



УДК 547.466 : 543.544

ПОЛИМЕРНЫЕ РЕАГЕНТЫ
В ЭНАНТИОМЕРНОМ АНАЛИЗЕ АМИНОКИСЛОТ

IV *. СИНТЕЗ ДИАСТЕРЕОМЕРНЫХ ДИПЕПТИДОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

*Самойлова Н. А., Андреев С. М., Цырянкин В. А.,
Давидович Ю. А., Рогожин С. В.**Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва*

С помощью гидрофильных поли-*N*-оксисукцинимидных эфиров *трет*-бутилоксикарбонил-*L*-аланина и -*L*-лейцина в присутствии *N*-этилморфолина соответственно в водной или водно-спиртовой среде осуществлен синтез диастереомерных дипептидов, исходя из следующих свободных *D(L)*-аминокислот: аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, валина, лейцина, изолейцина, метионина, пролина, серина, тирозина. После отщепления *N*-защитной группы водным или водно-спиртовым раствором хлористого водорода полученные дипептиды анализировали жидкостной хроматографией.]

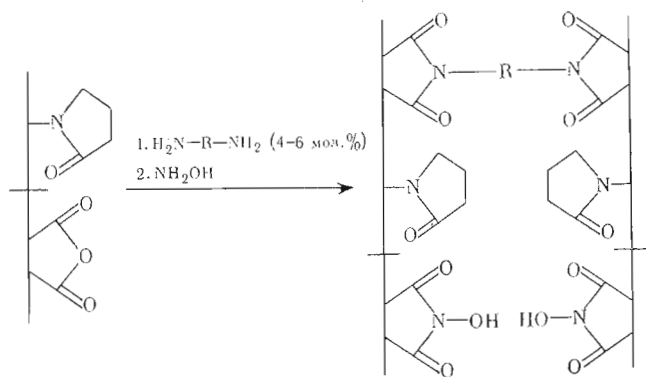
Ранее сообщалось об использовании для пептидного синтеза полимерных макросетчатых *N*-оксисукцинимидных эфиров *N*-защищенных аминокислот [1, 2]. В дальнейшем этот метод был применен для получения диастереомерных дипептидов, используемых для оценки энантиомерной чистоты аминокислот [3—5]. С указанной целью анализируемые аминокислоты превращали в этиловые эфиры [3], триметилсилильные производные [4] или использовали в виде суспензии в диметилсульфоксиде в присутствии гидроокиси тетрабутиламмония [5] и вводили затем в реакцию с полимер-активированной *трет*-бутилоксикарбонил(Вос)-*L*-аминокислотой. После отщепления Вос-группы трифторуксусной кислотой полученные дипептиды анализировали методом жидкостной хроматографии. Во всех случаях реакция аминолиза полимерных эфиров проводилась в органических растворителях, в которых хорошо набухает полимер.

В продолжение начатых в этой области работ, с целью упрощения методики, мы исследовали в настоящей работе возможность применения поли-*N*-оксисукцинимидных реагентов для получения *N*-защищенных диастереомерных дипептидов и условия *N*-деблокирования указанных дипептидов в водной среде.

Использованные ранее [3—5] поли-*N*-оксисукцинимиды и эфиры, синтезированные на их основе, отличаются довольно высокой гидрофобностью и практически не набухают в воде. В связи с этим мы применили в качестве полимера-активатора гидрофильный поли-*N*-оксисукцинимид, полученный по методике, аналогичной [1], сшиванием сополимера мадеинового ангидрида с *N*-винилпирролидоном 4—6% диамиподифенилоксида,

* Предыдущие сообщения см. ссылки [3—5].

бензидина или диаминодифенилметана и последующей обработкой гидроксиламиноом (схема).



R-остаток сшивающего агента,
ароматического диамина

Конденсацию ациламино кислот с полимером осуществляли методом смешанных ангидридов [6]. Для получения дипептида анализируемую *D(L)*-аминокислоту вводили в реакцию аминолиза с избытком гидрофильного полимерного эфира Вос-*L*-аланина или Вос-*L*-лейцина соответственно в воде или водно-спиртовой системе в присутствии органического основания — *N*-этилморфолина — и выдерживали 8—10 ч; использование неорганического основания (KOH) снижало выход дипептида. pH среды в процессе реакции поддерживали в пределах 8,5—9,0, добавляя *N*-метилморфолин; полимер находился в набухшем состоянии. В связи с тем что полимерный активированный эфир Вос-*L*-лейцина обладает несколько большей гидрофобностью, чем исходный поли-*N*-оксисукцинимид, добавление в реакционную систему этанола способствовало лучшему набуханию полимерного реагента и положительно сказывалось на выходах дипептидов; для полимерного эфира Вос-*L*-аланина присутствие спирта практически не оказывало влияния на исход аминолиза.

