

Notes

CHROM. 5233

Réaction photochimique de caractérisation des amines de structure $(R,R')CH-NH_2$ en chromatographie sur papier

Les amines du type $(R,R')CH-NH_2$, composés dans lesquels l'atome de carbone voisin de la fonction aminée n'est lié qu'à un seul atome d'hydrogène, ne réagissent que faiblement avec la ninhydrine^{1,2}. Dans certaines conditions expérimentales³, il n'est même pas possible de déceler la coloration classique dans le mélange réactionnel gardé pendant plusieurs jours à la température du laboratoire et à l'obscurité; le pourpre de RUHEMANN^{4,5}, pigment caractéristique de la réaction, apparaît au contraire rapidement si, après quelques heures de séjour à l'obscurité, on expose le mélange à la lumière solaire^{6,7}. Cette réaction photochimique, que nous avons décrite en milieu liquide, se produit également sur papier et permet ainsi de caractériser sur les chromatogrammes de nombreuses amines $(R,R')CH-NH_2$ et de les différencier des amines $R-CH_2-NH_2$, des α -amino-alcools et des α -amino-acides.

Mode opératoire

Le chromatogramme uni- ou bidimensionnel, renfermant au maximum 50 μ g de chaque amine $(R,R')CH-NH_2$, est développé selon la méthode habituelle, avec les phases solvantes convenables et bien séché dans un courant d'air; on le porte ensuite dans une chambre noire où on l'imprègne, par immersion rapide, d'une solution de ninhydrine à 0.50 p. 100 dans l'acétone; on le sèche à l'air libre pendant 120 min à la température ambiante, toujours à l'obscurité*, puis on le sort de la pièce obscure entre deux feuilles de papier noir qui le protègent de la lumière. On l'expose alors pendant 15 min directement au soleil ou à une vive lumière artificielle (lampe de 300 W maintenue à 40 cm du chromatogramme).

Résultats

La Fig. 1 illustre un exemple des résultats obtenus. Dès que l'on dévoile le chromatogramme, les spots (1) et (3) des amines $R-CH_2-NH_2$, qui ont réagi avec la ninhydrine pendant le séjour à l'obscurité, se montrent bien colorés; au contraire, les spots (2), (4) et (5) des amines $(R,R')CH-NH_2$, non immédiatement visibles, apparaissent progressivement au cours de l'exposition à la lumière. Nous avons vérifié que le léger échauffement du papier ainsi réalisé n'est pas le facteur responsable de l'apparition du pourpre de RUHEMANN et qu'il s'agit bien d'un effet purement photochimique.

Spécificité de la caractérisation

Pour garder à cette identification photochimique son entière spécificité, il convient de déposer sur le chromatogramme une quantité d'amine qui ne soit pas

* On peut s'aider, pour ces diverses manipulations, du faible éclairage d'une lanterne à travaux photographiques.

