



УДК 547.466/755.07:577.156

СИНТЕЗ ИНДОКСИЛОВОГО ЭФИРА N-АЦЕТИЛ-*D,L*-ЛЕЙЦИНА

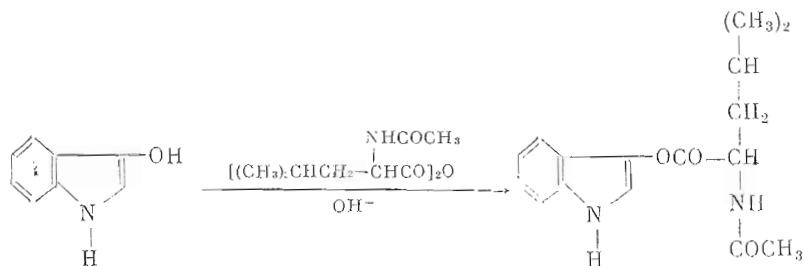
*Березин И. В., Казанская Н. Ф., Андрианова И. П.,
Айсина Р. В., Скурда Л. А.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
химический факультет*

Описан синтез нового субстрата протеиназ — индоксилового эфира *N*-ацетил-*D,L*-лейцина — реакцией индоксила с соответствующим ангидридом. Показано превосходство нового соединения перед описанными в литературе эфирами индоксила и карбоновых кислот в скорости гидролиза указанными ферментами.

Эфиры индоксила и карбоновых кислот (уксусной и масляной) являются субстратами эстераз и протеиназ и широко используются в гистохимических исследованиях [1, 2]. Принцип их действия основан на самопроизвольном окислении кислородом воздуха индоксила, выделяющегося при расщеплении эфира ферментом, до окрашенного соединения — индиго. Однако описанные в литературе 3-ацетокси- и 3-бутироксинидолы (общепринятым в литературе названием их является индоксилацетат и индоксилбутират [1]) не расщепляются трипсином, а в случае химо tripsина и других протеиназ скорость их гидролиза не достаточна для обеспечения такой концентрации индоксила, при которой скорость его окисления до индиго превышает бы скорость диффузии в свободные от протеиназ участки. Для повышения скорости расщепления индоксилового эфира ферментом необходимо, чтобы ацильную часть представлял остаток *N*-ацилированной аминокислоты, обладающий сродством к активному центру фермента. Мы получили эфир индоксила и *N*-ацетил-*D,L*-лейцина, который с высокой скоростью расщепляется протеолитическими ферментами и может быть использован как высокочувствительный реагент для гистохимического анализа.

Для получения названного эфира мы воспользовались способом, описанным для ацилирования индоксила уксусным ангидридом [3]. В соответствии с этим способом к щелочному раствору индоксила по каплям при охлаждении реакционной смеси добавляют ангидрид *N*-ацетил-*D,L*-лейцина, который синтезировали нагреванием *N*-ацетил-*D,L*-лейцина с уксусным ангидридом.



Получение индоксила является самостоятельной задачей, так как он крайне нестойкое соединение, легко окисляющееся кислородом воздуха. В связи с тем что исследования, касающиеся синтеза индоксила, в подавляющем большинстве были направлены на получение индиго [4], в литературе отсутствуют указания, позволяющие выделить индоксил в свободном виде или обеспечить стабилизацию его растворов для последующих превращений.

Кинетические параметры реакции гидролиза эфиров индоксила

Индоксилловый эфир	α -Химотрипсин		Субтилизин	
	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$
уксусной кислоты	$2 \cdot 10^{-3}$	0,5	$3,2 \cdot 10^{-1}$	2
<i>n</i> -масляной кислоты	$2,5 \cdot 10^{-3}$	0,11	$6,5 \cdot 10^{-1}$	3
N-ацетил- <i>D,L</i> -лейцина	17,7	1,05	1028	0,2

Нам удалось осуществить синтез эфира индоксила и N-ацетил-*D,L*-лейцина только при проведении всех стадий реакций с участием свободного индоксила в токе аргона, который специально очищали от кислорода пропусканием через кварцевую трубку с медными стружками, нагретую до 600° С.

