

CHROM. 4427

EMPFINDLICHER NACHWEIS VON SUBSTANZEN MIT PRIMÄREN AMINOGRUPPEN AUF DÜNNSCHICHTPLATTEN

P. HAEFELFINGER

Kontrollabteilung der Firma F. Hoffmann-La Roche & Cie., Basel (Schweiz)

SUMMARY

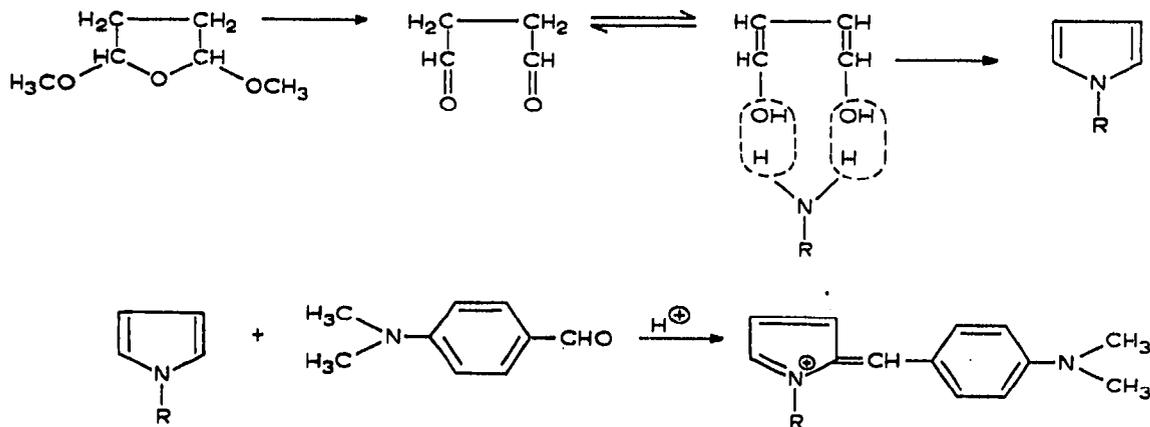
Sensitive method for the detection of substances containing primary amino groups on thin-layer plates

A simple colorimetric method for the detection of primary amines on thin-layer plates has been worked out. It is of interest that some benzodiazepines give the same colour reaction. Probably these compounds are split or undergo rearrangements to primary amines which give a positive reaction. For several amino acids the sensitivity of the new method is compared with the well-known ninhydrin reaction.

EINLEITUNG

Im Jahre 1966 haben SAWICKI UND JOHNSON¹ eine neue Methode zur photometrischen Bestimmung von primären Aminen und Aminosäuren veröffentlicht. Diese selektive und empfindliche Nachweisreaktion basiert darauf, dass primäre Aminogruppen mit Succindialdehyd Schiff'sche Basen bilden (N-substituierte Pyrrole), welche mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in saurer Lösung intensiv rotviolette kationische Verbindungen geben. Der für die Reaktion notwendige Succindialdehyd bildet sich aus 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran durch Erwärmen.

Der Reaktionsmechanismus kann folgendermassen formuliert werden:



Sekundäre Amine, Amide, Pyrimidine und Purine reagieren nicht.

Die Methode wurde zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren und primären Aminen nach der dünnschichtchromatographischen Trennung entwickelt. Es finden sich in der Publikation keine Angaben, ob nicht nach dem gleichen Verfahren Substanzen direkt auf der Dünnschichtplatte sichtbar gemacht werden können.

Die Methode von SAWICKI UND JOHNSON haben wir zur photometrischen Bestimmung primärer Amine verwendet und durch geeignete Wahl der Versuchsbedingungen die Empfindlichkeit wesentlich verbessern können. Ferner schien es uns interessant zu prüfen, ob dieses Verfahren auch zum Nachweis von Substanzen mit primären Aminogruppen auf Dünnschichtplatten verwendet werden kann.

