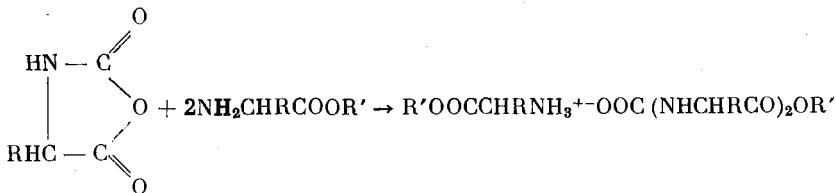


**КИНЕТИКА И ХИМИЗМ ПОЛИКОНДЕНСАЦИИ ЭФИРОВ
α-АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ**

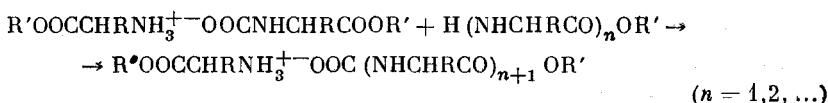
X. ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ПРОДУКТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭТИЛОВОГО ЭФИРА *d,l*-АЛАНИНА И АНГИДРИДА N-КАРБОКСИ-*d,l*-АЛАНИНА

К. Т. Порошин, Н. И. Прохорова, Ю. И. Хургин

В одном из предыдущих сообщений [1] была изучена кинетика изменения состава продуктов поликонденсации этилового эфира глицина в присутствии ангидрида N-карбоксиглицина $[A]/[\mathcal{E}]^1 = 0,5$ и $0,08$; там же нами был рассмотрен возможный механизм реакции. Первой и более быстрой стадией реакции является, по-видимому, взаимодействие ангидрида N-карбокси- α -аминокислоты с эфиром аминокислоты



с образованием несимметричного карбамата эфира дипептида. Карбамат распадаясь выделяет двуокись углерода, которая энергично реагирует с эфиром α -аминокислоты с образованием симметричного карбамата $\text{R}'\text{OOCCHRNH}_3^+ - \text{OOCNHCRCOOR}'$. По мере расхода ангидрида N-карбокси- α -аминокислоты все большее значение начинает приобретать поликонденсация этилового эфира α -аминокислоты в присутствии своего симметричного карбамата [2]:



Образующиеся несимметричные карбаматы распадаются с выделением пептида, содержащего на один аминокислотный остаток больше, чем исходный пептид. При этом происходит регенерация инициатора поликонденсации эфиров α -аминокислоты (выделяется CO_2).

При изучении поликонденсации этилового эфира глицина и ангидрида N-карбоксиглицина было обнаружено, что эфир α -аминокислоты в первой стадии реакции расходуется со значительной скоростью. Во второй стадии реакции, происходящей по карбаматному механизму, все процессы проходят сравнительно медленно. При инициировании поликонденсации этило-

¹ $[A]/[\mathcal{E}]$ — отношение начальных молярных концентраций ангидрида N-карбокси- α -аминокислоты и эфира α -аминокислоты.

вого эфира глицина двуокисью углерода [1] и симметричным карбаматом [3] первой быстрой стадии обнаружено не было.

В настоящем сообщении приведены результаты изучения состава продуктов взаимодействия ангидрида N-карбокси-*d,l*-аланина и этилового эфира *d,l*-аланина в широком интервале $[A]/[\mathcal{E}]$ (0,08–100). Поликонденсация этилового эфира *d,l*-аланина в присутствии сравнительно небольших количеств CO_2 [4] происходит медленнее, чем этилового эфира глицина; качественный состав продуктов реакции в обоих случаях одинаков. Однако выход дикетопиеразина при поликонденсации этилового эфира *d,l*-аланина значительно выше, чем при поликонденсации этилового эфира глицина (65–70% и 10–12% соответственно, при 40°). Вероятно, отношение скорости превращения эфира аланилаланина в дикетопиеразин к скорости присоединения мономера к пептидам (удлинение пептидных цепей) значительно больше, чем в случае эфира глицилглицина.

