

KINETIKUS REZOLVÁLÁS KISEBB TAGSZÁMU
ALANIN OLIGOPEPTIDEK LÁNCTAGSZÁM
NÖVELÉSI REAKCIÓJÁBAN

Doktori disszertáció

Mohácsi Tivadar
tudományos munkatárs

Készült

a

Magyar Tudományos Akadémia
Központi Kémiai Kutató Intézetében

1969



Diss. B 377



TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS.....	3
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
VÉGZETT MUNKÁM LEIRÁSA.....	15
1, A mérési módszer.....	15
2, A modell peptidek előállítása..	23
3, Mérések.....	30
4, Az eredmények kiértékelése.....	38
KISÉRLETI RÉSZ.....	41
ÖSSZEFOGLALÁS.....	54
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	55
IRODALOM.....	56

BEVEZETÉS

Makromolekulák, biopolimerek sztereokémiájának egyik fontos kérdése királis molekulákkal szemben tanúsított diszkriminációs képességük megismerése és annak egyszerű disszimmetrikus molekulák sztereokémiai sajátosságaiból való levezetése. Ismeretes, hogy biopolimereken, pl. proteineken végbemenő, vagy azok által katalizált bizonyos reakciók esetében ez a diszkriminációs készség száz, vagy igen közel száz százalékos, más szavakkal ilyen rendszereken vagy azok jelenlétében végbemenő reakciók során a reakcióban résztvevő egyszerűbb szerkezetű, csak egy vagy néhány aszimmetrikus elemet tartalmazó molekula fajtának csak egyik enantiomerje vagy csak egy sztereoizomer változata lép reakcióba vagy szenved változást. Például élő rendszerekben lefutó kémiai reakciók tanulmányozása során csaknem mindig azt tapasztaljuk, hogy ha a reakcióba lépő vagy a keletkező molekulák két vagy több sztereoizomer változatban létezhetnek, ezeknek csak egyike lép reakcióba ill. egyike képződik.

Proteineken lejátszódó folyamatok esetében

ez a nagyfoku szelektivitás minden bizonnyal kapcsolatos a nagyszámu aszimmetria elemen kívül a proteinek másodlagos, sőt magasabb rendű szerkezetével is. Érdekesnek tűnik azonban annak vizsgálata, hogyan változik viszonylag egyszerű szerkezetű, több aszimmetria elemet tartalmazó rendszerek, pl. oligomerek diszkriminációs képessége az aszimmetria elemek számának növekedésével ill. a tagok konfigurációs sorrendjének variálásával.

A disszertáció tárgyát képező munka mérési módszer, kinetikus rezolválás során keletkezett termékelegy összetételének meghatározására, továbbá hét, alaninból felépített mono-, di- és tripeptid származék diszkriminációs képességének mérése a C-terminálison az azidos kapcsolási módszer segítségével, racém alanin etilészterrel kivitelezett lánctagszám növelési reakciójában. Ez a munka része annak a vizsgálat sorozatnak, mely az MTA Központi Kémiai Kutató Intézetben a biopolimereken végbemenő reakciók sztereokémiájának felderítésére irányul. Munkámat Ötvös László a kémiai tudományok doktora és Tömösközi István a kémiai tudományok kandidátusa irányításával végeztem.

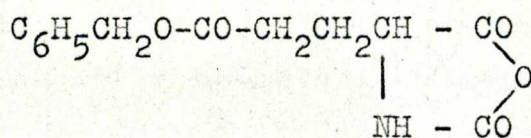
IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Meglepő módon, igen kevés utalást lehet találni az irodalomban ilyen vagy hasonló jellegű vizsgálatokra. Figyelembe véve a probléma jelentős elméleti érdekességét és ilyen jellegű ismeretek gyakorlati alkalmazhatóságának perspektíváit, ennek minden bizonnyal az az oka, hogy ezidőszert nem ismeretes olyan egyszerű kísérleti technika, amely ilyen jellegű effektusok kielégítő mértékű pontossággal való mérését lehetővé tenné.

Linderström-Lang (1) egy átlag harminc aminosavból felépített poli-DL-alanin preparátumban (2) vizsgálta az L és D enantiomerek eloszlását. Karboxipeptidáz ill. aminopolipeptidáz enzimek segítségével végzett lebontási folyamatok kinetikájának mérésével és a kapott eredményeknek penta-L-alanin hasonló körülmények között végzett enzimatis bontásának kinetikájával való egybevetéséből matematikai megfontolások segítségével arra a következtetésre jutott, hogy az L és D egységek statisztikus vagy közel statisztikus eloszlást mutatnak a láncban. Ez más szavakkal azt jelenti, hogy a vizsgált poli-DL-alanin szintézisekor a peptid lánc

egészen a harmincas tagszámig nem mutatott diszkriminációs készséget a lánctagszám növelésére rendelkezésre álló L és D monomer egységek között. Az eredmény nagymértékben valószínűtlen és feltehető, hogy az eredetileg más célokra készített poli-DL-alanin (2) tisztítása során a különböző térszerkezetű polisztereomerek frakcionálódást szenvedtek és ez vezetett a fenti megtévesztő eredményre. A hivatkozott irodalmak ugyanis nem közlik a vizsgált poli-DL-alanin előállítását és tisztítását, ill. az utóbbit csak részben.

Idelson és Blout (3), továbbá Doty és Lundberg (4) az L-glutaminsav γ -benzilészter N-karboxi-anhidrid



dioxános közegben végbemenő, amin vegyület ill. nátrium-metilát iniciálta polimerizációját vizsgálva megfigyelték, hogy a D izomer jelenlétében nagymértékben csökkent a polimerizációs folyamat sebessége, továbbá a termék polimerizációs foka és mindkettő minimumot mutatott a racém összetételnél. Az effektusok olyan nagymértékűek voltak, hogy a polimeri-

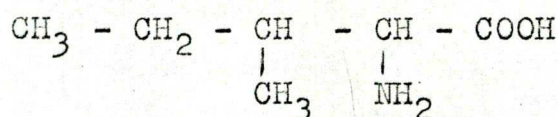
zációs folyamat sebessége racém összetételnél csak mintegy egytizenhetede volt az optikailag tiszta monomer esetében mért értéknek, míg a polimerizációs fok ugyanakkor egyötödére csökkent a termékben. A jelenséget azzal magyarázták, hogy az L-aminosav részekből felépített α -helix csak nehézségek árán tud D-aminosavat beépíteni.

Egy másik felfogás a jelenséget kapcsolatba hozta a már felépült lánc konformációjával, feltételezve hogy a "statisztikus gombolyag" (random coil) konformer más sebességgel vesz részt a reakcióban mint az α -helix konformer, továbbá hogy a konformációs átmenet a kettő között gátolt, amennyiben a másik enantiomer is beépült a láncba.

Az első felfogással szemben Eliel (5) megjegyzi, hogy a polimerizációs folyamatnak a D enantiomer jelenlétében megfigyelt sebesség csökkenése oly nagy mértékű, hogy az nem magyarázható egyszerűen a polimer láncnak a D származék beépítésével szemben tanúsított "vonakodásával", hanem inkább úgy néz ki, hogy az egész polimerizációs folyamat egy parciális "blokkolódást" szenved, amennyiben mégis beépülne egy D-aminosav.

Hasonlóan nem elégséges (6) egy konformációs átmenetet posztulálni ahhoz, hogy értelmezni lehessen a fenti kísérleti eredményt.

Williams és Brown (7) szintén N-karboxi-anhidridek polimerizációját vizsgálta dioxános közegben és nátrium-metilát iniciátor jelenlétében, aminosavnak azonban az izoleucint választották. Az izoleucin



β -szubsztituált aminosav lévén, a belőle felépített polimer lánc sztérikus okok miatt nem képes α -helix konformációt felvenni (8,9). Meglepő módon azt találták, hogy ebben az esetben a polimerizációs folyamat sebessége éppen fordított módon változik a monomer összetétellel mint a glutaminsav β -benzilészter származék esetén. Az optikailag tiszta monomer polimerizált viszonylag a leglassabban, a folyamat sebessége nőtt a monomer optikai tisztaságának csökkenésével és maximumot mutatott a racém összetételnél. Ebből az a következtetés vonható le (7), hogy, legalábbis ebben az esetben, a reaktív láncvégi utolsó aminosav konfigurációjával ellentétes konfigurációju monomer egység beépülése a kedvezményezett. Eszerint ebben az esetben a felépült polimer, térszerkezetét tekintve szündiotaktikus, míg a glutaminsav β -benzilészter származék esetében izotaktikus (5).

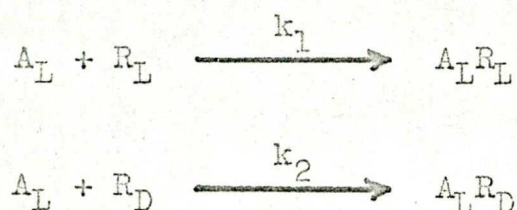
Összefoglalva megállapítható tehát, hogy makromolekuláknak egyszerűbb szerkezetű disszimmetrikus molekulákkal szemben megnyilvánuló diszkriminációs képességének mértékére vonatkozóan csak igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésre és azok is ellentmondásosak.

Másrészt makromolekulák diszkriminációs képességének egyszerű disszimmetrikus molekulák sztereokémiai sajátágaiból való értelmezéséhez szükséges lenne valamivel többet tudni a disszimmetrikus kölcsönhatások természetéről magáról. Ezen a téren a kvalitatív Cram (10) és Prelog (11) szabályokon kívül egy kvantitatív leírási módszer ismeretes az irodalomban (12,13). Egyszerű, két aszimmetriacentrumot tartalmazó diasztereomerek parciális aszimmetrikus szintézise során észlelt (11,14) optikai termelési adatok alapján Ugi (12) az izomer arányt kvantitativ leíró összefüggést talált, melyet később Ruch és Ugi (13) elméletileg is megalapozott. Ezen túlmenően Intézetünkben is folyamatban van egy, a kölcsönhatások fizikai értelmébe mélyebb betekintést nyújtó elmélet (15,16) kidolgozása.

