

CHROM. 4680

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER AMINE ALS β -AMINOVINYL-*o*-HYDROXYPHENYLKETONE

KRZYSZTOF KOSTKA

Institut für Organische Chemie der Medizinischen Akademie, Łódź (Polen)

(Eingegangen am 13. Februar 1970)

SUMMARY

*Thin-layer chromatography of amine derivatives in the form of β -aminovinyl *o*-hydroxyphenyl ketones*

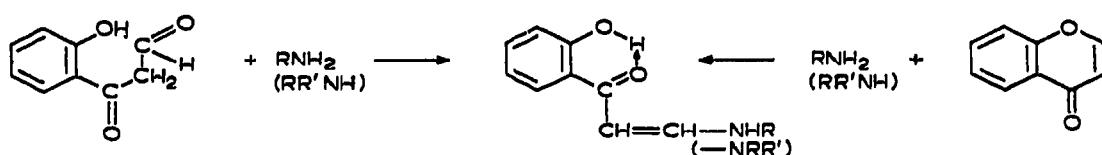
Thin-layer chromatographic separation and identification of amines and amino compounds containing other functional groups in the form of enamine derivatives (β -aminovinyl *o*-hydroxyphenyl ketones) is described. Optimal separation is obtained on Kieselgel G using the following developing solvent systems: (1) ethyl acetate-benzene (1:5), (2) chloroform-xylene (8:2), (3) acetone-xylene (1:9). The difference in spot coloration in UV light of the aliphatic (willow-green) and aromatic (orange) enamines enables, together with R_F values, a quick identification of the compounds investigated. The sensitivity of the method is 0.1–1 μ g. This new analytical procedure is highly specific and of general use. It also represents a valuable complementary method to the previously described general method of identification of amines in the form of crystalline derivatives with ω -formyl-*o*-hydroxyacetophenone or chromone and to the thin-layer and paper chromatography of amines in which ω -formyl-*o*-hydroxyacetophenone was used as a detecting reagent.

EINLEITUNG

Die Dünnsschichtchromatographie (DC) der Amine wurde in der Form von folgenden Gruppen von Derivaten durchgeführt: Sulfonamide^{1–4}, N-substituierte 2,4-Dinitroaniline^{5,6}, 3,5-Dinitrobenzamide^{3,7,8} und π Komplexe mit nitro- und chloraromatischen Verbindungen^{9,10}. Die DC-Trennungen von Benzamid- und Acetyl-Derivaten^{1,3,11,12} wurden nur an einigen Beispielen beschrieben.

Von den vielen Amin-Reagenzien finden, in der chromatographischen und präparativen Identifikation, nur wenige eine gleichzeitige Anwendung^{1–3,5,7,8}.

Die primären und sekundären aliphatischen und aromatischen Amine und Verbindungen, welche noch andere funktionelle Gruppen enthalten, reagieren sehr leicht mit guter Ausbeute mit ω -Formyl-*o*-hydroxyacetophenon oder mit Benzo- γ -pyron und bilden Enamin-Derivate, nämlich β -Aminovinyl-*o*-hydroxyphenylketone¹³.



Die Reaktionsgeschwindigkeit der Enamin-Bildung ist sehr gross. Die Verbindungen sind zitronengelb oder orangegelb und zeigen eine sehr starke Fluoreszenz im UV-Licht. Die Reaktion hat einen allgemeinen Verlauf und wurde zur präparativen Identifizierung der Amine angewandt¹⁴. In einer früheren Mitteilung haben wir das ω -Formyl- α -hydroxyacetophenon als ein neues Aminreagens auch in der Papier- und Dünnschichtchromatographie beschrieben¹⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Anwendung der β -Aminovinyl- α -hydroxyphenylketone (Enamine) in der DC zur Identifizierung der aliphatischen und aromatischen Amine und Verbindungen, die ausser der Amingruppe noch andere funktionelle Gruppen enthalten, untersucht. Neben der Ermittlung der optimalen Trennbedingungen (Fliessmittelzusammensetzung, Aktivierung, Kammersättigung) wurde die Nachweisgrenze auch Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Geräte und Materialien

Glasplatten in der Grösse 20×20 cm wurden mit einem Streichgerät der Fa. Camag in einer Dicke von 0.3 mm auf die übliche Art und Weise beschichtet. Als Sorptionsmittel wurde Kieselgel D-5 der Fa. Camag verwendet. Die gestrichenen Platten wurden einen Tag lang an der Luft getrocknet. Die aktivierten Kieselgel-Platten wurden durch Erwärmen während 1 h bei 110° hergestellt.

