

СИНТЕЗ НА 6-ИЗОТИОЦИАНО-3-АРИЛМЕТИЛЕН-1(3Н)-ИЗОБЕНЗОФУРАНОНИ И НА ТИОХИДАНТОИНОВИ ПРОИЗВОДНИ НА ПРИРОДНИ L-АМИНОКИСЕЛИНИ

Недялко Софрониев

Минно-геоложки университет "Св. Иван Рилски", 1700 София

РЕЗЮМЕ. Установено е, че цветните 6-изотиоциано-3-арилметилден-1(3Н)-изобензофуранони могат да се използват за определяне на N-крайни аминокиселини. При взаимодействието им с природни аминокиселини се получават цветни тиохидантоинови производни, чийто интензивен цвят улеснява изолирането и хроматографското им идентифициране.

Ключови думи: 6-Нитро-1(3Н)-изобензофуранон (6-нитрофталид), 6-нитро- и 6-амино-3-арилметилден-1(3Н)-изобензофуранони (6-нитро- и 6-амино-3-заместени бензилиденфталиди), 6-изотиоциано-3-арилметилден-1(3Н)-изобензофуранони (6-изотиоциано-3-заместени бензилиденфталиди), природни L-аминокиселини, тиохидантоинови производни на природни L-аминокиселини.

SYNTHESIS OF 6-ISOTHIOCYANO-3-ARYLMETHYLENE-1(3H)-ISOBENZOFURANONES AND THIOHYDANTOIN DERIVATIVES OF NATURAL L-AMINO ACIDS

Nedyalko Sofroniev

University of Mining and Geology "St. Ivan Rilski", 1700 Sofia

ABSTRACT. It is established that coloured 6-isothiocyano-3-arylmethylene-1(3H)-isobenzofuranones can be used by identification of N-ended amino acids. Thiohydantoin derivatives are obtained by their interaction with natural amino acids. The intensive colour facilitates their isolation and chromatography identification.

Key words: 6-Nitro-1(3H)-isobenzofuranone (6-nitrophthalide), 6-nitro- and 6-amino-3-arylmethylene-1(3H)-isobenzofuranones (6-nitro- and 6-amino-3-substituted benzylidene-phthalides), 6-isothiocyano-3-arylmethylene-1(3H)-isobenzofuranones (6-isothiocyano-3-substituted benzylidene-phthalides), natural L-amino acids, thiohydantoin derivatives of natural L-amino acids.

Въведение

Много пептиди намират широко приложение като лекарствени препарати с разнообразно физиологично действие. Ето защо въпросът за изолирането и охарактеризирането на пептидите е твърде актуален. Степенното разграждане от N-края на пептидната верига се осъществява с помощта на химични, ензимни и физични методи (Якубке и Ешкайт, 1985). Най-важният химически метод за степенно разграждане на пептиди и определяне на аминокиселинната им последователност е тиохидантоиновият метод на Edman. Като реагент се използва фенилизотиоцианат (реагент на Edman), който при взаимодействие с пептиди води до отцепването на N-крайна аминокиселина, като се получава цветно фенилтиохидантоиново производно на N-крайната аминокиселина (Edman, 1949; Edman, 1950; Edman and Lauber, 1956; Edman, 1970). Идентификацията на фенилтиохидантоиновите аминокиселини се осъществява чрез хартиена, тънкослойна и газова хроматография, а също така и чрез високоефективна течна хроматография (Downing and Mann, 1976; Zeeuws and Strosberg, 1978). Намаленият с една аминокиселина пептид се изолира и подготвя за следващия цикъл на разграждане по метода на Edman. Методът на Edman и до днес намира широко

приложение, като се търсят възможности за повишаване на неговата чувствителност и разширяване на обсега му. Известни са различни модификации на реактива на Edman (Levy and Chung, 1955; Frankel Conrat et al, 1955; Ramachandran et al, 1955; Sjoquist, 1957; Drobnica and Augustin, 1965; Krisitan and Drobnica, 1966; Ivanov et al, 1967; Van Rymentant, 1970). Освен фенилтиохидантоинови производни на аминокиселините, в литературата са описани и метилтиохидантоинови производни на различни аминокиселини (Кривцов и Степанов, 1965; Степанов и Кривцов, 1965).

