



УДК 547.493

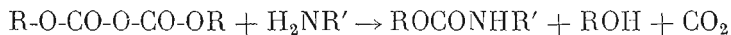
СИНТЕЗ ТРЕТ-БУТИЛОКСИКАРБОНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
НЕКОТОРЫХ ТРИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АМИНОКИСЛОТ
С ПРИМЕНЕНИЕМ ДИ-ТРЕТ-БУТИЛПИРОКАРБОНАТА

Позднев В. Ф.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва

Изучено взаимодействие ди-*трет*-бутилпирокарбоната (Coc_2O) с некоторыми трифункциональными аминокислотами с целью получения их *N-трет*-бутилоксикарбонильных производных. Реакцию проводили в водно-спиртовых растворах в присутствии карбоната калия при 25—45°. Аргинин реагирует с Coc_2O без щелочных реагентов с образованием N^α -*Вос*-аргинина.

Аминозащитные группы уретанового типа, занимающие центральное место в пептидном синтезе, вводятся с применением разнообразных производных угольной кислоты, причем чаще других используются алкилоксикарбонилхлориды, азиды и алкиларилкарбонаты [1, 2]. Менее известны диалкилпирокарбонаты [3] (диалкилдикарбонаты [4]), хотя они активнее азидов или алкиларилкарбонатов и устойчивее алкилоксикарбонилгалогенидов. Ацилирование аминов пирокарбонатами протекает в мягких условиях [5, 6], причем кроме ацилированного амина образуется только соответствующий спирт и CO_2 , что значительно упрощает выделение и очистку целевого продукта:



Ацилирование аминокислот пирокарбонатами было изучено в ряде работ [5—8], и казалось заманчивым применить эту методику для получения практически важных и сравнительно труднодоступных *N-трет*-бутилоксикарбонильных производных (*Вос*-производных) аминокислот. Однако отсутствие удобного метода синтеза ди-*трет*-бутилпирокарбоната [4, 9, 10] препятствовало использованию его в качестве *трет*-бутилоксикарбонилирующего реагента. Попытка получить *трет*-бутилоксикарбонильные производные аминокислот из смешанных алкил-*трет*-бутилпирокарбонатов [11] оказалась безуспешной. Хотя пирокарбонаты с одной *трет*-бутильной группой легко реагировали как эфирами, так и с триэтиламониевыми солями аминокислот, получить *Вос*-аминокислоты без примеси алкилоксикарбонильных производных не удалось. Однако найденные вскоре простые методы синтеза ди-*трет*-бутилпирокарбоната из *трет*-бутилуглекислого натрия и трихлорацетилхлорида [12] или хлорангидридов ароматических кислот [13, 14] сделали этот реагент доступным для широкого применения. Как и следовало ожидать, ди-*трет*-бутил-

пирокарбонат по реакционной способности мало отличался от алкил-*трет*-бутилпирокарбонатов. В водно-органических растворах натриевые соли аминокислот реагируют с Vos_2O при комнатной температуре, быстро и с высокими выходами превращаясь в N-Vos-производные [15]. Поэтому жесткие условия реакции, применявшиеся в работе Тарбелла и сотр. [10], по-видимому, нецелесообразны. Последующие работы подтвердили высокую реакционную способность Vos_2O как N-*трет*-бутилоксикарбонилирующего реагента на большом ряде аминокислот [14, 16] и гидразидов N $^\alpha$ -защищенных аминокислот и пептидов [17].

