

## Синтез О-тирозинфосфорилированных аддуктов различных производных метилфосфоновой и фосфорной кислот в качестве соединений сравнения для анализа биомедицинских проб

В.И. Крылов, И.И. Крылов, В.А. Яшкир, И.В. Рыбальченко

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации,  
105005, Российская Федерация, г. Москва, Бригадирский переулок, д. 13

Поступила 29.01.2019 г. Принята к публикации 17.06.2019 г.

Фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ) включены в 1-й Список Приложения по химикатам Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении (КХО). Для контроля за соблюдением КХО необходимы методы, позволяющие ретроспективно установить факт воздействия ФОВ на людей. Характерными долгоживущими биомаркерами экспонирования к ФОВ являются продукты фосфорилирования тирозина, которые могут образовываться в организме человека при поражении заринном, зоманом, табуном и V-газами американского, российского и китайского производства. Нами разработаны способы синтеза и выделения тирозиновых аддуктов производных метилфосфоновой и фосфорной кислот, используемых в качестве образцов сравнения. Схема синтеза включает последовательную защиту карбоксильной и аминной групп тирозина, его О-фосфорилирование соответствующими алкилфосфонатами и фосфатами, очистка от примесей методом колоночной хроматографии ( $\text{SiO}_2$ , элюент – хлористый метилен/этилацетат 1:1), снятие защитных групп с выделением соответствующих О-фосфорилированных тирозиновых аддуктов. После колоночной хроматографии выделены продукты с чистотой более 90 %, что позволило вовлекать их в дальнейшие превращения с использованием катализатора без угрозы его «отравления». Бензил- и карбоксибензильную защиту фосфорилированных L-тирозинов (12–17) снимали с помощью каталитического гидрирования молекулярным водородом при атмосферном давлении. Целевые аддукты фосфорилирующих реагентов и L-тирозина были получены с выходами 63–82 % в виде кристаллических белых веществ, легко растворимых в воде и этаноле, плохо – в хлористом метиле и ацетонитриле.

**Ключевые слова:** аддукт; биомаркер; колоночная хроматография; синтез; тирозин; фосфорилирование; фосфорорганические отравляющие вещества; ЯМР спектроскопия.

**Библиографическое описание:** Крылов В.И., Крылов И.И., Яшкир В.А., Рыбальченко И.В. Синтез О-тирозинфосфорилированных аддуктов различных производных метилфосфоновой и фосфорной кислот в качестве соединений сравнения для анализа биомедицинских проб // Вестник войск РХБ защиты. 2019. Т. 3. № 2. С. 103–110.

Фосфорорганические отравляющие вещества (ФОВ) включены в 1-й Список Приложения по химикатам Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении (КХО)<sup>1</sup> и подлежат строгому контролю в отношении запрещения их разработки, производства, накопления

<sup>1</sup> Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении. ООН, Женева, 1993.

