЕРИНАФТИНДАНТРИОНЫ-1,2,3 И ИХ ГИДРАТЫ

У перинафтиндантриона-1,2,3 известны только два производных — 5-нитроперинафтиндантрион-1,2,3 (215) и 6-нитроперинафтиндантрион-1,2,3 (218).

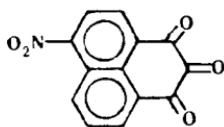
Непосредственные исходные продукты их синтеза — нитроперинафтиндандионы-1,3 (211) получают конденсацией соответствующих ангидридов нитронафталевых кислот с малоновым эфиром в присутствии безводного хлористого цинка. Нитроперинафтиндандионы-1,3, существующие в изомерных 3-оксинитроперинафтинденонных-1 (211) формах, окисляются в две стадии; при кипячении с фенолгидразином образуются 2,3-диоксинитроперинафтинденоны-1 (212), которые затем обрабатывают бромной водой [423, 424].



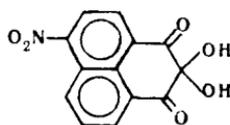
соответствующие альдегиды [141]. Гидрат 5-нитроперинафтиндантриона-1,2,3 дает цветную реакцию также с 1,3-диаминопропаном, путресцином, кадаверином, гистамином, глюкозамином и инсулином [141]. Аналогично незамещенному перинафтиндантриону-1,2,3 гидрат 5-нитроперинафтиндантриона-1,2,3 реагирует с  $\alpha$ -аминокислотами [418]. С избытком реагента в буферном растворе при pH 4,7 выделение аминного азота аминокислот в виде аммиака практически протекает количественно [418]. Это показано на примерах реакций с аланином, валином, лейцином, изолейцином, фенилаланином и аспарагиновой кислотой. Гидрат 5-нитроперинафтиндантриона-1,2,3 предложен для количественного определения  $\alpha$ -аминокислот [418].

На основе окислительно-восстановительной реакции 5-нитроперинафтиндантриона-1,2,3 и аскорбиновой кислоты разработан спектрофотометрический метод определения последней [422]. Анализ проводится в этанольном растворе, в котором реагент имеет максимум абсорбции при 275  $\mu\text{m}$ , а 2,3-диокси-5-нитроперинафтинденон-1 (216), количество которого измеряется, имеет максимумы поглощения при 335 ( $\epsilon$  10,02) и 480 ( $\epsilon$  2,18)  $\mu\text{m}$ . Этот метод предложено использовать для определения аскорбиновой кислоты в сложных смесях органических веществ. Определению не мешает присутствие аминокислот, кроме цистеина, так как реакция проводится при комнатной температуре и максимальное окрашивание наступает уже через 10 минут. Метод позволяет обнаружить аскорбиновую кислоту в присутствии глюкозы, фруктозы, ацетона, молочной, пировиноградной, мочевой и дегидроаскорбиновой кислот и других соединений, часто мешающих определению при других способах [418].

Практическое аналитическое использование второго известного изомера — 6-нитроперинафтиндантриона-1,2,3 (218) и его гидрата (219) не изучено.



218



219

Гидрат (219) оранжевого цвета, в безводную форму переходит только при температуре выше 200°. 6-Нитроперинафтиндантрион-1,2,3 (218) имеет т. пл. 215° [425], с *o*-фенилендиаминном образует производное феназина [424] и с анилином — 2-окси-2-анилино-6-нитроперинафтиндантрион-1,2,3 [425]. В литературе [425] имеется короткое замечание, что 6-нитроперинафтин-

дантрион-1,2,3 реагирует с  $\alpha$ -аминокислотами и аскорбиновой кислотой по общей схеме реакции этих соединений с перинафтиндантрионами-1,2,3, т. е. с образованием 2,3-диокси-6-нитроперинафтинденона-1 [425].

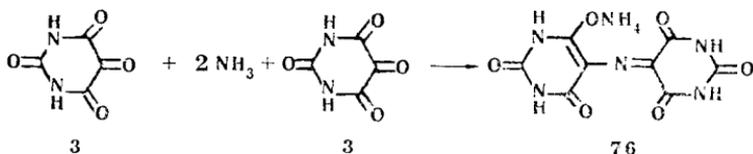
Интересно отметить, что гидраты нитроперинафтиндантрионов-1,2,3 окрашивают бумагу в синий цвет [423, 424]. Более подробно эта реакция не исследована. Не исследованы также реакции нитроперинафтиндантрионов-1,2,3 с другими группами соединений, которые с индантрионом-1,2,3 дают цветные реакции, например с аминами.

## Глава III

### АЛЛОКСАН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ

#### МУРЕКСИДНАЯ РЕАКЦИЯ, АЛЛОКСАН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ

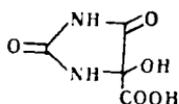
С аллоксана начиналось изучение взаимодействия циклических поликарбонильных соединений с аминокислотами [115]. Реакция аллоксана с аминокислотами и нингидриновая реакция аминокислот протекают аналогично, и окрашенные продукты реакции — пурпур Руэмана (79) и мурексид — имеют родственные структуры. Мурексидом Либиг и Велер [426] назвали аммониевую соль пурпуровой кислоты, образующуюся при выпаривании мочевой кислоты азотной и обработке остатка аммиаком. Соли пурпуровой кислоты, содержащие анион (76), имеют темно-красный цвет. Образование мурексида при обработке мочевой кислоты, ксантина, гипоксантина, пурина и его производных азотной кислотой или другими окислителями и последующее воздействие аммиаком на продукты окисления является известной мурексидной реакцией, издавна используемой для обнаружения пуриновых соединений. Продукты окисления пуринов, образующихся при выполнении мурексидной реакции, содержат главным образом аллоксан (3) (или его производные) с примесью аллоксантина (221), которые с аммиаком дают мурексид, определяемый по пурпуровой окраске.



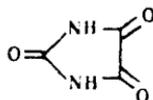
Аллоксан впервые был получен в 1838 г. [426] при окислении мочевой кислоты. В настоящее время аллоксан — легко доступное соединение, которое можно синтезировать по хорошо разработанным методикам окисления аллоксантина [427], барбитуровой кислоты [428] или ее производных [429—431]. Аллоксан крист-

таллизуется из воды и, в зависимости от условий, образует несколько кристаллогидратов: с одной (октаэдри), двумя и четырьмя (призмы) молекулами воды. Все гидраты бесцветные, моногидрат теряет воду при температуре выше  $170^\circ$  и плавится, как безводный препарат, при  $254\text{--}256^\circ$  с разложением. Безводный аллоксан желтого цвета получен высушиванием аллоксана в глубоком вакууме [432]. В литературе содержатся кристаллографические данные безводного аллоксана [433] и его дигидрата [434].

Как амид кислоты, аллоксан очень чувствителен к гидролизу. При действии на аллоксан карбонатов щелочных металлов с ним, как с соединением, имеющим рядом стоящие карбонильные группы, наблюдается бензиловая перегруппировка, в результате которой образуется аллоксановая кислота (219) [435]. Бензиловая перегруппировка аллоксана протекает также под влиянием вторичных алифатических аминов [436].

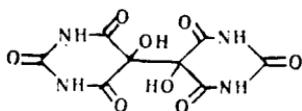


219

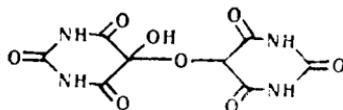


220

На аллоксан довольно легко действуют как окисляющие, так и восстанавливающие агенты. При окислении аллоксана разбавленной кислотой выделяется углекислый газ и образуется парабановая кислота (220). Аллоксан восстанавливается сероводородом аналогично нингидрину. В результате восстановительной димеризации образуется аллоксантин (221), которому еще довольно часто ошибочно приписывают структурную формулу полукетала (75).



221

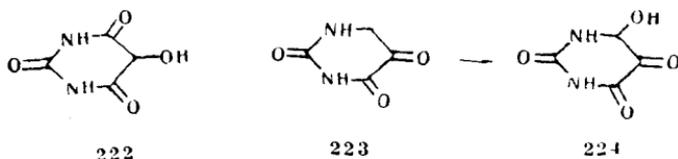


75

Спорный вопрос о структуре аллоксантина [93, 127, 437—439] был решен в 1965 г., когда Синг методом рентгеноструктурного анализа доказал правильность пинаколиновой (221) структуры [440].

Аллоксантин кристаллизуется из воды в виде бесцветных кристаллов, имеющих состав дигидрата; т. пл.  $253\text{--}255^\circ$ . Вещество умеренно растворяется в спиртах и эфире. Водные растворы аллоксантина имеют кислую реакцию и проявляют

восстановительные свойства: восстанавливают соли серебра. На воздухе вещество приобретает красный цвет. В водных растворах аллоксантин частично диссоциирует на аллоксан и диалуровую кислоту [441]. При использовании других восстановителей для аллоксана, например хлористого олова, реакция восстановления аллоксана в аллоксантин протекает дальше, и может быть изолирована 5-оксисбарбитуровая, или диалуровая, кислота (222). Выяснено, что при восстановлении аллоксана сероводородом температура, при которой проводится реакция, не имеет существенного значения. Важнейшим моментом этой реакции является соотношение реагентов. При начальном соотношении аллоксана и сероводорода, равном 2:1, образуется дигидрат аллоксантина, а при избытке сероводорода — диалуровая кислота [442].

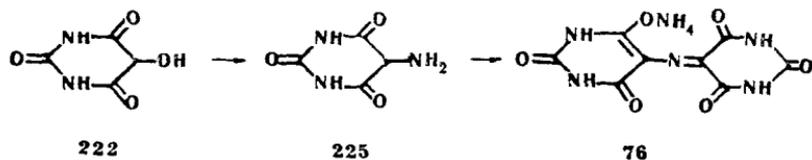


Диалуровая кислота довольно сильная. На воздухе она легко окисляется в аллоксантин.

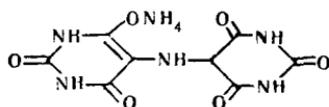
При окислении изобарбитуровой кислоты (223) образуется изомер диалуровой кислоты — изодиалуровая кислота (224). Интересно отметить, что изодиалуровая кислота легко изомеризуется в диалуровую при действии на нее холодным раствором щелочи.

Фотохимическое восстановление аллоксана в растворе изопропилового спирта также приводит к образованию аллоксантина, что было использовано как одно из доказательств пинаколиновой структуры аллоксана [439].

Мурексид (76), представляющий собой аммониевую соль двухосновной пурпуровой кислоты, может быть приготовлен из аллоксана, аллоксантина, диалуровой кислоты и урамила (225), получаемого из диалуровой кислоты и аммиака [443]. Урамил при конденсации с аллоксаном дает мурексид [445, 446], который образуется также в условиях окисления урамила [426, 446] и при взаимодействии аллоксантина с солями аммония [127, 447, 448].



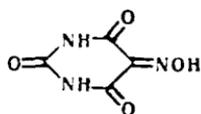
Препаративно мурексид получают с 75%-ным выходом при 2-минутном кипячении аллоксантина и ацетата аммония в уксусной кислоте. При охлаждении кристаллизуются пурпуровые кристаллы с зеленоватым блеском [448]. Кристаллизуется также из воды. Подщелачивание водных растворов мурексида вызывает сине-фиолетовое окрашивание. Гидросульфит натрия и треххлористый титан восстанавливают мурексид в бесцветное соединение — лейкомурексид (226) [448, 449].



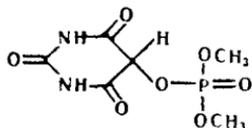
226

В кислой среде протекает гидролиз мурексида с образованием урамила, аллоксана и аллоксантина. Последний является продуктом вторичных реакций — конденсации аллоксана с диалуровой кислотой, которая образуется при гидролизе урамила. Урамил не гидролизуется в присутствии восстановителей, но аллоксан ускоряет его гидролиз [450]. Пурпуровую кислоту в виде оранжевого порошка можно получить только в смеси с хлористым аммонием при действии на мурексид сухим хлористым водородом; в водных растворах пурпуровая кислота полностью гидролизуется [445]. Для аналитических целей используют цинковую соль пурпуровой кислоты [451].

С гидроксиламином аллоксан образует 5-оксим, или виолуровую кислоту, (222) [452], имеющую большое аналитическое значение.



222



227

Как безводный аллоксан, так и его дигидрат, подобно индантриону-1,2,3, легко реагируют с приметилфосфитом с образованием эфира диалуровой кислоты (227) [453] и вступают в реакции с диазо- [454, 455] и другими соединениями. Особенно легко протекает альдольное присоединение к аллоксану соединений, содержащих активные метиленовые группы [456—458]. Можно предположить, что по механизму альдольной конденсации протекает также образование аллоксантина из аллоксана и диалуровой кислоты.

Аллоксан с рядом ионов тяжелых металлов: меди, цинка, кадмия, магния и др. — образует яркоокрашенные внутрикомплексные соединения, используемые в неорганическом анализе

[459, 461]. Однако чаще всего аллоксан применяется в органическом анализе для определения аминокислот и других органических соединений.

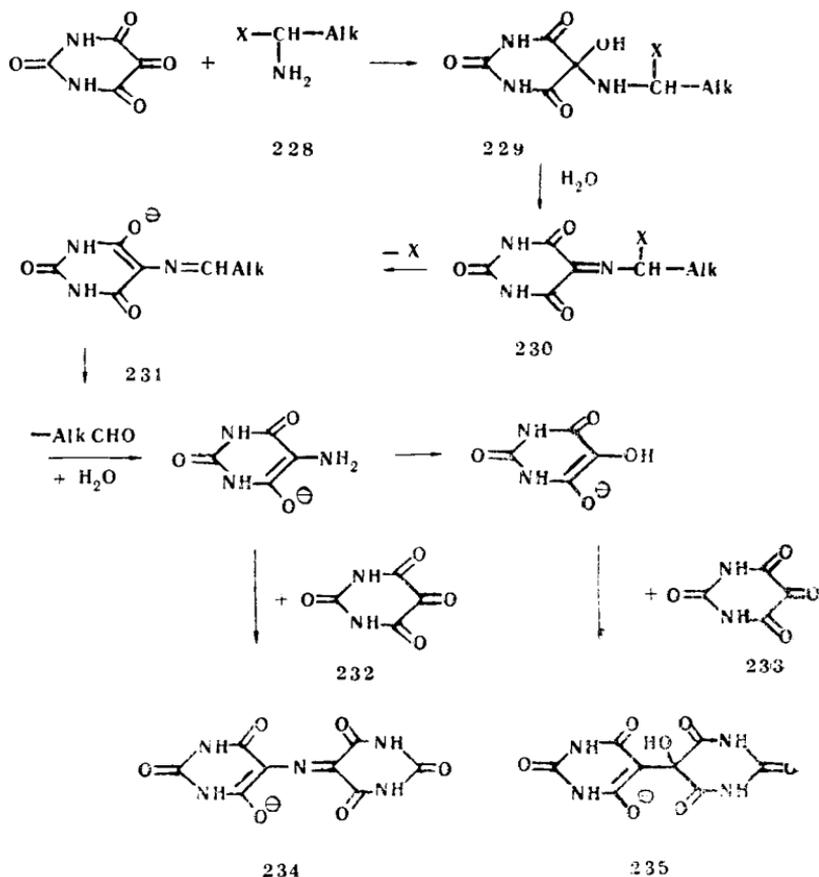
### ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУРЕКСИДНОЙ РЕАКЦИИ И АЛЛОКСАНА

Как уже отмечалось, впервые цветную реакцию с аллоксаном наблюдал Штреккер в 1862 г. [113]. Им было установлено, что аминокислоты — аланин и лейцин — распадаются на альдегиды, углекислый газ и аммиак, который переходит в состав мурексида. Таким образом, в мурексидной реакции вместо аммиака впервые была использована аминокислота. В дальнейшем возросло число примеров аминокислот, реагирующих с аллоксаном [127, 462—464]. Было обращено внимание на то, что мурексидную реакцию с аллоксаном кроме аминокислот дают и другие соединения, содержащие свободные аминогруппы: амины, пептиды, белки [63, 465]. Предпринимались попытки разработать количественный метод анализа, основанный на цветной реакции аллоксана с аминокислотами [465]. Изучалось влияние рН, температуры, количества применяемого реагента и других условий на реакцию аллоксана с аминокислотами. Выяснилось, что реакция должна проводиться в нейтральной среде при нагревании до 75°. Наилучшая концентрация реагента 2—2,5%. Но даже при таких оптимальных условиях не удалось достичь достаточной пропорциональности между количеством аминокислот и интенсивностью окрашивания реакционных растворов [465]. Безрезультатно закончились также попытки применять аллоксан в качестве специфического реагента для отдельных белковых фракций [63, 465].

Абдергальденом [63] было замечено, что в реакции аллоксана с аминокислотами образуется аллоксантин, подобно тому как в нингидриновой реакции образуется гидриндантин.

В водном растворе при небольшом нагревании аллоксантин реагирует с  $\alpha$ -аминокислотами: аланином, валином и лейцином — с выделением углекислого газа и аммиака. При соблюдении мер предосторожности можно доказать присутствие в реакционной смеси соответственно ацетальдегида, изомалянового и изовалерианового альдегидов [439]. Превращение протекало с выходом около 20%. В колбе после реакции было обнаружено вещество, которое принималось за урамил [439]. Авторами этой работы высказано предположение, что реакция аллоксантина с  $\alpha$ -аминокислотами протекает аналогично нингидриновой реакции аминокислот. Считается, что в реакционной смеси аллоксантин, подобно гидриндантину, диссоциирует на аллоксан и диалуровую кислоту, которые в дальнейшем взаимодействуют с ами-

нокислотами. Отсюда следует, что аллоксантин с аминокислотами образует тот же краситель, что и аллоксан с диалуровой кислотой [439]. Было показано [439], что при нагревании в водном растворе аллоксантина с этиламином, бутиламином и бензиламином в атмосфере углекислого газа образуются соответствующие альдегиды и аммиак, который частично расходуется на образование урамилы, идентифицируемого в конце реакции. 2-Аминобутан в таких же условиях дал около 15% метилэтилкетона, а третичный бутиламин не реагировал. Хотя в литературе это строго не сформулировано, отдельные факты и соответствующие теоретические рассуждения авторов многих работ свидетельствуют о том, что аллоксан в реакциях с аминокислотами и аминами ведет себя аналогично нингидрину в нингидриновой реакции.



X = а) H; б) COOH

Выше в виде общей схемы изображены мурексидные реакции алифатических аминов (228; X=H) и аминокислот (228; X=COOH). В отличие от пурпура Руэмана, или 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 (79), пурпуровая кислота и ее соли (234) менее устойчивы и более чувствительны к изменениям кислотности раствора. Последним обстоятельством можно объяснить вышеупомянутые пониженные выходы окрашенного продукта [465] и альдегидов [439], а также образование урамила [439], аллоксантина и других продуктов неустановленного строения [63] в реакциях аллоксана с аминами и аминокислотами.

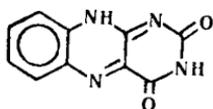
Можно предполагать, что при более детальном изучении будут найдены отличия отдельных стадий мурексидных реакций (образование аммиака, аминов и аминокислот) от соответствующих стадий нингидриновой реакции. Так, по сравнению с 2-аминоиндандионом-1,3 (83) урамил (225) — более устойчивое соединение, но его гидролиз специфически ускоряется присутствием аллоксана [450]. С другой стороны, при повышенных значениях pH нингидрин превращается в альдегидкарбоновую кислоту, но аллоксан вступает в реакцию бензильной перегруппировки. Все это и позволяет предполагать, что в начальных стадиях реакций аммиака с нингидрином и аллоксаном при их детальном изучении будут обнаружены различия.

Несмотря на некоторые отрицательные моменты мурексидной реакции аминокислот и ее малой, по сравнению с нингидриновой реакцией, изученностью, она нашла практическое применение в анализе аминокислот хроматографией на бумаге.

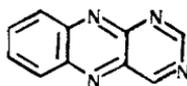
Начатое Абдергальденом [63] сравнительное изучение реакции аллоксана и нингидрина с большим числом аминокислот было продолжено в работе [466]. Можно предполагать, что работы [63, 466] послужили основой для авторов, предлагающих аллоксан для определения аминокислот при их анализе методом хроматографии на бумаге [319, 466]. При проявлении аминокислот аллоксаном на бумаге образуются красно-коричневые пятна. Пролин и оксипролин не реагируют. На основе большого фактического материала показаны хорошие аналитические свойства аллоксана [145, 319]. Цветные пятна на бумаге, образующиеся при реакции аминокислот с аллоксаном, без какой-либо дополнительной обработки стабильны в течение длительного срока. Чувствительность реакции для большинства аминокислот с аллоксаном, однако, немного ниже чувствительности их реакции с нингидрином (см. табл. 1). Аллоксан имеет преимущества перед нингидрином и изатином при определении на хроматографической бумаге  $\beta$ -аминомасляной кислоты, цистеина, карнозина и др.

Реакции аллоксана с ароматическими аминами имеют боль-

шое синтетическое значение. Из аллоксана и его производных синтетическим путем легко получить производные аллоксазина (236) и другие пиримидо-[4,5-*f*]хиноксалиновые (237) системы.



236



237

По этой теме имеется обстоятельный обзор В. М. Березовского и Т. В. Еременко [467]. Из новейшей литературы можно сослаться на серию работ Кларка-Льюиса с соавторами [468—475].

В литературе имеются данные о противоопухолевом [476, 477], радиационно-протекторном [478] и противовирусном [479] действиях аллоксана. Он является ингибитором некоторых ферментов и оказывает влияние на биосинтез уридиновых нуклеотидов [480] и рост клеток *Aspergillus furigatus* [481]. Вообще известно, что введение аллоксана в организм подопытных животных вызывает аллоксановый диабет. В целях получения некоторых данных для более глубокого изучения аллоксанового диабета было исследовано взаимодействие аллоксана с цистеином, вернее с сульфгидрильной группой цистеина. На основе спектроскопических данных было установлено, что продуктом реакции аллоксана с цистеином является диалуровая кислота как продукт восстановления аллоксана [482]. В реакции с глутатионом также образуются диалуровая кислота и продукт неустановленной структуры. Последний образуется также в реакции аллоксана с альбумином. Высказано предположение, что этот продукт может участвовать в механизме диабетогенеза [482].

Интересно отметить, что цистеин, глутатион и аскорбиновая кислота не восстанавливают аллоксан в водной среде с рН 1,6 [483]. В фосфатном буфере аллоксан окисляет аскорбиновую кислоту до дегидроаскорбиновой и сам восстанавливается до аллоксантина, что также является фактором, вызывающим диабет. Избыток (2 мол) аллоксана в этой реакции вызывает декарбоксилирование дегидроаскорбиновой кислоты и образование кетопентозы *L*-ксилулозы [483, 484].

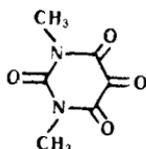
В связи с большой биологической активностью аллоксана на практике часто возникает необходимость определить присутствие его в биологических объектах. Для этой цели предложен ряд методов: мурексидная реакция на аллоксан, образование виолуровой кислоты и определение последней по цветной реакции с железом ( $\text{Fe}^{++}$ ) [485]. Очень чувствительны те методы, в которых аллоксан переводится во флюоресцирующие соедине-

ния [485—487], обычно являющиеся производными аллоксазина [486, 487].

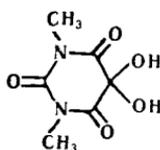
В заключение хотелось бы отметить перспективность аналитического применения аллоксана. Так, в работе [488] в качестве реактива используется 1%-ный раствор мурексида в концентрированной серной кислоте. Этот реактив дает цветные реакции с алкалоидами группы морфина, хинолина и изохинолина, с производными терпенов и рядом синтетических соединений. Реагирующим соединением реактива, предложенного авторами [488], является аллоксан. Следовательно, аллоксан дает цветные реакции с органическими соединениями различных структур.