В настоящем сообщении представлены результаты дальнейшего исследования взаимодействия Vos_2O с трифункциональными аминокислотами. Известно [14], что ни в лизине, ни в гистидине с помощью Vos_2O не удается избирательно проацилировать одну из аминогрупп. У аргинина основность α -аминогруппы и гуанидинового остатка различаются значительно, причем реакционная способность гуанидиногруппы подавлена в результате внутримолекулярного протонирования. Поэтому N $^\alpha$ -ацильные производные аргинина образуются достаточно легко [1]. Однако синтез N $^\alpha$ -Vos-аргинина, который неоднократно описан с применением Vos-азида [18—20], сопряжен с рядом трудностей как на стадии ацилирования, так и при выделении его из реакционной смеси. Оказалось, что для получения N $^\alpha$ -Vos-аргинина идеальным реагентом является Vos_2O . Для исчерпывающего превращения аргинина в N $^\alpha$ -Vos-аргинин требуется небольшой ($\sim 10\%$) избыток Vos_2O , реакция идет при комнатной температуре и с высокой скоростью. Поскольку ацилирование аргинина проходит количественно, а побочные продукты солевого типа отсутствуют, выделение и очистка Vos-аргинина чрезвычайно просты, а выход превышает 90%.

С N G -нитроаргинином Vos_2O также реагирует без осложнений, хотя и медленнее, чем со свободным аргинином. При проведении реакции в водном диметилформамиде в течение 2 ч при 40° N $^\alpha$ -Vos-N G -нитроаргинин выделен с выходом 85%.

Аминодикарбоновые кислоты, аспарагиновая и глутаминовая, отличаются пониженной основностью аминогруппы и при *трет*-бутилоксикарбонилировании их Vos-азидом в условиях контролируемого pH реакцию ведут в течение 26 и 13 ч [21]. Vos_2O реагирует с аспарагиновой и глутаминовой кислотами также медленнее, чем с простыми аминокислотами. Поэтому *трет*-бутилоксикарбонилирование аминодикарбоновых кислот проводили при повышенной температуре (40—45°) в течение 4 ч. При этом кроме N $^\alpha$ -Vos-аминокислот образуются небольшие примеси с более высокой хроматографической подвижностью и, как и основной продукт, окрашивающиеся нингидрином при 120°. При обработке примеси отделяются экстракцией бензолом из подкисленного раствора. При этом Vos-аминодикарбоновые кислоты извлекаются лишь в небольшой мере, отмываются из экстракта водой и затем, как обычно, переводятся в этилацетат. Vos-аспарагиновая кислота получена в индивидуальном виде в кристаллической форме, а Vos-глутаминовая — в виде соли с дициклогексиламином.

Синтез Vos-производных β - и γ -бензиловых эфиров аспарагиновой и глутаминовой кислот с применением Vos_2O осуществлен в работе [16], причем авторы специально подчеркивают мягкие условия реакции и ее высокую скорость. Нами проведен синтез γ -этилового эфира Vos-глутаминовой кислоты, однако в наших условиях (изопропанол-карбонатный раствор, 25°) за 15—20 мин (время реакции в работе [16]) выход Vos-производного составил только 60—70%, а для получения высокого выхода (> 90%) требуется ~ 1 ч.

Трет-бутилоксикарбонилирование серина и треонина также проводили при повышенной температуре ($\sim 40^\circ$) в течение 1—1,5 ч. При этом в каждом случае кроме основного продукта образовывалось еще два вещества в виде примесей, окрашивающихся на ТСХ нингидрином при 120°. Одно из этих веществ, с наиболее высокой хроматографической подвиж-

ностью, при обработке реакционной смеси извлекалось эфиром из щелочного раствора, другое экстрагировали петролейным эфиром после подкисления. Однако ни Вос-серин, ни Вос-треонин не удалось получить в кристаллической форме, и они были превращены в дициклогексиламмонийные соли с константами, соответствующими опубликованным.

Побочные продукты, образующиеся при *трет*-бутилоксикарбонилировании серина и треонина, не были выделены, и строение их не установлено, однако их поведение при обработке реакционной смеси и хроматографическая подвижность позволяют предположить, что они появляются в результате ацилирования гидроксильной и карбоксильной групп, которое наблюдали при реакции этих аминокислот с Вос-фторидом [22]. Чтобы проверить возможность образования N-Вос-О-Вос-серина под действием Вос₂O, мы обрабатывали серин 2 экв. Вос₂O при pH ~11 и 20°. По данным ТСХ, состав реакционной смеси в этом эксперименте не отличался от обычного и количество примесей было примерно тем же, но выход Вос-серина был выше, чем при реакции в карбонатном буфере. Таким образом, получить N-Вос-О-Вос-серин из Вос₂O при повышенных pH не удастся.

