

Х.-Д. Якубке  
Х. Ешкайт

---

# АМИНОКИСЛОТЫ ПЕПТИДЫ БЕЛКИ

Перевод с немецкого  
канд. хим. наук Н. П. Запеваловой  
и канд. хим. наук Е. Е. Максимова  
под редакцией  
д-ра хим. наук, проф. Ю. В. Митина

Москва «Мир» 1985

# 1. Аминокислоты

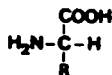
Аминокислоты существуют на нашей планете более трех миллиардов лет. Это доказано исследованием ископаемых микроорганизмов углеродсодержащих кремниевых остатков из докембрийского геологического периода с помощью рубидиево-цезиевого метода датирования. Существуют они и вне Земли, что показано хроматографическим анализом органических частей метеоритов. В водных экстрактах лунных пород найдены следы глицина и аланина.

Аминокислоты — это органические соединения, физико-химическое поведение и разнообразные реакции которых объясняются одновременным присутствием в молекуле основной аминогруппы  $\text{NH}_2$ — и кислой карбоксильной группы — $\text{COOH}$ .

Различают  $\alpha$ -аминокислоты, у которых амино- и карбоксильная группы соединены с одним и тем же атомом углерода, и  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -аминокислоты, функциональные группы которых разделены несколькими атомами углерода:



В природе встречаются главным образом  $\alpha$ -аминокислоты. Они имеют общую формулу



и различаются только по остаткам R боковой цепи. Все эти соединения содержат по крайней мере один центр хиральности (за исключением глицина, у которого  $\text{R} = \text{H}$ ). Вследствие этого следует различать оптически активные энантимеры и оптически неактивные (рацемические) формы  $\alpha$ -аминокислот. Встречающиеся в природе  $\alpha$ -аминокислоты имеют L-конфигурацию. Лишь некоторые продукты метаболизма низших организмов содержат D-аминокислоты.

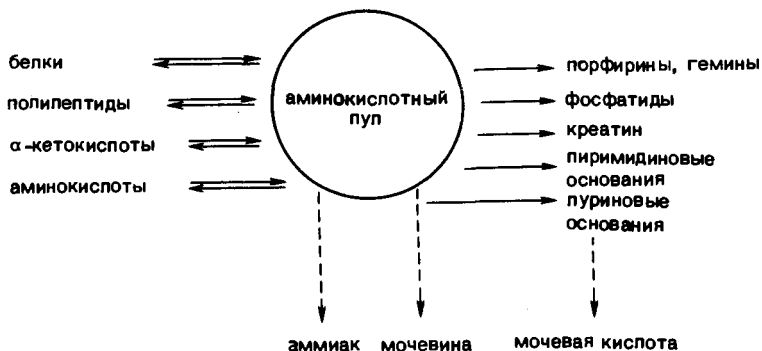


Рис. 1-1. Схематическое представление превращений аминокислот.

Аминокислоты как основные составные части белков участвуют во всех жизненных процессах наряду с нуклеиновыми кислотами, углеводами и липидами. Кроме аминокислот, входящих в состав белков, живые организмы обладают постоянным резервом «свободных» аминокислот, содержащихся в тканях и в клеточном соке. Они находятся в динамическом равновесии при многочисленных обменных реакциях. Аминокислоты используются в биосинтезе полипептидов и белков, а также в синтезе фосфатидов, порфиринов и нуклеотидов.

Свободные аминокислоты нужны в живом организме и для выполнения специфических задач. Так, глутаминовая кислота выполняет особую функцию переноса при переаминировании, метионин — при переметиловании. Главными продуктами разложения аминокислот являются аммиак, мочевина и мочевая кислота. Восполнение потерь аминокислот происходит в основном в результате расщепления белков, а также переаминирования  $\alpha$ -кетокислот и взаимных превращений аминокислот.

Далее, после обсуждения номенклатуры дается краткий обзор важнейших аминокислот, встречающихся в природе. Затем рассматриваются стереохимия, химические реакции, а также синтез и анализ аминокислот.

### 1.1. Номенклатура аминокислот

Названия аминокислот произошли в основном от исходных материалов, из которых они были впервые выделены; например, аспарагин (от лат. *asparagus* — спаржа) получен из сока спаржи, цистеин и цистин (от греч. *cystis* — мочевой пузырь) — из камней мочевого пузыря, глутамин и глутаминовая кислота (от нем. *das Gluten* — клейковина) — из клейковины пшеницы, серин (от греч. *seros* — шелковичный червь) — из шелка и тирозин (от греч. *tyros* — сыр) — из сыра. Другие названия связаны с методами выделения. Так, аргинин (от лат. *argentum* — серебро) был впервые получен в виде серебряной соли, триптофан выделен при расщеплении белка с по-

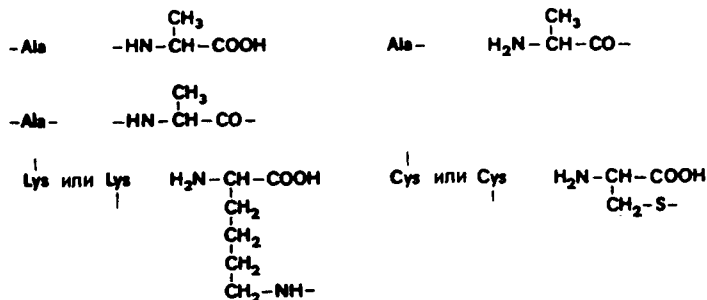
мощью трипсина. Структурные связи с другими природными соединениями также внесли вклад в названия некоторых аминокислот. Так, валин назван как производное валериановой кислоты, треонин структурно связан с моносахаридом треозой. Название «пролин» происходит от рационального обозначения пирролидин-2-карбоновой кислоты.

За исключением триптофана и аминокодикарбоновых кислот, названия аминокислот имеют окончания -ин, что подчеркивает их принадлежность к аминам. Аминоацильные остатки общей формулы  $\text{NH}_2\text{-CHR-CO-}$  называют, добавляя к корню слова окончание -ил. Поскольку у аспарагиновой и глутаминовой кислот и их полуамидов одинаковые корневые слова, остатки глутамина и аспарагина называют обычно «глутаминил» и «аспарагинил», остатки же глутаминовой и аспарагиновой кислот получили названия «глутамил» и «аспарагил».

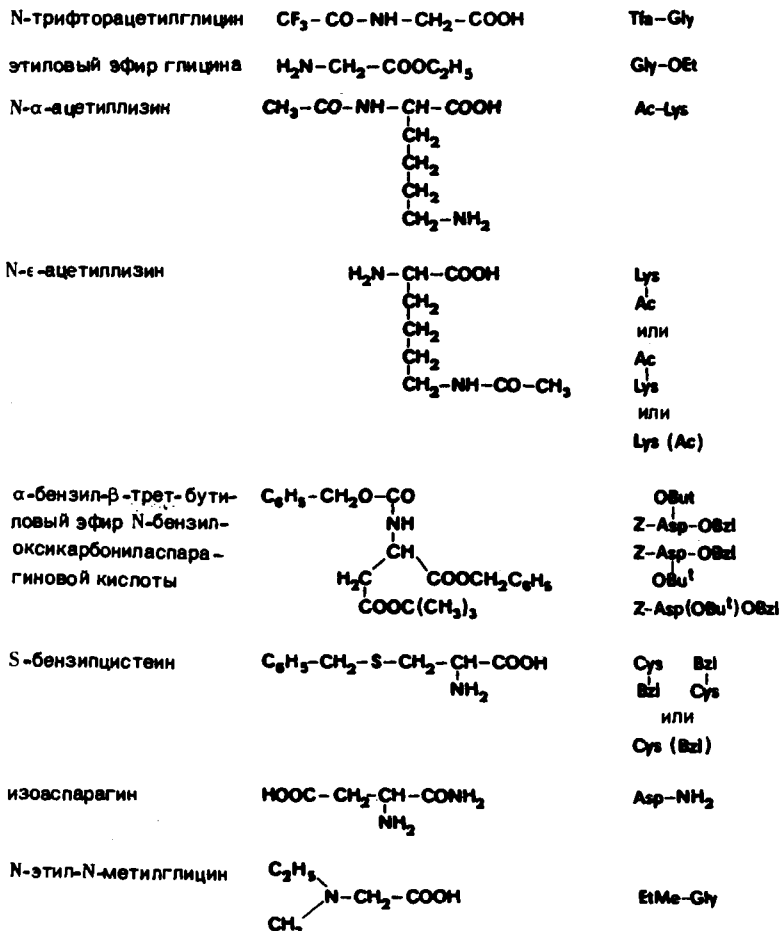
Для удобства написания пептидных фрагментов предложено пользоваться сокращенными названиями аминокислотных остатков, которые состоят из первых трех букв тривиального названия аминокислоты, например Ala для L-аланина и Met для L-метионина (сокращения для других аминокислот см. в табл. 1-1). Оптическая конфигурация аминокислоты указывается символами, причем специально отмечают только D- и DL-аминокислоты, например D-Ala и DL-Met. алло-Соединения обозначаются символом «а», например алле для алло-L-изолейцина.

У гидроксиаминокислот после первых двух букв Hu от латинского слова hydro следует первая буква названия аминокислоты, например для гидроксизина — Hyl или для гидроксипролина — Hup. Однако более удобен пятибуквенный символ: Hulus и Hurgo соответственно. Для аминокислот небелкового происхождения также введены сокращения. Для нораминокислот, которые имеют нормальную углеродную цепь, для различия с разветвленными изосоединениями перед символом ставят букву N, например для норлейцина Nle, для норвалина Nva. В случае высших неразветвленных аминокислот в начале символа ставят букву A, обозначающую функциональную аминогруппу, например для  $\alpha$ -аминомасляной кислоты Abu и для  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты Aad. В том случае, если молекула имеет две аминогруппы, символ начинается с буквы D, например для  $\alpha$ ,  $\gamma$ -диаминомасляной кислоты Dbu.  $\alpha$ - и  $\omega$ -положения аминогрупп специально не обозначают, во всех других случаях положение аминогруппы обозначается буквами греческого алфавита, например для  $\beta$ -аланина  $\beta$ -Ala. В случае N-алкиламинокислот, часто встречающихся в депептидах, сокращенное название алкила Me или Et пишут перед символом аминокислоты, например для N-метилвалина MeVal и для N-этилглицина EtGly.

*Обозначение аминокислотных остатков и производных аминокислот.* Принято обозначать замещения атома водорода в amino-, imino-, гуанидино-, окси- или тиольной группе, а также замещения -ОН в карбоксильной группе с помощью свободной связи (черточка): в случае замещения водорода  $\alpha$ -аминогруппы ее ставят слева от символа аминокислоты, в случае замещения в гидроксильной группе  $\alpha$ -карбоксила — справа, если же замещение имеется в боковой цепи, то проставляется свободная связь сверху или снизу:



Для производных аминокислот в соответствующих местах через связи записываются символы заместителей:



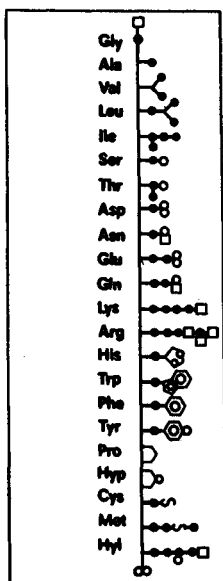


Рис. 1-2. Структурные символы аминокислот по Веллинеру и Мейстеру.

Принятая система сокращений помогает наглядно изображать схемы пептидных синтезов.

Рассмотренные сокращения (и сокращения, которые будут употребляться в дальнейшем) соответствуют правилам, принятым Международным союзом по чистой и прикладной химии (IUPAC) и Международным союзом по биохимии (IUB). Кроме того, введены также однобуквенные символы, которые применяются для изображения структур белков и длинных пептидных последовательностей, а также для расчетов с помощью ЭВМ.

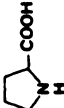


Первая система сокращений для аминокислот и пептидов была опубликована Брандом и Эдсалом в 1947 г. Система графического изображения аминокислот, предложенная Веллинером и Мейстером, учитывает структурные особенности аминокислотных цепей (рис. 1-2).

## 1.2. *Природные аминокислоты*




В настоящее время известно около 180 различных природных аминокислот. Особенно много аминокислот выделено за последние годы после того, как благодаря развитию методов очистки и успехам аминокислотного анализа были предприняты систематические исследования животного и растительного материала.

Таблица 1-1. 20 аминокислот белкового происхождения

Тип аминокислоты	Тривиальные названия аминокислот	Сокращение согласно IUPAC-IUBa	Структурная формула	Открыватель и исходный материал, из которого выделена (год)	Материалы с наиболее высоким содержанием аминокислоты и содержание, %
Алифатические, нейтральные аминокислоты	Глицин	Gly G	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Браконно, шелк (1820)	Фиброин шелка Желатин
	Аланин	Ala A	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Вейль, фиброин шелка (1888)	Фиброин шелка
	Валин	Val V	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	Горуп-Безане, экстракт железа (1836)	Эластин Сухожилия быка Аорта быка
	Лейцин	Leu L	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\   \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	Пруст, творог (1819)	Сывороточный альбумин быка Кукуруза Пепсиноген свиньи
Алифатические гидроксиминокислоты	Изолейцин	Ile I	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \\   \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	Эрлих, патока (1904)	Сывороточный альбумин быка Белок рвса
	Серин	Ser S	$\text{HOCH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Крамер, шелковый клей (1865)	Фиброин шелка Трипсиноген Пепсин

Треонин	Thr T	$H_2C-S-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$	Розе и др., фибрин (1935)	Кератин волоса человека	8,5
Цистеин	Cys C	$HS-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Бауман, цистин (восстановлен-ем) (1884)	Авидин (яичный белок)	10,5
Метионин	Met M	$H_3C-S-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Мюллер, казеин (1921)	Кератин волос	14,4
Пролин	Pro P		Фишер, казеин (1901)	Кератин перьев	8,2
Лизин	Lys K	$H_2N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Дрексель, казеин (1899)	Кератин шерсти	11,9
Аргинин	Arg R	$HN-CH_2-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$ 	Шульце и др., проростки люпина (1886)	$\gamma$ -Казеин	4,1
Гистидин	His H		Коссель, стурин (1896)	Овальбумин	5,2
Аспарагиновая кислота	Asp D	$HOOC-CH_2-CH(NH_2)-COOH$	Риттхаузен, бобовые (1868)	$\beta$ -Лактоглобулин	3,2
Аминокислоты, содержащие серу				Сальмин	6,9
Иминокислоты				Казеин	10,6
Основные аминокислоты				Желатин	16,3
				Миоглобин лошади	15,5
				Сывороточный альбумин быка	12,8
				$\beta$ -Лактоглобулин	12,6
				Сальмин	86,4
				Желатин	8,3
				Гистон (печени крысы)	15,9
				Гемоглобин	7,0
Кислые аминокислоты и полуамиды				Эдестин	12,0
				Глобулин ячменя	10,3



Тип аминокислоты	Тривиальные названия аминокислот	Сокращение согласно IUPAC-IUBa	Структурная формула	Открыватель и исходный материал, из которого выделена (год)	Материалы с наиболее высоким содержанием аминокислоты и содержание, %
Аспарагин	Asp N или Asp(NH <sub>2</sub> )	$\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Вокеллин и Робике, спаржа (1806)		
Глутаминовая кислота	Glu E	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Ритгхузен, бобы (1866)	Глиадин пшеницы Глиадин ржи Кукуруза	39,2 37,7 22,9
Глутамин	Gln Q или Gln(NH <sub>2</sub> )	$\text{H}_2\text{N}-\text{OC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$	Шульце, сахарная свекла (1877)		
Ароматические и гетероароматические аминокислоты	Phe F		Шульце и Барбьеря, ростки люпина (1879)	Сывороточный альбумин γ-Глобулин Овальбумин	7,8 4,6 7,7
Тирозин	Tyr Y		Либих, сыр (1846)	Фиброин шелка Папаин	12,8 14,7
Триптофан	Trp W		Гопкинс и Кол, казеин (1901)	Лизоцим (яйца) α-Лактальбумин	10,6 7,0

а Однобуквенные символы применяются только при написании аминокислотных последовательностей.

Первой выделенной природной аминокислотой был аспарагин. Он был изолирован в 1806 г. Вокелином и Робике из сока спаржи. Эта аминокислота относится к 20 аминокислотам, являющимся основными составными частями животных и растительных белков, причем их встраивание в молекулу белка регулируется информацией генетического кода. Этим так называемым «протеиногенным» аминокислотам посвящен следующий раздел.

### 1.2.1. Протеиногенные аминокислоты

Аминокислоты, участвующие в образовании белков, можно классифицировать по разным признакам. По положению изоэлектрической точки различают кислые, основные и нейтральные аминокислоты, по строению боковой цепи R — алифатические, ароматические и гетероциклические. Гидроксикаминокислоты содержат дополнительно ОН-группы, серусодержащие аминокислоты имеют в боковой цепи тиольные или тиоэфирные группы. Самостоятельную группу образуют иминокислоты пролин и гидроксипролин, у которых вторичная аминогруппа -NH- входит в состав пирролидинового кольца.

По полярности боковой цепи R различают полярные и неполярные аминокислоты. К *неполярным аминокислотам* относятся глицин и аланин, а также гидрофобные аминокислоты — валин, лейцин, изолейцин, пролин, метионин и фенилаланин. К *полярным аминокислотам* причисляют серин, треонин, цистеин, аспарагин, глутамин и триптофан (нейтральные соединения), аспарагиновую и глутаминовую кислоты и тирозин (кислые гидрофильные аминокислоты), а также лизин, аргинин и гистидин (основные гидрофильные аминокислоты). Гидрофильные полярные соединения увеличивают растворимость пептидов и белков в водных системах, в то время как нейтрально-полярные аминокислоты ответственны за каталитическую активность ферментов. В противоположность неполярным гидрофобным аминокислотам полярные аминокислоты обычно находятся на поверхности молекулы белка.

По строению соединений, получающихся при расщеплении углеродной цепи протеиногенных аминокислот, различают *глюкопластичные (глюкогенные)* и *кетопластичные (кетогенные) аминокислоты*. Глюкопластичные аминокислоты — глицин, аланин, серин, треонин, валин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, гистидин, метионин и пролин. При недостатке углеводов в организме они через шевелевоуксусную кислоту и фосфоэнолпировиноградную кислоту превращаются в глюкозу (глюконеогенез) или гликоген. Единственной кетопластичной аминокислотой является лейцин. Изолейцин, тирозин и фенилаланин могут быть и глюко-, и кетопластичными.

Кроме того, биохимики различают заменимые и незаменимые аминокислоты, смотря по тому, могут ли они образоваться в организме или должны быть доставлены с пищей.

*Незаменимые аминокислоты* [13 — 16]. Растения и некоторые микроорганизмы могут производить все аминокислоты, нужные им для синтеза клеточных белков. Животные организмы способны синтезировать только 10 протеиногенных аминокислот. Остальные 10 не могут быть получены с помощью биосинтеза и должны постоянно поступать в организм в виде пищевых белков. Отсутствие их в организме ведет к угрожающим жизни явлениям (задержка роста, отрицательный азотный баланс, расстройство биосинтеза белков и т. д.). Розе и сотр. [17] предложили для этих аминокислот название «незаменимые аминокислоты» (НАК). В табл. 1-2 приведены незаменимые для организма человека аминокислоты и минимальная суточная потребность в них.

Таблица 1-2. Минимальная суточная потребность организма человека в незаменимых аминокислотах (НАК)

Аминокислота	Потребность индивидуума, г	Аминокислота	Потребность массы тела [18], мг/кг
Arg	1,8	Arg	Взрослый организм не нуждается
His	0,9	His	
Ile	0,7	Ile	10
Leu	1,1	Leu	14
Lys	0,8	Lys	12
Met	1,1	Met (Cys)	13
Phe	1,1	Phe (Tyr)	14
Thr	0,5	Thr	7
Trp	0,25	Trp	3,5
Val	0,80	Val	10

Некоторые незаменимые аминокислоты, как, например, метионин, могут вводиться в организм животного в форме DL- или D-соединений, но скорость их усвоения значительно ниже по сравнению с аминокислотами L-ряда. Сначала происходит окислительное дезаминирование с помощью специфической D-аминокислотной оксидазы. Затем полученная  $\alpha$ -кетокислота стереоспецифически переаминируется в L-аминокислоту. Вообще говоря, НАК можно заменить промежуточными продуктами их биосинтеза, например соответствующими кетокислотами.

Потребность в НАК, определяемая по методу азотного баланса, различна для разных видов животных и в большой степени зависит от физиологического состояния организма. Так, например, необходимые молодым млекопитающим во время роста незаменимые аминокислоты аргинин и гистидин для поддержания обмена веществ взрослой особи не нужны. Обе эти аминокислоты наряду с другими входят в состав активных центров многих ферментов. Они служат для узнавания и связывания отрицательно заряженных субстратов и кофакторов [19]. Недостаток аргинина может быть причиной импотенции мужской особи.

Во время беременности повышается потребность женского организма в триптофане и лизине, у грудных детей — в триптофане и изолейцине. Особенно увеличивается потребность организма в незаменимых аминокислотах после больших потерь крови, ожогов, а также во время других процессов, сопровождаемых регенерацией тканей.

Для птиц незаменимой аминокислотой является глицин. У жвачных животных биосинтез всех НАК производится микроорганизмами кишечного тракта, при этом необходимы в достаточном количестве соединения азота (аммонийные соли, мочевины). Для человека обеспечение организма НАК — важнейшая задача питания. Высокую «биологическую ценность» имеют лишь немногие животные белки, такие, как белок куриного яйца или белок материнского молока. Они содержат НАК не только в достаточном количестве, но и в необходимом для человека соотношении. Низкая ценность многочисленных растительных белков связана с небольшим содержанием в них отдельных незаменимых аминокислот (главным образом лизина и метионина). Важными компонентами смешанного корма являются рыбная и соевая мука. В белке соевой муки и в белке кормовых дрожжей мало метионина, в кукурузе — лизина и триптофана. Дефицит может компенсироваться добавлением недостающей аминокислоты или подходящей комбинацией других белков.

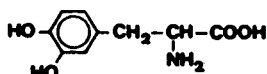
В табл. 1-3 приведено содержание НАК в некоторых важных природных белках. Бросается в глаза высокое содержание лизина в дрожжах, культивируемых на нефтепродуктах, бедных, однако, метионином.

В гидролизатах некоторых белков кроме протеиногенных аминокислот находятся и другие аминокислоты, появление которых обусловлено изменением боковых цепей после биосинтеза белка (разд. 3.6.2.1). Таковыми являются *4-гидроксипролин* и *5-гидроксизин* коллагена, пиридиновые аминокислоты *дезмозин* и *изодезмозин* эластина, а также N-метилированный лизин некоторых мышечных белков.

