

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Fisiología Aplicada de Pamplona
(Prof. Dr. J. Jiménez-Vargas)

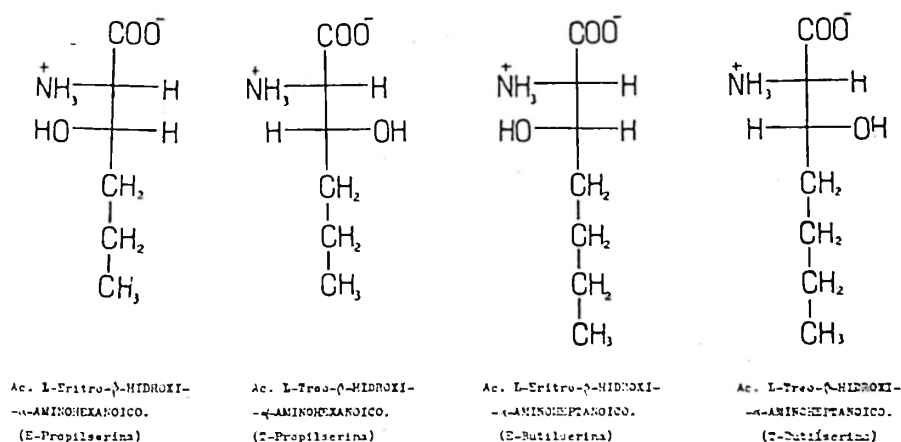
Estudio cromatográfico de cuatro nuevos aminoácidos sintéticos de estructura α -amino- β -hidroxílica

por

J. M.^a Macarulla

(Recibido para publicar el 4 de marzo de 1958)

Hemos realizado un estudio cromatográfico comparativo de cuatro nuevos aminoácidos sintéticos: Las formas Eritro y Treo de la Propilserina y Butilserina. Sus fórmulas y nombres químicos completos son los siguientes:



Hemos dibujado los compuestos de la serie L por analogía con los aminoácidos naturales aunque las muestras de partida — por ser sintéticas — contenían una mezcla racémica de

cada pareja de antípodas ópticos. Esta mezcla se comporta, para efectos cromatográficos, de la misma forma que cualquiera de los dos isómeros enantiomorfos.

Estos aminoácidos son cuerpos sólidos, cristalinos, solubles en agua y en mezclas hidroalcohólicas, etc. análogamente a los demás aminoácidos conocidos.

Material y métodos

Hemos preparado disoluciones 0,01 Molares en agua con un 10 % de isopropanol como estabilizante y hemos realizado el trabajo cromatográfico empleando papel de filtro Whatman número 1, utilizado en cada aplicación de 3 a 7 microlitos de disolución.

La técnica seguida es la recomendada por CRAMER con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (9).

En esquema es la siguiente :

Para la Cromatografía descendente, saturamos de agua y disolvente orgánico una cámara diseñada y construida según el modelo de DEXT (4). Preparamos un cromatograma como el de la fig. 1 y lo colocamos en la cubeta de la cámara. Pasada $\frac{1}{2}$ hora (se ha saturado de disolvente) colocamos la mezcla acuoso-orgánica de desarrollo y dejamos que se deslice sobre el papel durante 24-30 horas. Entonces se saca, se marca el frente a lápiz y se coloca en estufa de desecación con corriente de aire caliente (de 30 a 34°C.). Una vez seco el papel, se pulveriza con disolución de Ninhidrina en Butanol-Acético-Agua (3), y se pone durante 5 minutos en una estufa a 90-95°C. Se contornean las manchas a lápiz y se fijan con nitrato de cobre o cobalto. Finalmente se miden los valores de Rf de cada aminoácido. Cuando se han obtenido 8 ó 10 cromatogramas concordantes, se calculan los valores medios de Rf para aquel disolvente y se tabulan. Para la cromatografía ascendente se procede de un modo análogo.

Resultados

En principio podemos decir que el comportamiento de los aminoácidos estudiados es el que cabía esperar lógicamente de su fórmula y propiedades físico-químicas (8).

