

Utilización del reactivo de Boctor en la cromatografía cualitativa de derivados indólicos 'simples'*

L. CASAL DÍAZ Y A. MESA

Lab. de Fisiología Vegetal, Jardín Botánico Nacional y Estación Experimental de Pastos y Forrajes, "Indio Hatuey", Universidad de La Habana

Recibido: 2 de febrero de 1976

ABSTRACT. The spot colors of 20 different 'simple' indolic compounds obtained illuminating with day-light, and the fluorescence with ultraviolet light, are reported; our way of usage of Boctor's reagent (o-phosphoric acid 20% v/v in ethylic alcohol-95°) in the chromatographic development from thin-layer and paper chromatography is also showed. These results are compared with those obtained with van Urk and Ehrlich reagents, respectively. Our results suggest some advantages in the utilization of the new reagent in thin-layer chromatography, not in paper chromatography, and these are discussed. Two Rf tables are reported for both techniques, using a different adsorbent and paper to the common-used; the utilization of these materials is also discussed for the chromatography of those derivatives.

RESUMEN. Se reportan las condiciones de utilización, los colores obtenidos a la luz visible, y la fluorescencia a la luz ultravioleta de 20 compuestos indólicos 'simples' diferentes, revelados con el reactivo de Boctor (ácido o-fosfórico al 20% v/v en etanol de 95°), en la cromatografía de capa delgada y de papel. Se comparan dichos resultados con los obtenidos con los reactivos de van Urk y de Ehrlich, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que este nuevo revelador puede ser ventajosamente utilizado en la identificación de este tipo de compuestos en la cromatografía de capa delgada, no así en la de papel. Se reportan los Rf obtenidos en ambas técnicas utilizando adsorbente y papel diferentes a los habitualmente usados; se discute la posible utilización de éstos en el estudio cromatográfico de dichos derivados.

* Trabajo presentado en el Tercer Seminario de Investigaciones de la Facultad de Ciencias, Universidad de La Habana, el 5 de septiembre de 1973 (IIIer. SIC).

INTRODUCCION

El estudio de los compuestos indólicos 'simples' ocupa un papel destacado en las investigaciones biológicas. Gran número de dichos compuestos, y como sustancia representativa el IAA,** integran el metabolismo de las auxinas indólicas, que participan en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, y de sus órganos (*Leopold, 1963 y Heslop-Harrison, 1963*). En biología animal su papel más importante está dado por la aparición de derivados indólicos en la orina, en algunos procesos patológicos, cuya identificación y cuantificación tiene valor diagnóstico (*Beeson y McDermott, 1968*).

Recientemente se ha reportado un nuevo revelador para dichos compuestos en la Cromatografía de capa delgada (*Boctor, 1972*), que fue igualmente sensible que el DMAB para los tres derivados indólicos estudiados, y no reaccionó con los aminoácidos no indólicos, que fueron ensayados.

Ampliar su estudio, hasta 20 diferentes compuestos de este tipo, fue el propósito principal de nuestro trabajo. Utilizamos adsorbente y papel diferentes, para la Cromatografía de capa delgada y de papel respectivamente, a los habituales (*Kaldewey, 1969 y Jepson, 1969*), más asequibles a nosotros, con el propósito de obtener información útil para el trabajo de nuestro laboratorio; empleándolo en la Cromatografía de papel intentamos además, ampliar las posibilidades de utilización del revelador.

MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos utilizados, de diversa procedencia, eran de calidad analítica. Los derivados indólicos cromatografiados pertenecían a las siguientes casas comerciales: IAAm, I2CA, ICA, I5CA, Try-5-OH, I-5-OH: Koch-Light Lab. Ltd. (Inglaterra); IAN, IEtOH, IPyA, IIA: Chuchardt-München (R.F.A.); IPA, Sero, IOAC: BDH Chemicals Ltd. (Inglaterra); IAA y Try: Prolabo (Francia); Ska, IAAOEt, IBA: Sigma Chemicals Co. (EE.UU.); TryAm y Gram: Desconocida (obsequio de M. Vendrell-España).

