

Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета

Кафедра химии природных соединений

Направление Химия

Выпускная квалификационная работа

Синтез α -кето- δ -(N^G, N^G -диметилгуанидино) валериановой
кислоты – регулятора активности NO-синтетазы

Работу выполнил:

студент 4 курса

Марченко Сергей Алексеевич

Научный руководитель:

к. х. н., старший преподаватель

Глуздилов Иван Александрович

Заведующий кафедрой ХПС:

д. х. н., профессор

Трифонов Ростислав Евгеньевич

Санкт-Петербург

2016

Оглавление

1. Перечень условных обозначений	3
2. Введение	4
3. Литературный обзор.....	5
4. Обсуждение результатов	11
5. Экспериментальная часть	22
6. Выводы	27
7. Благодарности	28
8. Список цитированной литературы	29
9. Приложения	30

Перечень условных обозначений

DMVG - α -кето- δ -(N^G,N^G-диметилгуанидино) валериановая кислота

ADMA – асимметричный диметиларгинин – N^G, N^G-диметил –L-аргинин

AGXT2 - аланин-глиоксилат аминотрансфераза 2

Arg - аргинин - 2-амино-5-гуанидинпентановая кислота

Orn – орнитин –2, 5-диаминовалериановая кислота

Z-Cl – карбобензоксихлорид

трилон Б – динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты

Woc₂O – ди-трет-бутил-пирокарбонат

DMAP – 4-диметиламинопиридин

TFA – трифторуксусная кислота

TFAA - ангидрид трифторуксусной кислоты

Sc(OTf)₃ - трифторметансульфонат скандия

EDCI - 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид

HOBT – 1-гидроксибензотриазол

Введение

В последние годы отмечается повышенный интерес в отношении асимметричного диметиларгинина (ADMA) и α -кето- δ -(N^G,N^G-диметилгуанидино) валериановой кислоты (DMVG), как фактора риска развития сердечно-сосудистых заболеваний. Являясь структурным аналогом L-аргинина, ADMA ингибирует активность всех изоформ синтазы оксида азота, вызывая нарушение механизмов образования оксида азота в плазме крови и в тканях. В 1992 году было впервые показано, что увеличение концентрации ADMA приводит к значительному снижению выработки оксида азота. Известно, что NO играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса. В недавних работах была установлена строгая корреляция между уровнем ADMA в плазме и частотой развития сердечно-сосудистых заболеваний, таких как артериальная гипертензия, сахарный диабет, атеросклероз и других. [1] Также был найден путь трансаминирования ADMA в DMVG с помощью фермента аланин-глиоксилатаминотрансферазы 2 (AGXT2). Сверхэкспрессия AGXT2 была исследована на клеточных культурах и на мышцах. В итоге была доказана зависимость концентрации ADMA и концентрации NO. А значит, переход от ADMA к DMVG также может быть связан с NO-гомеостазом в условиях регуляции AGXT2. [2]

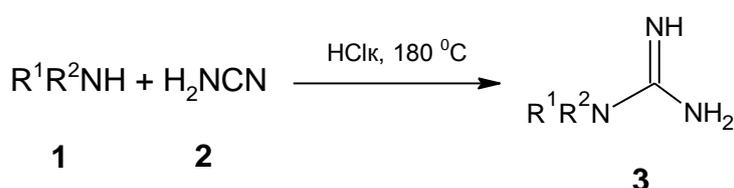
В настоящее время, в доступной нам литературе препаративный синтез DMVG не описан. В тоже время, при проведении биохимических исследований нарушения синтеза оксида азота, требуется наличие синтетических образцов в качестве стандартов сравнения. Целью данной работы является разработка препаративного метода синтеза DMVG.

На данный момент DMVG получают только ферментативным способом в небольших количествах, поэтому разработка эффективной схемы синтеза препаративным способом DMVG является актуальной проблемой.

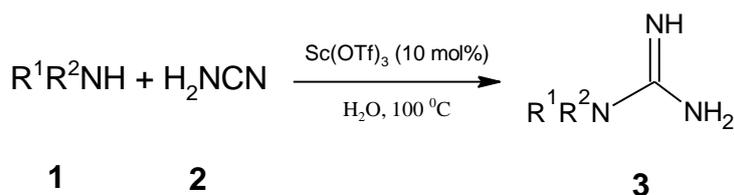
Литературный обзор

Для разработки схемы синтеза ADMA, как одного из производных аргининов, были проанализированы различные известные способы получения замещенных аргининов. Так как самым проблемным фрагментом ADMA является гуанидиновая группа. Поэтому было рассмотрено несколько существующих схем синтеза гуанилирования, синтеза замещенных аргининов в поисках оптимального варианта синтеза ADMA.

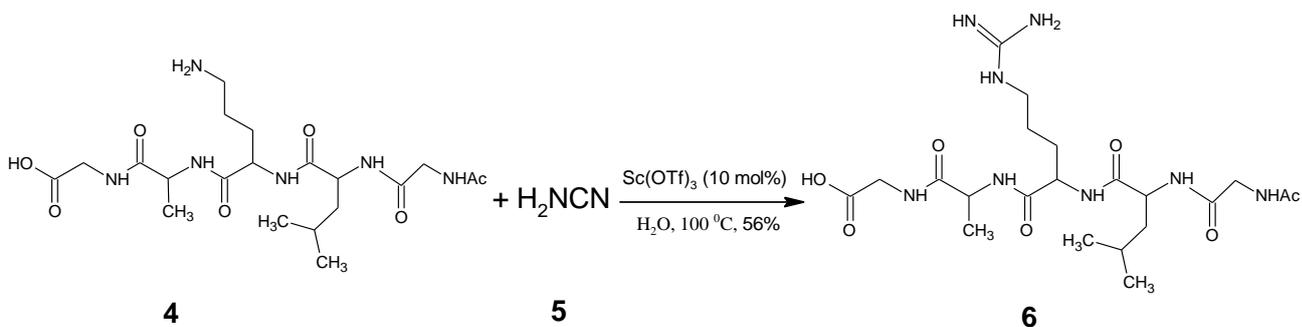
1. Получение гуанидиновой группы из цианоамидов и аминов:



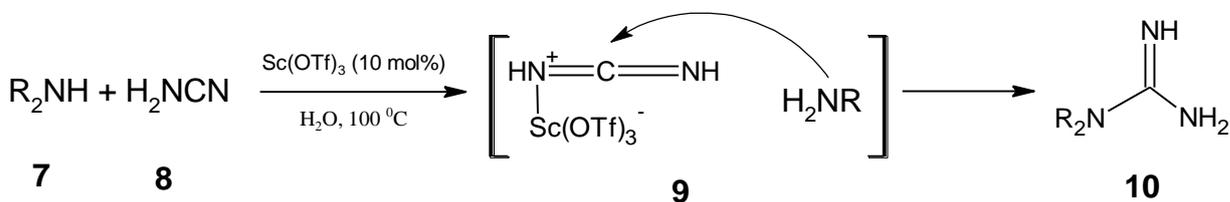
В классическом варианте эту реакцию проводят в жестких условиях, используя концентрированную соляную кислоту при 180 С. В таких условиях амины протонируются, и их нуклеофильность падает. Другой вариант использовать кислоты Льюиса в апротонных растворителях, например AlCl_3 в CH_2Cl_2 . К. Tsubokura и сотрудники оптимизировали этот метод. Они использовали в качестве катализатора водный раствор $\text{Sc}(\text{OTf})_3$ [3]:



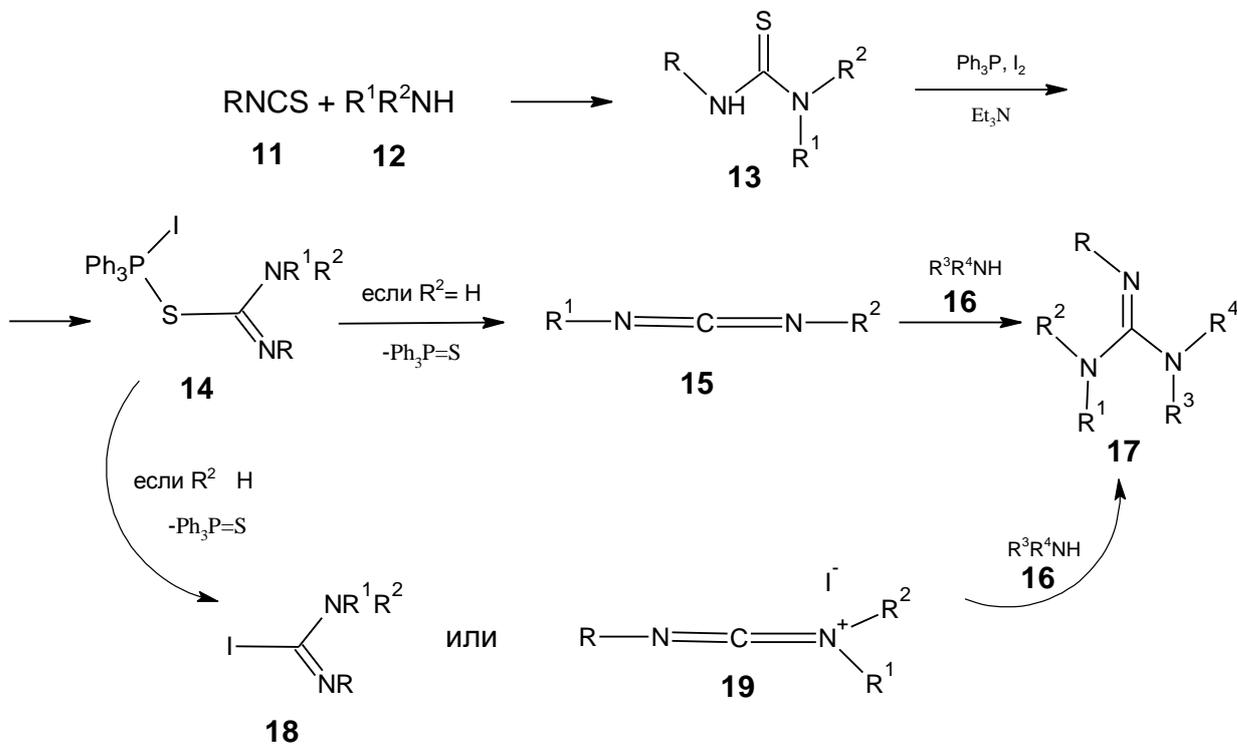
При использовании пептида (соединение **4**), содержащего орнитин, в качестве амина, можно получить пептид (соединение **6**), содержащий аргинин, с выход 56% и без рацемизации. [3]



Получение монозамещенных производных аргинина данным способом не изучено. Получение дизамещенных производных невозможно, так как интермедиантом реакции является активированный карбодиимид, а в последнем у атома азота не достаточно валентности для присоединения двух заместителей.



2. Получение производных гуанидина с помощью Ph_3P и I_2 :

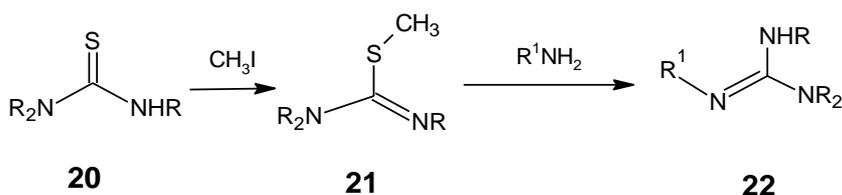


Замещенные гуанидины легко могут быть получены при взаимодействии арильного изотиоцианата с аминами с помощью системы $\text{Ph}_3\text{P} - \text{I}_2 / \text{Et}_3\text{N}$. C_2 -симметричные $\text{N},\text{N}',\text{N}''$ замещенные гуанидины (соединение **13**) были легко доступны с использованием арил изотиоцианат и амина в соотношении 1 : 2; в то время как при последовательном добавлении двух различных аминов в эквимольных соотношениях образовывались асимметричные производные (соединение **17**). Было обнаружено, что первичные и вторичные амины реагируют преимущественно с электронно-акцепторными арильными изотиоцианатами, быстро образуя гуанидиновый фрагмент с хорошими выходами в мягких условиях [4].

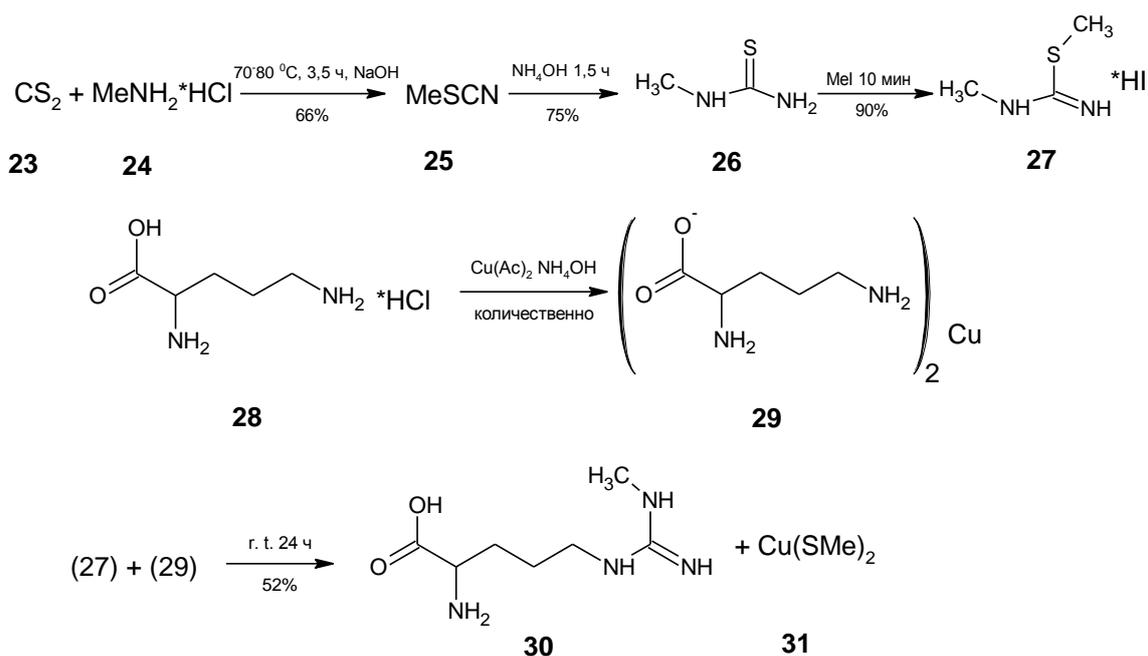
Реакции с защищенными аминокислотами в качестве исходного амина не описаны.

3. Использование производных тиомочевины и амина в синтезе монометиларгинина и диметиларгининов

Схема гуанилирования в общем виде:



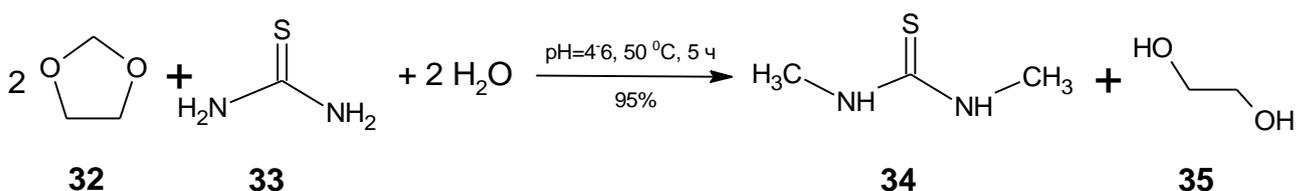
Хорошо описан способ получения монометиларгинина [5]:



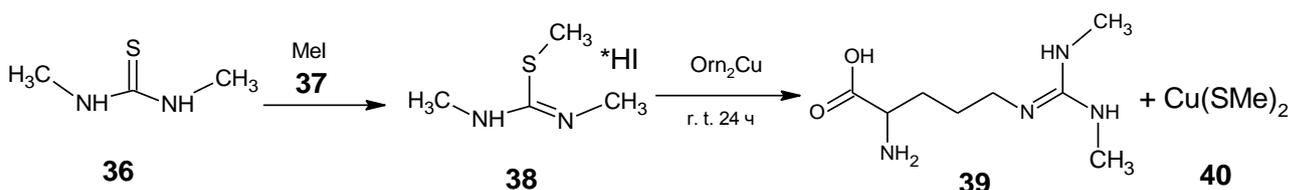
В этом способе используются доступные реагенты, всего 5 стадий, и получается хороший выход.

Принцип данных реакций, вероятно, можно использовать и для получения дизамещенных аргининов, предварительно синтезировав дизамещенную тиомочевину (соединения **34** и **43**), затем метилировать ее и провести реакцию с защищенным орнитином.

Д. Л. Рахманкуловым и сотрудниками разработана следующая реакция [6]:

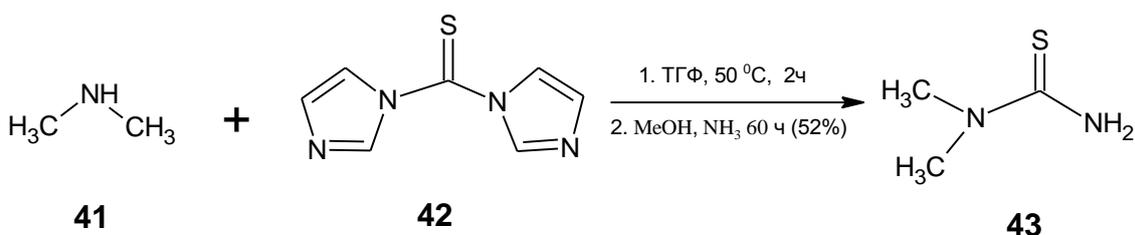


Логично предположить, что подобно способу получения монометиларгинина, возможно получить и симметричный диметиларгинин:

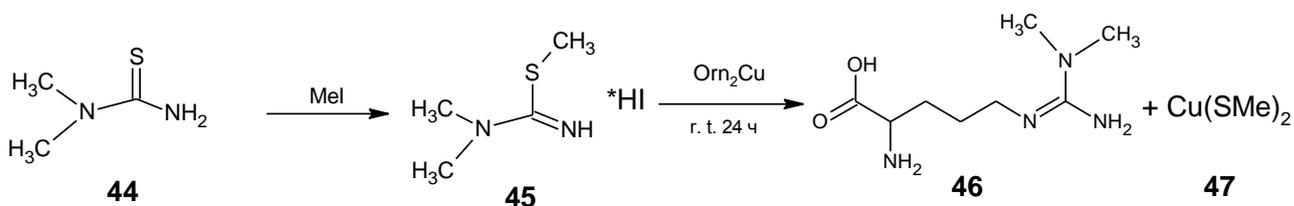


Поскольку целью данной работы является получение асимметричного диметиларгинина, были рассмотрены следующие реакции.

