

C.N.E.A. Biblioteca	
ARCHIVO PUBLICACIONES	
Nº 1	AÑO 1960

03.60.08

REPUBLICA ARGENTINA

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

INFORME N.º 42

Sintesis de Aminoacidos Marcados

I. - SINTESIS DE DL - VALINA - 1 C¹⁴ Y DL - LEUCINA - 1 - C¹⁴

por

MAURICIO F. BÜHLER, JOSE P. A. CASTRILLON, ALDO E. A. MITTA
y MARCELO A. DANKERT

BUENOS AIRES

1960

№ 0898

De los « *Anales de la Asociación Química Argentina* »
Tomo 48, Marzo de 1960, N° 1, pág. 48 a 56

SINTESIS DE AMINOACIDOS MARCADOS

1. - SINTESIS DE DL-VALINA-1-C¹⁴ Y DL-LEUCINA-1-C¹⁴ (*)

Por

MAURICIO F. BÜHLER; JOSE P. A. CASTRILLON; ALDO E. A. MITTA
y MARCELO A. DANKERT

SUMMARY. — The preparation of DL-Valine-1-C¹⁴ and DL-Leucine-1-C¹⁴ is described. The starting materials are isobutylbromide and isoamylbromide respectively, and the synthesis goes through the carbonation of the corresponding Grignard compound with C¹⁴O₂, bromination of the carboxylic acid obtained and ammonolysis of the α -bromoacid.

Desalting is accomplished by means of an ion exchange resin (Dowex 50) and the final purification, by recrystallization from an ethanol-water mixture. The isotopic purity of the products obtained is established by paper chromatography and autoradiography.

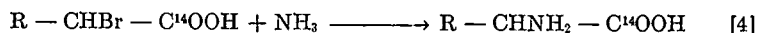
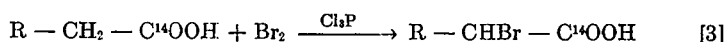
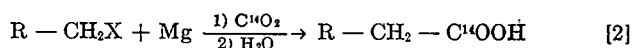
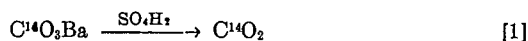
In the case of the purification of valine-1-C¹⁴ it is necessary to make use of cellulose column chromatography in order to get rid of an active impurity which behaves like an active α -aminoacid. It is quite certain that the active impurity takes its origin in the bromination stage of the synthesis.

Los aminoácidos marcados constituyen un importante aporte al campo de la Medicina y de la Biología. Han sido ya sintetizados todos los de importancia biológica, con marcas en las diferentes posiciones y con distintos elementos. Reid y Tolbert ⁽¹⁾ y Greenberg y Rothstein ⁽²⁾ resumen los métodos generales que han sido utilizados. Los autores citados en segundo término se refieren exclusivamente a marcación con carbono isotópico.

Para la síntesis de los aminoácidos que constituyen el presente trabajo se eligió el método de la amonolisis de los α -halogenuros de ácidos orgánicos ⁽³⁾ ⁽⁴⁾, por cuanto el menor costo de la materia prima marcada (C¹⁴O₃Ba), compensaba ampliamente (en el caso de DL-valina-1-C¹⁴) los mejores rendimientos que se obtienen por la

(*) Trabajo presentado en la Quinta Reunión de las Sesiones Químicas Rioplatenses, Buenos Aires, 29-31 de julio de 1959.

síntesis de Strecker ⁽⁵⁾, que utiliza KC^{14}N . Cabe agregar que no se tiene conocimiento de que la DL-valina-1- C^{14} haya sido preparada por el método elegido. La preparación de la DL-leucina-1- C^{14} se halla descrita en ⁽⁶⁾. Los pasos de esta síntesis son:



que se continúan con la eliminación de sales en columna de resina de intercambio iónico (Dowex 50 ⁽⁶⁾); cristalización de alcohol-agua; y en el caso de la valina, purificación por cromatografía en columna de celulosa ⁽⁷⁾.

La valina y la leucina brutas acusaron en la cromatografía sobre papel, la presencia de otra mancha revelable con ninhidrina, que tenía en ambos casos un R_f próximo al del aminoácido respectivo. La autorradiografía indicó que se trataba de impurezas radioactivas.

