



УДК 547.466.2.027 : 546.11\*2

КАТАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ МЕЧЕННЫХ  
ДЕЙТЕРИЕМ АМИНОКИСЛОТТихонов В. Е., Ямсков И. А., Бахмутов В. И.,  
Цырякин В. А., Даванков В. А.

Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва

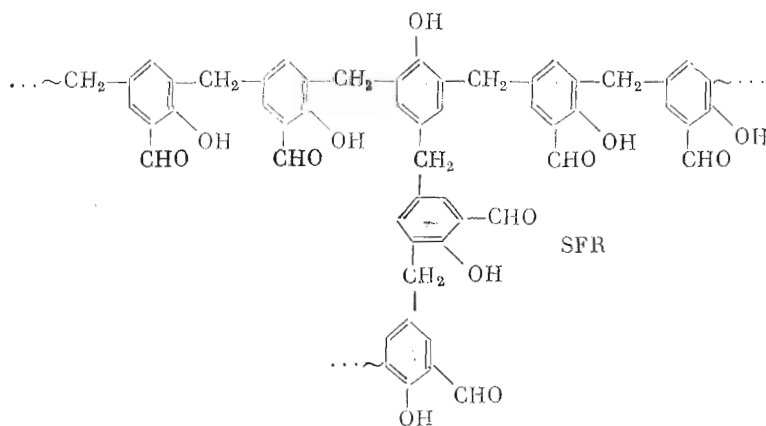
Разработан метод прямого каталитического введения дейтериевой метки в  $\alpha$ -аминокислоты (на примере Gly, Thr, Phe, Lys, Met, Trp и Tyr) и получения  $\alpha$ -DL-[ $\alpha$ - $^2\text{H}$ ]аминокислот с использованием в качестве катализатора геля, представляющего собой спитый фенолом полисалицилальформальдегидный полимер. Описаны методики синтеза катализатора, дейтерирования и выделения аминокислот.

В настоящее время возросший интерес к использованию в биохимических исследованиях аминокислот, меченных дейтерием или тритием в  $\alpha$ - и/или  $\beta$ -положение, привел к интенсивной разработке методов их синтеза [1–12], включающих в себя асимметрические химические превращения предшественников аминокислот [6, 7, 11, 12], а также сочетающих химический синтез с ферментативным расщеплением рацемических производных дейтерированных аминокислот [8, 10].

В ряду методов синтеза меченных дейтерием рацемических  $\alpha$ -аминокислот следует выделить прямое каталитическое дейтерирование оптически активных или рацемических аминокислот со свободной  $\alpha$ -аминогруппой, заключающееся в нагревании растворов аминокислот в  $^2\text{H}_2\text{O}$  с такими известными катализаторами рацемизации и  $\alpha$ - $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ -обмена, как пиридоксаль [1–4, 9] или салициловый альдегид [5], при 120–140°С в присутствии солей  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Al}^{3+}$  в течение 2–8 сут. При этом пиридоксаль и салициловый альдегид теряются безвозвратно, продукты их превращений загрязняют аминокислоты и снижают их выход. Кроме того, дейтерированные аминокислоты, обладающие низкой растворимостью, могут быть получены данным методом лишь в небольших количествах [9].

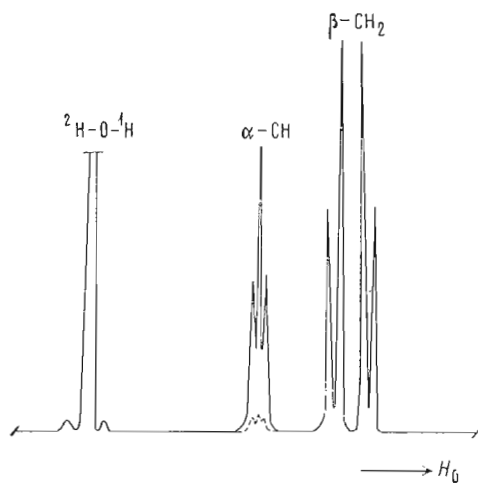
Нами разработан метод прямого дейтерирования аминокислот, имеющих свободную  $\alpha$ -аминогруппу, в  $\alpha$ -положение при использовании полимерного катализатора, который не загрязняет аминокислоты, обеспечивает высокие выходы и высокую степень дейтерирования аминокислот, в том числе и труднорастворимых, и может быть использован многократно.

