



УДК 547.466:542.936

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕКСАГИДРОИМИДАЗО[1,2-*a*]ПИРАЗИН-3,6-ДИОНОВ И ГЕКСАГИДРОИМИДАЗО[1,2-*a*]ИМИДАЗО[1,2-*d*]ПИРАЗИН-3,8-ДИОНОВ, НЕОБЫЧНЫХ ПРОДУКТОВ ДЕГИДРАТАЦИИ АМИНОКИСЛОТ

© 1998 г. В. А. Басюк[#], Р. Наварро-Гонсалес, Е. В. Басюк*

Институт ядерных исследований;

*Институт химии Национального автономного университета Мехико.

Сиркуито Экстериор, Университетский городок, 04510, Мехико, Федеральный округ. Мексика

Поступила в редакцию 07.04.97 г. Принята к печати 20.05.98 г.

Основными продуктами сублимации простых алифатических аминокислот (аланина, валина, норвалина, лейцина и α -аминоизомасляной кислоты) при 230–250°C в присутствии силикагеля в качестве катализатора являются пиперазин-2,5-дионы (выходы 35–59%). Кроме того, были обнаружены представители двух необычных классов соединений. Используя ¹H-ЯМР, спаренную технику ВЭЖХ/МС и ГХ/ИК-спектроскопию с преобразованиями Фурье/МС, эти соединения были идентифицированы как замещенные гексагидроимидазо[1,2-*a*]пиперазин-3,6-дионы и гексагидроимидазо[1,2-*a*]имидазо[1,2-*d*]пиперазин-3,8-дионы.

Ключевые слова: аминокислоты; дегидратация; силикагель; гексагидроимидазо[1,2-*a*]пиперазин-3,6-дионы; гексагидроимидазо[1,2-*a*]имидазо[1,2-*d*]пиперазин-3,8-дионы.

Многие аминокислоты возгоняются в вакууме без заметного разложения и потери оптической активности [1]. Мы использовали это свойство для получения симметричных пиперазин-2,5-дионов (ПД) сублимацией аминокислот при 170–220°C в присутствии силикагеля в качестве катализатора [2]. При этом было замечено, что небольшая фракция сырых продуктов, в отличие от ПД, относительно легко растворяется в неполярных растворителях (например, хлороформе). Попытки увеличить выходы ПД повышением температуры сублимации приводили к обратному эффекту, в то время как образование менее полярных продуктов при этом усиливалось.

Цель настоящей работы – выяснить строение этих продуктов. Аминокислоты *D*- и *L*-аланин, *L*-валин, *D,L*-норвалин, *L*-лейцин и α -аминоизомасляную кислоту (Aib) возгоняли при 230–250°C в присутствии силикагеля. После выделения неполярных продуктов экстракцией хлороформом их состав исследовали с помощью спектроскопии ¹H-ЯМР, спаренной техники ВЭЖХ/МС и

ГХ/ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье (ИК-СПФ)/МС.

Из таблицы видно, что суммарная масса компонентов ХЭ в случае Ala и Leu сопоставима с массой ПД, тогда как в случае Aib и Val образование ПД сильно преобладало.

Анализируя данные ВЭЖХ/МС, мы обратили внимание на хроматографические пики, которым соответствовали молекулярные ионы с массовыми числами 195 (Ala), 237 (Aib), 279 (Val и Nva) и 321 (Leu). Все эти числа подчиняются следующему правилу: соединения должны были образоваться при дегидратации 3 молекул соответствующей аминокислоты.

Выходы ПД и остатка ХЭ, выделенных из продуктов сублимации аминокислот (4 г в каждом случае) в присутствии силикагеля

Аминокислота	Выход	
	ПД, г (%)	ХЭ, г
Aib	1.35(41)	0.27
<i>L</i> -Ala	1.50(47)	1.27
<i>D</i> -Ala	1.39(44)	0.96
<i>L</i> -Val	2.03(59)	0.25
<i>D, L</i> -Nva	1.80(54)	0.75
<i>L</i> -Leu	1.21(35)	1.18

