

DIE TRENNUNG STEREOISOMERER VERBINDUNGEN DURCH VERTEILUNG

IV. MITTEILUNG. DIE GASCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG STEREOISOMERER CYCLOHEXYLAMINE

H. FELTKAMP UND K. D. THOMAS

*Pharmazeutisch-chemisches Institut der Universität,
Tübingen (Deutschland)*

(Eingegangen den 25. Juni 1962)

Die gaschromatographische Trennung von Aminen mit geringen Siedepunktunterschieden ist auf den üblichen Säulen häufig nicht möglich, weil starkes "tailing" die Trennung verhindert. So blieben auch frühere Versuche, stereoisomere Methylcyclohexylamine an Carbowax- oder Siliconsäulen zu trennen, erfolglos¹; lediglich die Trennung der unmethylierten, der monomethylierten und der dimethylierten Methylcyclohexylamine voneinander war auf der Siliconsäule möglich, indem etwa beim Siedepunkt des Amins gearbeitet wurde.

Über eine Möglichkeit das störende "tailing" auszuschalten, berichtete zuerst JAMES², dem es durch Vorbehandeln der Trägersubstanz mit Alkali gelang, die Trennungen wesentlich zu verbessern. Durch Anwendung derartiger alkalihaltiger Säulen gelang es dann auch SMITH UND RADFORD³ neben anderen nahe beieinander siedenden Aminen die stereoisomeren 1,2-Diaminocyclohexane zu trennen.

Die weitere Suche nach einfachen Analysenverfahren für Stereoisomerenmische verschieden substituierter Cyclohexylamine, die im Rahmen anderer Arbeiten benötigt wurden, gab den Anlass zu prüfen, ob Alkali enthaltende Säulen auch bei stereoisomeren mono-Aminocyclohexanen brauchbare Ergebnisse liefern. Hierbei zeigte sich, dass die mit einer nach den Angaben von SMITH UND RADFORD gebauten Siliconsäule erzielten Trennungen für analytische Zwecke zumeist ausreichten (vgl. Fig. 1-3). Die an dieser Säule bei verschiedenen Stereoisomerenpaaren festgestellten Retentionszeiten sind in Tabelle I zusammengefasst.

Die beiden Stereoisomeren eines Stereoisomerenpaares weisen jeweils ähnliche Unterschiede in den Retentionszeiten und in den Siedepunkten auf⁴. Beim Vergleich verschiedener Stereoisomerenpaare miteinander zeigt sich aber keine strenge Abhängigkeit der Retentionszeit vom Siedeverhalten. So besitzen z.B. bei 100° und 45 p.s.i. das N-Methyl-*cis*-2-methylcyclohexylamin $Sdp_{727} = 162.7^\circ$ und das N,N-Dimethyl-*trans*-2-methylcyclohexylamin $Sdp_{720} = 170.5^\circ$ die gleiche Retentionszeit von 37 Min. Bei 130° und 45 p.s.i. zeigen die gleichen Amine allerdings einen geringen Unterschied in der Retentionszeit (s. Tabelle I).

Diese Beobachtungen über den Einfluss der stationären Phase auf die Retentionszeiten waren der Anlass, die Trennung an polareren Säulen zu untersuchen. Eine in der gleichen Weise gebaute mit 10 % Fluorsilicon QF 1 beschichtete Säule, die

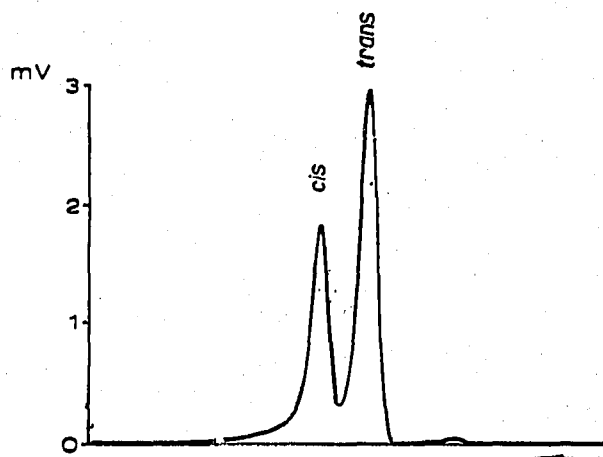


Fig. 1. Trennung der 2-Methylcyclohexylamine. 8 m Silicon DC 710, 130°, 45 p.s.i.

