



УДК 547.466

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, ОБРАЗУЮЩИХСЯ
ПРИ СИНТЕЗЕ 2-НИТРОФЕНИЛСУЛЬФЕНИЛАМИНОКИСЛОТ
В ВОДНО-ДИОКСАНОВОМ РАСТВОРЕ

Вегнер Р. Э., Чипенс Г. И.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Церконе И. К.

Химико-фармацевтическое производственное объединение «Олайнфарм», Олайне

Осуществлен анализ состава примесей, образующихся при синтезе 2-нитрофенилсульфениламино кислот в водно-диоксановом растворе. Кроме известных побочных продуктов (2,2'-динитродифенил-дисульфид, -тиосульфид, -тиосульфид, 2-нитробензол-сульфиновая и -сульфиновая кислоты) найдены 2,2'-динитродифенилсульфид, -сульфон и -дисульфид. Приведены хроматографические подвижности указанных веществ в ТСХ. Обсуждаются возможные пути образования побочных продуктов и их влияние на дальнейший ход пептидного синтеза.

Распространенным способом получения 2-нитрофенилсульфениламино кислот * [1, 2], широко используемых при синтезе пептидов [3], является ацилирование натриевых солей аминокислот NpS -хлоридом в водно-диоксановом растворе. Указанную реакцию применяют также для получения NpS -пептидов [4, 5], исходя из свободных пептидов. При этом вследствие одновременно протекающего частичного гидролиза NpS -хлорида наряду с NpS -аминокислотой (или NpS -пептидом) образуется целый ряд побочных продуктов, которые в основном удаляются (в процессе выделения [2] NpS -аминокислоты) в виде осадка после добавления воды к слабощелочной и нейтральной реакционной смеси. Однако проверка чистоты методом ТСХ как синтезированных в лаборатории, так и коммерческих NpS -аминокислот и даже их дициклогексилдиметиленовых солей показала наличие примесей. Их идентификация наталкивается на определенные трудности, поскольку в литературе отсутствуют данные о хроматографических подвижностях побочных продуктов реакции ацилирования.

С целью более подробного изучения и идентификации соединений, образующихся в реакции ацилирования аминокислот или пептидов NpS -хлоридом, и для их характеристики методом ТСХ мы исследовали химический состав осадка, полученного при синтезе NpS -глицина. Согласно данным ТСХ, осадок содержал восемь различных побочных продуктов (I) — (VIII), см. таблицу). После микропрепаративного выделения их структура была установлена при помощи масс-спектрометрии (для соединений (I) — (III), дающих молекулярные ионы, а также эти части для (IV), (V)), по характерным химическим превращениям (V), (VI)

* Далее для 2-нитрофенилсульфенильной группы использовано сокращение NpS , где Np обозначает ароматическую часть группы (2-нитрофенил- или 2-нитробензол-), а S — атом серы.

**Отнесение побочных продуктов синтеза NpS-аминокислот,
разделенных при помощи ТСХ на пластинках Silufol**

Соединение	R_f^* в системах		Соединение	R_f^* в системах	
	А	Б		А	Б
(I) NpSSNp	0,7	0,9	(V) NpSOSNp	0,2	0,9
(II) NpSNp	0,5	0,9	(VI) NpSO ₂ SO ₂ Np	0,1	0,9
(III) NpSO ₂ Np	0,4	0,9	(VII) NpSO ₂ H	0,0	0,5
(IV) NpSO ₂ SNp	0,3	0,9	(VIII) NpSO ₃ H	0,0	0,4

* Приведены ориентировочные значения хроматографических подвижностей, поскольку они несколько меняются в зависимости от условий проведения ТСХ: от активности адсорбента, степени насыщения камеры, количества нанесенного вещества, длины пробега фронта хроматографической системы, срока хранения системы (Б).

и сравнением свойств исследуемых соединений и заведомых образцов: для (IV) — отсутствие депрессии точки плавления пробы смешения, для (I), (VII), (VIII) — идентичность ИК-спектров; для всех соединений — совпадение хроматографических подвижностей.