### ДИМЕТИЛАЛЛОКСАН И ДРУГИЕ ЗАМЕЩЕННЫЕ АЛЛОКСАНЫ

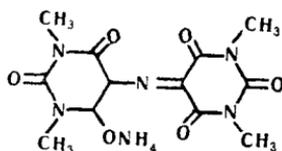
Из замещенных аллоксанов лучше всего изучен диметилаллоксан (238), который, как производное аллоксана, синтезируется по общей реакции получения этих соединений — окислением производных пурина [489]. Окисление кофеина для получения диметилаллоксана проводится азотной кислотой в растворе уксусной кислоты [490]. В таких условиях с очень хорошим выходом образуются бесцветные кристаллы гидрата диметилаллоксана (239) с т. пл. 270—272°. Безводный диметилаллоксан получают нагреванием его гидрата при температуре около 100° в вакууме.



238



239



240

Реакция диметилаллоксана с аминокислотами протекает аналогично мурексидной реакции аминокислот. Образуются тетраметилмурексид (240), углекислый газ и альдегид, содержащий на один углеродный атом меньше, чем исходная аминокислота [462]. Тетраметилмурексид имеет ярко-красный цвет, поэтому диметилаллоксан предложен как реактив для качественного и количественного определения аминокислот методами хроматографии на бумаге [491, 492] и в тонких слоях [492]. Цвета отдельных аминокислот при их проявлении на бумажных хроматограммах диметилаллоксаном различаются между собой, что, как и в случае других реагентов, объясняется цветом продуктов

побочных реакций [491]. Минимальные количества аминокислот, которые можно обнаружить с помощью диметилаллоксана, немного больше или равны таковым, которые могут быть открыты нингидрином.

Некоторое представление о цвете проявленных аминокислот и их открываемых количествах на бумажных хроматограммах дает табл. 3, составленная по данным работ [319, 492].

Таблица 3

Цвет продуктов и минимальные количества некоторых аминокислот, открываемые на бумажных хроматограммах диметилаллоксаном, нингидрином и аллоксаном

Аминокислота	Диметилаллоксан		Нингидрин		Аллоксан
	открываемое количество, мкг	цвет пятна	открываемое количество, мкг	цвет пятна	Цвет пятна
Лейцин	0,7	Красный	0,5	Пурпуровый	Красный
Лизин	0,8	Пурпуровый	3	Пурпуровый	Красный
Цистеин	1,2	Коричнево-красный			Коричнево-красный
Серин	0,5	Красный	0,3	Красно-пурпуровый	Красный
Аспарагиновая кислота	0,7	Красный	0,4	Синий	Красный
Тирозин	0,9	Коричнево-красный	3	Коричнево-красный	Коричнево-красный
Гистидин	0,8	Пурпурово-красный	25	Коричнево-пурпуровый	Красный
Аспарагин	0,7	Красный	1	Коричнево-желтый	Красный
Пролин	5,8	Красноватый	1	Желтый	—
Оксипролин	—	—	1	Оранжево-желтый	—

Примечание. Диметилаллоксан применялся в виде 0,5%-ного раствора в этаноле, нингидрин — в виде 0,1%-ного раствора в *n*-бутаноле.

Оксипролин обнаруживается диметилаллоксаном только в количествах, превышающих  $0,5 \text{ мк} \cdot \text{мол}$ , но пролин, в отличие от аллоксана, удается обнаружить в довольно небольших количествах [491]. Цветные реакции с диметилаллоксаном дают  $\beta$ - и  $\omega$ -аминокислоты, пептиды, протеины и гидразиды аминокислот. Хроматограммы, проявленные диметилаллоксаном, более стабильны к высвечиванию, чем хроматограммы, обработанные нингидрином или аллоксаном [491]. Извлеченный из пятен на

хроматограммах краситель в водных растворах довольно быстро разлагается, но при соблюдении выработанной методики [492] вполне пригоден для количественного определения.

Диметилаллоксан предложено использовать для определения аминокислот методом хроматографии в тонких слоях [492].

Методики количественного определения аминокислот диметилаллоксаном по сравнению с методиками, основанными на использовании нингидрина и аллоксана, имеют ряд преимуществ: краситель более стабилен, на его выход в меньшей мере влияют условия опыта, а следовательно, и ошибка определения относительно небольшая [492].

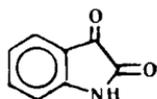
Диметилаллоксан и его производные, подобно аллоксану, используются также для синтетических целей [120, 493]. В литературе встречаются отдельные сведения о фенил-, дифенил- и других замещенных аллоксанах, которые в данной работе не обсуждаются. Здесь рассматривались только те свойства и реакции аллоксановых соединений, которые каким-либо образом характеризуют сходства или различия аллоксана и нингидрина, а также мурексидной и нингидриновой реакций.

## Глава IV

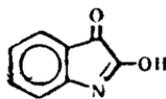
### ИЗАТИН И ЕГО РЕАКЦИИ С АМИНОСОЕДИНЕНИЯМИ

#### ИЗАТИН И ЕГО РЕАКЦИИ

Изатин известен с 1841 г., когда он в виде темно-красных кристаллов был получен Эрдманом и независимо от него Лораном при окислении индиго. В 1868 г. Кекуле [494] предложил для изатина лактамную структуру (4), но в 1882 г. [495] было доказано, что изатин в некоторых реакциях может реагировать в лактимной (4а) форме.



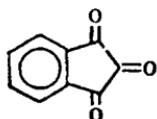
4



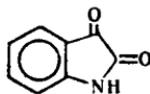
4а

Спорный вопрос о структуре изатина и большое практическое значение последнего в химии красителей явились причиной быстрого роста количества публикаций по химии изатина. В химических реакциях, в зависимости от характера применяемого реагента и условий реакции, образуются производные одной из этих двух таутомерных форм (4 и 4а). Следует отметить, что именно на примере изатина в органической химии впервые возникло понятие таутомерии.

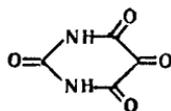
Для решения вопроса о структуре изатина использовались данные УФ- [496], ИК- [497—502] спектроскопии и рентгеноструктурного анализа [503]. Из этих работ следует, что в растворах изатина присутствует лактимная форма, а в кристаллическом и жидком состоянии — амидная форма (4).



2



4

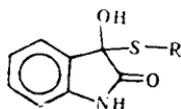


3

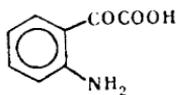
При формальном сопоставлении структурной формулы изатина (4) с формулами индантриона-1,2,3 (2) и аллоксана (3) видно, что кетогруппа изатина в положении 3 расположена так же, как крайние кетогруппы индантриона-1,2,3, а карбонильная группа в положении 2 соответствует карбонильной группе аллоксана в положении 2. У изатина отсутствует карбонильная группа, которую с двух сторон окружают другие карбонильные группы, но именно эти  $\beta$ -кетогруппы индантриона-1,2,3 и аллоксана являлись наиболее активными в химических реакциях. С учетом вышеизложенного представляет интерес перед рассмотрением реакций изатина с аминосоединениями коротко остановиться на реакциях карбонильных групп изатина и сравнить их с аналогичными реакциями нингидрина и аллоксана.

Обе карбонильные группы изатина различаются между собой по длине  $C=O$ -связи [503] и их химической активности. Наиболее активной является кетогруппа изатина, связанная с ароматическим кольцом. Она, как правило, участвует почти во всех реакциях, в которых участвуют  $\beta$ -кетогруппы индантриона-1,2,3 и аллоксана.

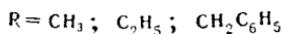
Изатин умеренно растворяется в воде и хорошо в спиртах, но в отличие от индантриона-1,2,3 и аллоксана кристаллогидраты и продукты присоединения спиртов не образует. Метилмеркаптан, этилмеркаптан и бензилмеркаптан при комнатной температуре медленно присоединяются к изатину с образованием 3-окси-3-метилмеркаптооксиндола (241) [504].



241

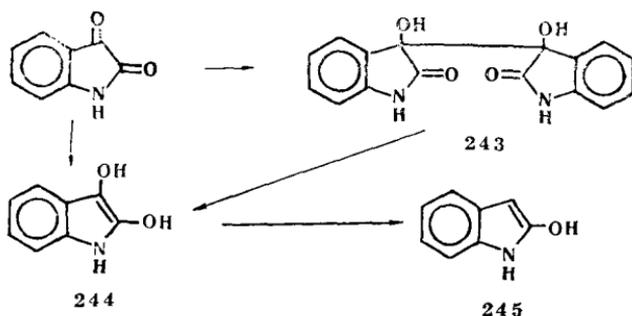


242

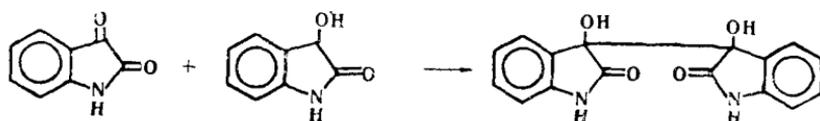


В холодном растворе едкого натра изатин растворяется, окрашиваясь в фиолетовый цвет. При более жестких условиях изатин, как амид-*o*-аминофенилглиоксальной, или изатиновой, кислоты, гидролизуется в эту кислоту (242).

Реакции восстановления изатина затрагивают кетогруппу в  $\beta$ -положении; образуются диоксиндол (244) и оксиндол (245). Последние являются основными продуктами восстановления изатина, но в определенных условиях при действии цинком в кислой среде [505] или сульфидом аммония [506] образуется бесцветный бимолекулярный продукт восстановления — изатид (243).

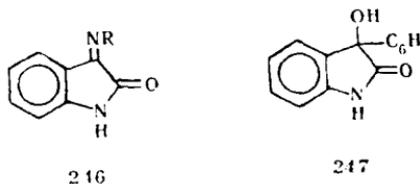


Изатид [507, 508] рассматривался как аналог аллоксантина [505] и, следовательно, гидриндантина. Подобно этим соединениям, которые образуются при конденсации трикетонов с продуктами их восстановления, изатид может быть получен при конденсации изатина с диоксиндолом в присутствии пиперидина [507].



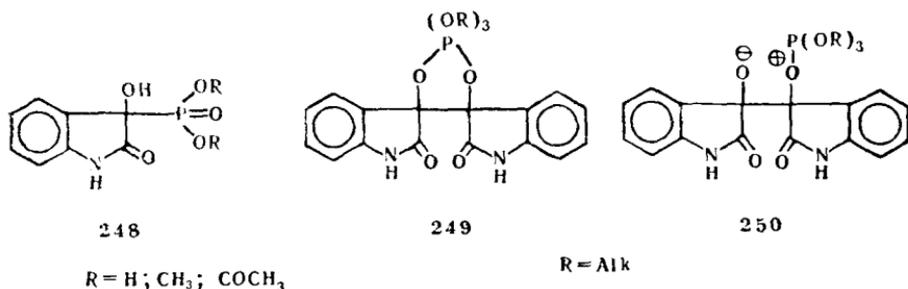
Различные восстановители: амальгама натрия [509], цинк в соляной [510] или уксусной [511] кислоте и гидросульфит натрия [512] — восстанавливают изатид в диоксиндол.

В обычных для кетонов реакциях с гидроксиламином [513, 514], фенилгидразином [515] и семикарбазидом [516] реагирует карбонильная группа изатина, занимающая положение 3, и образуются соответствующие производные (246).



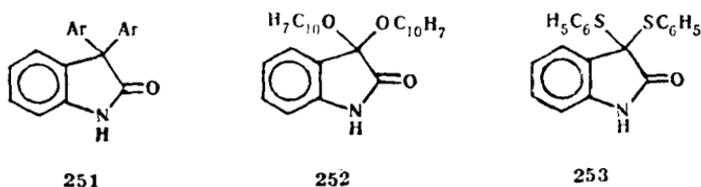
R = CH<sub>3</sub>; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

Продуктами взаимодействия изатина с фенилмагнием [517], метилмагнием [518] и другими алкил- и арилмагниегалогенидами являются 3-алкил- и 3-арилдиоксиндолы (247) [519].



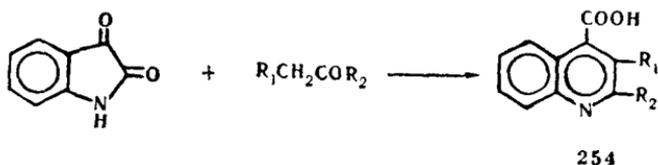
Изатин реагирует с диалкилфосфитами и триалкилфосфатами. В первом случае образуются производные диоксиндолфосфиновой кислоты (248), в последнем — бесцветные (2:1) аддукты со структурой 249 или 250 [520].

Подобно нингидрину и аллоксану изатин в присутствии серной кислоты, хлористого цинка, безводного хлористого алюминия и хлорокси фосфора реагирует с бензолом, алкилбензолом, фенолами, алкоксифенолами, анилином, производными анилина и др., образуя 3,3-дизамещенные производные оксиндола (251) [521—523].



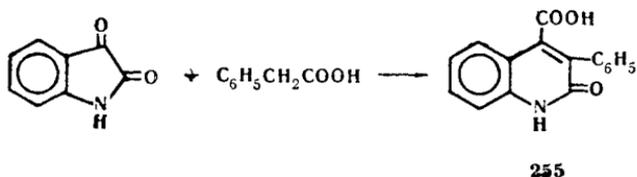
Но конденсация  $\alpha$ -нафтола протекает по иной схеме, и образуется 3,3-динафтоксиндол (252) [524]. Аналогичный продукт (253) образуется из изатина и тиофенола [525].

В 1886 г. Пфитцингер установил, что изатин в растворе концентрированной щелочи вступает во взаимодействие с кетонами, содержащими свободную  $\alpha$ -метильную или метиленовую группу, и образует производные хинолин-4-карбоновой, или цинхониновой, кислоты (254) [526]. Реакция Пфитцингера имеет большое синтетическое значение [527].

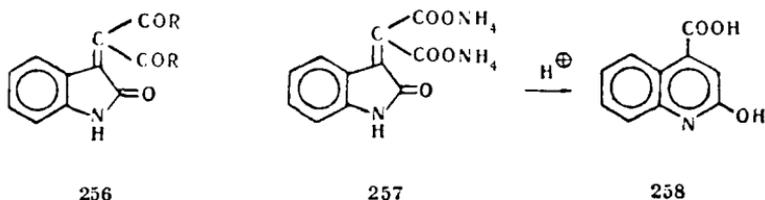


Изатин реагирует с соединениями, содержащими активные метиленовые группы, и в зависимости от характера соединения и от условий реакции образует различные производные 2-окси-

хинолин-4-карбоновой кислоты (254) [528, 529]. Так, при нагревании изатина с фенилуксусной кислотой в присутствии ацетата натрия образуется 3-фенил-2-оксихинолин-4-карбоновая кислота (255) [528].

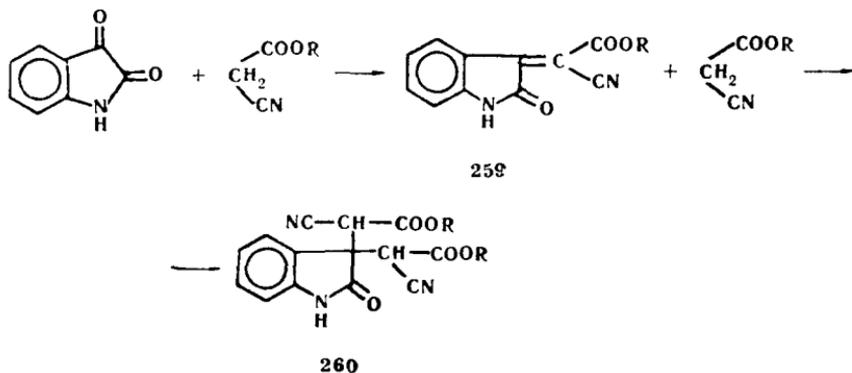


Но взаимодействие изатина с малоновой кислотой, малонамидом и малонанилидом в растворе абсолютного спирта в присутствии аммиака протекает таким образом, что с хорошими выходами образуются желтые продукты, имеющие структуры производных метиленоксиндола (256) [529].

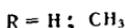
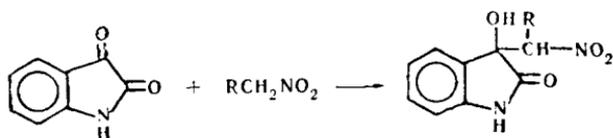


Аммониевая соль оксиндолилиденмалоновой кислоты (257) при обработке соляной кислотой перегруппировывается в 2-оксихинолин-4-карбоновую кислоту (258) [529]. Подобную же перегруппировку претерпевает продукт конденсации изатина с малоновым эфиром (256) [529].

С некоторыми компонентами активной метиленовой группы, например с эфирами циануксусной кислоты, реакция не прекращается на стадии образования алкилиденоксиндолов (259), а протекает дальше — до образования продуктов присоединения второй молекулы метиленового компонента (260) [527].

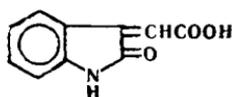


Очень легко протекает присоединение нитроалканов к изатину; реакции проводятся при сильном охлаждении, выходы продуктов присоединения 3-окси-3-нитрометилоксиндолов (**261**) хорошие [530, 531]. В качестве катализатора используют диэтиламин.

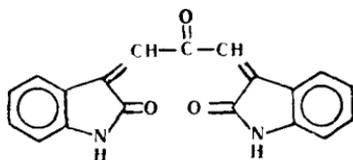


261

Интересно протекают реакции конденсации изатина с ангидридами алифатических карбоновых кислот. Конденсация изатина с уксусным ангидридом в присутствии пиридина дала ярко-красный продукт реакции [532], цвет и другие свойства которого не соответствовали предполагаемым структурам (**262**, **263**) [532, 533] продуктов альдольно-кетоновой конденсации.

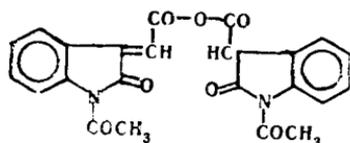


262

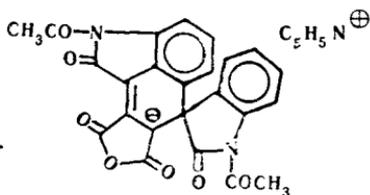


263

Методами ИКС и ЯМР было установлено, что красный продукт конденсации имеет структуру **265** и образуется из ангидрида оксиндолиденуксусной кислоты **264** в результате внутримолекулярной реакции Дильса—Алдера с последующими перегруппировкой и окислением [534].



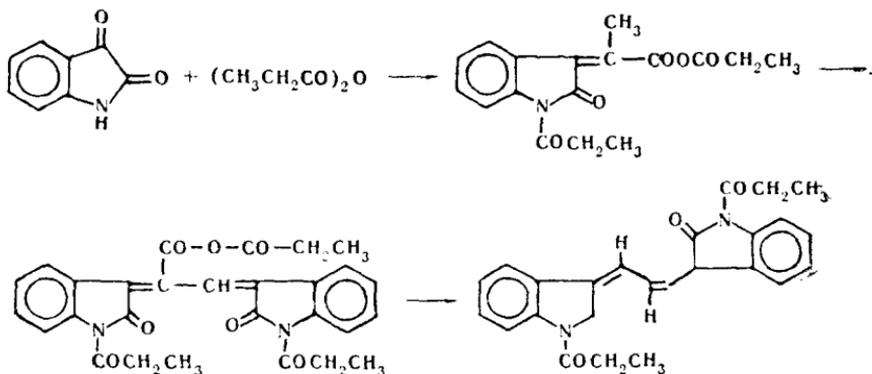
264



265

Конденсация изатина с пропионовым ангидридом в присутствии пиридина также дает красный продукт, который в отличие от продукта конденсации изатина с уксусным ангидридом не яв-

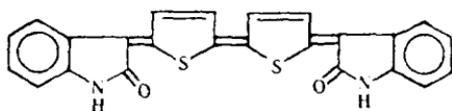
ляется пиридиновой солью и не содержит ангидридную группировку [535]. Конденсация изатина с пропионовым ангидридом протекает по следующей схеме:



266

В результате реакции образуется смесь геометрических изомеров 1,2-ди(*N*-пропионил-оксиндолилиден-3)этана (266) [535].

Очень своеобразно изатин реагирует с гетероциклическими соединениями. В присутствии серной кислоты изатин с тиофеном, неочищенного бензола [510] или чистого соединения [535, 537] образует синий краситель индофенин, которому была приписана структура 267 [538, 539], впоследствии подтвержденная экспериментально [540].



267

Индофениновая реакция изатина используется как очень чувствительный метод определения тиофена [541].

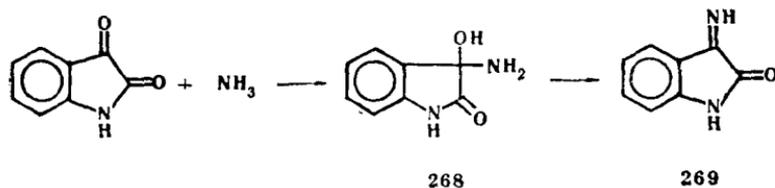
Аналогичная индофенину (267) структура была приписана также продукту конденсации изатина с пирролом [542], однако эта структура не считается окончательно доказанной [527]. Реакция изатина с пирролом более подробно будет рассмотрена совместно с реакциями аминсоединений.

### РЕАКЦИИ ИЗАТИНА С АМИНСОЕДИНЕНИЯМИ

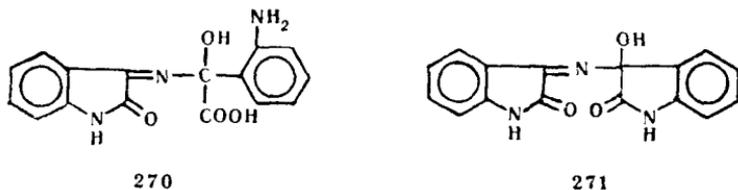
Изучение взаимодействия изатина с аммиаком представляло большие трудности. Несмотря на многочисленные работы, последовавшие после первых опытов Лорана в 1842 г. [543], структуры

продуктов реакции до появления работы Рейсера и Гопмана в 1924 г. [544] не были установлены.

Если через суспензию изатина в абсолютном спирте при охлаждении пропускать аммиак, то первым продуктом реакции, который выделяется в виде бесцветных, неустойчивых на воздухе кристаллов, является продукт присоединения аммиака — 3-окси-3-аминооксиндол (268) [544]. При более продолжительном воздействии аммиака на изатин в таких же условиях образуется желтый продукт —  $\beta$ -иминоизатин, или имазатин, (269) [543].



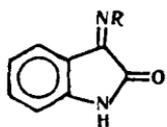
При продолжительном воздействии на изатин аммиаком в спирте или концентрированным водным раствором аммиака образуются красные кристаллы имазатиновой кислоты, или  $\beta$ -изатинамидил-*o*-аминоминдальной кислоты, (270) [544].



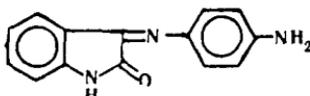
Изатиновая кислота не образует ангидрид — имазатин (271). Последний образуется как побочный продукт при взаимодействии изатина с аммиаком; его можно получить при нагревании спиртового раствора эквимолярных количеств  $\beta$ -иминоизатина и изатина. Вещество (271) желтого цвета и с небольшим усилением цвета растворяется в щелочах. Нагревание с кислотами и щелочами приводит к отщеплению изатина [544].

Продолжая начатое выше формальное сравнение изатина с индантрионом-1,2,3 и аллоксаном, имазатин, или 3-окси-3-(оксииндолиламино)-оксиндол, (271) можно рассматривать как аналог 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиона-1,3 (79) и пурпуровой кислоты (234). Но имазатин отличается от упомянутых красителей не только менее яркой окраской, но и тем, что его образование протекает не так легко, как пурпура Руэмана и мурексида, и поэтому сопровождается появлением многих побочных продуктов [545, 546].

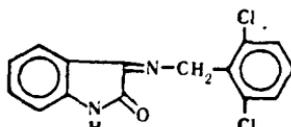
Взаимодействие изатина с гидроксиламином, гидразином, замещенными гидразинами и семикарбазидами приводит к образованию 3-замещенных продуктов изатина с общей формулой (272). Аналогичную структуру имеют продукты взаимодействия изатина с этиламином [547], анилином [548] и некоторыми другими первичными аминами [549].



