



УДК 547.466'546.057 : 547.461.4'546.057

СИНТЕЗ 2-НИТРОФЕНИЛОВЫХ ЭФИРОВ КАРБОНОВЫХ
КИСЛОТ И КАРБОКСИЛСОДЕРЖАЩИХ ПОЛИМЕРОВЦветков Д. Е., Андреев С. М., Фомина Л. А.,
Подгорнова Н. П.*, Якайте И. К.*, Калейс У. О.*Институт иммунологии Минздрава СССР, Москва;
* Всесоюзный научно-исследовательский институт
прикладной биохимии, Олайне, ЛатвССР

Разработаны простые способы синтеза 2-нитрофенилтрифторацетата и 2-нитрофениловых эфиров N-защищенных аминокислот, карбоновых кислот и карбоксилсодержащих полимеров. Этерификация осуществлялась в апротонных растворителях в присутствии пиридина при 0–20°С. Получены 2-нитрофениловые эфиры ряда Вос-, Z-, Fмос-аминокислот, стеариновой и дикарбоновых кислот, сополимера N-винилпириolidона с малениновым ангидридом, СН-сефарозы 4В.

Впервые 2-нитрофениловые эфиры защищенных аминокислот были предложены М. Бодански [1] в середине 50-х годов. Значительно позже была исследована их реакционная способность. Было отмечено, что в результате меньшей сольватации 2-нитрофениловые эфиры защищенных аминокислот лучше проникают в гранулы полимеров, используемых в твердофазном синтезе [2]. В последнее время интерес к этим активированным эфирам возрастает благодаря их стабильности и высокой реакционной способности в сочетании с низкой стоимостью нитрофенола [3]. К настоящему времени известны два способа синтеза: прямая этерификация *o*-нитрофенолом в пиридине в присутствии дициклогексилкарбодиимида [1–3] и использование в качестве конденсирующего агента ди-*трет*-бутилпирокрбоната [4]. Оба способа требуют значительного времени и не позволяют получать ряд 2-нитрофениловых эфиров без хроматографической очистки, что объясняется низкой нуклеофильностью 2-нитрофенола и близкой растворимостью целевых продуктов и примесей.

В 1964 г. Сакакибара предложил способ синтеза замещенных фениловых эфиров защищенных аминокислот путем переэтерификации соответствующих эфиров трифторуксусной кислоты. Это позволило получать эфиры защищенных аминокислот с выходами до 90%, причем переэтерификация длилась при комнатной температуре ~30 мин [5].

В настоящей работе по аналогичному методу нами был получен TfaONo: 2-нитрофенолом ацилировали небольшим избытком трифторуксусного ангидрида в присутствии 1 экв. пиридина в эфире или этилацетате. В отличие от условий, приведенных в [6], реакция проходит за 30 мин при 50°С, полученный TfaONo можно использовать без выделения или дополнительно очистить перегонкой. Неочищенный TfaONo можно хранить не менее полугодом при 4°С (табл. 1).

С использованием TfaONo нами был синтезирован ряд активированных 2-нитрофениловых эфиров N-защищенных аминокислот (табл. 2, 3). Трансэтерификация проходит в присутствии нескольких эквивалентов основания за 10–20 мин при 20°С с выходами целевых эфиров 60–90%; их константы соответствуют литературным [1–4]. Небольшие избытки TfaONo полностью гидролизуются при выделении соответствующих 2-нитрофениловых эфиров.

Известно, что применение трансэтерифицирующих агентов нередко сопровождается значительной рацемизацией [7]. При анализе диастереомер-

Принятые сокращения: Аср – ϵ -аминокапроновая кислота, ONo – 2-нитрофенилокси, DMF – диметилформамид, Ру – пиридин, NMM – N-метилморфолин, TfaONo – 2-нитрофенилтрифторацетат, Fмос – 9-фторэтилметоксикарбонил.

