

УДК 547.979.733'466

А. А. ХАЧАТУРЬЯН, А. Е. ВАСИЛЬЕВ, Г. Я. РОЗЕНБЕРГ,  
член-корреспондент АН СССР Н. К. КОЧЕТКОВ

### СИНТЕЗ «С-АМИНОАЦИЛЬНЫХ» ПРОИЗВОДНЫХ ГЕМИНА-IX

Гемин-IX (I) или его восстановленная по железу форма — гем входит в состав многих белков, в частности гемоглобина и ряда ферментов. Связь между структурой и функцией этих белков представляет собой весьма интересную и важную проблему. Среди различных подходов к решению этой проблемы перспективным кажется синтетический метод, состоящий в изучении модификации геминных остатков различными реагентами, поскольку гемин-IX может быть выделен из гемоглобина, модифицировав его, а затем в некоторых случаях вновь ресинтезирован с глобином с получением модифицированного гемоглобина. По этой причине мы предприняли синтез «С-аминоацильных» производных гемина-IX (II), в которых аминокислоты присоединены амидной связью к пропионильным остаткам гемина-IX. Модификация геминной части молекулы гемоглобина может позволить полнее понять вопрос о характере связи между гемом и глобином, в особенности тех связей, которые образуются за счет взаимодействия функциональных групп гема с остатками аминокислот, входящих в состав близко расположенных участков полипептидной цепи глобина (1). Такие работы уже проводились в отношении геминных остатков, модифицированных как по винильной, так и по карбоксильным группам (2).

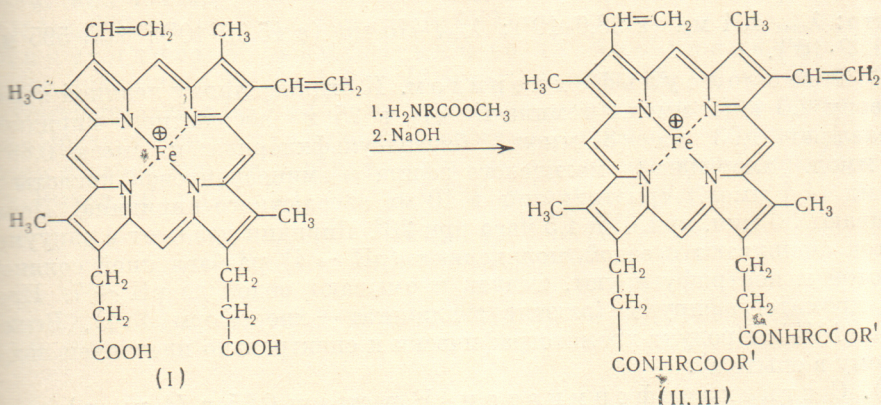
До настоящего времени были известны два способа получения С-аминоацильных производных гемина-IX. Один из них, предложенный Лаучером и Шредером (3), состоит в введении железа в соответствующий аминокислотный порфирин. Этот метод препаративно сложен и применен до сих пор только к порфиринам, не содержащим винильных групп. Непосредственная конденсация гемина-IX с эфирами аминокислот под действием дидиклетексилкарбодимида (ДЦГК) описана Лоссе и Мюллером (4). Авторы отметили, что они синтезировали бис-аминоацилгеминны с хорошими выходами, но хроматографическая характеристика полученных веществ приведена не была. При попытке воспроизвести конденсацию гемина-IX с метиловым эфиром *L*-гистидина, как это описано в (4), мы получили хроматографически неоднородный продукт реакции, в котором по данным тонкослойной хроматографии наряду с ожидаемым продуктом реакции содержались другие вещества. Препаративно разделить полученную смесь и выделить чистый продукт нам не удалось из-за сходного хроматографического поведения компонентов смеси. Аналогичные результаты были получены нами при конденсации гемина-IX карбодимидным методом с метиловыми эфирами глицина и  $\omega$ -аминоэнантиомерной кислоты. Подробное описание этих исследований будет опубликовано. Из этого следует, что для синтеза С-аминоацильных производных гемина-IX данный метод не подходит.

