



УДК 547.415.3

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА N-РЕТИНИЛИДЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛЯРНЫХ АМИНОКИСЛОТ

© 1996 г. А. Б. Пшеничникова[#], Е. Н. Карнаухова, Б. И. Мицнер, В. И. Швец

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 14.03.96 г.

Синтезированы водорастворимые N-ретинилиденаминокислоты и изучены их физико-химические свойства, в частности кинетика гидролиза в воде, водном этаноле, физиологическом растворе и 0.1 М фосфатном буферном растворе при pH 7.0. Показано, что наблюдаемые константы скорости гидролиза N-ретинилиденаминокислот уменьшаются в ряду Ser > Asp > Taur > Met > Lys.

Ключевые слова: N-ретинилиденаминокислоты, основания Шиффа, гидролиз, кинетика, ретиналь.

N-Ретинилиденамины – основания Шиффа полиенового альдегида ретиналя с алифатическими аминами, аминокислотами, пептидами – в последние годы используются как модели хромофорных центров природных ретинилиденпротеидов [1–4]. С другой стороны, представляют интерес такие N-ретинилиденамины, у которых свойства А-витамина сочетаются с биологической активностью аминокислотного компонента, а также с растворимостью в воде, устойчивостью к окислению на воздухе и к свету. Эти свойства определяют возможность медицинского применения таких соединений, в частности для лечения заболеваний, связанных с недостатком витамина А.

Известны альдимины ретиналя с алифатическими аминокислотами [5], метионином [6] и лизином [7]. Интерес представляют альдимины ретиналя с физиологически активными аминокислотами, такими, например, как таурин, который является модулятором нервной системы, регулятором функций клеточных мембран, а также антиоксидантом [8]. Таурин часто вводят в состав лекарственных препаратов, применяемых для лечения заболеваний глаз, нервной и сердечно-сосудистой системы [9].

Физико-химические свойства и кинетика гидролиза оснований Шиффа, в том числе ретилиденбутиламина, изучены достаточно подробно [10–12], однако водорастворимые N-ретинилиденаминокислоты практически не исследованы. Именно они явились объектом нашего исследования.

Для получения водорастворимых соединений использовались трифункциональные аминокислоты

Сокращения: РА – N-ретинилиденаминокислоты, Таур – таурин.

[#] Автор для переписки.

ты (лизин, таурин, метионин, серин, аспарагиновая кислота), содержащие в боковой цепи полярные группы.

N-Ретинилиденаминокислоты (III) мы получили конденсацией *all-E*-ретиналя (I) с аминокислотами (II) в безводном метаноле в присутствии метилата натрия и молекулярных сит 4 Å в качестве водоотнимающего агента (схема).

Синтез альдиминов требует либо кислотного, либо основного катализа [10], однако из-за неустойчивости ретиналя в кислой среде реакцию проводили в присутствии метилата натрия. Для возможно более полного протекания реакции конденсации применяли избыток ретиналя (от 1.5 до 3 экв. по отношению к аминокислоте). Для предотвращения побочных реакций (окисление, изомеризация) процесс проводили в темноте, в инертной атмосфере и на холоду. Молекулярные сита в качестве водоотнимающего агента использовали для конденсации таких аминокислот, как серин, метионин и аспарагиновая кислота. Так как *L*-лизин в безводном метаноле практически не растворяется и в реакционную массу добавляли воду, молекулярные сита и метилат натрия не использовали. Выбранные условия позволяли получать

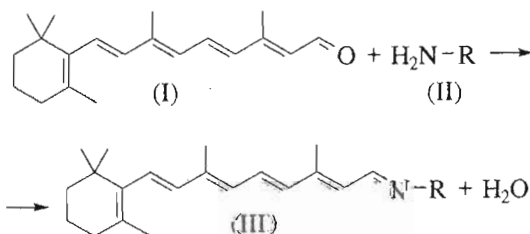


Схема.

преимущественно N^ε-ретинилиденлизин. Получение N-ретинилидентаурина с высоким выходом также проводили без молекулярных сит.

Контроль за протеканием реакции конденсации осуществляли обращенно-фазовой ВЭЖХ, ТСХ, а также спектрофотометрически. При смешивании аликвоты реакционной смеси в кювете с 0.3 н. раствором HCl в метаноле полоса поглощения света смещается от 360–375 к 445–460 нм, что отвечает переходу N-ретинилиденаминокислот в форме основания (В) в сопряженную кислоту (ВН⁺). Непрореагировавший ретиналь (λ_{max} 380 нм) в этих условиях превращается в диметилацеталь (λ_{max} 330 нм). Значительная разница в положении полос, соответствующих протонированному РА и диметилацеталю ретиналя, позволяет надежно контролировать ход конденсации, а также следить за очисткой РА от избытка ретиналя.