Alle Lösungsmittel wurden destilliert und die Enamin-Derivate kristallisiert. Xylol (p.a.) wurde als eine Mischung von *o*-, *m*- und *p*-Isomeren benutzt (Sdp. 138.0–142.0°).

Es wurden Enamin-Lösungen in bestimmter Konzentration vorbereitet: 0.05 g Enamin wurde je nach Löslichkeit in 5 ml Äthanol oder 5 ml Aceton gelöst. Von den 1%-igen Stammlösungen wurden aufeinanderfolgend 0.1%-ige (0.5 ml 1%-ige Lösung + 4.5 ml Äthanol) und 0.05%-ige (0.5 ml 0.1%-ige Lösung + 4.5 ml Äthanol) äthanolische Enamin-Lösungen angefertigt. Die Enamin-Derivate der β -Naphthylamin und ρ -Aminobenzofenon wurden in Chloroform, dagegen die Enamine der Piperazin und ρ -Aminobenzoësäure in Dimethylformamid (DMF) gelöst. Die Löslichkeit der Enamine wurde in der Tabelle I vermerkt.

Die Enamin-Lösungen wurden mit einer Mikropipette TL-705 der Fa. Camag auf die Startpunkte der Platten aufgetragen. Die durchschnittliche Grösse der Flecken auf den Kieselgel-Schichten der aufgetragenen Enamine betrug 3–4 mm.

Die Entwicklungskammern waren mit Filtrerpapier ausgekleidet.

Die Lokalisierung der Enamine auf den entwickelten Platten erfolgte durch Betrachten der Platten unter einer Analysen-Stablampe Pl 335–360 μm (Original Hanau) oder einer Quarzlampe Q-400 (ZWAE).

Bestimmung der Nachweisgrenze von Enaminen auf den DC-Platten ohne Entwicklung

Die Enamine wurden in Mengen von 1 μg (1 μl 0.1%-iger Lösung), 0.5 μg (5 μl

0.01%-iger Lösung), 0.2 µg (2 µl 0.01%-iger Lösung), 0.1 µg (1 µl 0.01%-iger Lösung) und 0.05 µg (0.5 µl 0.01%-iger Lösung) auf die Kieselgel-Schichten aufgetragen. Die Platten wurden an der Luft kurz getrocknet und gleich im UV-Licht betrachtet.

Entwicklung der Chromatogramme

Die Enamin-Lösungen in bestimmter Konzentration wurden mit einer Mikropipette quantitativ auf die Startpunkte der Platten, 20 mm von der Kante entfernt aufgetragen. Auf einer Platte wurden 12 Enamin-Derivate einzeln und ihre Mischung, von einem Startpunkt, chromatographiert. Von den mehreren untersuchten Fliessmitteln erwiesen sich die folgenden als besonders geeignet: (1) Äthylacetat-Benzol (1:5), (2) Chloroform-Xylol (8:2) und (3) Aceton-Xylol (1:9).

Für eine Trennung (Laufstrecke 17 cm) wurde in der Regel 1 h benötigt. Nach dem Entwickeln wurden die Platten an der Luft kurz getrocknet und gleich im UV-Licht betrachtet.

Die Messungen der R_F -Werte und die Trennung der Mischungen wurden für alle Enamine in der gleichen Temperatur zweimal auf den unaktivierten und zweimal auf den aktivierten Platten (1 h, Temp. 110°) in drei Fliessmitteln durchgeführt.