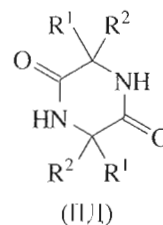
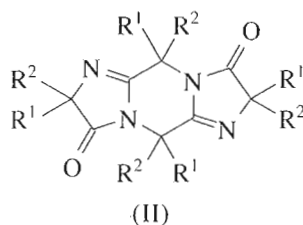
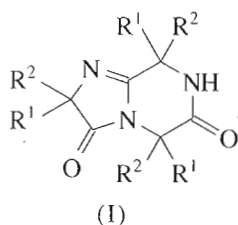
Сокращения: ПД – пиперазин-2,5-дион; ИК-СПФ – ИК-спектроскопия с преобразованиями Фурье; ХЭ – хлороформный экстракт.

[#] Автор для переписки (тел.: (52-5) 622-4674; факс: (52-5) 616-2233; e-mail: basiuk@nuclecu.unam.mx).

ющей аминокислоты с потерей 4 молекул воды. В случае природных аминокислот зарегистрировано несколько хроматографических пиков с одним и тем же молекулярным ионом и типом масс-спектрометрической фрагментации, тогда как для ахиральной Aib наблюдался только один такой пик, что указывает на образование смесей диастереомеров в первом случае. Фрагментация продуктов напоминала фрагментацию ПД [3, 4]: присутствовали серии пиков, соответствующие последовательной потере фрагментов CO (m/z 28) и

HNCO (m/z 43), т.е. при m/z 195–167–124 и 195–152–124 для Ala, 237–209–166 и 237–194–166 для Aib, 237–194–166 для Val, 265–222–194 и 209–181–138 для Leu (рис. 1). Это свидетельствует о наличии в молекулах двух групп C=O, по крайней мере одна из которых входит в состав амидной (пептидной) связи.

Мы предположили, что образующиеся продукты принадлежат к классу гексагидроимидазо[1,2-*a*]пиазин-3,6-дионов (I).



$R^1 = R^2 = \text{CH}_3$ (a);

$R^1 = \text{H}$; $R^2 = \text{CH}_3$ (b), $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (c), $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ (d), $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (e)

Эти соединения можно условно представить как продукты ацилирования одной из групп NH молекулы ПД третьей молекулой аминокислоты, причем аминогруппа последней образует азометиновую связь с ближайшей оксогруппой ПД (возможных объяснений механизма может быть несколько, однако, оснований для предпочтения какого-либо одного из них у нас нет). Теоретически то же самое возможно и с участием второй группы NH, что приведет к трициклическому амидину гексагидроимидазо[1,2-*a*]имидазо[1,2-*d*]пиазин-3,8-диону (II). Описанные примеры бициклических амидинов (I) крайне немногочисленны [5–8], например производное Aib (Ia) [5–7]. Соединение (IIa) [5, 6] является вообще единственным известным примером трициклических амидинов, причем при синтезе соединений (Ia) и (IIa) исходили из хлорангидридов три-, тетра- и пентапептидов Aib, но не из самой аминокислоты [5, 6].

В спектре ^1H -ЯМР ХЭ, выделенного из сублимата Aib, наиболее интенсивными являлись три пика при 1.32, 1.65 и 1.75 м.д. с соотношением интенсивностей 1 : 1 : 1 (рис. 2), соответствующие трем типам метильных групп бициклического амидина (Ia) [5, 6]. Тем самым данный спектр не только подтверждал образование амидина (Ia), но и указывал на то, что это соединение являлось основным компонентом ХЭ. Более того, здесь же обнаружены два малоинтенсивных пика при 1.33 и 1.88 м.д. (1:1), характерные для трициклического амидина (IIa) [5, 6]. Представленность соединений (Ia) и (IIa) в ХЭ составляло приблизительно 20 : 1.

