

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра органической химии

П. П. Пурыгин, В. В. Вишняков, И. А. Потапова

ХИМИЯ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

*Допущено УМО по классическому университетскому образованию
в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по направлению ВПО 020101 - химия*

2-е издание, переработанное и дополненное

Самара
Издательство «Самарский университет»
2010

УДК 547.965

ББК 24.2

П88

Рецензенты: д-р хим. наук, проф. И. К. Моисеев;
д-р биол. наук, проф. И. Ф. Шаталаев

Пурьгин, П. П.

П88 Химия аминокислот и пептидов : учебное пособие / П. П. Пурьгин, В. В. Вишняков, И. А. Потапова. - 2-е изд., перераб. и доп. - Самара : Изд-во «Самарский университет», 2010. - 70 с.

ISBN 978-5-86465-469-9

В данном учебном пособии изложены теоретические основы химии аминокислот и пептидов, оно включает разделы по синтезу пептидов и по синтезу и выделению аминокислот из природных источников. Практическая часть пособия дает возможность расширить и закрепить теоретические знания с помощью лабораторных работ и решения задач.

Предназначено для студентов старших курсов университета специальности «Химия» дневной и вечерней форм обучения и может быть рекомендовано студентам специальности «Биология».

УДК 547.965

ББК 24.2

*Все учебные пособия издательства «Самарский университет»
на сайте: weblib.ssu.samara.ru*

ISBN 978-5-86465-469-9

- © Пурьгин П. П., Вишняков В. В.,
Потапова И. А., 2010
- © Самарский государственный
университет, 2010
- © Оформление. Издательство «Самар-
ский университет», 2010

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Теоретическая часть	4
Введение	4
1.1. Изомерия и номенклатура аминокислот	6
1.2. Методы получения аминокислот	13
1.3. Реакционная способность аминокислот	21
1.4. Пептиды и белки	26
1.5. Структура белков	28
1.6. Определение аминокислотной последовательности	31
1.7. Пептидный синтез	36
2. Практическая часть	46
2.1. Хроматографическое разделение аминокислот	46
2.2. Методы синтеза пептидов	47
2.3. Синтез и выделение аминокислот из природного сырья	56
3. Задачи	60
Рекомендуемый библиографический список	63
Приложение	64

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Введение

Аминокислоты относятся к гетерофункциональным органическим соединениям, содержащим в одной молекуле аминную и кислотную функции. Эти две различные функции могут проявлять себя в органических реакциях как самостоятельные, и в то же время прослеживается четкая зависимость одной функции от другой.

Аминокислоты в зависимости от взаимного расположения amino- и карбоксильной группы подразделяются на α -, β -, γ - и т.д. аминокислоты, которые служат исходными мономерами для синтеза высокополимерных органических соединений - белков. В состав молекулы белка может входить несколько сотен или даже тысячи остатков аминокислот. Число их возможных комбинаций в молекуле белка беспредельно. Белки являются основой жизни, они входят в состав клеток живых организмов и обеспечивают их жизнедеятельность. Для каждого вида живых организмов набор белков строго специфичен.

В XX веке начала интенсивно развиваться химия кислород- и азотсодержащих ациклических соединений, но по сравнению с XIX веком относительный вес ее в общем объеме органической химии снизился. Это снижение не коснулось таких важных в биохимическом отношении соединений, как аминокислоты.

Первой аминокислотой, выделенной в 1805 году Робике и Вокленом в виде амида, была аспарагиновая (аминоянтарная кислота). Примерно в то же время гидролизом белков Браконно получил еще две аминокислоты - глицин и лейцин. В 1855 году лейцин был синтезирован Лимприхтом из изовалерианового альдегида и синильной кислоты. В 1850 году Штреккером был предложен общий способ синтеза аминокислот из альдегида и аммиака действием синильной и соляной кислот и последующим омылением полученных нитрилов. Таким путем Штреккер синтезировал аланин. В 1866 году Шейблер выделил из сахарной свеклы растительное основание - бетаин. В 1869 году бетаин был синтезирован Либрейхом из хлоруксусной кислоты и триметиламина. В 1894 году Курциусом была предложена общая реакция получения аминокислот через гидразид (или азид) малонового эфира, в 1912 году появилась реакция Манниха - синтез N-замещенных амино-

кислот, в 1937 году была открыта ферментативная реакция переаминирования (Браунштейн и Крицман), и, наконец, в 1939 году Уильяме синтезировал пантотеновую кислоту (витамин В₃). С этого времени начались многочисленные работы в области синтеза и анализа аминокислот. Первый синтез полипептидов относится к 1881-84 годам, в этот период Курциус, работавший в области азидов и азосоединений, синтезировал "биуретовое основание" и "у-кислоту".

В 1901 году появились первые работы Фишера, заслуга которого в области химии пептидов очень велика. В 1902 году Фишер экспериментально доказал механизм образования полипептидов, а в 1907 году синтезировал полипептид из 18 аминокислотных остатков. В 20-х годах XX века появилась теория (Зелинский и Садиков, Абдергальден, Талмуд и Др.) о циклическом строении белков, которая оказалась ошибочной.

В конце 30-х годов XX века вернулись к пептидной теории белков. Перед химиками встала задача получения полипептидов с заранее заданным порядком аминокислот. Основная трудность заключалась в том, чтобы "выключить" из реакции концевые группы, особенно аминогруппы. В 1932 году Бергман и Зервас предложили первый метод "защиты" концевой аминогруппы - карбобензоксихлоридом. В 40-е годы были получены первые полиаминокислоты с молекулярным весом, приближающимся к молекулярному весу белков (полиглицин из 110 остатков). Синтез белков осуществить было невозможно в связи с отсутствием достоверных данных о строении белков. К 1954 году была завершена титаническая работа Сенгера по расшифровке строения инсулина (природного белка). В 1964 году удалось синтезировать инсулин. Примерно в те же годы был открыт гетерофазный метод синтеза пептидов на твердом полимерном носителе, с этого времени было налажено промышленное производство пептидов.

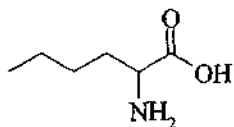
1.1. Изомерия и номенклатура аминокислот

Для аминокислот возможны следующие виды изомерии.

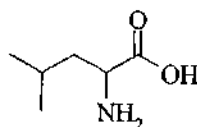
1.1.1. Структурная изомерия

а) изомерия углеродного скелета

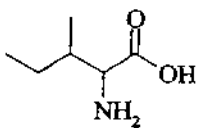
показана на примере α -аминокислот состава $C_6H_{13}NO_2$:



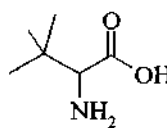
2-аминогексановая кислота



2-амино-4-метилпентановая кислота



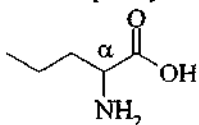
2-амино-3-метилпентановая кислота



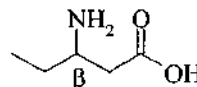
2-амино-3,3-диметилбутановая кислота

б) изомерия положения аминогруппы

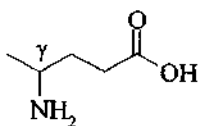
показана на примере аминовалериановых кислот:



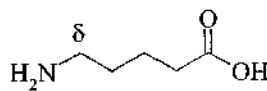
2-аминопентановая кислота
 α -аминовалериановая кислота



3-аминопентановая кислота
 β -аминовалериановая кислота



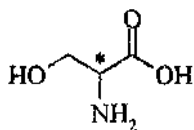
4-аминопентановая кислота
 γ -аминовалериановая кислота



5-аминопентановая кислота
 δ -аминовалериановая кислота

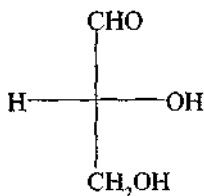
1.1.2. Стереизомерия (оптическая изомерия)

Все аминокислоты, содержащие хотя бы один асимметрический атом углерода (центр хиральности), существуют в виде энантиомеров определенной конфигурации. Впервые конфигурация оптически активных аминокислот была установлена на примере одной из природных аминокислот - (-)-серина, который входит в состав многих белков.

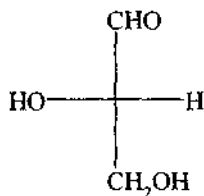


серин

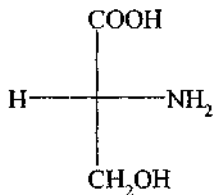
Конфигурация серина может быть изображена следующими проекционными формулами Фишера, по аналогии с конфигурацией глицеринового альдегида:



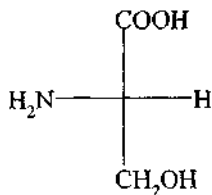
D-глицериновый альдегид



L-глицериновый альдегид

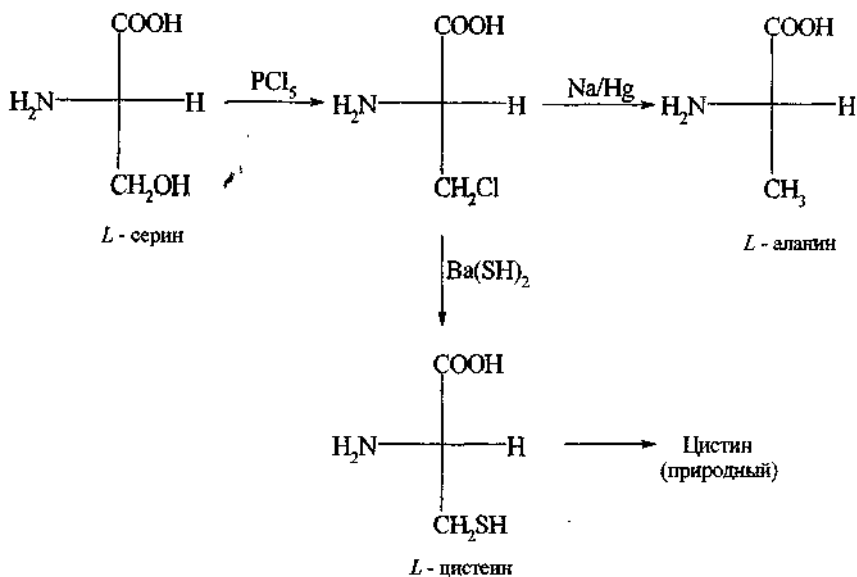


D-серин

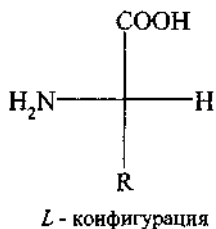


L-серин

Фишер установил связь серина с аланином, цистеина с цистином с помощью переходов, не затрагивающих асимметрического атома углерода, и таким образом определил их конфигурацию:



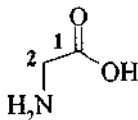
На основании общности конфигурации этих α-аминокислот, входящих в состав белков, было высказано предположение, что все природные α-аминокислоты имеют конфигурацию L-серина. В дальнейшем это было подтверждено экспериментально. В общем виде, используя проекционные формулы Фишера, все α-аминокислоты можно изобразить так:



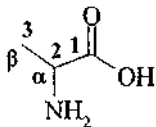
Согласно R-,S-номенклатуре, большинство “природных” α-аминокислот имеют S-конфигурацию, т.к. старшинство заместителей убывает в порядке $\text{H}_2\text{N} > \text{COOH} > \text{R}$. За исключением α-цистеина, имеющего R-конфигурацию, у которого $\text{R} = \text{HSCH}_2$, а эта группа имеет приоритет старшинства перед -COOH.

1.1.3. Номенклатура

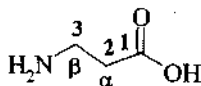
Для названий аминокислот используют три типа номенклатуры - тривиальную, рациональную и IUPAC. Двадцать важнейших α-аминокислот имеют тривиальные названия, рекомендуемые правилами IUPAC.



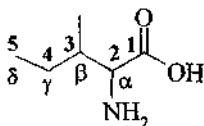
глицин (гликокол) – тривиальная;
аминоуксусная кислота – рациональная;
2-аминоэтановая кислота – IUPAC;



аланин – тривиальная;
α-аминопропионовая кислота – рациональная;
2-аминопропановая кислота – IUPAC;



β-аланин – тривиальная;
β-аминопропионовая кислота – рациональная;
3-аминопропановая кислота – IUPAC;



изолейцин – тривиальная;
α-амино-β-метилвалериановая кислота – рациональная;
2-амино-3-метилпентановая кислота – IUPAC.

Аминокислоты называют, как правило, по тривиальной номенклатуре и условно обозначают тремя буквами (или одной), например:

Глицин - Gly (G);

Аланин - Ala (A);

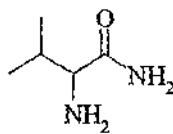
Валин - Val (V);

Лейцин - Leu (L);

Пролин - Pro (P);

Фенилаланин - Phe (F) и т.д. (см. приложение, таблица 1).

Правила ШРАС для производных аминокислот рекомендуют применение обычных суффиксов, например:



валинамид

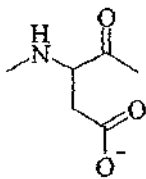
1.1.4. Классификация

По положению аминогруппы все аминокислоты подразделяют на α-аминокислоты, β-аминокислоты, γ-аминокислоты и т.д.

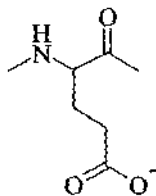
Все α-аминокислоты удобно разделить на несколько групп по химическим особенностям боковых заместителей.

/ Аминокислоты с ионными группами.

Аспарагиновая и глутаминовая кислоты могут нести отрицательный заряд на своих β- и γ-карбоксильных группах:

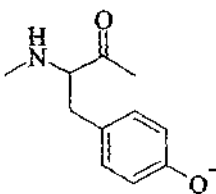


аспарагиновая кислота

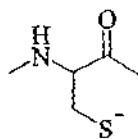


глутаминовая кислота

Тирозин и цистеин, имеют группы которые также могут нести отрицательный заряд:

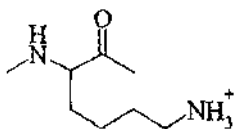


тирозин

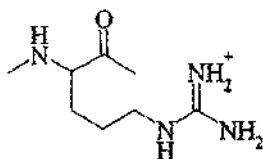


цистеин

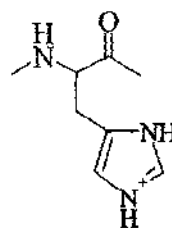
Лизин, аргинин и гистидин могут нести положительный заряд:



лизин



аргинин

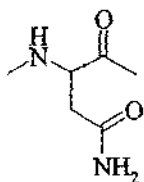


гистидин

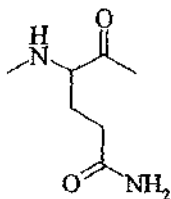
Ионные группы располагаются главным образом на поверхности глобулярных белков. Эти группы придают поверхности белка положительные или отрицательные заряды и тем самым обуславливают электростатические свойства белков в растворе.

2. Аминокислоты с полярными группами.

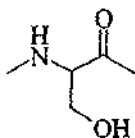
Аспарагин, глутамин, серин и треонин обладают полярными неионными группами.



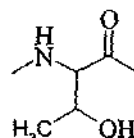
аспарагин



глутамин



серин

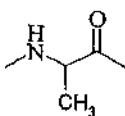


треонин

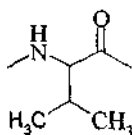
Эти аминокислоты достаточно полярны для того, чтобы их группы располагались на гидратированной поверхности белка или в случае нахождения внутри глобулы образовывали водородные связи.

3. Аминокислоты с неполярными боковыми цепями.

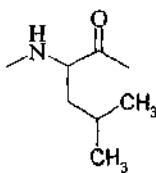
Эти аминокислоты содержат неполярные алифатические или ароматические боковые группы участвующие в гидрофобных взаимодействиях. К аминокислотам, содержащим алифатические неполярные группы, относятся: аланин, валин, лейцин, изолейцин и метионин.



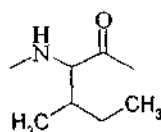
аланин



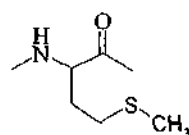
валин



лейцин

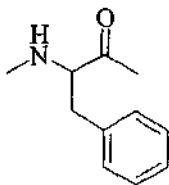


изолейцин

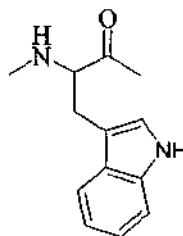


метионин

Ароматические боковые группы фенилаланина и триптофана также способны вступать в гидрофобные взаимодействия.



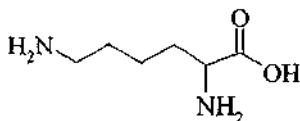
фенилаланин



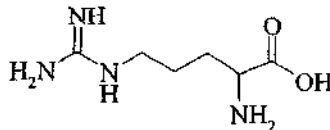
триптофан

4. Глицин отличается от других аминокислот отсутствием заместителя. Поэтому остатки глицина могут располагаться как в гидрофобном окружении, так и на поверхности белка. К тому же отсутствие заместителя у глицина делает полипептидную цепь более гибкой.

