

REPUBLICA ARGENTINA
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

SINTESIS DE AMINOACIDOS MARCADOS.
III. SINTESIS DE DL-ACIDO ASPARTICO 4-C¹⁴
Y DL-ACIDO GLUTAMICO 5-C¹⁴

por

Ricardo J. Correia - Carlos P. Arciprete - Aldo E. A. Mitta

==

BUENOS AIRES

1968

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
DEPENDIENTE DE LA PRESIDENCIA DE LA NACION

SINTESIS DE AMINOACIDOS MARCADOS. III. SINTESIS DE DL-ACIDO
ASPARTICO 4-C¹⁴ Y DL-ACIDO GLUTAMICO 5-C¹⁴*

Ricardo J. Correia⁽¹⁾, Carlos P. Arciprete⁽¹⁾ y Aldo E. A. Mitta⁽¹⁾

RESUMEN

Se describe la síntesis de ácido DL-aspartico 4-C¹⁴ y ácido DL-glutámico 5-C¹⁴.

El compuesto de partida fue en ambos casos el formamido malonato de etilo.

El C¹⁴ fue incorporado al ácido aspartico por medio del bromoacetato de etilo C¹⁴. El ácido DL-glutámico 5-C¹⁴ fue marcado por un nuevo método partiendo de C¹⁴O₃Ba, que es menos costoso que los métodos previos que emplean KC¹⁴N.

SUMMARY

The synthesis of DL-Aspartic Acid 4-C¹⁴ and DL-Glutamic acid 5-C¹⁴ is described.

The starting compound was formamidomalonate in both cases. C¹⁴ was incorporated to DL Aspartic Acid 4-C¹⁴ via ethyl bromoacetate 1-C¹⁴. DL Glutamic Acid 5-C¹⁴ was labelled by a new method starting from C¹⁴O₃Ba. This is less expensive than previous methods which employ KC¹⁴N.

* Trabajo presentado a las XII Sesiones Química Argentinas Córdoba (Abril 1967).

(1) Dirección de Investigaciones, Departamento de Química.

INTRODUCCION

En dos publicaciones anteriores de Bühler y col. (1) (2), se describió la síntesis de los aminoácidos valina, leucina, glicina y alanina marcados con C^{14} en el carboxilo, estudiándose también los problemas relacionados con su purificación. El presente trabajo se refiere a la síntesis de dos aminoácidos dicarboxílicos, ácido DL-aspartico $4-C^{14}$ y ácido DL-glutámico $5-C^{14}$.

Para la preparación del ácido aspártico se empleó el método de Wang y col. (3), que consiste en hacer reaccionar bromo acetato de metilo $1-C^{14}$ con formamido malonato de etilo, en presencia de etilato de sodio. Se usó bromo-acetato de etilo y etilato de potasio, siguiendo notas de Murray y Williams (4), lográndose un mayor rendimiento. La sustancia de partida fue acetato de sodio $1-C^{14}$, con el que se preparó ácido bromo-acético $1-C^{14}$, usando las técnicas descritas en una publicación anterior (2) excepto lo referente al balón de bromación, para evitar pérdidas por trasvase. La esterificación del ácido bromo-acético se efectuó catalizando con resinas de intercambio.

Para la preparación del ácido glutámico $5-C^{14}$, todos los métodos hallados en la literatura, emplean como materia prima marcada el $KC^{14}N$. Se desarrolló una síntesis que permite usar como producto de partida el $BaC^{14}O_3$, con menor costo de materia prima. Se preparó el ácido glutámico marcado, haciendo reaccionar el formamido malonato de etilo con acrilato de etilo $1-C^{14}$, de acuerdo con una de las técnicas descritas por Connor y col. (6). El acrilato de etilo $1-C^{14}$ fue sintetizado preparando previamente el ácido acrílico $1-C^{14}$, según el trabajo de Pichat y col. (7) y luego esterificado con etanol catalizando con resinas de intercambio.