Влияние условий реакции на выход 2-нитрофенилтрифторацетата

Соотношение реагентов 2-Нитрофенол : ангидрид : пиридин	Условия реакции		Выход, %
	Температура, °C (±2° C)	Время, мин	
1 : 1,12 : 1	50	20	91
1 : 1,15 : 1	20	60	90
1 : 1,1 : 1,05	40	45	89
1 : 0,9 : 0,9	50	60	82
1 : 1,15 : 1,05	15	60	83

Таблица 2

Условия реакции и характеристики 2-нитрофениловых эфиров Вос- и Z-аминокислот

Соединение	Г-экв. основание	Температура реакции, °C	Выход, %	Т. пл., °C	$[\alpha]_D^{20}$, град
Вос-Ala-ONo	3Py	20	80	87-88	-80
	2NMM	20	78	87-88	-80
Вос ₂ -Tyr-ONo	2NMM	20	80	*	-48
Вос-Phe(NO ₂)-ONo	2NMM	20	75	*	-80
Вос-Phe-ONo	3Py	20	85	147-148	-64
Вос-Gly-ONo	»	20	68	96-98	*
Вос-Asp(OBzl)-ONo	»	20	90	93-95	-42
Вос-Tyr(Bzl)-ONo	»	20	90	138-140	-49
Вос-Gln-ONo	»	-10	60	149-151	-52
Вос-Glu(OBzl)-ONo	»	20	70	124-126	-53
Вос-Asn-ONo	»	-10	78	164-166	-55
Z-Ala-ONo	»	20	86	94	-49
Z-Phe-ONo	»	20	80	107-109	-66
Z-Asn-ONo	»	-10	82	146-148	-42

* Вещество не охарактеризовано.

Таблица 3

Характеристики 2-нитрофениловых эфиров N-Fmoc-аминокислот

Соединение	Выход, %	Т. пл., °C	$[\alpha]_D^{20}$, град	Элементный анализ *		
				C	H	N
Fmoc-Gly-ONo	82	133-134	-	66,00	4,34	6,76
				66,02	4,34	6,70
Fmoc-Ala-ONo	80	148-148,5	-61,5	66,91	4,80	6,17
				66,65	4,65	6,47
Fmoc-Ile-ONo	82	64-65	-41	68,76	5,66	5,99
				68,19	5,51	5,29

* Верхняя и нижняя строки соответствуют найденным и вычисленным значениям (%).

ного состава дипептида Вос-Ala-Ala-OH [8], полученного взаимодействием Вос-Ala-ONo и H-Ala-ONa, методом ионообменной хроматографии показано, что степень рацемизации карбоксильного компонента составляет менее 0,1%.

Нами было исследовано влияние природы и количества основания на выход ONo-эфиров. Наиболее высокие выходы получены при использовании 2-3-кратных избытков пиридина, несколько ниже выходы для 1,5-кратных избытков N-метилморфолина. К невысоким выходам приводило использование триэтиламина, возможно из-за разложения в его присутствии 2-нитрофенилтрифторацетата. При использовании эквивалентных ко-

Характеристики 2-нитрофениловых эфиров жирных и дикарбоновых кислот

Кислота	Выход, %	Т. пл., °С	Элементный анализ *		
			С	Н	N
Стеариновая	89	57	71,11	9,70	3,36
			71,07	9,69	3,45
Янтарная	76	165–166	52,85	3,69	8,03
			55,33	3,33	7,77
Глутаровая	79	65–66	54,04	3,64	7,06
			53,54	3,67	7,48
Адипиновая	79	89–90	55,67	4,07	7,30
			55,67	4,12	7,22
Пробковая	76	81–80	58,00	4,43	6,48
			57,68	4,24	6,73

* Верхняя и нижняя строки соответствуют найденным и вычисленным значениям (%).

