

П. Н. РАБИНОВИЧ, Н. Л. ПРИДОРГИН и М. А. ГУБЕРНИЕВ

ПОЛУЧЕНИЕ *l*- и *d*- α -АМИНОКИСЛОТ ЭНЗИМАТИЧЕСКИМ
ГИДРОЛИЗОМ ИЗОПРОПИЛОВЫХ ЭФИРОВ РАЦЕМИЧЕСКИХ
 α -АМИНОКИСЛОТ

L- и *D*- β -ФЕНИЛАЛАНИН; *D*- и *L*-НОРЛЕЙЦИН; *L*- и *D*-ТРИПТОФАН

(Представлено академиком В. М. Родионовым 26 IV 1952)

Для получения оптических изомеров α -аминокислот из их рацематов в настоящее время успешно применяется энзиматический метод асимметрического гидролиза некоторых производных рацемических α -аминокислот. В большинстве опубликованных работ исходным материалом служили *N*-ацил- и *N*-галоидацилпроизводные (1), и только в нескольких работах (см. далее) применены амиды и эфиры кислот. Хотя первые сообщения о высоких результатах, полученных применением энзиматического метода асимметрического гидролиза эфиров и *N*-ацильных производных рацемических α -аминокислот, относятся к 1905 г. (2) и к 1924 г. (3), развитие и препаративное применение этого метода началось лишь в последние годы.

В качестве исходных материалов эфиры аминокислот следует предпочесть как *N*-ацилзамещенным, так и амидам кислот, так как приготовление эфиров несложно и выходы их высокие (70—90%). До сего времени применение энзиматического метода получения оптических изомеров из эфиров аминокислот описано в следующих работах (см. табл. 1).

Таблица 1

Эфир <i>d</i> -, <i>l</i> - α -аминокислоты	Энзим	Продолжит. взаимодействия	Выход. оптич. изомеров в %		Литература
			<i>l</i> -	<i>d</i> -	
Этиловый эфир лейцина	Трипсин	11 час.	83	—	(2)
Метиловый эфир триптофана	Водная вытяжка панкреатина	36 час. при 37—38°; еще 36 час.	50	60	(6)
То же	25% водная вытяжка панкреатина	16 час. при 36°	90	—	(6)
Изопропиловый эфир метионина	Водная вытяжка панкреатина	48 час. при 20°	40—50	40—50	(7)
То же	10% водная вытяжка панкреатина	17 час. при 20°	86,5	—	(8)
Изопропиловый эфир β -фенилаланина	2,5% водная вытяжка панкреатина	48 час. при 20°	50	30—38	(9)

Методика выделения оптических изомеров в том виде, как это описано для триптофана (5) и β -фенилаланина (9), трудоемка и длительна. Для получения чистых изомеров β -фенилаланина, исходя из готового изопропилового эфира, требуется провести 23 операции (несколько эфирных экстракций, вакуумных отгонок и др.). Получение чистых оп-

тических изомеров триптофана ⁽⁵⁾ еще более громоздко. Выделенные оптические изомеры переводились в соли β -нафталинсульфоокислоты (назилаты), которые очищались кристаллизацией. Из растворов очищенных назилатов свободные аминокислоты выделялись диэтиламинол. Большое число промывок, экстракций и т. д. вызвано необходимостью полностью отделить кристаллы выделившегося оптического изомера (свободная аминокислота) от пропитавшего их неизмененного маслянистого эфира оптического антипода. Кроме того, образующаяся маслянистая смесь продуктов по мере хода гидролиза становится все более вязкой, вследствие чего разбалтывается с трудом. Указанные технические затруднения снижают препаративную ценность этого по существу очень простого и удобного метода.

В результате изменения некоторых условий проведения процесса гидролиза разработан значительно упрощенный и более удобный метод получения оптических изомеров α -аминокислот из их рацемических изопропиловых эфиров.

В основном введены следующие изменения.

1. Для возможно полной этерификации β -фенилаланина (а также триптофана и норлейцина) необходимо кипятить смесь исходных продуктов до образования раствора, на что требуется не менее 6,5—7 час. Указание Ретлинда ⁽⁹⁾ об окончании этерификации фенилаланина за 2 часа неправильно.

2. Свободные изопропиловые эфиры получались из выкристаллизовавшихся хлоргидратов эфиров, а не из неочищенных хлоргидратов.