Кроме того аминокислоты, в которых число аминогрупп превышает число кислотных функций, называют основными аминокислотами:

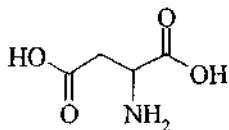


лизин

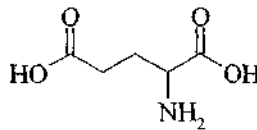


аргинин

Если в аминокислотах избыток кислотных групп, их называют кислыми аминокислотами:



аспарагиновая кислота



глутаминовая кислота

1.2. Методы получения аминокислот

1.2.1. Гидролиз белков

Белок обычно гидролизуют в 6н HCl при 100°C в течение 20 и более часов в отсутствие воздуха. Если гидролиз проводят с целью определения аминокислотного состава, как правило, ставят несколько параллельных опытов с различной продолжительностью гидролиза; при этом удается оценить скорость разрушения лабильных аминокислот, таких как серин, треонин, тирозин и триптофан, а также добиться полноты гидролиза наиболее стабильных пептидных связей, особенно образованных остатками изолейцина и валина. Глутамин и аспарагин при кислотном гидролизе превращаются в соответствующие дикарбоновые кислоты.

Возможно проведение частичного гидролиза, т.е. расщепление молекулы белка на относительно крупные фрагменты (пептиды). Существуют два общих метода осуществления частичного гидролиза полипептидов и белков:

- 1) гидролиз, катализируемый протеолитическими ферментами;
- 2) расщепление химическими реагентами.

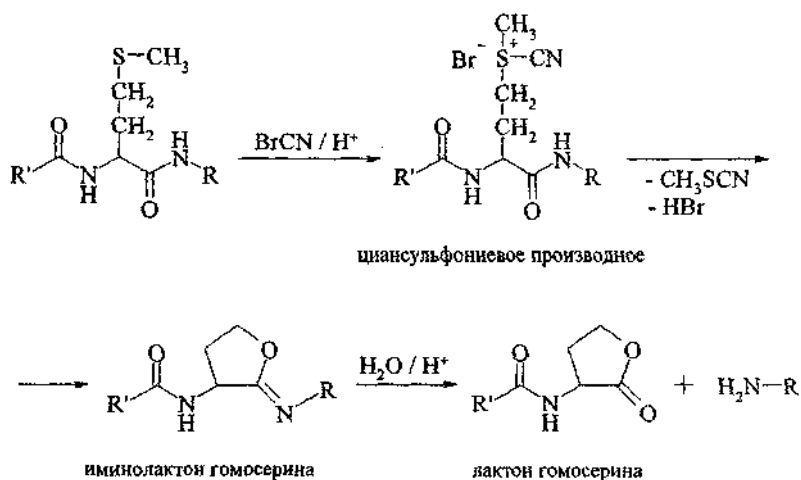
Протеолитические ферменты (протеазы, пептидгидролазы) относятся к классу гидролаз, содержатся во всех живых организмах и катализируют протеолиз (гидролиз белков и пептидов по пептидным связям).

Протеолитические ферменты катализируют ограниченное расщепление, в результате которого образуются с хорошим выходом относительно крупные фрагменты. Каждый протеолитический фермент гидролизует пептидные связи только определенного типа. Например, трипсин катализирует гидролиз пептидных связей, образованных исключительно карбоксильными группами лизина или аргинина, а химотрипсин - триптофана, фенилаланина и тирозина.

Специфический химический метод расщепления по остаткам метионина основан на использовании бромциана (BrCN) в кислой среде. Метод разработан в 1961 году Э. Гроссом и Б. Виткопом. Реакцию обычно проводят при комнатной температуре в течение 15-30 ч в сильноокислой среде (чаще всего в 70-90%-ной муравьиной кислоте) при 100-кратном избытке бромциана на каждый остаток метионина. В этих условиях связи, образованные остатками метионина, обычно расщепляются на 90-100%. Исключение составляют связи метионина с серином и треонином, расщепляющиеся лишь частично. В условиях

обработки белка бромцианом может иметь место частичный гидролиз связи Asp-Pro, неустойчивой в кислой среде.

Реакция с бромцианом проходит с образованием промежуточного циансульфониевого производного метионина, спонтанно превращающегося в кислых условиях в иминолактон гомосерина (гомосерин - α-амино-γ-оксимасляная кислота; $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$), который, в свою очередь, быстро гидролизуется с разрывом иминной связи. Получающийся на С-конце пептидов лактон гомосерина далее частично гидролизуется до гомосерина (HSer), в результате чего каждый пептидный фрагмент, за исключением С-концевого, существует в двух формах - гомосериновой и гомосеринлактоновой:

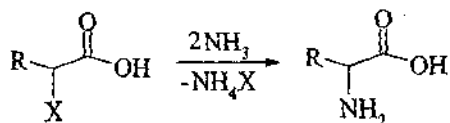


Большое число методов предложено для расщепления белка по карбоксильной группе остатка триптофана. Одним из используемых для этой цели реагентов является N-бромсукцинимид.

Как правило, при любом типе гидролиза образуется смесь аминокислот и/или пептидов, которая разделяется и идентифицируется различными методами.

1.2.2. Аммонолиз α-галогенкарбоновых кислот

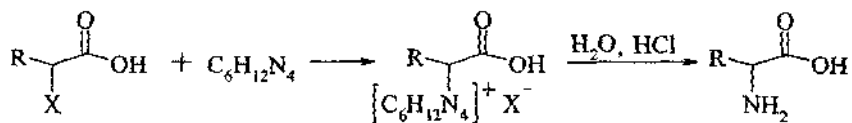
При взаимодействии α-хлор- или α-бромкарбоновых кислот с избытком водного, спиртового или жидкого аммиака в результате нуклеофильного замещения образуются соответствующие α-аминокислоты:



где X – Cl, Br.

Метод применим для синтеза не только α-аминокислот, но и аминокислот с любым отдалением аминогруппы от карбоксильной. Выходы аминокислот составляют 70-80% при 10-12-кратном избытке аммиака и добавлении карбоната аммония.

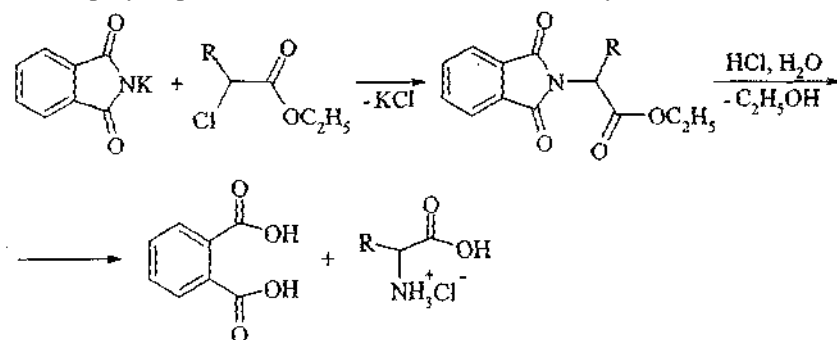
Хорошие результаты получены при замещении ос-галогенного атома на аминогруппу с помощью гексаметилентетрамина в кипящем диоксане или смеси диоксана с ксилолом:



Метод не требует больших затрат времени, экономичен и приводит к хорошим выходам соответствующей аминокислоты.

1.2.3. Синтез Габриэля

Фталимид калия, образующийся при действии спиртового раствора гидроксида калия на фталимид, при повышенных температурах реагирует с эфирами галогенкарбоновых кислот, образуя эфир фталиламинокислоты. Гидролизом продукта реакции 20%-ной соляной кислотой получают аминокислоты:

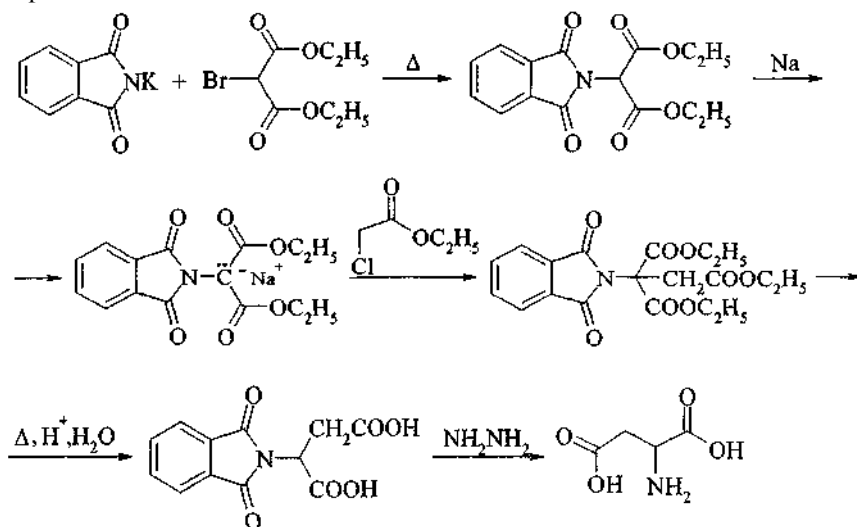


Поскольку фталимидный метод применим для введения аминогруппы не

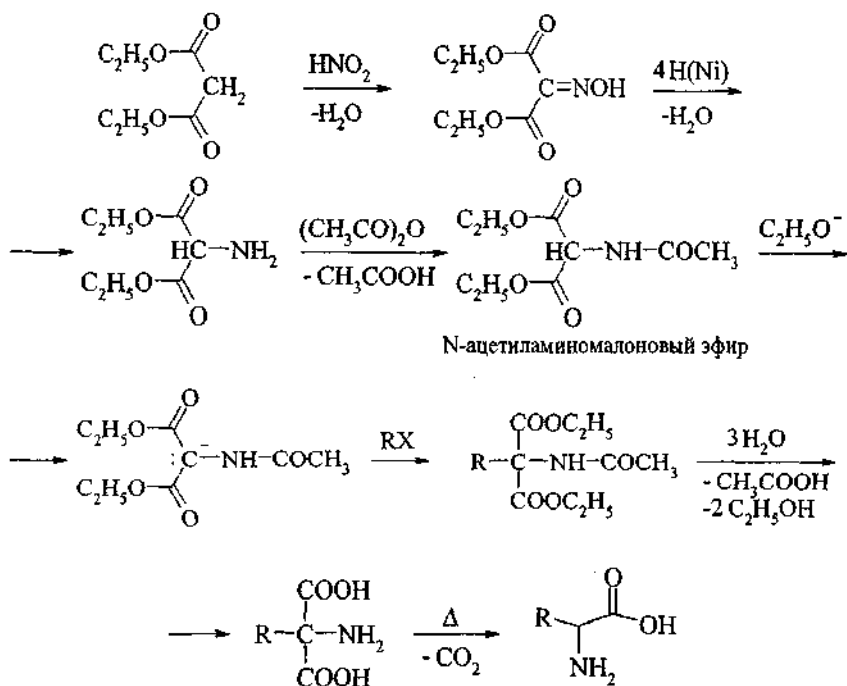
только в α -, но и в ω -положение, он широко используется для получения различных α,ω -диаминокислот.

1.2.4. Фталимидомалоновый

Этот метод был предложен Сёренсеном в 1903 году. Ключевым соединением в данном синтезе является N-фталимидомалонат, который легко получается бромированием малонового эфира, приводящим к образованию броммалонового эфира, и последующей конденсацией по Габриэлю с фталимидом калия. Эфир N-фталимидомалоновой кислоты действием металлического натрия превращают в натриевую соль. Конденсация полученной соли с этиловым эфиром хлоруксусной кислоты или с любым другим алкилгалогенидом приводит к образованию моноалкилированного фталимидомалонового эфира. Расщепление полученного эфира до соответствующей аминокислоты проводят продолжительным гидролизом минеральной кислотой.



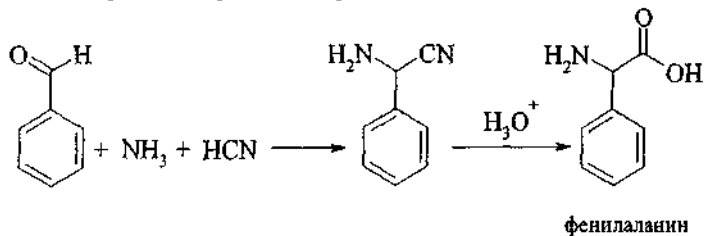
Этиловый эфир фталимидомалоновой кислоты был со временем, при попытках усовершенствовать метод, в значительной мере заменен рядом аналогичных реагентов, таких как N-бензоильное, N-ацетильное и N-формильное производные аминмалонового эфира.



Нитрозированием малонового эфира и последующим восстановлением получают аминомалоновый эфир, который затем ацилируют. Полученный N-ацетилмалоновый эфир превращают в аминокислоту, так же как в методе, предложенном Сёренсеном.

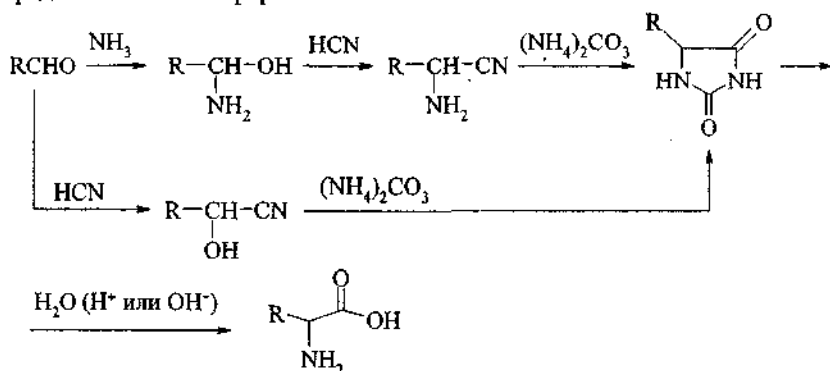
1.2.5. Синтез Штреккера

По этому методу из аммиака, альдегидов и синильной кислоты получают α -аминонитрилы, гидролиз которых дает α -аминокислоты.



Основными недостатками метода являются относительно низкие выходы α -аминокислот и применение токсичного цианистого водорода.

На основе открытой Штреккером реакции было разработано несколько препаративных методов синтеза, дающих возможность превратить альдегид в соответствующую α -аминокислоту, содержащую на один атом углерода больше, чем в исходном соединении. Более экономичным в отношении затрат времени, труда и реактивов стал вариант метода Штреккера, предложенный Бюхерером:

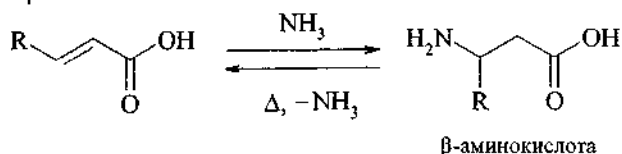


Бюхерер с сотрудниками показал, что 5-замещенные гидантоины легко образуются с хорошим выходом при нагревании α -аминитрилов или циангидринов с карбонатом аммония. Поскольку гидантоиновый цикл, как правило, устойчив к действию кислот, для превращения 5-алкилгидантоина в α -аминокислоту предпочитают применять щелочной гидролиз.

Этот вариант метода Штреккера стал одним из главных синтетических способов, используемых до настоящего времени в промышленности для производства α -аминокислот.

1.2.6. Синтез из α -, β -ненасыщенных карбоновых кислот

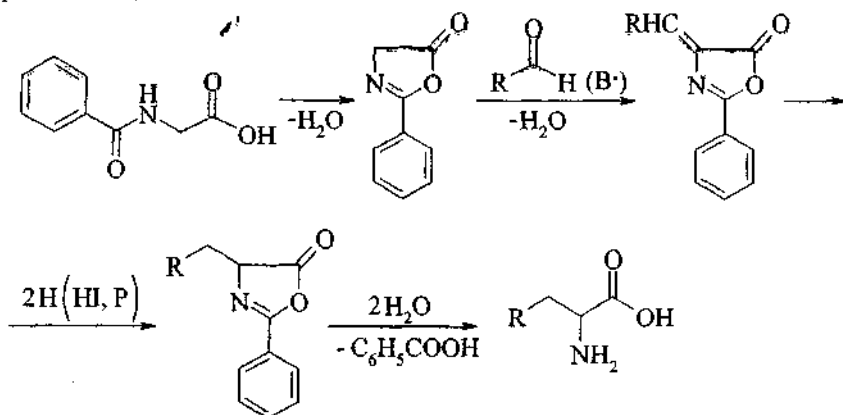
Присоединением аммиака к α -, β -ненасыщенным карбоновым кислотам получают β -аминокислоты.



При нагревании β -аминокислоты снова распадаются на исходные α -, β -ненасыщенные карбоновые кислоты и аммиак.

1.2.9. Синтез Эрленмейера

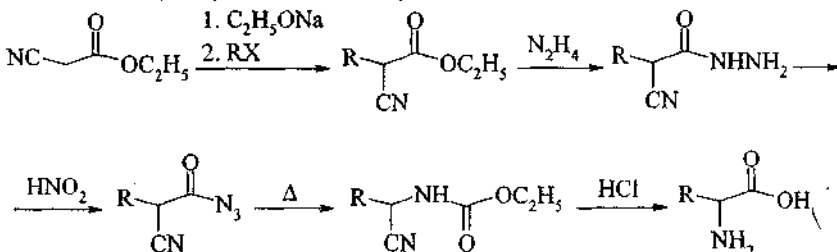
В конденсацию с альдегидами может быть введена гиппуровая кислота (бензоилглицин) или ее азлактон. Восстановление и гидролиз продуктов реакции ведет к α -аминокислотам:



Метод используется главным образом для синтеза ароматических аминокислот, таких как фенилаланин, тирозин, триптофан.

