



УДК 547.466'26.057

АКТИВАЦИЯ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ПИРОКАРБОНАТАМИ. АЦИЛИРОВАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ГИДРОКСИЛЬНЫХ ГРУПП С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ ДИ-*трет*- БУТИЛПИРОКАРБОНАТ — ПИРИДИН В КАЧЕСТВЕ КОНДЕНСИРУЮЩЕГО РЕАГЕНТА

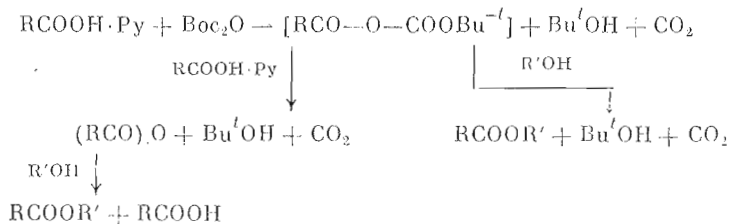
Иозднев В. Ф.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР, Москва

Разработан простой метод получения сложных эфиров конденсацией N-защищенных аминокислот с первичными спиртами с использованием ди-*трет*-бутилпирокарбоната в качестве конденсирующего реагента (в присутствии пиридина). Показано, что оптически активные аминокислоты при этом не рацемизируются. Метод пригоден также для ацилирования полимеров, содержащих первичные спиртовые группы.

Ди-*трет*-бутилпирокарбонат (Coc_2O) в последние годы находит широкое применение в качестве реагента для введения *трет*-бутилоксикарбонильной (Coc) защитной группировки [1—5]. Особенно эффективен Coc_2O для получения Coc -аминокислот, причем реакцию Coc_2O с аминокислотами проводят в водно-органических растворах в присутствии оснований. Недавно было обнаружено [6], что в безводных апротонных растворителях в присутствии пиридина Coc_2O способен реагировать с карбоновыми кислотами (в том числе с N-защищенными аминокислотами) с образованием смешанных ангидридов, выделить которые в индивидуальном состоянии не удастся. По мере накопления в реакционной смеси они реагируют с исходной кислотой и превращаются в симметричные ангидриды, которые при оптимальном соотношении реагентов можно получать с хорошими выходами. Дальнейшие исследования показали, что обнаруженные превращения Coc_2O при взаимодействии с карбоновыми кислотами не ограничиваются синтезом симметричных ангидридов. Если к реагирующей смеси Coc_2O и карбоновой кислоты добавить нуклеофильный реагент, который в условиях проведения реакции не взаимодействует с Coc_2O или взаимодействует медленнее, чем карбоновая кислота, то происходит ацилирование нуклеофильного реагента кислотой. Оказалось, что таким путем можно получать некоторые ариловые эфиры защищенных аминокислот, представляющие интерес для пептидного синтеза [7].

В настоящем сообщении приведены результаты исследования возможности использования Coc_2O в качестве конденсирующего реагента при получении эфиров N-защищенных аминокислот с первичными спиртами. Предполагается, что ацилирование первичных спиртов идет по схеме



Принятые сокращения: Bu^tOH — *трет*-бутиловый спирт, Py — пиридин, DMF — диметилформамид.

Смешанный ангидрид, образующийся на первой стадии реакции, может превратиться в сложный эфир двумя путями: 1) прореагировать с исходной кислотой с образованием симметричного ангидрида, из которого затем получается сложный эфир и регенерируется кислота, вновь реагирующая с Coc_2O ; 2) прореагировать со спиртом. Таким образом, кислота и спирт конкурируют между собой в реакции со смешанным ангидридом. Не исключено, что в некоторых случаях превращение смешанного ангидрида в сложный эфир происходит и тем и другим путем параллельно.

Следует отметить существенную роль пиридина в этих превращениях. При замене пиридина триэтиламиноом или *N*-метилморфолином смешанный ангидрид из Coc_2O и кислоты не образуется, хотя с другими диакилпирокарбонатами эта реакция идет и в присутствии *N*-метилморфолина [6]. Очевидно, в реакции Coc_2O с кислотами пиридин является не только основанием, но и катализатором ацильного переноса [8]. При этом пиридин не расходуется и не нейтрализуется, так что добавлять его в реакционную смесь можно в количестве, меньше эквивалентного.

В соответствии со схемой в результате реакции образуются 2 эквивалента *трет*-бутилового спирта, который теоретически может конкурировать с первичными спиртами в процессе этерификации кислоты. Однако из-за низкой реакционной способности *трет*-бутанола этого не происходит, хотя в некоторых случаях, по данным тонкослойной хроматографии, в реакционных смесях обнаруживаются примеси соединений, по подвижности соответствующие *трет*-бутиловым сложным эфирам.