Цистеин с 1 экв. Вос₂O реагирует с образованием смеси продуктов, но при действии более 2 экв. реагента гладко превращается в N-Вос-S-Вос-цистеин. Получить только N-Вос-или S-Вос-производные, изменяя pH реакционной смеси, не удалось.

N,N'-Ди-Вос-цистин образуется без осложнений и с высоким выходом с избытком Вос₂O при 40—45° в течение 1,5 ч. При подкислении щелочного раствора Вос₂-цистин частично выпадает в кристаллическом виде с примесью цистина, что несколько осложняет обработку реакционной смеси.

В заключение следует отметить, что принятые в настоящей работе условия *трет*-бутилоксикарбонилирования аминокислот с применением Вос₂O, по-видимому, не во всех случаях оптимальны. Нет сомнения, что в результате дальнейшей работы по оптимизации условий синтеза, что, вероятно, будет необходимо при промышленном получении этих широко применяемых производных аминокислот, предлагаемые методики могут быть улучшены и выходы доведены до количественных.

Экспериментальная часть

В работе использовали аминокислоты L-ряда. Восходящую тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Silufol (Чехословакия) в следующих системах растворителей: бензол — ацетон — уксусная кислота, 100 : 50 : 2 (А); хлороформ — метанол — 25% аммиак, 5 : 3 : 1 (В). Пробег фронта растворителя 6—7 см. Вос-производные аминокислот проявляли нингидрином при 120°. Вос₂O получали по методу [14], перегоняли в вакууме, т. пл. Вос₂O 21—22°. Реагент вводили в реакционную смесь в виде расплава, дозируемого пипеткой (~30°) или в кристаллической форме. Серин, γ-этиловый эфир глутаминовой кислоты и цистин — отечественного производства, остальные аминокислоты фирмы «Реанал».

N^α-Вос-аргинин. К перемешиваемой суспензии 1,75 г (10 мМ) свободного аргинина в 3 мл воды при комнатной температуре в течение 10—15 мин добавляли тремя равными порциями раствор 2,7 мл Вос₂O в 7 мл *трет*-бутанола. Реакционную смесь перемешивали 1 ч и упаривали в вакууме при 40° до прекращения отгонки растворителей. Остаток промывали декантацией смесью ацетон — эфир, эфиром, растворяли в 10 мл этанола и обрабатывали по методике А или Б.

А. К спиртовому раствору приливали 40 мл эфира. Вязкий осадок растирали, надосадочную жидкость сливали и осадок затирали в 30 мл сухого эфира, отфильтровывали и высушивали в вакуум-эксикаторе. Получали 2,6—2,7 г (95—98%) Вос-аргинина в виде белого сыпучего порошка с т. разл. 145—150°; $[\alpha]_D^{20}$ —6° (с 4, AcOH) [19], R_f 0,80 (система В). Найдено, %: С 48,50; Н 8,30; N 19,58. C₁₁H₂₂N₄O₄. Вычислено, %: 48,15; Н 8,09; N 20,04.

Б. Спиртовой раствор охлаждали до 0—5°, смешивали с охлажденным раствором 1 мл 12 н. соляной кислоты и 9 мл ацетона. Через 10 мин смесь разбавляли 30 мл эфира и оставляли на 3 ч при 0—4°. Образовавшийся осадок отфильтровывали, промывали смесью ацетон — эфир (1 : 1), эфиром и высушивали в вакууме над CaCl_2 — КОН. Получали 3,0—3,1 г (91—95%) кристаллического хлоргидрата N^α -Вос-аргинина с т. разл. 110—115° [20]. Найдено, %: С 40,56; Н 7,58; N 17,58; Cl 10,49. $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Вычислено, %: С 40,18; Н 7,04; N 17,04; Cl 10,79.