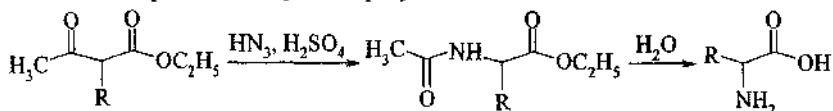
1.2.10. Аминирование методом молекулярной перегруппировки

Согласно этому методу, цианкусовый эфир алкилируется, затем под действием гидразина в этаноле превращается в соответствующий гидразид. Взаимодействием гидразида с азотистой кислотой получают азид, который при нагревании перегруппировывается, по Курциусу, в соответствующий уретан. При последующем кислотном гидролизе уретана получают соответствующую аминокислоту:

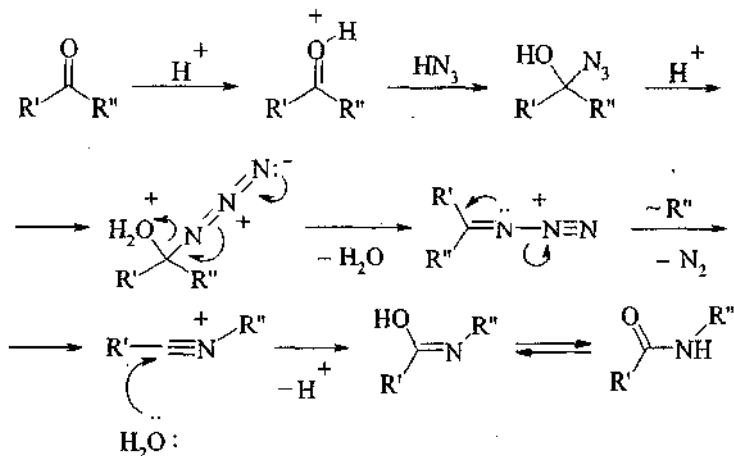


В качестве другого метода синтеза аминокислот может быть использована перегруппировка Шмидта для превращения алкилированного аце-

тоуксусного эфира в этиловый эфир соответствующей ацетиламино кислоты, после гидролиза которого образуется аминокислота:



Механизм реакции Шмидта можно представить следующим образом:



Реакция Шмидта может быть применена также и для синтеза диаминокислот из моноаминодикарбоновых кислот.

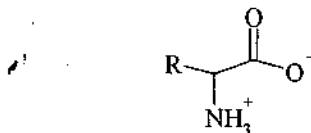
1.3. Реакционная способность аминокислот

Аминокислоты как бифункциональные органические соединения вступают во все химические реакции карбоновых кислот и аминов, кроме этого, они обладают и специфическими свойствами, обусловленными взаимным влиянием функций в одной молекуле.

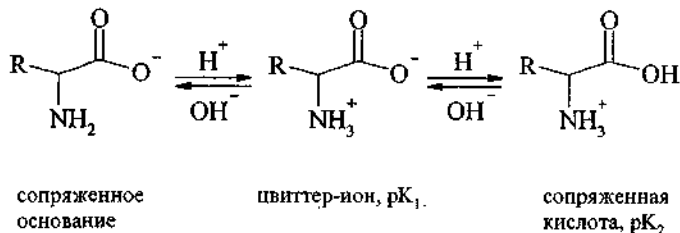
1.3.1. Кислотно-основные свойства аминокислот

Структура аминокислот, содержащая основную и кислотную функции, тем не менее, обладает особыми, специфическими свойствами, которые не характерны для оснований и кислот как таковых. Аминокислоты - нелетучие кристаллические вещества с высокими температурами плавления, хорошо растворимы в воде, нерастворимы в неполярных растворителях, константы кислотности и основности очень малы. Описанные свойства

ва соответствуют структуре биполярного иона (цвиттер-иона), что в общем виде можно изобразить так:



То есть это внутренняя соль, а соответствующие константы кислотности и основности – это, по существу, кислотность иона аммония и основность карбоксилат-аниона. В водном растворе существует равновесие между тремя формами аминокислот – цвиттер-ионом, сопряженной кислотой и сопряженным основанием:



В зависимости от рН среды превалирует та или иная форма в растворе. При низких значениях рН преобладает сопряженная кислота, при высоких – сопряженное основание. Если поместить аминокислоту в среду, обладающую проводимостью, и опустить туда пару электродов, то в кислых растворах аминокислота будет мигрировать к катоду, а в щелочных – к аноду. При некоторых значениях рН, характерных для данных аминокислот, кислота не будет передвигаться ни к катоду, ни к аноду, т.к. каждая молекула находится в виде цвиттер-иона. Это значение рН называется *изоэлектрической точкой* (pI) данной аминокислоты. Зная значения pK_2 сопряженной кислоты (обычно в пределах от 1 до 3) и значения pK_1 биполярного иона (значение находится в области 9-10), изоэлектрическую точку можно определить из соотношения:

$$\frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

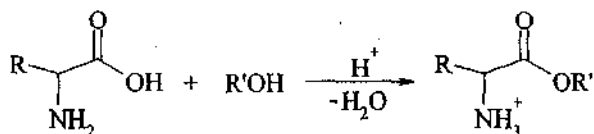
Белки, как и аминокислоты, являются амфолитами и мигрируют в электрическом поле со скоростью, зависящей от их суммарного заряда и

массы. При определенном для каждого белка значении рН его молекулы оказываются электронейтральными. Это значение рН называют *изоэлектрической точкой* (p_i) белка. Изоэлектрическая точка белка зависит от числа и природы заряженных групп в молекуле. Белковая молекула заряжена положительно, если рН среды ниже p_i, и отрицательно, если рН среды выше p_i.

Растворимость аминокислот и белков в изоэлектрической точке минимальна.

1.3.2. Этерификация

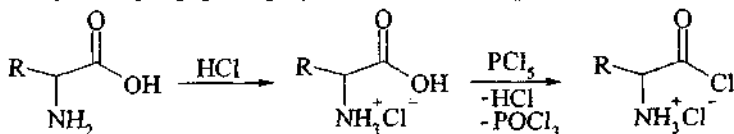
В присутствии неорганических кислот, например при насыщении сухим HCl спиртового раствора аминокислоты, из α-аминокислот и спиртов образуются сложные эфиры:



Другим методом получения сложных эфиров аминокислот является добавление к спиртовому раствору аминокислоты хлористого тионила (SOCl₂), при этом сначала образуется хлорангидрид аминокислоты, который затем реагирует со спиртом.

1.3.3. Образование α-аминоацилгалогенидов

После протонирования аминогруппы α-аминокислоты реагируют с пентахлоридом фосфора, образуя α-аминоацилхлориды.

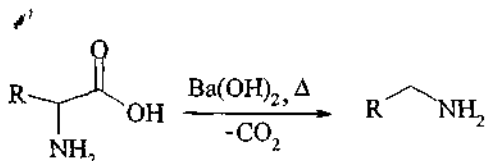


Вместо пентахлорида фосфора для получения α-аминоацилхлоридов может быть использован тионилхлорид (SOCl₂).

В большинстве случаев получение галогенангидридов аминокислот сопряжено с многочисленными трудностями, связанными с защитой аминогруппы и ее последующим деблокированием.

1.3.4. Декарбокслирование

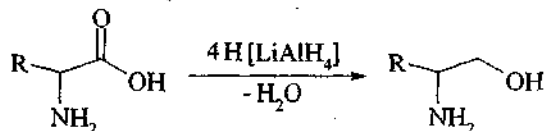
При нагревании с натронной известью или гидроксидом бария до температур более 200°C α-аминокислоты подвергаются декарбокслированию до первичных аминов:



Под действием ферментов-декарбоксилаз можно осуществить декарбокслирование в мягких условиях.

1.3.5. Восстановление

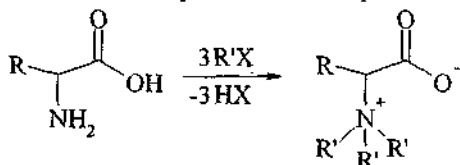
При взаимодействии с алюмогидридом лития возможно восстановление с образованием аминоспиртов:



Синтез 1,2-аминоспиртов ведут в атмосфере азота в полярном растворителе (например тетрагидрофуране).

1.3.6. Алкилирование

α-Аминокислоты подобно аминам могут алкилироваться под действием избытка алкилгалогенидов, диалкилсульфатов и диазоалканов. Образующиеся через стадии N-моно- и N,N-диалкильных соединений триалкильные производные обладают строением биполярных ионов:



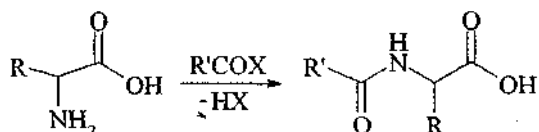
При нагревании глицина с иодистым метилом, таким образом, получают *бетаин*, название которого происходит от латинского названия свеклы – *Beta vulgaris*, – из сока которой он был впервые выделен. Отсюда бетаинами часто называют весь класс внутренних солей. Бетаины найдены в очень большом числе растений: в пшенице, ячмене, листьях табака, семенах подсолнечника.

1.3.7. Арилирование

Аминокислоты взаимодействуют с 2,4-динитрофторбензолом, образуя N-замещенный динитроанилин (см. п. 1.6. Определение аминокислотной последовательности. Метод Сенджера). Реакция протекает по механизму нуклеофильного ароматического замещения.

1.3.8. Ацилирование

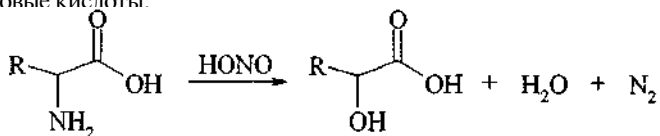
Ангидриды и галогенангидриды карбоновых кислот легко ацилируют аминокислоты уже при комнатной температуре, превращая их в N-ациламинокислоты:



Получение N-ацильных производных используют в химии аминокислот, в основном, как метод защиты аминогруппы.

1.3.9. Взаимодействие с азотистой кислотой

При подобном взаимодействии α-аминокислоты превращаются в α-гидроксикарбоновые кислоты.

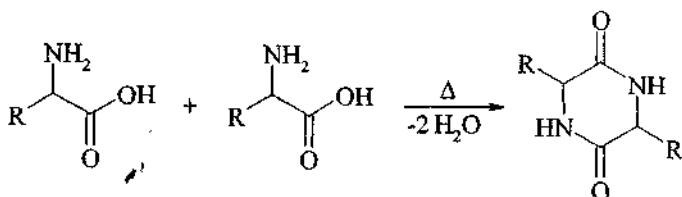


Измерение количества выделяющегося при этом азота используют для количественного определения аминокислот.

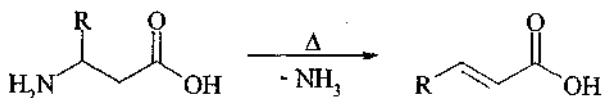
Эфиры α-аминокислот при обработке азотистой кислотой в двухфазной системе $\text{H}_2\text{O} - \text{CH}_2\text{Cl}_2$ при пониженной температуре (-5°C) переходят в диазоэфиры.

1.3.10. Отношение α-, p- и y-аминокислот к нагреванию

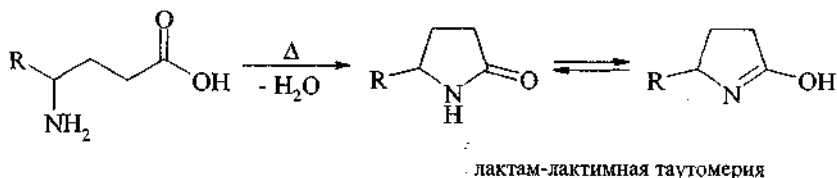
а) α-Аминокислоты при нагревании могут превращаться в циклические амиды, называемые дикетопиперазинами:



б) β-Аминокислоты при нагревании переходят в α,β-непредельные кислоты:



в) γ-Аминокислоты легко, с отщеплением воды, превращаются во внутренние циклические амиды, называемые лактамами:

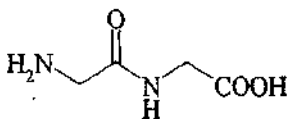


Амид-иминольную таутомерию лактамов называют **лактам-лактимной таутомерией**. Равновесие в большинстве случаев смещено в сторону лактамной формы.

1.4. Пептиды и белки

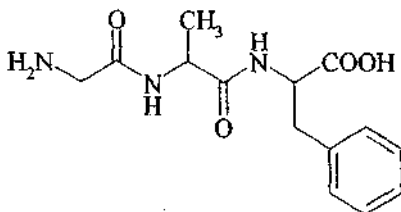
Пептиды и белки состоят из аминокислот, соединенных между собой амидными связями -CONH- (*гомодетные* пептиды), но нередко встречаются пептиды, содержащие наряду с амидной и другие виды связи (-S-; -S-S-; -COO-) между аминокислотами, такие пептиды называют *гетеродетными*. Пептиды можно классифицировать по числу аминокислотных остатков, называют их как производные той аминокислоты, которая заканчивает цепь. Эта аминокислота называется С-концевой кислотой. Кислота, α-аминогруппа которой находится на другом конце цепи, - N-концевая кислота.

Примеры:



дипептид глицилглицина (H-Gly-Gly-OH)

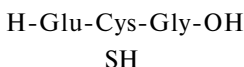
C- и N-концевыми аминокислотами являются остатки глицина



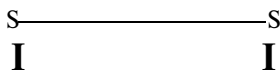
трипептид глицилаланилфенилаланин (H-Gly-Ala-Phe-OH)

C-концевой аминокислотой является фенилаланин, а N-концевой аминокислотой - глицин

По числу α -аминокислотных остатков, участвующих в построении пептида, различают олигопептиды (ди-, три-, тетра- и т.д. до декапептида) и полипептиды. Пептиды встречаются в живых организмах как продукты распада белков, например трипептид глутатион:



Некоторые пептиды (окситоцин, вазопрессин, инсулин) имеют громадное биологическое значение и являются важными гормонами:



вазопрессин

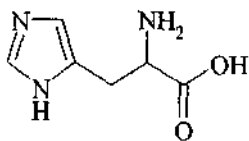
Вазопрессин вырабатывается гипофизом и стимулирует сокращение кровеносных сосудов.

Инсулин - биологически важный пептид, который построен из двух цепей, состоящих из 21 и 30 α -аминокислотных остатков, которые связаны между собой дисульфидными мостиками. Он вырабатывается поджелудочной железой и снижает содержание сахара в крови.

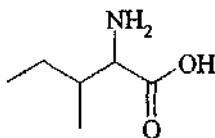
1.5. Структура белков

Белки, или протеины (*protos* [греч.] - первый) - важнейший класс биологически активных веществ. Без белков невозможно представить себе жизнь, Они чрезвычайно разнообразны по структуре и выполняют многочисленные биологические функции. Некоторые белки служат структурными элементами, являются гормонами, переносчиками кислорода, участвуют в мышечном сокращении, другие связаны с генетическим материалом или вовлечены в иммунную систему организма в качестве антител. Главная функция белков-ферментов - катализ биохимических реакций, они участвуют в тысячах превращений, происходящих в живой клетке.

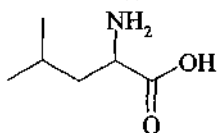
В условиях организма даже относительно простые реакции могут катализироваться ферментами, если некатализируемые реакции являются слишком медленными для обеспечения физиологических потребностей. Гормонами являются такие белки, как инсулин, ряд гормонов гипофиза, нейропептиды мозга, выполняющие роль регуляторов важнейших функций организма животных и человека (обмен веществ, рост, половое развитие и др.). Среди белково-пептидных веществ много антибиотиков (колицины, грамицидины, пенициллины и др.). Токсины - белки микробного, животного или растительного происхождения (энтеротоксины, зоотоксины и др.), обладающие большой токсичностью. Большую группу составляют транспортные белки, участвующие в переносе различных веществ (цитохром, гемоглобин и др.). Под понятием «защитные белки» объединяются вещества белковой природы, которые помогают организму преодолевать патологические состояния, бороться с возбудителями заболеваний (иммуноглобулины, интерферон, фибриноген, тромбин и др.). Структурные белки составляют остов тканей и органов (коллаген, эластин, кератин) и родственный класс - двигательные белки (актин, миозин). Рецепторные белки, воспринимают и преобразовывают световые сигналы (родопсин). Регуляторные белки и пептиды регулируют активность генов (гистоны, репрессоры). Запасные белки - казеин молока, яичный альбумин, глиадин пшеницы и др. Существуют многие миллиарды химически индивидуальных белков. Молекулярная масса белков - от 5-10 тысяч до 1 млн и более. Белки - важнейшая составная часть пищи человека и животных. Человеку необходимо в день 70 г белка. Существуют так называемые незаменимые аминокислоты, входящие в состав белков, они не синтезируются в организме и должны поступать с пищей. Это такие аминокислоты, как:



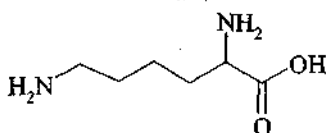
гистидин



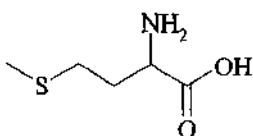
изолейцин



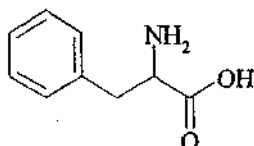
лейцин



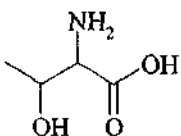
лизин



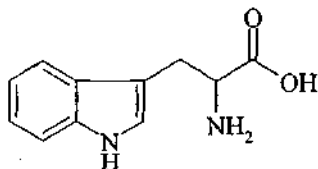
метионин



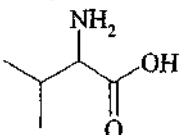
фенилаланин



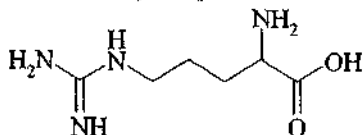
треонин



триптофан



валин



аргинин

Белки можно рассматривать на нескольких уровнях: первичная структура белков, вторичная, третичная и четвертичная.