El ácido DL-aspartico $4-C^{14}$ mostraba en la cromatografía sobre papel, trazas de glicina inactiva, debido a la hidrólisis del formamido malonato de etilo que no reaccionó. Estas desaparecieron en la segunda recristalización. En el caso del ácido glutámico $5-C^{14}$, la cantidad de glicina fue mayor, cerca del cinco por ciento, y se debió recurrir a su purificación usando una columna de resina Dowex 50W-X12, eluyendo con concentración continuamente creciente de ácido clorhídrico.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación del formamido malonato de etilo (8)

A una mezcla de 30,4 ml (0,2 moles) de malonato de etilo y 34 ml (0,6 moles)

de ácido acético glacial, se añade una solución de 38 gramos (0,55 moles) nitrito de sodio en 55 ml de agua. La mezcla es agitada, durante la adición del nitrito y mantenida entre 15 y 20° C. Una vez terminada la adición, la mezcla se deja a temperatura ambiente con agitación durante cinco horas, luego se extrae con cloroformo y el solvente es eliminado al vacío sobre baño de agua caliente. El residuo, un aceite amarillento que pesa alrededor de 38 g, se disuelve en 160 ml de ácido fórmico al 85% y se transfiere a un balón de dos bocas provisto de termómetro, agitador y condensador de reflujo. Se añade una pequeña cantidad de Zn técnico finamente dividido y se agita y calienta hasta que la reacción se inicie. Luego se añaden 30 g de Zn a través del condensador, cuidando que la temperatura se mantenga a 75-80° C sin calentamiento externo; terminada esta operación se filtra en caliente. El filtrado se avapora al vacío sobre baño de agua caliente. El residuo, que es un aceite que contiene una pequeña cantidad de formiato de zinc, se fracciona destilando en vacío (2 a 3 mm de mercurio) y se colecta la fracción entre 130-132° C. Punto de fusión 48-49° C. Rendimiento 54-55%.

Preparación de Bromuro de Acetilo 1-C¹⁴

En un mortero se pulverizan 1,364 g de 1 mCi/mM, (20 mM) de acetato de sodio 1-C¹⁴ preparado según (2), con 16 mM de ácido benzoico y se pasan a un balón de destilación de 50 ml de capacidad, limpiando el mortero con dos porciones de 2 mM cada una de ácido benzoico. Se añaden entonces 10 ml (15,7 g, 84,8 mM) de bromuro de benzoilo, colocando en el cuello del balón un tapón de lana de vidrio; se destila lentamente, calentando en un baño de aceite. Después de tres horas, con el baño aproximadamente 170° C, se obtiene un rendimiento de 1,773 g (71%). El bromuro de acetilo 1-C¹⁴ se recoge directamente en el balón de bromación, enfriado a -60° C, protegido de la humedad ambiente mediante un tubo con pentóxido de fósforo.

Preparación del ácido bromo-acético 1-C¹⁴

Se adapta el balón de bromación mantenido a -60° C, un refrigerante en metanol y nieve carbonica, luego se cambia el baño por uno de 0° C y en el término de 30-45 minutos se agregan gota a gota 2,46 g de bromo previamente secado sobre pentóxido de fósforo. Finalizada esta operación se reemplaza el baño de 0° C por uno de aceite y se mantiene la mezcla durante dos horas a 100° C. Terminada esta operación se agrega la menor cantidad posible de agua necesaria para hidrolizar el bromuro de ácido formado, y se elimina el bromo mediante una corriente de aire hasta decoloración; luego se liofiliza para eliminar el agua y se deja durante 24 horas en desecador de vacío. El rendimiento de esta operación es del orden de 75%.

Preparación de bromo-acetato de etilo 1-C¹⁴

Se agrega el balón que contiene el ácido bromo-acético seco, 20 ml de alcohol etílico absoluto y 500 mg de resina Dowex 50W-X8 forma hidrógeno, seca, se adapta un refrigerante con tubo de cloruro de calcio y se refluja durante 5 horas. El rendimiento de éster, en solución, es de 95%.

Preparación de ácido DL-aspartico 4-C¹⁴

Se mezclan en un balón 5,58 g de formamido malonato de etilo, una solución de 1,06 g de potasio en 25 ml de alcohol etílico absoluto y la totalidad del bromo-acetato de etilo obtenido a partir de 20 mM de acetato de sodio 1-C¹⁴ y se deja durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego se refluja durante dos horas y media, se enfría y filtra, lavando con alcohol etílico. El filtrado se evapora al vacío para eliminar el alcohol y el residuo es refluja durante tres horas con 37,5 ml de ácido clorhídrico concentrado. Luego se concentra al vacío para eliminar el ácido clorhídrico, se agregan 12 ml de agua y se lleva a pH3 con amoníaco concentrado. La solución se deja durante 48 horas en un refrigerador y el ácido aspártico 4-C¹⁴ precipitado se filtra y recristaliza dos veces en agua, para eliminar las trazas de glicina que lo acompañan. Se obtuvieron 1,092 g (8,2 mM) de ácido aspártico 4-C¹⁴. Rendimiento de esta operación: 81%. Rendimiento total basado en el acetato de sodio 1-C¹⁴: 41%. Actividad específica 1 mCi/mM.

