

CHROM. 6077

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE DER 2,4-DINITROPHENYLDERIVATE WASSERDAMPFFLÜCHTIGER AMINE UND IHRE ANWENDUNG AUF DIE TRENNUNG PFLANZLICHER AMINE

HEIDE-INGE ILERT UND THOMAS HARTMANN

Pharmakognostisches Institut der Universität Bonn, 53 Bonn 1 (B.R.D.)

(Eingegangen am 6. März 1972)

SUMMARY

Thin-layer chromatography of the 2,4-dinitrophenyl derivatives of simple steam volatile amines and its application to the separation of plant amines

Three solvent systems are described for separating the dinitrophenyl derivatives of steam volatile amines (DNP-amines) on Silica Gel HF₂₅₄. The solvent system pentane-acetic acid-isoamylester-ammonia (70:29:1) is particularly useful for the separation of amines found in biological materials. The separation of higher homologous aliphatic monoamines, and the isomeric propylamines, butylamines, and amylamines, which is not practicable with these solvents, has been carried out successfully by using a chromatographic system described by SCHWARTZ *et al.*¹⁰. Some examples are given to illustrate the efficiency of this method. Thus the occurrence of octylamine (apple fruit) and of 2-methylbutylamine (*Lychnis coronaria*) has been demonstrated in plants for the first time.

DNP-amines separated on Silica Gel H can be determined quantitatively by spectrophotometric methods after elution with methanol.

EINLEITUNG

Die durch alkalische Wasserdampfdestillation aus biologischem Material isolierbaren Amine stellen eine verhältnismässig einheitliche Fraktion dar, die sich, von wenigen Ausnahmen abgesehen (PÄA, BzA)*, aus den homologen aliphatischen Monoaminen zusammensetzt.

Diese im Pflanzenreich weit verbreitet, zumeist in Gemischen, vorkommenden Amine^{1,2} lassen sich als Salze, zumeist Hydrochloride, oder in Form geeigneter Derivate auftrennen. Während sich zur Trennung der hydrophilen Aminhydrochloride die Papierchromatographie bewährt³, bietet sich zur Trennung der lipophilen Aminderivate die Dünnschichtchromatographie (DC) an. Zur Trennung der Amine nach Überführung in geeignete Derivate liegen zahlreiche Vorschläge vor: 3,5-Dinitrobenzamide^{4,5}; 4-Nitroazobenzolcarbonsäure-4-amide⁶; 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonamide⁷⁻⁹; β -Phenylazobenzolsulfonamide¹⁰; 2,6-Dinitrophenylhydrazon-

pyruvamide¹¹; β -Aminovinyl-*o*-hydroxyphenylketone¹²; 4-Dimethylamino-3,5-dinitrobenzoylamide¹³; 2,4-Dinitrophenylamine^{14,15}.

Bei eigenen Untersuchungen haben sich die zuletzt genannten Dinitrophenyl-derivate (DNP-Amine) besonders bewährt^{16,17}. Die im folgenden beschriebene Methode erlaubt die DC-Trennung aller bisher aus der Natur bekannten wasserdampf-flüchtigen primären und sekundären Amine, einschliesslich der problematischen Propyl-, Butyl-, und Amylamine.

EXPERIMENTELLES

Die Aminextraktion aus biologischem Material erfolgte in bekannter Weise durch alkalische Wasserdampfdestillation^{1,16}.

Darstellung der DNP-Amine¹⁶

Zur Synthese der Testsubstanzen werden 5 mmol Amin-HCl und 5 mmol 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB) in 50 ml Aceton mit einer Lösung von 10 mmol NaHCO₃ in 50 ml Wasser gemischt und 40 min bei 60° gehalten. Nach dem Abkühlen wird etwas festes NaHCO₃ zugesetzt und das DNP-Amin durch Ausschütteln mit Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte werden mit Na₂SO₄ sicc. getrocknet und eingedampft. Das DNP-Amin wird dreimal aus heissem Methanol (DÄA aus 96 % Äthanol) umkristallisiert.

