

DEPARTAMENTO DE QUIMICA INORGANICA
FACULTAD DE FARMACIA DE GRANADA

ESTUDIO DE N-CARBOXIMETIL-L-FENILALANINA Y DE SU
CLORHIDRATO MONOHIDRATO

Abarca García M. E., González Pérez J.M., González García S. y Niclós Gutiérrez J.

RESUMEN

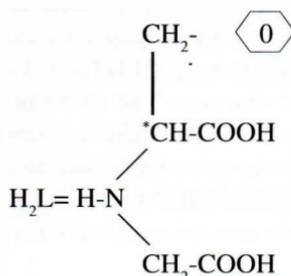
Se prepara N-carboximetil-L-fenilalanina o ácido C-bencil-iminodiacético (H_2L) por condensación de L-Phe y cloroacetato. La recristalización del producto en HCl 2~8N produce cristales de su clorhidrato monohidratado ($H_2L.HCl.H_2O$). Su espectro 1H -RMN en D_2O responde a los hidrógenos no disociables de su esqueleto molecular. Con datos potenciométricos de ($H_2L.HCl.H_2O$) se obtienen sus constantes de acidez $pK_0 = 1.57$, $pK_1 = 2.48$ y $pK_2 = 8.88 \pm 0.01$ para $I = 0.1M (KNO_3)$, $25.00 \pm 0.05^\circ C$ y atmósfera inerte de N_2 . La comparación de los espectros IR del aminoácido y su clorhidrato revelan el ordenamiento zwitteriónico de H_2L en estado sólido. Los datos de TG-ATD indican que $H_2L.HCl.H_2O$ pierde H_2O y HCl entre 100 y $190^\circ C$, sin fundir, para dar H_2L , que funde con descomposición a $225^\circ C$.

SUMMARY

N-Carboxymethyl-L-Phenylalanine or C-Benzyl-iminodiacetic acid (H_2L) and its hydrochloride monohydrate ($H_2L.HCl.H_2O$) were synthesized and studied both in solution and in solid state. The potentiometric data of $H_2L.HCl.H_2O$ gives to $pK_0 = 1.57$, $pK_1 = 2.48$ and $pK_2 = 8.88 \pm 0.01$ at $25.00 \pm 0.05^\circ C$, with $I = 0.1M (KNO_3)$ and under N_2 atmosphere. In solid state, this product loses H_2O and HCl ($100-190^\circ C$) to yield H_2L which melts at $225^\circ C$ with decomposition. The infrared data of the amino acid and its hydrochloride suggest a zwitterionic structure for the N-Carboxymethyl-L-Phenylalanine in solid state.

INTRODUCCION

La obtención de N-carboximetil- α -aminoácidos o ácidos iminodiacéticos-C-sustituidos por condensación de α -aminoácidos y halógeno-acetatos presenta las dificultades propias de ser un proceso intermedio que conduce en la práctica a mezclas de N-carboximetil- y N,N-bis(carboximetil)- derivados de los aminoácidos precursores, no siempre fáciles de separar (1). Este es, entre otros, el caso de la N-carboximetil-L-fenilalanina (CM-Phe) o ácido C-bencil-iminodiacético (C-Bz-H₂IDA= H₂L), que se conoce desde 1946(2), aunque su caracterización era muy deficiente (1). KORMAN Y CLARKE (3) pusieron de manifiesto que la condensación de un mol de L-fenilalanina con dos bromoacetato conduce, en efecto, a una mezcla de mono- y bis-carboximetil-derivados, de la que lograron separarlos. MIYAZAWA (4) confirmó estos resultados y aportó diversos procedimientos que conducen a H₂L con un rendimiento de hasta un 72% a escala de laboratorio. Este artículo informa de datos para la caracterización de N-carboximetil-L-fenilalanina (H₂L) y de su clorhidrato monohidrato (no descrito en la bibliografía, en disolución y en estado sólido.