** Para toda abreviatura véase la relación de éstas situada al final de Materiales y Métodos.

Cromatografía de capa delgada (CCD):

Agrupamos los 20 derivados indólicos, para esta técnica, en tres grupos: ácidos, neutros y básicos, y acuosolubles, por ser ésta la agrupación que obtenemos al estudiar un material vegetal por nuestras habituales técnicas (Powell, 1960, 1963 y 1964), corriendo cada grupo en el solvente correspondiente: ácido, neutro y básico, respectivamente, cuyas composiciones se detallan en la Tabla I. El IAA, usado como estándar, fue corrido en los tres sistemas.

Las placas fueron preparadas por el procedimiento de derrame ("pouring procedure", según Stahl, 1969) consistente en pesar 6 g. del adsorbente y suspenderlo en 14 ml. de agua destilada en cristal, agitando fuertemente la suspensión durante 1 minuto para verterla en cada placa de 200×200 mm. Las placas preparadas se dejaban secar, en posición horizontal y a temperatura ambiente, de un día para otro, y a la mañana siguiente se calentaban a 110°C . en posición horizontal, para ser utilizadas inmediatamente —esperando algunos minutos para que se enfriaran—, o se conservaban en una desecadora sobre un agente desecante activo (Silicagel self-indicating: BDH Chemicals Ltd., Inglaterra) hasta su utilización. El resto de la técnica se montó siguiendo las recomendaciones estándar, para la cromatografía analítica y saturado las cámaras por el sistema CS, de Stahl (1969). El adsorbente empleado fue silicagel para cromatografía de capa delgada (BDH Chemicals Ltd., Inglaterra) adicionada con un 13% de peso con tamaños de partícula inferiores a las 105 micras. Los sistemas de solventes fueron renovados cada 48 horas, exceptuando el básico que, por su fácil deterioro, se renovó diariamente. Cada compuesto fue corrido 10 veces como mínimo para calcular el hRf promedio.

Cada corrida fue montada con dos placas a la vez por cámara, conteniendo los mismos compuestos, con el fin de revelar una de ellas con el reactivo de van Urk por la técnica reportada (Stahl, 1969), y la otra con el de Boctor: con el cual se atomizó fuertemente la placa después de seca, y a continuación ésta se calentó de 10-20 minutos a 110°C . Inmediatamente después se observaron las placas a la luz del día y después a la luz ultravioleta corta y larga (lámpara Camag, longitudes de onda: 254 y 366 nm. Inglaterra). Se realizaron las observaciones a la luz ultravioleta por detectarse que las mayorías de los compuestos fluorescían de forma típica, ser ello una propiedad que podía ser de utilidad en tareas de

identificación de este tipo de compuestos, y no haber sido reportada en el mencionado trabajo original (*Boctor, 1972*).

Cromatografía de papel (CP):

El solvente básico (el más usado) descompone algunos derivados indólicos (*Jepson, 1969*) y, por ello, utilizamos otro de carácter opuesto con el objetivo de obtener los Rf de los compuestos destruidos, en el solvente básico, en el otro ácido; empleamos dichos solventes según se describe en la literatura (*Iskric y Kveder, 1965*).

Se utilizó una Cámara Panglas 300 Chromatank (Shandon, Inglaterra), papel Filtrak FN 1 (R.D.A.), en forma descendente, largo de corrida 45 cm, efectuada durante 15 horas, a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, la mayor parte durante la noche para disminuir la fotoxidación de los compuestos.

Dos de los cuatro cromatogramas, corridos a la vez, fueron revelados con el reactivo de Ehrlich de la manera usual (*Mowat, 1969*), y los otros dos, para comparación, con el reactivo de Boctor, usado por sumersión del papel en el revelador ("dip technique"), y calentamiento posterior a 80°C . de 20-40 minutos, que demostró ser la mejor de las posibilidades empleadas, sin modificar la composición del revelador. A pesar de lo antes expresado, los cromatogramas se deterioraban con facilidad al manipularlos, dificultando con ello la obtención de resultados, que junto con la no fluorescencia de un buen número de compuestos, con esta técnica, hizo desechar la idea inicial de estudiar los derivados indólicos en los dos sistemas de solventes y, por ello, en la próxima sección, sólo reportamos los resultados obtenidos en el solvente básico, sin entrar en su discusión detallada.

Cada compuesto fue corrido como mínimo 10 veces para obtener su Rf promedio.