Bonyolultabb, több aszimmetria elemet tartalmazó diasztereomerek keletkezése során fellépő ki-

netikus rezolválás vagy parciális aszimmetrikus szintézis mértékének kvantitatív leírása nem annyira matematikai nehézségekbe ütközik, mint elsősorban a számolt értékek megfelelő pontosságú kísérleti ellenőrzése jelent megoldatlan problémát.

Valamely A_L disszimmetrikus molekula valamely R racém vegyülettel való reakciója esetén a kinetikus rezolválás egzakt mértéke a k_1/k_2 hányados,



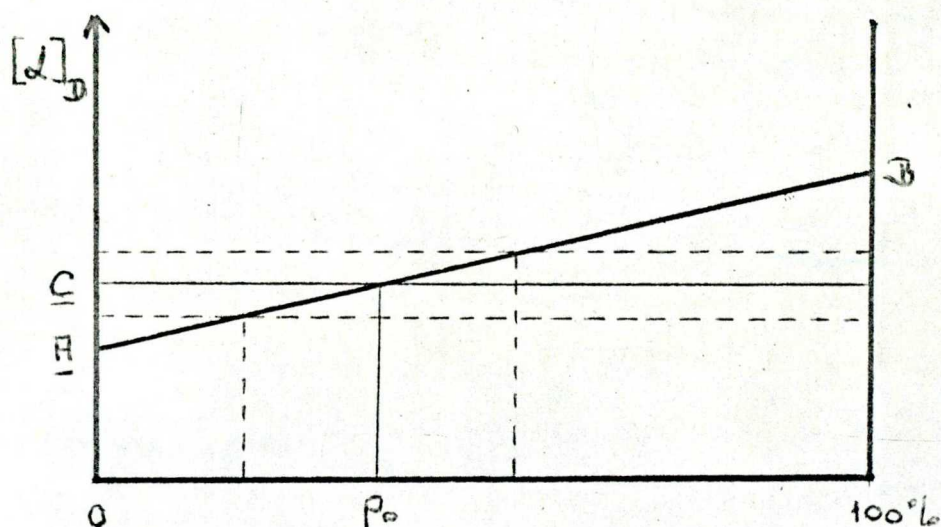
ahol R_L és R_D az R racém partner L ill. D komponense. A k_1/k_2 hányados közvetlen kinetikai mérése helyett célszerű és szokásos a kinetikus rezolválás mértékét, vagyis A_L -nek R irányába megnyilvánuló diszkriminációs készségét az $[A_LR_L]/[A_LR_D]$ hányadosból meghatározni a kapott termékelegyen. Kimutatható ugyanis, hogy ha R nagy feleslegben van jelen, azaz a reakció lefutása során R_L és R_D relatív koncentrációja gyakorlatilag állandónak tekinthető, akkor az $[A_LR_L]/[A_LR_D]$ koncentráció hányados igen jó közelítéssel adja a k_1/k_2 hányadost.

A feladat tehát visszavezethető egy két diasztereomert tartalmazó biner elegy összetételének

meghatározására, ahol a diasztereomerek n aszimmetria elemet tartalmazhatnak, de egymástól csak egy aszimmetria elem konfigurációjában különböznek.

Két aszimmetriacentrumot tartalmazó diasztereomerekből álló biner elegy összetételének meghatározására ismeretes módszerek az ellenáramu megoszlás (17), a frakcionált kristályosítás (18,19), a gáz-kromatográfiás (20,21) és a papirkromatográfiás (22,23,24) elválasztáson alapuló meghatározási módszerek, továbbá a termék optikai aktivitásának mérésén alapuló (25) módszer és legújabban egy mágneses rezonancia spektroszkópián alapuló módszer (26). Az elválasztásos módszerek közös hátránya nagy munkaigényességük, továbbá hogy specifikusak, azaz az elválasztási technikát esetről esetre ki kell dolgozni, továbbá hogy a kapott eredmények nem kielégítő pontosságúak. Az optikai aktivitás mérésén alapuló módszer, bár viszonylag egyszerű, csak durva közelítéssel adja a kívánt értéket, továbbá előfeltétel a komponensek optikai aktivitásának ismerete adott körülmények között. Például egy adott tripeptid származék diszkriminációs képességének méréséhez el kell készíteni a belőle leszármaztatható két tetrapeptid származékot optikai aktivitásuk mérése céljából.

A módszerrel elérhető pontosság a következő módon becsülhető meg: ha A és B a két diasztereomer fajlagos forgatóképességének értéke és a p_0 összetételhez tartozó C fajlagos forgatási érték 1%-os oldatban történő mérésekor a leolvasások egy 0.05° szélességű intervallumba esnek, beleértve a nullpont meghatározás bizonytalanságát is, ami általában egy igen elfogadható érték, akkor az $[\alpha]_D$ tengelyen egy 5° szélességű tartományon belül esnek a számított $[\alpha]_D$ értékek és ez a p tengelyre átvetítve egy $500/(A-B)$ szélességű tartományt fed le:



pl. ha A és B különbsége 25° , ami már egy számottevő eltérés, p_0 csak $\pm 10\%$ pontossággal adható meg (pl. $42 \pm 10\%$ az egyik komponens beépülése százalékban kifejezve), ahol még nem vettük figyelembe az A és B mérésekor fellépő bizonytalanságot.

A magmágneses rezonancia spektroszkópián alapuló módszer kétségtelenül gyors, elegáns módszer elegyek összetételének meghatározására, hatékonyságát illetően azonban már két aszimmetria elemet

tartalmazó diasztereomer rendszerek esetében is egymásnak ellentmondó irodalmi adatok (26,27,28) teszik kétségesse. A rendszerben jelenlévő aszimmetria elemek számának növekedésével várható módon az ezzel a technikával elérhető mérési pontosság is rohamosan csökken.

A teljesség kedvéért meg kell még említeni az u.n. enzimátikus módszereket. Bár meglehetősen költséges segédanyagok (karboxilázok, aminopeptidázok) segítségével, ezek a módszerek alkalmasak természetes szerves anyagok egy csoportjának (proteinek, polipeptidek) diszkriminációs képességének kielégítő pontosságu mérésére. Általánosságban véve azonban, alkalmazhatóságuknak határt szab az, hogy csak természetes vagy azokkal rokon szubsztráton fejtik ki hatásukat. Ugyanakkor alkalmazásuknak előfeltétele a védőcsoportok eltávolítása, amely kémiai művelet során csak nehezen biztosítható, ha egyáltalán, a változatlan izomer összetétel.

Összefoglalva megállapítható tehát, hogy az irodalomban mindezideig nem ismeretes olyan mérési módszer, amely több aszimmetria elemet tartalmazó, csak egy aszimmetria elem konfigurációjában különböző diasztereomerekből álló biner elegy összetételének nagy pontosságu meghatározására viszonylag egyszerű módon nyújtana lehetőséget. Bizonyára ez

az oka annak, hogy biopolimerek, de ugyanakkor egyszerűbb szerkezetű disszimmetrikus molekulák diszkriminációs képességére vonatkozóan is olyan kevés adat áll rendelkezésre az irodalomban.

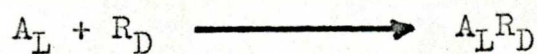
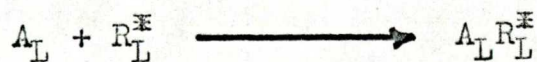
VÉGZETT MUNKÁM LEÍRÁSA

A jobb áttekinthetőség biztosítása céljából célszerű az anyagot a következő pontokra bontva tárgyalni:

- 1, a mérési módszer
- 2, a modell peptidek előállítása
- 3, a mérések
- 4, a kapott eredmények értékelése

1, A mérési módszer

A vizsgált reakciókban keletkező, diasztereo-
merekből álló biner elegyek összetételének pontos meghatározására egy új mérési módszert fejlesztettünk ki (29). Ennek lényege az, hogy a racém elegy L vagy D komponensét radioaktív nyomjelzővel, pl. ^{14}C -vel jelölve a kapott termék összetételének meghatározása a termék moláris aktivitásának meghatározására vezethető vissza:



illetve



ahol a jelölések azonosak a már korábban bevezetett jelölésekkel (l. 10. oldal) és a R jel radioaktív jelölést jelent.

Az izotópokkal történő nyomjelzési technika, annak bevezetése óta (30) igen sokrétű és változatos módon nyert alkalmazást a legkülönbözőbb problémák tanulmányozása során. Mégis, az irodalomban nem ismeretes utalás arra, hogy racém elegy egyik komponensét izotóppal jelezve a racém elegy komponenseinek relatív reaktivitását mérték volna. Így az Intézetünkben kifejlesztett és a disszertáció anyagát képező kísérleti munka során első ízben alkalmazott eljárás a nyomjelzési technika egy új, független alkalmazásának tekinthető.

A módszer számos előnnyel rendelkezik. Ellenkéntben a hasonló jellegű vizsgálatokra eddig rendelkezésre álló mérési technikákkal, ennél a módszer-nél nem szükséges ismerni a diasztereomer termék-elegy komponenseinek szinte egyetlen fizikai tulajdonságát sem, az eljárás általánosan alkalmazható hasonló típusú vizsgálatokban a reagáló partnerek fizikai és kémiai tulajdonságaitól nagymértékben függetlenül. Legfőbb előnye azonban az, hogy a kívánt meghatározást, a biner elegy komponensei relatív mennyiségének meghatározását nagy pontossággal teszi lehetővé. A meghatározás pontosságának elvi

korlátja a radioaktivitás mérés pontossága, azaz kb. $\pm 1\%$.