С другой стороны, инициирование аминами [5] (в том числе и эфирами α -аминокислот [6]) поликонденсации ангидридов N-карбокси-*d,l*-аланина было неоднократно применено как для получения модельных высокомолекулярных полиг*d,l*-аланинов, так и для изучения кинетики и механизма этой реакции [7, 8]. Изучение инфракрасных спектров поглощения полиг *α* -аминокислот, полученных из ангидридов N-карбокси- α -аминокислот [9], показало, что в них всегда содержатся как α -спиральные структуры, так и β -полипептиды. Однако оказалось, что β -пептидная фракция полиг *α* -аминокислот является низкомолекулярной фракцией со средней степенью поликонденсации, равной 4–6 [10]. Следует также иметь в виду, что в продуктах поликонденсации ангидридов N-карбокси- α -аминокислот содержится значительное количество дикетопиеразинов [11, 12]; особенно много их обнаруживается при инициировании спиртами, так как промежуточными соединениями при этом являются эфиры дипептида.

Поликонденсация эфиров α -аминокислот в присутствии CO_2 , симметричных карбаматов или ангидридов N-карбокси- α -аминокислот и поликонденсация последних в присутствии аминов, эфиров или амидов α -аминокислот или пептидов проходит, вероятно, через одинаковые стадии — образование несимметричных карбаматов [2, 13]. Поэтому возможно изучение общего механизма поликонденсации эфиров α -аминокислот и ангидридов N-карбокси- α -аминокислот в условиях взаимного инициирования.

Экспериментальная часть

Было изучено взаимодействие ангидрида N-карбокси-*d,l*-аланина и этилового эфира *d,l*-аланина при разных величинах $[A]/[\mathcal{E}]$. Реакцию проводили в тех же условиях и при тех же величинах $[A]/[\mathcal{E}]$ (0,5 и 0,08), что и при изучении поликонденсации этилового эфира глицина в присутствии ангидрида N-карбоксиглицина; дополнительно были проведены опыты при $[A]/[\mathcal{E}] = 1, 50$ и 100. Кроме того, было исследовано взаимодействие этилового эфира *d,l*-аланина со своим симметричным карбаматом. Опыты проводили в 5%-ном растворе исходных веществ в диоксане при температуре $40 \pm 0,05^\circ$. Методика их постановки и обработки продуктов реакции описана ранее [1]. Определяли выход продуктов реакции (твердой фазы), расход мономера, содержание аминного азота (по Ван-Сляйку), дикетопиеразина, три- и тетрапептидных фракций (методом дифференцированного титрования [14]).

К сожалению, нам, так же как и другим авторам [15], не удалось подобрать систему растворителей для хроматографического анализа продуктов поликонденсации этилового эфира *d,l*-аланина. Среднюю степень полимеризации вычисляли по концентрации конечных аминных групп.

Взаимодействие этилового эфира *d,l*-аланина со своим симметричным карбаматом. Был изучен состав про-

дуктов взаимодействия этилового эфира *d,l*-аланина со своим симметричным карбаматом (предполагаемым инициатором) при относительной молярной концентрации последнего $[И]/[М] = 0,5$ и $0,08$, где $[И]$ — концентрация инициатора, $[М]$ — концентрация мономера.

Методика постановки опытов описана ранее для поликонденсации этилового эфира глицина [3]. Оказалось, что этиловый эфир *d,l*-аланина крайне медленно взаимодействует со своим симметричным карбаматом (за 120 час. израсходовано 8,92% эфира *d,l*-аланина); единственным продуктом реакции оказался аланиновый дикетопиеразин. Значительно быстрее реакция идет без растворителя, но и в этом случае никаких других продуктов, кроме дикетопиеразина, не образуется (за 17,75 часа израсходовано 58,7% эфира *d,l*-аланина). Такое течение реакции может быть объяснено тем, что скорость циклизации эфира аланилаланина во много раз больше, чем скорость образования трипептида. Поэтому, возможно, не возникают пептиды, получающиеся при поликонденсации этилового эфира глицина в присутствии своего карбамата [3]. Образование некоторого количества пептидов при поликонденсации этилового эфира *d,l*-аланина в присутствии CO_2 [4], вероятно, связано с разогреванием реакционной массы при поглощении инициатора [16].

Поликонденсация этилового эфира *d,l*-аланина в присутствии ангидрида *N*-карбокси-

-d,l-аланина. а) $[A]/[\Theta] = 0,5$. При поликонденсации этилового эфира *d,l*-аланина накопление продуктов реакции происходит с очень малой скоростью. Выход твердой фазы за 12 час. достигает лишь 10% по отношению к исходным продуктам (рис. 1, кривая 1), в дальнейшем скорость накопления твердой фазы резко снижается. Продукты реакции содержат дикетопиеразин и пептидную фракцию.