Para ambas técnicas se utilizó el mismo revelador sin modificar: Acido-o-fosfórico al 20% v/v en alcohol etílico de 95° (*Boctor, 1972*).

Abreviaturas empleadas: DMAB: p-Dimetilaminobenzaldehido; I2CA: Acido Indol-2-carboxílico; I5CA: Acido Indol-5-carboxílico; ICA: Acido Indol-3-carboxílico; IPyA: Acido Indol-3-pirúvico; ILA: Acido Indol-3-láctico; IBA: Acido Indol-3-butírico; IPA: Acido Indol-3-propiónico; IAA: Acido Indol-3-acético; TryAm: Triptamina; Gram: Gramina; IAAm: Indol-3-acetamida; IEtOH: Triptofol; IAN: Indol-3-acetonitrilo; IAAOEt: Indol-3-aceto de etilo; IOAC: Acetato de indoxilo; Ska: Escatol; Try-5-OH: 5-hidroxi-Tripófano; I5OH: 5- hidroxi-Indol; Sero: Serotonina; y Try: Triptófano.

TABLA I

*Resultados de la Cromatografía de capa delgada*GRUPO ACIDOS Solvente: Cloroformo: Acido Acético, 95:5
(Randerath, 1971)

Derivados Indólicos	hRf	Revelador	Color	UV 254 nm	UV 366 nm
I2CA	46	Boctor van Urk	Viol Rs cl (I)	No —	No —
I5CA	51	Boctor van Urk	Rs osc Rj	Rs (c) G o Am (b) —	Ig —
ICA	46	Boctor van Urk	Rs C Rs	Nj (I) —	Ig —
IPyA	07!	Boctor van Urk	G C C	Dudosa —	Ig —
ILA	09	Boctor van Urk	Viol Vd Az	C —	Ig —
IBA	53	Boctor van Urk	Vd Az	Oc —	C —
IPA	54	Boctor van Urk	Vd Az	Oc —	C —
IAA	48	Boctor van Urk	Viol Az Viol	Oc o Vd (I) —	Vd Az (I) —

GRUPO NEUTROS Y BASICOS Solvente: n-Hexano: Butanona, 65:35
(Kaldewey, 1969)

TryAm (B)	00	Boctor van Urk	Viol Az	C (E) —	Ig —
Gram (B)	00	Boctor van Urk	Rs Rs (l)	Nj (E) —	Ig —
IAAm	05	Boctor van Urk	Viol Az	Viol (I) —	Az (I) —
Derivados Indólicos	hRf	Revelador	Color	UV 254 nm	UV 366 nm

TABLE I (Continuación)
GRUPO NEUTROS Y BASICOS

IEtOH	32	Boctor van Urk	Viol Rj Az	Oc (I) —	Ig —
IAN	52	Boctor van Urk	Viol cl Viol Roj	Vd cl (I) —	Vd (E) —
IAAOEt	56	Boctor van Urk	Viol cl Rj Viol	G (E) (Vd ocs) —	Az cl —
IOAC	59	Boctor van Urk	G Az C Rj (c) Vd o Az (b)	Vd osc —	Ig —
Ska	66	Boctor van Urk	C (I) Az	Vd C (E) —	Ig —
IAA	24!				

GRUPO ACUOSOLUBLES Solvente: Acetato de metilo: Isopropanol: Agua
Amoniacal, 45:35:20 (Randerath, 1971)

Try-5-OH	45	Boctor van Urk	G Viol Az	No —	No —
I-5-OH	92	Boctor van Urk	Viol ng Viol Rj	C —	Ig —
Sero	79	van Urk Boctor	Az Az	No —	No —
Try	56	Boctor van Urk	Viol Rj Az	Oc —	Ig —
IAA	61				

Abreviaturas empleadas: Am: Amarillo; Az: Azul; C: Carmelita; G: Gris; Nj: Naranja; Oc: Ocre; Rj: Rojo; Rs: Rosado; Vd: Verde; Viol: Violeta; ng: negruzco; cl: claro; osc: oscuro; (B): Indol de carácter básico; (c): centro de la mancha; (b): borde de la mancha; (I): el color aparece lentamente; ocs: color ocasional; Ig: Igual fluorescencia; (I): Fluorescencia intensa; (E) Fluorescencia escasa; !: Cola en la corrida.