Zur Umsetzung von Aminfraktionen aus biologischem Material für qualitative und quantitative Untersuchungen siehe HARTMANN¹⁶.

Analytische Dünnschichtchromatographie

DC-Platten werden in üblicher Weise mit Kieselgel HF₂₅₄ (Merck) 0.25 mm dick beschichtet¹⁸. Vor Gebrauch wird 2 h bei 110° aktiviert. Fließmittel: (AI) Pentan-Essigsäure-isoamylester-Ammoniak (70:29:1); (AII) Benzol-Äthylacetat-Petroläther (Siedeb. 40–60°) (97:2:1); (AIII) Pentan-Benzol-Triäthylamin (45:45:10).

Zur Detektion der DNP-Amine genügt in der Regel die Betrachtung im UV-Licht (254 nm).

Trennsystem in Anlehnung an SCHWARTZ *et al.*¹⁰: 14 g bei 800° 16-h geglühtes MgO (Merck 5866) werden mit 7 g Kieselguhr (Merck 8129) in einem Gemisch aus 8 ml Polyäthylenglykol-400 (Fluka) und 48 ml Äthanol in einem fest verschlossenen Kolben 5 min kräftig geschüttelt. Ein gelegentliches Verklumpen des Gemisches lässt sich durch Zusatz einiger weiterer Milliliter Äthanol beheben. Die wie üblich beschichteten Platten werden 15 min luftgetrocknet und anschliessend 10 min bei 110° aktiviert. Als Fließmittel dient *n*-Heptan, gesättigt mit Polyäthylenglykol-400 (AIV). Zur Äquilibrierung der Kammeratmosphäre muss das Fließmittel 16 h vor Versuchsbeginn angesetzt werden. Die Platten werden in Streichrichtung entwickelt.

Zur Detektion der DNP-Amine ist ausser der Betrachtung im UV-Licht (366 nm) auch das Besprühen der Platten mit einer alkalischen Nitromethanlösung geeignet¹⁰.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Die wie üblich beschichteten Platten (25 g Kieselgel H pro 20 × 20 cm Platte)

oder AII entwickelt. Man kratzt die gewünschte Aminzone aus, extrahiert wahlweise mit Methanol oder nach Zugabe einiger Milliliter wässriger NaHCO_3 -Lösung mit Äther. Die Extrakte werden zur Trockne eingedampft und im geeigneten System analytisch rechromatographiert.

Quantitative Dünnschichtchromatographie

Man verwendet an Stelle von Kieselgel HF₂₅₄ Kieselgel H ohne Fluoreszenzindikator, trägt die zu bestimmende nach HARTMANN¹⁶ quantitativ gewonnene DNP-Aminprobe strichförmig (6 cm) aus einer Mikroliterspritze auf und entwickelt mit AI. Die zu bestimmenden Substanzonen werden sorgfältig ausgekratzt und in einem festverschlossenen Zentrifugenglas mit 5.0 ml Methanol unter kräftigem Schütteln extrahiert. Als Blindwert wird eine entsprechend grosse, aminfreie Kieselgelzone extrahiert. Nach Abzentrifugieren des Kieselgels wird der Überstand bei 350 nm ($D = 10$ mm) gegen den Blindwert im Spektralphotometer ausgemessen.

ERGEBNISSE

Allgemeine Trennverfahren

In Tabelle I sind die R_F -Werte der überprüften DNP-Amine in vier Trennsystemen zusammengefasst. Die R_F -Werte sind, wie zumeist bei DC, nur annähernd reproduzierbar, so dass es sich empfiehlt, zur sicheren Identifizierung stets Testsubstanzen mitzuchromatographieren.