Методика этерификации кислот первичными спиртами с использованием системы Coc_2O —пиридин в качестве конденсирующего реагента отличается мягкими условиями проведения реакции и простотой исполнения. Смесь кислоты, 0,2—1 эквивалента пиридина, 1,4—1,5 эквивалента спирта и Coc_2O в аprotонном растворителе (бензол, этилацетат, тетрагидрофуран или диметилформамид) при концентрации реагентов 0,5—1 М перемешивали при 15—20°С до прекращения выделения CO_2 и затем еще 2—3 ч. Практически смесь оставляли на ночь, хотя в большинстве случаев реакция заканчивается через 6—7 ч. Двоокись углерода собирали в газометр и по ее количеству контролировали прохождение реакции. Обработку реакционных смесей и выделение конечных продуктов осуществляли, как правило, экстракционным методом. Следует отметить, что в диметилформамиде реакция этерификации идет быстрее, чем в других растворителях.

Система Coc_2O —пиридин успешно использована для получения сложных эфиров *N*-защищенных аминокислот и некоторых спиртов безильного типа, представляющих интерес для пептидного синтеза. Новым методом получены бензиловые, 4-нитробензиловые, 9-флуоренилметилловые эфиры, причем в некоторых случаях с выходами более высокими, чем при использовании других методов. Хорошие результаты получены также при этерификации 2,2,2-трифторэтиловым и пропаргиловым спиртами. С несколько менее удовлетворительными результатами проходит ацилирование 4-пиридилкарбинола, но 3-пиридилметилловый эфир бензилоксикарбонил-*L*-фенилаланина образуется без осложнений, хотя трудно кристаллизуется, и поэтому выделен в виде гидрохлорида с выходом 89% [9]. Изучена также возможность ацилирования новым методом гидроксильных групп серина и тирозина. Как и следовало ожидать, этиловый эфир *N*-бензил-*L*-тирозина легко конденсируется с *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*- и *D*-фенилаланином. Продукты конденсации выделены в кристаллической форме и с высокими выходами. При ацилировании 4-нитробензилового эфира *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-серина (образованного из 4-нитробензилового эфира *L*-серина и Coc_2O) *N*-бензилоксикарбонил-*L*-фенилаланином депсипептид также получен в кристаллической форме с выходом 64%. Депсипептидные конъюгаты выделены в хроматографически гомогенном состоянии и охарактеризованы ИК-спектрами. Состав их подтвержден элементным анализом и щелочным гидролизом, в результате которого они полностью расщепляются с образова-

нием соответствующих N-замещенных аминокислот, идентифицированных тонкослойной хроматографией.

Для пептидного синтеза на полимерных носителях представляют интерес методы присоединения первой аминокислоты к гидроксилсодержащим полимерам. В связи с этим проверена возможность применения системы Vos_2O — пиридин для ацилирования N-*трет*-бутилоксикарбонил-аминокислотами гидроксиметилированного сополимера стирола с дивинилбензолом [10] и полиэтиленгликоля [11]. Оказалось, что при ацилировании гидроксиметилированного стирол-дивинилбензольного сополимера даже эквивалентным количеством Vos -аминокислоты и Vos_2O степень замещения гидроксильных групп составляет ~50% (0,5 ммоль аминокислоты на 1 г сухого полимера), а при ацилировании полиэтиленгликоля небольшим избытком (~1,5 эквивалента Vos -аминокислоты и Vos_2O) степень замещения гидроксильных групп близка к количественной.

Специального рассмотрения заслуживает вопрос о рацемизации оптически активных аминокислот при активации их карбоксильной группы системой Vos_2O — пиридин. Известно, что смешанные ангидриды N-алкилоксикарбонильных производных аминокислот с эфирами угольной кислоты в присутствии оснований средней силы достаточно устойчивы к рацемизации [12]. Но активация карбоксильной группы системой Vos_2O — пиридин, по-видимому, лишь отчасти проходит по механизму метода смешанных ангидридов, и не исключено, что основным ацилирующим агентом в этом случае являются симметричные ангидриды защищенных аминокислот. А склонность к рацемизации симметричных ангидридов может быть выше [13, 14], чем смешанных. Таким образом, вопрос о рацемизации при синтезе сложных эфиров с использованием Vos_2O в качестве конденсирующего реагента связан с механизмом процесса активации и решение его путем поиска аналогий в литературе [12, 13] невозможно. Сравнение физико-химических характеристик соединений, описанных ранее и полученных новым методом, также не дает однозначных результатов.

Для получения дополнительных данных о рацемизации Vos -аминокислот при активации их Vos_2O в присутствии пиридина использованы два теста. В первом 9-флуоренилметилловый эфир N-*трет*-бутилоксикарбонил-L-фенилаланина, полученный с помощью Vos_2O , обрабатывали раствором пирролидина в тетрагидрофуране, образовавшийся N-*трет*-бутилоксикарбонил-L-фенилаланин выделяли и превращали в кристаллическую соль с дициклогексиламином. Температура плавления и величина удельного вращения полученного образца оказались практически идентичны характеристикам дициклогексиламмонийной соли, выделенной из исходного *трет*-бутилоксикарбонил-L-фенилаланина.