Таким путем идентифицированы и отнесены к определенным пятнам хроматограмм следующие вещества: 2,2'-динитродифенилдисульфид (I), 2,2'-динитродифенилсульфид (II), 2,2'-динитродифенилсульфон (III), 2,2'-динитродифенилтиолсульфонат (IV), 2,2'-динитродифенилтиолсульфинат (V), 2,2'-динитродифенилдисульфон (VI), 2-нитробензолсульфиновая кислота (VII) и 2-нитробензолсульфоная кислота (VIII). Необходимо отметить, что при получении NpS-аминокислот не в слабощелочных [4], а в сильнощелочных средах [6] (pH 10—12) ассортимент побочных продуктов значительно обедняется и состоит, как правило, из дисульфида (I), тиолсульфоната (IV), сульфиновой и сульфоной кислот (VII), (VIII).

В осадке не обнаружены ортапированная кислота (которая, по данным работы [7], получается при гидролизе NpS-хлорида в горячем метаноле), NpS-ортапированная кислота, 2-нитротииофенол [8] (очевидно, окисляется во время реакции), 2,2'-динитродифенил NpNp (наличие которого могло бы указывать на образование радикала Np-). В реакционной смеси, кроме главного продукта реакции — NpS-глицина, не обнаружены другие вещества, содержащие в своей молекуле серу и остаток аминокислоты (глицина).

Большая часть обнаруженных веществ (I, IV, V, VII, VIII) — хорошо известные побочные продукты [1, 6] получения NpS-аминокислот, и проблема здесь состояла только в отнесении соответствующих пятен, наблюдаемых в ТСХ. Механизмы образования этих продуктов обсуждены в работах [9—12]. Напротив, данных об образовании остальных найденных нами продуктов — сульфида (II), сульфена (III) и дисульфона (VI) — найти в литературе не удалось. Правда, отмечено [13] образование 2,2'-(2-фенилазо-1-нафтил)сульфида при нагревании соответствующего тиолсульфоната. Поэтому можно допустить, что сульфид (II) также образуется вследствие разложения тиолсульфоната (IV) (или гипотетического, более реакционноспособного изомерного дисульфоксида; подобным образом, с выделением двуокиси серы, из дисульфона (VI) мог бы образоваться сульфон (III)). Однако более вероятно появление сульфида (II) при окислении кислородом воздуха [14] невыделенного 2-нитротииофенола, который образуется при гидролизе тиосульфината (V) и тиолсульфоната (IV) [8]. Возникновение дисульфона (VI) может быть связано с рекомбинацией радикалов NpSO₂·, образующихся при гомолитическом распаде неустойчивого сульфенилсульфона NpSOSO₂Np — продукта обратимой реакции димеризации сульфиновой кислоты (VII) [15].

Для успешного синтеза пептидов с использованием NpS-аминокислот при минимальной затрате сил на очистку промежуточных продуктов важно оценить допустимость в NpS-аминокислотах примесей (I) — (VIII). Согласно нашему опыту, дисульфид (I) и сульфид (II) в условиях реакции конденсации при получении пептидов, например с использованием дициклогексилкарбодиимида, являются стабильными веществами и в дальнейших превращениях не участвуют. Напротив, тиолсульфонаты [16], в нашем случае соединение (IV) и сульффиновые кислоты (VII) вступают в обратимую реакцию с веществами, содержащими аминогруппу, и таким образом аминокислота может частично реагировать с NpS-группой. Кроме того, сульффиновая и сульффиновая кислоты (VII, VIII) в присутствии конденсирующего агента могут реагировать вместо карбоксильного компонента и образовывать соответственно сульффирил- и сульффирилпептиды. Тиолсульфинат (V) ввиду его нестабильности, склонности к диспропорционированию до дисульфида и тиолсульфоната обычно не присутствует в исходных NpS-аминокислотах.