Die Fließmittel AI, AII, und AIII lassen sich zu zweidimensionalen Systemen kombinieren. Mit ihnen gelingt bis auf die Trennung der höheren Homologen des HxA, der isomeren Propyl- und Butylamine, und der Abtrennung von MBA von

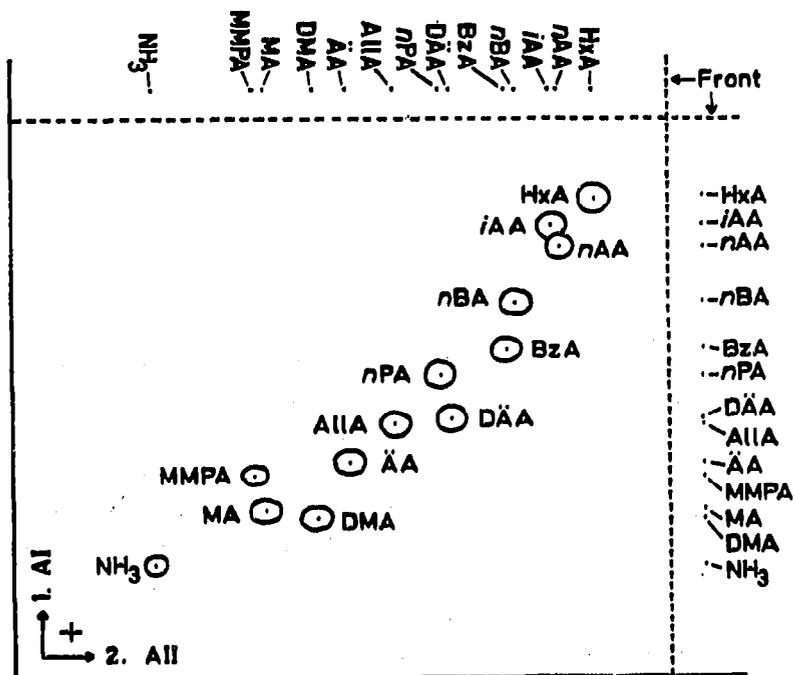


Fig. 1. Zweidimensionale Trennung der DNP-Derivate wasserdampfvlüchtiger Amine an Kieselgel

TABELLE I

R_F-WERTE DER DNP-AMINE IN VERSCHIEDENEN DC TRENNSYSTEMEN

Stationäre Phasen: Kieselgel HF₂₅₄ und Polyäthylenglykol. Fließmittel: (AI) Pentan-Essigsäure-isoamylester-Ammoniak (70:29:1); (AII) Benzol-Äthylacetat-Petroläther (97:2:1); (AIII) Pentan-Benzol-Triäthylamin (45:45:10); (AIV) *n*-Heptan, gesättigt mit Polyäthylenglykol (Lit. 19).

Erfassungsgrenze der Methode: 10⁻³ μmol.

DNP-Amin	Abkürzung	F.p.(°C)	Kieselgel HF ₂₅₄			Polyäthylenglykol
			AI	AII	AIII	AIV
<i>DNP-</i>						
Ammoniak	NH ₃	182	0.12	0.13	0.03	0.00
Methylamin	MA	179	0.21	0.33	0.30	0.01
Dimethylamin	DMA	85	0.19	0.39	0.34	0.03
Äthylamin	ÄA	113.5	0.32	0.44	0.59	0.05
Diäthylamin	DÄA	79.5	0.42	0.54	0.69	0.13
<i>n</i> -Propylamin	<i>n</i> PA	95	0.50	0.52	0.75	0.10
Isopropylamin	<i>i</i> PA	94.5	0.49	0.53	0.74	0.15
<i>n</i> -Butylamin	<i>n</i> -BA	90	0.64	0.60	0.81	0.16
Isobutylamin	<i>i</i> BA	80	0.66	0.57	0.82	0.19
<i>n</i> -Amylamin	<i>n</i> AA	82	0.75	0.66	0.85	0.23
Isoamylamin	<i>i</i> AA	91.5	0.79	0.64	0.86	0.24
2-Methylbutylamin	MBA	46-47	0.75	0.65	0.85	0.26
<i>n</i> -Hexylamin	HxA	51	0.84	0.70	0.88	0.32
<i>n</i> -Heptylamin	HpA	^a	0.89	0.73	0.88	0.41
<i>n</i> -Octylamin	OA	^a	0.93	0.75	0.90	0.50
<i>n</i> -Decylamin	DA	42.5	0.97	0.78	0.92	0.67
<i>n</i> -Undecylamin	UDA	n.b. ^b	n.b. ^b	n.b. ^b	n.b. ^b	0.73
Allylamin	AllA	68-75	0.43	0.47	0.62	0.02
β-Phenyläthylamin	PÄA	155	0.52	0.54	0.66	0.04
3-Methylmercaptopylamin	MMPA	63	0.28	0.30	0.57	0.03
Benzylamin	BzA	117.5	0.58	0.55	0.67	0.03

