

Aus dem Institut für Biochemie und Technologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei Hamburg (BRD)

Über die Bedeutung flüchtiger Aromastoffe bei Fisch

II. Mitteilung

Von H. Trommsdorff

1. Gaschromatographie von Aminen

In einer I. Mitteilung (in: Chemie Mikrobiol. Technol. d. Lebensm. im Druck) wurden die Methodiken der Gewinnung und Anreicherung von flüchtigen Aromastoffen in Bezug auf ihre Anwendbarkeit auf Fisch behandelt. Die vorliegende Arbeit befaßt sich speziell mit der Gaschromatographie von Aminen, da diese Stoffgruppe neben Carbonylen und Schwefelverbindungen im Zusammenhang mit den flüchtigen Stoffen bei Fisch Interesse verdient. Außerdem sei betont, daß die Bestimmung von Trimethylamin sowie des Gesamtbasenstickstoffs (TVB) seit langem zum festen Bestandteil der im Fischereilaboratorium durchgeführten Routineanalysen gehört, Analysen, die im Zusammenhang einer Qualitätsbeurteilung des Fisches durchgeführt werden. Auch vom Standpunkt einer Routineanalyse im Fischereilaboratorium liegt eine gaschromatographische Bestimmung von Aminen im Zuge einer Weiterentwicklung der analytischen Möglichkeiten.

Zur Gaschromatographie von Aminen liegen zahlreiche Veröffentlichungen vor, deren wichtigste hier kurz erwähnt werden sollen.

Bereits James und Martin¹⁾ haben sich 1950 mit der Trennung von Aminen befaßt. Die durch die hohe Polarität der Amine bedingten Schwierigkeiten traten sehr bald zu Tage und führten zu zahlreichen Untersuchungen, die durch die Suche nach einer geeigneten stationären Phase gekennzeichnet waren. Diese Entwicklung ist bis heute noch nicht zum Abschluß gekommen.

Amell und Mitarb.²⁾ trennten Methylamin, Dimethylamin und Diäthylamin an O-Tolluidin als stationärer Phase. Letzteres dampft jedoch sehr leicht vom Trägermaterial ab und ist daher wenig geeignet.

Sze und Mitarb.³⁾ weisen auf die Bedeutung der Inaktivierung des Trägermaterials besonders hin und trennen aliphatische Amine auf Tetrahydroxyläthylendiamin (THED) und Tetraäthylpentamin (TEP).

Van Heuvel und Mitarb.⁴⁾ befassen sich mit der Gaschromatographie von Aminen im Hinblick auf biologisch wichtige Amine und weisen auf die Möglichkeit der Gaschromatographie von Aminderivaten anstelle der freien Amine hin. SE 30 und F 60 dienen als stationäre Phasen.

O'Donnell und Mitarb.⁵⁾ betonen die hohe Oberflächenaktivität der Trägermaterialien auf Basis von Diatomen-erden und empfehlen Chromosorb P. Die stationären Pha-

sen Carbowax 20 M und Carbowax 400 werden mit Dofax 9N9 verglichen, wobei letztere stationäre Phase wegen besserer Trennung und höherer Temperaturbeständigkeit (225° C) der Vorzug gegeben wird. Golovnya und Mitarb.⁶⁾ chromatographieren an verschiedenen stationären Phasen und identifizieren aliphatische Amine durch die entsprechenden Differenzen der Kovats Indices. Heins und Mitarb.⁷⁾ chromatographieren wegen der großen Anzahl möglicher Isomere die Derivate von Pyridinbasen an einer Kapillarsäule mit N,N-bis-Hydroxyäthyltrimethylamin. Häntsch⁸⁾ trennt aliphatische Amine C 1 bis C 5 an 2 stationären Phasen, nämlich Hexaäthylenglycol-dimethyläther und Triäthanolamin sowie dem Siliconöl DC 703. Smith und Mitarb.⁹⁾ empfehlen zur Vermeidung des Tailing die Verwendung von Kunstharzpolymeren wie Porapak Q als Trägermaterial und verwenden zur Gaschromatographie aliphatische Amine als stationäre Phasen, Polyäthylenimin sowie Tetraäthylenpentamin. Nach den Ergebnissen der Verfasser werden homologe Reihen am zweckmäßigsten mit stationären Phasen geringerer Polarität (Apiezon L, Siliconöl) getrennt, während bei Vorliegen von Aminmischungen sehr ähnlicher Siedepunkte der Komponenten eine gewisse Polarität der stationären Phase wie Polyäthylenglycol vorteilhaft ist. Umbreit¹¹⁾ befaßt sich mit der Gaschromatographie von Aminen direkt aus wässrigen Lösungen. Auf einer Vorsäule im Einspritzblock werden aus den Amin-HCl-Salzen mit KOH auf Chromosorb 101 die Amine in Freiheit gesetzt und auf Amin 220 aufgetrennt.

Die Problematik der Chromatographie freier Amine (starke Polarität, hohe Affinität zur stationären Phase. Tailing, hohe Flüchtigkeit der niederen Amine) hat zu Bestrebungen geführt, nicht die freien Amine sondern deren Substitutionsprodukt an der Aminogruppe zu chromatographieren. In diesem Zusammenhang wurden verschiedentlich die Bildung Schiff'scher Basen aus primären Aminen und Ketonen herangezogen. Walle¹²⁾ empfiehlt im Hinblick auf eine gaschromatographische Trennung 2,5-Hexandion als Reagenz, da der Aminostickstoff nunmehr Bestandteil eines aromatischen Pyrolringes ist und keine wesentlichen basischen Eigenschaften mehr aufweist. Moffat und Mitarb.¹³⁾ ziehen diese Reaktion zur Derivatierung von Phenylaminen in Blut und Urin heran unter besonderer Berücksichtigung einer Indikation mit dem ECD (niedere Erfassungsgrenze, selektive Indikation). Die höchste Empfindlichkeit zeigen Derivate mit Pentafluorbenzol.

Day und Mitarb.¹⁴⁾ verwenden die DNP-Derivate primärer und sekundärer Amine (C 1 bis C 4) zur Gaschromatographie. Als stationäre Phase dient DEGS (Diäthylenglycolsuccinat) als Detektor der ECD. Die gleiche Reaktion verwendet auch Walle¹⁵⁾ unter Beachtung quantitativer analytischer Aspekte. Als stationäre Phase diente ein Ge-

misch aus SE 30 und Neopentylglycolsuccinat (NPGS). Am häufigsten wird die Perfluoracetylierung der Aminogruppe bearbeitet, wobei Trifluoressigsäureanhydrid oder neuerdings Heptafluorbuttersäureanhydrid als Reagenz verwendet werden.