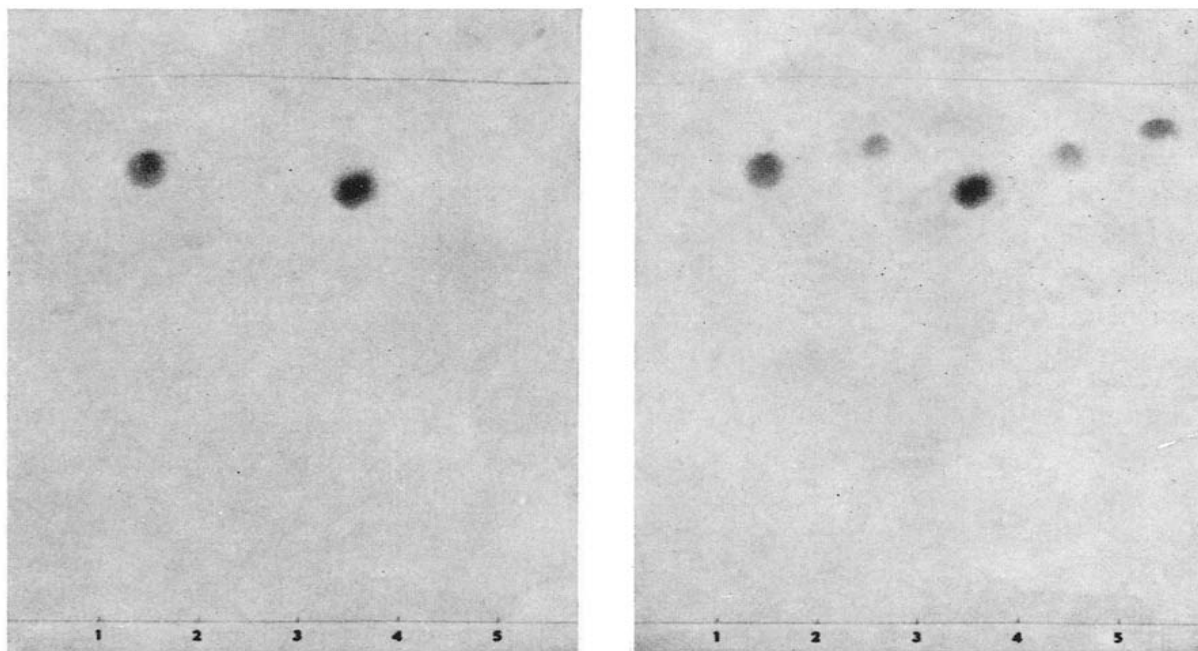


Fig. 1. Influence de la lumière sur la réaction des amines $(R,R')CH-NH_2$ avec la ninhydrine. Dépôt de $50 \mu\text{g}$ des amines suivantes: (1), phényl-2-éthylamine, HCl; (2), phényl-1-amino-2-propane, $\frac{1}{2}H_2SO_4$; (3), benzylamine, HCl; (4), phényl-1-éthylamine, HCl; (5), phényl-1-propylamine, HCl. Chromatographie unidimensionnelle ascendante. Papier Schleicher et Schüll No. 2043b. Phase solvante: *n*-butanol-acide acétique-eau (2:1:1). À gauche: avant exposition à la lumière; à droite: après 5 min d'exposition à la lumière.

trop importante et de limiter la durée du séjour à l'obscurité du chromatogramme traité par la ninhydrine, car les amines $(R,R')CH-NH_2$, à forte concentration, réagissent à la longue avec la tricétone indanique même en l'absence de lumière: les conditions adoptées dans notre mode opératoire répondent largement à cet impératif, car l'amino-1-diphényl-1,2-éthane, une des amines $(R,R')CH-NH_2$ les plus réactives, déposé à la dose de $50 \mu\text{g}$, ne conduit pas à la formation de pourpre de RUHEMANN après 24 h de séjour à l'obscurité. Il est également nécessaire de sécher le chromatogramme, après son imprégnation par le réactif, à l'air libre ou à l'étuve à 37° et non point à l'étuve à 100° : en effet, à température élevée, les amines $(R,R')CH-NH_2$ réagissent directement avec la ninhydrine, sans intervention photochimique. La caractérisation photochimique peut également être effectuée sur une couche mince de cellulose ou de gel de silice, mais l'utilisation de ces deux supports s'est révélée moins favorable que celle du papier chromatographique, sur le plan de la spécificité aussi bien que sur celui de la sensibilité.

Sensibilité de la réaction

Les conditions si douces de durée et de température de traitement par la ninhydrine que nous avons sélectionnées réduisent évidemment la sensibilité de la réaction par rapport aux techniques de révélation habituelles non spécifiques; cependant la caractérisation photochimique permet de déceler environ $5 \mu\text{g}$ des amines les plus réactives (phényl-1-propylamine, phényl-1-éthylamine, *p*-méthoxyamphétamine...), la limite s'élevant à 8–10 μg pour les amines aliphatiques ou les amines cyclaniques.

TABLEAU I

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DE DIVERSES AMINES DU TYPE (R,R')CH-NH₂

Chromatographie unidimensionnelle descendante; papier Whatman No. 1; dépôt de 25 µg de chaque substance, en solution dans 10 µl d'eau; phase solvante: butanol-acide acétique-eau (12:3:5); révélation par une solution acétonique de ninhydrine à 0.5 p. 100. Colorations: V = violet; Br = brunâtre; J = jaune; Or = orangé; () = coloration faible; o = pas de coloration.