Целта на настоящата работа е намирането на нови цветни реагенти, осигуряващи по-голяма чувствителност на метода на Edman при определяне на N-крайна аминокиселина в пептидна верига. За получаването на такива реагенти използвахме производни на 6-нитро-3-арилметилден-1(3Н)-изобензофураноните. В литературата са описани различни методи за получаване на 3-арилметилден-1(3Н)-изобензофуранони (Leopold, 1901; Barry and Zimmer, 1962; Hrnčiar and Yoniak, 1966; Hrnčiar and Kuruc, 1967; Awad et al, 1968; Hrnčiar et al, 1968; Hrnčiar and Ulehla, 1969; Krasnec and Hrnčiar, 1971; Minchev et al, 1986). 3-Арилметилден-1(3Н)-изобензофураноните

съдържат система от спрегнати двойни връзки (хромофорни групи), поради което са цветни съединения, които флуоресцират. Това дава възможност тези съединения да бъдат използвани като изходни

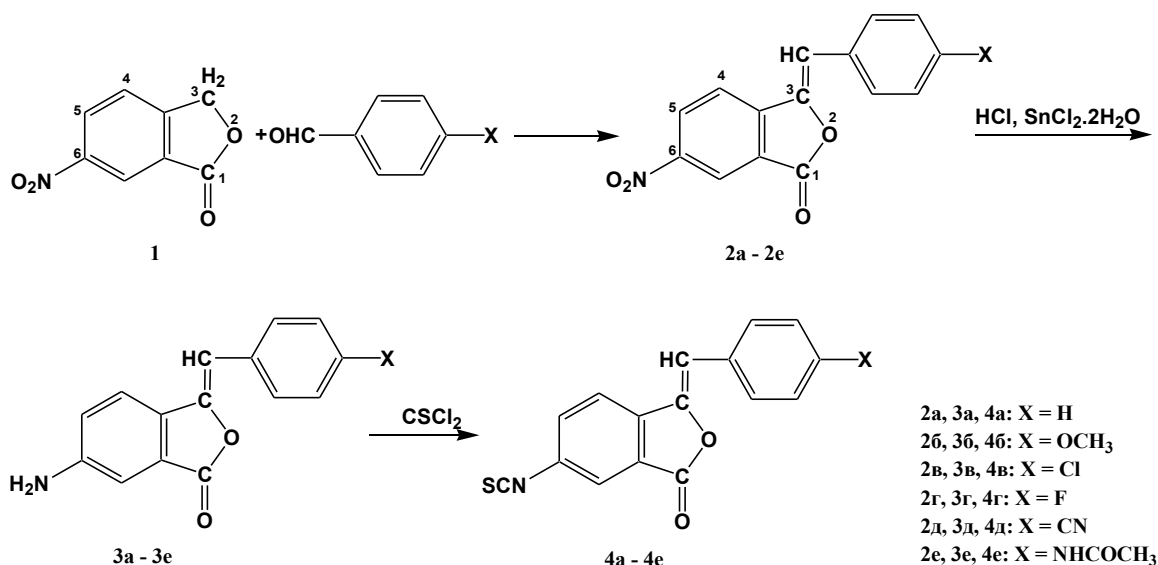
съединения за получаване на 6-изотиоциано-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофуранони, които могат да се прилагат по метода на Edman за определяне на N-крайни аминокиселини в пептидната верига.

