



УДК 547.964.4

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАЦЕМИЗАЦИИ
В ПРОЦЕССЕ СИНТЕЗА И ГИДРОЛИЗА ПЕПТИДОВ

*Витт С. В., Мягкова М. А., Сапоровская М. Б.,
Никитина С. Б., Великов В. М.*

*Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР, Москва*

Определение рацемизации в процессе пептидного синтеза α -бунгаротоксина проводили методом газовой хроматографии на капиллярных колонках с оптически активной стационарной фазой. Показано, что стандартный кислый гидролиз белков (α - и β -казеин и химотрипсин) приводят к значительной рацемизации некоторых аминокислот. Предложено проводить гидролиз в более мягких условиях, так как при определении соотношения энантиомеров полнота гидролиза не существенна. Перед гидролизом защищенных пептидов необходимо удалить защитные группы.

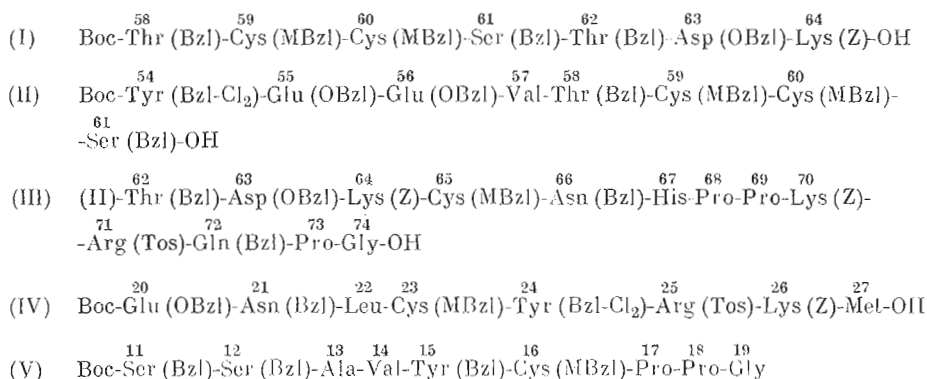
Разработанный в последние годы метод определения энантиомерной чистоты аминокислот, присутствующих в виде смеси, с помощью газовой хроматографии на диссимметрических фазах был использован для решения различных вопросов биоорганической и органической химии [1, 2]. Как было показано [3], точность и воспроизводимость определения энантиомеров смеси аминокислот зависят от относительного времени удерживания и степени разрешения [4]. При этом энантиомеры легких аминокислот определяются с точностью до 0,02 отн.%, а менее летучих — до 1 отн.% [3]. Опубликовано исследование, показывающее возможность применения этого метода для изучения рацемизации в пептидном синтезе [1].

Теоретически преимущество газохроматографического метода определения рацемизации при пептидном синтезе по сравнению с хроматографическими методами заключается в том, что определение энантиомерной (диастереомерной для белковой молекулы) чистоты аминокислот этим методом не зависит от длины пептидных цепей, не требует эталонов с доказанной структурой и обладает заведомо большей точностью и воспроизводимостью.

Энантиомерный анализ аминокислот распространяется на все белковые аминокислоты, кроме аргинина, гистидина, триптофана и цистина [5]. Вместе с тем очевидно, что использование газохроматографического энантиомерного анализа в пептидном синтезе должно охватывать весь комплекс проблем, связанных с энантиомерной чистотой всех продуктов пептидного синтеза — начальных, промежуточных и конечных, и тем самым обеспечить нахождение условий для нерацемизирующего синтеза. Реализация этих возможностей требует со своей стороны разработки методов нерацемизирующего превращения упомянутых продуктов в аминокислоты, а затем в производные, применяемые в энантиомерном газохрома-

тографическом анализе, обычно алкиловые эфиры N-трифторацетиламино-кислот. Требование нерацемизирующего превращения относится и к прямому гидролизу защищенного пептида с одновременным снятием защитных групп, а также к гидролизу с предварительным снятием защитных групп.