Сульффон (III) и дисульффон (VI), как правило, являются минорными примесями и поэтому не могут в заметной степени повлиять на ход пептидного синтеза. Из характерных реакций дисульффинов следует упомянуть их спонтанный гидролиз на сульффиновую и сульффиновую кислоты, а также реакцию с аминами [17], приводящую к сульффирилпроизводным аминам. Присутствие сульффиновой кислоты (VII) приводит к частичному отщеплению NpS-группы.

Авторы выражают благодарность И. Б. Мажейка за обсуждение результатов масс-спектрометрического анализа исследованных соединений.

Экспериментальная часть

Температуры плавления определяли в открытых капиллярах без поправки. Масс-спектры снимали на приборе MS-50 (АЕИ, Англия) при температуре источника ионов 150° и энергии ионизирующих электронов 70 эВ (напуск через прямой ввод). ИК-спектры записывали на приборе UR-20 (ГДР) с призмами NaCl, LiF в вазелиновом масле.

Синтез NpS-глицина и получение осадка, содержащего побочные продукты, проводили, придерживаясь методики [2]. В стакане емкостью 200 мл в смеси, состоящей из 10 мл 2М водного раствора NaOH и 25 мл диоксана, не содержащего перекиси, растворяли 1,5 г (0,020 моль) глицина. При перемешивании магнитной мешалкой в условиях, не исключающих доступ воздуха, в течение 15 мин по каплям добавляли равные объемы 2М раствора NpS-хлорида в диоксане (12 мл) и 2М водного раствора NaOH (12 мл). Смесь разбавляли водой до 200 мл, осадок отфильтровывали и сушили в вакууме над P_2O_5 . Выход осадка желто-зеленого цвета, содержащего кроме следов глицина и NpS-глицина еще продукты (I) — (VIII), 0,45 г. После подкисления фильтрата H_2SO_4 до pH 3,0 NpS-глицин выделяли с выходом 90%, размягчение при 129° с постепенным разложением при более высоких температурах (литературные данные: т. пл. 147° (разлож., на столике Кюфлера при быстром нагреве), [1]; т. пл. $126-128^\circ$, [18]); ТСХ — R_f 0,0 (А), 0,9 (Б), 0,75 (этилацетат), следы примеси сульффоната (IV) и глицина (R_f 0,1 (Б)).

При повторении опыта получения NpS-глицина с использованием избытка щелочи (10+16 мл 2М раствора NaOH) осадок содержал вещества (I), (IV), (VII) и (VIII).

При анализе реакционной смеси ТСХ, несмотря на продолжающийся во время хроматографирования гидролиз, можно также обнаружить NpS-хлорид (R_f 0,8 (А)), желтое пятно; после опрыскивания 1% раствором метилового оранжевого в 90% этаноле — красное пятно на оранжевом фоне).

ТСХ проводили при комнатной температуре (20°) восходящим способом на пластинках с закрепленным слоем силикагеля с люминесцентным индикатором (Silufol, UV 254, Kavalier, ЧССР) в системах: бензол (А) и *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 4:1:1 (по объему) (Б) (см. примечание к таблице). В качестве камер для ТСХ использовали конические колбы емкостью 0,5 л с пришлифованными пробками диаметром 45 мм. Дополнительные меры по насыщению камер парами растворителей не применялись, поскольку улучшение насыщения камеры ухудшает разделение, особенно в системе А, — вещества остаются вблизи стартовой точки. Стартовые пятна, полученные после нанесения диоксидных растворов веществ, сушили в потоке теплого воздуха около 3 мин. Пробег фронта системы доводили до 10 см, считая от стартовой линии. После хроматографирования пятна обнаруживали визуально при дневном освещении (I, II — желтые, остальные — слабозеленые или бесцветные) и в УФ-свете (IV, VI, VII, VIII) — фиолетовые, остальные темные, на светящемся фоне). Нингидриновая реакция пятен (I) — (VIII) отрицательная до и после обработки пластин как 1М раствором хлористого водорода в уксусной кислоте, так и 4М водным NaOH. Интенсивность молярной абсорбции света в желтой области в растворе этилацетата возрастает в ряду $\text{NpSO}_2\text{H} < \text{NpSO}_2\text{SNp}$ ($\lambda_{\text{макс}}$ в области 350—400 нм, так же как в растворе циклогексана [19], отсутствует) \ll NpSSNp ($\lambda_{\text{макс}}$ 360 нм) $<$ NpSNp ($\lambda_{\text{макс}}$ 380 нм).