личество оснований скорость этерификации снижается и возрастает количество побочных продуктов, определяемых с помощью ТСХ на силикагеле. В ИК-спектрах продуктов реакций присутствуют полосы 1847 см^{-1} валентных колебаний карбонильной группы симметричного ангидрида или соответствующего оксазолана. В случае карбоновых кислот и карбоксилсодержащих полимеров подобные полосы не наблюдались и выходы соответствующих 2-нитрофениловых эфиров в среднем выше. Влияние растворителя на переэтерификацию незначительно, но наиболее технологичен этилацетат.

Переэтерифицирующие реагенты позволяют получать с хорошими выходами эфиры дикарбоновых кислот без примесей циклических ангидридов [8]. Нами были получены не описанные ранее 2-нитрофениловые эфиры дикарбоновых кислот с выходами 70–80% (табл. 4).

Для активации карбоксильных групп в полимерах и носителях используют, как правило, различные карбодимиды. При этом могут затрагиваться различные функциональные группы как носителя, так и лиганда, образовываться поперечные сшивки матрицы, изменяться биологическая активность лиганда. Кроме того, образуются побочные продукты модификации матрицы карбодимидами [9]. Ранее для активации носителей был предложен переэтерифицирующий реагент — оксисукцинимидный эфир трифторуксусной кислоты, позволяющий избирательно активировать карбоксильные группы [8]. Однако при его использовании необходим тщательный контроль реакции активации, чтобы предотвратить образование ди-N-оксисукцинимидного эфира янтарной кислоты [10], трудноотделимого от активированной матрицы. Применение TaO_n для активации позволяет избежать этих осложнений.

Экспериментальная часть

В работе использовали 2-нитрофенол (Fluka, Швейцария), производные аминокислот (Reanal, ВНР; Fluka, Швейцария), СН-сефарозу 4В (Pharmacia; содержание карбоксильных групп 0,014 ммоль/мл). Модифицированный сополимер N-винилпирролидона и малеинового ангидрида получали согласно [8], растворители очищали по методикам [11]. Температуры плавления определяли на приборе Boetius (ГДР), ИК-спектры — на приборе Hitachi 260-10 (Япония), удельное вращение измеряли на фотоэлектронном поляриметре АГ-ЕПО, длина кюветы 0,25 дм. УФ-поглощение определяли с помощью спектрофотометра Ultrospec 11e (ЛКВ, Швеция). Аминокислотный анализ выполняли на анализаторе Biotronic LC-2000 (ФРГ). ТСХ проводили на пластинках (Merck, ФРГ) кизельгель-60 в системах хлороформ — метанол — уксусная кислота (9:1:0,5) и этилацетат — гексан (1:2), вещества обнаруживали хлор-толидиновым реагентом.

2-Нитрофенилтрифторацетат. К раствору 34,7 г (0,25 моль) 2-нитрофенола и 39,2 мл (0,25 моль) трифторуксусного ангидрида в 100 мл сухого

этилацетата прибавляли при интенсивном перемешивании 20,0 мл (0,25 моль) пиридина. В течение 20 мин температуру поддерживали $\sim 50^\circ\text{C}$, затем реакционную смесь разбавляли двумя объемами гексана, выпавший осадок отфильтровывали, фильтрат концентрировали и перегоняли в вакууме. Получили 64,60 г (91%), т. кип. $87^\circ\text{C}/4$ Торр и n_D^{20} 1,4630 [6] (см. также табл. 1).

2-Нитрофениловые эфиры карбоновых кислот. К раствору 5,0 ммоль N-защищенной аминокислоты или карбоновой кислоты в безводном органическом растворителе добавляли 15 ммоль пиридина и 5,5 ммоль Tf_2O при температуре от -10 до 20°C в зависимости от строения карбоксильного компонента, смесь выдерживали 1–20 ч. Образовавшийся 2-нитрофениловый эфир осаждали водой либо влажным эфиром или реакционную смесь разбавляли этилацетатом и экстрагировали 5% растворами NaHCO_3 , H_2SO_4 и водой. Органический слой высушивали, упаривали, остаток перекристаллизовывали из подходящего растворителя. Выходы приведены в табл. 2–4.