В настоящем сообщении приводятся результаты экспериментального исследования вопроса о степени рацемизации при стандартном гидролизе на примере природных L-пептидов — α -казеина, β -казеина и химотрипсина, а также результаты использования метода для установления диастереомерной чистоты защищенных и незащищенных пептидов на примере фрагментов (I)–(V), используемых при синтезе α -бунгаротоксина:



На основании представления о том, что в использованных природных белках отсутствуют аминокислоты D-ряда, их наличие в гидролизате можно объяснить лишь следствием рацемизации при гидролизе, так как рацемизация в процессе получения производных имеет заведомо меньшую величину [2]. Определение энантиомерного состава смеси аминокислот, полученных в результате гидролиза α - и β -казеина и химотрипсина (см. таблицу), показало, что степень рацемизации $\frac{[D]}{|D|+|L|} \cdot 100\%$ зависит от продолжительности гидролиза. Она наименьшая при проведении гидролиза при 100° в течение 6 ч. Это позволяет считать данный метод гидролиза пригодным для контроля за степенью рацемизации в условиях пептидного синтеза. Вместе с тем обращает на себя внимание то обстоятельство, что степень рацемизации связана со структурой аминокислотного фрагмента. Так, наибольшая рацемизация наблюдалась во всех случаях для аспарагиновой кислоты и пролина. Высокая степень рацемизации последних в процессе гидролиза делает необходимым дальнейшее улучшение методики нерацемизирующего гидролиза пептидов. Что же касается повышенной рацемизации метионина в случае химотрипсина, то, возможно, в этом случае мы встретились с явлением влияния окружения фрагмента на его рацемизируемость. Эта точка зрения, естественно, нуждается в специальном подтверждении, хотя уже сам факт различной рацемизируемости при гидролизе защищенных и незащищенных пептидов свидетельствует в его пользу.

Прямой кислотный гидролиз защищенного полипептида (II) привел к 19,3%-ному содержанию D-Ser-61 и 30%-ному содержанию D-Val-57*. В том случае, когда пептид (II) до гидролиза обрабатывался жидким фтористым водородом с целью снятия защитных групп, в образовавшейся после гидролиза аминокислотной смеси с помощью ГЖХ обнаружилось только 0,99% D-Val-57, а D-Ser не был обнаружен вовсе. Посколь-

* По-видимому, этот результат связан с тем, что защитные группы повышают СН-кислотность у α -углеродного атома по сравнению с незащищенными пептидами.

**Рацемизация аминокислот при гидролизе белков
6 н. HCl при 100°***

Аминокислоты**	α-Казеин			β-Казеин		Химотрипсин	
	120 ч***	6 ч	3 ч	12 ч	6 ч	12 ч	6 ч
Ala	1,0	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2
Val	0,5	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Leu	1,04	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Pro	1,49	0,5	<0,5	4,9	0,5	2,5	0,6
Asp	15,0	9,3	8,0	5,0	3,0	4,9	2,6
Met	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	7,3	<1,0

* Рацемизация дана в процентах $\frac{[D]}{[D] + [L]} \cdot 100\%$.

** Степень рацемизации других аминокислот, присутствующих в белках, за исключением неопределяемых Thr, His, Arg, Cys, меньше, чем порог их определения в смеси.

*** При 110°.

ку такая обработка показала минимальную степень рацемизации, мы в дальнейшем придерживались схемы анализа с предварительным снятием защитных групп.

Интересно было провести оценку степени рацемизации при синтезе пептидов различными методами. Пептид (I) получен двумя методами: азидным и дициклогексилкарбодимидным в присутствии 1-оксибензотриазола, используемого в качестве антирацемизирующей добавки.

По данным ГЖХ, в гидролизате пептида, полученного азидным методом, присутствует 1,08% *D*-Ser, во втором случае содержание *D*-Ser-61 составило 1,58%. Пептид (III) получен также дициклогексилкарбодимидным методом. Содержание *D*-Val-57 составило 1,44%, а *D*-Ser-61 — 1,32%. При анализе незащищенного пептида (IV) не обнаружено рацемизации Leu-22. Анализ продукта гидролиза пептида (V) показал наличие 2,02% *D*-Val-14.

Экспериментальная часть

Циклогексильный эфир *N*-ТФА-*L*-валил-*L*-валина получали из *L*-валил-*L*-валина (Reanal, Венгрия) 99% диастереомерной чистоты. Циклогексильный эфир *N*-ТФА-*L*-фенилаланил-*L*-лейцина получали описанным в литературе способом [6]. Получен продукт с т. пл. 110°, диастереомерная чистота 99,5%. Чистоту хиральных фаз проверяли ГЖХ-анализом их *N*-ТФА-метильных эфиров на наполненных колонках с 3% OV-1 на хромосорбе W/AW при температуре 240 и 200° соответственно.

Для определения энантиомеров Ala, Val, Thr, *allo*-Thr, Ser, Leu, *iso*-Leu, Pro при 110° использовалась стальная капиллярная колонка (длина 90 м, внутренний диаметр 0,5 мм) с циклогексильным эфиром *N*-ТФА-*L*-валил-*L*-валина, а для определения энантиомеров Asp, Phe, Glu при 130° — колонка (длина 45 м, внутренний диаметр 0,5 мм) с циклогексильным эфиром *N*-ТФА-*L*-фенилаланил-*L*-лейцина.