NACHWEIS VON SUBSTANZEN MIT PRIMÄREN AMINOGRUPPEN AUF DÜNNSCHICHTPLATTEN

Prinzip des Nachweises

Es zeigte sich schon nach wenigen Versuchen, dass die Reaktion von SAWICKI UND JOHNSON auch auf den Dünnschichtplatten durchgeführt werden kann.

Die Platten werden nach der dünnschichtchromatographischen Trennung getrocknet und mit einer essigsäuren Lösung von 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran besprüht. Die Platten werden zur Bildung von Succindialdehyd erwärmt und mit einer stark sauren Lösung von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd anschliessend die Substanzen mit primären Aminogruppen sichtbar gemacht. Die Flecken färben sich rotviolett bis blau an. Die Methode arbeitet gut und erfordert keine besonderen Vorrichtungen.

Nachweisgrenzen

Bekanntlich ist die Nachweisgrenze auf Dünnschichtplatten von folgenden Faktoren abhängig:

- (1) Art der Dünnschichtplatten (Sorptionmittel, Schichtdicke, Aktivierung).
- (2) Konzentration und Menge der aufgetragenen Lösungen, Art des Lösungsmittels.
- (3) Mobile Phase, eventuell Kammersättigung.
- (4) Trennstrecke.

Leider werden diese Angaben in Veröffentlichungen häufig nicht erwähnt, sodass ein Vergleich der Nachweisgrenzen unmöglich ist.

Der Nachweis von Aminosäuren mit Ninhydrin ist im allgemeinen sehr empfindlich. Von FAHMY *et al.*² sind systematische Untersuchungen über die Nachweisgrenzen durchgeführt worden. In Anlehnung an diese Versuche wählten wir folgende Bedingungen:

Dünnschichtplatten: DC-Fertigplatten von Merck, Kieselgel F₂₅₄, Schichtdicke, 0,25 mm; keine Aktivierung der Platten.

Aufgetragene Lösungsmengen: 1 μ l; die Konzentration wurde so gewählt, dass die angegebene Substanzmenge in 1 μ l enthalten ist; Lösungsmittel, Wasser.

Mobile Phase: *n*-Propanol-Wasser (70:30); Kammersättigung.

Trennstrecke: 10 cm.

In der Tabelle I ist die Ninhydrin Nachweismethode mit dem neuen Verfahren verglichen. In einigen Fällen ist die Sichtbarmachung mit Ninhydrin in anderen die neue Methode empfindlicher. In Fig. 1 ist eine Platte einerseits mit Ninhydrin andererseits mit dem neuen Verfahren sichtbar gemacht worden.

TABELLE I

NACHWEISGRENZEN EINIGER AMINOSÄUREN AUF DÜNNESCHICHTPLATTEN

	<i>Ninhydrin- Reaktion^a auf Kieselgel G-Platten (μg)</i>	<i>Reaktion mit 2,5-Dimethoxy- tetrahydro- furan + p- Dimethyl- aminobenz- aldehyd (μg)</i>
β -Alanin	0.009	0.005
Asparaginsäure	0.1	0.02
Glutaminsäure	0.04	0.01
Glycin	0.001	0.005
Histidin	0.05	0.05
Methionin	0.01	0.01
Tyrosin	0.03	0.01
Valin	0.01	0.008

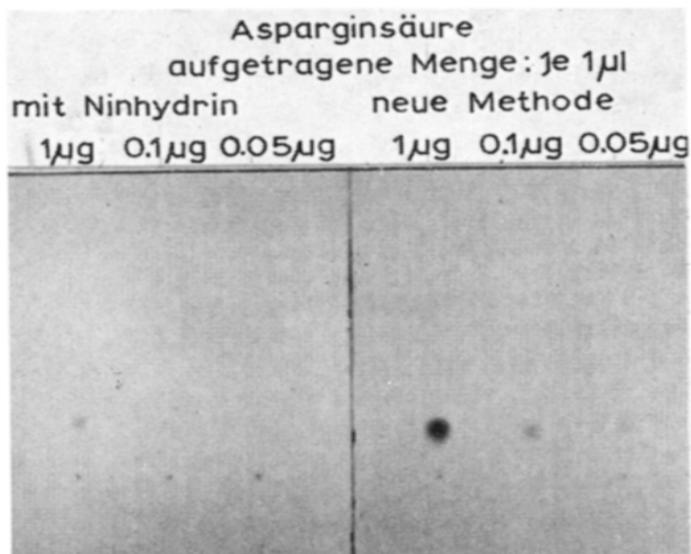


Fig. 1. Vergleich des Ninhydrin Nachweises mit der neuen Methode am Beispiel von Asparaginsäure.