Чистые С-аминоацильные производные гемина-IX мы получили, используя для активации карбоксильных групп метод смешанных ангидридов. В качестве ангидридообразующих агентов мы испробовали бензолсульфохлорид, *n*-толуолсульфохлорид и этилхлорформат. Первые два реагента дали не слишком хорошие результаты. Так, при конденсации гемина-IX с метиловым эфиром  $\omega$ -аминоэнантиомерной кислоты под действием бензолсульфохлорида в пиридине выход диэфира С-аминоацильного производного составил 16%, а под действием *n*-толуолсульфохлорида — 26,9%.



Эти, а также все описанные ниже С-аминоацильные производные, были получены в хроматографически чистом виде после хроматографирования на окиси алюминия. Невысокие выходы могут быть объяснены тем, что активация карбоксильных групп сульфохлоридами, по-видимому, протекает через карбоновый ангидрид, который в случае гемина-IX либо недостаточно реакционноспособен, либо неоднороден и реагирует по нескольким направлениям.

Применение для активации карбоксильных групп гемина-IX этилхлорформиата, менее склонного к образованию простого ангидрида, оказалось бы более удачным. Выходы бис-эфиров С-аминоацильных производных гемина-IX составили 42—62% (в диметилформамиде в присутствии триэтиламина) и были получены легко очищаемые продукты реакции. Этим методом были синтезированы диметилловые эфиры гемино-IX-бис-глицина (IIa), гемино-IX-бис-*L*-фенилаланина (IIб) и гемино-IX-бис- $\omega$ -аминоэнантовой кислоты (IIв).



II. R' = CH<sub>3</sub>: а. R = CH<sub>2</sub>, б. R = CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, в. R = (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>  
 III. R' = H: б. R = CHCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, в. R = (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>

Щелочной гидролиз диэфиров С-аминоацильных производных гемина-IX (II) протекает без осложнений и соответствующие дикислоты (III) были получены с выходами 75—90%. Все дикислоты гемина-IX, в отличие от диэфиров, растворимы в воде при pH 7 и могут быть использованы для синтеза с глобином.

### Экспериментальная часть

Гемин-IX получен из эритроцитов человека по методу (5) и перекристаллизован по методу (6). Хлориды метиловых эфиров *L*-фенилаланина (т. пл. 159—161°), глицина (т. пл. 173—175°) и  $\omega$ -аминоэнантовой кислоты (т. пл. 129—130°) получены по (7) и соответствовали по свойствам описанным в литературе. Препаративную хроматографию производных гемина-IX проводили на колонке 30 × 3 см с Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> V степени активности. Тонкослойную хроматографию проводили на окиси алюминия V активности (система а хлороформ — ацетон 5 : 1, б хлороформ — этилацетат 1 : 1). Все производные гемина-IX со свободными карбоксильными группами индивидуальны тонкослойной хроматографией на незакрепленном слое кремниевой кислоты в системе пиридин — изопропанол — вода (8 : 1 : 55). Высушивание веществ проводили над хлористым кальцием, а затем над силикагелем в вакууме. Спектры в видимой области сняты на регистрирующем спектрофотометре Перкин — Элмер UV — ViS 139 фирмы «Хитачи» в смеси хлороформ — этанол 7 : 3. Температуры плавления определены на электроконтактном автоматическом приборе фирмы «Жуан».



Диметиловый эфир гемино-IX-бис- $\omega$ -аминоэнанто-  
вой кислоты (IIв). а) С тозилхлоридом. К охлажденному  
ледяной водой раствору 0,65 г (1 ммол.) гемина-IX (I) в 10 мл абсолют-  
ного пиридина прибавляют 0,76 г (4 ммол.) тозилхлорида, перемешивают  
20 мин. и при 0° прибавляют раствор метилового эфира  $\omega$ -аминоэнанто-  
вой кислоты из 0,47 г (2,4 ммол.) хлоргидрата, основание выделено с по-  
мощью  $\text{NH}_3$  в эфире при 0° в 10 мл абсолютного пиридина. Перемешивают  
1 час при 0° и 24 часа при 20° и пиридин упаривают. Остаток растворяют  
в хлороформе, промывают 2%  $\text{HCl}$ , водой, упаривают до 2—3 мл и хро-  
матографируют, вымывая продукт смесью хлороформ — этилацетат (1:1).  
Элюат упаривают и остаток перекристаллизовывают из смеси хлоро-  
форм — эфир. Выход 0,25 г (26,9%). Темно-красные кристаллы, не пла-  
вляющиеся при температуре  $< 300^\circ$ .  $R_f^a$  0,49;  $R_f^b$  0,34.

