

CHROM. 7244

MIKROQUANTITATIVE BESTIMMUNG VON ALIPHATISCHEN AMINEN MIT 7-CHLOR-4-NITROBENZO-2-OXA-1,3-DIAZOL

H.-J. KLIMISCH und L. STADLER

Forschungsinstitut* der Cigarettenindustrie e.V., D 2 Hamburg 54 (B.R.D.)

(Eingegangen am 4. Oktober 1973)

SUMMARY

Microquantitative determination of aliphatic amines with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole

Fluorometric determination of microanalytical quantities of aliphatic amines with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole is described. Reaction conditions in a one-phase system, clean-up methods and column or thin-layer chromatographic separation procedures are investigated in order to know the potential of the reagent. For quantitative investigation, separation on polyamide sheets with subsequent *in situ* measurement by means of a Zeiss chromatogram spectrophotometer is particularly suitable. A linear calibration curve is obtained for quantities between 15 and 150 ng per spot. The high stability of the reaction products and the efficient reproducibility of the procedure justify recommendation of the reagent for the microanalytical determination of amines.

EINLEITUNG

Zur Bestimmung von Mikromengen primärer und sekundärer Amine hat das Dansylchlorid in letzter Zeit einige Bedeutung erlangt¹. Umfassende Untersuchungen haben aber auch Probleme dieser Methode deutlich gemacht. Eigenfluoreszenz des Dansylchlorids sowie der durch Hydrolyse gebildeten Sulfonsäure machen sich störend bemerkbar. Ausserdem kann es beim Arbeiten mit Reagenzüberschuss zu Seitenreaktionen des Dansylchlorids kommen. Dabei täuschen Reaktionsprodukte wie z.B. Dansyl-dimethylamin und Dansyl-methylamin ein Vorkommen dieser Amine vor¹. Hinzu kommt, dass Dansylchlorid nichtaminspezifisch ist, sondern auch mit aliphatischen und aromatischen Alkoholen fluoreszierende Derivate bildet. Das kürzlich eingeführte 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl)² zeigte beim Nachweis von Sulfonamiden³ und zentralstimulierenden Aminen⁴ bemerkenswerte Vorteile. Es fluoresziert selbst nicht, seine Umsetzungsprodukte liessen sich gut chromatographieren und zeigten Vorteile in der NMR- und Massenspektrometrie⁵. Ausserdem ist das Reagenz spezifisch für den Nachweis primärer und sekundärer Amine als Dansylchlorid, da es mit Phenolen, Thiolen und Anilinen keine fluoreszierenden Produkte bildet⁶. Es erschien daher interessant, sein Reaktionsverhalten gegenüber Aminen sowie die Eigenschaften dieser Aminderivate näher zu untersuchen.

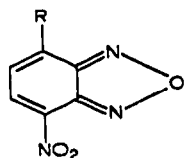
* Direktor: Prof. Dr. W. Dontenwill.

MATERIAL UND METHODEN

Reagenzien

NBD-Cl (Merck, Darmstadt, B.R.D.) wurde aus Methanol-Wasser umkristallisiert und anschliessend sublimiert. Es enthielt dann keine fluoreszierenden Verunreinigungen mehr. Schmelzpunkt: 96–96.5°.

TABELLE I
NBD-AMINE



R	Schmelzpunkt (°C)	% Gehalt **					
		C		H		N	
		a	b	a	b	a	b
	217–218	46.15	46.18	3.85	3.81	26.90	26.26
	134–135	—	—	—	—	—	—
	171–172	48.60	48.80	4.55	4.58	25.20	24.99
	85–86	52.85	53.01	5.60	5.65	22.40	22.13
	211–212	—	—	—	—	—	—
	166–167	53.22	53.40	4.84	4.94	22.58	22.29

* Diese Derivate wurden uns dankenswerterweise von Dr. G. Eisenbrand, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

** a = Theoretisch; b = gefunden.

Alle Amine wurden frisch destilliert, ebenso alle Lösungsmittel, die ausserdem noch über Säulen (Al_2O_3 , sauer, W-200; Woelm, Eschwege, B.R.D.) gereinigt wurden.