Preparación de bromuro de vinilo (9)

En un balón de 1,5 l de tres bocas, provisto de termómetro, manta calefactora, ampolla de alimentación, una columna Vigreux con camisa refrigerada y un agitador magnético, se coloca una solución hidroalcohólica de hidróxido de potasio preparada con 260 ml de alcohol etílico de 96°, 140 ml de agua y 70 g de hidróxido de potasio. La solución se calienta con agitación a 70-75° C y se van agregando sobre ella 15 ml de 1-2 dibromo-etano, gota a gota. El bromuro de vinilo producido, que se desprende del extremo superior de la columna, se hace pasar por una torre secadora con cloruro de calcio, y luego se recoge mediante un refrigerante con mezcla frigorífica a -20° C sobre tetrahidrofurano seco, también mantenido a -20° C. La salida debe estar protegida de la humedad ambiente con un tubo de cloruro de calcio. El rendimiento de esta reacción es de 70-72%. El tetrahidrofurano usado fue destilado sobre KOH y sobre LiH y redistilado nuevamente sobre LiH inmediatamente antes de su empleo.

Preparación del bromuro de vinil magnesio

Se siguió en líneas generales el método indicado por Pichat y col. (7), pero el bromuro de vinilo fue incorporado en solución en tetrahidrofurano, mediante una ampolla de alimentación. Se usó un balón de tres bocas, provisto de una ampolla para la solución con el bromuro de vinilo, de un refrigerante con mezcla frigorífica y salida a una trampa con glicerina, y de una entrada para el nitrógeno. La reacción fue iniciada agregando una gota de bromuro de etilo sobre el magnesio, que estaba cubierto por una pequeña cantidad de tetrahidrofurano; la cantidad total de solvente agregada fue la necesaria para que el título final del Grignard se encontraba entre 0,5 y 0,6 N. El rendimiento de esta reacción fue del orden de 85-90%.

Preparación de ácido acrílico 1-C¹⁴

El ácido acrílico fue preparado utilizando el aparato descrito por Buhler y col. (1), mediante la carbonatación del bromuro de vinil magnesio a -20° C. En el balón de reacción se colocaron 46 ml (23 mM), de bromuro de vinil magnesio en tetrahidrofurano (solución 0,5N). El anhídrido carbónico se libera a partir de 20 mM de BaC¹⁴O₃ de actividad específica 1 mCi/mM; terminada la carbonatación se hidroliza a -20° C con 10 ml de agua y luego se acidifica con 10 ml de ácido sulfúrico 6N. Luego se extrae el ácido acrílico 1-C¹⁴ mediante extracción continua con éter libre de peróxido, durante 12 horas, en presencia de 10 mg de hidroquinona, para evitar su polimerización. Se obtuvieron 17 mMol de ácido acrílico 1-C¹⁴. Rendimiento 85%. Luego la solución etérea se seca con tamices moleculares.

Preparación de acrilato de etilo 1-C¹⁴

Se concentra al vacío la solución etérea del ácido acrílico, y luego se le agregan 20 ml de alcohol etílico absoluto y 500 mg de resina Dowex 50W-X8, seca, reflujiéndose durante 5 horas. El rendimiento de la esterificación, en solución alcohólica, es del orden de 90%.

Preparación del ácido DL-glutámico 5-C¹⁴

Se prepara una solución de 195 mg (5 mMol) de potasio metálico en 10 ml de alcohol absoluto. Luego se disuelven 4,060 g (20 mMol) de formamido malonato de etilo y se dejan agitando a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se

le agrega gota a gota la solución de acrilato de etilo $1-C^{14}$ en alcohol absoluto, una vez separada la resina, y se sigue agitando durante 6 horas a temperatura ambiente. Se deja luego la mezcla a temperatura ambiente durante por lo menos 12 hs, y al día siguiente se refluja durante 2 horas. Se evapora luego el alcohol a presión reducida sobre baño de agua caliente y el residuo se refluja con 20 ml de ácido clorhídrico 6 N; después de 1 hora se adicionan 20 ml de ácido clorhídrico concentrado y se continúa el reflujo durante 6 horas más. La mezcla hidrolizada se filtra y el filtrado es tratado con carbón activado. El líquido resultante se evapora sobre baño de agua caliente a presión reducida. Se disuelve el residuo en 10 ml de agua y con amoníaco concentrado se lo lleva a pH 3. Se agregan 10 ml de alcohol etílico y se deja cristalizar 48 hs. en refrigerador. Luego se recrystaliza de alcohol etílico al 50%, pero debido a que aún contiene algo de glicina, es necesario hacer una purificación usando una columna de resina Dowex 50W-X12.