ERGEBNISSE

Für 54 Enamine (β -Aminovinyl-*o*-hydroxyphenylketone) wurden die kleinsten Substanzmengen festgelegt, die auf Chromatogrammen, ohne dass diese entwickelt wurden, eine deutliche Fluoreszenz des Fleckes im UV-Licht geben. Auf dieser Grundlage wurde die Brauchbarkeit des angewandten Verfahrens zur Identifizierung sowohl der primären und sekundären Amine als auch der noch andere funktionelle Gruppen enthaltenden Verbindungen nachgewiesen.

Nach dem Auftragen von 0.1 µg Enamin auf die Platten wurde für 46 Amine eine gute Sichtbarkeit festgestellt. Morpholin-, Piperazin-, Benzyl- und *n*-Amylamin-Enamine geben bei Verwendung von 0.2 µg fluoreszierende Flecken, die p -Anisidin- und N-Methylanilin-Derivate wurden dagegen erst in einer Menge von 0.5 µg sichtbar. β -Naphthylamin- und p -Nitroanilin-Enamine geben nach dem Auftragen von 0.6 µg deutlich sichtbare Flecken. Die kleinsten Mengen der auf die Platten aufgetragenen Enamine, welche ohne Entwicklung im UV-Licht noch gut sichtbar sind, wurden in der Tabelle I angegeben (Nachweisgrenze).

Im Verlauf weiterer Untersuchungen wurden die Empfindlichkeit der Methode und die R_F -Werte für die untersuchten Enamine mit den folgenden drei entwickelnden Lösungsmittelgemischen festgestellt: (1) Äthylacetat-Benzol (1:5), (2) Chloroform-Xylol (8:2) und (3) Aceton-Xylol (1:9). Die beste Differenzierung der R_F -Werte wurde bei den Laufmitteln 1 und 3 erzielt.

Die Reproduzierbarkeit der R_F -Werte ist gut. Die Abweichungen in den Versuchen waren nicht grösser als 0.02 der R_F -Werte. Es wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung der Platten und die aufgetragenen Mengen der Enamine auf die R_F -Werte keinen Einfluss ausüben. Bei der Entwicklung der Chromatogramme ist jedoch sorgfältig auf die stabile Temperatur zu achten. Die in der Tabelle I angegebenen R_F -Werte in den drei Laufmitteln stellen einen Durchschnittswert aus vier Einzeltrennungen dar.

TABELLE I

DC DER AMIN-DERIVATE (β -AMINOVINYL-O-HYDROXYPHENYLKETONE) AUF KIESELGEL D-5-SCHICHTEN

Fließmittel. (1) Äthylacetat-Benzol (1:5), (2) Chloroform-Xylo (8:2), (3) Aceton-Xylo (1:9).