Synthese der NBD-Amine

Die in Tabelle I aufgeführten Derivate des NBD-Cl wurden analog einer von Reisch *et al.*⁵ veröffentlichten Vorschrift synthetisiert. Sie wurden dünnschichtchromatographisch (DC), massenspektrometrisch und durch Elementaranalysen auf Reinheit und Identität geprüft.

Analytische Reaktionsbedingungen

25–500 μl einer methanolischen Aminlösung (1–20 μg Amin) wurden in einem 1 bis 3 ml-Messkolben mit dem vier- bis achtfachen Äquivalent einer 0.05% methanolischen NBD-Cl-Lösung und 50–100 μl einer 0.1 M wässrigen NaHCO_3 -Lösung versetzt. Der Messkolben wurde sofort verschlossen und 1.5 Std. bei 55° im Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde bis zur Marke aufgefüllt.

Reinigungsmethoden

(i) Die Reaktionslösung wurde am Rotationsverdampfer unter Wasserstrahlvakuum eingengt, das Konzentrat in 10 ml Wasser aufgenommen und dreimal mit dem gleichen Volumen Essigsäureäthylester oder Methylenchlorid extrahiert. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat kann die Lösung des NBD-Amins entweder konzentriert oder gleich in Küvetten UV- oder fluoreszenz-spektroskopisch vermessen werden.

(ii) Die auf die Hälfte eingengte Reaktionslösung wurde auf eine Kieselgelsäule (1.25 \times 60 cm, Kieselgel 60, d_p = 10–40 μm ; Merck) aufgetragen und mit Cyclohexan–Essigester (1:1) eluiert. Nach einem nicht fluoreszierenden Vorlauf (NBD-Cl) wurde die fluoreszierende Fraktion des NBD-Amins aufgefangen. Die Elution war beendet, wenn kein fluoreszierendes Eluat mehr von der Säule tropfte. Man kann die Säule auch vorher mit NBD-Cl und dem zu messenden NBD-Amin eintesten und dann die entsprechenden Fraktionen gewinnen.

UV-spektroskopische Bestimmung

Die Extinktion der gereinigten NBD-Amin-Lösung wurde bei der Wellenlänge maximaler Absorption (Tabelle II) mit einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II (Zeiss, Oberkochen, B.R.D.) in einer 1 cm-Küvette vermessen und die quantitativen Werte aus einer Eichkurve bestimmt.

Fluoreszenz-spektroskopische Bestimmung

Die Fluoreszenzintensität der gereinigten NBD-Amin-Lösung wurde am Zeiss-Fluorometer mit zwei Monochromatoren bei einer Anregungswellenlänge von 464 nm gemessen. Die Fluoreszenz Messwellenlängen sind in Tabelle II angegeben. Der Anregungsspalt war 1.4 mm, der Messspalt 0.3 mm.

Dünnschichtchromatographische Trennung

An Kieselgelplatten. 5 μl der ungereinigten Reaktionslösung wurden mit einem Desaga Auftragegerät (Desaga, Heidelberg, B.R.D.) auf Kieselgel 60, 20 \times 20 cm

TABELLE II
MESSWELLENLÄNGEN DER NBD-AMINE IN ESSIGSÄUREÄTHYLESTER

<i>Substanz</i>	<i>UV-Maximum (nm)</i>	<i>Fluoreszenz- maximum (nm) *</i>
NBD-Dimethylamin	464–466	522
NBD-Diäthylamin	475	527
NBD-Methyläthylamin	470	524–525
NBD-Äthylpropylamin	472	526–527
NBD-Pyrrolidin	476	523
NBD-Piperidin	473	531

* Anregung: 464 nm.

TABELLE III
 R_F -WERTE DER NBD-AMINE AUF KIESELGELPLATTEN UND POLYAMIDFOLIEN

Kieselgel — Fliessmittel: I. Dimension, Cyclohexan–Essigsäureäthylester (1:1); II. Dimension, Petroläther–Chloroform–Äther–Eisessig (33:33:33:1). Polyamid-11 — Fliessmittel: Heptan–Essigsäureäthylester–*n*-Butanol (8:1:1).