Purificación del ácido DL-glutámico $5-C^{14}$

El ácido glutámico fue purificado utilizando una columna de 10 mm de diámetro y 1 m de altura, con resina Dowex 50W-X12 (200-400 mesh), previamente lavada con HONa 2N, agua destilada, HCl 2N y nuevamente agua hasta reacción negativa de ión Cl. La muestra se eluye con ácido clorhídrico de concentración creciente, desde 0,1N hasta 2N. Los eluidos se recogen mediante un colector automático en fracciones de 5ml. Las fracciones correspondientes al ácido glutámico fueron concentradas, ajustado a pH con amoníaco concentrado, y luego se precipita con alcohol.

Se obtienen 1,423 gramos de ácido DL-glutámico $5-C^{14}$ monhidratado. Rendimiento total basado sobre el $BaC^{14}O_3$: 40%. Actividad específica: 0,97 mCi/mM.

Cromatografía

- a) Sobre papel se hizo con papel Whatman N° 1; disolvente: fenol-agua (100:20) en presencia de NaCN 20mg/100 g mezcla y NH₃ al 0,3%, colocados en vasos separados dentro de la cuba cromatográfica; corrimiento: ascendente; revelador: ninhidrina al 0,2% en acetona. Rf: Aspártico 0.16. Rf: del ácido glutámico 0,23 Rf: de la Glicina 0,44.
- b) Sobre capa delgada. Capas de Silicagel G de 250 micrones; disolvente: n-propanol-amoniaco aq. 34% (67:33); corrimiento: ascendente; revelador: ninhidrina al 0,2% en acetona. Rf del ácido aspártico 0.09. Rf: del ácido glutámico 0.15. Rf de la glicina 0.28.

Aplicando estos dos métodos a muestras de ácido aspártico 4-C^{14} recristalizado y de ácido glutámico 5-C^{14} purificado por columna, revelaron una sola mancha del mismo Rf que los aminoácidos respectivos inactivos usados como testigos.

Autorradiografía

Se colocaron sobre una película radiográfica duplicados sin revelar de los cromatogramas sobre papel, y se dejaron durante una semana en la oscuridad. Luego de revelados, presentaron una sola mancha correspondiente al respectivo aminoácido.

Mediciones de radiactividad

Las muestras para medición, purificadas hasta actividad constante, fueron diluídas a fin de adecuar su actividad a la de un standard, y calibradas, por recuento a espesor infinito, con un tubo Geiger Müller de ventana fina, tipo TGC-2.

BIBLIOGRAFIA

1. BUHLER, M. F.; CASTRILLON, J. P. A.; MITTA, A. E. A. y DANKERT, M. A. - Anal. Asoc. Quím. Arg., 48, 48 (1960); Informe CNEA 42 (1960).-
2. BUHLER, M. F.; MITTA, A. E. A. y LEZEROVICH, J. B. de - Informe CNEA 142 (1965).-
3. WANG, S. C.; WINNICK, T. y HUMMEL, J. P. - J. Am. Chem. Soc. 73, 2390 (1951).-
4. MURRAY, A. y WILLIAMS, D. L. - "Organic Syntheses with Isotopes" Interscience Publishers, Inc., New York, pag. 255 (1958).-
5. LEVESQUE, Ch. L. y GRAIG, A. M. - Ind. Eng. Chem. 40, 96 (1948).-
6. CONNOR, R. y Mc CLELLAN, W. M. R. - J. Org. Chem. 3, 570 (1939).-
7. PICHAT, L.; HERBERT, M. y AUBERT, F. - J. Labelled Compounds 1, 66 (1965).-
8. GALAT, A. - J. Am. Chem. Soc. 69, 965 (1947).-
9. KOGERMAN, P. N. - J. Am. Chem. Soc. 52, 5062 (1930).-
10. PICHAT, L.; ROCHAS, G. y HERBERT, M. - Bull. Soc. Chim. France (5), 1384 (1965).-