Обсъждане

Получаването на 6-нитро-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофураноните (**2a** - **2e**) осъществихме при кондензацията на 6-нитро-1(3Н)-изобензофуранон (**1**) с р-заместени ароматни алдехиди по Barry and Zimmer (1962). Температурите на топене и данните от елементния анализ на съединенията **2a** - **2e** съвпадат добре с данните за същите съединения описани в литературата (Barry and Zimmer, 1962; Hrnčiar et al, 1968; Minchev et al, 1986). 6-Нитро-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофураноните (**2a** - **2e**) са цветни кристални съединения, които флуоресцират. Съединения **2a** и **2b** дават в ацетонов разтвор жълта флуоресценция, докато при останалите **2b**, **2g** - **2e** се наблюдава синьозелена флуоресценция. В инфрачервените спектри на съединенията **2a** - **2e** са налице ивици на поглъщане за нитрогрупа при 1330 cm^{-1} и 1500 cm^{-1} , ивици на поглъщане за $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$ при 980 cm^{-1} , за $\text{C}=\text{C}$ връзка при 1620 cm^{-1} и ароматна $\text{C}=\text{C}$ връзка при 1550 cm^{-1} , както и за карбонилна група при 1780 cm^{-1} .

Редукцията на 6-нитро-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофураноните (**2a** - **2e**) осъществихме по метода на

Hrnčiar et al (1968). Получават се различно оцветени 6-амино-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофуранони (**3a** - **3e**), които са кристални вещества - **3a** - **3b** и **3d** са жълтооцветени, **3g** - светлокафяво, **3e** - оранжево. Те флуоресцират в ацетонов разтвор по-силно в сравнение със съответните нитропроизводни **2a** - **2e**. Температурите на топене и данните от елементния анализ на 6-амино-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофураноните (**3a** - **3e**) съвпадат с тези на описаните в литературата аминокиселини (Awad et al, 1968; Hrnčiar et al, 1968; Minchev et al, 1986). При условията на провеждане на реакцията се редуцира само нитрогрупата, без да протича редукция на $\text{C}=\text{C}$ връзката. В инфрачервените спектри на съединенията **3a** - **3e** се запазват ивиците на поглъщане за $\text{C}=\text{C}$ връзката при 1620 cm^{-1} , изчезват тези за нитрогрупа при 1330 cm^{-1} и 1500 cm^{-1} , а се появяват ивици на поглъщане за аминогрупа при 3320 cm^{-1} и 3450 cm^{-1} . Запазват се ивиците за поглъщане на карбонилна група при 1780 cm^{-1} , за $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$ при 980 cm^{-1} , за $\text{C}=\text{C}$ връзка при 1620 cm^{-1} и за ароматна $\text{C}=\text{C}$ връзка при 1550 cm^{-1} .



6-Изотиоциано-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофураноните (**4a** - **4e**) получихме с високи добиви по аналогия с тиофосгеновия метод на Edman (1970). От получените изотиоцианатни производни **4a** - **4e** с по-углъбен жълт цвят е съединението **4b**, а също така **4a** и **4c**, което е предпоставка за по-голяма чувствителност ако тези съединения се използват за получаването на реагенти за доказване на N-крайни аминокиселини. В инфрачервените спектри на съединенията **4a** - **4e** изчезва ивицата на поглъщане за свободна аминогрупа при 3320 cm^{-1} и 3450 cm^{-1} , а се появява ивица на поглъщане за изотиоцианатна група (NCS) при 2100 cm^{-1} , като се запазват ивиците на поглъщане за $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$ при 980 cm^{-1} , за $\text{C}=\text{O}$ при 1780 cm^{-1} ,

за $\text{C}=\text{C}$ връзка при 1620 cm^{-1} и за ароматна $\text{C}=\text{C}$ връзка при 1550 cm^{-1} . Съединенията **4a** - **4e** показват в ацетонов разтвор флуоресценция, която се определя в зависимост от вида на заместителя X на р-място във фениловия остатък. При съединение **4a** се наблюдава бледолилава флуоресценция, при **4b** - синя и **4c** - лилава флуоресценция, а при останалите **4d** - **4e** - светлосиня флуоресценция. Това прави възможно използването им като цветни реагенти за определяне на N-крайни аминокиселини в пептидни вериги. При взаимодействието на 6-изотиоциано-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофуранона (**4a**) и 6-изотиоциано-3-(4-метоксифенил)метилен-1(3Н)-изобензофуранона (**4b**) с

