

CHROM. 5366

Identification par chromatographie sur couches minces des chlorhydrates des méthylamines et des éthylamines

La chromatographie des alkylamines sur colonne, sur couches minces ou sur papier, avec des solvants variés¹⁻¹⁰ sépare les termes en C₃ et au delà. Des difficultés, dues surtout à l'adsorption des amines sur les supports, sont tournées en chromatographiant les dérivés acylés¹⁴⁻²⁴: alors les premiers termes sont séparés. Mais nous cherchons une méthode de chromatographie directe, sans traitement préalable, afin de décélérer des alkylamines en C₁ et C₂* que nous soupçonnons présentes dans les mélanges sels d'ammonium-méthanal²⁵. Ces mélanges sont utilisés dans la formol-titration de RONCHESE où l'on devrait voir tout l'azote se transformer en hexaméthyl-ènetétramine seule: en fait, une partie de l'azote se trouve combinée sous d'autres formes (imines, amines, etc.).

Partie expérimentale, chromatographie ascendante sur couches minces

Produits utilisés. Solvants et réactifs: Merck ou Prolabo. Chlorhydrates d'alkylamines Fluka et Carlo Erba. Le chlorhydrate de tri-*n*-butylamine est obtenu par neutralisation de la base en solution aqueuse.

Préparation des couches minces. Étaleur de Stahl à fente réglable (Desaga): 250 à 350 μm sur plaques de verre, longueur 200 mm.

Les différents supports employés sont: la terre siliceuse G pour CCM et le gel de silice G selon Stahl pour CCM (Merck), la poudre de cellulose pour CCM (Pleuger) et la poudre de cellulose MN 300 sans liant (Macherey et Nagel), la poudre de cellulose avec gypse pour CCM (Pleuger), les résines AG 50W-X8 pour CCM, 200-400 mesh, sphériques, avec liant et "Chelex 100", 200-400 mesh (Bio-Rad).

Composition des réactifs de révélation. R₁, ninhydrine 0.27 g, pyridine 5 ml, méthanol 95 ml; R₂, ninhydrine 0.27 g, pyridine 5 ml, DMSO 95 ml; R₃, naphthoquinone-1,2 sulfonate de sodium 0.60 g dissous dans 12 ml d'eau, ajouter éthanol 90° jusqu'à 200 ml et enfin 10 ml de pyridine; R₄, 1.5 g d'iode bisublimé dissous dans 250 ml d'éther de pétrole. R₁, R₂, R₃ sont employés en pulvérisation, R₄ en bain.

Lecture des chromatogrammes. Dans nos conditions opératoires, l'identification des taches demande que deux R_F voisins diffèrent au moins de 0.06 unité pour que ces taches soient absolument indépendantes.

Résultats et discussion

Efficacité de la révélation

Nous avons choisi nos quatre réactifs après essais de nombreux révélateurs proposés pour les amines. L'iode révèle les amines primaires, secondaires et tertiaires en les colorant identiquement. Par analogie nous avons essayé l'action du brome et du chlore sans aucun avantage.

La ninhydrine est beaucoup plus sensible que l'iode mais elle n'est pas plus spécifique des amines²⁶⁻²⁸. Elle ne doit pas révéler les amines tertiaires: seule BERTETTI⁴ signale la possibilité d'une faible coloration avec celles-ci. Nous avons

* Abréviations utilisées dans ce mémoire: Me = méthylamine, DiMe = diméthylamine, TriMe = triméthylamine, E = éthylamine, DiE = diéthylamine, TriE = triéthylamine.

TABLEAU I

 R_F DANS LE SOLVANT ALCOOL ISOAMYLIQUE-ACIDE CHLORHYDRIQUE SUR CELLULOSE SANS LIANT

Composition du solvant	R	Me	DiMe	TriMe	E	DiE	TriE	Mélange	Temps de migration (h)
100:40	R ₁	0.34	0.42	"	0.48	0.75	"	0.34-0.45	13
	R ₂	0.34	0.42	0.43	0.48	0.75	0.76	0.50-0.79	
	R ₄	0.34	0.42	0.43	0.48	0.75	0.76		
150:30	R ₁	0.28	0.38	"	0.45	0.73	"	0.28-0.40 0.46-0.73	9

^a Amines tertiaires non révélées, $c \leq 20\%$.