272



273

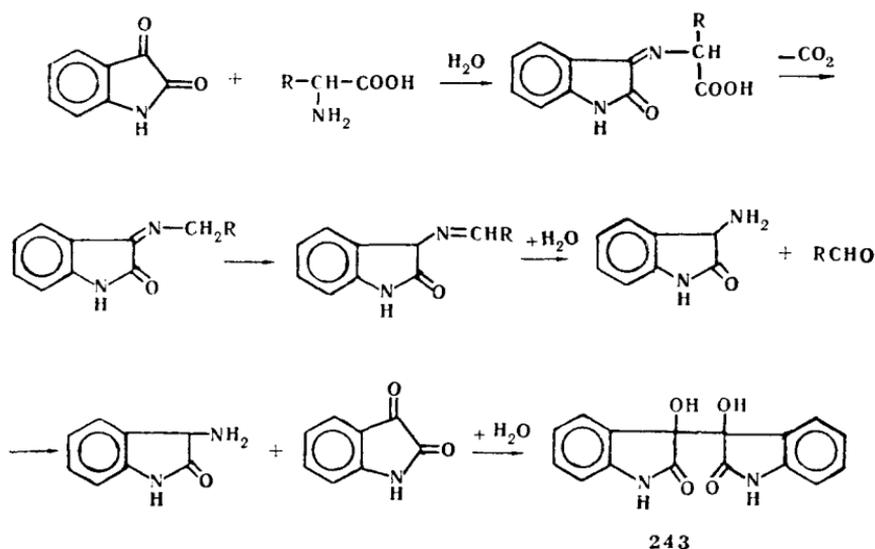


274

3-Иминооксиндолы (272) обычно синтезируются в реакциях, проводимых в спиртовых средах, и представляют собой желтые кристаллические вещества. Продукт взаимодействия *p*-фенилендиамина с изатином имеет красный цвет (273) [549]. Изатин и 2,6-дихлорбензиламин в результате нагревания также образуют продукт реакции, имеющий структуру основания Шиффа (274) [425], но при нагревании незамещенного бензиламина с изатином обнаружен бензальдегид [425]. В результате нагревания 1-аминаметилнафталина с водным раствором изатина было обнаружено образование  $\alpha$ -нафталальдегида, но в аналогичной реакции 2,4,6-триметилбензиламина соответствующий 2,4,6-триметилбензальдегид не был найден [550]. Образование ароматических альдегидов в реакциях арилметиламинов с изатином можно объяснить окислением аминов по общей схеме деградации Штреккера. Механизм этой реакции изатина аналогичен механизму реакций с аминокислотами.

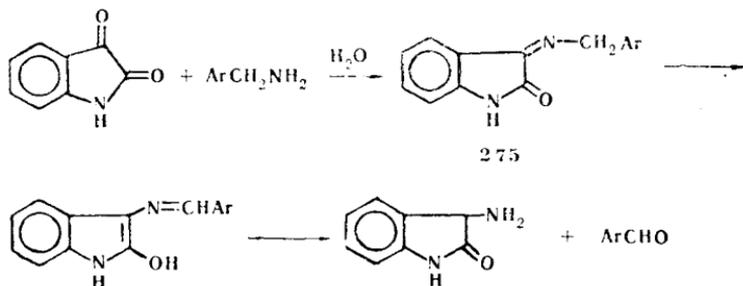
В 1911 г. Траубе показал, что в реакции изатина с  $\alpha$ -аминофенилуксусной кислотой образуется бензальдегид — продукт деградации аминокислоты по Штреккеру [463]. Второй важной работой по выяснению механизма реакции изатина с аминокислотой является исследование Лангенбека [551], который установил, что в отсутствие кислорода воздуха реакция изатина с  $\alpha$ -аланином протекает с образованием изатида (243). Кроме того, было показано, что реакция протекает с выделением аммиака и углекислого газа. При изучении взаимодействия изатина с аланином, валином, норвалином, лейцином, изолейцином, норлейцином, фенилаланином и  $\alpha$ -аминомасляной кислотой были получены [63] аналогичные результаты.

Реакцию изатина с  $\alpha$ -аминокислотами коротко можно изобразить следующим образом [416, 552]:



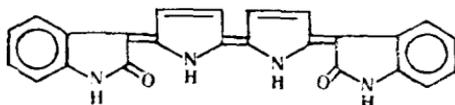
В присутствии кислорода воздуха небольшие количества изатина окисляют значительные количества аминокислот. Это можно объяснить каталитическим действием изатина, который, окисляя  $\alpha$ -аминокислоты, восстанавливается до изатида (243). Кислород воздуха окисляет изатид в изатин и, таким образом, на окисление аминокислот фактически используется только кислород воздуха [551]. Интересно отметить, что при окислении аминокислот изатином его восстановление не идет дальше образования изатида; диоксиндол не удается изолировать [551, 553]. При восстановлении изатина до диоксиндола и оксиндола изатид является только промежуточным продуктом [508, 554, 555].

Реакцию изатина с упомянутыми арилметиламинами, в результате которой образуются ароматические альдегиды, можно изобразить аналогично [425, 550].

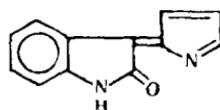


С 2,6-дихлорбензиламином и 2,4,6-триметилбензиламином реакция прекращается на стадии образования основания Шиффа (275) вследствие стерических затруднений [425, 550].

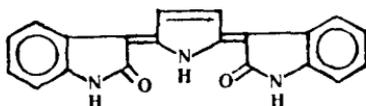
Пиррол, как уже отмечалось, образует с изатином окрашенный продукт реакции — пирроловый синий, структура которого долгое время изображалась подобно индофенину (276) в виде 3-(5-пирроленил)изатина (277) или (278) [542].



276

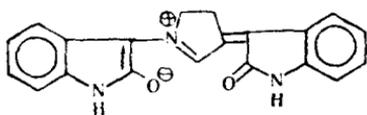


277

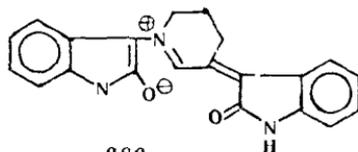


278

На основе спектроскопических данных большого числа родственных и модельных соединений было показано [155, 556], что пирроловый синий имеет структуру сложного биполярного иона (279).

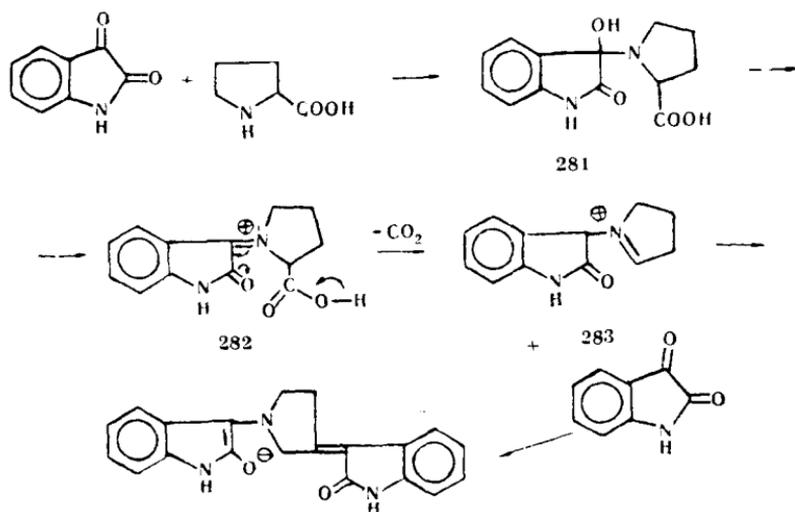


279



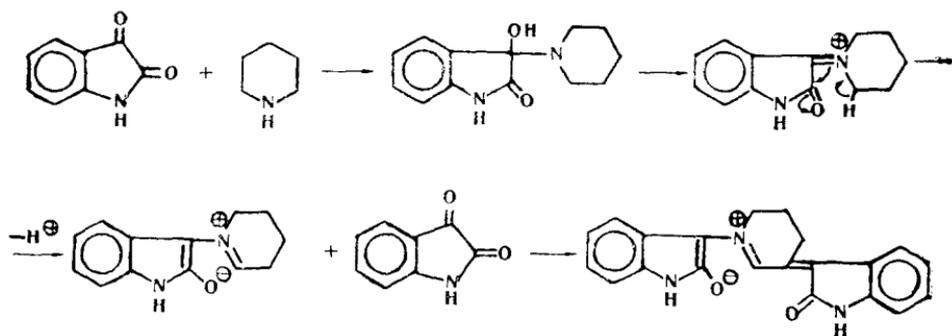
280

Аналогичная структура (280) доказана и для синего красителя — продукта реакции изатина и пиперидина в присутствии уксусного ангидрида [556]. Показано [557], что реакция образования изатинового синего является общей для пяти- и шестичленных азотистых гетероциклов, содержащих группировку  $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ . Пролин и оксипролин в водном растворе и уксусной кислоте с изатином образуют синий краситель [154], который в случае пролина оказался идентичным синему пигменту, полученному в реакции изатина с пирролидоном [202]. Это можно объяснить тем, что изатин реагирует с пролином аналогично нингидрину.



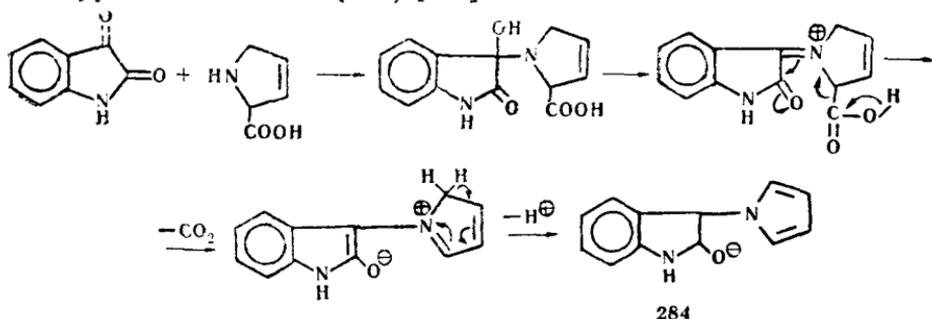
После дегидратации продукта нуклеофильного присоединения пролина к изатину (281) очень легко декарбоксилируется пролиновый остаток промежуточного продукта (282). Вторая стадия образования красителя протекает по схеме альдольно-кетоновой конденсации промежуточного продукта (283), который реагирует как метиленовый компонент со второй молекулой изатина.

В случае отсутствия карбоксильной группы в  $\alpha$ -положении к азоту во время реакции вместо декарбоксилирования протекает дегидрирование у  $\alpha$ -углеродного атома, что также приводит к образованию красителя.

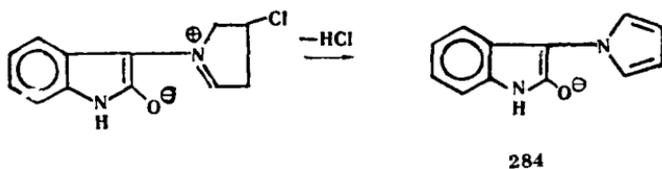


Таким образом, пролин и пирролидин,  $\alpha$ -пипеколиновая кислота и пиперидин реагируют по одному и тому же механизму нуклеофильного присоединения к изатину с последующим образованием изатина синего.

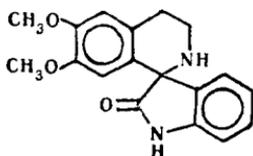
Реакции  $\Delta^3$ -пирролина [558] и 3,4-дегидропролина [204] с изатином в некоторой степени отличаются от вышеизображенных. В последнем случае вместо альдольно-кетоновой конденсации протекает ароматизация пирролинового кольца с образованием 3-пирролилоксиндола (284) [204].



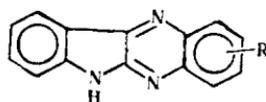
3-Пирролилоксиндол (284) является продуктом реакции изатина и 4-хлорпролина; в этом случае в последней стадии отщепляется хлористый водород [204].



При сравнении рассмотренных реакций изатина и вторичных циклических аминов и их  $\alpha$ -карбоновых кислот с реакциями нингидрина видна тесная аналогия в механизмах реакции и между продуктами реакций этих ди- и трикарбонильных соединений. Очень сложно протекает реакция изатина с 2-(3,4-диметоксифенил)этиламин в кислой среде в присутствии бензола [559]. В результате нагревания реакционной смеси был получен 6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-1-спиро-3'-(2'-оксоиндолин) (285).



285

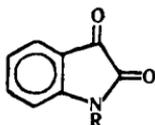


R = а) H; б) Alk

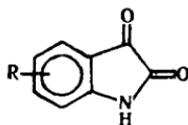
286

Изатин с *o*-фенилендиамином и его производным реагирует с участием обеих карбонильных групп, образуя соединения 6H-индол-[2,3-*b*]хиноксалина (286) [560].

Известно очень большое число замещенных изатинов [561—564] как у азота (287), так и в бензольном кольце (288). Изучены их структура [565] и дегидрогеназная активность [501, 565—570].



287



288

Замещенные изатины (287, 288) в некоторых случаях по своей реакционной способности значительно отличаются от незамещенного изатина [571]. Отдельные замещенные изатины имеют преимущества перед незамещенными при их практическом использовании в анализе аминокислот и других соединений.

### ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗАТИНОВ

Изатин хорошо дополняет нингидрин при его использовании в анализе аминокислот; изатином обычно определяют пролин и оксипролин. Разработан метод колориметрического определения пролина в белковых гидролизатах в присутствии других протеиновых аминокислот [572]. Способность изатина образовывать с пролином изатиновый синий была использована для идентификации пролина на бумажных хроматограммах [285, 573]. Была проверена возможность применения N-метил-, 6-хлор-, 7-хлор-, 5-метил- и 5,7-диметилизатинов для разноцветного проявления протеиновых аминокислот на хроматографической бумаге [574, 575]. Полихромное проявление аминокислот на бумаге позволило разделить соединения, имеющие очень близкие значения  $R_f$ . Благодаря этому изатин имеет преимущество перед 1,2-нафтохинон-4-сульфо кислотой, *n*-бензохиноном и аллоксаном [576, 577]. Оттенки окрасок пятен аминокислот можно изменить дополнительной обработкой хроматограммы раствором силиката [578] или солей металлов [308, 579]. Изатиновый реактив, содержащий 0,2% изатина, 0,06% хлористого, йодистого или салициловокислого кадмия и 4% уксусной кислоты, при проявлении аминокислот на бумажных хроматограммах окрашивает пятна аминокислот в цвета более разнообразных оттенков, чем один изатин [579]. Исследовалось также влияние двуххлористого олова, хлористого кобальта, треххлористого железа и ацетата уранила. Автор [579] приходит к выводу, что почти каждая аминокислота имеет свой оптимальный реактив изатина с примесью соли металла.

Хорошие результаты полихромного проявления аминокислот на бумажных хроматограммах были достигнуты при анализе биохимических объектов [580, 581].

Чувствительность изатиновой реакции для многих аминокислот такого же порядка, как и чувствительность нингидриновой и аллоксановой реакций аминокислот (см. табл. 1).

Пиррольные и индольные соединения очень распространены в природе. Для анализа этих природных азотсодержащих соединений иногда используется изатин. Предложен метод определения пиррольных и индольных соединений с помощью продуктов реакций, которые образуются при конденсации их с изатином в растворе серной кислоты [582].

Способность циклических пяти- и шестичленных гетероциклов, содержащих группировку  $\text{—NH—CH}_2\text{—CH}_2$ , в реакции с изатином образовывать изатиновый синий была использована для обнаружения пиперидиновых и пирролидиновых алкалоидов [557].

Интересным является тот факт, что 1-метил-5-хлор-6-метоксиизатин обнаружен в качестве метаболита у *Micromonospora carbonacea* [583]. В литературе имеются данные, что изатин, 4-хлор-, 6-хлор-, 5-бром- и 5,7-дихлоризатины действуют как гербициды [584]. Обработка гороха и других растений разбавленным раствором изатина способствует их росту и развитию [585, 568]. Методом меченых атомов было показано, что в тканях растений изатин превращается в антралиловую кислоту и изатид [587]. N-Метил- и N-этилизатины оказались эффективными антивиральными профилактическими средствами [588]. В литературе имеется много данных о противовирусной активности семикарбазонов, тиосемикарбазонов [589—591] и других производных изатина [592]. Некоторые производные изатина проявляли противоопухолевую активность [593, 594]. Изатин ингибирует действие ксантиноксидазы [595] и других ферментов [596].

Для определения изатина и его производных в биологических объектах разработаны методы их анализа [597—599]. Используя реакцию превращения изатина в *n*-нитрофенилгидразон и цветную реакцию последнего с магнием, можно капельным методом открывать присутствие 0,5 мкг изатина [600, 601].

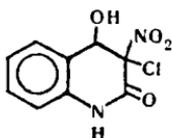
Как видно из вышеизложенного, изатин принадлежит к группе циклических поликарбонильных соединений и, подобно нингидрину и аллоксану, вызывает деградацию аминокислот и аминов по Штреккеру. Хотя реакции изатина с аминами и аминокислотами протекают по общим схемам, так же как соответствующие реакции нингидрина и аллоксана, однако они имеют особенности, которые лучше всего проявляются при взаимодействии изатина с пролином и оксипролином. В отличие от нингидриновой и аллоксановой реакций аминокислот и аминов соответствующие реакции в изатиновом ряду мало изучены.

## Глава V

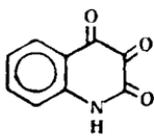
### ХИНИЗАТИН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ

#### ХИНИЗАТИНЫ

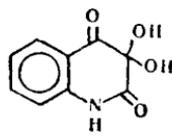
В процессе термического разложения 4-окси-3-хлор-3-нитрокарбостирила (289) образуется хинизатин (5) [602], который кристаллизуется из воды в виде светло-желтого кристаллогидрата. При нагревании вещество теряет кристаллизационную воду и окрашивается в красный цвет [602].



289



5

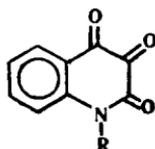


290

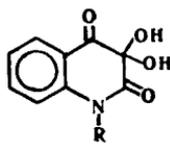
В структурной формуле хинизатина можно заметить фрагменты нингидрина, аллоксана и изатина. Поэтому интерес представляли не только эмпирические данные о цветных реакциях хинизатина с аминокислотами — цвет продуктов реакции, специфичность и чувствительность, но и выяснение механизма реакций хинизатина и его производных с аминокислотами.

Если хроматограмму аминокислот на бумаге обработать 0,4%-ным раствором хинизатина в растворе *n*-бутанола и уксусной кислоты или 0,2%-ным этанольным раствором и затем непродолжительно нагревать ее при температуре 100°, то протеиновые аминокислоты обнаруживаются в виде фиолетово-синих пятен. Пролин и оксипролин образуют синие красители; вообще по расцветке образуемых аминокислотных пятен хинизатин напоминает изатин в его реакциях с аминокислотами [603].

Ввиду невысокой чувствительности реакций хинизатина с аминокислотами [602] были синтезированы его *N*-метил- (291а), *N*-фенил- (291б) и *N*-бензил- (291в) производные [604]. Предполагалось, что в результате введения заместителей у азота и исключения вследствие этого лактамно-лактимной таутомерии возрастет чувствительность реакций новых реагентов с аминокислотами [604].



291



292

- R = а) CH<sub>3</sub>  
 б) C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>  
 в) CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

Оказалось, что действительно применение 0,2%-ных спиртовых растворов N-замещенных хинизатинов на бумажных хроматограммах позволяет с помощью их цветных реакций открывать от 1 до 5 мкг протеиновых аминокислот [604] (табл. 4).

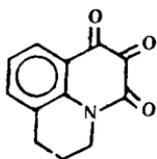
Таблица 4

Количества аминокислот, мкг, явно обнаруживаемых на бумажных хроматограммах хинизатинами [603, 604]

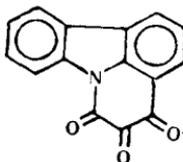
Аминокислота	Количество аминокислоты, мкг, обнаруживаемой хинизатинами				
	291а	291б	291в	293	294
Аланин	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
Аргинин	0,5	2,0	1,0	1,0	1,0
Аспарагин	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
Аспарагиновая кислота	0,5	1,0	2,0	1,0	1,0
Валин	1,0	5,0	2,0	1,0	1,0
Гистидин	1,0	2,0	1,0	1,0	1,0
Глицин	0,25	0,25	0,25	1,0	1,0
Глютамин	0,25	1,0	2,0	1,0	1,0
Глютаминовая кислота	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0
Лейцин	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0
Лизин	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0
Метионин	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0
Оксипролин	5,0	—	—	—	20,0
Орнитин	0,25	2,0	2,0	1,0	1,0
Пролин	5,0	—	—	3,0	5,0
Серин	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
Тирозин	1,0	5,0	5,0	1,0	1,0
Триптофан	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0
Фенилаланин	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0
Цистеин	1,0	2,0	2,0	1,0	1,0
Цистин	0,5	2,0	1,0	1,0	1,0

- Примечание: 1. Реагенты применялись в виде 2%-ных растворов в этаноле.  
 2. Пролин и оксипролин в количествах менее 5 мкг не дают цветных реакций с N-замещенными хинизатинами.

Кроме N-замещенных хинизатинов были синтезированы конденсированные системы, включающие остаток хинизатина: 1,8-триметиленхинизатин (293) и 1,9-мезоксалилкарбазол (294) [603—605].

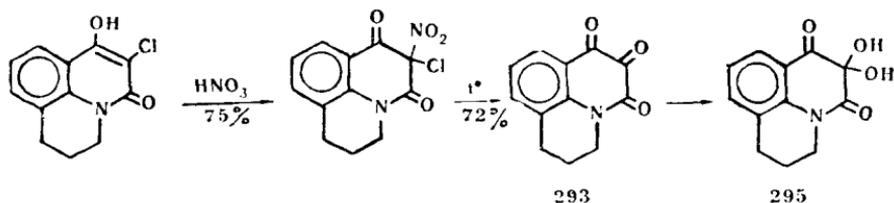


293



294

1,8-Триметиленхинизатин был синтезирован по общей схеме синтеза *vis*-трикарбонильных соединений — разложением 2-хлор-2-нитро-1,3-дикарбонильных соединений.

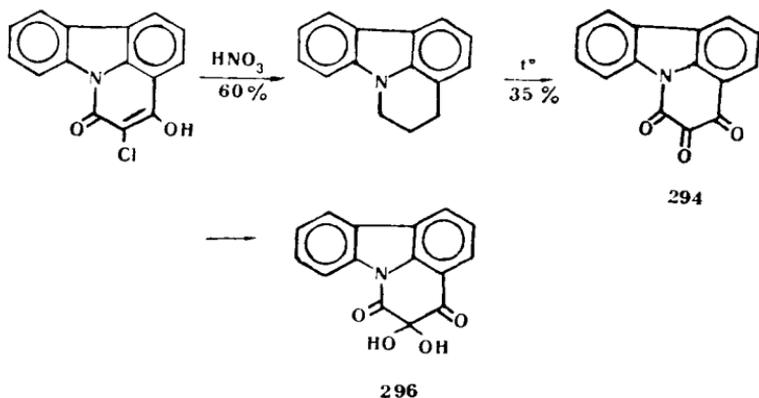


293

295

1,8-Триметиленхинизатин (293) кристаллизуется из воды в виде оранжево-желтых кристаллов, содержащих молекулу кристаллизационной воды, которая теряется при нагревании выше 120—130°. Безводный 1,8-триметиленхинизатин темно-красного цвета [605].

1,9-Мезоксалилкарбазол получается аналогично. Выходы реакций синтеза, за исключением последней стадии, хорошие.