Микропрепаративно вещества выделяли элюированием их с сорбента ацетоном и упариванием элюата в вакууме при 40°. Вещества (VII) и (VIII) удалось успешно разделить в системе Б только при условии предварительного отделения веществ (I) — (VI) в системе А.

Синтезированы следующие вещества, использованные в качестве свидетелей в ТСХ: 2,2'-динитродифенилдисульфид [20]; 2,2'-динитродифенилсульфид [22] из 2-хлорнитробензола и сульфида натрия [21] (препарат содержал небольшие количества примесей, подвижности которых совпадали с подвижностями веществ (I), (III) и (VI)); 2,2'-динитродифенилсульфон [23]; 2,2'-динитродифенилтиолсульфонат [7]; 2,2'-динитродифенилтиолсульфинат [24] (содержал примеси соответствующего тиолсульфоната и дисульфида); 2,2'-динитрофенилдисульфид [25]; 2-нитробензолсульфиновую кислоту [8]; 2-нитробензолсульфоновую кислоту [26]; 2,2'-динитродифенил [27], R_f 0,8 (А); 2,2'-динитродифенилтрисульфид [28], R_f 0,8 (А); 2-нитрофенол [29]; натриевую соль 2-нитробензолтиосульфоновой кислоты NpSSO_3Na [29], R_f NpSSO_3H 0,7 (Б); ортаноловую кислоту [26], R_f 0,4 (Б), нингидриновая реакция положительная.

Количественные соотношения веществ в осадке примерно следующие: I+II+IV+(VII+VIII)+(III+VI) 15+15+30+30+5(%).

Идентификация продуктов (I) — (VIII). Хроматографические подвижности совпадают с подвижностями заведомых образцов для всех продуктов.

2,2'-Динитродифенилдисульфид (I). Масс-спектр, $m/e(I, \%)$: 308 (34) M^+ , 227 (32), 198 (88) ($M - \text{C}_5\text{H}_4\text{NO}_2$)⁺, 156 (39), 154 (34), ($M - \text{NpS}$)⁺, 139 (42), 138 (51), ($M - \text{NpS}, -\text{O}$)⁺, 98 (60), 71 (88), 51 (100), 41 (95). ИК-спектр совпадает со спектром заведомого образца, $\nu, \text{см}^{-1}$: 1590 ср., 1570 ср. (C=C аромат.), 1515 с. (NO асим.), 1340 с. (NO сим.), 1310 с., 1255 ср., 1110 ср., 1040 ср., 960 сл., 860 ср., 780 ср., 735 с., 715 ср.

2,2'-Динитродифенилсульфид (II). Масс-спектр, $m/e(I, \%)$: 276 (43) M^+ , 230 (52) ($M - \text{NO}_2$)⁺, 214 (22), ($M - \text{O}, -\text{NO}_2$)⁺, 202 (40), 184 (72) ($M - 2\text{NO}_2$)⁺, 183 (76), 167 (78), 166 (61), 154 (59), ($M - \text{Np}$)⁺, 152 (62), 149 (60), 138 (79) ($M - \text{Np}, -\text{O}$)⁺, 136 (33), 128 (80), 115 (62), 106 (98), 80 (100), 63 (100), 55 (90). ИК-спектр практически не отличается от спектра дисульфида (I).

2,2'-Динитродифенилсульфон (III). Масс-спектр, $m/e(I, \%)$: 308 (12) M^+ , 276 (10), 227 (10), 224 (31), 198 (40), 186 (8) ($M - \text{Np}$)⁺, 182 (22), 174 (17), 171 (22), 166 (27), 154 (100), 138 (13), 127 (17), 125 (17),

108 (48), 106 (78) ($M - \text{NpSO}_2, -\text{O}$)⁺, 98 (37), 96 (86), 91 (45), 79 (56), 78 (58), 69 (42), 57 (48).