*Dove*¹⁶⁾ chromatographiert industriell wichtige aromatische Amine als Trifluoracetylamine an Apiezon J und Carbowax 20 M.

*Irvin*¹⁷⁾ trennt primäre und sekundäre aliphatische Amine sowie Pyridinderivate aus Tabak ebenfalls als Trifluoracetylamine. Polyphenyläthyläther, Apiezon L und DEGS dienen als stationäre Phasen. *Zeman*¹⁸⁾ trennt aliphatische Trifluoracetylamine an einer DEGA-Kapillarsäule und wertet über Massenspektroskopie aus. *Halmekoski*¹⁹⁾ trennt pharmazeutisch interessante Acetylamine an Siliconöl DC 560 T und EGSS-Z. Phenäthylamine werden von *Martin* und Mitarb.²⁰⁾ als Perfluorbenzolderivate an SE 30 chromatographiert und mit einem ECD indiziert. *Ehrsson*²¹⁾ stellt Diperfluor-reaktionsprodukte primärer Amine her und chromatographiert mit OV 1 und QF 1 und einem EC-Detektor. Wegen der hohen Flüchtigkeit der Derivate wird diese Methode für die Gaschromatographie höherer Amine empfohlen.

Auch die Silylierung wird zur Derivatisierung der Aminogruppe herangezogen. So trennen *Hornig* und Mitarb.²²⁾ Amine der Katechin-Reihe und ähnliche biogene, biologisch wichtige Amine als Trimethylsilylderivate an OV 1 und OV 17. *Metcalfe* und Mitarb.²³⁾ wenden die Silylierung auf technisch wichtige langkettige Amine (C 11 bis C 15) an und verwenden als stationäre Phase ein modifiziertes Siliconöl SF 96.

Über die Gaschromatographie von Aminen bei Fisch als Untersuchungsmaterial liegen einige Arbeiten vor; so befaßte sich bereits 1959 *Hughes*²⁴⁾ mit der Gaschromatographie von Aminen aus Hering und verwendete den Titrationsdetektor nach *James* und *Martin*. Die Trennung erfolgte an Hexadecanol-Octadecan. *Sato* und Mitarb.²⁵⁾ trennten niedrigere aliphatische Amine aus verdorbenem Fisch an Triäthanolamin als stationäre Phase, beklagen jedoch das starke Tailing der Peaks.

*Nonaka*²⁶⁾ bearbeitet Trimethylamin aus Fischmehlextrakt mit Äthylalkohol. *Wick*²⁷⁾ beschäftigt sich ebenfalls mit niederen aliphatischen Aminen aus Fisch und verwendet CHEED als stationäre Phase.

Nach Beginn unserer eigenen Arbeiten wurden noch die Arbeiten von *Key* und *Hardy*²⁸⁾ bekannt, welche Dofax 9N9 verwendeten, sowie die von *Gruger*²⁹⁾, der Penwalt 223 und KOH als stationäre Phase verwendet, außerdem die Arbeit von *Miller*³⁰⁾ mit TEP als stationärer Phase.

2. Material und Methoden

Die verwendeten Testsubstanzen wurden über den üblichen Chemikalienhandel beschafft (*Merck, Serva*). Es kamen entweder die freien Amine oder deren HCl-Salze zum Einsatz. Für die freien Amine wurde Heptan als Lösungsmittel gewählt. Die Amine wurden aus ihren Salzen nach Überschichtung mit Heptan mit NaOH in Freiheit gesetzt.

Für die Untersuchungen des TVB-Komplexes wurden die Lösungen verwendet, welche bei der Routine-Analyse des TVB-Komplexes nach Beendigung der Titration anfallen und die Amine wiederum als Salze enthalten. Diese Lösungen werden zur Trockne abrotiert und mit NaOH (s. o.) zerlegt.

Zur Untersuchung gelangende Fische stammten aus dem Labor für allgemeine Routine-Analyse des Institutes.

Methoden

Alle Gaschromatogramme wurden mit dem Gerät L 400 der Fa. Siemens durchgeführt. Als Säulen dienten ausschließlich Glas-Säulen. Im allgemeinen diente ein FID als Detektor, in einigen Fällen auch ein H₂-ECD. Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet, als Schreiber der Kompensograph von Siemens.

Die gaschromatographischen Bedingungen werden jeweils bei den einzelnen Beispielen angegeben.

Die Trifluoracetylierung wird mit Trifluoressigsäureanhydrid wie folgt durchgeführt:

0,1 bis 0,2 ml Amin werden mit 0,2 bis 0,3 ml eines Kohlenwasserstoffs, z. B. n-Heptan in einem kleinen Reagenzglaschen gelöst. Nach Zugabe von 0,2 ml TFEA (Trifluoressigsäureanhydrid) wird das Reaktionsgefäß sofort mit einer Gummikappe verschlossen und durch leichtes Schütteln durchgemischt.

Auch Aminsalze können trifluoracetyliert werden. In diesem Falle wird wie folgt verfahren: Ca. 40 bis 50 mg Aminsatz werden mit 0,6 ml eines Esters als Lösungsmittel (hier Octansäure-methylester) überschichtet. Durch Zugabe von 0,4 ml 6 n KOH werden die Amine in Freiheit gesetzt. Nach Durchmischen und erfolgter Phasentrennung wird die untere Schicht (KOH) abgetrennt und die Esterschicht mit 0,5 ml TFEA (Trifluoressigsäuremethylester) oder 0,2 ml TFEA versetzt.

Diese Lösung wird direkt zur GC verwendet.

3. Versuche

3.1. Versuche zur Methodik

Unsere eigenen Untersuchungen sollen in methodischer Hinsicht die für die Anwendung auf Fischmaterial günstigsten gaschromatographischen Bedingungen ermitteln. Auch hier kommt wieder der Auswahl einer geeigneten stationären Phase erhebliche Bedeutung zu. Es wurden beide Möglichkeiten — Gaschromatographie der freien Amine und Gaschromatographie von Aminderivaten — herangezogen.

3.1.1. Gaschromatographie von freien Aminen

3.1.1.1. Apiezon G als stationäre Phase.

Es werden in Toluol-Lösung chromatographierte Peaks erhalten, welche kein Tailing aufweisen. Bei aliphatischen Aminen C 1 bis C 4 liegen die Retentionszeiten jedoch sehr niedrig (0,5 bis 2 min), obwohl die Säulentemperatur nur 60° C isotherm betrug und der Gasmengenstrom mit 25 ml/min Stickstoff ebenfalls einen niedrigen Wert darstellt (Abb. 1). Die Amine werden aus Toluol-Lösungen chromatographiert. Wäßrige Lösungen der salzsauren Salze können auf einer Vorsäule (KOH auf Chromosorb) zerlegt werden. Dieses Vorsäulenmaterial befand sich im Eingangsteil der Trennsäule. Nachteilig ist die relativ schnelle Erschöpfung des Vorsäulenmaterials.

