



УДК 547.466 : 543.544

ПОЛИМЕРНЫЕ РЕАГЕНТЫ В ЭНАНТИОМЕРНОМ АНАЛИЗЕ
АМИНОКИСЛОТI. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИЛИЛИРОВАНИЯ
ДЛЯ СИНТЕЗА ДИАСТЕРЕОМЕРНЫХ ДИПЕПТИДОВ*Андреев С. М., Цырянкин В. А., Давидович Ю. А.,
Самойлова Н. А., Рогожин С. В.**Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва*

С помощью полимерных N-оксисукцинимидных эфиров *трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лейцина, *L*-аланина и *L*-глутаминовой кислоты из аминокислот в присутствии N,O-бис(триметилсилил)ацетамида синтезированы диастереомерные дипептиды, которые использовались в дальнейшем для энантиомерного анализа соответствующих аминокислот на обычном аминокислотном анализаторе. Предлагаемая методика была использована для энантиомерного анализа аспарагиновой кислоты, серина, глутаминовой кислоты, аланина, пролина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, фенилаланина, лизина и аргинина.

В предыдущей работе [1] мы сообщили об использовании полимерных реагентов в энантиомерном анализе аминокислот. Анализируемые аминокислоты превращали в этиловые эфиры, которые вводили в реакцию с избытком полимерного N-оксисукцинимидного эфира *трет*-бутилоксикарбонил-*L*-аминокислоты. После отщепления Вос-защитной группы трифторуксусной кислотой полученные эфиры дипептидов подвергали диастереомерному анализу методом жидкостной хроматографии [2].

Продолжая исследования в этой области, мы предприняли попытку отказаться от предварительной этерификации анализируемых аминокислот с целью упрощения методики подготовки образцов для анализа и создания предпосылок для улучшения разделения диастереомеров. Однако использование свободных аминокислот в качестве аминокислотных компонентов не дало удовлетворительных результатов вследствие их низкой растворимости в органических растворителях, необходимых для хорошего набухания соответствующих полимерных реагентов [3] и успешного протекания реакции аминолиза. Между тем известно, что обработка аминокислот некоторыми силилирующими реагентами позволяет быстро и с количественным выходом превращать их в соответствующие триметилсилильные производные, обладающие хорошей растворимостью в апротонных растворителях и высокой реакционной способностью в реакциях аминолиза [4, 5]. Использование в качестве силилирующих агентов N,O-бис(триметилсилил)ацетамида и его аналогов, являющихся мощными «донорами» триметилсилильных групп (при отсутствии нуклеофильных свойств у самих реагентов и продуктов их превращения в реакциях силилирования),

Результаты хроматографического разделения диастереомерных дипептидов

Дипептид	pH элюента	Время выхода дипептида из хроматографической колонки, мин *	Отношения площадей пиков диастереомеров LD/LL	Дипептид	pH элюента	Время выхода дипептида из хроматографической колонки, мин *	Отношения площадей пиков диастереомеров LD/LL
<i>L-Ala-D-Ser</i>	3,25	27	1,04	<i>L-Leu-D-Asp</i>	3,25	35	0,81
<i>-L-Ser</i>	3,25	31		<i>-L-Asp</i>	3,25	43	
<i>-D-Glu</i>	3,25	32	0,91	<i>-D-Ala</i>	4,25	28	0,60
<i>-L-Glu</i>	3,25	35		<i>-L-Ala</i>	4,25	32	
<i>-D-Ala</i>	4,25	21	0,76	<i>-D-Ile **</i>	5,28	29	0,52
<i>-L-Ala</i>	4,25	24		<i>-L-Ile</i>	5,28	20	
<i>-D-Val</i>	4,25	26	0,77	<i>-D-Leu **</i>	5,28	32	0,57
<i>-L-Val</i>	4,25	28		<i>-L-Leu</i>	5,28	23	
<i>-D-Met</i>	4,25	29	0,77	<i>L-Glu-D-Arg **</i>	5,28	21	0,98
<i>-L-Met</i>	4,25	32		<i>-L-Arg</i>	5,28	35	
<i>-D-Pro</i>	3,25	43	0,92	<i>-D-Phe***</i>	4,25	29	0,82
<i>-L-Pro</i>	3,25	57		<i>-L-Phe</i>	4,25	56	
				<i>N^{α,ε}-(Glu)₂-D-Lys</i>	4,25	30	1,0
				<i>N^{α,ε}-(Glu)₂-L-Lys</i>	4,25	54	

* Скорость элюции 90 мл/ч (55°).