En el caso de la leucina bastaron dos recrystalizaciones para obtener un producto cromatográfica y autorradiográficamente puro; contrariamente, en el caso de la valina, resultaron infructuosas tanto las recrystalizaciones en alcohol-agua, como la disolución en butanol saturado de agua y recuperación del aminoácido eliminando el agua por destilación de la solución. La impureza resiste 24 horas de ebullición a reflujo con ácido clorhídrico 6 N y tampoco se elimina por sublimación, lo que haría concluir que se trata de un α -aminoácido.

Todo parece indicar que la sustancia responsable de esta impureza se forma durante la bromación. Para su aparición es independiente que el ácido que se somete a la halogenación sea obtenido por la síntesis de Grignard o por la oxidación del alcohol respectivo. Por otra parte, la cromatografía gaseosa del isobutanol y del bromuro de isobutilo y el espectro infrarrojo del bromuro de isobutilo utilizados en la síntesis de la valina señalaron a estos productos como especies químicas puras en el ámbito de sus respectivos poderes resolutivos. Además, la cromatografía sobre papel del ácido isovalérico sólo reveló una mancha.

Finalmente se comprobó, que purificando el ácido α -bromo-i-valérico por cristalización, se obtiene un aminoácido puro.

Esta purificación del ácido α -halogenado resulta, sin embargo, incómoda por la pérdida de rendimiento que en general acompaña a la recrystalización de sustancias de bajo punto de fusión.

En el presente caso se recurrió, para la purificación de la valina-1-C¹⁴, a la cromatografía en columna de celulosa, lográndose separarla de su impureza con una recuperación de aproximadamente 80 %.

Sobre la valina-1-C¹⁴ y la leucina-1-C¹⁴ cromatográfica y autorradiográficamente puras se efectuaron las mediciones de radioactividad con un contador Geiger Müller TG-C2 de ventana fina, comprobándose que el rendimiento isotópico fué del mismo orden que el químico.

La actividad específica de los aminoácidos preparados es de aproximadamente 0,1 mc por milimol.

PARTE EXPERIMENTAL

Aparato. — El aparato utilizado se encuentra reproducido en las figuras 1 y 2.

Consta de un "manifold" A, unido a un sistema de alto vacío; un generador de anhídrido carbónico B, un reactor G, una entrada para nitrógeno seco E y un tubo manométrico F.

El reactor G, provisto de un agitador accionado magnéticamente, tiene forma de pera para hacerlo más resistente a los cambios bruscos de temperatura.

Las mediciones de la presión reducida se efectúan con un equipo Philani, con un cabezal Philips H y otro Pirani, no indicado.

Preparación de ácido iso-valérico-1-C¹⁴. — Se coloca en B, 1,9705 g (0,01 mol) de carbonato de bario (conteniendo 10 mg de C¹⁴O₂Ba, 1,2 mc) cubierto con lana de vidrio y en C, 30 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se evacúa el sistema hasta 0,1 micrón y cerrando la llave M se prueba el aparato en cuanto a posibles pérdidas. Se introduce nitrógeno seco por E hasta alcanzar presión atmosférica (el exceso burbujea por el mercurio del tubo manométrico; se quita el tapón N y se introducen 61 ml de solución de bromuro de isobutilmagnesio 0,97 M diluidos con 20 ml de éter anhidro. Se repone el tapón N, se cierra la llave E, se congela el contenido de G con un baño de nitrógeno líquido. Conseguido esto, se abre la llave M volviéndose a evacuar hasta 0,1 μ . Se cierra M y se reemplaza el baño de nitrógeno líquido por otro a -20°C . Se espera a que al descongelarse la solución se libere del nitrógeno atrapado, después de lo cual se vuelve a congelar y a evacuar el sistema. Se cierra M. Se vuelve a llevar el reactivo de Grignard a -20°C , se pone en marcha el agitador y se inicia la carbonatación girando con cuidado el generador de anhídrido carbónico de manera que poco a poco se vuelque el ácido sulfúrico sobre el carbonato de bario. La operación se regula de manera que la

altura del mercurio en el tubo F no baje de 50 cm. Cuando disminuye el desprendimiento de anhídrido carbónico se calienta con un mechero para completar el ataque del $C^{14}O_3Ba$. Al cabo de unos 15 minutos se estabiliza la presión. Se congela nuevamente el contenido de G para reunir allí todo el anhídrido carbónico restante en la línea; se cierra la llave D, se vuelve a llevar el producto de la reacción a $-20^{\circ}C$ y se continúa agitando durante aproximadamente 10 minutos.