3.1.1.2. Auch mit Hexadecanol als stationäre Phase liegen die Retentionszeiten der leichtflüchtigen Amine noch sehr niedrig (ca. 3 min), was den Ergebnissen von *Nonaka*²⁶⁾

GC freier Amine auf Apiezon G

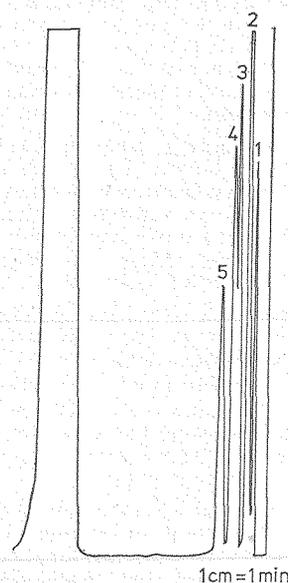


Abb. 1.

- | | |
|----------------------------|-----------------------------------|
| 1) 0,5 min iso-Butylamin | 20 % Apiezon C 1,5 m 60° isotherm |
| 2) 0,7 min Butyl-2-Amin | 25 ml N ₂ /min |
| 3) 0,7 min tert. Butylamin | |
| 4) 1,3 min n-Propylamin | |
| 5) 1,1 min Diäthylamin | 5) 1,8 min n-Butylamin |

entspricht. Die Peaks zeigen nur geringes Tailing, Hexadecanol kann jedoch nur bis 50° C Säulentemperatur verwendet werden und wurde daher nicht weiter herangezogen.

3.1.1.3. Besonders eingehend wurde Amin 220 als stationäre Phase beachtet, da diese nach Angaben des Herstellers besonders auf die Gaschromatographie von Aminen zugeschnitten ist. Die Peaks weisen noch ein gewisses Tailing auf, was bei Aminen mit hoher C-Zahl etwas stärker in Erscheinung tritt; auch scheint das Alter der Säule bei dem Grad des Tailing eine Rolle zu spielen. Nachteilig ist die Häufung von Peaks im Gebiet der Retentionszeiten bis 3 min; in diesem Retentionsgebiet liegen bereits 8 Amine der 12 Amine der ersten vier Glieder in den homologen Reihen primärer, sekundärer und tertiärer Amine. (Siehe Abb. 2, Spalte 1. Diese Abbildung gibt einen Vergleich verschiedener Trennmaterien.) Es dürfte bei Chromatographie einer Mischung stets nur eine teilweise Trennung

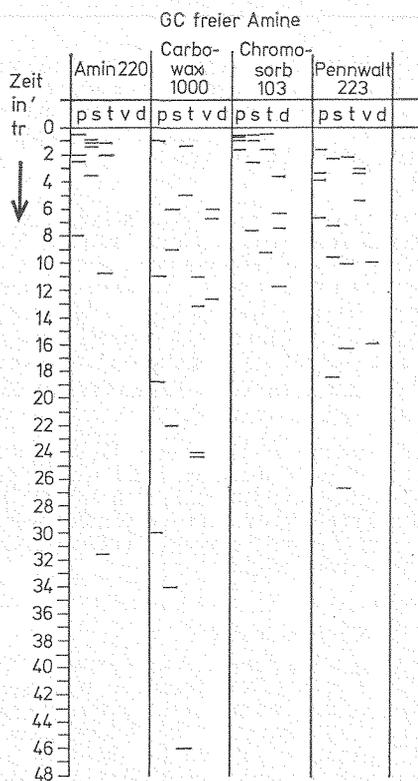


Abb. 2.

p = primäre Amine v = verzweigte Amine
s = sekundäre Amine d = Diamine
t = tertiäre Amine

erreicht werden; auch liegen die Retentionszeiten von Methylamin und Dimethylamin noch unter 1 min. Die Gefahr, diese Amine nicht quantitativ zu erfassen, ist groß. Besonders ungünstig verhält sich Amin 220 bei sekundären Aminen. Die Retentionsindices von Dimethylamin, Diäthylamin und Dipropylamin liegen sehr eng zwischen 720 und 800. Dieser Sachverhalt wird auch durch Abbildung 3 dargestellt. Bei allen 3 Gruppen von unverzweigten Aminen (primär, sekundär, tertiär) besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen Logarithmus der Retentionszeit und Retentionsindex bis zu einer Retentionszeit von 10 min. Bei höheren Retentionszeiten flacht diese Kurve etwas ab. Diese Tendenz entspricht dem Verhalten der Kohlenwasserstoffe selbst (auf welche die RI-Werte bezogen sind), bei denen ebenfalls bei RI-Werten über 1000 eine gewisse Abflachung der Kurve eintritt (Abb. 4).

3.1.1.4. Ähnliche Untersuchungen wurden mit einer Reihe anderer stationärer Phasen durchgeführt, um größere Unterschiede in den Retentionszeiten der einzelnen Amine zu erhalten. In Abbildung 2, Spalte 2 sind z. B. bei Carbowax 1000 auch Amine mit verzweigter Kohlenstoffkette (v) sowie Diamine (d) behandelt. Gegenüber Amin 220 wird ein deutliches Ansteigen der Retentionszeiten beobachtet, was sich besonders deutlich bei den sekundären Aminen zeigt. Die geringste Retentionszeit beträgt jetzt 1 min für

Methylamin, nur noch Trimethylamin hat mit 1,4 min eine ähnliche Retentionszeit. Dieses unterschiedliche Verhalten drückt sich auch in den Rohrschneider-Konstanten s von Amin 220 (2,14) und Carbowax 1000 (8,85) aus; (letzte Konstante wurde experimentell bestimmt).