Во втором тесте 2,2,2-трифторэтиловые эфиры N-*трет*-бутилоксикарбонил-L- и D-фенилаланина, полученные с помощью Vos_2O , дблокировали раствором хлористого водорода в ледяной уксусной кислоте и ацилировали хлорангидридом N-трифторацетил-L-пролина [15, 16]. Диастереомерный состав полученных защищенных дипептидов проанализирован методом ГЖХ. Найдено, что в L, L-дипептиде содержание L, D-формы не превышает 1% и, следовательно, образование 2,2,2-трифторэтилового эфира *трет*-бутилоксикарбонил-L-аланина с помощью Vos_2O проходит практически без рацемизации.

Таким образом, оба теста показали, что синтез сложных эфиров оптически активных N-*трет*-бутилоксикарбониламинокислот с помощью системы Vos_2O — пиридин не сопровождается заметной рацемизацией. Однако не исключено, что при активации с Vos_2O других N-защищенных аминокислот и при изменении условий реакции степень рацемизации может быть и выше. Поэтому полученные данные целесообразно рассматривать как предварительный результат, пока не будет проведено систематическое изучение этого вопроса.

Полученные в настоящей работе результаты убедительно свидетельствуют, что Vos_2O можно использовать не только в качестве донора *трет*-бутилоксикарбонильной защитной группировки, но и как реагент, активи-

вирующий карбоксильную группу. Новый метод ацилирования спиртов с применением системы Vos_2O — пиридин в качестве конденсирующего реагента дает, как правило, высокие выходы сложных эфиров, отличается простотой исполнения и мягкими условиями проведения процесса. По-видимому, он может представлять интерес не только для химии аминокислот и пептидов, но и для других разделов биоорганической химии, особенно в тех случаях, когда требуется этерифицировать карбоксильную группу в мягких условиях.

Экспериментальная часть

Состав реакционных смесей и индивидуальность полученных соединений контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254 в следующих системах растворителей: бензол — гептан — ацетон, 5:3:2 (А); бензол — ацетон — ледяная уксусная кислота, 100:50:1 (Б), пробег фронта растворителя 6 см. Детектирование Vos -аминокислот и эфиров Vos -аминокислот производили опрыскиванием 5% раствором пингидрина в смеси *n*-бутиловый спирт — муравьиная кислота (9:1) с последующим нагреванием. *N*-Бензилоксикарбонильные производные аминокислот на пластинках деблокировали 2 М раствором HBr в уксусной кислоте, нагревали при 100°C и обнаруживали с помощью раствора пингидрина. Удельное оптическое вращение измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 241 (Швеция). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР), ИК-спектры — на спектрометре Pye-Unicum SP 1000 (Англия).

Температуры плавления определяли в открытых капиллярах и не исправляли. Растворители для синтетических работ очищали по стандартным методикам. В работе использован Vos_2O , полученный по описанной ранее методике [17].

При стандартной обработке реакционных смесей растворы в этилацетате промывали водой, 5% раствором Na_2CO_3 , водой, 5% H_2SO_4 , водой, насыщенным раствором NaCl , высушивали MgSO_4 и упаривали в вакууме на роторном испарителе при 40°C . Конечные продукты высушивали 16–20 ч в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 и KOH .

Бензиловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил-O-бензил-L-тирозина (I). Раствор 1,85 г (5 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонил-O-бензил-L-тирозина, 0,6 мл бензинового спирта, 0,25 мл пиридина и 1,5 мл (6,8 ммоль) Vos_2O в 5 мл этилацетата перемешивали 16 ч, разбавляли этилацетатом до 40 мл и после стандартной обработки остаток кристаллизовали из смеси эфира с петролейным эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали гексаном и после высушивания получали 1,8 г (81%) соединения (I), R_f 0,56 (А), т. пл. $81\text{--}82^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} -15,4^\circ$ (c 1, DMF). Найдено, %: С 71,35; Н 6,92; N 3,65. $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{NO}_4$. Вычислено, %: С 71,16; Н 6,82; N 3,95.

Бензиловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил-L-триптофана (II). Раствор 0,56 г (0,20 ммоль) *N*-трет-бутилоксикарбонил-L-триптофана, 0,25 мл бензинового спирта, 0,1 мл пиридина и 0,55 мл (0,25 ммоль) Vos_2O в 3 мл тетрагидрофурана перемешивали 5 ч, разбавляли этилацетатом до 30 мл и после стандартной обработки остаток перекристаллизовывали из эфира с гексаном. Получили 0,62 г (83%) соединения (II), R_f 0,40 (А), т. пл. $139\text{--}140^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} -8,7^\circ$ (c 1, MeOH). Лит. данные [18]: т. пл. $136\text{--}137^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{578}^{20} -9^\circ$ (c 1, MeOH).

