

N-carboximetil-treonina: Síntesis propiedades ácidas y caracterización en estado sólido

N-carboxymethyl-D, L-threonine. Synthesis, acid properties and characterization in solid state

TERCERO MORENO, J. M., MATILLA HERNÁNDEZ, A., GONZÁLEZ GARCÍA, S. Y NICLÓS GUTIÉRREZ, J.

Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. 18071 Granada, España.

RESUMEN

Se propone la síntesis de N-Carboximetil-D,L-Treonina ($H_2CMT=H_2L$) por condensación de D,L-treoninato y cloroacetato potásicos, desalinización parcial en medio neutro y posterior cambio iónico por resina catiónica en forma ácida. Rendimiento: 75%. El tratamiento mediante el programa HYPERQUAD de 238 datos potenciométricos de tres valoraciones de H_2CMT frente a KOH en KNO_3 0.1M a 25.00 ± 0.05 °C y atmósfera inerte (N_2) permite la determinación de las constantes de formación de sus especies protonadas, con las que se simula la curva de valoración. En estado sólido, el aminodiácido se caracteriza por su espectro IR y por análisis térmico (TG-ATD).

Palabras clave: N-carboximetil-treonina: Síntesis. Hyperquad. Constantes de disociación. Espectro infrarrojo. Análisis térmico.

ABSTRACT

N-Carboxymethyl-D,L-threonine ($H_2CMT=H_2L$) was obtained by reaction of D,L-threonine and chloroacetate in alkaline medium and followed by cation change with Amberlite IR-120(H) of the desalinized mother liquor. Yield: 75%. The treatment of 238 potentiometric data from three mixed solutions (H_2L+HCl) by HYPERQUAD program gives to $\log_{11}=8.73(01)$, $\log_{12}=11.22(01)$ and $\log_{13}=12.76(02)$ for the species HL^- , H_2L and H_3L^+ at 298°K, I=0.1M (KNO_3) and N_2 inert atmosphere. These constants give a good simulation of the H_2L titration curve. The infrared spectra and TG-DTA data of H_2CMT are also discussed on the basis of its zwitterionic structure.

Key words: N-carboxymethyl-D, L-threonine. Synthesis. Hyperquad. Protonation constants. Infrared spectrum. Thermal analysis.

Recibido: 1-3-1994.

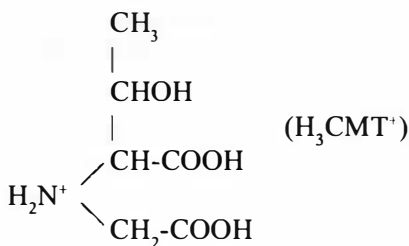
Aceptado: 15-3-1994.

BIBLID [0004-2427(1994) 35:1; 75-83]

INTRODUCCIÓN

La preparación de N-Carboximetil derivados de -aminoácidos por condensación con halogenoacetatos es una apropiada ruta para la obtención de derivados C-sustituidos del ácido iminodiacético, aunque no exenta de dificultades cuando conduce a una mezcla con N,N-bis(carboximetil)-derivado (1). El aislamiento del N-carboximetil-aminoácido puede, además, verse afectado por la presencia de C-sustituyentes que favorezcan su solubilidad en agua y en medios salinos. Éste es el caso, entre otros, de N-carboximetil-L-serina, L-aspártico, L-glutámico (2). De hecho, el aislamiento de estos y otros N-carboximetil-L-aminoácidos ha requerido su retención por una resina catiónica y posterior elución con hidróxido amónico.

La síntesis de N-carboximetil-D,L-treonina fue planteada por Korman y Clarke (3) sin resultados satisfactorios. Un amplio estudio de Miyazawa (4) ofrece varias alternativas para esta síntesis, consiguiendo un 34% de rendimiento. En este artículo se aporta una nueva síntesis de N-carboximetil-D,L-treonina ($H_2CMT=H_2L$) con mayor rendimiento, así como un estudio de sus propiedades ácidas con aplicación del programa HYPERQUAD que desarrollan Gans, Vacca y Sabatini (5) en la actualidad, como mejora del programa SUPERQUAD (6).