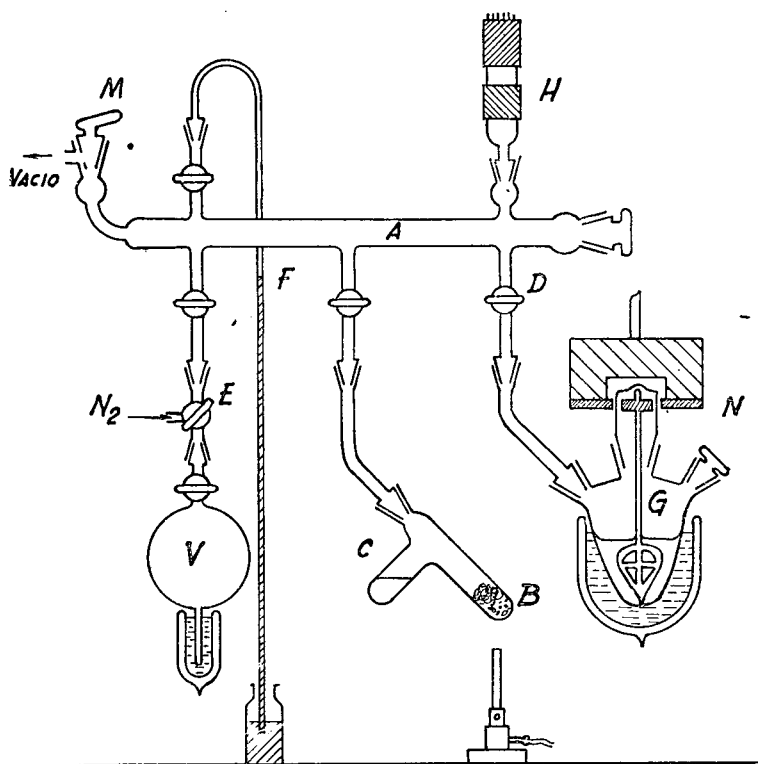


FIG. 1.

Mientras esto se realiza se evacúa el resto de la línea y el recipiente V; se sumerge la parte estrecha de X en N_2 liq.; se cierra M y se abre D con lo cual se reúne en V el anhídrido carbónico activo que no hubiera reaccionado. Posteriormente se lo fija en hidróxido de bario.

Para la elaboración ulterior del producto de la reacción, se lleva el sistema a presión atmosférica permitiendo la entrada de nitrógeno, se quita el tapón N y con el agitador en marcha y con mucho cuidado al comienzo, se agregan gradualmente 50 ml de ácido sulfúrico 1 N. Cuando se ha disuelto todo se pasa al con-

tenido de G a una ampolla de decantación, se decanta la capa acuosa y se lava con agua la etérea hasta liberarla de sulfatos.

Se reextraen con éter los extratos acuosos y luego de un lavado con agua se reúne este extracto etéreo con la solución etérea anterior.

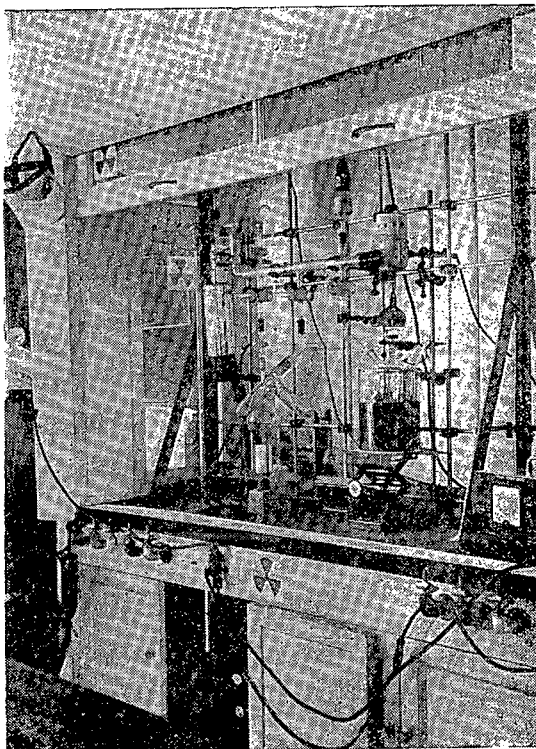


FIG. 2.