Поскольку аналогичные амидиновые производные других исследованных аминокислот не были описаны и охарактеризованы спектрально, мы не имели возможности сравнить полученные ЯМР-спектры со спектрами индивидуальных соединений. Однако даже на основании имеющихся данных можно констатировать, что основные компоненты ХЭ построены из аминокислотных остатков и в то же время имеют спектральные особенности, сходные с таковыми для родственных ПД. Например, ^1H -ЯМР спектр неполярных продуктов сублимата *L*-Leu имел интенсивный метильный дублет при 0.95 м.д., метиленовый мультиплет около 1.50 м.д. и триплет СН при 3.25 м.д. [9]. Для смеси диастереомеров соответствующего ПД (наши измерения) характерны три мультиплета при 0.95, 1.75 и 3.90 м.д., отвечающие фрагментам CH_3 , CH_2 и СН. В спектрах смеси компонентов соответствующего ХЭ найдены при мультиплета приблизительно в тех же положениях (0.95, 1.70 и 3.90 м.д.), однако их мультиплетность оказывается значительно выше, чем в предыдущем случае – благодаря более многочисленным возможным диастереомерным комбинациям для амидина (Ie).

Далее мы исследовали полученные образцы с помощью спаренной техники ГХ/ИК-СПФ/МС. В случае Aib масс-спектр компонента, соответствующего хроматографическому пику с наибольшей площадью, был близок к вышеупомянутому спектру, полученному с помощью ВЭЖХ/МС. В ИК-спектре этого компонента содержались три интенсивных пика, отвечающие валентным колебаниям двойных связей C=O (два типа, 1753 и