chromatographié sur cellulose avec différents solvants (Tableaux I, II, V) les solutions aqueuses pures à 30% de chlorhydrate de TriMe, TriE, tributylamine et les mélanges de chlorhydrates de TriMe à 30% et de Me à 10% ou de DiMe à 20% et d'E à 10%. Les plaques sont séchées à l'air normalement et pulvérisées avec les réactifs R₁ ou R₂, mises à l'étuve à 60° puis chauffées lentement jusqu'à 90-100°. Les trois amines tertiaires seules ou séparées de ces mélanges donnent des taches pâles distinctes jaunes, vertes ou bleues quelquefois incolores, mais parfaitement décelables cependant car les plaques de cellulose après traitement à la ninhydrine et chauffage présentent un fond très légèrement coloré en rose—traces d'alcool de la phase mobile²⁰—et les taches tranchent nettement alors. Les R_F sont confirmés sur d'autres plaques révélées avec l'iode R₄.

TABLEAU II

 R_F DANS LES SOLVANTS ALCOOLS VARIÉS-ACIDE CHLORHYDRIQUE SUR CELLULOSE SANS LIANT
Révélateur R₁.

Composition du solvant	Me	DiMe	TriMe	E	DiE	Mélange	Temps de migration (h)
Alcool heptylique normal-HCl (100:13)	0.12	0.15	—	0.22	0.46	0.10-0.15 0.21-0.47	9
Alcool heptylique normal-HCl (100:45) (saturation)	0.29	0.38	0.34 ^a	0.43	0.64	0.27-0.37 0.43-0.64	19½
Alcool isoamylique-alcool heptylique-HCl (10:50:15)	0.22	0.29	—	0.37	0.63	0.22-0.30 0.37-0.63	9
Alcool isoamylique-alcool octylique secondaire-HCl (1:2:1)	0.24	0.32	—	0.39	0.64	0.24-0.32 0.37-0.63	10½

^a Révélateur R₂.

Après chromatographie bidimensionnelle des solutions aqueuses à 30% des amines tertiaires précédentes, la ninhydrine ne révèle plus que la tri-*n*-butylamine: la dilution des taches après deux migrations abaisse trop la concentration pour que les amines tertiaires légères soient encore révélées. Donc les amines tertiaires sont détectées par la ninhydrine quand leur concentration atteint un seuil suffisant. Le Tableau III résume le comportement des six amines vis à vis des réactifs de révélation utilisés.

TABLEAU III

Durée de vie des colorations des taches^b: R₁ et R₃, plusieurs jours; R₂, plusieurs jours, maximum d'intensité quelquefois au bout d'un jour; R₄, quelques minutes. Couleur du fond (phase fixe)^{a,b}: R₁ et R₂ incolore ou légèrement rosé. Peut devenir violet quand la température de révélation dépasse 90°; les taches sont alors visibles car elles se décolorent; R₃, jaune; R₄, jaune pâlissant très rapidement.

Alkylamines C ₁ et C ₂	Couleur des taches ^{a,b}				Intensité relative des taches ^{b,c}		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁ , R ₂	R ₃	R ₄
Me	jaune, gris,	vert pré,		jaune	+++	+±	+
DiMe	bleu à violet	violet, gris	rose soutenu	à orange	+±	+	+
TriMe	incolore, jaune pâle, vert pâle, violet pâle		o	jaune à orange	±	o	+++
E	jaune, bleu foncé à violet	vert pré, violet foncé	violet pâle	jaune à orange	++++	+++	++
DiE	jaune, bleu pâle	vert pré, bleu- violet	rose à peine visible	jaune à orange	+	±	+
TriE	incolore, jaune pâle, vert léger		o	orange	±	o	+++

^a En lumière blanche.

^b Appréciation subjective à l'œil.

^c o, aucune coloration; ±; +; +±; ++; +++; +++++; coloration d'intensité croissante.

Séparation en milieu acide

Sur cellulose sans liant. Un éluant ternaire, acide-alcool-eau sépare quatre amines sur six. Avec l'acide acétique les taches sont brouillées par des altérations de couleur plus faible en deça ou au delà de la tache. Le mélange *n*-butanol-acide chlorhydrique-eau a l'avantage sur le précédent de donner de belles taches sans trainée. Avec l'alcool isoamylique au lieu de butanol la proportion optimale d'acide chlorhydrique est de 28.6% en volume d'acide pur ($d = 1.19$). La séparation est meilleure (Tableau I).

On observe que ce sont les alcools les plus "lourds" (heptylique, octylique etc.) qui assurent la meilleure séparation, mais ils augmentent le temps de chromatographie et de séchage des plaques (Tableau II).