Вначале была получена 1,1-диметилтиомочевину разработанным ранее методом [7]:

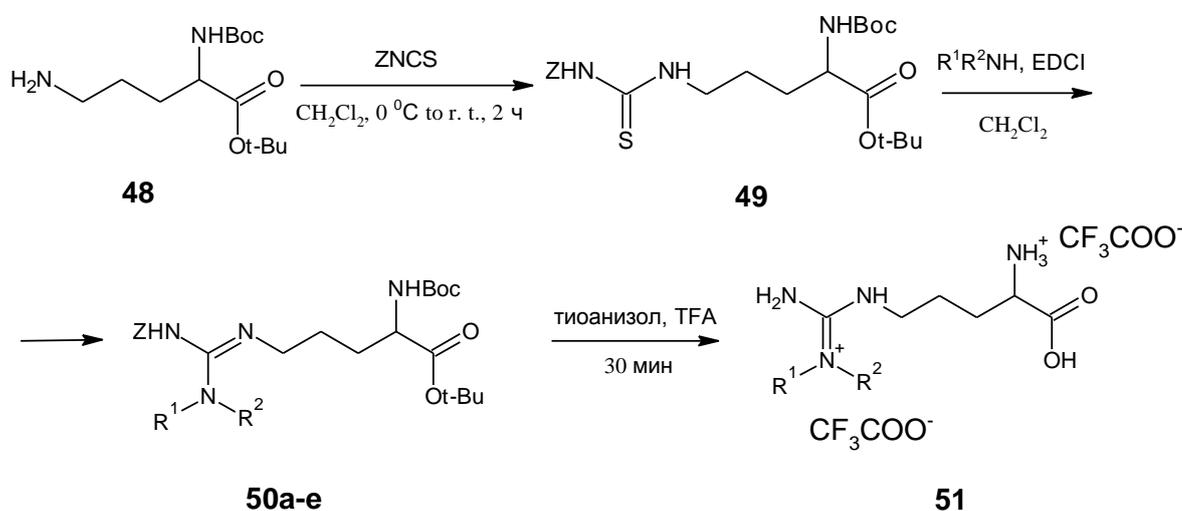


Затем была предположена возможность следующих реакций для получения ADMA:



Но защищенный орнитин не может прореагировать с тиоизоуруниевой солью теоретически ввиду выраженности щелочной среды, в которой практически не образуется интермедиат реакции – карбодиимид.

4. Использование тиоцитрулина и амина в синтезе замещенных аргининов:



D. Shade и сотрудники успешно применили эту стратегию для получения монозамещенных аргининов. [8] В качестве гуанилирующего реагента использовали защищенный тиоцитрулин. Для получения защищенных аргининов (соединения **50a-e**) использовали 1,5 эквивалента амина и 1,5 эквивалента EDCI в безводном CH_2Cl_2 для обеспечения конверсии по тиоцитрулину (соединение **49**). Деблокирование аргинина (соединения **50a-e**) проводили в мягких условиях с использованием смеси TFA и тиоанизола. Далее представлена таблица с выходами замещенного аргинина (соединения **50a-e**):

	R ¹	R ²	выход продукта (соединение 50), %
a		H	87
b		H	89
c		H	87
d		H	89
e		H	85

Таблица 1

Вывод

Получение дизамещенных производных аргинина из цианоамида и амина оказалось невозможным.

Использование реакций с Ph₃P и I₂ для получения дизамещенных аргининов не исключено, но недостаточно изучено.

Использование тиомочевины применимо для получения монометиларгинина и симметричного диметиларгинина, но не приемлемо для синтеза ADMA.

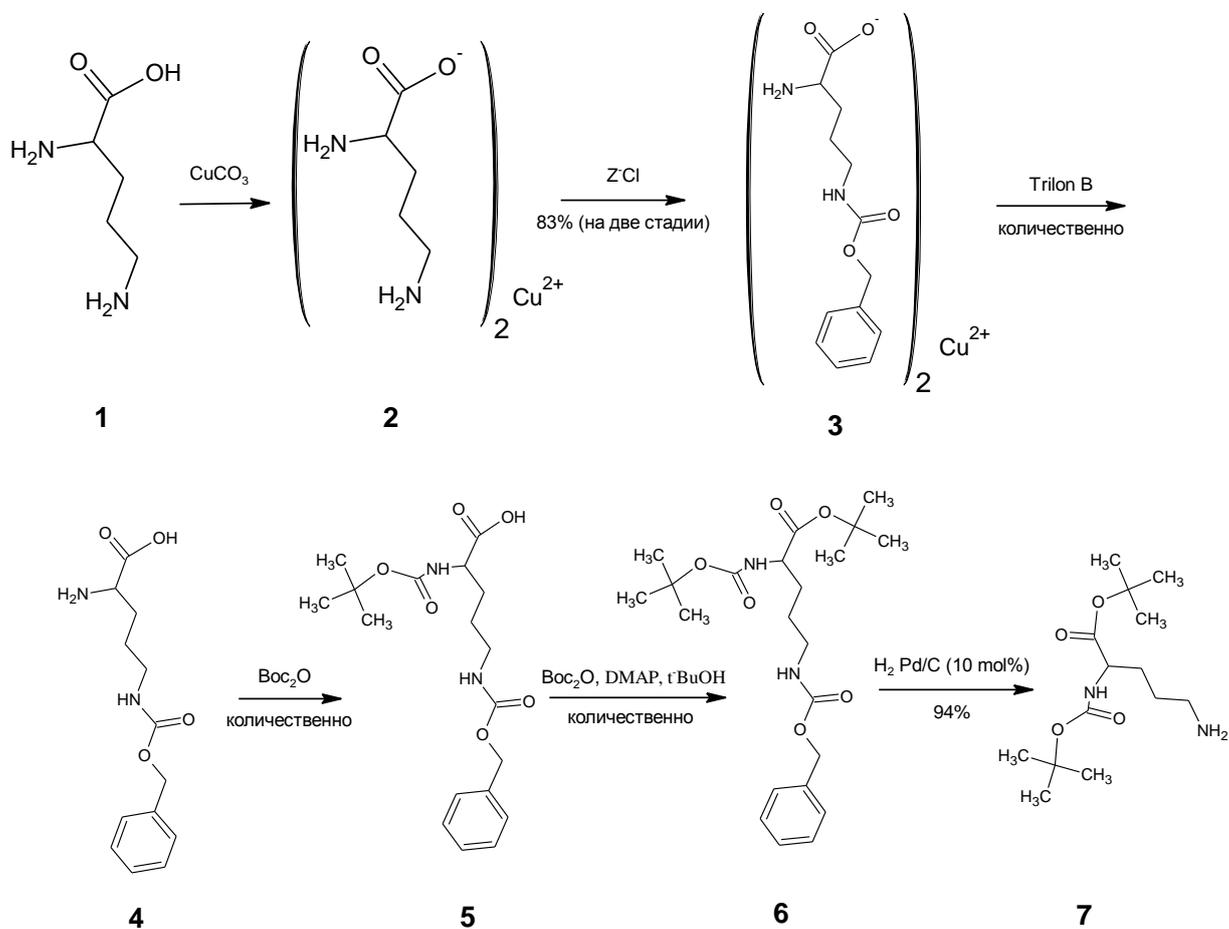
Реакция с тиоцитрулином представляются наиболее приемлемыми для получения нужного соединения. Исходя из этого, была разработана схема синтеза ADMA с использованием тиоцитрулина.

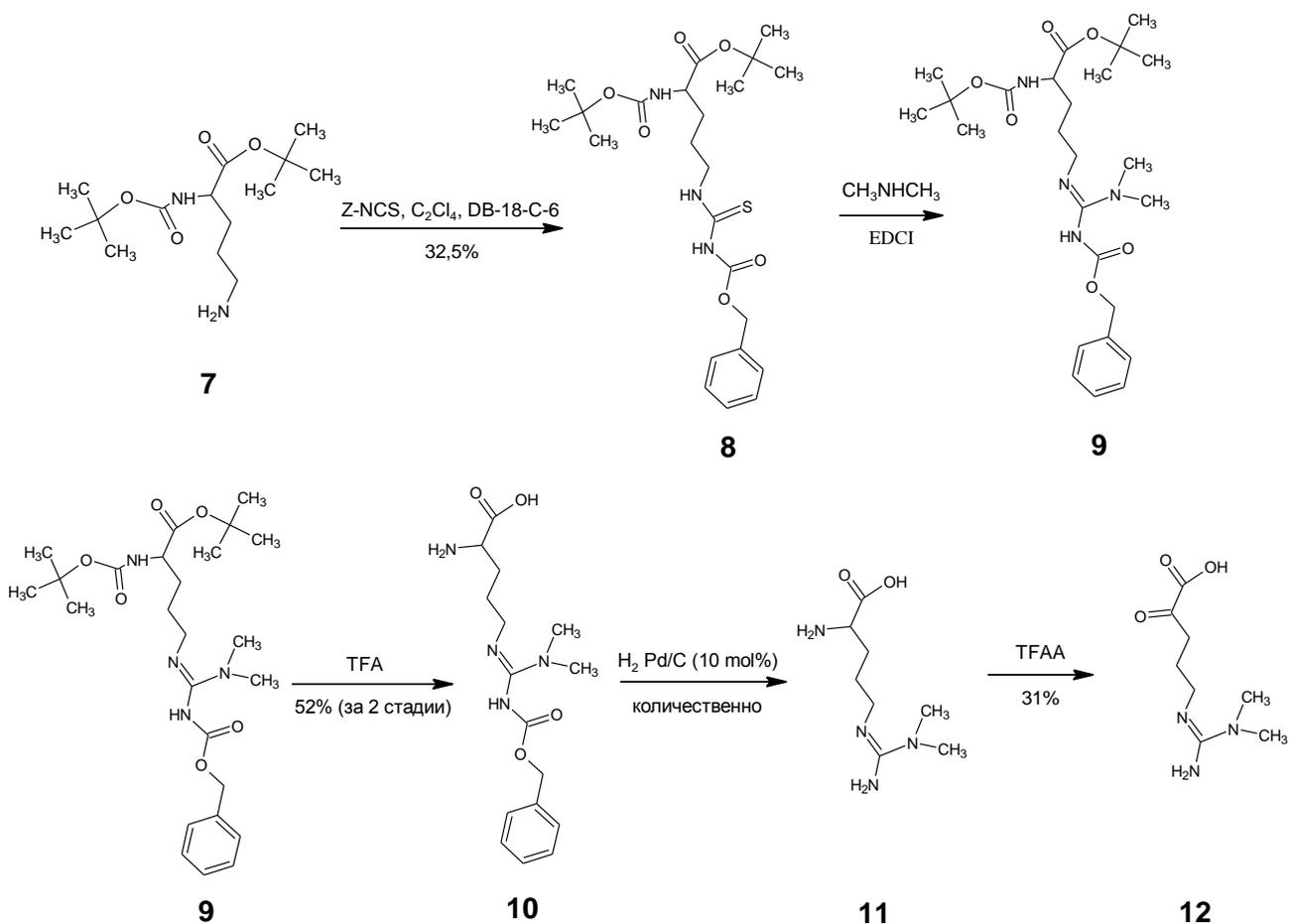
Обсуждение результатов

Синтез ADMA состоит из нескольких стадий:

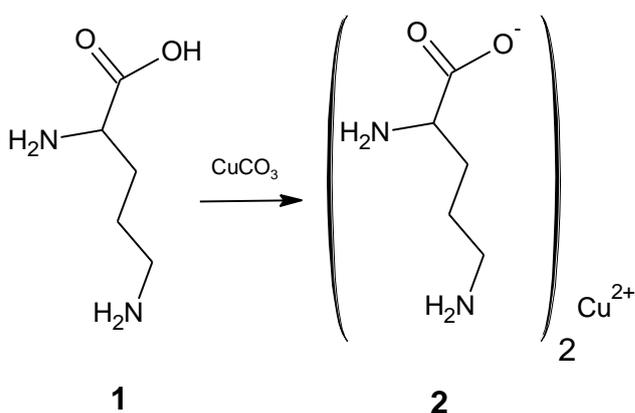
- 1) Получение медного комплекса орнитина
- 2) Введение Z-группы
- 3) Разложение медного комплекса орнитина
- 4) Введение Вос-группы
- 5) Введение трет-бутильной группы
- 6) Удаление Z-группы
- 7) Получение защищенного тиоцитрулина
- 8) Получение защищенного асимметричного диметиларгинина
- 9) Удаление Вос- и трет-бутильной групп
- 10) Удаление Z-группы
- 11) Получение α -кето- δ -(N^G, N^G -диметилгуанидино) валериановой кислоты

Схема синтеза:



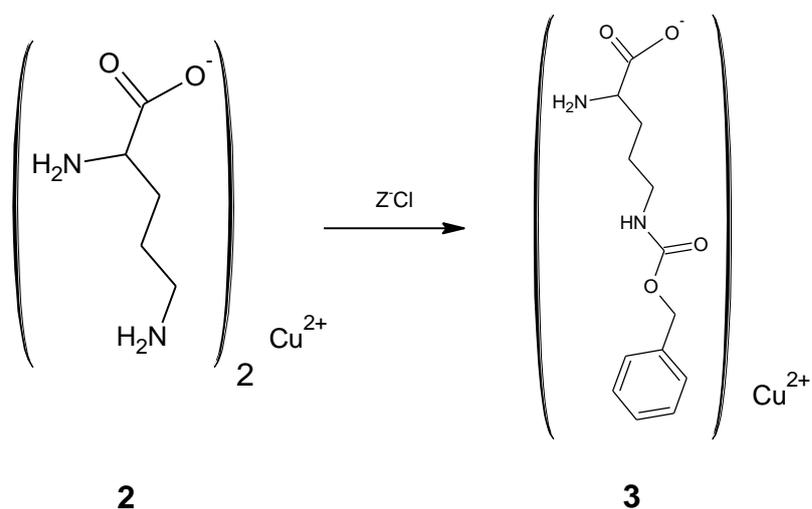


1) На первой стадии получали медный комплекс орнитина.



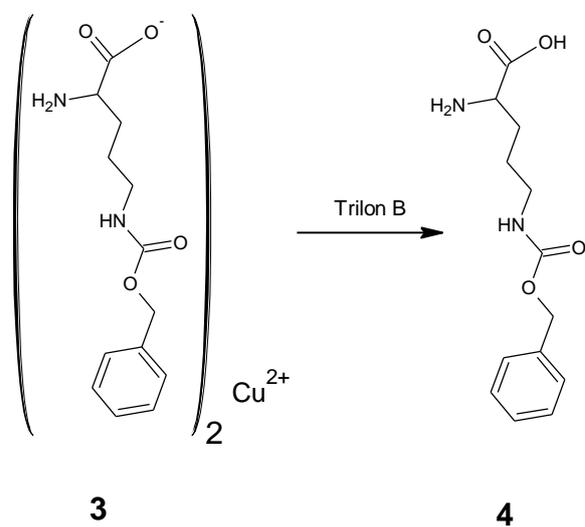
Карбонат меди брали в 3-кратном избытке, так как, вводя избыток реагентов, можно провести реакцию до полного завершения. Для увеличения скорости реакции смесь нагревали до 90 °С. По окончании реакции раствор окрашивается в ярко-синий цвет.

2) На следующей стадии вводили Z-группу.



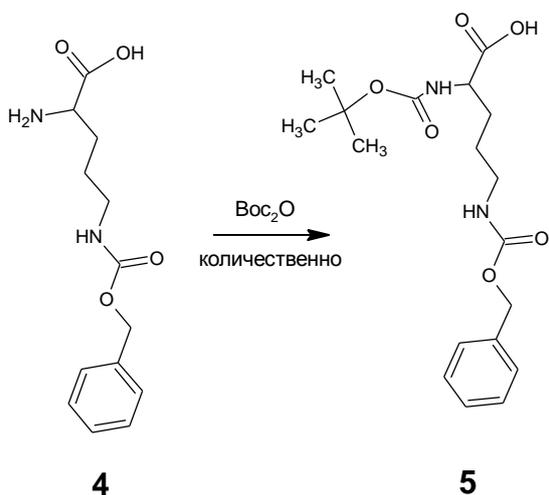
Реакцию проводили при пониженной температуре, так как Z-Cl разлагается при комнатной температуре. Также важен контроль pH. В слабощелочной среде разложение Z-Cl протекает медленно. Полноту протекания реакции проверили с помощью ТСХ.

3) Далее разлагают медный комплекс трилоном-Б



В качестве растворителя использовали воду, так как медный комплекс орнитина, трилон-Б и комплекс меди с ЭДТА растворимы, а продукт реакции нет.

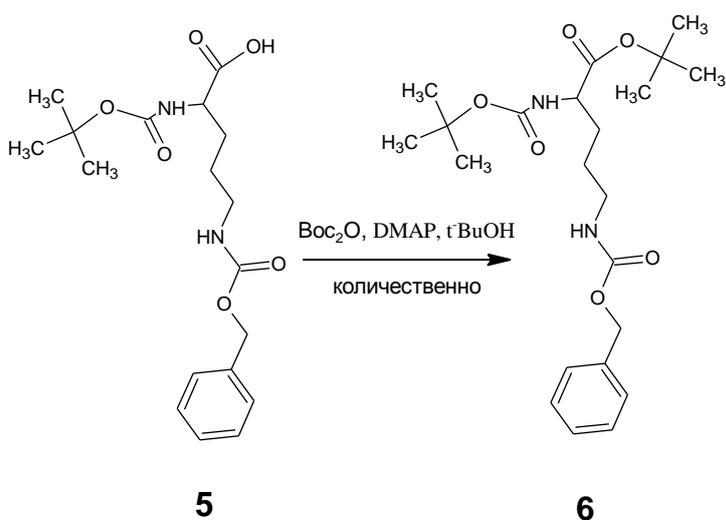
4) Постановка Вос-защиты.



