



УДК 577.112.3;577.122.324

ОБРАЗОВАНИЕ ДИПЕПТИДОВ – ПОБОЧНАЯ РЕАКЦИЯ ПРИ РАЦЕМИЗАЦИИ ФЕНИЛАЛАНИНА

© 1999 г. Е. К. Котлова[#], Е. А. Тимохина, Г. Г. Честухина, В. М. Степанов*Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1*

Поступила в редакцию 14.01.99 г. Принята к печати 22.03.99 г.

Показано, что в ходе рацемизации *D*-фенилаланина в присутствии уксусного ангидрида помимо *Ac-D,L*Phe-OH образуются ацетилированные дипептиды *Ac-D*Phe-*D*Phe-OH, *Ac-L*Phe-*L*Phe-OH, *Ac-D*Phe-*L*Phe-OH и *Ac-L*Phe-*D*Phe-OH. Суммарное содержание дипептидов в реакционной смеси в зависимости от условий реакции составляет от 40 до 60%. Сделан вывод, что фенилаланин подобно α -аминоизомасляной кислоте склонен к полимеризации в условиях рацемизации.

Ключевые слова: фенилаланин, рацемизация; уксусный ангидрид; оксазолон.

Оптически активные энантиомеры аминокислот находят широкое применение в здравоохранении, пищевой промышленности и животноводстве. В частности, *L*-фенилаланин входит в состав смесей для парентерального питания и является одним из компонентов интенсивного подсластителя – аспартама, а его *D*-антипод применяется как эффективный антидепрессант и анальгетик. Рацемические смеси являются исходными для получения оптически активных энантиомеров, поэтому проблема рацемизации α -аминокислот остается актуальной как в лабораторной практике, так и в промышленности.

Одним из наиболее доступных реагентов, применяемых в процессе рацемизации α -аминокислот, является уксусный ангидрид. Оптически активные α -аминокислоты легко превращаются в рацемические ацетильные производные при нагревании их с уксусным ангидридом при температуре около 100°C [1]. Промежуточная стадия в этом процессе – образование оксазолонов (азлактонов), обладающих малой оптической стабильностью [2, 3]. Однако протекающая в присутствии уксусного ангидрида рацемизация часто сопровождается образованием побочных соединений, частичной деструкцией и осмолением [4, 5].

Ранее нами была разработана технологическая схема ферментативного синтеза подсластителя – аспартама (метилового эфира *L*-аспартил-*L*-фенилаланина), включающая в качестве исходного сырья метиловый эфир *D,L*-фенилаланина и предполагающая последующую рацемизацию невовлеченного в синтез производного *D*-фенилаланина [6]. С этой целью был изучен процесс ра-

цемизации этой аминокислоты в присутствии уксусного ангидрида и выявлены сопровождающие его побочные реакции.

При действии уксусного ангидрида на *D*-фенилаланин образуется соответствующий оксазолон, который легко превращается в рацемическую α -ацетиламинокислоту гидролизом в мягких условиях (схема 1, *a*) [7]. Эта реакция протекает как в водно-щелочной, так и в безводной среде. Однако, поскольку рацемизация в водных растворах сопряжена с повышенным расходом уксусного ангидрида из-за его гидролиза, происходящего с большой скоростью при высоких значениях pH [8], наиболее целесообразным нам представлялось проведение этого процесса в безводной среде в присутствии уксусной кислоты либо уксусного ангидрида в качестве растворителя (таблица).

Следует отметить, что, в связи с прикладным характером поставленной задачи, необходимо было подобрать условия рацемизации с наименьшим расходом используемых реагентов. В литературе описывается рацемизация производных α -аминокислот в присутствии каталитического количества уксусного ангидрида (0.1–2% по весу), протекающая в расплаве в вакууме или в атмосфере инертного газа при температуре 170–200°C [5, 9]. Этот способ представляется перспективным в случае *N*-ациламинокислот, но он вряд ли пригоден для свободных аминокислот из-за их высокой температуры плавления, сопровождаемого разложением (например, температура плавления *D,L*-фенилаланина 271–273°C).

Есть сведения, что в присутствии эквимольного количества уксусного ангидрида *D*-фенилаланин не теряет оптической активности [1]. Однако в нашем случае в таких условиях наблюдалась его

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 315-37-38; e-mail: lab11@vnigen.msk.su).