Найдено: %: N 9,07; Fe 5,82  
 $\text{C}_{50}\text{H}_{92}\text{ClFeN}_6\text{O}_6$ . Вычислено %: N 9,00; Fe 5,98

Спектр:  $\lambda_{\text{max}}$  404 м $\mu$  ( $\epsilon$  98,6  $\cdot 10^3$ );  $\lambda_{\text{max}}$  475 м $\mu$  ( $\epsilon$  15,06  $\cdot 10^3$ );  $\lambda_{\text{max}}$  595 м $\mu$   
 ( $\epsilon$  10,93  $\cdot 10^3$ ).

б) С бензолсульфохлоридом. К охлажденному ледяной водой  
раствору 1,3 г (2 ммол.) гемина-IX (I) в 25 мл абсолютного пиридина  
прибавляют 1,03 мл (8 ммол.) бензолсульфхлорида и смесь 0,86 г  
(4,4 ммол.) хлоргидрата метилового эфира  $\omega$ -аминоэнантовой кислоты и  
0,62 мл (4,4 ммол.) триэтиламина в 10 мл абсолютного пиридина. Пере-  
мешивают 30 мин. при 0° и 1,5 часа при 20°. Пиридин удаляют в вакууме,  
остаток смешивают с водой, подкисляют (рН  $\sim$  4) разбавленной соляной  
кислотой и центрифугируют. Осадок промывают водой до рН  $\sim$  7. Про-  
дукт хроматографируют (элюент этилацетат — хлороформ 1:1). Выход  
0,30 г (16%). Продукт хроматографически и спектрально идентичен полу-  
ченному в опыте а).

в). С этилхлорформиа том. К раствору 0,65 г (1 ммол.) гемина-  
IX (I) в 10 мл абсолютного диметилформамида прибавляют 0,56 мл  
(4 ммол.) триэтиламина, охлаждают ледяной водой и приливают 0,2 мл  
(2 ммол.) свежеперегнанного этилхлорформиата в 3 мл абсолютного эфи-  
ра. Реакционную массу обрабатывают смесью 0,43 г (2,2 ммол.) хлоргид-  
рата метилового эфира  $\omega$ -аминоэнантовой кислоты и 0,31 мл (2,2 ммол.)  
триэтиламина и 4 мл абсолютного диметилформамида, перемешивают  
30 мин. при 0° и 2 часа при 20°, выливают в воду, подкисляют разбавлен-  
ной соляной кислотой до рН 3—4 и центрифугируют. Осадок промывают  
водой, сушат и хроматографируют, элюируя продукт смесью хлороформ —  
этилацетат (1:1). После обычной перекристаллизации получают продукт  
идентичный по данным тонкослойной хроматографии и спектральным дан-  
ным веществу, полученному в опыте а). Выход 0,55 г (59,2%).

Гемино-IX-бис- $\omega$ -аминоэнантовая кислота (IIIв).  
К раствору 200 мг (0,21 ммол.) диметилового эфира гемино-IX-бис- $\omega$ -ами-  
ноэнантовой кислоты (IIв) в 20 мл ацетона прибавляют 1 мл 1N  $\text{NaOH}$ ,  
перемешивают 5 час. при 20°, нейтрализуют 1N  $\text{HCl}$ , растворитель удаля-  
ют и остаток растворяют в 1% растворе карбоната натрия. Раствор фильт-  
руют, фильтрат подкисляют разбавленной  $\text{HCl}$ , выпавший осадок отделя-  
ют, промывают водой до отрицательной реакции на  $\text{Cl}^-$  и сушат. Выход  
175 мг (90%). Не плавится при температуре  $< 300^\circ$ .