3.1.1.5. Entsprechend den Empfehlungen von Keay und Mitarb.²⁸⁾ wurde eine Reihe von Versuchen mit Dofax 9N9 durchgeführt. Bei einer Belegung mit 2,5 % stationärer Phase und einer Säulenlänge von 3 m konnte z. B. eine

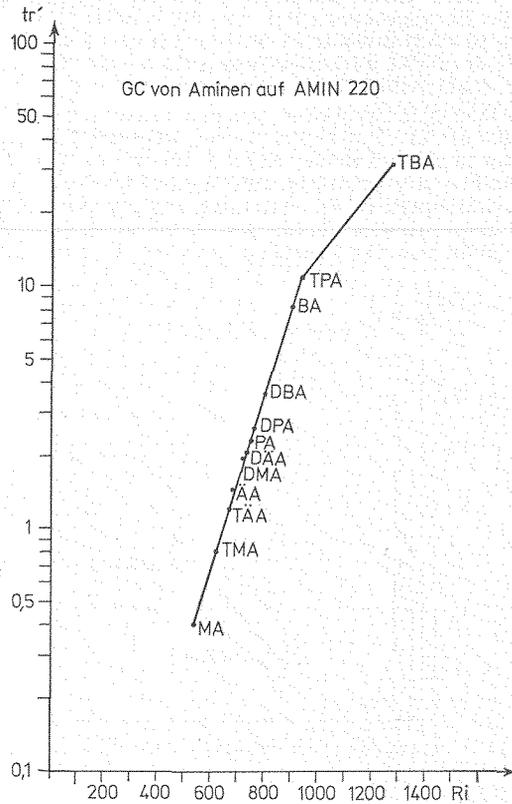


Abb. 3.

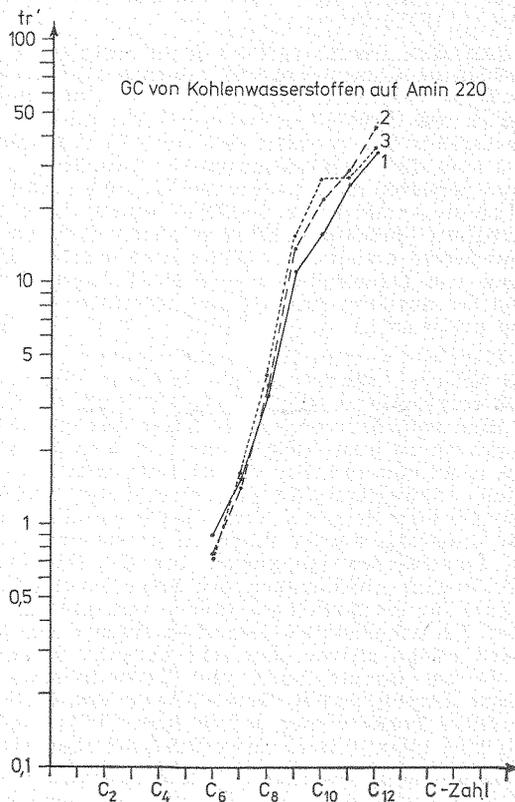


Abb. 4.

Trennung von Dimethylamin und Trimethylamin erreicht werden. Da die Herstellung dieser stationären Phase aus uns nicht bekannten Gründen eingestellt wurde, war es nicht möglich, diesen Weg weiter zu verfolgen.

3.1.1.6. Ungünstig verliefen auch die Versuche mit Diäthylenglycolsuccinat (DEGS). Die Retentionsindices in den homologen Reihen ändern sich mit steigender Kohlenstoff-Zahl nur wenig.

3.1.1.7. Wegen ihrer geringen Polarität wurden einige Siliconöle herangezogen. Bei den Siliconölen OV 1 und OV 17 wird noch merkliches Tailing festgestellt. Bei OV 1 ist eine Linearität zwischen Logarithmus der Retentionszeit und Kohlenstoff-Zahl vorhanden.

Recht brauchbare Ergebnisse wurden zunächst mit Siliconöl DC 550 erzielt; die Peaks wiesen kein Tailing auf und die Retentionsindexwerte zeigten innerhalb der homologen Reihen der primären und sekundären Amine eine lineare Abhängigkeit der Retentionsindices von der Kohlenstoff-Zahl. In der Reihe der tertiären Amine weicht Tributylamin von der Linearität ab (Abb. 5). Leider zeigte

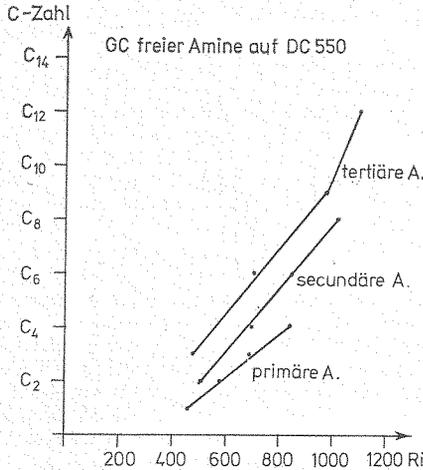


Abb. 5.

sich, daß die Säule bereits bei Temperaturen über 130° C merklich SiO₂ abgibt, was zu sehr unliebsamen Störungen am Detektor (FID) führte.

3.1.1.8. Besondere Beachtung fand das inzwischen im Handel erschienene Chromosorb 103, welches als festes Adsorbens keine flüchtigen stationären Phasen benötigt und lt. Angaben des Herstellers besonders für die Trennung von Amingemischen geeignet sein soll. In Abbildung 2, Spalte 3 sind die Retentionszeiten der primären, sekundären und tertiären Amine sowie der Diamine eingetragen. Die primären Amine haben t_r -Werte bereits unter 1 min (hier wird mit Carbowax 1000 eine bessere Spreizung der Retentionswerte erzielt). Bei sekundären Aminen ist die Trennung von Dimethylamin und Diäthylamin fraglich, während bei tertiären Aminen und Diaminen eine Trennung zu erwarten ist.

3.1.1.9. Ebenfalls speziell für Amintrennungen wird vom Applied Science Laboratories die stationäre Phase Penwalt 223 vorgeschlagen. Sie soll die Phase Dofax 9N9 ersetzen. Eine zunächst verwendete Säule mit 1,5 m Länge erwies sich als zu kurz. Methylamin und Äthylamin wurden z. B. nicht getrennt. Bei Verwendung einer 3-m-Säule und einem Temperaturprogramm von 75 bis 200° C mit einer Steigerungsrate von 5° C/min sowie 45 ml/min Stickstoff als Trägergas werden innerhalb der homologen Reihen die betreffenden Trennungen erreicht. Abbildung 6 zeigt die lineare Abhängigkeit der Retentionsindices von der C-Zahl für die homologen Reihen mit unverzweigten C-Ketten. Bei unbekanntem Gemischen ergeben sich jedoch in einigen Fällen gleiche oder sehr ähnliche Retentionszeiten, so bei Dimethylamin und Trimethylamin oder Äthylamin, Isopropylamin, Butyl-2-Amin und Butylamin tertiär. Diese Peaks weisen jedoch kein Tailing auf und sind für eine quantitative Auswertung sehr gut geeignet.