^a HpA und OA sind bei Raumtemperatur flüssig. HpA konnte bei -15° zur Kristallisation gebracht werden. OA erstarrte zwar unter diesen Bedingungen, kristallisierte aber nur schlecht aus.

^b n.b. = nicht bestimmt.

*n*AA die Trennung aller untersuchten Amine. AI trennt im eindimensionalen Verfahren am besten und ist zur ersten Überprüfung eines unbekanntes Amingemisches am geeignetsten. Die mit diesem Fließmittel nicht trennbaren Paare MA-DMA, ÄA-MMPA, und DÄA-AllA lassen sich im zweidimensionalen System (AI/AII) gut trennen (Fig. 1). Zur Trennung von PA und PÄA, die auch mit diesem System nicht gelingt, muss AI mit AIII kombiniert werden.

Bei der Analyse von Amingemischen aus biologischem Material ist die Trennung durch die oft sehr unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Amine erschwert. Zur sicheren Erfassung auch der in sehr geringen Mengen vorhandenen Amine empfiehlt sich eine eindimensionale präparative Vortrennung, Elution der interessierenden Aminbanden und analytische Rechromatographie im jeweils günstigsten System.

Bei der präparativen Vortrennung von Aminextrakten aus Blütenpflanzen beobachteten wir gelegentlich eine nicht identifizierte Substanz, die in AI unter Schwanz-

In diesem Fall ist mit AII vorzutrennen, da die Substanz in diesem Fließmittel einen höheren R_F -Wert als HxA aufweist und die Trennung nicht stört.

Spezielle Trennverfahren

Eine wertvolle Ergänzung zu den oben besprochenen Trennverfahren ist die von SCHWARTZ *et al.*¹⁰ zur Trennung der homologen primären und sekundären Amine als DNP-Derivate beschriebene Methode (Tabelle I, AIV). Mit dieser Methode lassen sich nicht nur die höheren homologen Monoamine einwandfrei trennen, sondern es gelingt auch die bisher nur in Einzelfällen^{13,20} mögliche Trennung der isomeren Amine. Die folgenden Beispiele sollen die Leistungsfähigkeit der Methode verdeutlichen.

Höhere homologe Monoamine (Fig. 2A). Die mit der Methode einwandfreie Trennung der homologen aliphatischen Monoamine bis zum DA veranlasste uns, ein bereits früher²⁰ bei der papierchromatographischen Analyse der Aminfraktion aus Äpfeln beobachtetes Amin mit etwas höherem R_F -Wert als HxA erneut zu untersuchen. Nach präparativer Vortrennung des DNP-Amingemisches aus Äpfeln der Sorte "Golden Delicious" und Rechromatographie der interessierenden Zone, liess sich das fragliche Amin als das bisher aus der Natur nicht bekannte Octylamin identifizieren.

Propylamine (Fig. 2B). Die beiden Propylamine werden gut getrennt. Das in der Aminfraktion von *Mercurialis perennis* L. nachgewiesene Propylamin konnte so als *i*PA identifiziert werden. Auch in diesem Fall wurde zur Abtrennung der Hauptamine (MA, *i*AA) zunächst eine präparative Vortrennung durchgeführt.