RESULTADOS Y DISCUSION

CCD.

Los resultados se muestran en la Tabla I. La desviación típica de cada una de las medias reportadas nunca fue superior a 5 unidades de hRF. Todos los derivados estudiados reaccionaron con ambos reactivos, mostrando similar variabilidad de colores, aunque diferentes, a los obtenidos con el reactivo de van Urk: donde predomina el azul, respecto al de Boctor: donde lo hace el violeta. El color de las manchas obtenido por nosotros con el reactivo de van Urk, para los compuestos estudiados, coincide con aquellos reportados en la literatura del tema (*Kaldewey, 1969*). Los colores reportados para los nuevos derivados estudiados (todos menos el Try, e IAA, ya estudiados) se opacan con el tiempo, probablemente, por absorción de humedad ambiental (*Boctor, 1972*).

No utilizamos la técnica de revelado reportada, pues al hacerlo, obtuvimos manchas de aspecto carbonizado y color diferente; por ello, y por desconocer la temperatura de recalentamiento, no se recalentaron las placas con el propósito de fijar dichos colores, como es recomendado por Boctor (*1972*). Interpretamos lo señalado como un sobrecalentamiento de las manchas y por ello variamos el tiempo de calentamiento sin modificar la temperatura, y así obtuvimos las condiciones de utilización señaladas en la sección anterior, siendo el tiempo habitual 10 minutos y utilizando sólo mayor tiempo en aquellas corridas en el solvente básico, donde las manchas tardaban en aparecer y eran de aspecto menos brillante a los 10 minutos, sobre todo si la placa no había sido secada convenientemente antes de revelarla, probablemente por interferencia del carácter básico, de restos de solvente presentes en la placa, en el mecanismo de la reacción.

Recibimos detalles aclaratorios, no publicados, del procedimiento de coloración, consistentes en calentamiento de la placa, después de atomizada, a la temperatura señalada de 7-15 minutos, dejarla enfriar, y recalentarla a igual temperatura 40 minutos (Boctor, comunicación personal).

El estado avanzado de este estudio, y la disminución notable de la fluorescencia de muchos derivados, al efectuar las operaciones recién descritas, nos indujeron a continuar con el procedimiento aquí recomendado.

El color violeta obtenido por nosotros para el IAA difiere del naranja carmelitoso que reporta Boctor en 1972, a lo cual no hallamos explica-

ción plausible, ya que según el trabajo original lo único que provoca el calentamiento y posterior recalentamiento de las placas es estabilizar el color durante más de dos semanas, sin alterarlo.

Las manchas fluorescen a la luz ultravioleta de diversos colores, con gran variabilidad de éstos, predominando el ocre, y el carmelita. Compuestos del mismo grupo, e igual hRf y color con el nuevo revelador, como el I2CA y el IAA de los ácidos, y el IAN o IAAOEt de los neutros, son fácilmente identificables entre sí por el dato fluorescencia (Tabla I). La recién mencionada propiedad no desfallece como el color y perdura varios días. Solamente las manchas correspondientes al I2CA, Try-5-OH, y Sero no fluorescen a la luz ultravioleta (para el IPyA este dato es dudoso); parece que las sustituciones del anillo indólico de estos compuestos impiden la formación de moléculas de carácter fluorescente.

Ambos reveladores y la silicagel empleada permiten diferenciar entre sí los compuestos de cada grupo, exceptuando el IBA e IPA, que pudieran diferenciarse por el hRf distinto que presentan en otras condiciones (*Kaldewey, 1969*). La Gram revela lentamente con el reactivo de van Urk y de forma rápida con el Boctor.

Nuestra observación, aunque cualitativa, concuerda con Boctor (*1972*), en que el revelador de ácido fosfórico presenta igual sensibilidad aproximada al de van Urk, ya que aplicaciones de iguales volúmenes y concentraciones muy pequeñas de compuestos indólicos revelaban o no con ambos reactivos, es decir, que si la concentración del volumen aplicado era muy pequeña, ninguno de los dos reveladores eran efectivos, y siempre ambos reveladores detectaron concentraciones aproximadamente iguales. Las cantidades asequibles en peso, de cada uno de los compuestos, asequibles no nos permitieron comprobar esto cuantitativamente.