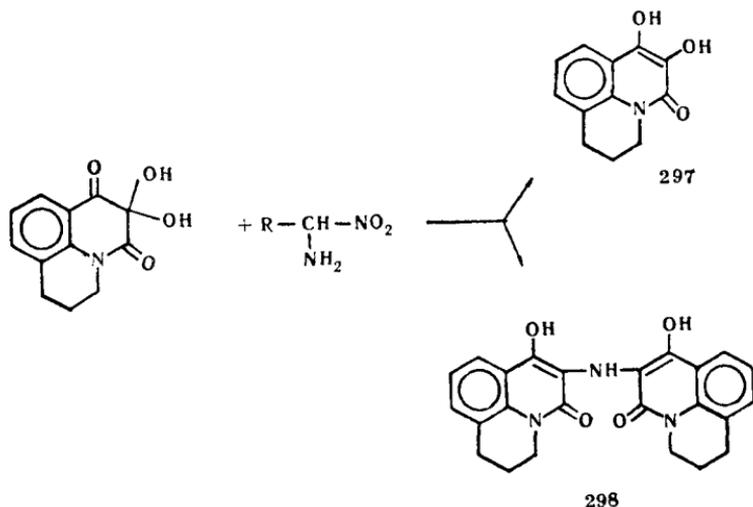
294

296

1,9-Мезоксалилкарбазол кристаллизуется из спирта в виде желтоватых кристаллов, содержащих кристаллизационную воду, которую теряет при нагревании, образуя при этом красноватый продукт (294).

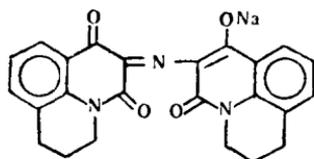
1,8-Триметиленхинизатин и 1,9-мезоксалилкарбазол также используются для цветного обнаружения аминокислот на бумажных хроматограммах (см. табл. 4). Из данных табл. 4 видно, что наибольшее увеличение чувствительности по сравнению с другими радикалами вызывает введение метильной группы у азота хинизатина.

1,8-Триметиленхинизатин служит хорошей моделью для изучения механизма нингидриновой реакции [606]. При нагревании эквимольных количеств 1,8-триметиленхинизатина и аминокислоты в спиртовых растворах наблюдалось появление синей окраски и постепенное ее исчезновение. Были изолированы два продукта реакции — 2-оксо-3,4-диокси-1,8-триметилен-1,2-дигидрохинолин (297) и бис-(2-оксо-4-окси-1,8-триметилен-1,2-дигидро-3-хинолил) амин (298) [606].



В реакционном растворе, как и в случаях реакции с нингидрином и аминокислотами, был обнаружен альдегид, содержащий на один углеродный атом меньше, чем исходная аминокислота [606].

*Бис*-(2-оксо-4-окси-1,8-триметилен-1,2-дигидро-3-хинолил) амин (298) представляет собой бесцветное вещество. В ИК-спектрах этого продукта отсутствуют максимумы абсорбции C=N-группы, но обнаруживается абсорбция —NH—группы [606]. При обработке *бис*-амин (298) алкоголями вещество окрашивается вначале в зеленый, а затем в синий цвет. Синий продукт был изолирован в твердом виде: изучены его спектроскопические и химические свойства. Было установлено, что этот продукт (299) является аналогом пурпура Руэмана.



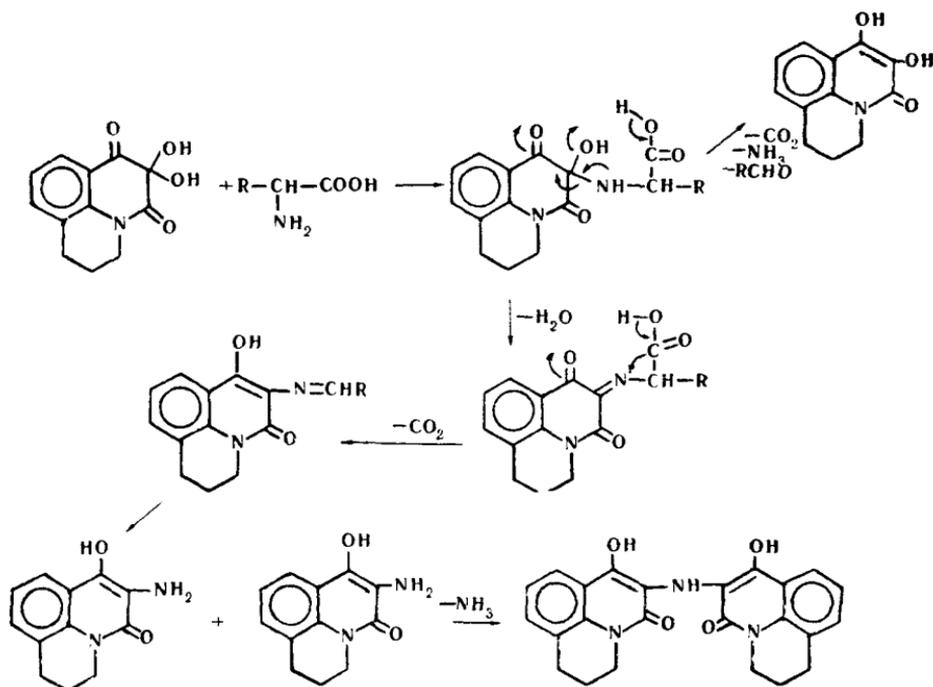
299

Синий аналог пурпура Руэмана при каталитическом восстановлении присоединяет 1 мол водорода и дает бесцветную соль *бис*-(2-оксо-4-окси-1,8-триметилен-1,2-дигидро-3-хинолил) амина.

Выделить из синей соли (299) соответствующую кислоту, аналогичную 2-[индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандиону-1,3 (79), или пурпуровой кислоте, не удастся. Даже очень осторожное разложение синей соли окисленного *бис*-амин приводит к разложению выделяемой кислоты.

Авторами работы [606] изучены соотношения, при которых образуются 2-оксо-3,4-диокси-1,8-триметилен-1,2-дигидрохинолин (297) и *бис*-(2-оксо-4-окси-1,8-триметилен-1,2-дигидро-3-хинолил)амин (298). Соотношение этих соединений в смеси продуктов реакции 1,8-триметиленхинизатина с аминокислотами зависит от кислотности среды. В кислой среде 2-оксо-3,4-диокси-1,8-триметилен-1,2-дигидрохинолин является почти единственным продуктом реакции, что объясняется характером гидролиза промежуточного продукта, имеющего структуру основания Шиффа.

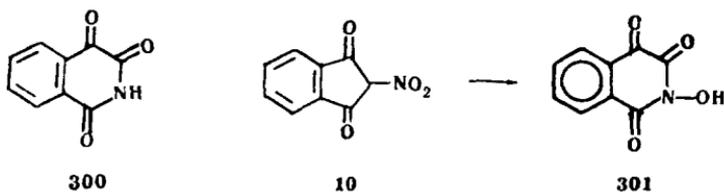
При рассмотрении нижеследующей схемы превращения 1,8-триметиленхинизатина в реакциях с аминокислотами необходимо еще раз отметить, что эта реакция протекает без избытка трикарбонильного соединения — 1,8-триметиленхинизатина.



В упомянутом детальном исследовании [606] и в других работах [407, 607] описано изолирование соединений, которые, с одной стороны, характеризуют особенности продуктов и течение одного из вариантов нингидриновой реакции, когда трикарбонильным соединением является 1,8-триметиленхинизатин, а с другой стороны — выявленные особенности этой разновидности нингидриновой реакции вносят ценные дополнения в общую теорию нингидриновой реакции.

### N-ОКСИФТАЛОНИМИД

Фталонимид (300) является изомером вышерассмотренного хинизатина и аналогом ценного аминокислотного реагента изатина. Однако в отличие от изатина и хинизатина фталонимид с аминокислотами не реагирует. Замещение водорода имидной группы гидроксилом дает N-оксифталонимид (301), реагирующий с аминокислотами.



N-Оксифталонимид образуется, если на 2-нитроиндандион-1,3 (10) в растворе хлороформа при нагревании подействовать уксусным ангидридом [608]. N-Оксифталонимид растворяется в горячей воде, спирте, ледяной уксусной кислоте; не растворяется в эфире и хлороформе; т. пл. 207°.

N-Оксифталонимид может быть использован для полихромного проявления аминокислот на бумажных хроматограммах. Механизм цветной реакции N-оксифталонимида с аминокислотами не выяснен.

Для проявления аминокислот на бумажных хроматограммах N-оксифталонимид применяется в виде 0,5%-ного спиртового

Таблица 5

**Цвет пятен аминокислот при их проявлении  
N-оксифталонимидом на бумажных хроматограммах [609]**

Аминокислота	Цвет
$\alpha$ -Аланин	Синий
$\beta$ -Аланин	Синий
Аргинин	Голубой
Аспарагин	Серо-синий
Аспарагиновая кислота	Синеватый
Валин	Синий
Глицин	Серо-синий
Глутамин	Синевато-зеленый
Глутаминовая кислота	Голубой
Изолейцин	Серо-голубой
Лейцин	Синий
Лизин	Желто-зеленый
Метионин	Зеленовато-синий
Норвалин	Синий
Орнитин	Синий
Пролин	Голубой
Серин	Серо-фиолетовый
Треонин	Серый
Тирозин	Фиолетово-красный
Триптофан	Фиолетовый
$\beta$ -Фенил- $\alpha$ -аланин	Зеленый
$\beta$ -Фенил- $\beta$ -аланин	Синий

раствора, который готовят за несколько дней до употребления. При старении раствора N-оксифталонимида его желтая окраска светлеет, и такие почти бесцветные растворы, в отличие от свежеприготовленных, при проявлении аминокислот не окрашивают хроматограмму в желтоватый цвет. Интенсивность окраски фона несколько снижается при снижении концентрации раствора реагента, но при этом уменьшается и чувствительность реакции.

Если сухую хроматограмму, на которой разделены протеиновые аминокислоты, смачивать раствором реагента, высушивать при комнатной температуре и нагревать 15 минут при температуре 140°, то аминокислоты проявляются в виде разноцветных пятен (табл. 5).

На чувствительность реакции N-оксифталонимида и оттенки окраски пятен аминокислот влияют температура и время проявления. В общем чувствительность реакции N-оксифталонимида на триптофан, тирозин, лизин, орнитин и некоторые другие аминокислоты приблизительно равна чувствительности реакции изатина на эти же аминокислоты. N-Оксифталонимидом не проявляются гистидин, цистеин и оксипролин. Следует отметить, что оксипролин, не обнаруживающийся на хроматограмме, проявленной N-оксифталонимидом, идентифицируется при обработке этой же хроматограммы изатином.

В отличие от изатина [309] N-оксифталонимид дает цветные реакции с  $\alpha$ -аланином, аспарагином и глутамином.

## Глава VI

### ПРОИЗВОДНЫЕ И АНАЛОГИ ИНДАНДИОНА-1,3

#### ИНДАНДИОН-1,3 И ЗАМЕЩЕННЫЕ ИНДАНДИОНЫ-1,3

Нингидрин, вернее гидрат индантриона-1,2,3, может быть рассмотрен как 2,2-диоксииндандион-1,3. Аналогичное отношение имеют аллоксан к барбитуровой кислоте и изатин к оксиндолу.

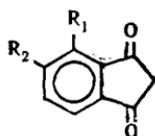
Среди производных и аналогов индандиона-1,3 встречается много реагентов на аминосоединения: 2-нитрозоиндандион-1,3, 2-нитроиндандион-1,3, биндон и др. Производные барбитуровой кислоты (например, виолуровая кислота) и оксиндола (например,  $\beta$ -оксим изатина) используются в неорганическом анализе.

В заключение обзора реакций нингидрина, аллоксана, изатина и хинизатина представляется целесообразным рассмотреть реакции производных и аналогов индандиона-1,3 — 2-нитрозоиндандиона-1,3, 2-нитроиндандиона-1,3 и биндона — с аминосоединениями.

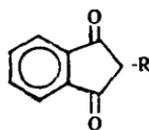
Индандион-1,3, замещенные во фталоильном кольце индандионы-1,3, содержащие свободные метиленовые группы, барбитуровая кислота и ряд других соединений реагируют с бромированным гистидином, образуя окрашенные продукты [610]. Для определения гистидина, кроме общих аминокислотных реагентов — нингидрина, аллоксана и изатина, применяются и более специфические реагенты. Имидазольный цикл гистидина легко вступает в реакцию азосочетания с солями диазония, полученными из замещенных анилинов, сульфаниловой или арсаниловой кислоты. Очень давно известны цветные реакции гистидина с бромом [611] или хлористым бензоилом [612]. С целью повышения специфичности и устранения других недостатков аналитических реакций гистидина многократно предпринимались попытки модифицировать их.

По предложению А. П. Сафронова [613] бромирование гистидина дополняется последующей обработкой димедоном или фенолметилпиразолоном, образующим при этом окрашенные продукты реакции, которые экстрагируются органическими раство-

рителями. Автор [613] обратил внимание на то, что предложенные реагенты содержат в циклической структуре группировку  $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ . И действительно (табл. 6), алифатические  $\beta$ -дикетоны (ацетилацетон, бензоилацетон, дибензоилметан) и некоторые гетероциклические соединения (роданин, гидантоин, антипирин), а также биндон с продуктами бромирования гистидина образуют желтые или светлоокрашенные соединения. При применении барбитуровой кислоты наблюдается фиолетовое окрашивание. Наиболее интенсивно окрашенные соединения образуются, если продукт бромирования гистидина обработать индандион-1,3 (9) или его производными, имеющими заместители во фталоильном кольце (302). 2-Замещенные индандионы-1,3 (303) оказались неактивными, из чего следует, что для появления окрашивания требуется кетон с рядом стоящей незамещенной метиленовой группой.



302



303

- а)  $R_1 = R_2 = \text{H}$   
 б)  $R_1 = \text{Hal}$ ;  $R_2 = \text{H}$   
 в)  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{Hal}$   
 г)  $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$

Наиболее чувствительными из приведенных реагентов в условиях определения гистидина по методике Сафронова оказались индандион-1,3 (9) и 4-хлориндандион-1,3 (302б). В последнем случае переход окрашенного продукта в этилацетатный слой наблюдается при содержании 2  $\mu\text{кг}$  гистидина в 4  $\text{мл}$  исходного водного раствора, т. е. 0,5  $\mu\text{кг}/\text{мл}$ .

Интересно отметить, что продукт взаимодействия бромированного гистидина с биндоном (12) имеет только желтый цвет, но индандионы-1,3 (302), которые сами по себе не окрашены, дают наиболее интенсивно окрашенный продукт. Это позволяет предполагать, что индандион-1,3 и замещенные во фталоильном кольце индандионы-1,3 могут найти аналитическое применение и в других аналогично проводимых реакциях.

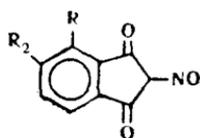
Таблица 6

**Цвет продуктов взаимодействия  
кетонов с бромированным гистидином**

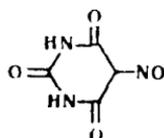
Кетон	Цвет продукта реакции в этилацетатном слое
Ацетилацетон	Желтый
Бензоилацетон	Светло-желтый
Дибензоилметан	Светло-желтый
Роданин	Зелено-желтый
Гидантоин	Светло-желтый
Антипирин	Розовый
Барбитуровая кислота	Светло-фиолетовый
Индандион-1,3	Зеленый
4-Хлориндандион-1,3	Васильковый
5-Хлориндандион-1,3	Синий
4-Броминдандион-1,3	Синий
5-Броминдандион-1,3	Темно-синий
4-Йодиндандион-1,3	Синий
4,5-Диметоксииндандион-1,3	Фиолетовый
Биндон	Желтый

**2-НИТРОЗОИНДАНДИОН-1,3**

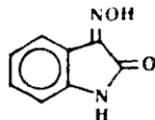
Нитрозогруппа, связанная с углеродным атомом, который содержит свободный водородный атом, способна участвовать в нитрозо-изонитрозотаутомерных превращениях, поэтому реакционная способность соединений, содержащих такие группировки, как правило, очень высока. Альдоксимы, кетоксимы и нитрозосоединения часто используются как в неорганическом, так и в органическом анализе. Ценными аналитическими свойствами обладают нитрозопроизводные индандиона-1,3, барбитуровой кислоты и оксиндола: 2-нитрозоиндандион-1,3 (11), виолуровая кислота (222) и  $\beta$ -оксим изатина (305).



304



222



305

а)  $R_1 = R_2 = H$ б)  $R_1 = Cl$ ;  $R_2 = H$ в)  $R_1 = NO_2$ ;  $R_2 = H$ г)  $R_1 = H$ ;  $R_2 = CH_3$

2-Нитрозоиндандион-1,3 при pH 5 и повышенной температуре реагирует с некоторыми аминокислотами, образуя окрашенные продукты реакций [614]. Орнитин реагирует моментально, глицин, гистамин, триптофан, серин и фенилаланин — медленнее. Для проявления аминокислот на бумажных хроматограммах применялся спиртовой раствор 2-нитрозоиндандиона-1,3 [614]. Окрашенные продукты с аминокислотами, кроме 2-нитрозоиндандиона-1,3, образуют также его производные: 2-нитрозо-4-хлориндандион-1,3 (304а), 2-нитрозо-4-нитроиндандион-1,3 (304б) и 2-нитрозо-5-метилиндандион-1,3 (304в) [615]. Если к водному раствору аминокислоты прибавлять 0,5%-ный спиртовой раствор соответствующего 2-нитрозоиндандиона-1,3 [616—618], то через некоторое время достигается максимальная интенсивность окрашивания раствора (табл. 7).

2-Нитрозоиндандион-1,3 и 2-нитрозо-5-метилиндандион-1,3 с большинством аминокислот дают сходные окраски, так же как и другая пара реагентов. — 2-нитрозо-4-хлориндандион-1,3 и 2-нитрозо-4-нитроиндандион-1,3.  $\alpha$ -Аланин с 2-нитрозоиндандионом-1,3 и 2-нитрозо-4-нитроиндандионом-1,3,  $\beta$ -аланин со всеми проверенными реагентами, а пролин с 2-нитрозо-4-нитроиндандионом-1,3 окрашиваются уже при комнатной температуре. При нагревании цвет продуктов реакций этих аминокислот меняется. При более высоких концентрациях некоторых аминокислот в растворе продукт реакции выпадает в осадок при охлаждении реакционного раствора. Осадок не образуется с пролином, оксипролином,  $\alpha$ -аланином,  $\beta$ -аланином, серином, лизином, орнитином, гистидином и треонином. Характер цветных реакций 2-нитрозоиндандиона-1,3 (11) и его аналогов (304а—в) таков, что эти реагенты можно использовать для количественного определения лизина и треонина. По методике анализа лизина и треонина анализируются растворы, содержащие в 4 мл от 0,0005 до 0,02 г аминокислоты. Присутствие других аминокислот мешает определению [615]. Общий характер цветных реакций 2-нитрозоиндандиона-1,3 и его производных был использован для разработки методики обнаружения протеиновых аминокислот после их разделения на бумажных хроматограммах [615]. Чувствительность цветных реакций 2-нитрозоиндандионов-1,3 и нингидрина с аминокислотами, указанная в табл. 7, определена по общепринятой методике [309]. Из таблицы видно, что чувствительность реакций всех аминокислот с 2-нитрозоиндандионами-1,3 на хроматограммах ниже чувствительности нингидриновой реакции. Из проверенных реагентов наилучшими аналитическими свойствами обладает 2-нитрозо-5-метилиндандион-1,3 (304в). Следует отметить, что пятна аминокислот на хроматограммах, проявленных 2-нитрозоиндандионами-1,3, не изменяются при хранении больше месяца.

## Цвет продуктов взаимодействия аминокислот с 2-нитрозоиндандионами-1,3,

Аминокислота	2-Нитрозоиндандион-1,3			2-Нитрозо-4-нитроиндандион-1,3		
	время, мин	количество, мкг	цвет	время, мин	количество, мкг	цвет
α-Аланин	5*	4,5	Оранжево-фиолетовый	5*	4,5	Зеленовато-коричневый
β-Аланин	2*	8,9	Оранжевый	5*	8,9	Зеленовато-коричневый
Аспарагин	5*	13,2	Оранжевый	5	26,4	Красно-коричневый
Аспарагиновая кислота	5*	3,3	Зеленовато-красный	4	6,6	Светло-коричневый
Валин	5	2,9	Темно-синий	3	2,9	Темно-зеленый
Гистидин	2	19,1	Зеленовато-коричневый	5	19,1	Темно-красный
Глицин	15	3,8	Фиолетово-синий	15	1,8	Желто-коричневый
Глютамин	5	7,3	Темно-синий	5	7,3	Красно-коричневый
Глютаминная кислота	5	14,7	Темно-синий	5	14,7	Красный
Изолейцин	5	3,3	Темно-синий	5	3,3	Красноватый
Лейцин	5	3,3	Темно-синий	5	3,3	Красно-коричневый
Лизин	5	2,3	Темно-красный	3	2,3	Темно-красный
Метионин	5	3,7	Серовато-фиолетовый	5	3,7	Красно-коричневый
Оксипролин	5	13,1	Алый	4	13,1	Коричневый
Орнитин	4	2,0	Фиолетово-серый	5	2,0	Зеленый
Пролин	2	23,0	Темно-красный	5*	23,0	Красный
Серин	15	2,6	Фиолетово-синий	15	2,6	Красно-коричневый
Треонин	5	11,9	Серовато-красный	5	11,9	Красный
Триптофан	5	20,4	Темно-коричневый	2	20,4	Оранжевый
β-Фенил-α-аланин	5	16,5	Серовато-красный	5	16,5	Красный
Цистеин	4	15,8	Желто-алый	4	7,9	Темно-коричневый

\* Реакция проводилась при комнатной температуре, в остальных случаях — паров.

Химизм цветных реакций 2-нитрозоиндандионов-1,3 с аминокислотами не изучен. Имеются косвенные данные о том, что разложение 2-нитрозоиндандионов-1,3 в индантрион-1,2,3 во время реакции не является причиной окрашивания.

Таблица 7

время появления максимальной окраски и чувствительность реакций

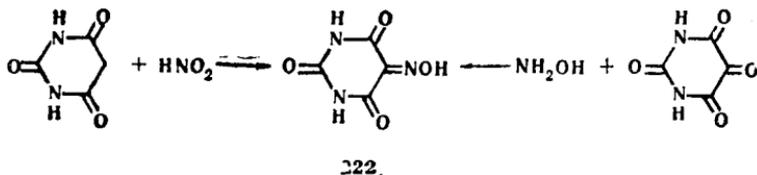
2-Нитрозо-4-хлориндандион-1,3			2-Нитрозо-5-метилиндандион-1,3			Нингидрин
время, мин	количе- ство, мкг	цвет	время, мин	количе- ство, мкг	цвет	количе- ство, мкг
3	4,5	Темно-фиолетовый	5	4,5	Темно-синий	0,1
5*	8,9	Оранжево-красный	5*	8,9	Оранжево-красный	1,0
2	13,2	Красный	5	6,6	Оранжевый	0,8
2	6,6	Красный	5	1,6	Красно-коричне- вый	0,2
5	2,9	Темно-фиолетовый	5	2,9	Темно-синий	0,09
2	19,1	Темно-красный	2	19,1	Красный	0,3
15	1,8	Желто-коричневый	15	1,8	Темно-синий	0,2
5	3,6	Темно-синий	5	7,3	Темно-фиолетовый	0,9
2	14,7	Темно-фиолетовый	5	3,6	Темно-фиолетовый	0,2
2	3,3	Темно-фиолетовый	5	3,3	Темно-синий	0,1
2	3,3	Темно-фиолетовый	5	1,6	Синий	0,1
2	2,3	Красно-коричне- вый	2	2,3	Темно-красный	0,1
5	7,4	Темно-фиолетовый	2	3,7	Темно-фиолетовый	0,1
2	13,1	Красный	5	13,1	Фиолетово-оран- жевый	1,6
2	2,0	Красный	5	2,0	Сине-коричневый	0,2
2	11,5	Темно-красный	2	23,0	Оранжевый	1,4
20	5,2	Желто-коричневый	20	1,3	Синий	0,1
2	11,9	Темно-фиолетовый	5	11,9	Красно-коричне- вый	0,2
2	10,2	Темно-коричневый	5	20,4	Темно-коричневый	1,3
5	16,5	Коричневый	2	16,5	Красный	1,0
5	15,8	Темно-коричневый	10	15,8	Красный	0,5

при нагревании хроматограмм при температуре 110—115° в атмосфере водяных:

В литературе отсутствуют данные о применении 2-нитрозоиндандиона-1,3 в неорганическом анализе, хотя он, подобно другим β-нитрозопроизводным циклических α,γ-дикетонов, например изо-нитрозодимедону [619], с ионами металлов образует окрашенные

комплексные соединения. Обстоятельно изучены комплексные соединения металлов с аналогом 2-нитрозоиндандиона-1,3 — 5-изонитрозобарбитуровой, или виолуровой, кислотой (222).