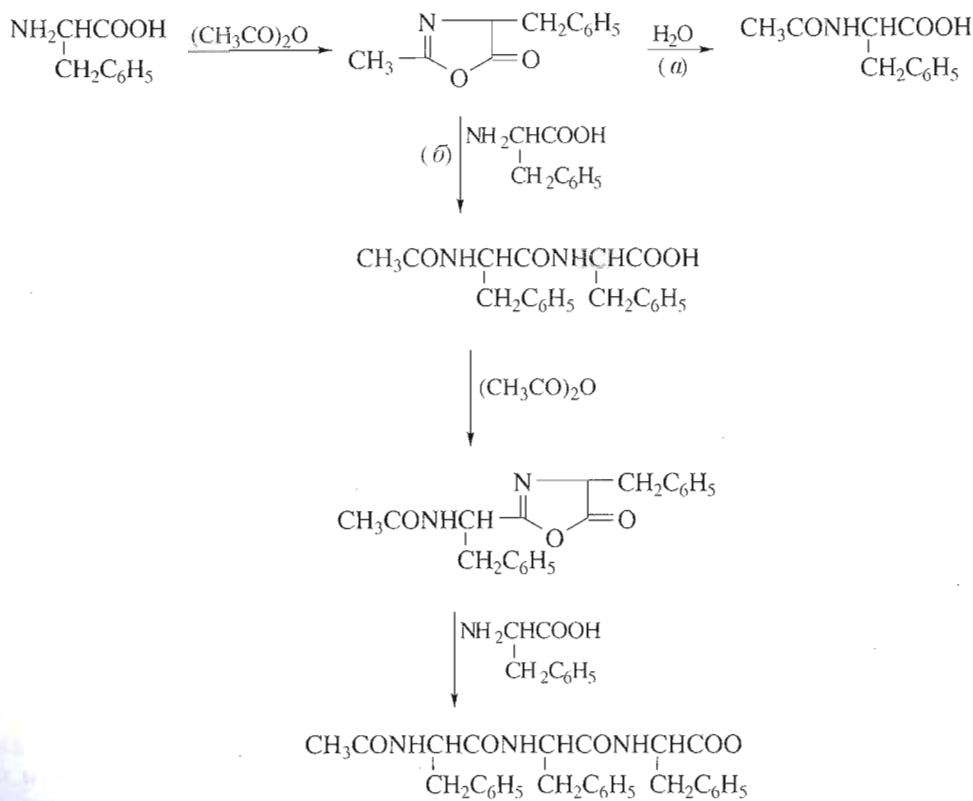


Схема 1.

частичная рацемизация (таблица). Использование полтора кратного избытка уксусного ангидрида приводило к возрастанию степени оптической изомеризации от 64 до 75%, а увеличение продолжительности реакции в 2 раза обеспечивало полную рацемизацию. Дальнейшее повышение избытка уксусного ангидрида до соотношения 5.2 : 1 позволило сократить время реакции с 2 до 0.5 ч при сохранении количественной степени рацемизации.

Отметим, что использование в качестве растворителя 14 эквивалентов уксусной кислоты (в расчете на *D*-фенилаланин) несколько снижает расход уксусного ангидрида (с 1.73 до 1.5 эквивалента). Однако этот способ кажется нам менее перспективным в связи с последующей необходимостью утилизации большого объема растворителя.

Наиболее удобными условиями крупномасштабного процесса рацемизации, с нашей точки зрения, являются 95°C и 5-кратный избыток уксусного ангидрида. Однако при ВЭЖХ-анализе состава полученного в таких условиях рацемата наряду с *Ac-D,L*Phe-OH были обнаружены два побочных продукта (рис. 1). Суммарное содержание этих продуктов в выделенном рацемате в зависимости от условий реакции составляло 40–60%. Поскольку в литературе часто указывается на со-

провождающие рацемизацию побочные реакции и деструкцию [4, 5], а сведения об идентификации побочных продуктов весьма ограничены, мы решили исследовать это явление более подробно.

Известно [7], что некоторые α-ациламинокислоты под действием уксусного ангидрида превращаются в нейтральные вещества – диацилдикетопиперазины. Кроме того, промежуточные оксазолонны имеют тенденцию полимеризоваться, по-

Рацемизация *D*-фенилаланина в присутствии уксусного ангидрида

Соотношение реагентов <i>D</i> Phe : Ac ₂ O, моль/моль	Условия	[α] _D ²⁰ , (с1, метанол), град*	Степень рацемизации, %
1 : 1.0	1 ч, 110–120°C	-14.65	64
1 : 1.5	1 ч, 110–120°C	-9.85	75
1 : 1.73	1 ч, 110–120°C	-0.15...-0.17	колич.
1 : 1.5	2 ч, 100°C, 5 мл AcOH/1 г	-0.15...-0.17	колич.
1 : 2.6	1 ч, 110–120°C	-0.16...-0.18	колич.
1 : 5.2	0.5 ч, 93–97°C	-0.11...-0.13	колич.