Под **первичной структурой** следует понимать последовательность α-аминокислотных остатков в полипептидных цепях. Число таких структур практически неограниченно. Так, для 20-членного пептида, состоящего из различных аминокислот, существует $20!$ (т.е. $\approx 2 \cdot 10^6$) возможностей их взаимного расположения. Очевидно, что в живой природе реализуется только незначительная доля возможных изомеров белков. Первичную структуру белков можно определить непосредственным анализом белка или нуклеотидной последовательности соответствующих генов с помощью генетиче-

ского кода. Стратегия изучения первичной структуры белка всецело определяется его аминокислотным составом и молекулярной массой. Сейчас известны первичные структуры нескольких тысяч белков.

Вторичная структура белков - это возможность формирования конформаций в пространстве регулярной структуры полипептидной цепи. Исторически первой описанной конформацией полипептидной цепи была (3-структура (У. Астберн, 1941 год), или "складчатый лист". Через 10 лет Л. Полинг и Р. Корн установили, что это не что иное, как стабилизированный межцепочечными водородными связями ассоциат зигзагообразных пептидных цепей. В 1951 году Л. Полинг и Р. Корн обнаружили одну из главных канонических форм полипептидной цепи и назвали ее α -спиралью. Радикалы аминокислотных остатков оказываются на периферии цилиндра, образованного спиралью, и обеспечивают гидрофобную или гидрофильную природу этой цилиндрической поверхности. Формирование вторичной структуры происходит в основном за счет водородных связей, возникающих между карбонильной группой и NH амидной группы, а также между некоторыми боковыми R-заместителями аминокислот. В формировании вторичной структуры также участвуют гидрофобные взаимодействия некоторых R-заместителей.

Третичная структура белков. Полипептидная цепь, содержащая участки вторичной структуры, укладывается в пространстве в компактную систему, в которой элементы вторичной структуры взаимодействуют между собой и с участками неупорядоченной структуры, образуя глобулу (глобулярные белки) или вытянутое волокно (фибриллярные белки). Для многих белков третичная структура эквивалентна полной пространственной структуре.

Четвертичная структура белков. Во многих белках существуют субъединицы, образующие трехмерные ассоциаты или еще более сложные ансамбли. Термин "четвертичная структура" был предложен в 1958 году Дж. Берналом. Процесс формирования четвертичной структуры белков происходит в строгом соответствии с законами термодинамики. Здесь действуют, вандер-ваальсовы силы, ионные и водородные связи. Характерной особенностью белков с четвертичной структурой является их способность к самосборке, например, гемоглобин легко собирается из смеси α - и β -цепей.

Конфигурационные особенности белков, устойчивость их пространственной структуры и природу взаимодействий можно лучше понять, изучая процессы денатурации и ренатурации белков.

Денатурация - это такое изменение конформации белковой молекулы, которое происходит при резком изменении внешних условий и сопровождается изменением физико-химических свойств белка и полной потерей

биологической активности. В основном белки денатурируют при 50-60°C, реже при 100°C. Иногда денатурацию вызывает изменение pH среды, детергенты. Важной является проблема обратимости денатурации-ренатурации белков, т. е. восстановление конформаций и биологической активности. Впервые полную ренатурацию белка удалось осуществить в 1961 году на примере рибонуклеазы К. Анфисену.

1.6. Определение аминокислотной последовательности

Прежде чем определять аминокислотную последовательность белка, необходимо установить его аминокислотный состав. Наиболее широко применяемый количественный метод аминокислотного анализа белкового гидролизата основан на использовании ионообменной хроматографии.

Затем необходимо определить, содержит ли белок одну субъединицу (полипептидную цепь) или состоит из нескольких субъединиц. Если обнаружено несколько субъединиц, следует установить, идентичны ли их аминокислотные последовательности и связаны ли они межцепочечными дисульфидными мостиками.

Общий подход к определению аминокислотной последовательности включает следующие стадии: 1) осуществление частичного гидролиза белка ферментами или химическими реагентами; 2) выделение полученных пептидов; 3) определение аминокислотных последовательностей этих небольших фрагментов.

Для определения полной аминокислотной последовательности белка должны быть использованы по крайней мере два различных типа частичного гидролиза с тем, чтобы установить структуру белка методом перекрывающихся пептидов.

Прежде чем анализировать пептиды, образовавшиеся при неполном гидролизе белков, необходимо их разделить, выбрав при этом наиболее рациональную схему разделения. Это один из сложнейших и ответственных этапов в установлении первичной структуры белка. При выборе методов разделения пептидов необходимо учитывать количество разделяемых веществ и их физико-химические свойства, прежде всего длину полипептидной цепи. Наиболее хорошо разработаны методы разделения "коротких" пептидов (до 20 аминокислотных остатков). Здесь очень часто используется метод "пептидных карт". Этот метод заключается в том, что смесь пептидов наносится в виде полоски на лист хроматографической бумаги или на пластинку с тонким слоем целлюлозы и подвергается двумерной хроматографии или двумерному

электрофорезу. После "проявления" пептидной карты образуется набор пятен с определенным взаимным расположением, характерный для данного белка.

Вторым наиболее часто используемым методом разделения пептидов является ионообменная хроматография на катионитах "дауэкс". Элюируются пептиды из колонки с помощью пиридин-ацетатного буфера с определенным (подобранным) значением рН и определенной концентрацией.

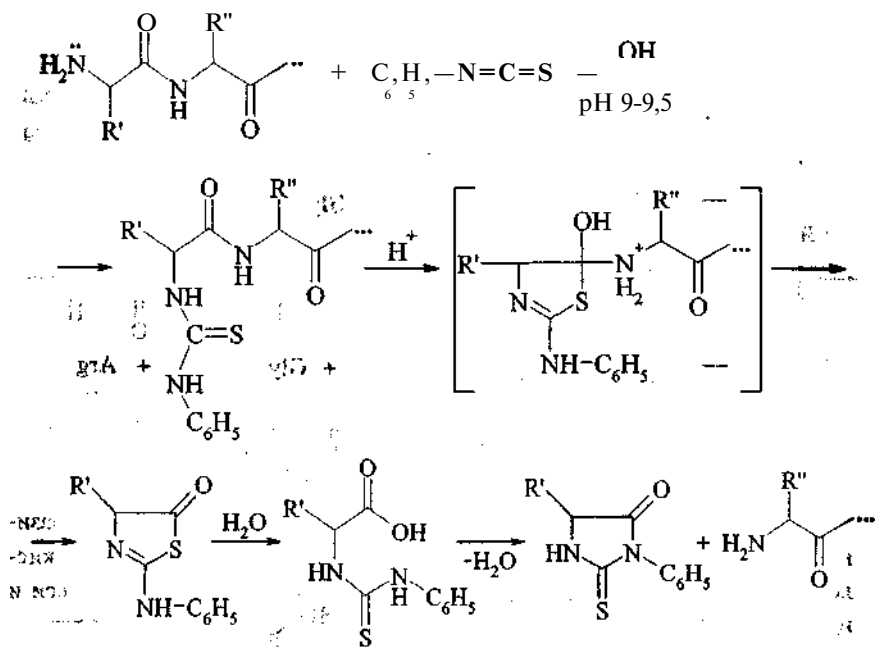
Более сложная задача - разделить смеси "длинных" пептидов (более 20 аминокислотных остатков). Такие пептиды в водных растворах "слипаются", образуя высокомолекулярные агрегаты. Для предотвращения агрегации в растворы добавляются детергенты. В качестве основных методов разделения "длинных" пептидов используется гель-фильтрация (фракционирование пептидов по молекулярной массе на специальных биогелях), ионообменная хроматография на ионообменных целлюлозах, противоточное распределение (фенол-вода, бутанол-вода), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на носителях с обращенными фазами (силикагель с ковалентно присоединенными C_8 или C_{18} и углеводородными радикалами).

Для установления аминокислотной последовательности пептидов тффбелков используется совокупность химических, ферментативных и физико-химических методов.

Метод Эдмана (метод ступенчатой деструкции, 1950 год)

К аминокислотной группе N-концевой α -аминокислоты присоединяют фенол-изотиоцианат (ФИТЦ), каждый цикл деградации включает в себя 3 стадии:

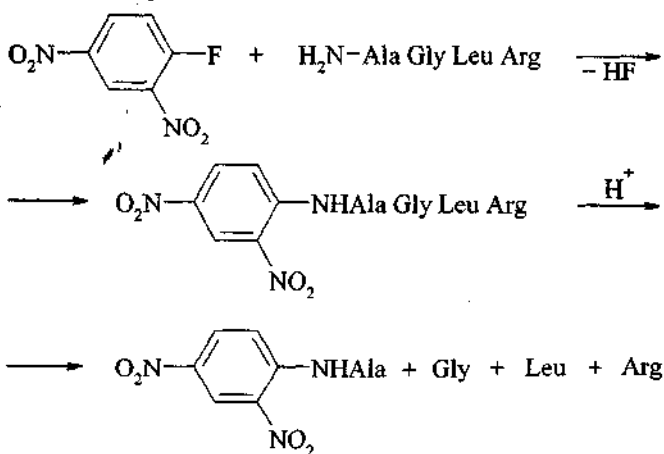
- 1) образование фенилтиокарбомойлпептида (ФТК);
- 2) отщепление N-концевого остатка аминокислоты в виде тиазолинона;
- 3) изомеризацию тиазолинона в фенилтиогидантоин (ФТГ) и идентификация его.



На первой стадии" реакции ФИТЦ присоединяется к непротонированной α-аминогруппе пептида. Образуется ФТК-пептид. На второй стадии в присутствии сильной безводной кислоты N-концевая аминокислота отщепляется, образуется тиазолинон. На стадии 3 тиазолинон быстро гидролизуется в ФТК-аминокислоту. На стадии 4 происходит циклизация ФПС-аминокислоты в фенилтиогидантоин (ФТГ). Отщепленные ФТГ идентифицируются тонкослойной хроматографией на силикагеле и полиамиде, жидкостной и газожидкостной хроматографией высокого разрешения на колонках с обращенной фазой.

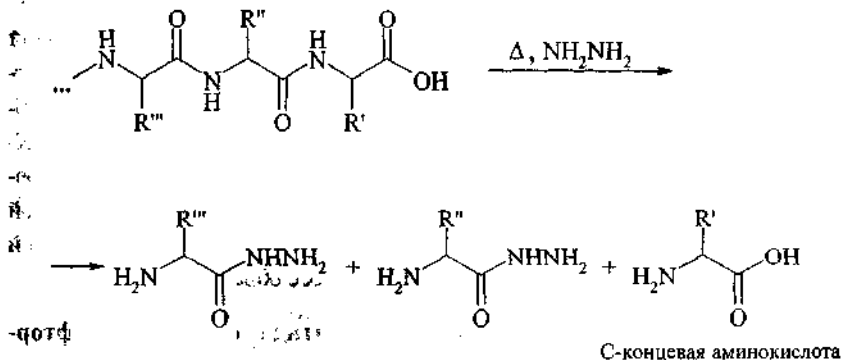
Метод Сенджера (взаимодействие пептида с 2,4-динитрофторбензолом, 1945 год)

При реакции α-аминогруппы пептида или белка с 2,4-динитрофторбензолом получается динитрофенильное производное (ДНФ) желтого цвета. Это производное гидролизуется в кислой среде, пептидные связи разрываются, и образуется ДНФ-производное N-концевой аминокислоты, которое затем экстрагируется эфиром и идентифицируется методом тонкослойной хроматографии:



Метод Акабори (метод гидразинолиза пептидов, 1952 год)

Пептид или белок нагревается при 100-120°C с безводным гидразином. Пептидные связи разрываются с образованием гидразидов аминокислот, а С-концевая кислота освобождается, ее можно выделить из смеси и идентифицировать.

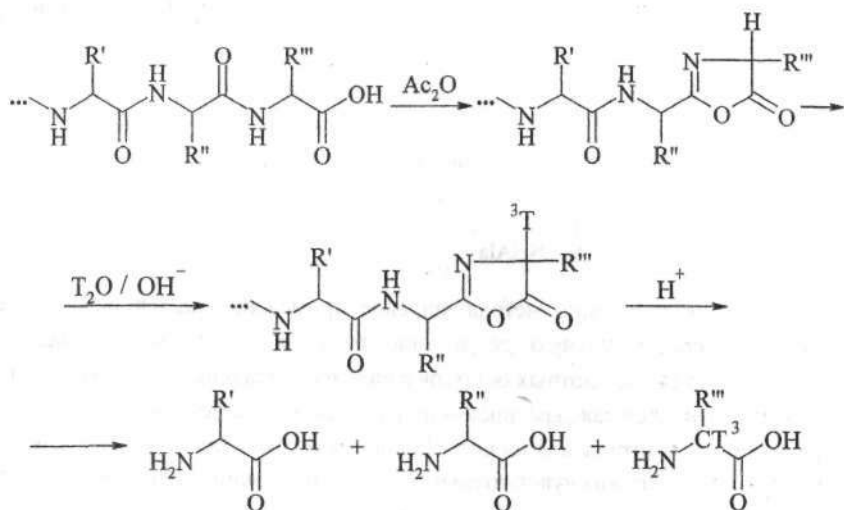


Метод имеет ограничения, т.к. ряд аминокислот разрушается, а ряд гидразидов очень лабилен и превращается в аминокислоты.

Метод Матсуо (оксазалоновый метод, метод тритиевой метки)

С-концевая аминокислота под действием уксусного ангидрида циклизуется с образованием оксазалона. В условиях дальнейшего щелочного гидролиза увеличивается подвижность атомов водорода в положении 4 ок-

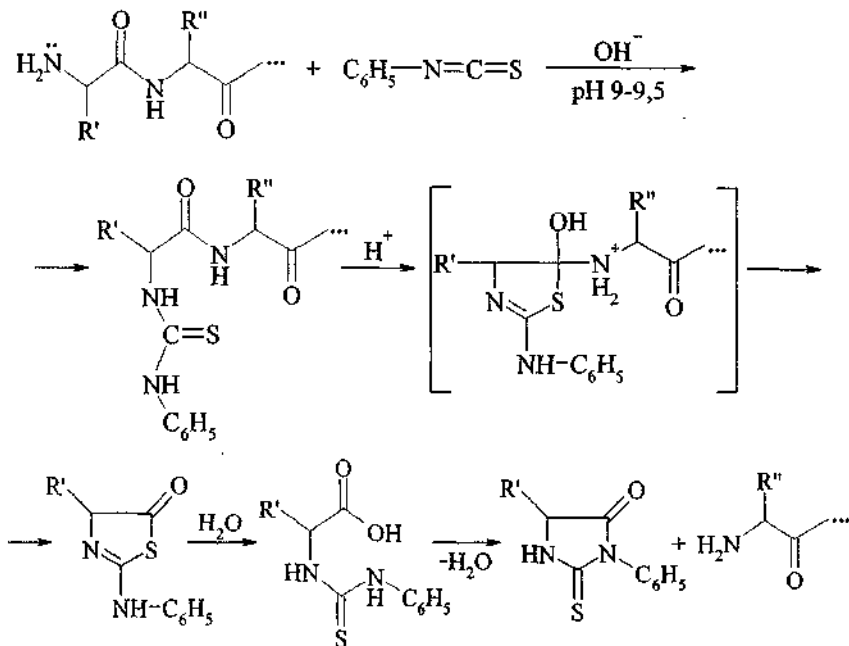
сазалонового кольца, они могут легко замещаться на тритий, а после кислотного гидролиза можно получить радиоактивно меченую С-концевую аминокислоту, идентифицируется она хроматографически и измерением радиоактивности:



меченая С-аминокислота

Метод Грея и Хартли (дансильный метод, 1963 год)

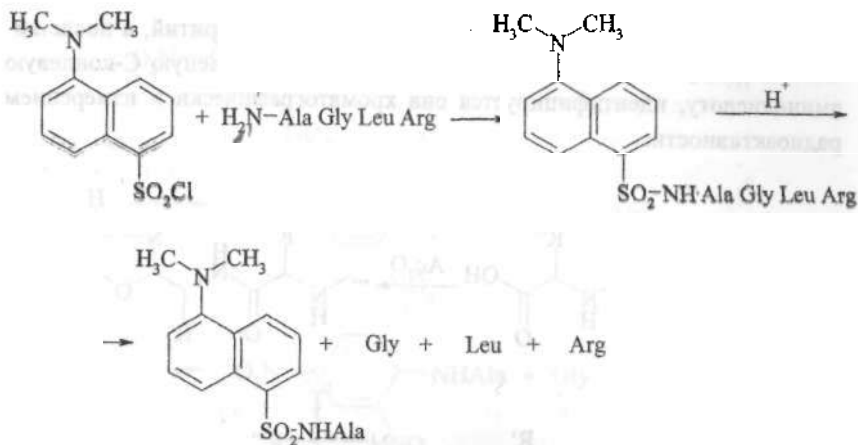
Реакция дансилхлорида с непротонированной α -аминогруппой пептида или белка с образованием дансилпептида (ДНС-пептида). После гидролиза в кислой среде освобождается N-концевая аминокислота, содержащая дансильный остаток. Идентификация ДНС-аминокислот УФ-спектроскопией, микротонкослойной хроматографией, сейчас – высокоэффективной жидкостной хроматографией.