Удаление Вос-группы осуществляли в соединениях с *N*-концевым аланином подкислением реакционной смеси после окончания аминолиза водной 2 н. HCl до pH 1, а в случае лейцина — добавлением равного объема 5,5 н. HCl в смеси вода — этанол (1 : 1) и выдерживанием реакционной смеси в обоих случаях в течение 1,5—2 ч; при этом полимер переходил в ненабухшее состояние. По данным ТСХ, деблокирование на 100% в приведенных условиях протекало для Вос-аланина за 0,5, Вос-лейцина — за 1 ч.

После проведения указанной операции раствор над полимером непосредственно мог быть использован для введения в колонку жидкостного анализатора.

Наряду с пептидообразованием в приведенных выше условиях протекает и реакция гидролиза, однако сравнительно высокие выходы дипептидов (табл. 1) указывают на то, что скорость реакции образования амидной связи все же значительно превышает скорость конкурирующей реакции. Несколько меньшие выходы наблюдали в случае использования свободных аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также серина. Это явление, по-видимому, обусловлено повышенной сорбцией указанных аминокислот полимером. Так, анализ растворов *L*-аланина и *L*-серина, а также *L*-аланина и *L*-глутаминовой кислоты при pH, аналогичных реакции аминолиза, до и после добавления в раствор исходного поли-*N*-оксисукцинимиды показало, что после обработки полимером происходит снижение концентраций *L*-серина и *L*-глутаминовой кислоты на 20—30% по сравнению с *L*-аланином.

Выходы дипептидов, %

Полимерный эфир аминокислоты	Анализируемая аминокислота (аминокомпонент)									
	Asp	Ala	Val	Pro	Tyr	Met	Ile	Leu	Ser	Glu
Вос- <i>L</i> -Leu	60	95	90	95	96	—	—	—	—	—
Вос- <i>L</i> -Ala	—	98	94	80	—	90	95	95	60	55

Таблица 2

Анализ *D(L)*-валина с использованием полимерного *N*-оксисукцинимидного эфира Вос-*L*-аланина

Энантиомер	Содержание энантиомеров в смеси, %		Энантиомер	Содержание энантиомеров в смеси, %	
	найдено	взято		найдено	взято
<i>D</i>	12,5	10,6	<i>D</i>	32,0	30,5
<i>L</i>	87,5	89,4	<i>L</i>	68,0	69,5
<i>D</i>	21,5	20,0	<i>D</i>	40,0	38,0
<i>L</i>	78,5	80,0	<i>L</i>	60,0	62,0

В дополнение к предыдущим сообщениям [3—5] в данной работе осуществлен анализ тирозина, достигнута хорошая воспроизводимость в реакции аминолиза для пролина.

Выход диастереомерных дипептидов оценивали по площадям соответствующих пиков на хроматограммах. Отщепленный от полимера и деблокированный карбоксильный компонент в использованных условиях разделения [4] легко идентифицировался и не затруднял анализа.

После проведения вышеизложенных процедур полимер-активатор, практически не содержащий активированной аминокислоты, применялся для повторной активации *N*-ациламинкислот.

При использовании данного метода для анализа оптической чистоты аминокислот рацемизации и стереоселективности в ходе аминолиза не наблюдалось (табл. 2). Данные по хроматографическому разделению диастереомерных дипептидов были опубликованы нами ранее [4]; анализ тирозина проводился согласно условиям, приведенным в работе [7].

В заключение следует отметить, что предлагаемая в настоящем сообщении методика оказалась удобной для получения и препаративного разделения диастереомерных пептидов, например при анализе малых количеств аминокислот, меченных тритием. Данный метод прост в осуществлении, подготовка образца аминокислоты к анализу происходит в одной колбе, без выделения промежуточных продуктов.