MATERIAL Y MÉTODOS

Síntesis N-carboximetil-D,L-treonina: Se neutralizan 11.91g (0,1 mol) de D,L-treonina (Merck) con una disolución enfriada de 5.57g (0.1 mol) de KOH en 50 ml de agua. En baño de hielo-sal, con agitación constante y flujo de nitrógeno, se adicionan gota a gota 22.3g. (0.4 mol) de KOH disuelto en 100 ml de agua sobre una disolución de 18.1g (0.2 mol) de ácido cloroacético en 100 ml de agua. Después, se adiciona la disolución de treoninato potásico sobre la disolución alcalina de cloroacetato potásico. Todas estas disoluciones se preparan con agua desionizada exenta de gases (CO_2). La mezcla de reacción obtenida se deja a temperatura ambiente, en matraz cerrado, al abrigo de la luz durante

30 días. Se neutraliza con HCl 6N y se concentra en evaporador a presión reducida hasta inicio de la precipitación. Se enfría la disolución en baño de hielo y sal y se separa por filtración cloruro potásico (subproducto de la síntesis) repitiendo la secuencia concentración, enfriamiento y filtración hasta retirar al menos 20 g de KCl (~50%). La disolución parcialmente desalinizada se pasa por una columna de resina Amberlita IR-120(H), en forma ácida, eluyendo con agua (~2 ml/min). Se investiga en los líquidos de elución la presencia de cloruros (ensayo a la gota con disolución de AgNO_3) y se reúnen los líquidos libres de cloruro con $\text{pH} < 4$. Se concentran a unos 70-100 ml y se llevan a nevera, donde se produce la precipitación del producto deseado, que se recristaliza de su disolución en agua caliente y deseca a vacío sobre P_2O_{10} . Rendimiento: 13.3g, 75%. Calculado para $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_5$: C 40.68, H 6.26, N 7.91, $\text{PM} = 177.16$; exp. C 40.34, H 6.30, N 7.90, $\text{Pm}_{\text{exp.}} = 176.8 \pm 0.2$ (por valoración alcalimétrica). Producto anhidro, estable hasta 143°C , según TG-ATD. $\text{Pf} = 165.5-168.5$ (descomp.) en ref. 4.

La determinación de las constantes de formación de las especies protonadas $\log \beta_{11} \text{H}_i\text{CTM} = \text{LH}_i^{(2-i)}$ ($i=3,2,1$) se realizó a partir de 238 datos ($2.20 < \text{pH} < 11.05$) procedentes de tres valoraciones potenciométricas de 50 ml de disoluciones de H_2CMT ($1.53 \cdot 10^{-3}$ a $3.62 \cdot 10^{-4}$ M) adicionadas de HCl ($\text{HCl}/\text{H}_2\text{CMT}$ 4, para favorecer la presencia efectiva de la especie H_3L^+) y fuerza iónica ajustada a 0.1M (KNO_3), frente a KOH 0.1M (exenta de CO_2), a $25.00 \pm 0.05^\circ\text{C}$ y en atmósfera inerte (N_2), contemplando las recomendaciones más recientes de IUPAC (7, 8). Todas las disoluciones se prepararon con agua exenta de gases. Equipo valorador Metrohm Dosimat/665 con pH-metro Crison 2002 y electrodo combinado Ingold. Los cálculos se hicieron mediante el programa HYPERQUAD, cedido por los autores (5).

Los espectros IR se registraron con un espectrofotómetro Beckman IR 4260 por la técnica del comprimido (KBr). Las curvas de TG-ATD se obtuvieron en atmósfera de aire con un equipo Rigaku, serie Thermoflex calentando a $5^\circ\text{C}/\text{min}$ entre la temperatura ambiente y 600°C .