MATERIAL Y METODOS

La N-carboximetil-L-fenilalanina (CM-Phe= H₂L) se preparó por un procedimiento descrito con detalle en (1) que modifica otros apartados en la bibliografía (3, 4) con el uso de cloroacetato potásico y diversos detalles de aislamiento de H₂L, entre los que destaca la desalinización parcial (50% de KCl, subproducto de la síntesis) antes de acidular para precipitar el producto deseado. Rendimiento > 60% P.f. (descomp.) = 225°C (228-223°C en (3) y 220°C en (4)). P.M._{cal} = 223.23, P.M._{exp} = 223.16. Calculado para C₁₁H₁₃NO₄: C59.19, H5.88, N6.27; experimental, C58.61, H5.66, N6.12%.

La recrystalización de H₂L en HCl 2 a 8N produce cristales incoloros de su clorhidrato monohidrato (H₂L.HCl..H₂O). El producto pierde agua y HCl (100-190°) sin difundir, para dar H₂L con pf. = 225°C PM_{cal} = 277.71, PM_{exp} = 277.63. Calculado para C₁₁H₁₆NO₅Cl, 47.58, H5.81, N5.04; experimental, C47.23, H5.76, N5.00%.

TABLA I.- Datos del espectro H^1 -RMN de N-carboximetil-L-fenilalanina (H_2L) en $DC1/D_2L$, correspondiente a $D_3L^+C^-$.

| SEÑAL | MULTIPLICIDAD | DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ , ppm) | CONSTANTE DE ACOPLAMIENTO (J. HZ) | INTEGRACION ($n^\circ H$) | ASIGNACION |
|-------|---------------|--|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| A | Doblete | 3.47(3.36)' | 6 | 2 | $\phi-CH_2-C$ |
| B | Singlete | 4.11 | - | 2 | $N-CH_2-COO$ |
| C | Multiplete | 4.58(4.50) | (6) | 1 | $N-CH-COO$ $CH_2-\phi$ |
| - | Singlete | 7.15 | - | - | Disolvente (HD_2O^*) |
| D | Singlete | 7.45(7.45) | - | 5 | $-C_6H_5$ |

* Desplazamiento químico de la misma señal en el espectro de L-fenilalanina en $DC1/D_2O$.

Como muchos otros ácidos iminodiacéticos N- y C-sustituídos (1), el comportamiento potenciométrico de CM-Phe (H_2L) muestra la valoración de un grupo de acusada acidez y separada de la de otro, mucho más débil, en la región alcalina (Figura 1-a). Su clorhidrato valora solapadamente dos grupos más ácidos y, después, un tercero, débil, en medio alcalino (Figura 1-b). Considerando el solapamiento de sus dos primeras disociaciones y su separación de la tercera (6-10), se han obtenido los valores de $pK_0 = 1.57$, $pK_1 = 2.48$ y $pK_2 = 8.88 \pm 0.01$, válidos a $25^\circ C$ y fuerza iónica $I = 0.1M$ (KNO_3), que corresponden a los equilibrios:

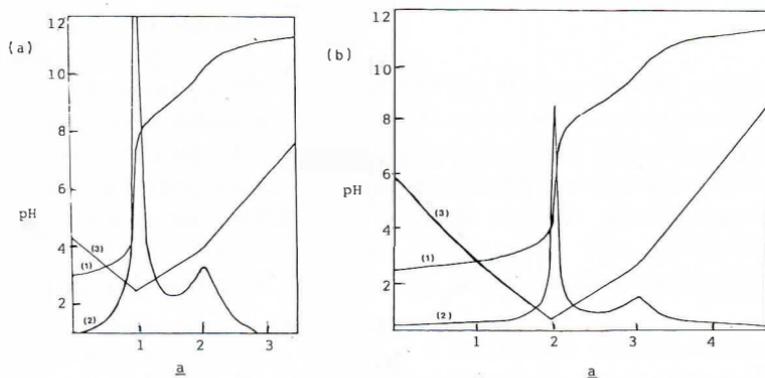


Figura 1. Valoración (1) potenciométrica, (2), su primera derivada y (3) valoración conductimétrica (a) de N-carboximetil-L-fenilalanina ($1.64 \times 10^{-3} M$) y (b) de su clorhidrato ($H_2L.HCl \cdot H_2O$, $1.72 \times 10^{-3} M$) frente a KOH ($0.1027 M$). $a = EqKOH/mol$ de compuesto.