На первой стадии" реакции ФИТЦ присоединяется к непротонированной α-аминогруппе пептида. Образуется ФТК-пептид. На второй стадии в присутствии сильной безводной кислоты N-концевая аминокислота отщепляется, образуется тиазолион. На стадии 3 тиазолион быстро гидролизуется в ФТК-аминокислоту. На стадии 4 происходит циклизация ФПС-аминокислоты в фенилтиогидантоин (ФТГ). Отщепленные ФТГ идентифицируются тонкослойной хроматографией на силикагеле и полиамиде, жидкостной и газожидкостной хроматографией высокого разрешения на колонках с обращенной фазой.

Метод Сенджера (взаимодействие пептида с 2,4-динитрофторбензолом, 1945 год)

При реакции α-аминогруппы пептида или белка с 2,4-динитрофторбензолом получается динитрофенильное производное (ДНФ) желтого цвета. Это производное гидролизуется в кислой среде, пептидные связи разрываются, и образуется ДНФ-производное N-концевой аминокислоты, которое затем экстрагируется эфиром и идентифицируется методом тонкослойной хроматографии:



Среди модификаций метода широкое применение нашел метод, сочетающий последовательную деградацию пептида по Эдману с анализом N-концевых аминокислотных остатков в виде их дансильных производных. По этому методу перед каждым циклом деградации отбирается определенная аликвотная часть пептида для анализа N-концевой аминокислоты. Достоинства метода - более высокая чувствительность при определении ДНС-аминокислот.

1.7. Пептидный синтез

Это построение пептидной цепи путем соединения аминокислот с помощью химических методов. Обычно получают пептиды, содержащие до 45 аминокислот, так можно синтезировать и небольшие белки. Пептидный синтез - надежное средство доказательства строения природных белковых веществ, благодаря ему удается получать аналоги биологически активных пептидов, практически важные препараты для медицины и сельского хозяйства.

Различают следующие типы пептидного синтеза.

1. Классический пептидный синтез в растворе (ступенчатый - последовательное присоединение аминокислот от C-конца к N-концу цепи и блочный - построение цепи из уже синтезированных фрагментов).

2. Синтез пептидов на полимерном носителе (растущая полипептидная цепь присоединена ковалентно к растворимому или нерастворимому полимеру, а затем отделяется от полимера. Может быть твердофазный и жидкофазный синтез).

3. Синтез гомо- и гетерополиаминокислот из повторяющихся остатков одной-двух аминокислот.

4. Ферментативный пептидный синтез.

5. Полусинтез пептидов (отщепление в молекуле природного пептида или белка небольшого фрагменте, а затем введение новой аминокислотной последовательности).

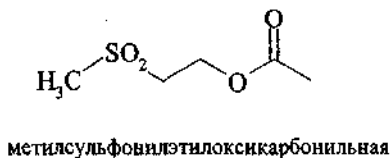
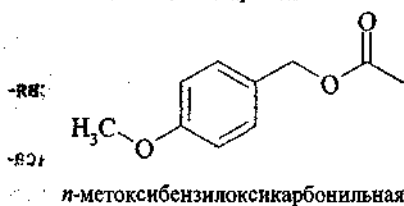
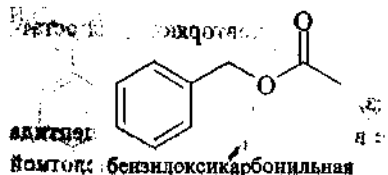
6. Синтез циклических пептидов.

7. Синтез гетеродетных пептидов (с участием не только амидных связей, но и сложноэфирных, дисульфидных и др.).

Пептиды заданного строения не удается получить прямой конденсацией α -аминокислот, т.к. даже при реакции двух α -аминокислот получается четыре различных дипептида. Поэтому аминогруппу одной α -аминокислоты и карбоксильную группу другой α -аминокислоты необходимо блокировать защитными группами. Кроме того, требуется активация карбоксильной группы, которая будет образовывать пептидную связь, т.к. карбоновые кислоты дают с аминами только соли. Необходимо также исключить рацемизацию.

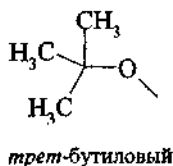
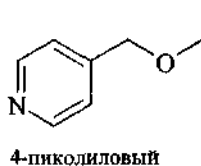
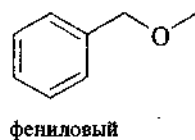
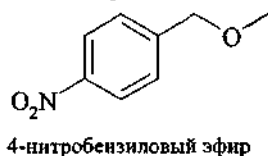
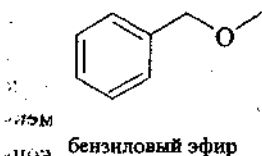
В пептидном синтезе существуют два типа защитных групп - постоянные и временные.

Постоянные - это группировки для защиты боковых функциональных групп, они удаляются на заключительном этапе синтеза пептида. Временные - это защитные группы для N-концевой α -аминогруппы и C-концевого карбоксила, они снимаются перед каждой стадией удлинения цепи или конденсации фрагментов. Защитные группы должны полностью блокировать соответствующую группировку от участия в химических реакциях, должны быть устойчивыми при удалении других защитных групп, не должны вызывать побочных реакций и рацемизации, защищенные производные должны быть устойчивыми к идентификации, не должны создавать затруднений при растворимости и выделении пептидов. Существует целый ряд защитных группировок для концевой α -аминогруппы. Все они условно могут быть подразделены на три типа - ацильные, алкильные (арильные) и уретановые. Первые два типа используются сравнительно редко, что связано с трудностью их введения, удаления и легкостью процессов рацемизации. Защитные группы уретанового типа легко вводятся с помощью хлоридов, азидов, карбонатов, легко удаляются каталитическим гидрогенолизом, ацидолизом или мягким щелочным гидролизом. Это такие защитные группы, как:

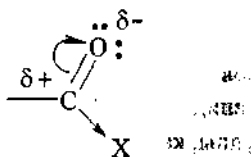


Для защиты карбоксильной функции широко используются различные сложноэфирные группировки, чаще всего бензиловые и *tert*-бутиловые эфиры, реже метиловые и этиловые. Иногда для блокирования карбоксиллов применяют солеобразование.

Наиболее часто для защиты карбоксильных групп применяются:



Активация карбоксильной группы, вступающей в образование пептидной связи, сводится к увеличению электрофильности карбонильного углерода, обеспечивая высокую скорость и полноту синтеза пептида:



Очень важна природа группы X.

До 1950 года в качестве активирующей группы X использовали азид ($X=N_3$) или хлорангидрид ($X=Cl$) соответствующей кислоты. С начала пятидесятых годов в синтетическую пептидную химию было введено большое количество новых активирующих групп, которые привели к тому, что хлорангидридный метод практически вышел из употребления. Наиболее широко изученными методами активации карбоксильной группы являются методы: смешанных ангидридов ($X= -OOCR$, $-OOCOR$), активированных эфиров ($X= -OCH_2CN$, $-OC_6H_5$, $-SC_6H_5$, $-OC_6H_4NO_2$ и т.д.), взаимодействие с дидециклогексилкарбодиимидом.

Азидный метод Курциуса

Эфир N-защитенной аминокислоты или пептида подвергается гидролизу в течение 12-48 часов при комнатной температуре, а затем образовавшийся гидразид обрабатывается водным раствором нитрита натрия в кислой среде при $-5^\circ C$, при этом гидразид переводится в азид, который легко вступает в реакцию с метиловым, этиловым или бензиловым эфиром аминокислоты или пептида:



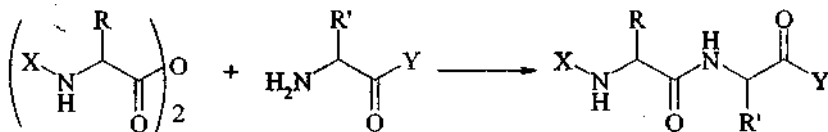
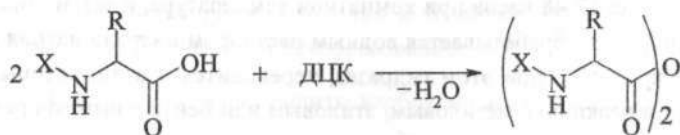
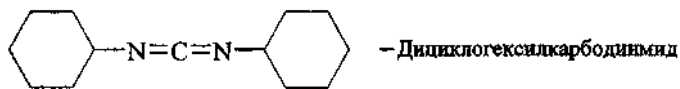
где X и Y – NH_2 -защитные и $COOH$ -защитные группы.

Поскольку некоторые ацильные заместители, например фталильная и трифторацетильная группы, легко отщепляются при действии гидразина, очевидно, что использование этого метода для получения промежуточных гидразидов, имеющих указанные заместители, приводит к значительному деацилированию. При наличии тритильной группы стерические препятствия, обусловленные этим объемным заместителем, способствуют тому, что

только эфиры тритилглицина образуют гидразиды. Таким образом, практическое применение азидного метода ограничено синтезами, в которых применяются более подходящие бензилоксикарбонильные и тозилные производные.

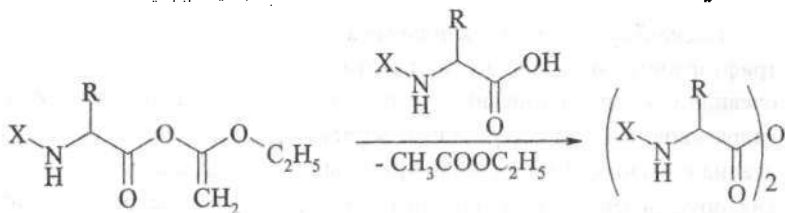
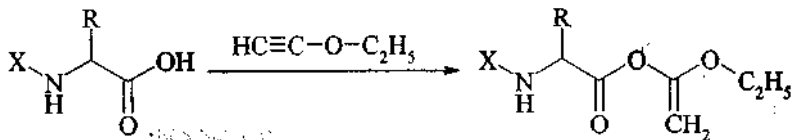
Метод ангидридов

N-защищенная аминокислота обрабатывается дициклогексилкарбодиимидом (ДЦК), образующиеся ангидриды вводятся в реакцию с аминокислотой или пептидом:



где X и Y – NH₂-защитные и COOH-защитные группировки.

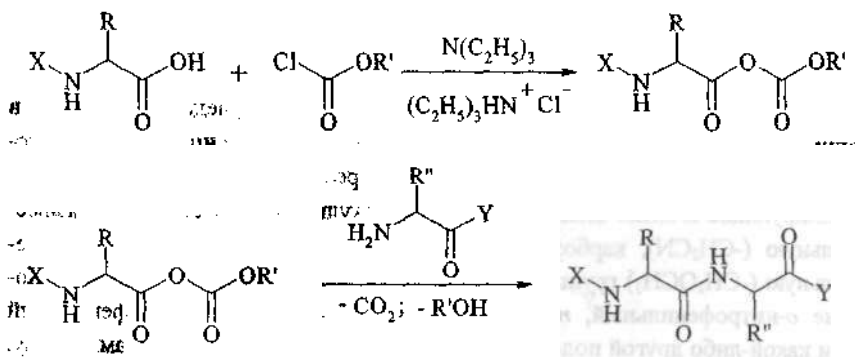
Ангидриды ациламино кислот также можно получить если в качестве конденсирующего агента использовать этоксиацетилен.



Недостатком метода симметричных ангидридов является то, что в синтезируемый пептид включается только половина исходной аминокислоты. В настоящее время метод симметричных ангидридов находит применение в твердофазном методе синтеза пептидов.

Часто используется **метод смешанных ангидридов** ациламинокислот с карбоновыми кислотами или с алкилугольной кислотой. Метод смешанных ангидридов с алкилугольной кислотой, один из распространенных методов создания пептидной связи, основан на использовании смешанных ангидридов ациламинокислот с моноэфирами угольной кислоты.

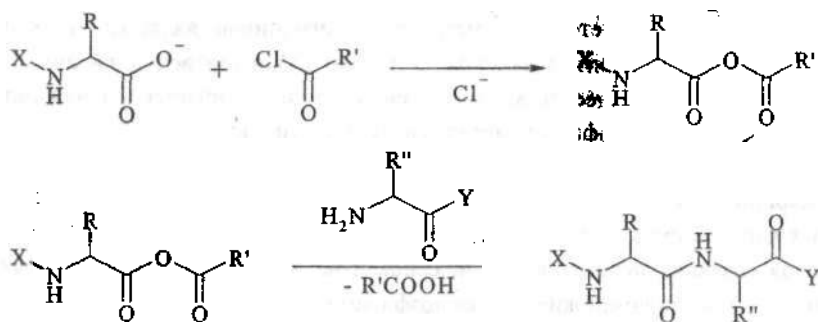
При обработке ацилированной аминокислоты или пептида одним эквивалентом эфира хлоругольной кислоты в присутствии основания образуется соответствующий смешанный ангидрид.



Обычно используют этиловые, изопропиловые, *втор-* и *трет-*бутиловые эфиры хлоругольной кислоты.

В методе смешанных ангидридов возможно протекание побочной реакции, связанной с расщеплением смешанного ангидрида в нежелательном направлении, происходящем при атаке нуклеофила на атом углерода угольной кислоты.

При взаимодействии солей N-защищенных аминокислот с хлорангидами карбоновых кислот в инертном растворителе образуются соответствующие смешанные ангидриды, ацилирующие аминокислотный компонент.



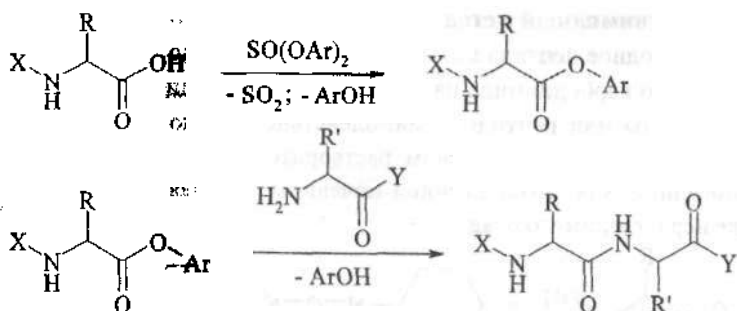
Основными побочными процессами при использовании смешанных ангидридов карбоновых кислот являются реакция диспропорционирования с образованием симметричных ангидридов и атака аминоконпонента по карбонильному атому углерода карбоновой кислоты.

Метод активированных эфиров

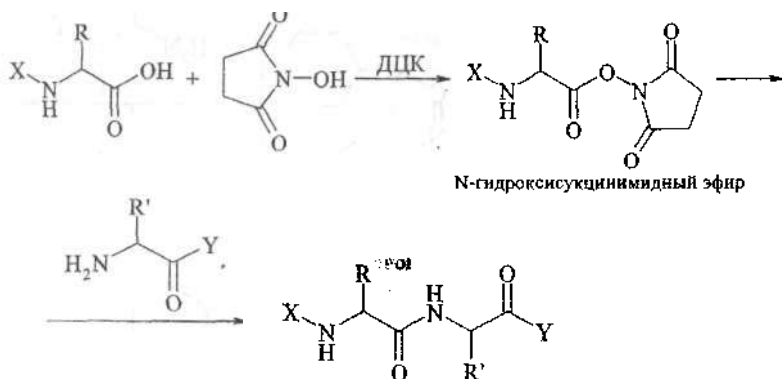
Некоторые сложные эфиры карбоновых кислот вследствие наличия в спиртовой компоненте сложноэфирной группы электроотрицательного заместителя могут обладать достаточно высокой реакционной способностью как ацилирующие агенты. Сложные эфиры, молекулы которых содержат цианметильную ($-\text{CH}_2\text{CN}$), карбозтоксиметильную ($-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$) или метоксиметильную ($-\text{CH}_2\text{OCH}_3$) группы, а также ароматические сложные эфиры, имеющие *o*-нитрофенильный, *i*-нитрофенильный или *я*-карбометоксифенильный или какой-либо другой подобный заместитель, легко подвергаются аминолизу. Особенно легко вступают в такие реакции производные фенола и тиофенола, содержащие в *и*-и *о*-положениях электроотрицательные группы. Большое распространение получили также активированные эфиры на основе *N*-гидро-кисукцинимида и *N*-гидро-ксибензотриазола.

Соответствующие реакционноспособные эфиры могут быть получены действием спиртов, фенолов или тиофенолов на галогенангидриды ациламино кислот или при действии на смешанные ангидриды ациламино кислот с алкилугольной кислотой.