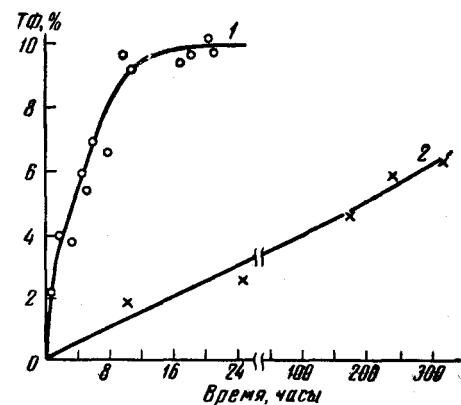


Рис. 1. Выход твердой фазы ТФ (% от исходных продуктов):

1 — $[A]/[\Theta] = 0,5$; 2 — $[A]/[\Theta] = 0,08$

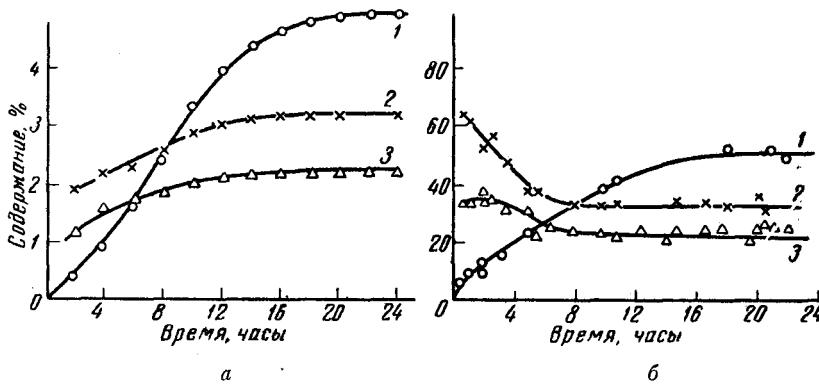


Рис. 2. Состав продуктов поликонденсации ($[A]/[\Theta] = 0,5$): а — в % от твердой фазы; б — в % от исходной навески мономеров.
1 — дикетопиеразин; 2 — тетрапептидная фракция; 3 — трипептид

Анализ данных дифференцированного титрования (рис. 2, а и б) показывает, что в начальной стадии реакции пептидная фракция образуется сравнительно быстро. Однако уже через 1—2 часа скорость накопления

пептидной фракции начинает значительно уступать скорости накопления дикетопиеразина и через ~ 12 час. дикетопиеразин составляет до 50% твердой фазы. К этому времени начинает резко замедляться скорость накопления твердой фазы и в ее составе происходят сравнительно небольшие изменения. Через 24 час. после начала реакции твердая фаза содержала: дикетопиеразина — 48,45%, трипептида — 23,5% и тетра-пептидной фракции — 32,1%. Средняя степень полимеризации пептидной фракции твердой фазы ($n_{\text{л}}$) в начальной стадии реакции равна 4,2 и медленно увеличивается до 6,1 к 12-му часу реакции, после чего рост этой величины прекращается (рис. 3, кривая 1).

Этиловый эфир *d,l*-аланина значительно энергичнее реагирует с ангидридом N-карбокси-*d,l*-аланина, чем со своим симметричным карбаматом, так же как и соответствующие производные глицина [1, 3]. В начале реакции (1–2 часа) эфир аминокислоты инициирует поликонденсацию ангидрида N-карбокси- α -аминокислоты; при этом образуются в основном пептиды. На более поздних этапах реакции происходит поликонденсация эфира *d,l*-аланина по карбаматному механизму, что, как было показано выше, сопровождается образованием только дикетопиеразина. Действительно, на более поздних стадиях реакции прекращается рост пептидной фракции, а относительная концентрация дикетопиеразина увеличивается (рис. 2; рис. 3, кривая 1).