El diagrama de las sucesivas disociaciones (Figura 2), construido con estos valores de pK_a , ilustra el solapamiento de los equilibrios (1) y (2) y su separación del equilibrio (3). La magnitud relativa de los pK_a del clorhidrato de CM-Phe se explica sobre la base de las estructuras zwitteriónicas de las especies protonadas de CM-Phe en disolución, considerándose los dos posibles zwitteriones de H_2L :

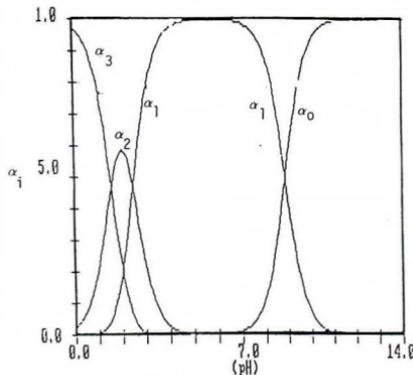
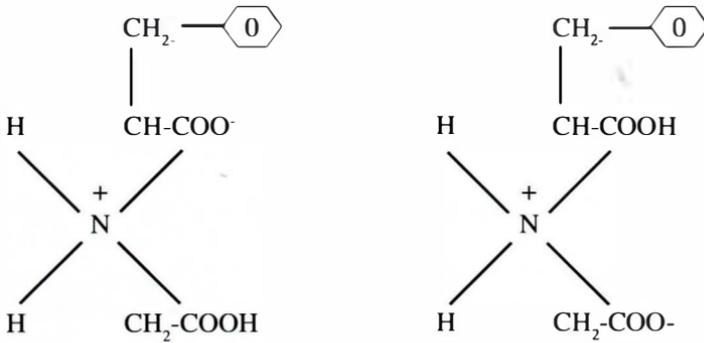


Figura 2. Diagrama del grado de formación de las especies $\text{H}_i\text{L}^{(2-i)}$ ($i = 3, 2, 1, 0$) del ácido H_2L construidos con los valores pK_a ($\text{H}_2\text{L} \cdot \text{HCl} = \text{H}_3^+\text{L} \cdot \text{Cl}^-$).

La comparación de estas constantes con los pK_a del ácido iminodiacético (H_2IDA) o N-carboximetil-glicina (CM-Gly), su N-bencil-derivado (ácido N-Bz- H_2IDA) y varios C-derivados de H_2IDA) y varios C-derivados de H_2IDA (N-carboximetil-derivados de valina, leucina y serina) es instructiva (Tabla 2). Teniendo en cuenta

la corrección estadística que debe aplicarse al pK_2 de N-Bz-H₂IDA*, que se explica con detalle en otro lugar (1), resulta la secuencia general de pK_a de H₂IDA > CM-Phe o C-BZ-H₂IDA > N-Bz-H₂-IDA, acorde con lo esperado de los efectos (inductivo-I > estérico) de los sustituyentes C-bencilo < N-bencilo sobre la acidez de H₂IDA. Además, el valor del pK_2 de CM-Phe es también menor que el de otros N-carboximetil-aminoácidos con cadena lateral C-sustituyente no disociable (alquilo o hidroximetilo). El hecho de que todos los C-derivados de H₂IDA incluidos en la Tabla II tengan valores de pK_a menores que el prototipo H₂IDA indica que el factor esférico de los correspondientes C-sustituyentes es siempre importante y actúa favoreciendo sus disociaciones ácidas, sobre todo la última, cooperando con el efecto-I (bencilo, hidroximetilo) o contraponiéndose con el efecto +I (i-propilo, sec-butilo) del C-sustituyente).