** Анализ для изолейцина, лейцина и аланина проводили на колонке 50 см, остальные аминокислоты анализировали на колонке 14 см.

*** Хроматографическое разделение диастереомеров, содержащих фенилаланин, проводили при температуре 40°.

позволяет совместить в одной стадии реакцию силилирования анализируемых аминокислот с реакцией аминолиза активированного карбоксильного компонента [6].

В данном сообщении описывается синтез ряда диастереомерных дипептидов с N-концевыми аланином, валином, глутаминовой кислотой и приводятся условия их разделения методом жидкостной хроматографии.

Анализируемые аминокислоты (2—10 мг) вводили в реакцию аминолиза с полимерными N-оксисукцинимидными эфирами оптически чистых Вос-аминокислот [7] в диметилформамиде в присутствии N,O-бис(триметилсилил)ацетамида. Полученные продукты анализировали с использованием автоматического аминокислотного анализатора. Выход целевых дипептидов составляет для большинства изученных аминокислот более 95%.

Для некоторых аминокислот наблюдались аномалии. Так, в случае пролина не удалось добиться хорошей воспроизводимости выхода соответствующих дипептидов. Этот факт можно, по-видимому, объяснить тем, что из-за пониженной нуклеофильности N,O-биссилилированное производное практически не реагирует с активированными эфирами и реакционно-способной формой является в этом случае H-Pro Si Me₃. Наличие в реакционной системе доноров протонов (следы воды, N-оксигруппы и т. п.) приводит к силил-протонному обмену, который и вызывает трудноконтролируемое изменение скорости аминолиза. Взаимодействие силилированного аргинина с полимерным N-оксисукцинимидным эфиром карбоксильного компонента приводит к нескольким продуктам конденсации, что, однако, не затрудняет последующего анализа. Удаление Вос-защитной группы в триптофансодержащем дипептиде вызывает частичное разложение соединения, что затрудняет его анализ. В последнее время появились сравнительно мягкие методы отщепления Вос-защиты, позволяющие успешно решать указанную проблему [8]. Относительно низкие выходы

Таблица 2

Анализ глутаминовой кислоты, содержащей различные соотношения *D*- и *L*-изомеров, с использованием полимерного *N*-оксисукцинимидного эфира Вос-аланина

Содержание энантиомеров в смеси, %				Содержание энантиомеров в смеси, %			
найдено *		взято		найдено *		взято	
<i>D</i>	<i>L</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>D</i>	<i>L</i>
10	90	9,5	90,5	30	70	29	71
25	75	24	76	41	59	40	60

* Данные единичных измерений.

(20%) дипептидов наблюдали в случае аспарагиновой кислоты, что, по-видимому, связано с низкой скоростью ее спилирования в указанных условиях.

Хроматографию диастереомерных дипептидов проводили в условиях аминокислотного анализа на сульфокатионите с применением Na-цитратных буферных растворов. Данные по разделению *LL*- и *LD*-диастереомеров приведены в табл. 1. Чувствительность данного метода энантиомерного анализа аминокислот может быть оценена как 1 : 1000 (одного энантиомера по отношению к другому). Результаты энантиомерного анализа проб глутаминовой кислоты, содержащих различные соотношения *L*- и *D*-энантиомеров (табл. 2), находятся в хорошем соответствии с истинным содержанием *L*- и *D*-изомеров в образце.

В заключение следует отметить, что полимерные *N*-оксисукцинимидные эфиры *N*-защищенных аминокислот оказались удобными реагентами для энантиомерного анализа аминокислот и аминов [9] в тех случаях, когда нельзя получить летучие производные для ГЖХ.