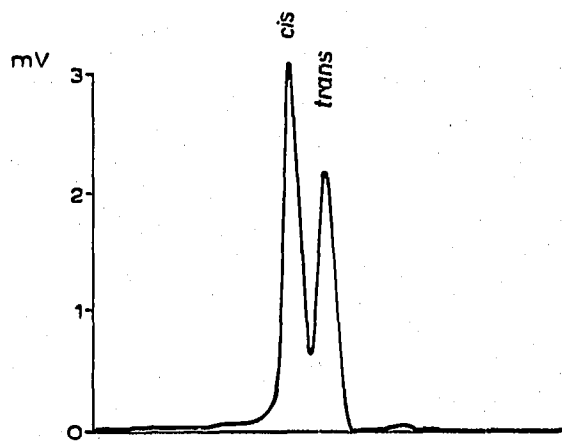


Fig. 2. Trennung der N-Methyl-3-methylcyclohexylamine. 8 m Silicon DC 710, 100°, 45 p.s.i.

im Prinzip gleichartige, aber weniger gute Trennungen ergab, erwies sich als unbeständig. Anscheinend zersetzt sich das Fluorsilicon unter dem Einfluss von Kaliumhydroxyd. Da Amine mit freien Hydroxylgruppen zu assoziieren* vermögen und das Ausmass derartiger Assoziationen zumeist sehr wesentlich von der Zugänglichkeit der hierzu befähigten Gruppen abhängt, war für stereoisomere Cyclohexylamine ein unterschiedliches Verhalten zu erwarten. Amine mit einer in Äquatorialstellung verhältnismässig frei liegenden Aminogruppe sollten besser eine Wasserstoffbindung

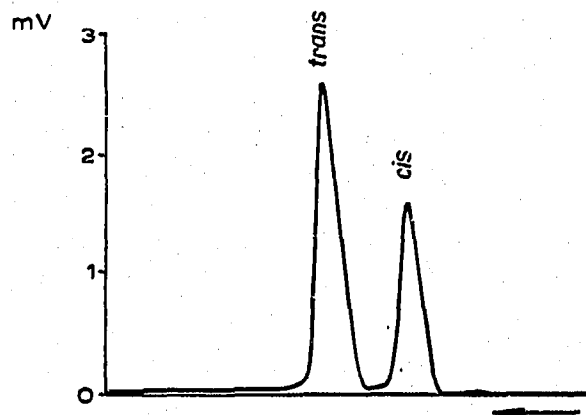


Fig. 3. Trennung der N,N-Dimethyl-4-methylcyclohexylamine. 8 m Silicon DC 710, 100°, 45 p.s.i.

eingehen können als axiale Amine, deren Stickstoff mit seinem freien Elektronenpaar durch die beiden benachbarten axialen Wasserstoffatome gehindert wird. Dass diese Überlegung zutrifft, hat bereits die flüssig/flüssig-Verteilung ergeben⁵. Es lag daher nahe, auch in der Gaschromatographie den Einfluss einer flüssigen Phase mit freien Hydroxylgruppen zu studieren, weshalb in der beschriebenen Weise eine Säule mit 10 % Hyprose als flüssiger Phase gebaut wurde. Die an dieser Säule erhaltenen Chro-

* Unter Assoziation ist hier nur die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung ("hydrogen bond") zwischen Amino- und Hydroxylgruppe gemeint.