3.1.2. Gaschromatographie von Trifluoracetylaminen

Bereits in der Einleitung wurde auf Bestrebungen hingewiesen, die bei der Gaschromatographie freier Amine auf-

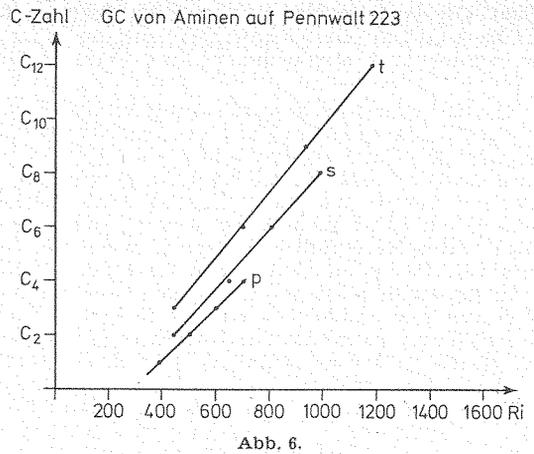


Abb. 6.

tretenden Schwierigkeiten durch Gaschromatographie entsprechender Amin derivative zu umgehen. Wir haben in unseren Versuchen hierfür die Trifluoracetyl derivative herangezogen und auch hier zunächst die Frage nach einer geeigneten stationären Phase gestellt.

3.1.2.1. Apiezon G

Einige Testversuche mit n-Butylamin ergaben eine sehr niedrige Retentionszeit von 1,2 min. Da eine Abtrennung von den vorausgehenden Aminen der homologen Reihe der normalen primären Amine nicht zu erwarten war, wurden keine weiteren Versuche mit Apiezon G durchgeführt.

Die Verringerung der Polarität durch die Trifluoracetylgruppe hat sich bei dieser unpolaren stationären Phase auf die Retentionszeit nicht wesentlich ausgewirkt.

3.1.2.2. Hexadecanol

Mit dieser stationären Phase liegen die Retentionszeiten der Trifluoracetylamine deutlich höher als bei den freien Aminen (Trifluoracetylmethylamin = 8 min). Dabei mußte jedoch ein Temperaturprogramm verwendet werden, welches die für Hexadecanol zulässige Säulentemperatur von 50° C wesentlich übersteigt.

3.1.2.3. Siliconöle

3.1.2.3.1. OV 1 (Methylsiliconöl)

Im Abschnitt über die freien Amine wurde bereits auf eine Linearität zwischen Retentionszeit und Kohlenstoff-Zahl hingewiesen. Mit Diäthylamin als Beispiel wurde für das Trifluoracetyldiäthylamin eine Retentionszeit von 1,3 min erhalten gegenüber 2,0 min für das freie Amin. Die Peaks weisen noch ein gewisses Tailing auf, ähnlich wie bei Siliconöl DC 550.

3.1.2.3.1. Siliconöl DC 550 (Methylphenylsiliconöl)

Die mit dieser stationären Phase erhaltenen Peakformen sind sehr gut. Die Null-Linie bleibt im wesentlichen konstant. Die drei ersten Glieder der homologen Reihe ergeben eine lineare Abhängigkeit der Retentionsindices von der Kohlenstoff-Zahl. Auf die Temperaturempfindlichkeit dieser stationären Phase wurde bereits hingewiesen, was einen praktischen Einsatz verhindert.

3.1.2.3.3. DC 560

Ganz ähnlich verhält sich Siliconöl DC 560 (Chlorphenylmethylsiliconöl). Die Peaks weisen nur geringes Tailing auf. Innerhalb der homologen Reihe besteht lineare Abhängigkeit der Retentionszeit von der Kohlenstoff-Zahl (t_r zwischen 0,5 und 20 min).

3.1.2.4. Amin 220

Wie bei den freien Aminen wurde auch für die Gaschromatographie der Trifluoracetylamine Amin 220 eingehend bearbeitet. Eine Auftrennung der Trifluoracetyl derivative einiger aliphatischer Amine bis C 4 zeigt Abbildung 7. Die Retentionszeiten liegen zwischen 6 und 25 min, lediglich Trifluoracetyläthylamin und Trifluoracetylsekundäres Butylamin³⁾ fallen zusammen und sind von Trifluoracetylmethylamin⁴⁾ nicht vollständig getrennt.

Wegen der großen Bedeutung der Auftrennung der drei Amine Methylamin, Dimethylamin und Trimethylamin für die Anwendung auf Fischprobleme wurden die weiteren Untersuchungen an Mischungen dieser 3 Komponenten

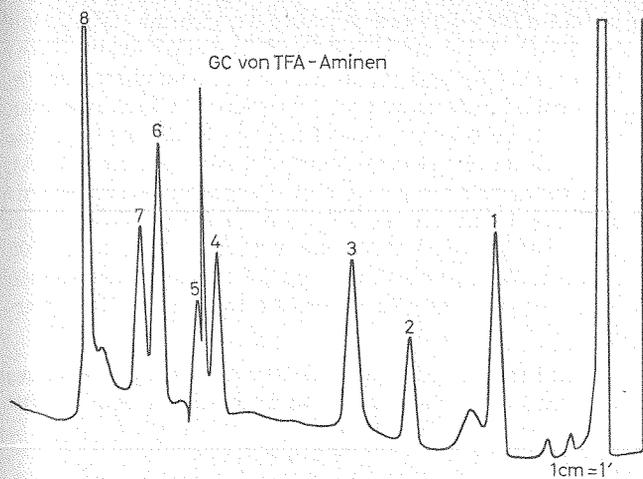


Abb. 7.

- 1) 6,5 min Trifluoracetyl-Dimethylamin
- 2) 10,4 min Trifluoracetyl-Diäthylamin
- 3) 13,0 min Trifluoracetyl-Butylamin(tertiär) $(H_3C)_3 \cdot C-NH_2$
- 4) 19,0 min Trifluoracetyl-Methylamin
- 5) 19,7 min Trifluoracetyl-Äthylamin/TFA-s-Butylamin
- 6) 21,7 min Trifluoracetyl-Propylamin
- 7) 22,4 min Trifluoracetyl-i-Butylamin
- 8) 24,9 min Trifluoracetyl-Butylamin

10 % Amin 220, 3 m, 50–150°
4,2°/min, N₂ 60 ml/min

durchgeführt. Die wesentlich langsamere Desorption des Trifluoracetylmethylamins⁴⁾ gegenüber dem Trifluoracetylierung des sekundären Dimethylamins wird das noch am Stickstoffatom gebundene Wasserstoffatom substituiert, während beim Trifluoracetylmethylamin noch ein weiteres H-Atom vorhanden ist und eine stärkere Bindung an das Säulenmaterial bewirkt.