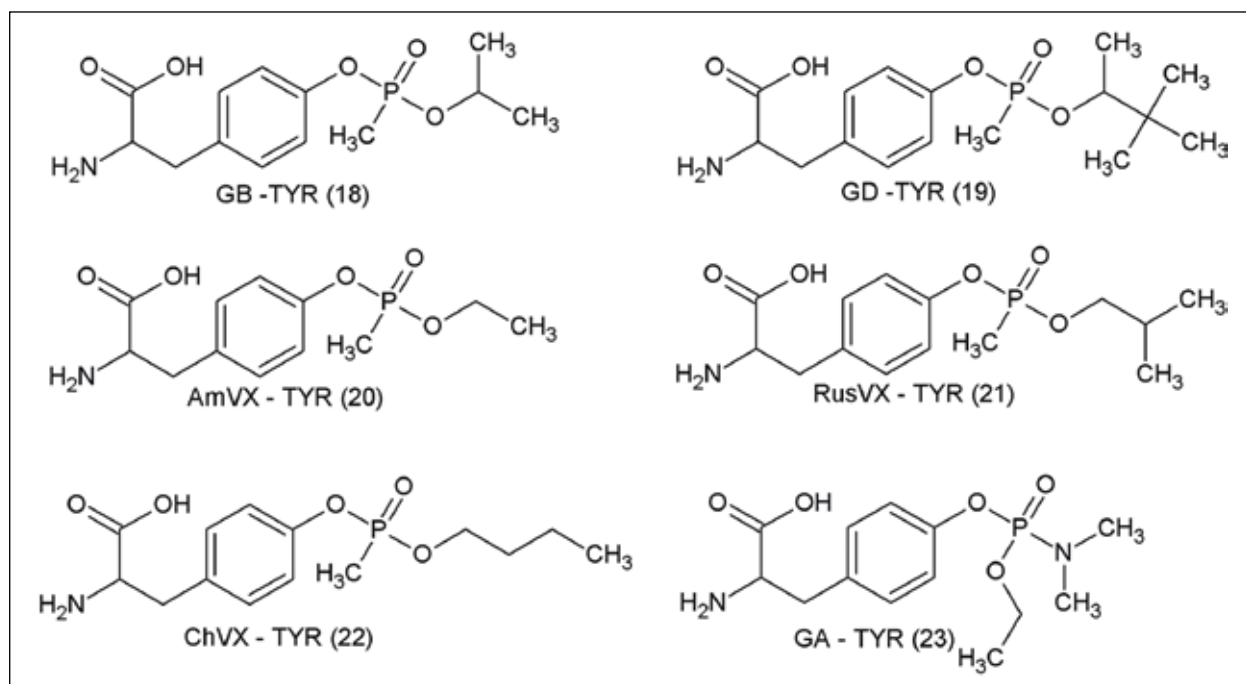


Рисунок 1 – Аддукты фосфорилирования тирозина

и применения. При осуществлении всеобъемлющего контроля за соблюдением КХО в последние годы особое значение придается методам аналитического контроля биомедицинских проб<sup>2</sup> [1, 2], источником которых являются люди и (или) животные и которые считаются наиболее информативными при установлении ретроспективного воздействия ФОВ на организм.

Веществами или биомаркерами, подтверждающими факт воздействия ФОВ на людей и животных, рекомендуется считать как свободные метаболиты этих ОВ, так и их аддукты с ДНК и аминокислотами плазмы крови. В частности, показано [1], что характерными долгоживущими биомаркерами ФОВ являются продукты фосфорилирования тирозина (рисунок 1), наличие которых в биомедицинских пробах однозначно свидетельствует о поражении организма и может быть зафиксировано методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в комбинации с тандемной масс-спектрометрией [3, 4]. Вместе с тем, для достоверной идентификации данных аддуктов указанным методом требуется использование соединений сравнения.

Цель работы – синтез фосфорилированных производных тирозина, которые могут образовываться в организме при поражении заринном, зоманом, табуном и V-газами американского, российского и китайского производства.

Исходя из анализа данных источников [5–8], нами предложена схема синтеза (рисунок 2), включающая последовательную защиту карбоксильной и аминной групп тирозина, его О-фосфорилирования соответствующими алкилфосфонатами и фосфатами, снятие защитных групп с выделением соответствующих О-фосфорилированных тирозиновых аддуктов [8]. Защиту L-тирозина (1) осуществляли в две стадии. На первом этапе L-тирозин (1) обрабатывали бензиловым спиртом (2) в присутствии стехиометрического количества *p*-толуолсульфокислоты, получали бензиловый эфир L-тирозина в виде соли (*p*-толуолсульфоната) (3) с выходом 85 % от теоретического.

Далее при взаимодействии полученной соли (3) с карбоксибензилхлоридом (4) в присутствии двух эквивалентов триэтиламина в метаноле при 0 °С получили бензиловый эфир N-карбоксибензил-L-тирозина (5) в виде белого кристаллического вещества (из гексан/этанол 2:1) с выходом 80 % от расчетного.

Соответствующие O-алкилметилхлорфосфонаты (6–10) и O-этил-N,N-диметиламидохлорфосфат (11) были получены по известным методикам [9–11].

Фосфорилирование бензинового эфира N-карбоксибензил-L-тирозина (5) O-алкилметилхлорфосфонатами (6–10) и O-этил-N,N-диметиламидохлорфосфатом (11) для повышения выходов реакций проводили при предвари-