TABELLE I

	Retentionszeit			
	8 m Silicon DC 710/KOH		8 m Hyprose/KOH	4 m Carbowax/KOH
	130°, 30 p.s.i.	130°, 45 p.s.i.	130°, 45 p.s.i.	70°, 45 p.s.i.
<i>2-Methylcyclohexylamin</i>				
nicht methyliert				
<i>trans</i>	19.5	14.5	9.5	21
<i>cis</i>	21.5	16.5	9.5	26
monomethyliert				
<i>trans</i>	23.5	17.5	7	20
<i>cis</i>	25	18.5	6.5	22
dimethyliert				
<i>trans</i>	25	19.5	5.5	18
<i>cis</i>	31.5	24.5	7.5	25
<i>3-Methylcyclohexylamin</i>				
nicht methyliert				
<i>trans</i>	21	15	11	25
<i>cis</i>	19.5	14	11	25
monomethyliert				
<i>trans</i>	23.5	17	7	20.5
<i>cis</i>	24.5	18.5	9	24.5
dimethyliert				
<i>trans</i>	25.5	20	6.5	17.5
<i>cis</i>	29.5	22.5	8.5	22.5
<i>4-Methylcyclohexylamin</i>				
nicht methyliert				
<i>trans</i>	19.5	14.5	11	23
<i>cis</i>	20.5	15.5	10.5	25
monomethyliert				
<i>trans</i>	24	19	9.5	24.5
<i>cis</i>	24	18.5	7.5	22.5
dimethyliert				
<i>trans</i>	29	23	7	23.5
<i>cis</i>	27	21	6	19
<i>4-tert.-Butylcyclohexylamin</i>				
nicht methyliert				
<i>trans</i>		130°, 50 p.s.i.	160°, 60 p.s.i.	
<i>cis</i>		51.5	14.5	
		50.5	11.5	

matogramme unterscheiden sich grundsätzlich von denen der Siliconsäule. Die unmethylierten Amine kommen jetzt weit nach ihren über 20° höher siedenden N,N-Dimethylierungsprodukten. Dazwischen liegen mit ihren Retentionszeiten die N-monomethylierten Amine. Offenbar nimmt die Fähigkeit zur Ausbildung einer Wasserstoffbindung mit fortschreitender Methylierung des Stickstoffs ab. Auch innerhalb der einzelnen Stereoisomerenpaare der unmethylierten Amine macht sich der Einfluss des unterschiedlichen Assoziationsvermögens bemerkbar, indem erwartungsgemäss die Amine mit hauptsächlich äquatorialer Aminogruppe im Verhältnis stärker

zurückgehalten werden als die mit vorwiegend axialer. Das hat zur Folge, dass bei den 2- und 3-Methylcyclohexylaminen die auf Grund der unterschiedlichen Siedepunkte auf der Siliconsäule erzielten Trennungen aufgehoben werden, während beim 4-Methylcyclohexylamin sogar das niedriger siedende, aber stärker assoziierende *trans*-Amin zuletzt kommt. Beim 4-*tert.*-Butylcyclohexylamin, bei dem auf Grund der Siedepunkte an der Siliconsäule nur eine schlechte Trennung eintrat, konnte eine wesentliche Verbesserung der Trennung erreicht werden, da hier das stärker assoziierende Isomere auch den höheren Siedepunkt besitzt.

Aus dem gleichen Grunde ist auch die Trennung der N-monomethylierten Methylcyclohexylamine besser als auf der Siliconsäule. Ein gewisser Unterschied in der Assoziationsfähigkeit innerhalb der Stereoisomerenpaare ist also auch hier vorhanden, wenngleich die Assoziation im ganzen gesehen sicherlich weit geringer ist als bei den unmethylierten Aminen. Hingegen war bei den dimethylierten Aminen kein Einfluss einer H-Bindung festzustellen. In grundsätzlich gleicher Weise können die Trennungen auf einer Carbowaxsäule erklärt werden, wenn auch hier die Einflüsse der Wasserstoffbrücken geringer sind, da nur noch wenige freie Hydroxylgruppen vorhanden sind. Immerhin besitzt, genau wie auf der Hyprosesäule, das am niedrigsten siedende unmethylierte Amin die höchste Retentionszeit gegenüber seinen Methylierungsprodukten.