Zur Verbesserung der Trennbedingungen des gesamten Amin-Komplexes wurde der Gasmengenstrom, der Temperaturbeginn und das Temperaturprogramm von 2,5°/min variiert. Bei einer Starttemperatur von 20° C min isotherm und einem Temperaturprogramm von 2,5°/min bis 160° C sowie einem Gasmengenstrom (Stickstoff) von 20 ml/min steigen allerdings die Retentionszeiten für Trifluoracetyldimethylamin auf 18,5 bis 28 min und für Trifluoracetylmethylamin auf 52 min an (Abb. 8). Schließlich wurden folgende Bedingungen gewählt: 10 min isotherm bei 50° C, Temperaturprogramm bis 100° C mit einer Steigerungsrate von 2,5°/min, Gasmengenstrom 33 ml/min Stickstoff. Für die drei Amine ergeben sich folgende Retentionszeiten:

GC von TFA-Methylaminen

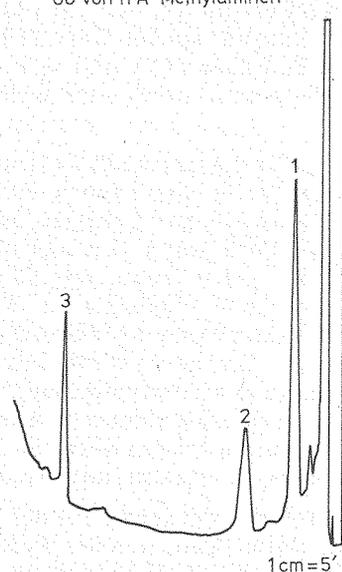


Abb. 8.

- 1) 1,8 min TMA
 - 2) 18,5 min TFA-DMA
 - 3) 52,0 min TFA-MA
- 10 % Amin 220, 3 m
20° 10 min, isotherm 20–160°
2,5°/min

Trimethylamin 0,9 min, Trifluoracetyldimethylamin 8,2 min, Trifluoracetylmethylamin 26,3 min (Abb. 9).

3.1.2.5. Carbowax 1000

Das Retentionsverhalten der Trifluoracetylamine ähnelt demjenigen bei Amin 220. Die Peaks weisen nur geringes Tailing auf. Bei einigen primären Aminen wie n-Butylamin und Isobutylamin ist keine Trennung zu erwarten, da die Retentionszeiten zwischen 21,3 und 22,1 min liegen.

3.1.2.6. Chromosorb 103

Auch für die Trennung der Trifluoracetylamine wurde dieses Trennmateriale eingesetzt. Gegenüber den freien Aminen tritt auch hier im Falle der Trifluoracetylamine eine bemerkenswerte Spreizung der Retentionszeiten auf. Für die Trennung der drei Methylamine (TMA, DMA, MA) ergeben sich folgende Retentionswerte:

TMA 0,5 min, Trifluoracetyl-DMA 2,4 min, Trifluoracetylmethylamin 6,9 min, wenn bei 200° C isotherm und mit 35 ml/min Stickstoff chromatographiert wird. In Abbildung

GC von TFA-Methylaminen

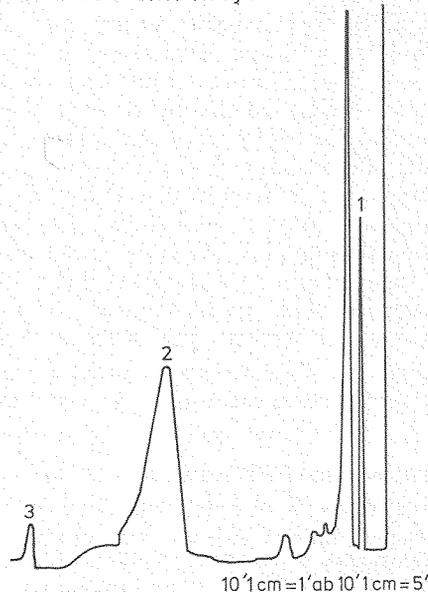


Abb. 9.

- 1) 0,9 min Trimethylamin
 - 2) 8,2 min Trifluoracetyl-Dimethylamin
 - 3) 26,3 min Trifluoracetyl-Methylamin
- 10 % Amin 220, 3 m
10 min isotherm 50°
50–100°, 2,5°/min
N₂ 33 ml/min

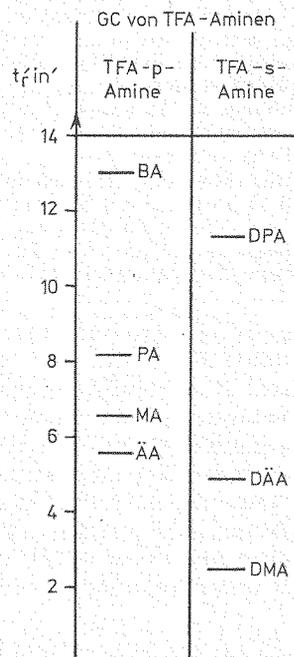


Abb. 10.

10 ist das Retentionsverhalten der TFA-Derivate der primären und sekundären Amine an Chromosorb 103 dargestellt. Gegenüber Amin 220 (s. Abb. 9) wird eine bedeutende Senkung der Retentionszeiten erreicht (TFA-MA von 26,3 min auf 6,9 min).

Die Trifluoracetylierungsreaktion verläuft bei Diaminen ab C 4 deutlich langsamer. Die Ausbeuten sind nicht ausreichend. Es werden stets größere Anteile der nicht umgesetzten freien Diamine erhalten. An Chromosorb 103 ergeben sich bei 200° isotherm und 35 ml/min. N₂ für die freien Diamine folgende Retentionszeiten: Äthylendiamin 3,6 min, Trimethylen-diamin 6,3 min, Tetramethylen-diamin (Putrescin) 7,4 min und Pentamethylen-diamin 11,7 min.

3.2. Anwendung auf Versuchsmaterial aus Fisch

Neben diesen methodischen Versuchen wurde eine Reihe von Untersuchungen an aus Fisch stammendem Material durchgeführt. Im Vordergrund stand dabei die Auftrennung des Komplexes des Gesamt-Basenstickstoffs TVB (total volatile bases). Der TVB-Wert ist eine äußerst wichtige Kennzahl zur Qualitätsbeurteilung von Fisch, deren Ermittlung im Fischereilaboratorium ständig durchgeführt wird. Diese Kennzahl beschreibt die Stoffgruppe der Amine jedoch nur summarisch, ähnlich den in der Fettchemie gebräuchlichen Kennzahlen. Eine stoffliche Differenzierung des TVB-Komplexes dürfte einerseits die analytische Qualitätsbeurteilung des Fisches wesentlich erweitern und andererseits Ansatzpunkte dafür bieten, unsere Kenntnisse über die stofflichen Veränderungen bei Lagerung und Verderb von Fisch zu vertiefen.