Por titulación de esta solución etérea con solución de hidróxido de sodio 1 N, en presencia de fenolftaleína, el rendimiento de la operación resulta, 95 % del teórico.

Se decanta la solución de iso-valerato de sodio, se lava la capa etérea varias veces, reuniendo los lavados con la solución; se acidifica con ácido sulfúrico 5 N, se reextrae con éter el ácido isovalérico, se seca la solución etérea con sulfato de sodio anhidro y se evapora el éter a baja temperatura. Los últimos rastros se eliminan en la línea de alto vacío sobre el producto enfriado a -40°C .

Preparación de ácido iso-caprónico-1-C¹⁴. — Se prepara a partir de 51 ml de solución 1,1 molar de bromuro de isoamilmagnesio y 1,9705 g de carbonato de bario con-

teniendo 9,4 mg de carbonato de bario activo, 1,13 mc, en forma enteramente análoga a la descrita para el ácido iso-valérico-1-C¹⁴. Rendimiento, por titulación, 96 % del teórico.

Preparación de ácido α -bromo-isovalérico-1-C¹⁴ y su amonólisis. — En un baloncito de 40 ml de capacidad se ponen 0,334 g de ácido isovalérico-1-C¹⁴, 0,2 ml de bromo seco y 1 gota de tricloruro de fósforo. Se adapta un refrigerante provisto de una trampa y un tubo con hidróxido de potasio sólido. Se calienta en un baño de aceite a 70-80°, irradiando con una lámpara de luz ultravioleta. La operación dura aproximadamente 24 horas. Se la da por finalizada cuando no se observan más vapores de bromo en el refrigerante. Una vez frío se añaden 1-2 gotas de agua y se deja 2 horas a temperatura ambiente. Se pasa luego el contenido del baloncito a un tubo de vidrio de paredes resistentes de unos 30 cm de largo lavando con éter el refrigerante y el balón.

Se elimina el éter con cuidado, se enfría el residuo a -80°C, se agregan aproximadamente 10 ml de amoníaco líquido anhidro y se cierra el tubo a la llama. Se deja 48 horas a temperatura ambiente, se abre el tubo previo enfriamiento a 80°C y se elimina el amoníaco con precaución, completando la operación en baño de María.

Preparación del ácido α -bromoisocaproico-1-C¹⁴ y su amonólisis. — Se sigue con pocas variantes el método descrito por Tolbert y sol. (1).

0,884 g de ácido isocaproico-1-C¹⁴ se dejan de un día para otro con 0,2 ml de tricloruro de fósforo. Se agregan 2,0 ml de bromo seco gota a gota en el término de media hora manteniendo el producto reaccionante a 80-90°C. Una vez frío se añaden 10 ml de agua y se elimina el exceso de bromo por arrastre con aire en el curso 4-5 horas. Se extrae con éter el ácido bromado, se seca el éter con sulfuro de sodio anhidro y se lo transfiere al tubo en que ha de realizarse la aminación, que se efectúa exactamente en la misma forma descrita anteriormente.

Eliminación de sales y cristalización. — Los productos provenientes de la aminación por amonólisis, disueltos en la mínima cantidad posible de agua se introducen en una columna de resina Dowex 50 (2 cm de diámetro por 20 cm de alto) a una velocidad de 15 gotas por minuto. Se lava con agua destilada hasta reacción negativa de halogenuros y luego se eluye el aminoácido con solución de hidróxido de amonio 2 N hasta reacción negativa con ninhidrina. La solución amoniacal se lleva a seco en baño de María. Se obtuvo respectivamente 0,249 y 0,720 g de valina y leucina brutas.