Индивидуальность полученных соединений подтверждали нормально-фазовой ВЭЖХ и спектрофотометрически, а также данными масс-спектрометрии с использованием плазменной десорбции (²⁵²Cf) (табл. 1). У N-ретинилидентаурина в спектрах присутствовали молекулярные ионы как кислоты (m/z 391.5), так и ее натриевой соли (m/z 414.5). В N-ретинилиденлизине (m/z 412.5) удалось обнаружить примесь N^α,N^ε-диретинилиденового производного (m/z 679.0). В спектре N-ретинилиденсерина обнаружен единственный пик, m/z которого (389.4) почти на 18 единиц превышает расчетное значение для M⁺, который может соответствовать иону [M + H₂O]⁺.

Для всех N-ретинилиденаминокислот были получены спектры ¹H-ЯМР, которые по химическим сдвигам протонов остатка ретиналя и атома углерода при иминном азоте аналогичны спектрам известных N-ретинилиденаминов [13].

Растворимость РА в воде, определенная спектрофотометрически, изменяется от 1.5 мг/мл для N-ретинилиденлизина до 60 мг/мл для N-ретини-

лиденсерина. Точно оценить растворимость не удастся из-за быстрого гидролиза РА.

Величину pK_a иминогруппы получали графически на основании спектрофотометрического определения относительного содержания РА в форме сопряженной кислоты и основания. Величина pK_a может быть определена как отрезок, отсекаемый на оси абсцисс прямой в координатах lg(a_{ВН⁺}/a_В)+рН, где a_{ВН⁺}/a_В – отношение активностей РА в форме сопряженной кислоты и основания (отношение активностей для разбавленных водных растворов РА может быть заменено отношением концентраций РА в форме сопряженной кислоты и основания). Для этого определяли оптическое поглощение раствора РА в фосфатном буфере (рН 5.73–7.45) и в водном растворе HCl на аналитической длине волны, соответствующей поглощению протонированной формы РА. На основании полученных данных для каждого буферного раствора рассчитывали соотношение протонированной и непротонированной форм РА, т.е. A_{ВН⁺}/(A_Σ – A_{ВН⁺}) (табл.1).}}}}

Гидролиз N-ретинилиденаминокислот исследовали спектрофотометрически в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.0), а также в дистиллированной воде, физиологическом растворе и 87.4% (15 М) водном этаноле. Концентрация этанола 87.4% была выбрана с целью более точного определения наблюдаемых констант скорости, поскольку с увеличением концентрации воды в водном этаноле скорость гидролиза резко возрастает и точность определения падает. Для контроля использовали аликвоту реакционной смеси, смешанной с метанольным раствором HCl. Величину оптического поглощения определяли при длине волны, соответствующей протонированной форме N-ретинилиденаминокислоты. При гидролизе N-ретинилиденлизина и N-ретинилидентаурина в физиологическом растворе и водном этаноле образование ретиналя и убыль РА оценивали также с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, в условиях

Таблица 1. Физико-химические свойства N-ретинилиденаминокислот

Аминокислотный остаток	Т. пл., °С	R _f (система А)	УФ-спектр в метаноле, λ _{max} , нм		Масс-спектр, M ⁺ при m/z (расчетная молекулярная масса)	pK _a	ВЭЖХ**	Выход, %
			В	ВН ⁺				
Asp	270	0.5	375	460	400.0 (399.55)	8.14	12.4	72
Lys	290	0.62*	365	455	412.5 (412.64)	7.11	15.9	82
Met	286	0.38	367	455	415.6 (415.66)	7.24	10.8	80
Ser	264	0.40	360	455	389.4 (371.54)	7.92	–	73
Taur	116	0.11	365	445	391.5 (391.60)	7.44	6.3	91

* Система Б.

** Метод 1; приведено время удерживания в минутах.

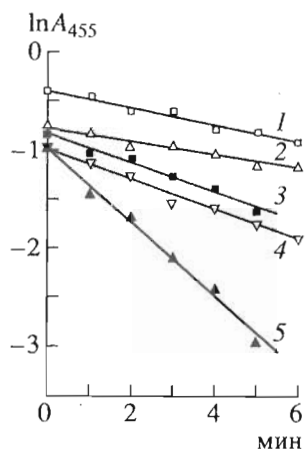


Рис. 1. Изменение оптического поглощения растворов при гидролизе в фосфатном буфере (рН 7.0) N-ретинилиденаминокислот с аминокислотными компонентами Met (1), Lys (2), Taur (3), Asp (4), Ser (5).