A módszer egy további előnye az, hogy lehetővé teszi a racém elegy L és D komponensei beépülésének külön kísérletekben történő, egymástól független mérését. Ha ugyanis a racém elegynek egyik esetben az L, másik esetben a D enantiomerjét jelöljük nyomjelzővel, úgy ezen enantiomerek beépülése valóban egymástól függetlenül mérhető. A beépüléseket százalékban kifejezve, összegüknek a száz százaléktól való eltérése ill. el nem térése demonstrálja a kapott eredmény megbízhatóságát. Mellékreakciók fellépése esetén ugyanis a kapott termék nem biner elegy, hanem melléktermékeket is tartalmazhat, melyeknek zavaró hatását eliminálni kell. Mindkét enantiomer jelölése, azaz a kísérleteknek kétféle racém eleggyel, $L^{\pm}D$ és $LD^{\pm}$, való kivitelezése esetén az eljárás önmaga kontrolljának is tekinthető.

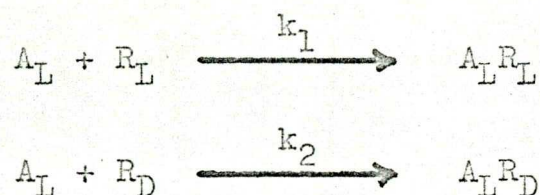
Az egyetlen felmerülő nehézségnek az tűnhet, hogy az egyik enantiomerjében radioaktív nyomjelzővel jelzett racém elegy elkészítéséhez mindkét antipódnak száz százalékos optikai tisztaságban kell hozzáférhetőnek lenni, ami egyes esetekben valóban problémát jelenthet. Kimutatható azonban, hogy

1, nem szükséges az, hogy a racém komponensként alkalmazott elegy valóban 50-50 százalékos

arányban tartalmazza az antipódokat,

- 2, elegendő az, ha a racém elegy készítéséhez felhasznált két komponens, tehát a jelzett és nem jelzett komponensek optikai tisztaságát pontosan ismerjük, ezeknek azonban nem szükséges egynek lenni. Más szavakkal, elegendő annak ismerete, hogy hogyan oszlik meg a bevitt radioaktivitás a "racém" elegy komponensei között.

Ez a következőképpen látható be: az optikailag aktív komponens (A_L), melynek diszkriminációs képességét kívánjuk mérni, a racém elegy R_L és R_D komponenseivel különböző, a k_1 és k_2 sebességi állandókkal jellemezhető sebességgel reagál:



A kiindulási anyagok kezdeti, és a termékek mindenkor koncentrációira a következő jelöléseket bevezetve:

$$\begin{array}{ll} [A_L] = a & [A_L R_L] = x \\ [R_L] = b & [A_L R_D] = y \\ [R_D] = c & \end{array}$$

a

$$\frac{dx}{dt} = k_1(a-x-y)(b-x)$$

és a

$$\frac{dy}{dt} = k_2(a-x-y)(c-y)$$

reakciósebességi egyenletekből integrálással a

$$\ln \frac{b}{b-x} = -\frac{k_1}{k_2} \ln \frac{c}{c-y}$$

összefüggést kapjuk.

Tegyük fel, hogy a jelen esetben R-nek az R_L komponensét jelöltük w_L moláris aktivitással, továbbá hogy $R^{\#}$ optikai tisztasága $p_L \neq 1$. Ebben az esetben $R^{\#}$ $R_L^{\#}$ mellett $R_D^{\#}$ -t is tartalmaz, azaz a radio-metrikus meghatározáskor $A_L R_D^{\#}$ -t is mérjük. Akkor

$$R^{\#} = m_L^{\#} = \frac{p_L + 1}{2} m^{\#} \quad \text{és}$$

$$m_D^{\#} = \frac{1 - p_L}{2} m^{\#}$$

ahol $R^{\#} = m^{\#}$ a radioaktív anyag mólszáma, $m_L^{\#}$ és $m_D^{\#}$ pedig a jelzett L és D komponensek mólszáma:

$$m_L^{\#} + m_D^{\#} = m^{\#}$$

Hasonlóan, a nem radioaktív, p_D optikai tisztaságú R komponens (mely esetünkben főleg D izomert tartalmaz) móljainak száma legyen m , ahol

$$m = m_L + m_D$$

és

$$m_L = \frac{1-p_D}{2} m; \quad m_D = \frac{p_D+1}{2} m$$

ahol m_L és m_D a nem radioaktív L és D izomerek mólszámai.

Akkor a "racém elegy" ($R^{\pm} + R$) moláris aktivitása:

$$w_2 = \frac{m^{\pm}}{m^{\pm} + m} w_1$$

Mivel sem $R^{\pm}$, sem R nem optikailag tiszta, a következő egyenletek írhatók fel, ahol a vesszős tagok az inaktív anyagok koncentrációit jelzik:

$$b = b^{\pm} + b'$$

$$c = c^{\pm} + c'$$

$$x = x^{\pm} + x'$$

$$y = y^{\pm} + y'$$

Belátható, hogy érvényesek a következő összefüggések:

$$\frac{b^{\pm}}{b} = \frac{x^{\pm}}{x} \quad \text{és} \quad \frac{c^{\pm}}{c} = \frac{y^{\pm}}{y}$$

továbbá

$$\begin{aligned} \frac{x^{\pm}}{x} = \frac{b^{\pm}}{b} &= \frac{m_L^{\pm}}{m_L^{\pm} + m_L} = \frac{\frac{p_L + 1}{2}}{\frac{p_L + 1}{2} m^{\pm} + \frac{1-p_D}{2} m} = \\ &= \frac{(p_L+1)m^{\pm}}{(p_L+1)m^{\pm} + (1-p_D)m} \end{aligned}$$

Mivel

$$w_2 = \frac{m^{\#}}{m^{\#} + m} w_1$$

a fenti összefüggés így írható:

$$\frac{\frac{x^{\#}}{x}}{p_L + 1 + (1-p_D)\left(\frac{w_1}{w_2} - 1\right)} = A$$

és hasonlóan

$$\frac{\frac{y^{\#}}{y}}{1-p_L + (p_D+1)\left(\frac{w_1}{w_2} - 1\right)} = B$$

Ha a végtermék moláris aktivitása w_3 , akkor

$$w_3 = w_1 \frac{x^{\#} + y^{\#}}{x + y} = (n_L^{\#} + n_D^{\#}) w_1$$

ahol $n_L^{\#}$ az $A_L R_L^{\#}$ móltörtje és $n_D^{\#}$ az $A_L R_D^{\#}$ móltörtje.

Mivel $x^{\#} = Ax$ és $y^{\#} = By$, így

$$x^{\#} + y^{\#} = Ax + By,$$

továbbá

$$\frac{x^{\#} + y^{\#}}{x + y} = n_L^{\#} + n_D^{\#} = A \frac{x}{x + y} + B \frac{y}{x + y} =$$

$$= An_L + Bn_D$$

ahol n_L és n_D a keletkezett összes A_LR_L és A_LR_D móltörtje,

$$n_L + n_D = 1$$

Ezért

$$n_L^{\pm} + n_D^{\pm} = \frac{w_3}{w_1} = An_L + B(1-n_L) = (A-B)n_L + B$$

és

$$n_L = \frac{\frac{w_3}{w_1} - B}{A - B}$$

és innen az R_L inkorporációja százalékban kifejezve:

$$100 n_L$$

Természetesen a módszerrel elérhető mérési pontosság függ attól, mennyire szelektíven kötődik a bevitt radioaktivitás az egyik optikai módosulathoz.

2. A modell peptidek előállítása

A vizsgálatokhoz a következő peptideket készítettük el:

Z-Ala-OEt (DL)

Z-Ala-OEt (L)

Z-Ala-Ala-OEt (L-L)

Z-Ala-Ala-OEt (L-D)

Z-Ala-Ala-Ala-OEt (L-L-L)

Z-Ala-Ala-Ala-OEt (L-L-D)

Z-Ala-Ala-Ala-OEt (L-D-L)

Z-Ala-Ala-Ala-OEt (L-D-D)

ahol $Z = C_6H_5CH_2O-CO-$,

továbbá mind a nyolc származéknak a hidrazidját.

Mivel ellentétben a racém komponens összetevőinek optikai tisztaságával szemben támasztott alacsony igényekkel, a diszkriminációs képességük mérése céljából előállított modell peptideket lehetőség szerint száz százalékos optikai tisztaságban kellett előállítani, kapcsolási módszerül az azidos kapcsolási módszert választottuk. Irodalmi adatok (31) szerint ugyanis ilyen típusu kapcsolások során racemizációt mindeddig nem sikerült kimutatni.

Kiindulási anyagul DL-alanint használtunk. Ezt többszöri vizes-alkoholos átcsapással tisztítottuk, míg halogén tartalma 0.1% alá csökkent. Az alanint

ugyanis 2-bróm-propionsav ammonolizisével készítik és a melléktermékként képződő ammonium-bromid jelenléte igen zavaróan hat a rezolválás során. A tisztított DL-alanint Greenstein enzimátikus módszerével (32) rezolváltuk. Eszerint a racém alanint jégecetes oldatban 90° körüli hőmérsékleten ecetsav-anhidriddel acetileztük, az izolált acetyl-DL-alanint átkristályosítással tisztítottuk, majd egyszer mólos vizes oldatban, pH 7-re történő semlegesítés után disznóveséből izolált Aciláz I enzimmel $35-40^{\circ}$ -on kezeltük 2-3 napig. Amennyiben a semlegesítést NaOH-val végeztük, a folyamat spektrofotometriás uton (33) követhető volt. Az enzim hatására az N-acetyl-L-alanin szelektív hidrolizist szenved, míg az N-acetyl-D-alanin változatlan marad. A két termék oldékonysága jelentősen eltér, pl. alkoholban. Így az oldat forralásból és szűrésből álló enzim-mentesítése utáni bepárlással és alkoholos hígítással tiszta L-alanint kaptunk, míg az oldatban maradó N-acetyl-D-alanin izolálása, ioncserés tisztítása (34) és sósavas hidrolizise D-alanint szolgáltatott.

A módszer alkalmazása során az L-alanint 100 százalékos optikai tisztaságban nyertük 60-75%-os termeléssel, míg a D-alanin izolálása során 30-40% volt az elérhető termelés és a termék optikai tisztasága 85-100% között változott.