природни аминокиселини, се получават цветни тиохидантоинови производни на природните аминокиселини (**6a** - **6g**), чийто интензивен жълт цвят улеснява изолирането им и хроматографското им идентифициране. Получаването на тиохидантоиновите производни с природните аминокиселини L-аланин и L-фенилаланин протича по-схемата на Edman (1970) на два етапа. Първият етап на взаимодействие на **4a** и **4b** с L-аланин и L-фенилаланин е присъединителна реакция,

протичаща в слабо алкална среда, като след подкисляване с 1N HCl се стига до образуване на съответните междинни производни **5a** - **5g**. При тези условия 6-изотиоциано-3-арилметил-1(3H)-изобензофураноните (**4a**) и (**4b**) не изомеризират до съответните 2-арил-1H-инден-1,3(2H)-диони (2-арил-1,3-индандиони). Това може да стане в присъствие на по-силна база, каквато е натриевият метилат, като аналогични реакции са описани в литературата (Hrnčiar et al, 1968).

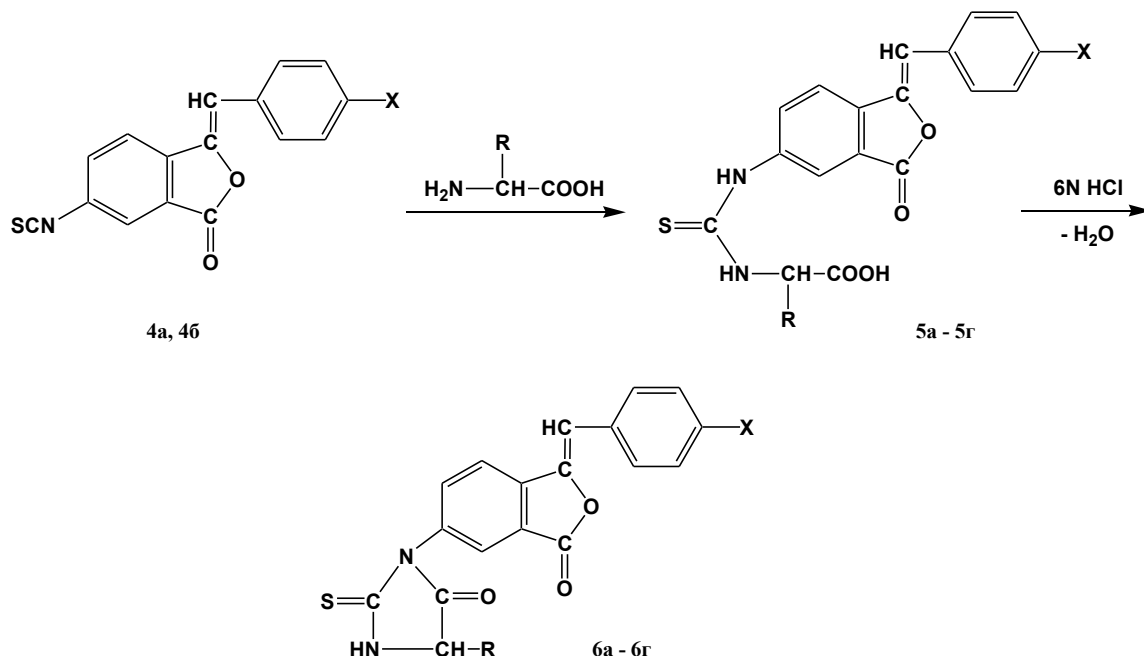


Таблица 1

№	Т.т., °C	Добив %	Анализ N,%		Анализ S,%		R _f	
			изч.	нам.	изч.	нам.		
4a	203 - 205	93	5,01	4,45	11,48	11,32	0,78 ^A	0,88 ^B
4b	232 - 233	95	4,53	4,24	10,36	10,15	0,73 ^A	0,84 ^B
4в	227 - 229	97	4,46	4,40	10,22	9,97	0,75 ^A	0,86 ^B
4г	242 - 243	80	4,71	4,60	10,78	10,60	0,43 ^A	0,71 ^B
4д	201 - 204	74	9,20	9,11	10,54	10,71	0,36 ^A	0,77 ^B
4e	228 - 230	79	8,33	8,15	9,53	9,36	0,23 ^A	0,81 ^B
6a	195 - 196	53	7,99	8,12	9,15	9,00	0,51 ^B	0,84 ^B
6б	226 - 228	50	7,36	7,43	8,43	8,54	0,48 ^B	0,83 ^B
6в	204 - 206	49	6,57	6,37	7,52	7,66	0,49 ^B	0,83 ^B
6г	217 - 218	52	6,14	5,98	7,02	7,14	0,47 ^B	0,82 ^B