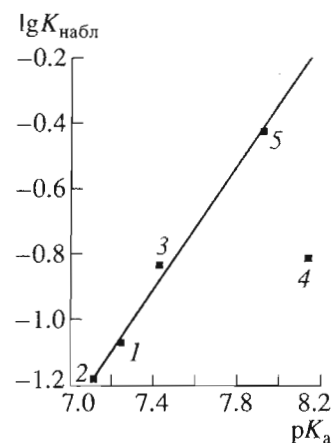


Рис. 2. Корреляция между константой скорости гидролиза и pK_a N-ретинилиденаминокислот (фосфатный буфер, рН 7.0) с аминокислотными компонентами Met (1), Lys (2), Taur (3), Asp (4), Ser (5).

которой время удерживания N-ретинилиденлизина и N-ретинилидентаурина составляет соответственно 1.4 и 5.9 мин, что позволяет достоверно определять их концентрацию даже в водном ацетонитриле. Константы скорости реакции первого порядка, полученные методом ВЭЖХ для N-ретинилиденлизина и N-ретинилидентаурина, составляют соответственно 0.092 и 0.109 мин^{-1} в физиологическом растворе и 0.021 и 0.0023 мин^{-1} в водном этаноле, т.е. практически совпадают с константами, полученными спектрофотометрическим методом в пределах ошибки измерения.

Линеаризация экспериментальных данных кинетики гидролиза в полулогарифмических координатах $\ln A_{455} \div \text{время}$ соответствует первому порядку реакции гидролиза по N-ретинилиденаминокислоте (рис. 1), что согласуется с механизмом гидролиза оснований Шиффа [12]. Наблюдаемые константы скорости первого порядка ($k_{\text{набл}}$), рас-

считанные как тангенс угла наклона в координатах $\ln A_{455} \div \text{время}$, приведены в табл. 2. В водном этаноле РА гидролизуются медленнее, чем в чистых водных растворах, прежде всего, очевидно, вследствие меньшей диэлектрической проницаемости среды.

Скорость гидролиза РА зависит от строения аминокислотного остатка, уменьшаясь в ряду Ser > Asp > Taur > Met > Lys. Эта зависимость может быть связана с величиной доли протонированной формы РА, гидролиз которой является лимитирующей стадией в кислых и нейтральных средах [10–12]. Действительно, быстрее гидролизуются РА с большим значением pK_a сопряженной кислоты, причем константы скорости и константы равновесия протонирования связаны почти линейной зависимостью (рис. 2). N-Ретинилиденаспарагиновая кислота гидролизует почти в 4 раза медленнее, чем следует из найденной корреляции, возможно из-за присутствия в молекуле дополнительной карбоксильной группы, стабилизирующей протонированную форму РА.

Таблица 2. Влияние среды и строения аминокислотного остатка на скорость гидролиза N-ретинилиденаминокислот

Аминокислотный остаток	Наблюдаемая константа скорости реакции гидролиза, $k_{\text{набл}}$, мин^{-1}			
	вода	фосфатный буфер, рН 7.0	физиологический раствор	87.4% водный этанол
Asp	0.15	0.16	0.16	0.06
Lys	0.07	0.06	0.09	0.02
Met	0.10	0.10	0.14	0.04
Ser	0.44	0.37	0.45	0.09
Taur	0.14	0.15	0.11	0.002

Как показали кинетические эксперименты, использование N-ретинилиденлизина и N-ретинилидентаурина в качестве препаратов с комплексной, в том числе А-витаминной, активностью принципиально возможно, но осложняется нестабильностью водных растворов РА из-за достаточно быстрого гидролиза (время полупревращения в физиологическом растворе 7.7 и 6.3 мин соответственно). Вместе с тем именно быстрый гидролиз РА в организме с образованием *all-E*-ретинала и аминокислоты определяет их эффективность как лекарственных препаратов. Водно-этанольные растворы гораздо стабильнее и могут быть использованы на стадии приготовления лекарственных форм.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

УФ-спектры получали на спектрофотометре Beckman DU-6 (США), а масс-спектры – на плазменно-десорбционном масс-спектрометре МСБХ (Украина).