<sup>2</sup> Там же

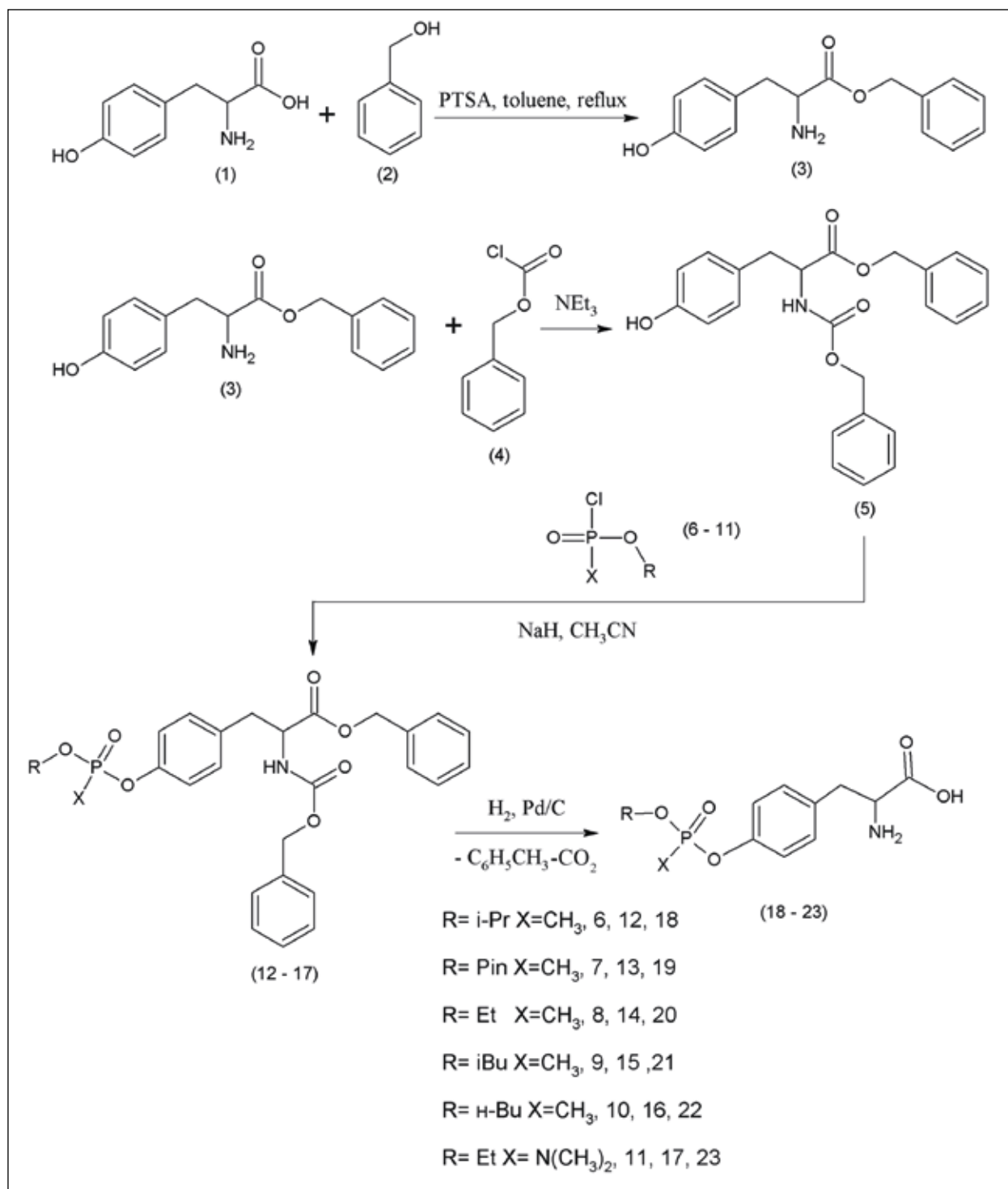


Рисунок 2 – Схема поэтапного синтеза целевых продуктов

тельной обработке (5) гидридом натрия в ацетонитриле. По результатам ТСХ и данным ЯМР спектроскопии, полученные в результате реакций фосфорилированные бензиловые эфиры N-карбоксибензил-L-тирозина (12–17) в виде вязких жидкостей содержат много примесей. Нами была разработана методика их очистки методом колоночной хроматографии ( $\text{SiO}_2$ ,

элюент – хлористый метилен/этилацетат 1:1). Во всех случаях были выделены продукты с чистотой более 90 %, что позволило вовлекать их в дальнейшие превращения с использованием катализатора без угрозы его «отравления».

На последней стадии бензил- и карбоксибензильную защиту фосфорилированных L-тирозинов (12–17) снимали с помощью ката-

литического (10 % Pd на активированном угле) гидрирования молекулярным водородом при атмосферном давлении. Целевые аддукты фосфорилирующих реагентов и L-тирозина (GB-TYR (18); GD-TYR (19); AmVX-TYR (20); RusVX-TYR (21); ChVX-TYR (22); GA-TYR (23)) были получены с выходами 63–82 % в виде кристаллических белых веществ, легко растворимых в воде и этаноле, плохо – в хлористом метиле и ацетонитриле.