4-Нитробензиловый эфир N-бензилоксикарбонил-L-аланина (III). Раствор 1,2 г (5,4 ммоль) *N*-бензилоксикарбонил-L-аланина, 0,9 г (5,8 ммоль) 4-нитробензинового спирта, 0,5 мл пиридина и 1,5 мл (6,8 ммоль) Vos_2O в 10 мл бензола перемешивали 7 ч (по данным ТСХ, Z-Ala-OH прореагировал полностью), разбавляли этилацетатом до 30 мл и после стандартной обработки кристаллический остаток растирали в смеси эфира с петролейным эфиром. Осадок отфильтровывали, промывали гексаном и высушивали. Выход эфира (III) 1,6 г (83%), R_f 0,45 (А), т. пл. $99\text{--}100^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} -18,0^\circ$ (c 1, MeOH). Лит. данные [19]: т. пл. $98\text{--}99^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} -16,8$ (c 1, MeOH).

9-Флуоренилметиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*L*-аланина (IV). Раствор 1,1 г (5,0 ммоль) *N*-бензилоксикарбонил-*L*-аланина, 1,0 г (5,1 ммоль) 9-флуоренилкарбинола, 0,25 мл пиридина и 1,4 мл (6,4 ммоль) $\text{Вос}_2\text{O}$ в 7 мл тетрагидрофурана перемешивали 5 ч, разбавляли этилацетатом и после стандартной обработки остаток растворяли в бензоле, раствор упаривали и остаток кристаллизовали из смеси четыреххлористого углерода с петролейным эфиром. Выход эфира (IV) 1,5 г (74%), R_f 0,51 (A), т. пл. 80–83°С. После перекристаллизации из метанола т. пл. 93–95°С, $[\alpha]_D^{20}$ –32,1° (*c* 1, MeOH). Лит. данные [20]: т. пл. 90–91°С, $[\alpha]_D^{20}$ –38,1° (*c* 1, MeOH).

9-Флуоренилметиловый эфир *N*-трет-бутилоксикарбонил-*L*-фенилаланина (V). Раствор 1,3 г (4,9 ммоль) трет-бутилоксикарбонил-*L*-фенилаланина, 1,2 г (6,1 ммоль) флуоренилкарбинола, 0,4 мл пиридина и 1,5 мл (6,8 ммоль) $\text{Вос}_2\text{O}$ в 10 мл бензола перемешивали 5 ч, причем выпадал кристаллический осадок. Смесь разбавляли петролейным эфиром до 20 мл, осадок отфильтровывали, промывали гексаном и высушивали. Выход эфира (V) 1,5 г (67%), т. пл. 124–125°С. Фильтрат разбавляли этилацетатом и после стандартной обработки кристаллический остаток растирали в петролейном эфире и получали вторую порцию эфира (V). Выход 0,5 г, т. пл. 123–124°С. Общий выход 89%. После перекристаллизации из метанола получили 1,8 г эфира (V), R_f 0,72 (A), т. пл. 125–126°С, $[\alpha]_D^{20}$ –6,5° (*c* 1, CHCl_3). ИК-спектр (в KBr, ν , см^{-1}): 3365 (NH), 1735 (C=O), 1695 (NC=O), 1535 (NH). Лит. данные [20, 21]: т. пл. 125–126°С, $[\alpha]_D^{20}$ –6° (*c* 0,8, CHCl_3).

Тест на рацемизацию. К раствору 0,4 г соединения (V) в 3 мл тетрагидрофурана добавляли 0,3 мл пирролидина, смесь выдерживали 30 мин (по данным ТСХ, соединение (V) в смеси отсутствовало), разбавляли этилацетатом до 25 мл, промывали 1 М раствором Na_2CO_3 (2×15 мл). Экстракт подкисляли лимонной кислотой, экстрагировали этилацетатом (2×15 мл), промывали раствором NaCl, высушивали MgSO_4 и упаривали. Остаток растворяли в эфире, добавляли 0,2 мл дициклогексиламин, осадок отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали. Получали дициклогексиламмонийную соль трет-бутилоксикарбонил-*L*-фенилаланина с т. пл. 213–215°С, $[\alpha]_D^{20}$ +28,3° (*c* 1, MeOH).

Дициклогексиламмонийная соль, полученная из исходного трет-бутилоксикарбонил-*L*-фенилаланина, имеет т. пл. 214–215°С, $[\alpha]_D^{20}$ +28,5° (*c* 1, MeOH).

4-Пиридилметиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*L*-аланина (VI). Раствор 1,1 г (0,5 ммоль) бензилоксикарбонил-*L*-аланина, 0,6 г (5,5 ммоль) 4-пиридилкарбинола и 1,3 мл (6,0 ммоль) $\text{Вос}_2\text{O}$ в 10 мл тетрагидрофурана перемешивали 16 ч, причем смесь интенсивно окрашивалась. Разбавляли 20 мл 1 М HCl, экстрагировали 15 мл эфира, эфирный раствор промывали 5 мл 1 М HCl, водой. Кислотный экстракт подщелачивали Na_2CO_3 , экстрагировали этилацетатом (2×20 мл), экстракт промывали водой, раствором NaCl, высушивали и упаривали. Остаток кристаллизовали из эфира. Выход соединения (VI) 0,9 г (57%), R_f 0,33 (B), т. пл. 104–105°С, $[\alpha]_D^{20}$ –20,4° (*c* 1, DMF). Лит. данные [22]: т. пл. 111–112°С, $[\alpha]_D^{20}$ –24,2° (*c* 1, DMF).