При взаимодействии азотистой кислоты с барбитуровой и гидроксиламина с аллоксаном образование 5-изонитрозобарбитуровой кислоты происходит настолько легко, что ее часто получают в реакционном растворе во время анализа [620].



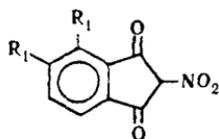
На способности виолуровой кислоты образовывать комплексы основаны спектрофотометрические методы определения лития, натрия, калия, рубидия, магния [621], железа (II), меди (II), кобальта (III) [622, 623]. Некоторыми преимуществами перед виолуровой кислотой в отдельных случаях обладают 2-тиовиолуровая и N,N'-замещенные виолуровые кислоты [624—627]. Виолуровая кислота была использована в анализе первичных ароматических аминов, которые образуют соли разных окрасок.

Продуктом непосредственного оксимирования изатина является β-оксим (305) [628], который по сравнению с α-оксимом изатина имеет меньшее аналитическое значение, но сравнительно часто применяется в анализе металлов [629—631].

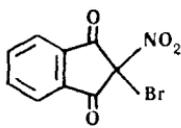
### 2-НИТРОИНДАНДИОН-1,3

2-Нитроиндандион-1,3 (10) является сильной кислотой. Его способность образовывать хорошо кристаллизующиеся соли была использована для кристаллографической идентификации протеиновых аминокислот [632]. 2-Нитроиндандион-1,3 применяется в классической методике Ванага [633] разделения и идентификации первичных, вторичных и третичных аминов [634]. Он дает ряд специфических цветных реакций на антипирин [635, 636], формальдегид [637], гидразин [638] и другие соединения [639]. Литература об аналитическом использовании 2-нитроиндандиона-1,3 до 1960 г. обобщена в работах [640, 641].

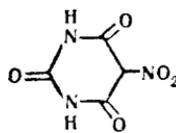
Динезин, или хлоргидрат 2-(диэтиламиноэтил)фенотиазина, аминазин, пропазин и ряд других гетероциклических соединений дают цветные реакции с 2-нитроиндандионом-1,3, что используется для колориметрического определения динезина [642] и аминазина [643].



306



20a



307

- а)  $R_1=R_2=H$   
 б)  $R_1=R_2=OCH_3$   
 в)  $R_1=Cl; R_2=H$   
 г)  $R_1=H; R_2=J$

При исследовании аналитических свойств 2-нитроиндандиона-1,3 (10) и его производных (306а—г) была обнаружена новая цветная реакция 2-нитроиндандионов-1,3. При проявлении смеси обычных природных аминокислот на бумажных хроматограммах спиртовыми растворами 2-нитроиндандиона-1,3 (10), 2-нитро-4,5-диметоксииндандиона-1,3 (306а), 2-нитро-4-хлориндандиона-1,3 (306б) или 2-нитро-5-йодиндандиона-1,3 (306в) пролин, оксипролин и орнитин образуют фиолетово-красные, а триптофан — коричнево-красные пятна на светло-желтом фоне [644]. В определенных условиях из всех протеиновых аминокислот цветные пятна дают только пролин, оксипролин и орнитин. Триптофан обнаруживается при более высокой температуре проявления хроматограммы. Чувствительность хроматографической реакции 2-нитроиндандиона-1,3 на триптофан приблизительно одинакова с чувствительностью нингидриновой реакции. Реакция 2-нитроиндандиона-1,3 положительна при нанесении на хроматограмму 0,4 мкг пролина, 0,8 мкг оксипролина и 1 мкг орнитина и, таким образом, чувствительность этих реакций превышает чувствительность нингидриновой реакции и равняется чувствительности реакции изатина. На основе цветных реакций 2-нитроиндандиона-1,3 с пролином, оксипролином и орнитином разработана методика количественного определения этих аминокислот [644].

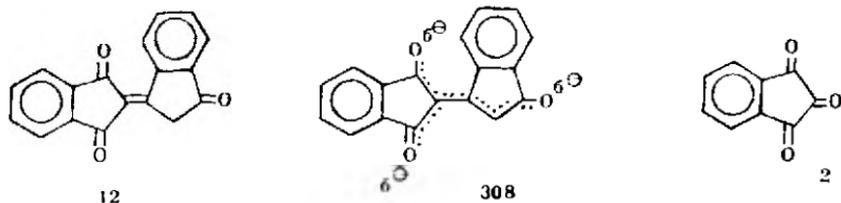
2-Бром-2-нитроиндандион-1,3 (20б) дает цветную реакцию с триптофаном [645], что было использовано для разработки специфической хроматографической реакции на триптофан. При обработке хроматограммы 0,5%-ным раствором 2-бром-2-нитроиндандиона-1,3 в этаноле и высушивании при комнатной температуре из протеиновых аминокислот проявляется только триптофан в виде фиолетового пятна, остальные протеиновые аминокислоты в таких условиях не проявляются [615].

Аналог 2-нитроиндандиона-1,3 — 2-нитробарбитуровая, или дилитуровая, кислота (307) по некоторым аналитическим свойствам напоминает 2-нитроиндандион-1,3. Она была использована

для кристаллографической идентификации алифатических аминов [646] и аминокислот [647]. Цветные реакции дилитуровой кислоты с аминсоединениями в литературе не описаны.

### БИНДОН

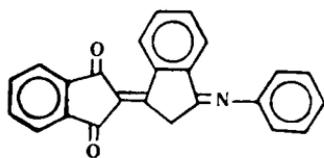
Продукт самоконденсации индандиона-1,3 — ангидро-бис-индандион-1,3-, или биндон, (12), является общепризнанным реагентом на амины [648]. Это желтое кристаллическое вещество с т. пл. 206—209° [59]. Хорошо растворяется в горячей уксусной кислоте, хуже в хлороформе и бензоле с желтым окрашиванием, в спиртах — с фиолетово-красным окрашиванием. Исследованием ИК-спектров биндона установлено [649], что в твердом состоянии он существует в трикетоформе (12), а его калиевая соль в твердом состоянии содержит изомерный анион (308) [649]. Биндон хорошо растворяется в щелочах с интенсивным фиолетовым окрашиванием.



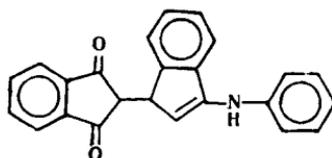
По своей структуре биндон (12) может рассматриваться как винилог безводного нингидрина (2), вторая карбонильная группа которого удалена через систему двух сопряженных двойных связей.

Более подробное рассмотрение химических свойств и структуры продуктов реакций подтверждает, что такое сравнение биндона с индантрионом-1,2,3 не является только формальным. Из трех карбонильных групп биндона с реагентами карбонильной группы, как и в случае индантриона-1,2,3, реагирует только одна, которая находится рядом с активной метиленовой группой [649, 650].

Первую цветную реакцию биндона с аминсоединениями обнаружил Либерман [651], который при нагревании биндона в ледяной уксусной кислоте с первичными ароматическими аминами наблюдал синее окрашивание. Некоторые из продуктов реакции были выделены в твердом состоянии и, например, продукту конденсации биндона с анилином приписывалась структура 309 или 310 [651, 652].



309



310

Несмотря на то что вопрос о структурах впервые полученных [651] окрашенных продуктов реакции биндона с ароматическими первичными аминами не решен, Г. Ванг всесторонне изучил аналитические свойства биндона и показал, что последний в ледяной уксусной кислоте является характерным общим реактивом на первичные алифатические и ароматические амины [653—655].

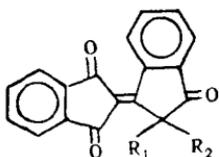
При взаимодействии биндона с первичными ароматическими аминами в ледяной уксусной кислоте появляется синяя, а в разбавленных растворах — зеленая окраска. Алифатические первичные амины с биндоном в уксусной кислоте дают фиолетовое окрашивание. Вторичные алифатические амины практически не реагируют и подобно диарил-, триарил-, диарилалкиламинам, пирдину, хинолину, пирролу и другим аминсоединениям окрашенные продукты не образуют [653]. Первичные алифатические и ароматические ди- и полиамины с биндоном реагируют подобно моноаминам. У диаминов ароматического ряда чувствительность реакции биндона в значительной мере зависит от взаимного расположения аминогрупп: чем ближе друг к другу расположены аминогруппы, тем хуже протекает реакция [654]. Одновременное нахождение других функциональных групп в молекуле алифатических аминов в меньшей мере мешает биндоновой реакции, чем наблюдается в ряде ароматических аминов [655]. Положительную реакцию с биндоном дают алифатические аминокислоты, аминокислоты и соединения, которые содержат ароматические или гетероциклические радикалы, а также пептиды и белки.

Соединения с ацилированными первичными аминогруппами и амиды кислот биндоновую реакцию не дают.

Из соединений, содержащих вторичные аминогруппы, в цветную реакцию с биндоном вступают такие, в которых аминогруппа связана с одним замещенным или незамещенным ароматическим, а также другим алифатическим радикалом. Реакции таких соединений малочувствительны. Чисто алифатические вторичные амины положительную биндоновую реакцию дают только при очень больших их концентрациях, а чисто ароматические вторичные амины с биндоном не реагируют. Соединения, содержащие одну или более третичных аминогрупп, биндоновую реакцию тоже не дают.

Положительную реакцию — зеленое окрашивание — дает гексаметилентетрамин; цвет продукта реакции биндона с пирролином и пролином синий [655].

На основе биндоновой реакции разработан метод количественного определения очень небольших количеств алифатических аминов [656].



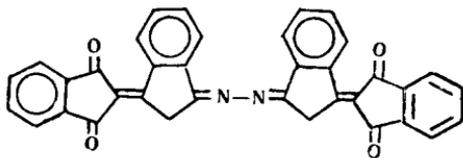
311

- а)  $R_1 = H$ ;  $R_2 = CH_3$
- б)  $R_1 = Br$ ;  $R_2 = CH_3$
- в)  $R_1 = NO_2$ ;  $R_2 = CH_3$
- г)  $R_1 = NO_2$ ;  $R_2 = Br$
- д)  $R_1 = H$ ;  $R_2 = Br$
- е)  $R_1 = R_2 = Br$ ;

Цветную реакцию с ароматическими аминами — зеленое окрашивание — дает метилбиндон (311а) [657]. Бромметилбиндон (311б) при нагревании в ледяной уксусной кислоте с  $N,N'$ -диалкиланилинами,  $N,N'$ -диалкилтолуидинами,  $N$ -алкиланилинами, дифениламином, фенилтолиламином и диарилалкиламинами образует зеленый краситель [658]. Первичные ароматические, алифатические и ациклические амины, ацилпроизводные аминов, аминокислоты и некоторые алкалоиды зеленого окрашивания в таких условиях с бромметилбиндоном не дают [658].

Было установлено [659], что при нагревании этилового эфира биндонилуксусной кислоты в ледяной уксусной кислоте с первичными ароматическими аминами появляется зеленая окраска. Так как вторичные и третичные ароматические и алифатически-ароматические амины, алифатические амины, некоторые азотистые гетероциклические соединения и алкалоиды зеленого окрашивания с реагентом не дают, то эта реакция с этиловым эфиром биндонилуксусной кислоты была использована как новая цветная реакция на первичные ароматические амины [659]. В качестве аналитического реагента аминов предложен нитробромбиндон (311г) [660], который в ледяной уксусной кислоте вступает в характерные цветные реакции с пирролом, индолами и карбазолами.

При нагревании биндона в ледяной уксусной кислоте с гидразином или соединениями, отщепляющими гидразин, образуется азин биндона (312) и появляется зеленое окрашивание [661]. На основе этой реакции разработана чувствительная и специфическая аналитическая реакция на гидразин [661].



312

Бромбиндон (311д) при нагревании в ледяной уксусной кислоте дает зеленое окрашивание с цистеином. Такое же окрашивание с цистеином дает дибромбиндон (311е), но реакция менее чувствительна, чем с монобромбиндоном. При нагревании 2-нитро-2-бромбиндона (311г) в ледяной уксусной кислоте появляются фиолетовая окраска и зеленая флюоресценция [660]. Тирозин, цистеин, серин, лейцин, валин, норвалин и др. дают только желтое окрашивание раствора. Спирты, фенолы, карбоновые кислоты и их производные не мешают цветной реакции. В присутствии дифениламина флюоресцентная реакция триптофана с нитробромбиндоном не наблюдается [660].

Из приведенных работ Г. Ванага и Р. Жагаты можно сделать вывод, как сильно изменяется аналитический характер реагента биндона с введением простейших заместителей в положении 2. Путем введения заместителей в групповой реактив биндон можно получить отдельные специфические реагенты. Известное структурное сходство биндона с нингидрином и общий характер биндоновой реакции аминсоединений позволяют рассматривать биндоновую реакцию как реакцию аминсоединений, имеющую некоторое отношение к нингидриновой реакции. Более того, это позволяет надеяться в будущем найти некоторые общие моменты в механизмах биндоновой и нингидриновой реакций.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

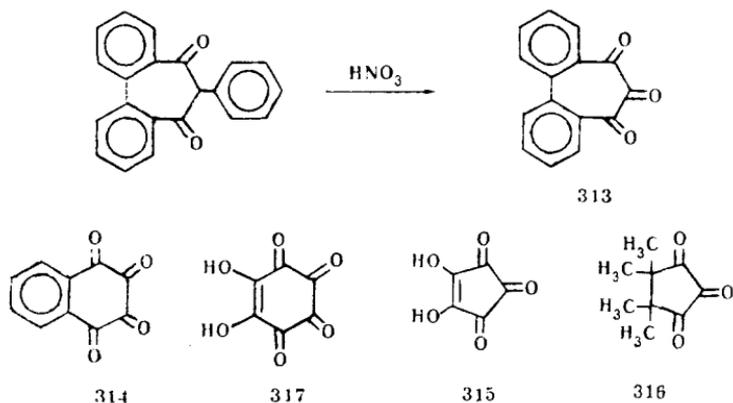
Основная литература о нингидриновых реакциях посвящена собственно нингидриновой реакции. В аналитической практике значительно реже, чем нингидрин, используются гидрат перинафтиндантриона-1,2,3, аллоксан, изатин и хинизатин. Однако, несмотря на такую широкую применяемость, нингидрин как аналитический реагент имеет ряд недостатков: нестабильность красителя пурпура Руэмана, трудности стандартизации условий проведения реакций, при несоблюдении которых протекает ряд побочных реакций [492]. Некоторые авторы [662, 663] пришли к убеждению, что разбросанность результатов при определении аминокислот в меньшей мере зависит от ошибок хроматографического разделения, чем от ошибок, связанных с нингидриновой реакцией. Следовательно, изыскание и изучение новых реагентов на аминокислоты всегда является актуальным вопросом. Изучение поликарбонильных реагентов на аминосоединения должно вестись в двух направлениях:

1) основываясь на известных фактах и представлениях о механизме нингидриновой реакции, синтезировать в чем-то измененные структуры нингидриновых реагентов;

2) изучать взаимодействие аминосоединений с известными поликарбонильными соединениями. Такие реакции до сих пор не исследовались совсем или исследовались недостаточно.

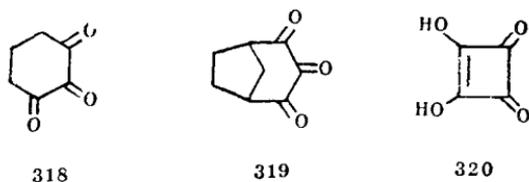
Очень интересно было бы изучить поведение дигидрата 1,2,3,4-тетрагидротетраоксонафталина (314) в его реакциях с аминокислотами и аминами, но здесь помехой может стать невысокая стабильность тетракетона [664].

В литературе описано получение циклического трикетона с семичленным циклом — дибензо[*a,c*]циклогептан-5,6,7-триона (313) [665]. Этот трикетон — стабильное соединение и представляет интерес как своеобразный аналог нингидрина.

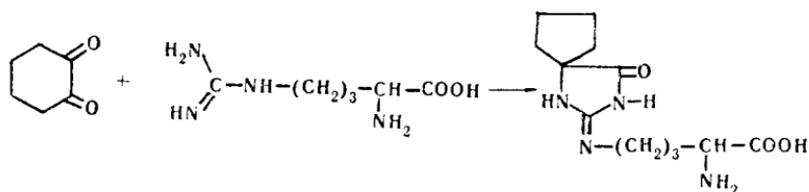


В кроконовой кислоте (315) в отличие от нингидрина отсутствует фрагмент бензольного кольца. Она легко синтезируется [666], имеет интересные свойства [30, 667, 668] и уже применяется в неорганическом анализе [669]. Аналог кроконовой кислоты — тетраметилциклопентантрикетон-1,2,3 (316) представляет собой синие кристаллы, образующие с водой бесцветный кристаллогидрат [670]. Реакции гидрата тетраметилциклопентантрикетона-1,2,3 с аминоксоединениями не исследованы.

Тетракетон — родизоновая кислота (317) в виде натриевой соли используется для анализа бария, кальция, стронция и других металлов [671—673] и органических оснований [674]. Окислительными свойствами обладает циклогексантрион-1,2,3 (318), образующий дигидрат [675]. Синтезирован аналог циклогексантриона-1,2,3 (319), связанный диметиленовой группой [676].



Сильнокислыми свойствами обладает дикетоаналог кроконовой кислоты — дикеточиклобутендион (320) [677]. Его реакции с аминокислотами или аминами неизвестны, но циклогександион-1,2 предложен как специфический реактив для модификации аргинина [678—680]. Гуанидиновая группировка аргинина в сильнощелочной среде конденсируется с циклогександионом-1,2, образуя 2-[(4-амино-4-карбоксивбутил)имино]-5,5-циклотетраметил-4-имидазолин (321), структура которого доказана встречным синтезом [679].



321

Циклогександион-1,2 считают специфическим реагентом для гуанидиновой группировки и используют его для модификации этих группировок в полипептидах. 1-Хлорциклогександион-2,3 и 1-хлорциклопентандион-2,3 вступают во взаимодействие с первичными и вторичными аминами [681].

*o*-Диацетилбензол, различные алкилзамещенные *o*-диацилбензолы с аминокислотами образуют оранжевые продукты реакции [682—684]. *o*-Диацетилбензол [684] и другие *o*-диацилбензолы [682, 683] используются для определения аминокислот.

Таким образом, отдельные поликетоны, по структуре значительно отличающиеся от нингидрина, дают цветные реакции с аминосоединениями. Для выявления новых карбонильных реагентов для цветных реакций аминосоединений требуется систематическое изучение реакций аминосоединений с соединениями поликарбонильных рядов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Morrell R. S. — J. Chem. Soc., 1944, 46.
2. West R. — J. Chem. Educ., 1965, 42, 386.
3. Abderhalden E., Schmidt H. — Z. physiol. Chem., 1913, 85, 143.
4. Ruhemann S. — J. Chem. Soc., 1910, 97, 1438.
5. Ruhemann S. — J. Chem. Soc., 1910, 97, 2025.
6. McCaldin D. J. — Chem. Rev., 1960, 60, 39.
7. Юферов В. П. — В кн.: Успехи биологической химии, т. 12. М., «Наука», 1971, 62.
8. Ruhemann S. — J. Chem. Soc., 1911, 99, 792.
9. Teeters W. O., Shriner R. L. — J. Am. Chem. Soc., 1933, 55, 3026.
10. Кошелева Г. Н. — Труды ВНИИ хим. реактивов, 20. М., Госхимиздат, 1951, 251.
11. Štěpán J., Král V. — Čas. lek. česk., 1953, 92, 208.
12. Dominguez X. A. — J. Chem. Educ., 1953, 30, 624.
13. Egashira S. — Nippon Kagaku Zasshi, 1954, 75, 308; С. А., 1957, 51, 11263.
14. Пат. США, 3419616 (1966); С. А., 1969, 70, 67996.
15. Scheiber J., Hopfer G. — Chem. Ber., 1920, 53, 697.
16. Hassal C. H. — J. Chem. Soc., 1948, 50.
17. Франц. пат., 1348567 (1964); С. А., 1964, 60, 11963.
18. Бельг. пат., 640382 (1964); С. А., 1965, 63, 556.
19. Пат. США, 3366690 (1968); РЖХ, 1969, 13Н221П.
20. Wanag G., Lode A. — Chem. Ber., 1938, 71, 1267.
21. Ваняг Г. Нитрондандион. Рига, Изд-во АН ЛатвССР, 1954, 46.
22. Gustowski W. — Przem. chem., 1951, 30, 694.
23. Физер Л. Современные методы эксперимента в органической химии. М., Госхимиздат, 1960, 159.
24. Gruen H., Norcross B. E. — J. Chem. Educ., 1965, 42, 268.
25. Allen C. F., Wilson C. V. — J. Org. Chem., 1940, 5, 146.
26. Арбузов А. Е., Арбузов Б. А., Луговкин Б. П. — Изв. АН СССР, отдел. хим. наук, 1947, 3, 535.
27. Ремик А. Электронные представления в органической химии. М., ИЛ, 1950, 303.
28. Богоносцева Н. П. — Уч. зап. Казанского гос. ун-та, Химия, 1956, 116, 71.
29. Хохлов А. С., Шукина Л. А., Шемякин М. М. — ЖОХ, 1951, 21, 1016.
30. Eistert B. — Chem. Ber., 1960, 93, 1451.
31. Regitz M., Heck G. — Chem. Ber., 1964, 97, 1482.
32. Regitz M. et al. — Lieb. Ann., 1965, 690, 125.
33. Regitz M., Adolph H. G. — Z. Naturforsch., 1968, 23B, 1269.
34. Regitz M., Adolph H. G. — Chem. Ber., 1968, 101, 3604.
35. Kornblum N. et al. — J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 6562.
36. Epstein W. W., Sweat F. W. — Chem. Rev., 1967, 67, 247.
37. Пат. США 3385894 (1968); С. А., 1969, 70, 3560.
38. Пат. США 3435064 (1969); С. А., 1969, 70, 96483.