#### Экспериментальная часть

Регистрацию  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  ЯМР спектров проводили на спектрометре AgilentDD2 NMRSystem 600 при температуре 20 °С. Частота регистрации спектров  $^1\text{H}$  600 МГц и  $^{31}\text{P}$  242,88 МГц. Шкалу для протонных экспериментов градуировали по отношению к сигналу соответствующего дейтерорастворителя, для экспериментов  $^{31}\text{P}$  по отношению к внутреннему стандарту (фосфорная кислота). Текущий контроль осуществлялся с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Marchery-Nagel AlugramSILG/UV254, детектирование проводили на УФ облучателе Ультрамаг-K3254/365 при длине волны 254 нм.

*n*-Толуолсульфонат бензилового эфира L-тирозина (3)

Смесь 10 г (0,055 моль) L-тирозина (1), 25 мл бензилового спирта (2), 120 мл толуола и 12,6 г (0,066 моль) моногидрата *n*-толуолсульфокислоты кипятили 7 ч в колбе, снабженной насадкой Дина-Старка, до полного отделения воды. Смесь охлаждали до комнатной температуры, осадок фильтровали, промывали диэтиловым эфиром, сушили на воздухе и перекристаллизовывали из этанола. Выход (3) составил 20,7 г (85 % от теоретического) в виде белого кристаллического вещества.

Бензиловый эфир *N*-карбоксивензил-L-тирозина (5)

Растворяли 10,9 г (0,0246 моль) (3) в 100 мл метанола, добавляли 5 г (0,0495 моль) триэтиламина, охлаждали до температуры 0 °С и прибавляли 4,2 г (0,0246 моль) карбоксивензилхлорида. Смесь перемешивали 8 ч при 0 °С, отогревали до комнатной температуры, выливали в 100 мл воды, экстрагировали диэтиловым эфиром (3×100 мл), промывали экстракт водой, насыщенным раствором NaCl, сушили над  $\text{MgSO}_4$  и концентрировали при пониженном давлении. Остаток перекристаллизовывали из смеси гексан-этанол (2:1), получили 7,93 г (80 % от теоретического) (5) в виде легкоплавких ( $T_{\text{пл}}=102\text{--}104$  °С) белых кристаллов.

Общая методика получения *O*-алкилметилхлорфосфонатов (6–10)

В четырехгорлую колбу емкостью 500 мл, снабженную мешалкой, термометром, капельной

воронкой, хлоркальциевой трубкой и помещенную в охлаждающую баню (температура минус 5 °С), помещали 20,4 г (0,153 моль) метилдихлорфосфоната в 250 мл сухого диэтилового эфира. Из капельной воронки при интенсивном перемешивании, медленно, при 0 °С, прибавляли смесь 0,15 моль соответствующего сухого спирта, 15,5 г (0,153 моль) триэтиламина и 150 мл сухого диэтилового эфира. После прибавления реакционную смесь перемешивали 2 ч при комнатной температуре и оставляли на ночь. Хлоргидрат триэтиламина отделяли, фильтрат упаривали, выдерживали при пониженном давлении (15 мм рт. ст.) при 40 °С 20 мин, переносили в прибор для перегонки в вакууме и перегоняли 3 раза, собирая каждый раз фракцию с постоянной температурой кипения. В результате получили в виде бесцветных жидкостей:

*O*-изопропилметилхлорфосфонат (6) 13,15 г (56 % от теоретического) с  $T_{\text{кип}} = 54\text{--}56$  °С при 5 мм рт. ст.,  $n_{\text{D}}^{20}=1,3340$ .

*O*-пинаколилметилхлорфосфонат (7) 23,7 г (78 % от теоретического) с  $T_{\text{кип}} = 82\text{--}84$  °С при 5 мм рт. ст.,  $n_{\text{D}}^{20}=1,3440$ .

*O*-этилметилхлорфосфонат (8) 14,4 г (66 % от теоретического) с  $T_{\text{кип}} = 64\text{--}66$  °С при 10 мм рт. ст.,  $n_{\text{D}}^{20}=1,3460$ .