TABLA II.- Valores de pK_a de clorhidratos de ácidos iminodiacéticos (H₂IDA), varios H₂IDA-C-sustituídos y N-Bz-H₂IDA para I = 0.1M y 25 C (tomados de la ref. 1).

| COMPUESTO* | C-/N-SUSTITUYENTE | pK_0 | pK_1 | pK_2 |
|----------------------------------|-------------------|--------|--------|--------|
| H ₂ IDA = CM-Gly | H | 1.82 | 2.61 | 9.34 |
| CM-Val | C-i-propilo | 1.54 | 2.42 | 9.23 |
| CM-Leu | C-sec-butilo | 1.52 | 2.43 | 9.23 |
| CM-Ser | C-hidroximetilo | 1.59 | 2.43 | 8.78 |
| CM-Phe = C-Bz-H ₂ IDA | C-bencilo | 1.57 | 2.48 | 8.88 |
| N-Bz-H ₂ IDA | N-bencilo | 1.30 | 2.18 | 8.90** |

* CM = N-carboximetil-, Gly = glicina, Val = L-valina, Leu = L-leucina, Ser = L-serina, Phe = L-fenilalanina, Bz = bencilo.

** Valor corregido, en términos estadísticos, $8.90 - 0.30 = 8.60$.

En estado sólido, el espectro IR de N-carboximetil-L-fenilalanina (H₂L) muestra, entre otras las bandas debidas a los grupos carboxílicos ($\nu(C=O) = 1740 \text{ cm}^{-1}$) carboxilato (ν_{as} a 1620 y ν_{as} a 1380 cm^{-1}) y $NH_2^+(\delta)$ a 1560 cm^{-1}), mientras que en el espectro IR de su clorhidrato monohidrato desaparecen las bandas debidas al grupo carboxilato en el espectro de H₂L y se aprecian dos tipos de grupos carboxílicos,

* De las distintas posibilidades de disociación y asociación del último protón disociable del zwitterión de la especie HL en el ácido iminodiacético y en un N-derivado, se deduce que $pK_2(N-R-H_2IDA) = pK_2(H_2IDA) + 0.30$. En consecuencia, el pK_2 de N-Bz-H₂IDA que debe compararse en la Tabla II es $8.90 - 0.30 = 8.60$.

con $\nu(\text{C}=\text{O})$ a 1765 y 1740 cm^{-1} (ver figura 3 y Tabla III). En consecuencia, la N-carboximetil-L-fenilalanina o ácido C-bencil-iminodiacético debe adoptar en estado sólido una estructura zwitteriónica, análoga a las establecidas por difracción de rayos X para las tres variedades alotrópicas del ácido iminoacético (11-13) y para sus derivados N-metil y N-2-hidroxietil-iminodiacético (14).

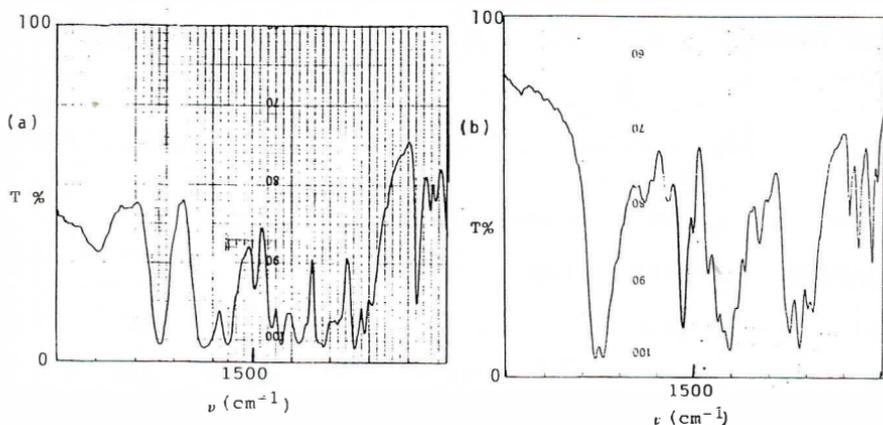
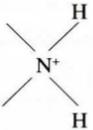
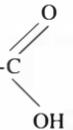
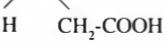
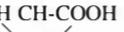
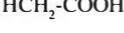


Figura 3. Detalle que muestra (a) la presencia de una sola banda $\nu(\text{C}=\text{O})$ de $-\text{CO}_2\text{H}$ en el espectro IR de $\text{CM-Phe}=\text{H}_2\text{L}$ a 1740 cm^{-1} , frente a (b) dos bandas del mismo modo en el espectro IR del clorhidrato $\text{H}_2\text{L}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}=\text{H}_2\text{L}^+\text{Cl}^-\cdot\text{H}_2\text{O}$.