Por todo lo antes comentado creemos que el revelador de ácido fosfórico demuestra ser de utilidad en tareas de identificación por esta técnica, por lo menos al utilizar compuestos comerciales puros, y por la propiedad de las manchas de fluorescer, proporciona más parámetros a la observación que el revelador de van Urk comúnmente empleado. Sin embargo, queremos destacar que este último revelador ha demostrado ser altamente específico (*Fawcett, 1961*), existe gran cantidad de información en relación con sus límites de detección (*Kaldewey, 1969*), y su mecanismo de reacción (*Sundberg, 1970*), y su empleo ha permitido la identificación cromatográfica en materiales biológicos de gran cantidad de derivados

indólicos 'simples', razones por las cuales continúa siendo el principal revelador de compuestos indólicos en la actualidad para la CCD. El revelador de ácido fosfórico, del cual reportamos algunas propiedades, debe continuar estudiándose, en los aspectos mencionados anteriormente, para probar su real utilidad.

CP.

Los resultados se muestran en la Tabla II. La desviación típica de cada una de las medias reportadas nunca fue superior a 0.05 unidades de Rf. La Gram sólo reveló con el reactivo de Boctor y en esto se mostró superior al de Ehrlich. El carácter fluorescencia permite diferenciar entre sí compuestos de Rf cercanos y cuyas manchas revelan con colores aproximadamente iguales (Tabla II).

El nuevo revelador, sin modificar, no es adecuado para tareas de identificación por CP ya que causa deterioro marcado en los cromatogramas.

El papel Filtrak FN 1 no separó adecuadamente los derivados indólicos estudiados, aunque bien esto pudiera deberse a que el solvente no se adecuó a la cámara usada, como se recomienda, ya que la usada por nosotros no fue del tipo Universal comúnmente empleada (*Jepson, 1969*); también pudiera deberse la defectuosa separación de muchos compuestos al diferente soporte inerte usado por nosotros.

CONCLUSIONES

El revelador de ácido fosfórico es útil para el revelado de cromatogramas de capa delgada de derivados indólicos 'simples', y sugerimos su continúe su estudio para determinar su especificidad, límites de detección, y mecanismo de reacción.

La forma de utilización recomendada, unida a la propiedad de los compuestos coloreados de fluorescer típicamente a la luz ultravioleta que describimos, pudiera permitir su empleo en la identificación de este tipo de derivados en materiales biológicos. La silicagel utilizada proporciona una adecuada separación de los compuestos indólicos 'simples' en los sistemas de solventes empleados.

El revelador de ácido fosfórico, sin modificar, no es adecuado para la CP por el deterioro que causa a los cromatogramas.

TABLA II

Resultados de la Cromatografía en papel

SOLVENTE: Isopropanol:Amoniaco:Agua, 10:1:1 (Iskrie y Kveder, 1965)

Derivados Indólicos	Rf × 100	Revelador	Color	UV 254 nm	UV 366 nm
I2CA	63	Boctor Ehrlich	Viol G G	No —	No —
I5CA	57	Boctor Ehrlich	Rs Nj Rs Nj	Am (I) —	Ig —
ICA	56	Boctor Ehrlich	Rs C Rs	Nj (I) —	Ig —
IPyA	Descompone				
ILA	66	Boctor Ehrlich	Viol Vd G	C —	Ig —
IBA	75	Boctor Ehrlich	Viol Vd Az	C —	Ig —
IPA	70	Boctor Ehrlich	Vd Az	C Vd —	Ig —
IAA	64	Boctor Ehrlich	Viol Az	Oc o Vd —	Vd Az —
TryAm (B)	83	Boctor Ehrlich	Viol Viol	No —	No —
Gram (B)	90	Boctor Ehrlich	Rs C Ninguno	No —	No —
IAAm	82	Boctor Ehrlich	Vd Az	C Vd —	Ig —
Derivados Indólicos	Rf × 100	Revelador	Color	UV 254 nm	UV 366 nm
IEtOH	90	Boctor Ehrlich	Viol Az	Dudosa —	Ig —
IAN	92	Boctor Ehrlich	Rs (c) G (b) Rs C	Am Vd (I) —	Ig —

TABLA II (Continuación)