Таблица 2

№	X	R	Абсорбция λ [nm]	Флуоресценция λ max [nm] Qf
6a	H	CH ₃	380	480 0,304
6б	OCH ₃	CH ₃	380	478 0,273
6в	H	CH ₂ C ₆ H ₅	385	477 0,358
6г	OCH ₃	CH ₂ C ₆ H ₅	388	478 0,285

В инфрачервените спектри на междинните съединения **5a** - **5g** изчезва ивицата на поглъщане за изотиоцианатна група (NCS) при 2100 cm⁻¹, а се появяват ивици на поглъщане за C=S при 1100-1200 cm⁻¹ и за вторични NH групи при 3300 cm⁻¹ и 3420 cm⁻¹. Налице са също ивици на поглъщане за

C=O от карбоксилна група при 1700 cm⁻¹ и за хидроксилна група при 2900 - 3000 cm⁻¹, които липсват в инфрачервените спектри на съединенията **4a** - **4e**. Вторият етап на реакцията се заключава в директно превръщане в кисела среда на съединенията **5a** - **5g** в съответните

тиохидантоинови производни (**6a** - **6g**), които се получават под формата на жълти кристали. Новосинтезираните тиохидантоинови производни (**6a** - **6g**) охарактеризирахме с помощта на инфрачервени, абсорбционни и флуоресцентни спектри. В инфрачервените спектри на съединенията **6a** - **6g** изчезват ивиците на поглъщане за C=O от карбоксилната група при 1700 cm^{-1} и за свободна хидроксилна група при 2900 – 3000 cm^{-1} , а се появява ивица на поглъщане за amidна карбонилна група при 1720 cm^{-1} . Налице е ивица на поглъщане за C=S при 1100 – 1200 cm^{-1} , както и тази за вторична NH при 3300 cm^{-1} , а изчезва ивицата на поглъщане за другата вторична NH група при 3420 cm^{-1} . Данните от абсорбционните и флуоресцентните спектри за съединения **6a** - **6g**, снети в етанол, са посочени в таблица 2. Флуоресцентния квантов добив Q_f е измерен по стандартна методика по Паркер (1972). От определените квантови добиви най-висок квантов добив се наблюдава при **6в** и **6а** в сравнение с квантовите добиви на **6б** и **6г**. Това, че съединенията **6а** и **6в** имат най-висок квантов добив показва, че те могат успешно да се използват като стандарти при определяне на N-крайни аминокиселини в пептидна верига по метода на Edman.

Материали и методи

Температурите на топене са определяни в открита капилара без корекция. Инфрачервените спектри са снети в нуйол на спектрофотометър IR 10, Carl Zeiss. Абсорбционите и флуоресцентните спектри са снети на Specord 40, Carl Zeiss. Органичните разтворители са изпарявани при остатъчно налягане 14 mm живачен стълб. Новосинтезираните съединения охарактеризирахме чрез елементен анализ, а чистотата на новополучените съединения контролирахме чрез тънкослойна хроматография на DC-Alufolien plates Kieselgel 60 F₂₅₄, 0,2 mm. Използвани са следните хроматографски системи: А, етилацетат – петролев етер (1:2); Б, хлороформ – метанол (98:2); В, хлороформ-метанол – л. оцетна киселина (80:20:2).