El ordenamiento estructural zwitteriónico deducido para $\text{CME-Phe} (\text{H}_2\text{L})$ en estado sólido, a partir de los espectros IR, está de acuerdo con los resultados del estudio de la estabilidad térmica de este producto y su clorhidrato (Figura 4) que muestran la estabilidad de la N-carboximetil-L-fenilalanina hasta los 200°C, iniciando su descomposición con la pérdida de un grupo carboxílico entre 200 y 250°C (con efecto endo a 223°C \cong pf. descomp.), mientras que su clorhidrato monohidrato, menos estable, pierde agua y cloruro de hidrógeno entre 100 y 190°C (exp.= 21.39%, calc.= 19.62%), en procesos solapados, transformándose, en el ácido H_2L , más estable por su naturaleza zwitteriónica, que se descompone después por encima de los 200°C.

TABLA III.- Frecuencias (cm^{-1}) de las absorciones características y asignaciones a modos vibracionales en los espectros IR de N-CM-Phe o C-Bz- H_2 IDA ($\text{H}_2\text{L} \rightarrow \text{H}_2\text{L}$) y de su clorhidrato monohidrato ($\text{H}_2\text{L} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{H}_3\text{L}^+ \text{Cl}^- \cdot \text{H}_2\text{O}$) en comprimido de KBr.

| COMPUESTO H_2O |  |  |  | CH_2, CH_2 |  | INTERPRETACION |
|--|---|---|---|---------------------------------|---|---|
| CM-Phe | $\nu_{\text{as.}} \text{s}(\text{NH}_2^+)$ | $\nu(\text{C}=\text{O})$ | $\nu_{\text{as.}}(\text{COO})$ | | | |
| C-Bz- H_2 IDA | 2800-2200 | 1740 | 1620 | | | |
| (H_2L) | (picos a | | | $\nu_{\text{as.}}(\text{CH}_2)$ | 3050 |  |
| | 2720, 2680 | | $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ | 3020 | Esquelet. |  |
| | 2540, 2480 | | 1380 | | 1500 |  |
| | 2340, 2200 | | | | $\delta(\text{C-H}) \text{ arom.}$ |  |
| | $\delta(\text{NH}_2^+)$ | | | | 740 |  |
| | 1560 | | | | 700 | |
| CM-Phe.HCl | $\nu(\text{OH})$ | $\nu_{\text{as.}}(\text{NH}_2)$ | $\nu(\text{C}=\text{O})$ | $\nu_{\text{as.}}(\text{COO})$ | $\nu_{\text{as.}}(\text{CH}_2)$ | $\nu_{\text{as.}}(\text{C-H})$ |
| C-Bz- H_2 IDA.HCl | 3400 | 2800, 2200 | 1740 | — | 3020 | 3050 |
| ($\text{H}_2\text{L} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$) | $\delta(\text{H}_2\text{O})$ | (picos a | 1765 | | | |
| | 1630 | 2490, 2420 | | | | |
| | 2320) | | | | | |
| | $\delta(\text{NH}_2)$ | | | | $\delta(\text{C-H}) \text{ arom}$ |  |
| | 1530 | | | | 740 |  |
| | | | | | 700 |  |
| | | | | | |  |
| | | | | | |  |
| | | | | | |  |