Большинство из существующих методов получения индоксила многостадийны или требуют применения труднодоступных реагентов [5]. Мы использовали два способа: 1) гидролиз коммерческого препарата — индоксилбутирата щелочью в водной среде; 2) сплавление со щелочью натриевой соли N-фенилглицина при 300° С в соответствии со способом, разработанным ранее в производстве индиго [4].

В обоих случаях последующую реакцию индоксила с ангидридом N-ацетил-*D,L*-лейцина проводили без выделения его из реакционной смеси по описанному выше способу. Выход эфира составлял 30 и 20% соответственно.

Заключение о пригодности синтезированного эфира в качестве субстрата для гистохимических целей было сделано на основании изучения кинетики гидролиза его α -химотрипсином и субтилизином. Для сравнения проводили гидролиз известных коммерческих субстратов — индоксилбутирата и индоксилацетата этими же ферментами. В таблице представлены значения каталитической константы и константы Михаэлиса для изученных случаев.

Замена остатков уксусной и масляной кислот на остаток N-ацетил-*D,L*-лейцина резко сказывается на скорости гидролиза эфиров индоксила. Этого и следовало ожидать, поскольку лейцин, являясь гидрофобной аминокислотой, использует возможности предоставляемые ей активными центрами α -химотрипсина [6] и субтилизина [7].

Индоксилловый эфир N-ацетил-*D,L*-лейцина гидролизует также трипсином, но с невысокой скоростью ($k_{\text{кат}} 1 \text{ с}^{-1}$, $K_m 2 \cdot 10^{-3} \text{ М}$), в то время как эфиры уксусной и масляной кислот совсем не гидролизуются этим ферментом.

Таким образом, полученное соединение — эфир индоксила и N-ацетил-*D,L*-лейцина — значительно превосходит применяющиеся в гистохимическом анализе субстраты — красители по скорости гидролиза ферментами и может быть также рекомендовано для фиксации местонахождения протеолитического фермента, закрепленного в неподвижном слое.

Экспериментальная часть

Все опыты с участием свободного индоксила проводили в атмосфере аргона, дополнительно освобожденного от кислорода пропусканием через медные стружки, нагретые до 600° С. Через все растворы и растворители, добавляемые в реакционную смесь на стадии ацилирования индоксила, предварительно пропускали в течение 15 мин ток аргона, очищенного как описано выше.

Хроматографический анализ осуществляли на пластинках марки «Silufol» в системе бензол — диоксан, 4:1. Эту же систему использовали для колоночной хроматографии на силикагеле марки «Chemapol» L40/100 мкм.

Использовали индоксилловые эфиры уксусной и масляной кислот (Chemapol), *D,L*-лейцин (Союзреактив), фенилглицин отечественного производства и следующие ферменты: трипсин (КФ 4.4.21.4) производства Олайнского завода химических реактивов (Латвийская ССР), α -химотрип-

син (КФ 3.4.21.1) отечественного производства и субтилизин (КФ 3.4.21.14), предоставленный ВНИИ биотехника.

N-Ацетил-D,L-лейцин (т. пл. 187–189° С) получали обработкой D,L-лейцина уксусным ангидридом в щелочной среде [8].

Ангидрид N-ацетил-D,L-лейцина получали выдерживанием N-ацетил-D,L-лейцина с избытком уксусного ангидрида при 40° С и выделяли после отгонки последнего в виде вязкого масла.

Индоксильный эфир N-ацетил-D,L-лейцина. А. Смесь 1 г индоксилбутирата, 5 мл воды и 20 мл 1 н. NaOH нагревали до растворения осадка в токе аргона. Раствор при этом окрашивался в темно-зеленый цвет. Реакционную смесь охлаждали до 0° С, добавляли 10 мл диоксана и затем по каплям 3 г ангидрида N-ацетил-D,L-лейцина в 10 мл диоксана. Реакционную смесь оставляли на 1 ч при 20° С, затем добавляли последовательно 1 мл метанола и 1 мл уксусной кислоты в 5 мл диоксана и реакционную смесь упаривали досуха. Маслообразный остаток растворяли в 3 мл бензола и делили на колонке с силикагелем, собирая фракции с R_f 0,2. Растворитель упаривали. Получали 0,5 г (33%) розовато-сиреневого порошка. Т. пл. 140° С. Найдено, %: С 66,45; Н 6,85. $C_{16}H_{26}N_2O_3$. Вычислено, %: С 66,66; Н 6,94.