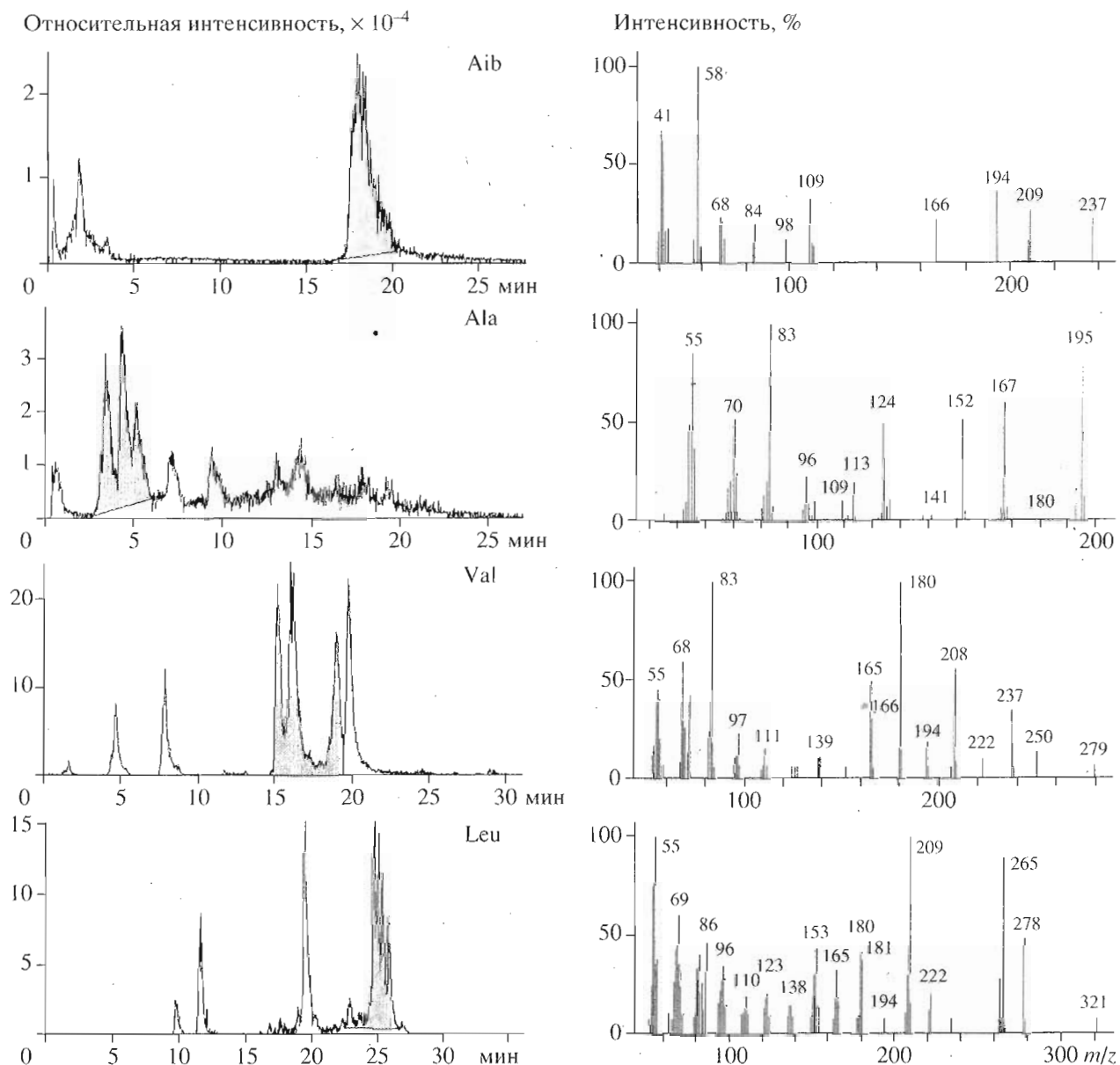


Рис. 1. Хроматограммы ХЭ, полученные методом ВЭЖХ/МС (слева) и масс-спектры электронного удара, соответствующие заштрихованным хроматографическим пикам (справа).

1713 cm^{-1}) и $\text{C}=\text{N}$ (1640 cm^{-1}), а также ν_{NH} в области 3450 cm^{-1} . В ИК-спектре амидина (Ia) в конденсированной фазе, полученном ранее, $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ и $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ наблюдались при 1730, 1670 и 1640 cm^{-1} [5, 6]. Трициклическому амидину (IIa) также соответствовал отдельный хроматографический пик, хотя и значительно меньшей интенсивности. Для его масс-спектра характерен молекулярный ион при m/z 304, для ИК-спектра – два пика $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ и $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ при 1753 и 1633 cm^{-1} (в конденсированной фазе – 1720 и 1630 cm^{-1} [5, 6]), в то время как поглощение ν_{NH} в области 3450 cm^{-1} отсутствовало.

При идентификации амидиновых производных Ala, Val, Nva и Leu мы исходили из того, что

их спектры также должны иметь особенности, характерные для производных Aib. В случае Ala наибольшему хроматографическому пику соответствовал масс-спектр с молекулярным ионом при m/z 195 и фрагментацией с потерей CO (m/z 28) и HNCО (m/z 43), дающей серии пиков при m/z 195–167–124 и 195–152–124. ИК-спектр аналогичен спектру соединения (Ia): найдены интенсивные пики $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ (два типа) и $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ при 1761, 1726 и 1646 cm^{-1} , а также пик ν_{NH} в области 3450 cm^{-1} , что позволяет идентифицировать соединение как (Ib). Трициклический амидин (IIb) также был обнаружен в виде пика небольшой интенсивности. Для масс-спектра характерен молекулярный ион

при m/z 248, а также фрагментация с потерей двух остатков CO (серия пиков при m/z 248–220–192). Пики $\nu_{C=O}$ и $\nu_{C=N}$ найдены в ИК-спектре при 1759 и 1645 см^{-1} , а поглощение ν_{NH} в области 3450 см^{-1} отсутствовало.

Вполне закономерно, что с увеличением размеров алкильных α -заместителей термическая устойчивость производных Val, Nva и Leu оказывается ниже, чем в случае Aib и Ala. Бициклические амидины разлагались в хроматографической колонке, давая очень широкие размытые пики. Тем не менее методом ГХ/ИК-СПФ/МС мы смогли идентифицировать ряд продуктов деструкции соединений (Ic–e), которая проявлялась в первую очередь в дегидрировании, дегидратации и отщеплении α -заместителей от молекул амидинов, а в дальнейшем затрагивала и саму имидазопиразиновую систему (соответствующие продукты найдены и в случае Aib и Ala).

Попытки выделить чистые компоненты ХЭ, в первую очередь амидины (I), успехом не увенчались. Теоретически разделение возможно методом препаративной ВЭЖХ, которой мы к сожалению не располагаем. Однако даже при наличии ее задача является непростой: уже хроматографирование на аналитической колонке показало, что в случае Ala, например, ХЭ содержит не менее 50 отдельных соединений, редко разделяемых полностью.