A kapott L-alaninból két uton valósítottuk meg a benziloxi-karbonil-L-alanil-hidrazid elkészítését. Egyrészt irodalmi adatok alapján (35) az L-alanin észterezésével és a kapott etilészter klór-hangyasav benzilészterrel való reagáltatásával kloroform-víz rendszerben MgO jelenlétében és az azt követő hidrazinos kezeléssel etilalkoholban, másrészt az L-alanin közvetlen benziloxi-karbonilezésével (36), majd a kapott Z-alanin sósavas-etilalkoholos észterezésével és az észter hasonló hidrazinos reagáltatásával. Mivel ez a módszer az irodalomban nem ismert, célszerű valamivel részletesebben tárgyalni.

Ismeretes, hogy a benziloxi-karbonil védőcsoport savas közegben könnyen eltávolítható, azaz savra meglehetősen érzékeny (37,38,39). Mégis, azt találtuk, hogy szobahőmérsékleten sósavas etilalkohollal szemben eléggé ellenálló a védőcsoport, ilyen körülmények között a karboxil észterezhető anélkül, hogy számottevő mértékben bomlana a vegyület. A reakciót számított mennyiségű tionil-kloridnak 24 óra állás után a reakció elegybe való beadagolásával tettük teljessé. A benziloxi-karbonil-L-alanin etilészter egy olajos anyag, ezt tiszta formában nem izoláltuk, hanem közvetlenül hidraziddá alakítottuk és ebben a formában tisztítottuk. A második uton

lényegesen magasabb termeléssel tudtuk a benziloxi-karbonil-L-alanil-hidrazidot előállítani, mint az irodalmi leírás (35) alapján.

A benziloxi-karbonil-alanin di- és tripeptid észterek és hidrazidok előállítása az azidos kapcsolási módszerrel történt egy irodalmi leírás (35) alapján. Eszerint a védett aminosav-hidrazidot sósavas-ecetsavas-vizes közegben -5° körüli hőmérsékleten NaNO_2 -vel nitrozáltuk, a kapott azidot diklórmetánnal extraháltuk, az oldatot vízzel és híg hidrokarbonát oldattal mostuk, majd rövid szárítás után 1,5 ekvivalens L- (vagy D-) alanin etilészter diklór-metános oldatával elegyítettük, melyet a megfelelő észter hidroklorid diklór-metánban való oldásával és ekvivalens mennyiségű trietil-aminnal való kezelésével kaptunk. Huszonnégyórás, szobahőmérsékleten történő reagáltatás után az elegyet újból mostuk híg savval, nátrium -hidrokarbonát oldattal és vízzel, majd szárítás után bepároltuk és a nyers terméket etilalkoholból történő kristályosítással tisztítottuk. A tripeptid észter származékok hasonló módon készültek a dipeptid-hidrazidokból. A kapott észter származékok fizikai állandóit és analízis adatait az 1. Táblázat (28. oldal) tartalmazza.

A táblázatokban a peptid származékokat rövidített jelöléssel jelöltük. Z minden esetben benzil-oxi-karbonil védőcsoportot jelent, ezután csak az alanin egységek konfigurációja van feltüntetve és végül a karboxilcsoport helyettesítője (pl. OEt, N_2H_3 , N_3).

Az irodalmi leirással (35) szemben a fő módosítás abban állt, hogy az ott megadott éter ill. éter-etilacetát közeg helyett diklór-metánt használtunk oldószerként. Ilymódon a reakciókeverék végig homogén maradt, ami egyszerűsítette a feldolgozást és főleg relative nagyobb termelés elérését tette lehetővé. Másrészt a nitrozálási reakció közegéül szolgáló sósav-ecetsav-víz rendszer összetételét változtattuk; mindkét változtatás főleg a mérési reakciók kivitelezése során volt különösen jelentős, melyről a későbbiekben lesz szó.

Az észterek átalakítását hidrazidokká vízmentes etilalkoholos közegben végeztük 1,2-1,5 ekvivalens 98-100%-os hidrazin-hidrát jelenlétében történő 1-4 órás forralással és a hűtésre kivált termék átkristályosításával vízmentes etilalkoholból. A kapott hidrazidok fizikai állandóit és analízis adatait a 2. Táblázat mutatja (29. oldal).

1. Táblázat

A benziloxi-karbonil-alanin észterek fizikai állandói és
analízis adatai

Anyag:	op.	irodalmi op.(35)	$[\alpha]_D^{20}$ c 1, EtOH	Analízis:			Számított össze- tétel		
				C	H	N	C	H	N
Z-DL-OEt	olaj	-	--	-	-	-	-	-	-
Z-L-OEt	olaj	-	--	-	-	-	-	-	-
Z-L-L-OEt	116°	116°	-44.0°	59,47	6,79	8,71	59,61	6,88	8,69
Z-L-D-OEt	92°	92°	+ 6,35°	59,49	7,04	8,97			
Z-L-L-L-OEt	196°	192°	-59,2°	58,17	7,11	10,57	58,00	6,92	10,68
Z-L-L-D-OEt	176-8°	176°	-20,3°	57,78	7,14	10,39			
Z-L-D-L-OEt	148-8,5°	142°	+ 4,3°	58,19	7,04	10,77			
Z-L-D-D-OEt	165-7°	-	+34,5°	57,92	6,85	10,70			

2. Táblázat

A benziloxi-karbonil-alanil-hidrazidok fizikai állandói és
analízis adatai

Anyag:	op.	irodalmi op. (35)	$[\alpha]_D^{20}$ c 1, AcOH	Analízis			Számított értékek		
				C	H	N	C	H	N
Z-DL-N ₂ H ₃	118,5- 119°	-	-	55,95	6,44	17,56	55,69	6,37	17,71
Z-L-N ₂ H ₃	138,5- 139°	138,5°	-13,0°	55,65	6,25	17,83			
Z-L-L-N ₂ H ₃	209°	209°	-38,4°	54,40	6,69	18,02	54,54	6,54	18,17
Z-L-D-N ₂ H ₃	193°	193°	+ 9,5°	54,34	6,75	18,08			
Z-L-L-L-N ₂ H ₃	235-7°	235°	-57,2°	53,86	7,10	18,41	53,82	6,64	18,46
Z-L-L-D-N ₂ H ₃	205°	205°	-29,8°	53,72	6,94	18,37			
Z-L-D-L-N ₂ H ₃	192-4°	194°	+ 2,4°	53,70	6,70	18,40			
Z-L-D-D-N ₂ H ₃	256-7°	-	+31,5°	53,61	6,85	18,33			

3. Mérések

a, A ^{14}C -vel jelzett racém elegyek előállítása

A modell peptidek lánctagszám növelési reakcióját a C-terminálison hajtottuk végre és racém alanin etilészterrel viteleztük ki. Független mérésekkel állapítottuk meg az L és D enantiomerek beépülését és a kapott eredményt százalékos beépülésben fejeztük ki. Ezekhez a mérésekhez elkészítettük az L ill. D enantiomerjében ^{14}C -vel jelzett racém elegyeket.

A radioaktív jelzést minden esetben a C_1 -en ^{14}C -vel jelzett etilalkohollal való észterezéssel végeztük. A radioaktív etilalkohol metil-magnézium-jodid $^{14}\text{CO}_2$ -vel végzett karbonizációjával, a kapott C_1 jelzett ecetsav észterezésével és LiAlH_4 -es redukciójával készült. Aktivitása a kristályos α -naftil-karbamát alakban végzett mérés alapján

7 661 393 dpm/mmale

volt.

Ezt a radioaktív etilalkoholt száraz sósavgázzal telítettük, majd az észterezni kívánt 100%-os optikai tisztaságu L-alanin hozzáadása után a heterogén elegyet mágneses keverővel másnapig kevertettük, a homogén oldatot keverés közben az aminosavval egyenértékű tionil-kloriddal kezeltük $20-30^\circ$ -on és további egy napig állni hagytuk. Ezután az etil-

alkohol feleslegét légköri nyomáson ledesztilláltuk, a maradékot alaposan leszivattuk és P_2O_5 -ről frissen desztillált etilacetátból átkristályosítottuk, majd P_2O_5 felett súlyállandóságig szárítottuk.

A ledesztillált etilalkohol, mely sósavat és a tionil-klorid átalakulás termékeit is tartalmazta, közvetlenül felhasználható volt a D-alanin észtere-sítésére; az eljárás teljesen azonos volt az L-izo-mer esetében leírttal. A felhasznált D-alanin 94%-os optikai tisztaságu volt.

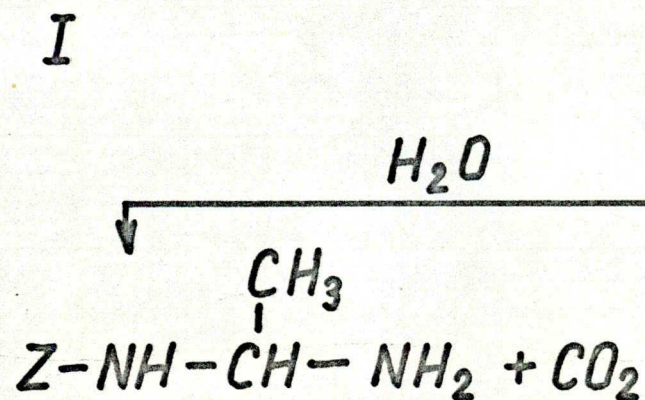
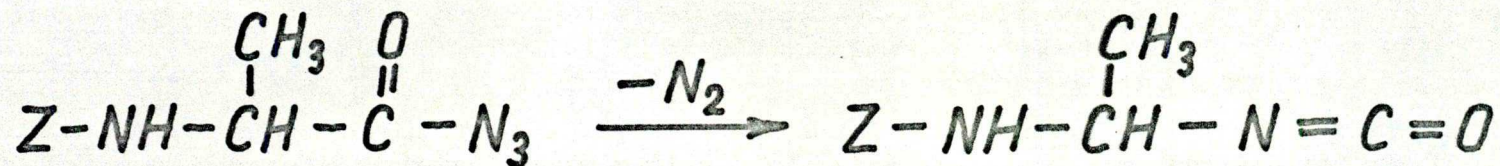
A kapott jelzett L-alanin etilészter hidro-kloridot 94%-os optikai tisztaságu nem radioaktív D-alanin etilészter hidrokloriddal kristályosítottuk össze olyan arányban, hogy, a jelzett és nem jelzett komponensek optikai tisztaságának figyelembevételé-vel, a racém elegy pontosan 1:1 arányban tartalmazza az L és D enantiomereket. Az elegy jele: $L^{\pm}D$ észter hidroklorid.