3-Пиридилметиловый эфир *N*-бензилоксикарбонил-*L*-фенилаланина (VII). Раствор 1,5 г (5,0 ммоль) бензилоксикарбонил-*L*-фенилаланина 0,5 мл (5,2 ммоль) 3-пиридилкарбинола, 1,5 мл (6,9 ммоль) $\text{Вос}_2\text{O}$ и 0,4 мл пиридина в 5 мл тетрагидрофурана перемешивали 10 ч и разбавляли этилацетатом до 30 мл. Раствор промывали водой, 10 мл 5% лимонной кислоты, 5% раствором Na_2CO_3 , насыщенным раствором NaCl и высушивали MgSO_4 . Упаривали, остаток растворяли в 15 мл сухого эфира и добавляли 5 мл 2 М раствора HCl в диоксане. Маслообразный осадок растирали в охлажденном эфире до полной кристаллизации, отфильтровывали, высушивали и получали 1,9 г (89%) хлоргидрата соединения (VII). R_f 0,42 (B), т. пл. 138–140°С, $[\alpha]_D^{20}$ –10,0 (*c* 1, MeOH). ИК-спектр

(в КВг, ν , см^{-1}): 3430 (NH), 2480 (гидрохлорид пиридина), 1745 (OC=O), 1715 (NC=O). Найдено, %: С 61,58; Н 6,0; N 7,21; Cl 9,2. $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{HCl}$. Вычислено, %: С 61,44; Н 5,67; N 7,16; Cl 9,1.

Пропаргиловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил-L-4-нитрофенилаланина (VIII). Раствор 1,5 г (5,0 ммоль) трет-бутилоксикарбонил-L-4-нитрофенилаланина, 0,35 мл (5,9 ммоль) пропаргилового спирта, 0,25 мл пиридина и 1,4 мл (6,4 ммоль) $\text{Вос}_2\text{O}$ в 5 мл этилацетата перемешивали 16 ч, разбавляли этилацетатом до 30 мл и после стандартной обработки остаток кристаллизовали из смеси эфира с гексаном. Осадок отфильтровывали, высушивали и получали 1,3 г (75%) соединения (VIII) с т. пл. 65–66° С. Из фильтрата после упаривания и дополнительной кристаллизации остатка получали вторую порцию с т. пл. 64–65° С. Общ. выход 1,7 г (97%). После перекристаллизации из эфира с петролейным эфиром т. пл. 66–67° С, $[\alpha]_D^{20} -38,4^\circ$ (с 1, DMF). УФ-спектр в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 278 ($10,1 \cdot 10^3$). ИК-спектр (в КВг, ν , см^{-1}): 3360 (NH), 3270 (C=CH), 2100 (C=C), 1750 (OC=O), 1690 (NC=O), 1520 (NH). Найдено, %: С 58,31; Н 6,02; N 7,78. $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_8$. Вычислено, %: С 58,61; Н 5,78; N 8,03.

2,2,2-Трифторэтиловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил-L-аланина (IX). Раствор 1,0 г (5,3 ммоль) трет-бутилоксикарбонил-L-аланина, 0,25 мл пиридина, 0,62 мл (8,6 ммоль) трифторэтанола и 1,3 мл (6,0 ммоль) $\text{Вос}_2\text{O}$ в 5 мл этилацетата перемешивали 16 ч, разбавляли этилацетатом до 30 мл и после стандартной обработки остаток кристаллизовали из гексана. Выход соединения (IX) 1,3 (90%), R_f 0,56 (А), т. пл. 50–51° С, $[\alpha]_D^{20} -36,6^\circ$ (с 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). ИК-спектр (в КВг, ν , см^{-1}): 3400 (NH), 1770 (OC=O), 1695 (NC=O), 1530 (NH). Найдено, %: N 5,19; F 21,10. $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NO}_3$. Вычислено, %: N 5,16; F 21,0.

2,2,2-Трифторэтиловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил-D-аланина (X). Соединение (X) получено аналогично соединению (IX). Выход 89%, т. пл. 49–50° С, $[\alpha]_D^{20} +34,9^\circ$ (с 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

2,2,2-Трифторэтиловый эфир N-трифторацетил-L-пролил-L-аланина (XI). а) Раствор 1,0 г соединения (IX) в 15 мл 1 М HCl в ледяной уксусной кислоте выдерживали 1 ч при 20° С, упаривали в вакууме, остаток растирали в эфире, осадок отфильтровывали, высушивали и получали 0,7 г хлоргидрата трифторэтилового эфира L-аланина (IXa) с т. пл. 205–206° С, $[\alpha]_D^{20} +4,3^\circ$ (с 1, MeOH).