Ob die mit zunehmender Methylierung abnehmende Assoziation auf einer sterischen Hinderung durch die eingetretenen Methylgruppen beruht, kann hier nicht entschieden werden.

Die an Hyprose- und Carbowaxsäulen beobachteten Retentionszeiten sind ebenfalls in Tabelle I zusammengefasst.

Trennungen desselben Gemisches dreier Amine — eines unmethylierten, eines monomethylierten und eines dimethylierten — an beiden Säulen zeigen die Fig. 4 und 5. Die unterschiedliche Assoziation gibt sich nicht nur in der deutlich sichtbaren Umkehr der Reihenfolge, sondern auch im Breiterwerden der Banden auf dem Chromatogramm der Hyprosesäule zu erkennen.

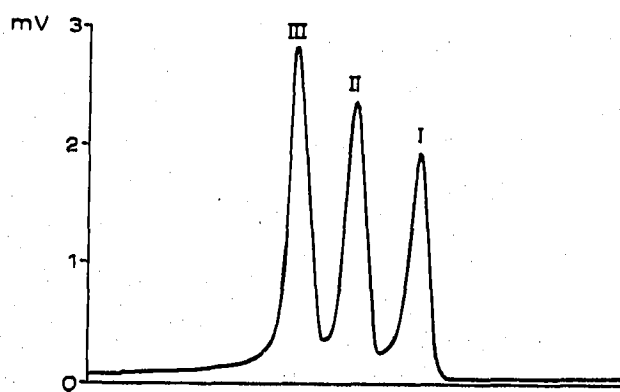


Fig. 4. Trennung der *trans*-3-Methylcyclohexylamine. (I) unmethyliert; (II) monomethyliert; (III) dimethyliert. Silicon DC 710, 130°, 45 p.s.i.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Säulen haben sich zur Analyse von Gemischen stereoisomerer Cyclohexylamine und zur Reinheitsprüfung der einzelnen Isomeren bisher gut bewährt.

(Die Reinheitsprüfung bereitete allerdings zunächst Schwierigkeiten, weil bei häufigem Spritzen immer geringe Mengen zuvor chromatographierter Amine in den Chromatogrammen festzustellen waren. Es wurde daher vermutet, dass ein Teil des Amins — wahrscheinlich als Carbaminat — im Verdampfungsraum zurückbleibt

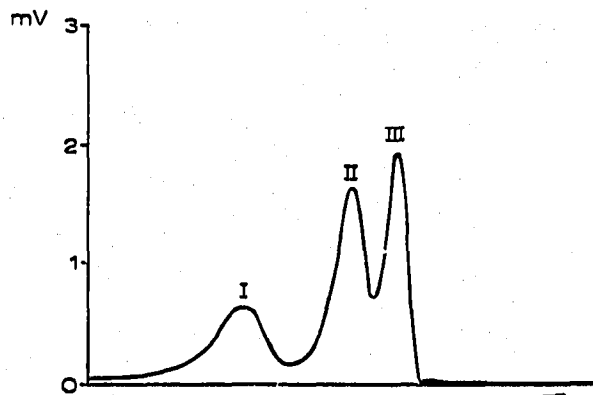


Fig. 5. Trennung der *trans*-3-Methylcyclohexylamine. (I) unmethyliert; (II) monomethyliert; (III) dimethyliert. Hyprose, 130°, 45 p.s.i.

und beim Einspritzen der nächsten Aminprobe teilweise freigesetzt bzw. mitgerissen wird. Durch Einspritzen eines anderen, mit seiner Retentionszeit nicht störenden Amins sollte sich der Verdampfungsraum reinigen lassen, was auch in diesem Falle mit Äthylendiamin gelang).