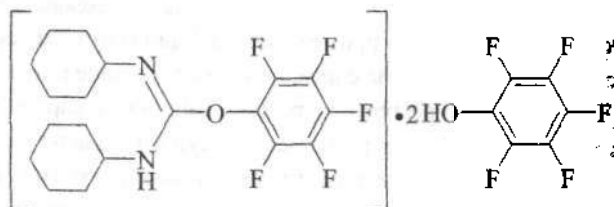
Другой путь синтеза активированных эфиров заключается в действии диарилсульфита ($\text{SO}(\text{OAr})_2$) или триарилфосфита ($\text{P}(\text{OAr})_3$) на *N*-защищенную аминокислоту:



Разновидностью метода является конденсация с помощью дициклогексилкарбодиимида в присутствии 4-нитрофенола, N-гидроксиsuccинида или N-гидроксибензотриазола:



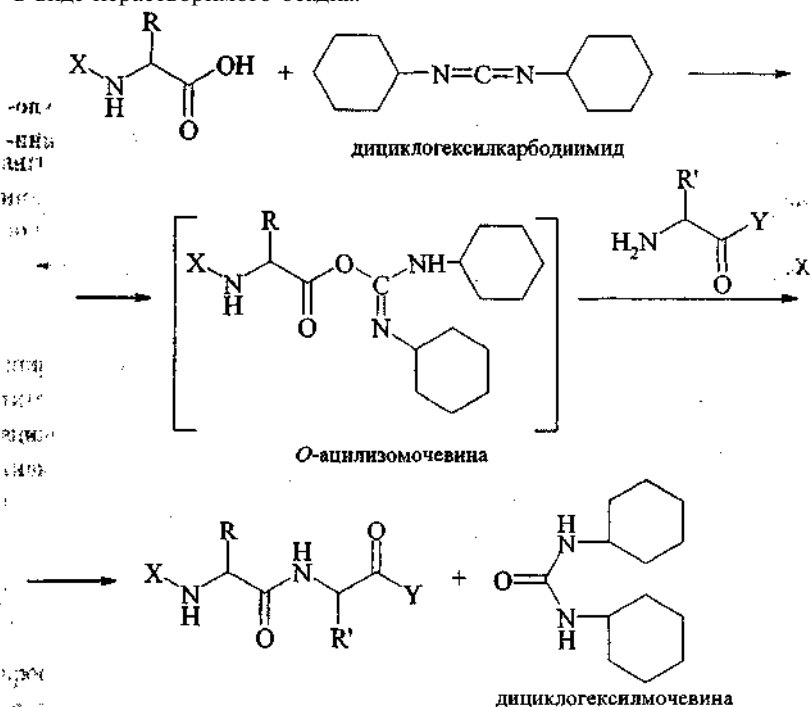
Часто в методе активированных эфиров используется "F-комплекс", состоящий из трех молекул пентафторфенола и одной молекулы дициклогексилкарбодиимида:



При синтезе пептидов прибавляют "F-комплекс" к смеси карбонильного и аминоконпонента в эквимольных количествах, иногда небольшой избыток.

Карбодиимидный метод

Производное пептида может быть легко получено действием N,N'-дизамещенного карбодиимида на ациламино кислоту или ацилпептид и эфир аминокислоты или пептида. Взаимодействие обычно проводят при комнатной температуре в инертном растворителе. Реакция сопровождается образованием NН'-дизамещенной мочевины, которая обычно выделяется в виде нерастворимого осадка.

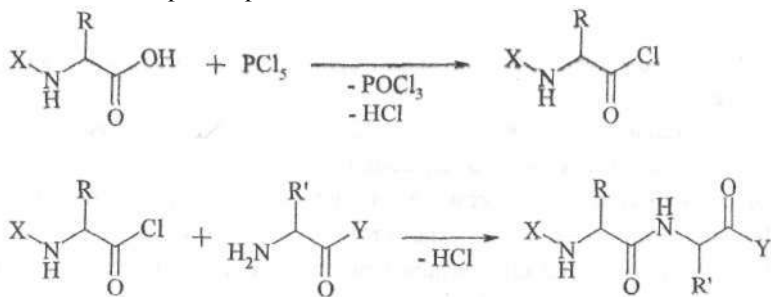


Особое преимущество применения NН'-дициклогексилкарбодиимида заключается в удобстве работы с ним, поскольку хорошие результаты получают при действии этого реагента на раствор аминного и карбоксильного компонентов при комнатной температуре как в отсутствие, так и при наличии в реакционной смеси воды. Кроме того, при использовании этого реагента нет необходимости защищать гидроксильные группы гидроксиаминокислот.

Хлорангидридный метод

Хлорангидриды получают при действии на ациламино кислоту пентахлорида фосфора, треххлористого фосфора или хлористого тионила в инертном растворителе. Взаимодействие полученного хлорангидрида с

аминокомпонентой может проводиться как в инертном растворителе, так и в водной среде в присутствии подходящего основания для связывания выделяющегося хлороводорода:



Этот метод, сыгравший важную роль на заре синтеза пептидов, в настоящее время применяется редко, т.к. возможно образование побочных продуктов и значительная рацемизация.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1. Хроматографическое разделение аминокислот

2.1.1. Одномерная тонкослойная хроматография аминокислот на силикагеле

Все операции с приготовлением и нанесением хроматограмм следует проводить в чистых резиновых перчатках!

Хроматографию проводят в стеклянной камере с притертой крышкой. Стенки камеры обкладывают хроматографической бумагой, предварительно смоченной в хроматографической системе. Для разделения аминокислот используют смесь: н-бутанол - CH_3COOH - H_2O (4:1:1) или смесь 2-метил-бутанол - 2-метилэтилкетон - вода (2:1:1). Линию старта проводят в 1 см от нижнего края пластинки. На линию старта наносят тонкими капиллярами исследуемую смесь аминокислот и стандартную смесь аминокислот. Затем помещают пластинку в камеру, которую плотно закрывают крышкой. По окончании пластинку высушивают и аминокислоты проявляют раствором нингидрина.

Реакция с нингидрином. К 500 мг нингидрина добавить 25 мл воды, 5 мл ледяной уксусной кислоты и довести ацетоном до 250 мл. Полученным раствором обработать хроматограмму и нагревать 15 мин при 60°C .

2.1.2. Хроматография на бумаге

Все операции с приготовлением и нанесением хроматограмм следует проводить в чистых резиновых перчатках!

За несколько дней до начала работы листы хроматографической бумаги промывают в течение 2 суток в камере для нисходящей хроматографии в системе н-бутанол - CH_3COOH - H_2O (4:1:1). Затем вырезают полосу бумаги длиной 50 см так, чтобы растворитель при хроматографии проходил перпендикулярно машинной выработке бумаги. В 8 см от конца полоски проводят стартовую линию и отмечают точки нанесения в 2,5 см от краев и между собой. В обозначенных точках наносят исследуемые смеси аминокислот и стартовую смесь аминокислот. Полосу бумаги осторожно помещают в хроматографическую камеру для нисходящей хроматографии и оставляют при постоянной температуре на сутки. В качестве растворителей для хроматографии используют две системы:

- 1) н-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:5) (верхний слой);
- 2) к-бутанол - уксусная кислота - вода - пиридин (15:3:12:10).

Проявляют аналогично, как при одномерной тонкослойной хроматографии аминокислот.

2.2. Методы синтеза пептидов

2.2.1. Получение N-ацилированных аминокислот

Карбобензоксивалин (кбз-валин)

К раствору 5 г (0,0427 моля) валина в 21,4 мл (0,0427 моля) 2н NaOH при 0°C и тщательном перемешивании одновременно прибавляют по каплям в течение 20 мин 6,3 мл (0,044 моля) карбобензоксихлорида (n_D^{20} 1,5215) и 11,0 мл (0,044 моля) 4н NaOH. Реакционную смесь перемешивают 1 час при охлаждении и 2-3 часа при комнатной температуре. Не вошедший в реакцию карбобензоксихлорид экстрагируют эфиром. Водный раствор подкисляют конц. HCl по конго и оставляют на несколько часов в холодильнике. Образующееся масло экстрагируют этилацетатом, высушивают этилацетатный раствор над б/в Na_2SO_4 и растворитель упаривают в вакууме. Кбз-валин пересаждают из бензола гексаном.

Кбз-валин отфильтровывают, промывают холодной водой и высушивают в эксикаторе над конц. H_2SO_4 . Выход кбз-валина - 75%, T_m - 75-78°C. Аналогично получают некоторые другие кбз-аминокислоты.

Формиллейцин

10 г (0,076 моля) лейцина растворяют в 158 мл (4,04 моля) безводной муравьиной кислоты. К полученному раствору при нагревании до 60°C и тщательном перемешивании добавляют по каплям 53 мл (0,56 моля) уксусного ангидрида. Нагревание и перемешивание реакционной смеси продолжают в течение 5 часов.

Полученный после формилирования раствор упаривают в вакууме до образования маслянистой жидкости, добавляют 60 мл воды и упаривают досуха. Кристаллический продукт промывают 1н HCl и водой. Формиллейцин получают с выходом 78%, $T_{пл}$ - 115-116°C.

Фталилфенилаланин

Смесь 9,90 г (0,06 моля) фенилаланина и 8,95 г (0,06 моля) тщательно измельченного фталевого ангидрида нагревают 30 мин при температуре масляной бани 145-150°C. После охлаждения твердый продукт реакции растворяют в 40 мл горячего метанола, раствор фильтруют и разбавляют

40 мл воды; при медленном охлаждении фталилфенилаланин выпадает в виде тонких бесцветных игл. Выход - 88%, $T_{пл}$ - 183-185°C.

Аналогично получают и другие фталиламинокислоты.

Тозил-L-валин

К раствору 5 г¹(0,043 моля) L-валина в 55 мл 1н гидроксида натрия добавляют 11 г (0,058 моля) твердого и-толуолсульфохлорида; смесь интенсивно перемешивают при комнатной температуре в течение 3 часов, избыток хлорангидрида отфильтровывают и фильтрат подкисляют разбавленной соляной кислотой (по конго красному). Тозил-1-валин, осаждающийся в виде белого кристаллического осадка, отфильтровывают, промывают водой и высушивают. Перекристаллизация из смеси этилацетата с легким петролевым эфиром дает 6,8 г вещества. $T_{пл}$ - 144°C.

Тритилглицин

Этиловый эфир тритилглицина. К суспензии 1,39 г (0,01 моля) гидрохлорида этилового эфира глицина в 15 мл сухого хлороформа добавляют 2,2 г (0,022 моля) триэтиламина, затем 2,8 г (0,01 моля) трифенилхлорметана и смесь оставляют на 6 часов при комнатной температуре. Раствор дважды промывают водой, высушивают сульфатом натрия и растворитель отгоняют в вакууме. Полного удаления хлороформа достигают путем добавления нескольких миллилитров этанола и последующего упаривания в вакууме. После перекристаллизации остатка из этанола получают 86% этилового эфира тритилглицина. $T_{пл}$ - 114°C. Аналогичная методика может быть использована для синтеза эфиров других тритиламинокислот.

Тритилглицин. Этиловый эфир тритилглицина (3,45 г, 0,01 моля) растворяют при нагревании в 11 мл (избыток 10%) 1н спиртового раствора гидроксида калия и 6 мл спирта. Раствор оставляют на 1 час при комнатной температуре, разбавляют трехкратным объемом воды, охлаждают и затем подкисляют уксусной кислотой. Осадок тритилглицина несколько раз промывают водой и перекристаллизовывают из спирта. Выход - 92%, $T_{щ}$ - 178-179°C.

2.2.2. Получение гидрохлоридов эфиров аминокислот

Гидрохлорид метилового эфира фенилаланина

10 г (0,06 моля) фенилаланина в 100 мл безводного метанола в течение 6 часов при охлаждении насыщают сухой HCl. Растворитель упаривают в вакууме досуха, остаток растворяют в безводном метаноле и в течение 3 часов в раствор снова пропускают сухой HCl. После отгонки метанола в вакууме ос-

таток последовательно обрабатывают безводным метанолом и сухим диэтиловым эфиром с последующей отгонкой растворителей в вакууме. Полученное вещество пересаждают из абс. этилового спирта диэтиловым эфиром и сушат над щелочью в вакуум-эксикаторе. Гидрохлорид метилового эфира фенилаланина получают с выходом 80%, $T_{\text{ц}}$ -154-156°C.

Аналогично получают гидрохлориды метиловых эфиров других аминокислот.

Гидрохлорид этилового эфира глицина

К суспензии 150 г (2,00 моля) глицина в 1,5 л 96%-ного этанола прибавляют 357 г (3,00 моля) тионилхлорида с такой скоростью, чтобы реакционная смесь слабо кипела. Смесь затем кипятят с обратным холодильником 2 часа.

После этого растворитель испаряют на роторном вакуумном испарителе, а остаток растворяют в 800 мл этанола. Гидрохлорид этилового эфира глицина высаживают прибавлением примерно 500 мл диэтилового эфира и фильтруют. После промывания диэтиловым эфиром и сушки над P_4O_{10} в течение 2 дней получают продукт с выходом 98% в виде бесцветных кристаллов с $T_{\text{пл}}$ 133-135°C. Перекристаллизация из смеси этанол - диэтиловый эфир дает продукт в виде бесцветных игл с $T_{\text{пл}}$ 145-146°C.

2.2.3. Получение эфиров аминокислот и N-ациламинокислот

Метилловый эфир треонина

К 1,8 г (0,0106 моля) гидрохлорида метилового эфира треонина, суспендированного в 10 мл безводного хлороформа и охлажденного до -5°C, добавляют 33 мл охлажденного 3%-ного раствора аммиака в хлороформе. Смесь перемешивают при охлаждении 15 мин и отфильтровывают от хлористого аммония. Растворитель упаривают в вакууме досуха. Остаток пересаждают из горячего этилацетата петролейным эфиром и сушат над хлористым кальцием в вакуум-эксикаторе. Выход метилового эфира треонина - 72% , $T_{\text{пл}}$ - 70-72°C.

Метилловый эфир фенилаланина

К суспензии 1,18 г (5,5 ммоль) гидрохлорида метилового эфира фенилаланина в тетрагидрофуране при 0°C добавляют 0,88 мл триэтиламина. Выпавший в осадок хлористый триэтиламмоний отфильтровывают и растворитель упаривают в вакууме досуха. Выход метилового эфира фенилаланина - 90%. Масло.

Метиловый эфир кбз-аланина

»

В суспензию 10 г (0,44 моля) мелкорастертого кбз-аланина в 100 мл безводного диэтилового эфира при комнатной температуре пропускают диазометан до появления устойчивой желтой окраски от небольшого избытка диазометана/раствор фильтруют и упаривают в вакууме досуха. Полученное в остатке масло несколько раз обрабатывают безводным диэтиловым эфиром с последующей отгонкой растворителя в вакууме. Вещество сушат в вакуум-эксикаторе над пятиокисью фосфора.

Выход метилового эфира кбз-аланина - 77%, $T_{\text{пл}}$ - 45-47°C.

2.2.4. Синтез производных пептидов методом смешанных ангидридов

Метиловый эфир кбз-фенилаланилглицина

В плоскодонной колбе растворяют 5 г (0,0165 моля) кбз-фенилаланина в 50 мл абс. триэтиламина, охлаждают до 0°C и добавляют при перемешивании 1,82 мл (0,019 моля) этилового эфира хлоругольной кислоты. Затем через 8-10 мин добавляют второй компонент, охлажденный до 0°C раствор 2,1 г (0,019 моля) гидрохлорида метилового эфира глицина и 2,62 мл (0,019 моля) абс. триэтиламина в 25 мл абс. хлороформа. Смесь выдерживают в течение 30 мин при 0°C и оставляют на ночь при комнатной температуре. Раствор тщательно промывают 1н соляной кислотой (2 раза), водой (2-3 раза), 3%-ным раствором бикарбоната натрия (3-4 раза) и снова водой, высушивают над сульфатом натрия и растворитель отгоняют в вакууме. Масло обрабатывают абс. эфиром с последующей отгонкой его в вакууме. Выход метилового эфира кбз-фенилаланилглицина - 80%, $T_{\text{пл}}$ - 115°C. Аналогично получают пептиды других аминокислот. На 1 моль N-ациламино кислоты обычно берут 1,12-1,2 моля остальных компонентов реакции (триэтиламина, этилового эфира хлоругольной кислоты и гидрохлорида метилового эфира аминокислоты).

Растворитель (абс. хлороформ, диоксан, тетрагидрофуран и др.) берется из расчета 10 мл на 1 г N-ациламино кислоты или гидрохлорида эфира аминокислоты.

2.2.5. Синтез производных пептидов азидным методом

Гидразид кбз-аланина

К 2,37 г (0,01 моля) метилового эфира кбз-аланина в 30-50 мл абс. метанола прибавляют при комнатной температуре шестикратное количество (0,06 моля) 85%-ного гидразин-гидрата. Реакционную смесь нагревают с об-

ратным холодильником при встряхивании 1,5 часа на водяной бане и оставляют на 12 часов при комнатной температуре. Раствор упаривают в вакууме до 2/3 объема и разбавляют водой. Гелеобразное вещество закристаллизовывают при стоянии под водой, промывают и сушат в вакуум-эксикаторе над хлористым кальцием. Выход гидразида кбз-аланина - 90% , $T_{пл}$ - 13 8°С.

Метилвый эфир кбз-аланилфенилаланина

К охлажденному до -10°С раствору 3 г (0,0126 моля) гидразида кбз-аланина в 30 мл разбавленной (2:1) CH_3COOH приливают 10,9 мл (0,032 моля) Zn соляной кислоты, затем при сильном перемешивании по каплям прибавляют охлажденный раствор 1,03 г (0,016 моля) азотистокислого натрия в 9 мл воды. Реакционную смесь перемешивают при -5°С еще 10 мин. Полученный азид экстрагируют из раствора охлажденным этилацетатом и последовательно промывают водой, охлажденным раствором 3%-ного бикарбоната натрия (3 раза) и снова водой. Раствор сушат 20 мин в холодильнике над прокаленным сульфатом натрия, фильтруют, снова охлаждают и прибавляют к охлажденному до -5°С раствору 2,5 г (0,0139 моля) метилового эфира фенилаланина в 13 мл этилацетата. Раствор оставляют на 24 часа при комнатной температуре, после чего досуха упаривают в вакууме.

Полученное масло растворяют в хлороформе и раствор промывают 0,5н HO (2 раза), водой (2 раза), 3%-ным раствором бикарбоната натрия (3 раза) и снова водой до нейтральной реакции. Раствор высушивают над Na_2SO_4 .