Teljesen hasonló módon készült az $LD^{\pm}$ észter hidroklorid keverék is, 100%-os optikai tisztaságu L-alanin etilészter hidroklorid felhasználásával; az L és D enantiomerek arányát itt is pontosan 1:1-re állítva be.

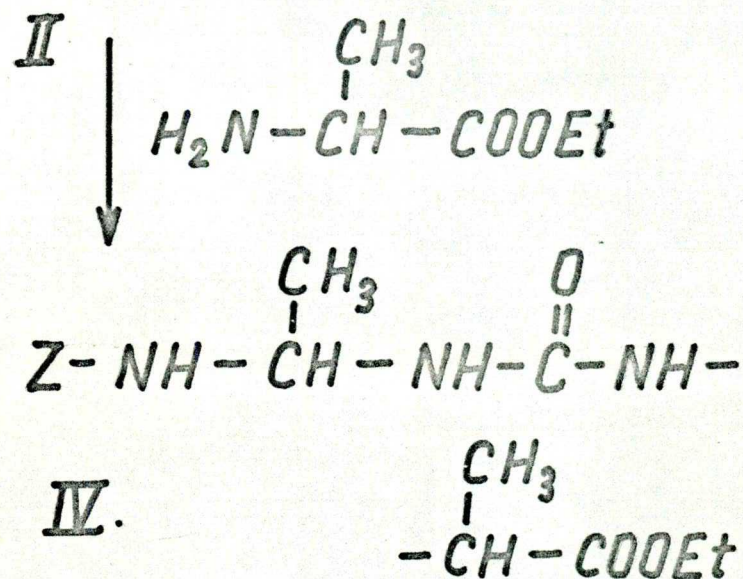
b. A beépülések mérése

Az L és D izomerek beépülésének mérésénél a számbajövő problémák közül a legkomolyabb az, hogy a reakcióterméket oly módon kell megtisztítani, hogy az elegy tisztítás után már valóban csak a főtermékként keletkezett két diasztereomert tartalmazza, ugyanakkor ezek aránya ne változzon meg a tisztítás során, mert az a mérési eredmény durva meghamisítását jelentené. Az eltávolítandó anyagok egyrészt a feleslegben alkalmazott racém észter el nem reagált frakciójából és a vele együtt a reakciókeverékbe juttatott segédanyagokból (trietyl-amin, sósav) tevődnek össze, másrészt mint ismeretes (40) az azidos kapcsolási módszert számos mellékreakció kíséri és ezek termékei alkotják az eltávolítandó anyagok másik csoportját.

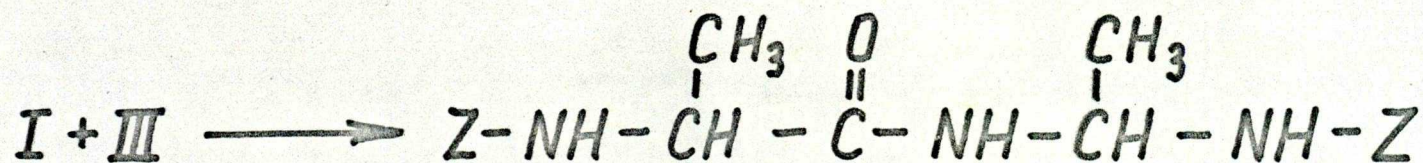
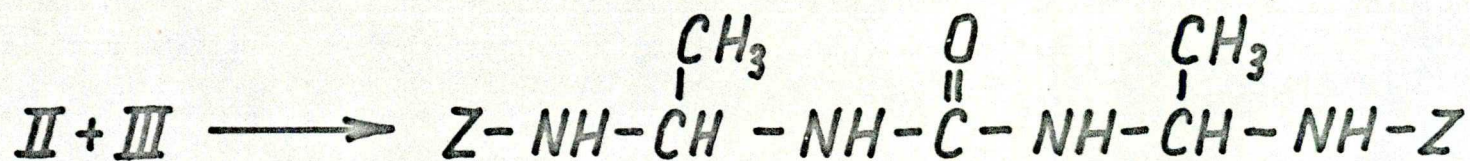
Mint már történt rá utalás, reprodukálható eredmények nyerésének előfeltétele az acilező ágens, esetünkben a modell peptidek, konfigurációs stabilitása elkészítésük és az acilezési reakciókban való részvételük közben, ez pedig majdnem kizárólag csak az azidos kapcsolási módszer esetén biztosított. Másrészt az azidos kapcsolási módszer komoly hátránya az, hogy számos mellékreakció kíséri. Ezekről a mellékreakciókról nyújt áttekintést, a teljesség igénye nélkül, a 3. Táblázat (33. oldal).



III.



IV.



Mint látható, a bomlástermékek szintén reakcióba léphetnek a jelenlévő alanin etilészterrel mint primer aminnal és ilymódon radioaktív melléktermékek is képződhetnek.

Az eltávolítandó anyagok egy része kémiai természeténél fogva savas ill. lúgos mosással eltávolítható. Ilyen kezelés során a semleges természetű, apoláros, vízben nagymértékben oldhatatlan főtermék peptid molekulák várható módon semmilyen változást, pl. koncentráció változást, nem szenvednek, azaz koncentrációjuk aránya változatlan marad. Mivel a savas-lúgos kirázással el nem távolítható melléktermékek, pl. karbamid származékok (1. 3. Táblázat) szelektív eltávolítására nincs lehetőség, a reakció körülményeket kell úgy megválasztani, hogy ezek már eleve ne, vagy csak elhanyagolható mértékben keletkezzenek. Zavaró hatásuk eliminálásáról meggyőző bizonyítékot nyújt az, ha a független kísérletekben mért L és D inkorporációk százalékos összege jó közelitéssel adja a száz százalékot, mint erről a mérési módszer c. fejezetben volt már szó. A lehetséges melléktermékek molekulasúlya ugyanis eltérő a főtermékétől, a melléktermékek megjelenése tehát a végtermékben mindenképp eltolná a beépülési százalék összeget a száztól.

A 2. Táblázatban felsorolt benziloxi-karbonil-alanin-hidrazid származékokat az ismert módon savas-vizes közegben nitrozáltuk és a megfelelő azid származékok diklór-metános oldatát tisztítás és szárítás után megfeleztük, majd előre elkészített $L^{\pm}D$ és $LD^{\pm}$ észterek diklór-metános oldatához adtuk. Az észter oldatok úgy készültek, hogy a bemért hidrazid felére számított 10-15-szörös moláris mennyiségű $L^{\pm}D$ ill. $LD^{\pm}$ észter hidrokloridot diklór-metánban oldottuk, majd az észter hidrokloriddal ekvivalens mennyiségű trietil-amint adtunk az oldatokhoz.

A reakcióelegyeket egy napos szobahőmérsékleten való állás után hig savval, nátrium-hidrogén-karbonát oldattal és vízzel mostuk, szárítottuk, majd bepároltuk. A kapott nyers terméket minden további tisztítás nélkül radioaktivitás mérésre adtuk. A radioaktivitások mérése dimetil-formamid oldatban folyadék szcintillációs módszerrel történt Packard készüléken. A reakciókban alkalmazott hidrazidok mennyiségét, a nitrozálásnál alkalmazott oldószer rendszert, a kapott termékek kémiai termelési adatait és fajlagos aktivitásukat az 5. Táblázat mutatja a kísérleti részben (53. oldal.).

Figyelembe véve a felhasznált racém elegy komponenseinek optikai tisztaságát (100 ill. 94%), a

racém elegy $L/D = 1.0000$ arányát és a jelzésre felhasznált etilalkohol moláris aktivitását, az L és D enantiomerek beépülését a következő, egyszerűsített formulák segítségével határoztuk meg:

$$L^{\pm} : \frac{100 \times w_3}{7\,424\,443} \quad \text{és}$$

$$D^{\pm} : \frac{97w_3 - 22\,984\,179}{7\,201\,709}$$

ahol w_3 a dpm/mg fajlagos aktivitás és a termék molekulaszúlyának szorzata.

A kapott eredményeket a 4. Táblázat tartalmazza (37. oldal).

Az első oszlop tartalmazza az optikailag tiszta benziloxi-karbonil-alanil-azidokat a korábbi táblázatokban alkalmazott egyszerűsített jelöléssel, a második oszlop az $L^{\pm}D$ észterrel végzett kísérlet terméke fajlagos aktivitásának mért értékéből számított L-alanin inkorporáció értéket százalékos beépülésben kifejezve, a harmadik oszlop a hasonló módon kapott D-aminosav inkorporáció értékeket, míg a negyedik és ötödik oszlopok ezen értékek összegét ill. hányadosát.

4. Táblázat

Az L és D alanin egységek beépülése a modell peptidek lánctagszám
növelési reakciójában

Anyag:	L [±]	D [±]	L + D	L/D
Z-DL-N ₃	49,37	49,57	98,94	0,995
Z- L-N ₃	45,81	52,70	98,51	0,869
Z-L-L-N ₃	86,59	12,99	99,58	6,665
Z-L-D-N ₃	23,30	76,77	100,07	0,303
Z-L-L-L-N ₃	81,35	19,12	100,47	4,254
Z-L-L-D-N ₃	24,86	75,39	100,25	0,329
Z-L-D-L-N ₃	66,13	31,36	97,49	2,108
Z-L-D-D-N ₃	18,74	82,14	100,88	0,228

4. A kapott eredmények értékelése

A mérési módszer hatékonyságának ellenőrzése céljából első kísérletként racém benziloxi-karbonil-alanil-azidot reagáltattunk az $L^{\pm}D$ és $LD^{\pm}$ racém alanin etilészterekkel annak kontrollálása céljából, milyen pontossággal adja vissza a mérési technika az itt fellépő, szükségképpen 50-50%-os megoszlást. A kapott értékek eltérése az elméleti 50-50-től belül esik a radioaktivitás mérésének $\pm 1\%$ -os hibahatárán.

