

Aptitude particulière à l'estérification de certains acides aminés; étude chromatographique

Les acides aspartique et glutamique, en solution éthanolique contenant de l'acide chlorhydrique^{1,2} ou mis au contact d'une résine échangeuse d'ions (Dowex 50) sous sa forme acide³, subissent très facilement une estérification au niveau du groupement carboxylique le plus éloigné de la fonction azotée. DE VAY et Coll.^{4,5} ont montré que cette estérification est responsable de l'apparition sur les chromatogrammes de ces amino-acides purs d'un spot supplémentaire décelable par la ninhydrine; ces auteurs signalent en outre que la β -alanine et l'acide γ -amino-butérique s'avèrent également très sensibles à l'action de l'éthanol, tandis que les monoacides α -aminés naturels, dont le groupement acide est engagé dans la formation d'un zwitterion, ne subissent aucune estérification. Des artefacts analogues se produisent également à la suite de l'estérification de divers acides organiques lors de l'extraction des produits végétaux par des solvants organiques^{6,7}. Dans cette note, nous montrons que l'estérification peut intéresser d'autres acides aminés et s'effectuer également à partir du méthanol et du *n*-butanol.

Partie expérimentale

L'acide aminé est dissous dans l'eau distillée ou dans l'acide chlorhydrique dilué (pH = 1.5), à la concentration de 0.1 mmole/ml; on ajoute à des échantillons de ces deux solutions du méthanol, de l'éthanol ou du *n*-butanol de façon à réaliser une concentration finale en alcool de 85 % (v/v); les mélanges ainsi préparés sont homogènes à l'exception de ceux qui renferment du butanol et qui n'ont pas été acidifiés: ces derniers sont agités fréquemment. Après 24 h de séjour à la température du laboratoire, on procède à la chromatographie ascendante sur papier Whatman No. 1, avec comme phase solvante un mélange *n*-butanol-acide acétique-eau (65:15:25, v/v); on dépose sur le papier 20 μ l de chaque mélange. On chromatographie également, comme témoins, une solution aqueuse neutre et une solution chlorhydrique (pH 1.5) de chaque aminoacide. Après séchage, on pulvérise une solution de ninhydrine à 0.1 % dans le *n*-butanol et l'on porte le chromatogramme 10 min dans une étuve à 80°.

Résultats

Notre étude a porté sur 21 composés diversement substitués mais comportant tous dans leur molécule un groupement aminé non situé en α d'un groupement acide. Nos résultats, groupés dans le Tableau I, montrent qu'en présence d'alcool et d'acide chlorhydrique, de nombreux acides aminés présentent sur les chromatogrammes deux spots bien distincts, l'un correspondant à l'acide aminé lui-même, l'autre à son ester (dont la caractérisation a été effectuée dans le cas de l'acide glutamique). L'estérification intéresse en particulier les homologues supérieurs de l'acide α -amino-butérique et de l'acide glutamique. Les alcools méthylique, éthylique et *n*-butylique, dans nos conditions expérimentales, ont manifesté un comportement analogue, sauf dans le cas de l'acide β -méthylaspartique qui n'a fourni de deuxième spot qu'avec le méthanol. Les différents esters formés par le même acide aminé présentent un R_F d'autant plus grand que l'alcool qui a servi à leur formation possède un poids moléculaire plus élevé. Certains facteurs structuraux se montrent peu favorables à l'estérification:

TABLEAU I

CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DE QUELQUES ACIDES AMINÉS EN SOLUTION AQUEUSE NEUTRE (N), EN SOLUTION AQUEUSE ACIDE (A), EN PRÉSENCE D'ACIDE CHLORHYDRIQUE ET DE MÉTHANOL (M), D'ÉTHANOL (E) OU DE *n*-BUTANOL (B)