Avec les meilleurs solvants (voir Tableaux I et II), la chromatographie du mélange des six chlorhydrates d'amines—0.20 μ l contenant 7 μ g de chaque amine primaire, 15 μ g de chaque secondaire et 20 μ g de chaque tertiaire—permet la séparation et la caractérisation de la Me, DiMe, E, DiE, en révélant les chromatogrammes avec les réactifs R₁ ou R₂. TriMe et TriE en quantité insuffisante ne sont pas révélées. Mais leurs R_F déterminés avec l'iode sont très voisins de ceux des amines secondaires.

Autres supports. Sur terre siliceuse G, les amines sont moins retenues que sur cellulose; la séparation est du même genre mais beaucoup moins efficace et moins

TABLEAU IV

 R_F SUR GEL DE SILICE

Révéléateur R_1 . Couleurs des taches: Me = violet foncé; DiMe = violet foncé; TriMe = jaune, vert, bleu; E = violet foncé; DiE = bleu foncé à violet; TriE = jaune.

Solvant	Me	DiMe	TriMe	E	DiE	TriE	Mélanges	Temps (h)
alcool isoamylique-HCl (100:40)	0.32	0.26	0.22	0.37	0.35	0.31	0.22-0.30 0.37	12
alcool heptylique normal- HCl (100:40)	0.22	0.16	0.12	0.25	0.23	0.16	0.12-0.17 0.23	20
alcool heptylique normal- HCl (100:45)	0.22	0.14	0.10	0.23	0.20	0.15	0.11-0.16 0.23	17

belle avec des traînées et deux fronts de solvant. Par contre le gel de silice G, avec les mêmes solvants permet de séparer la TriMe dans le mélange des six amines comme le montre le Tableau IV. Il reste le problème de la TriE qui est masquée quelque soit le support et le solvant acide employés.

Remarquons enfin que les amines sont retenues par la phase fixe dans l'ordre suivant: Terre siliceuse G < cellulose < gel de silice.

Chromatographie d'échange. La méthode de séparation des ions monovalents²⁹⁻³⁷ sur résine AG 50W-X8, éluée par l'acide nitrique 1/6, n'est pas efficace pour les chlorhydrates de nos amines.

Sur support de poudre de cellulose imprégnée d'acide silico-12 tungstique en solution aqueuse à 5%, séchée à l'air, puis éluée par l'alcool isoamylique-acide chlorhydrique (100:40), les résultats sont assez identiques à ceux de la chromatographie sur cellulose pure.

Sur cellulose mélangée avec de la résine "Chelex 100", préalablement saturée en cuivre II, (cellulose résine: 1/6 en poids) les amines après migration donnent directement des taches jaunes sur fond vert clair mais la séparation est mauvaise même avec le solvant précédent.

La cellulose imprégnée de cuivre II ou de nickel—solution aqueuse des chlorures³⁸⁻⁴⁰—fournit aussi dès séchage de la plaque chromatographiée des taches

TABLEAU V

 R_F DANS LE SOLVANT *n*-BUTANOL-PYRIDINE-EAU SUR CELLULOSE SANS LIANT

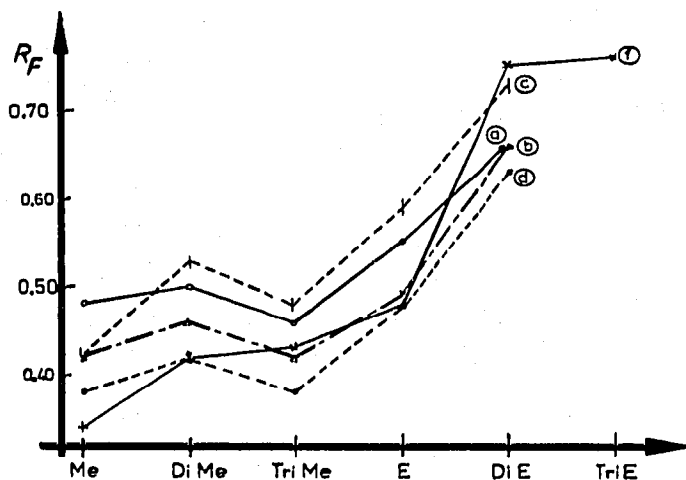
Révéléateur R_1 . Couleurs des taches: Me = gris foncé (c), violet (e) jaune + anneau violet (a); DiMe = jaune pâle (c), jaune clair (a); TriMe = bleu pâle (c), violet pâle (a); E = bleu foncé (c); violet (e), jaune + anneau violet (a); DiE = bleu foncé (c), jaune clair (a).