39. Schipper E. et al. — *Tetrahedron Lett.*, 1968, 6201.
40. Becker H. D., Russell G. A. — *J. Org. Chem.*, 1963, 28, 1896.
41. Becker H. D. — *J. Org. Chem.*, 1964, 29, 1358.
42. Яп. пат., 6911653 (1969); С. А., 1969, 71, 101600.
43. Пат. ФРГ, 1270040 (1960); РЖХ, 1970, 4Н240П.
44. Пат. ГДР, 79010 (1971); С. А., 1972, 76, 34013.
45. Брит. пат., 1079748 (1967); С. А., 1968, 68, 2737.
46. Bolton W. — *Acta cryst.*, 1965, 18, 5.
47. Schönberg A., Moubasher R. — *J. Chem. Soc.*, 1943, 71.
48. Knoche W. et al. — *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1966, 31, 388.
49. Hamilton P. V., Ortiz P. J. — *Anal. Chem.*, 1950, 22, 948.
50. Успенская Ж. В., Кретович В. Л. — В кн.: *Биохимия зерна*, 5. М., Изд-во АН СССР, 1960, 5.
51. Пасхина Т. С. — В кн.: *Современные методы в биохимии*. М., «Медицина», 1964, 162.
52. Schönberg A., Singer E. — *Chem. Ber.*, 1970, 103, 3871.
53. Schönberg A., Singer E. — *Chem. Ber.*, 1971, 104, 160.
54. Schönberg A., Singer E. — *Chem. Ber.*, 1972, 105, 2246.
55. Purvis J. E. — *J. Chem. Soc.*, 1911, 99, 1953.
56. Polonovski M., Gonnard P., Glotz G. — *Bull. Soc. chim. France*, 1939, 1557.
57. MacFadyen D. A. — *J. Biol. Chem.*, 1950, 186, 1.
58. Lepley A. R. et al. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1969, 153, 758.
59. Wislicenus W., Kötze A. — *Lieb. Ann.*, 1889, 252, 72.
60. Heusler F., Schieffer H. — *Chem. Ber.*, 1899, 32, 28.
61. Ponzio G., Pichetto A. — *Gazz. chim. ital.*, 1923, 53, 20; *Chem. Z.*, 1923, 3, 1485.
62. Ruhemann S. — *J. Chem. Soc.*, 1911, 99, 1306.
63. Abderhalden R. — *Z. physiol. Chem.*, 1938, 252, 81.
64. Holleck L., Lehmann O. — *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1965, 30, 4024.
65. Velček A. K., Špalek E., Kratky L. — *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1950, 15, 340.
66. Holleck L., Khalafalta S. E., Manuel A. M. — *Naturwiss.*, 1955, 42, 558.
67. Holleck L., Lehmann O., Manuel A. — *Naturwiss.*, 1960, 47, 108.
68. Melkonian G. A., Holleck L. — *Ber. Bunsenges. phys. Chem.*, 1960, 64, 1210.
69. Holleck L., Lehmann O. — *Monatsh. Chem.*, 1961, 92, 33.
70. Holleck L., Lehmann O. — *Ber. Bunsenges. phys. Chem.*, 1963, 67, 609.
71. Shams A. M., El Din, Holleck L. — *Monatsh. Chem.*, 1968, 99, 212.
72. Moubasher R. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, 73, 3245.
73. Moubasher R. et al. — *J. Chem. Soc.*, 1950, 1998.
74. Eistert B., Müller R. — *Chem. Ber.*, 1959, 92, 2071.
75. Schönberg A., Junghans K. — *Chem. Ber.*, 1963, 96, 3328.
76. Mustafa A. et al. — *Lieb. Ann.*, 1968, 712, 116.
77. Cockburn R., Speakman J. B. — *Proc. Int. Wool Textile Research Conf.*, Melbourne, 1955 C, 340; С. А., 1957, 51, 18618.
78. Арбузов Б. А. и др. — *ДАН*, 1966, 171, 605.
79. Ramirez F., Patwardham A. W., Smith C. P. — *J. Org. Chem.*, 1965, 30, 2575.
80. Арбузов Б. А. и др. — *Изв. АН СССР, сер. хим.*, 1969, 12, 2727.
81. Mustafa A., Sidky M. M., Soliman F. M. — *Tetrahedron*, 1967, 23, 99.

82. Chatterjee S. — *Science*, 1967, **157**, 314.
83. Junek H., Sterk H. — *Tetrahedron Lett.*, 1968, 4309.
84. Chatterjee S. — *J. Chem. Soc.*, 1969 B, 725.
85. Junek H., Aigner H., Fischer-Colbrie H. — *Monatsh. Chem.*, 1972, **103**, 639.
86. Lukats B., Clauder O. — *Acta chim. (Budapest)*, 1972, **71**, 93; *C. A.*, 1972, **76**, 59287.
87. Dilthey W., Horst I., Schommer W. — *J. prakt. Chem.*, 1935, **143**, 189.
88. Ried W., Freitag D. — *Chem. Ber.*, 1966, **99**, 2675.
89. Eistert B., El-Chahawi M. A. — *Chem. Ber.*, 1970, **103**, 173.
90. Каписак Л. А., Баттисте М. А. — *Synthesis*, 1971, **3**, 153.
91. Пелчер Ю. Э., Ванар Г. Я. — *Изв. АН ЛатвССР, сер. хим.*, 1965, **5**, 612.
92. Schönberg A., Singer E. — *Tetrahedron Lett.*, 1969, 4571.
93. Retinger J. M. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1917, **39**, 1059.
94. Hantzsch A. — *Chem. Ber.*, 1921, **54**, 1267.
95. West E. S., Reinehart R. E. — *J. Biol. Chem.*, 1942, **146**, 105.
96. Schönberg A., Moubasher R. — *J. Chem. Soc.*, 1944, 366.
97. Beilst. *Handb. org. Chemie*, 4. Aufl., **7**, E 1, 475, E II, 831.
98. Elsevier's *Encyclopaedia of Organic Chemistry*, vol. 12A. Amsterdam, Els. Publ. Co., 1948, 325.
99. Kaufmann V. — *Chem. Ber.*, 1897, **30**, 382.
100. Gabriel S., Leupold E. — *Chem. Ber.*, 1898, **31**, 1159.
101. Riemschneider R. — *Monatsh. Chem.*, 1962, **93**, 841.
102. Troll W., Cannan R. K. — *J. Biol. Chem.*, 1953, **200**, 803.
103. Bruce T. C., Richards F. M. — *J. Org. Chem.*, 1958, **23**, 145.
104. Abderhalden E., Schmidt H. — *Z. physiol. Chem.*, 1911, **72**, 37.
105. Abderhalden E. *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*. Berlin, Urban und Schwarzenberg, 1923, *Abt. 1, Teil 7*, 95.
106. Abderhalden E. *Mikrochemie, H. Molisch Festschrift*, 1936, 1.
107. Abderhalden E. — *Fermentforsch.*, 1936, **15**, 93.
108. Abderhalden E. — *Fermentforsch.*, 1936, **15**, 348.
109. Abderhalden E. — *Fermentforsch.*, 1940, **16**, 297.
110. Halle W., Loewenstein E., Pribram E. — *Biochem. Z.*, 1913, **55**, 357.
111. Neuberg C. — *Biochem. Z.*, 1913, **56**, 500.
112. Harding V. J., Warneford F. H. S. — *J. Biol. Chem.*, 1916, **25**, 319.
113. Strecker A. — *Lieb. Ann.*, 1862, **123**, 363.
114. Ruhemann S. — *J. Chem. Soc.*, 1911, **99**, 1486.
115. Harding V. J., MacLean R. M. — *J. Biol. Chem.*, 1916, **25**, 337.
116. Moore S., Stein W. H. — *J. Biol. Chem.*, 1948, **176**, 367.
117. Neuzil E. et al. — *C. r. Acad. sci.*, 1967, **264 C**, 1498.
118. MacFadyen D. A. — *Fed. Proc.*, 1947, **6**, 273.
119. Friedman M. — *Microchem. J.*, 1971, **16**, 204.
120. Gusling H., Schwarzenbach G. — *Helv. chim. acta*, 1949, **32**, 1484.
121. Буркина А. Я., Сенов П. Л. — *ЖАХ*, 1972, **27**, 473.
122. Dakin H. D., Dudley H. W. — *J. Biol. Chem.*, 1913, **15**, 127.
123. Harding V. J., MacLean R. M. — *J. Biol. Chem.*, 1915, **20**, 217.
124. Harding V. J., MacLean R. M. — *J. Biol. Chem.*, 1916, **24**, 503.
125. Schlenk W., Weichel T. — *Chem. Ber.*, 1911, **44**, 1182.
126. Woker G., Antener I. — *Helv. chim. acta*, 1937, **20**, 1260.
127. Piloty O. — *Lieb. Ann.*, 1904, **333**, 22.
128. Akabori S. — *Chem. Ber.*, 1933, **66**, 143.
129. Schönberg A., Moubasher R. — *Chem. Rev.*, 1952, **50**, 261.

130. Moubasher R., Ibrahim M. — *J. Chem. Soc.*, 1949, 702.
131. MacFadyen D. A. — *J. Biol. Chem.*, 1944, 163, 507.
132. Wittmann H., Müller A. K., Ziegler E. — *Monatsh. Chem.*, 1970, 101, 1388.
133. MacFadyen D. A., Fowler N. — *J. Biol. Chem.*, 1950, 186, 13.
134. Moubasher R. — *J. Chem. Soc.*, 1949, 1038.
135. Jacobs S. — *Colloq. Spectroscop. Intern.* 9th, Lyon, 1961, 3, 247; *C. A.*, 1963, 59, 1085.
136. Kisfaludy S., Brulich M. — *Acta med. Acad. sci. hung.*, 1960, 16, 175; *C. A.*, 1961, 55, 10560.
137. Klinger W. — *Wiss. Z. F.-Schiller-Univ. Math.-naturwiss. Reihe*, 1959/60, 9, 175.
138. Gardner H. — *Lancet*, 1930, 219, 525.
139. Klinger W. — *Naturwiss.*, 1955, 42, 645.
140. Riffart H. — *Biochem. Z.*, 1922, 131, 78.
141. Moubasher R., Othman A. M. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 2666.
142. Bremner J. M., Kenten R. H. — *Biochem. J.*, 1951, 49, 651.
143. Yamagishi M. — *J. Pharm. Soc. Japan*, 1954, 74, 1233.
144. Neuzil E., Breton J. C., Plagnol H. — *Rev. esp. fisiol.*, 1960, 16, Suppl. 3, 47; *C. A.*, 1961, 55, 8362.
145. Takagi E. et al. — *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1955, 28, 213.
146. Irion W., Moosmüller E. — *Z. anal. Chem.*, 1953, 140, 416.
147. Russel D. W. — *J. Chromatogr.*, 1960, 4, 251.
148. Neuzil E., Josselin J., Breton J. C. — *C. r. Acad. sci.*, 1961, 119.
149. Neuzil E., Breton J. C., Plagnol H. — *Bull. mém. Fac. nat. med. pharm. Dakar*, 1959, 7, 157.
150. Neuzil E., Josselin J., Breton J. C. — *Bull. mém. Fac. nat. med. pharm. Dakar*, 1960, 8, 149.
151. Neuzil E., Breton J. C., Plagnol H. — *Bull. mém. Fac. nat. med. pharm. Dakar*, 1961, 9, 139.
152. Plagnol H. *Influence de la structure des composés aminés dans leur réaction avec la ninhydrine*. Bordeaux, 1962.
153. Harada K. et al. — *Suisan Daigaku Kenkyu Hokoku*, 1967, 61, 11; *C. A.*, 1968, 69, 26100.
154. Grassmann W., Arnim K. V. — *Lieb. Ann.*, 1934, 509, 288.
155. Johnson A. W., McCaldin D. J. — *J. Chem. Soc.*, 1958, 817.
156. Dietzsch K., Neubauer E. — *Wiss. Z. Univ. Rostock. Math.-naturwiss. Reihe*, 1969, 18, 965.
157. Treibs A., Herrmann E., Meissner E. — *Lieb. Ann.*, 1958, 612, 229.
158. Ogawa S., Kochi Y., Nishimura H. — *Eisei Shikenjo Hôkoku*, 1958, 76, 21; *C. A.*, 1959, 53, 16465.
159. Tomita M., Fukagawa T. — *Z. physiol. Chem.*, 1926, 158, 64.
160. Tomita M. — *J. oriental med.*, 1924, 2, 189; *Chem. Zbl.*, 1925, I, 2715.
161. Kendo K., Masuda S. — *Fukuoka Igaku Zasshi*, 1956, 47, 1883; *C. A.*, 1959, 53, 19017.
162. Friedman M. — *Canad. J. Chem.*, 1967, 45, 2271.
163. Shapiro R., Chatterjee N. — *J. Org. Chem.*, 1970, 35, 447.
164. Suffis R., Levy A., Dean D. E. — *Anal. Chem.*, 1964, 36, 636.
165. Neuzil E., Pauc A., Nadad Y. — *Bull. Soc. pharm. Bordeaux*, 1967, 106, 60.
166. Neuzil E., Breton J. C. — *Bull. Soc. pharm. Bordeaux*, 1960, 99, 91.

167. Neuzil E., Breton J. C. — Congr. Soc. pharm. France, 9th, Clermont-Ferrand, 1957, 97; C. A., 1959, 53, 20689.
168. Neuzil E. et al. — Bull. Soc. pharm. Bordeaux, 1965, 104, 227.
169. Johnson A. W., McCaldin D. J. — J. Chem. Soc., 1960, 3412.
170. Israel M., Jones L. C., Modest E. J. — J. Heterocycl. Chem., 1972, 9, 255.
171. Shapiro R., Agarwal S. C. — J. Am. Chem. Soc., 1968, 90, 474.
172. Shapiro R., Hachmann J. — Biochem., 1966, 5, 2799.
173. Cronin D. A., Gilbert I. — J. Chromatogr., 1972, 71, 251.
174. Barakat M. Z., Wahba N., El-Sadr M. M. — Analyst, 1954, 79, 715.
175. Spencer R. P., Brody K. R., Lutters B. M. — Mikrochim. ichnol. anal. acta, 1964, 1144.
176. Conn R. B. — Clin. Chem., 1960, 6, 537.
177. Quay W. B. — J. Pharm. Sci., 1968, 57, 1568.
178. Оксенбург Г. Ф. — Вopr. мед. химии, 1969, 15, 317.
179. Samejima K., Dairman W., Udenfriend S. — Anal. Biochem., 1971, 42, 222.
180. Samejima K., Dairman W., Stone J., Udenfriend S. — Anal. Biochem., 1971, 42, 237.
181. Бельг. пат. 655926 (1965); C. A., 1966, 65, 5577.
182. США пат. 3293061 (1966); C. A., 1967, 66, 86761.
183. Smith E. C., Althouse P. M., Shigley J. W. — J. Chromatogr., 1959, 2, 440.
184. Филипович Ю. Б. — Научн. доклады высшей школы. Химия и хим. технол., 1959, 1, 110.
185. Friedman M., Sigel C. W. — Biochem., 1966, 5, 478.
186. Bigwood E. J. — Proc. Colloq. Bruges, 1959. Amsterdam, 1960, 99; C. A., 1960, 54, 15464.
187. Dent C. E. — Biochem. J., 1948, 43, 169.
188. Jaroszewicz L., Czerepko K. — Anal. Chem., 1964, 10, 37.
189. Kuhn R., Hammer I. — Chem. Ber., 1951, 84, 91.
190. Ose S. et al. — J. Pharm. Soc. Japan, 1950, 70, 707.
191. Field L., Sweetman B. J. — J. Org. Chem., 1969, 34, 1799.
192. Teyeau F., Marquavielle J., Marquavielle-Regnier S. — Bull. Soc. pharm. Bordeaux, 1954, 92, 231.
193. Field L., Sweetman B. J., Bellar M. — J. Med. Chem., 1969, 12, 624.
194. Kato S. — Eisei Shikenjo Hokoku, 1968, 86, 91; C. A., 1969, 71, 111495.
195. Tomimaga N. — Seikagaku, 1961, 33, 829; C. A., 1962, 56, 11743.
196. Tomimaga N. — Seikagaku, 1962, 34, 258; C. A., 1963, 58, 4459.
197. Tomimaga N. — Bull. Chem. Soc. Japan, 1962, 35, 851.
198. Labadie M., Neuzil E., Breton J. — Bull. Soc. chim. biol., 1965, 47, 2125.
199. Riemschneider R., Koka R., Kriseler H. — Monatsh. Chem., 1963, 94, 1131.
200. Wittmann H., Wurm G. — Monatsh. Chem., 1972, 103, 633.
201. Heesing A., Müller-Matthesius R., Rose H. — Lieb. Ann., 1970, 735, 72.
202. Grasmann W., Arnim K. — Lieb. Ann., 1935, 519, 192.
203. Stafford W. H. — J. Chem. Soc., 1952, 580.
204. Hudson C. B., Robertson A. V. — Austral. J. Chem., 1967, 20, 1511.
205. Hokino H. et al. — J. Pharm. Soc. Japan, 1971, 91, 630.
206. Fowden L. — Biochem. J., 1956, 64, 323.
207. Chinard F. — J. Biol. Chem., 1952, 199, 91.

208. Neuzil E., Pauc M., Breton J. C. — Bull. Soc. pharm. Bordeaux, 1965, **104**, 217; C. A., 1966, **65**, 10950.
209. Tsuji A., Hojo M. — Buneski Kagaku, 1962, **11**, 1255; C. A., 1963, **58**, 8853.
210. Neuzil E. — Bull. Soc. pharm. Bordeaux, 1953, **91**, 122; C. A., 1954, **48**, 329.
211. Van Slyke D. D. et al. — J. Biol. Chem., 1941, **141**, 627.
212. Van Slyke D. D., Hamilton P. B. — J. Biol. Chem., 1943, **150**, 471.
213. Арен А. К. и др. — Изв. АН ЛатвССР, сер. хим., 1970, **3**, 323.
214. Palazzo S. — Ann. chim. (Roma), 1961, **51**, 88.
215. Conn R. B., Davis R. B. — Nature, 1959, **183**, 1053.
216. Lagercrantz C., Yland M., — Acta chem. scand., 1963, **17**, 277.
217. Огг J. C. — Nature, 1965, **203**, 1008.
218. Харитonenков И. Г., Юферов В. П., Калмансон А. Э. — Биофизика, 1967, **12**, 413.
219. Юферов В. П., Харитonenков И. Г. — ДАН, 1967, **175**, 1392.
220. Юферов В. П. и др. — ДАН, 1968, **180**, 1484.
221. Юферов В. П. — Биофизика, 1968, **13**, 1119.
222. Yuferev V. P. et al. — Biochim. biophys. acta, 1970, **200**, 160.
223. Virtanen A. I., Laine T. — Scand. Arch. physiol., **1938**, 392.
224. Virtanen A. I., Laine T., Toivanen T. — Z. physiol. Chem., 1940, **266**, 193.
225. Jacobs S. — Nature, 1959, **183**, 262.
226. Schlenker F. S. — Anal. Chem., 1947, **19**, 471.
227. Sobel A. E., Hirschman A., Berman L. — J. Biol. Chem., 1945, **161**, 99.
228. Konitzer K., Körner J., Voigt S. — Z. anal. Chem., 1966, **223**, 426.
229. Herzfeld E. — Biochem. Z., 1914, **59**, 249.
230. Kakač B., Vejdeck Z. Handbuch der Kolorimetrie, Bd. III. Jena, G. Fischer-Verlag, 1966, 7.
231. Stegemann H. — Z. physiol. Chem., 1960, **319**, 102.
232. Fowden L. — Biochem. J., 1951, **48**, 327.
233. Moore S., Stein W. H. — J. Biol. Chem., 1954, **211**, 907.
234. Tetzner E. — Mikrochemie, 1940, **38**, 141.
235. Kawerau E., Wieland T. — Nature, 1951, **168**, 77.
236. Singh C. — J. Chromatogr., 1965, **18**, 194.
237. Meyer H., Riklis E. — Nature, 1953, **172**, 543.
238. Цариченко А. П. — Научн. труды Краснодарск. гос. пед. ин-та, 1966, **70**, 86.
239. Пятницкий М. П., Цариченко А. П. — В кн.: Методы количественного определения органических веществ. Краснодар, 1971, 5.
240. Yamamoto M., Young I. L. — J. Chromatogr., 1971, **57**, 152.
241. James L. B. — J. Chromatogr., 1971, **59**, 178.
242. Lae J. P., Takahashi T. — Anal. Biochem., 1966, **14**, 71.
243. Lamothe P. J., McCormick P. G. — Anal. Chem., 1972, **44**, 821.
244. Frei R. W., Frodyma M. M. — Anal. Biochem., 1964, **9**, 310.
245. Moore S. — J. Biol. Chem., 1968, **243**, 6281.
246. Починок Х. Л. — Физиология и биохимия культурных растений, 1972, **4**, 101.
247. Ki Paik W., Kim S. — Nature, 1964, **202**, 793.
248. Jacobs S. — Nature, 1964, **204**, 71.
249. Лукьянов В. Б., Симонов Е. Ф. — Вестн. Моск. гос. ун-та, сер. хим., 1965, **20**, 4, 30.
250. Anderson N. G., Stevens R. H., Holleman J. W. — Anal. Biochem., 1968, **26**, 104.

251. Castillo F., Miller S. L. — *J. Chromatogr.*, 1971, **63**, 403.
252. Kusakabe H. — *Sci. Papers Inst. Chem. Res. (Tokyo)*, 1964, **58**, 150; *C. A.*, 1965, **62**, 13842.
253. Kasai T., Obata Y. — *Nippon Nagei Kagaku Kaishi*, 1965, **39**, 319; *C. A.*, 1965, **63**, 18632.
254. Wolf A. — *Prax. Naturwiss.*, 1969, Т. 3, **18**, 208.
255. Цариченко А. П., Феоктистова А. К. — В кн.: *Методы количественного определения органических веществ*. Краснодар, 1971, 23.
256. Krauss A. — *Z. anal. Chem.*, 1967, **229**, 343.
257. Пасхина Т. С. — *Усп. биол. химии*, 1950, **1**, 307.
258. Алексеенко Л. П. — В кн.: *Современные методы в биохимии*, т. 1. М., «Медицина», 1964, 129.
259. Moore S., Stein W. H. — *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 663.
260. Moore S., Stein W. H. — *J. Biol. Chem.*, 1954, **211**, 893.
261. Bender A. E., Palgrave J. A., Doell B. H. — *Analyst*, 1959, **84**, 526.
262. Moore S., Spackman D. H., Stein W. H. — *Anal. Chem.*, 1958, **30**, 1185.
263. Spackman D. H., Moore S., Stein W. H. — *Anal. Chem.*, 1958, **30**, 1190.
264. Rosen H., Berard C. W., Levenson S. M. — *Anal. Biochem.*, 1962, **4**, 213.
265. Bohley P. — *Naturwiss.*, 1962, **49**, 326.
266. Schwerdtfeger E. — *J. Chromatogr.*, 1962, **7**, 418.
267. Knight W. S. — *Anal. Biochem.*, 1968, **22**, 539.
268. Castillo F., Miller L. — *J. Chromatogr.*, 1971, **63**, 403.
269. Langner H. J., Heckel U. — *J. Chromatogr.*, 1969, **45**, 142.
270. Zacharius R. M., Talley E. A. — *Anal. Chem.*, 1962, **34**, 1551.
271. Elliot W. H. — *Biochim. biophys. acta*, 1958, **29**, 446.
272. Zacharius R. M., Talley E. A. — *J. Chromatogr.*, 1962, **7**, 51.
273. Schilling E. D., Burchill P. J., Clayton R. A. — *Anal. Biochem.*, 1963, **5**, 1.
274. Schilling E. D. et al. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1961, **5**, 217.
275. Adolf L. E. — *Arch. Pharm.*, 1961, **294**, 193.
276. Olson A. C., White L. M., Noma A. T. — *J. Chromatogr.*, 1969, **43**, 399.
277. Freimuth U., Trübsbach A. — *Nahrung*, 1968, **12**, 887.
278. Mardens Y., Van Sande M., Caers I. — *Anal. Lett.*, 1971, **4**, 285.
279. Hamilton P. B. — In: *Advances in chromatography*, vol. 2. New York, M. Dekker, 1966, 4.
280. Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P. — *J. Biochem.*, 1944, **38**, 224.
281. Atkinson R. O., Stuart R. G., Stuckey R. E. — *Analyst*, 1950, **75**, 447.
282. Wellington E. F. — *Can. J. Chem.*, 1953, **31**, 484.
283. Pratt J. J., Auclair J. L. — *Science*, 1948, **108**, 213.
284. Bull H. B., Hahn I. W., Baptist V. H. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 550.
285. Acher R., Fromageot C., Jutisz M. — *Biochim. biophys. acta*, 1950, **5**, 81.
286. Thompson J. F., Zacharius R. M., Steward F. C. — *Plant Physiol.*, 1951, **26**, 375.
287. Thompson J. F., Steward F. C. — *Plant Physiol.*, 1951, **26**, 421.
288. Пасхина Т. С. — *Труды комиссии по аналит. химии*, 1955, **6** (9), 389.
289. Пасхина Т. С. — *Биохимия*, 1954, **19**, 702.