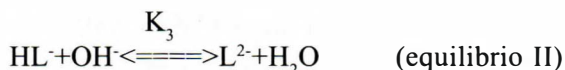
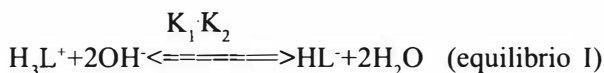
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método que se propone en este artículo para la preparación y el aislamiento de H_2CMT conduce a un rendimiento notablemente superior al referido por Miyazawa (34%, en ref.4). Esta diferencia puede explicarse por la utilización de cloroacetato potásico con un 100% en exceso y por la semidesalinización practicada antes de separar el aminodiácido por cambio iónico. El nuevo método de síntesis de H_2CMT difiere también del propuesto por Snyder y Angelici (2) para N-carboximetil-L-serina y otros N-carboximetil-aminoácidos en el uso de un 100% de ClCH_2COOH en exceso en vez de cantidad estequiométrica de

BrCH_2COOH (algo más reactivo), en la desalinización referida y en la resina cambiadora, Ambertita IR-120(H) en vez de Dowex 50W-X4 (lo que implica eluciones con agua en vez de con NH_4OH 0,75 M).

El comportamiento potenciométrico de una disolución de H_2CMT adicionada de HCl en exceso (relación $\text{HCl}/\text{H}_2\text{CMT}=4$) frente a KOH (Figura 1) revela el hábito esperado para la neutralización de una mezcla de ácido fuerte (HCl) y un ácido iminodiacético, tal que su especie catiónica H_3L^+ manifiesta dos grupos de acusada y semejante fuerza ácida, que se neutralizan solapados en medio ácido en un proceso separado de la valoración de un tercer grupo, mucho más débil, en medio alcalino. Las constantes de formación de las especies protonadas H_3L^+ , H_2L y HL de H_2CMT , estimadas por HYPERQUAD, importan $\log\beta_{13}=12.76\pm 0.02$, $\log\beta_{12}=11.22\pm 0.01$ y $\log\beta_{11}=8.73\pm 0.01$, respectivamente. Los valores de pK_a convencionales son $\text{pK}_0=\log\beta_{13}-\log\beta_{12}=1.54$, $\text{pK}_1=\log\beta_{12}-\log\beta_{11}=2.49$ y $\text{pK}_2=\text{pK}(\text{N})=\log\beta_{11}=8.73$. La validez de estos valores se ilustra en la excelente convergencia de los puntos de valoración experimental con la curva potenciométrica simulada (Figura 1).

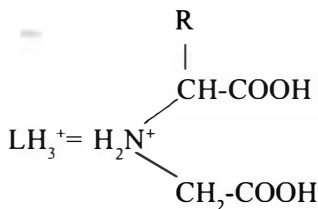
El diagrama de distribución de especies de $\text{H}_2\text{CMT}=\text{LH}_i^{(2-i)}$ ($i=3,2,1,0$) confirma el solapamiento de las dos primeras disociaciones en medio ácido y la separación de la última, en medio alcalino (Figura 2).



Además, puede apreciarse que la adición de HCl antes de valorar es necesaria para producir cantidades significativas de la especie catiónica LH_3^+ (12%) al comienzo de la valoración ($\text{pH}=2,2$) representado en la Figura 1.

La Tabla I muestra la comparación de valores de pK_a del ácido iminodiacético o N-Carboximetil-glicina ($\text{R}=\text{H}$) con varios C-derivados con sustituyente R alquílico (con efecto inductivo +I, dador de electrones) o hidroxialquilo. De su observación se desprenden las siguientes consideraciones:

a) La presencia de R (alquilo o hidroxialquilo) produce un descenso similar de los valores de pK_1 y pK_2 de H_2IDA , indicando un predominio del factor estérico sobre el efecto inductivo que se traduce en un sensible aumento de la fuerza de los grupos carboxílicos en las especies LH_3^+ :



Aunque la presencia de R impide toda equivalencia formal entre ambas agrupaciones acéticas, es interesante notar que el valor $\text{pK}=\text{pK}_1-\text{pK}_0=0.79$ del ácido iminodiacético (con grupos equivalentes) es superior al factor estadístico $\text{pK}_a=0,60$ requerido para dos grupos equivalentes y no interactuantes. El comportamiento de H_2IDA sugiere que también las dos primeras disociaciones en su C-derivados deben ser "interactuantes".