Butylamine (Fig. 2C). Wegen der geringen R_F -Differenzen lässt sich ein *i*BA-*n*BA-Gemisch nicht zu scharf voneinander abgesetzten Flecken auftrennen. Eine sichere Identifizierung der beiden Isomeren gelingt jedoch durch Cochromatographie. Hierbei empfiehlt es sich die Analyse strichförmig mit den beiden punktförmig an

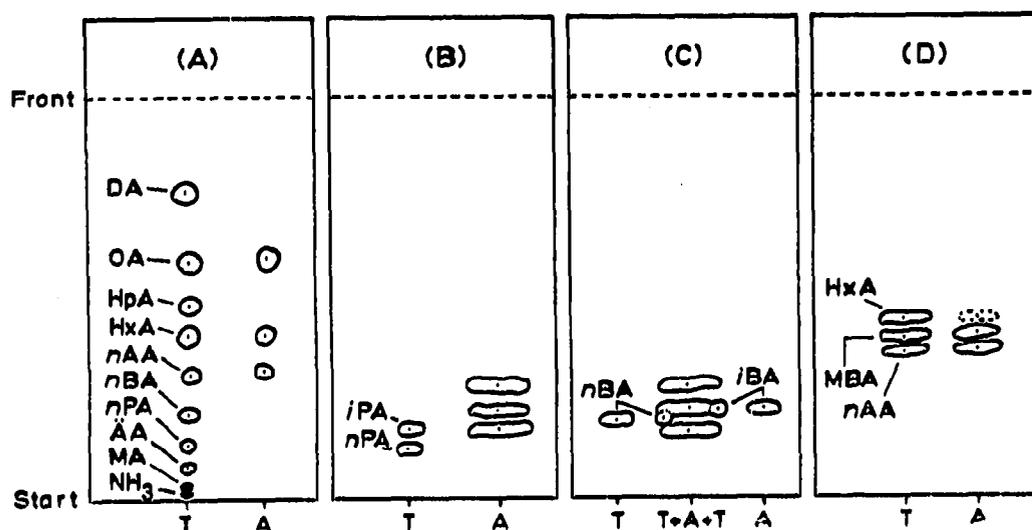


Fig. 2. Beispiele zur Trennung der DNP-Derivate höherer homologer aliphatischer Monoamine und isomerer Propyl-, Butyl-, und Amylamine nach dem Verfahren von SCHWARTZ *et al.*¹⁰. (A) = Homologe Monoamine. Nachweis von Octylamin aus Äpfeln. (B) = Propylamine. Nachweis von Isopropylamin aus *Mercurialis perennis*. (C) = Butylamine. Nachweis von Isobutylamin aus *Mercurialis perennis*. (D) = Amylamine. Nachweis von 2-Methylbutylamin aus *Lychnis*

den Strichenden aufgetragenen Testsubstanzen zu chromatographieren. Auf diese Weise liess sich das BA aus *Mercurialis perennis* als *i*BA identifizieren.

Amylamine (Fig. 2D). Die isomeren Amylamine umfassen *n*AA, *i*AA und MBA. Mit dem Fliessmittel AIV gelingt die Abtrennung des MBA von den beiden anderen, mit diesem System nicht trennbaren, Isomeren. Letztere lassen sich jedoch nach Elution aus der Platte mit dem Fliessmittel AI — gegebenenfalls in Kombination mit AII — auf Kieselgel voneinander trennen (Fig. 1). Mit diesem Verfahren konnten wir aus dem Aminextrakt von *Lychnis coronaria* neben *i*AA auch das bisher aus der Natur nicht bekannte 2-Methylbutylamin nachweisen.