<i>NBD-Amin</i>	<i>R_F-Werte</i>		
	<i>Kieselgel</i>		<i>Polyamid</i>
	<i>I. Dimension</i>	<i>II. Dimension</i>	
NBD-Dimethylamin	0.15	0.28	0.31
NBD-Methyläthylamin	0.23	0.38	0.44
NBD-Pyrrolidin	0.23	0.41	0.37
NBD-Diäthylamin	0.30	0.49	0.60
NBD-Piperidin	0.37	0.55	0.57
NBD-Äthylpropylamin	0.41	0.60	0.71

Platten (Merck) aufgetragen und in gesättigten N-Kammern entwickelt. Die Platte wurde zweimal mit Fliessmittel I in einer Dimension und zweimal mit Fliessmittel II unter 90° in dieser Dimension entwickelt. (Siehe Tabelle III.)

An Polyamid-11 Folien. Die Auftragung erfolgte wie oben beschrieben auf Polyamid-11 Folien (Macherey, Nagel & Co., Düren, B.R.D.). Die Folien wurden dreimal mit dem Fliessmittel Heptan–Essigsäureäthylester–*n*-Butanol (8:1:1) entwickelt. (Siehe Tabelle III.)

In situ fluorimetrische Messung auf Polyamid-11 Folien

Eine direkte *in situ* Vermessung der auf Polyamid-11 getrennten NBD-Amine wurde mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer (Zeiss) in Fluoreszenzordnung P-M vorgenommen. Eine Quecksilberdampfampe mit einem Zeiss M-436 Filter diente als Anregungsquelle. Bei einer Spaltbreite von 0.3 mm wurde der Emissionsmonochromator auf die jeweilige Wellenlänge maximaler Fluoreszenz eingestellt (NBD-Dimethylamin = 530 nm, NBD-Piperidin = 537 nm). Die quantitative Auswertung erfolgte über einen integrierenden Schreiber Vitatron UR 403 (Fig. 1).

Als Vergleichsstandard wurde das entsprechende NBD-Amin mitchromatographiert und vermessen. Eichkurven wurden mit verschiedenen Konzentrationen der chromatographierten NBD-Amine erstellt.

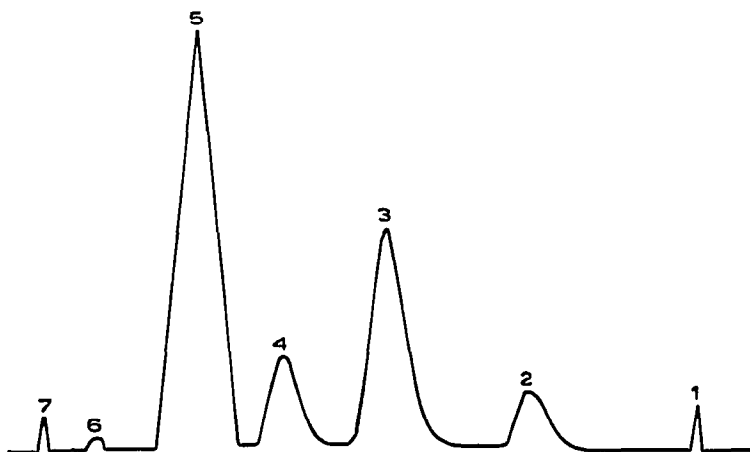


Fig. 1. Schreiberbild einer *in situ* analytischen Vermessung eines auf Polyamid-11 Folie getrennten derivatisierten Amingemisches. 1 = Peak des Auftragspunktes; 2 = NBD-Dimethylamin; 3 = NBD-Methyläthylamin; 4 = NBD-Piperidin; 5 = NBD-Äthylpropylamin; 6 = NBD-Cl; 7 = Peak der Fließmittelfront.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ein ideales Reagenz zur Analyse von Aminen sollte nach einer Zusammenstellung von Seiler¹ folgende Bedingungen weitmöglichst erfüllen:

(1) Schnelle quantitative Reaktionen unter milden Bedingungen in Wasser oder Wasser enthaltenden Reaktionsmedien.

(2) Spezifische Reaktion mit primären oder sekundären Aminogruppen ohne Seitenreaktionen.

(3) Der Reagenzüberschuss soll sich einfach von den Reaktionsprodukten trennen lassen.

(4) Hohe Nachweisempfindlichkeit der Reaktionsprodukte.

(5) Günstige chromatographische Trenneigenschaften der Reaktionsprodukte. Zwei weitere Eigenschaften erscheinen uns ausserdem wichtig:

(6) Günstige Stabilität der Reaktionsprodukte bei UV Bestrahlung in Lösung oder auf DC Platten.