Также мы не можем точно оценить выходы амидинов по реакции дегидратации аминокислот. Приблизительная оценка с учетом интенсивностей хроматографических пиков (а также пиков в спектре ^1H -ЯМР для случая Aib) показывает, что ХЭ содержат в среднем около 50% бициклических производных (I), т.е. их выходы составляют от 4% для Aib и Val до 22% для Ala (трициклических амидинов (II) – на 1–2 порядка ниже). Кроме того, значительная часть (до 50%) образовавшихся вначале амидинов подверглась термодеструкции.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что при прямой дегидратации аминокислот могут образовываться не только пептидные связи, но и амидиновые $C=N$. Для нас представляла интерес информация о том, является ли данная дегидратация обратимой. Было установлено, что амидины (I) гидролизуются с образованием аминокислот при действии концентрированной HCl при 90–100°C. В случае Ala полный гидролиз протекает менее, чем за 24 ч: пики в жидкостной хроматограмме, соответствующие диастереомерам амидина (Ib), полностью исчезают, и появляется пик Ala. Для остальных аминокислот за это же время полный гидролиз не достигается, и в целом он протекает тем медленнее, чем объемнее заместитель в α -положении (т.е. медленнее всего в случае Leu).

Мы пытались обнаружить другие реакционные системы, где могут образовываться амидины

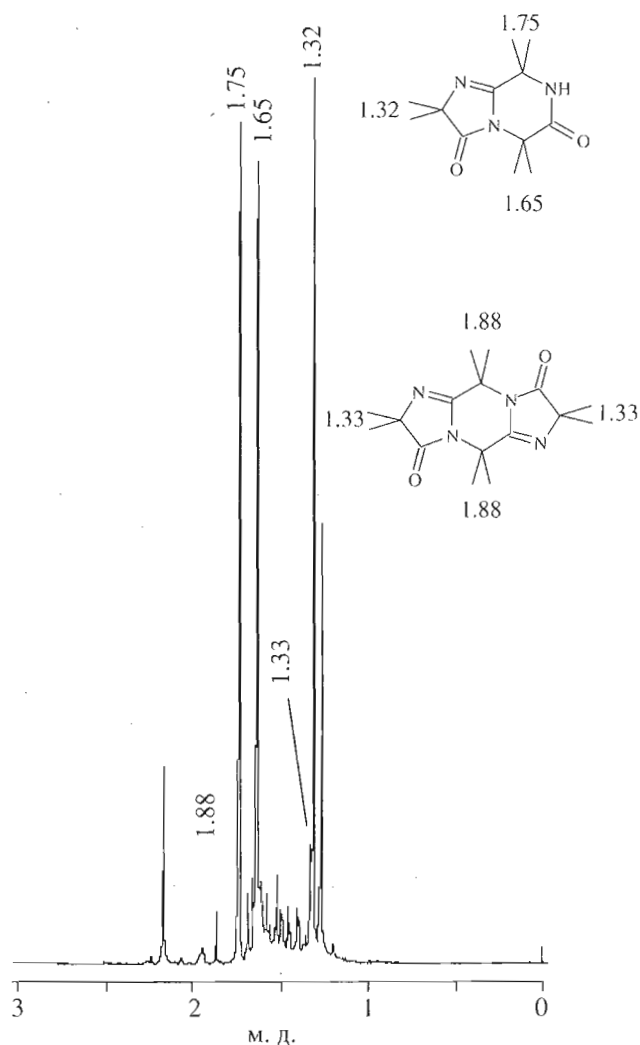


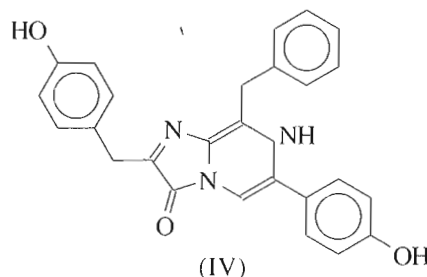
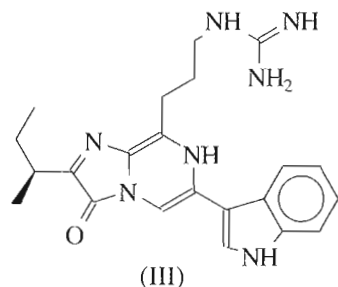
Рис. 2. ^1H -ЯМР-спектр ХЭ, выделенного из сублимата Aib.