* Для *Ac-D*Phe [α]_D²⁰ -40°.

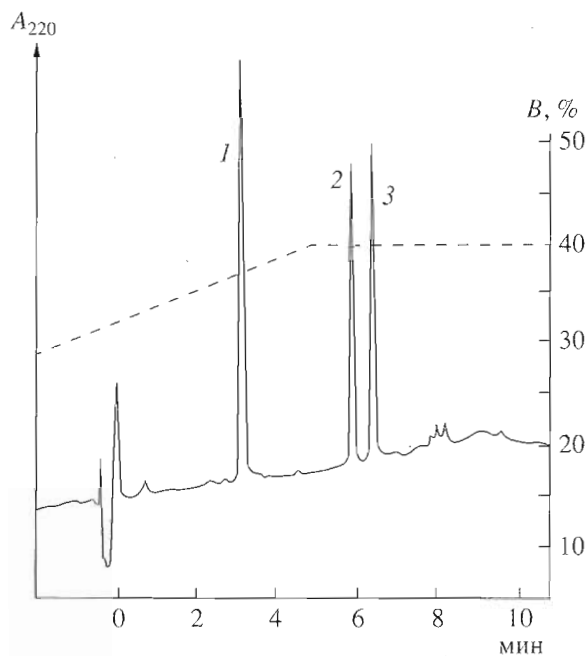


Рис. 1. Профиль ВЭЖХ выделенного рацемата: Ac-D,LPhe-OH (1), Ac-DPhe-DPhe-OH и Ac-LPhe-LPhe-OH (2); Ac-DPhe-LPhe-OH и Ac-LPhe-DPhe-OH (3). (Условия получения рацемата см. последнюю строку таблицы.)

видимому, путем ацилирования одной молекулы оксазолон другой с последующей перегруппировкой, приводящей к образованию пирролидинового кольца [7] (схема 2).

Однако эти превращения в данном случае маловероятны, поскольку кислотный гидролиз суммарного рацемата приводит к количественному появлению фенилаланина, что указывает на отсутствие каких-либо структурных превращений этого аминокислотного остатка.

В ряде случаев обработка аминокислот уксусным ангидридом может сопровождаться образованием димерных или даже полимерных продуктов [7]. Такая полимеризация возможна благодаря способности 5(4)-оксазолон реагировать с первичными аминами с образованием соответ-

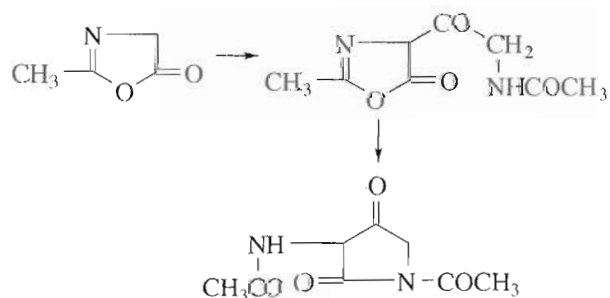


Схема 2.

ствующих амидов. Результат обработки конкретной аминокислоты зависит от соотношения скоростей ее реакции с оксазолоном или уксусным ангидридом. Так, α-аминоизомасляная кислота образует оксазолон с выходом 20% с последующей полимеризацией [7].

Мы предположили, что и в нашем случае образование побочных продуктов происходит по механизму, аналогичному процессу полимеризации α-аминоизомасляной кислоты [7] (схема 1, б). Образующийся на первом этапе оксазолон реагирует с молекулой D-фенилаланина с образованием дипептида. Последующие реакции димера с уксусным ангидридом и аминокислотой могут привести к появлению трипептида и других полимерных продуктов.

Для подтверждения этого предположения мы выделили побочные вещества (2) и (3) рис. 1 в индивидуальном виде, что удалось сделать благодаря существенной разнице в их растворимости. Вещество (2), в отличие от ацетил-D,L-фенилаланина (1) и вещества (3), практически не растворялось в ацетонитриле и метаноле.