В качестве такого катализатора был использован спитый фенолом салицилальформальдегидный полимер (SFR), структуру которого можно представить следующим образом:



Механизм дейтерирования аминокислот аналогичен механизму их радемиизации в присутствии альдегидсодержащих катализаторов [13–15].

Процесс дейтерирования аминокислот в присутствии катализатора SFR проводили при 70–85° С в области  $\rho^2\text{H}$  11,9–12,7 (в той области  $\rho^2\text{H}$ , где хорошо набухает полимер SFR и хорошо растворяются все аминокислоты) в атмосфере азота и с участием сокатализаторов процесса  $\text{AlF}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  или  $\text{CuSO}_4$  при мольном соотношении аминокислота – сокатализатор от 4 : 1 до



Фрагмент ПМР-спектра фенилаланина до и после (пунктир) дейтерирования. Условия дейтерирования см. в таблице, опыт 3

объясняется более сильным электростатическим взаимодействием с отрицательно заряженной полимерной матрицей SFR при высоких значениях  $\rho^2\text{H}$ , приводящим к снижению эффективной концентрации аминокислоты в фазе полимера [15]. Что касается треонина, то следует отметить его значительное (~15%) разложение в процессе дейтерирования.

Степень дейтерирования аминокислот определяли методом ПМР-спектроскопии, отбирая пробы реакционного раствора (при необходимости пробы концентрировали) без дополнительной очистки в случае применения соединений алюминия или после очистки от сульфата  $\text{Cu}^{2+}$ , как описано ниже. На рисунке приведен фрагмент ПМР-спектра дейтерированного фенилаланина (опыт 3), включающий в себя сигналы  $\beta\text{-CH}_2$ - и  $\alpha\text{-CH}$ -протонов, представляющих собой АВХ-систему. Сравнение интенсивности сиг-

30 : 1 и весовых соотношениях аминокислота – SFR от 0,5 : 1 до 2 : 1. Дейтерирование аминокислот проводили без предварительного замещения лабильных атомов водорода амино- и карбоксильных групп на атомы дейтерия, поэтому максимально возможная степень дейтерирования (без учета изотопного эффекта) составляла 96–98% в соответствии с изотопным  $^2\text{H}/^1\text{H} + ^1\text{H}$ -составом реакционной среды. Полученные результаты (таблица) показывают, что все аминокислоты подвергаются более или менее полному дейтерированию, причем лучше всего дейтерировываются нейтральные и основные аминокислоты (Phe, Lys, Trp, Tyr и Gly), в то время как кислые аминокислоты, например Glu, дейтерировываются неудовлетворительно. Вероятно, это

Условия и результаты дейтерирования аминокислот в присутствии катализатора SFR

№	Аминокислота	Количество аминокислоты		SFR, г	Сокатализатор	Количество сокатализатора		Объем $^2\text{H}_2\text{O}$ , мл	Температура, °С	Время реакции, ч	$\rho^2\text{H}$	Степень дейтерирования, %
		г	ммоль			г	ммоль					
1	Gly	1,0	13,3	1,0	$\text{CuSO}_4$	0,1	0,4	20,0	85	13	12,7	86
2	Glu	1,5	10,2	1,0	$\text{CuSO}_4$	0,1	0,4	20,0	85	8	12,5	50
3	Phe	0,5	3,0	1,0	$\text{CuSO}_4$	0,025	0,1	10,0	85	12	12,4	94
4	Phe	1,6	9,6	1,0	$\text{Al}_2\text{O}_3$	0,2	1,9	20,0	70	16	12,4	77
5	Lys-HCl	0,9	4,1	0,5	$\text{AlF}_3$	0,1	1,1	20,0	75	8	12,5	88
6	Met	1,6	10,7	1,0	$\text{CuSO}_4$	0,1	0,4	20,0	70	8	12,4	46
7	Trp	0,5	2,4	1,0	$\text{AlF}_3$	0,1	1,1	10,0	75	10	12,3	95
8	Trp	2,0	9,6	1,0	$\text{Al}_2\text{O}_3$	0,2	1,9	20,0	70	8	11,9	77
9	Trp	0,5	2,4	0,5	$\text{CuSO}_4$	0,025	0,1	10,0	85	7	12,5	92
10	Tyr	0,5	2,6	0,5	$\text{CuSO}_4$	0,025	0,1	10,0	85	8	12,6	88
11	Thr	0,5	4,2	1,0	$\text{CuSO}_4$	0,1	0,4	10,0	80	7	12,4	80