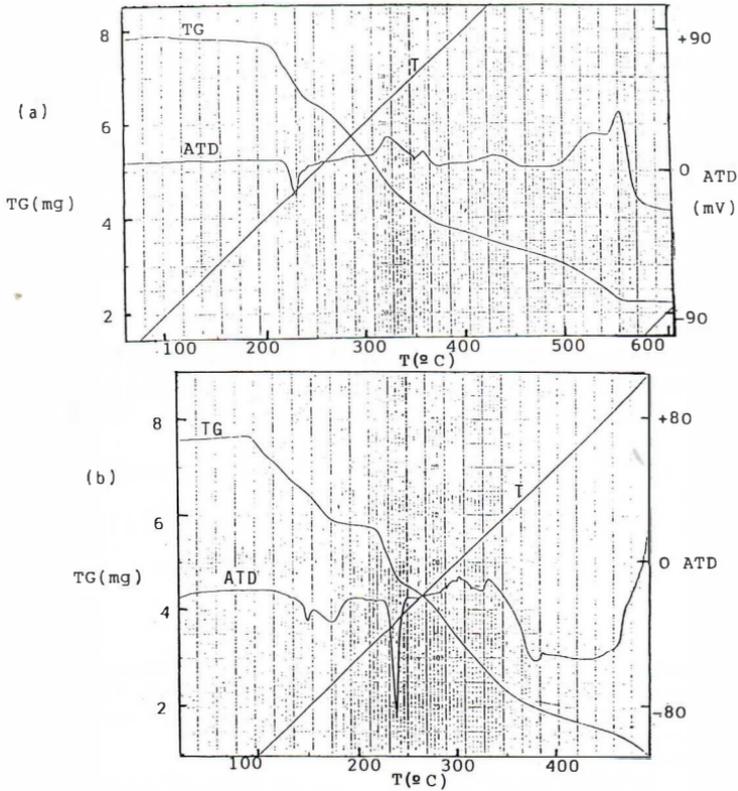


Figura 4. Curvas de análisis térmico (TG-ATD): (a) de CM-Phe H_2-L_{\pm} (7.8 mg) y (b) de su clorhidrato monohidrato ($H_2L.HCl.H_2O$) (8.75 mg.)

BIBLIOGRAFIA

- (1) ABARCA GARCIA, M.E.; "Estudio de complejos de N-carboximetil-fenilalanina con cationes divalentes de transición y post-transición", Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 1990.
- (2) KANAO, S.; Yakugaku Zasshi, **66B**, 17-25 (1946)
- (3) KORMAN, S.; y CLARKE, H.T.; J. Biol. Chem. **221**, 113-131 (1956).
- (4) MIYAZAWA, T.; Bull. Chem. Soc. Jap., **53**, 2555-65(1980).
- (5) GONZALEZ GARCIA, S.; y NICLOS GUTIERREZ, J.; Ars Pharmaceutica, **22**, 429-444 (1981).
- (6) IRVING, H.M.N.H.; y DA SILVA, J.R.R.R.F.; J. Chem. Soc., 488-494 (1963).

- (7) IRVING, H.M.N.H.; y MILES, M.G.; *J. Chem. Soc. (A)*, 727-732 y 1268-1275 (1966).
- (8) GONZALEZ GARCIA, S.; NICLOS GUTIERREZ, J.; FERNANDEZ MARTINEZ, M.T.; y SANCHEZ SANTOS, F.J.; *Studia Chemica*, **9**, 147-161 (1984).
- (9) FERNANDEZ MARTINEZ, M.T.; GONZALEZ PEREZ, J.M.; GONZALEZ GARCIA, S.; y NICLOS GUTIERREZ, J.; *Ars. Pharmaceutica*, **27**, 455-466 (1986).
- (10) GONZALEZ PERET, J.M.; FERNANDEZ MARTINEZ, M.T.; GONZALEZ MOLES, M.L.; GONZALEZ GARCIA, S.; y NICLOS GUTIERREZ, J.; *Ars. Pharmaceutica*, **28**, 175-186 (1987).
- (11) BOMAN, C.-E.; HERBERTSSON, H.; y OSKARSSON, A.; *Acta Crystallogr.*, **B30**, 378-382 (1974).
- (12) BERNSTEIN, J.; *Acta Crystallogr.*, **B35**, 360-366 (1979).
- (13) DELFINO, M.; NICOLOSI, J.A.; y LADELL, J.; *J. Appl. Cryst.* **12**, 621-622 (1979).
- (14) SKOL'NIVOKA, L.M.; PORAIKOSHITS, M.A.; y DYATLOVA, N.M.; *Zh. Strukt. Khim.*, **27**, 138-160 (1986) y sus referencias.