NACHWEIS VON SUBSTANZEN OHNE PRIMÄRE AMINOGRUPPEN

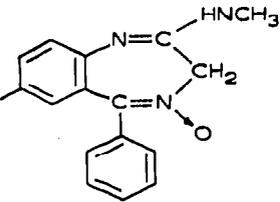
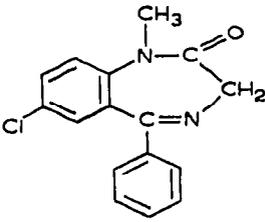
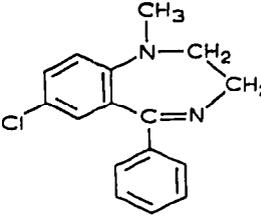
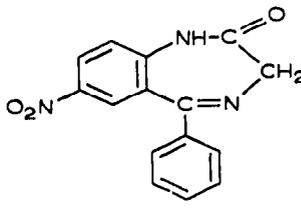
Bei Versuchen zeigte es sich, dass die Reaktion von SAWICKI UND JOHNSON auch mit Substanzen durchgeführt werden kann, die keine primäre Aminogruppe enthalten. Allerdings handelt es sich dabei um Verbindungen, die durch Spaltung oder Umwandlung in primäre Amine übergeführt werden können.

Mit verschiedenen Benzodiazepin-Derivaten haben wir die Farbreaktion durchgeführt. In Tabelle II findet sich eine Zusammenstellung, welche Verbindungen positiv oder negativ reagiert haben.

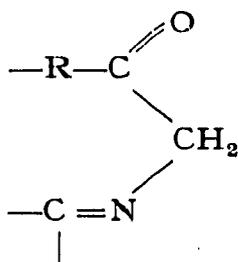
TABELLE II

NACHWEIS EINIGER BENZODIAZEPINE

Reaktion mit 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran + *p*-Dimethylaminobenzaldehyd.

<i>Chlordiazepoxid</i>	<i>Diazepam</i>	<i>Medazepam</i>	<i>Nitrazepam</i>
(Librium "Roche" Substanz)	(Valium "Roche" Substanz)	(Nobrium "Roche" Substanz)	(Mogadon "Roche" Substanz)
			
negativ	positiv	negativ	positiv

Versuche mit weiteren Verbindungen haben gezeigt, dass Benzodiazepine mit der Gruppierung



eine positive Farbreaktion ergeben. Allerdings haben wir bis jetzt noch keinen allgemein gültigen Zusammenhang gefunden zwischen Struktur und positiver Farbreaktion.

Die Nachweisgrenzen von Diazepam und Nitrazepam sind in Tabelle III zusammengestellt. Es sind dabei folgende Versuchsbedingungen gewählt worden:

Dünnschichtplatten: DC-Fertigplatten von Merck, Kieselgel F₂₅₄; Schichtdicke, 0,25 mm; keine Aktivierung der Platten.

Aufgetragene Lösungsmengen: 1 µl; Lösungsmittel, Chloroform.

Mobile Phase: Essigester-Heptan (1:1); Kammersättigung.

Trennstrecke: 10 cm.

Die kolorimetrische Nachweismethode ist also etwa gleich empfindlich wie die Fluoreszenzlöschung im kurzwelligen UV. Die kolorimetrische Sichtbarmachung ist wesentlich spezifischer als die Fluoreszenzlöschung, was in einigen Fällen einen grossen Vorteil bedeutet.