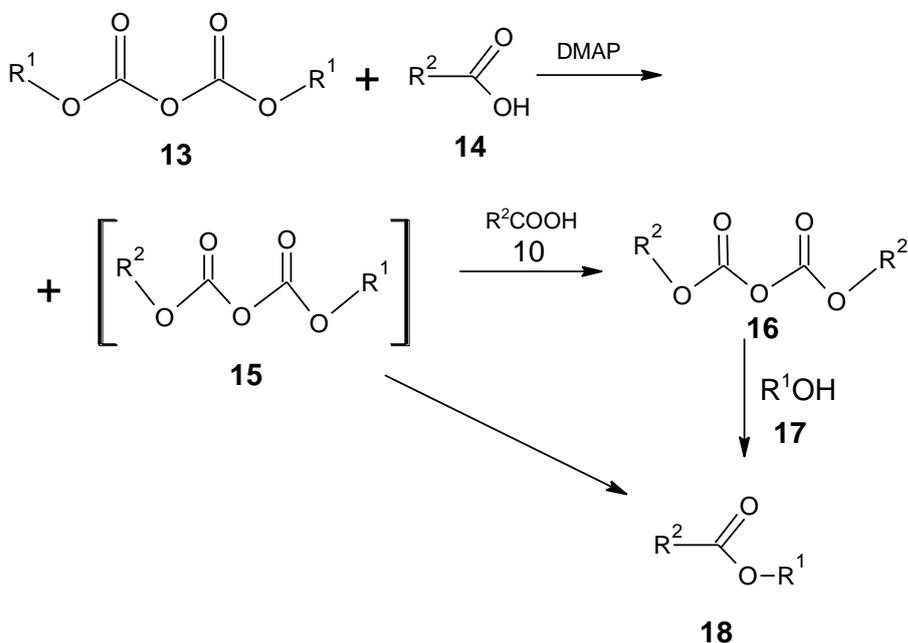
В качестве растворителя использовали изопропиловый спирт. Он хорошо растворяет исходные соединения и смешивается с водой. Реакцию проводили при pH =8-9, так как в сильнощелочной среде Boc_2O разлагается, а в кислой идет деблокирование защитной группы. После проведения реакции выпал осадок. Его отфильтровали, а растворитель упарили. После этого добавили гексан, т.к. в нем хорошо растворяется непрореагировавший Boc_2O , а продукт не растворяется. Затем продукт отфильтровали, промыли гексаном, растворитель упарили. Относительная чистота 81% (приложение 1).

5) Далее вводили трет-бутильную группу

Использовали методику, указанную в работе К. Takeda и сотрудников [9].

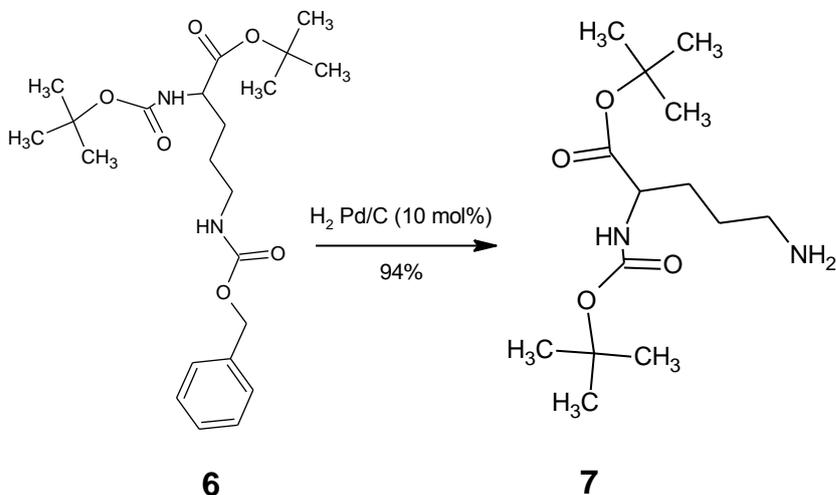


В качестве растворителя использовали трет-бутиловый спирт, т.к. в нем хорошо растворимы исходные соединения, реакция протекает быстро и с высоким выходом. Также он участвует реакции (соединение **17**):



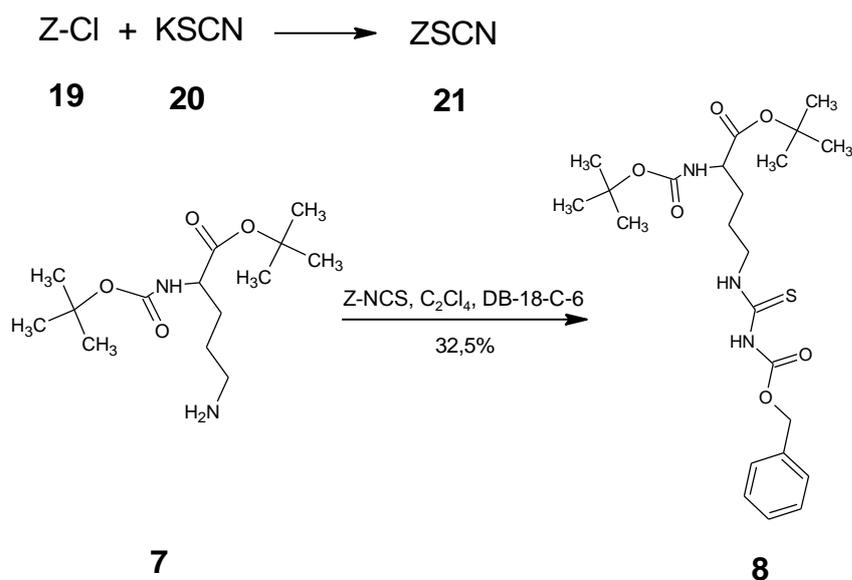
При использовании ТГФ время реакции увеличивается в 3-4 раза, а при использовании метанола реакция идет долго и с маленьким выходом (около 6%) [9]. В качестве катализатора использовали третичный амин – DMAP. По окончании реакции раствор желтел, а затем становился коричневым вследствие окисления DMAP. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ. Время удерживания исходного соединения – 13,5 мин, продукта 16.5 мин, DMAP – 7,5 мин (приложение 2).

б) На следующей стадии удаляли Z- защиту.

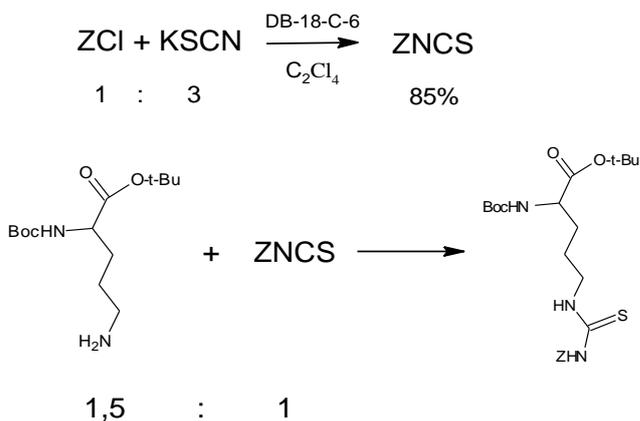


Водород получали при смешивании 2н натриевой щелочи с алюминием. В качестве катализатора использовали палладий на угле (10% Pd / C, 10 массовых %). Он пирофорен, поэтому в начале его растворили в воде, а затем аккуратно добавили к раствору защищенного орнитина в метаноле. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ. (Приложение 3) Время удерживания продукта – 15 мин. По спектру видно, что в полученном растворе много примесей. Поэтому было решено осадить полученное соединение в виде оксалата. Вначале трет-бутиловый эфир Вос-орнитина растворяли в диэтиловом эфире. Осадить не получилось: после охлаждения большая часть вещества осталась в растворе. Результативным оказалось перекристаллизация в гексане: после охлаждения выпал оксалат соединения **7**. Имеется хроматограмма после очистки (относительная чистота 76%, приложение 4).

7) Далее получали тиоцитрулин:



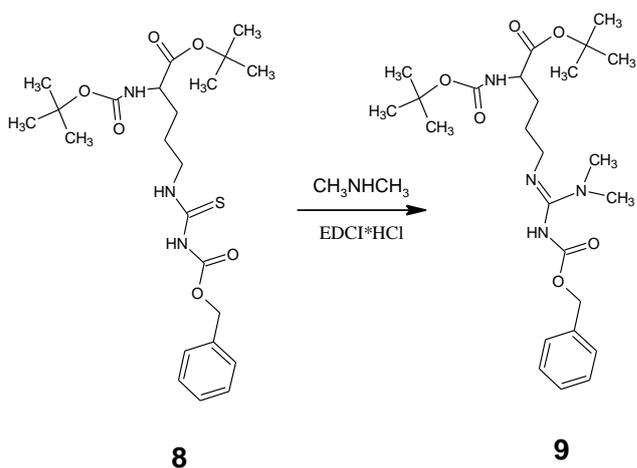
Как было показано в исследованиях А. Jirgensons[10], а также в работах D. Schade [8] и соавторов предпочтительнее использовать следующие соотношения реагентов, для того чтобы провести конверсию по ZNCS:



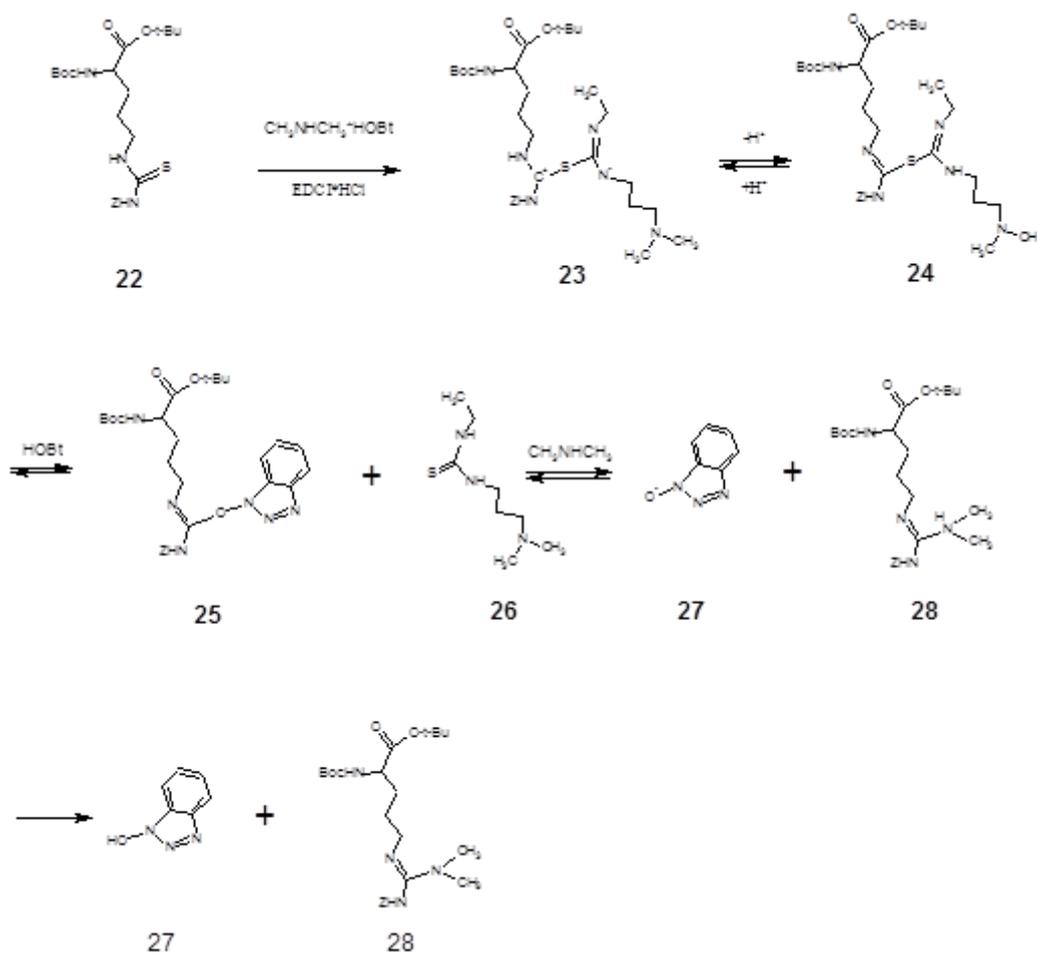
В качестве катализатора использовали дибензо-18-краун-6. Также можно было использовать менее гидрофобный 18-краун-6. Катализатор является специфическим комплексообразователем для ионов калия. При проведении реакции Z-Cl с KSCN в бензоле без катализатора выход ZNCS не превышает 10%. При использовании катализатора выход повышается до 20%, а при использовании C_2Cl_4 в качестве растворителя до 85%. [8]

На второй стадии получили тиоцитрулин. Протекание реакции контролировали с помощью ВЭЖХ. Продукт содержал много примесей, поэтому было решено очистить его на колонке. В качестве сорбента использовали силикагель 40-63 мкм, а в качестве элюента - смесь петролейного эфира и этилацетата в соотношении 4:1. Вначале смесь очистили от четыреххлористого этилена (приложение 5). C_2Cl_4 поглощает с временем удерживания 16,5 мин, а продукт - 17,2 мин, относительная чистота 44%. Пики находятся рядом, поэтому для разделения необходимо было использовать слабополярный растворитель, После очистки получили тиоцитрулин с выходом 32% и относительной чистотой 78% (приложение 6).

8) Стадия получения защищенного асимметричного диметиларгинина:



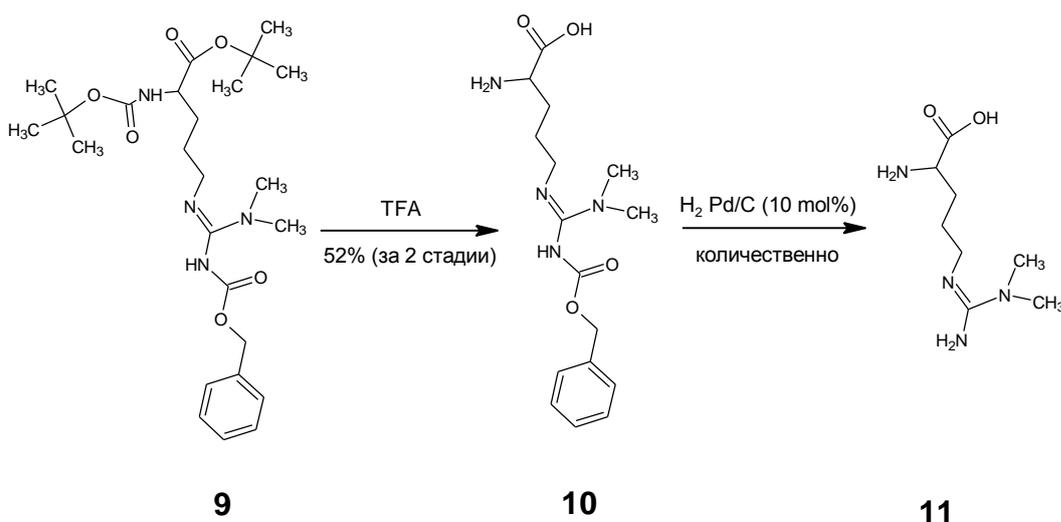
Предполагаемый механизм этой реакции представлен ниже:



Этот механизм предположен по аналогии с механизмом получения амидов карбодиимидным способом.

Реакцию проводили на ледяной бане, так как при комнатной температуре карбодиимид разлагается. В качестве карбодиимида взяли EDCI, так как он хорошо растворим в воде. После проведения реакции смесь промывали водой, для удаления тиомочевины и остатков карбодиимида, Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ. На хроматограмме (приложение 7 и 8) пик 6 мин соответствует тиомочевине, 7 мин – НОВt, 14 мин – продукту реакции, 17 мин - исходному веществу.

9 и 10) Далее проводили деблокирование защитных групп:



Вначале удаляли Вос и t-Бу группы. Для этого использовали раствор TFA в CH_2Cl_2 в соотношении 1: 2. По ВЭЖХ конверсия составила 88% - реакция прошла не до конца, для достижения полной конверсии исходного соединения использовали чистую TFA. (приложение 9) Затем продукт был очищен на препаративной ВЭЖХ и лиофилизирован. Продукт был идентифицирован методом ЯМР ^1H и C^{13} (приложение 11).

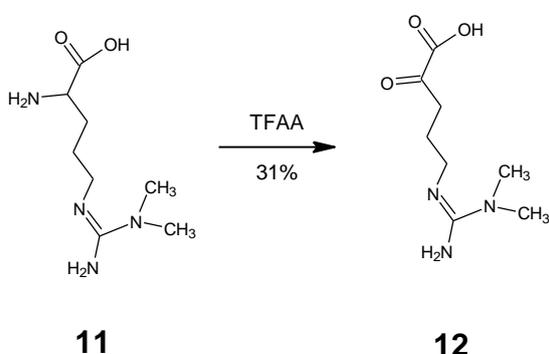
Следующая стадия – гидрогенолиз. Проводили реакцию так же, как и на стадии получения соединения **7**.

Для очистки продукт осаждали в виде соли гидрохлорида. Для этого получали безводную соляную кислоту по следующей реакции:

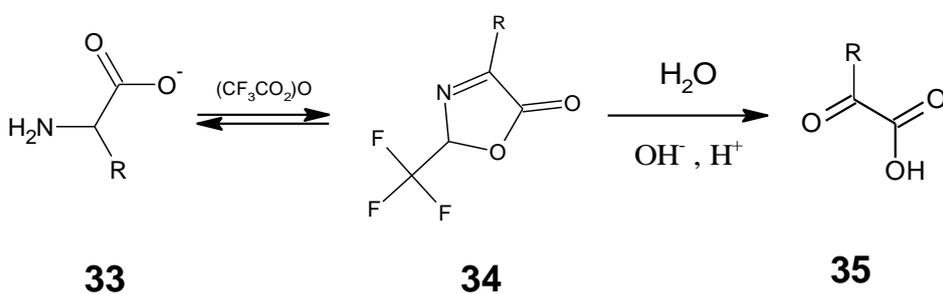


ADMA предварительно высушили, для этого его несколько раз смешивали с бензолом, а затем упаривали. При смешивании диметиларгинина с HCl в диоксане ADMA не растворился. После добавления 10 мл MeOH ADMA растворился. При охлаждении выпал гидрохлорид асимметричного диметиларгинина.