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Bau der Chromatographiesäulen

100 g Chromosorb W (W. H. Curtin Co., Houston, Tex. 30/60 mesh) wurden mit Methanol gut angefeuchtet und mit einer Lösung von 5 g Kaliumhydroxyd in 100 ml Methanol eine Stunde lang im Rotationsverdampfer ohne Anwendung von Wärme und Vakuum vermischt. Darauf wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Die völlig trockene Masse wurde gesiebt (Din Gewebe No. 14) und die groben Anteile verworfen.

Silicon- und Carbowaxsäule

50 g der so vorbereiteten Trägersubstanz wurden mit Methylenchlorid angefeuchtet, mit einer Lösung von 5 g Siliconöl DC 710 (Dow Corning Corp., Midland, Mich.), bzw. 5 g Carbowax 20000 in 50 ml Methylenchlorid versetzt und in der beschriebenen Weise gemischt, getrocknet und gesiebt.

Hyprosesäule

50 g der präparierten Trägersubstanz wurden mit 60 ml Chloroform angefeuchtet und mit einer Lösung von 5 g Hyprose in 60 ml Chloroform versetzt. Sonst wurde wie oben verfahren.

Füllen der Säulen

Das Füllmaterial wurde unter ständigem leichtem Klopfen in senkrecht hängende Kupferrohre (\varnothing 4 mm) entsprechender Länge eingefüllt und das Klopfen unter ge-

gelegentlichem Nachfüllen eine Stunde lang fortgesetzt. Es wurden *ca.* 5 g Füllmaterial auf 1 m Kolonnenlänge verbraucht.

Versuchsbedingungen

Die Versuche wurden sämtlich im Beckman Gaschromatographen GC 2 durchgeführt. Temperatur 100–160°, Druck 30–45 p.s.i., H₂ als Trägergas. Hitzdrahtdetektor, Empfindlichkeit 2, Probenmenge 1–2 μ l.

Reinigung

Zur Entfernung von Amin- bzw. Carbaminresten aus der Apparatur genügte zumeist dreimaliges Einspritzen von je 5 μ l Äthylendiamin.

Die Darstellung der untersuchten Amine ist an anderer Stelle⁴ beschrieben.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Überziehen der Trägersubstanz mit Kaliumhydroxyd liess sich das "tailing" beim Gaschromatographieren von Aminen nicht nur an Silicon- sondern auch an Hyprosesäulen weitgehend verhindern. 10 Stereoisomerenpaare von Alkyl-cyclohexylaminen bzw. ihrer N-Mono- und ihrer N,N-Dimethylierungsprodukte konnten getrennt werden. Der Einfluss des Siliconöls als stationäre Phase war gering, so dass hier die Retentionszeiten den Siedepunkten ungefähr vergleichbar waren. Dagegen wurde auf der Hyprosesäule die Retentionszeit einesamins von dessen Fähigkeit zur Ausbildung einer H-Bindung entscheidend beeinflusst.

SUMMARY

In the gas chromatography of amines on silicone and hyprose columns, tailing could be prevented to a great extent by treating the support with potassium hydroxide. Ten pairs of stereoisomers consisting of alkylcyclohexylamines and their N-monomethyl and N,N-dimethyl derivatives could be separated. Silicone oil as stationary phase had only a slight effect on the retention times, so that with this phase there is some relation between the retention times and the boiling points of the amines. On the other hand with hyprose columns the capacity of an amine to form a hydrogen bond has a considerable influence on the retention time.

LITERATUR

- ¹ K. D. THOMAS, *Dissertation*, Universität, Tübingen, 1961.
- ² A. T. JAMES, A. J. P. MARTIN UND G. H. SMITH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 238;
A. T. JAMES, *Biochem. J.*, 52 (1952) 242;
A. T. JAMES, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1564.
- ³ E. D. SMITH UND R. D. RADFORD, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 1160.
- ⁴ K. D. THOMAS UND H. FELTKAMP, *Arch. Pharm.*, im Druck.
- ⁵ H. FELTKAMP, *Arch. Pharm.*, im Druck.