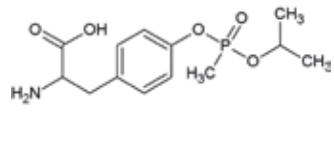
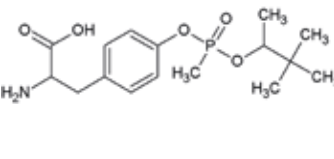
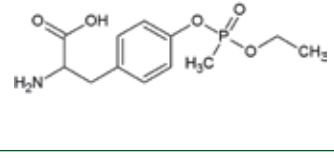
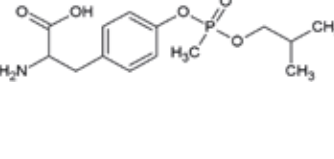
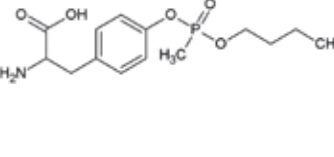
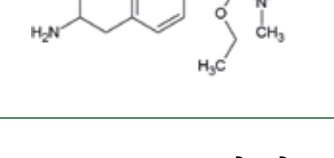
*O*-изобутилметилхлорфосфонат (9) 20,1 г (77 % от теоретического) с  $T_{\text{кип}} = 74\text{--}76$  °С при 5 мм рт.ст.,  $n_{\text{D}}^{20}=1,3340$ .

*O*-*n*-бутилметилхлорфосфонат (10) 12 г (56 % от теоретического) с  $T_{\text{кип}} = 80\text{--}82$  °С при 5 мм рт. ст.,  $n_{\text{D}}^{20}=1,3382$ .

*O*-этил-*N,N*-диметиламидохлорфосфат (11)

В капельную воронку помещали раствор 2,3 г (0,05 моль) сухого этилового спирта в 100 мл диэтилового эфира и добавляли по каплям к интенсивно перемешиваемому раствору 7,67 г (0,05 моль) хлорокси фосфора в 100 мл диэтилового эфира при температуре минус 5 °С в аргоновой атмосфере. Смесь отогревали до комнатной температуры, перемешивали 20 ч, диэтиловый эфир отгоняли на роторном испарителе, остаток переносили в прибор для перегонки в вакууме и перегоняли, собирая фракцию при температуре 71–73 °С при 20 мм рт. ст. Выход *O*-этилдихлорфосфата составил 6,92 г (85 % от теоретического). Раствор 3,83 г (0,085 моль) сухого диметиламина в 20 мл диэтилового эфира был добавлен по каплям к интенсивно перемешиваемому раствору 6,92 г (0,0425 моль) *O*-этилдихлорфосфата в 30 мл диэтилового эфира при температуре 0 °С. Реакционную смесь отогревали до комнатной температуры и перемешивали 2 ч, затем фильтровали от гидрохлорида диметиламина, фильтрат упаривали на роторном испарителе, остаток переносили в прибор для перегонки в вакууме и перегоняли, собирая фракцию 98 °С при 12 мм рт. ст. Выход *O*-этил-*N,N*-диметиламидохлорфосфата (11) составил 5,47 г (75 % от теоретического) в виде бесцветной жидкости,  $n_{\text{D}}^{20}=1,4422$ .

Таблица 1 – Данные  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  ЯМР спектроскопии O-фосфорилированных тирозинов (18–23)