b) Los C-derivados de H_2IDA en la Tabla I tienen un valor de $\text{pK}_2=\text{pK}(\text{N})$, para la disociación del protón amónico, algo menor que para el prototipo no sustituido. Para N-carboximetil-D,L-valina ($\text{H}_2\text{CM-Val}$) y -D,L-leucina ($\text{H}_2\text{CM-Leu}$) ($\text{pK}_2=9.23$), con sustituyentes alquílicos (efecto+I), esto supone el predominio del factor estérico sobre el carácter dador de electrones del sustituyente. El valor de pK_2 para los N-carboximetil derivados de D,L-serina (8.78) y D,L-treonina (8.73) es aún menor, lo que debe atribuirse a la presencia del -OH alcohólico en sus respectivos sustituyentes R.

TABLA I

Valores de pK_a de las especies LH_3^+ del ácido iminodiacético (H_2IDA) y su C-derivados, para $l=0.1\text{M}$ y $t=25^\circ\text{C}$.

COMPUESTO*	C-SUSTITUYENTE	pK_0	pK_1	pK_2	Ref.
$\text{H}_2\text{IDA}=\text{CM-Gly}$	—H	1.82	2.61	9.34	(9)
CM-Val	— $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	1.54	2.42	9.23	(9)
CM-Leu	— $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$	1.52	2.43	9.23	(9)
CM-Ser	— $\text{CH}_2\text{-OH}$	1.59	2.43	8.78	(9)
CM-Treo	— $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	1.54	2.49	8.73	—

*CM=N-Carboximetil, Gly=glicina, Val=D,L-valina, Leu=D,L-leucina, Ser=D,L-serina, Treo=D,L-treonina.

En estado sólido, el espectro IR (Figura 3) de N-Carboximetil-D,L-Treonina (H_2CMT) muestra una absorción ensanchada de la tensión $\nu(\text{O-H})$ hacia 3400 cm^{-1} , que debe atribuirse a sus grupos funcionales alcohólico y carboxílico. La absorción a 1640 cm^{-1} que pudiera atribuirse a la deformación de agua $\delta(\text{H}_2\text{O})$, debe,

sin embargo, atribuirse a un modo combinado o a una resonancia de Fermi de otras absorciones de menor energía, dado el estado anhidro de la muestra. En apoyo de esta idea se tienen los resultados de análisis elemental y de TG-ATD. Además, el tratamiento térmico de H₂CMT hasta 135 °C no modifica sensiblemente su espectro IR. Por lo demás, la ausencia de una banda $\nu(\text{N-H})$ de amina secundaria hacia 3180 cm⁻¹ y la presencia de los modos $\delta(^+\text{NH}_2)$ y $\rho_r(^+\text{NH}_2)$ (1550 y 830 cm⁻¹) $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ y $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ de grupos carboxilato (1595 y 1380 cm⁻¹) acompañando a la definida e intensa banda de modos $\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C-O})+\delta(\text{OH})$ $\delta(\text{OH})$ y $\pi(\text{OH})$ de -COOH 1740, 1405, 1250 y 935 cm⁻¹, entre otras, permite concluir que H₂CMT debe adoptar en estado sólido una estructura betaínica estabilizada por abundantes enlaces de hidrógeno, análoga a las establecidas por difracción de rayos X para las tres variedades cristalinas del ácido iminodiacético (10-12).