ТСХ осуществляли на силуфоле (Чехо-Словакия) в системах хлороформ–метанол–трифторуксусная кислота, 10 : 1 : 0.1 (А) и 10 : 2 : 0.1 (Б). ВЭЖХ выполняли на колонке (150 × 3 мм) Serapon SGX (Ково, Чехо-Словакия) в системе хлороформ–метанол (87:13) со скоростью элюции 1.5 мл/мин (метод 1) или на колонке (150 × 3.3 мм) Serapon SGX C18 в системе ацетонитрил–вода, 70 : 30 (0.2% трифторуксусной кислоты по объему) со скоростью элюции 1.5 мл/мин (метод 2).

В работе использовали реактивы отечественного производства марок х. ч. и ч. д. а. и L-аминокислоты фирмы Reanal (Венгрия), молекулярные сита Wolfen-Zeorsorb 4 Å (Германия). *all-E*-Ретиналь был любезно предоставлен А.А. Ходоновым (МИТХТ).

Синтез N^ε-*all-E*-ретинилиденаминокислот. К охлажденному до 0°C раствору, содержащему 15 мг аминокислоты и 0.08 мл (0.36 ммоль) 4.5 н. раствора метилата натрия в 3 мл метанола, при перемешивании добавляли 50 мг (0.18 ммоль) *all-E*-ретиналя и 0.5 г молекулярных сит. Реакционную массу перемешивали 4 ч при 0°C в темноте в атмосфере аргона (для лизина и серина – 20 мин). Раствор декантировали и упаривали в вакууме, остаток промывали гексаном и ацетоном, сушили в вакууме.

В синтезе N-ретинилиденлизина к раствору 53 мг (0.19 ммоль) *all-E*-ретиналя в 10 мл метанола приливали раствор 20 мг (0.14 ммоль) L-лизина в 1 мл H₂O. По окончании конденсации к реакционной смеси добавляли 1 мл бензола и растворитель упаривали в вакууме.

В синтезе N-ретинилидентаурина к раствору 0.1 г (0.8 ммоль) таурина в 5 мл метанола добавля-

ли 2.3 мл (1.61 ммоль) 0.7 н. раствора метилата натрия, затем раствор 0.68 г (2.39 ммоль) *all-E*-ретиналя в 3.5 мл метанола. По окончании реакции конденсации в охлажденную до –30°C реакционную массу вносили 0.73 мл (2.41 ммоль) 3.3 н. раствора HCl в метаноле. Далее обрабатывали согласно общей методике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карнаухова Е.Н., Мицнер Е.И., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. // Журн. орган. химии. 1979. Т. 15. С. 718–725.
2. Скалабан Т.Д., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П., Преображенский Н.А. // Журн. орган. химии. 1971. Т. 7. С. 2311–2317.
3. Христофоров В.Л., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П. // Докл. АН СССР. 1971. Т. 20. С. 759–764.
4. Smith S.O., Braiman M.S., Myer A.B., Pardo J. // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 3108–3125.
5. Скалабан Т.Д., Звонкова Е.Н., Евстигнеева Р.П., Белова Т.П. // Хим.-фармацевт. журн. 1972. С. 17–21.
6. Joos B. Verfahren zur Herstellung neuer Vitamine-A-Aldehydderivate. Pat.Schweizerische N 406 198. 1966. C07c 149/14.
7. Христофоров В.Л. Исследования в области родопсина: Дис. ... канд. хим. наук. М.: МИТХТ, 1973. С. 102.
8. Huxtable R.J. // Prog. Neurobiol. 1989. V. 32. P. 471–533.
9. Taurine. Nutritional Value and Mechanisms of Action / Ed. J.B. Lombardini, S.W. Schaffer, J. Azuma. N.Y.: Plenum Press, 1992. P. 456.
10. Brault M., Pollack R.M., Bevins L. // J. Org. Chem. 1976. V. 41. P. 346–350.
11. Cooper A., Dixon S.F., Nutley M.A., Robb J.L. // J. Am. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 7254–7263.
12. Дженкс В. Катализ в химии и энзимологии: Пер. с англ. М.: Мир, 1972. С. 367–371.
13. Liu R.S.H., Asato A.E. // Methods Enzymol. 1982. V. 88. P. 506–516.

Synthesis and Characterization of N-Retinylidene Derivatives of Polar Amino Acids

A. B. Pshenichnikova, E. N. Karnaukhova, B. I. Mitsner, and V. I. Shvets

Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

Abstract—Water-soluble N-retinylideneamino acids were synthesized and their physicochemical characteristics studied. The latter included the kinetics of hydrolysis in water, aqueous ethanol, physiological solution, and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0. The observed hydrolysis rate constants for N-retinylideneamino acids were shown to decrease in the order Ser > Asp > Taur > Met > Lys.

Key words: N-retinylideneamino acids, Schiff bases, hydrolysis, kinetics, retinal.