Unabhängig vom TVB-Komplex wurden einige Versuche mit Trichloressigsäure-Extrakt von Fisch durchgeführt.

3.2.1. Versuch zum TVB-Komplex

Als Versuchsmaterial diente Ostseedorsch. Es wurde ein 3wöchiger Eislagerversuch durchgeführt und in Abständen einiger Tage jeweils Proben analysiert. Die gaschromatographische Trennung erfolgte an Amin 220 und mit einem FID als Detektor.

Von den Aminsalzen wurden jeweils ca. 2 mg in ein Gläschen eingewogen, mit 0,5 ml n-Heptan überschichtet, mit 2 Mikroliter KOH 50% versetzt und das Gläschen sofort mit einer Gummikappe, welche eine Probenentnahme vermittelt einer Dosierspritze gestattet, verschlossen. Durch Umschütteln werden die Amine in Freiheit gesetzt und im Heptan gelöst. Von der Heptanlösung werden in der Regel 1 Mikroliter dosiert. Bei gelegentlichen Dosierungen der überstehenden Gasschicht betrug die Dosiermenge 2 ml. In dieser Serie wurden 21 Proben als Doppelproben untersucht.

Bei einer Starttemperatur des Gaschromatographen von 20° C ergaben sich 12 Peaks mit einer maximalen Retentionszeit von 67 min. Durch Startbeginn bei 50° C und Steigerung des Gasmengenstroms von 20 auf 33 ml/min konnte die maximale Retentionszeit auf 58–59 min gesenkt werden.

Eine Auswertung erfolgte zunächst nur qualitativ, um einen Überblick über die Natur der zu erwartenden Amine zu erhalten. Zur Identifizierung dienten Retentionsindices, bezogen auf eine entsprechende Eichkurve mit Kohlenwasserstoffen C 5 bis C 12 (siehe Abb. 3). Da innerhalb der Versuchsdauer dieser großen Serie eine neue Säule (B) in Betrieb genommen werden mußte, ergab sich eine geringe Abweichung der RI-Kurve gegenüber Abbildung 3. Die Ermittlung der RI-Werte erfolgte unter Verwendung der für Säule B gültigen Kurve.

Als Testsubstanzen für die Auswertung dienten die 12 Amine der Methyl- bis Butyl-Reihe, je als primäre

(p), sekundäre (s) und tertiäre (t) Amine. Mit Ausnahme von Butylamin (BA) und Tripropylamin (TPA) konnten die übrigen 10 Amine der Testsubstanzen in den Proben nachgewiesen werden. Hinzu kommen noch die 3 noch nicht identifizierten Substanzen x₁ bis x₃ mit Retentionswerten unter Tributylamin (TBA), deren Identifizierung nur eine Frage der entsprechenden Testsubstanzen ist. In allen Proben werden noch 3 bis 4 Peaks mit RI-Werten zwischen 1300 und 1600 gefunden. Eine Identifizierung der noch unbekanntenen Peaks soll im Zuge der Fortsetzung dieser Arbeit erfolgen.

In Abbildung 11 werden die Mittelwerte der RI-Indices der primären, sekundären und tertiären Amine zu-

	R _i ~	R _i Bereich	Häufigkeit Anzahl
p	MA	575-585	14
	ÄA	660-695	3
	PA	740-755	3
	BA	-	-
s	DMA	705-715	4
	DÄA	735-760	2
	DPA	720-785	3
	DBA	785-815	7
t	TMA	595-645	24
	TÄA	650-670	4
	TPA	-	-
	TBA	1300-1340	15
	X ₁	1120	6
	X ₂	1150	3
	X ₃	1220	3
	X ₄	1335	13

Amine als TVB-Komplexe

Abb. 11.

sammengestellt. Ferner ist die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Amine in den 42 Proben angegeben. Hieraus ist ersichtlich, daß TMA am häufigsten gefunden wird. Daneben spielen TBA, MA und x₄ eine wichtige Rolle. Es folgen DBA und x₁ in der Häufigkeit. Die übrigen Amine werden nur gelegentlich beobachtet.

Zur Beurteilung des Lagerverhaltens wurde TBA als Beispiel gewählt. Das in allen Proben enthaltene TMA ist für diesen Zweck weniger geeignet, da dieses stets einen sehr großen Peak ergibt, der über die Schreiberbreite weit hinaus gehen kann, was für einen Vergleich von Peak-Höhen ungünstig ist. Mit Rücksicht auf die übrigen Bestandteile des Gemisches wurde die Empfindlichkeit des Schreibers nicht vermindert. Auch auf ein Umschalten der Empfindlichkeit während der Aufnahme des Chromatogrammes wurde verzichtet. Ähnliche Überlegungen treffen auch für MA zu. TBA und x₄ sind weitere Substanzen mit hoher Häufigkeit.

Verfolgt man die Veränderungen mit der Lagerzeit, so ergibt sich eine stetige Zunahme des TVB-Wertes, wie zu erwarten war. Am 16. Lagertag ist dessen Wert von anfangs 30 mg^{0/0} auf einen Endwert von 61 mg^{0/0} angestiegen (siehe Abb. 12). Verfolgt man jedoch die Veränderungen am gebildeten TBA (ausgedrückt in

Tage der Lagerung	Höhe TBA in mm	mg % TVB
3	37	29,7
5	52	30,8
9	190	46,8
11	163	50,3
15	—	53,3
16	23	61,4
18	—	61,2
22	—	61,2

Lagerverhalten des TVB-Komplexes

Abb. 12.

Peak-Höhe), so erfolgt ein sehr deutlicher Anstieg von 37 mm Peakhöhe am 3. Tag auf 190 mm am 9. Tag. Bis zum 16. Tag ist die Peakhöhe wieder auf 23 mm abgesunken.

Interessant ist ferner, daß Dialkyklamine (DÄÄ, DPA, DBA) erst am 9. Lagertag auftauchen.

3.2.2. Versuche mit Trichloressigsäure-Extrakt

Die bisher geschilderten Versuche zur GC von Aminen aus Fisch gehen ausschließlich von den durch Wasserdampf-Destillation gewonnenen Amingemischen aus. Da jedoch zur Isolierung von Aminen neben der Wasserdampf-Destillation auch die Extraktion mit Trichloressigsäure (TCE) verwendet wird, wurden einige Testversuche zur gaschromatographischen Auftrennung derartiger TCE-Extrakte von Fisch durchgeführt.