Neben verschiedenen Benzodiazepinen hat auch Panthenol eine positive Farbreaktion mit 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran und *p*-Dimethylaminobenzaldehyd gegeben. Bei dieser Substanz ist die positive Reaktion auf die Bildung von 3-Amino-1-propanol zurückzuführen. Die Nachweisempfindlichkeit beträgt ca. 0,5 µg Panthenol/1 µl auf 0,25 mm dicken Kieselgelplatten.

TABELLE III

NACHWEISGRENZE VON DIAZEPAM UND NITRAZEPAM

<i>Nachweismethode</i>		
	<i>Fluoreszenz- löschung im kurz- welligen UV (μg)</i>	<i>Reaktion mit 2,5-Dimethoxy- tetrahydro- furan + p- Dimethyl- aminobenz- aldehyd (μg)</i>
Diazepam	0.1	0.05
Nitrazepam	0.1	0.01

EXPERIMENTELLER TEIL

Bemerkung zur Wahl der mobilen Phase: Bei der Farbreaktion nach SAWICKI UND JOHNSON reagiert auch Ammoniak. Die mobile Phase sollte daher möglichst keinen Ammoniak enthalten oder sonst sind nach der Entwicklung möglichst alle Spuren des Fließmittels zu entfernen.

Reagenzien

Die folgenden Reagenzien wurden verwendet: 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran; *p*-Dimethylaminobenzaldehyd; Eisessig; konz. HCl; Citratpuffer pH 6.6 (210 g Citronensäure + 400 ml 5 N NaOH, ad 1 l Wasser. 470 ml 1 N NaOH werden mit 530 ml der obigen Citratlösung versetzt und der pH auf 6.6 mit NaOH oder Citronensäure eingestellt.) Sprühreagenz A (1% 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran in Eisessig

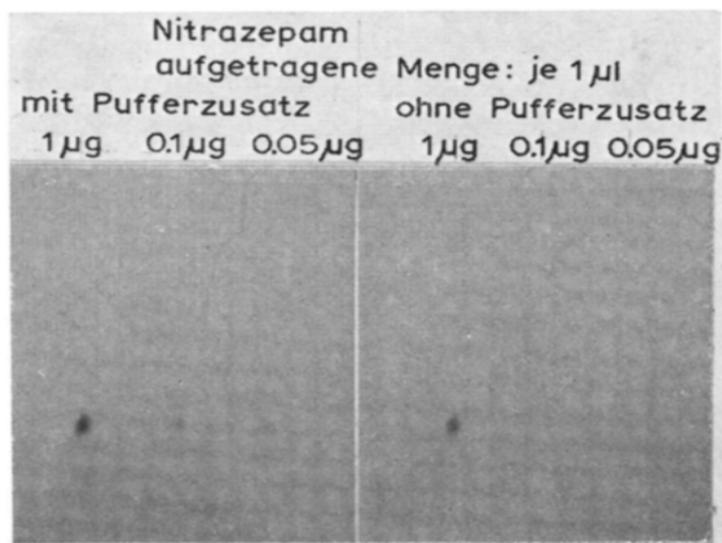


Fig. 2. Vergleich von Sprühreagenz A m.t. und ohne Citratpuffer am Beispiel von Nitrazepam.

resp. 1% 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran in Eisessig-Citratpuffer pH 6.6 (1:2). Sprühreagenz A ist einige Tage haltbar.) Sprühreagenz B (2% *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in Eisessig-konz. HCl (85:15). Sprühreagenz B ist einige Wochen haltbar.)

Durchführung des Nachweises

Nach dem Trocknen werden die Dünnschichtplatten mit Reagenz A besprüht. Es hat sich bei unseren Versuchen gezeigt, dass bei einigen Substanzen durch den Zusatz von Citratpuffer die Nachweisgrenze stark erniedrigt wird. In Fig. 2 ist ein solches Beispiel abgebildet.