IAAOEt	92	Boctor Ehrlich	Viol Az	Dudosa —	Ig —
IOAC	Descompone				
Ska	92	Boctor Ehrlich	Ninguno Az	No —	No —
Try-5-OH	51	Boctor Ehrlich	G Viol Viol Rj	No —	No —
I-5-OH	89	Boctor Ehrlich	C cl Viol Rj	Viol —	Ig —
Sero	62	Boctor Ehrlich	Viol Viol	No —	No —
Try	53	Boctor Ehrlich	G Viol Az	C cl —	Ig —

Abreviaturas empleadas: Am: Amarillo; Az: Azul; C: Carmelita; G: Gris; Nj: Naranja; Oc: Ocre; Rj: Rojo; Rs: Rosado; Vd: Verde; Viol: Violeta; ng: negruzco; cl: claro; osc: oscuro; (B) Indol de carácter básico; (c) centro de la mancha; (b): borde de la mancha; ocs: color ocasional; Ig: Igual fluorescencia; (I): Fluorescencia intensa; (E): Fluorescencia escasa.

El papel usado, sin modificar la mezcla de solventes empleada, no permite buenas separaciones de los derivados estudiados.

RECONOCIMIENTOS

Queremos agradecer la colaboración brindada por las Cras. Amelia Gort, Ofelia Sam, y Mirna Surlí, alumnas de años superiores de la Escuela de Ciencias Biológicas, U.H., en la obtención de los resultados aquí reportados.

Además deseamos agradecer profundamente al profesorado de la Escuela de Química, U.H. (Lab. de Química Orgánica), los equipos y reactivos facilitados, y en especial, a la Lic. Lila Castellanos por su crítica ayuda en la preparación de este artículo.

Damos también las gracias al Dr. Arturo Amaral y a la Lic. Esperanza Peña por la crítica revisión a que sometieron nuestro artículo.

REFERENCIAS

- BEESON P. B. Y McDERMOTT W. Tratado de Medicina Interna de Cecil Loeb, II, 913-914. Ediciones R-Instituto del Libro, Habana, 1968.
- BOCTOR F. N. A new reagent for detecting tryptophan, indole, and indole-3-acetic acid in thin-layer chromatography. *J. Chromatog.* 67, 371, 1972.
- FAWCETT C. H. Indole auxins. *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 12, 345, 1961.
- HESLOP-HARRISON J. Plant growth substances. En: *Vistas in Botany*, III, 104-194, ed. Turrill, W. B., Pergamen Press, Londres, 1963.
- ISKRIC S. AND KVEDER S. A new aspect of the in vitro metabolism of some biogenic amines. *Croatica Chem. Acta* 37, 233, 1965.
- JEPSON J. B. Indoles and related Ehrlich reactors. En: *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, I, 183-211, ed. Smith I., Heineman, Londres, 1969.
- KALDEWEY H. 'Simple' indole derivatives and plant growth regulators. En: *Thin-layer chromatography — A laboratory handbook*, 471-489, ed. Stahl, E. Springer-Verlag, Berlín, 1969.
- LEOPOLD A. C. Auxins and Plant growth, 60-136. *Ciencia y Técnica*, Instituto del Libro, Habana, 1967 (Edición foránea: 1963).
- MOWAT J. A. Auxins and indole derivatives. En: *Data for Biochemical Research*, 550-552, ed. Dawson, R. M. C. y otros, Oxford University Press, Londres, 1969.
- POWELL L. E. Separation of plant growth regulating substances on silicagel columns. *Plant Physiol.* 35, 256, 1960.
- POWELL L. E. Solvent systems for silicagel column chromatography of indole derivatives, *Nature* 200, 79, 1963.
- POWELL L. E. Preparation of indole extracts from plants for gas chromatography and spectrophotofluorometry. *Plant Physiol.* 39, 836, 1964.
- RANDERATH K. Chromatographie sur couches minces, 101-106. Gauthier-Villars, París, 1971.
- STAHL E. ed. *Thin-layer chromatography — A laboratory handbook*, 61-86. Springer-Verlag, Berlín, 1969.
- SUNDBERG R. The chemistry of indoles. En: *Organic Chemistry. A series of Monographs*, 18, 42-43, Academic Press, Londres, 1970.