Исходните съединения синтезирахме по методи описани в литературата. 6-Нитро-1(3Н)-изобензофуранон (**1**) получихме по Borsche et al (1934), 6-нитро-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофураноните (**2a**) и (**2б**) по Barry and Zimmer (1962), (**2в**) по Hrnčiar et al (1968), (**2г** - **2е**) по Minchev et al (1986), 6-амино-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофураноните (**3a**) и (**3в**) по Hrnčiar et al (1968), (**3б**) по Awad et al (1968), (**3г** - **3е**) по Minchev et al (1986).

Резултати

1. Получаване на 6-нитро-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофуранони (**2a** - **2e**)

0,02 мол (3,58 г) 6-нитро-1(3Н)-изобензофуранон (**1**) и три капки пиридин се загряват при 190-200°C с 0,02 мол от съответния р-заместен бензалдехид. Получената стопилка се загрява с етанол до кипене за отстраняване на нереагиралия 6-нитро-1(3Н)-изобензофуранон. След филтруване, твърдият остатък се прекристализира из л. оцетна киселина. Получават се жълтооцветените

кристални вещества **2a** - **2e**, които по своите характеристики отговарят на описаните в литературата съединения (Barry and Zimmer, 1962; Hrnčiar et al, 1968; Minchev et al, 1986).

2. Получаване на 6-амино-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофуранони (**3a** - **3e**)

В 250 мл двугърлена облодънна колба, снабдена с магнитна бъркалка, обратен хладник и тръба за продухване на сух хлороводород, се поставят 15 г $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 120 мл л. оцетна киселина. Получената смес се нагрива на водна баня при 60°C при разбъркване до разтварянето на $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. След това се прибавят 0,02 мол от съответния 6-нитро-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофуранон (**2a** - **2e**) и в продължение на 3,5 часа в реакционната смес се продухва сух хлороводород, при разбъркване при 60°C на водна баня. След охлаждане на реакционната смес се образува утайка, която се филтрува и промива с вода. Свободният амин се получава от амониевата сол чрез третиране с воден разтвор на амоняк и последващо промиване с вода. Получените 6-амино-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофуранони (**3a** - **3e**) се прекристализират из диметилформамид, като **3a** - **3в** и **3д** са жълтооцветени, **3г** – светлокафяви и **3е** - оранжеви иглести кристали, които по своите характеристики отговарят на описаните в литературата съединения (Hrnčiar et al, 1968 ; Awad et al, 1968; Minchev et al, 1986).

3. Получаване на 6-изотиоциано-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофуранони (**4a** - **4e**)

В облодънна колба се поставят 30 мл вода, 2 г (1,32 мл) тиофосген и 20 мл хлороформ. Получената смес се разбърква с магнитна бъркалка при 0°C. Към сместа се прибавя на порции суспензия приготвена от 0,01 мол от съответния 6-амино-3-арилметилен-1(3Н)-изобензофуранон (**3a** - **3e**) и 70 мл хлороформ в продължение на 1 час при непрекъснато разбъркване. Разбърква се още 15 мин при 0°C и след това още 2 часа при 20°C. Получените два слоя се разделят с делителна фуния. Водният слой се екстрахира два – три пъти с хлороформ. Хлороформените извлеци се обединяват и се сушат над безводен CaCl_2 , филтрува се CaCl_2 и полученият филтрат се изпарява до сухо под вакуум. Жълтият твърд остатък се прекристализира из етилацетат, като се получават жълтооцветените кристални съединения **4a** - **4e**. Данните за новополучените съединения са посочени в таблица 1.

4. Получаване на тиохидантоинови производни на L-аминокиселините (**6a** - **6g**)

0,001 мол (0,089 г) L-аланин или 0,001 мол (0,165 г) L-фенилаланин се прибавят към 6 мл пиридин-вода (1:1). Получената суспензия се обработва с 50 мл 1N NaOH до pH 9, при което съответната аминокиселина се разтваря. Разтворът се нагрива на водна баня при 40°C при разбъркване с магнитна бъркалка. Прибавят се бавно и на капки 8 мл пиридинов разтвор на 0,0011 мол (0,307 г) 6-изотиоциано-3-фенилметилен-1(3Н)-изобензофуранон (**4a**) или 0,0011 мол (0,314 г) 6-изотиоциано-3-(4-метоксифенил)метилен-1(3Н)-изобензофуранон (**4б**). Чрез прибавяне на 1N NaOH се поддържа pH 9 на реакционната смес при непрекъснато разбъркване. След 1 час разтворът се разрежда с 8 мл вода. Неколкократно се екстрахира с