Composé	Coloration du spot	
	Après 2 h d'incubation à l'obscurité et avant l'exposition à la lumière	Après l'exposition à la lumière
<i>Amines aliphatiques</i>		
Isopropylamine, HCl	o	(V)
DL-Amino-2-butane, HCl	o	V
DL-Amino-2-pentane, HCl	o	(V)
Amino-3-pentane, HCl	o	V
DL-Amino-2-méthyl-4-pentane, ½H ₂ SO ₄	o	V
DL-Amino-2-heptane, ½H ₂ SO ₄	o	V
DL-Amino-3-heptane, HCl	o	V
Amino-4-heptane, HCl	o	V
DL-Amino-2-méthyl-4-hexane, HCl	o	V
DL-Amino-2-octane, HCl	o	V
DL-Amino-3-octane, HCl	o	V
DL-Amino-4-octane, HCl	o	V
DL-Amino-2-méthyl-6-heptane, ½H ₂ SO ₄	o	V
DL-Amino-2-dodécane, HCl	o	V
DL-Amino-6-méthyl-2-heptanol-2, HCl	o	V
DL-(Diéthylamino)-5-amino-2-pentane, 2HCl	o	V
<i>Amines cyclaniques</i>		
Cyclopropylamine, ½H ₂ SO ₄	o	J → (V)
DL- <i>cis</i> -Phényl-2-cyclopropylamine, HCl	V	V
DL- <i>trans</i> -Phényl-2-cyclopropylamine, HCl	V	V
Cyclopentylamine, HCl	o	V
Amino-1-indane, HCl	J	J → V (24 h)
Amino-2-indane, HCl	o	(J)
Cyclohexylamine, HCl	o	V
Hydroxy-4-cyclohexylamine, HCl	o	V
Cycloheptylamine, HCl	o	(V)
Cyclo-octylamine, ½H ₂ SO ₄	o	V
<i>Amines aliphatiques à substituant aromatique</i>		
DL-Phényl-1-éthylamine, HCl	o	V
DL-(<i>p</i> -Chlorophényl)-1-éthylamine, HCl	o	V
DL-(<i>p</i> -Bromophényl)-1-éthylamine, HCl	o	V
DL-(<i>n</i> -Propoxy-4'-phényl)-1-éthylamine, HCl	o	J → Br → BrV → V
DL-(<i>n</i> -Octoxy-4'-phényl)-1-éthylamine, HCl	o	J → Br → BrV → V
DL-(Phénoxy-4'-phényl)-1-éthylamine, HCl	o	J → Br → BrV → V
Ether di-(amino-1'-éthyl)-4-phénylique racémique, 2HCl	o	J → Br → BrV → V
DL-(Méthoxy-4'-isopropoxy-3'-phényl)-1-éthylamine, HCl	o	J → Br → BrV → V
DL-(Méthoxy-4'-cyclohexoxy-3'-phényl)-1-éthylamine, HCl	o	J → Br → BrV → V
DL-Phényl-1-propylamine, HCl	o	V
DL-β-Phényl-β-alanine	o	o
DL-Phényl-1-butylamine, HCl	o	V
Benzhydrylamine, HCl	Br	Br V → V
DL-Amino-1-diphényl-1,2-éthane, HCl	o	V

(Pour la suite voir p. 314)

TABLEAU I (suite)

Composé	Coloration du spot	
	Après 2 h d'incubation à l'obscurité et avant l'exposition à la lumière	Après l'exposition à la lumière
DL-Phényl-1-amino-2-propane, $\frac{1}{2}$ H ₂ SO ₄	o	V
DL-(Hydroxy-4'-phényl)-1-amino-2-propane, HBr	o	V
DL-(Méthoxy-4'-phényl)-1-amino-2-propane, $\frac{1}{2}$ H ₂ SO ₄	o	V
DL-(Méthoxy-3'-méthylènedioxy-4',5'-phényl)-1-amino-2-propane, HCl	o	V
DL-(Diméthoxy-2',5'-phényl)-1-amino-2-propane, HCl	o	V
Diphényl-1,3-amino-2-propane, HCl	J	V
DL-Amino-3-phényl-1-butane, HCl	o	V
<i>Amines aliphatiques à substituant hétérocyclique</i>		
DL-(Pyridyl-2')-1-éthylamine, 2HCl	BrOr	BrV
DL-(Pyridyl-3')-1-éthylamine, 2HCl	(V)	V
DL-(Pyridyl-4')-1-éthylamine, 2HCl	V	V
DL-(Tétrazolyl-5')-1-éthylamine, 2HCl	V	V
DL- α -Méthyl-tryptamine, HCl	J	J \rightarrow BrV
DL- α -Éthyl-tryptamine, acétate	o	BrV
Amino-3-quinuclidine, 2HCl	V	V