Найдено: %: N 9,39; Fe 6,22  
 $\text{C}_{48}\text{H}_{58}\text{ClFeN}_6\text{O}_6$ . Вычислено %: N 9,27; Fe 6,16

Спектр:  $\lambda_{\text{max}}$  404 м $\mu$  ( $\epsilon$  95,2  $\cdot 10^3$ );  $\lambda_{\text{max}}$  508 м $\mu$  ( $\epsilon$  10,65  $\cdot 10^3$ );  $\lambda_{\text{max}}$  538 м $\mu$   
 ( $\epsilon$  9,05  $\cdot 10^3$ );  $\lambda_{\text{max}}$  637 м $\mu$  ( $\epsilon$  5,66  $\cdot 10^3$ ).

Диметиловый эфир гемино-IX-бис-L-фенилала-  
нина (IIб) синтезирован аналогично IIв из 1,30 (2 ммол.) гемина-IX.



0,4 мл (4 ммол.) этилхлорформиата и 0,95 г (4,4 ммол.) хлоргидрата метилового эфира *L*-фенилаланина. После хроматографирования (вымывание хлороформом), выход 1,22 г (62,5%). Т.пл. 94–95° (из хлороформ-петролейного эфира).  $R_f^a$  0,72,  $R_f^b$  0,67.

Найдено %: N 8,79; Fe 5,72  
C<sub>54</sub>H<sub>54</sub>ClFeN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>. Вычислено %: N 8,63; Fe 5,73

Спектр:  $\lambda_{\max}$  403 мμ ( $\epsilon$  87,5·10<sup>3</sup>);  $\lambda_{\max}$  472 мμ ( $\epsilon$  13,05·10<sup>3</sup>);  $\lambda_{\max}$  594 мμ ( $\epsilon$  9,15·10<sup>3</sup>).

Гемино-IX-бис-*L*-фенилаланин (IIIб) получают аналогично IIIв из соответствующего диэфира IIб. Выход 75,8%.

Найдено %: N 9,30; Fe 5,80  
C<sub>52</sub>H<sub>50</sub>ClFeN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>. Вычислено %: N 8,88; Fe 5,90

Спектр:  $\lambda_{\max}$  404 мμ ( $\epsilon$  78·10<sup>3</sup>);  $\lambda_{\max}$  482 мμ (широкая полоса) ( $\epsilon$  10,2·10<sup>3</sup>);  $\lambda_{\max}$  600 мμ (широкая полоса) ( $\epsilon$  6,17·10<sup>3</sup>).

Диметилвый эфир гемино-IX-бис-глицина (IIа) получен аналогично IIв из 1,30 г (2 ммол.) гемина-IX, 0,4 мл (4 ммол.) этилхлорформиата и 0,55 г (4,4 ммол.) хлоргидрата метилового эфира глицина. Продукт хроматографируют в системе хлороформ — этанол (9:1), а затем в хлороформе и перекристаллизовываются их смеси хлороформ — эфир. Выход 0,67 г (42,2%). Т.пл. > 300°,  $R_f^a$  0,17;  $R_f^b$  0,08.

Найдено %: N 10,74; Fe 6,86  
C<sub>40</sub>H<sub>42</sub>ClFeN<sub>6</sub>O<sub>6</sub>. Вычислено %: N 10,58; Fe 7,03

Спектр:  $\lambda_{\max}$  404 мμ ( $\epsilon$  101,2·10<sup>3</sup>);  $\lambda_{\max}$  474 мμ ( $\epsilon$  14,75·10<sup>3</sup>);  $\lambda_{\max}$  596 мμ ( $\epsilon$  10,48·10<sup>3</sup>).

Центральный институт гематологии  
и переливания крови  
Москва

Поступило  
15 XII 1969

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> M. F. Perutz, J. Mol. Biol., 13, 646 (1965). <sup>2</sup> A. Rossi-Fanelli, E. Anselmi, A. Caputo, Adv. Protein Chem., 19, 73 (1964). <sup>3</sup> W. Lautsch, E. Schröder, Monats. Chem., 88, 432 (1957). <sup>4</sup> G. Losse, E. Müller, Hoppe-Seyler's Zs. Phys. Chem., 327, 205 (1962). <sup>5</sup> T. Asackura, Y. Yoneyama, J. Biochemistry (Tokyo), 55, 90 (1964). <sup>6</sup> H. Fischer, K. Zeile, Ann., 468, 98 (1929).  
M. Brenner, W. Huber, Helv. chim. acta, 36, 1409 (1953).