290. Giri K. V., Krishnamurthy K., Venkatasubramanian T. A. — *Current Sci. (India)*, 1952, **21**, 44.
291. Auclair I. L., Dubreuil R. — *Can. J. Zool.* 1952, **30**, 109.
292. Kalyankar G. D., Snell E. E. — *Nature*, 1957, **180**, 1069.
293. Arx E. V., Neher R. — *J. Chromatogr.*, 1963, **12**, 329.
294. Giri K. V., Radhakrishnan A. N., Vaidyanathan C. S. — *J. Ind. Inst. Sci.*, 1953, **35A**, 145.
295. Barbiroli G. — *Mikrochim. ichnoanal. acta*, 1965, 652.
296. Neuzil E., Breton J. C., Plagnol H. — *Bull. mém. École nat. méd. pharm. Dakar*, 1954, **6**, 169; *C. A.*, 1961, **55**, 1462.
297. Kaneda M., Tominaga N. — *Kogoshima Daigaku Rigakubu Kiyo*, 1968, **1**, 59; *C. A.*, 1970, **72**, 90841.
298. Barrolier J. — *Naturwiss.*, 1955, **42**, 416.
299. Хабас И. М., Элькин С. Б. — *Бюлл. эксп. биол. мед.*, 1955, **40**, 7, 79.
300. Stäbchen-Kirchner H. — *Z. physiol. Chem.*, 1968, **349**, 1049.
301. Heilmann J., Barrolier J., Watzke E. — *Z. physiol. Chem.*, 1958, **309**, 219.
302. Moffat E. D., Lytle R. — *Anal. Chem.*, 1959, **31**, 926.
303. Matheson A. T., Tigane E., Haner C. S. — *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1961, **39**, 417.
304. Przybylska J., Kociatkowski Z., Wiewiorowski M. — *Rocz. nauk. roln.*, 1958, **79A**, 1.
305. Borkowski T., Madecka-Borkowska I. — *Chemia analit.*, 1959, 1—2, 119.
306. Stefl M., Tulach J., Sovová A. — *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1960, **25**, 435.
307. Moore S. — *J. Biol. Chem.*, 1968, **243**, 6281.
308. Knaut T. — *J. Chromatogr.*, 1964, **13**, 560.
309. Bode F. — *Biochem. Z.*, 1955, **326**, 433.
310. Kolor M. G., Roberts H. R. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **70**, 620.
311. Circo R., Freeman B. O. — *Anal. Chem.*, 1963, **35**, 272.
312. Wachter H. et al. — *J. Chromatogr.*, 1969, **44**, 651.
313. Tyihak E., Vagryfalvi D. — *J. Chromatogr.*, 1970, **49**, 343.
314. Хроматография на бумаге. Под ред. И. М. Хайса, К. М. Мацека. М., ИЛ, 1962.
315. Филипович Ю. Б. — *Изв. высш. учебн. зав. СССР, Химия и хим. технол.*, 1959, **2**, 1, 20.
316. Филипович Ю. Б. — *ЖАХ*, 1960, **15**, 374.
317. Kofranyi E. — *Z. physiol. Chemie*, 1955, **299**, 129.
318. Opienska-Blauth J., Kowalska H., Pietrusiewicz M. — *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Sect. D. Medicina*, 1956, **11**, 175.
319. Saifer A., Oreskes J. — *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 501.
320. Names L., Szurkos A. — *Revista med.*, 1959, **5**, 441; *C. A.*, 1960, **54**, 7437.
321. Reifer J., Buraczewska L. — *Acta biochim. polon.*, 1959, **6**, 219.
322. Pasieka A. E., Morgan J. F. — *Biochim. biophys. acta*, 1956, **19**, 366.
323. Lipton R., Price T. D., Melicow M. M. — *J. Chromatogr.*, 1967, **26**, 412.
324. Subrahmanian N., Rao M. V. L. — *J. Sci. Ind. Res.*, 1955, **14B**, 566.
325. Clarkson T. W. — *Biochim. biophys. acta*, 1955, **18**, 453.
326. Roberts H. R., Kolor M. G. — *Nature*, 1958, **182**, 1602.
327. Work E. — *Biochem. J.*, 1957, **67**, 416.
328. Ressler C., Ratzkin H. — *J. Org. Chem.*, 1961, **26**, 3356.

329. Nakahara M. et al. — Sapporo Igaku Zasshi, 1963, 24, 418; C. A., 1965, 63, 4647.
330. Goshima F., Yokoyma K. — Bunseki Kagaku, 1969, 18, 1493; C. A., 1970, 72, 97223.
331. Davies R. L. — J. Chromatogr., 1972, 71, 564.
332. Андреева Т. Ф., Осипова О. П. — В кн.: Методика количественной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот у растений. М., Изд-во АН СССР, 1962, 59.
333. Бензингер Э. Н. — Труды комиссии по аналит. химии, 1955, 6 (9), 467.
334. Peterson J. — J. Chromatogr., 1968, 38, 301.
335. Methods of biochemical analysis, vol. XIII. Ed. D. Glick. New York, Interscience Publ., 1965.
336. Хроматография в тонких слоях. Под ред. Э. Шталая. М., «Мир», 1965, 404.
337. Krauss K. J., Reinbothe H. — Biochem. Physiol. Pflanz., 1970, 161, 577.
338. Hecht E. — Clin. chim. acta, 1966, 13, 506.
339. Izard C. — C. r., 1960, 250, 3906.
340. Slobodian E., Mechanic G., Levy M. — Science, 1962, 135, 441.
341. Moszczynski P., Wilska-Jeszka J. — Chem. anal. (Warszawa), 1971, 16, 1071; C. A., 1972, 76, 98043.
342. Yamagishi M. — J. Pharm. Soc. Japan, 1954, 74, 1001.
343. Yanagi S. — J. Biol. Chem., 1956, 220, 683.
344. Сторожук П. Т. — В кн.: Сб. научн. работ Волгоградского гос. мед. ин-та, 1969, 22, 318.
345. Cristol P., Benezech C., Paulet A. — Bull. Soc. chim. France, 1955, 183; C. A., 1955, 49, 12553.
346. Cristol O., Paulet A., Cristol P. — Bull. Soc. chim. biol., 1956, 38, 639; C. A., 1956, 50, 15621.
347. Gilmour D., Calaby J. H. — Austral. J. Sci. Res., 1949, 2B, 216.
348. Yamashita T., Uchio H., Izumiya N. — Nippon Kagaku Zasshi, 1959, 80, 769; C. A., 1967, 55, 3459.
349. Кравченко А. А., Лапук В. X. — Лаб. дело, 1968, 1, 21.
350. Kaiser E. et al. — Anal. Biochem., 1970, 34, 595.
351. Faure F. — Bull. Soc. pharm. Bordeaux, 1959, 98, 187.
352. Weigele M. et al. — J. Am. Chem. Soc., 1972, 94, 4052.
353. Scheuner G., Gabler W. — Acta histochem., 1967, 26, 107.
354. Rappu G., Törk I. — Acta morph. Acad. sci. hung., 1963, 12, 43.
355. Ronwin E., Roach J. von, Tucker B. L. — Canad. J. Chem., 1968, 46, 3013.
356. Chambers J. R., Isbell A. F. — J. Org. Chem., 1964, 29, 832.
357. Warren S. G. — J. Chem. Soc., 1966C, 1349.
358. De Koning A. J. — Biochim. biophys. acta, 1966, 130, 521.
359. Roop W. E., Tan S. A., Roop B. L. — Anal. Biochem., 1971, 44, 77.
360. Roseau G., Pantel P. — J. Chromatogr., 1969, 49, 392.
361. Tauster O. — J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 491.
362. Stoffyn P. J. — J. Org. Chem., 1959, 24, 1360.
363. Крылова Р. Г., Рядовская С. Н., Голова О. П. — Высокомолекуляр. соед., 1950, 11B, 381.
364. Witt J., Holzer H. — Acta biol. med. germ., 1963, 11, 712.
365. Białou M., Kupryszewski G., Sokolowski J. — Zesz. nauk Wyzsza szkola ped. Gdansk, mat. fiz. chem., 1965 (1966), 5, 87; РЖХ, 1967, 5Г 235.
366. Kusuda F., Yoichi Y., Ogino A. — Bunseki Kagaku, 1969, 18, 1456; C. A., 1970, 72, 93362.
367. Островский Ю. М., Гвоздева М. А. — Бюлл. эксп. биол. и мед., 1959, 48, 1120.

368. Островский Ю. М., Гвоздева М. А. — Аптечное дело, 1960, 9, 2, 52.
369. Yamagishi M. — J. Pharm. Soc. Japan, 1954, 74, 599; C. A., 1954, 48, 10749.
370. Яворский Н. П. — Аптечное дело, 1965, 14, 48.
371. Wachsmuth H., Koesckhoven L. — J. pharm. Belg., 1963, 18, 273; C. A., 1964, 61, 6861.
372. Запутряев Б. А., Быкова К. Н., Нагорная Л. П. — Фармация, 1970, 19, 85.
373. Jones L. R., Riddick J. R. — *Analyt. Chem.*, 1954, 26, 1035.
374. Rosenthaler R. — *Pharm. acta. helv.*, 1961, 36, 602.
375. Zacharius R. M., Porter W. L. — *J. Chromatogr.*, 1967, 30, 190.
376. Dulong de Roshay C., Dupont C. M. — *C. r. Soc. biol.*, 1952, 146, 1741.
377. Waidyasekera P. L. D. — *Sci. Cult. (Calcutta)*, 1964, 30, 463; C. A., 1965, 62, 4369.
378. Yasuda K. et al. — *Okajima's folia anat. japon.*, 1957, 30, 1; C. A., 1962, 56, 899.
379. Hornsey S., Hedges M. I., Bryant P. E. — *Int. J. Rad. Biol.*, 1968, 13, 581; C. A., 1968, 69, 57320.
380. Di Vita G., Marrian D. H. — *Rad. Prot. Sensitization, Proc. Int. Symp.*, 2nd, 1969, 225; C. A., 1971, 74, 28565.
381. William W. A. — *Rad. Prot. Sensitization, Proc. Int. Symp.*, 2nd, 1969, 155; C. A., 1971, 74, 20071.
382. Scott O. C. A., Sturrock J. E. — *Int. J. Rad. Biol.*, 1968, 13, 573; C. A., 1968, 69, 65012.
383. Foster I. L. — *Int. J. Rad. Biol.*, 1968, 13, 577; C. A., 1968, 69, 57308.
384. Tiffany B. D. et al. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 1682.
385. Sprössig M., Mücke H. — *Acta virol.*, 1963, 7, 472.
386. Whitehouse M. W., Ghosh P. B. — *Biochem. Pharmacol.*, 1968, 17, 158.
387. Griffiths M. — *Arch. Biochem.*, 1949, 20, 451; C. A., 1949, 43, 9124.
388. Bruns F. — *Naturwiss.*, 1954, 41, 360.
389. Bernheim F. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1968, 128, 1128; C. A., 1968, 69, 104136.
390. Morihara K., Monna K., Akabori S. — *Proc. Japan Acad.*, 1965, 41, 828.
391. Morihara K. — *J. Biochem.*, 1967, 62, 250.
392. Ruhemann S. — *J. Chem. Soc.*, 1912, 101, 780.
393. Moubasher R. — *J. Chem. Soc.*, 1950, 2243.
394. Ваняг Г., Стунда И. — *Изв. АН ЛатвССР*, 1960, 3, 77.
395. Осадчий С. А., Бархаш В. А. — *ЖОрХ*, 1970, 6, 1815.
396. Meier R., Lotter H. G. — *Chem. Ber.*, 1957, 90, 222.
397. Errera G. — *Gazz. chim. ital.*, 1913, 43, I, 583.
398. Errera G. — *Gazz. chim. ital.*, 1914, 44, II, 18.
399. Errera G., Sorges F. — *Gazz. chim. ital.*, 1913, 43 II, 625.
400. Errera G., Ajon G. — *Gazz. chim. ital.*, 1914, 44 II, 92.
401. Calderaro E. — *Gazz. chim. ital.*, 1914, 44 II, 389.
402. Moubasher R. — *J. Biol. Chem.*, 1948, 175, 187.
403. Said A., Fleita D. H. — *Chemist-Analyst*, 1963, 52, 79.
404. Moubasher R., Awad W. J. — *J. Chem. Soc.*, 1949, 1137.
405. Eistert B., Gauster O., Ried W. — *Lieb. Ann.*, 1969, 723, 188.
406. Kappe T., Lender E., Ziegler E. — *Monatsh. Chem.*, 1968, 99, 990.
407. Kappe T., Lender E., Ziegler E. — *Monatsh. Chem.*, 1968, 99, 2157.
408. Ried W., Mehrotra M. L. — *Lieb. Ann.*, 1968, 718, 120.

409. Regitz M., Adolph H. G. — *Lieb. Ann.*, 1969, **723**, 47.  
410. Moubasher R., Mustafa A. — *J. Chem. Soc.*, 1947, **130**.  
411. Eistert B., Eifler W., Gauster O. — *Chem. Ber.*, 1969, **102**, 1988.  
412. Schönberg A., Mamluk M. — *Chem. Ber.*, 1972, **105**, 1562.  
413. Wittmann H. A. et al. — *Monatsh. Chem.*, 1970, **101**, 380.  
414. Pallazzo S., Tometta B. — *Ann. chim.*, 1958, **48**, 924; *C. A.*, 1959, **53**, 8090.  
415. Schönberg A., Moubasher R., Mustafa A. M. — *J. Chem. Soc.*, 1948, **176**.  
416. Moubasher R., Awad W. I. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **179**, 915.  
417. Moubasher R., Sina A. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **180**, 681.  
418. Moubasher R. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1950, **184**, 693.  
419. Bremner J. M., Salomon M. — *Analyt. Biochem.*, 1966, **16**, 179.  
420. Wittmann H., Müller A. K., Ziegler E. — *Monatsh. Chem.*, 1969, **100**, 497.  
421. Moubasher R. — *J. Biol. Chem.*, 1948, **176**, 529.  
422. El Ridi M. S., Moubasher R., Hassan Z. F. — *Biochem. J.*, 1951, **49**, 246.  
423. Calderaro E. — *Gazz. chim. ital.*, 1915, **45** II, 131.  
424. Calderaro E. — *Gazz. chim. ital.*, 1916, **46** I, 261.  
425. Moubasher R., Sina A. — *J. Chem. Soc.*, 1950, **1422**.  
426. Wöhler F., Liebig J. — *Lieb. Ann.*, 1838, **26**, 241.  
427. Хартмэн Б., Шеппард О. — В кн.: Синт. орг. преп., 3. М., ИЛ, 1959, 2.  
428. Холмгрэн А., Уэннер В. — В кн.: Синт. орг. преп., 4. М., ИЛ, 1953, 20.  
429. Спир Дж., Дабович Т. — В кн.: Синт. орг. преп., 3. М., ИЛ, 1952, 12.  
430. Brückmann G., Isaacs S. D. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 390.  
431. Ziegler E., Kappe T. — *Monatsh. Chem.*, 1964, **95**, 1057.  
432. Biltz H. — *Chem. Ber.*, 1912, **45**, 3659.  
433. Bolton W. — *Acta cryst.*, 1964, **17**, 147.  
434. Singh Ch. — *Acta cryst.*, 1965, **19**, 759.  
435. Kwart H., Sarasohn I. M. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 909.  
436. Fisher F. R. — *Diss. Abstr.*, 1953, **13**, 667.  
437. Nightingale D. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1937, **59**, 806.  
438. Winslow N. M. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 2089.  
439. Moubasher R., Othman A. M. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 2667.  
440. Singh C. — *Acta cryst.*, 1965, **19**, 767.  
441. Biilmann E., Bentzon I. — *Chem. Ber.*, 1918, **51**, 522.  
442. Tipson R. S., Cretcher L. H. — *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1951, **40**, 399.  
443. Biltz H., Damm P. — *Chem. Ber.*, 1913, **46**, 3662.  
444. Möhlau R. — *Chem. Ber.*, 1904, **37**, 2686.  
445. Möhlau R., Litter H. — *J. prakt. Chem.*, 1906 (2), **73**, 449.  
446. Beilstein F. — *Lieb. Ann.*, 1858, **107**, 176.  
447. Hartley W. N. — *J. Chem. Soc.*, 1905, **87**, 1791.  
448. Davidson D. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1936, **58**, 1821.  
449. Kuhn R., Lyman J. C. — *Chem. Ber.*, 1936, **69**, 1547.  
450. Davidson E., Epstein E. — *J. Org. Chem.*, 1936, **1**, 305.  
451. Gutzeit G. — *Helv. chim. acta*, 1929, **12**, 716.  
452. Andreasch R. — *Monatsh. Chem.*, 1900, **21**, 286.  
453. Ramirez F., Bhatia S. B., Smith C. P. — *J. Org. Chem.*, 1966, **31**, 4105.  
454. Biltz H., Kramer E. — *Lieb. Ann.*, 1924, **436**, 154.

455. Eistert V., Donath P. — Chem. Ber., 1969, **102**, 1725.  
456. Ванаг Г. Я., Пелчер Ю. Э. — ДАН, 1961, **140**, 815.  
457. Пелчер Ю. Э., Ванаг Г. Я. — Изв. АН ЛатвССР, сер. хим., 1964, **1**, 45.  
458. Пелчер Ю. Э., Ванаг Г. Я. — Изв. АН ЛатвССР, сер. хим., 1967, **2**, 189.  
459. Кульберг Л. — ЖОХ, 1947, **17**, 1089.  
460. Saxena M. C., Bhattacharya A. K. — Z. anorg., allgem. Chem., 1962, **315**, 114.  
461. Welcher F. J. Organic Analytical Reagents, vol. 1. New York, Van Nostrand.  
462. Hurlley W. H., Wootton W. O. — J. Chem. Soc., 1911, **99**, 288.  
463. Traube W. — Chem. Ber., 1911, **44**, 3145.  
464. Wieland H., Bergel F. — Lieb. Ann., 1924, **439**, 196.  
465. Lieben F., Edel E. — Biochem. Z., 1932, **244**, 403.  
466. Copley G. N. — Analyst, 1941, **66**, 492; C. A., 1942, **36**, 1266.  
467. Березовский В. М., Еременко Т. В. — Успехи химии, 1963, **32**, 671.  
468. Clark-Lewis J. W., Singh R. P. — J. Chem. Soc., 1962, 3162.  
469. Clark-Lewis J. W. et al. — Austral. J. Chem., 1964, **17**, 877.  
470. Clark-Lewis J. W., Edgar J. A. — J. Chem. Soc., 1965, 551.  
471. Clark-Lewis J. W., Edgar J. A. — J. Chem. Soc., 1965, 5556.  
472. Clark-Lewis J. W. — Chem. Ind., 1966, 241.  
473. Clark-Lewis J. W., Moody K. — Austral. J. Chem., 1970, **23**, 323.  
474. Clark-Lewis J. W., Moody K. — Austral. J. Chem., 1970, **23**, 1229.  
475. Clark-Lewis J. W., Moody K., Thompson M. J. — Austral. J. Chem., 1970, **23**, 1249.  
476. Grobon P. — Rev. pathol. gén., physiol. clin., 1957, **57**, 893; C. A., 1957, **51**, 13193.  
477. Франц пар., М 3743 (1966); C. A., 1967, **66**, 79594.  
478. Doolittle D. P., Watson J. — Int. J. Rad. Biol., 1966, **11**, 389; C. A., 1967, **66**, 52797.  
479. Weinstein L., Te-Wen Chang, Hudson J. B. — Antibiotics Chemother., 1957, **7**, 443; C. A., 1958, **52**, 4834.  
480. Younathan E. S., Stone J. E., Harris T. S. — J. Biol. Chem., 1964, **239**, 290.  
481. Kaufmann H. P., Viswanathan C. V. — Fette, Seifen, Anstrichmittel, 1965, **67**, 563; C. A., 1966, **64**, 1060.  
482. Patterson J. W., Lazarow A., Lively S. — J. Biol. Chem., 1949, **177**, 197.  
483. Tipson R. S., Cretcher L. H. — J. Am. Pharm. Assoc., 1951, **40**, 440.  
484. Nath M. C., Bhattachary E. P. M. — Nature, 1955, **176**, 787.  
485. Said A., Fleita D. H. — Chemist-Analyst, 1963, **52**, 109.  
486. Tipson R. S., Cretcher L. H. — Anal. Chem., 1950, **22**, 822.  
487. Nedjelko B., Felber J. P. — Anal. Biochem., 1969, **29**, 91.  
488. Запугряев Б. А., Феодосеев А. В., Тимофеева А. И. — Фармация, 1967, **16**, 40.  
489. Biltz V. — Chem. Ber., 1910, **43**, 1620.  
490. Biltz V., Struff K. — Lieb. Ann., 1914, **404**, 131.  
491. Akabori S., Narita K., Fujii Y., Ishii J. — J. Biochem., 1961, **50**, 424.  
492. Rüstow B., Hock A. — Pharmazie, 1969, **24**, 453.  
493. Bredereck H., Pfeiderer W. — Chem. Ber., 1954, **87**, 1119.  
494. Kekule A. — Chem. Ber., 1869, **2**, 748.  
495. Baeyer A., Oekonomider S. — Chem. Ber., 1882, **15**, 2093.  
496. Davis R. — Tetrahedron Lett., 1966, 5021.

497. Арбузов А. Е., Бастанова М. Ш. — Изв. АН СССР, отд. хим. наук, 1952, 2, 459.
498. Шоригин Д. Н. — Журн. физ. хим., 1955, 29, 1033.
499. O'Sullivan D. G., Sadler P. W. — J. Chem. Soc., 1956, 2202.
500. O'Sullivan D. G., Sadler P. W. — J. Chem. Soc., 1958, 1217.
501. Sadler P. W., Mix H., Krause H. W. — J. Chem. Soc., 1959, 667.
502. Kurosaki K. — Nippon Kagaku Zasshi, 1961, 82, 1555; C. A., 1963, 58, 12088.
503. Goldschmit G. H., Llewellyn F. J. — Acta cryst., 1950, 3, 234.
504. Schönberg A., Schütz O. — Chem. Ber., 1927, 60, 2344.
505. Baeyer A., Knop C. A. — Lieb. Ann., 1866, 140, 1.
506. Erdmann O. L. — J. prakt. Chem., 1841 (1), 24, 1.
507. Heller G. — Chem. Ber., 1904, 37, 938.
508. Stolle R., Mекle M. — J. prakt. Chem., 1934 (2), 139, 329.
509. Baeyer A. — Chem. Ber., 1868, 1, 17.
510. Baeyer A. — Chem. Ber., 1879, 12, 1309.
511. Plancher G., Bonavia A. — Gazz. chim. ital., 1902, 32 II, 414; Chem. Z., 1903 I, 838.
512. Marschalk Ch. — Chem. Ber., 1912, 45, 582.
513. Gabriel S. — Chem. Ber., 1883, 16, 517.
514. Baeyer A., Conistock W. — Chem. Ber., 1883, 16, 1705.
515. Fischer E. — Chem. Ber., 1887, 17, 572.
516. Marchlewski L. — Chem. Ber., 1896, 29, 1030.
517. Kohn M. — Monatsh. Chem., 1910, 31, 747.
518. Kohn M., Ostersetzer A. — Monatsh. Chem., 1911, 32, 905.
519. Myers F. L., Lindwall H. G. — J. Am. Chem. Soc., 1938, 60, 2153.
520. Mustafa A., Sidky M. M., Soliman F. M. — Tetrahedron, 1966, 22, 393.
521. Baeyer A., Laza M. J. — Chem. Ber., 1885, 18, 2637.
522. Liebermann C., Danaila N. V. — Chem. Ber., 1907, 40, 3588.
523. Inagaki S. — J. Pharm. Soc. Japan, 1933, 53, 133; Chem. Z., 1933 II, 2133.
524. Candea C. — Bull. Sect. sci. Acad. roum., 1922/1923, 8, 31; Chem. Z., 1923, III, 218.
525. Danaila N. V., Candea C. — Bull. Acad. roum., 1915/1916, 4, 334; Chem. Z., 1916 II, 490.
526. Pfitzinger W. — J. prakt. Chem., 1886 (2), 33, 100; Chem. Z., 1886, 308.
527. Sumpter W. C. — Chem. Rev., 1944, 34, 393.
528. Borsche W., Jacobs W. — Chem. Ber., 1914, 47, 354.
529. Lindwall H. G., Hill A. J. — J. Am. Chem. Soc., 1935, 57, 735.
530. Conn W. R., Lindwall H. G. — J. Am. Chem. Soc., 1936, 58, 1236.
531. Crawford R. B., Lindwall H. G. — J. Am. Chem. Soc., 1940, 62, 171.
532. Grassmann W., Arnim K. — Lieb. Ann., 1936, 522, 66.
533. Borsche W. — Chem. Ber., 1936, 69, 1376.
534. Ballantine J. A., Johnson A. W., Katner A. S. — J. Chem. Soc., 1964, 3323.
535. Johnson A. W., Katner A. S. — J. Chem. Soc., 1965, 1455.
536. Meyer W. — Chem. Ber., 1882, 15, 2893.
537. Meyer W. — Chem. Ber., 1883, 16, 1465.
538. Heller G. — Z. angew. Chem., 1924, 37, 1017; Chem. Z., 1925, I, 1077.
539. Schlenk W., Blum O. — Lieb. Ann., 1923, 433, 95.
540. Steinkopf W., Hanske W. — Lieb. Ann., 1939, 541, 238.
541. Isobe T., Akiyoshi O. — J. Chem. Soc. Japan, Ind. Chem. Sect., 1953, 56, 817; C. A., 1954, 48, 13548.
542. Steinkopf W., Wilhelm H. — Lieb. Ann., 1941, 546, 211.