A Z-L-Ala- N_3 diszkriminációs képessége kicsi, az egy aszimmetria elemet tartalmazó aciklusos molekulák esetében tapasztalt diszkriminációs értékek nagyságrendjébe esik. Kedvezményezett a D enantiomer beépülése. Ez a megfigyelés összhangban van más kutatók rokon jellegű vizsgálatainak eredményeivel (41,42).

Már dipeptideknél ugrásszerűen megnő a diszkriminációs képesség, kedvezményezett a reakciócentrumhoz közelebbi aszimmetria elem konfigurációjával megegyező konfigurációju aminosav beépülése. Az eredmények alapján az a következtetés vonható le, hogy a molekula diszkriminációs képességének meghatározásában döntő szerep jut az utolsó aszimmetria elem konfigurációjának. Ugyanakkor az L-L és L-D dipeptid származékok diszkriminációs képességének

egybevetéséből az is kitűnik, hogy a következő, távolabbi aszimmetria elem konfigurációjának hatása sem elhanyagolható. A diszkriminációs képesség, abszolút értékben, nagyobb az L-L mint az L-D származéknál, vagyis úgy tűnik, hogy a peptid "lánc" diszkriminációs képessége akkor maximális, ha azonos konfigurációjú tagokból épül fel.

Tripeptideknél a legelső, ami szembetűnik az, hogy az L-L-L tripeptid származék valamivel kisebb hatásfokkal szelektál az L és D lánctagszám növelő komponensek között, mint az L-L dipeptid származék. Ugyanakkor az L-D-D származék a mérési hibahatár körüli eltéréssel azonos mértékben képes szelektálni mint az L-L-L származék. Ebből úgy tűnik, hogy a reakciócentrumtól legtávolabbi aszimmetria elem hatását teljesen leárnyékolja az azt követő, azonos konfigurációjú elemekből álló dublett. A dublett hatásának reális mértékét valószínűleg a tripeptid fokon mért értékek adják, a dipeptid fokon tapasztalt, ehhez adódó plusz érték talán onnan ered, hogy a relative nagy térkitöltésű benziloxi-karbonilcsoport az adott konformációban felvett térállásával szerencsés módon fokozza a rendszer aszimmetriáját, míg egy további aszimmetria elem beépítésével együttjáró eltávolodása ennek a csoportnak kioltja

ezt a hatást.

Az L-L-D származék diszkriminációs képessége lényegében azonos az L-D dipeptidével, meghatározó szerepe tehát itt is a reakciócentrumhoz közeli dublettnak van. A tripeptidek közül a legkisebb diszkriminációs képességgel az L-D-L származék rendelkezik, ez kisebb még az L-D dipeptid származéknál mért értéknél is. Ez a tény arra mutat, hogy alternáló konfigurációs sorrend esetén a legnagyobb a beépült idegen enantiomer egységek "zavaró" hatása a peptid diszkriminációs képességére.

A fenti következtetések további ellenőrzése, ill. esetleges további információk nyerésének egyik lehetséges útja a mérési módszer kiterjesztése a tetrapeptid fokra. Ezek a vizsgálatok folyamatban vannak.

KISÉRLETI RÉSZ

Az olvadáspont értékeket Kofler készüléken határoztuk meg és a megadott értékek korrigáltak.

DL-Alanin tisztítás:

100 g. nyers alanint minimális mennyiségű (kb. 150-160 ml.) forró vízben oldunk, aktiv szenes derítés és szűrés után 600 ml. absz. etilalkoholt adunk hozzá, majd éjszakán át állni hagyjuk. A kivált kristályokat szűrjük, etilalkohollal többször mossuk és vákumban szárítjuk. A termék súlya 80-82 g., hófehér kristályok, op. $270-296^{\circ}$ között a melegítés sebességétől függően. Amennyiben a termék Br^{-} ion tartalma alapján számított NH_4Br tartalma 0.1%-nál nagyobb, az eljárást ismételni kell.

A DL-alanin rezolválása:

a, N-acetil-DL-alanin:

89.1 g. (1 mól) DL-alanint 900 ml. 99%-os jégecetben oldunk forráspont hőmérsékleten, az oldatot 1-2 percig hűlni hagyjuk, majd 3-4 részletben 150 ml. (1,5 mól) ecetsavanhidridet adunk hozzá. Ezután az oldatot kb. 2 percig újra forraljuk, majd másnapig állni hagyjuk. Csökkentett nyomáson történő bepárlás után a maradékhoz 4-5 alkalommal 20 ml.

vizet, majd végül 20 ml. benzolt adunk és minden alkalommal szárazra pároljuk. A kapott szirupos, sárgásbarna terméket, mely még enyhén ecetsav szagu, forró etilacetátban oldjuk, üvegbottal való dörzsöléssel beindítjuk a kristályosodást, majd szobahőmérsékletre történt lehülés után az elegyet $0-5^{\circ}$ hőmérsékleten tartjuk másnapig. A kivált kristályokat szűrjük, éterrel többször mossuk és szárítjuk. A termék súlya 105-108 g., termelés 80-81%, op. 136° .

b. Rezolválás:

131 g. (1 mól) N-acetil-DL-alanint 500 ml. kétszer desztillált vízben oldunk, az oldatot 4N NaOH oldattal pH 7-re semlegesítjük, majd az egészet 1000 ml.-re higitjuk, 150 mg. Aciláz I enzimet adunk hozzá és 2-3 napig $35-40^{\circ}$ -on tartjuk. Ezután az oldatot 5 percig forraljuk, aktiv szénnel derítjük és csökkentett nyomáson bepároljuk. A kapott szirupos anyagot 250 ml. vízmentes etilalkohollal higitjuk és másnapig állni hagyjuk. A kivált kristályokat szűrjük, etilalkohollal többször mossuk és szárítjuk. A termék súlya 33-34 g., 75% termelés, op. $275-276^{\circ}$, $[\alpha]_D^{20}$ $14,6^{\circ}$ (c 2, 6N HCl) és $33,0^{\circ}$ (c 1, AcOH).

c. A D-alanin izolálása:

Az L-alanin kiszűrésekor kapott szűrletet

csökkentett nyomáson bepároljuk, 200 ml. vízben oldjuk a maradékot és az L-alanin nyomainak eltávolítása céljából Dowex 50 (H^+) gyantán bocsátjuk át, majd a gyantát vízzel mossuk. Az eluátumot 200 ml.-re bepárolva 100 ml. tömény sósavat adunk hozzá és 2-3 órán át forraljuk visszafolyó hűtő alkalmazásával. Ezután az oldatot csökkentett nyomáson bepároljuk, 250 ml. etilalkoholban forrón oldjuk és tömény NH_4OH -val pH 7-re semlegesítjük. A kivált anyagot szűrjük, forró alkohollal többször mossuk, majd szárítjuk. A termék súlya: 14-18 g., 30-40% termelés, $op.$ $278-80^\circ$, $[M]_D^{20}$ $-12,4$ és $-14,6^\circ$ között (c 2, 6N HCl) és -28.0 és -33.0° között (c 1, AcOH). Forró vízből való kristályosítással az optikai aktivitás növelhető, azonban a kristályosítási veszteség 30-50%.

Benziloxi-karbonil-L-alanil-hidrazid:

I. L-Alanin etilészter benziloxi-karbonilezésével és a kapott termék hidrazinos kezelésével

a, L-Alanin etilészter hidroklorid:

Vizmentes etilalkoholba száraz sósavgázt vezetünk keverés és hűtés közben, míg az oldat HCl tartalma 0,12-0,13 g/ml. lesz. 89 g. (1 mól) L-alanint 200 ml. fenti HCl oldathoz adva a heterogén

elegyet mágneses keverővel keverjük míg homogén oldatot nyerünk (20-24 óra). Jeges vizes hűtés és intenzív keverés közben 72 ml. (1 mól) tionil-kloridot csepegtetünk az oldathoz, majd 24 óra állás után az egészet bepároljuk. Az olajos maradékot 400 ml., P_2O_5 -ről frissen desztillált etilacetátban forrón oldjuk és lassan hűlni hagyjuk. A kivált kristályokat szűrjük és 0° -os etilacetáttal mossuk, majd vákumban súlyállandóságig szárítjuk. A termék súlya 140-145 g., 92.5-95.0% termelés, op. 84° .

b, Benziloxi-karbonilezés:

15.4 g. (0.1 mól) L-alanin etilészter hidroklorid, 75 ml. viz és 180 ml. kloroform elegyéhez hűtés és intenzív keverés közben 5,2 g. (0,13 mól) MgO -t adunk 3 részletben kb. 30 perc alatt, miközben 22,2 g. (0,13 mól) klór-hangyasav benzilésztert csepegtetünk be $0-5^\circ$ közötti hőmérsékleten. További 30 perc keverés után 5 ml. piridint adunk a rendszerhez, majd 5 perc múlva 5N sósavval pH 4-5-re savanyítjuk. A két fázist elválasztjuk, a szerves fázist mossuk 0,5N sósavval, vízzel, 5%-os $NaHCO_3$ oldattal és vízzel, majd szárítjuk (Na_2SO_4) és bepároljuk. Háromszor 50 ml. etilalkoholt adunk a maradékhoz és újra bepároljuk, végül 100 ml. etilalkoholban oldjuk és 7.0 g. 98-100%-os hidrazin-hid-

rátot adunk hozzá. A kivált anyagot másnap szűrjük, P_2O_5 felett szárítjuk és etilacetátból átkristályosítjuk. A termék súlya 13,1 g., 55% termelés.

A benziloxi-karbonil-DL-alanil-hidrazid hasonló módon készült, fizikai állandóikat és analízis adataikat a 2. Táblázat (29. oldal) mutatja.