Composition du solvant	Me	DiMe	TriMe	E	DiE	Mélange	Temps de migration	Observations
(a) 30:90:30	0.48	0.50	0.46	0.55	0.66	—	3 h	taches rondes sans traînées
(b) 30:108:30	0.42	0.46	0.42	0.49	0.66	0.40-0.45 0.52-0.66	1 h 25 min	taches ovales sans traînée
(c) 30:120:30	0.42	0.53	0.48	0.59	0.73	0.46-0.53 0.60-0.72	1 h 30 min	taches ovales sans traînée
(d) 30:138:30	0.38	0.42	0.38	0.48	0.63	0.38-0.43 0.49-0.62	1 h 25 min	taches rondes sans traînée
(e) 20:100:30	0.46	0.49	0.45	0.53	0.66	0.43-0.49 0.55-0.66	3 h 50 min	taches ovales sans traînée

colorées (jaunes sur fond vert dans le cas du cuivre, bleues sur fond blanc dans le cas du nickel), même pour les amines tertiaires. Les amines forment donc des complexes relativement stables avec ces ions métalliques même en milieu fortement acide. La résolution du mélange est identique à celle sur cellulose pure (Tableau I). Dans nos conditions opératoires, le cuivre et le nickel ne semblent jouer qu'un rôle de révélateur.

Séparation en milieu alcalin

Nous avons utilisé le mélange *n*-butanol-pyridine-eau (30:90:30) employé pour la séparation des amino-acides⁴¹. Pour comparer ses qualités avec celles des solvants acides nous faisons varier sa composition. Les variations des teneurs en alcool ou en eau sont défavorables: il faut garder le rapport alcool-eau (1:1). La teneur optimale en pyridine apparaît dans le mélange (30:120:30) sans cependant séparer parfaitement DiMe et TriMe, — R_F 0.53 et 0.48—(Tableau V). L'ordre



Eig. 1. R_F comparés des amines sur cellulose en milieu acide ou alcalin. Solvants a, b, c et d, voir Tableau V; f, alcool isoamylique-acide chlorhydrique (100:40).

croissant des R_F s'établit alors: Me < TriMe < DiMe < E < DiE. La TriE donne le même R_F que la DiE. Ce milieu alcalin est donc égal et même légèrement supérieur aux meilleures phases acides en considérant les valeurs relatives des R_F (Figure 1).

Conclusions

La séparation de Me, DiMe, E, DiE est obtenue sur cellulose sans liant en milieu acide, par exemple alcool isoamylique-acide chlorhydrique (100:40) ou en milieu alcalin *n*-butanol-pyridine-eau (30:120:30).

En présence d'amines tertiaires en faible quantité la séparation s'effectuera de même, sans gêne pour la révélation à la ninhydrine.

Avec la TriMe en forte quantité on identifiera les cinq amines sur cellulose en milieu alcalin puis la TriMe sera confirmée par chromatographie sur gel de silice avec un solvant acide et révélation à la ninhydrine avec chauffage très progressif.

La TriE donne le même R_F que la DiE sur cellulose ou la DiMe sur gel de silice, on ne peut donc pas l'identifier. Dans le cas où sa concentration lui permettrait d'être révélée par la ninhydrine et de gêner l'identification de la DiE ou de la DiMe

une chromatographie bidimensionnelle résoudra cette difficulté puisqu'alors la TriE diluée ne sera plus révélée.

Laboratoire de Chimie Minérale,
Faculté de Pharmacie de Nancy,
BP. 403, 54 Nancy (France)