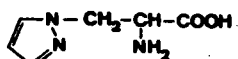
Таблица 1-3. Содержание НАК в белках различного происхождения [20]

Аминокислота	Содержание НАК, % (на сухую массу)						
	пшеничная мука	соевая мука	рыбная мука	говядина	коровье молоко	кормовые дрожжи	дрожжи из нефти
Leu	7,0	7,7	7,8	8,0	11,0	7,6	7,0
Ile	4,2	5,4	4,6	6,0	7,8	5,5	3,1
Val	4,1	5,0	5,2	5,5	7,1	6,0	8,4
Thr	2,7	4,0	4,2	5,0	4,7	5,4	9,1
Met	1,5	1,4	2,6	3,2	3,2	0,8	1,2
Lys	1,9	6,5	7,5	10,0	8,7	6,8	11,6
Arg	4,2	7,7	5,0	7,7	4,2	4,1	8,0
His	2,2	2,4	2,3	3,3	2,6	1,7	8,1
Phe	5,5	5,1	4,0	5,0	5,5	3,9	7,9
Trp	0,8	1,5	1,2	1,4	1,5	1,6	1,2
Cys	1,9	1,4	1,0	1,2	1,0	1,0	0,1

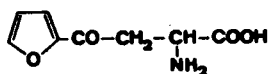




(5)

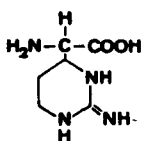


(6)

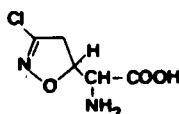


(7)

Производное глицина *саркозин*  $\text{CH}_3\text{-NH-CH}_2\text{-COOH}$  — промежуточное звено метаболизма аминокислот; входит в состав актиномицина.  $\alpha$ -(2-Иминогексагидро-4-пиримидил)глицин (8) является структурной единицей химо-статина — тетрапептида микробного происхождения (эта группа тетрапептидов — ингибиторы протеаз химотрипсина и папаина). Изолированная из *Streptomyces sviveus*  $\alpha$ -амино-3-хлоро-2-изоксалин-5-уксусная кислота (9) — антибиотик с противоопухолевым действием.

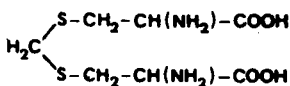


(8)

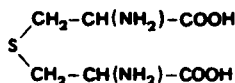


(9)

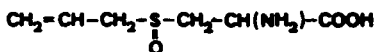
Представителями цистеинового ряда являются *дьянколовая кислота* (10) из восточноазиатских бобов, содержащийся в волосах и шерсти *лантинонин* (11), *аллиин* (12) лука, гомолог метионина *этионин*  $\text{H}_2\text{C}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ , а также часто встречающийся в грибах *гомоцистеин*  $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ .



(10)



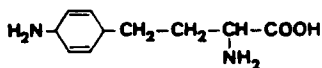
(11)



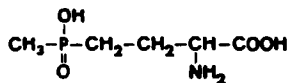
(12)

Из соединений, принадлежащих к ряду аминокислот, интересны *гомосерин*  $\text{HOCH}_2\text{-CH}_2\text{-C(NH}_2\text{)-COOH}$  из *Pisum sativum*, содержащаяся в полимиксинах  $\text{L-}\alpha$ ,  $\gamma$ -диаминомасляная кислота  $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)-COOH}$ , а также антибиотик  $\text{L-2-амино-4-(4'-амино-$

-2',5'-циклогексадиенил)масляная кислота (13) и составная часть одного из пептидных антибиотиков *L*-2-амино-4-(метилфосфино)масляная кислота (14).

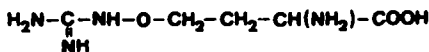


(13)

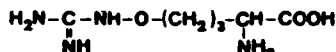


(14)

Как антагонисты аргинина действуют присутствующий в бобовых *канаванин* (15) и его гомолог бактериального происхождения *5-(O-изоуреидо)-L-норвалин* (16).



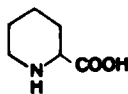
(15)



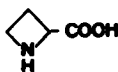
(16)

Канаванин как конкурентный ингибитор препятствует проникновению аргинина через клеточные мембраны и может встраиваться в белки вместо аргинина.

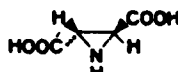
Представители ряда иминокислот — это распространенная в бобовых и микроорганизмах *пипеколиновая кислота* (17), а также встречающаяся в лилейных и агавах *азетидин-2-карбоновая кислота* (18).



(17)



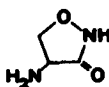
(18)



(19)

Антагонист пролина азетидин-2-карбоновая кислота, — токсин, входящий в состав эндемического ландыша. Действие этого токсина основано на том, что аппарат биосинтеза белка не может отличить пролин от азетидинкарбоновой кислоты. Сам же ландыш защищен от неконтролируемого встраивания этой кислоты в собственные белки благодаря наличию высокоспецифичной пролил-тРНК-синтетазы.

К ряду иминокислот принадлежит также *L-транс-2,3-дикарбоксиазиридин* (19) из культуры *Streptomyces*. Антибиотик *D-циклосерин* (20) действует как антагонист *D*-аланина и препятствует синтезу *D*-аланина, необходимого для построения стенок бактериальных клеток.



(20)

К ряду основных аминокислот относится *орнитин*  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$  (наличие его в белках спорно). Орнитин, как и *цитруллин*  $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ , — промежуточный продукт цикла мочевины; он широко распространен как свободная аминокислота, а также входит в состав различных антибиотиков. Как составная часть белка орнитин до сих пор был обнаружен только в гидролизатах некоторых морских водорослей.

Из ряда аминодикарбоновых кислот следует упомянуть *L- $\alpha$ -аминоадипиновую кислоту*  $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$  (которая появляется в грибах на первой ступени биосинтеза лизина), а также *L, L- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -диаминопимелиновую кислоту*  $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$  (материал для клеточных стенок бактерий).

Аминотрикарбоновая  $\alpha$ ,  $\gamma$ -карбоксиглутаминовая кислота (Gla) была найдена в протромбине и в минерализированных белках тканей [22, 23].

### 1.3. *Стереохимия аминокислот* [24 — 26]

#### 1.3.1. Оптическая активность аминокислот

Все аминокислоты, за исключением глицина, оптически активны благодаря хиральному строению. Энантиомерные формы, или оптические антиподы, имеют различные показатели преломления (круговое двулучепреломление) и различные коэффициенты молярной экстинкции (круговой дихроизм) для лево и право циркулярно поляризованных компонент линейно-поляризованного света. Они поворачивают плоскость колебаний линейного поляризованного света на равные углы, но в противоположных направлениях. Вращение происходит так, что обе световые составляющие проходят оптически активную среду с различной скоростью и при этом сдвигаются по фазе.

По углу вращения  $\alpha$ , определенному на поляриметре, можно определить удельное вращение  $[\alpha]_D$ :

$$[\alpha]_D' = \frac{100\alpha}{lc}$$

где  $c$  — концентрация (г/100 мл) раствора;  $l$  — толщина слоя, т. е. длина трубки поляриметра (в дм). При этом обычно указывают температуру измерения  $t$ , растворитель и длину волны поляризованного света (обычно работают с монохроматическим светом с длиной волны натриевой линии  $\lambda = 589,3$  нм).

Используют также молекулярное вращение, т. е.  $[\alpha]$  относят к 1 молю:

$$[M]_D' = \frac{M}{100} [\alpha]_D'$$

В табл. 1-4 приведены значения удельного вращения и молекулярного вращения протеиногенных аминокислот в различных растворителях. Следует заметить, что зависимость оптического вращения от концентрации



Таблица 1-4. Молекулярное вращение  $[M]_D$  и удельное вращение  $[\alpha]_D$  протеиногенных аминокислот

Аминокислота	Молекулярная масса $M$	$[M]_D^{25}$ ( $[\alpha]_D^{25}$ ) в различных средах			Концентрация $c$
		вода	5 н. HCl	уксусная кислота	
Ala	89,10	+ 1,6(1,8)	+ 13,0(14,6)	+ 29,4(33,0)	2
Val	117,15	+ 6,6(5,63)	+ 33,1(28,3)	+ 72,6(62,0)	1—2
Leu	131,18	- 14,4(11,0)	+ 21,0(16,0)	+ 29,5(22,5)	2
Ile	131,18	+ 16,3(12,4)	+ 51,8(39,5)	+ 64,2(48,9)	1
alle	131,18	+ 20,8(15,9)	+ 51,9(39,6)	+ 55,7(42,5)	1
Ser	105,10	- 7,9(7,5)	+ 15,9 <sup>a</sup> (15,1)		2
Thr	119,12	- 33,9(28,5)	- 17,9(15,0)	- 35,7(30,0)	1—2
aThr	119,12	+ 11,9(10,0)	+ 37,8(31,7)	+ 45,3 <sup>b</sup> (38,0)	1—2
Cystin	240,31	- 509,2 <sup>a</sup> (211,9)	- 557,4(231,9)		1
Cys	121,16	- 20,0(16,5)	+ 7,9(6,5)	+ 15,7(13,0)	2
Met	149,22	- 14,9(9,8)	+ 34,6(23,3)	+ 29,8(20,0)	1—2
Pro	115,14	- 99,2(86,2)	- 69,5(60,4)	- 92,1(80,0)	1—2
Hyp	131,14	- 99,6(76,0)	- 66,2(50,5)	- 100,9 <sup>a</sup> (77,0)	2
aHyp	131,14	- 78,0(59,4)	- 24,7(18,8)	- 39,3(30,0)	2
Lys	146,19	+ 19,7(13,5)	+ 37,9(25,9)		2
Arg	174,21	+ 21,8(12,5)	+ 48,1(27,6)	+ 51,3(29,4)	2
His	155,16	- 59,8(38,5)	+ 18,3(11,8)	+ 11,6(7,5)	2
Asp	133,11	+ 6,7(5,0)	+ 33,8(25,4)		2
Asn	132,12	- 7,4(5,6)	- 7,4(5,6)	+ 37,8 <sup>a</sup> (28,6)	2
Glu	147,14	+ 17,7(12,6)	+ 46,8(31,8)		2
Gln	146,15	+ 9,2(6,3)	+ 46,5 <sup>a</sup> (31,8)		2
Phe	165,20	- 57,0(34,5)	- 7,4(4,5)	- 12,4(7,5)	1—2
Tyr	181,20		- 18,1(10,0)		2
Trp	204,23	- 68,8(33,7)	- 5,7(2,8)	- 69,4(34,0)	1—2

<sup>a</sup> В 1 н. HCl.

<sup>b</sup>  $c = 0,25$ .

имеет значение только в первом приближении. В области  $c = 1 + 2$  соответствующие значения почти не зависят от изменения концентрации.

Если при измерении молекулярного вращения оптического активного соединения используют линейно-поляризованный свет с непрерывно меняющейся длиной волны, то получают характерный спектр. В том случае, если значения молекулярного вращения возрастают с уменьшением длины волны, говорят о положительном *эффекте Коттона*, в противоположном случае — об отрицательном. Особенно существенные эффекты наблюдаются при длине волны, соответствующей максимумам полос поглощения соответствующих энантиомеров: происходит изменение знака вращения. Это явление, известное как дисперсия оптического вращения (ДОВ), наряду с

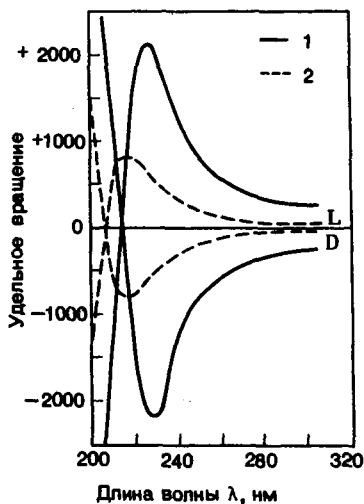


Рис. 1-3. Кривые ДОВ для D- и L-аланинов. 1 — гидрохлорид, 2 — нейтральный раствор аминокислоты.

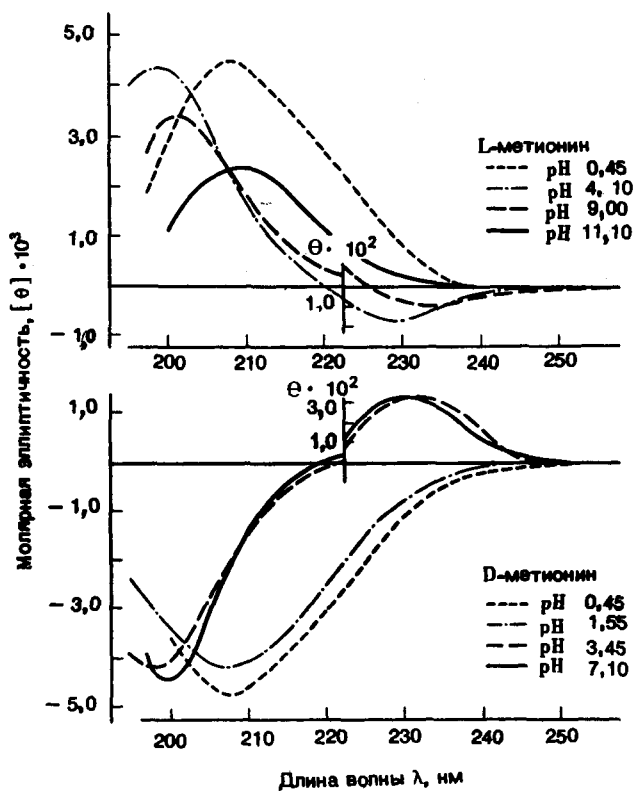


Рис. 1-4. Спектры КД D- и L-метионина.

круговым дихроизмом (КД) используется при структурных исследованиях оптически активных соединений.

На рис. 1-3 представлены кривые ДОВ L- и D-аланина, а на рис. 1-4 — спектры КД D- и L-метионина. Положение и величина вращения карбонильных полос в области 200 — 210 нм сильно зависят от рН. Для всех аминокислот принято, что при L-конфигурации проявляется положительный, при D-конфигурации отрицательный эффект Коттона.

### 1.3.2. Конфигурация и конформация аминокислот

Конфигурацию протеиногенных аминокислот соотносят с D-глюкозой; такой подход предложен Э. Фишером в 1891 г. В пространственных формулах Фишера заместители у хирального C-2 атома занимают положение, которое соответствует их абсолютной конфигурации (это было доказано через 60 лет).

На рис. 1-5 приведены пространственные формулы D- и L-аланина.

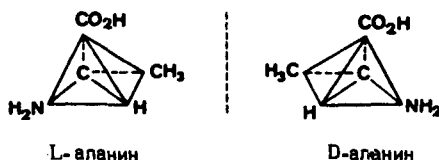
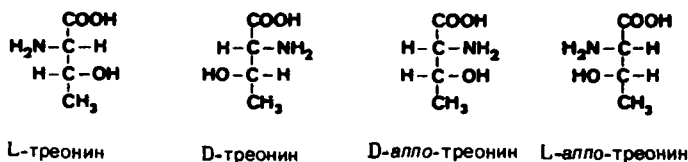


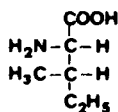
Рис. 1-5. Пространственные формулы D- и L-аланина.

В двумерном изображении для D- и L-изомеров принят определенный порядок расположения заместителей. У D-аминокислоты наверху изображают карбоксильную группу, далее следуют по часовой стрелке аминогруппа, боковая цепь и атом водорода (см. ниже). У L-аминокислоты принят обратный порядок расположения заместителей, причем боковая цепь всегда стоит внизу.

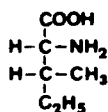
В случае абсолютной конфигурации по Кану, Ингольду и Прелогу заместители хирального C-атома располагаются в убывающем порядке и D-аминокислотам соответствует обозначение (R)-, а L-аминокислотам — (S)-. Хотя эта система универсальна, она до сих пор не получила признания в номенклатуре аминокислот.

Аминокислоты треонин, изолейцин и гидроксипролин имеют два центра хиральности.

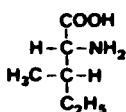




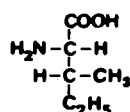
L-изолейцин



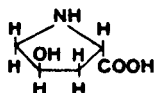
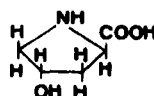
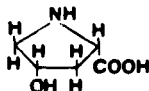
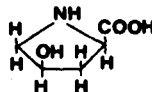
D-изолейцин



D-алло-изолейцин

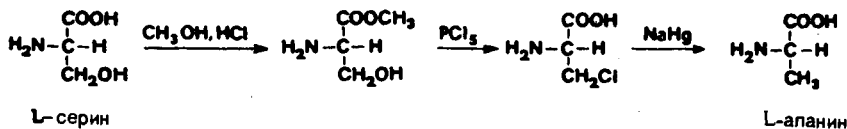


L-алло-изолейцин

4-гидрокси-L-пролин  
(транс-4-гидрокси-L-пролин)4-гидрокси-D-пролин  
(транс-4-гидрокси-D-пролин)алло-4-гидрокси-L-пролин  
(цис-4-гидрокси-L-пролин)алло-4-гидрокси-D-пролин  
(цис-4-гидрокси-D-пролин)

У цистина  $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$  оба центра хиральности идентичны, так что кроме D-, L- и DL-форм появляется неактивный мезо-цистин.

При первых стереохимических исследованиях ограничивались указанием, что соединения, выделенные из белка, относятся к одному и тому же стериическому ряду. Основными критериями стерической корреляции служили одинаковое поведение при взаимодействии со стереоспецифическими ферментами, одинаковый положительный сдвиг оптического вращения при возрастающей концентрации кислоты [27], а также взаимные превращения отдельных аминокислот, происходящие с сохранением центра хиральности. Первым превращением такого рода был перевод L-серина в L-аланин, осуществленный Фишером:



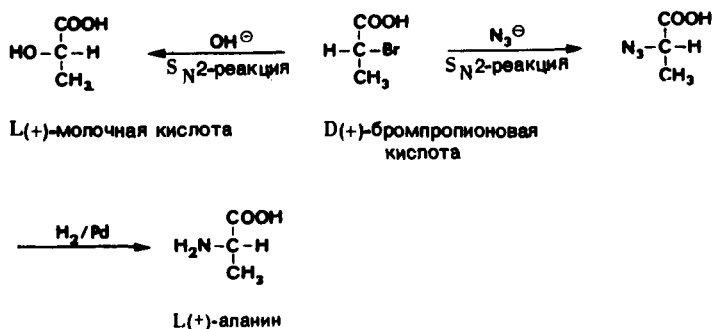
В 1933 г. Кун и Фрейденберг наблюдали однотипный сдвиг молекулярного вращения для производных аланина и молочной кислоты. Как видно из данных табл. 1-5, у производных L(+)-молочной кислоты и (+)-аланина происходит аналогичный переход  $[M]_D$  из положительной области в отри-

Таблица 1-5. Молекулярное вращение  $[M]_D$  различных производных аланина и молочной кислоты

Заместители		$M_D$		
		производное (+)-аланина	производное L-молочной кислоты	производное D-молочной кислоты
$R^1$	$R^2$	$\begin{array}{c} \text{CO}R^2 \\   \\ R^1-O-C-H \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CO}R^2 \\   \\ R^1-NH-C-H \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CO}R^2 \\   \\ H-C-OR^1 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$
$C_6H_5CO-$	$-NH_2$	+70	+120	-120
$C_6H_5CO-$	$-OC_2H_5$	+12	+49	-49
$C_6H_5CO-$	$-OCH_3$	0	+35	-35
$CH_3CO-$	$-OC_2H_5$	-74	-76	+76

цательную, так что природный (+)-аланин можно отнести к L-ряду. Таким образом была установлена относительная конфигурация протеиногенных аминокислот.

После установления абсолютной конфигурации молочной кислоты на основании расчета дисперсии вращения (Кун, 1935 г.) и винной кислоты с помощью рентгеноструктурного анализа (Бийвэ, 1951 г.) нужно было установить однозначные стереические связи природных аминокислот с этими гидроксикислотами. Это удалось Ингольду и др. в 1951 г.; они осуществили перевод D(+)-бромпропионовой кислоты в L(+)-молочную кислоту и в L(+)-аланин. Эти превращения протекают по  $S_N2$ -механизму, и, как показано кинетическими исследованиями, обуславливают обращение конфигурации у асимметрического атома углерода. Таким образом была однозначно установлена абсолютная конфигурация аминокислот.



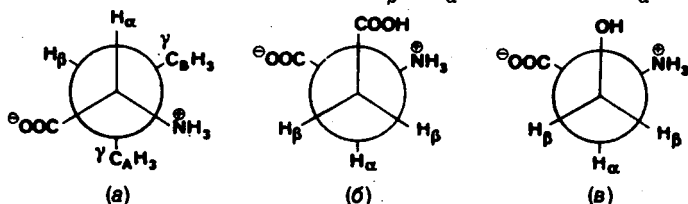
В настоящее время определение абсолютной конфигурации аминокислот проводят как с помощью рентгеноструктурного анализа и ферментативных методов, так и с помощью исследования спектров КД и ДОВ [28]. Оптически активный  $h - \pi^*$ -переход карбоксильной группы ( $\lambda = 210$  нм) положителен для L-аминокислот и отрицателен для D-аминокислот [29, 30]. Для таких исследований часто применяются производные аминокислот. N-Алкилтиотиокарбонильные и дансильные производные L-аминокислот обнаруживают положительный эффект Коттона, гидантоины — отрицательный.

Пирролинон [31], получающийся при реакции 2-метокси-2-дифенил-3(2H)-фуранона (МДФФ) с аминокислотами, имеет характеристический мультиплет в спектре КД. Отнесение конфигурации в таких случаях производят по максимуму абсорбции в длинноволновой области ( $\sim 380 - 430$  нм), положение которого не зависит от природы заместителей у хирального C-атома.

Для некоторых аминокислот наблюдается связь между их конфигурацией и вкусом, например L-Trp, L-Phe, L-Tyr и L-Leu имеют горький вкус, а их D-энантиомеры сладкие. Сладкий вкус глицина (от греч. glykys — сладкий) известен давно. Мононатриевая соль глутаминовой кислоты — глутамат натрия — один из важнейших носителей вкусовых качеств, применяемых в пищевой промышленности. Интересно отметить также, что производное дипептида из аспарагиновой кислоты и фенилаланина обнаруживает интенсивно сладкий вкус. Взаимосвязи строения и вкуса рассматриваются в работах [32, 33].

В последние годы стереохимия аминокислот развивается в основном в направлении изучения проблем конформации. Исследования с помощью различных физических методов, в особенности спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) высокого разрешения, показывают, что заместители у  $\alpha$ - и  $\beta$ -C-атомов аминокислоты предпочитают находиться в определенных конформациях [34 — 38].

Ниже с помощью проекционных формул Ньюмена приведены преимущественные конформации аминокислот с разветвленной боковой цепью: валина (а), L-аспарагиновой кислоты (б) и L-серина (в). При этом в формулах б и в представлено направление от  $C_\beta$  к  $C_\alpha$ , а в случае а  $C_\alpha - C_\beta$ .



С помощью  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии можно проводить конформационный анализ как в твердом состоянии, так и в растворе. Например, N-трет-бутилоксикарбонилфенилаланин (Boc-Phe) в кристаллическом состоянии существует в виде ротамера с E-конфигурацией уретановой связи. При растворении в  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  E-конформер переходит в течение нескольких часов в Z-конформер, стабильный в растворе [39].

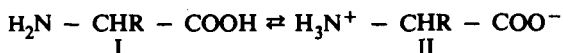
Конформационный анализ аминокислот дает важные сведения о конформационном поведении белков и пептидов.

## 1.4. Физико-химические свойства аминокислот

В твердом состоянии и в сильнополярных растворителях аминокислоты существуют в виде диполярных цвиттер-ионов. Это объясняет высокую температуру разложения аминокислот и их трудную растворимость в неполярных растворителях. Доказательства ионного дипольного строения аминокислот получены методами ЯМР-, ИК- и КД-спектроскопии: в спектрах отсутствуют полосы поглощения  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ -групп. Сведения о кристаллической структуре обобщены в обзоре [40].