543. Laurent A. — J. prakt. Chem., 1842 (2), 25, 450.  
544. Reißert A., Hopmann H. — Chem. Ber., 1924, 57, 972.  
545. Jacini G. — Gazz. chim. ital., 1947, 77, 295; C. A., 1948, 42, 2960.  
546. Campuano S., Giammanco L. — Gazz. chim. ital., 1956, 86, 126; C. A., 1957, 51, 1207.  
547. Haslinger C. — Chem. Ber., 1907, 40, 3398.  
548. Pummerer R., Göttler M. — Chem. Ber., 1910, 43, 1376.  
549. Binz A., Heuter R. — Chem. Ber., 1915, 48, 1038.  
550. Angyal S. I. et al. — J. Chem. Soc., 1949, 2704.  
551. Langenbeck W. — Chem. Ber., 1927, 60, 930.  
552. Giovannini E., Portmann P. — Helv. chim. acta, 1948, 31, 1361.  
553. Langenbeck W. — Chem. Ber., 1928, 61, 942.  
554. Kohn M., Ostersetz A. — Monatsh. Chem., 1916, 37, 25.  
555. Bergmann E. D. — J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 1549.  
556. Johnson A. W., McCaldin D. J. — J. Chem. Soc., 1957, 3470.  
557. McCaldin D. J. — Canad. J. Chem., 1960, 38, 1229.  
558. Hudson C. B., Robertson A. V. — Tetrahedron Lett., 1967, 4015.  
559. Brouwer W. G. et al. — J. Chem. Soc. Perkin Transact. I, 1972, 124.  
560. Popp F. D. — J. Heterocyclic Chem., 1969, 6, 125.  
561. Akahoshi M. — J. Pharm. Soc. Japan, 1951, 71, 710; C. A., 1952, 46, 2047.  
562. Baker B. R. et al. — J. Org. Chem., 1952, 17, 149.  
563. Noland W. E., Rush K. R. — J. Org. Chem., 1964, 29, 947.  
564. Somasekhara S. et al. — Current Sci., 1965, 34, 508.  
565. Mangini A., Passerini R. — Boll. Sci. fac. chim. ind. Bologna, 1951, 9, 51; CA, 1952, 46, 351.  
566. Langenbeck W., Weschky L., Gödde O. — Chem. Ber., 1937, 70, 672.  
567. Mix H., Krause H. W. — Chem. Ber., 1956, 89, 2630.  
568. Mix H., Krause H. W., Reihsig J. — J. prakt. Chem., 1958, 6, 174.  
569. Giovanni E. et al. — Helv. chim. acta, 1957, 40, 249.  
570. Cassebaum H., Liedel K. — J. prakt. Chem., 1960, 12, 91.  
571. Hudson C. B., Robertson A. V. — Austral. J. Chem., 1967, 20, 1521.  
572. Voctor F. N. — Anal. Biochem., 1971, 43, 66.  
573. Saifer A., Oreskes I. — Science, 1954, 119, 124.  
574. Smith I. — Nature, 1953, 171, 43.  
575. McKee H. S., Urbach G. E. — Austral. J. Biol. Sci., 1953, 6, 369.  
576. Noworytko J., Sarnecka-Keller I. M. — Acta biochim. polon., 1955, 2, 91.  
577. Бояркин А. Н. — Физиология растений, 1956, 3, 381.  
578. Бояркин А. Н. — Физиология растений, 1958, 5, 382.  
579. Морозова Р. П. — Укр. біохім. журн., 1965, 37, 290.  
580. Pasieka A. E., Morgan J. J. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 93, 54.  
581. Shih V. E., Madigan P. M. — Clin. chim. acta, 1969, 24, 481.  
582. Miller G. — J. prakt. Chem., 1957 (4), 4, 179.  
583. Reimann H., Jaret R. — Chem. Ind., 1967, 2173.  
584. Пат. ФРГ, 1013459 (1957); C. A., 1960, 40, 705.  
585. Galston A. W., Chen H. R. — Plant Physiol., 1965, 40, 705.  
586. Chen H. R., Galston A. W., Milstone L. — Plant Physiol., 1966, 41, 1485.  
587. Kutacek M., Galston A. W. — Plant Physiol., 1968, 43, 1793.  
588. Sadler P. W. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1965, 130, 71.  
589. Natting L. A., Weber E. M., Tryon J. L. — J. Virol., 1967, 1, 650.

590. Sy M., Maillet M., Pages I. — Chem. ther., 1970, 5, 216.
591. Alexandrescu M. et al. — Rev. roum. inframicrobiol., 1969, 6, 219; C. A., 1970, 73, 11669.
592. Venditti J. M., Kline I., Goldin A. — Cancer Res., Suppl. 1964, 24, pt 2, 827; C. A., 1964, 61, 11208.
593. Popp F. D. — J. Med. Chem., 1969, 12, 182.
594. Wiley R. H., Irick G. — J. Org. Chem., 1959, 24, 1925.
595. Susheela I. et al. — Enzymologia, 1969, 37, 325.
596. Abderhalden E. — Z. Vitamin-, Hormon-, Fermentforsch., 1941, 1, 241; C. A., 1948, 42, 7441.
597. Herrmann E. C., Rosselet I. P. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, 104, 304.
598. Reid L. — J. Chromatogr., 1960, 4, 458.
599. Sen S. P., Leopold A. C. — Physiol. plant., 1954, 7, 98.
600. Goldstein D., Liebergott E. — Mikrochim. acta, 1962, 352.
601. Feigl F., Goldstein D. — Talanta, 1960, 4, 209.
602. Kappe T., Ziegler E. — Monatsh. Chem., 1964, 95, 415.
603. Wittmann H. — Monatsh. Chem., 1964, 95, 1198.
604. Wittmann H. — Monatsh. Chem., 1965, 96, 523.
605. Ziegler E., Kappe T. — Monatsh. Chem., 1964, 95, 59.
606. Wittmann H., Dreveny W., Ziegler E. — Monatsh. Chem., 1968, 99, 1205.
607. Wittmann H., Dreveny W., Ziegler E. — Monatsh. Chem., 1968, 99, 1543.
608. Ваняг Г., Ваняг Э. — ДАН, 1953, 90, 59.
609. Эглите Г. К., Ошкая В. П. — Изв. АН ЛатвССР, сер. хим., 1968, 3, 345.
610. Эглите Г. К., Ошкая В. П. — Изв. АН ЛатвССР, сер. хим., 1971, 2, 160.
611. Hunter A. — J. Biol. Chem., 1952, 196, 589.
612. Bramberger E. — Lieb. Ann., 1893, 273, 267.
613. Сафронов А. П. Авт. свид. № 131962. — Бюлл. изобр., 1960, 18.
614. Neuzil E., Masseyeff R. — Bull. Soc. pharm. Bordeaux, 1961, 100, 33.
615. Эглите Г. К., Ошкая В. П. — Изв. АН ЛатвССР, сер. хим., 1972, 5, 605.
616. Чема Г. Я., Ротберг Ю. Т., Ошкая В. П. — Изв. АН ЛатвССР, сер. хим., 1968, 3, 328.
617. Ошкая В. П., Эглите Г. К., Кронтале Б. В. — ЖОрХ, 1968, 4, 338.
618. Ошкая В. П., Страутиня В. К. — Изв. АН ЛатвССР, сер. хим., 1971, 4, 425.
619. Shome S. C. — Anal. chim. acta, 1949, 3, 679.
620. Файгель Ф. Капельный анализ органических веществ. М., Госхимиздат, 1962, 505, 588.
621. Taylor M. E. — Diss. Abstr., 1960, 21, 1353.
622. Leermakers P. A., Hoffman W. A. — J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 5663.
623. Singh R. P. — J. Ind. Chem. Soc., 1960, 37, 442.
624. Дроздов Н. С., Крылов В. П. — ДАН, 1960, 135, 1135.
625. Singh R. P. — J. Ind. Chem. Soc., 1959, 36, 57.
626. Chawla R. S., Singh R. — Mikrochim. acta, 1970, 332.
627. Bhargava P. N., Veerabhadriah N., Satyanarayana B. — J. Ind. Chem. Soc., 1957, 34, 889.
628. Sullivan D. G., Sadler P. W. — J. Org. Chem., 1957, 22, 283.
629. Novorka V., Sykora V., Vorišek J. — Chim. anal., 1947, 29, 268.

630. Pallad R. — *Chim. anal.*, 1951, **33**, 239.
631. Divis L., — *Sb. Vys. šk. chemicko-technol. Praze. Anal. chem.*, 1968, **3**, 85; C. A., 1970, **73**, 10333.
632. Larsen J., Witt N. F., Pøe Ch. F. — *Mikrochem. ver. Mikrochim. acta*, 1948, **34**, 1.
633. Губен-Вейль. Методы органической химии, т. 2, 4-е изд. М., Госхимиздат, 1963, 650.
634. Ванаг Г. Я. — *ЖОХ*, 1947, **17**, 2080.
635. Ванаг Г. Я., Мацканова М. А. — *ЖАХ*, 1947, **3**, 21.
636. Romanowski H., Andrzejewska J. — *Farm. Polska*, 1963, **19**, 8, 154.
637. Ванаг Г., Ванаг Э. — *ЖАХ*, 1955, **10**, 63.
638. Ванаг Г. Я., Мацканова М. А. — *ЖАХ*, 1957, **12**, 149.
639. Ванаг Г., Мацканова М. — *Изв. АН ЛатвССР*, 1954, **10**, 143.
640. Ванаг Г. Нитроиндандион. Рига, Изд.-во АН ЛатвССР, 1954.
641. Циклические  $\beta$ -дикетоны. Под ред. Г. Ванага. Рига, Изд-во АН ЛатвССР, 1961.
642. Карнишаускайте Г. А., Бернштейн В. Н. — *Аптечное дело*, 1965, **14**, 6, 42.
643. Карнишаускайте Г. А., Бернштейн В. Н. — *Аптечное дело*, 1966, **15**, 4, 39.
644. Эглите Г. К., Ошкая В. П. — *Изв. АН ЛатвССР, сер. хим.*, 1971, **2**, 179.
645. Мацканова М. — В кн.: Циклические  $\beta$ -дикетоны. Рига, Изд-во АН ЛатвССР, 1961, 93.
646. Plein E. M., Dewey B. T. — *Ind. Eng. Chem.*, 1943, **15**, 534.
647. Larsen J., Pøe Ch. F., Witt N. J. — *Mikrochemver. mikrochim. acta*, 1949, **34**, 351.
648. Байер К. Анализ органических соединений, 2-е изд. М., ИЛ, 1953, 142.
649. Жагат Р., Страдынь Я., Гринвалде А., Ванаг Г. — *ДАН*, 1960, **135**, 77.
650. Жагат Р., Ванаг Г. — *Изв. АН ЛатвССР*, 1961, **6**, 65.
651. Liebermann C. — *Chem. Ber.*, 1897, **30**, 3137.
652. Wislicenus W., Schneck H. — *Chem. Ber.*, 1916, **50**, 189.
653. Wapag G. — *Z. anal. Chem.*, 1938, **113**, 21.
654. Wapag G. — *Z. anal. Chem.*, 1940, **119**, 413.
655. Wapag G. — *Z. anal. Chem.*, 1941, **122**, 119.
656. Singewald A. — *Z. anal. Chem.*, 1958, **164**, 219.
657. Wapag G. — *Z. anal. Chem.*, 1942, **123**, 292.
658. Жагат Р. А., Ванаг Г. Я. — *Изв. АН ЛатвССР, сер. хим.*, 1961, **2**, 175.
659. Жагат Р. А., Ванаг Г. Я. — *Изв. АН ЛатвССР, сер. хим.*, 1962, **1**, 35.
660. Ванаг Г., Жагат Р. — *Изв. АН ЛатвССР*, 1960, **5**, 77.
661. Ванаг Г. Я., Жагат Р. А. — *ДАН*, 1960, **133**, 362.
662. Frodyma M. M., Frei R. W. — *J. Chromatogr.*, 1965, **17**, 131.
663. Frodyma M. M., Frei R. W. — *J. Chromatogr.*, 1964, **15**, 501.
664. Першин Т. Н. и др. — *Хим.-фарм. журн.*, 1970, **4**, 56.
665. Aleksiev V., Milošev B. — *Monatsh. Chem.*, 1969, **100**, 2024.
666. Tatiadi A. J., Irbell H. S., Sager W. F. — *J. Res. Nat. Bur. Stand.*, 1963, **67A**, 153; C. A., 1963, **58**, 12450.
667. West R. et al. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 6204.
668. Yamada K., Nizuno N., Hirata Y. — *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1958, **31**, 543.
669. Prebendowski S. — *Roczn. chem.*, 1957, **31**, 329.
670. Shoppe C. W. — *J. Chem. Soc.*, 1936, 269.
671. Llaser A. J. — *Mikrochim. acta*, 1955, 921.
672. Mukherji A. K., Dey A. K. — *Chim. anal.*, 1957, **39**, 148.

673. Al-Mahdi A. A. K., Schoenfeld T. — *Mikrochim. acta*, 1962, 254.  
674. Feigl F., Gentil V. — *Mikrochim. acta*, 1954, 435.  
675. Peacherer B., Jumpolsky L. M., Wuest H. M. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, 70, 2587.  
676. Alder K. et al. — *Lieb. Ann.*, 1955, 593, 23.  
677. Cohen S., Lacher J. R., Park J. D. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 81, 3480.  
678. Toi K. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 3455.  
679. Toi K. et al. — *J. Biol. Chem.*, 1967, 242, 1036.  
680. Anzai K. — *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1969, 42, 3314.  
681. Simon H. et al. — *Chem. Ber.*, 1965, 98, 3692.  
682. Riemschneider R., Weygand C. — *Monatsh. Chem.*, 1955, 86, 201.  
683. Riemschneider R., Claus P. — *Monatsh. Chem.*, 1962, 93, 844.K.  
684. Митико К. — *Bunseki Kagaku*, 1967, 16, 669; *РжХ*, 1968, 17Г185.

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- $\alpha$ -Аланин 35, 87, 123, 136  
 $\beta$ -Аланин 78, 141  
Аллоксан 36, 104, 108  
Аллоксантин 36, 104, 108  
 $\alpha$ -Аминокислоты 35, 96, 108, 123, 131, 137, 142  
 $\beta$ -Аминокислоты 35, 61, 76, 97  
 $\gamma$ -Аминокислоты 36, 61  
 $\delta$ -Аминокислоты 36, 61  
 $\alpha$ -Аминомасляная кислота 36, 123  
 $\beta$ -Аминомасляная кислота 61, 110  
Аминосоединения 82, 146  
Аспарагин 136  
Аспарагиновая кислота 35, 96, 102  
2-Ацилиндандионы-1,3 12
- Барбитуровая кислота 104, 138, 140, 144  
4,5-Бензидантрион-1,2,3 89  
5,6-Бензидантрион-1,2,3 89  
Биндон 139, 146  
2-Бром-2-нитроиндандион-1,3 12, 145  
реакция на триптофан 145
- Валин 35, 96, 102, 123, 149  
Виолуровая кислота 111, 140, 144
- 2-Галоген-2-нитроиндандионы-1,3 12, 88, 145  
Гидразиды аминокислот 70, 113  
Гидразинокарбоновые кислоты 79  
Гидриндантин 31, 74, 92  
 $\alpha$ -Гидриндон 10, 18  
 $\beta$ -Гидриндон 11, 18  
Гистидин 136, 138, 141  
Глицин 39, 68, 141  
Глютамин 37, 136  
Глютаминовая кислота 35, 97
- 3,4-Дегидропролин 68  
Дегградация аминокислот по Штреккеру 45, 86, 129  
2-Диазоиндандион-1,3 14, 91, 93
- Диалкилфосфиты 23, 118  
Диалуровая кислота 106, 108  
 $\beta$ -Дикетоны 87, 91, 139, 143  
Диметилаллоксан 112  
Диметилсульфоксид 14  
4,5-Диметоксииндантрион-1,2,3 88  
Диоксиндол 117
- Изатид 116, 124  
Изатин 115  
восстановление 116  
конденсация 117  
применение в хроматографическом анализе 128  
реакции с аминосоединениями 121  
с активными метиленовыми группами 118  
Изолейцин 96, 102, 123  
Имазатин 122  
Индандион-1,2 10, 17  
Индандион-1,3 11, 14, 138  
Индандионы-1,3, замещенные в бензольном кольце 138  
Индантриол-1,2,3 20  
Индантрион-1,2,3 10, 16, 20  
Индофениновая реакция 121
- Лейцин 35, 96, 102, 123, 149  
Лизин 68, 76, 78, 141
- 5,6-Метилendioкситрикетогидринден 86  
Мурексид 37, 106  
Мурексидная реакция 108  
аминов 108  
аминокислот 108  
аммиака 106
- Нингидрин  
биологическая активность 85  
восстановление 19  
производные 17

- расщепление 18, 34  
реакции Дильса—Алдера 25  
  конденсации 24  
  образования аддуктов 25  
  образования гетероциклов 57, 70  
  окисления 19  
присоединения 21, 23  
синтез 10  
физические свойства 16  
электронные спектры 17
- Нингидриновая реакция 9  
  амидов кислот 70  
  аминоалкилфосфоновых кислот 60  
  аминов 49, 78  
  аминокислот 37, 59, 72  
  аммака 37, 49, 73, 88  
  безазотистых соединений 83  
  гидразинокарбоновых кислот 79  
  иминокислот 65  
  индолов 53  
  механизм 35, 41  
  побочные реакции 63  
  применение в колориметрическом анализе 73  
  в хроматографическом анализе 75  
  в электрофоретическом анализе 76
- Нингидриновые реактивы 74
- Нингидрины, замещенные в бензольном кольце 86, 88
- 2-Нитрозоиндандион-1,3 140
- 2-Нитроиндандион-1,3 12, 136, 144
- 2-Нитроперинафтиндантрионы-1,2,3 100
- 2-Оксииндандион-1,3 19, 34, 39
- Оксилизин 68, 113
- Оксипролин 65, 113, 125, 130, 145
- N-Оксифталонимид 135, 136
- Пептиды 39, 72, 78, 108
- Перинафтиндантрион-1,2,3 90
- Пролин 65, 125, 130, 145
- Пурпур Руэмана 37, 41
- Реактив Гриньяра 20
- Серин 96, 141, 149
- Сложные эфиры аминокислот 36, 70, 97
- 4,5,6,7-Тетрафториндантрион-1,2,3 88
- Тирозин 35, 76, 149
- Треонин 14
- Триалкилфосфиты 23, 118
- Трикетогидринден *см.* Нингидрин
- Триптофан 35, 65, 76, 141, 145
- Урамил 107, 110
- $\beta$ -Фенил- $\alpha$ -аланин 35, 141
- $\beta$ -Фенил- $\beta$ -аланин 35
- Хинизатин 130  
  N-замещенные производные 130  
  конденсированные системы 132  
  применение в хроматографическом анализе 130
- Цистеин 35, 61, 111, 136, 149
- Цистин 76

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие . . . . .	5
<b>Глава I. Химия нингидрина и нингидриновая реакция</b>	
Общие сведения . . . . .	7
Образование и получение нингидрина . . . . .	10
Физико-химические свойства индантриона-1,2,3 и его гидрата	16
Производные карбонильных групп нингидрина и другие кетоны индана . . . . .	17
Расщепление, окисление и восстановление нингидрина . . . . .	18
Реакции индантриона-1,2,3 с реактивом Гриньяра, diaзосоединениями, серо- и фосфорсодержащими соединениями . . . . .	20
Реакции конденсации нингидрина . . . . .	24
Гидриндантин и родственные ему структуры . . . . .	31
Открытие нингидриновой реакции и первый этап выяснения ее механизма . . . . .	35
2-[Индандион-1',3'-илиден-(2')]аминоиндандион-1,3, или пурпур Руэмана . . . . .	38
Развитие представлений о механизме нингидриновой реакции	41
Нингидриновая реакция аммиака и аминов . . . . .	49
Нингидриновые реакции аминокислот и их производных . . . . .	59
Нингидрин в анализе аминокислот и пептидов . . . . .	72
Реакции нингидрина с аналогами аминокислот, производными аминов и безазотистыми соединениями . . . . .	79
Биологическая активность нингидрина . . . . .	85
<b>Глава II. Производные и аналоги нингидрина</b>	
Замещенные в бензольном кольце нингидрины . . . . .	86
Перинафтиндантрион-1,2,3 и его гидрат . . . . .	90
Нитроперинафтиндантрионы-1,2,3 и их гидраты . . . . .	100
<b>Глава III. Аллоксан и его производные</b>	
Мурексидная реакция, аллоксан и его производные . . . . .	104
Практическое использование мурексидной реакции и аллоксана . . . . .	108
Диметилаллоксан и другие замещенные аллоксаны . . . . .	112

**Глава IV. Изатин и его реакции с аминосоединениями**

Изатин и его реакции . . . . .	115
Реакции изатина с аминосоединениями . . . . .	121
Практическое использование изатинов . . . . .	128

**Глава V. Хинизатин и его производные**

Хинизатины . . . . .	130
N-Оксифталонимид . . . . .	135

**Глава VI. Производные и аналоги индандиона-1,3**

Индандион-1,3 и замещенные индандионы-1,3 . . . . .	138
2-Нитрозоиндандион-1,3 . . . . .	140
2-Нитроиндандион-1,3 . . . . .	144
Биндон . . . . .	146
Заключение . . . . .	150
Литература . . . . .	153
Предметный указатель . . . . .	171

Валдис Петрович Ошкая  
НИНГИДРИНОВЫЕ РЕАКЦИИ

Обложка *А. Остапенко*

Редактор *Н. Дундина*. Художественный редактор  
*Г. Крутой*. Технический редактор *Э. Поча*. Кор-  
ректор *Ю. Афремович*.

Сдано в набор 28 июня 1973 г. Подписано к печати  
23 января 1974 г. Типогр. бумага № 1. Формат  
60×90<sup>1/16</sup>. 11 физ. печ. л.; 11 усл. печ. л.; 10,25 уч.-  
изд. л. Тираж 1000 экз. ЯТ 18017. Цена 78 коп. Из-  
дательство «Зинатне», Рига, ул. Тургенева, 19. От-  
печатано в типографии «Циня» Государственного  
комитета Совета Министров Латвийской ССР по  
делам издательств, полиграфии и книжной тор-  
говли, г. Рига, ул. Блаумана, 38/40. Заказ № 2054-Д.