№ п/п соединения	Выход, % от теоретического	Структурная формула соединения	$^1\text{H}$ ЯМР, $\delta$ , м.д.; J, Гц	$^{31}\text{P}$ ЯМР {1H}, $\delta$ , м.д.; J, Гц
18	63		7.38, д, 2H, J=6.3; 7.20, д, 2H, J=6.3; 4.82, 1H, дисептет, J=8.0, 6.2, O-CH; 3.8, м, 1H, CH-NH <sub>2</sub> ; 3.32, м, CH <sub>2</sub> -Ar; 3.03, м, 1H CH <sub>2</sub> -Ar; 1.68, д, 3H, J=17.7 CH <sub>3</sub> -P; 1.38, д, 6H, J=6.2 CH <sub>3</sub> ; 1.30, д, 6H, J=6.2, 2xCH <sub>3</sub>	28.2
19*	79		7.38, д, 2H, J=6.3; 7.20, д, 2H, J=6.3; 4.48, м и 4.59, м, 1H, O-CH; 3.8, м, 1H, CH-NH <sub>2</sub> ; 3.32, м, CH <sub>2</sub> -Ar; 3.03, м, 1H CH <sub>2</sub> -Ar; 1.66, д и 1.62, д 3H, CH <sub>3</sub> -P, J=17.6; 1.38, д и 1.15, д, 3H, CH <sub>3</sub> -CH, J=6.3; 0.96, с и 0.91, с, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -C	28.71 28.00
20	74		7.38, д, 2H, J=6.3; 7.20, д, 2H, J=6.3; 4.22, ддк, 2H, J=10.2, 8.0, 7.1, O-CH <sub>2</sub> (AB); 3.8, м, 1H, CH-NH <sub>2</sub> ; 3.32, м, CH <sub>2</sub> -Ar; 3.03, м, 1H CH <sub>2</sub> -Ar; 1.64, д, 3H, J=17.7, CH <sub>3</sub> -P; 1.38, т, 3H, J=7.1, CH <sub>3</sub>	29.4
21	82		7.38, д, 2H, J=6.3; 7.20, д, 2H, J=6.3; 3.84, ддд, 2H, J=9.7, 7.3, 6.7, CH <sub>2</sub> -O (AB); 3.8, м, 1H, CH-NH <sub>2</sub> ; 3.32, м, CH <sub>2</sub> -Ar; 3.03, м, 1H CH <sub>2</sub> -Ar; 1.89, м, 1H, CH; 1.68, д, 3H, J=17.6, CH <sub>3</sub> -P; 1.97, м, 1H, CH; 0.98, д, 6H, J=6.8, 2xCH <sub>3</sub>	29.41
22	63		7.38, д, 2H, J=6.3; 7.20, д, 2H, J=6.3; 4.03, м, 2H, O-CH <sub>2</sub> ; 3.8, м, 1H, CH-NH <sub>2</sub> ; 3.32, м, CH <sub>2</sub> -Ar; 3.03, м, 1H CH <sub>2</sub> -Ar; 1.67, д, 3H, J=17.6, CH <sub>3</sub> -P; 1.60, м, 2H, CH <sub>2</sub> ; 1.33, м, 2H, CH <sub>2</sub> ; 0.89, т, 3H, J=7.0, CH <sub>3</sub>	29.48
23	79		7.38, д, 2H, J=6.3; 7.20, д, 2H, J=6.3; 4.15-3.95, м, 2H, CH <sub>2</sub> -O; .8, м, 1H, CH-NH <sub>2</sub> ; 3.32, м, CH <sub>2</sub> -Ar; 3.03, м, 1H CH <sub>2</sub> -Ar; 2.58, д, 6H, J=10.3, N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ; 1.32, тд, 3H, J=7.1, 1.0, CH <sub>3</sub>	6.8

Примечание.

\*Сигналы представлены двумя пиками, характерными для диастереомеров.

Общая методика фосфорилирования бензилового эфира N-карбокси-бензил-L-тирозина (12–17)

К охлаждаемому до температуры 5 °С раствору 1,7 г (0,0042 моль) (5) в 40 мл сухого ацетонитрила при перемешивании прибавляли

120 мг (0,005 моль) NaN, предварительно отмытого гексаном от минерального масла, перемешивали 30 мин при комнатной температуре и прибавляли 0,005 моль соответствующего фосфорильного производного (6–11), продолжали

перемешивание 1 ч, контролируя ход реакции по ТСХ.

Реакционную смесь упаривали в вакууме до половины объема, выливали в 40 мл воды, экстрагировали хлороформом (3×30 мл). Экстракт промывали 20 мл воды, сушили над  $MgSO_4$ , концентрировали при пониженном давлении и образующуюся в остатке бесцветную вязкую жидкость подвергали очистке хроматографией на колонке 150×30 мм,  $SiO_2$  (GeduranSi 60 40–63 мкм, Merck), элюент – метилхлорид/этилацетат 1:1, скорость элюирования 1 мл/мин, при этом были выделены (12–17) по данным  $^1H$  ЯМР с чистотой 90–97 %.

О-(О-изопропил)метилфосфонил-N-карбоксібенизил-L-тирозина бензиловый эфир (12) 1,59 г (72 % от теоретического).

О-(О-пинаколил)метилфосфонил-N-карбоксібенизил-L-тирозина бензиловый эфир (13) 1,87 г (78,5 % от теоретического).

О-(О-этил)метилфосфонил-N-карбоксібенизил-L-тирозина бензиловый эфир (14) 1,48 г (69 % от теоретического).

О-(О-изобутил)метилфосфонил-N-карбоксібенизил-L-тирозина бензиловый эфир (15) 1,82 г (80,5 % от теоретического).

О-(н-бутил)метилфосфонил-N-карбоксібенизил-L-тирозина бензиловый эфир (16) 1,59 г (72 % от теоретического).