б) К суспензии 0,5 г соединения (IXa) в 10 мл тетрагидрофурана при перемешивании и охлаждении (0–5° С) добавляли порциями хлорангидрид N-трифторацетил-L-пролина [16] и N-метилморфолин до исчезновения эфира (IXa) в реакционной смеси (контроль методом ТСХ в системе ацетонитрил – конц. аммиак, 9:1). Реакционную смесь фильтровали, фильтрат упаривали, остаток растворяли в этилацетате и после стандартной обработки остаток кристаллизовали растиранием в гексане. Осадок отфильтровывали, промывали гексаном и высушивали. Выход дипептида (XI) 0,45 г (51%), R_f 0,27 (А), т. пл. 91–92° С $[\alpha]_D^{20} -88,5^\circ$ (с 1, MeOH). ИК-спектр (в КВг, ν , см^{-1}): 3360 (NH), 1760 (OC=O), 1695 (NC=O), 1540 (NH). Найдено, %: N 7,90; F 31,52. $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_4$. Вычислено, %: N 7,71; F 31,38. Из фильтрата после упаривания получали еще порцию соединения (XI). Выход 0,4 г, R_f 0,27 (А). Общ. выход 91%.

2,2,2-Трифторэтиловый эфир N-трифторацетил-L-пролил-D-аланина (XII). Дипептид (XII) получен аналогично дипептиду (XI) из хлоргидрата трифторэтилового эфира D-аланина (т. пл. 201–203° С, $[\alpha]^{20} -4,2^\circ$ (с 1, MeOH)). Т. пл. 122–123° С, $[\alpha]_D^{20} -51,7^\circ$ (с 1, MeOH).

Исследование диастереомерного состава дипептидов (XI) и (XII) методом ГЖХ. Анализ проводили на хроматографе ЛХМ 8М. Колонка из нержавеющей стали 200×0,3 см с 3% политриэтиленгликольсукцинатом на хроматоне Н-гексамегилдисилазан. Температура колонки 200° С, газ-носитель – гелий, скорость 40 мл/мин. Детектор пламенно-ионизационный. В этих условиях время удерживания дипептида (XI) 225 с, дипептида (XII) – 180 с. В результате анализа установлено, что содержание дипептида (XII) в обеих порциях дипептида (XI) менее 1%.

2,2,2-Трифторэтиловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил-L-4-нитрофенилаланина (XIII). Раствор 1,5 г (5,0 ммоль) трет-бутилоксикарбонил-L-4-нитрофенилаланина, 0,25 мл пиридина, 0,62 мл трифторэтанола и 1,3 мл (6,0 ммоль) Wos_2O в 5 мл этилацетата перемешивали 16 ч, разбавляли этилацетатом до 30 мл и после стандартной обработки кристаллический остаток перекристаллизовывали из смеси эфира с гексаном. Выход эфира (XIII) 1,7 г (86%), R_f 0,52 (A), т. пл. 106–107° С, $[\alpha]_D^{20}$ –22,8° (с 1, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$). УФ-спектр в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ): 278 (10,6·10³). ИК-спектр (в KBr, ν , см⁻¹): 3370 (NH), 1760 (OC=O), 1690 (NC=O), 1540 (NH), 1360 (NO₂). Найдено, %: N 7,35; F 14,2. $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$. Вычислено, %: N 7,14; F 14,5.

4-Нитробензиловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил-L-серина (XIV). К раствору 2,0 г (5,0 ммоль) толуолсульфоната 4-нитробензинового эфира L-серина и 1,2 мл (5,5 ммоль) Wos_2O в 10 мл диметилформамида при перемешивании добавляли порциями в течение 20 мин раствор 0,8 мл (5,7 ммоль) триэтиламина в 3 мл этилацетата. Смесь перемешивали 3 ч, затем разбавляли этилацетатом до 30 мл и после стандартной обработки остаток растирали в гексане. Осадок отфильтровывали и высушивали. Выход соединения (XIV) 1,4 г (86%), R_f 0,24 (A), 0,63 (B), т. пл. 85–90° С. После перекристаллизации из бензола т. пл. 99–100° С, $[\alpha]_D^{20}$ –6,0° (с 1, CHCl_3). Лит. данные [23]: т. пл. 100–103° С, $[\alpha]_D^{20}$ –6,8° (с 1,4, CHCl_3).

4-Нитробензиловый эфир N-трет-бутилоксикарбонил-O-(N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланил)-L-серина (XV). Раствор 0,6 г (1,8 ммоль) соединения (XIV), 0,6 г (2,0 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланина, 0,15 мл пиридина и 0,5 мл (2,3 ммоль) Wos_2O в 5 мл этилацетата перемешивали 16 ч, разбавляли этилацетатом до 30 мл и после стандартной обработки остаток кристаллизовали из смеси эфира с петролейным эфиром. Выход соединения (XV) 0,7 г (64%), R_f 0,42 (A), 0,87 (B), т. пл. 96–98° С, $[\alpha]_D^{20}$ –33,0° (с 1, DMF). УФ-спектр в $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\lambda_{\text{макс}}$ (ϵ): 268 (10,1·10³). ИК-спектр (в KBr, ν , см⁻¹): 3400 (NH), 1755 (OC=O), 1695 (NC=O), 1530 (NH). Найдено, %: C 62,06; H 5,75; N 6,82. $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_{10}$. Вычислено, %: C 61,92; H 5,52; N 6,75.