2,2'-Динитродифенилтиолсульфонат (IV). Не дает депрессии точки плавления при смешении с заведомым образцом (т. пл. 141–142°). Масс-спектр, m/e (I , %): 198 (21), 186 (18) ($M - \text{NpS}$)⁺, 154 (100), ($M - \text{NpSO}_2$)⁺, 138 (74), 123 (70), 106 (70), 98 (74), 77 (65), 64 (100), 51 (100), 44 (93).

2,2'-Динитродифенилтиолсульфинат (V) выделить в чистом виде не удастся. Всегда содержит примеси дисульфида (I) и тиолсульфоната (IV), что является характерным следствием реакции диспропорционирования арилтиолсульфинатов [30]. Признаки масс-спектра, отличающего его от масс-спектров веществ (I) и (IV): m/e , 211 (71%), 169 (37), 73 (100).

2,2'-Динитродифенилдисульфид (VI). При попытке микропрепаративного выделения разлагается с образованием 2-нитробензолсульфиновой (VII) и 2-нитробензолсульфоновой (VIII) кислот (спонтанный гидролиз α -дисульфонов [31]).

2-Нитробензолсульфиновая кислота (VII). ИК-спектр совпадает со спектром заведомого образца, ν , cm^{-1} : 1540 с., 1350 с., 1310 ср., 1090 ср., 850 ср., 790 ср., 750 ср., 660 сл.

2-Нитробензолсульфоновая кислота (VIII). ИК-спектр совпадает со спектром заведомого образца, ν , cm^{-1} : 1540 с., 1350 с., 1250 с., 1220 с., 1080 ср., 1030 ср., 860 ср., 740 с., 670 ср., 620 ср., 570 ср.

При огнесении пятен можно использовать свойство тиолсульфоната (IV) — но не тиолсульфината (V), как это следует из работы [32], — темнеть при нагревании. Пластины ТСХ с пятнами разделенных веществ (I)–(VIII) нагревали 10 мин при 130–150°. Пятно (IV) стало бурым, окраска остальных пятен не изменилась. При нагревании тиолсульфоната (IV) и дисульфида (VI) выделяется двуокись серы — бумага конго красного, смоченная нейтральным раствором перекиси водорода и приближенная к соответствующему пятну хроматограммы, нагретой до 200°, окрашивается в синий цвет [33].

Хроматографическая подвижность соединений типа NpS_xNp в случае $x=1, 2, 3$ (т. е. 2,2'-динитродифенилсульфида, -дисульфида и -трисульфида) увеличивается с возрастанием значения x . Указанная закономерность отмечена (при $x=2, 3$) для ТСХ также в несколько отличающихся условиях [34].