El estado anhidro y la estructura zwitteriónica de H₂CMT se reflejan en su estabilidad térmica hasta 143 °C (Figura 4), temperatura a la que inicia su descomposición con la descarboxilación del grupo carboxílico (143-195 °C, efecto endo- a 188 °C, pérdida calc. 24,84%, exp. 28,04% para -CO₂) seguida de inmediato por la pirólisis, con una razonable compensación de efectos endo- y exotérmicos y un efecto fuertemente exotérmico hacia 435 °C. El residuo a 550 °C es menor del 2%.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) ABARCA GARCÍA, M. E.; GONZÁLEZ PÉREZ, J. M.; GONZÁLEZ GARCÍA, S. y NICLOS GUTIÉRREZ, J.: *Ars Pharmaceutica*, 31, 257-266 (1990) y sus referencias.
- (2) SNYDER, R. V. y ANGELICI, R. J.: *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 35, 523-535 (1973).
- (3) KORMAN, S. y CLARKE, H.: *J. Biol. Chem.*, 221, 113-128 (1956).
- (4) MIYAZAWA, T.: *Bull. Chem. Soc. Japan*, 53, 2.555-2.565 (1980).
- (5) VACCA, A., HYPERQUAD: "An improved program for equilibrium constant calculations". Disertación, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, 1993.
- (6) GANS, P., SABATINI, A. y VACCA, A.: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1.195-1.200 (1985).
- (7) COMMISSION ON EQUILIBRIUM DATA: *Anal. Chem. Div. IUPAC, Pure Appl. Chem.*, 59, 1.721-1.728 (1987).
- (8) TUCK, D. G.: *Pure Appl. Chem.*, 61, 1.161-1.163 (1989).
- (9) ABARCA GARCÍA, M. E.: Tesis Doctoral, Universidad de Granada (Facultad de Farmacia), Granada, 1990.
- (10) BERSTEIN, J.: *Acta Crystallogr.*, B35, 360-366 (1979).
- (11) BOMAN, C. E., HEBERTSSON, H., OSKARSSON, A.: *Acta Crystallogr.*, B30, 378-382 (1974).
- (12) DELFINO, M., NICOLOSI, J. A., LADELL, J. J.: *Appl. Cryst.*, 12, 621-622 (1979).