налов  $\beta$ - $\text{CH}_2$ -протонов с интегральной интенсивностью сигналов ароматических протонов указывает на отсутствие дейтерирования в  $\beta$ -положение аминокислоты. Спектры ПМР других дейтерированных аминокислот аналогичны приведенному спектру [ $\alpha$ - $^2\text{H}$ ]Phe. Степень дейтерирования глицина была определена после введения в  $\alpha$ -дейтероглицин (точнее говоря, смесь [ $\alpha$ - $^2\text{H}_2$ ]Gly, [ $\alpha$ - $^2\text{H}_1$ ]Gly и незамещенного Gly) внутреннего стандарта — метильной группы, для чего дейтероглицин трансформировали в соответствующий метиловый эфир.

Необходимо отметить значительный эффект полимера, так как дейтерирование аминокислот в отсутствие SFR не наблюдалось (в пределах ошибки измерения — 5%), а также то, что достигнутые (таблица) степени дейтерирования аминокислот не являются предельными и могут быть повышены как увеличением продолжительности нагревания реакционной среды, так и изменением изотопного  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -соотношения в системе путем предварительной лиофилизации растворов аминокислот в  $^2\text{H}_2\text{O}$ .

Получаемые данным методом рацемические  $\text{C}^\alpha$ -дейтеро-DL-аминокислоты могут быть разделены на соответствующие энантиомеры лигандообменной хроматографией на асимметрических сорбентах [16] или классическим кристаллизационным методом.

### Экспериментальная часть

В работе использовали реагенты и растворители квалификации х.ч. или ч.д.а. Изотопная чистота  $^2\text{H}_2\text{O}$  составляла 99,8%. Спектры ПМР записывали на приборе Bruker WP-200-Sy с рабочей частотой 200 МГц. Растворы  $\text{NaO}^2\text{H}$  в  $^2\text{H}_2\text{O}$  готовили растворением металлического натрия в  $^2\text{H}_2\text{O}$  в атмосфере азота.  $\text{p}^2\text{H}$  растворов определяли как  $\text{pH}+0,4$ , где  $\text{pH}$  — наблюдаемое значение  $-\lg[\text{H}^+]$  в  $^2\text{H}_2\text{O}$ , определенное с помощью  $\text{pH}$ -метра, калиброванного по водным буферным растворам [17].

*Синтез катализатора SFR.* К раствору салицилальдегидной смолы в диметилформамиде (полученной по методике, предложенной для синтеза фенолформальдегидной смолы [18]) добавляли раствор фенола (20% по весу) в диметилформамиде. Смесь нагревали при  $150^\circ\text{C}$  до образования геля, после чего гель извлекали и промывали последовательно диметилформамидом, 0,1 н. раствором  $\text{NaOH}$ , а затем 0,1 н. соляной кислотой и водой. Содержание СНО-групп составляет 7 ммоль/г, весовая набухаемость в 0,01 н. водном растворе  $\text{NaOH}$  — 4 г/г полимера, а в диметилформамиде — 5 г/г полимера.

*Дейтерирование и выделение аминокислот.* Навеску SFR (0,5–1,0 г) промывали 10 мл раствора 1 н.  $\text{NaO}^2\text{H}$  в  $^2\text{H}_2\text{O}$  (при этом наблюдалось интенсивное набухание полимера), а затем 10 мл  $^2\text{H}_2\text{O}$ . К подготовленному катализатору приливали раствор аминокислоты (0,5–2,0 г) и соли металла (0,025–0,1 г) в 10–20 мл  $^2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{p}^2\text{H}$  которого предварительно доводили до 11,9–12,7 с помощью концентрированного раствора  $\text{NaO}^2\text{H}$  в  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Реакционную смесь выдерживали при перемешивании и нагревании при  $70$ – $85^\circ\text{C}$  в течение указанного в таблице времени в атмосфере азота. После завершения дейтерирования реакционную смесь подкисляли соляной кислотой до  $\text{pH}$  1–2, полимер отделяли фильтрованием, раствор упаривали досуха, остаток растворяли в 10 мл воды и полученный раствор пропускали через колонку (250×20 мм) с дауэксом 50×4 (300–400 меш) в  $\text{H}^+$ -форме для сорбции аминокислоты и ионов металла, а затем колонку промывали водой до нейтрального значения  $\text{pH}$  элюата. После этого аминокислоту десорбировали 0,5 н. водным раствором аммиака. Элюат упаривали досуха, при этом малорастворимые аминокислоты (Phe, Tug, Tgr) интенсивно кристаллизовались еще до полного упаривания аммиачного элюата, а хорошо растворимые аминокислоты после полного упаривания раствора перекристаллизовывали из воды. Выход аминокислот составлял не менее 90% от исходного количества, за исключением треонина (выход 80–85%), вследствие значительного разложения (~15%).