Así, utilizando los disolventes de desarrollo corrientes en Cromatografía, se obtienen sobre el papel manchas bien definidas, ovales o redondas que, al revelar con Ninhidrina, toman un color rojo análogo al de los otros α -aminoácidos y son perfectamente fijables con la disolución alcohólica de nitrato de cobre (3).

TABLA I

Valores de $R_f \times 100$ de aminoácidos de la serie β -hidroxi- α -aminocarboxilica en los disolventes que se indican:

		A M I N O A C I D O S							
Disolventes		Serina	Treonina	T. Propil-serina	E. Propil-serina	T. Butil-serina	E. Butil-serina	Norvalina	Norleucina
1	Colidina-lutidina-agua (1:1:1) Cromatografía ascendente	33	45	60	57	70,5	68,5	47	
2	Fenol 80 %. Cr. descendente Valores de C. E. Dent*	35,5 (37)	49,5 (50)	71	70	77	77,5	76,5 (79)	85 (83)
3	Fenol 80 % + vapores de HN_3 Cromatografía descendente	40	51	75	73	80	79,5	—	—
4	Fenol-Ac. fórmico-agua (10:1:1,5) Cr. descendente	45	57	75	73,5	78	80,5	—	—
5	Butanol-Ac. fórmico-agua (5:1:1) Cr. descendente	13,5	17	32	33,5	39,5	40,5	—	—
6	Butanol-Ac. acético-agua (4:1:1) Cr. descendente	14	20	41	43	51,5	53	47	51,5
7	Butanol-amoniaco-agua (9:1:Sat.) Cr. descendente	0,3	0,5	18,5	18	28	26	—	—
8	Propanol 80 % Cromatografía descendente	20,5	27,5	50	51,5	59,5	61	55	64

La magnitud de los desplazamientos corresponde a la prevista, de acuerdo con su estructura química (8), siempre mayor para la Butilserina que para la Propilserina.

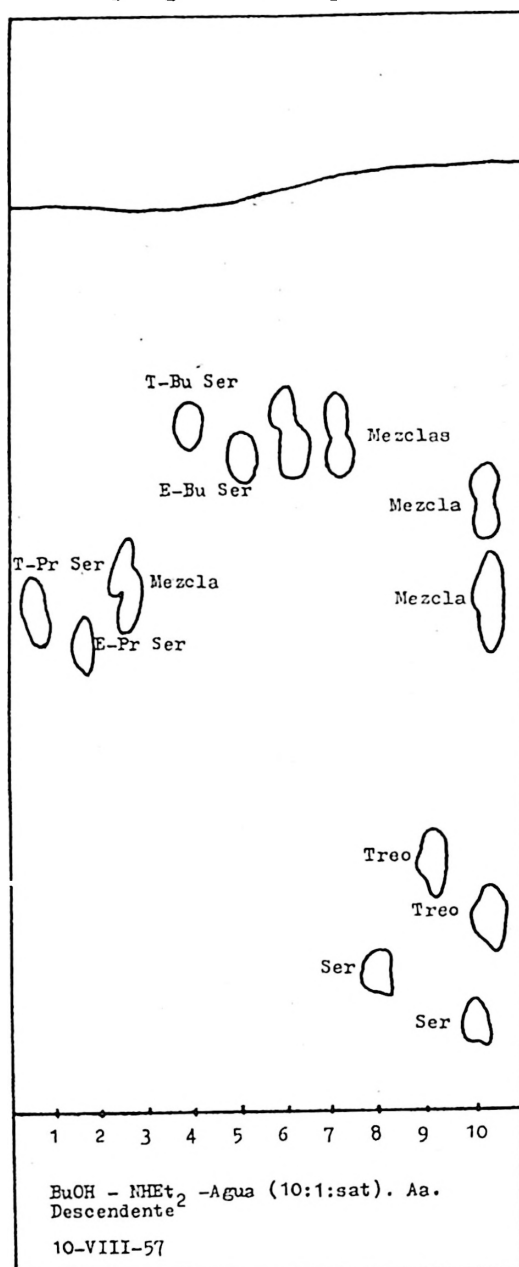


Fig. 1.—Resolución de mezclas de aminoácidos β -hidroxilados utilizando como disolvente Butanol-Dietilamina-Agua (9:1:sat.). Las formas Treo tienen Rf más altos que las Eritro correspondientes.