### 1.4.1. Растворимость

Аминокислоты (за немногими исключениями) хорошо растворяются в воде, аммиаке и других полярных растворителях, в неполярных и слабополярных растворителях (этанол, метанол, ацетон) растворяются плохо. Причиной такого поведения является легкий переход незаряженной молекулы (I) в цвиттер-ион (II), который связан с выигрышем свободной энергии 44,8 — 51,5 кДж/моль. В равновесии практически существует только цвиттер-ион (II). Например, в водном растворе аланина II:I = 260 000. Кроме того, растворимость аминокислот зависит от их строения. Более высокую растворимость имеют соединения с гидрофильной боковой цепью. Низкая растворимость большинства аминокислот в их изoeлектрической точке объясняется снижением гидрофильности амино- и карбоксильных групп. Особенно трудно растворимы ароматические аминокислоты (Тур, Фен, Трир), в спиртах относительно легко растворяются аминокислоты (Про и Нур). Данные о растворимости аминокислот приведены в табл. 1-6.

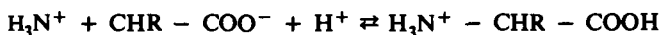


### 1.4.2. Кислотно-основные свойства

Кислотно-основные свойства аминокислот вследствие их диполярности сильно зависят от pH среды. В области pH 4 — 9 все аминокислоты ведут себя как кислоты (доноры протонов)



или как основания (акцепторы протонов)



В сильнокислой области существуют преимущественно катионы  $\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CHR} - \text{COOH}$ , в сильнощелочной — анионы  $\text{H}_2\text{N} - \text{CHR} - \text{COO}^-$ .

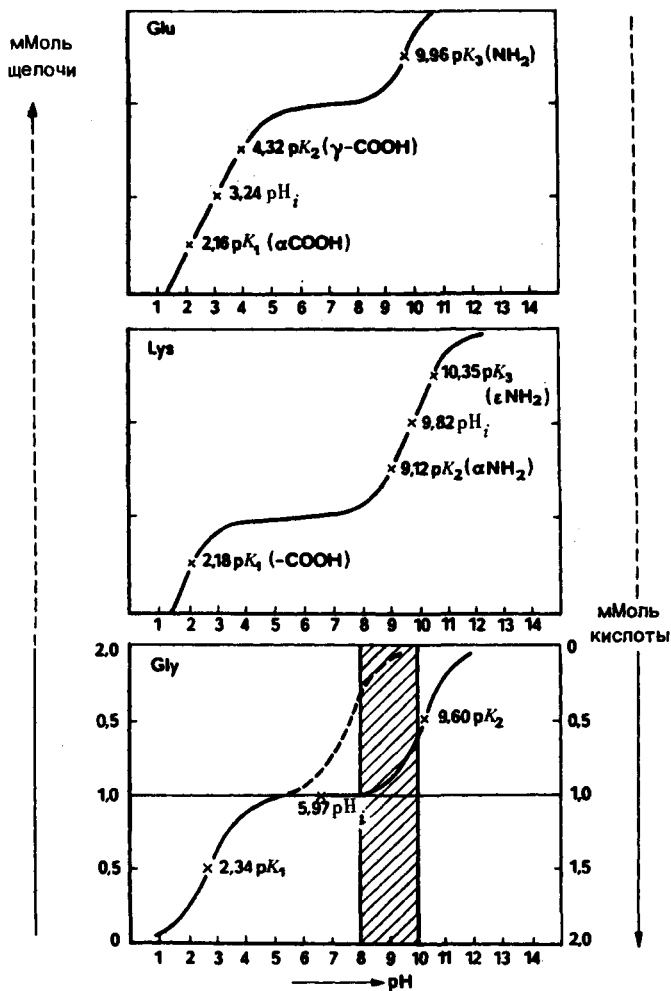


Рис. 1-6. Кривые титрования глицина, лизина и глутаминовой кислоты.

При титровании щелочью аминокислоты протонируются и ведут себя как двухосновные кислоты, т. е. они могут отдавать два протона. Если регистрировать изменение pH при добавлении щелочи, то получаются типичные кривые титрования для аминокислот (рис. 1-6).





Значение отдельных ступеней диссоциации лежит далеко одно от другого и может быть найдено с помощью уравнения Гендерсона — Хассельбаха:

$$pH = pK + \lg \frac{[\text{акцептор протонов}]}{[\text{донор протонов}]}$$

При равных концентрациях акцептора протонов и донора протонов измененное значение pH численно равно значению pK соответствующей группы.

В кривых титрования глицина, например, при  $pK = 2,34$  в эквимолярных концентрациях сосуществуют  $H_3N^+-CH_2-COOH$  и  $H_3N^+-CH_2-COO^-$ , а при  $pK = 9,60$  наступает концентрационное равновесие между  $H_3N^+-CH_2-COO^-$  и  $H_2N-CH_2-COO^-$ . Точки перегиба на кривой титрования дают значения  $pK_1$  и  $pK_2$ , т. е. pK карбокси- и аминогрупп.

При pH 5,97 для глицина кривая титрования имеет точку перегиба, которая называется *изоэлектрической точкой* ( $pH_i$ ). pH, соответствующее этой точке у моноаминокарбоновой кислоты, есть среднее арифметическое значений  $pK_1$  и  $pK_2$  и в сущности определяет условия (кислотность раствора), при которых почти все молекулы аминокислоты существуют в виде цвиттер-ионов. При формальном титровании глицина значение  $pK_2$  сдвигается из основной в нейтральную область pH (заштрихованная область). Это объясняется тем, что аминокислоты сначала переводятся в гидроксиметиламинокислоты, которые затем титруются с фенолфталеином в качестве индикатора как истинные слабые кислоты.

У аминокислот, имеющих диссоциирующие группы в боковой цепи (Glu, Asp, Cys, Tug, Lys, Arg, His), на кривых титрования появляется третий перегиб ( $pK_3$ ). На рис. 1-6 приведены кривые титрования лизина и глутаминовой кислоты, значения pK — в табл. 1-6.

В отличие от нейтральных и кислых аминокислот значение  $pH_i$  основных аминокислот вычисляют как среднее арифметическое значений  $pK_2$  и  $pK_3$ , например для лизина  $pH_i = 9,82 = (9,12 + 10,53):2$ . Большое биологическое значение имеет поведение гистидина в качестве буфера. Это единственная протеиногенная аминокислота, которая действует в физиологической области pH 6 — 8.

Значения pK характеризуют кислотность аминокислот. Благодаря  $-I$ -эффекту аммонийной группы глицин ( $pK_1 = 2,34$ ) обладает более высокой кислотностью, чем уксусная кислота ( $pK = 4,76$ ). Этот эффект уменьшается с увеличением расстояния между amino- и карбоксильной группами: для  $\beta$ -аланина  $pK_1 = 3,6$ , для 6-аминогексановой кислоты  $pK_1 = 4,43$ .

У аминокислот карбоновых кислот  $\alpha$ -карбоксильная группа проявляет более сильные кислотные свойства, и преимущественно она принимает участие в образовании цвиттер-ионной структуры.

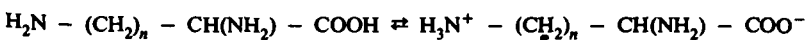
Основной характер аминокислот ослабляется из-за COO-группы, так что глицин с  $pK_2 = 9,72$  менее основен, чем этиламин с  $pK = 10,75$ . Еще более низкая основность у эфиров аминокислот (например, для этилового эфира глицина  $pK = 7,7$ ).

Таблица 1-6. Температура разложения, растворимость, и константы диссоциации протеиногенных аминокислот

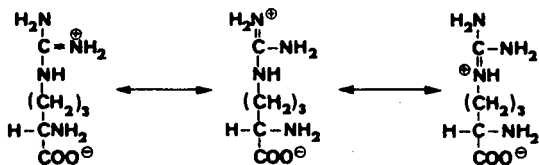
Аминокислота	Температура разложения, °C	Растворимость в воде, г/100 мл		pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>	pK <sub>3</sub>	pH <sub>i</sub>
		25°C	100°C				
Gly	292	24,99	67,17	2,34	9,60		5,97
Ala	297	16,65	37,3	2,34	9,69		6,01
Val	315	8,85	18,8	2,32	9,62		5,96
Leu	337	2,43	5,64	2,36	9,60		5,98
Ile	284	4,12	8,26	2,36	9,68		6,02
Ser	228	5,0	32,2	2,21	9,15		5,68
Thr	253	20,5		2,71	9,62		6,16
Cys	178 <sup>a</sup>			1,71	8,27(SH-)	10,78	5,02
$\overbrace{\text{Cys} \quad \text{Cys}}^{\text{Cys}}$	260	0,01	0,11	1,04	2,05(COOH)	8,0 10,25(NH <sub>2</sub> )	5,03
Met	283	3,5	17,6	2,28	9,21		5,74
Pro	222	16,23	23,9 (70°C)	1,99	10,6		6,30
Hyp	270	36,1	51,6 (65°C)	1,92	9,73		5,83
Lys	224			2,18	9,12 (α-NH <sub>2</sub> )	10,53	9,82
Arg	238			2,17	9,04 (α-NH <sub>2</sub> )	12,84 (гуанидо)	10,76
His	277	0,43		1,82	6,00 (имидазол-)	9,17	7,59
Asp	270	0,5	6,9	1,88	3,65 (β-COOH)	9,60	2,77
Asn	236	2,98	55,1	2,02	8,80		5,41
Glu	249	0,86	14,0	2,16	4,32 (γ-COOH)	9,96	3,24
Gln	185	3,6		2,17	9,13		5,65
Phe	284	2,96	9,9	1,83	9,13		5,48
Tyr	344	0,045	0,56	2,20	9,11	10,07(OH)	5,66
Trp	282	1,14	4,99	2,38	9,39		5,89

<sup>a</sup> Для гидрохлорида.

У диаминокислот ω-аминогруппа проявляет более выраженные основные свойства, чем α-аминогруппа. Здесь цвиттер-ионная структура осуществляется преимущественно с участием ω-аминогруппы



У сильноосновной аминокислоты аргинина протон присоединяется к гуанидиновой группе с образованием мезомерно-стабилизированного гуанидо-катиона:



Хорошее представление о кислотно-основных равновесиях в растворах аминокислот особенно важно при их разделении в аналитических и препаративных целях с помощью электрофореза и ионообменной хроматографии.

Рис. 1-7 наглядно показывает, каким образом происходит разделение аминокислот при электрофорезе: анионные или катионные формы отклоняются в направлении соответствующего электрода, цвиттер-ионы не отклоняются. Подбирая подходящие буферные системы, можно разделить любые аминокислоты.

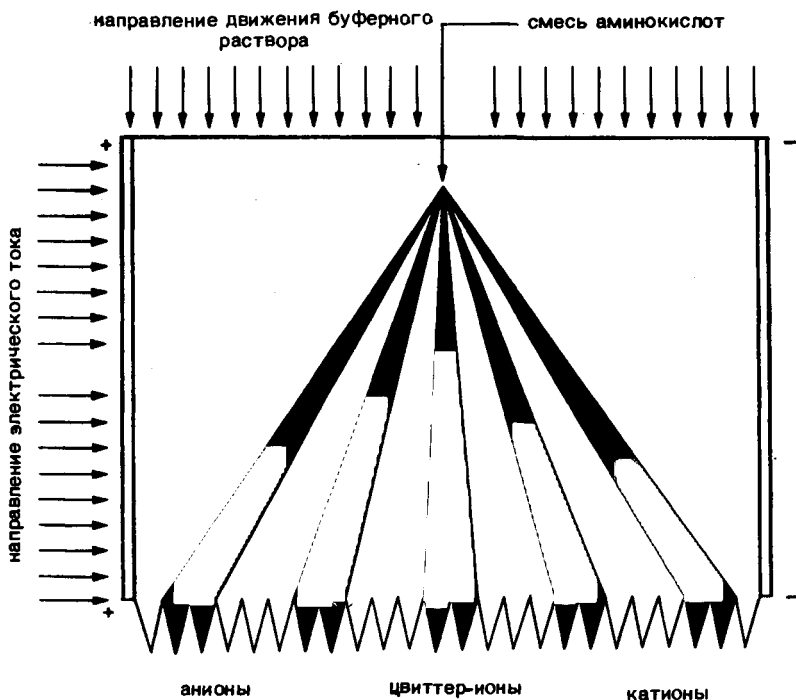


Рис. 1-7. Разделение аминокислот посредством непрерывного проточного электрофореза.

### 1.4.3. Спектры поглощения аминокислот

**УФ-спектры** [41, 42]. В области видимого спектра растворы протеиногенных кислот практически не поглощают, а в УФ-области для ароматических аминокислот можно наблюдать относительно высокое поглощение (ср. УФ-спектры тирозина и триптофана, рис. 1-8). Характеристический максимум поглощения этих аминокислот лежит  $> 250$  нм; слабое поглощение цистина, которое объясняется наличием дисульфидной группы, обнаруживается при 240 нм.

Высокая молярная экстинкция тирозина при 280 нм используется для определения содержания белка в растворах.

**ИК-спектры** [43, 44]. В спектрах аминокислот отсутствуют полосы нормальных валентных колебаний в области  $3300 - 3500$   $\text{см}^{-1}$ , наблюдается поглощение при  $3070$   $\text{см}^{-1}$ , которое можно отнести к  $\text{H}_3\text{N}^+$ -группе. Эта полоса наблюдается также в спектрах гидрохлоридов аминокислот. Кроме того, две характеристические полосы  $\text{H}_3\text{N}^+$  группы находятся в области  $1500 - 1600$   $\text{см}^{-1}$ .

Аминокислоты и их соли показывают типичное для  $\text{COO}^-$  поглощение при  $1560 - 1600$   $\text{см}^{-1}$ . Карбонильное поглощение  $\text{COOH}$ -группы при  $1700 - 1730$   $\text{см}^{-1}$  у гидрохлоридов аминокислот сдвинуто на  $\sim 20$   $\text{см}^{-1}$  в коротковолновую область. Непрерывный ряд полос находится в интервале  $2500 - 3030$   $\text{см}^{-1}$ .

**Спектры ЯМР** [34 — 38, 45].  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектроскопические исследования аминокислот показали, что химический сдвиг аминокислотных протонов, а

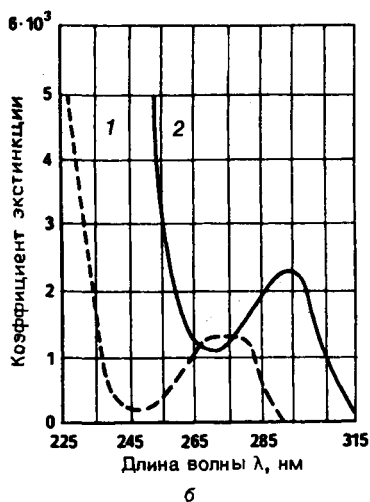
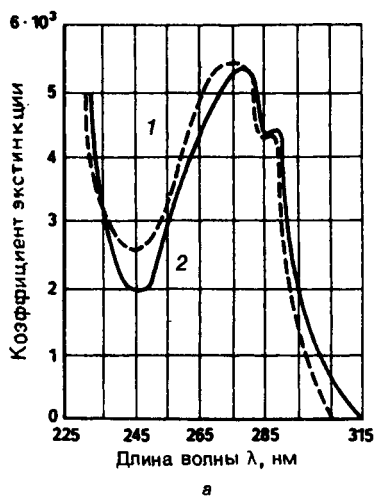


Рис. 1-8. УФ-Спектры триптофана (а) и тирозина (б) в 0,1 н. HCl (1) и 0,1 н. NaOH (2).

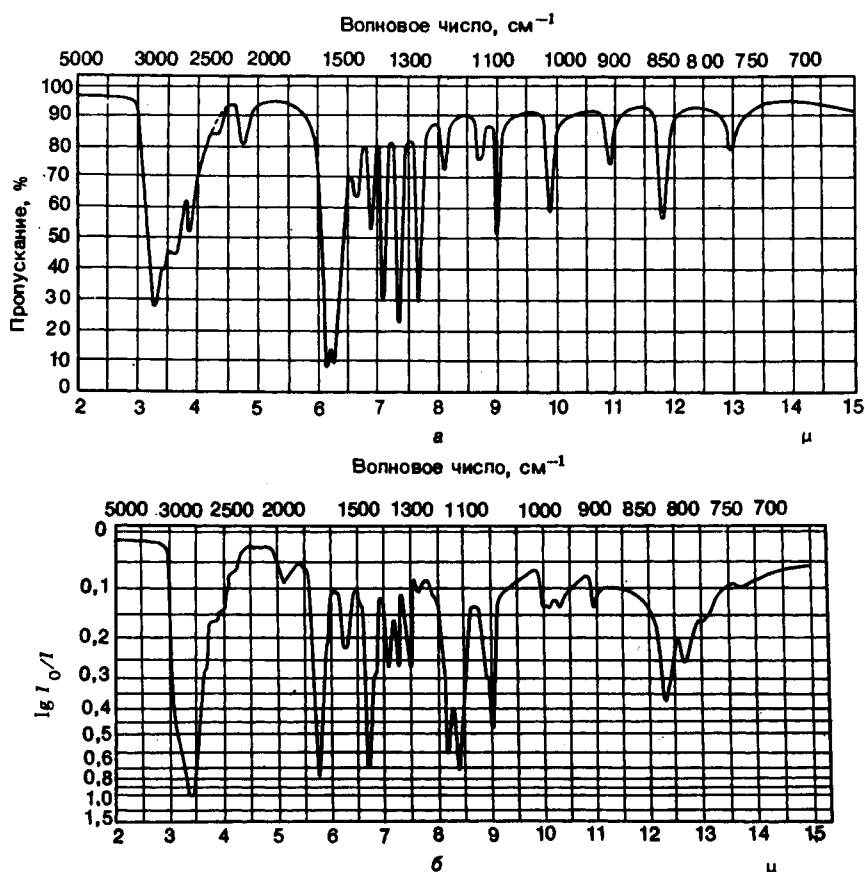


Рис. 1-9. ИК-спектры L-аланина (а) и L-аланингидрохлорида (б).

также константы протон-протонного взаимодействия зависят от заряженного состояния молекулы. В графическом изображении зависимость химического сдвига от рН имеет вид типичной кривой титрования. В качестве растворителей для ЯМР-спектроскопии аминокислот, пептидов и белков служит обычно вода или  $D_2O$ , а в качестве внутреннего стандарта применяют тетраметилсилан (ТМС), гексаметилдисулфоксан (ГМДС) и 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат (ДСС).

В случае  $^{13}C$ -ЯМР-спектроскопии [46, 47], которая применяется для выяснения строения неизвестных соединений и для аналитической характеристики простых производных аминокислот и пептидов, резонансные пики свободных аминокислот (стандарт — ТМС) лежат для карбоксильных групп между  $-168$  и  $-183$  м. д., для  $\alpha$ -углеродного атома между  $-40$  и

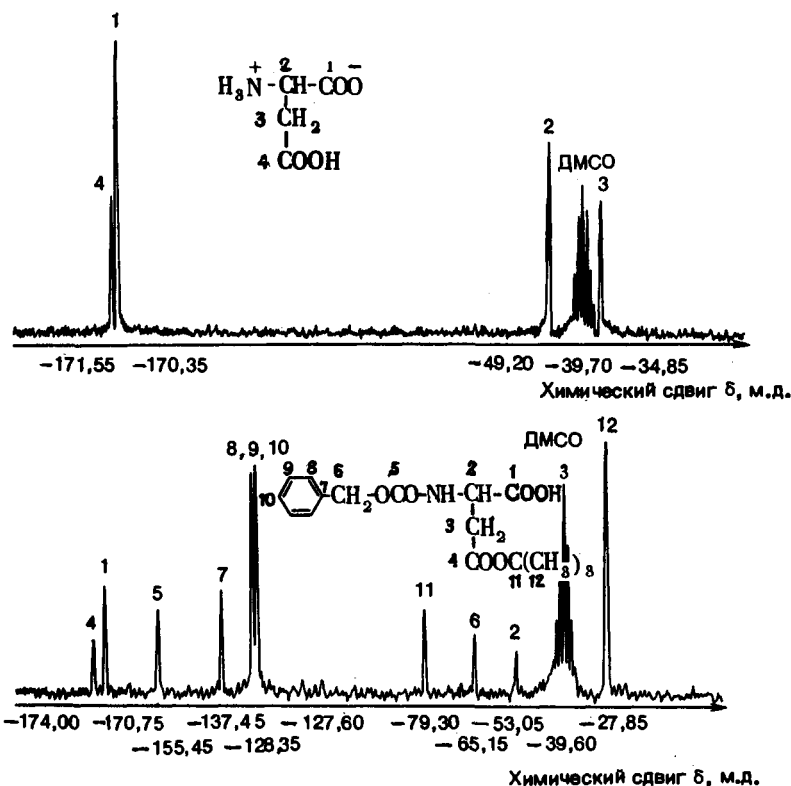


Рис. 1-10.  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-Спектры аспарагиновой кислоты и  $\beta$ -*tert*-бутилового эфира бензилоксикарбониласпарагиновой кислоты.

-65 м. д., для  $\beta$ -углеродного атома между -17 и -70 м. д. и для  $\gamma$ - и  $\delta$ -углеродных атомов между -17 и -50 м. д. Сигналы атомов углерода ароматических и гетероароматических колец находятся между -110 и -140 м. д. На рис. 1-10 приведены  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры аспарагиновой кислоты и  $\beta$ -*tert*-бутилового эфира бензилоксикарбонил-1-аспарагиновой кислоты.

В полипептидах и белках индивидуальные сигналы сдвигаются и перекрываются из-за взаимодействия отдельных аминокислотных остатков. Это затрудняет количественное отнесение сигналов к определенным группам. Например, при применении в качестве внутреннего стандарта ДСС сигналы протонов у метильных групп алифатических остатков лежат между 0,9 и 1,5 м. д., у остальных протонов алифатических боковых цепей между 1,5 и 3,5 м.д., у протонов  $\alpha$ -С-атома между 3,5 и 4,5 м.д., у ароматически-

связанных СН-протонов, а также у протона пептидной группы CO-NH между 6,7 и 9,0 м.д. Резонансная область C<sub>2</sub>-протона имидазола гистидина лежит между 8,0 и 9,2 м.д., а NH-индольного протона триптофана между 9,0 и 11,0 м.д.

## 1.5. Получение аминокислот [1—5, 48—53]

Аминокислоты можно получать путем выделения из белковых гидролизатов, с использованием микробиологических методов, с помощью ферментативных методов или путем химического синтеза. Первые три подхода дают L-аминокислоты, а при химическом синтезе получаются DL-соединения, которые нужно еще разделить на оптические антиподы. До недавнего времени аминокислоты удавалось получить только в очень малых количествах, но в последние годы их производство приняло индустриальные масштабы и в 1977 г. достигло 400 000 т. Аминокислоты используются как вкусовые добавки в пищевой промышленности (глутамат натрия, аспарагиновая кислота, цистин, глицин и аланин), как питательные растворы и терапевтические средства в медицине (все протеиногенные аминокислоты), как добавки для улучшения неполноценных питательных белков и фуража (лизин, метионин, триптофан), как промежуточные вещества в косметической промышленности (серин, треонин, цистеин), а также как исходные вещества для синтеза различных пептидов.