Когда необходимо было повторить процесс дейтерирования с тем же образцом катализатора, после завершения цикла дейтерирования реак-

ционную смесь не подкисляли соляной кислотой, а отделяли катализатор SFR фильтрованием и к нему без предварительной подготовки приливали свежий раствор аминокислоты и соли металла. Так, при использовании  $\text{AlF}_3$  в качестве сокатализатора нами было проведено 10 циклов дейтерирования без снижения активности катализатора SFR.

Устойчивость аминокислот в процессе дейтерирования контролировали методом жидкостной хроматографии на аминокислотном анализаторе KLA-3B с колонкой (40×0,5 см), заполненной сульфокатионитом «Амипек А-5». Анализ проводили при 55°С, подвижная фаза — водные растворы цитрата натрия с рН 3,25–5,28.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Posner B. I., Flavin M. J. *Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 20, p. 6412–6419.
2. Miles W., McPhie P. J. *Biol. Chem.* 1974, v. 249, № 9, p. 2852–2857.
3. Tenenbaum S. W., Witherup T. H., Abbott E. H. *Biochim. et biophys. acta*, 1974, v. 362, № 2, p. 308–315.
4. Billington D. C., Golding B. T., Kebbell M. J., Nassereddin I. K., Lockart I. M. J. *Labelled Compounds and Radiopharm.*, 1981, v. 18, № 12, p. 1773–1784.
5. Johns R. B., Whelan D. J. *Austral. J. Chem.*, 1966, v. 19, № 11, p. 2143–2147.
6. Levine-Pinto H., Mordat J. L., Fromageot P., Meyer D., Poulin J. C., Kagan H. B. *Tetrahedron*, 1982, v. 38, № 1, p. 119–123.
7. Kovacs J., Jham G., Hui K. Y. *J. Labelled Compounds and Radiopharm.*, 1982, v. 19, № 1, p. 83–93.
8. Santamello E., Ravasi M., Astori F. J. *Labelled Compounds and Radiopharm.*, 1982, v. 19, № 4, p. 611–617.
9. LeMaster D. M., Richards F. M. J. *Labelled Compounds and Radiopharm.*, 1982, v. 19, № 5, p. 639–646.
10. Slieker L., Benkovic S. J. *J. Labelled Compounds and Radiopharm.*, 1982, v. 19, № 5, p. 647–657.
11. Townsends C. A., Neese A. S., Theis A. B. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1982, № 2, p. 116–118.
12. Gani D., Young D. W. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1982, № 15, p. 867–869.
13. Metzler D. E., Snell E. E. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1952, v. 74, № 4, p. 974–980.
14. Белокопъ Ю. П., Беликов В. М., Каргинов В. А., Никитина С. Б., Петровская В. П. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1974, № 9, с. 1976–1983.
15. Ямсков И. А., Тихонов В. Е., Даванков В. А. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 6, с. 885–891.
16. Davankov V. A. *Adv. in Chromatography*, 1980, v. 18, p. 139–195.
17. Covington A. K., Raabo M., Robinson R. A., Batey R. G. *Anal. Chem.*, 1968, v. 40, № 4, p. 700–706.
18. Серенсен У., Кемпбел Т. *Препаративные методы в химии полимеров*. М.: Мир, 1963, с. 354.

Поступила в редакцию  
20.IV.1984

#### A CATALYTIC METHOD FOR PREPARING DEUTERATED AMINO ACIDS

ТИХОНОВ В. Е., ЯМСКОВ И. А., ВАКБМУТОВ В. И., ТСЫРЬЯПКИН В. А.,  
ДАВАНКОВ В. А.

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

A method for direct catalytic incorporation of deuterium into  $\alpha$ -amino acids has been developed.  $\alpha$ -DL-[ $\alpha$ - $^2\text{H}$ ]amino acids have been prepared using phenol-crosslinked salicylaldehyde-formaldehyde polymer as a catalyst. The techniques for the catalyst synthesis, as well as for deuteration and isolation of amino acids have been described.