

УДК 543.544.6+547.965

ХИМИЯ

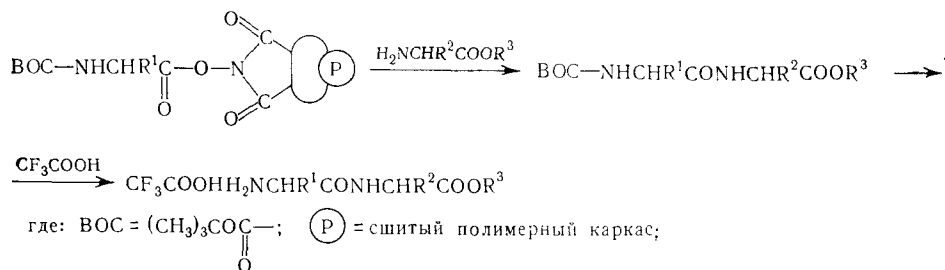
В. А. ЦЫРЯПКИН, С. М. АНДРЕЕВ, Ю. А. ДАВИДОВИЧ, Н. А. САМОЙЛОВА,
В. М. БЕЛИКОВ, С. В. РОГОЖИН

ПОЛИМЕРНЫЕ РЕАГЕНТЫ В ЭНАНТИОМЕРНОМ АНАЛИЗЕ АМИНОКИСЛОТ

(Представлено академиком А. Н. Несмеяновым 23 IV 1975)

Для энантиомерного анализа аминокислот Манинг и Мур ⁽¹⁾ предложили использовать жидкостную хроматографию диастереомерных дипептидов, получаемых в результате взаимодействия анализируемых аминокислот с N-карбоксиянгидридом выбранной L-аминокислоты.

В настоящей работе для получения диастереомерных пептидов, необходимых для проведения энантиомерного анализа аминокислот, мы предлагаем использовать метод полимерных реагентов ⁽²⁾, предусматривающий взаимодействие анализируемой аминокислоты с избытком нерастворимого полимерного активированного эфира N-защитенной L-аминокислоты. В результате аминолиза образуется соответствующий дипептид, который переходит в раствор, легко отделяемый от полимера простым фильтрованием и промывкой. Использование достаточно большого избытка полимерного активированного эфира обеспечивает количественный выход на стадии аминолиза при практическом отсутствии побочных продуктов. Возможность многократного использования полимерного реагента, легкость стандартизации всех механических операций, а также простота их выполнения являются существенными преимуществами предлагаемого метода по сравнению с ранее описанным ⁽¹⁾. Недавно мы сообщили об использовании в пептидном синтезе полимерных макросетчатых N-оксисукцинимидных эфиров N-защитенных аминокислот ^(3, 4), обладающих, наряду с высокой реакционной способностью и хорошей набухаемостью в различных органических растворителях, высоким содержанием активированных аминокислот и значительной проницаемостью для крупных органических молекул. Совершенно очевидно, что в сочетании со сферической формой гранул полимера, отличающихся хорошей механической прочностью в набухом состоянии, эти качества создают все необходимые предпосылки для эффективного применения данных полимерных реагентов в энантиомерном анализе аминокислот (для синтеза диастереомерных дипептидных производных в соответствии с приведенной ниже схемой).



R^1 и R^2 — боковые радикалы аминокислот; $\text{R}^3 = \text{H}$, алкил.

В данном сообщении описан синтез ряда диастереомерных дипептидов с N-концевым *L*-лейцином и приведены условия их разделения методом жидкостной хроматографии на сульфокатионите.