N^α -Вос-нитроаргинин. В 10 мл воды растворяли 1,5 г K_2CO_3 и 2,2 г (10 мМ) нитроаргинина, добавляли 10 мл ДМФА и 2,7 мл Voc_2O . Смесью перемешивали 2 ч при 35—40°, разбавляли водой до 70 мл и перемешивали еще 20 мин при 20°. Затем реакционную массу экстрагировали эфиром, подкисляли лимонной кислотой и трижды экстрагировали этилацетатом (30, 15, 15 мл). Экстракт промывали насыщенным раствором хлористого натрия, высушивали Na_2SO_4 (2 ч) и упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали из этилацетата, разбавляли эфиром и отфильтровывали осадок. Получили 2,7 г (85%) N^α -Вос-нитроаргинина с т. пл. 119—120°. $[\alpha]_D^{29} -6^\circ$ (с 2, ДМФА) [23].

N-Вос-аспарагиновая кислота. К раствору 0,65 г (4,9 мМ) аспарагиновой кислоты и 1,5 г K_2CO_3 в 5 мл воды добавляли 2 мл *изо*-пропилового спирта и 1,4 г Voc_2O , смесь перемешивали 4 ч при 40—45° (на ТСХ кроме основного пятна N-Вос-аспарагиновой кислоты R_f 0,35 (А) примесь с R_f 0,67 (А)). Смесью разбавляли водой до 30 мл, подкисляли лимонной кислотой и экстрагировали бензолом (2 × 10 мл). Экстракт промывали водой (5 мл), водный раствор насыщали хлористым натрием и экстрагировали этилацетатом (15; 2 × 10 мл). Экстракт высушивали Na_2SO_4 , упаривали и остаток кристаллизовали из смеси этилацетат — петролейный эфир. Осадок отфильтровывали, промывали гексаном и высушивали в вакууме над P_2O_5 и парафином. Получали 0,96 г (83,5%) Вос-аспарагиновой кислоты с т. пл. 122—123°, $[\alpha]_D^{29} -6^\circ$ (с 1, CH_3OH) [21].

Дициклогексиламмониевая соль N-Вос-глутаминовой кислоты. В условиях синтеза Вос-аспарагиновой кислоты из 0,75 (5,1 мМ) глутаминовой кислоты и 1,4 мл Voc_2O получали 1,2 г Вос-глутаминовой кислоты в виде вязкого масла, которое растворяли в эфире (20 мл), смешивали с 2 мл дициклогексилamina и получали 2,5 г (80%) хроматографически однородной бис-дициклогексиламмониевой соли Вос-глутаминовой кислоты с т. разл. 176—178°, $[\alpha]_D^{29} +9^\circ$ (с 1, CH_3OH) [24].

Дициклогексиламмониевая соль γ -этилового эфира Вос-глутаминовой кислоты. К раствору 0,90 г (5,1 мМ) γ -этилового эфира глутаминовой кислоты в 4 мл 1 М K_2CO_3 и 4 мл *изо*пропилового спирта приливали 1,4 мл Voc_2O . Смесью перемешивали 1 ч при 24—25°, разбавляли водой до 30 мл, экстрагировали эфиром (2 × 15 мл), экстракт промывали 1 М K_2CO_3 (10 мл), объединенный водный раствор подкисляли лимонной кислотой и экстрагировали этилацетатом (20; 2 × 15 мл). Экстракт высушивали Na_2SO_4 , упаривали в вакууме, остаток растворяли в эфире и смешивали с 1 мл дициклогексилamina. Через 1 ч осадок отфильтровывали, промывали эфиром и после высушивания в вакууме над H_2SO_4 получали 1,85 г (79,5%) дициклогексиламмониевой соли γ -этилового эфира Вос-глутаминовой кислоты; т. пл. 130—131°.

Из филтраты после упаривания и кристаллизации из эфира с гексаном получали дополнительно 0,30 г того же вещества с т. пл. 131—131,5°. Общий выход 92%. $[\alpha]_D^{29} +15^\circ$ (с 1, CH_3OH). Найдено, %: С 62,90; Н 9,69; N 6,28. $\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_6$. Вычислено, %: С 63,13; Н 9,71; N 6,13.