Выделенные вещества (2) и (3) оказались оптически неактивными, а их ЯМР- и масс-спектры (рис. 2) были практически идентичны и соответствовали ацетилированному дипептиду Ac-Phe-Phe-OH (*M*, 354). Следовательно, в процессе рацемизации фенилаланина в присутствии уксусного ангидрида образуется смесь ацилдипептидов с разнообразным набором конфигурации остатков фенилаланина LL, DD, DL и LD.

Различия между веществами (2) и (3), заключающиеся в их хроматографическом поведении и растворимости, можно объяснить, предположив, что одно из них представляет собой смесь двух дипептидов, состоящих из остатков фенилаланина только L,L- и D,D-конфигурации (Ac-LPhe-LPhe-OH и Ac-DPhe-DPhe-OH), а другое – смесь дипептидов, каждый из которых содержит разновращающиеся остатки фенилаланина (Ac-LPhe-DPhe-OH и Ac-DPhe-LPhe-OH).

Для доказательства этого методом ферментативной конденсации в присутствии термолизина был синтезирован дипептид Ac-LPhe-LPhe-OH; по данным ВЭЖХ он полностью соответствовал веществу (2). Кроме того, карбодиимидным способом из соответствующих Cbz-производных с последующим гидрированием и ацетилированием было получено соединение Ac-DPhe-LPhe-OH, по хроматографической подвижности совпадающее с веществом (3). Этим же способом синтезированы дипептиды Ac-DPhe-D,LPhe-OH и Ac-LPhe-D,LPhe-OH, каждый из которых в условиях ВЭЖХ был представлен двумя пиками, соответствующими по времени выхода веществам (2) и (3), что полностью подтверждало наше предположение.