Анализируемые аминокислоты использовались в виде их этиловых эфиров, получаемых по методике (⁵). Полимерный N-оксисукцинимидный эфир трет.-бутилоксикарбонил (BOC)-*L*-лейцина был получен методом смешанных ангидридов в условиях, исключающих рецемизацию (^{6, 7}). Содержание активированной аминокислоты в полученном полимерном реагенте составляло 2,0 ммоль/г полимера. Реакцию аминоллиза проводили путем суспензирования гранул полимерного реагента (1–2 г) в растворе 2–10 мг эфира соответствующей аминокислоты в сухом тетрагидрофуране (ТГФ) с последующим выдерживанием реакционной смеси при комнатной температуре в течение нескольких часов. Затем полимер отфильтровывали, промывали ТГФ и диэтиловым эфиром, после чего сушили в вакууме до постоянного веса (высушенный полимер пригоден для повторного многократного использования). Фильтрат упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл CF₃COOH, раствор выдерживали 30 мин. при комнатной температуре и упаривали досуха. Полученный таким образом дипептид был готов для последующего хроматографического анализа. В альтернативном варианте для проведения реакции аминоллиза раствор эфира анализируемой аминокислоты пропускали через колонку, заполненную полимерным активированным эфиром BOC-*L*-лейцина. С помощью 1 г полимерного реагента можно выполнить более 10 энантиомерных анализов. В промежутке между анализами полимер может храниться непосредственно в колонке в течение нескольких месяцев. Отработанная в колонке смола регенерировалась нами по методике (⁴), причем с помощью регенерированной смолы снова многократно проводился энантиомерный анализ. Качество полимерного реагента при этом существенно не изменялось. Следует отметить, что аминоллиз указанного полимерного реагента можно проводить, используя в качестве аминокислотного компонента свободную аминокислоту. Реакция протекает в этом случае в водной, водно-органической или органической системе в присутствии соответствующего основания. Необходимой предпосылкой для успешного синтеза целевых дипептидов по этой методике является достаточно хорошая набухаемость данного полимерного реагента в указанных реакционных системах.

Применяя описанные выше методические варианты, мы исследовали процедуру превращения в дипептидные производные с N-концевым *L*-лейцином следующих аминокислот: аланина, валина, лейцина, изолейцина, серина, треонина, а также аспарагиновой и глутаминовой кислот. Смесь диастереомеров *L-L* и *L-D* получали взаимодействием полимерного N-оксисукцинимидного эфира BOC-*L*-лейцина с эфиром соответствующей рацемической аминокислоты, тогда как чистый *L-L*-диастереомер получали взаимодействием указанного полимерного реагента с эфиром *L*-аминокислоты. При этом выход дипептидов составлял для всех перечисленных аминокислот более 95% (выход определяли хроматографически по соотношению площадей пиков присутствующих в растворе исходной аминокислоты и соответствующего дипептида).

Хроматографию диастереомерных дипептидов проводили в условиях аминокислотного анализа на сульфокатионите с применением Na-цитратных буферных растворов. Данные по разделению *L-L*- и *L-D*-диастереомеров аминокислот приведены в табл. 1. В условиях анализа рацемизации *L*-аминокислот не наблюдалось. При этом чувствительность данного метода энантиомерного анализа аминокислот может быть оценена как 1 : 1000 (одного энантиомера по отношению к другому). В табл. 2 приведены результаты анализа проб аланина, содержащих различные соотношения *L*- и *D*-энантиомеров. Как видно из данных табл. 2, результаты энантиомерного анализа находятся в хорошем соответствии с истинным содержанием *L*- и *D*-изомеров в образце (с точностью до ожидаемой ошибки единичного

Результаты хроматографического разделения диастереомерных дипептидов, содержащих N-концевой L-лейцин

Дипептид *	pH элюента	Время выхода дипептидов из хроматографической колонки, мин.	Отношение ** площадей пиков диастереомеров LD/LL	Дипептид *	pH элюента	Время выхода дипептидов из хроматографической колонки, мин.	Отношение ** площадей пиков диастереомеров LD/LL
L-Leu-D-AspOEt	4,25	55	0,50	-D-AlaOEt	4,25	84	0,67
-L-AspOEt	4,25	60		-L-AlaOEt	4,25	100	
-D-ThrOEt	3,25	92	1,37	-D-ValOEt	4,25	106	0,54
-L-ThrOEt	3,25	112		-L-ValOEt	4,25	118	
-D-SerOEt	3,25	85	0,86	-D-IleOEt	5,28	35	0,45
-L-SerOEt	3,25	116		-L-IleOEt	5,28	26	
-L-GluOEt	4,25	89	0,74	-D-LeuOEt	5,28	39	0,61
-D-GluOEt	4,25	103		-L-LeuOEt	5,28	30	

* Скорость элюции 90 мл/час. Анализ дипептидов на основе треонина и серина проводили на колонке длиной 14 см; остальные дипептиды анализировали на колонке длиной 50 см.

** Полученных из рацематов аминокислот.

измерения (около 3%), соответствующей ошибке стандартного аминокислотного анализатора).