Щелочной гидролиз соединения (XV). К раствору 5 мг депсипептида (XV) в 0,1 мл метанола добавляли две капли 4 М раствора NaOH и через 2 ч хроматографировали в системе (B). Исходное соединение на ТСХ не обнаруживалось, но появились два пятна, соответствующие трет-бутилоксикарбонилсерину (R_f 0,23) и бензилоксикарбонилфенилаланину (R_f 0,62).

Этиловый эфир N-бензоил-O-(N-трет-бутилоксикарбонил-L-фенилаланил)-L-тирозина (XVI). Раствор 313 мг (1 ммоль) этилового эфира N-бензоил-L-тирозина, 300 мг (1 ммоль) N-бензилоксикарбонил-L-фенилаланина, 0,5 мл пиридина и 0,3 мл (1,3 ммоль) Wos_2O в 3 мл тетрагидрофурана перемешивали 16 ч, разбавляли этилацетатом до 25 мл и после стандартной обработки остаток кристаллизовали растиранием в эфире. Выход соединения (XVI) 450 мг (85%), R_f 37 (A), 0,78 (B), т. пл. 145–146° С, $[\alpha]_D^{20}$ –53,5° (с 1, DMF). Найдено, %: C 68,69; H 6,23; N 5,10. $\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7$. Вычислено, %: C 68,55; H 6,47; N 4,99.

При щелочном гидролизе, проведенном так же, как и в предыдущем эксперименте, соединение разрушается полностью с образованием бензоилтирозина (R_f 31, B) и трет-бутилоксикарбонилфенилаланина (R_f 0,62, B).

Этиловый эфир N-бензоил-O-(N-трет-бутилоксикарбонил-D-фенилаланил)-L-тирозина (XVII). Соединение (XVII) получали аналогично соединению (XVI). Выход 83%, R_f 0,37 (A), т. пл. 146–147° С $[\alpha]_D^{20}$ –27,8° (с 1, DMF). При щелочном гидролизе разрушается с образованием бензоилтирозина и трет-бутилоксикарбонилфенилаланина.

N-трет-Бутилоксикарбонил-L-лейцил-полимер (XVIII). Суспензию 20 г хлорметилированного сополимера стирола с дивинилбензолом («Merrifield-смола» фирмы Reanal, Венгрия, с содержанием хлора 1 мэкв/г) и 3 г ацетата калия в 80 мл диметилформамида нагревали с перемешиванием при

100° С 10 ч, добавляли 10 л гидразингидрата и нагревали еще 5 ч. Полимер отфильтровывали, промывали водой (2×50 мл), спиртом (2×50 мл), эфиром и высушивали. Полученный полимер (10 г) с остаточным содержанием хлора 0,03 мэкв/г [24] промывали тетрагидрофураном (30 мл), бензолом (2×20 мл), смешивали с 10 мл бензола и добавляли раствор 20 ммоль *трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лейцина в 10 мл тетрагидрофурана (раствор 5 г гидрата *трет*-бутилоксикарбониллейцина в этилацетате высушивали MgSO₄, упаривали, остаток растворяли в толуоле, упаривали и остаток растворяли в тетрагидрофуране), 0,5 мл пиридина, 5 мл (23 ммоль) Вос₂О и смесь встряхивали 20 ч. Полимер отфильтровывали, промывали тетрагидрофураном, бензолом, эфиром, высушивали и получали 11,5 г *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-лейцил-полимера. Для определения содержания лейцина пробу полимера обрабатывали раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле (1:1). Содержание аминокрупп в лейцил-полимере определяли методом с пикриновой кислотой [25]. Найдено 0,51 ммоль лейцина на 1 г полимера.

N-*трет*-Бутилоксикарбонил-*L*-фенилаланил-полимер (XIX). *N*-*трет*-Бутилоксикарбонил-*L*-фенилаланин присоединяли к оксиметилированному полимеру так же, как в предыдущем эксперименте. Навеску полученного полимера гидролизовали 6 н. соляной кислотой в пропионовой кислоте (110° С, 20 ч) и содержание фенилаланина в гидролизате определяли пингидриновым методом. Найдено 0,5 ммоль фенилаланина на 1 г полимера.