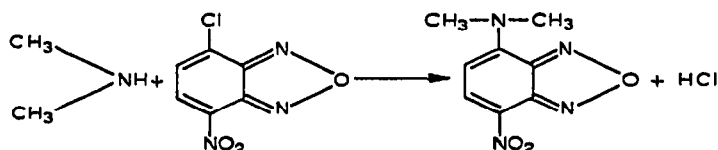
(7) Einheitliche Eigenschaften bei der Aufnahme von Massenspektren zur Identifizierung der Reaktionsprodukte.

Keines der bisher angewandten Aminreagenzien¹ erfüllt alle Bedingungen. Besonders eine Reaktion in wässrigen Medien, eine hohe Amin-Spezifität und Stabilität sind gleichzeitig bisher nicht zu erreichen gewesen.

Reaktionsbedingungen

Eingehende Untersuchungen mit NBD-Cl zeigten deutlich einige Vorteile dieses Reagenzes.

Da die Derivatisierung in rein wässrigen Medien nur sehr langsam verläuft, führten Lawrence und Frei⁶ diese Reaktion in einem Zweiphasengemisch Wasser-Methylisobutylketon durch.



Wir konnten diese Methode gut reproduzieren. Allerdings zeigten DC Untersuchungen der Reaktionslösung mehr Nebenprodukte als sie bei der Verwendung von Methanol in einem einphasischen Lösungsmittelgemisch auftraten. Die niedrige Reaktionstemperatur von 55° sowie die leichte Verdampfbarkeit des Lösungsmittels erwiesen sich ebenso als vorteilhaft. Bei einer Konzentration von etwa 0.025% NBD-Cl in der methanolisch wässrigen Reaktionslösung war nach 1.5-stündigem Erwärmen auf 55° die Reaktion quantitativ verlaufen. (Siehe Tabelle IV.) Zur Verkürzung der Reaktionszeiten kann die NBD-Cl Konzentration erhöht werden. Bei der beschriebenen Mikrobestimmung der Amine bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml erwies sich die geringe Reagenzkonzentration als günstig, wenn anschliessend ohne Reinigungsschritte eine direkte *in situ* Analyse der Derivate erfolgte.

TABELLE IV

DURCHSCHNITTliche AUSBEUTE AN NBD-R BEI VERSCHIEDENEN AMINKONZENTRATIONEN AUS FÜNF REAKTIONSANSETZEN

Amin- konzentration (µg/ml)	Ausbeute (%)	
	R = N(CH ₃) ₂	R = -N
20	95.5	96.2
15	94.7	96.3
10	97.1	94.4
5	94.8	92
1	95.8	86.8

Chromatographie und quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung der NBD-Amine kann colorimetrisch oder fluorimetrisch in Lösungsmitteln oder direkt als *in situ* Bestimmung auf DC-Platten durchgeführt werden.

Zur UV-spektroskopischen Bestimmung (Tabelle II) muss dazu der Reagenzüberschuss vollständig entfernt werden. Das geschieht am besten mit einer Kieselgelsäule. Da zwischen dem NBD-Cl und seinen Aminderivaten ein grosser Polaritätsunterschied besteht, ist die Trennung einfach. NBD-Cl kann im Vorlauf abgetrennt werden. Die Nachweisgrenze für das NBD-Dimethylamin bei der Verwendung von 1 cm-Küvetten liegt bei 0.3 µg/ml, entsprechend $1.5 \cdot 10^{-9}$ Mol Dimethylamin pro ml.

Bei einer fluorimetrischen Bestimmung lässt sich die Empfindlichkeit noch steigern. 10 ng/ml NBD-Dimethylamin lassen sich noch quantitativ auswerten. Da die Fluoreszenzanregung bei 464 nm erfolgt, ist die Verwendung von Quarzküvetten und UV-Anregungslicht nicht erforderlich (Tabelle II).

Es erwies sich auch hierbei als vorteilhaft, einen grossen Reagenzüberschuss vor der Vermessung zu entfernen, da sonst eine Verlagerung der Messwellenlängen eintrat. Da das NBD-Cl selbst nicht fluoresziert, genügt es, den grössten Teil des Reagenzüberschusses durch eine flüssig-flüssig-Verteilung in Wasser-Methylenchlorid oder Essigester zu entfernen.