11) Получение α -Кето- δ -(N^G,N^G-диметилгуанидино) валериановой кислоты (DMVG):

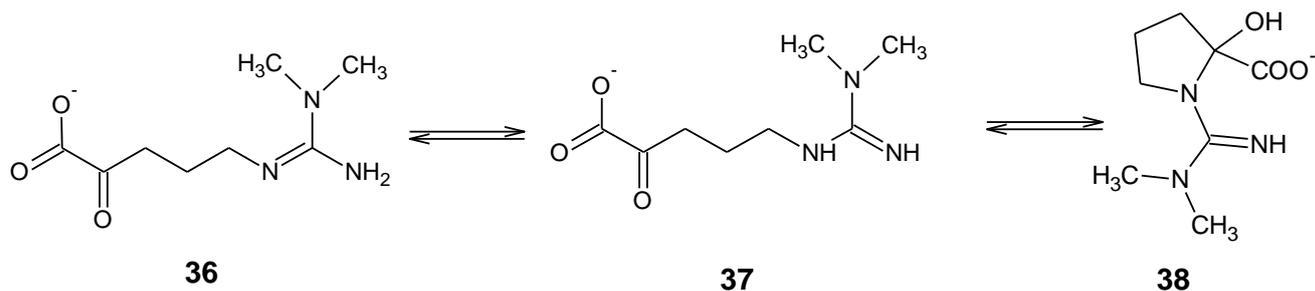


Предварительно ADMA сушили под вакуумом в течение часа при T = 70 C, для того чтобы избавиться от H₂O. Механизм этой реакции не доказан. Klein и соавторы предположили такой механизм [11]:



Для того чтобы получить соединение **35** из **34**, добавляли 1н NaOH, выдерживали 20 мин и доводили pH до 8 трифторуксусной кислотой. Это оптимальные условия, при которых побочные реакции практически не идут. К таким выводам пришли Klein и соавторы. [11]

В сильнощелочной среде в течение суток проходит циклизация:



Соединение **38** было идентифицировано методом ЯМР (Приложение 12 и 13)

Далее продукт был очищен на препаративной колонке (приложение 14) и лиофилизирован. DMVG была охарактеризована методами ЯМР и масс-спектроскопией (приложение 15, 16 и 17).

Экспериментальная часть

Ход реакции и относительную чистоту соединений оценивали с помощью аналитической ВЭЖХ.

Аналитическую высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на хроматографе Shimadzu LC-20AD, оснащенным спектрофотометрическим детектором SPD-M20A. При проведении аналитической ВЭЖХ использовали колонку YMC Triart-C18-S 3,0 мкм, 2x150мм при скорости потока элюента 0,3 мл/мин. Фаза А: 0,1% TFA/H₂O, В: 0,1% TFA/ацетонитрил.

Препаративную ВЭЖХ проводили на хроматографе Shimadzu LC-20AP со спектрофотометрическим детектором SPD-20A при длинах волн 214 и 254 нм и колонкой YMC Actus-Triart Prep C18-S 15 мкм, 12нм, 50x250мм при скорости потока элюента 50 мл/мин.

Метод А: градиентный режим 0 мин -5% этанола, 95% вода; 5 мин-5% этанола, 95% вода; 60 мин -50% этанола, 50% вода. Метод В: изократически, 2% EtOH, 98% H₂O

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C получены на спектрометре Bruker Avance 400 (400.1 МГц для ¹H, 100.6 МГц для ¹³C) для растворов в D₂O и DMSO-d₆

Масс-спектры высокого разрешения с ионизацией методом электроспрея (ESI) зарегистрированы на спектрометре microTOF 10223 фирмы Bruker.

Медный комплекс N_ε-карбобензоксид – L-орнитина (3)

Навеску монохлоргидрата орнитина (33,72 г, 0,20 моль) растворили в 285 мл воды, добавили избыток карбоната меди (33 г, 0,27 моль). Смесь кипятили в течение 30 мин., отфильтровали и добавили 78 мл 2н раствора едкого натра. Раствор охладили до 0 °С и при перемешивании добавляли десятью порциями в течение 30 мин карбобензоксидхлорид (32 мл, 0,22 моль), затем продолжили перемешивать смесь в течение 2 часов, после чего отфильтровывали, промывали водой, спиртом и высушили. Выход 49,59 г (83%)

N^ε-карбобензоксид-L-орнитин (4)

Медный комплекс N_ε-карбобензоксид – L-орнитина (22,04 г, 0,07 моль) растерли в ступке с трилоном Б (56,26 г, 0,17 моль) до гомогенности и суспензировали в 300 мл воды, затем кипятили, перемешивая, в течение 40 мин. Выпадал белый осадок N_ε-карбобензоксид – L-орнитина. Раствор остудили, осадок отфильтровывали и промывали водой. Выход 41,12 г (количественно).

N^ε-Карбобензоксид-N^α-третбутилоксикарбонил-L-орнитин (5)

N^ε-Карбобензоксид-L-орнитин (41,12 г, 0,15 моль) растворили в изопропиловом спирте при перемешивании, затем небольшими порциями добавляли ди-трет-бутил-пирокарбонат (40,70 г, 0,18 моль) в течение 30 мин, после чего оставляли смесь при перемешивании на 1 час. Поддерживая pH около 8-9, добавляя 2н растворы NaOH и NaHCO₃. Осадок отфильтровали, растворили в изопропиловом спирте. Отгоняли изопропиловый спирт на роторном испарителе, затем избыток ди-трет-бутил-пирокарбоната экстрагировали гексаном, а водную фазу подкисляли 2н H₂SO₄ до pH 8. Продукт экстрагировали этилацетатом, органическую фазу промывали насыщенным раствором NaCl, сушили Na₂SO₄, а этилацетат упаривали на роторном испарителе. Выход количественный.

трет-Бутиловый эфир N^ε-карбобензоксид-N^α-третбутилоксикарбонил-L-орнитина (6)

N^ε-Карбобензоксид-N^α-третбутилоксикарбонил-L-орнитин (56,39 г, 0,154 моль) растворили в 150 мл третбутанола, затем при перемешивании добавили ди-трет-

бутил-пирокарбонат (50,88 г, 0,231 моль). После полного растворения добавляли небольшими порциями раствор 4-диметиламинопиридина (5,64 г, 0,046 моль) в 100 мл третбутанола. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. После удаления органического растворителя в вакууме остаток растворили в 250 мл этилацетата, промыли водой, 2н H₂SO₄, водой, NaHCO₃, водой и сушили Na₂SO₄. Этилацетат удалили на роторном испарителе. Выход количественный.

трет-Бутиловый эфир N^α-третбутилоксикарбонил-L-орнитина (7)

Навеску трет-бутилового эфира N^ε-карбобензоксид-N^α-третбутилоксикарбонил-L-орнитина (10 г, 0,035 моль) растворили в 80 мл метанола, применив палладиевый катализатор (10% / C, 1 г, 10 массовых процентов), и гидрировали в течение 3 часов при комнатной температуре, контролируя ход реакции деблокирования по ТСХ (бензол-ацетон, 2:1). После окончания реакции катализатор отфильтровали на целите-545, промыли метанолом, растворитель упарили на роторном испарителе. Для дополнительной очистки полученное соединение перекристаллизовали.

Трет-бутиловый эфир N^α-третбутилоксикарбонил-L-орнитина растворили в гексане и добавили щавелевую кислоту (0,92 г). Полученный осадок отфильтровали, промыли гексаном и оставили сушиться при комнатной температуре. Выход 7,06 г (94%)

Карбобензоксид изотиоцианат (21)

Подготовка KCSN:

Роданид калия (12,2 г) растворили при нагревании в 95 мл этанола, к полученному раствору добавили 460 мл диэтилового эфира. Осадок отфильтровали и высушили.

Очищенный роданид калия (10,38 г, 0,107 моль) суспензировали в 60 мл четыреххлористого этилена. Затем добавили карбобензоксидхлорид (5,1 мл, 0,036 моль) и дибензо-18-краун-6 (0,64 г, 0,002 моль). Реакцию проводили при перемешивании на масляной бане (T=85⁰C). Оставляли на ночь. После окончания реакции смесь охладили, отфильтровали. Осадок промыли четыреххлористым этиленом. Выход 10,38 г (85%)

трет-Бутиловый эфир N^ε-карбобензоксид-N^α-третбутилоксикарбонил-L-тиоцитрулина (8)

Приготовили раствор диизопропилэтиламина (3,56 мл, 0,02 моль) в CH_2Cl_2 , затем добавили оксалат трет-бутилового эфира N^α -третбутилоксикарбонил-L-орнитина (6,76 г, 0,01 моль). После этого колбу охлаждали льдом и через капельную воронку добавляли в течение часа раствор карбобензоксироданида в C_2Cl_4 . Окончание реакции контролировали с помощью ТСХ (бензол-ацетон 4:1). Полученный раствор промыли водой, высушили Na_2SO_4 , растворитель упарили на роторном испарителе. Продукт очистили на колоночной хроматографии (сорбент - силикагель 40-63, элюент - петролейный эфир-этилацетат 4:1). Выход 3,16 г (32,5%).

трет-Бутиловый эфир N^ϵ -карбобензоксидиметил-L-аргинин (N^α -третбутилоксикарбонил- N^G, N^G -диметил L-аргинин (9))

В 100 мл CH_2Cl_2 растворили трет-бутиловый эфир N^ϵ -карбобензоксидиметил-L-тиоцитрулина (3,12 г, 0,0065 моль), затем добавили диметиламмонийную соль гидроксибензотриазола (11,4 мл, 0,013 моль). При охлаждении льдом и перемешивании добавили 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (2,48 г, 0,013 моль) и N-метилморфолин (2,1 мл, 0,0195 моль). Контролировали ход реакции с помощью ВЭЖХ. После окончания реакции раствор промыли водой, 0,5н H_2SO_4 , водой, NaHCO_3 , водой. Сушили Na_2SO_4 , в последующем растворитель упарили. Выход 3,16 г (32%).

N^ϵ -Карбобензоксидиметил-L-аргинин (N^G, N^G -диметил L-аргинин (10))

Приготовили смесь TFA – CH_2Cl_2 2:1 (20мл: 10 мл), затем добавили трет-бутиловый эфир N^ϵ -карбобензоксидиметил-L-аргинина. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа, контролируя окончание реакции на ВЭЖХ. После чего добавили 100 мл метил-трет-бутилового эфира. Продукт выпадал в осадок, его отфильтровали, очистили с помощью препаративной ВЭЖХ (метод А) и лиофилизировали. Выход 1,14 г (52% на 2 стадии)

^1H ЯМР (400 MHz, DMSO) δ =4,00 [m, 4H, β и γ - CH_2], 2,93 [s, 6H, NMe_2], 3,15 [t, 2H, δ - CH_2], 3,63 [t, 1H, α -CH], 5,04 [s, 2H, CH_2Ph], 5,08 [m, 5H, Ph].

^{13}C ЯМР (100,6 МГц, DMSO) $\delta=25,36$ ($\gamma\text{-CH}_2$), 28,14 ($\beta\text{-CH}_2$), 38,98 (2C, NMe₂), 42,97 ($\delta\text{-CH}_2$), 52,91 (C гуанид.), 66,62 ($\alpha\text{-CH}$), 128,06 128,09 128,77 (5C, Ph), 138,05 (Ph), 155,88 [CO(Z)], 158,80 [CO₂(Z)], 174,42 (CO₂).

N^G,N^G-Диметил L-аргинин (11)

N^ε-Карбобензокси-N^G,N^G-диметил L-аргинин растворили в 50 мл метанола, прибавляя палладиевый катализатор (10% / C, 1 г, 10 массовых процентов), и пропускали ток водорода 2 часа при комнатной температуре, контролируя ход реакции деблокирования ТСХ (вода - бутанол –уксусная кислота - этилацетат, 1:1:1:1). После окончания реакции катализатор отфильтровали на целите-545, промыли метанолом, растворитель упарили на роторном испарителе. Выход количественный 0,68 г.

Гидрохлорид N^G,N^G-диметил L-аргинина

Приготовили безводную HCl, для этого смешали тионилхлорид (0,28 мл, 0,0034 моль) с водой (0,061 мл, 0,0034 моль) в сухом диоксане (10 мл). Полученную смесь добавили к раствору N^G,N^G-диметил L-аргинина (0,68 г, 0,0034 моль) в 10 мл сухого диоксана и 10 мл метанола, затем растворитель упарили, а гидрохлорид N^G,N^G-диметил L-аргинина сушили. Выход 1,07 г (67%)

α -Кето- δ -(N^G,N^G-диметилгуанидино) валериановая кислота (12)

Предварительно N^G,N^G-диметил L-аргинин сушили при T=70 °C в течение 1 часа. Затем добавили ангидрид трифторуксусной кислоты (7 мл) и кипятили 3 часа. Полученную смесь охладили до -17 °C, добавили 50 мл 1н NaOH, через 20 мин добавляли 0,5н раствор трифторуксусной кислоты по каплям до pH=8. После чего лиофилизировали, очищали на препаративной колонке. (метод В) Затем еще раз лиофилизировали. Выход 280 мг (31%)

^1H ЯМР (300 МГц, D₂O) $\delta=1,74$ [m, $\gamma\text{-CH}_2$], 2,69 [t, 2H, $\delta\text{-CH}_2$], 2,86 [s, 6H, NMe₂], 3,11 [t, 2H, $\beta\text{-CH}_2$], 4,69 [s, 3H, NH₃].

^{13}C ЯМР (75 МГц, CDCl₃) $\delta=22,35$ ($\beta\text{-CH}_2$), 36,55 (2C, NMe₂), 38,26 ($\gamma\text{-CH}_2$), 41,44 ($\delta\text{-CH}_2$), 156,28 (C гуанид.), 170,72 (CO₂), 206,47 (CO).

MS (ESI): m/z = 202 [M+H⁺], 224 [M+Na], 240 [M+K].

Выводы

1. Предложена схема синтеза α -кето- δ -(N^G, N^G -диметилгуанидино) валериановой кислоты.
2. Осуществлен синтез α -кето- δ -(N^G, N^G -диметилгуанидино) валериановой кислоты по предложенной схеме.

Благодарности

Выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю, к. х. н. Глуздикову Ивану Александровичу за постановку задачи и постоянное руководство работой, а также Никольскую Софью Константиновну за неоценимый вклад в работу.

Выражаю также благодарность компании ООО «Пептидные технологии» за предоставленную возможность выполнения ВКР, ресурсному центру СПбГУ «Методы анализа состава вещества» за помощь в проведении исследований и Селиванову Станиславу Ивановичу за съемку ЯМР спектров.

Список литературы

- 1) Р. Родионов, И. Блхин, М. Галагудза, Е. Шляхто, С. Лентц; Артериальная гипертензия, 2008, 14, 4, 306-314.
- 2) J. Martens-Lobenhoffer, R. N Rodionov, A. Drust, S. M. Bode-Boger; Analytical biochemistry, 2011, 419, 234-240.
- 3) K. Tsubokura; I. Takayuki; T. Misako; K. Almira; F. Koichi; N. Yoichi; T. Katsunori; Synlett 2014; 25(09), 1302-1306.
- 4) S. Wangngae, M. Pattarawarapan, W. Phakhodee; Synlett 2016, 27, 1121-1127.
- 5) M. Abou-Gharbia, W. K. Paik, D. Swern Journal of labelled compounds and radiopharmaceuticals; 1980, vol. XVIII (6), 777-779.
- 6) Д. Л. Рахманкулов, Н. Е. Максимова, Е. А. Кантор, А. М. Сыркин; патент СССР 591462, 1978 год.
- 7) Патент RU 2 419 619 C2
- 8) D. Schade, J. Kotthaus, B. Clement; synthesis 2008; 15; 2391-2397.
- 9) K. Takeda, A. Akiyama, H. Nakamura, S. Takizawa, Y. Mizuno, H. Takayanagi, Y. Harigaya; Synthesis 1994; 1994(10), 1063-1066.
- 10) A. Jirgensohn, I. Kumsa, V. Kaussa, I. Kalvinsa; synthetic communications 1997; 27 (2); 315-322.
- 11) C. Klein, G. Schulz, W. Steglich; Leibigs Ann. Chem., 1983, 1623-1637.