N-*трет*-Бутилоксикарбонил-*L*-4-нитрофенилаланил - полиэтиленгликоль (XX). Раствор 2,5 г (8 ммоль) *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-4-нитрофенилаланина, 7,5 г полиэтиленгликоля (*M*_n 3000, 5 мэкв ОН-групп), 0,4 мл пиридина и 2,0 мл (9 ммоль) Вос₂О в 25 мл диметилформамида перемешивали 20 ч при 20° С. Раствор фильтровали, упаривали в вакууме при 40° С, остаток растворяли в эфире (100 мл) и выдерживали 16 ч при 4° С. Полимер отфильтровывали, промывали эфиром и высушивали. Получали 8,8 г *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*L*-4-нитрофенилаланил-полиэтиленгликоля с содержанием 0,56 ммоль 4-нитрофенилаланина на 1 г полимера. Содержание 4-нитрофенилаланина определяли спектрофотометрически при 278 нм (ϵ 10,1·10³).

N-*трет*-Бутилоксикарбонил-*D*-триптофил-полиэтиленгликоль (XXI). *N*-*трет*-бутилоксикарбонил-*D*-триптофан присоединяли к полиэтиленгликолю так же, как в предыдущем эксперименте. Содержание триптофана на полимере определяли фотометрически при 280 нм. Найдено 0,49—0,51 ммоль триптофана на 1 г полимера.

ЛИТЕРАТУРА

1. Driessen H. P. C., Bloemendal H., De Jong W.-N. Int. J. Peptide and Protein Res., 1982, v. 20, p. 289—297.
2. Flynn D. L., Zelee R. E., Gricco P. A. J. Org. Chem., 1983, v. 48, № 14, p. 2424—2426.
3. Kolasa T., Gross E. Int. J. Peptide and Protein Res., 1982, v. 20, p. 259—266.
4. Weller H. N., Gordon E. M. J. Org. Chem., 1982, v. 47, № 21, p. 4160—4161.
5. Позднеев В. Ф. Химия природн. соедин., 1982, № 1, с. 129—130.
6. Позднеев В. Ф. Ж. орган. химии, 1983, т. 19, № 4, с. 882.
7. А.с. № 1022965 (СССР). Способ получения эфиров карбоновых кислот/Позднеев В. Ф. Заявл. 24.10.80, № 2997346. Опубл. в Б.И., 1983, № 22.
8. Черкасова Е. М., Богатков С. В., Головини З. П. Успехи химии, 1977, т. 46, № 3, с. 477—506.
9. Sachdev G. P., Fruton J. S. Biochemistry, 1969, v. 8, № 11, p. 4231—4237.
10. Su-Sun Wang. J. Org. Chem., 1975, v. 40, № 9, p. 1235—1239.
11. Mutter M., Uhmann R., Bauer E. J. Liebigs Ann. Chem., 1975, № 5, S. 901—915.
12. Кемп Д. В. кн.: Пептиды. Основные методы образования пептидных связей. М.: Мир, 1983, с. 344—346.
13. Atherton E., Benoiton N. L., Brown E., Sheppard R. C., Williams B. J. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1981, № 4, p. 336—337.
14. Neises B., Andries T., Steglich W. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1982, № 19, p. 1132—1133.
15. Halpern B., Westley J. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1965, v. 19, № 3, p. 361—363.
16. Halpern B., Westley J. W. Tetrahedron Lett., 1966, № 21, p. 2283—2286.
17. Позднеев В. Ф., Смирнова Е. А., Подгорнова Н. Н., Зенцова Н. К., Калей У. О. Ж. орган. химии, 1979, т. 15, № 1, с. 106—109.
18. Weber U. Z. Naturforsch., 1976, B. 31b, № 8, S. 1157—1158.

19. *Stadler P. A.* Helv. chim. acta, 1978, v. 61, № 5, p. 1675-1681.
20. *Kessler H., Siegmeier R.* Tetrahedron Lett., 1983, v. 26, № 3, p. 281-283.
21. *Bcdnarek M. A., Bodanszky M.* Int. Peptide and Protein Res., 1983, v. 21, № 2, p. 196-201.
22. *Camble R., Garner R., Young G. T.* J. Chem. Soc., 1969, C, № 14, p. 1911-1916.
23. *Theodoropoulos D., Schwartz I., Walter R.* Biochemistry, 1967, v. 6, № 12, p. 3927-3941.
24. *Hancock W. S., Battersby J. E., Harding D. R. K.* Anal. Biochem., 1976, v. 69, № 2, p. 497-503.
25. *Fontana A., Veronese F. M., Rocci E.* Z. Naturforsch., 1971, B. 26, № 4, S. 314-320.

Поступила в редакцию
14.XII.1983

**ACTIVATION OF CARBOXYLIC ACIDS WITH PYROCARBONATES. ACYLATION
OF PRIMARY HYDROXYLS USING DI-*tert*-BUTYLPYROCARBONATE —
PYRIDINE SYSTEM AS A CONDENSING REAGENT**

POZDNEV V. F.

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

A facile route for preparing respective esters by coupling N-protected amino acids and primary alcohols using di-*tert*-butylpyrocarbonate in the presence of pyridine has been worked out. No racemization was observed for the optically active amino acids under these conditions. The method may be extended to acylation of polymers containing primary hydroxyls.