II. Benziloxi-karbonil-L-alanin észterezésével és az észter hidrazinos kezelésével

L-Alanin lugos-vizes közegben klór-hangyasav benzilészterrel történő kezelésével (36) 85%-os termeléssel kapjuk a benziloxi-karbonil-L-alanint, $op. 84^\circ$, $[\alpha]_D^{20} -13,9^\circ$ (c 2, AcOH).

103,4 g. (0,46 mól) benziloxi-karbonil-L-alanint 250 ml. vízmentes etilalkoholban oldunk enyhe melegítéssel, majd hűtés után 250 ml. 10%-os vízmentes etilalkoholos sósav oldatot adunk hozzá és az egészet másnapig szobahőmérsékleten állni hagyjuk. Ekkor keverés és hűtés közben 33 ml. (0,46 mól) $SOCl_2$ -t csepegtetünk az oldathoz. További egynapos állás után szobahőmérsékleten bepároljuk az oldatot, majd a maradékot azonnal feloldjuk 600 ml. kloroformban és 250 ml. telített $NaHCO_3$ oldattal mossuk. A savas bepárlás végén részleges bomlás történik, amit a benzil-klorid szagának megjelenése is jelez. Az elérhető termelés nagymértékben függ attól,

mennyire gyorsan távolítjuk el a NaHCO_3 -tal a savnyomokat. A kloroformos oldatot újra bepároljuk. Amennyiben a savnyomokat előzőleg teljesen eltávolítottuk, további bomlás ebben a fázisban nem történik. A továbbiakban úgy járunk el, mint az előző módszernél; a termelés 80-82% (88-90 g.).

Benziloxi-karbonil-L-alanil-L-alanin etilészter

25.56 g. (0,108 mól) benziloxi-karbonil-L-alanil-hidrazidot oldunk 120 ml. jégecet, 50 ml. tömény sósav és 450 ml. víz elegyében, az oldatot -10° -ra hűtjük és egy részletben hozzáadunk 35 g. (0,5 mól) NaNO_2 -t tömény vizes oldat alakjában. Az oldat hőmérséklete emelkedik, azonban külső hűtéssel -5° -on tartjuk. Két-három perc múlva az oldatot extraháljuk 200 ml. -10° -ra lehűtött diklór-metánnal, a szerves fázist 0° -ra hűtött 100 ml. vízzel, 10%-os NaHCO_3 oldattal és ismét vízzel mossuk, majd Na_2SO_4 -n szárítjuk 10 percig.

Közben 23 g. (0,15 mól) L-alanin etilészter hidrokloridot oldunk 250 ml. diklór-metánban, majd 21 ml. Et_3N -t adunk az oldathoz cseppenként. Az így kapott rendszerhez adjuk a fenti azid oldatot és az egészet másnapig állni hagyjuk. Akkor mossuk 100 ml. N sósavval, 10%-os NaHCO_3 oldattal és végül vízzel, majd szárítás (Na_2SO_4) után az oldatot be-

pároljuk. A maradékot etilacetátban oldjuk 70°-on és kezdődő zavarosodásig petrolétert adunk hozzá. A kivált kristályokat másnap szűrjük, etilacetát - petroléter 1:1 elegyével mossuk és súlyállandóságig szárítjuk. A termék súlya 21.0 g., 60% termelés.

Benziloxi-karbonil-L-alanil-D-alanin etilészter

Teljesen hasonló módon készült, azzal az eltéréssel, hogy az L-alanin etilészter hidroklorid helyett annak antipódját használtuk. A termelés itt is 60% volt. Mindkét anyag fizikai állandóit és analízis adatait az 1. Táblázat mutatja.

Benziloxi-karbonil-dipeptid hidrazidok

20,95 g. (0,065 mól) benziloxi-karbonil-L-alanil-L(ill. D)-alanin etilésztert 50 ml. abs. etilalkoholban forrón oldunk, majd 8 ml. 98-100%-os $N_2H_4 \cdot H_2O$ hozzáadása után az egészet 90 percig forraljuk visszafolyó hűtő alkalmazásával. Ezután az oldatot éjszakán át 0°-on tartjuk, a kivált anyagot szűrjük és vizmentes etilalkoholból átkristályosítjuk. A termék súlya 15-16 g., termelés 78-80%. Az anyalugokból további anyagmennyiség nyerhető, az együttes termelés 85-87%. A termékek fizikai állandóit és analízis adatait a 2. Táblázat mutatja.

Benziloxi-karbonil-L-alanil-L-alanil-L-alanin etil-
észter

15,76 g. (51,12 mmól) benziloxi-karbonil-L-alanil-L-alanil-hidrazidot oldunk 300 ml. jégecet, 30 ml. tömény sósav és 300 ml. víz elegyében, az oldatot -5 és -10° közötti hőmérsékleten 10 g. NaNO_2 tömény vizes oldatával kezeljük, 200 ml. -10° -os diklór-metánnal extraháljuk, majd a későbbiek során ugyanugy járunk el, mint a benziloxi-karbonil-dipeptid észterek előállításakor. Az alkoholból átkristályosított termék súlya 14,80 g., 73,6% termés.

Hasonló módon készült a másik három védett tripeptid észter származék is. Az alábbiakban a kiindulási benziloxi-karbonil-dipeptid hidrazidok súlya, az annak oldására alkalmazott jégecet-sósav-víz oldószer-keverék összetétele és a termelés értékei vannak feltüntetve:

- L-L-D: 14,28 g., 300:100:100, 80%;
- L-D-L: 12,08 g., 80: 50 :50, 60,45%;
- L-D-D: 10,70 g., 100: 50: 50, 72,56%.

Valamennyi benziloxi-karbonil-tripeptid észter fizikai állandói és analízis adatai az 1. Táblázatban vannak feltüntetve.

Benziloxi-karbonil-tripeptid hidrazidok:

A benziloxi-karbonil-tripeptid észterek alkoholos közegben feleslegben alkalmazott $N_2H_4 \cdot H_2O$ -val való 1-4 órás forralás hatására a megfelelő hidrazidokká alakulnak. A tisztított termékekre számított termelés 80-90% volt. Például: 2,8673 g. (7,29 mmól) Z-3L-OEt, 50 ml. etilalkohol és 3 ml. 98-100%-os $N_2H_4 \cdot H_2O$ elegyét 90 percig forralva és a másnapra kivált anyagot etilalkoholból átkristályosítva 2,4000 g. benziloxi-karbonil-tripeptid hidrazidot nyerünk, termelés 86,8%.

A benziloxi-karbonil-tripeptid hidrazidok fizikai állandóit és analízis adatait a 2. Táblázat tartalmazza.

A ^{14}C jelzett racém alanin etilészterek készítése

a, a ^{14}C etilalkohol aktivitásának mérése

2,2 ml. α -naftil-izocianáthoz 1 ml. ^{14}C etilalkoholt adva a keverék 2-3 óra múlva szilárd, kristályos anyaggá alakult. Ezt szén-tetrakloridból négyszer átkristályosítva és minden átkristályosítás után aktivitás mérésre adva a következő értékeket kaptuk: 35463, 35812, 35627 és 35470 dpm/mg (100 sec. alatt). Ezek középértékéből a molekula súlyok figyelembevételével az etilalkohol moláris aktivitása



7661393 dpm/mmól-nak adódik.

b, A jelzett L-alanin etilészter hidroklorid készítése

27,4650 g. L-alanin (100%-os optikai tisztaság) és 250 ml., a fenti aktivitású ^{14}C jelzett etilalkohol elegyében keverés és hűtés közben száraz sósavgázt vezetünk, míg homogén oldatot kapunk (kb. 4 óra). Egynapi állás után 23 ml. SOCl_2 -t csepegtetünk az oldathoz keverés és hűtés közben $10-15^\circ$ -on, majd további egy nap állás után légköri nyomáson bepároljuk az oldatot. A desztillációs maradék gyorsan bekristályosodik, ezt 200 ml., P_2O_5 -ről frissen desztillált etilacetátból átkristályosítva és P_2O_5 és NaOH felett exsikkátorban súlyállandóságig szárítva 45,2290 g. terméket ($\text{L-Ala-OEt}^{\text{H}}.\text{HCl}$) kapunk, termelés 95,5%.

c, A jelzett D-alanin etilészter hidroklorid készítése

25,0130 g. D-alanin (94% optikai tisztaság) és a jelzett L-alanin etilészter készítése során ledesztillált radioaktív etilalkohol elegyében száraz sósavgázt vezetünk és az oldatot hasonló módon feldolgozva 40,8020 g. $\text{D-Ala-OEt}^{\text{H}}.\text{HCl}$ -t nyerünk, termelés 94,6%.

d, Az L[±]D-alanin etilészter hidroklorid készítése

32,1185 g. L-Ala-OEt[±].HCl és 34,1690 g. D-Ala-OEt.HCl (94% optikai tisztaság) elegyét 400 ml., P₂O₅-ről frissen desztillált etilacetátból átkristályosítva 63,0620 g. L[±]D-alanin etilészter hidrokloridot nyerünk, termelés 95,13%.

e, Az LD[±]-alanin etilészter hidroklorid készítése

37,5132 g. D-Ala-OEt[±].HCl és 35,2626 g. L-Ala-OEt.HCl (100% optikai tisztaság) elegyét hasonlóan összekristályosítva 70,5182 g. LD[±]-alanin etilészter hidrokloridot nyerünk, termelés 96,90%.

A beépülések mérése

Hasonló módon járunk el, mint a benziloxi-karbonil-alanin észterek szintézisének, azzal a különbséggel, hogy észter komponensként L[±]D ill. LD[±] észtereket használunk 10-15-szörös moláris mennyiségben, továbbá hogy a nyers terméket átkristályosítás nélkül radioaktivitás mérésre adjuk.

Az 5. Táblázat mutatja a reakciókban alkalmazott hidrazidok mennyiségét, a nitrozálásnál alkalmazott oldószer rendszert, a kapott termékek kémiai termelési adatait és fajlagos aktivitásukat.