El primer resultado llamativo es una ligera diferencia de comportamiento entre las formas Eritro y Treo del mismo aminoácido. En la literatura aparecen referencias cromatográficas comparativas de la Aleotreonina (forma Eritro) con respecto a la Treonina (forma Treo). DENT dice que son imposibles de separar con Fenol, Colidina-Lutidina o Butanol y les asigna valores del Rf análogos (4). BLOCK recoge en unas Tablas (1) valores idénticos para los dos. Sólo HARDY y Col. consiguen separarlos utilizando Butanol-Dietilamina (la Treonina avanza más que la Aleotreonina) (5, 6).

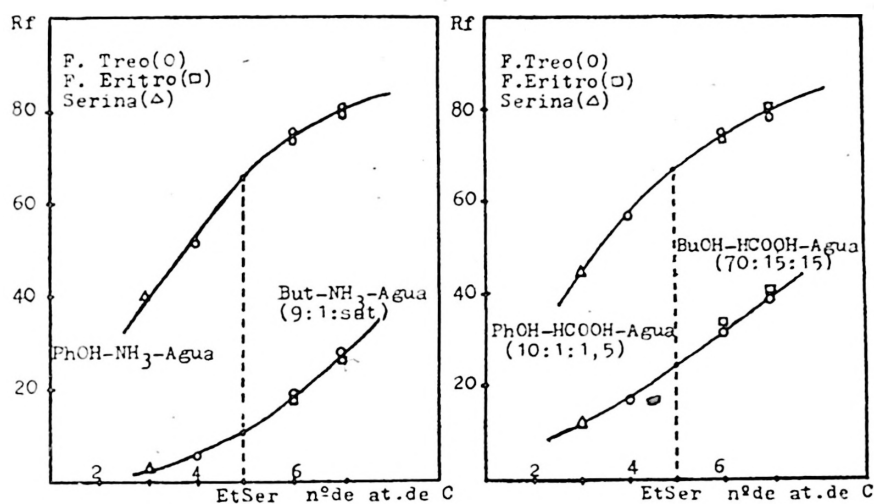


Fig. 2. — Comportamiento de los aminoácidos de la serie γ -amino- β -hidroxilica con los disolventes usuales en presencia de NH_3 o ácido Fórmico. Como regla general en medio básico (NH_3 , NHEt , Col-Lutidina, etc.). Las formas Treo se desplazan más, y en medio ácido (AcH, HCOOH ...) o alcohólico corren más las Eritro.

Nosotros hemos utilizado la mezcla ternaria: Colidina-Lutidina-Agua (1:1:1) en cromatografía ascendente (en campana) y hemos obtenido muy buenos resultados. Es de destacar que las formas Treo avanzan invariablemente algo más que las Eritro correspondientes. Sin embargo, la diferencia de desplazamientos no ha sido suficiente para desdoblar una mezcla de ambas, apareciendo en este caso una mancha mayor, algo alargada y difusa. Junto a estos aminoácidos hemos cromatografiado algunos de la serie α -amino- α carboxílica simple (Norvalina y Norleucina) que utilizamos como referencia.

Es interesante que, a diferencia de los otros disolventes cromatográficos, en Colidina-Lutidina los grupos hidróxilos de los aminoácidos no retrasan su desplazamiento sobre el papel. Esto fué constatado por DENT (4) en su mapa bidimensional para las parejas siguientes de aminoácidos: Serina-Treonina,

Tirosina-Fenilalanina, Hidroxiprolina-Prolina, que difieren únicamente en la posesión o no de un grupo hidróxilo en la molécula. Los aminoácidos E. y T. Propilserina con la Norleucina caen dentro de este grupo de sustancias y responden a la ley general. Según MARTÍN (2,10) el Rf es análogo en los elementos de cada pareja porque el grupo hidroxílico de la molécula no modifica el coeficiente de reparto del aminoácido entre el agua y el disolvente orgánico.