Хроматограф обладал следующими параметрами: термостат с кратковременной стабильностью 0,1%, постоянство расхода газов поддерживалось масляными вентилями Negretty; система деления пробы цельностеклянная, сброс 1 : 50—1 : 100, пламенно-ионизационный детектор фирмы Hitachi; усилитель — ИТМ Дзержинского филиала ОКБА — использовался в режиме 1×10 (ампер на полную шкалу). Величина вводимой в хроматограф пробы 1—2 мкл, содержание по каждой аминокислоте в колонке 10—100 нг. Газ-носитель — гелий. Интегратор — Varian-480 (США).

Реактивы: α- и β-казеин были выделены из цельного коровьего молока. Чистоту препарата проверяли с помощью электрофореза в полиакриламид-

ном геле. Химотрипсин — марки А (Союзреактив). Использовали аминокислоты и их производные (Reanal, Венгрия), фтористый водород (Protein Research foundation, Англия). Индивидуальность полученных соединений контролировали хроматографированием на пластинках с закрепленным слоем силикагеля типа «Merck», «Eastman Kodak» (ФРГ). Хроматограммы проявляли иодом или нингидрином, Вос-производные предварительно выдерживали в парах HCl. Для оценки чистоты пептидов, полученных фрагментной конденсацией, использовали аналитические колонки с сефадексом LH-20 и Bio-Beads в диметилформамиде или метаноле. Синтез пептида (I) осуществляли дициклогексилкарбодиимидным методом с добавлением 1-оксibenзотриазола и азидным методом исходя из фрагментов 58—61 и 62—64.

Пептиды (II), (III), (IV) синтезировали дициклогексилкарбодиимидным методом в присутствии 1-оксibenзотриазола конденсацией блоков 54—57 и 58—61 (соединение (II)). Полипептид (III) получен конденсацией защищенных пептидов 54—57, 58—61, 62—64, 65—69, 70—74. Октапептид (IV) и нонапептид (V) получены конденсацией соответственно фрагментов 20—22 и 23—27, 11—14 и 15—19. Хлористый метилен сушили над хлористым кальцием и перегоняли с дефлегматором. Изопропиловые эфиры N-ТФА аминокислот получали по методике, описанной ранее [2].

Гидролиз белков проводили 6 н. HCl при 110 и 100° в течение 20, 12 и 6 ч (см. таблицу). Прямой кислотный гидролиз защищенных пептидов, фрагментов α -бунгаротоксина проводили 6 н. HCl при 100° в течение 6 ч. Деблокирование защитных групп пептидов (I)—(V) проводили обработкой жидким фтористым водородом при 0°. Последующий кислотный гидролиз осуществляли 6 н. HCl при 100° в течение 6 ч.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bayer E., Gil-Av E., Konig W. A., Nakaparksin S., Oro J., Parr W. (1970) J. Amer. Chem. Soc., 92, 1738—1740.
2. Витт С. В., Сапоровская М. Б., Пасконова Е. А., Никитина С. Б., Садовская В. К., Беликов В. М. (1975) Прикл. биохим. и микробиол., 3, 418—422.
3. Сапоровская М. Б., Витт С. В., Никитина С. Б., Беликов В. М. (1974) Изв. АН СССР. Сер. хим., 676—681.
4. Витт С. В., Сапоровская М. Б., Аввакумов Г. В., Беликов В. М. (1976) Усп. химии, 548—574.
5. Koenig W. A., Nicholson G. J. (1975) Anal. Chem., 47, 951—958.
6. Koenig J. A., Parr W., Lichtenchein E., Bayer E., Oro J. (1970) J. Chromatogr. Sci., 8, 173—191.

Поступила в редакцию
27.IV.1977

GLC STUDY OF AMINO ACID RACEMISATION DURING PEPTIDE SYNTHESIS AND HYDROLYSIS

VITT S. V., MYAGKOVA M. A., SAPOROVSKAYA M. B.,
NIKITINA S. B., BELIKOV V. M.

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

The determination of racemisation in the course of the α -bungarotoxin synthesis has been performed using capillary columns packed with an optically active stationary phase. On the example of α - and β -caseins and chymotrypsin a conventional acid hydrolysis of proteins was demonstrated to result in a considerable racemisation of some amino acids. It was proposed to carry out the hydrolyses under milder conditions because the completeness of hydrolysis is not essential in respect to determination of enantiomeric ratios. Prior to hydrolysis, the protecting groups should be removed from blocked peptides.