Influence de la structure chimique de l'amine

Nous avons utilisé notre technique photochimique pour la caractérisation de 54 amines (R,R')CH-NH₂ différentes (Tableau I). La vitesse de formation du pourpre de RUHEMANN sous l'influence de l'irradiation lumineuse est conditionnée par la structure chimique de l'amine; les amines aliphatiques à substituant aromatique, en particulier le phényl-1-amino-2-propane (amphétamine), se montrent les plus réactives et leur spot est déjà décelable après une minute d'irradiation lumineuse; les amines aliphatiques, comme l'amino-2-butane ou l'amino-2-heptane, ainsi que certaines amines cyclaniques (cyclohexylamine*, cyclo-octylamine) nécessitent une exposition à la lumière plus longue, allant jusqu'à 15 min pour l'isopropylamine.

Avec d'autres amines, on observe l'apparition à l'obscurité d'une coloration jaune (amino-1-indane, diphényl-1,3-amino-2-propane, α -méthyltryptamine) ou brune (benzhydrylamine, α -pyridyl-1-éthylamine) que l'irradiation lumineuse fait virer au violet; ces intermédiaires colorés, vraisemblablement constitués par des cétimines⁹, apparaissent dans quelques cas au cours même de l'irradiation lumineuse (cyclopropylamine, produits de substitution de l' α -phényléthylamine).

Parmi les nombreux composés de structure (R,R')CH-NH₂ examinés, seuls la β -phényl- β -alanine et l'acide amino-3-butyrique ne donnent pas lieu à la réaction photochimique.

Dans le groupe des amines (R,R')CH-NH₂, la présence dans les radicaux R ou R' de certains groupements atomiques entraîne un comportement particulier;

* Une réaction photochimique entre la cyclohexylamine et la ninhydrine a été signalée, dans des conditions tout à fait différentes, par MIZELL ET SIMPSON⁸.

aussi nos résultats appellent-ils les remarques suivantes, qui précisent le cadre d'application de la réaction photochimique de caractérisation :

(a) les α -amino-acides ($R = -COOH$), les α -amino-alcools ($R = -CH_2OH$) et la plupart des peptides, que l'on peut également considérer comme des amines du type $(R,R')CH-NH_2$, se colorent très nettement en l'absence de toute irradiation lumineuse; la lumière ne renforce même pas l'intensité de la coloration.

(b) les spots de la *cis*- et de la *trans*-phényl-2-cyclopropylamine se colorent en violet à l'obscurité, ce qui s'explique par le mécanisme particulier de réaction de ces deux amines avec la ninhydrine¹⁰; il en est de même de la (γ -pyridyl)-1-éthylamine, de la (tétrazolyl-5')-1-éthylamine, de l'amino-3-quinuclidine et, à un moindre degré, de la (β -pyridyl)-1-éthylamine dont le spot faiblement violacé après le séjour à l'obscurité se colore ensuite fortement à la lumière.

Laboratoire de Biochimie Médicale "B",
Faculté de Médecine et de Pharmacie,
33-Bordeaux (France)

E. NEUZIL
J. JOSSELIN
Y. VIDAL

- 1 D. F. DAVIES, K. M. WOLFE ET H. M. PERRY, JR., *J. Lab. Clin. Med.*, 41 (1953) 802.
- 2 M. YAMAGISHI, *J. Pharm. Soc. Jap.*, 74 (1954) 1233.
- 3 E. NEUZIL, J.-C. BRETON ET H. PLAGNOL, *Bull. Mém. École Nat. Méd. Pharm. Dakar*, 5 (1957) 251.
- 4 S. RUHEMANN, *J. Chem. Soc.*, 99 (1911) 1486.
- 5 D. A. MACFADYEN, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 1.
- 6 E. NEUZIL, J. JOSSELIN ET J.-C. BRETON, *C.R. Acad. Sci.*, 252 (1961) 119.
- 7 Y. VIDAL, *Thèse Doct. Univ. Bordeaux (Sciences)*, 1970.
- 8 M. MIZELL ET S. B. SIMPSON, JR., *J. Chromatogr.*, 5 (1961) 157.
- 9 E. NEUZIL, J.-C. BRETON ET H. PLAGNOL, *Bull. Mém. École Nat. Méd. Pharm. Dakar*, 7 (1959) 195.
- 10 E. NEUZIL, A. PAUC ET Y. VIDAL, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 106 (1967) 60.

Reçu le 1 décembre 1970

J. Chromatogr., 56 (1971) 311-315