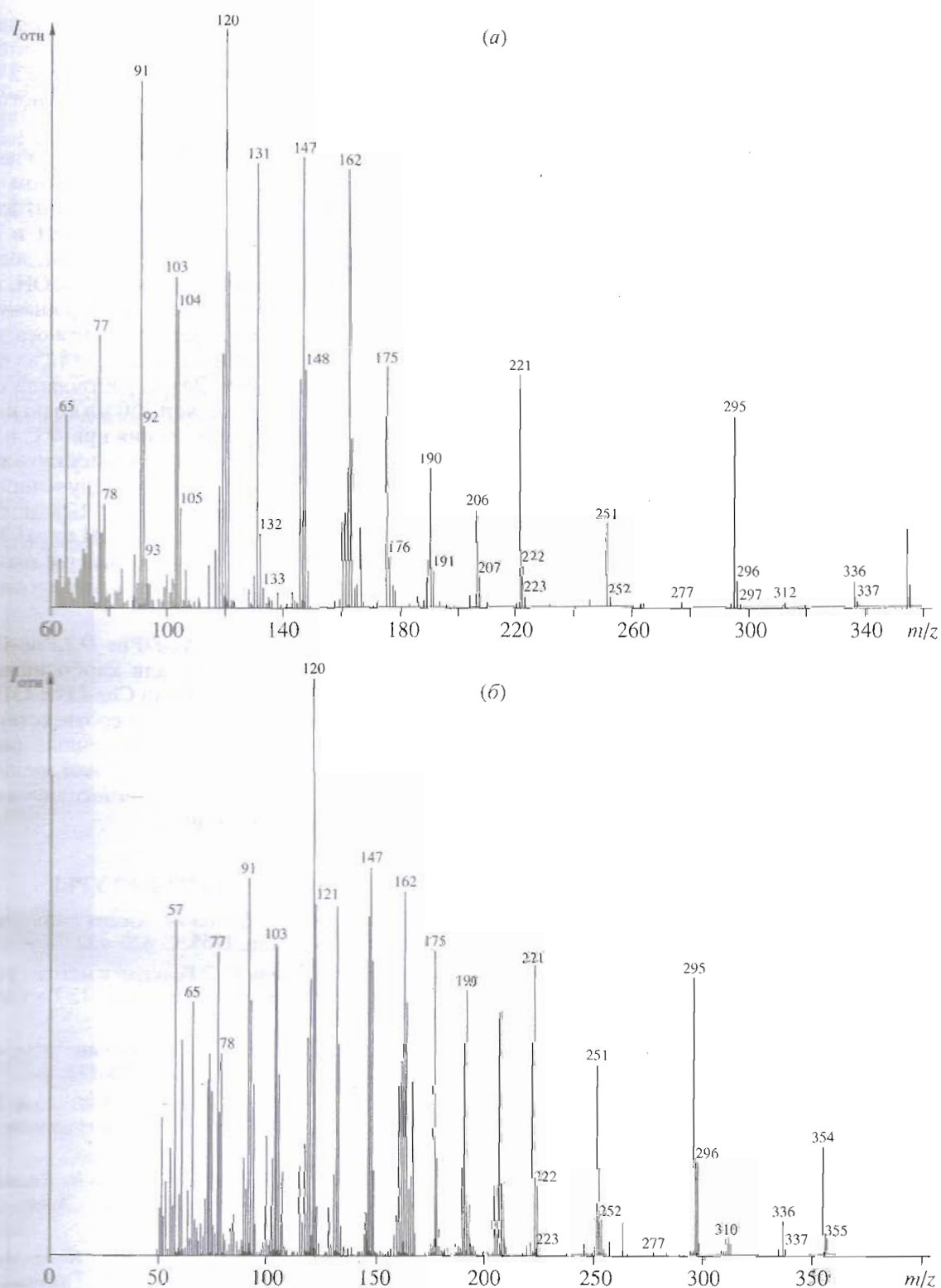


Рис. 2. Масс-спектры вещества (2) – (а) и вещества (3) – (б).

Таким образом, показано, что рацемизация *D*-фенилаланина в присутствии уксусного ангидрида сопровождается образованием ацетилдипептидов. Следовательно, *D*-фенилаланин, как и α -ами-

ноизомасляная кислота, склонен к полимеризации в условиях рацемизации. В связи с этим, при использовании рацемизованного в присутствии уксусного ангидрида фенилаланина необходимо

дополнительно гидролизовать полимерные фенилаланинсодержащие продукты. Вероятнее всего, реакция образования ди- или полипептидов протекает в той или иной мере и при синтезе оксазолонов других α -аминокислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы кристаллические термолизин (Serva, Германия) и химотрипсин (Sigma, США).

ВЭЖХ проводили на приборе Gilson 704, используя колонку (4.5 × 250 мм) Ultrasphere ODS (Beckman). Растворы для хроматографии содержали трифторуксусную кислоту и триэтиламин (по 0.05%) в воде и метанол (5% в буфере А и 90% в буфере В). Рацемическую смесь разделяли в градиенте концентрации буфера В при скорости потока 1.5 мл/мин (рис. 1). Детекция при 215 нм.

ТСХ на пластинках Silufol вели в системе *n*-бутанол–вода–пиридин – уксусная кислота (10 : 15 : 12 : 3) с обнаружением веществ раствором нингидрина или 1% KI.

Аминокислотный состав определяли на автоматическом кислотном анализаторе Biotronik LC 5001 (Германия).

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе MAT 44 (Varian, Германия).

Рацемизацию *D*-фенилаланина проводили в круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником. В колбу помещали 8 г (48.48 ммоль) *D*-фенилаланина и добавляли уксусного ангидрида (требуемое количество 4.6–24.2 мл (48.48–255.00 ммоль)). Смесь выдерживали 0.5–2 ч при 95–120°C, периодически перемешивая, при этом фенилаланин растворялся. Затем раствор концентрировали упариванием в вакууме и повторяли упаривание 5 раз с водой, что обеспечивало гидролиз оксазолона и полную отгонку уксусного ангидрида. Получали рацемат *N*-ацетил-*D,L*-фенилаланина в виде масла слегка желтоватого цвета. Для кристаллизации продукта масло растворяли в 6 мл 2 М NaOH и переосаждали, добавляя к реакционной смеси раствор 6 н. HCl до достижения pH 1.5. Выпавший осадок отделяли и высушивали.

Степень рацемизации определяли, растворяя 100 мг кристаллов в 10 мл метилового спирта и измеряя угол вращения полученного раствора на поляриметре Перкин–Элмер (Швеция) при 20–25°C и длине волны 589 нм. При расчете степени рацемизации учитывали, что угол вращения 1% раствора *N*-ацетил-*D*-фенилаланина в метиловом спирте равен -40° . Считали рацемизацию прошедшей практически полностью, если значение $[\alpha]_D^{20}$ не превышало $\pm 0.2^\circ$.

Ac-LPhe-OH и Ac-DPhe-OH получали, выдерживая 1 г (6.06 ммоль) фенилаланина соответствующей конфигурации, растворенного в 2 мл уксусной кислоты, с 1.3 г (12 ммоль) уксусного ангидрида при 0–4°C в течение 3 ч.