Nr.	Amin	R _F -Werte im Fließmittel			Nachweisgrenze vor dem Entwickeln (μg)	Nachweisgrenze nach dem Entwickeln (μg)	Löslichkeit ^a	
		1	2	3				
1	Äthylamin	0.35	0.20	0.38	0.1	0.5	1.0	A
2	n-Propylamin	0.44	0.23	0.47	0.1	1.0	0.5	1.0
3	Isopropylamin	0.43	0.29	0.47	0.1	1.0	1.0	1.0
4	n-Butylamin	0.44	0.25	0.49	0.1	1.0	0.5	0.2
5	Isobutylamin	0.50	0.31	0.52	0.1	0.5	0.5	1.0
6	n-Amylamin	0.53	0.28	0.55	0.2	4.0	4.0	3.0
7	n-Hexylamin	0.54	0.30	0.56	0.1	1.0	0.5	1.0
8	Cyclohexylamin	0.58	0.36	0.55	0.1	1.0	0.5	1.0
9	Benzylamin	0.54	0.29	0.50	0.2	1.0	0.5	1.0
10	Äthanolamin	0.04	0.00	0.02	0.1	0.5	0.5	0.2
11	1-Aminopropanol-2	0.06	0.00	0.07	0.1	1.0	0.5	0.2
12	Allylamin	0.43	0.26	0.44	0.1	0.5	0.5	0.5
13	Dimethylamin	0.14	0.07	0.18	0.1	0.5	0.2	0.2
14	Diäthylamin	0.23	0.11	0.29	0.1	0.2	0.2	0.5
15	Di-n-propylamin	0.36	0.12	0.40	0.1	0.2	0.2	0.5
16	Diisopropylamin	0.29	0.09	0.35	0.1	0.2	0.1	0.1
17	Di-n-butylamin	0.50	0.16	0.49	0.1	0.1	0.1	0.1
18	Diisobutylamin	0.49	0.16	0.47	0.1	0.2	0.2	0.2
19	Diäthanolamin	0.00	0.00	0.00	0.1	0.1	0.1	0.1
20	N-Methylbenzylamin	0.41	0.17	0.37	0.1	0.2	0.2	0.2
21	Pyrrolidin	0.21	0.07	0.24	0.1	0.2	0.2	A
22	Piperidin	0.30	0.10	0.32	0.1	0.5	0.2	0.5
23	Piperazin	0.16	0.15	0.15	0.2	1.0	0.5	1.0
24	Morpholin	0.10	0.03	0.14	0.2	0.5	0.5	0.5
25	Ephedrin	0.10	0.00	0.11	0.1	0.2	0.2	0.1
26	Anilin	0.64	0.54	0.63	0.1	1.0	1.0	1.0
27	o-Toluidin	0.64	0.73	0.69	0.1	1.0	1.0	1.0
28	m-Toluidin	0.63	0.75	0.68	0.1	1.0	1.0	1.0
29	p-Toluidin	0.67	0.55	0.64	0.1	1.0	1.0	1.0
30	o-Chloranilin	0.60	0.66	0.58	0.1	0.5	0.5	0.2
31	m-Chloranilin	0.63	0.63	0.65	0.1	1.0	1.0	1.0
32	p-Chloranilin	0.66	0.64	0.65	0.1	0.5	1.0	0.2
33	o-Bromanilin	0.58	0.61	0.60	0.1	1.0	1.0	1.0
34	m-Nitroanilin	0.57	0.41	0.54	0.1	1.0	1.0	1.0
35	p-Nitroanilin	0.56	0.33	0.53	0.6	4.0	4.0	4.0
36	m-Aminophenol	0.30	0.06	0.22	0.1	0.5	0.5	0.5
37	m-Aminoacetophenon	0.43	0.25	0.43	0.1	1.0	1.0	1.0
38	p-Aminobenzophenon	0.58	0.25	0.51	0.1	1.0	1.0	1.0
39	p-Anisidin	0.56	0.47	0.54	0.5	1.0	1.0	1.0
40	Phenetidin	0.65	0.71	0.66	0.1	1.0	1.0	1.0
41	2,5-Dimethoxyanilin	0.57	0.40	0.54	0.1	1.0	1.0	1.0
42	Anästhesin	0.57	0.37	0.53	0.1	1.0	1.0	1.0
43	2-Aminopyridin	0.49	0.30	0.55	0.1	1.0	1.0	1.0
44	3-Aminopyridin	0.55	0.32	0.54	0.1	1.0	1.0	1.0
45	2-Amino-3-methylpyridin	0.53	0.37	0.59	0.1	0.5	0.5	0.2
46	2-Amino-4-methylpyridin	0.50	0.27	0.56	0.1	1.0	1.0	0.2
47	2,6-Diaminopyridin	0.30	0.12	0.27	0.1	1.0	1.0	0.2
48	m-Phenyldiamin	0.58	0.36	0.53	0.1	0.5	0.5	0.2
49	α -Naphthylamin	0.66	0.64	0.64	0.1	1.0	1.0	1.0
50	β -Naphthylamin	0.65	0.62	0.64	0.6	2.0	2.0	2.0
51	p-Aminobenzosäure	0.17	0.11	0.17	0.1	1.0	1.0	0.5
52	p-Aminophenylsäure	0.05	0.00	0.03	0.1	0.2	0.2	0.2
53	N-Methylanilin	0.51	0.25	0.48	0.5	1.0	0.5	0.5
54	Äthylanilin	0.52	0.21	0.43	0.1	1.0	1.0	1.0

^a 1%ige Lösungen wurden in Aceton (A), Chloroform (Ch) oder Dimethylformamid (DMF) vorbereitet.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die auf den Platten vor der Entwicklung im UV-Licht gut sichtbaren Enaminmengen auf den entwickelten Chromatogrammen unzureichend sichtbar waren. Aus diesem Grunde wurden die geprüften Enamine auf die Chromatogramme in grösseren Mengen aufgetragen. Es wurde festgestellt, dass 0.1 bis 1 μg Enamin auf entwickelten Chromatogrammen im UV-Licht genügend deutlich fluoreszierende Flecken bilden. Für manche Amine erwies sich die Anwendung von 1 μg Derivat noch unzureichend.