Приложения

Приложение 1

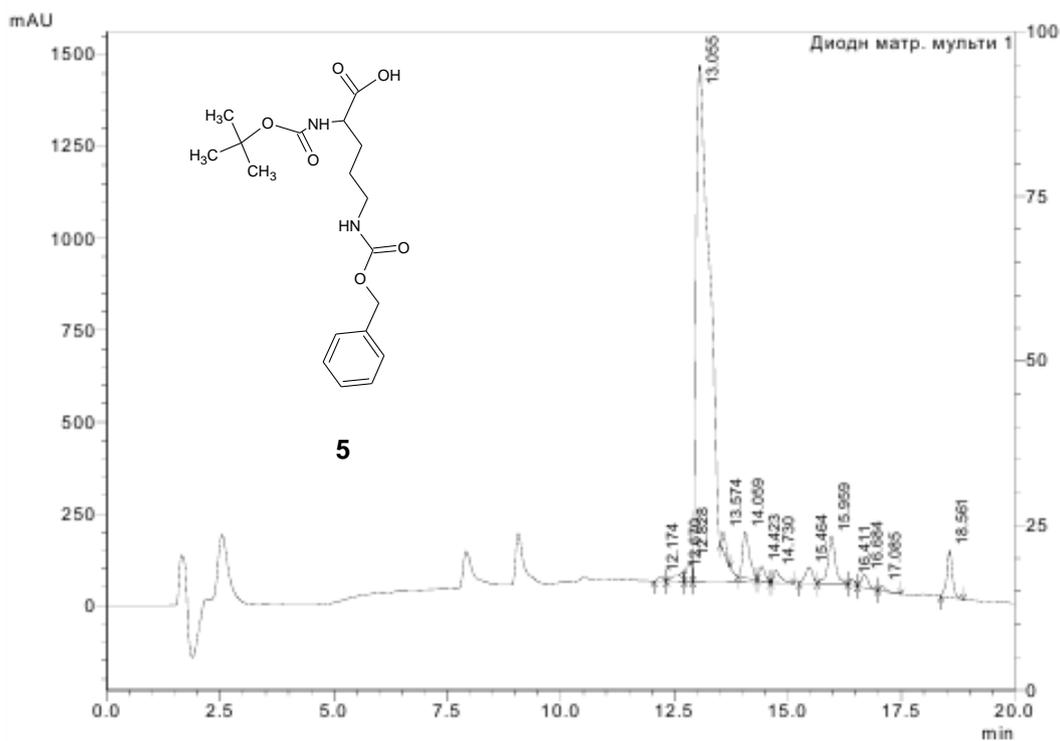
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Sergey\Boc-Orn(Z)-OH.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : Boc-Orn(Z)-OH
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : Boc-Orn(Z)-OH.lcd
 Method File Name : 0.3mL_5-95B.lcm
 Data Acquired : 01.02.2016 14:40:38
 Data Processed : 01.02.2016 15:00:41
 Sample Comments : dissolved in water

Mobile Phase A: water (0.1% TFA)
 Mobile Phase B: acetonitrile (0.1% TFA)
 Mobile Phase C:
 Mobile Phase D:
 Pump Total Flow: 0.3000 mL/min
 Oven Temperature: 25 C
 <<LC Program>>

Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий
0.01	Насосы	B.Cone	5	
0.01	Насосы	T.Flow	0.3	
15.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Контролер	Stop		

Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm
 Manufacturer: YMC
 Column description:
 COMMENTS
 Phase A: 0.1% TFA in water
 Phase B: 0.1% TFA in ACN



PDA Ch1 214nm 4nm

Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	12.174	0.000	0.139	105483	0.282
2	12.670	0.000	0.000	358668	0.960
3	12.828	0.000	0.000	446316	1.194
4	13.055	2.899	0.380	30342807	81.193
5	13.574	1.667	0.104	316180	0.846
6	14.059	0.000	0.161	1354602	3.625
7	14.423	0.000	0.143	356769	0.955
8	14.730	2.544	0.156	377053	1.009
9	15.464	0.000	0.176	515559	1.380
10	15.959	1.024	0.154	1496597	4.005
11	16.411	0.000	0.121	119065	0.319
12	16.684	0.000	0.158	372923	0.998
13	17.085	2.062	0.131	112719	0.302
14	18.561	0.997	0.121	1096471	2.934
Общий				37371212	100.000

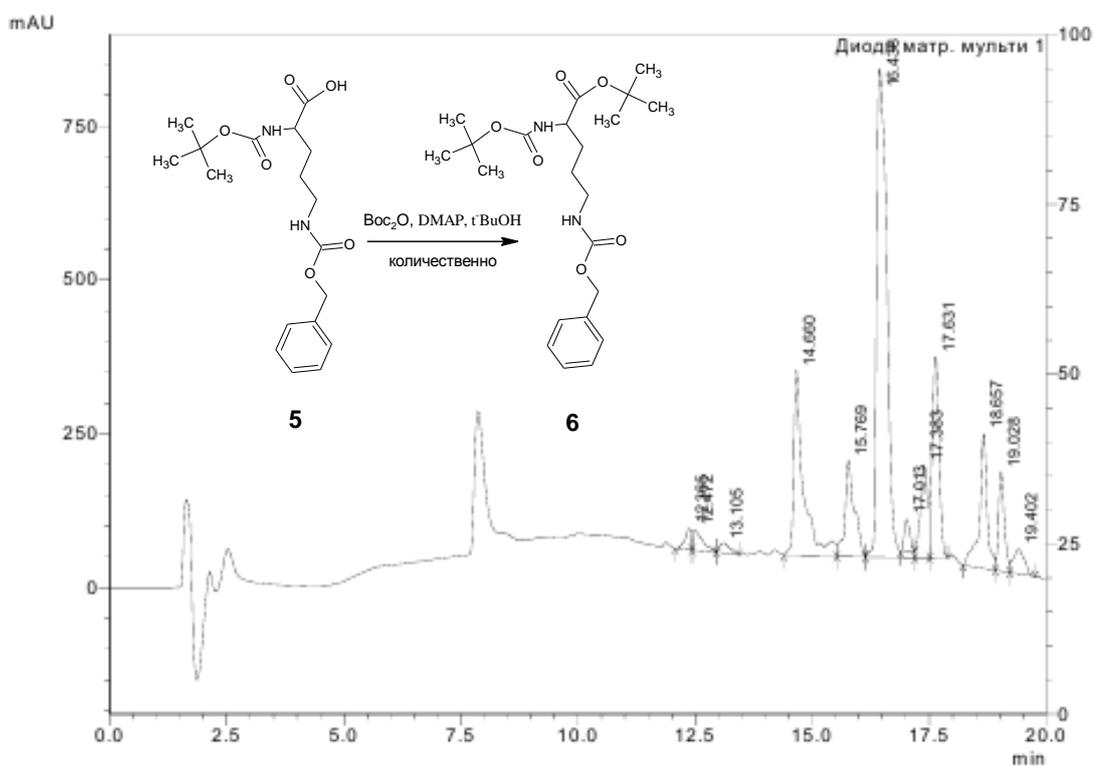
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Sergey\Boc om -(z) tBu worked up.lod
 Acquired by : Admin
 Sample Name : Boc om -(z) tBu worked up
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : Boc om -(z) tBu worked up.lod
 Method File Name : 0,3mL 5-95B.lcm
 Data Acquired : 02.02.2016 16:36:56
 Data Processed : 02.02.2016 16:56:56
 Sample Comments : dissolved in water

Mobile Phase A: water (0.1% TFA)
 Mobile Phase B: acetonitrile (0.1% TFA)
 Mobile Phase C:
 Mobile Phase D:
 Pump Total Flow: 0.3000 mL/min
 Oven Temperature: 25 C
 <<LC Program>>

Время	Класс	Команда	Значение	Комментарий
0.01	Насосы	B.Cone	5	
0.01	Насосы	T.Flow	0.3	
15.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Контроллер	Stop		

Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm
 Manufacturer: YMC
 Column description:
 COMMENTS
 Phase A: 0.1% TFA in water
 Phase B: 0.1% TFA in ACN



PDA Ch1 214nm 4nm

Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	12.365	0.000	0.000	348994	1.174
2	12.472	0.000	0.000	465046	1.564
3	13.105	1.575	0.252	235495	0.792
4	14.660	2.917	0.150	4335307	14.582
5	15.769	0.000	0.166	2211946	7.440
6	16.438	1.848	0.248	12180425	40.969
7	17.013	1.309	0.137	442627	1.489
8	17.383	0.000	0.000	1636127	5.503
9	17.631	0.000	0.162	3321020	11.170
10	18.657	0.000	0.133	2513832	8.435
11	19.028	0.000	0.130	1399146	4.706
12	19.402	0.000	0.285	641171	2.157
Общий				29731136	100.000

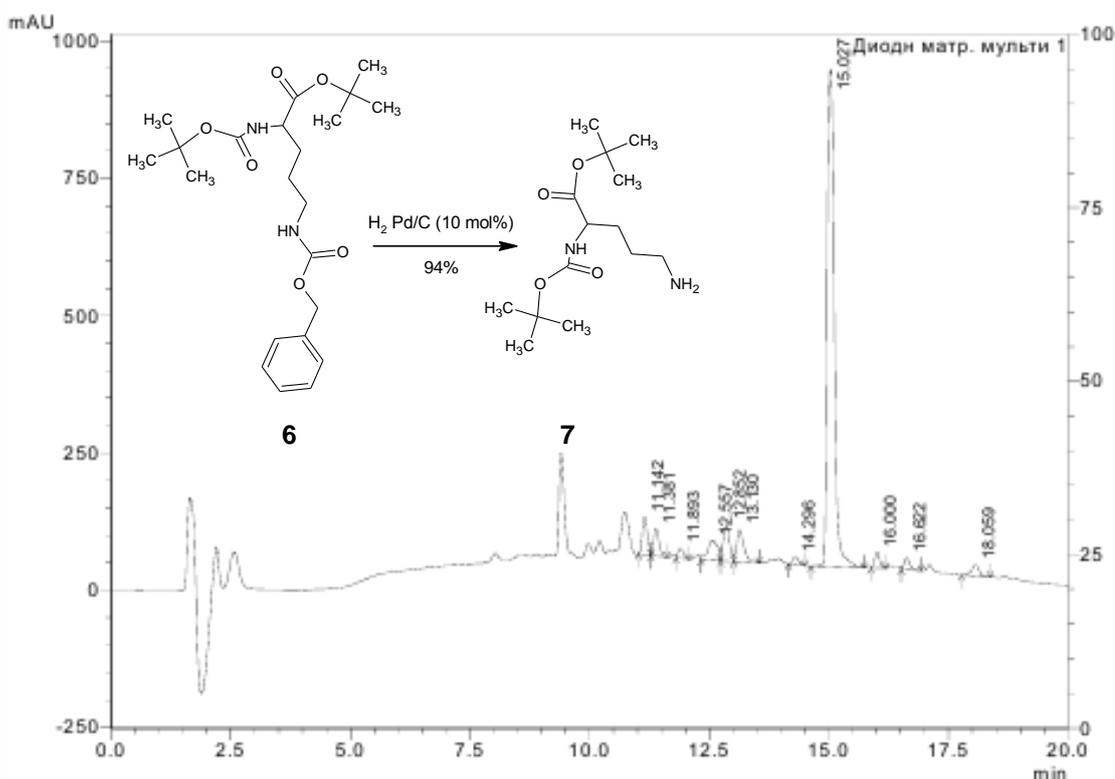
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Sergey\Boc orn -(z) otBu H2 Pd RM 5h 2.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : Boc orn -(z) otBu H2 Pd RM 5h 2
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : Boc orn -(z) otBu H2 Pd RM 5h 2.lcd
 Method File Name : 0.3mL_5-95B.lcm
 Data Acquired : 04.02.2016 14:07:16
 Data Processed : 04.02.2016 14:27:18
 Sample Comments : dissolved in water

Mobile Phase A: water (0.1% TFA)
 Mobile Phase B: acetonitrile (0.1% TFA)
 Mobile Phase C:
 Mobile Phase D:
 Pump Total Flow: 0.3000 mL/min
 Oven Temperature: 25 C
 <<LC Program>>

Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий
0.01	Насосы	B.Cone	5	
0.01	Насосы	T.Flow	0.3	
15.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Контроллер	Stop		

Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm
 Manufacturer: YMC
 Column description:
 COMMENTS
 Phase A: 0.1% TFA in water
 Phase B: 0.1% TFA in ACN



PDA Ch1 214nm 4nm

Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	11.142	0.000	0.117	507734	3.911
2	11.381	0.000	0.116	370549	2.854
3	11.893	0.000	0.130	145333	1.119
4	12.557	0.000	0.251	539635	4.156
5	12.852	0.000	0.147	612618	4.718
6	13.130	0.000	0.152	607995	4.683
7	14.296	1.230	0.125	117960	0.909
8	15.027	1.406	0.164	9473372	72.964
9	16.000	0.000	0.110	212871	1.640
10	16.622	0.000	0.126	179200	1.380
11	18.059	0.974	0.156	216441	1.667
Общий				12983708	100.000

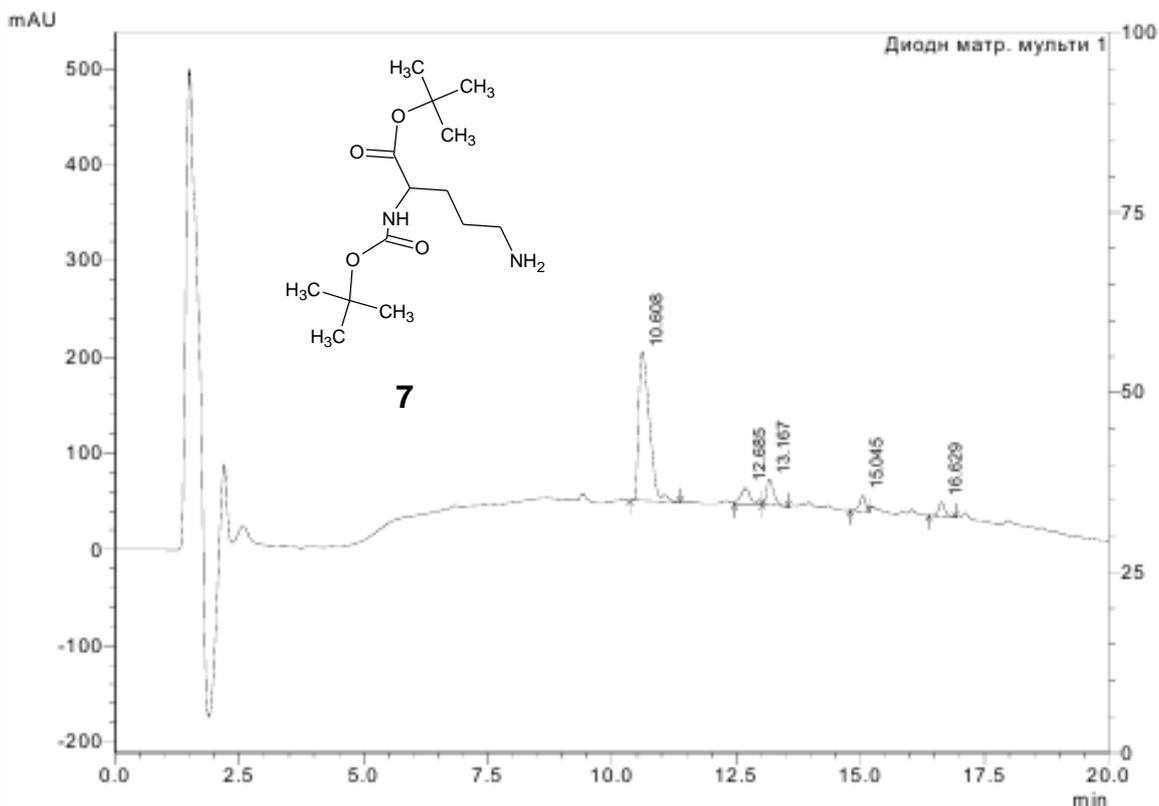
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Sergey\Boc om otBu x H2C2O4.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : Boc om otBu x H2C2O4
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : Boc om otBu x H2C2O4.lcd
 Method File Name : 0.3mL 5-95B.lcm
 Data Acquired : 04.02.2016 14:42:19
 Data Processed : 08.02.2016 15:37:33
 Sample Comments : dissolved in water

Mobile Phase A: water (0.1% TFA)
 Mobile Phase B: acetonitrile (0.1% TFA)
 Mobile Phase C:
 Mobile Phase D:
 Pump Total Flow: 0.3000 mL/min
 Oven Temperature: 25 C
 <<LC Program>>

Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий
0.01	Насосы	B.С.с	5	
0.01	Насосы	T.Flow	0.3	
15.00	Насосы	B.С.с	95	
20.00	Насосы	B.С.с	95	
20.00	Контроллер	Стоп		

Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm
 Manufacturer: YMC
 Column description:
 COMMENTS
 Phase A: 0.1% TFA in water
 Phase B: 0.1% TFA in ACN



PDA Ch1 214nm 4nm

Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	10.608	1.712	0.238	2338471	75.738
2	12.685	0.000	0.177	216838	7.023
3	13.167	1.559	0.143	248410	8.045
4	15.045	0.000	0.128	151630	4.911
5	16.629	1.041	0.132	132243	4.283
Общий				3087592	100.000

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Bergey\ZNCS+Boc Om OtBu 3,5 h.tcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : ZNCS+Boc Om OtBu 3,5 h
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : ZNCS+Boc Om OtBu 3,5 h.tcd
 Method File Name : 0.3mL 5-95B.lcm
 Data Acquired : 10.02.2016 17:22:19
 Data Processed : 10.02.2016 17:42:21
 Sample Comments : dissolved in water

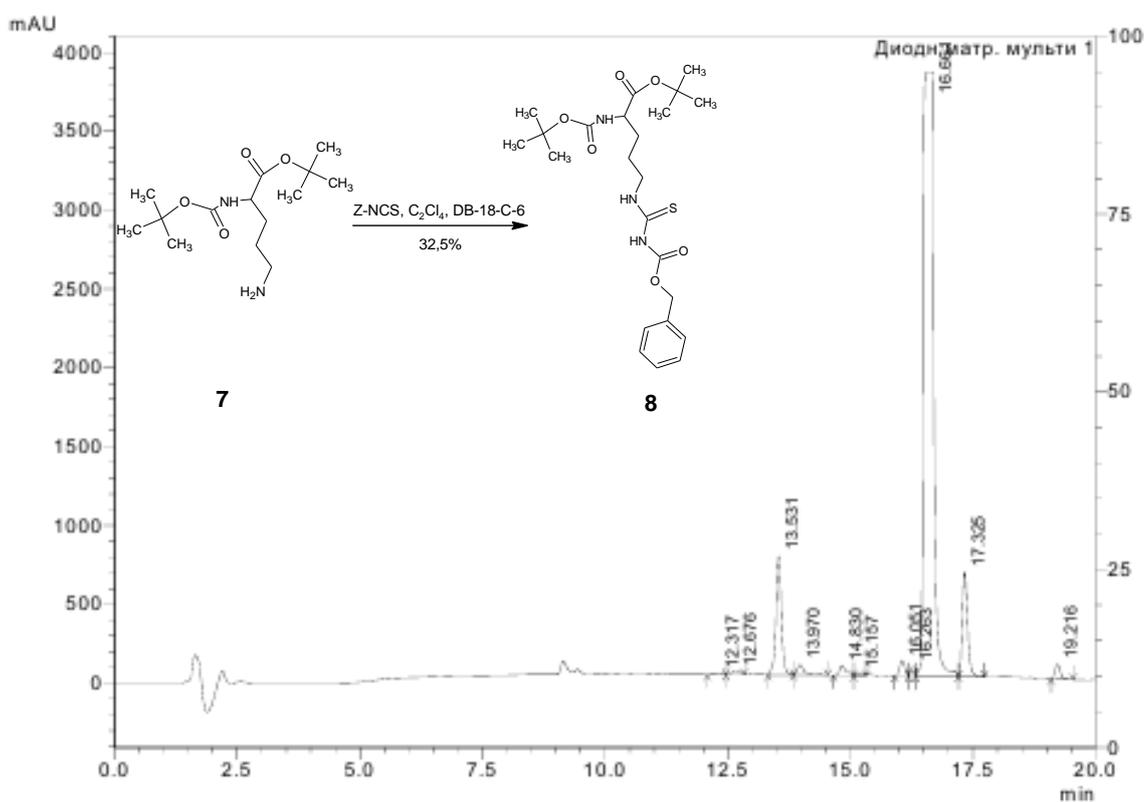
Mobile Phase A: water (0.1% TFA)
 Mobile Phase B: acetonitrile (0.1% TFA)
 Mobile Phase C:
 Mobile Phase D:
 Pump Total Flow: 0.3000 mL/min
 Oven Temperature: 25 C
 <<LC Program>>

Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий
0.01	Насосы	B.Stop	5	
0.01	Насосы	T.Flow	0.3	
15.00	Насосы	B.Stop	95	
20.00	Насосы	B.Stop	95	
20.00	Контроллер	Stop		

Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm
 Manufacturer: YMC
 Column description:

COMMENTS

Phase A: 0.1% TFA in water
 Phase B: 0.1% TFA in ACN



PDA Ch1 214nm 4nm

Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	12.317	0.000	0.137	108902	0.155
2	12.676	0.000	0.220	311651	0.444
3	13.531	1.030	0.112	5822801	8.296
4	13.970	0.000	0.130	686315	0.978
5	14.830	0.000	0.118	600440	0.856
6	15.157	0.000	0.000	183862	0.262
7	16.051	0.000	0.123	786874	1.121
8	16.263	0.000	0.000	421075	0.600
9	16.661	0.833	0.223	55640088	79.277
10	17.325	1.294	0.113	4926229	7.019
11	19.216	1.304	0.114	696341	0.992
Общий				70184579	100.000

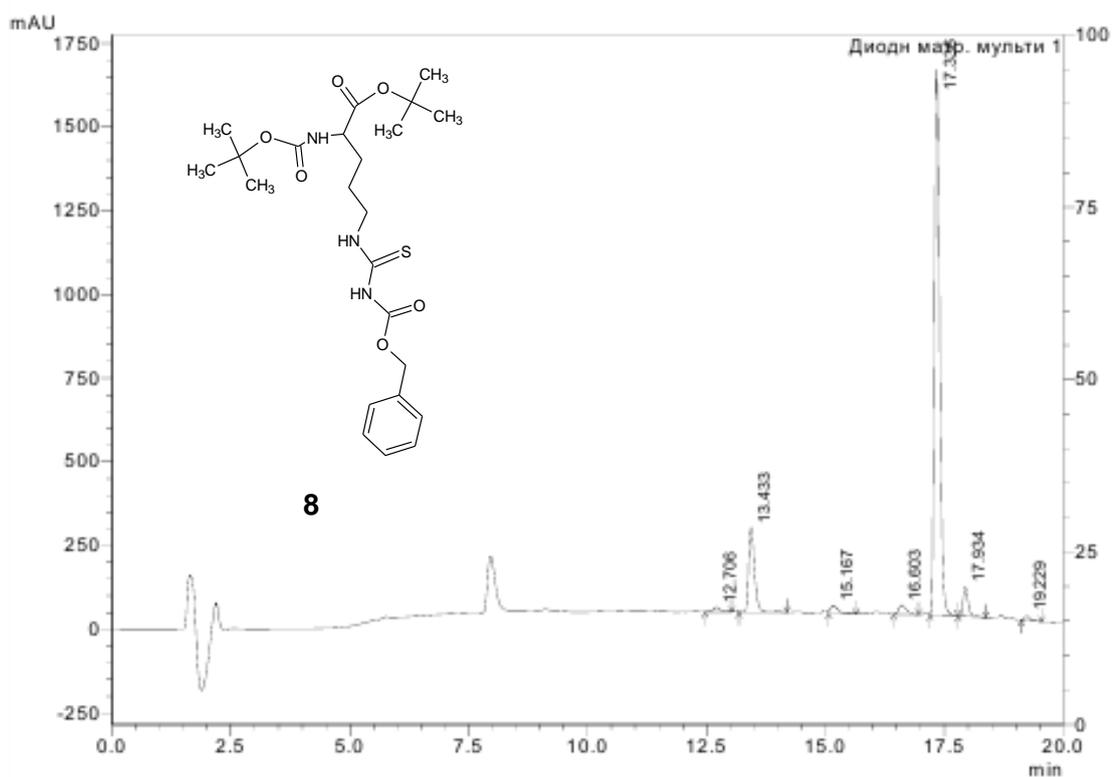
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Sergey\Boc-Cyt(SZ)-OBu Pur\1p6-10.dil\od
 Acquired by : Admin
 Sample Name : 1p6-10.dil
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : 1p6-10.dil.od
 Method File Name : 0.3mL_5-95B.lcm
 Data Acquired : 11.02.2016 18:59:19
 Data Processed : 11.02.2016 19:19:21
 Sample Comments : dissolved in water

Mobile Phase A: water (0.1% TFA)
 Mobile Phase B: acetonitrile (0.1% TFA)
 Mobile Phase C:
 Mobile Phase D:
 Pump Total Flow: 0.3000 mL/min
 Oven Temperature: 25 C
 <<LC Program>>

Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий
0.01	Насосы	B.Cone	5	
0.01	Насосы	T.Flow	0.3	
15.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Контроллер	Stop		

Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm
 Manufacturer: YMC
 Column description:
 COMMENTS
 Phase A: 0.1% TFA in water
 Phase B: 0.1% TFA in ACN



PDA Ch1 214nm 4nm

Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	12.706	0.000	0.166	172834	1.054
2	13.433	1.439	0.125	2169099	13.230
3	15.167	0.000	0.152	256137	1.562
4	16.603	1.489	0.170	322191	1.965
5	17.336	1.307	0.122	12729608	77.641
6	17.934	1.425	0.107	643142	3.923
7	19.229	1.442	0.121	102534	0.625
Общий				16395544	100.000

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

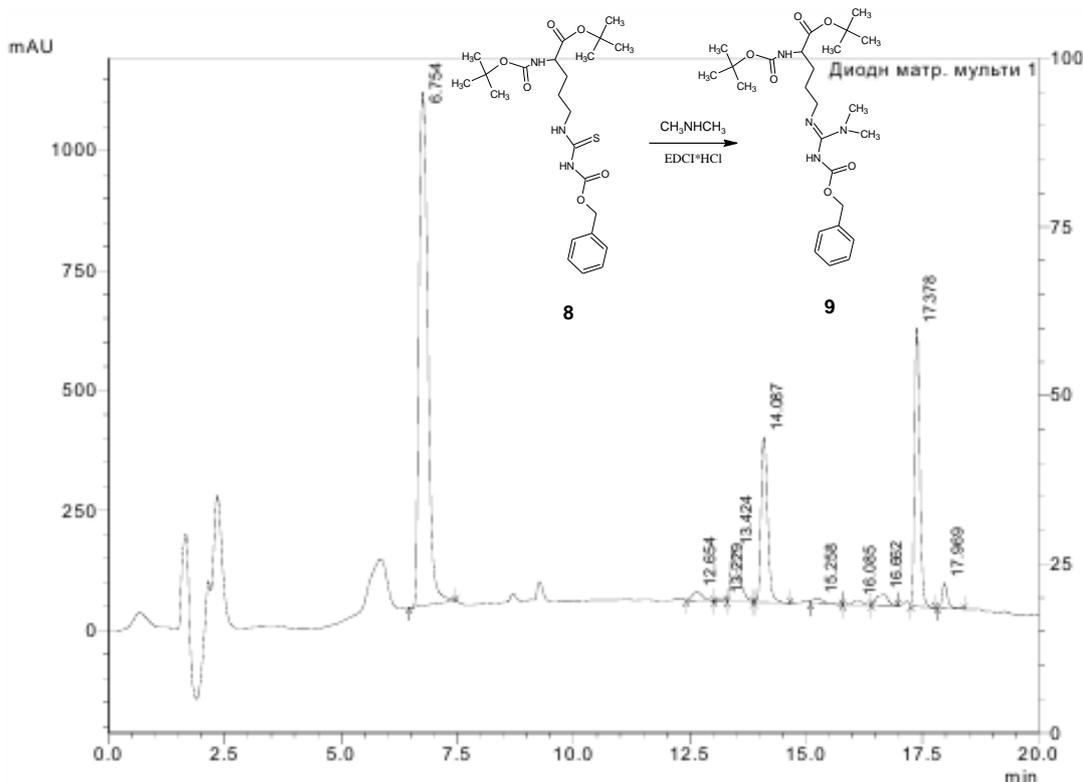
C:\LabSolutions\Data\Sergey\Boc-Cyt(SZ)-OBu +EDC+Me2NH 0 h.tad
 Acquired by : Admin
 Sample Name : Boc-Cyt(SZ)-OBu +EDC+Me2NH 0 h
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : Boc-Cyt(SZ)-OBu +EDC+Me2NH 0 h.tad
 Method File Name : 0.3mL_5-95B.lcm
 Data Acquired : 18.02.2016 16:07:47
 Data Processed : 20.02.2016 16:54:24
 Sample Comments : dissolved in water

Mobile Phase A: water (0.1% TFA)
 Mobile Phase B: acetonitrile (0.1% TFA)
 Mobile Phase C:
 Mobile Phase D:
 Pump Total Flow: 0.3000 mL/min
 Oven Temperature: 25 C
 <<LC Program>>

Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий
0.01	Насосы	B.Cone	5	
0.01	Насосы	T.Flow	0.3	
15.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Контроллер	Stop		

Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm
 Manufacturer: YMC
 Column description:

COMMENTS
 Phase A: 0.1% TFA in water
 Phase B: 0.1% TFA in ACN

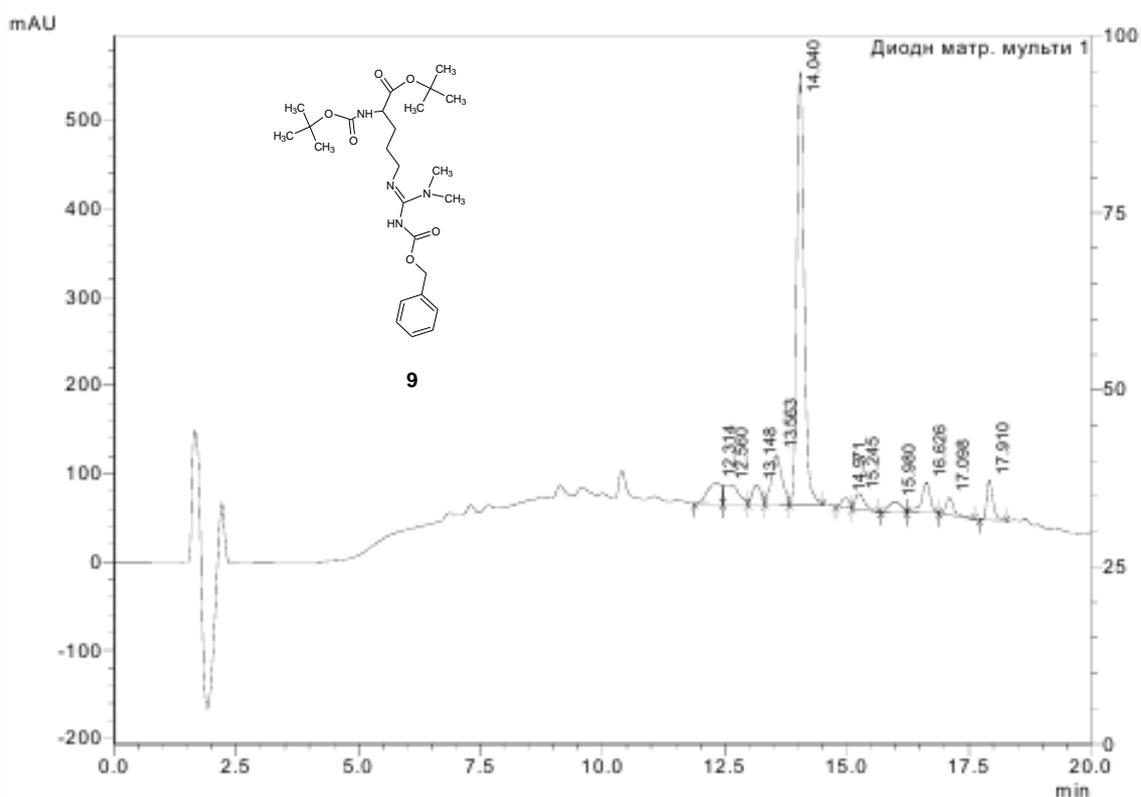


PDA Ch1 214nm 4nm

Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	6.754	1.388	0.207	14085947	56.762
2	12.654	0.000	0.257	339975	1.370
3	13.229	0.000	0.000	102139	0.412
4	13.424	0.000	0.165	1363298	5.494
5	14.087	1.355	0.151	3380040	13.621
6	15.258	0.000	0.000	180636	0.728
7	16.085	0.000	0.229	139815	0.563
8	16.662	0.994	0.275	362147	1.459
9	17.378	1.311	0.119	4456783	17.960
10	17.969	1.473	0.114	404870	1.632
Общий				24815651	100.000

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

<p>C:\...Data\Sergey\Boc-Cyt(SZ)-OBu +EDC+Me2NH 21 h worked up.lcd Acquired by : Admin Sample Name : Boc-Cyt(SZ)-OBu +EDC+Me2NH 21 h worked up Injection Volume : 5 µL Data File Name : Boc-Cyt(SZ)-OBu +EDC+Me2NH 21 h worked up.lcd Method File Name : 0,3mL_5-95B.lcm Data Acquired : 19.02.2016 14:30:39 Data Processed : 19.02.2016 14:50:42 Sample Comments : dissolved in water</p> <p>Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm Manufacturer: YMC Column description: COMMENTS Phase A: 0.1% TFA in water Phase B: 0.1% TFA in ACN</p>	<p>Mobile Phase A: water (0.1% TFA) Mobile Phase B: acetonitrile (0.1% TFA) Mobile Phase C: Mobile Phase D: Pump Total Flow: 0.3000 mL/min Oven Temperature: 25 C <<LC Program>></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: small;"> <thead> <tr> <th>Время</th> <th>Блок</th> <th>Команда</th> <th>Значение</th> <th>Комментарий</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.01</td> <td>Насосы</td> <td>B.Cone</td> <td>5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>0.01</td> <td>Насосы</td> <td>T.Flow</td> <td>0.3</td> <td></td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>Насосы</td> <td>B.Cone</td> <td>95</td> <td></td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>Насосы</td> <td>B.Cone</td> <td>95</td> <td></td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>Контролер</td> <td>Stop</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий	0.01	Насосы	B.Cone	5		0.01	Насосы	T.Flow	0.3		15.00	Насосы	B.Cone	95		20.00	Насосы	B.Cone	95		20.00	Контролер	Stop		
Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий																											
0.01	Насосы	B.Cone	5																												
0.01	Насосы	T.Flow	0.3																												
15.00	Насосы	B.Cone	95																												
20.00	Насосы	B.Cone	95																												
20.00	Контролер	Stop																													



PDA Ch1 214nm 4nm

Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	12.314	0.000	0.000	477687	5.424
2	12.560	0.000	0.000	459848	5.222
3	13.148	0.000	0.211	273640	3.107
4	13.563	0.000	0.225	830523	9.431
5	14.040	1.285	0.161	5119514	58.132
6	14.971	0.000	0.214	122397	1.390
7	15.245	0.000	0.205	231865	2.633
8	15.980	0.000	0.316	223790	2.541
9	16.626	0.000	0.171	441238	5.010
10	17.098	1.859	0.155	219243	2.489
11	17.910	1.661	0.133	406969	4.621
Общий				8806714	100.000

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

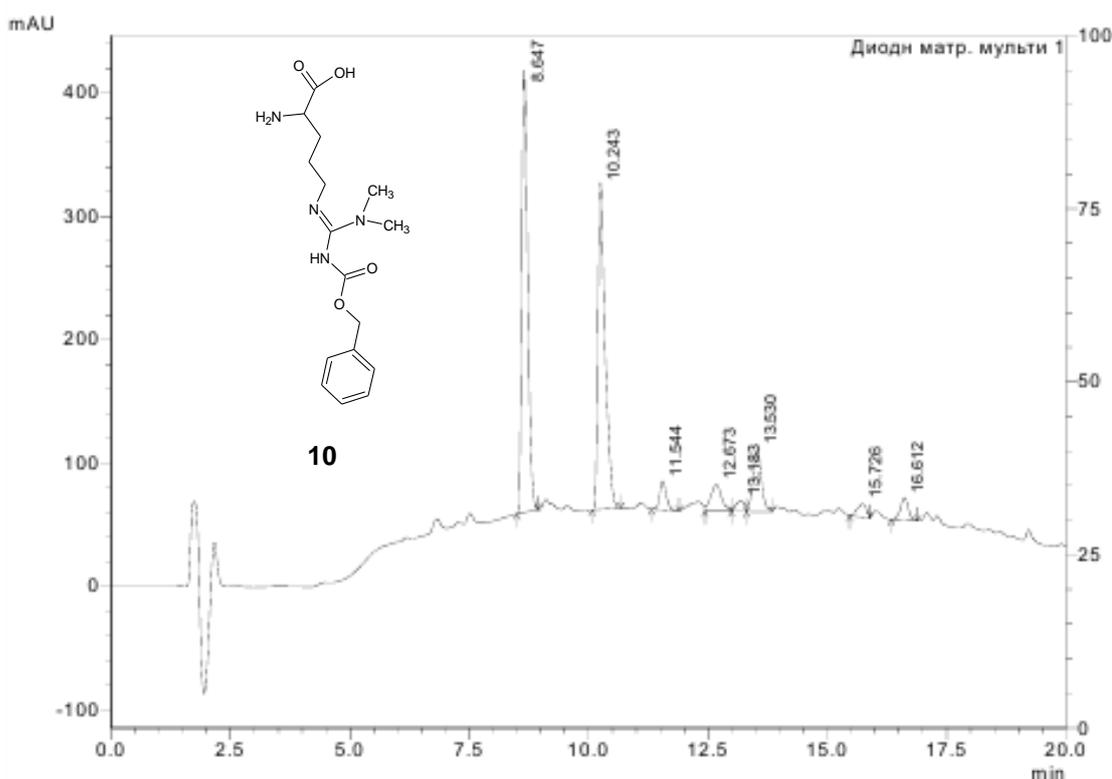
C:\LabSolutions\Data\Sergey\Arg (d1Me) z OH TFA 1h 40 min.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : Arg (d1Me) z OH TFA 1h 40 min
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : Arg (d1Me) z OH TFA 1h 40 min.lcd
 Method File Name : 0.3mL_5-95B.lcm
 Data Acquired : 19.02.2016 17:41:59
 Data Processed : 19.02.2016 18:02:01
 Sample Comments : dissolved in water