Ac-LPhe-LPhe-OH получали из Ac-LPhe-OH и H-LPhe-OMe ферментативным синтезом с использованием термолизина [10]. Для этого растворяли 2 г (8.97 ммоль) Ac-LPhe-OH и 2.31 г (10.76 ммоль) H-LPhe-OMe в 32 мл воды, доводили pH до 6.3 с помощью 10% раствора NaOH, добавляли 16.6 мг термолизина и выдерживали при 37°C в течение 1 сут. Образовавшийся осадок, содержащий целевое вещество, отделяли на фильтре и промывали водой. Затем растворяли осадок в 30 мл метанола, добавляли 150 мл воды и оставляли для полноты высаживания при 4°C на 18 ч. Отделяли осадок на фильтре и высушивали. Для последующего омыления 40 мг полученного Мезэфира пептида растворяли в 50 мл 10% метанола, раствор подщелачивали 0.5 М NaOH до pH 7.2–7.6, вносили 2 мг химотрипсина и выдерживали при 25–30°C в течение 16 ч, затем анализировали реакционную смесь ВЭЖХ.

Ac-DPhe-LPhe-OH, Ac-DPhe-D,LPhe-OH и Ac-LPhe-D,LPhe-OH получали карбодимидным синтезом из Cbz-DPhe-OH или Cbz-LPhe-OH и метиловых эфиров фенилаланина соответствующей конфигурации [11, с. 40]. Защищенные пептиды гидрировали [11, с. 108] и подвергали щелочному омылению [11, с. 174], а затем ацетилировали по вышеприведенной методике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринштейн Дж., Виниц М. Химия аминокислот и пептидов. М.: Мир, 1965. С. 420–422.
2. Лурье С.Н., Чаман Е.С. Реакции и методы исследований органических соединений. М.: Госхимиздат, 1959. С. 201.
3. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. М.: Мир, 1985. С. 170–172.
4. Chibata I., Yamada S., Hongo C., Yoshioka R. Process for Racemization of Optically Active α -aminoacids or a Salt Thereof. EP 0 057 092, 1982.
5. Karrenbauer M., Kleemann A. Process for Racemization of *N*-acetyl-*D,L*- α -aminocarboxylic Acids. Patent 4,602,096 US, 1986.
6. Степанов В.М., Честухина Г.Г., Котлова Е.К., Юсупова М.П., Терентьева Е.Ю., Тимохина Е.А., Борматова М.Е., Иванова Н.М., Суворова Н.Л., Мильготон И.М., Мудрый Ф.В., Ситников В.И. Способ получения метилового эфира *N*-бензилоксикарбонил-*L*-аспартил-*L*-фенилаланина. Патент 20 83 585 РФ, 1994.
7. Гетероциклические соединения / Ред. Эльдерфилд Р. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1961. С. 269–301.

8. Амирханян М.М., Степанянц Б.С., Амирханян О.М., Еланян М.Ф., Степанов В.М. Способ получения оптически активных L-аминокислот. А. с. 1685924 А1 СССР, 1988.
9. Kagaku D. Method for Racemization of N-acetylphenylalanine. Patent 60-61952 JP, 1983.
10. Юсупова М.П., Котлова Е.К., Тимохина Е.А., Степанов В.М.// Биоорг. химия. 1995. Т. 21. С. 33–38.
11. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наук. думка, 1987.

Phenylalanine Racemization: A Side Reaction of Dipeptide Formation

E. K. Kotlova[#], E. A. Timokhina, G. G. Chestukhina, and V. M. Stepanov[†]

*State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms,
Pervyi Dorozhnyi proezd 1, Moscow, 113545 Russia*

It was shown that acetylated dipeptides, Ac-D-Phe-D-Phe-OH, Ac-L-Phe-L-Phe-OH, Ac-D-Phe-L-Phe-OH, and Ac-L-Phe-D-Phe-OH, are formed during D-phenylalanine racemization. The overall content of these dipeptides in the reaction mixture ranged from 40 to 60% depending on the reaction conditions. We concluded that, like α -aminoisobutyric acid, phenylalanine is prone to polymerization under racemization conditions.

Key words: phenylalanine, racemization; acetic anhydride; oxazolones

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 315-3738; fax: +7 (095) 315-0501; e-mail: lab11@vniigen.msk.su.