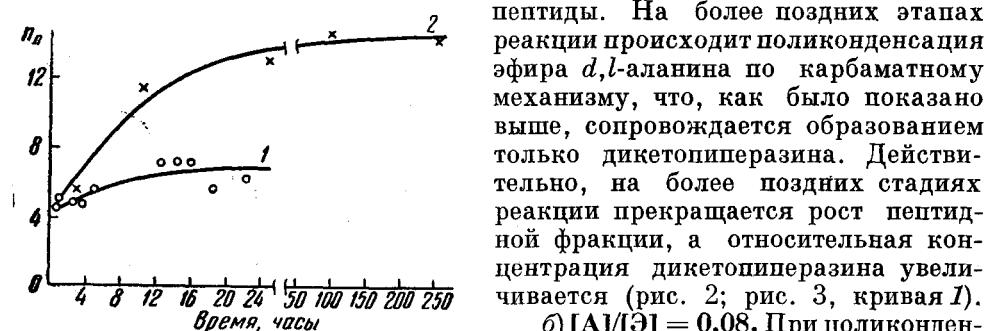


Рис. 3. Средняя степень полимеризации пептидной фракции

1 — $[A]/[\text{Э}] = 0,5$; 2 — $[A]/[\text{Э}] = 0,08$

шает 6–7% по отношению к исходным продуктам (рис. 1, кривая 2). Начиная с самых ранних стадий реакции основной продукт реакции — дикетопиеразин; его концентрация в твердой фазе медленно растет от 51% (10 час.) до 58% (300 час.). Средняя степень полимеризации пептидной фракции (рис. 3, кривая 2) сравнительно быстро увеличивается от $n_{\text{л}} = 5,8$ (3 часа) до $n_{\text{л}} = 11,5$ (10 час.), после чего происходит сравнительно медленный рост длины пептидов; через 300 час. $n_{\text{л}}$ достигает значения 14,0. Однако при дифференцированном титровании тетрапептидная (красная) фракция [14] не была обнаружена.

П о л и к о н д е н с а ц и я а н г и д р и д а N-к а р б о к с и -*d,l*-а л а н и н а. а) $[A]/[\text{Э}] = 100$. При инициировании поликонденсации ангидрида N-карбокси-*d,l*-аланина этиловым эфиром *d,l*-аланина был получен продукт, в состав которого входили пептиды со средней степенью полимеризации 19–20, а 5–10% твердой фазы составлял дикетопиеразин. Методом дифференцированного титрования, несмотря на большую длину пептидов, было обнаружено только 20% тетрапептидной фракции. Следует отметить, что этим методом не определяется 25–30% твердой фазы.

б) $[A]/[\text{Э}] = 50$. При поликонденсации N-карбокси-*d,l*-аланина и присутствии этилового эфира *d,l*-аланина были поставлены длительные опыты на 10–15 и более суток. Выход твердой фазы составлял не менее 50% по отношению к исходному мономеру.

Дикетопиеразина в твердой фазе содержится 5–7%. Средняя степень полимеризации для разных продуктов реакции изменяется от 20 до 40. Методом дифференцированного титрования не определяется 25–30% продуктов реакции (определенено всего лишь 18–25% тетрапептидной фракции).

в) $[A]/[\mathcal{E}] = 1$. При взаимодействии эквимолекулярных количеств ангидрида *N*-карбокси-*d,l*-аланина и этилового эфира *d,l*-аланина образуется значительное количество дикетопиеразина (за 18 час. — 16,7%, за 66 час. — 27,2%) в твердой фазе. Средняя степень полимеризации пептидной фракции невысока (6,00 и 5,4 соответственно). Пептиды, вероятно, образуются в начальный период реакции, главным образом за счет ангидрида *N*-карбокси-*d,l*-аланина. На более поздних стадиях реакции непререагировавший эфир α -аминокислоты вступает в поликонденсацию по карбаматному механизму, благодаря чему образуется значительное количество дикетопиеразина.

Таблица

Содержание дикетопиеразина (*C*) в продуктах взаимодействия этилового эфира *d,l*-аланина и ангидрида *N*-карбокси-*d,l*-аланина
(вес.-% от твердой фазы)

$[A]/[\mathcal{E}]$	<i>C</i> , %	Время, часы
0,08	60,1	200
0,5	48,45	24
1,0	27,2	66
50	7,2	235
100	12,1	20

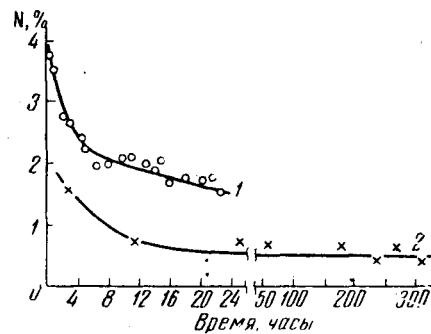


Рис. 4. Концентрация амминного азота в твердой фазе:
1 — $[A]/[\mathcal{E}] = 0,5$; 2 — $[A]/[\mathcal{E}] = 0,08$.