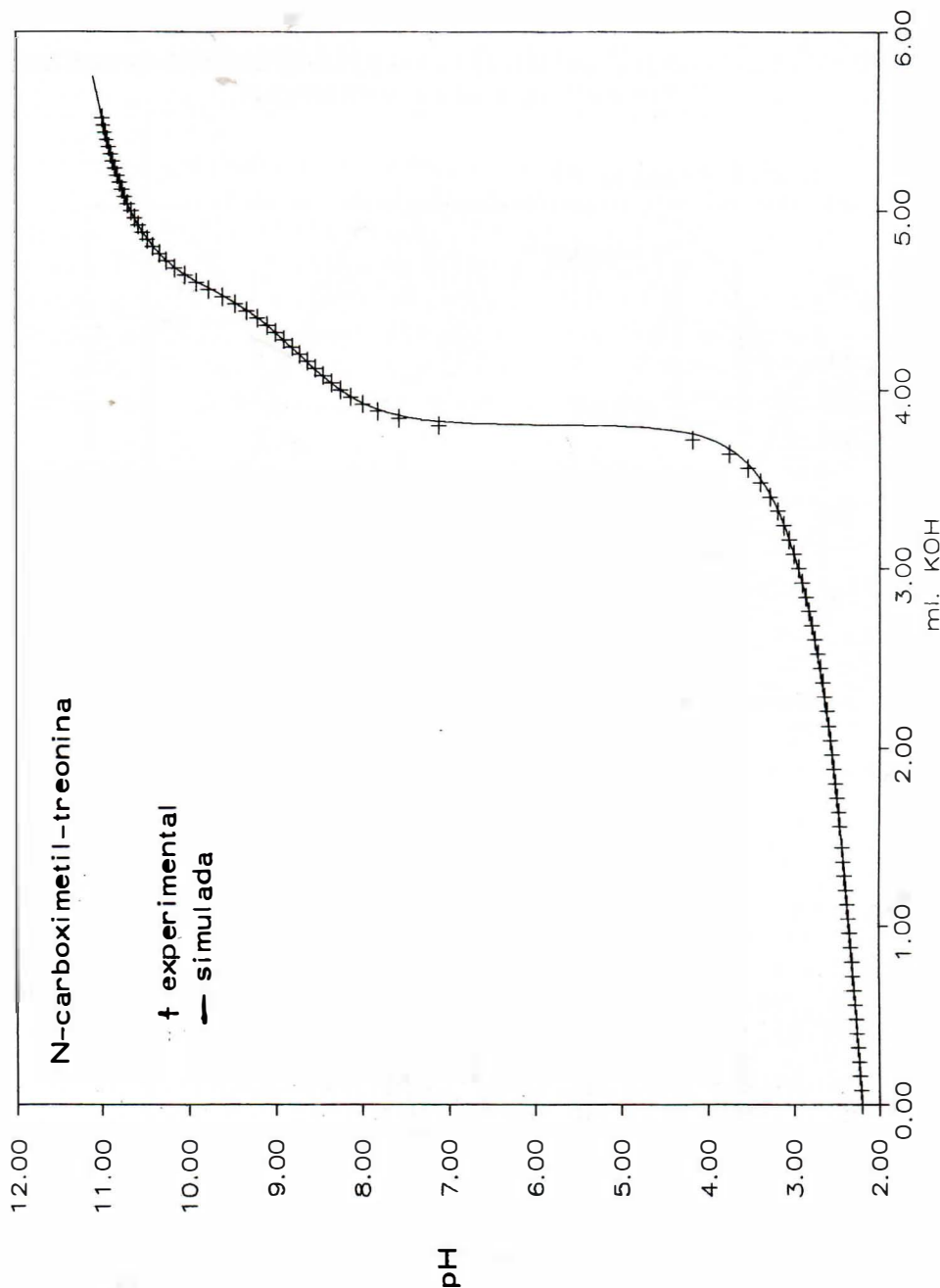


Figura 1.—Valoración potenciométrica de N-carboximetil-D,L-treonina ($[H_2CMT]=1.53 \cdot 10^{-3}M$, 50 ml) adicionada de HCl ($[H]_r=9.05 \cdot 10^{-3}M$, $[HCl]=5.99 \cdot 10^{-3}M$) frente a KOH ($9.87 \cdot 10^{-3}M$). Datos experimentales=(+). Línea continua=curva de valoración simulada con $pK_a=1.54$, 2.49 y 8.73.

Diagrama de distribución de N-carboximetil-treonina

[CMT]=1 mM, pK =1.54; pK =2.49; pK =8.73

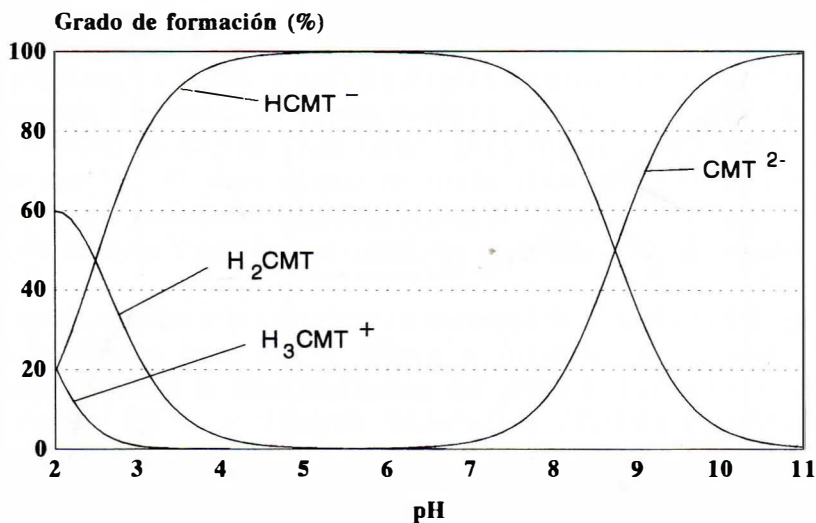


Figura 2.—Diagrama de distribución (% de formación) de las especies $H_iL^{(2-i)}$ de H_2CMT ($i=3,2,1,0$).