#### **Информация о конфликте интересов**

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

#### **Сведения о рецензировании**

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

#### **Список источников**

1. Берзин И.А., Романов В.С., Савельева Е.И. и др. Определение метаболитов фосфорорганических отравляющих веществ в биомедицинских пробах с использованием твердофазной экстракции // Российский биомедицинский журнал. 2009. Т. 10. С. 44.
2. Black R.M., Clarke R., Read R.W. et al. Application of gas-chromatography mass-spectrometry and the gas-chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agent sarin, sulphur mustard and their degradation products // J. Chromatogr. A. 1994. V. 662. № 2. P. 301–321.
3. Родин И.А., Браун А.В., Ставрианиди А.Н. и др. Обнаружение маркеров нервно-паралитических веществ методом ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии-танDEMной спектromетрии // Аналитика и контроль. 2012. Т. 16. № 3. С. 254.
4. Sato A., Yoshida M., Hara S. Primary amino acid lithium salt as a catalyst for asymmetric Michael addition of

О-этил-N,N-диметиламидофосфорил-N-карбоксібенизил-L-тирозина бензиловый эфир (17) 1,87 г (78,5 % от теоретического).

*Общая методика гидрогенолиза фосфорильных аддуктов бензилового эфира N-карбоксібенизил-L-тирозина (18–23)*

В прибор для гидрирования при атмосферном давлении помещают полученный ранее соответствующий фосфорильный аддукт О-бензил-N-карбоксібенизил-L-тирозина, 50 мл этанола и 100 мг 10 % палладия на активированном угле. Прибор заполняют водородом и встряхивают 8 часов, пропуская медленный ток водорода. Катализатор отфильтровывают, растворитель удаляют в вакууме и остаток растирают с 5 мл ацетонитрила, фильтруют и промывают на фильтре 10 мл диэтилового эфира. Получают О-фосфорилированные тирозины (18–23). Данные  $^1H$  и  $^{31}P$  ЯМР спектроскопии приведены в таблице 1.

#### **Выводы**

В результате исследований осуществлен синтез соединений сравнения фосфорилированных аддуктов L-тирозина, которые были с успехом применены лабораторией 27 НЦ МО РФ в рамках проведения 2 и 3 профессиональных биомедицинских тестов ОЗХО.

isobutyraldehyde with beta-nitroalkenes // Chem. Commun. (Camb.) 2008. № 46. P. 6242–6244.

5. Hiroyuki Nakamura, Masaru Fujiwara, Yoshinori Yamamoto. A concise synthesis of enantiomerically pure L-(4-Boronophenyl)alanine from L-tyrosine // J. Org. Chem. 1998. V. 63. P. 7529–7530.

6. Hutton C.A., Skaff O. A convenient preparation of dityrosine via Miyaura borylation-Suzuki coupling of iodotyrosine derivatives // Tetrahedron Let. 2003. V. 44. P. 4895–4898.

7. Williams N.H., Harrison J.M., Read R.W. et al. Phosphorylated tyrosine in albumin as a biomarker of exposure to organophosphorus nerve agents // Arch. Toxicology. 2007. V. 81. P. 627–639.

8. Bryant P.J.R., Ford-Moore A.H., Perry B.J. et al. The preparation and physical properties of isopropyl methylphosphonofluoridate (Sarin) // J. Chem. Soc. 1960. P. 1553–1555.

9. Briseno-Roa L., Hill J., Notman S. et al. Analogues with fluorescent leaving groups for screening and selection of enzymes that efficiently hydrolyze organophosphorus nerve agents // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. P. 246–255.

10. Jalalifar M., Javidan A., Khalikov Sh. Synthesis of

ethyl and phenyl amido(ethoxyphenylalaninyl)phosphate compounds // *Asian. J. Chem.* 2012. V. 4. P. 1097–1100.

11. Kruithof C.A., Dijkstra H.P., Lutz M. et al. Non-tethered organometallic phosphonate inhibitors for lipase inhibition: positioning of the metal center in the active site of cutinase // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2008. P. 4425–4432.

#### Об авторах

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр» Министерства обороны Российской Федерации, 105005, Российская Федерация, г. Москва, Бригадирский переулок, д. 13.

Крылов Владислав Игоревич. Научный сотрудник отдела.

Крылов Игорь Иванович. Старший научный сотрудник отдела, канд. хим. наук, доцент.

Яшкир Вадим Анатольевич. Старший научный сотрудник отдела, канд. хим. наук, доцент.

Рыбальченко Игорь Владимирович. Ведущий научный сотрудник отдела, доктор хим. наук, профессор.