Дициклогексиламмониевая соль Вос-серина. К раствору 1 г (10 мМ) серина и 1,5 г K_2CO_3 в 10 мл воды и 10 мл *изо*пропилового спирта прибавляли 2,7 мл (12 мМ) Voc_2O и смесь перемешивали 1 ч при 40° (на ТСХ кроме пятна Вос-серина два пятна с более высокой подвижностью, окрашивающиеся нингидрином при 120°), затем разбавляли водой до 50 мл,

эфиром (15 мл) экстрагировали примесь, дающую на ТСХ пятно с R_f 0,85 (А). Водный раствор подкисляли лимонной кислотой и петролевым эфиром (2×15 мл) экстрагировали вещество с R_f 0,6 (А). Экстракт промывали 10 мл воды, объединенный водный раствор насыщали хлористым натрием и экстрагировали этилацетатом ($20; 3 \times 15$ мл). Экстракт высушивали Na_2SO_4 , упаривали в вакууме, остаток (1,8 г масла) растворяли в эфире, раствор смешивали с 1,8 мл дициклогексилламина и через 2 ч кристаллический осадок отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали в вакууме над H_2SO_4 . Получали 3,3 г (85%) дициклогексилламониевой соли Вос-серина с т. пл. 136—137°.

После перекристаллизации из смеси метанол — эфир получали 3 г (77,8%) вещества с т. пл. 142—144°; $[\alpha]_D^{29} +11^\circ$ (с 1, CH_3OH) [25].

Дициклогексилламониевая соль Вос-треонина. В условиях синтеза Вос-серина и после аналогичной обработки из 1,2 г (10 мМ) треонина и 1,4 мл Woc_2O получали 3,8 (95%) дициклогексилламониевой соли Вос-треонина с т. пл. 152—154°; $[\alpha]_D^{30} +14^\circ$ (с 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) [26].

N-Вос-S-Вос-цистеин. Раствор 3 г K_2CO_3 в смеси 10 мл воды и 5 мл *изо*-пропилового спирта нагревали на кипящей водяной бане и охлаждали ($\sim 20^\circ$) в токе азота. К перемешиваемому раствору добавляли 1,2 г (10 мМ) цистеина, после его полного растворения приливали 5,5 мл (25 мМ) Woc_2O и перемешивали 2 ч при 20° . Реакционную смесь разбавляли водой до 70 мл, экстрагировали петролевым эфиром, подкисляли лимонной кислотой и экстрагировали хлористым метиленом (3×15 мл), экстракт промывали водой и высушивали Na_2SO_4 . После отгонки растворителя остаток растирали в теплом петролевым эфире. Осадок отфильтровывали, промывали петролевым эфиром и высушивали в вакууме над силикагелем. Получали 2,3 г (72%) Woc_2 -цистеина с т. пл. 119—121°. После перекристаллизации из CCl_4 получали 1,7 г с т. пл. 120—124°; $[\alpha]_D^{20} -27^\circ$ (с 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) [27].

N,N'-ди-Вос-цистин. К раствору 3 г K_2CO_3 в 10 мл воды добавили 2,4 г (10 мМ) цистина, 10 мл *изо*пропилового спирта и 5 мл (23 мМ) Woc_2O . Смесь перемешивали 1,5 ч при $40-45^\circ$, разбавляли водой до 70 мл, экстрагировали эфиром и подкисляли лимонной кислотой. Образовавшийся белый кристаллический осадок отфильтровывали, промывали водой и после высушивания получали 0,8 г (18%) ди-Вос-цистина с примесью цистина. Водный раствор экстрагировали этилацетатом ($20 + 2 \times 10$ мл), экстракт промывали водой, раствором NaCl и высушивали над Na_2SO_4 . После упаривания растворителя в вакууме получали маслообразный остаток, который кристаллизовали из смеси эфир — петролевым эфир, и получали 3,3 г (75%) ди-Вос-цистина с т. пл. 135—138°. Оба осадка растворяли в этилацетате, раствор профильтровывали, разбавляли петролевым эфиром и получали 4 г (91%) ди-Вос-цистина с т. пл. 140—142°; $[\alpha]_D^{20} -137^\circ$ (с 1, CH_3OH) [28].