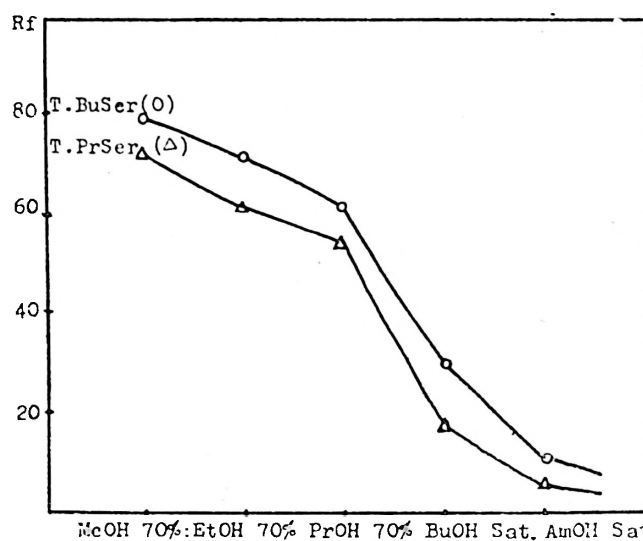


Fig. 3. — Valores de Rf de los aminoácidos sintéticos T-Propilserina y T-Butilserina en los cinco primeros alcoholes alifáticos.

Con la mezcla citada de Colidina-Lutidina-Agua conseguimos una separación neta de todos los términos hidroxilados de esta serie (Serina, Treonina, T-Propilserina y T. Butilserina). Los valores de Rf obtenidos con el método ascendente figuran en la Tabla I-1.

Utilizando el fenol 80 % también se obtienen resultados dignos de mención. En primer lugar las formas E. y T. de un aminoácido sufren desplazamientos análogos y por lo tanto sus mezclas no se pueden desdoblar con este disolvente. Los aminoácidos de cadena larga viajan notablemente en fenol, apareciendo sus manchas en las proximidades del frente y siendo por tanto algo difusas y alargadas longitudinalmente. En la mayoría de los cromatogramas la T. Propilserina se desplaza algo más que la E. Propilserina y la T. Butilserina algo menos que su homólogo E. Este fenómeno curioso observado en los cromatogramas se refleja ligeramente en la medida de Rf

obtenida como promedio de 10 determinaciones. Los resultados figuran también en la Tabla I-2.

En este caso la posesión de un grupo hidroxílico en la molécula supone, para el aminoácido, un descenso del Rf equivalente a tener dos átomos de carbono menos en ella. Así la Butilserina se desplaza como la Norvalina y la Propilserina como el ácido α -Aminobutírico.

Modificado el pH del líquido fenólico de desarrollo hemos obtenido variaciones interesantes en la conducta relativa de las formas Eritro y Treo. Así, operando con fenol en presencia de amoníaco o bien con la mezcla Fenol-Acido Fórmico-Agua, se obtienen los resultados que figuran en la Tabla I-3 y I-4, que siguen una ley general que luego destacaremos.

Empleando como líquidos de desarrollo las mezclas: Butanol-Acido Fórmico-Agua y Butanol-Acido-Acético-Agua, la forma Eritro de un aminoácido se desplaza invariablemente más que la Treo del mismo, sin llegar a desdoblarse las mezclas de ambas. Esta diferencia de comportamiento se refleja claramente en las medidas de Rf que constan en la Tabla I-5 y I-6, recogidas como promedio de 9 determinaciones concordantes, realizadas por el método descendente (en cámara). En este caso, el grupo hidroxílico produce también un notable descenso en el Rf del aminoácido con respecto a su homólogo de la serie no hidroxilada.

En cambio, con las mezclas Butanol-Amoníaco-Agua y Butanol-Dietilamina-Agua las formas Treo viajan algo más que las Eritro correspondientes (Tabla I-7) repitiéndose el fenómeno de alterarse la posición relativa de las formas epímeras con la modificación del pH. Concretamente, la mezcla Butanol-Dietilamina-Agua recomendada por HARDY y colaboradores (5, 6) para separar las formas E. y T. de la Treonina, ha dado con nuestros aminoácidos unos resultados similares (aunque algo mejores) a los de la Colidina-Lutidina. Corriendo los cromatogramas durante 40-50 horas según el método descendente en cámara se consigue un desdoblamiento parcial de la mezcla de las dos formas epímeras de cada uno. No obstante la separación no es perfecta. El revelado debe reunir unos cuidados especiales por la tendencia de Dietilamina a empapar el papel y dar una coloración azulada uniforme con la Ninhidrina, coloración que enmascara las marchas de los aminoácidos. Por ello, aparte de realizar una buena evaporación del papel con aire caliente, hay que localizar y fiar estas manchas apenas aparezcan al calentar en estufa. La Dietilamina favorece notablemente el desplazamiento de los aminoácidos.