3. Для взаимодействия с энзимом (водная вытяжка продажного панкреатина) применялся бензольный раствор изопропилового эфира аминокислоты. При этом условии стало возможным оперировать и с твердыми эфирами, как, например, с изопропиловым эфиром триптофана (т. пл. 84°). Смесь выделяющейся кристаллической свободной аминокислоты с бензольным раствором неизмененного эфира оптического изомера — вполне подвижная масса и разбалтывание с водной вытяжкой энзима происходит без затруднения.

4. Кислотный гидролиз неизмененного эфира (неприродной формы аминокислоты) проводился с одновременным отгоном образующегося изопропилового спирта, что позволило время гидролиза снизить до 2—2,5 час. вместо 12 час. для эфира d - β -фенилаланина (ср. ⁽⁹⁾).

5. Очистка выделенных оптических изомеров производилась одно-, двухкратной кристаллизацией из воды.

Схема процесса. 1. Исходная d -, l - α -аминокислота переводится кипячением с изопропиловым спиртом, содержащим 12—15% хлористого водорода, в хлоргидрат изопропилового эфира, который выделяют в кристаллическом виде.

2. Из водного раствора хлоргидрата эфира нейтрализацией аммиаком выделяют свободный изопропиловый эфир (основание).

3. Смесь бензольного раствора свободного изопропилового эфира с водной вытяжкой панкреатина взбалтывается 24—30 час. при комнатной температуре. В результате асимметрического энзиматического гидролиза образуется изопропиловый спирт и природный оптический изомер свободной аминокислоты, который выделяется в кристаллическом виде. Неизмененный эфир аминокислоты-антипода остается в бензольном растворе.

4. Из бензольного раствора отгоняют растворитель. Остаток, неизмененный эфир, кипятят с соляной кислотой. Получают хлоргидрат неприродной формы аминокислоты, из которого нейтрализацией аммиаком выделяют свободную аминокислоту.

5. Выделенные аминокислоты очищают кристаллизацией из воды; получают оптически чистые аминокислоты.

Ниже сообщены результаты законченной части работы.

Экспериментальная часть

Изопропиловые эфиры. Этерификация проводилась обычным методом: смесь аминокислоты с изопропиловым спиртом, содержащим 12—15% хлористого водорода, кипятилась с обратным холодильником до образования раствора. По охлаждении спиртового раствора выпадала основная масса белоснежного кристаллического хлоргидрата эфира β -фенилаланина. Хлоргидраты эфиров норлейцина и триптофана выпадали после отгонки спирта. Кристаллы хлоргидрата отфильтрованы, отжаты, промыты 2—3 раза (по 25—30 мл) холодным изопропиловым спиртом и высушены при 70—80°. Для получения свободного эфира к водному раствору хлоргидрата эфира добавлен 25% аммиак, около 90 мл на 1 г-мол. хлоргидрата (10% избытка против теории). Хлоргидрат эфира фенилаланина растворялся в 5 частях воды, хлоргидрат эфира норлейцина в 3 ч. воды и хлоргидрат триптофана в 9 ч. воды. Эфир фенилаланина и эфир норлейцина отслаиваются в виде подвижной почти бесцветной маслянистой жидкости. Отстоявшийся слой эфира отделяют от водного слоя. Эфир триптофана выделяется в виде очень вязкого масла, которое через короткое время затвердевает в бесформенные кусочки. Перекристаллизованный из бензола или из спирта изопропиловый эфир триптофана имеет т. пл. 84°. Изопропиловые эфиры очень мало растворимы в воде.

Условия этерификации и полученные результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

<i>d</i> -, <i>l</i> -аминокислота	Изопропил. спирт с 12—15% хлорист. водорода в мл	Продолжит. кипячения в час.	Получено эфира хлоргидрата в г	Отогнано спирта в мл	Т. пл. эфира хлоргидрата в °	Выход в % теории
β -фенилаланин 165 г, 1 г-мол	2300	7	200 + 30 после отгонки спирта	2000	191	95
Норлейцин 131 г, 1 г-мол	2000	8—10	175—180	1500—1600	163—168	82—90
Триптофан 204 г, 1 г-мол	1800	6,5—7	240—250	1500	217—222	85—90