Para su cristalización se disuelven los productos en agua, se concentra la solución a baño de María (eventualmente previa decoloración con carbón activo y filtración) hasta comienzo de cristalización, se agrega aproximadamente 5 volúmenes de alcohol y se deja una noche en la heladera. En el caso de la leucina, dos recristalizaciones rindieron 0,490 g (47 % respecto del C¹⁴O₃Ba) de leucina-1-C¹⁴ pura.

Contrariamente, después de tres recristalizaciones la valina seguía presentando dos manchas en la cromatografía sobre papel.

PURIFICACION EN COLUMNAS DE CELULOSA

Se utilizó una columna de 4 cm de diámetro por 60 cm de alto, cargada hasta unos 15 cm del borde superior con celulosa Whatman en polvo, seca, y firmemente prensada.

La columna se satura con una mezcla de butanol, ácido acético y agua en la proporción 12/2/5 respectivamente (disolvente).

Se disuelven 0,333 g de valina impura, recristalizada una sola vez, en la menor cantidad posible de disolvente (aprox. unos 20 ml).

Se agrega celulosa en polvo hasta formar una pasta y se vierte cuantitativamente en la columna, evitando, por agitación suave con una varilla de vidrio, que queden retenidas pequeñas burbujas de aire.

Se agrega un poco más de celulosa y se la cubre con un aplaquita de vidrio poroso. El conjunto debe quedar húmedo.

Se hace correr el disolvente a un ritmo de aproximadamente 6 gotas por minuto.

Se recogen fracciones cada hora por medio de un colector de muestras automático. Se determina el tubo en que comienza a salir el aminoácido mediante la reacción de la ninhidrina practicada sobre papel con una microgota de muestra. Luego, por cromatografía sobre papel, se establece la serie de tubos en que la valina se recoge pura. El contenido de éstos se pasa cuantitativamente, lavando con agua, a un pequeño vaso de precipitados, se concentra en baño de María y se precipita con alcohol.

Se obtuvieron 0,244 g y de las aguas madres 0,021 g más, o sea 0,265 g de valina-1-C¹⁴ cromatográficamente pura, lo que fué confirmado por cromatografía bidimensional. La autorradiografía reveló la presencia de una sola mancha activa.

El rendimiento con respecto al CO₂Ba en valina-1-C¹⁴ blanca, cristalina, cromatográfica y autorradiográficamente pura fué de un 33 % aproximadamente. (En ensayos previos, con material no marcado se obtuvieron rendimientos de más del 40 %).

Las aguas madres, llevadas a sequedad, dieron 0,027 g más de valina-1-C¹⁴ cromatográficamente pura, pero ligeramente coloreada.

Cromatografía sobre papel. — Para la cromatografía monodimensional ascendente de ácidos orgánicos (i-valérico, i-caprónico) se utiliza papel Whatman N° 1 y como disolvente alcohol/amoniaco 100:1 revelando con rojo de metilo o azul de bromotimol.

Para la cromatografía monodimensional ascendente de aminoácidos se usa como disolvente una mezcla butanol/ácido acético/agua en la proporción 12/3/5, y para la bidimensional, ese mismo disolvente y luego fenol/agua, 4/1, revelando con ninhidrina.

Autorradiografías. — La valina y la leucina marcadas se hacen correr sobre papel Whatman N° 1 durante 16 horas con butanol/ácido acético/agua. La tira de papel, una vez seca, se coloca sobre una placa de radiografía y se deja una semana en la oscuridad. La revelación de la placa debe acusar una sola mancha correspondiente a la posición de los respectivos aminoácidos en el cromatograma.

Mediciones de radiactividad. — Las muestras para la medición se diluyen con aminoácidos puros inactivos, se recristalizan de alcohol-agua y los productos diluidos así obtenidos, se miden en cápsulas de aluminio a espesor infinito con un tubo TGC-2 de ventana fina. Se efectúan las correcciones correspondientes al tiempo muerto y al fondo y se calculan las actividades específicas en microcuries por milimol en base a un patrón de actividad conocida. Las actividades medidas fueron de 0,13 mc/mM para la valina-1- C^{14} y 0,11 mc/mM para la leucina-1- C^{14} . Ambos datos concuerdan con los calculados teniendo en cuenta la actividad específica del $C^{14}O_2$ Ba original y su posterior dilución: 0,12 mc/mM y 0,11 mc/mM respectivamente.