Por último, con Propanol 80 % como disolvente, se obtuvieron resultados análogos. Las formas Eritro de cada amino-

ácido se desplazan escasamente más que las Treo, siendo imposible desdoblar sus mezclas. Con este alcohol las manchas aparecen ovales y bien delimitadas, pero los valores de Rf oscilan algo más por crecer la evaporación frontal en este disolvente (p. eb. 97,2° C.) (7). Se han evitado errores relativos al deducir los valores medios que figuran en la Tabla I-8 tomando siempre igual número de medidas de Rf de la forma E. y T. sobre cada cromatograma particular. En conjunto la mezcla Propanol-Agua (80-70 %), por su simplicidad, estabilidad, fácil eliminación y claridad de resultados constituye un excelente disolvente cromatográfico.

Hemos estudiado además el poder separador de los cinco primeros alcoholes alifáticos aplicado a los aminoácidos α -hidroxilados resultando ser máximo en el propanol, capaz de desdoblar con claridad una mezcla de los cuatro términos, quedando un espacio vacío a nivel de la Étilserina cuyo comportamiento hemos podido prever en todos los casos. El Metanol 70 % da valores de Rf muy altos y manchas difusas por exceso de solubilidad de los aminoácidos en él. El Etanol 70 % tiene los mismos defectos más atenuados. El Butanol saturado (no admite más que un 15 % de agua) da resultados bajos y no desdobla bien las mezclas. Finalmente el alcohol Amílico saturado tiene los mismos defectos que el Butanol pero más acentuados, quedando algunos aminoácidos en la mancha de origen.

En la fig. 3 se detallan los Rf, en Cromatografía ascendente, para las formas Treo de los dos aminoácidos nuevos en la serie de alcoholes alifáticos primarios. Se observa que decrecen con el peso molecular del disolvente (11).

Discusión

En conjunto el comportamiento cromatográfico de los ácidos β -Hidroxi- α -Aminohexanoico y β -Hidroxi- α -Aminoheptanoico es normal y perfectamente ajustado a las leyes generales de Cromatografía.

Considerando en detalle todas las investigaciones realizadas sobre las formas Eritro y Treo con diversos disolventes sacamos otra importante conclusión general digna de estudio: *en medio básico, las formas Treo se desplazan más que las Eritro correspondientes y en medio neutro o ácido ocurre lo contrario* (Tabla I y fig. 2).

En efecto, empleando Fenol-Amóníaco, Butanol-Amóníaco, Butanol-Dietilamina, Colidina-Lutidina, etc., se observa sobre los cromatogramas y se refleja en los Rf de las Tablas que las formas Treo avanzan más que las Eritro. Todos estos disol-

ventes tienen el comùn denominador de ser buenos aceptores de protones (bases en sentido amplio).

En cambio, empleando Fenol-Acido F6rmico, Butanol-Acido F6rmico, Butanol-Acido Ac6tico, etc., y tambi6n Fenol-Agua, Butanol-Agua, Propanol-Agua, etc., se observa cualitativa y cuantitativamente que, contrariamente al caso anterior, las formas Eritro se desplazan m6s que las Treo correspondientes.

Las escasas referencias cuidadosas de la literatura comparando la Alotreonina (Eritro) con la Treonina (Treo) (5), vienen a confirmar este resultado. Los primeros disolventes anotados, conteniendo un 6cido org6nico, son buenos dadores de protones y el fenol solo o los alcoholes alif6ticos primarios son dadores d6biles. Por ello el efecto diferenciante es menor en estos 6ltimos.

La explicaci6n l6gica ser6 que la diferente disposici6n en el espacio de los grupos hidr6filos de la mol6cula favorecer6 distintamente la disociaci6n 6cida o b6sica de las formas epimeras (E. y T.) y por tanto la capacidad de ser retenidos los amino6cidos sobre el papel (adsorci6n superpuesta a la partici6n) (10).