Mobile Phase A: water (0.1% TFA)
 Mobile Phase B: acetonitrile (0.1% TFA)
 Mobile Phase C:
 Mobile Phase D:
 Pump Total Flow: 0.3000 mL/min
 Oven Temperature: 25 C
 <<LC Program>>

Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm
 Manufacturer: YMC
 Column description:

Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий
0.01	Насосы	B.Cone	5	
0.01	Насосы	T.Flow	0.3	
15.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Насосы	B.Cone	95	
20.00	Контроллер	Stop		

COMMENTS
 Phase A: 0.1% TFA in water
 Phase B: 0.1% TFA in ACN

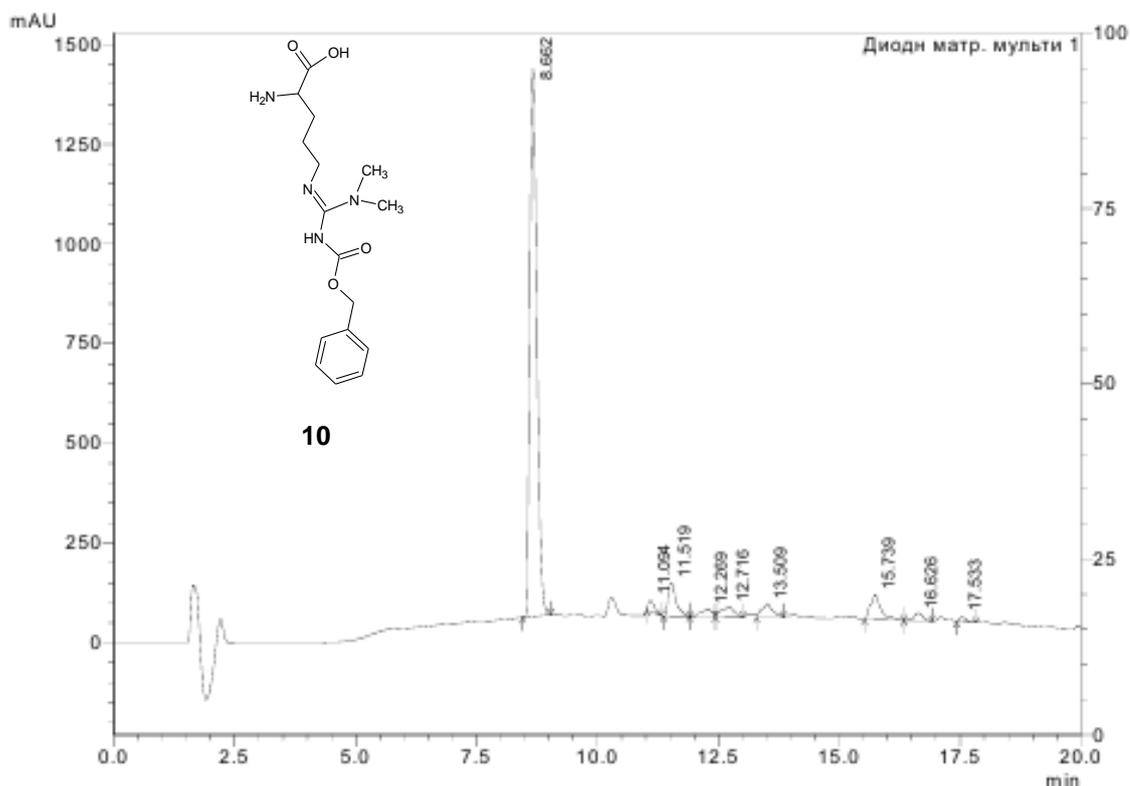


PDA Ch1 214nm 4nm

Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	8.647	1.473	0.135	3088332	41.038
2	10.243	1.805	0.155	2783585	36.989
3	11.544	1.235	0.144	224070	2.977
4	12.673	0.000	0.242	346584	4.605
5	13.183	0.000	0.000	113090	1.503
6	13.530	0.000	0.180	615484	8.179
7	15.726	0.000	0.234	143492	1.907
8	16.612	0.967	0.171	210857	2.802
Общий				7525495	100.000

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

<p>C:\LabSolutions\Data\Sergay\Arg (diMe) z OH TFA 1 day +10ml TFA.lod Acquired by : Admin Sample Name : Arg (diMe) z OH TFA 1 day +10ml TFA Injection Volume : 5 uL Data File Name : Arg (diMe) z OH TFA 1 day +10ml TFA.lod Method File Name : 0.3mL_5-95B.lcm Data Acquired : 20.02.2016 14:04:13 Data Processed : 20.02.2016 14:24:15 Sample Comments : dissolved in water</p> <p>Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm Manufacturer: YMC Column description: COMMENTS Phase A: 0.1% TFA in water Phase B: 0.1% TFA in ACN</p>	<p>Mobile Phase A: water (0.1% TFA) Mobile Phase B: acetonitrile (0.1% TFA) Mobile Phase C: Mobile Phase D: Pump Total Flow: 0.3000 mL/min Oven Temperature: 25 C <<LC Program>></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; font-size: small;"> <thead> <tr> <th>Время</th> <th>Блок</th> <th>Команда</th> <th>Значение</th> <th>Комментарий</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.01</td> <td>Насосы</td> <td>B.Cone</td> <td>5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>0.01</td> <td>Насосы</td> <td>T.Flow</td> <td>0.3</td> <td></td> </tr> <tr> <td>15.00</td> <td>Насосы</td> <td>B.Cone</td> <td>95</td> <td></td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>Насосы</td> <td>B.Cone</td> <td>95</td> <td></td> </tr> <tr> <td>20.00</td> <td>Контроллер</td> <td>Stop</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий	0.01	Насосы	B.Cone	5		0.01	Насосы	T.Flow	0.3		15.00	Насосы	B.Cone	95		20.00	Насосы	B.Cone	95		20.00	Контроллер	Stop		
Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий																											
0.01	Насосы	B.Cone	5																												
0.01	Насосы	T.Flow	0.3																												
15.00	Насосы	B.Cone	95																												
20.00	Насосы	B.Cone	95																												
20.00	Контроллер	Stop																													

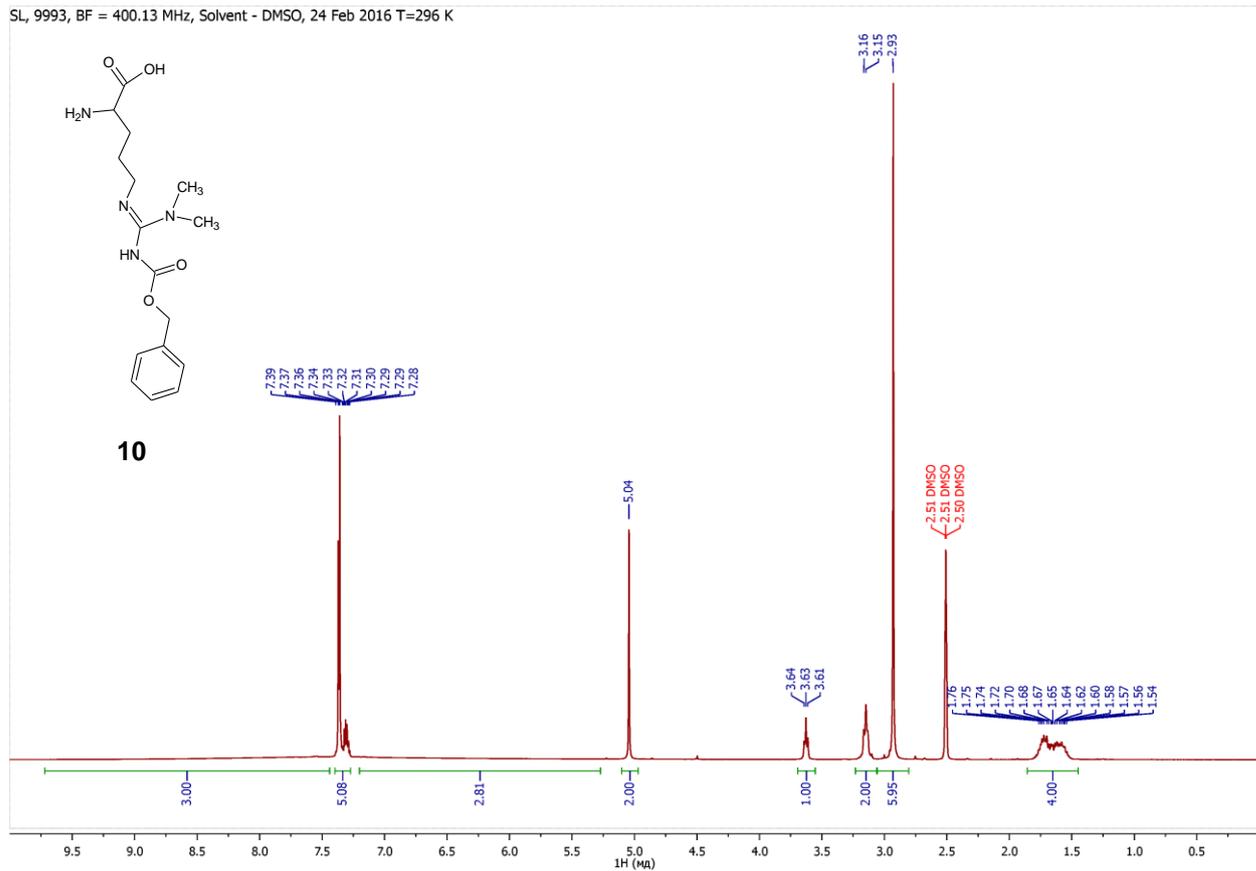


PDA Ch1 214nm 4nm

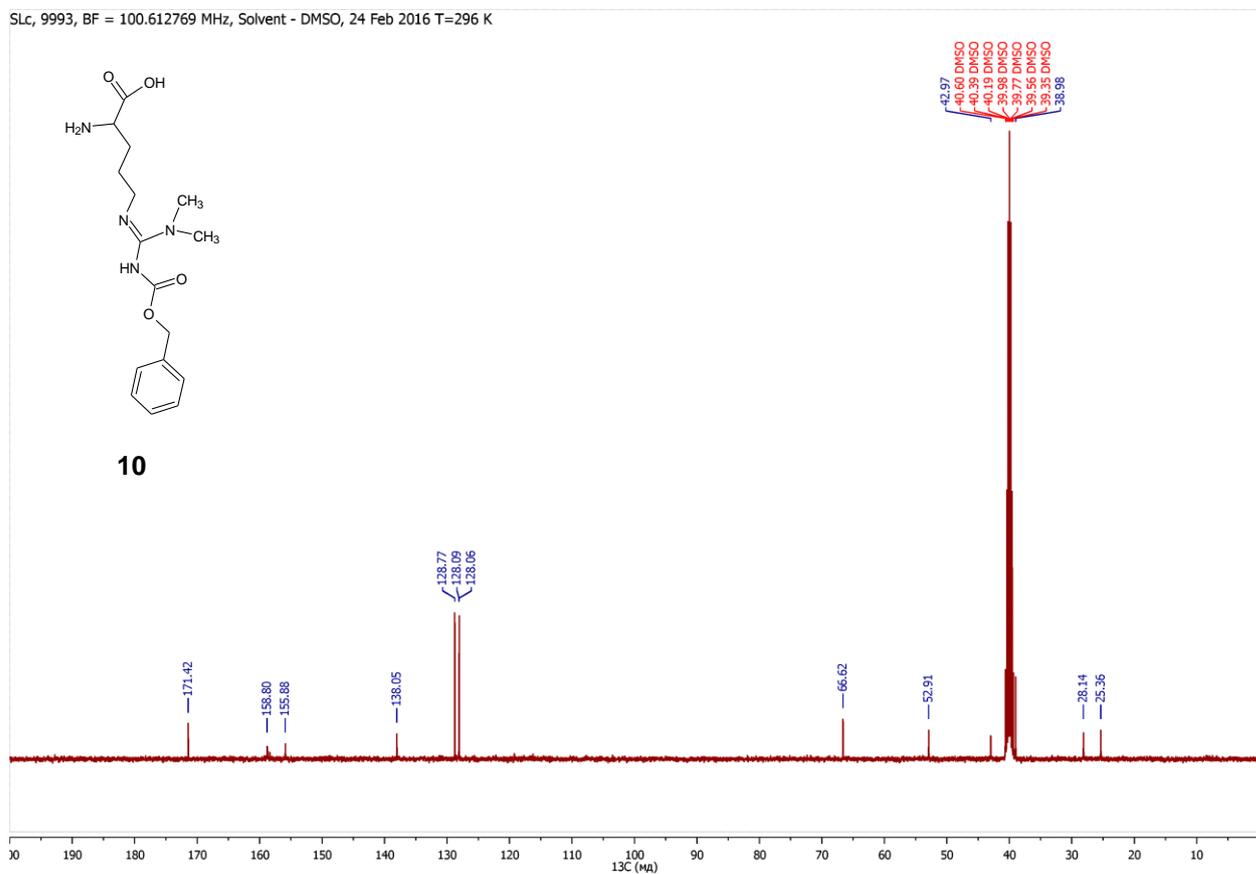
Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	8.662	1.366	0.161	14018725	78.688
2	11.094	1.697	0.147	237609	1.334
3	11.519	1.879	0.165	953263	5.351
4	12.269	0.000	0.000	330062	1.853
5	12.716	0.000	0.313	461979	2.593
6	13.509	0.000	0.246	525947	2.952
7	15.739	1.748	0.230	934283	5.244
8	16.626	0.992	0.193	244408	1.372
9	17.533	1.627	0.144	109200	0.613
Общий				17815476	100.000

Приложение 11

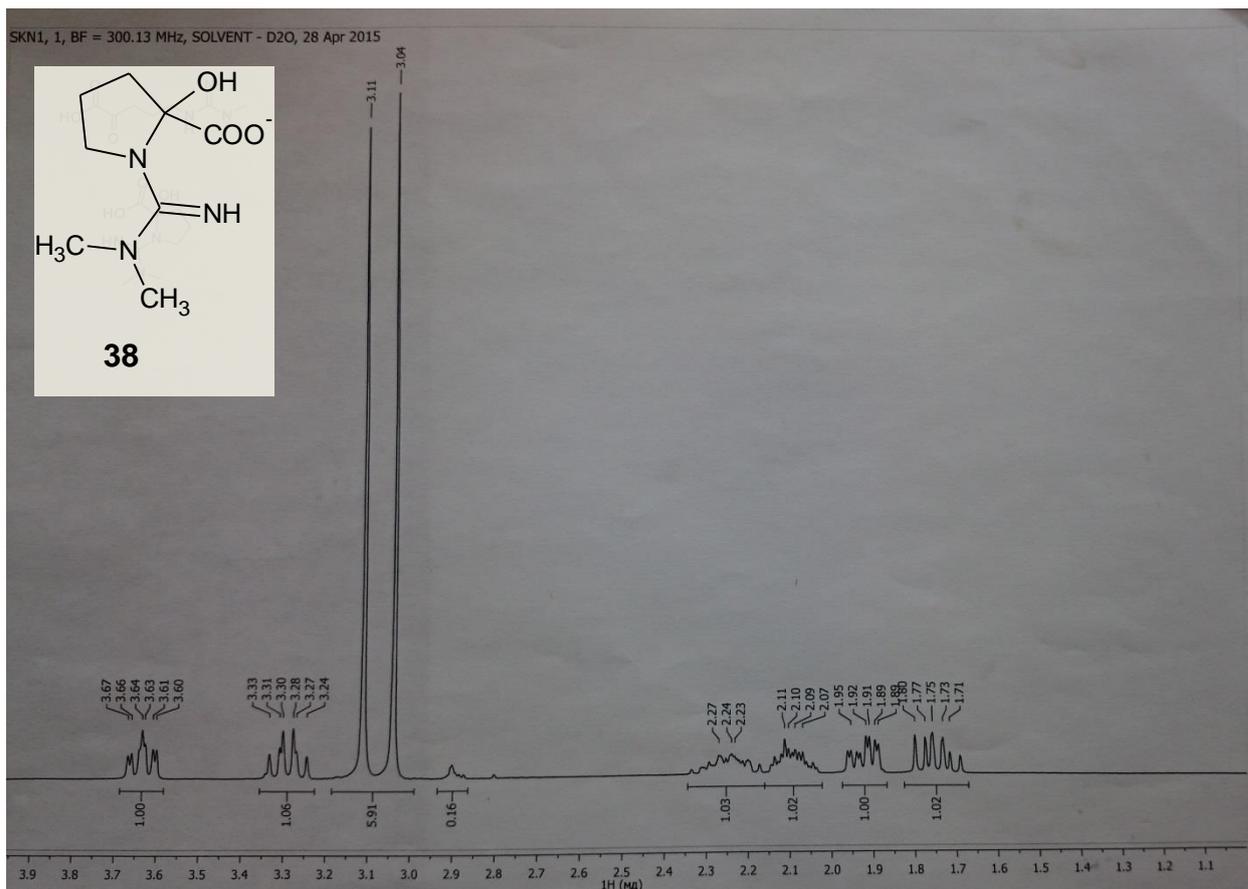
SL, 9993, BF = 400.13 MHz, Solvent - DMSO, 24 Feb 2016 T=296 K