Б. Смесь 3,4 г порошкообразного КОН и 2,9 г К-соли фенилглицина нагревали 10 мин до 300° С в токе аргона. Продолжая продувку аргоном, реакционную смесь охлаждали льдом с водой и приливали 20 мл воды и затем 20 мл диоксана, перемешивали до растворения осадка. К полученному желто-зеленому раствору добавляли по каплям 10,3 г ангидрида N-ацетил-D,L-лейцина в 20 мл диоксана. Реакционную смесь оставляли на 1 ч при 20° С, затем прибавляли последовательно 2 мл метанола в 7 мл диоксана и 2 мл уксусной кислоты в 7 мл диоксана. Полученный раствор упаривали досуха и делили на силикагеле. Собирали фракцию с R_f 0,2. Получали 0,8 г (20%) розовато-сиреневого порошка с т. пл. 141° С.

Гидролиз индоксильного эфира и N-ацетил-D,L-лейцина протеиназами. Для определения кинетических параметров за реакцией гидролиза эфиров индоксила ферментами следили потенциометрическим методом с помощью рН-стата (ТТТ2-ВР 3, Radiometer, Дания) при следующих условиях: рН 8,0, 25° С, 0,2 М NaCl, 0,02 М CaCl₂, 10% ацетона (по объему). Концентрацию эфиров варьировали от 2,5 до 0,3 мМ для индоксилацетата и эфира индоксила и N-ацетил-D,L-лейцина и от 1,0 до 0,05 мМ для индоксилбутирата. В ряде случаев для получения кинетических параметров пользовались интегральным методом обчета кинетических кривых [9], что было обусловлено низкой растворимостью соединений и, следовательно, малым количеством кислоты, оттитровываемой прибором. Концентрацию фермента в ячейке рН-стата поддерживали такой, чтобы обеспечивалась достаточная скорость гидролиза: α -химотрипсин и трипсин $1 \cdot 10^{-6}$ – $6 \cdot 10^{-8}$ М, субтилизин 10^{-8} – 10^{-9} М. Над реакционным раствором продували азот, чтобы предотвратить образование кристаллов индиго.

ЛИТЕРАТУРА

1. Берстон М. Гистохимия ферментов. М.: Мир, 1965, с. 114.
2. Лилли Р. Д. Техника и практика гистохимии и гистопатологии. М.: Мир, 1969, с. 318.
3. Vorländer D., Descher B. Ber., 1901, v. 37, p. 1854.
4. Эльдерфилд Р. Гетероциклические соединения, т. 3. М.: Изд-во иностр. лит., 1954, с. 140.
5. Коган П. М. Химия красителей. М.: Госхимиздат, 1956, с. 431.
6. Березин И. В., Маргинец К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1977, с. 126–170.
7. Васенева О. В., Кост О. А., Казанская Н. Ф., Васильева Т. Е. Вестник МГУ, 1979, т. 20, с. 256–260.
8. Widmer E., Widmer R. Helv. chim. acta, 1926, v. 9, p. 301.
9. Березин И. В., Клецов А. А. Биохимия, 1972, т. 37, с. 171–181.

Поступила в редакцию
22.XII.1981
После доработки
16.II.1982

THE SYNTHESIS OF N-ACETYL-*D,L*-LEUCINE INDOXYL ESTER

BEREZIN I. V., KAZANSKAYA N. F., ANDRIANOVA I. P.,
AISINA R. B., SKIRDA L. A.

Chemistry Department, M. V. Lomonosov State University, Moscow

N-Acetyl-*D,L*-leucine indoxyl ester was prepared by treating indoxyl with N-acetyl-*D,L*-leucine anhydride. The new compound was tested as a substrate for a number of proteinases, and the rate of its enzymatic hydrolysis was shown to be significantly higher than that of indoxylbutyrate and indoxylacetate.