### 1.5.1. Выделение из белковых гидролизатов

При получении аминокислот белки прежде всего расщепляют с помощью основного, кислотного или ферментативного гидролиза [54]. В классическом методе кислотного гидролиза [55, 56] используют 6 н. HCl ( $t_{\text{кип}}$  110 °С) или 8 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Время реакции от 12 до 72 ч в зависимости от строения белка. Очень устойчивы к гидролизу пептидные связи, образованные лейцином, изолейцином и валином. При этом триптофан разрушается полностью, серин и треонин до 10%.

Потери аминокислот, обусловленные присутствием углеводов, могут быть снижены, если работу проводят в вакууме и применяют большой избыток кислоты (белок: HCl = 1:10000).

В других методах кислотного гидролиза используют смесь пропионовой кислоты с 12 н. HCl [57] (время реакции при 160 °С 15 мин, при 130 °С 2 ч), 3 н. 4-толуолсульфокислоту [58] или 3 н. меркаптоэтансульфоную кислоту [59] (время реакции при 110 °С 24 ч). Последний метод используется специально для аналитических целей. Триптофан при этом сохраняется на 95%.

При щелочном гидролизе с 6 н. раствором гидроксида бария в автоклаве (давление ~ 700 кПа) разрушаются гидроксиаминокислоты и цистеин, в то время как триптофан сохраняется.

Очень легко протекает ферментативный гидролиз белков. Для осуществления полного гидролиза необходимо применение комбинации нескольких ферментов, что связано с высокой специфичностью протеаз. На практике применяют протениазы животного и бактериального происхождения (эндопептидазы), такие, как трипсин, пепсин и папаин в комбинации со специфическими амино- и карбоксипептидазами [60]. Нередко хорошие результаты получают, используя неочищенный фермент (сырой препарат), например панкреатин, который содержит все пищеварительные ферменты поджелудочной железы (его используют при получении аспарагина и глутамина).

Выделение отдельных аминокислот из белкового гидролизата не сопровождается никакими затруднениями в тех случаях, когда они содержатся в достаточно высоких концентрациях и заметно отличаются друг от друга по свойствам.

Глутаминовая кислота, например, кристаллизуется прямо из концентрированного гидролизата, насыщенного хлористым водородом, цистин и тирозин отделяют благодаря их плохой растворимости в воде. Селективное отделение ароматических аминокислот удается выполнить с помощью адсорбции на активированном угле. Полученную при гидролизе смесь аминокислот лучше всего разделить хроматографически. Выделению отдельных компонентов предшествует обычно разделение на кислые, основные и нейтральные группы аминокислот, при этом большое значение имеют электрофорез и специфические ионообменники. Раннее распространенные методы разделения, такие, как фракционная перегонка эфиров (по Фишеру), экстракция моноаминокарбоновых кислот *n*-бутиловым или амиловым спиртом (по Дакину), осаждение «гексоновых оснований» лизина, аргинина и гистидина фосфорновольфрамовой кислотой или флавиановой кислотой, теперь имеют только второстепенное значение.

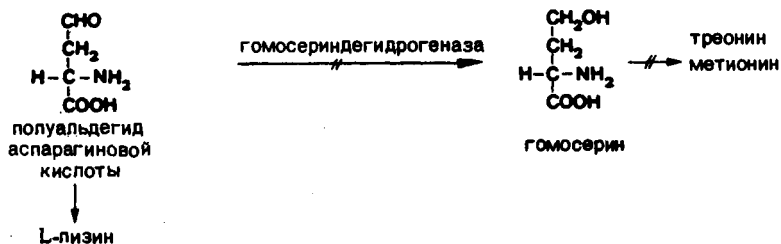
### 1.5.2. Микробиологические методы [53, 61]

Почти все протениогенные аминокислоты можно получать с помощью специфических микроорганизмов. Принцип микробиологического метода (ферментации) заключается в аэробном выращивании микроорганизмов в разбавленных питательных растворах, содержащих усвояемые источники углерода и азота, как, например, углеводы, углеводороды, органические и неорганические соединения азота, минеральные соли и ростовые вещества. Можно использовать также полупродукты биосинтеза аминокислот. Например, глутаминовая кислота получается из  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, изолейцин и серин можно получать ферментацией культуры, содержащей треонин или глицин. В качестве микроорганизмов применяются культуры дикого типа, например *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum*, а также мутанты, которые производят большое количество специфических аминокислот.

В случае аутокотрофных мутантов микроорганизмы не располагают некоторыми ферментами, необходимыми для биосинтеза определенных ами-



нокислот. Синтез поэтому может остановиться на одной из первых ступеней или пойти по другому пути. Если продуктом первой ступени или продуктом такого побочного пути являются аминокислоты, то они производятся и аккумулируются в большом количестве, например применение мутанта, дефицитного по гомосерину из *Escherichia coli*, обуславливает накопление лизина. Отсутствие гомосериндегидрогеназы блокирует гомосерин-треонин-метиониновый путь синтеза



в пользу побочного синтеза, приводящего к образованию лизина. В случае регуляторных мутантов, применяемых для получения аргинина, метионина, изолейцина и триптофана, «наработка» аминокислот осуществляется путем нарушения механизма обратной связи.

Таблица 1-7. Аминокислоты, полученные ферментацией

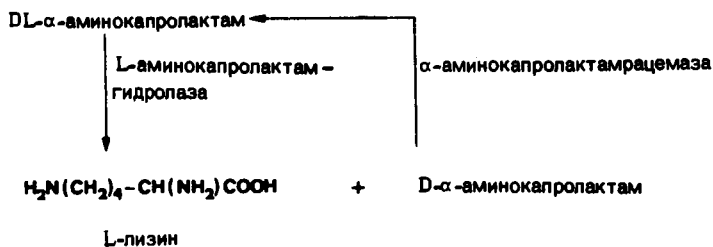
Микроорганизмы	Источники С, N	Полученные аминокислоты
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Глюкоза или гидролизат крахмала, патока тростникового и свекловичного сахара, аммиак, мочевины	Glu
Мутанты <i>Brevibacterium flavum</i>	Патока тростникового и свекловичного сахара, гидролизат крахмала, <i>n</i> -алканы, уксусная кислота	Lys, Val, Orn, Met, Trp, Glu
Мутанты <i>Pseudomonas trifoli</i> и <i>E. coli</i>	Этанол, неорганические соединения азота	Lys, Arg, Ile
<i>Serratia marcescens</i>	Фумаровая кислота, аммиак	Asp
Род <i>Corynebacterium</i>	Фенилмолочная кислота	Phe
Род <i>Brevibacterium</i>	Нефть, нитрат аммония	Glu, Ala, Asp
	Фосфаты, сульфат магния, хлорид марганца(II)	Lys, Arg, Tyr
<i>Candida lipolytica</i> , <i>E. coli</i> и др.	Хлорид кальция и сульфат железа(II) в следовых количествах	Gly, Trp, Pro, Ser

Особое техническое значение приобрела ферментация глутаминовой кислоты так называемыми микроорганизмами дикого типа. Культивируют бактерии в стерилизованных ферментерах при 35° С, используя в качестве источника углерода глюкозу или патоку и вводя в систему воздух и аммиак. Через 40 ч из культуры можно изолировать глутаминовую кислоту. Выход составляет 50 кг аминокислоты на 100 кг введенной глюкозы. Глутаминовая кислота в форме моноглутамата натрия применяется в значительных количествах как вкусовое вещество и приправа в пищевой промышленности. При незначительной добавке глутамата заметно усиливается и улучшается естественный вкус мясных блюд.

Аминокислоты, полученные ферментативно, представлены в табл. 1-7.

### 1.5.3. Ферментативные методы

В то время как при ферментации аминокислот присутствуют все ферменты микроорганизмов, при ферментативных синтезах используются изолированные или фиксированные на носителе ферменты для катализа заданного пути реакции. Так, при получении аспарагиновой кислоты путем присоединения аммиака к фумаровой кислоте используют L-аспартазу, при получении L-аланина из L-аспарагиновой кислоты — L-аспартат-β-декарбоксилазу. Особенно большое значение имеет синтез L-лизина из D, L-α-аминокапролактама с помощью L-аминокапролактамагидролазы, получаемой микробиологическим путем [62]. В этом синтезе, проводимом как одностадийный процесс, остающийся D-α-аминокапролактam рацемизируется α-аминокапролак-



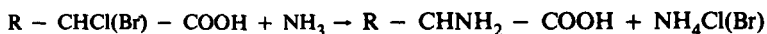
тамрацемазой и таким образом в конце концов полностью переводится в L-лизин.

### 1.5.4. Методы химического синтеза

Известно очень много методов синтеза аминокислот. Ниже остановимся лишь на некоторых: аминокислоты галогенкарбоновых кислот, синтез Штрекера, синтезы через азлактоны, гидантоины и шиффовы основания, а также синтезы с малоновым эфиром. Кроме того, рассматриваются асимметрический и пребиотический синтез, а также биосинтез аминокислот.

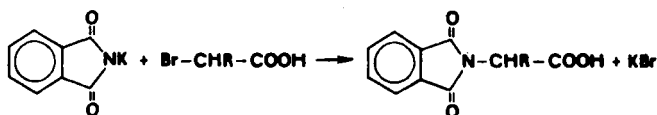
## 1.5.4.1. Аминолиз галогенкарбоновых кислот

Старейший метод синтеза аминокислот — нуклеофильное замещение галогена в легкодоступных галогенкарбоновых кислотах:



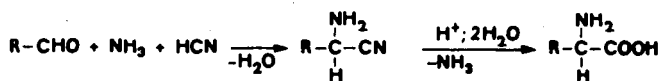
Впервые таким путем в 1858 г. был получен глицин из монохлоруксусной кислоты. Выходы составляют 60 — 70%, если применять 10-кратный избыток аммиака и работать в присутствии карбоната аммония. При этом аминогруппа образующейся кислоты дает карбамат аммония  $R = \text{CH}(\text{NH}-\text{COONH}_4)$ , и это предохраняет ее от дальнейшего превращения во вторичные и третичные аминокислоты.

Удобнее использовать реакцию эфиров галогенкарбоновых кислот с фталымидом калия с последующим расщеплением получающейся фталил-аминокислоты кислотным гидролизом или гидразиолизом (синтез Габриэля). В качестве реагента аминолиза применяют также уротропин (Хильман, 1948 г.).



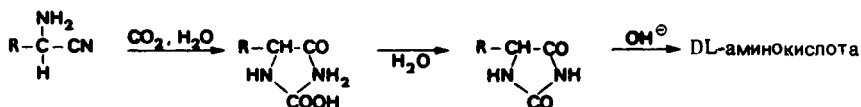
## 1.5.4.2. Синтез Штрекера

Синтез аминокислот, предложенный в 1850 г. Штрекером, основан на присоединении синильной кислоты к карбонильной группе альдегида в присутствии аммиака. Получающийся при этом нитрил  $\alpha$ -аминокарбоновой кислоты омыляется далее в DL-аминокислоту:

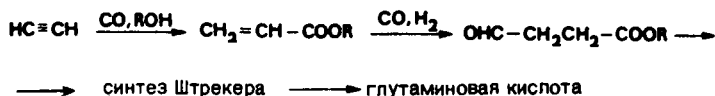


В качестве побочных продуктов могут получаться иминодинитрилы  $\text{NH}(\text{CHR}-\text{CN})_2$ , тринитрилы и карбоновые кислоты; общий выход при этом синтезе ~75%.

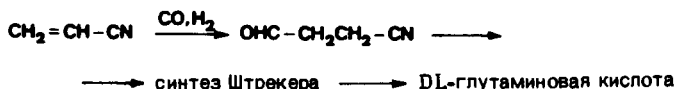
Бухерер внес изменения в синтез Штрекера: альдегид реагирует со смесью цианида натрия и карбоната аммония (или мочевины) и дает легко изолируемый гидантоин, который затем расщепляется щелочным гидролизом:



Синтез Штрекера имеет большое значение для получения в промышленности глутаминовой кислоты, метионина и лизина. Исходные альдегиды получают из продуктов нефтехимического производства, и синтезы обычно ведут через гидантоины. По методу Дюпона исходят из ацетилена:

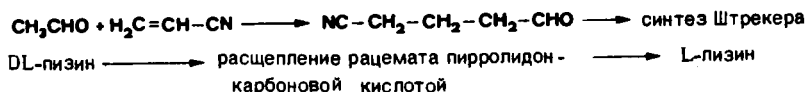


По методу Аджиномото получают DL-глутаминовую кислоту, исходя из акрилонитрила:

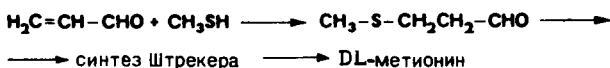


Расщепление рацемата по этому методу происходит самопроизвольной кристаллизацией при затравливании оптически чистыми кристаллами, причем выпавшая в осадок D-глутаминовая кислота после рацемизации снова вводится в процесс. В настоящее время в мире ежегодно производится ~250 000 т глутамата натрия, причем большую часть составляет продукт, полученный синтетически.

При техническом синтезе лизина исходят из цианмасляного альдегида, который получают присоединением ацетальдегида к акрилонитрилу:



Промышленное производство DL-метионина (в 1977 г. произведено 100 000 т), который применяется главным образом как добавка в корм скоту, ведется по методу Штрекера из β-метилмеркаптопропионового альдегида, который получают из акролена и метилмеркаптана. В этом случае не требуется разделения энантиомеров, так как L- и D-метионин одинаково хорошо усваиваются животными.



#### 1.5.4.3. Азлактонный синтез по Эрлейнмейеру — Плехлю

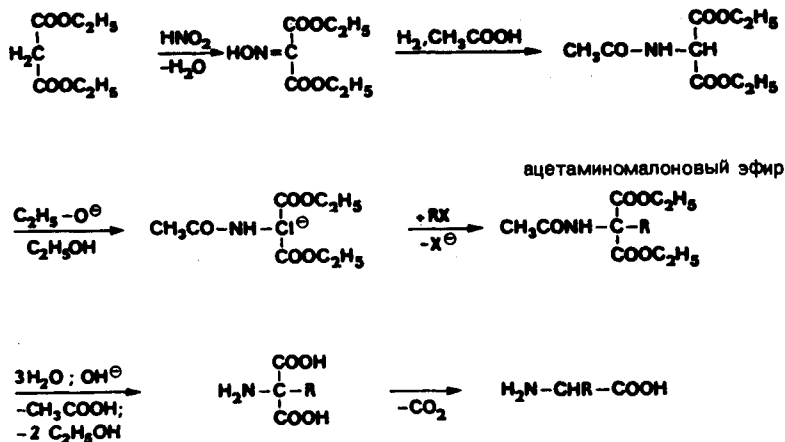
Синтез основан на том, что ароматический или α, β-ненасыщенный алифатический альдегид обрабатывается бензоилглицином (гиппуровая кислота) или ацетилглицином (ацетуровая кислота) в присутствии уксусного ангидрида и ацетата натрия. При этом образуется замещенный азлактон, кото-



Синтезы проходят с выходом ~90%. Повторное металлизирование и алкилирование позволяют ввести второй алкильный остаток, что приводит к разветвлению цепи. При использовании шиффового основания, полученного из этилового эфира глицина и бензофенона, алкилирование можно проводить в условиях техники фазового переноса.

#### 1.5.4.6. Синтезы с малоновым эфиром

В синтезе аминокислот этот метод имеет большое значение. Введение боковой цепи происходит путем алкилирования аниона малонового эфира, который образуется в присутствии сильных оснований, например метилата натрия. Наиболее благоприятно протекание реакции через N-ациламино-малоновый эфир:



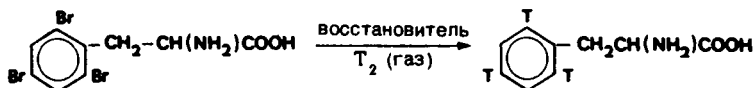
В качестве ацильного остатка кроме ацетильной и формильной групп применяется фталимидогруппа (Сёренсен, 1903 г.), алкилирующими реагентами служат алкилгалогениды и основания Манниха.

#### 1.5.4.7. Синтез меченых аминокислот [64]

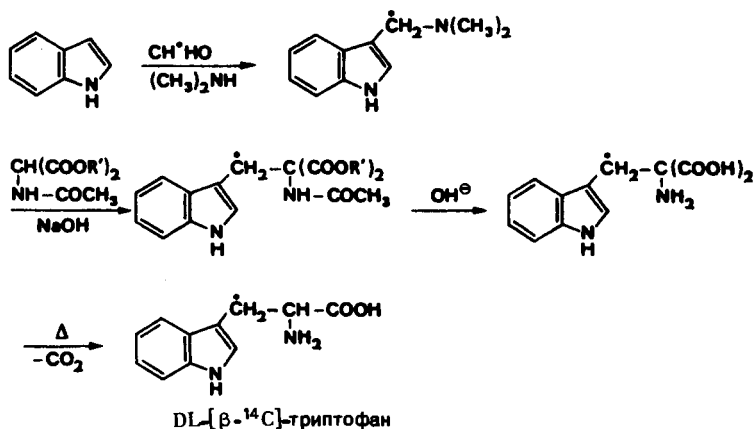
Применение меченых аминокислот значительно расширило наши знания о биохимических функциях аминокислот, пептидов и белков. В зависимости от конкретной задачи синтезируются аминокислоты с одной или несколькими метками, меченные азотом-15, тритием, углеродом-14 и серой-35. Введение тритиевых меток осуществляют методом изотопного обмена или (лучше) прямым химическим синтезом.

В случае изотопного обмена получают препараты с удельной активностью < 10 Ки/ммоль, причем радиоактивные изотопы обычно равномерно распределены по молекуле. Можно проводить восстановление ненасыщен-

ных или галогенированных полупродуктов в присутствии газообразного трития. При этом, например, из 2,4,6-трибром-*l*-фенилаланина получается *l*-2,4,6-<sup>3</sup>H-фенилаланин с высокой удельной активностью (60 — 80 Ки/ммоль):



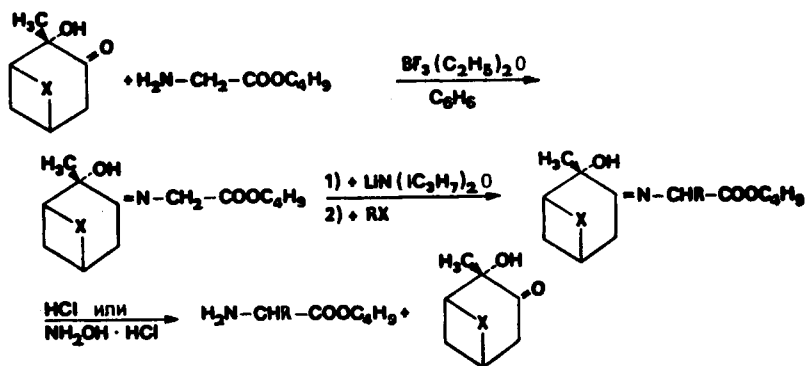
Аминокислоты могут быть получены микробиологическими методами, если в питательном растворе содержится <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> или другие источники <sup>14</sup>C [65]. После разрушения клеточной структуры фракции белка изолируют и полученную при гидролизе смесь аминокислот разделяют хроматографически. О биосинтезе <sup>35</sup>S-*l*-метионина с очень высокой удельной активностью сообщили Бретчер и Смит [66]. Для введения <sup>14</sup>C-метки можно использовать прямой химический синтез. Большое применение находит малоновый эфир (синтезы с цианкусным эфиром, содержащим 2-<sup>14</sup>C в остатке уксусной кислоты, для C<sub>2</sub>-метки и с <sup>14</sup>C-синильной кислотой для C<sub>1</sub>-метки). Если исходят из <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, то сначала из алкилгалогенида, магния и CO<sub>2</sub> получают карбоновую кислоту R-<sup>14</sup>COOH (реакция Гриньяра), затем с помощью галогенирования и аминоллиза ее переводят в аминокислоту. Синтез Штрекера, с K<sup>14</sup>CN приводит к метке карбоксильного углерода, с <sup>15</sup>NH<sub>3</sub> — к <sup>15</sup>N-аминокислотам (имеющим важное значение в исследовательской практике). Классический синтез триптофана с малоновым эфиром — пример введения метки в положение C<sub>3</sub> (Гейдельберг, 1949 г.):



Производные цистеина и валина, меченные тритием, а также валин с двойной меткой (<sup>15</sup>N и <sup>2</sup>H) применялись при исследованиях биосинтеза пенициллина [67, 68].

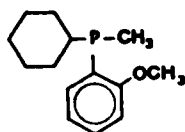
## 1.5.4.8. Асимметрические синтезы [69, 70]

Для стереоспецифического синтеза аминокислот с помощью хиральных реагентов имеются многочисленные возможности. Из них следует упомянуть асимметрическое гидрирование ненасыщенных соединений с хиральными катализаторами — фосфинами родия и рутения [71] или фосфиновыми лигандами, фиксированными на полимере [72], асимметрическое декарбоксилирование специфических комплексов малоната кобальта (III) при малоновом синтезе, переаминирование  $\alpha$ -кетокислот с L-пролином в качестве хирального реагента и асимметрическое алкилирование шиффовых оснований [73, 74]. Практическое значение асимметрический синтез имеет в том случае, если он приводит к получению ценных, редких аминокислот, если хиральные реагенты не очень дороги или если их можно регенерировать. Проблематичны асимметрические синтезы, протекающие через циангидрины или гидантоины, так как при гидролизе приходится считаться с рацемизацией. Об асимметричном синтезе по методу Штрекера сообщается в работе [75]. Ниже приводится пример асимметрического алкилирования шиффоа основания *трет*-бутилового эфира глицина и гидроксипинанона [76].



При гидролитическом расщеплении алкилированного основания L-аминокислоты получают с оптическим выходом 60 — 80%, гидроксипинанон может быть регенерирован, например, в виде оксима и вновь использован для синтеза.

Практический интерес получил асимметрический синтез L-ДОФА, при котором удалось осуществить стереоспецифическое гидрирование дигидроксикоричной кислоты с помощью катализатора Вилькинсона  $\text{RhL}_3\text{Cl}$  [77].



Структура оптически активного лиганда L



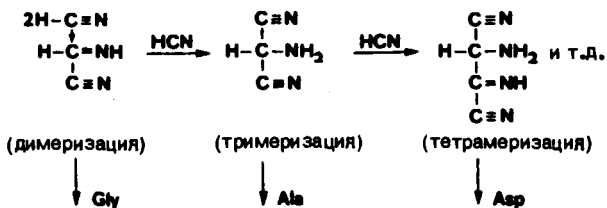
## 1.5.4.9. Пребиотические синтезы [78 — 85]

В связи с проблемой возникновения жизни на Земле внимание исследователей привлекает вопрос первого синтеза аминокислот. В результате исследований твердо установлено, что рацематы почти всех природных аминокислот могли быть получены в особых энергетических условиях из простых углеродных и азотных соединений.

Абиогенное образование аминокислот происходило не только на Земле. Это было подтверждено хроматографическим анализом мерчисонского метеорита, упавшего в 1969 г. в Австралии. В экстрактах образцов, которых не касалась рука человека нашли 23 рацемические аминокислоты, среди них глицин, глутаминовую кислоту, аланин, валин и пролин (в миллиграммовых количествах), а также саркозин, изовалли, пипеколиновую и аминокислоты (в следовых количествах).