Durch den Zusatz des Citratpuffers wird die Farbe der Flecken auf der Dünnschichtplatte etwas nach rot verschoben. Es ist durchaus möglich, dass je nach der zu bestimmenden Substanz der pH-Wert des Puffers variiert werden sollte. Wir haben keine entsprechenden Versuche durchgeführt.

Anschliessend an das Besprühen werden die Platten 5–10 min auf 100° erwärmt. Es ist auch möglich, die Platten *ca.* 1 min mit einem Heissluftföhn zu erhitzen, allerdings sind die Versuchsbedingungen so nicht genau definiert.

Nach dem Abkühlen der Platten besprüht man mit Reagenz B. Innerhalb kurzer Zeit (meist weniger als 1/2 min) werden die Substanzen als rotviolette Flecken sichtbar. Die Farbe der Flecken ist ziemlich stabil, der Plattenuntergrund ist meist nur schwach gefärbt.

DISKUSSION

Zum Nachweis von Substanzen mit primären Aminogruppen eignet sich die Farbreaktion mit 2,5-Dimethoxytetrahydrofuran und *p*-Dimethylaminobenzaldehyd gut. Im Vergleich zur Ninhydrin-Nachweismethode ergeben sich folgende Vor- und Nachteile:

Reagenzien: Ninhydrin-Methode, 1–2 Lösungen; vorliegende Methode, 2 Lösungen.

Zeitaufwand: Bei beiden Methoden etwa gleich, neue Methode eher etwas rascher.

Empfindlichkeit: Bei beiden Methoden etwa gleich.

Anwendungsbereich: Die vorliegende Methode ist auch bei einigen Benzodiazepinen anwendbar, wo mit Ninhydrin keine positive Reaktion erhalten wird.

Aufgrund dieses Vergleiches ist ersichtlich, dass jede Methode ihre Vor- und Nachteile besitzt. Da jedoch der Nachweis mit Ninhydrin sich im allgemeinen gut bewährt hat, wird das neue Verfahren nur in speziellen Fällen zur Anwendung kommen. So ist man bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Benzodiazepine ab und zu froh, die Substanzen mit einer empfindlichen Farbreaktion sichtbar machen zu können.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine einfache Methode zum kolorimetrischen Nachweis von Substanzen mit primären Aminogruppen auf Dünnschichtplatten beschrieben. Interessant ist,

dass auch einige Benzodiazepine diese Reaktion ergeben. Vermutlich bilden sich bei diesen Verbindungen durch Spaltung oder Umlagerung primäre Amine, die dann positiv reagieren. Die vorliegende Nachweismethode wird anhand von einigen Aminosäuren mit dem allgemein üblichen Ninhydrin-Nachweis verglichen. Je nach den Substanzen ist die eine oder die andere Methode empfindlicher.

DANK

Bei der experimentellen Bearbeitung wirkte Frl. R. KNUCHEL mit.

LITERATUR

- 1 E. SAWICKI AND H. JOHNSON, *Chemist-Analyst*, 55 (1966) 101.
- 2 A. R. FAHMY, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND M. BRENNER, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 2022.

DISCUSSION

NEHER: How is the sensitivity of this reaction with primary aromatic or heterocyclic amines?

HAEFELFINGER: In some special cases we have found that the new method is as sensitive as the well-known Bratton-Marshall reaction. However, we have no great experience in this field.

NEHER: How does it work on cellulose and alumina layers in comparison to ninhydrin?

HAEFELFINGER: Since we could separate our substances on silica gel layers, we have not tested other adsorbents. We believe, however, that on other layers the sensitivity is within the same range as that of the ninhydrin method.

DEYL: Up to what extent is your detection procedure applicable to the detection of peptides and proteins?

HAEFELFINGER: We do not know yet.

BRENNER: Ich möchte auf die Strukturanalogie zwischen Diazepam und dem $\Delta^{4,5}$ -Dehydroprolin hinweisen; letzteres gibt wie das $\Delta^{1,2}$ -Dehydroprolin mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd eine Farbreaktion.

J. Chromatog., 48 (1970) 184-190