ЛИТЕРАТУРА

1. Goerdeler J., Holst A. (1959) *Angew. Chem.*, 71, 775.
2. Zervas L., Borovas D., Gazis E. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.*, 85, 3660–3666.
3. Wünsch E. (1974) in: *Synthese von Peptiden* (Wünsch E., Hg.), Bd. 1, S. 203–218 (Houben-Weyl Methoden der organischen Chemie (Müller E., Hg.), Bd. 15/1), «G. Thieme», Stuttgart.
4. Abderhalden E., Riesz E. (1930) *Fermentforschung*, 12, 180–222.
5. Wünsch E., Drees F. (1967) *Chem. Ber.*, 100, 816–819.
6. Photaki I. (1976) *Top. Sulfur Chem.*, 1, 150.
7. Zincke T., Farr F. (1912) *J. Liebigs Ann. Chem.*, 391, 57–88.
8. Vinkler E., Klivényi F. (1960) *Acta chim. Acad. scient. hung.*, 22, 345–357.
9. Vinkler E., Klivényi F. (1973) *Int. J. Sulfur Chem.*, 8, 111–117.
10. Klivényi F., Stájer G., Szabó A. E., Pintye J. (1973) *Acta chim. Acad. scient. hung.*, 75, 177–183.
11. Stirling C. J. M. (1971) *Int. J. Sulfur Chem.*, Part B, 6, 277–320.
12. Оаз С. (1975) *Химия органических соединений серы*, с. 406–426, «Химия», М.
13. Burawoy A., Chaudhuri A. (1956) *J. Chem. Soc.*, 653–658.
14. Cole E. R. (1957) *Chem. Ind.*, 1511.
15. Kice J. L., Pawlowski N. E. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 4898–4904.
16. Болдырев Б. Г., Колесникова С. А. (1965) *Ж. общ. химии*, 35, 198–199.
17. Backer H. J. (1951) *Rec. trav. chim.*, 70, 254–259.
18. Kricheldorf H. R., Fehrle M. (1974) *Synthesis*, 422–424.
19. Leandri G., Mangini A., Tundo A. (1957) *J. Chem. Soc.*, 52–57.
20. Bogert M. T., Stull A. (1928) *Org. Synth.*, vol. 8, pp. 64–65, J. Wiley, N. Y.

21. Гитис С. С., Иванов А. В., Кампиная Э. Г., Удрис Н. В., Николаев В. И. (1968) Научн. тр. Тульск. гос. пед. ин-та, вып. 1, с. 109-115 (Р. Ж. «Химия» (1969) 15Ж227).
22. Круликовская Е. А., Кирилова В. Г., Быкова Л. Б. (1968) Тр. Томского ун-та, 192, 134-135 (Р. Ж. «Химия» (1970) 5Ж361).
23. Michel K., Matter M. (1961) Helv. chim. acta, 44, 2204-2208.
24. Di Nunno L., Scorrano G. (1966) Boll. Sci. Fac. Chim. Ind. Bologna, 24, 103-104 (Chem. Abstr., 66:55167c).
25. Cowell G., Finar I. L. (1962) J. Chem. Soc., 4146-4150.
26. Wohlfahrt T. (1902) J. prakt. Chem., 66, 551-557.
27. Mosby W. L. (1957) J. Org. Chem., 22, 671-673.
28. Лукашевич В. О., Сергеева М. М. (1949) Ж. общ. химии, 19, 1493-1510.
29. Lecher H. Z., Hardy E. M. (1955) J. Org. Chem., 20, 475-487.
30. Backer H. J., Klosterziel H. (1954) Rec. trav. chim., 73, 129-139.
31. Kice J. L., Kasperek G. J. (1969) J. Amer. Chem. Soc., 91, 5510-5516.
32. Oae S., Kawamura S. (1962) Bull. Chem. Soc. Jap., 35, 1156-1159.
33. Файгель Ф., Ангер В. (1976) Капельный анализ неорганических веществ, т. 2, с. 91-92, «Мир», М.
34. Kessler W., Iselin B. (1966) Helv. chim. acta, 49, 1330-1344.

Поступила в редакцию
4.X.1978

INVESTIGATION OF BY-PRODUCTS FORMED IN THE SYNTHESIS OF 2-NITROPHENYLSULFENYL-AMINO ACIDS IN AQUEOUS DIOXANE SOLUTION

VEGNER R. E., CHIPENS G. I., PERKONE I. K.

*Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga;
Chemical-Pharmaceutical Production Union «Olainfarm», Olaine*

Analysis of by-products formed in the synthesis of 2-nitrophenylsulfenyl-amino acids in aqueous dioxane solution is carried out. In addition to known side products (2,2'-dinitrodiphenyl-disulfide, -thiolsulfonate, -thiolsulfinate, 2-nitrobenzene-sulfonic and sulfonic acids), 2,2'-dinitrodiphenyl-sulfide, -sulfone and -disulfone are also identified. Chromatographic mobilities of these compounds in thin-layer chromatography are given. Probable reactions leading to side products and their influence on the course of subsequent peptide synthesis are discussed.