Аминокислотные анализы водных экстрактов образцов лунного грунта, проведенные в рамках американской программы «Аполлон», показали присутствие глицина и аланина. Еще четыре аминокислоты были обнаружены с помощью газовой хроматографии в кислотном гидролизате экстракта. Это Glu, Ser, Asp, Tug. Спектроскопические данные однозначно показывают присутствие  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HCHO}$  и  $\text{HCN}$  в космическом пространстве. В лунных пробах также обнаружены исходные продукты для абиогенного образования «внеземных» аминокислот:  $\text{CH}_4$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCN}$  (20 — 70 нг/г). Возможно, правда, что часть предшественников аминокислот происходит от газов земных ракет.

Особое значение при абиогенном синтезе аминокислот имеет, по-видимому, сильная кислота [86]. Исходя из нее, можно легко объяснить синтезы ряда аминокислот в присутствии альдегидов и аммиака (синтез Штрекера). Кроме того, превращения самой  $\text{HCN}$  тоже могут привести к возникновению различных аминокислот.



Новые возможности олигомеризации цианидов рассматриваются в работе [87]. Сообщается также об образовании аминокислот при облучении растворов  $\text{HCN}$  кобальтом-60 [88].

При пребиотическом синтезе пептидов могли играть роль конденсационные реагенты, образованные в ходе химической эволюции, такие, как циклические или линейные полифосфаты или ненасыщенные алифатические структуры (например, карбодимид) [89, 90].

В работе [91] сообщается об олигомеризации глицина до пентаглицина под влиянием периодической тепловой обработки суспензии гидратированного глинистого материала и глицина. Полиаминокислоты образуются путем термической конденсации при 105 °С без катализаторов [92].

Большой интерес представляют сообщения о том, что в экстрактах вулканического пепла, собранного в момент извержения, обнаружены некоторые аминокисло-

Таблица 1-8. Аминокислоты, полученные абиогенно

Исходные компоненты	Источник энергии	Аминокислоты
$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2, \text{H}_2\text{O}$	Электрический разряд	Gly, Ala, $\beta$ -Ala, Abu
$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2, \text{H}_2\text{S}$	То же	Cys, цистин, Met и др.
$\text{CH}_4, \text{CO}_2, \text{N}_2$	" "	Gly, Ala, Nva, Abu, Ser, Asp и др.
$\text{HCNO}, \text{NO}_3^-, \text{H}_2\text{O},$ $\text{FeCl}_3$	УФ-облучение	Ser, Asp, Asp, Gly, Ala, Thr, Val, Orn, Arg, Pro, Glu, Lys, Leu, Ile, His
Глюкоза, $\text{NH}_3,$ $\text{V}_2\text{O}_5(\text{H}_2\text{O}_2)$	" "	Gly, Ala, Asp, Val, Lys
$\text{CH}_4, \text{C}_2\text{H}_6, \text{NH}_3,$ $\text{H}_2\text{S}, \text{HCN}$	УФ-облучение и электрический разряд	Phe, Tyr и др.
$\text{HCHO}, \text{KNO}_3, \text{H}_2\text{O}$	Солнечный свет (25—300 ч)	Asp, Lys, Ala, Gly, Orn, Arg, Glu, His, Ser, Thr
Винная кислота, $\text{KNO}_3, \text{H}_2\text{O}$	Солнечный свет (500 ч)	Asp, Ala
$\text{CH}_3\text{COONH}_4, \text{H}_2\text{O}$	$\beta$ -Излучение	Asp, Glu
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	$\gamma$ -Излучение	Gly, Ala
$(\text{NH}_3\text{CH}_2)_2\text{CO}_3$	$n, \gamma$ -Излучение	Gly, Ala, Lys
Пропионовая кислота, $\text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$	Электрофорез в тлеющем разряде, 3 ч	Ala, $\beta$ -Ala, Gly
$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O} (\text{SiO}_2)$	Тепловая энергия (950°C)	Gly, Ala, Ser, Asp, Thr, Glu, Val, Leu, Pro, Ile, alle Tyr, Abu
$\text{HCN}, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O},$ глицин, оксид алюминия	90°C, 18 ч	Arg, Ala, Gly, Ser, Asp, Glu, Leu, Ile, Abu, Thr
$((\text{CH}_3)_3\text{NH})_2\text{CO}_3$	$n, \gamma$ -Излучение	Gly, Ala, Lys, Val, Abu

ты — глицин, аланин, серин, аспарагиновая кислота — в количестве 0,1 мг/кг [92a]. Это свидетельствует о том, что на поверхности пепла при повышенных температурах может происходить синтез аминокислот из вулканических газов:  $\text{CO}, \text{NH}_3, \text{CH}_4$ .

#### 1.5.4.10. Биосинтез аминокислот [93]

Лишь 10 аминокислот могут синтезироваться в организмах млекопитающих. В синтезе этих заменимых аминокислот (рис. 1-11) используются простые продукты углеводного обмена; процесс включает несколько стадий.

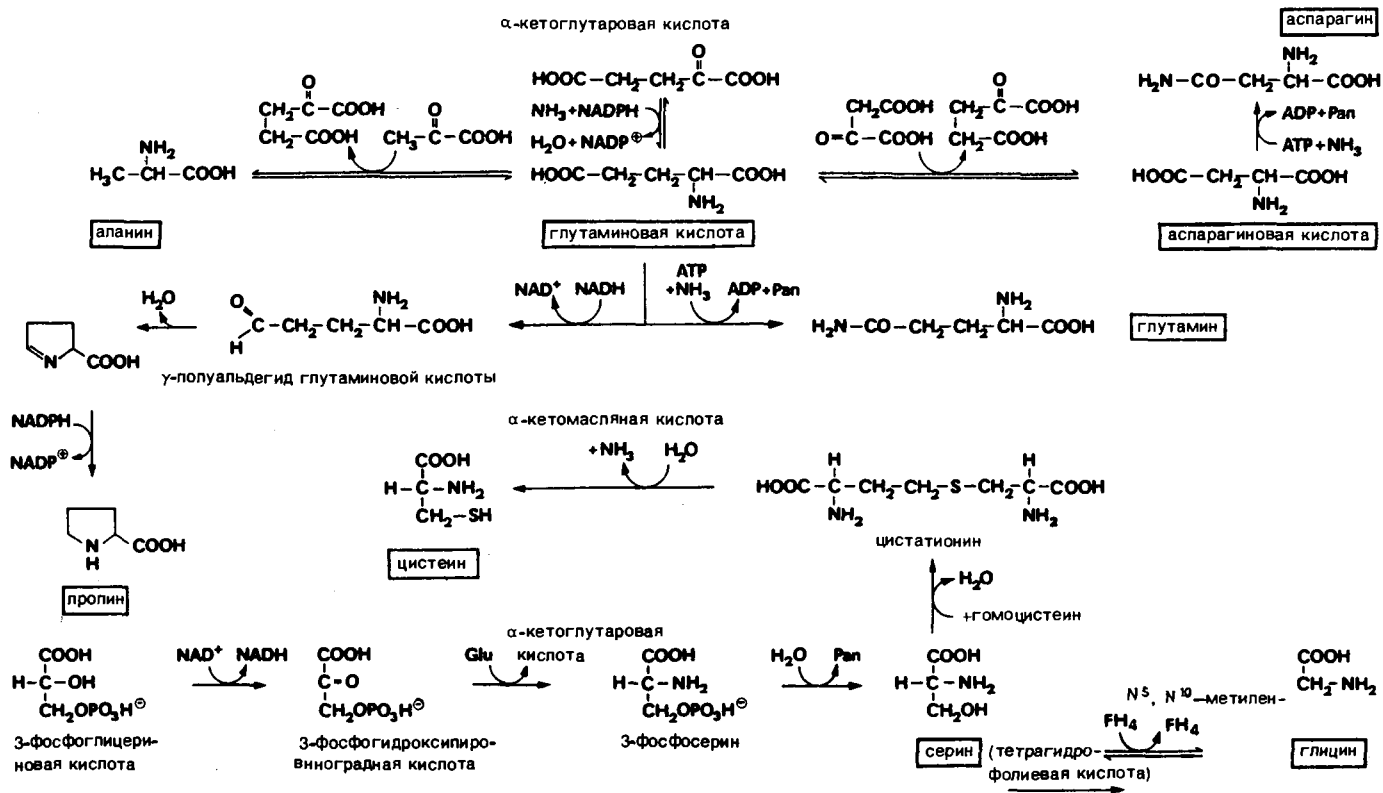


Рис. 1-11. Биосинтез заменимых аминокислот. Не показан синтез тирозина; он образуется гидроксилированием фенилаланина.

Центральное положение занимает здесь глутаминовая кислота, которая образуется при реакции  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты с аммиаком, а затем благодаря переаминированию передает аминогруппу другим аминокислотам.

Биосинтез незаменимых аминокислот исследовался преимущественно у микроорганизмов и высших растений, причем оказалось, что для разных видов наблюдаются только небольшие изменения путей синтеза. Исходными веществами в этих случаях тоже являются сравнительно простые алифатические соединения (см. табл. 1-9).

Таблица 1-9. Исходные вещества для биосинтеза незаменимых аминокислот

Аминокислота	Исходные вещества
Лейцин, валин	Пировиноградная кислота
Изолейцин	$\alpha$ -Кетомасляная кислота
Лизин	Кетоглутаровая кислота или полуальдегид аспагиновой кислоты
Метионин, треонин	Гомосерин
Фенилаланин (тирозин)	Фосфоенолпировиноградная кислота
Триптофан	Эритрозо-4-фосфат
Гистидин	5-Фосфорибозил-1-пирофосфат, глутамин, АТФ

Биосинтез аминокислот с разветвленными боковыми цепями (Leu, Val, Ile) и ароматическими кольцевыми системами (Phe, Tug, Trp) происходит аналогично.

## 1.6. *Разделение рацематов аминокислот [94, 95]*

В 1851 г. Пастер показал, что синтетические аминокислоты и аминокислоты естественного происхождения различаются по их оптическим свойствам. Предположение, что синтетические соединения представляют собой эквимолярную смесь D- и L-энантиомеров, было подтверждено в 1886 г. микробиологическими исследованиями Шульца и Боссхардта. В том же году Пьютти удалось разделить на энантиомеры DL-аспарагин путем перекристаллизации из водного раствора. Эрлих детально исследовал ферментативный метод расщепления рацематов и выделил с хорошими выходами в чистом виде D-антиподы ряда важных аминокислот. Первое химическое разделение рацемата было проведено Фишером в конце прошлого века. Для этого из N-ациламино кислот были получены соли с алкалоидами. Такие диастереомерные соли имеют различные физические свойства.

В настоящее время разделение рацематов аминокислот осуществляют в промышленном масштабе. При этом особое значение имеют хроматогра-

фическое разделение на носителях с хиральными группами, методы селективной кристаллизации и ферментативные разделения с помощью фиксированных на носителях ферментов. Для того чтобы рацемат полностью перевести в L-или D-форму, второй антипод, полученный при разделении рацемата, *рацемизацией* снова переводится в DL-аминокислоту, которая опять подвергается разделению на оптические антиподы. Рацемизацию проводят ферментативно с помощью специфических рацемаз или действием уксусного ангидрида, а в случае свободных аминокислот и их солей — нагреванием до 200 — 250 °C водных растворов под давлением.

Длительный естественный процесс рацемизации ведет к образованию определенных D-аминокислот в окаменелостях и морских отложениях. Например, для эпимеризации L-изолейцина в D-*алло*-изолейцин период полупревращения составляет ~ 100 000 лет, так что можно использовать определение степени рацемизации для установления возраста пород (аминокислотное датирование [96 — 98], которое далеко превышает область датирования по радиоактивному углероду). Следует, однако, принимать во внимание, что рацемизация свободных аминокислот зависит также от температуры, pH, ионной силы и ионного состава среды [99].

Одним из неразрешенных вопросов, касающихся пребиотического периода, является разделение на энантиомеры полученных абиогенным путем DL-аминокислот. Возможно, в этом процессе участвовал циркулярно- или эллиптически-поляризованный свет, возникающий при отражении от поверхности моря; он мог активировать преимущественное образование в химических реакциях одного из антиподов. В 1977 г. Норден [100] получил экспериментальное доказательство фоторазложения или фотоинверсии энантиомеров при облучении водных растворов DL-аминокислот циркулярно-поляризованным светом. Облучение вело к накоплению энантиомеров с положительным циркулярным дихроизмом. Этим может объясняться преобладание L-аминокислот в биосфере. Преимущественное разрушение D-антиподов при действии <sup>90</sup>Sr-β-излучения на DL-тирозин (Гарей, 1968 г.) тоже говорит в пользу оптического отбора.

Другая принципиальная возможность преимущественного накопления одного энантиомера основана на энантиоселективном обмене с неорганическими хиральными носителями. Так, например, кварцевый порошок абсорбирует из диметилформамидного раствора DL-аланина преимущественно D-аланин (D:L = 49,5:50,5), из раствора гидрохлорида изопропилового эфира DL-аланина — гидрохлорид D-эфира с обогащением от 1,5 до 12,4% [101]. Происхождение оптической активности обсуждается в работах [102 — 104].

### 1.6.1. Методы кристаллизации [105]

В некоторых случаях при кристаллизации из пересыщенных растворов образуются не смешанные кристаллы DL-энантиомеров, а эвтектика из кристаллов D- и L-изомеров, так что энантиомеры можно отделить друг от друга механическим отбором. В ряду аминокислот применение этого метода ограничено, так как только аспарагин, глутаминовая кислота и треонин выпадают в виде хорошо образованных кристаллов (*спонтанная кри-*

*сталлизация*). Практическое значение имеет метод *затравки*: в пересыщенные растворы аминокислот вводят кристаллы D- или L-энантиомеров соответствующей аминокислоты. Выкристаллизовывающаяся аминокислота имеет такую же конфигурацию, как добавленная затравка. Этот метод успешно применяется для расщепления глутаминовой кислоты, гистидина, треонина, аспарагиновой кислоты, аспарагина и глутамина.

Методы кристаллизации успешно применяются также в случае аммониевых солей ацилированных аминокислот (Тгр, Phe) или в случае солей аминокислот с ароматическими сульфокислотами, например сульфаниловая кислота или антрахинон- $\beta$ -сульфокислота используются для разделения лизина, сульфаниловая кислота — для серина.

### 1.6.2. Химические методы

Химические методы расщепления рацематов основаны на образовании диастереоизомерных солей с оптически активными вспомогательными веществами и разделении их фракционной кристаллизацией. Для образования солей с N-ацил(или N-алкил)-аминокислотами применяют алкалоиды,  $\alpha$ -фенилэтиламин, фенхиламин, хлорамфеникол и его синтетический предшественник L(+)-*трео*-1-(4-нитрофенил)2-амино-1,3-пропандиол.

Для образования солей с такими производными аминокислот, как эфиры, амиды, гидразиды и нитрилы, в качестве оптически активных вспомогательных веществ успешно применяют винную кислоту, дибензоил-D-винную кислоту или D-камфорсульфокислоту.

Успех химического расщепления рацематов зависит от вида и количества применяемого растворителя, температуры кристаллизации и легкости отщепления вспомогательного вещества от диастереомерной соли. Только в исключительных случаях выделение оптически чистого энантиомера удается без последующей перекристаллизации. Высокую чистоту имеют соединения, самопроизвольно выделившиеся в твердую фазу в виде кристаллов из растворов продуктов реакции. Можно повлиять на поведение энантиомера при кристаллизации, добавляя вспомогательные вещества противоположной конфигурации. Так, например, при добавлении L-винной кислоты вместо D-винной диастереомер, который раньше оставался в маточном растворе, выделялся в виде кристаллов высокой степени оптической чистоты.

### 1.6.3. Ферментативные методы

Среди ферментативных методов получения оптически активных аминокислот различают три направления:

- 1) селективное окисление или декарбоксилирование энантиомеров DL-аминокислот специфическими ферментами;
- 2) катализируемый ферментами асимметрический синтез производных аминокислот;

3) ферментативный гидролиз  $\alpha$ -амино- или  $\alpha$ -карбоксизамещенных производных аминокислот.

Первое направление нашло лишь ограниченное применение для получения специфически меченных энантиомеров. Из экономических соображений вместо изолированных оксидаз и карбоксилаз вводят микроорганизмы (дрожжи, *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*, *E. coli* и т. д.), которые содержат нужные системы ферментов и могут использовать в своем обмене только один антипод (обычно L-форму).

Второе направление использует стереоспецифическое образование амидов и фенилгидразидов N-ациламинокислот из N-ацил-DL-аминокислот и анлина или фенилгидразина, катализируемое папанином и пепсином. Для успешного протекания реакции должны получаться нерастворимые продукты (из хорошо растворимых исходных веществ). Метод применим и для расщепления аминокислот с двумя центрами хиральности. Это было показано Соколовской и др. [108] на примере реакции бисбензилоксикарбонилдиаминопимелиновой кислоты с анлином, катализируемой папанином. При этом получается кристаллический LL-моноанилид (исходное DD-соединение остается неизменным).

Большое значение имеет введенный Гринштейном ферментативный гидролиз, при котором ацетил- или хлорацетиламинокислоты расщепляются ацилазами. Реже применяют расщепление эфиров DL-аминокислот с помощью эстераз. Благодаря использованию фиксированных на носителе микробных ферментов (в ос-

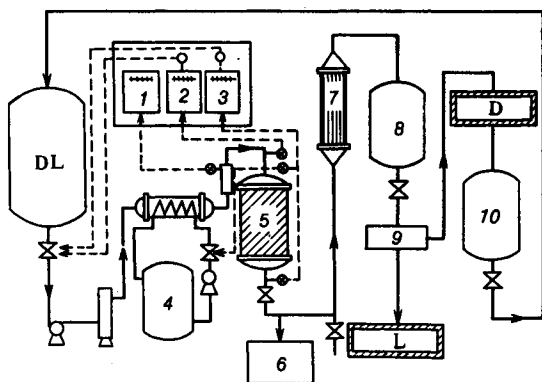


Рис. 1-12. Непрерывное производство кристаллических L-аминокислот на иммобилизованной аминоксилазе. DL — ацетил-DL-аминокислота, L — L-аминокислота, D — ацетил-D-аминокислота, 1 — 3 — приборы для измерения скорости потока, pH и температуры, 4 — камера с горячей водой, 5 — колонка с иммобилизованной аминоксилазой, 6 — автоматический самописец, 7 — испаритель, 8 — камера кристаллизации, 9 — фильтр-разделитель, 10 — камера для рацемизации.

новном это системы аминоксилаза — ДЭАЭ-сефадекс) этот процесс был автоматизирован и заметно удешевлен. Метод применяется для промышленного получения ряда L-аминокислот (Phe, Val, Met, Trp, ДОФА и др.). Остающиеся при расщеплении N-ацил-D-аминокислоты рацемизируются и снова вводятся в процесс расщепления [53]. Схема непрерывного процесса получения L-аминокислот с помощью иммобилизованных ацилаз представлена на рис. 1-12.

## 1.7. Анализ аминокислот [109, 110]

Для аналитического определения аминокислот разработано множество методов, из которых здесь рассматриваются только методы бумажной, тонкослойной, ионообменной и газовой хроматографии, а также ферментативные и изотопные методы.

Аминокислотный анализ существенно способствовал бурному развитию химии белка. Главными областями применения аминокислотного анализа (наряду с идентификацией отдельных аминокислот) являются установление аминокислотного состава белковых гидролизатов, определение первичной структуры белков, а также аналитический контроль пептидного синтеза.

### 1.7.1. Хроматографические методы [109 — 117]

При хроматографическом разделении смесь веществ в подвижной фазе транспортируется через стационарно закрепленную (неподвижную) фазу. При этом компоненты смеси из-за различий в строении, растворимости, полярности или заряде вступают в специфическое взаимодействие с неподвижной фазой, которое обуславливает различные скорости транспорта компонентов.

В соответствии с агрегатным состоянием подвижной фазы различают жидкостную хроматографию (ЖХ) и газовую хроматографию (ГХ). Кроме того, по совокупности возможных комбинаций разделения различают следующие виды хроматографии: жидкость — твердая фаза (ЖТХ), жидкость — жидкость (ЖЖХ), газ — твердое тело (ГТХ) и газожидкостную (ГЖХ).

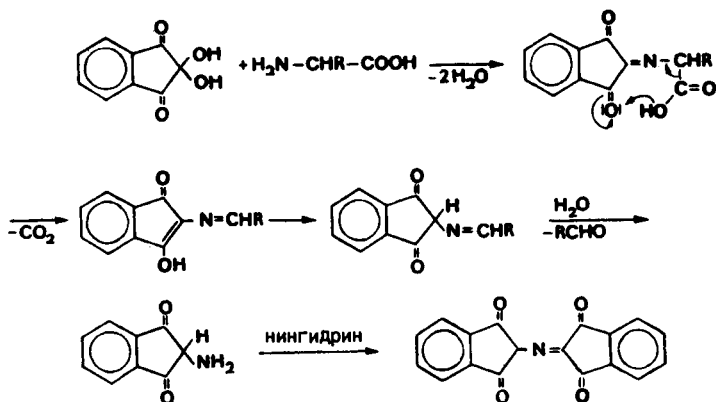
Если растворенное вещество вступает во взаимодействие с твердой стационарной фазой, то основной эффект разделения определяется адсорбционным равновесием. В этом случае говорят об адсорбционной хроматографии в противоположность распределительной хроматографии, при которой разделение компонентов происходит соответственно их распределению по закону Нернста. В случае жидкостной хроматографии на процесс разделения могут оказывать влияние физико-химические свойства подвижной фазы. Если состав подвижной фазы в ходе процесса разделения ступенчато или непрерывно меняется, то говорят о градиентной хроматографии. Современная высокоэффективная хроматография основана на ис-



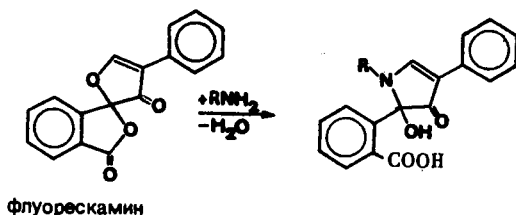
пользовании стационарных фаз с частицами малых диаметров с применением давления до 700 бар. В газовой хроматографии высокий эффект разделения достигается применением капиллярной техники, в особенности введением стеклянных капилляров. Современные аминокислотные анализаторы автоматизированы таким образом, что процесс анализа занимает немного времени. Градиентное элюирование осуществляется дозирующими устройствами. Высокочувствительная детекторная система делает возможной точную работу с нано- и пикограммовыми количествами.

Идентификация аминокислот производится в большинстве случаев с помощью окрашенных или флуоресцирующих производных или с помощью радиоактивных реагентов [118]. Особенно важными являются реакции с нингидрином и флуорескаминем.

В случае реакции с нингидрином получается сине-фиолетовая окраска (максимум поглощения 570 нм; для пролина 440 нм) в результате взаимодействия  $\alpha$ -аминогруппы и реагента по схеме:



Техника работы с флуорескаминем разработана в 1972 г. [119 — 122]. Аминокислоты реагируют при комнатной температуре с 4-фенилспирофуран-2(3Н)-1'-фталаном (флуорескамин) и дают сильнофлуоресцирующие соединения. Сам флуорескамин и полученные разрушением его избытка продукты гидролиза не обнаруживают собственной флуоресценции. В противоположность нингидрину реагент практически нечувствителен к аммиаку. Примерно так же ведет себя 2-метоксн-2,4-дифенил-3-(2Н)-фуранон (МДФФ).