PH. BAUDOT

- 1 J. M. BREMNER ET R. H. KENTEN, *Biochem. J.*, 49 (1951) 651.
- 2 R. SCHWYZER, *Acta Chem. Scand.*, 6 (1952) 219.
- 3 M. STEINER ET E. STEIN VON KAMIENSKI, *Naturwissenschaften*, 40 (1953) 483.
- 4 J. BERTETTI, *Ann. Chim. (Rome)*, 43 (1953) 351 et 361.
- 5 W. DIHLMANN, *Biochem. Z.*, 325 (1954) 295.
- 6 K. TEICHERT, E. MUTSCHLER ET H. ROCHELMEYER, *Deut. Apoth. Ztg.*, 100 (1960) 283.
- 7 E. MERCK AG, *Chromatographie*, 85-86.
- 8 E. LEDERER, *Chromatographie en Chimie Organique et Biologique*, Vol. I, Masson, Paris, 1959, 78-81, 497-498.
- 9 L. MEITES, *Handbook of Analytical Chemistry*, 1e éd., Mc Graw-Hill, New York, Toronto, London, 1963, pp. 10-73.
- 10 J. M. BOBITT, *Thin-Layer Chromatography*, Reinhold, New York, London, 1963, p. 133.
- 11 H. GRASSHOF, *J. Chromatogr.*, 20 (1965) 163.
- 12 D. MIKEŠ, *Laboratory Handbook of Chromatographic Methods*, D. van Nostrand, London, 1966, pp. 127-128.
- 13 S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
- 14 K. RANDEPATH, *Thin-Layer Chromatography*, Verlag Chemie Academic Press, New York, London, 1963, pp. 90-91.
- 15 J. G. KIRCHNER, *Thin-Layer Chromatography*, Interscience, J. WILEY & Sons, New York, London, Sydney, 1967, pp. 293-295.
- 16 E. STAHL, *Thin-Layer Chromatography*, 2e éd., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1969, pp. 494-496.
- 17 S. PATAI, *The Chemistry of the Amino Group*, Interscience, J. Wiley & Sons, London, New York, Sydney, 1968, p. 98.
- 18 G. NEURATH ET E. DOERK, *Chem. Ber.*, 97 (1964) 172.
- 19 N. SEILER ET M. WIECHMANN, *Experientia*, 21 (1965) 203.
- 20 T. MOMOSE ET M. NAKAMURA, *Chem. Pharm. Bull. Jap.*, 10 (1962) 553.
- 21 A. JART ET A. J. BIGLER, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 255.
- 22 H. VAN DUIN, *Biochim. Biophys. Acta.*, 12 (1953) 490.
- 23 I. M. LOCKHART, *Nature*, 177 (1956) 393.
- 24 D. B. PARIHAR, S. P. SHARMA ET K. K. VERMA, *J. Chromatogr.*, 26 (1967) 292.
- 25 PH. BAUDOT, *Chim. Anal.*, 51 (1969) 425.
- 26 J. L. GAUMET, *Thèse*, Faculté des Sciences, Bordeaux, 1969.
- 27 D. GROSS, *J. Chromatogr.*, 10 (1963) 233.
- 28 E. D. SCHILLING, P. I. BURCHILL ET R. A. CLAYTON, *Anal. Biochem.*, 5 (1963) 1.
- 29 E. HEFTMANN, *Chromatography*, Reinhold, New York, 1961, pp. 285-288, 321-322.
- 30 L. MEITES, *Handbook of Analytical Chemistry*, 1e éd., Mc Graw-Hill, New York, Toronto, London, 1963, pp. 10-159 et 164.
- 31 J. C. GIDDINGS ET R. A. KELLER, *Adv. Chromatogr.*, 20 (1965) 1 et 34.
- 32 D. MIKEŠ, *Laboratory Handbook of Chromatographic Methods*, D. van Nostrand, London, 1966, p. 284.
- 33 J. A. BERGER, G. MEYNIEL ET J. PETIT, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 195.
- 34 J. G. KIRCHNER, *Thin-Layer Chromatography*, Interscience, J. Wiley & Sons, New York, London, Sydney, 1967, pp. 721-722.
- 35 F. W. E. STRELOW, J. H. J. COETZEE ET C. R. VAN ZYL, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 196.
- 36 L. L. WILSON ET D. W. WILSON, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 11B, Elsevier, Amsterdam, 1968, pp. 254-257.
- 37 G. L. STAROBINETS, A. B. CHIZHEVSKAYA, R. V. MARTSINKEVICH ET L. M. DVSYANKO, *Teor. Innogo Obmena Khromatogr., Tr. Vses. Nauch.-Tekh. Konf.*, (1965) 78. *C.A.*, 71 (1969) 53990v.
- 38 F. HELFFERICH, *Nature*, 189 (1961) 1001.
- 39 K. SHIMOMURA, L. DICKSON ET H. F. WALTON, *Anal. Chim. Acta*, 37 (1967) 102.
- 40 R. A. A. MUZZARELLI, A. FERRERO MARTELLI ET O. TUBERTINI, *Analyst*, 94 (1969) 616.
- 41 R. MUNIER, C. THOMMEGAY ET G. SARRAZIN, *Bull. Soc. Chim.*, 10 (1967) 3971.

Reçu le 12 janvier 1971; manuscrit modifié reçu le 23 mars 1971