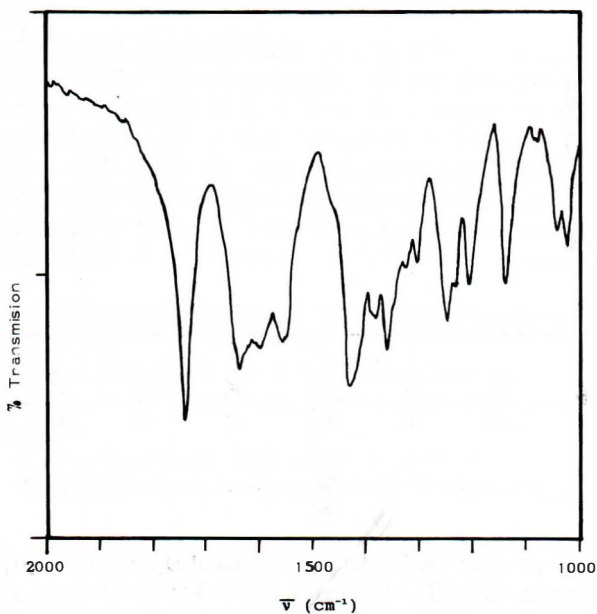


Figura 3.—Espectro IR de H_2CMT en la región de 2.000 a 1.000 cm^{-1} .

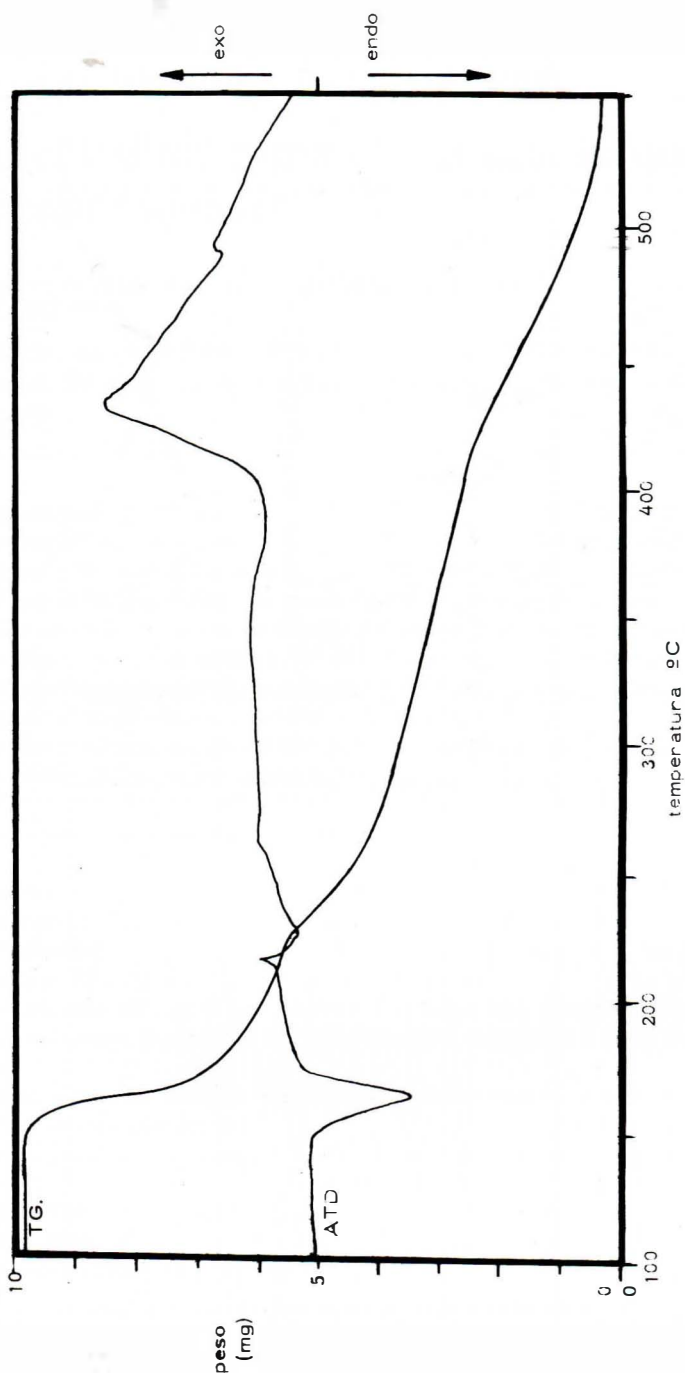


Figura 4.—Curvas de análisis térmico (TG-ATD) de H₂CMT (9.7 mg).