Из других показательных реакций высокую чувствительность имеют реакции с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой, 1,2-нафтохинон-4-сульфокислотой (аминокислотный реагент Фолина), 4,4'-тетраметилдиаминодифенилметаном (ТДМ, голубое окрашивание) [123], а также образование интенсивно флуоресцирующих производных с 2-фталевым альдегидом в присутствии восстановителей [124 — 126], пиродоксалем и  $Zn(II)$  [127, 128], дансилхлоридом (5-диметиламинонафталинсульфонилхлоридом) [129, 130] и [ $^3H$ ]-бансилхлоридом (5-ди-*n*-бутиламинонафталинсульфонилхлоридом) [131, 132] и мансилхлоридом (*N*-метил-2-анилин-6-нафталинсульфонилхлоридом) [132]. Интенсивность флуоресценции можно значительно усилить применением смешанных систем растворителей, например ДМСО— $H_2O$  [133].

### 1.7.1.1. Бумажная хроматография

Бумажная хроматография, впервые примененная в 1944 г. Консденом, Гордоном и Мартином, представляет собой распределительную хроматографию, при которой адсорбционно связанная с целлюлозой вода образует стационарную, а смесь органических растворителей — подвижную фазу. Непрерывная диффузия растворенных компонентов из одной фазы в другую приводит к их распределению между фазами. Отношение концентраций при таком распределении соответствует закону распределения Нернста  $C = c_2/c_1$ , где  $C$  — зависящий от температуры коэффициент распределения, а  $c_1$  и  $c_2$  — концентрации вещества в обеих фазах. После идентификации разделенных веществ их положение на хроматограмме характеризуется коэффициентом удерживания  $R_f$  (от англ. retention factor):

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное веществом}}{\text{расстояние, пройденное подвижной фазой}}$$

Часто коэффициент удерживания указывают в процентах ( $hR_f$ ) или как относительную величину (к стандарту)  $R_{st}$  (расстояния, пройденные отдельными веществами, относят к одному определенному веществу, см.  $R_{Leu}$  в табл. 1-10).

Существует определенная связь между строением и значением  $R_f$ . Аминокислоты с заряженными или полярными боковыми цепями (аминодикарбоновые и диаминокрбоновые кислоты, гидроксикислоты) имеют более низкие значения  $R_f$ , чем аналогичные аминокислоты с незамещенными боковыми цепями. С повышением гидрофобного влияния боковой цепи повышается значение  $R_f$ , например, в ряду  $Gly < Ala < Val < Leu$ .

В табл. 1-10 приведены значения  $R_f$  и  $R_{Leu}$  протениногенных аминокислот, полученные при хроматографии на бумаге шлейхер-шоуль 2043 в в системах бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:1) и бутанол — изомаляная кислота — уксусная кислота — вода (5:0,5:0,7:5). Значения  $R_{Leu}$  — результаты трехкратного элюирования. Значения коэффициентов удерживания воспроизводятся, если хроматографирование идет в направлении волокна бумаги.

В настоящее время бумажная хроматография применяется чаще всего как двумерная хроматография. Для хроматографирования в первом направ-

Таблица 1-10. Значения  $R_f$  и  $R_{Leu}$  протенногенных аминокислот [138]

Аминокислота	$R_f$	$R_{Leu}$	Аминокислота	$R_f$	$R_{Leu}$
Cys	0,07	0,04	Ala	0,44	0,44
Lys	0,14	0,09	Pro	0,43	0,50
His	0,20	0,11	Tyr	0,45	0,56
Arg	0,20	0,14	Trp	0,50	0,63
Asp	0,19	0,21	Met	0,55	0,75
Ser	0,27	0,23	Val	0,60	0,77
Gly	0,26	0,27	Phe	0,68	0,91
Glu	0,30	0,32	Ile	0,72	0,98
Thr	0,35	0,35	Leu	0,73	1,00

лении применяют главным образом систему бутанол — уксусная кислота — вода (4:1:5); во втором направлении работают с несколькими системами: этанол — вода (95:5), бензиловый спирт — вода (70:30), пиридин — амиловый спирт — вода (35:35:30).

### 1.7.1.2. Тонкослойная хроматография [139 — 143]

Методом тонкослойной хроматографии (ТХ) можно быстро разделить аминокислоты; метод требует несложного оборудования и малых исходных количеств. Для изготовления слоев толщиной 0,1 — 0,3 мм применяют стандартные носители, такие, как силикагель, оксид алюминия, порошок целлюлозы, ионообменники на основе целлюлозы, полиамиды, а также полиакриламидный и декстрановый гели. В зависимости от материала носителя ТХ бывает адсорбционной (например, разделение на силикагеле и оксиде алюминия) или распределительной (например, разделение на слоях целлюлозы). В качестве подвижной фазы применяют те же системы, что и для бумажной хроматографии.

На рис. 1-13 приведены результаты двумерного разделения гидролизата В-цепи инсулина на силикагеле G.

При определении очень малых количеств аминокислот применяют проявление ТХ-пластинки флуорескаминном [раствор 10 мг флуорескамина в смеси ацетон/гексан (1:4)] [145]. После элюирования подходящим растворителем наблюдают флуоресценцию при 366 нм. Предел обнаружения метода при проявлении с помощью производного флуорескамина 10 пмоль.

Особенно легко и быстро удастся разделить смесь аминокислот с помощью комбинации двумерного разделения, например тонкослойного электрофореза на целлюлозе и хроматографии (метод «отпечатков пальцев»). Сначала проводят электрофорез (низковольтный электрофорез без охлаждения, 20 В/см, муравьиная кислота), а затем хроматографируют во втором направлении, например с элюентом состава *трет*-бутанол:метанол:пиридин:муравьиная кислота:вода (33:43:9,6:0,4:20). В слу-

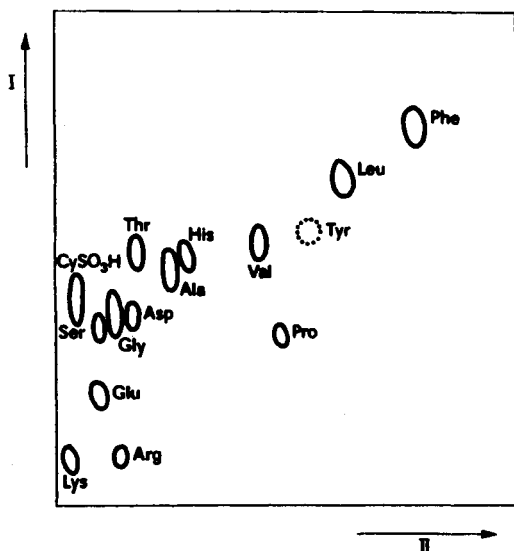


Рис. 1-13. Разделение гидролизата В-цепи инсулина с помощью тонкослойной хроматографии [144]. Состав элюента и время: направление I — хлороформ/метанол/17%-ный раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$  (2:1:1), 75 мин; направление II — фенол/вода (75:25), 180 мин.

чае тонкослойного электрофореза биологического материала не требуется предварительной деминерализации (обессоливания) образца. Легкоподвижные чужеродные ионы через небольшой промежуток времени после начала электрофореза уходят из области разделения аминокислот.

### 1.7.1.3. Ионообменная хроматография [146, 147]

После установления условий проведения количественной нингидринной реакции Муру и Штейну удалось в 1948 г. разделить 2,5 мг гидролизата сывороточного альбумина быка с помощью распределительной хроматографии на колонке с крахмалом. Элюат был разделен на 400 фракций, в каждой фракции проведена нингидринная реакция, и из интегральных кривых поглощения, соответствующих отдельным аминокислотам, рассчитывались их молярные доли в смеси. На коллег-современников большое впечатление произвели высокая скорость анализа (1 нед), малое количество анализируемого вещества и малая погрешность ( $\pm 3\%$ ).

С переходом к ионообменной хроматографии Шпакман, Мур и Штейн смогли автоматизировать анализ [148]. Принцип работы первых автоматических аминокислотных анализаторов показан на рис. 1-14.

В качестве ионообменников применялись смолы лауэкс и амберлит. Разделение аминокислот проходило в колонке  $9,9 \times 150$  см с помощью непрерывно прокачиваемого

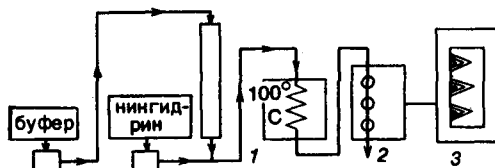


Рис. 1-14. Автоматический аминокислотный анализатор по Шпакману, Муру и Штейну.

мого цитратного буфера (рН 3,25 и 4,25). Элюат подавался в капиллярную тефлоновую трубку 1, где взаимодействовал с нингидрином (15 мин при 100° С); интенсивность нингидриного окрашивания измерялась в проточном колориметре 2 и регистрировалась самописцем 3. Время анализа 24 ч. Мур и Штейн совместно с Анфинсеном получили за эту работу в 1972 г. Нобелевскую премию по химии.

Автоматические аминокислотные анализаторы все время совершенствуются [149]. Современные чувствительные автоматические анализаторы требуют для разделения белкового гидролизата 2 — 3 ч. Цех и Вольтер предложили жидкостную хроматографическую систему под давлением; это позволяет проводить анализ за 45 мин, причем предел обнаружения лежит в области пикомолей.

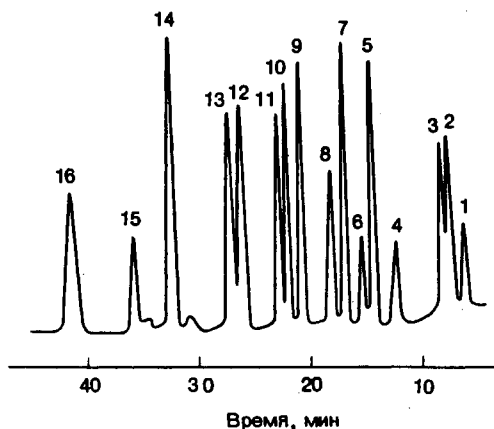


Рис. 1-15. Жидкостная хроматограмма высокого давления гидролизатов аминокислот. Разделение на колонке Хевлетта — Паккарда HP 1010 В (3 × 250 мм), наполненной сильнокислой полистиролдивинилбензольной ионообменной смолой (размер зерен 8 — 2 мкм): концентрация аминокислоты: 500 пмоль/л, реагент для детектирования — флуорескамин; детектор флуориметрический типа Хевлетта — Паккарда (тип 1033 А).

1 — Asp, 2 — Thr, 3 — Ser, 4 — Glu, 5 — Gly, 6 — ALa, 7 — Cys, 8 — Val, 9 — Met, 10 — Ile, 11 — Leu, 12 — Tyr, 13 — Phe, 14 — Lys, 15 — His, 16 — Arg.

## 1.7.1.4. Газовая хроматография [151 — 156]

Газовая хроматография предложена как метод Джеймсом и Мартином в 1952 г.; как метод химического анализа ГХ отличается особо высокой производительностью. Благодаря высокой скорости потока подвижной фазы (газообразные водород, гелий, азот и аргон) достигается быстрое установление фазового равновесия. В качестве стационарной фазы применяют чаще всего силикон, полиэфир или полигликоль на таких носителях, как цеолит, хромосорб, стерхамол и др. Длина колонки при обычных разделениях колеблется от 1 до 6 м, при разделениях энантимеров на капиллярных колонках их длина достигает 150 м. Идентификация разделенных веществ производится высокочувствительными детекторами — пламенно-ионизационным ( $10^{-10}$  моль), электронзахватывающим, а также работающими на основе измерения теплопроводности ( $10^{-16}$  моль). Предел обнару-

Таблица 1-11. Производные аминокислот для газохроматографического разделения

Аминофункция	Карбоксильная функция	Неподвижная фаза	Литература
Ацетил	Пропиловый эфир	Карбовакс 20-MX	159
Трифторацетил (ТФА)	Метиловый эфир	XE-60/QE-1/MS-200	160
Гептафторбутирил (ГФБ)	Бутиловый эфир	Ализон М	161
	Метиловый эфир	ПЭГ/адипат/ализзон	162
Триметилсилил (ТМС)	Пропиловый эфир	OV-1	163
	Изоамиловый эфир	SE-30	164
	Триметилсилиловый эфир (ТМС-эфир)	OV-11	165
Динитрофенил (ДНФ)	Метиловый эфир	SE-30	166
<i>Циклические производные аминокислот</i>			
Фенилтиогидантоин (ФТГ-аминокислоты)	ТМС-эфиры	OV-101/OV-225	167
Метилтиогидантоин (МТГ-аминокислоты)	ТМС-производные	OV-17	168
Оксазолидин [2,2-бис(хлордиформетил)оксазолидин-5-он]		Силикон	169

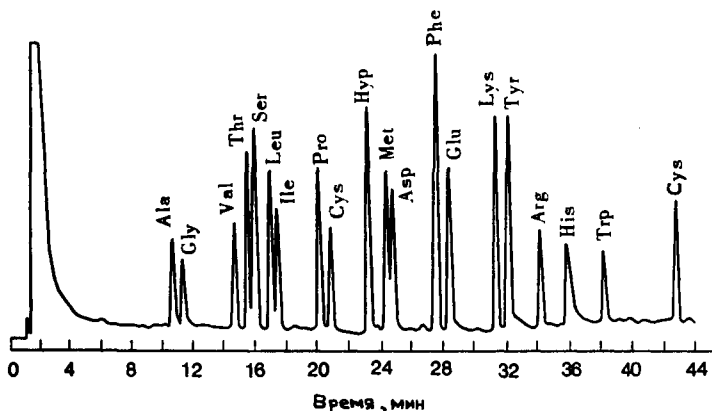


Рис. 1-16. ГХ-анализ N-ГФБ-пропиловых эфиров 20 протеиногенных аминокислот.

жения лежит в нано- и пикомольной области. Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией предоставляет идеальные возможности для обнаружения неизвестных аминокислот и пептидных структур [157 — 158].

Существенный недостаток ГХ состоит в том, что для анализа нельзя непосредственно использовать трудноретучие аминокислоты. Сначала их нужно перевести в летучие соединения путем получения подходящих производных или с помощью реакций разложения. Наилучшим оказалось одновременное замещение аминно- и карбоксильной функций аминокислот. В табл. 1-11 приведены производные аминокислот, с которыми удалось полное разделение, или получены достаточно удовлетворительные результаты. Продукты распада, такие, как альдегиды, амины, аминокислоты, нитрилы, гидроксикислоты и др., до сих пор не удалось однозначно идентифицировать.

О применении газовой хроматографии для определения рацемизации при пептидном синтезе сообщается в разд. 2.2.6.2, для установления аминокислотной последовательности — в разд. 3.6.1.2.2.

На рис. 1-16 приведены результаты газохроматографического разделения 20 протеиногенных аминокислот в виде N-гептафторбутирилпропиловых эфиров. Получение производных осуществлялось взаимодействием с ангидридом гептафтормасляной кислоты.

#### 1.7.1.5. Хроматографическое разделение энантиомеров

Хроматографические методы разделения энантиомеров применяются прежде всего при определении конфигурации аминокислот, для исследования рацемизации и для препаративного выделения небольших количеств энантиомеров. Некоторые аминокислоты могут быть разделены на оптические

антиподы с помощью бумажной и тонкослойной хроматографии. При этом разделение достигается применением оптически активных элюэнтов или взаимодействием с хиральными молекулами целлюлозы.

На альгинатсиликагелевых бумагах L-аминокислоты более подвижны, чем D-аминокислоты.

В случае лигандообменной хроматографии [170—173] применяют хиральные полимерные носители, которые содержат ионы переходных металлов ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  и др.), координационно связанные оптически активными аминокислотами так, что остаются ненасыщенные координационные связи. В ходе разделения свободные координационные связи занимают лигандами подвижной фазы. Таким образом был разделен ряд DL-аминокислот на полистирольных смолах с L-пролином, сульфированным фенилаланином [174], L-гидроксипролином [175] и другими энантиомерами аминокислот в качестве фиксированных лигандов. Некоординированные энантиомеры элюировались в виде комплекса с ионом  $\text{Cu}^{2+}$ , координированные энантиомеры вымывались концентрированным аммиаком.

В случае газохроматографического разделения энантиомеров различают методы, основанные на двух принципах:

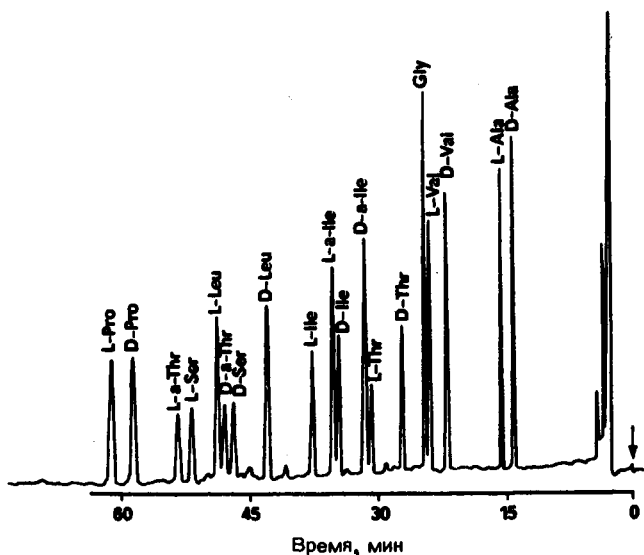


Рис. 1-17. Разделение энантиомеров изопропиловых эфиров пентафторпропиониламино кислот в стеклянной капиллярной колонке (20 м) с N-ТФА-L-Phe-L-Asp-бисциклогексильным эфиром в качестве неподвижной фазы. Температура  $130^{\circ}\text{C}$ ; температурная программа:  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до  $165^{\circ}\text{C}$ .



- 1) получение производных энантиомеров с оптически активными реагентами с последующим разделением на оптически неактивной фазе;
- 2) непосредственное разделение энантиомеров на хиральной неподвижной фазе [176, 177].

В качестве хиральных реагентов для получения пригодных для хроматографии диастереомерных производных аминокислот используют оптически активные амиловый спирт как компонент этерификации для N-пентафторпропиониламино кислот [178] и  $\alpha$ -хлоризовалерилхлорид как ацилирующий компонент для эфиров аминокислот [179]. Применение продажных стеклянных капилляров с готовой неподвижной фазой обеспечивает оптимальное разделение большинства аминокислот.

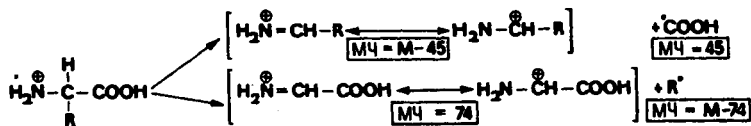
Использование второго принципа позволило разделить эфиры N-трифторацетиламино кислоты в стеклянных капиллярах (диаметр 15 мм, длина 150 м), которые содержат в качестве оптически активной неподвижной фазы эфир N-трифторацетил-L, L-дипептида. Циклогексильный эфир N-ТФА-Val-Val [180] был применен для энантиомерного разделения аминокислот, а циклогексильные эфиры N-ТФА-Phe-Leu [181] и N-ТФА-L-Abu-L-Abu [182] использовались при анализе образцов метеоритов. Особой термической устойчивостью отличаются бисциклогексильный эфир N-ТФА-Phe-Asp [183] и карборанилпропиловый эфир N-ТФА-Val-Val [184]. По Кёнигу, эффект разделения основан на пространственном сближении между партнерами одинаковой конфигурации, причем кроме связывания водородными мостиками важную роль играет также диполь-дипольное взаимодействие между дипептидными и аминокислотными производными.

Байер и др. [185, 186] предложили *хиральный полисилоксан* для газохроматографического разделения энантиомерных аминокислот и других DL-соединений (гидроксикислоты, спирты, амины). В качестве хиральных якорных групп используются аминокислоты или пептиды, которые присоединяются к термически устойчивому органосилоксановому остову. Особенно подходящей оказалась фаза Chirasil-Val с *трет*-бутиламидом L-валина в качестве оптически активного лиганда.

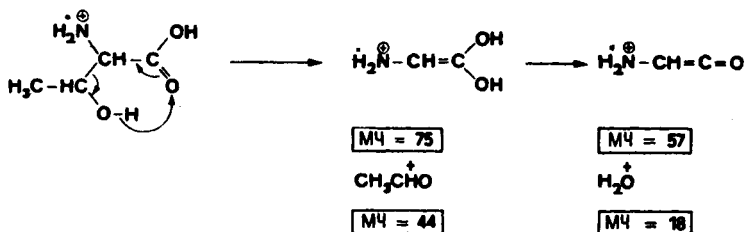
### 1.7.2. Масс-спектрометрический анализ аминокислот [187 — 189]

Принцип масс-спектрометрического анализа заключается в регистрации фрагментных ионов и радикалов, которые образуются при разложении первичного, полученного электронным ударом, богатого энергией молекулярного иона. Для оценки спектра требуется знание механизма реакций разложения ионизированной аминокислотной молекулы.

Характерное для  $\alpha$ -аминокислот разложение на стабилизированные мезомерией иминные ионы и относительно устойчивый радикал  $\cdot\text{COOH}$  и радикал боковой цепи R $\cdot$  идет по следующей схеме:



Кроме указанных реакций, дальнейшее фрагментирование зависит от строения боковой цепи. В показанном на рис. 1-18 масс-спектре треонина, например, кроме пика нормальных фрагментов (MЧ = 74 и MЧ = 45) можно наблюдать еще два пика относительно высокой интенсивности. Они обусловлены протекающей реакцией:



В связи с трудной летучестью аминокислот проба вносится в ионный источник масс-спектрометра при 10<sup>-4</sup> — 10<sup>-5</sup> Па и 100 — 150 °С. Благоприятно введение летучих производных аминокислот, которые применяются и для газовой хроматографии.

Масс-спектрометрия приобрела особое значение при анализе аминокислотных последовательностей белков (разд. 3.6.1.2.2). Для определения фенилтигидантоина используют масс-спектроскопию полевой десорбции ионов, причем применяется прибор высокого разрешения с фотодетектором.

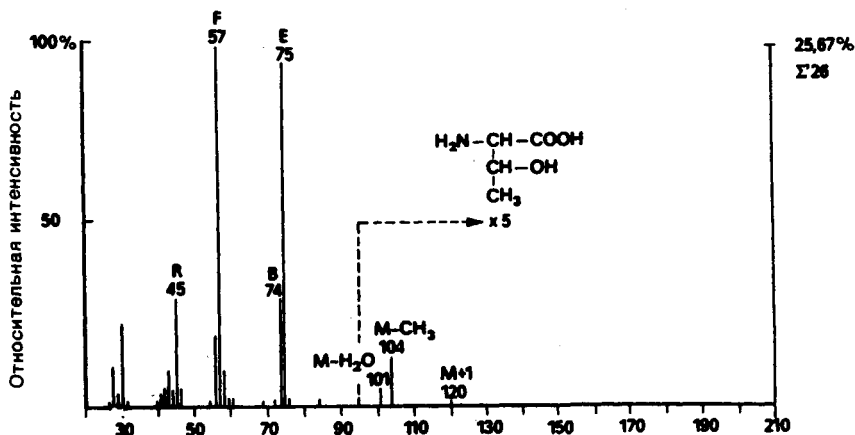


Рис. 1-18. Масс-спектр треонина (70 эВ).