Gemische von mehreren Aminderivaten müssen vor ihrer quantitativen Bestimmung aufgetrennt werden. Damit verbunden ist eine gleichzeitige Entfernung des Reagenzüberschusses. Die an einer Kieselgelplatte (Tabelle III) getrennten NBD-Amine lassen sich abkratzen und nach erfolgter Elution vermessen.

Für eine direkte fluorimetrische *in situ* Bestimmung mit einem Dünnschichtscanner haben sich Polyamid-11 Folien bewährt (Fig. 1). Im Vergleich zu Kieselgelplatten ist die Trennkraft des Systems grösser. Ausserdem ist die Fluoreszenzintensität gleicher Mengen auf den dünnen Polyamidfolien erheblich höher.

Für eine quantitative Bestimmung wurden bekannte Mengen der zu bestimmenden NBD-Amine als Standard mitchromatographiert. Jeder Fleck wurde fünfmal ausgemessen und die erhaltenen Integratorwerte gemittelt. Unter den angegebenen Messbedingungen erhielten wir zwischen 15 und 150 ng NBD-Dimethylamin pro Fleck eine lineare Eichkurve. Bei einer weniger empfindlichen Einstellung des Scanners lassen sich auch Werte bis 500 ng pro Fleck⁶ vermessen.

Stabilität

Die an Polyamid-11 Folien chromatographierten NBD-Amine waren unter den Lagerungsbedingungen Zimmertemperatur (21°) und Luftfeuchtigkeit (72% rel.) stabil. Nach vier Wochen zeigten sie noch die gleiche Fluoreszenzintensität. Bei UV Bestrahlung der Flecken mit einer Quecksilberdampflampe mit Monochromatorfilter M 436 sank die Fluoreszenzintensität nach 10 min um 3%, nach 20 min um 10%. Damit tritt auf Kieselgelplatten⁶ eine doppelt so schnelle Fluoreszenzabnahme als auf den Polyamidfolien ein.

Gemessen an den beschriebenen Anforderungen an ein ideales Aminreagenz werden viele der gestellten Bedingungen von NBD-Cl erfüllt. Besonders hervorzuheben sind dabei die grosse Stabilität des Reagenzes und der Umsetzungsprodukte gegenüber dem Einfluss von Wasser. Dies ermöglicht eine Umsetzung in wässrigen Reaktionsmedien bei sehr geringen Aminkonzentrationen unter milden Reaktionsbedingungen.

Die Spezifität des Reagenzes zur Bestimmung primärer und sekundärer aliphatischer Amine ist bei einer fluorimetrischen Auswertung gegeben, da Reagenz und Umsetzungsprodukte mit anderen funktionellen Gruppen nicht fluoreszieren.

Über die Vorteile in der Massenspektrometrie soll an anderer Stelle berichtet werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die fluorimetrische Bestimmung mikroanalytischer Mengen aliphatischer Amine mit 7-Chlor-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol wird beschrieben. Reaktionsbe-

dingungen in einem Einphasensystem, Reinigungsmethoden und säulen- bzw. dünn-schichtchromatographische Trennverfahren wurden untersucht, um die Anwendungsmöglichkeiten des Reagenzes kennenzulernen. Zur quantitativen Bestimmung eignet sich besonders eine Trennung an Polyamidfolien mit anschliessender *in situ* Vermessung mit einem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer. Zwischen 15 und 150 ng pro Fleck erhält man eine lineare Eichkurve. Die grosse Stabilität der Reaktionsprodukte und eine gute Reproduzierbarkeit des Verfahrens empfehlen das Reagenz zur mikroanalytischen Aminbestimmung.

LITERATUR

- 1 N. Seiler, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 97.
- 2 P. B. Ghosh und M. W. Whitehouse, *Biochem. J.*, 108 (1968) 155.
- 3 J. Reisch, H. Alfes und H. J. Kommert, *Z. Anal. Chem.*, 245 (1969) 390.
- 4 D. Clasing, H. Alfes, H. Möllmann und J. Reisch, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 7 (1969) 648.
- 5 J. Reisch, H. Alfes, H. J. Kommert, N. Jantos, H. Möllmann und D. Clasing, *Pharmazie*, 25 (1970) 331.
- 6 J. F. Lawrence und R. W. Frei, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 2046.