В заключение следует отметить, что диастереомерные дипептиды, полученные вышеописанным методом, можно легко трансформировать в летучие N-трифторацетильные производные, имея в виду их дальнейшее использование для энантиомерного анализа методом газовой хроматографии.

1. Полимерный N-оксисукцинимидный эфир ВОС-L-лейцина. К раствору 3,00 г (12 ммол.) ВОС-L-лейцина и 1,21 г (12 ммол.) N-метилморфолина в 20 мл диметилформамида (ДМФ), охлажденному до -15° , прибавляли при перемешивании 1,63 г (12 ммол.)

Таблица 2

Анализ аланина, содержащего различные соотношения D- и L-изомеров в смеси

№ опыта	Найдено, % *		Взято, %	
	D	L	D	L
1	20,4	80,0	21,0	79,0
2	30,0	70,0	29,6	70,4
3	40,0	60,0	39,5	60,5
4	10,0	90,0	9,6	90,4

* Данные единичных измерений.

температуре в течение 20 мин. полимер отфильтровывали, тщательно промывали ацетоном, метанолом, эфиром и сушили в вакууме при комнатной температуре. Выход: 5,15 г (84%) полимерного реагента с содержанием ВОС-L-лейцина порядка 1,96 ммоль на 1 г полимера.

2. Типичная методика получения дипептидных производных для энантиомерного анализа аминокислот. Суспензию анализируемой аминокислоты (2–10 мг) в 5 мл абсолютного этанола, насыщенного сухим хлористым водородом, нагревали при 60° в течение 30 мин., после чего реакционный раствор упаривали в вакууме досуха. К полученному таким образом хлоргидрату этилового эфира ами-

изобутилхлорформата и полученную реакционную смесь выдерживали при этой температуре в течение 5 мин. После этого к смеси прибавляли 3,0 г полимерного макросетчатого N-оксисукцинимиды, полученного по методике ⁽³⁾ и представляющего собой сферические гранулы диаметром 0,2–0,4 мм с содержанием реакционноспособных N-оксисукцинимидных групп порядка 4,0 ммоль/г. Температуру суспензии постепенно доводили до комнатной, а затем быстро повышали до 50° . После перемешивания при этой

нокислоты прибавляли полимерный N-оксисукцинимидный эфир ВОС-L-лейцина (1–2 г), суспендированный в смеси сухого ТГФ и триэтиламина (10 мл). Реакционную смесь оставляли при комнатной температуре в течение 0,5–10 час., после чего полимер отфильтровывали, промывали ТГФ, эфиром и сушили в вакууме при комнатной температуре. Фильтрат упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 1 мл CF_3COOH , раствор выдерживали 30 мин. при комнатной температуре и упаривали досуха. Остаток растворяли в 2–10 мл буферного раствора с pH 2,2 и наносили на колонку аминокислотного анализатора.

Анализ диастереомерных дипептидов проводили на аминокислотном анализаторе «Hitachi» KLA-3B (Япония) с колонками длиной 50 и 14 см (диаметром 0,9 см), наполненных сульфокатионитом «Hitachi» № 2612. В качестве элюентов использовали буферные растворы цитрата натрия: 0,2 N растворы с pH 3,25 и 4,25 и 0,35 N раствор с pH 5,28, причем скорость элюции была во всех случаях постоянной и соответствовала 90 мл/час.

Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР
Москва

Поступило
4 IV 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. M. Manning, S. Moore, J. Biol. Chem., v. 243, № 21, 5591 (1968). ² M. Fradkin, A. Patchornik, E. Katchalski, J. Am. Chem. Soc., v. 88, № 13, 3464 (1966). ³ С. В. Рогожин, Ю. А. Давидович и др., ДАН, т. 211, № 6, 1356 (1973). ⁴ С. В. Рогожин, Ю. А. Давидович и др., ДАН, т. 212, № 1, 108 (1973). ⁵ S. Makasumi, C. H. Nicholls, H. A. Saroff, J. Chromatog., v. 12, 106 (1963). ⁶ G. W. Anderson, F. M. Callahan, J. E. Zimmerman, J. Am. Chem. Soc., v. 89, 178 (1967). ⁷ D. S. Kemp, Z. Bernstein, J. Rebeck, J. Am. Chem. Soc., v. 92, 4756 (1970).