(I) и (II) непосредственно из аминокислот. В частности, следовые количества производных (Ia) и (Ib) были найдены в продуктах обработки Aib и Ala тионилхлоридом и оксихлоридом фосфора в интервале температур от -60 до 70°C (предварительные результаты).

Описанные здесь реакции протекают в очень жестких условиях, поэтому закономерно возникает вопрос о принципиальной возможности образования амидинов (I) и (II) в живых организмах в результате каких-либо биохимических процессов. До сих пор не было выделено никаких природных соединений, имеющих в основе конденсированную имидазо[1,2-*a*]имидазо[1,2-*d*]пиразиновую систему: таким образом, биосинтез соединений типа трициклических амидинов (II) представляется маловероятным. Однако есть основания считать, что соединения типа амидинов (I) могут быть синтезированы *in vivo*. Например,

в морской фауне встречаются два соединения, содержащие в основе систему имидазо[1,2-*a*]пир-

зин-3-она, – люциферина Cypridina (III) и коэлен-теразина (IV) [10–14]:



Они отвечают за биолюминесценцию разнообразных морских организмов – от относительно примитивных *Radiolaria* до рыб. Сущность биосинтетических процессов, приводящих к соединениям (III) и (IV), остается невыясненной, однако *in vitro* их аналоги могут быть синтезированы циклизацией модифицированных дипептидов [15, 16].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованы аминокислоты *D*- и *L*-Ala, *L*-Val, *D,L*-Nva, *L*-Leu и Aib производства Sigma (США). 99% чистоты и силикагель дисперсности 3–12 меш (Aldrich, США). Типичный сублимационный эксперимент включал нагревание аминокислоты (4 г) в смеси с силикагелем (10 г) в вакуируемой круглодонной колбе при 10^{-1} мм рт. ст. и температуре 230–250°C. В ходе нагревания аминокислота возгонялась, реагировала с поверхностью силикагеля, и продукты вместе с непрореагировавшими остатками аминокислоты конденсировались в ненагреваемом горле колбы. Для более полного превращения исходного реагента в соответствующие продукты, сублимат возвращали на дно колбы и возгонку повторяли при тех же условиях еще 2 раза. Такая трехкратная сублимация длилась в общей сложности 7–9 ч. Сублимат извлекали и подвергали экстракции хлороформом с целью извлечения малополярных продуктов. (Остаток после экстракции перекристаллизовывали из воды или смеси вода–этанол и получали соответствующие ПД – см. таблицу.) Выпаривание ХЭ давало аморфные остатки цвета от желтого до коричневого. Гидролиз полученных ХЭ-остатков проводили в концентрированной соляной кислоте при 90–100°C в течение 24 ч.

Для исследований методом ВЭЖХ/МС использовали жидкостный хроматограф Hewlett-Packard 1090 Series II, спаренный с масс-спектрометром HP 5989 через интерфейс HP 59980B Particle Beam. Хроматографическая колонка размером 100 × 2.1 мм внутр. диам. была упакована сорбен-

том ODS Hypersil с размером частиц 5 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь воды с метанолом с линейной градиентной программой от 0 до 20% метанола при 30 мин (для Ala и Aib) или от 0 до 100% метанола при 40 мин (для Val, Nva и Leu). Скорость потока – 1 мл мин⁻¹, температура – 45°C. Вспомогательное детектирование по УФ-поглощению осуществляли при длине волны 200 нм. Температура распылителя интерфейса поддерживалась 60°C.

Для исследований методом ГХ/ИК-СПФ/МС использовали газовый хроматограф HP 5890 Series II Plus, спаренный параллельно с ИК-СПФ-детектором HP 5965B по поглощению в газовой фазе и упомянутым выше масс-спектрометром. Капиллярная колонка HP-5 (сшитый 5% фенилметил-силикон) имела следующие характеристики: длина 25 м, 0.32 мм внутр. диам., толщина пленки неподвижной фазы 0.52 мкм, фазовое отношение 150. Температура инжектора – 250°C. В качестве газа-носителя использовали гелий при скорости потока 2 мл мин⁻¹. Для нагрева капиллярной колонки использовали следующие температурные программы: (для Ala и Aib) – 10 мин при 50°C, затем до 130°C при скорости нагрева 10°C в мин и до 240°C при скорости нагрева 25°C в мин; (для Val, Nva и Leu) – 50°C до 250°C при скорости нагрева 10°C в мин. Температура оптической ячейки ИК-СПФ-детектора и интерфейсов (ГХ/ИК-СПФ и ГХ/МС) поддерживалась при 250°C. Спектральное разрешение ИК-СПФ-детектора составляло 4 см⁻¹. Масс-спектры регистрировались при ионизации электронным ударом; энергия электронов составляла 70 эВ.