2-Нитрофениловый эфир сополимера N-винилпирролидона с малеиновым ангидридом, модифицированного ϵ -аминокапроновой кислотой (СVM-Аср-ОН). К суспензии 0,70 г СVM-Аср-ОН (содержащего 2,1 ммоль/г Н-Аср-ОН) и 3 мл DMF прибавили 0,60 г (2,2 ммоль) Tf_2O и 0,5 мл (7,0 ммоль) пиридина. Через 1 сут разбавили 10-кратным объемом изопропилового спирта, выпавший осадок отфильтровали, промыли трижды изопропиловым спиртом и эфиром. Получили 0,71 г модифицированного полимера. Содержание 2-нитрофенола, определяемое спектрофотометрически в 0,3 М растворе NH_4OH с добавлением 20% DMF (ϵ_{226} $3,7 \cdot 10^3$), составило 1,6 ммоль/г.

Активация ОН-сепфарозы 4В. 1,0 г СН-сепфарозы 4В (содержание карбоксильных групп 55 мкмоль/г) суспендировали в смеси 1 мл DMF и 75,0 мкл N-метилморфолина, прибавили 38,3 мг (135,0 мкмоль) Tf_2O . Через 1 сут после промывки DMF, водой, 0,5 М раствором NaHCO_3 получили 4 мл набухшего сорбента, содержащего ONo -группы (12,5 мкмоль/г).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bodanzsky M. // Nature. 1955. V. 175. № 4459. P. 685.
2. Bodanzsky M., Funk K. W., Fink M. L., Kondo M., Lin C. Y., Bodanzsky A. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. P. 2234–2240.
3. Bodanzsky M., Funk K. // J. Org. Chem. 1973. V. 38. № 7. P. 1296–1302.
4. Позднеев В. Ф., Подгорнова Н. Н., Якайте И. Л., Калей У. О. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 898–901.
5. Sakakibara S., Inukai N. // Bull. Chem. Soc. Japan. 1964. V. 37. № 8. P. 1231–1232.
6. Белоус В. М., Алексеева Л. А., Ягупольский Л. М. // Журн. орган. химии. 1975. Т. 11. № 8. С. 1672–1675.
7. Гершкович А. А., Серебряный С. Б. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 7. С. 869–894.
8. Андреев С. М., Сидорова М. В., Ракова О. А., Цветков Д. Е., Фомина Л. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 5. С. 696–700.
9. Briand J. P., Muller S., Van Regenmortel M. H. V. // J. Immunol. Methods. 1985. V. 78. № 1. P. 59–69.
10. Андреев С. М., Павлова Л. А., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1980. № 5. С. 1078–1081.
11. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. С. 434.

Поступила в редакцию 20.VII.1988

SYNTHESIS OF 2-NITROPHENYL ESTERS OF ORGANIC ACIDS AND CARBOXYLIC POLYMERS

TSVETKOV D. E., ANDREEV S. M., FONINA L. A.,
PODGORNOVA N. N.*, JAKAITE I. K.*, KALEYS U. O.*

*Institute of Immunology, Ministry of Public Health of the USSR, Moscow;
* All-Union Research Institute of Applied Biochemistry, Olaine, Latvian SSR*

The development of the technique for preparation of 2-nitrophenyl esters of organic acids and carboxylic polymers has been developed and used for activation of the following compounds: copolymer of vinylpyrrolidone with maleic anhydride containing ϵ -aminocaproic acid residues, CH Sepharose 4B, fatty acids, dicarboxylic acids, Boc-, Z-, Fmoc-protected amino acids. The esterification was carried out in aprotic solvents in the presence of pyridine for 60 min at 0 – 20°C .