Можно легко определять отдельные аминокислоты, так как благодаря высокой интенсивности молекулярных пиков из-за малого фрагментирования и относительно слабого межмолекулярного взаимодействия получают спектры высокого разрешения.

### 1.7.3. Методы анализа с использованием изотопов [192 — 194]

Изотопные методы являются обычными методами аминокислотного анализа; к ним относятся:

- 1) метод изотопного разбавления и
- 2) метод активированных производных.

В случае метода изотопного разбавления смешивают анализируемую пробу с определенным количеством меченой аминокислоты и рассчитывают степень разбавления изотопа после выделения определяемой аминокислоты:

$$B = \left( \frac{C_0}{C} - 1 \right) A$$

где  $B$  — искомое количество аминокислоты в пробе,  $A$  — количество добавленной меченой аминокислоты,  $C_0$  — концентрация изотопного элемента в добавленной аминокислоте и  $C$  — концентрация изотопного элемента в выделенной аминокислоте. Об ультрачувствительном методе изотопного разбавления для определения L-аминокислот сообщают Рубин и Гольдштейн [195].

В случае часто применяемого метода активированных производных аминокислота, подлежащая определению, сначала метится взаимодействием [195] с реагентами, которые содержат устойчивые или радиоактивные изотопы. Затем ее смешивают с избытком немеченого производного аминокислоты и очищают до постоянной молярной концентрации изотопа  $C_c$ . Количество  $w$  искомой аминокислоты находят по формуле

$$w = W \frac{C_c}{C_r}$$

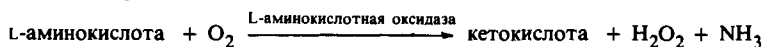
где  $W$  — количество добавленного неактивного производного,  $C_r$  — молярная концентрация изотопа в производном, полученном из реакции между очищенной аминокислотой и реагентом.

Особо чувствительный метод двойной метки основан на применении меченого [ $^3\text{H}$ ]-дансилхлорида в качестве реагента и меченой [ $^{14}\text{C}$ ]-аминокислоты как внутреннего стандарта. Отношение  $^3\text{H}:^{14}\text{C}$  в дансильном производном зависит от отношения количества добавленной [ $^{14}\text{C}$ ]-аминокислоты к концентрации немеченой аминокислоты в пробе. Этот метод особенно подходит для идентификации аминокислот в биологическом материале. Его чувствительность лежит в пикомольной области [196].

### 1.7.4. Ферментативные методы

Ферментативные методы аминокислотного анализа основаны на определении продуктов реакции, которые образуются при биохимическом расщеплении аминокислот. Из-за их сравнительно низкой чувствительности ( $10^{-2}$  —  $10^{-4}$  моль/л) эти методы применяют только при серийных анализах определенных аминокислот. К анализируемой смеси аминокислот добавляют специфическую декарбоксилазу (или же производящие эту декарбоксилазу микроорганизмы), и получающуюся при декарбоксилировании углекислоту определяют манометрически в аппарате Варбурга.

Все большее значение приобретает определение аминокислот с помощью ферментативных электродов [197 — 200], в которых стереоселективное расщепление катализируется иммобилизованными ферментами; например, в случае оксидного электрода, специфичного к L-аминокислотам, расщепление протекает по схеме



Для определения можно использовать образующиеся  $\text{H}_2\text{O}_2$  или  $\text{NH}_3$ . Аммиак можно определять титрованием, пероксид водорода — либо амперометрически, либо по вторичной реакции с ионами  $\text{I}^-$ . Изменение концентрации  $\text{I}^-$  можно регистрировать иодселективным электродом.

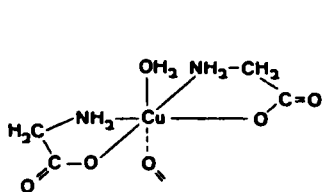
## 1.8. Специфические реакции аминокислот

Химические реакции аминокислот определяются их функциональными группами и столь многочисленны, что следует остановиться только на важнейших из них. О реакциях, которые ведут к производным аминокислот, имеющим значение для синтеза пептидов, говорится в гл. 2.

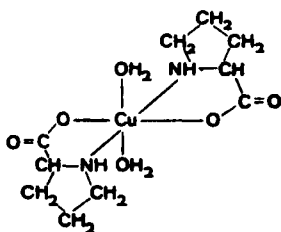
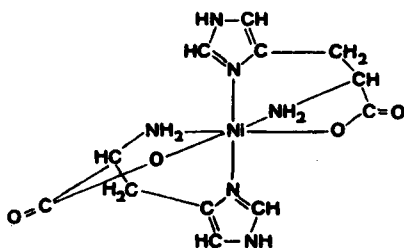
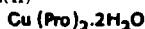
### 1.8.1. Образование комплексов с металлами [201]

Аминокислоты образуют с ионами тяжелых металлов хелатные комплексы, из которых наиболее известны темно-синие, хорошо кристаллизующиеся соединения с  $\text{Cu(II)}$ . Образование хелата типа  $\text{CuA}_2$  используется при комплексометрическом титровании ряда аминокислот. Титрование производят раствором сульфата меди (II) при pH 9 в присутствии мурексида как индикатора [202].

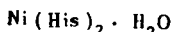
Анализ кристаллических структур комплексов белков с металлами показал, что аминокислотные комплексы металлов имеют октаэдрическое строение, причем два остатка аминокислоты связаны с центральным атомом металла амино- и карбоксильными группами, а свободные координационные места заняты водой. Особой устойчивостью отличаются комплексы с аминокислотами, имеющими функциональные боковые цепи, как, например, гистидин, азот имидазола в котором образует дополнительную связь с центральным атомом.



гидрат бис-глицината меди (II)

дигидрат бис-DL-пролина  
меди(II)

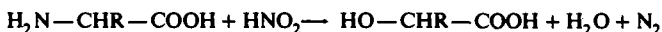
гидрат бис-L-гистидината никеля(II)



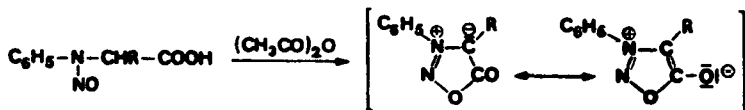
Бек и др. [203] провели систематические исследования комплексов аминокислот и простых пептидов с платиной (II). При этом оказалось, что построенные из аминокислотных комплексов платины(II) олигопептидные комплексы типа *cis*-PtAS<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (AS<sub>2</sub> — эфир дипептида, X — анионный лиганд, например Cl<sup>-</sup>) обладают противоопухолевым действием.

### 1.8.2. Реакции с азотистой кислотой

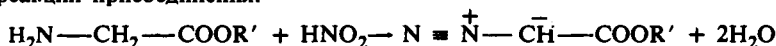
Свободные аминокислоты как первичные амины реагируют с HNO<sub>2</sub> с отщеплением азота. При этом аминогруппа замещается гидроксилом и изменения конфигурации у хирального атома углерода не происходит. Измерение количества выделяющегося азота служит для количественного определения аминокислот по ван Слайку (1910 г.):



Из N-алкил(или арил)-аминокислот и HNO<sub>2</sub> получаются *сидноны*. Сначала получается нитрозамин, при дегидратации которого с помощью ацетангидрида происходит замыкание кольца.

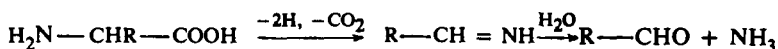


Фенилзамещенные сидноны и сиднонимины представляют фармакологический интерес благодаря их противоопухолевому, бактериостатическому и жаропонижающему действию [204]. Эфиры аминокислот при реакции с  $\text{HNO}_2$  переходят в относительно устойчивые диазоэфиры. Известным примером является диазоуксусный эфир, получающийся из эфира глицина, который находит применение в органическом синтезе для расширения циклов и реакций присоединения:



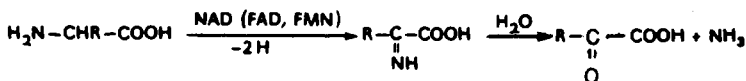
### 1.8.3. Окислительное дезаминирование

Элиминирование аминогруппы аминокислоты происходит при окислении с образованием карбонильного соединения и аммиака. Впервые оно наблюдалось Штрекером (1862 г.) при взаимодействии аланина с аллоксаном. В качестве окислителей применяются ди- и трикетоны, N-бромсукцинимид, оксид серебра(II) и др. Конечными продуктами реакции, протекающей с одновременным декарбоксилированием, являются альдегид, цепь которого на один С-атом короче, и аммиак:



Окислительное дезаминирование аминокислот нингидрином имеет аналитическое значение (разд. 1.7.1).

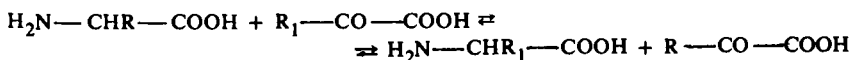
При биохимическом дезаминировании аминокислот аминогруппа на первой стадии реакции под влиянием D- и L-аминокислотных оксидаз дегидрируется в иминогруппу, затем полученная иминокислота гидролизуется в кетокислоту:



При этом в роли акцепторов водорода выступают никотинамидденидинуклеотид, флавинаденидинуклеотид или флавимононуклеотид. Образующийся аммиак токсичен для организмов и выделяется у человека и других млекопитающих в виде мочевины, у птиц и рептилий в виде мочевой кислоты.

### 1.8.4. Переаминирование

Аминогруппа аминокислоты может переноситься в обратимой реакции на кетокислоту, и при этом получаются новая аминокислота и новая кетокислота:



Биохимическое переаминирование — важнейшая реакция переноса группы в аминокислотном обмене. Она катализируется аминотрансферазами (трансаминазами), коферментом является пиридоксальфосфат, который принимает участие в обмене аминогрупп, образуя шиффовы основания в качестве промежуточной ступени.

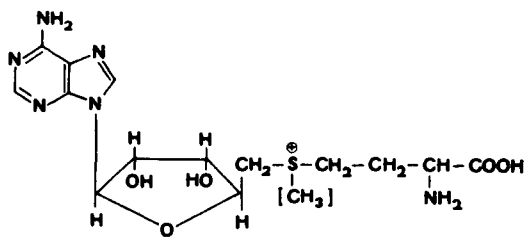
Путем переаминирования большинство аминокислот может превращаться одна в другую или заменяться соответствующей кетокислотой. Поэтому реакции переаминирования — одни из важнейших при биосинтезе заменимых аминокислот. Особенно легко переаминируются глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Соответствующие им трансаминазы (глутаматоксалацетаттрансаминаза и глутаматпируваттрансаминаза) имеют очень высокую активность. Кетокислоты, получающиеся из этих аминокислотных кислот ( $\alpha$ -кетоглутаровая и шавелевоуксусная кислоты), осуществляют связь углеводного и белкового обмена.

### 1.8.5. N-Алкилирование

По числу соединенных с азотом алкильных групп различают моно-, ди- и триалкиламино кислоты. Проще всего полное алкилирование аминогруппы (пералкилирование) проходит с диазоалканами или диалкилсульфатами, причем оно идет ступенчато через моно- и диалкилированные продукты. Моно- и диметиламино кислоты принимают участие в образовании пептидов микробного происхождения.

Некоторые перметилированные аминокислоты обнаружены в природе, например *Herzynin* как бетаин гистидина в шампиньонах, *Hypaphorin* как бетаин триптофана в семенах *Erythrina hypaphorus*, *Stachydrin* как бетаин пролина в *Stachys* и других растениях и гомобетаин  $\beta$ -аланина в мясном экстракте. Название «бетаины» произошло от латинского (*Beta Vulgaris* — сахарная свекла, в которой имеется простейший представитель этого ряда бетаин  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ ). Они всегда находятся в цвиттер-ионной форме.

При биохимическом N-метилировании роль донора метильной группы исполняет аденозилметионин, получающийся из метионина и аденозинтрифосфата:

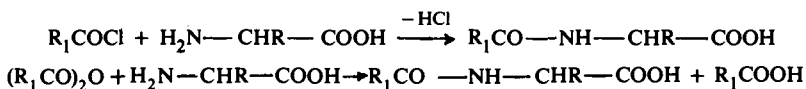


В качестве активного сульфониоиевого соединения S-аденозилметионин переносит связанную с ним метильную группу в виде  $\text{CH}_3^+$  к свободной элек-

тронной паре азота, а сам он при этом переходит в аденозилгомоцистеин. Из коламина  $H_2N-CH_2-CH_2OH$  получается при этом, например, *холин*  $(CH_3)_3N^+-CH_2-CH_2OH$ , из гуанидоуксусной кислоты  $H_2N-C(NH)-NH-CH_2-COOH$  — *креатин*  $H_2N-C(NH)-N(CH_3)-CH_2-COOH$ .

### 1.8.6. N-Ацилирование

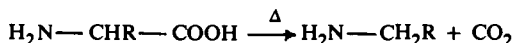
При взаимодействии ацилирующих реагентов (хлорангидриды, ангидриды и др.) с аминокислотами получаются по реакции Шоттена — Баумана N-ациламинокислоты:



Полученные N-ацилсоединения обычно хорошо кристаллизуются и подходят для характеристики и идентификации аминокислот. Часто N-ацильные остатки можно легко и быстро отщепить снова, так что они могут служить временной защитой аминогруппы (разд. 2.2.4.1.1). Фторзамещенные N-ациламинокислоты служат для приготовления легколетучих производных для газовой хроматографии, N-ацетил- и N-хлорацетиламинокислоты для ферментативного расщепления DL-соединений. Аминокислоты, ацилированные остатками природных жирных кислот, как, например, N-лауроил- и N-стеарилглутаминовая кислоты, приобретают большое значение в качестве поверхностно-активных веществ, не загрязняющих окружающую среду.

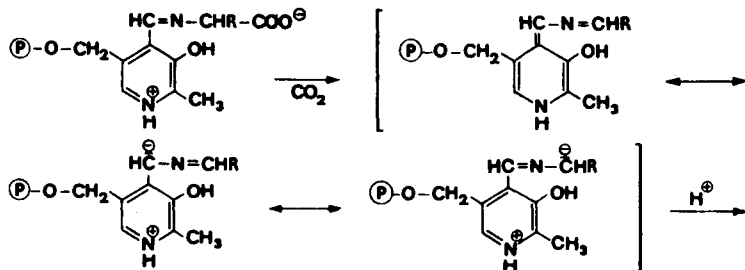
### 1.8.7. Декарбоксилирование

Из реакций карбоксильной группы аминокислот особое значение имеет декарбоксилирование. При постепенном нагревании до температур  $> 200^\circ C$  аминокислоты начинают отщеплять  $CO_2$  и переходить в первичные амины:

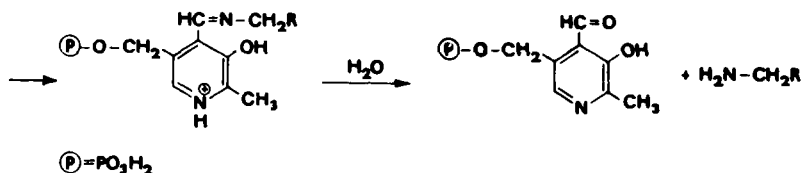


Реакции катализируются ионами металлов. Например, аспарагиновая кислота легко декарбоксилируется в присутствии  $Cu(II)$  с образованием аланина.

Декарбоксилирование аминокислот в живых системах катализируется декарбоксилазами. В них принимает участие пиридоксальфосфат, кофермент метаболизма аминокислот.







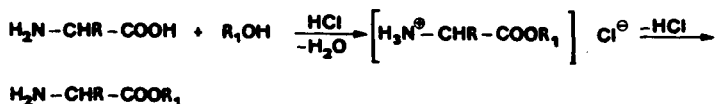
Продукты декарбоксилирования аминокислот, за исключением простых алифатических аминокислот, таких, как Gly, Ala, Val, Leu и Ile, обладают выраженным биологическим действием (биогенные амины). Некоторые из них имеют сильное фармакологическое действие, другие являются составными частями коферментов, гормонов и витаминов. Производные триптамина широко известны как вещества, вызывающие галлюцинации. Так, N,N-диметил- и N,N-диэтилтриптамин содержатся в нюхательном табаке, употребляемом некоторыми южноамериканскими индейцами, псилоцин и псилоцибин, активные составные части *Psilocybe mexicana* с вызывающим галлюцинации действием, являются соответственно 4-гидрокси-N,N-диметилтриптамином и его эфиром с ортофосфорной кислотой. Обзор биогенных аминов приведен в табл. 1-12.

Таблица 1-12. Важнейшие биогенные амины

Аминокислоты	Продукт декарбоксилирования	Местонахождение и действие
Гистидин	Гистамин	Тканевый гормон, действующий на кровяное давление
Лизин	Кадаверин	Компонент рибосом
Орнитин	Путресцин	Продукт бактериального метаболизма
Аргинин	Агматин	Продукт метаболизма кишечных бактерий
Аспарагиновая кислота	$\beta$ -Аланин	Компонент кофермента А
Глутаминовая кислота	$\gamma$ -Аминомасляная кислота	Продукт метаболизма головного мозга; препарат, снижающий кровяное давление
Серин	Коламин	Компонент холина и фосфатидов
Треонин	Пропанол-амин	Компонент витамина B <sub>12</sub>
Цистеин	Цистеамин	Компонент кофермента А
Тирозин	Тирамин	Тканевый гормон, вызывающий сокращение матки
ДОФА	Дофамин	Нейромедиатор (центральная нервная система); промежуточное вещество в синтезе адреналина
Триптофан	Триптамин	Тканевый гормон
5-Гидрокситриптофан	Серотонин	То же
N-Ацетил-5-гидрокситриптофан	Мелатонин	Гормон эпифиза

### 1.8.8. Этерификация

Наиболее распространенный метод этерификации аминокислот — взаимодействие с безводным спиртом в присутствии катализаторов (хлороводород, сильноокислые катионообменники):



Сначала получается гидрохлорид эфира, при добавлении основания эфир аминокислоты освобождается, извлекается органическим растворителем и перегоняется в вакууме. Свободные эфиры имеют характерный аминный запах. При хранении и особенно при нагревании они переходят в 2,5-диоксопиперазины, отщепляя спирт. По этой же причине часть продукта теряется при перегонке эфиров аминокислот. Относительно термически устойчивы *изопропиловые эфиры*, и благодаря этому свойству они были предложены для осторожного разделения смесей аминокислот перегонкой их эфиров.

*Метилловые эфиры* чаще всего готовят, используя тионилхлорид и метанол, при этом, вероятно, в качестве активированного промежуточного продукта образуется эфир хлорсульфиновой кислоты [206].

Эфиры аминокислот и пептидов получают в очень мягких условиях из их цезиевых солей реакцией с алкилгалогенидами [207]. Одностадийный метод этерификации аминокислот первичными, вторичными и третичными спиртами в присутствии имидхлорида, полученного из диметилформамида, описал Штадлер [208].

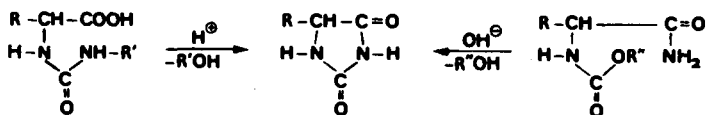
Эфиры аминокислот при действии восстановителей переходят в аминокальдегиды или аминокспирты. Особенно гладко проходит восстановление с литийалюминийгидридом; при этом с высокими выходами образуются оптически активные аминокспирты.

Этерификация как защита карбоксильной группы при пептидном синтезе, а также «активированные» эфиры рассматриваются в гл. 3.

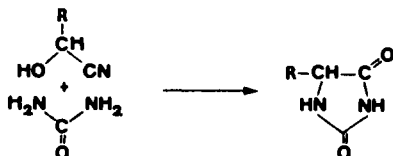
### 1.9. Циклические производные аминокислот

Из множества циклических производных аминокислот в этом разделе рассмотрены наиболее важные: пятичленные гидантоины, оксазолиноны и оксазолидиндионы и шестичленные диоксопиперазины.

*Гидантоины* (имидазолидиндионы) уже упоминались в связи с синтезом аминокислот. Их получают циклизацией уреидокарбоновых кислот при катализе кислотами или циклизацией амидов алкилоксикарбониламинокислот при катализе основаниями.



Проще всего их получают путем нагревания циангидринов с мочевиной или реакцией аминокислот с изоцианатами.

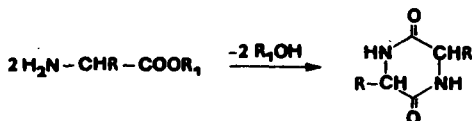


*Креатинин*, образующийся в мышечной ткани, представляет собой 2-имино-3-метилгидантоин. Стоит упомянуть и *тиогидантоин*, который образуется при определенных аминокислотных последовательностях реакцией с изотиоцианатами (ср. разд. 3.6.1.2.2).

Оксазолиноны (азлактоны) получают дегидратацией N-аминамонокислот с помощью уксусного ангидрида или в присутствии карбодимидов. Они являются промежуточными продуктами синтеза аминокислот. Их образование в побочных реакциях пептидного синтеза ведет к частичной рацемизации соответствующей аминокислоты (разд. 2.2.6.1).

*Оксазолидиндионы* (N-карбоксиянгидриды, называемые по имени их открывателя также ангидридами Лейкса) получают отщеплением бензилхлорида от хлорангидридов N-бензилоксикарбониламинокислот или, проще, из аминокислоты и фосгена. Они очень реакционноспособны и применяются прежде всего для получения полиаминокислот и пептидов (разд. 2.2.5.2.3).

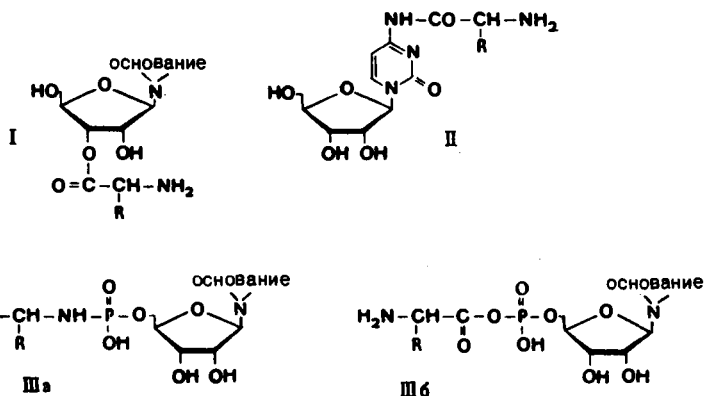
*2,5-Диоксопиперазин*, образующийся при межмолекулярной эфирной конденсации эфиров, аминокислот, известен как продукт обмена веществ различных микроорганизмов. Для синтетической химии аминокислот и пептидов он имеет лишь второстепенное значение.



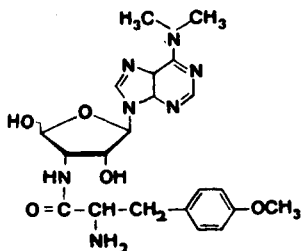
## 1.10. Фосфорил- и фосфатидиламинокислоты

Значение этих соединений определяется тем, что они входят в состав биохимически важных фосфопептидов и фосфобелков. Эти аминокислоты обычно образуются из гидроксикаминокислот (Ser, Thr, Hyp) и содержат фосфор, связанный ковалентной P—O-связью. Их получают, например, при





связывания с помощью остатка фосфорной кислоты (IIIa и IIIб). Эфирная группировка типа I встречается в тРНК (разд. 3.7.1), которая имеет важное значение в биосинтезе белка. Удивительная структурная аналогия имеется у антибиотика *пурамицина*, ингибирующего биосинтез белка.