¹H-ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Varian Gemini (200 МГц) для растворов в дейтерохлороформе или дейтерометаноле.

Авторы признательны за финансовую поддержку Национальному совету по науке и технике Мексики (гранты CONACyT-1843-OE9211 и -4282-E9406), а также Национальному автономному университету Мехико (грант DGAPA-IN102796).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gross D., Grodsky G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1955. V. 77. P. 1678–1680.
2. Basiuk V.A., Gromovoy T.Yu., Chuiko A.A., Soloshonok V.A., Kukhar V.P. // *Synthesis*. 1992. P. 449–451.
3. Ballistreri A., Giuffrida M., Maravigna P., Montaudou G. // *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* 1985. V. 23. P. 1145–1161.
4. Smith G.G., Reddy G.S., Boon J.J. // *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2*. 1988. P. 203–211.
5. Ali M.Y., Khatun A. // *Tetrahedron*. 1985. V. 41. P. 451–454.
6. Ali M.Y., Dale J., Titlestad K. // *Acta Chem. Scand.* 1973. V. 27. P. 1509–1518.
7. Jones D.S., Kenner G.W., Preston J., Sheppard R.C. // *Tetrahedron*. 1965. V. 21. P. 3209–3218.
8. Yamada T., Iwamoto A., Yanagi T., Miyazawa T., Kuwata S., Saviano M., Pavone V. // *Pept. Chem.* 1993. V. 31. P. 65–68.
9. Pouchert C.J. *The Aldrich Library of NMR Spectra*. Milwaukee: Aldrich Chemical Company, 1983. V. 1. P. 489.
10. Goto T. // *Pure Appl. Chem.* 1968. V. 17. P. 421–441.
11. Hori K., Cormier M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1973. V. 70. P. 120–123.
12. McCapra F. // *Pure Appl. Chem.* 1970. V. 24. P. 611–629.
13. McCapra F. // *Acc. Chem. Res.* 1976. V. 9. P. 201–208.
14. Shimomura O., Johnson F.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1975. V. 72. P. 1546–1549.
15. McCapra F., Roth M. // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1972. P. 894–895.
16. McCapra F., Manning M.J. // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1973. P. 467–468.

**Hexahydroimidazo[1,2-*a*]pyrazine-3,6-dione
and Hexahydroimidazo[1,2-*a*]imidazo[1,2-*d*]pyrazine-3,8-dione,
Unusual Dehydration Products of Amino Acids**

V. A. Basiuk*#, R. Navarro-González*, and E. V. Basiuk**

**Instituto de Ciencias Nucleares*

***Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior C.U., México, D.F., 04510 México*

Major sublimation products of conventional amino acids (alanine, valine, norvaline, leucine, and α -aminobutyric acid) at 230–250°C in the presence of silica gel as a catalyst are piperazine-2,5-diones (yields 35–59%). In addition, representatives of two unusual classes of compounds were found. Using ^1H NMR and coupled HPLC–MS and GC–Fourier transform IR–MS techniques, we identified these substances as substituted hexahydroimidazo[1,2-*a*]pyrazine-3,6-diones and hexahydroimidazo[1,2-*a*]imidazo[1,2-*d*]pyrazine-3,8-diones.

*Key words: amino acids, dehydration, silica gel, hexahydroimidazo[1,2-*a*]pyrazine-3,6-diones, hexahydroimidazo[1,2-*a*]imidazo[1,2-*d*]pyrazine-3,8-diones*

To whom correspondence should be addressed; phone: (52-5) 622-4674; fax: (52-5) 616-2233; e-mail: basiuk@nuclecu.unam.mx.