После отгонки в вакууме растворителя масло последовательно обрабатывают безводным этанолом и диэтиловым эфиром с последующей отгонкой растворителей. Выход метилового эфира кбз-аланилфенилаланина - 60-70%.

Гидразид-кбз-глицина

10 г (0,048 моля) кбз-глицина растворяют в 100 мл абс. метанола, содержащего 3,65 г хлористого водорода. Раствор оставляют на 36 часов при комнатной температуре, растворитель отгоняют в вакууме. Остаток (метилвый эфир кбз-глицина) растворяют в 50 мл безводного метанола, добавляют 3 мл (0,08 моля) 85%-ного гидразин-гидрата и оставляют на 24 часа при комнатной температуре. Кристаллы отфильтровывают, промывают водой. Выход гидразида кбз-глицина - 72% , $T_{пл}$ -117°С.

Метиловый эфир кбз-глицилглицина у

6,4 г (0,028 моля) гидразида кбз-глицина растворяют в смеси 50 мл воды, 5 мл ледяной уксусной кислоты и 3 мл конц. соляной кислоты, охлаждают до -10°C при сильном перемешивании и добавляют по каплям 2,1 г (0,03 моля) азотистокислого натрия в 15 мл воды. Далее поступают, как описано выше (см. синтез метилового эфира кбз-аланилфенилаланина). Раствор азиды в этилацетате вводят в реакцию с 2,67 г (0,03 моля) метилового эфира глицина и оставляют на 24 часа в холодильнике и на 24 часа при комнатной температуре.

Раствор дипептида промывают последовательно 0,5н соляной кислотой, водой, 3%-ным раствором бикарбоната натрия и снова водой, высушивают Na_2SO_4 и упаривают в вакууме досуха. Выход метилового эфира кбз-глицилглицина - 70% , $T_{\text{пл}}$ - $63-65^{\circ}\text{C}$.

2.2.6. Синтез производных пептидов карбодимидным методом

Метиловый эфир кбз-L-валил-L-лейцина

0,145 г (0,001 моля) гидрохлорида метилового эфира лейцина растворяют при слабом нагревании и перемешивании в 30 мл абс. нитрометана, затем добавляют по каплям 0,15 мл (0,001 моля) абс. триэтиламина и перемешивают смесь 20 мин, после чего добавляют 0,245 г (0,001 моля) кбз-L-валина. Спустя 10 мин к охлажденной до 0°C смеси добавляют 0,24 г (0,0012 моля) дициклогексилкарбодимида, смесь перемешивают еще 30 мин и оставляют на ночь.

Дициклогексилмочевину отфильтровывают, растворитель отгоняют в вакууме и остаток обрабатывают 30 мл абс. этилацетата. Смесь оставляют на 1 час в холодильнике, выпавшие кристаллы гидрохлорида триэтиламина отфильтровывают, раствор промывают 2 раза 5 мл 0,5н HCl , водой, 3%-ным раствором бикарбоната натрия и снова водой, сушат над б/в сульфатом натрия и отгоняют в вакууме. Масло обрабатывают абс. метанолом и эфиром с последующей отгонкой растворителя в вакууме. Масло закристаллизовывается при стоянии в холодильнике. Выход метилового эфира кбз-1-валил-1-лейцина - 81% , $T_{\text{пл}}$ - $71-72^{\circ}\text{C}$.

Метиловый эфир кбз-аланилтирозина

К 2,8 г (0,0125 моля) кбз-аланина и 2,5 г (0,0127 моля) метилового эфира тирозина в 11 мл диметилформамида добавляют 2,6 г (0,0127 моля) дициклогексилкарбодимида. После стояния в течение ночи реакционную смесь отфильтровывают от дициклогексилмочевины, фильтрат разбавляют

этилацетатом, промывают 2 раза 5 мл 0,5н HCl, водой, 3%-ным раствором бикарбоната натрия и снова водой, сушат над б/в Na₂S₀₄ и упаривают досуха в вакууме. Кристаллизацией остатка из этилацетата получают 4 г (79%) метилового эфира кбз-аланилтирозина, T_{пл} - 121-122°C.

Метилловый эфир формиллейцил-N⁰-кбз-лизина

2 г (0,0067 моля) гидрохлорида метилового эфира г[^]-кбз-лизина растворяют в 15 мл абс. диметилформаида, охлаждают до 0°C, смешивают с 0,8 мл (0,0067 моля) абс. триэтиламина и энергично встряхивают в течение 10-15 мин. Выпавший в осадок триэтиламмоний отделяют и промывают 10 мл диметилформаида.

В фильтрате растворяют при легком нагревании 0,9 г (0,006 моля) формиллейцина. Раствор охлаждают до -10°C, добавляют 1,4 г (0,007 моля) карбодииида и оставляют при 0°C на 24 часа.

Выпавшую дициклогексилмочевину отфильтровывают, а фильтрат упаривают в вакууме досуха.

Масло растворяют в этилацетате, раствор промывают 0,5н соляной кислотой, водой, 3%-ным раствором бикарбоната натрия и снова водой, высушивают над б/в Na₂S₀₄ и упаривают в вакууме досуха. Дипептид закристаллизовывается при стоянии под абс. эфиром. Выход метилового эфира формиллейцил-г[^]-кбз-лизина - 82% , T_{пл} - 118°C.

Метилловый эфир о-нитрофенилсульфенилаланилглицина

К суспензии 1,07 г (0,01 моля) гидрохлорида метилового эфира глицина в 30 мл абс. хлороформа прибавляют 2,25 г (0,01 моля) о-нитрофенилсульфенилаланина и 1,5 мл абс. триэтиламина, перемешивают при комнатной температуре до образования прозрачного раствора и добавляют порциями 2,06 г дициклогексилкарбодииида. Раствор перемешивают 2,5 часа, оставляют на ночь при комнатной температуре. Реакционную смесь подкисляют 50%-ной уксусной кислотой, осадок отфильтровывают, а фильтрат промывают водой и упаривают в вакууме досуха. Остаток растворяют в этилацетате и оставляют на ночь при 4°C. Выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровывают и раствор упаривают в вакууме. Метилловый эфир о-нитрофенилсульфенилаланилглицина перекристаллизовывают из абс. метанола. Выход — 51% , T_{пл} — 123-125°C.

2.2.7. Синтез производных пептидов методом активированных эфиров

Получение и-нитрофениловых эфиров кбз-аминокислот

К 0,2-0,5 молярному раствору кбз-аминокислоты в этилацетате добавляют и-нитрофенол (20% - избыток от рассчитанного количества), охлаждают до 0°C и добавляют рассчитанное количество дициклогексилкарбодиимида.

Смесь выдерживают 30 мин при 0°C и 1 час при комнатной температуре. Через 1 час 30 мин дициклогексилмочевину отфильтровывают и промывают этилацетатом. Объединенные фильтраты упаривают в вакууме досуха, кристаллический остаток перекристаллизовывают из горячего этанола.

Этиловый эфир кбз-лейцилглицина

7,74 г (0,02 моля) и-нитрофенилового эфира кбз-лейцина ($T_{пл}$ - 95 °C) добавляют к раствору, приготовленному из 3,36 г (0,027 моля) гидрохлорида этилового эфира глицина и 3,5 мл (0,027 моля) триэтиламина в 20 мл хлороформа. Раствор оставляют на ночь при комнатной температуре. После удаления растворителя в вакууме к остатку добавляют этилацетат и воду. Органический слой промывают водой, 1н раствором аммиака, 1н HCl и снова водой. После удаления этилацетата получают кристаллическое вещество, которое перекристаллизовывают из разбавленного этанола. Выход этилового эфира кбз-лейцилглицина - 73,5%, $T_{пл}$ - 94-95°C.

Метиловый эфир кбз-глицилглицина

Получают по вышеописанной методике с выходом 70%, $T_{пл}$ 63-65°C из и-нитрофенилового эфира кбз-глицина ($T_{пл}$ - 128°C) и гидрохлорида метилового эфира глицина.

2.2.8. Получение ацилированных пептидов

Кбз-глицилглицин

5,5 г (0,02 моля) метилового эфира кбз-глицилглицина растворяют в 50 мл абс. метанола и к раствору добавляют 13,8 мл (0,028 моля) 2н раствора едкого натра. После часового выдерживания раствора при комнатной температуре его разбавляют водой, фильтруют и подкисляют 2н HCl по конго.

Осадок отфильтровывают, промывают водой и эфиром. Вещество перекристаллизовывают из горячего безводного метанола. Выход кбз-глицилглицина - 93%, $T_{\text{пл}}$ - 178°C.

2.2.9. Удаление N-защитных групп

Удаление карбобензоксизащиты

Кбз-пептид растворяют в десятикратном объеме безводного метанола, добавляют палладиевой черни, несколько капель уксусной кислоты и гидрируют в течение нескольких часов.

Полнота удаления кбз-защиты проверяется хроматографически.

По окончании гидрирования раствор отфильтровывают от катализатора и упаривают в вакууме.

Удаление формильной защиты

Метилловый эфир лейцил-№2-кбз-лизина

100 мг (0,2 ммоль) метилового эфира формиллейцин-№1-кбз-лизина растворяют в 0,4 мл 1н метанольного раствора хлороводорода.

Через 12 часов растворитель упаривают в вакууме, а сухой остаток несколько раз обрабатывают водой с последующей отгонкой в вакууме. Остаток растворяют в метаноле и добавлением триэтиламина доводят рН среды до 9.

Выпавший солянокислый триэтиламин отфильтровывают, фильтрат упаривают досуха в вакууме. Остаток растворяют в метаноле и пептид осаждают эфиром. Выход метилового эфира лейцил-г^α-кбз-лизина - 53%, $T_{\text{пл}}$ - 98°C.

Удаление тритильной группы

Глицилглицин

Суспензию 0,005 моля тритилглицилглицина в 5 мл 50%-ной уксусной кислоты нагревают в течение 1-2 мин на кипящей водяной бане, причем при этом происходит растворение исходного соединения и осаждение трифенилкарбинола. Добавляют воду, трифенилкарбинол отфильтровывают и фильтрат выпаривают в вакууме досуха. После обработки остатка этанолом и последующего фильтрования с выходом 94% получают нужный дипептид.

2.3. Синтез и выделение аминокислот из природного сырья

2.3.1. Глицин

В круглодонную колбу, снабженную нисходящим холодильником и термометром, доходящим почти до дна колбы, помещают 22,5 г карбоната аммония, 10 мл конц. водного раствора аммиака, 5 мл воды и осторожно нагревают на водяной бане до 55°C. При этой температуре в течение 15 мин медленно добавляют раствор 5 г монохлоруксусной кислоты, содержащей 95% чистого вещества, в 4 мл воды. Температура реакционной смеси не должна превышать 60°C. При этой температуре смесь нагревают в течение 4 часов. Затем постепенно повышают температуру до 80°C и отгоняют аммиак и диоксид углерода в приемник с водой. После чего смесь нагревают на пламени горелки, пока температура жидкости не достигнет 112°C. После чего добавляют 0,1 г активированного угля, кипятят 10 мин и отфильтровывают горячую жидкость. Фильтрат (около 10 мл) охлаждают до 70°C и смешивают с 40 мл этилового спирта. Через несколько часов образуются кристаллы сырого продукта. Полученный глицин очищают суспендированием в течение 2 часов с 20 мл этилового спирта и отсасывают на воронке Бюхнера. Выход - 2,5 г (64% от теоретического).

Полученный продукт загрязнен хлоридом аммония. Для окончательной очистки аминоксусную кислоту растворяют в небольшом количестве воды (5-7 мл), нагревают до слабого кипения с небольшим количеством активированного угля и фильтруют в горячем виде. При добавлении 75 мл этилового спирта кислота выпадает в осадок, который отфильтровывают и промывают на фильтре 5 мл этилового спирта.

Аминоксусная кислота (глицин) - белое кристаллическое вещество с $T_{пл}$ 232-236°C, трудно растворяется в этиловом спирте (0,43 г в 100 мл при 25°C), хорошо - в воде (25,3 г в 100 мл при 25°C).

2.3.2. DL-аланин

В колбу с притертой пробкой емкостью 400 мл наливают 300 мл конц. аммиака, охлаждают до 1-4°C и медленно при перемешивании приливают 10 г холодной α -бромпропионовой кислоты. Смесь выдерживают 4 суток, затем раствор упаривают в вакууме до 20 мл, фильтруют и фильтрат разбавляют пятикратным количеством метилового спирта. После стояния в течение ночи в холодильнике (0-4°C) выпавшие кристаллы отсасывают и промывают 25 мл холодного метилового спирта и затем 25 мл эфира. Выход сырого аланина - 4-5 г.

Для очистки продукт растворяют в 20 мл воды, добавляют 100 мл метилового спирта и смесь для кристаллизации оставляют на ночь в холодильнике. Затем кристаллы отсасывают и промывают.

Выход чистого Д1-аланина 3,5-4 г (65-70% от теоретического), $T_{пл}$ - 285°C (с разложением).

2.3.3. L-глутаминовая кислота из клейковины муки

100 г пшеничной муки делят на четыре равные порции, каждую из которых замешивают с 15 мл воды в плотный шарик теста и отставляют на 20 мин. Клейковину муки отмывают от крахмала. Для этого шарик теста разминают пальцами под непрерывной струей воды над тонким шелковым ситом, следя за тем, чтобы не было потерь кусочков. Промывание клейковины продолжают до тех пор, пока вода, стекающая с пальцев, не будет прозрачной. Отмытую вязкую клейковину растягивают тонким слоем на стеклянной пластинке или часовом стекле и сушат при 105°C.

Так обрабатывают все четыре шарика заготовленного теста.

В круглодонную колбу емкостью 100 мл переносят 12 г сухой растертой в порошок клейковины и заливают 35 мл конц. HCl. Смесь нагревают 6 часов под тягой на кипящей водяной бане, присоединив к колбе обратный холодильник. После этого колбу оставляют на ночь, затем гидролизат разбавляют вдвое водой и отфильтровывают через воронку Бюхнера.

В раствор вносят 3-4 г активированного угля, кипятят 15 мин, отстаивают и фильтруют. Фильтрат упаривают в фарфоровой чашке на водяной бане примерно до одной трети исходного объема. Жидкость переливают в коническую колбочку, охлаждают ее льдом и насыщают раствор хлористым водородом. Перемешивая смесь стеклянной палочкой, вызывают появление кристаллов гидрохлорида глутаминовой кислоты. Оставляют смесь на ночь в холодильнике. Образовавшиеся кристаллы отсасывают на воронке со стеклянным фильтром и высушивают на воздухе.

Чтобы выделить свободную глутаминовую кислоту, гидрохлорид растирают в ступке, добавив к нему половинное по массе количество анилина. Образовавшуюся густую массу разбавляют двойным объемом воды и переносят в фарфоровую чашку. Ступку споласкивают минимальной порцией воды. Смесь глутаминовой кислоты и водного раствора хлористоводородной соли анилина нагревают 10 мин на кипящей водяной бане. После охлаждения осторожно сливают жидкость. В остаток наливают 15 мл спирта и растирают. Образовавшийся осадок фильтруют на воронке Бюх-

нера и промывают спиртом. Полученную глутаминовую кислоту высушивают в эксикаторе над хлористым кальцием.

Выход - 25% от массы исходной клейковины, $T_{пл}$ - 224-225°C.

2.3.4. Цистин из шерсти

Сырую овечью шерсть освобождают от механических загрязнений, промывают слегка теплым мыльным раствором, тщательно прополаскивают дистиллированной водой и просушивают.

В 2-литровую круглодонную колбу помещают 200 г подготовленной шерсти, заливают 400 мл 20%-ной HCl и, снабдив колбу обратным холодильником, проводят гидролиз, нагревая смесь 5-6 часов до равномерного кипения. Процесс считают законченным, когда проба гидролизата покажет отрицательную биуретовую реакцию, для этого небольшое количество гидролизата сильно подщелачивают гидроксидом натрия и добавляют две-три капли 1%-ного раствора сульфата меди; фиолетовая окраска не должна появляться.

Горячую массу фильтруют, остаток на фильтрате промывают дистиллированной водой. В фильтрат, объединенный с промывными водами, добавляют кристаллический ацетат натрия до тех пор, пока проба на минеральную кислоту не станет отрицательной по конго. Уксуснокислый раствор оставляют на двое суток в холодильнике для кристаллизации цистина. Выпавшие кристаллы отфильтровывают. Чтобы очистить сырой цистин от пигментов, его растворяют в возможно малом количестве кипящей 3%-ной HCl и повторным кипячением с новыми порциями активированного угля полностью обесцвечивают (требуется от двух до пяти обработок каждый раз с 2 г угля).

Бесцветный или слегка желтоватый раствор фильтруют горячим через складчатый фильтр и добавляют профильтрованный насыщенный раствор ацетата натрия (40-50 г) до отрицательной реакции по конго. По мере охлаждения начинает кристаллизоваться цистин. Через 5-6 часов его отфильтровывают и дважды промывают горячей водой (для удаления остатков тирозина). Выход около - 5 г, $T_{ц}$ - 258-261°C.