бензол за отстраняване на пиридина и на нереагиралите изходни съединения. При подкисляване с 1N HCl се отделя утайка, която се екстрахира с етилацетат и след измиване с вода етилацетатният слой се суши с безводен Na₂SO₄ и накрая разтворителят се изпарява под вакуум до сухо. Остава жълт твърд остатък от междинните съединения **5a - 5г**, който се суши в ексикатор. Остатъкът **5a - 5г** се разтваря в 5 мл л. оцетна киселина, след което се прибавя

1 мл 6N HCl на капки и при разбъркване. Сместа се нагрява 6 часа на водна баня при 60°C и при разбъркване. След охлаждане тиохидантоиновите производни (**6a - 6г**) кристализират под формата на бледожълти кристали. Данните за новополучените съединения са посочени в Таблица 1.

Литература

Awad, W., A. Islam, S. El - Shafei. 1968. *J. Chem. UAR*, 11(1), 57.
Barry, R., H. Zimmer. 1962. *J. Org. Chem.*, 27, 3710.
Borsche, W., K. Diakont, H. Hanau. 1934. *Chem. Ber.*, 67B, 675.
Drobnica, L., Y. Augustin. 1965. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 30, 1221.
Downing, M., K. Mann. 1976. *Anal. Biochem.*, 74, 298.
Edman, P. 1949. *Arch. Biochem. Biophys.*, 22, 475.
Edman, P. 1950. *Acta. Chem. Scand.*, 4, 277.
Edman, P., K. Lauber. 1956. *Acta. Chem. Scand.*, 10, 466.
Edman, P. 1970. *Mol. Biol. Biochem. Biophys.*, 8, 211.
Frankel Conrat, H., Y. Harries, A. Levy. 1955. *Methods in Biochem. Anal.*, 2, 383.
Hrnčiar, P., D. Yoniak. 1966. *Chem. Zvesti*, 20, 336.
Hrnčiar, P., E. Kuruc. 1967. *Chem. Zvesti*, 21, 267.
Hrnčiar, P., M. Hrnčiarova, V. Kovalčik. 1968. *Cheskosl. Farm.*, 17 (3), 118.
Hrnčiar, P., Y. Ulehla. 1969. *Chem. Zvesti*, 23, 53.

Ivanov, Ch., I. Mancheva, S. Gaitandgiev. 1967. *Compt. rend Acad. bulg. Sci.*, 20, 87.
Krasnec, L., P. Hrnčiar. 1971. *Chem. Zvesti*, 25, 359.
Kristian, P., L. Drobnica. 1966. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, 31, 1333.
Leopold, E. 1901. *Chem. Ber.*, 34, 2836.
Levy, A., D. Chung. 1955. *Biochim. Biophys. Acta*, 17, 454.
Minchev, S., N. Sofroniev, A. Lyapova. 1986. *Compt. rend. Acad. bulg. Sci.*, 39 (2), 57.
Ramachandran, Y., A. Epp, W. Connell. 1955. *Anal. Chem.*, 27, 1734.
Sjoquist, Y. 1957. *Arkiv Kemi*, 11, 129.
Van Rymentant, M. 1970. *Bull. Soc. Chem. Biolog.*, 52, 905.
Zeeuws, R., A. Strosberg. 1978. *FEBS Letters*, 85, 68.
Кривцов, Б., В. Степанов. 1965. *ЖОХ*, 35, 556.
Степанов, В., Б. Кривцов. 1965. *ЖОХ*, 35, 982.
Паркер, С. 1972. "Фотолюминисценция растворов", Мир, Москва.
Якубке, Х., Х. Ешкайт. 1985. "Аминокислоты, пептиды, белки", Мир, Москва, стр. 369.

Препоръчана за публикуване от
Катедра "Химия", МТФ