Im Verlauf der Untersuchungen beobachtete man auf den Chromatogrammen verschiedene, von der Menge der aufgetragenen Substanz und der Art der entwickelnden Lösungsmittel unabhängige Fluoreszenz der Enamine. Enamine der primären und sekundären aliphatischen und heterocyclischen Amine sind im UV-Licht als blassgrüne, die der primären und sekundären aromatischen Amine als orangefarbige Flecken sichtbar. Der deutliche Unterschied der Fleckenfärbung im UV-Licht der Derivate aliphatischer und aromatischer Amine ermöglicht eine sofortige Differenzierung dieser beiden Aminklassen.

SCHLUSSFOLGERUNGEN UND DISKUSSION

Der Dünnschichtchromatographievorgang der Enamine (β -Aminovinyl- ω -hydroxyphenylketone), die in der Reaktion von Aminen mit ω -Formyl- ω -hydroxyacetophenon oder Benzo- γ -pyron entstehen, wurde untersucht.

Die DC der Enamine wurde nach der üblichen Methodik durchgeführt. Auf den mit Kieselgel bedeckten Platten wurden die R_F -Werte der 54 Enamine in drei Lösungsmittelgemischen festgelegt. Die Flecken der aliphatischen und heterocyclischen Enamin-Derivate weisen im UV-Licht blassgrüne Färbung auf, während die Enamine der aromatischen Amine orangefarbig fluoreszieren. Die verschiedene Färbung der Flecken kann, neben den R_F -Werten, als zusätzlicher wertvoller Faktor, der die Identifizierung der Amine in Gestalt ihrer Derivate erleichtert, ausgenutzt werden.

Die Nachweisgrenze vor der Entwicklung der Chromatogramme liegt zwischen 0.1–0.6 μg je Enamin Derivat pro Flecken, nach der Entwicklung der Chromatogramme ist sie kleiner und beträgt 0.1–1 μg Enamin ($2 \cdot 10^{-4} \mu\text{Mol}$ – $1 \cdot 10^{-3} \mu\text{Mol}$ Amin/Fleck).

Die Empfindlichkeit der von uns angewandten Methode der chromatographischen Identifizierung der Amine als β -Aminovinyl- ω -hydroxyphenylketone übertrifft andere bisher übliche Methoden zur Identifizierung von Aminen in Gestalt der Derivate^{2,9}. Von den wenigen Veröffentlichungen, deren Verfasser die kleinsten Mengen von Amin-Derivaten angeben, sind es lediglich SEILER UND WIECHMANN¹, die die biogene Amine in Form ihrer 1-Dimethylaminonaphthalen-5-sulfonyl- (DANS-) Derivate in einer Menge von $10^{-4} \mu\text{Mol}$ und in manchen Fällen sogar $5 \cdot 10^{-6} \mu\text{Mol}$ im Fleck identifizieren. Dieses Verfahren ist aber schwer durchführbar und die verwendete DANS-Cl-Verbindung ist ein unspezifisches Reagenz—es bildet Derivate nicht nur mit Aminen sondern auch mit Alkoholen und anderen Verbindungen.

SCHWARZ *et al.*⁸, die die niedrigeren aliphatischen Amine identifizieren, tragen die 2,4-Dinitroaminophenyl-Derivate in einer Menge von $10^{-3} \mu\text{Mol}$ auf Chromatogramme auf. Die Empfindlichkeit der Auftrennung von ausschliesslich aromatischen Aminen in Gestalt von p -Toluolsulfonamiden² ist zweimal kleiner.