Quantitative Dünnschichtchromatographie der DNP-Amine

DNP-Amine lassen sich papierchromatographisch quantitativ trennen und bestimmen^{10,21}. Die quantitative Aminbestimmung ist auch in Kombination mit DC möglich. Eichkurven der an Kieselgel H mit dem Fliessmittel AI getrennten und nach Elution mit Methanol bestimmten DNP-Amine verlaufen linear. Die molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) der DNP-Amine liegen etwas niedriger als bei direkter Bestimmung ohne Chromatographie (z.B. *n*PA, $\epsilon = 1.735 \cdot 10^4$ bzw. $1.794 \cdot 10^4$; HxA, $\epsilon = 1.765 \cdot 10^4$ bzw. $1.840 \cdot 10^4$). Diese bei der chromatographischen Trennung nicht vermeidbaren Verluste von 3 bis 4 % sind konstant, machen jedoch die Aufstellung eigener Eichkurven notwendig. Der für die Bestimmung günstigste Extinktionsbereich liegt bei 0.2–0.6, entsprechend 0.06–0.17 μ mol Amin pro Bestimmungsansatz (5 ml). Leerextrakte zeigen im Messbereich der DNP-Amine (350 nm) eine nur geringe und konstante Absorption ($E = 0.002$ – 0.003 pro cm^2 Kieselgelfläche).

ZUSAMMENFASSUNG

Drei Fliessmittelsysteme zur Trennung wasserdampf-flüchtiger Amine in Form ihrer Dinitrophenylderivate (DNP-Amine) an Kieselgel HF₂₅₄ werden beschrieben. Besonders geeignet zur Auftrennung von Amingemischen aus biologischem Material ist das System Pentan–Essigsäure-isoamylester–Ammoniak (70:29:1). Die mit diesen Systemen nicht mögliche Trennung der höheren homologen aliphatischen Monoamine und isomeren Propyl-, Butyl-, und Amylamine lässt sich mit dem von SCHWARTZ *et al.*¹⁰ beschriebenen Verfahren erreichen. An einigen Beispielen wird die Leistungsfähigkeit der Methode verdeutlicht. So gelang der chromatographische Nachweis des aus der Natur bisher nicht bekannten Octylamins aus Äpfeln und des 2-Methylbutylamins aus *Lychnis coronaria*.

Die an Kieselgel H aufgetrennten DNP-Amine lassen sich nach Elution mit Methanol spektralphotometrisch quantitativ bestimmen.

LITERATUR

- 1 E. STEIN V. KAMIENSKI, *Planta*, 50 (1957) 315.
- 2 T. A. SMITH, *Biol. Rev.*, 46 (1971) 201.
- 3 E. STEIN V. KAMIENSKI, *Planta*, 50 (1957) 291.
- 4 M. VEČEŘA UND J. GASPARIČ, *Chem. Ind.*, (1957) 263.
- 5 M. VEČEŘA UND J. GASPARIČ, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 24 (1959) 465.
- 6 G. NEURATH UND E. DÖRK, *Chem. Ber.*, 97 (1964) 172.

- 9 N. SEILER UND M. WIECHMANN, *J. Chromatogr.*, 28 (1967) 351.
- 10 A. JAART UND A. J. BIGLER, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 255.
- 11 D. P. SCHWARTZ UND A. C. R. BREWINGTON, *Microchem. J.*, 12 (1967) 547.
- 12 K. KOSTKA, *J. Chromatogr.*, 49 (1970) 249.
- 13 I. P. G. WIROTAMA UND K. H. NEY, *J. Chromatogr.*, 61 (1971) 166.
- 14 I. M. LOCKHART, *Nature*, 177 (1956) 393.
- 15 A. M. ASATOOR, *J. Chromatogr.*, 4 (1960) 144.
- 16 T. HARTMANN, *Planta*, 65 (1965) 315.
- 17 D. DÖNGES, M. STEINER, K.-W. GLOMBITZA UND T. HARTMANN, *Pharmazie*, 24 (1969) 672.
- 18 K. RANDEKATH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 2. Aufl., 1965.
- 19 D. P. SCHWARTZ., R. BREWINGTON UND O. W. PARKS, *Microchem. J.*, 8 (1964) 402.
- 20 T. HARTMANN, *Experientia*, 23 (1967) 680.
- 21 D. KORDTS, R. VOIGT UND F. WEISS, *Pharmazie*, 15 (1960) 586.

J. Chromatogr., 71 (1972) 119-125