Cromatografía de partición (en fase gaseosa) de alcohol isobutílico y de bromuro de isobutilo. — La muestra (1 gota = 8 μ l) se inyectó en una columna de dos metros utilizando silicona D. C. 702 como relleno líquido. La temperatura de la columna se fijó alrededor de 60°C. Se utilizó nitrógeno como "carrier" con un flujo de 20 ml por minuto. Se realizaron inyecciones cambiando los flujos y manteniendo fija la temperatura para modificar los tiempos de retención. Se obtuvieron en todos los casos cromatogramas de un solo pico, sin la presencia de picos extraños de compuestos más o menos volátiles que las sustancias estudiadas.

Espectro de absorción infrarrojo del bromuro de isobutilo. — Se utilizó el espectrómetro de infrarrojo del Laboratorio de Física de C.N.E.A. El aparato es de un solo haz y se redujo al mínimo el espectro de absorción de la humedad ambiente inyectando en el sistema óptico una corriente constante de aire caliente y seco. Se eligieron para el reconocimiento las bandas comprendidas entre 7,08 y 7,8 μ . bien características de las frecuencias vibracionales de halógeno-radical orgánico. La imposibilidad de barrer las longitudes de onda superiores a 9 μ (el aparato tiene óptica de fluoruro de calcio) limita las posibilidades de identificación. El espectro obtenido concuerda con el correspondiente al del halogenuro-butilo. La comparación directa se efectuó con el espectro del cloruro correspondiente considerando el desplazamiento de la banda al sustituirse el cloro por bromo. Como conclusión puede, considerarse el producto libre de impurezas.

Espectro infrarrojo (bromuro de isobutilo).

Números de onda (cm^{-1})

Previstos (8)	Hallados
2930.....	2930
1415.....	1415
.....	1400
1377.....	
1375.....	1375
1370.....	1370
1340.....	1340
1310..	

RESUMEN

Se preparó DL-valina-1-C¹⁴ a partir de bromuro de isobutilo a través de la siguiente secuencia de reacciones: carbonatación con C¹⁴O₂ del compuesto de Grignard correspondiente, en la línea de alto vacío; bromación del ácido isovalérico-1-C¹⁴ formado y amonólisis del ácido α -bromo-isovalérico-1-C¹⁴ con amoníaco líquido en tubo cerrado. La purificación del aminoácido se realizó, previa eliminación de sales con resinas de intercambio iónico (Dowex 50), por cristalización en alcohol-agua y cromatografía en columna de celulosa.

La pureza isotópica fué establecida por cromatografía sobre papel y autorradiografía.

Con pocas variantes en el procedimiento se preparó DL-leucina-1-C¹⁴ a partir de bromuro de isoamilo y C¹⁴O₃Ba.

Agradecemos al laboratorio de Fluoroquímica de la Div. Química Inorgánica de la C.N.E.A. la realización de los análisis por cromatografía de partición en fase gaseosa y por espectrografía infrarroja.

BIBLIOGRAFIA

- (1) REID, J. y TOLBERT, B. M. — *The synthesis of labeled alpha aminoacids*, U.C.R.L., 408 (1949).
- (2) GREENBERG, D. M. y ROTHSTEIN, M. — *Methods in Enzymology*, Colowik y Kaplan (1957).
- (3) MARVEL, C. S. — *Organic Synthesis*, 21, 74 (1941).
- (4) CHERONIS y SPITZMUELLER. — *J. Org. Chem.*, 6, 467 (1941).
- (5) SELF, R. E. y TOLBERT, B. M. — *Preparation of valine-1-C¹⁴*, U.C.R.L., 1301 (1951).
- (6) HAUPTMAN, H., ADAMS, P. T. y TOLBERT, B. M. — *The synthesis of Leucine and several branched chain fatty acids labeled with carbon-14 in various positions*, U.C.R.L., 935 (1950).
- (7) BLOCK, R. J., DURRUM, E. L. y ZWEIG, G. — *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, N. York, 1958.
- (8) MARRISON, L. W. — Collection I.C.I. Ltd. General Chemical Division, MAR-L-1000-12/57.

DIVISIÓN QUÍMICA ORGÁNICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA

Recibido, diciembre de 1959.