Például: 0,5014 g. (1,6258 mmól) Z-2L-N₂H₃-t oldunk 10 ml. jégcet, 5 ml. tömény sósav és 20 ml. víz elegyében, az oldathoz -5°-on 0,3240 g. (4,695 mmól, 2,888 ekvivalens) NaNO₂ tömény vizes oldatát adjuk, az egészet 50 ml. CH₂Cl₂-vel extraháljuk, a szerves fázist 50 ml. vízzel, 10% NaHCO₃ oldattal és vízzel mossuk, Na₂SO₄-on szárítjuk, szűrés után CH₂Cl₂-vel 50 ml.-re higitjuk, az oldatot két egyenlő részre osztjuk és hozzáadjuk

a, 1,2485 g. L[±]D észter hidroklorid (8,133 mmól, 10.0 ekvivalens), 50 ml. CH₂Cl₂ és 1,13 ml. Et₃N, ill.

b, 1,3115 g. LD[±] észter hidroklorid (8,53 mmól, 10,5 ekvivalens), 50 ml. CH₂Cl₂ és 1,19 ml. Et₃N

elegyéhez. Egynapi, szobahőmérsékleten való állás után mindkét oldatot mossuk 50 ml. N sósavval, 10% NaHCO₃ oldattal és vízzel, szárítjuk (Na₂SO₄), majd bepároljuk és súlyállandóságig szárítjuk. A kapott termékek súlya: a, 200.0 mg., 62,5% és 234,4 mg. 73,25%, míg a termékek fajlagos aktivitása 15820 és 3191 dpm/mg (100 sec. alatt) volt.

5. Táblázat

Az L- és D-aminosavak beépülés mérések kísérleti adatai

Anyag	Bemérés (mg) (mmól)	AcOH-HCl-H ₂ O (ml.)	L [±] D		LD [±]	
			Termelés %	dpm/mg	Termelés %	dpm/mg
Z-DL-N ₂ H ₃	991,9 (4,18)	6:1,2:25	59,9	11370	50,5	12150
Z-L-N ₂ H ₃	1000 (4,22)	6:1,2:25	56,2	10550	50,3	12870
Z-L-L-N ₂ H ₃	501,4 (1,63)	10:5:20	62,5	15820	73,25	3191
Z-L-D-N ₂ H ₃	497,4 (1,61)	10:5:20	74,2	4396	72,0	15090
Z-L-L-L-N ₂ H ₃	451,9 (1,22)	20:10:10	82,1	13002	76,9	3567
Z-L-L-D-N ₂ H ₃	561,3 (1,48)	20:10:10	71,1	3974	75,4	12560
Z-L-D-L-N ₂ H ₃	517,4 (1,36)	20:10:10	50,5	10570	63,4	5522
Z-L-D-D-N ₂ H ₃	426,4 (1,12)	20:10:10	63,3	2227	71,5	7986

ÖSSZEFOGLALÁS

Az irodalomban mindeztideig nem ismeretes olyan mérési technika, mely kinetikus rezolválás során keletkezett, diasztereomerekből álló biner elegyek összetételének nagy pontossággal történő meghatározását viszonylag egyszerű módon tenné lehetővé. Módszert dolgoztunk ki ilyen jellegű mérések nagy pontossággal történő elvégzésére, melynek lényege az, hogy a racém elegy egyik összetevőjét radioaktív nyomjelzővel, pl. ^{14}C -vel jelölve, a kívánt mérés a termékelegy moláris aktivitásának mérésére vezethető vissza.

Irodalmi leírások módosításával szintetizáltunk hét, alaninból felépített mono-, di- és tripeptid származékot és mértük diszkriminációs képességüket racém alanin etilészterrel szemben, a peptid származékoknak a C-terminálison végrehajtott lánctagszám növelési reakciójában. Az L és D aminosav származékok beépülésének külön kísérletben történő, független mérésével igazoltuk, hogy a módszer igen nagy pontossággal alkalmas a kívánt mérés viszonylag egyszerű kivitelezésére. Következtetéseket vontunk le az általunk vizsgált kisebb tagszámú oligopeptidek diszkriminációs képessége és sztereikus szerkezete közötti összefüggést illetően.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet kívánok mondani munkahelyi vezetőimnek, Ötvös Lászlónak a kémiai tudományok doktorának és Tömösközi Istvánnak a kémiai tudományok kandidátusának munkám témájának és a vizsgálati módszernek a kijelöléséért, munkám folyamatos irányításáért.

Köszönettel tartozom volt főnökömnek és tanáromnak, Dr. Fodor Gábor professzor Urnak egy nagyobb mennyiségű D-alanin preparátumért, mellyel munkámat nagymértékben előrelendítette.

Ezuton mondok köszönetet az Intézet Analitikai Laboratoriuma dolgozóinak a mikroanalizisek és radioaktivitás mérések elvégzéséért, továbbá Dr. Mády György kollégámnak az enzimatisz rezolválás spektrofotometriás követésében nyújtott segítségéért.

Ezuton is köszönöm Dr. Halmos Miklós docensnek, a kémiai tudományok kandidátusának a disszertáció megírásában nyújtott segítségét, sok értékes tanácsát.

IRODALOM

- 1, K. Linderstrøm-Lang: Acta Chem. Scand. 12,
851 (1958)
- 2, A. Berger, K. Linderstrøm-Lang: Arch. Bio-
chem. Biophys. 69, 106 (1957)
- 3, M. Idelson, E.R. Blout: J. Am. Chem. Soc.
80, 2387 (1958)
- 4, P. Doty, R.D. Lundberg: J. Am. Chem. Soc.
78, 4810 (1956); ibid. 79, 3961
(1957)
- 5, E.L. Eliel: Stereochemistry of Carbon Com-
pounds, McGraw-Hill Book Company, Inc.
New York, 1962, 451. o.
- 6, C.H. Bamford, H. Block, in Polyamino Acids,
Polypeptides and Proteins, M.A. Stahl-
man (Ed.) University of Wisconsin
Press, Madison, Wisconsin, 1965, 65.o.
- 7, F.D. Williams, R.D. Brown: IUPAC International
Symposium on Macromolecular Chemistry,
Budapest, 1969, Abstracts I kötet I/18,
75. o.
- 8, E.R. Blout, in Polyamino Acids, 1. 6.
irodalom, 275. o.
- 9, A. M. Liquori: J. Polymer Sci., 12C, 235
(1966).

- 10, D.J. Cram, F.A. Abd Elhafez: J. Am. Chem. Soc. 74, 5828 (1952)
- 11, V. Prelog: Helv. Chim. Acta 36, 308 (1953)
- 12, I. Ugi: Chimia 19, 89 (1965); Z. Naturforsch. 20b, 405 (1965)
- 13, E. Ruch, I. Ugi: Theor. Chim. Acta 4, 287 (1966)
- 14, A. McKenzie: J. Chem. Soc. 85, 1249 (1904)
- 15, Tömösközi, I., Mohácsi T.: Magyar Kémikusok Egyesülete 1969 évi Vegyészkonferenciája, Szeged, Előadásvázlatok 116. o.
- 16, Tömösközi, I., Mohácsi, T.: Magyar Kémikusok Lapja, előkészületben
- 17, D.W. Clayton, J.A. Farrington, G.W. Kenner, J. M. Turner: J.Chem.Soc. 1957, 1398
- 18, G.W.Anderson, F.M. Callahan: J.Amer.Chem. Soc. 80, 2902 (1958)
- 19, N.A. Smart, G.T. Young, M.W. Williams: J. Chem. Soc. 1960, 3902
- 20, F. Weygand, A. Prox, L. Schmidhammer, W. König: Angew. Chem. 75, 282 (1963)
- 21, B. Halpern, L. Chew, J.W.Westley: Anal. Chem. 39, 399 (1967)
- 22, E. Taschner, T. Sokolowska, J.F. Biernat, A. Chimiak, C. Wasielewski, B. Rzeszotorska: Ann. 663, 197 (1963)

- 23, T. Sokolowska, J.F. Biernat: J. Chrom. 13,
269 (1964)
- 24, H.F. Feltkamp, A. Prommer: J. Chrom. 18,
403 (1965)
- 25, M.W. Williams, G.T. Young: J.Chem.Soc.
1963, 881; A.L.Heard, G.T.Young:
J.Chem. Soc. 1963, 5807
- 26, B. Halpern, D.E. Nitecki, B. Weinstein:
Tetrahedron Letters 1967, 3075
- 27, T. Wieland, H. Bende: Chem. Ber. 98, 504
(1965)
- 28, M. van Gorkom: Tetrahedron Letters 1966,
5433
- 29, Ötvös, L., Tömösközi, I., Mohácsi, T.:
előkészületben
- 30, G. Hevesy, F. Paneth: Z. Anorg. Chem. 82,
322 (1913)
- 31, M. Bodanszky, M.A. Ondetti: Peptide Syn-
thesis, Interscience, New York,
1966, 149. o.
- 32, J.P. Greenstein, M. Winitz: Chemistry of
the Amino Acids, Wiley, New York,
1961, 1831. o.
- 33, H. Rosen: Arch. Biochem. Biophys. 67, 10
(1957)

- 34, E. Gasior, T. Janik: Chem. Anal. (Warsaw)
12, 1133 (1967); C.A. 68:36655k
- 35, B.F. Erlanger, E. Brand: J.Amer.Chem.Soc.
73, 3508, 3510 (1951)
- 36, Organic Syntheses (Ed.: E.C. Horning), Coll.
Vol. III. Wiley, New York, 1955, 167. o.
- 37, J. White: J. Biol. Chem. 106, 141 (1934)
- 38, K. Okawa: Bull. Chem. Soc. Japan 31, 88
(1958)
- 39, A.E. Barkdoll, W.F. Ross: J.Amer. Chem.Soc.
66, 951 (1944)
- 40, E. Schnabel: Ann. 659, 168 (1962)
- 41, O. Cervinka, J. Budilova: Collection Czech.
Chem. Commun. 32, 2383 (1967)
- 42, F. Weygand, W. Steglich, X.B.de la Lama:
Tetrahedron, Suppl. 8. Part I. 9-13 o.