La regularidad de comportamiento dentro de la serie de los 6cidos α -amino- β -hidroxilados es perfecta y permite predecir claramente la posici6n y propiedades del tercer t6rmino de la serie (el Acido β -Hidroxi- α -Aminovaleri6nico o Etilserina). En efecto, quedar6 bien separado en la mezcla de los 5 amino6cidos utilizando, entre otros, cualquier disolvente de la Tabla y los Rf aproximados — deducidos por interpolaci6n gr6fica que no detallamos m6s que en 4 casos (fig. 2) — ser6n los siguientes: Colidina-Lutidina-Agua (1:1:1) [0.53], Fenol 80 % [0.61], Fenol 80 % + Amon6aco [0.63], Fenol-F6rmico-Agua (10:1:1.5) [0.66], Butanol-F6rmico-Agua (5:1:1) [0.25], Butanol-Ac6tico-Agua (4:1:1) [0.31], Butanol-Amon6aco-Agua (9:1:Sat.) [0.11], Propanol 80 % [0.40].

Resumen

Se estudia con detalle la conducta cromatogr6fica de cuatro nuevos amino6cidos sint6ticos, en los disolventes usuales, resultando ser normal en casi todos los aspectos. En general las formas Eritro y Treo del mismo amino6cido no se separan bien de sus mezclas, aunque se deduce y com-

Los nuevos amino6cidos nos han sido facilitados por el Profesor Doctor J. Pascual Vidal y el Dr. A. Par6s, del Laboratorio de Qu6mica Org6nica de la Facultad de Ciencias de Barcelona. Se lo agradecemos sinceramente, as6 como su informaci6n sobre los mismos amino6cidos.

prueba que en medio básico las formas Treo tienen Rf mayores y en medio ácido o alcohólico neutro se desplazan más las Eritro.

Finalmente, se estudia la capacidad de diversos alcoholes alifáticos para desdoblar mezclas de los aminoácidos de esta serie y se predice la conducta de la Étilserina y su Rf en los disolventes usuales.

Summary

Chromatographic study of four new synthetic amino-acids of α -amino- β -hydroxyl structure

A detailed study of the chromatographic conduct of four new synthetic amino acids, in the usual solvents, turning out to be normal on almost all aspects. In general the Erythro and Threo forms of the same amino-acid do not separate too well from their mixtures although it is deduced and verified that in a basic medium the Threo forms have a greater Rf and in acid or neutral alcoholic medium the Erythro forms displace themselves more.

Finally a study is made of the capacity that various aliphatic alcohols have of separating mixtures of the amino-acids of this series and the conduct and Rf of the ethyl-serine in the usual solvents are predicted.

Bibliografía

- (1) BLOCK, R. J.; DURRUM, E. L., y ZWEIG, G. : Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 1955.
- (2) CONSDEN, R.; GORDON, A. H., y MARTIN, A. J. P. : *Biochem. J.*, **38**, 224, 1944.
- (3) CRAMER, F. : Paper Chromatography (2.^a ed. ingl.), 1954.
- (4) DENT, C. E. : *Biochem. J.*, **43**, 169, 1948.
- (5) HARDY, T. L., y HOLLAND, D. O. : *Chemistry & Industry*, 855, 1952.
- (6) HARDY, T. L.; HOLLAND, D. O., y NAVLER, J. H. C. : *Anal. Chem.*, **27**, 971, 1955.
- (7) LANGE, N. A. : Handbook of Chemistry, 1956.
- (8) MACARULLA, J. M. : *Rev. Med. del Est. Gral. de Navarra* (en prensa).
- (9) MACARULLA, J. M., y ALVAREZ DE LA VEGA, P. : *Rev. Med. del Est. Gral. de Navarra*, **1**, 205, 1957.
- (10) MARTIN, A. J. P. : *Ann. Repts. Prog. Chem.*, **45**, 267, 1948.
- (11) SHIBATANI, A., y FUKUDA, M. : *J. Biochem. (Japón)*, **38**, 181, 1951 de C. A. **45**, 8933, 1951.