ЛИТЕРАТУРА

1. Шредер Е., Любке К. (1967) Пептиды, т. 1, «Мир», М.
2. Wunsch E. (1974) in Houben-Weyl Methoden der organischen Chemie, 4 Aufl., Bd. 15, Synthese von Peptiden, Teil I, s. 46—161 (Verlag G. Thieme), Stuttgart.
3. Шамшурин А. А. (1965) в сб. Диэтилпируогольный эфир (ПИРЭФ) — новый консервант в виноделии, с. 3—17, «Карти Молдавеняскэ», Кишинев.
4. Dean C. S., Tarbell D. S., Friederang A. W. (1970) J. Org. Chem., 35, 3393—3397.
5. Boehm T., Mentha D. (1938) Chem. Ber., 71, 1797—1802.
6. Thoma W., Rinke H. (1959) J. Liebigs Ann. Chem., 624, 30—36.
7. Rosnati I. (1964) Bull. Soc. chim. France, 1542.
8. Larrouquere Y. (1964) Bull. Soc. chim. France, 1543.
9. Hove J. H., Morris L. R. (1962) J. Org. Chem., 27, 1901—1902.
10. Tarbell J. H., Yamamoto Y., Pope B. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 730—732.
11. Позднев В. Ф. (1971) Ж. орган. химии, 7, 1656—1660.
12. Позднев В. Ф. (1971) Ж. орган. химии, 7, 1078—1079.

13. Позднев В. Ф. (1973) Авт. свид. № 405866. Откр. изобр. тов. знаки, 50, № 45, 92.
14. Позднев В. Ф. (1974) Химия природн. соедин., 764—766.
15. Позднев В. Ф. (1974) Химия природн. соедин., 384—385.
16. Moroder L., Hallett A., Wunsch E., Keller O., Wersin G. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 1651—1653.
17. Долинская С. И., Позднев В. Ф., Чаман Е. С. (1974) Химия природн. соедин., 266—267.
18. Loffet A. (1967) Experientia, 23, 406—407.
19. Berndsen G., Losse C. Pat. DDR 76678. РЖ «Химия» (1971) 10п256.
20. Yamashiro D., Blake J. (1972) J. Amer. Chem. Soc., 94, 2855—2859.
21. Schnabel E. (1967) J. Liebigs Ann. Chem., 702, 188—196.
22. Schnabel E., Stoltefuss J., Offe H., Klauke E. (1971) J. Liebigs Ann. Chem., 743, 57—68.
23. Hoffmann K., Haas W., Smithers M. J., Wells R. D., Wolman Y., Yanaihara N., Zanatti G. (1965) J. Amer. Chem. Soc., 87, 620—636.
24. Schröder E., Klieger E. (1967) J. Liebigs Ann. Chem., 673, 196—207.
25. Otsuka H., Inouye K., Shinokazi F., Kanajama M. (1966) Bull. Chem. Soc. Jap., 39, 1171—1178.
26. Wünsch E., Wendlberger G. (1964) Chem. Ber., 97, 2504—2514.
27. Muraki M., Mizogutchi T. (1971) Chem. Pharm. Bull. Jap., 19, 1708—1713.
28. Photaki J. (1966) J. Amer. Chem. Soc., 88, 2292—2299.

Поступила в редакцию
21.IV.1977

THE SYNTHESIS OF *TERT*-BUTYLOXYCARBONYL DERIVATIVES OF SOME TRIFUNCTIONAL AMINO ACIDS USING DI-*TERT*-BUTYLPYROCARBONATE

POZDNEV V. F.

*Institute of Biological and Medical Chemistry,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

The interaction of di-*tert*-butylpyrocarbonate (Boc_2O) with some trifunctional amino acids was studied with the aim of preparing respective *N-tert*-butyloxycarbonyl derivatives. The reaction was carried out in water-alcohol mixtures in the presence of potassium carbonate at 25–45°. Arginine treatment with Boc_2O , no alkaline reagents being added, was found to give rise to N^α -Boc-arginine.