Экспериментальная часть

ИК-спектры снимали на приборе UR-20 (ГДР). Хроматографическое разделение дипептидов выполняли на аминокислотном анализаторе Hitachi KLA-3B (Япония).

*Полимерный N-оксисукцинимидный эфир Вос-*L*-аланина.* Раствор 1 г (5,29 ммоль) Вос-*L*-аланина и 0,61 г (5,3 ммоль) *N*-этилморфолина в 8 мл диметилформамида охлаждали до -10° , при перемешивании прибавляли 0,72 г (5,3 ммоль) изобутилхлорформиата. Реакционную смесь перемешивали при -10° 5 мин, затем прибавляли 1 г (3,2 ммоль) гидрофильного

поди-N-оксисукцинимид, температуру реакционной смеси постепенно доводили до 40° и перемешивали 1 ч при этой температуре. После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры полимер отфильтровывали, промывали метанолом, ацетоном, эфиром и сушили в вакууме. Получено 1,45 г полимерного эфира. Содержание аминокислоты 1,81 ммоль/г полимера. ИК-спектр (1790, 1820 см⁻¹). Объемная набухаемость в воде (рН 5) — 2,2.

Поли-N-оксисукцинимидный эфир *Boc-L-лейцина* был получен аналогично, методом смешанных ангидридов. В данной работе применяли полимерные эфиры, содержащие 1,5—1,8 ммоль аминокислоты на 1 г полимера.

Энантиомерный анализ аминокислот. К раствору 2—5 мг анализируемой аминокислоты в 0,5 мл воды и 0,1 мл N-этилморфолина прибавляли при перемешивании 0,1 г поли-N-оксисукцинимидного эфира *Boc-L-аланина*, при этом полимер впитывал весь растворитель. Реакционную смесь оставляли на 8—10 ч при комнатной температуре, после чего подкисляли 2 н. HCl до рН 1 и выдерживали 1,5 ч. При этом полимер переходил в ненабухшее состояние, и раствор над полимером наносили на колонку аминокислотного анализатора.

В случае использования полимерного эфира *Boc-L-лейцина* в реакцию аминолиза добавляли дополнительно 0,5 мл этанола, а *Boc*-группу удаляли, прибавляя в реакционную смесь 1,1 мл 5,5 н. HCl в смеси вода — этанол (1 : 1).

Анализ диастереомерных дипептидов проводили в условиях, приведенных в работе [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Юртанов А. И. (1973) Докл. АН СССР, 211, 1356—1358.
2. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Юртанов А. И. (1973) Докл. АН СССР, 212, 108—111.
3. Цыряпкин В. А., Андреев С. М., Давидович Ю. А., Самойлова Н. А., Беликов В. М., Рогожин С. В. (1975) Докл. АН СССР, 223, 1156—1159.
4. Андреев С. М., Цыряпкин В. А., Давидович Ю. А., Самойлова Н. А., Рогожин С. В. (1976) Биоорганич. химия, 2, 725—728.
5. Andreev S. M., Tsiryapkin V. A., Samoilova N. A., Mironova N. V., Davidovich Yu. A., Rogozhin S. V. (1977) Synthesis, 5, 303—304.
6. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Самойлова Н. А., Миронова Н. В., Юртанов А. И., Андреев С. М. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 428—433.
7. Manning J. M., Moore S. (1968) J. Biol. Chem., 243, 5591—5597.

Поступила в редакцию
22.VII.1977

После переработки
19.X.1977

POLYMERIC REAGENTS IN ENANTIOMERIC ANALYSIS OF AMINO ACIDS. IV. THE SYNTHESIS OF DIASTEREOMERIC DIPEPTIDES IN AQUEOUS MEDIUM

SAMOILOVA N. A., ANDREEV S. M., TSIRYAPKIN V. A.,
DAVIDOVICH Yu. A., ROGOZHIN S. V.

*Institute of Organo-Element Compounds, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

Synthesis of diastereomeric dipeptides has been performed in the presence of N-ethylmorpholine in aqueous or aqueous-alcohol media using free *D* (*L*)-amino acids (Ala, Asp, Glu, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Ser and Tyr) and hydrophilic *Boc-L-Ala* or *Boc-L-Leu* poly-N-hydroxysuccinimide esters. After removal of the N-protecting group by treatment with aqueous or aqueous-alcohol hydrogen chloride solution the dipeptides have been analyzed by liquid chromatography.