2.3.5. Тирозин из молока

Выделение казеина. 1 л цельного молока разбавляют 2 л дистиллированной воды; к раствору прибавляют 6 мл уксусной кислоты. Полученную сыворотку отфильтровывают через ткань, хорошо отжимают и промывают один-два раза водой. Промытую сыворотку, содержащую казеин и жир,

растирают в фарфоровой чашке с небольшим объемом 1%-ного раствора едкого натра. Густую кашицу нейтрализуют, хорошо перемешивая раствором едкого натра той же концентрации (по фенолфталеину), и слабо подогревают. Раствор переливают в высокий стакан и оставляют на ночь. Всплывший на поверхности жир отделяют, а раствор отфильтровывают от остатков жира несколько раз через тонкое полотно (пока жидкость не будет лишь слегка мутной). Фильтрат снова подкисляют уксусной кислотой (6-10 мл), осадок казеина отцеживают, промывают, еще раз растворяют в щелочи и осаждают уксусной кислотой. Полученный таким образом казеин возможно полно отжимают, растирают с небольшим количеством спирта в пасту, отсасывают, промывают спиртом и эфиром; сушат на воздухе или в эксикаторе над серной кислотой. Сухой обезжиренный препарат казеина - белый аморфный порошок. Выход - 20-25 г.

Получение тирозина. В 0,5-литровой круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником, кипятят 16 часов всю порцию полученного казеина вместе с трехкратным весовым количеством 25%-ной серной кислоты. К окрашенной в темный цвет жидкости прибавляют насыщенный при нагревании раствор гидрата окиси бария до слабощелочной реакции по фенолфталеину. Чтобы осадить избыток ионов бария, пропускают углекислый газ. Отфильтрованный осадок смешивают с 200 мл воды и нагревают до кипения для растворения тирозина, увлеченного осадком, снова фильтруют и кипятят с небольшим количеством свежей воды. Затем отфильтровывают и промывают до отрицательной реакции Миллона (проба на тирозин). Фильтраты сливают вместе и до тех пор упаривают в фарфоровой чашке, пока не начнут выделяться кристаллы. Охлажденную массу фильтруют, маточный раствор снова упаривают до появления кристаллов тирозина; операцию повторяют два-три раза.

Выпавшие отдельные фракции кристаллов соединяют и перекристаллизовывают из горячей воды, добавляя активированный уголь.

Выход а-тирозина - около 0,8-1 г, $T_{пл}$ - 314-316°C.

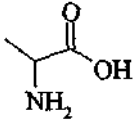
3. ЗАДАЧИ

1. Напишите структурные формулы следующих соединений:

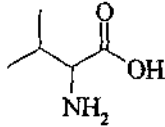
- а) глицин; б) серии; в) цистеин; г) глутаминовая кислота; д) пролин;
е) триптофан.

2. Назовите следующие соединения:

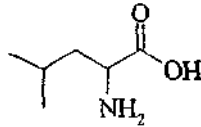
а)



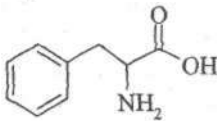
б)



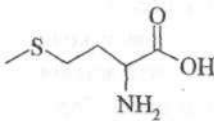
в)



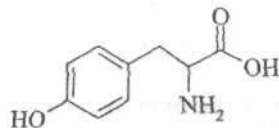
г)



д)



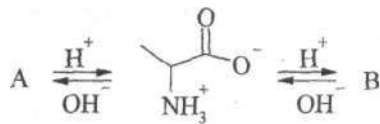
е)



3. Напишите проекционные формулы энантимеров аланина, валина, лейцина, изолейцина, треонина.

4. Представьте глицин, аланин, валин и лейцин в виде внутренних солей.

5. Рассмотрите равновесие биполярного иона аланина:



6. При очень высоких значениях pH раствора аминокислота обладает двумя основными центрами: $-\text{NH}_2$ и $-\text{COO}^-$.

Какой из них отличается более высокой основностью? Почему?

Что получилось бы в результате простого протонирования

$\text{H}_2\text{N}-\text{CHR}-\text{COO}^-$?

7. Укажите основные ионные формы для каждого из приведенных ниже соединений при pH 2:

- а) лейцин; б) лизин; в) глицин; г) глицилглицин.

8. Ниже даны изоэлектрические точки нескольких пептидов, а также величины их pK_1 и pK_2 (pK_1 указывает на кислотность группы $-COOH$, а pK_2 – на кислотность группы $-NH_3^+$). На основании этих данных укажите на взаимосвязь между pK_1 , pK_2 и pI .

Пептид	pK_1	pK_2	pI
Gly-Ala	3,15	8,23	5,69
Gly-Gly	3,14	8,25	5,70
Gly-Gly-Gly	3,23	8,09	5,66

9. Напишите уравнения реакций, при помощи которых можно осуществить следующие превращения:

- изокапроновая кислота \longrightarrow лейцин;
- изомасляный альдегид \longrightarrow валин;
- нитроэтан \longrightarrow аланин;
- втор*-бутилбромид \longrightarrow изолейцин.

10. Предложите схему синтеза аланина из этилена. Что произойдет с аланином при нагревании? Напишите для аланина реакции с азотистой кислотой, пятихлористым фосфором.

11. Приведите возможные схемы превращения ацетилен в *P*-аланин. Напишите для кислоты реакции с $NaOH$, HCl и PCl_5 .

12. Напишите реакцию глицина с хлорангидридом монохлоруксусной кислоты, полученное соединение обработайте аммиаком.

13. Используя в качестве исходного вещества ацетилен, предложите схемы получения:

- глицилглицина;
- глицилаланина.

14. К каким дипептидам приведет конденсация валина с изолейцином? Назовите их.

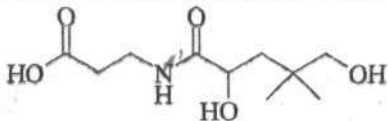
15. Как бы вы стали проводить классический синтез Ala-Gly и Gly-Ala-Gly?

16. Брадикинин - нонапептид, обладающий физиологической активностью. Он понижает кровяное давление, увеличивает проницаемость капилляров и вызывает ощущение боли. Он имеет следующую аминокислотную последовательность:

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg.

Какие трипептиды, содержащие фенилаланин, образуются при неполном гидролизе этого пептида?

17. Пантотеновая кислота – это витамин В₃:



Можно ли считать пантотеновую кислоту пептидом?

Систематическое название пантотеновой кислоты Щ(+)-М-(2,4-диокси-3,3-диметилбутирил)-р-аланин. Напишите структурную формулу (3-аланина).

Пантотеновую кислоту можно получить прямой конденсацией (3-аланина с оптически активной формой лактона 2,4-диокси-3,3-диметилмасляной кислоты, которую синтезируют из изомаляного альдегида. Напишите основные стадии синтеза пантотеновой кислоты, используя для этого любые необходимые реагенты.

18. При нагревании ос-аминокислоты глицина образуется дикетопиперазин (C₄H₆N₂O₂).

Однако при нагревании 3-аминомасляной кислоты, которая является Р-аминокислотой, возникает продукт А (C₄H₆O₂). Нагревание у-аминовалериановой кислоты дает лактам Б (C₃H₉NO).

Напишите структурные формулы дикетопиперазина, а также продуктов А и Б.

19. Объясните повышенную устойчивость в условиях кислотного гидролиза пептидных связей, образованных остатками изолейцина и валина.

20. При гидролизе пептида образуются следующие дипептиды: Glu-His, Asp-Glu, Phe-Val, Val-Asp.

Какова структура пептида?

21. Гастрины - гормоны, которые вызывают выделение желудочного сока у млекопитающих, содержат 17 аминокислотных остатков. В результате неполного гидролиза гастрина образуются следующие фрагменты:

- а) Gly-Gly-Pro-Trp;
- б) Leu-Glu-Glu-Glu;
- в) Glu-Glu-Ala-Ala-Tyr;
- г) Glu-Trp;
- д) Met-Asp-Phe;
- е) Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Ala-Tyr
- ж) Trp-Met.

N-концевой аминокислотой служит глутаминовая кислота, а C-концевой аминокислотой - фенилаланин. Какая структура согласуется с этими данными?

Примечание: пептид содержит по две из следующих кислот: аланин, глицин, триптофан. Кроме того, в его состав входит по одной из следующих аминокислот: аспарагиновая кислота, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин и тирозин.

22. При действии на пептид, состоящий из 17 аминокислотных остатков, трипсином гидролизуются связи, образованные карбоксильной группой лизина и аргинина, а при обработке бромцианом расщепляются связи, образованные карбоксильной группой метионина. При этом образовались следующие пептиды:

бромциановые пептиды:

Ala-Val-Met

Тыр-Asn-Lys-Val-Ile-Gly-Ser-Met

Ala-Phe-Arg-Ser-Glu-Val.

триптические пептиды:

Ala-Val-Met-Тыр-Asn-Lys;

Ser-Glu-Val

Val-Ile-Gly-Ser-Met-Ala-Phe-Arg.

Установите структуру исходного пептида.

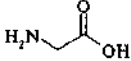
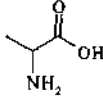
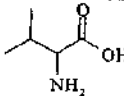
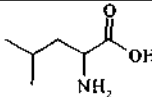
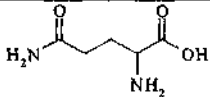
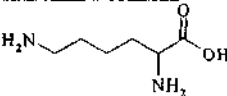
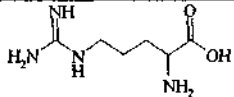
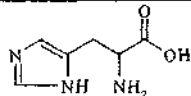
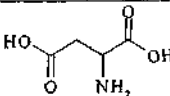
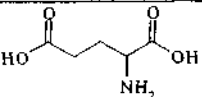
Рекомендуемый библиографический список

1. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1985.
2. Ленинджер А. Основы биохимии. Т.1. М.: Мир, 1985.
3. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987.
4. Гершкович А.А., Кибирев В.В. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наукова думка, 1987.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

Структура α-аминокислот, наиболее часто встречающихся в белках

Аминокислота	Условное обозначение		Структурная формула
	Трехбукв.	Однобукв.	
глицин	Gly	G	
аланин	Ala	A	
валин	Val	V	
лейцин	Leu	L	
глутамин	Gln	Q	
лизин	Lys	K	
аргинин	Arg	R	
гистидин	His	H	
аспарагиновая кислота	Asp	D	
глутаминовая кислота	Glu	E	

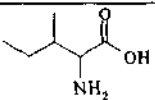
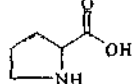
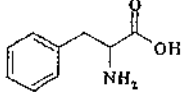
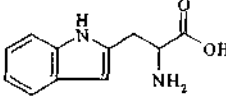
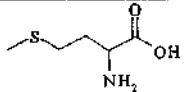
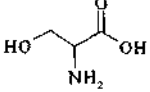
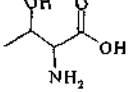
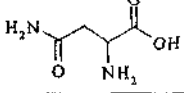
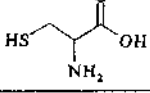
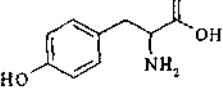


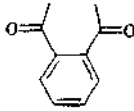

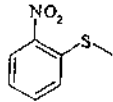
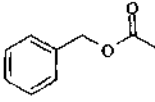
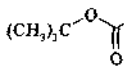
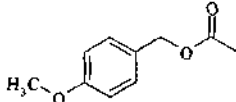
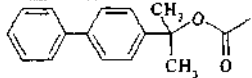
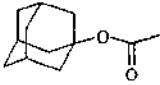
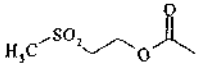
изолейцин	Ile	I	
пролин	Pro	P	
фенилаланин	Phe	F	
триптофан	Trp	W	
метионин	Met	M	
серин	Ser	S	
треонин	Thr	T	
аспарагин	Asn	N	
цистеин	Cys	C	
н. тирозин	Tyr	Y	

Таблица 2

NH₂-защитные группы

Группа	Формула	Сокращение	Условия отщепления
формильная		Form	1н HCl/CH ₃ OH; гидразиндиацетат в CH ₃ OH; фенилгидразин
трифторацетильная		Tfa	0,2н NaOH; разб. NH ₄ OH
фталильная		Phl	гидразинолиз
<i>n</i> -толуол-сульфонильная (тозилъная)		Tos	Na/NH ₃
о-нитрофенил-сульфонильная		Nps	мягкий ацидолиз; тиолиз (тиоацетамид; тиогликолевая кисл.)
бензилокси-карбонильная (карбо-бензокси)		Z	H ₂ /Pd; HBr/CF ₃ COOH; HF
<i>t</i> -бутилокси-карбонильная		Boc	CF ₃ COOH; 2н.HCl/диоксан; BF ₃ ·Et ₂ O/CH ₃ COOH; HF; COOH
<i>n</i> -метоксибензилокси-карбонильная		Mz	То же
2-(4-бифенил)-пропил-2-окси-карбонильная		Bpsc	1% CF ₃ COOH
1-адамантилокси-карбонильная		Adoc	CF ₃ COOH
метилсульфонил-этилокси-карбонильная		Msc	NaOH, pH 10-12, 0°C

α,α-диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильная		Ddz	5% CF ₃ COOH, фотолит
9-флуоренил-метилоксикарбонильная		Fmoc	морфолин или пиперидин в диметилформамиде

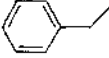

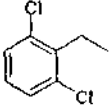
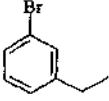

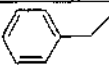
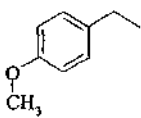
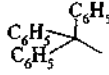
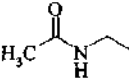
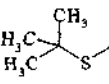
Таблица 3

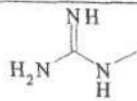
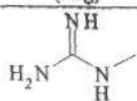
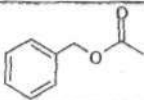
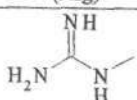
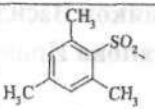
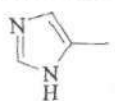
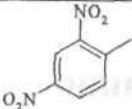
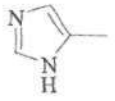

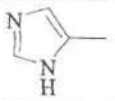
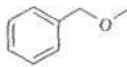
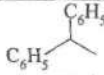
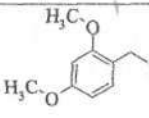
COOH-защитные группы

Сложный эфир	Формула	Сокращение	Условия отщепления
бензиловый		OBzl	H ₂ /Pd; OH ⁻
<i>n</i> -нитробензиловый		OBzl(NO ₂)	H ₂ /Pd; OH ⁻
<i>m</i> -метоксибензиловый		OBzl(oMe)	CF ₃ COOH, 0°C, H ₂ /Pd
<i>t</i> -бутиловый		OBu ^t	CF ₃ COOH; HCl/CH ₂ Cl ₂
4-пиколиловый		OPic	OH ⁻ ; H ₂ /Pd; Na/NH ₃
фенациловый		OPac	H ₂ /Pd; тиофенолят натрия
9-флуоренил-метилый		OFm	10% пиперидин; вторичные или третичные амины в диметилформамиде
фениловый		OPh	OH ⁻ /H ₂ O ₂ (pH 10,5)

Таблица 4

Защита функциональных групп

Защищаемая группа	Блокирующая ρ' группа	Формула	Сокращение	Условия отщепления
-OH (Ser; Thr; Tyr)	бензильная		Bzl	H ₂ /Pd; HF/; CF ₃ COOH
-OH (Ser; Thr; Tyr)	<i>t</i> -бутильная		Bu ^t	HF/анизол
-OH(Tyr)	2,6-дихлор-бензильная		Cl ₂ Bzl	HF/анизол (0°C, 30 мин)
-OH(Tyr)	3-бром-бензильная		BrBzl	HF/анизол (0°C, 30 мин)
-OH(Tyr)	циклогексильная		cHex	HF/анизол (0°C, 30 мин)
-SH(Cys)	бензильная		Bzl	Na/NH ₃ ; HF/анизол
-SH(Cys)	<i>p</i> -метокси-бензильная		MBzl	HF/анизол (0°C, 30 мин); CF ₃ COOH/ Hg ²⁺
-SH(Cys)	трифилльная		Trt	соли Hg ²⁺ , Ag ⁺ ; CF ₃ COOH - CH ₃ CH ₂ SH
-SH(Cys)	ацетидамидо-метильная		AcM	соли Hg ²⁺ ; (20°C, 60 мин, pH 4)
-SH(Cys)	<i>t</i> -бутилтио		SBu	тиолиз (тиофенол; HSCH ₂ COOH)

 (Arg)	N ^o -нитро	-NO ₂	NO ₂	H ₂ /Pd; Na/NH ₃ ; HF/анизол
 (Arg)	N ^o -моно- или N ^o , ^δ -дипенил- оксикарбониль- ная		Z	H ₂ /Pd; HBr/CH ₃ COO H
 (Arg)	мезитилен-2- сульфонильная		Mts	HF/анизол; CF ₃ COOH; CH ₃ SO ₃ H
	динитрофениль- ная		Dnp	тиолиз
	тозильная		Tos	HF (0°C, 30 мин)
	N-бензилокси- метильная		Bom	H ₂ /Pd
-CONH ₂ (Asn, Gln)	бензогидрильная		Bzh	HF/анизол
-CONH ₂ (Asn, Gln)	2,4-диметокси- бензильная		Dml	HF/анизол; CF ₃ COOH/ анизол

Учебное издание

**Пурьгин Петр Петрович,
Вишняков Василий Валерьевич,
Потапова Ирина Анатольевна**

ХИМИЯ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

Учебное пособие

Редактор Т.А. Мурзинова
Компьютерная верстка, макет Н.П. Бариновой

Подписано в печать 17.11.10. Гарнитура Times New Roman. Формат 60х84/16.
Бумага офсетная. Печать оперативная.
Усл.-печ. л. 4,2, уч.-изд. л. 4,5. Тираж 100 экз. Заказ №1920
Издательство «Самарский университет», 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.
Тел. 8 (846) 334-54-23
Отпечатано на УОП СамГУ