Экспериментальная часть

Полимерные N-оксисукцинимидные эфиры N-трет-бутилоксикарбонилпроизводных L-лейцина, L-аланина, γ-трет-бутилового эфира L-глутаминовой кислоты получали методом смешанных ангидридов, как описано ранее [7]. Содержание аминокислот в полимере — 1,5—2,0 ммоль/г.

Получение дипептидных производных для энантиомерного анализа аминокислот. К суспензии анализируемой аминокислоты (2—10 мг) в 2 мл диметилформамида добавляли 0,2 мл *N*,*O*-бис(триметилсилил)ацетамида и полимерный *N*-оксисукцинимидный эфир Вос-*L*-лейцина (0,1 г). Реакционную смесь встряхивали и оставляли на 10—15 ч при комнатной температуре, после чего полимер отфильтровывали, промывали этанолом и эфиром, фильтрат упаривали в вакууме досуха, остаток растворяли в 1 мл трифторуксусной кислоты, раствор выдерживали 30 мин при комнатной температуре и упаривали досуха. Остаток растворяли в 2—10 мл буферного раствора с рН 2,2 и наносили на колонку аминокислотного анализатора (аналогично реакцию проводили и с полимерными *N*-оксисукцинимидными эфирами Вос-*L*-аланина и *γ*-трет-бутиловым эфиром Вос-*L*-глутаминовой кислоты).

Анализ диастереомерных дипептидов проводили на аминокислотном анализаторе «Hitachi KLA-3B» (Япония) с колонками 50×0,9 и 14×0,9 см при 55°, наполненными сульфокатионитом «Hitachi-2612». В качестве элюентов использовали буферные растворы цитрата натрия: 0,2 н. с рН 3,25 и 4,25, а также 0,35 н. с рН 5,28. Скорость элюции была во всех случаях постоянной и соответствовала 90 мл/ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цыряпкин В. А., Андреев С. М., Давидович Ю. А., Самойлова Н. А., Бсликов В. М., Рогожин С. В. (1975) Докл. АН СССР, **223**, 1156—1159.
2. Manning J. M., Moore S. (1968) J. Biol. Chem., **243**, 5591—5597.
3. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Юртапов А. И. (1973) Докл. АН СССР, **211**, 1356—1358.
4. Kricheldorf H. (1972) Liebigs Ann. Chem., **763**, 17—38.
5. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Андреев С. М., Миронова Н. В., Юртапов А. И. (1974) Изв. АН СССР, Сер. хим., 1868—1871.
6. Birkofer L., Müller F. (1968) in Peptides (Bricas, ed.), pp. 151—155, North-Holland Publishing Comp., Amsterdam.
7. Рогожин С. В., Давидович Ю. А., Самойлова Н. А., Миронова Н. В., Юртапов А. И., Андреев С. М. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 428—433.
8. Loffet A., Dremier C. (1971) Experientia, **27**, 1003—1006.
9. Белов Ю. П., Даванков В. А., Цыряпкин В. А., Рогожин С. В. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1619—1620.

Поступила в редакцию
25.XI.1975

POLYMERIC REAGENTS IN ENANTIOMERIC ANALYSIS OF AMINO ACIDS. I. THE USE OF SILYLATION FOR THE SYNTHESIS OF DIASTEREOMERIC DIPEPTIDES

ANDREEV S. M., TSIRYAPKIN V. A., DAVIDOVICH Yu. A.
SAMOILOVA N. A., ROGOZHIN S. V.

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

Polymer N-hydroxysuccinimide esters of Boc-L-Leu, Boc-L-Ala and Boc-L-Glu have been used for the synthesis of diastereomeric dipeptides in the presence of bis (trimethylsilyl) acetamide. The dipeptides obtained were used for further analysis of enantiomers by means of amino acid analyzer of a common type. The procedure was applied for the enantiomeric analysis of Asp, Ser, Glu, Ala, Pro, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Lys and Arg.