Энзиматический гидролиз

Получение природного оптического изомера. Приготавливался 5% раствор энзима. Продажный панкреатин с активностью в 40—50 единиц настаивался на воде 2—2,5 часа (5 г панкреатина в 100 мл воды); смесь время от времени взбалтывалась. Несколько отстоявшаяся водная вытяжка фильтровалась с отсасыванием. Бензольный раствор свободного изопропилового эфира взбалтывался (механически с 5% водной вытяжкой панкреатина при комнатной температуре (18—20°)) в продолжение 24—28 час. По мере прохождения гидролиза постепенно увеличивалось количество выпадающего мелкого кристаллического осадка природного оптического изомера аминокислоты. По окончании взбалтывания кристаллы отфильтровывались (с отсасыванием), промывались 2—3 раза бензолом и 2—3 раза холодной водой. Осадок переносился в стакан, заливался ацетоном, взмучивался и отфильтровывался. Ацетоновый фильтрат отбрасывался. Полученный реакционный продукт кристаллизовался из воды. Бензольно-водный фильтрат повторно взбалтывался 6 час. Если выпадал осадок, то его присоединяли к основной порции до перекристаллизации.

Изопропиловый эфир аминокислоты	Бензол в мл	5% водная вытяжка панкреа- тина	Продол- жит. взбалтыва- ния в час.	Получено изомера в % от теории		Получено оптич. чистых изомеров в % от теории	
				природн.	непри- родн.	природн.	непри- родн.
β -фенилаланин . . .	200	700	24+6	95	80—90	80	70
Норлейцин	175	700	28	85—95	75—85	75—85	70—75
				(d-)	(l-)	(d-)	(l-)
Триптофан	1000	1000	24+6	95	90	85—90	80—85

Получение неприродного оптического изомера. Из бензольно-водного фильтрата отделен бензольный слой. Водный слой упарен, полученное дополнительное количество природного изомера аминокислоты присоединено к основной порции до ее кристаллизации. Из бензольного раствора на паровой бане отогнана главная масса бензола. К жидкому маслянистому остатку добавлялось 260 мл 18% соляной кислоты и смесь нагревалась при слабом кипении. Образующийся изопропиловый спирт, остатки бензола и немного воды непрерывно отгонялись через прямой холодильник. Постепенно маслянистый слой переходил в раствор, и через 2,5—3 часа гидролиз закончен. К горячему солянокислому раствору добавлено 3—4 г активированного угля, профильтровано. По охлаждении выкристаллизовавшийся хлоргидрат неприродного изомера аминокислоты отфильтрован и тщательно отжат от маточного раствора. Кристаллический хлоргидрат растворен в воде (в случае необходимости раствор вторично обрабатывался активированным углем) и нейтрализован 25% аммиаком. Выпавший бесцветный кристаллический осадок неприродного изомера аминокислоты отфильтрован, промыт два раза холодной водой и несколько раз холодным метиловым спиртом. Получен почти оптически чистый продукт.

Таблица 4

Аминокислота	$[\alpha]_D^{20}$		Концентр. раствора в %
	природн.	неприродн.	
β -фенилаланин	—35,3°	+35,5°	2
Триптофан	—31,6°	+32°	0,5
Норлейцин	—4,5°	+4,6°	1

Получен почти оптически чистый продукт.

В табл. 3 приведены условия энзиматического гидролиза и полученные результаты; загрузка 1 г-мол. изопропилового эфира.

В табл. 4 указаны полученные величины $[\alpha]_D^{20}$ (растворитель — вода).

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
25 IV 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. Neuberger and I. Mendl, *Enzymologia*, **14**, 128 (1950). ² O. Warburg, *Ber.*, **38**, 187 (1905). ³ C. Neuberger u. K. Linhardt, *Biochem. Zs.*, **147**, 372 (1924). ⁴ C. Neuberger, *ibid.*, **145**, 186 (1924); **147**, 370 (1924). ⁵ M. Brenner, E. Sailer u. V. Kocher, *Helv. Chim. Acta*, **31**, 1908 (1948). ⁶ M. Brenner u. V. Kocher, Швейц. пат. 268326 16 VIII 1950; *C. A.*, **45**, 5190 (1951). ⁷ M. Brenner u. V. Kocher, *Helv. Chim. Acta*, **32**, 333 (1949); K. Wretling, *Acta physiol. Scand.*, **u. 20**, 1 (1950). ⁸ M. Brenner u. V. Kocher, Швейц. пат. 266637 16 V 1950; *C. A.*, **45**, 828 (1951). ⁹ K. Wretling, *J. Biol. Chem.*, **186**, 221 (1950).