Нуклеоаминокислота N-(пурин-6-ил)аспарагиновая кислота была найдена в мицелии пенициллина.

О синтезе эфиров нуклеотидил-(5'-N)-аминокислот и пептидов путем связывания соответствующих аминокислотных и нуклеотидных производных карбонимидных и карбонилдиимидазольных методами сообщалось в работе [209]. Стереорегулярные гомонуклеотиды из активированных производных урацил-N'-β-аланина получили Швачкин и сотр. [210].

## Литература

1. Lücke K., Schröder E., Kloss G., Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine, Bd. I u. II, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
2. Weinstein B., Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 1-5, Marcel Dekker, Inc., New York, 1971-1978.
3. Fahnenstich R., Heese J., Tanner H. Aminosäuren in: Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie, Verlag Chemie, Weinheim, 1974.

4. *Гринштейн Дж., Виниц М.* Химия аминокислот и пептидов. — М.: Мир, 1965.
5. *Meister A.*, Biochemistry of the Amino Acids, Bd. 1 a. 2, Academic Press, New York — London, 1965.
6. *Corrigan J. J.*, Science, **164**, 142 (1969).
7. IUPAC-IUB-Nomenklaturregeln, J. Biol. Chem., **245**, 5171 (1970); J. Biol. Chem., **247**, 977 (1972); Pure Appl. Chem., **31**, 641 (1972); Pure Appl. Chem., **40**, 315 (1974); Eur. J. Biochem., **53**, 1 (1975).
8. *Brand E., Edsal J. T.*, Ann. Rev. Biochem. **16**, 224 (1947).
9. *Wellner D., Meister A.*, Science, **151**, 77 (1966).
10. *Barret G. C.* Amino Acids, Peptides, Proteins, **8**, 1 (1976).
11. *Fowden L.*, Endeavour **21**, 35 (1962).
12. *Tschiersch B.*, Pharmazie **17**, 721 (1962).
13. *Kühnau J.*, Angew. Chem. **61**, 357 (1949).
14. *Schuphan W., Schwerdtfeger E.*, Die Nahrung **9**, 755 (1965).
15. *Сафонова Е. Н., Беликов В. М.* — Успехи химии 1967, **36**, с.913.
16. The Therapeutic Use of EAS and their Analogues. IIIrd Int. Symp. (1976) Erlangen, Z. Ernährungswiss **16**, 1 (1977).
17. *Rose W. C. et al.*, J. Biol. Chem. **176**, 753, (1948); **188**, 49 (1951); **206**, 421 (1954); **216**, 763 (1955); **217**, 987 (1955).
18. Joint FAO/WHO Ad Hoc Expert Comitee, WHO, Techn. Report Ser. No. **522**, 55 (1973).
19. *Schneider F.*, Naturwiss. **65**, 376 (1978).
20. *Champagnat A. et al.*, Nature **197**, 13 (1963).
21. *Bell E. A., John D. I.*, Int. Rev. Sci.: Org. Chem. Ser. Two, **6**, 1 (Hsg.: H. N. Rydon), Butterworth/London, (1976).
22. *Märki W.*, Helv. Chim. Acta **59**, 1591 (1976).
23. *Shah D. V., Tews J. K., Harper A. E., Suttie J. W.*, Biochim Biophys. Acta **539**, 209 (1978).
24. *Neuberger A.*, Adv. Protein Chem. **4**, 297 (1948).
25. *Гринштейн Дж., Виниц М.* Химия аминокислот и пептидов. — М.: Мир, 1965, с. 105.
26. *Eliel E. L.*, Chemie u. Zeit **8**, 148 (1974).
27. *Lutz O., Jirgenson B.*, Ber. dtsch. chem. Ges. **63**, 448 (1930); **64**, 1221 (1931).
28. *Toniolo C., Signor A.*, Experientia **28**, 753 (1972).
29. *Jennings J. P., Klyne W., Scopes P. M.*, J. Chem. Soc. **1965**, 294.
30. *Fowden L., Scopes P. M., Thomas R. N.* J. Chem. Soc. **1971**, 833.
31. *Toome V., Weigle S. M.* Tetrahedron **31**, 2625 (1975).
32. *Wieser H., Jugel H., Belitz H.-D.*, Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch. **164**, 277 (1977).
33. *Ariyoshi Yasuo*, Agr. and Biol. Chem. **40**, 983 (1976).
34. *Taddel F., Pratt L.*, J. Chem. Soc. **1964**, 1553.
35. *Abraham R. J., Thomas U. A. J.* Chem. Soc. **1964**, 3739.
36. *Martin R. B., Mathur R.*, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 1065 (1965).
37. *Cavanaugh J. R.*, J. Amer. Chem. Soc. **89**, 1558 (1967).
38. *Roberts G. C. K., Jardetzky O.*, Adv. Protein Chem. **24**, 460 (1970).
39. *Zimmerman S. S., Pottle M. S., Nemethy G., Scheraga H. A.* Macromolecules **10**, 1 (1977).
40. *Marsh R. E. Donoheu J.*, Adv. Protein Chem. **22**, 235 (1967).
41. *Beaven G. H., Holiday E. R.*, Adv. Protein Chem. **7**, 319 (1952).
42. *Wetlaufer D. B.*, Adv. Protein Chem. **17**, 303 (1962).
43. *Sutherland G. B. B. M.*, Adv. Protein Chem. **7**, 291 (1952).

44. *Turba F.*, Aminosäuren, Peptide in: Hoppe Seyler/Thierfelder, Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse, 10. Aufl., Bd. III/2, S. 1685ff., Springer-Verlag; Berlin — Göttingen — Heidelberg (1955).
45. *Takeda M., Jardetzky O.*, J. Chem. Phys. **26**, 1346 (1957).
46. *Breitmair E., Voelter W.*, <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie, Verlag Chemie, Weinheim, 1974.
47. *Voelter W., Zech K., Grimminger W., Breitmair E., Jung G.*, Chem. Ber. **105**, 3650 (1972).
48. *Wieland Th.*, Fortschr. chem. Forschung **1**, 211 (1949).
49. *Kaneko T., Izumi Y., Chibata I., Itoh T.* Synthetic Production and Utilization of Amino Acids, Halsted Press, Wiley, New York, 1974.
50. *Беликов В. М.* — Вестник Академии наук СССР 1973, № 8, 33.
51. *Сафонова Е. Н., Беликов В. М.* — Успехи химии 1974, **43**, с.1575.
52. *Meienhofer J.*, J. Med. Chem. **18**, 643 (1975).
53. *Izumi Y., Chibata I., Itoh T.*, Angew. Chem. **90**, 187 (1978).
54. *Hill R. L.*, Adv. Protein Chem. **20**, 37 (1965).
55. *Moore S., Stein W. H.*, Methods in Enzymology **6**, 819 (1963).
56. *Gruber H. A., Mellon E. F.*, Anal. Biochem. **26**, 180 (1968).
57. *Westall F., Hesser H.*, Anal. Biochem. **61**, 610 (1974).
58. *Liu T. Y., Chang Y. H.*, J. Biol. Chem. **246**, 2842 (1971).
59. *Penke B., Ferenczi R., Kovacs K.*, Anal. Biochem. **60**, 45 (1974).
60. *Hill R. L., Schmidt R.* J. Biol. Chem. **237**, 389 (1962).
61. *Yamada K. et al.*, The Microbial Production of Amino Acids, Kodansha, Tokyo/Wiley, New York, 1972.
62. *Fukumura T.*, Agric. Biol. Chem. **40**, 1687 (1976).
63. *Hoppe D.*, Angew. Chem. **87**, 450 (1975).
64. *Schütte H. R.*, Radioaktive Isotope in der organischen Chemie und Biochemie, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin/Verlag Chemie, Weinheim, 1966.
65. *Tovey K. C., Spiller G. H., Oldham K. G., Lucas N., Carr N. G.*, Biochem. J. **142**, 47 (1974).
66. *Bretscher M. S., Smith A. E.*, Anal. Biochem. **47**, 310 (1972).
67. *Morecombe D. J., Young D. W.*, J. C. S. Chem. Commun. 198 (1975).
68. *Huang F. C., Chan J. A., Sih C. J., Fawcett P., Abraham E. P.*, J. Amer. Chem. Soc. **97**, 3858 (1975).
69. *Valentine D., Scott J. W.*, Synthesis 329 (1978).
70. *Scott J. W., Valentine D.*, Science **184**, 943 (1974).
71. *Hermann K.*, Nachr. Chem. Tech. Lab. **26**, 651 (1978).
72. *Takaishi N., Imai H., Bertelo C. A., Stille J. K.*, J. Amer. Chem. Soc. **100**, 264 (1978).
73. *Harada K., Iwasaki T., Okawara T.*, Bull. Chem. Soc. Japan **46**, 1901 (1973).
74. *Harada K., Okawara T.*, J. Org. Chem. **38**, 707 (1973).
75. *Weinges K., Stemmler B.*, Chem. Ber. **106**, 2291 (1973).
76. *Oguri T., Kawai N., Shiori T., Yamada S.*, Chem. Pharm. Bull. **26**, 803 (1978).
77. *Izumi Y., Tai A.* Stereo-Differentiation Reactions, Kodansha, Tokyo/Academic Press, New York, 1977.
78. *Böhm R., Losse G.*, Z. Chem. **7**, 409 (1967).
79. *Wolman Y., Haverland W. J., Miller S. L.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**, 809 (1972).
- 79a. *Митин Ю. В., Власов Г. П.* — ЖОХ 1965, **35**, с.861.
80. *Miller S. L., Orgel L. E.*, The Origins of Life on Earth, Englewood Cliffs, N. Y.: Prentice Hall (1973).
81. *Hatataka H., Egami F.*, Bull. Chem. Soc. Japan **50**, 1147 (1977).
82. *Harada K., Suzuki S.*, Nature **266**, 275 (1977).

83. *Eigen M., Schuster P.*, Naturwiss. **65**, 351 (1978).
84. *Lawless J. G., Peterson E.*, Orig. Life **6**, 3 (1975).
85. *Ivanov C. P., Slavcheva N. N.*, Orig. Life **8**, 13 (1977).
86. *Wolman Y., Miller S. L.*, Tetrahedron Letters 1199 (1972).
87. *Ferris J. P., Ryan T. J.*, J. Org. Chem. **38**, 3302 (1973).
88. *Sweeney M. A., Toste A. P., Ponnaperuma C.*, Orig. Life **7**, 187 (1976).
89. *Rabinowitz J.*, Helv. Chim. Acta **52**, 2663 (1969); **53**, 1353 (1970).
90. *Rabinowitz J., Hampai A.*, Helv. Chim. Acta **62**, 1842 (1978).
91. *Lahav N., White D., Chang S.*, Science **201**, 67 (1978).
92. *Hennon G., Plaquet R., Biserte G.*, Biochimie **57**, 1395 (1975).
- 92а. *Мархинин Е. К., Подклетнов Н. Е.* — ДАН СССР 1977, **235**, с.1203.
93. *Ленинджер А.* Основы химии. В 3-х томах. Пер. с англ. — М.: Мир, 1985.
94. *Greenstein J. P.*, Adv. Protein Chem. **9**, 121 (1954).
95. *Losse G., Jeschkeit H.*, Pharmazie **15**, 164 (1960).
96. *Helfman P. M., Bada J. L.*, Nature **262**, 279 (1976).
97. *Bada J. L., Protsch R.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **70**, 1331 (1973).
98. *Schröder R. A., Bada J. L.*, Science **182**, 479 (1973).
99. *Smith G. G., Williams K. M., Wonnacott D. M.*, J. Org. Chem. **43**, 1 (1978).
100. *Norden B.*, Nature **266**, 567 (1977).
101. *Bonner W. A., Kavasmanek P. R., Martin F. S., Flores J. J.*, Orig. Life, 367 (1975).
102. *Elios W. E.*, J. Chem. Educ. **49**, 448 (1972).
103. *Harada K.*, Naturwiss. **57**, 114 (1970).
104. *Thiemann W.*, Naturwiss. **61**, 476 (1974).
105. *Harada K.*, Nature **206**, 1354 (1965).
106. *Yamada S., Yamamoto I., Chibata I.*, J. Org. Chem. **38**, 4408 (1973).
107. *Yamada S., Hongo C., Yamamoto M., Chibata I.*, Agric. Biol. Chem. **40**, 1425 (1976).
108. *Arendt A., Kolodziejczyk A., Sokolowska T., Szufler E.*, Roczniki Chem. **48**, 635 (1974).
109. *Blackburn S.*, Amino Acid Determination, M. Dekker. Inc., New York, Basel, 1978.
110. *Jaeger E.*, in Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, 15/2, 681ff. (1974).
111. *Turba F.*, Chromatographische Methoden in der Proteinchemie, Springer-Verlag, Berlin, 1954.
112. *Hesse G.*, Chromatographisches Praktikum, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1968.
113. *Hesse G.*, Methodicum Chemicum, Bd. I, 1, 92; Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
114. *Krauss G.-J., Krauss G.*, Wiss. u. Fortschr. **23**, 458, 512, 552 (1973); **24**, 26, 76, 126 (1974).
115. *Krauss G.-J., Krauss G.*, Experimente zur Chromatographie, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1979.
116. *Eppert G.*, Einführung in die schnelle Flüssigkeitschromatographie, Akademie-Verlag, Berlin, 1978.
117. *Hrapia H.*, Einführung in die Chromatographie, Akademie-Verlag, Berlin, 1977.
118. *Lustenberg N., Lange H. W., Hempel K.*, Angew. Chem. **11**, 227 (1972).
119. *Udenfried S., Stein S., Böhlen P., Dairman W., Leimgruber W.*, Science **178**, 871 (1972).
120. *Mendez E., Lai C. Y.*, Anal. Biochem. **65**, 281 (1975).
121. *Stein S., Böhlen P., Stone J., Dairman W., Udenfried S.*, Arch. Biochem. Biophys. **155**, 202 (1973).



122. *Nakamura H., Pisano J. J.*, J. Chromatogr. **121**, 33 (1976).
123. *von Arx E., Faupel M., Brugger M.*, J. Chromatogr. **120**, 224 (1976).
124. *Roth M., Hampai A.*, J. Chromatogr. **83**, 353 (1973).
125. *Benson J. R., Hare P. E.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**, 619 (1975).
126. *Cronin J. P., Hare P. E.*, Anal. Biochem. **81**, 151 (1977).
127. *Maeda M., Tsuji A.*, Anal. Biochem. **52**, 555 (1973).
128. *Lange H. W., Lustenberg N., Hempel K.* Z. Anal. Chem. **261**, 337 (1972).
129. *Bayer E., Grom E., Kaltenegger B., Uhmann R.*, Anal. Chem. **48**, 1106 (1976).
130. *Seiler N., Wiechmann M.*, Z. Anal. Chem. **220**, 109 (1966).
131. *Burzynski S. R.*, Anal. Biochem. **65**, 93 (1975).
132. *Osborne N. N., Stahl W. L., Neuhoff V.*, J. Chromatogr. **123**, 212 (1976).
133. *Froehlich P. M., Myrohy L. D.*, Anal. Chem. **49**, 1606 (1977).
134. *Hais I. M., Macek K.*, Handbuch der Papierchromatographie VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena (1958).
135. *Cramer F.*, Papierchromatographie, 5. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, 1962.
136. *Jork H., Kraus L.*, Methodicum Chemicum, 1/1, 67, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
137. *Zweig G., Sherma J.*, Anal. Chem. **48**, 66R (1976).
138. *Grütte F. K., Kohnke B.* J. Chromatogr. **26**, 325 (1967).
139. *Randerath K.*, Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, 1966.
140. *Шмаль Э.* Хроматография в тонких слоях. — М.: Мир, 1965.
141. *Pataki G.*, Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, Verlag W. de Gruyter, Berlin, 1966.
142. *Kirchner J. G.*, Thin-Layer-Chromatography, Intersci. Publ., New York — London — Sidney, 1967.
143. *Issaq H. I., Barr E. W.*, Anal. Chem. **49**, 83A (1977).
144. *Fahmy A. P., Niederwieser A., Pataki G., Brenner M.*, Helv. Chim. Acta **44**, 2022 (1961).
145. *Nakamura H., Pisano J. J.*, J. Chromatogr. **121**, 33 (1976).
146. *Rybak M., Brada Z., Hais J. M.*, Säulenchromatographie an Celluloseaustauschern, VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1966.
147. *Determann H., Lampert K.*, Methodicum Chemicum, Bd 1/1, 134, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
148. *Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.*, Anal. Chem. **30**, 1190 (1958).
149. *Bayer E. et al.*, Anal. Chem. **48**, 1106 (1976).
150. *Zech K., Voelter W.*, Chromatographia **8**, 350 (1975); J. Chromatogr. **112**, 643 (1975).
151. *Husek P., Macek K.*, J. Chromatogr. **113**, 139 (1975).
152. *Marek V.*, Chem. Listy, **68**, 250 (1974).
153. *Kaiser R., Prox A.*, in: Analytische Methoden zur Untersuchung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, S. 267, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M., 1968.
154. *Kolb B.*, in: Methodicum Chemicum, Bd. 1/2, 1059, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
155. *Röder W., Wölm G.*, Grundlagen der Gaschromatographie, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1976.
156. *Schomburg G.*, Gaschromatographie, Taschentext 48, Verlag Chemie, Weinheim-New York, 1976.
157. *Lawless J. G., Peterson E.*, Orig. Life **6**, 3 (1975).
158. *Frick W., Chang D., Folkers K., Daves G. D.*, Anal. Chem. **49**, 1241 (1977).

159. Adams R. F., J. Chromatogr. **95**, 189 (1974).
160. Cliffe A. J., Berridge N. J., Westgarth D. R., J. Chromatogr. **78**, 333 (1973).
161. Gehrke C. W., Takeda H., J. Chromatogr. **76**, 63 (1973).
162. Hasegawa M., Matsubara I., Anal. Biochem. **63**, 308 (1975).
163. Moss C. W., Lambert M. A., Diaz F. J., J. Chromatogr. **60**, 134 (1971).
164. Zanetta J. P., Vincendon G., J. Chromatogr. **76**, 91 (1973).
165. Gehrke C. W., Leimer K., J. Chromatogr. **57**, 219 (1971).
166. Ikekawa N., Hoshino O., Watanuki R., Anal. Biochem. **17**, 16 (1966).
167. Eyem J., Sjöquist J., Anal. Biochem. **52**, 255 (1973).
168. Lamkin W. M., Jones N. S., Pan T., Ward D. N., Anal. Biochem. **58**, 549 (1974).
169. Weygand F., Z. Anal. Chem. **205**, 406 (1964).
170. Davankov V. A., Rogozhin S. V., J. Chromatogr. **60**, 280 (1971).
171. Davankov V. A., Rogozhin S. V., Semchkin A. V., J. Chromatogr. **91**, 493 (1974).
172. Masters R. G., Leyden D. E., Anal. Chim. Acta **98**, 9 (1978).
173. Песлекас И., Рогожин С. В., Даванков В. А. — ЖОХ, 1974, **44**, с.468.
174. Ямсков И. А., Березин Б. Б., Тихонов В. Е., Бельчич Л. А., Даванков В. А. — Биоорг. химия **4**, 1170 (1978).
175. Davankov V. A., Zolotarev Yu. A., J. Chromatogr. **155**, 285 (1978).
176. König W. A., Nicholson G. J., Anal. Chem. **47**, 951 (1975).
177. König W. A., Chem. Ztg. **101**, 201 (1977).
178. König W. A., Rahn W., Eyem J., J. Chromatogr. **133**, 141 (1977).
179. Halpern B., Westley J., Chem. Commun. **12**, 246 (1965).
180. Feibush B., Gil-Av E., Tetrahedron **26**, 1361 (1970).
181. König W. A., Parr W., Lichtenstein H. A., Bayer E., Oro J., J. Chromatogr. Sci. **8**, 183 (1970).
182. Parr W., Howard P. J., Angew. Chem. **84**, 586 (1972); Anal. Chem. **45**, 716 (1973).
183. Stölting K., König W. A., Chromatographia **9**, 331 (1976).
184. Brazell R., Parr W., Andrawes F., Zlatkis A., Chromatographia **9**, 57 (1976).
185. Frank H., Nicholson G. J., Bayer E., Angew. Chem. **90**, 396 (1978).
186. Frank H., Nicholson G. J., Bayer E., J. Chromatogr. Sci. **15**, 174 (1977).
187. Heyns K., Grützmaier H. F., Massenspektrometrische Analyse von Aminosäuren und Peptiden, Fortschr. chem. Forschung **6**, 536 (1966).
188. Spitteler G., Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen, Verlag Chemie, Weinheim, 1966.
189. Fehlhaber H. W., in: Methodicum Chemicum, Bd. I/1, S. 496, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, 1973.
190. Schulten H. R., Wittmann-Liebold B., Anal. Biochem. **76**, 300 (1976).
191. Suzuki Tateo, Song Kyung-Duck, Hagaki Yasuhiro, Tuzimura Katura, Org. Mass. Spectrom. **11**, 557 (1976).
192. Foster G. L., J. Biol. Chem. **159**, 431 (1945).
193. Shemin D., J. Biol. Chem. **159**, 439 (1945).
194. Keston A. S., Udenfriend S., Cannan R. K., J. Amer. Chem. Soc. **71**, 249 (1949).
195. Rubin I. B., Goldstein G., Anal. Biochem. **33**, 244 (1970).
196. Brown J. P., Perham R. N., Eur. J. Biochem. **39**, 69 (1973).
197. Nanjo M., Guilbault G. G., Anal. Chim. Acta **73**, 367 (1974).
198. Tran-Minh C., Broun G., Anal. Chem. **47**, 1359 (1975).
199. Johansson G., Edström K., Ögren L., Anal. Chim. Acta **85**, 55 (1976).
200. Mascini M., Palleschi G., Anal. Chim. Acta **100**, 215 (1978).
201. Freeman H. C., Adv. Protein Chem. **22**, 258 (1967).
202. Garwargious Y. A., Besada A., Hassouna M. E. M., Mikrochim. Acta **1003** (1974).

203. *Beck W., Purucker B., Girth M., Schönenberger H., Seidenberger H., Ruckdeschel G.*, Z. Naturforsch. **31b**, 832 (1976).
204. *Ackermann E.*, Pharmazie **22**, 537 (1967).
205. *Jain J. C., Sharma I. K., Sahni M. K., Grupta K. C., Mathur N. K.*, Indian J. Chem. **B15**, 766 (1977).
206. *Brenner M., Huber W.*, Helv. Chim. Acta **36**, 1109 (1953).
207. *Wang S. S., Gisin B. F., Winter D. P., Makowske R., Kulesha I. D., Tzougraki C., Meienhofer J.*, J. Org. Chem. **42**, 1286 (1977).
208. *Stadler P. A.*, Helv. Chim. Acta **61**, 1675 (1978).
209. *Юодка Б., Лиоранчайте Л., Янушоните Л., Саснаускене С.* — Биоорг. хим., 1976, **2**, с.1513
210. *Швачкин Ю. П., Воскова Н. А., Коршунова Г. А.*, — ЖОХ, 1976, **46**, с.2634.