Интересно отметить, что при увеличении относительного содержания ангидрида *N*-карбокси- α -аминокислоты уменьшается удельный вес поликонденсации этилового эфира α -аминокислоты по карбаматному механизму с одновременным уменьшением концентрации дикетопиеразина (см. таблицу и рис. 4) в твердой фазе на поздних стадиях реакции. Так как при $[A]/[\mathcal{E}] = 1$ пептидная фракция состоит из сравнительно коротких пептидов, методом дифференцированного титрования удается полностью определить состав твердой фазы.

Выводы

- Изучен состав продуктов взаимодействия ангидрида *N*-карбокси-*d,l*-аланина и этилового эфира *d,l*-аланина.
- Взаимодействие ангидрида *N*-карбокси-*d,l*-аланина с этиловым эфиром *d,l*-аланина происходит по предложенному ранее механизму.
- Исследовано влияние начального содержания исходных веществ на выход дикетопиеразина и пептидов в продуктах реакции.

Институт органической химии
им. Н. Д. Зелинского АН СССР

Поступила в редакцию
23 IV 1959

ЛИТЕРАТУРА

- К. Т. Порошин, Ю. И. Хургин, Н. И. Прохорова, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1958, 1428.
- К. Т. Порошин, Т. Д. Козаренко, Ю. И. Хургин, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1957, 174; 1957, 642.
- К. Т. Порошин, Ю. И. Хургин, Т. Д. Козаренко, Докл. АН СССР, 124, 105, 1959.
- В. В. Коршак, К. Т. Порошин, Т. Д. Козаренко. Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1954, 663.
- E. R. Blout, R. H. Karlson, J. Amer. Chem. Soc., 78, 941, 1956.
- К. Т. Порошин, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1957, 996.
- W. E. Nalby, S. G. Waley, G. Watson, J. Chem. Soc. 1950, 3009.

8. E. J. Ambrose, A. Elliot, Proc. Roy. Soc., A 205, 47, 1951.
9. A. Elliot, Proc. Roy. Soc., A 226, 408, 1954.
10. E. R. Blout, A. Asadourian, J. Amer. Chem. Soc., 78, 955, 1956.
11. К. Т. Порошин, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1956, 743.
12. L. Sluyterman, R. Labrieyge, Reueil trav. chim., 73, 347, 1954.
13. D. G. H. Ballard, C. H. Bamford, Proc. Roy. Soc., A 223, 495, 1954.
14. К. Т. Порошин, Т. Д. Козаренко, Ю. И. Хургин, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1955, 773; 1956, 626.
15. H. Brockmann, H. Musso, Chem. Ber., 87, 581, 1954.
16. Ю. И. Хургин, К. Т. Порошин, Т. Д. Козаренко, Изв. АН СССР, Отд. хим. н., 1959, 941.

KINETICS AND MECHANISM OF THE POLYCONDENSATION OF α -AMINO ACID ESTERS AND PEPTIDES. X. INVESTIGATION OF THE CONSTITUTION OF THE PRODUCTS OF INTERACTION BETWEEN THE ETHYL ESTER OF *d,l*-ALANINE AND N-CARBOXY-*d,l*-ALANINE ANHYDRIDE

K. T. Poroshin, N. I. Prokhorova, Yu. I. Khurgin

S u m m a r y

The interaction of N-carboxy-*d,l*-alanine anhydride and the ethyl ester of *d,l*-alanine has been studied over a relative concentration ($[A]/[E]$) range from 0.08 to 100. As a result of polycondensation of the anhydride induced by the ester peptides are formed. With excess ester ($[A]/[E] > 1$) after all the anhydride has been consumed the reaction proceeds in accordance with the mechanism of α -amino acid ester polycondensation via carbamate formation. Special experiments have shown that this reaction is very slow for *d,l*-alanine derivatives and leads mainly to formation of diketopiperazines. In support of this increase in the $[A]/[E]$ ratio is accompanied by decrease in diketopiperazine formation. For $[A]/[E] > 1$ the reaction takes place according to the mechanism of polycondensation of N-carboxy-*d,l*-amino acid anhydrides.