Aus den TCE-Extrakten wurde analog den Titrationsrückständen der Wasserdampfdestillation (s. o.) durch Behandeln mit Alkali die freien Amine sowie nach Trifluoracetylierung mit Essigsäureanhydrid die trifluoracetylierten Amine an Amin 220 als stationäre Phase gaschromatographiert. Diese Versuche haben ergeben, daß auch die TCE-Extrakte als Ausgangsbasis für eine gaschromatographische Auftrennung des Amin-Komplexes verwendet werden können.

4. Schlußfolgerungen

4.1. Zur Methodik

Hier seien folgende Gesichtspunkte herausgestellt:

1. Die Gaschromatographie der Amine wird durch deren Polarität wesentlich beeinflusst. Von den stationären Phasen für die freien Amine hat sich bisher Pennwalt 223 am besten bewährt.

Die Gaschromatographie der TFA-Amine hat aus 2 Gründen Interesse:

a) Durch Verminderung der Polarität gegenüber den freien Aminen tritt eine Spreizung der Retentionszeiten ein, was sich auf die Auswertung benachbarter Peaks günstig auswirkt.

b) Da nur primäre und sekundäre Amine trifluoracetylierbar sind, ist eine Unterscheidungsmöglichkeit gegenüber tertiären Aminen gegeben.

Die GC von Trifluoracetylaminen sollte nicht an Pennwalt 223 vorgenommen werden, da diese stationäre Phase bei Dosierung von diesen Amin-

Derivaten u. U. unter Spuren nicht ungesetzten Reagenzes oder gebildeter Trifluoressigsäure angriffen wird und ihre Trennwirksamkeit schnell verlieren kann.

Chromosorb 103 sowie Polyester wie Carbowax 1000 kommen hier als Trennmedien in Betracht.

2. Da die Trifluoracetylierungsreaktion bei Diaminen — vor allem bei C-Zahlen über C 3 — unvollständig verläuft, sollten Diamine als freie Amine an Chromosorb 103 chromatographiert werden.

Die Frage einer quantitativen Derivatisierung bietet über Per-Fluor-arylierung bzw. Silylierung Möglichkeit einer Lösung.

4.2. Zur Anwendung auf Fisch

1. Wie die unter 3.2. geschilderten Versuche zeigen, läßt sich der TVB-Komplex in eine ganze Reihe von einzelnen Aminen auftrennen. Das Auftreten dieser einzelnen Amine bietet einen Ansatzpunkt, den Metabolismus der Stickstoffverbindungen bei Lagerung und Verderb von Fisch besser zu verstehen, als dies durch Ermittlung des TVB-Komplexes und Bestimmung von TMA möglich ist. Es dürfte in diesem Zusammenhang von Interesse sein, festzustellen zu versuchen, welche Amine unter bestimmten Lagerbedingungen gefunden werden oder ob z. B. das relative Verhältnis der einzelnen Amine des TVB-Komplexes untereinander bereits weitergehende Aussagen zur Qualität zuläßt. Eine Ausdehnung dieser zunächst bewußt qualitativ durchgeführten Versuche auf die quantitative Ebene ist erforderlich und wird bearbeitet.

2. Die Identifizierung der bisher nicht gedeuteten Peaks des TVB-Komplexes sollte über entsprechende Testsubstanzen bzw. unter Ausnutzung der zwischen Retentionsindex und den einzelnen Amin-Reihen sich ergebenden funktionellen Zusammenhänge vorgenommen werden. Auf letzteren Punkt soll in einer späteren Arbeit eingegangen werden.

Die Untersuchungen wurden durch den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. gefördert, wofür an dieser Stelle gedankt sei.

LITERATUR

- 1) James, E. T., und A. J. P. Martin, *Biochem. Journ.* **50**, 679 (1950).
- 2) Amell u. Mitarb., *Anal. Chem.* **33**, 1805—6 (1961).
- 3) Sze u. Mitarb., *Anal. Chem.* **35**, 240 (1963).
- 4) van Heuvel u. Mitarb., *Anal. Chem.* **36**, 1540 (1964).
- 5) O'Dannel u. Mitarb., *Anal. Chem.* **36**, 2097 (1964).
- 6) Golovnya u. Mitarb., a) *Anal. Abstr.* **13**, 6277 (1966); b) *Journ. Anal. Chem.* **22**, 797—801 (1967).
- 7) Haas u. Mitarb., *J. Chrom.* **21**, 302 (1966).
- 8) Häntsch, *Talanta* **13**, 1297 (1966).
- 9) Smith u. Mitarb., *Anal. Chem.* **40**, 522 (1968).
- 10) Smith u. Mitarb., *J. Chrom.* **42**, 183 (1969).
- 11) Umbreit, *J. Chrom.* **43**, 25—32 (1969).
- 12) Walle, *Acta Pharm. Suecica* **5**, 353 (1968).
- 13) Moffat u. Mitarb., *Analyt. Letters* **3** (4), 205 (1970).
- 14) Day u. Mitarb., *Analyt. Chem.* **38**, 1053 (1966).
- 15) Walle, *Acta Pharm. Suecica* **5**, 367 (1968).
- 16) Dove, *Anal. Chem.* **39**, 1188 (1967).
- 17) Irvine, *J. Chrom.* **43**, 129 (1969).
- 18) Zeman, *Z. Anal. Chem.* **247**, 158 (1969).
- 19) Halmekoski, *Anal. Abstr.* **15**, 432 (1968).
- 20) Martin u. Mitarb., *J. Chrom.* **66**, 255 (1972).
- 21) Ehrsson, *Acta Pharm. Suecica* **8**, 591 (1971).
- 22) Hornig, *Biochem. Biophys. Acta* **148**, 597 (1967).
- 23) Metcalfe u. Mitarb., *Anal. Chem.* **44**, 403 (1972).
- 24) Hughes, *J. Sci. Fd. Agr.* **10**, 431 (1959).
- 25) Sato u. Mitarb., *J. Fac. Fish Hiroshima Univ.* **5**, 193 (1963).
- 26) Nonaka, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* **33**, 753 (1967).
- 27) Wiik u. Mitarb., *J. Fd. Sci.* **32**, 365 (1967).
- 28) Keay u. Mitarb., *J. Sci. Fd. Agr.* **23**, 9 (1972).
- 29) Gruger, *J. Agr. Fd. Chem.* **20**, 781 (1972).
- 30) Müller u. Mitarb., *J. Agr. Fd. Chem.* **20**, 709 (1972).