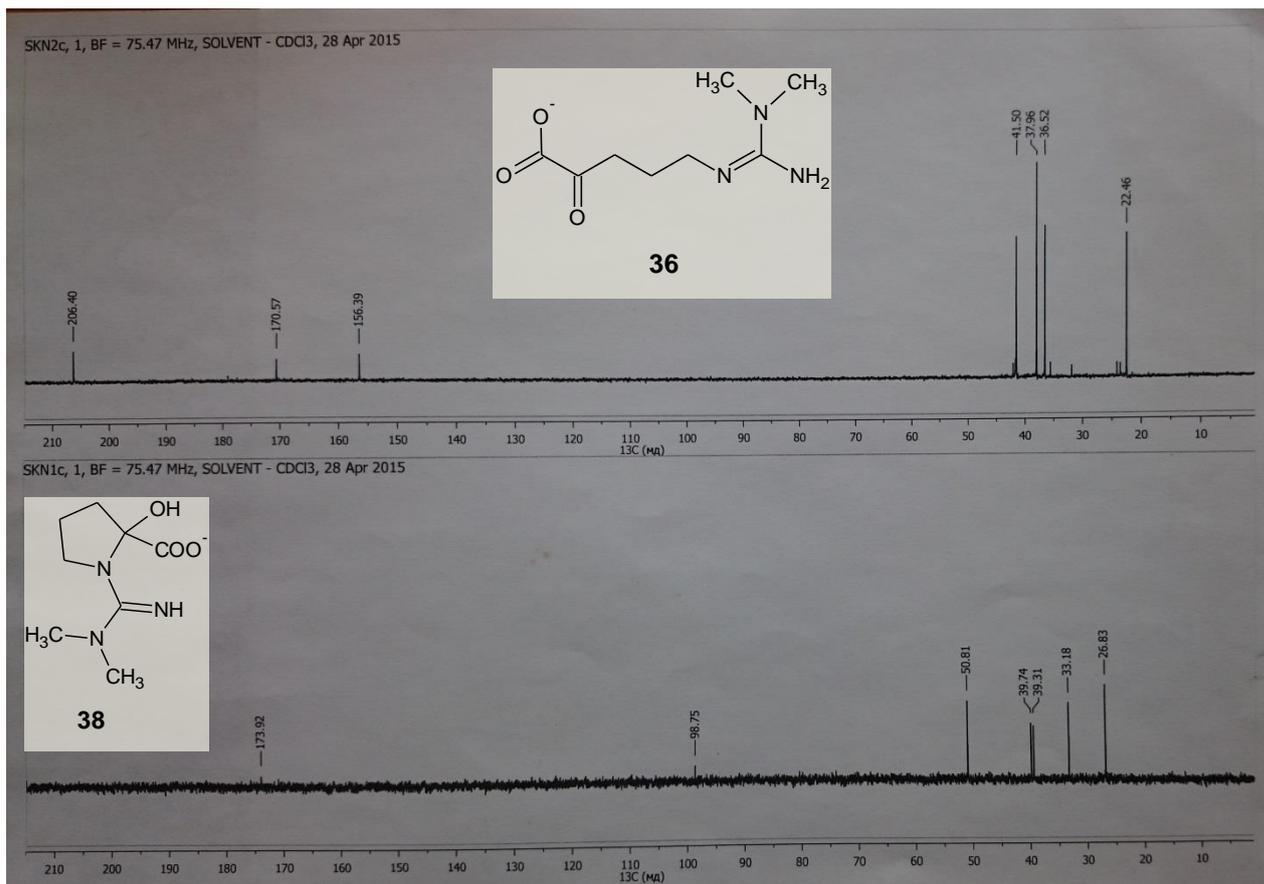
SLC, 9993, BF = 100.612769 MHz, Solvent - DMSO, 24 Feb 2016 T=296 K



Приложение 12



Приложение 13



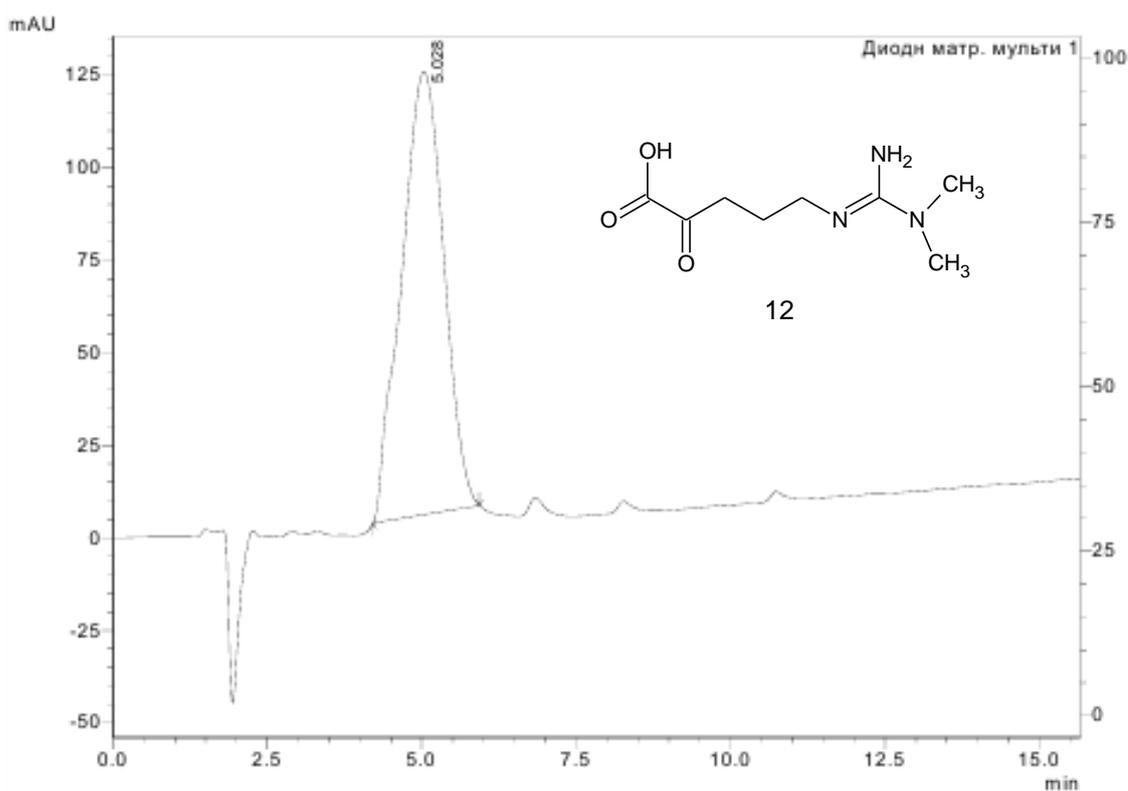
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Sergey\alpha keto Arg (dMe) OH 1P 4-10.Jod
 Acquired by : Admin
 Sample Name : a keto Arg (dMe) OH 1P 4-10
 Injection Volume : 5 uL
 Data File Name : a keto Arg (dMe) OH 1P 4-10.Jod
 Method File Name : 2-12_20min_0,3ml.lcm
 Data Acquired : 17.03.2016 15:21:18
 Data Processed : 17.03.2016 15:37:01
 Sample Comments : dissolved in water

Mobile Phase A:
 Mobile Phase B:
 Mobile Phase C:
 Mobile Phase D:
 Pump Total Flow: 0.3000 mL/min
 Oven Temperature: 25 C
 <<LC Program>>

Время	Блок	Команда	Значение	Комментарий
0.01	Насосы	B.Cone	2	
0.01	Насосы	T.Flow	0.3	
20.00	Насосы	B.Cone	12	
25.00	Насосы	B.Cone	95	
25.00	Контролер	Stop		

Column: YMC-Triart C18 3u 2.0 x 150 mm
 Manufacturer: YMC
 Column description:
 COMMENTS
 Phase A: 0.1% TFA in water
 Phase B: 0.1% TFA in ACN



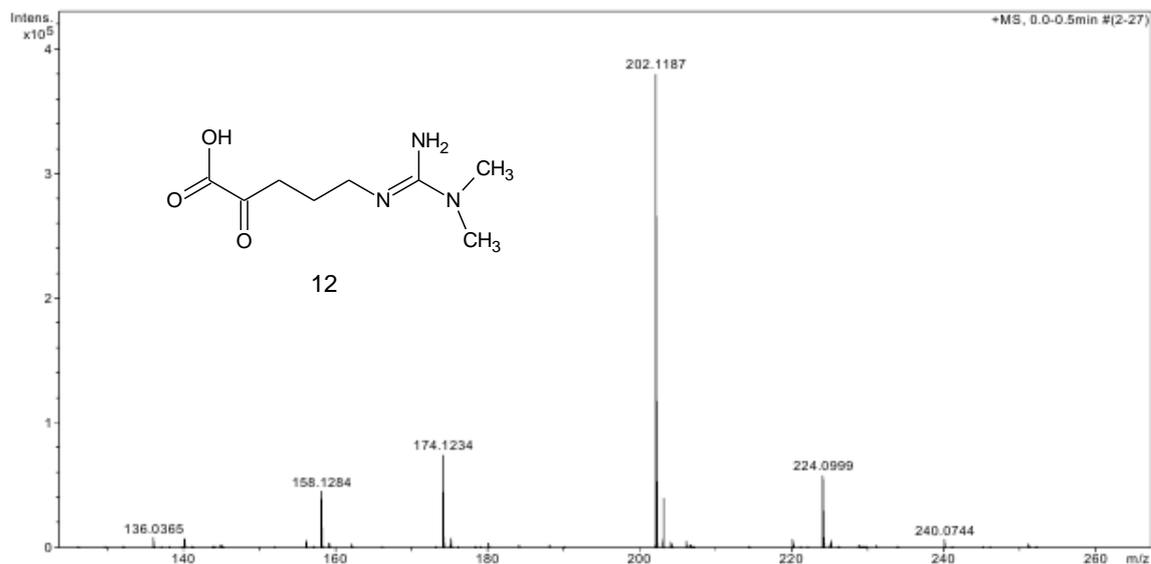
PDA Ch1 214nm 4nm

Пик#	Время удерживания	Фактор асимметрии	Ширина на 50% высоты	Площадь	Площадь%
1	5.028	0.997	0.746	5703735	100.000
Общий				5703735	100.000

Mass Spectrum Report

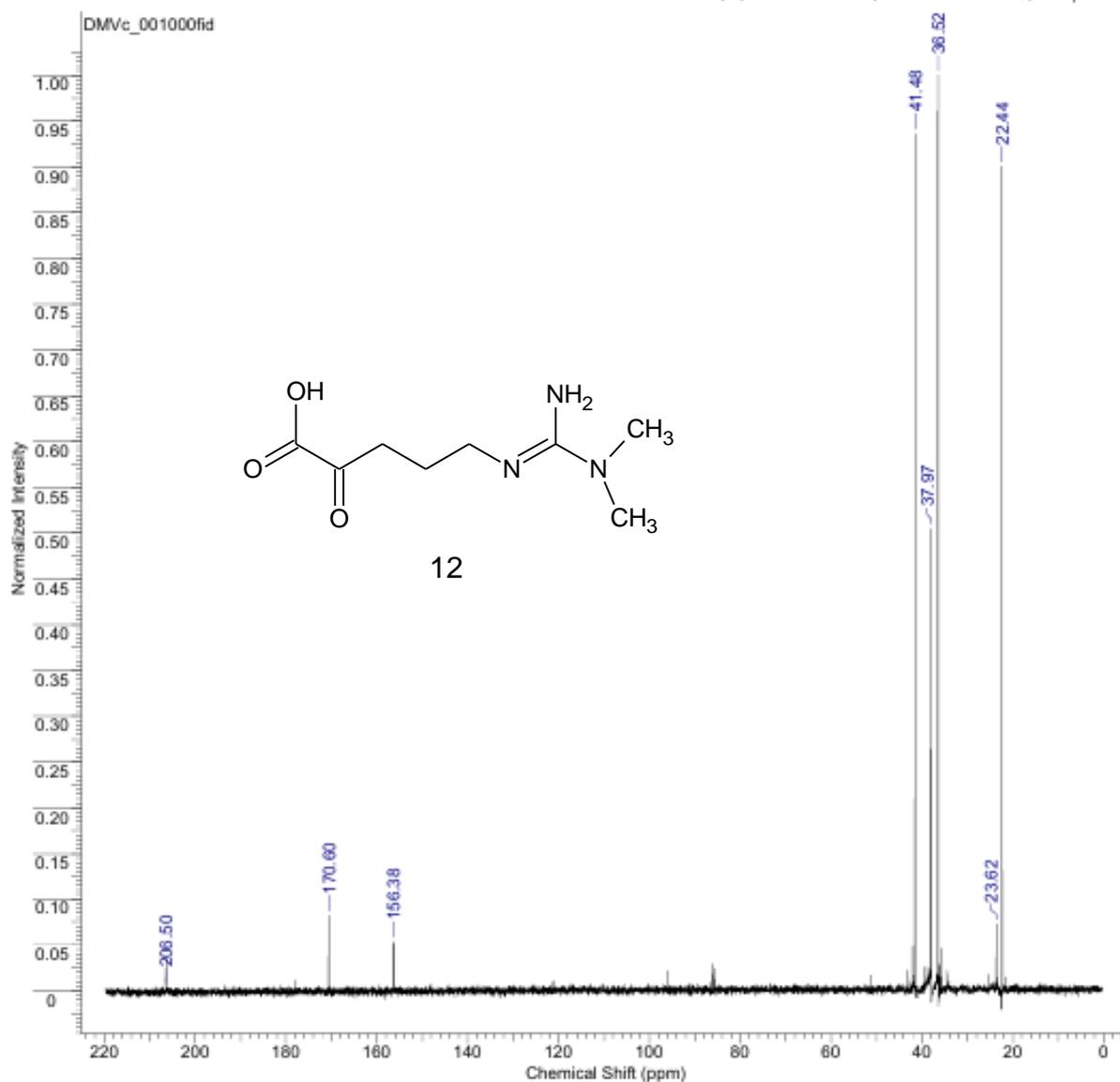
Analysis Info		Acquisition Date	25.03.2016 16:50:46
Analysis Name	D:\Data\march 2016\N4.d	Operator	Bruker Customer
Method Name	tune_low.m	Instrument / Ser#	micrOTOF 10223
Sample Name	N4		
Comment	H2O+AcN 150v		

Acquisition Parameter					
Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3000 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source



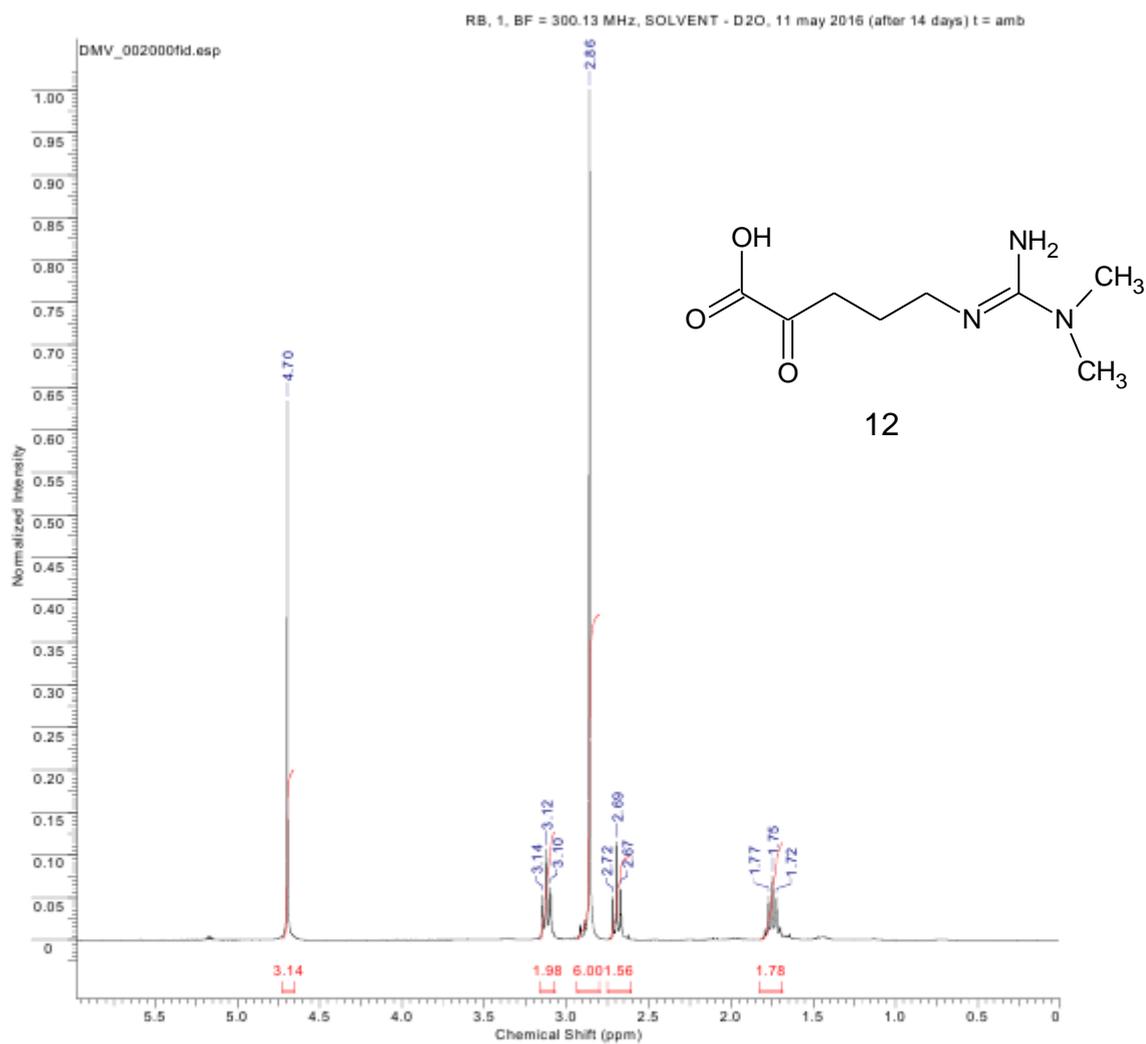
Приложение 16

SKN1c, 1, BF = 75.47 MHz, SOLVENT - CDCl3, 28 Apr 2015



No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	22.44	1693.5	0.9008
2	23.62	1782.4	0.0734
3	36.52	2756.6	1.0000
4	37.97	2865.7	0.5052
5	41.48	3130.4	0.9364
6	156.38	11802.7	0.0538
7	170.60	12875.9	0.0827
8	206.50	15586.1	0.0024

Приложение 17



No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	1.72	517.2	0.0505
2	1.75	524.3	0.0754
3	1.77	531.3	0.0514
4	2.67	801.4	0.0600
5	2.69	808.4	0.1160
6	2.72	815.4	0.0510
7	2.86	858.4	1.0000
8	3.10	929.7	0.0615
9	3.12	936.7	0.1066
10	3.14	943.7	0.0532
11	4.70	1410.0	0.6338