| Acide aminé $\begin{array}{c} R_1 \quad R_2 \\ \quad \\ HOOC-CH-CH-NH_2 \end{array}$ | R_1 | R_2 | R_F | | | | |
|---|------------------------------------|-------------------------------|-------|------|------|------|------|
| | | | N | A | M | E | B |
| β -Alanine | H | H | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.14 | 0.14 |
| Isosérine ⁸ | OH | H | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| Acide β -amino-butyrique | H | CH ₃ | 0.38 | 0.38 | 0.38 | 0.38 | 0.38 |
| β -Phényl- β -alanine | H | C ₆ H ₅ | 0.76 | 0.76 | 0.76 | 0.76 | 0.76 |
| Acide β -amino-isobutyrique | CH ₃ | H | 0.49 | 0.50 | 0.50 | 0.50 | 0.50 |
| Acide aspartique | H | COOH | 0.14 | 0.16 | 0.16 | 0.16 | 0.16 |
| Acides β -hydroxy-aspartiques ⁹ (érythro et thréo) | HO | COOH | 0.06 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 |
| Acide β -méthyl aspartique ¹⁰ (thréo) | CH ₃ | COOH | 0.19 | 0.22 | 0.22 | 0.22 | 0.22 |
| | | | | | 0.62 | 0.77 | 0.88 |
| | | | | | 0.37 | 0.49 | 0.77 |
| | | | | | 0.12 | 0.20 | 0.49 |
| | | | | | 0.26 | | |
| Acide aminé $\begin{array}{c} R_3 \\ / \quad \backslash \\ HOOC-(CH_2)_n-CH \\ \backslash \quad / \\ NH_2 \end{array}$ | n | R_3 | R_F | | | | |
| | | | N | A | M | E | B |
| Acide γ -amino-butyrique | 2 | H | 0.40 | 0.42 | 0.42 | 0.42 | 0.42 |
| Acide δ -amino-valérianique | 3 | H | 0.38 | 0.39 | 0.39 | 0.39 | 0.39 |
| Acide ε -amino-caproïque | 4 | H | 0.45 | 0.47 | 0.47 | 0.47 | 0.47 |
| Acide δ -amino-caprylique | 6 | H | 0.67 | 0.69 | 0.69 | 0.69 | 0.69 |
| Acide 11-amino-undécanoïque | 9 | H | 0.87 | 0.88 | 0.88 | 0.88 | 0.88 |
| Acide glutamique | 2 | COOH | 0.24 | 0.26 | 0.26 | 0.26 | 0.26 |
| Acide α -amino-adipique | 3 | COOH | 0.27 | 0.27 | 0.27 | 0.27 | 0.27 |
| Acide α -amino-pimélique | 4 | COOH | 0.32 | 0.33 | 0.33 | 0.33 | 0.33 |
| | | | | | 0.33 | 0.51 | 0.79 |
| | | | | | 0.38 | 0.53 | 0.75 |
| | | | | | 0.40 | 0.59 | 0.84 |
| Acide aminé $\begin{array}{c} COOH \\ / \quad \backslash \\ R_4-CH_2-CH \\ \backslash \quad / \\ NH_2 \end{array}$ | R_4 | | R_F | | | | |
| | | | N | A | M | E | B |
| Acide cystéique | SO ₃ H | | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| Acide homocystéique | CH ₂ -SO ₃ H | | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 | 0.10 |
| Acide γ -méthylglutamique ¹¹ | CH(CH ₃)-COOH | | 0.29 | 0.31 | 0.31 | 0.31 | 0.31 |
| Acide γ -méthylène-glutamique ¹¹ | CH(=CH ₂)-COOH | | 0.22 | 0.24 | 0.24 | 0.24 | 0.24 |

(a) Dans la molécule de β -alanine, une substitution sur le carbone β par un groupement méthyle ou phényle; la substitution sur le même atome de carbone par un groupement carboxylique, que réalise la passage de la β -alanine à l'acide aspartique, ne gêne cependant pas la formation de l'ester, mais l'acide aspartique s'est montré toutefois plus lentement estérifiable que l'acide glutamique.

(b) Dans la molécule d'acide glutamique, l'introduction d'un substituant en position γ inhibe l'estérification.

(c) Le remplacement du groupement carboxylique par un groupement acide sulfonique, dans les molécules d'acide aspartique et glutamique, empêche également la formation d'esters.

Remerciements

Nous remercions Mlle M. L. KORNGUTH et MM. BROCKMANN, ISENBERG ET FOWDEN, qui nous ont aimablement procuré certains acides aminés utilisés dans ce travail.

Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine et de Pharmacie,
Bordeaux (France)

E. NEUZIL
D. REISS

- 1 R. KOCH ET H. HANSON, *Z. Physiol. Chem.*, 292 (1953) 180.
- 2 K. HEYNS, W. KOCH ET W. KÖNIGSDORF, *Naturwiss.*, 39 (1952) 381.
- 3 P. H. PLAISTED, *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 19 (1958) 231.
- 4 J. E. DE VAY, A. R. WEINHOLD ET G. ZWEIG, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 815.
- 5 G. ZWEIG, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 821.
- 6 J. CARLES ET A. LATTES, *Compt. Rend.*, 252 (1961) 1829.
- 7 J. CARLES, A. LATTES ET F. LATTES, *J. Chromatog.*, 6 (1961) 486.
- 8 H. BROCKMANN ET H. MUSSO, *Chem. Ber.*, 89 (1956) 241.
- 9 M. L. KORNGUTH ET H. J. SALLACH, *Arch. Biochem.*, 91 (1960) 39.
- 10 H. D. ISENBERG, E. SEIFTER ET J. I. BERKMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 187.
- 11 L. FOWDEN ET J. DONE, *Biochem. J.*, 55 (1953) 548.

Reçu le 30 juillet 1965

J. Chromatog., 21 (1966) 355-357

Paper chromatographic separation and behaviour of the *cis*- and *trans*-isomers of cinnamic acid derivatives

In a previous publication¹ it was shown that the *cis* and *trans* isomers of a number of cinnamic acid derivatives could be separated by paper chromatography using an aqueous 2 % v/v acetic acid solvent. With alcoholic and phenolic solvents the isomers were always unresolved. It was deduced that the spot of higher R_F in any given case represented the *cis* isomer, and that of lower R_F the *trans* isomer. Prior to this, CARTWRIGHT AND ROBERTS² examined the effect of aqueous acetic acid solvents upon the mobilities of *trans* cinnamic acid derivatives on paper chromatograms. They found that plain water, free from the slightest trace of acid, caused chlorogenic, *o*- and *p*-coumaric acids and caffeic acid to run very closely together near the solvent front.

J. Chromatog., 21 (1966) 357-362