Die in dieser Arbeit beschriebene Anwendung der DC von Amin-Derivaten (β -Aminovinyl-*o*-hydroxyphenylketone), zur Identifizierung der primären und sekundären aliphatischen und aromatischen Amine und deren Derivate, der heterocyclischen und isocyclischen Amine und der Aminoverbindungen, die in ihrer Struktur noch andere funktionelle Gruppen enthalten, wurde am umfangreichen Versuchsmaterial durchgeführt. Das Verfahren ist spezifisch und hat für alle β -Aminovinyl-*o*-hydroxyphenylketone einen generellen Charakter. Es stellt eine wertvolle Vervollständigung der bereits beschriebenen allgemeinen Methode der präparativen Identifizierung von Aminen in Form der Enamine, die mit ω -Formyl-*o*-hydroxyacetophenon oder mit Chromon entstehen¹⁴, und der DC und PC Analyse, in der das ω -Formyl-*o*-hydroxyacetophenon als Anfärbereagens verwendet ist¹⁵.

DANK

Für das Interesse an dieser Arbeit und für wertvolle Anregungen bin ich Frau Prof. Dr. ZOFIA JERZMANOWSKA zu besonderem Dank verpflichtet.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die dünnenschichtchromatographische Auftrennung und Identifizierung der Amine und der Aminoverbindungen, die in ihrer Struktur noch andere funktionelle Gruppen enthalten, in Form der Enamin-Derivate (β -Aminovinyl-*o*-hydroxyphenylketone) beschrieben. Die besten Trennergebnisse erzielt man auf Kieselgelschichten mit folgenden Fliessmitteln: (1) Äthylacetat-Benzol (1:5), (2) Chloroform-Xylol (8:2) und (3) Aceton-Xylol (1:9). Der verschiedene Farnton der Flecken, im UV-Licht, der aliphatischen (blassgrün) und aromatischen (orange) Enamine ermöglicht, neben dem R_f -Wert, eine schnelle Identifikation der untersuchten Verbindungen. Die Nachweissgrenze liegt bei den meisten Enaminen zwischen 0.1-1 μ g pro Flecken. Die neue analytische Methode ist allgemein, hat einen spezifischen Charakter und bildet eine wertvolle Vervollständigung der schon früher von uns beschriebenen präparativen Identifikation der Amine mit ω -Formyl-*o*-hydroxyacetophenon oder Chromon und der dünnenschicht- und papierchromatographische Analyse der Amine, in der das ω -Formyl-*o*-hydroxyacetophenon als Anfärbereagens verwendet wird.

LITERATUR

- 1 N. SEILER UND M. WIECHMANN, *Experientia*, 21 (1965) 203; *J. Chromatog.*, 28 (1967) 351.
- 2 D. B. PARIHAR, S. P. SHARMA UND K. C. TEWARI, *J. Chromatog.*, 24 (1966) 443.
- 3 H. GERLACH UND H. J. SENF, *Pharm. Zentralhalle*, 105 (1966) 93.
- 4 A. JART UND A. J. BIGLER, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 255.
- 5 D. P. SCHWARZ, R. BREWINGTON UND O. W. PARKS, *Microchem. J.*, 8 (1964) 402.
- 6 S. HOLDER UND H. J. BREMER, *J. Chromatog.*, 25 (1966) 48.
- 7 K. TEICHERT, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 100 (1960) 283.
- 8 M. VEČERA UND J. GASPARIČ, in J. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, Vol. I, Fischer Verlag, Jena, 1958, S. 396.
- 9 D. B. PARIHAR, S. P. SHARMA UND K. K. VERMA, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 258.
- 10 D. B. PARIHAR, S. P. SHARMA UND K. K. VERMA, *J. Chromatog.*, 31 (1967) 120.
- 11 E. A. MISTRYUKOV, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 314.
- 12 H. GÄNSHIRT, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnenschichtchromatographie*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962, S. 316.
- 13 K. KOSTKA, *Roczniki Chem.*, 40 (1966) 1683.
- 14 K. KOSTKA, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 14 (1969) 1145.
- 15 K. KOSTKA, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 15 (1970) 517.