**Контактная информация для всех авторов:** 27nc\_1@mil.ru

**Контактное лицо:** Крылов Владислав Игоревич; 27nc\_1@mil.ru

## Synthesis of O-tyrosine Phosphorylated Adducts of Methylphosphonic and Phosphoric Acid Derivatives as Reference Compounds for the Analysis of Biomedical Samples

V.I. Krylov, I.I. Krylov, V.A. Yashkir, I.V. Rybalchenko

*Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Brigadirskii Lane 13, Moscow 105005, Russian Federation*

Organophosphorus chemical agents are included in the 1st List of the Annex on Chemicals of the Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on Their Destruction (Chemical Weapons Convention, CWC). For the purposes of verification of compliance with the provisions of the CWC, special methods, which are considered the most informative at determining the retrospective effects of organophosphorus toxicants on the body, are necessary. Typical long-lived biomarkers of organophosphate toxic agents are tyrosine phosphorylation products, the presence of which in biomedical samples clearly indicates the exposure to sarin, soman, tabun and V-series agents. We have elaborated methods for the synthesis and isolation of tyrosine adducts derivatives of methylphosphonic and phosphoric acids, used as reference samples. The synthesis scheme included the consecutive protection of carboxyl and amino groups of tyrosine, its O-phosphorylation by the corresponding alkylphosphonates and phosphates, the removal of protective groups with the release of corresponding O-phosphorylated tyrosine adducts. Their purification from impurities was carried out, using column chromatography (SiO<sub>2</sub>, eluent: dichloromethane/ethyl acetate 1:1). The purity of the obtained products was more than 90 %, so it was possible to involve them in further transformations with the use of catalyst without the threat of its «poisoning». Benzyl and carboxybenzyl protection of phosphorylated L-tyrosines (12–17) was removed by means of catalytic hydrogenation by molecular hydrogen under atmospheric pressure. Target adducts of phosphorylated reagents and L-tyrosin were obtained (63–82 %) in form of crystal white substances, readily soluble in water and ethanol, and poorly – in dichloromethane and acetonitrile.

**Keywords:** adduct; biomarker; column chromatography; synthesis; tyrosine; phosphorylation; organophosphorus nerve agents; NMR spectroscopy.

**For citation:** Krylov V.I., Krylov I.I., Yashkir V.A., Rybalchenko I.V. Synthesis of O-tyrosine Phosphorylated Adducts of Methylphosphonic and Phosphoric Acid Derivatives as Reference Compounds for the Analysis of Biomedical Samples // *Journal of NBC Protection Corps*. 2019. V. 3. № 2. P. 103–110.

#### Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

#### Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

#### References

1. Berzin I.A., Romanov V.S., Savelyeva Ye.I. et al. Detection of organophosphorus poisonous substances metabolites in biomedical samples by solid-phase extraction // *Russian Biomedical Journal*. 2009. V. 10. P. 44 (in Russian).
2. Black R.M., Clarke R., Read R.W. et al. Application of gas-chromatography mass-spectrometry and the gas-chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of chemical warfare samples, found to contain residues of the nerve agent sarin, sulphur mustard and their degradation products // *J. Chromatogr. A*. 1994. V. 662. № 2. P. 301–321.
3. Rodin I.A., Braun A.V., Stavrianidi A.N. et al. Detection of nerve agents markers by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Analytics and control*. 2012. V. 16. № 3. P. 254 (in Russian).
4. Atsushi Sato, Masanori Yoshida, Shoji Hara. Primary amino acid lithium salt as a catalyst for asymmetric Michael addition of isobutyraldehyde with b-nitroalkenes // *Chem. Comm*. 2008. P. 6242–6244.
5. Hiroyuki Nakamura, Masaru Fujiwara, Yoshinori Yamamoto. A concise synthesis of enantiomerically pure L-(4-Boronophenyl)alanine from L-tyrosine // *J. Org. Chem*. 1998. V. 63. P. 7529–7530.
6. Hutton C.A., Skaff O. A convenient preparation of dityrosine via Miyaura borylation-Suzuki coupling of iodotyrosine derivatives // *Tetrahedron letters*. 2003. V. 44. P. 4895–4898.
7. Williams N.H., Harrison J.M., Read R.W. et al. Phosphylated tyrosine in albumin as a biomarker of exposure to organophosphorus nerve agents // *Arch. Toxicology*. 2007. V. 81. P. 627–639.
8. Bryant P.J.R., Ford-Moore A.H., Perry B.J. et al. The preparation and physical properties of isopropyl methylphosphonofluoridate (Sarin) // *J. Chem. Soc*. 1960. P. 1553–1555.
9. Briseno-Roa L., Hill J., Notman S. et al. Analogues with fluorescent leaving groups for screening and selection of enzymes that efficiently hydrolyze organophosphorus nerve agents // *J. Med. Chem*. 2006. V. 49. P. 246–255.
10. Jalalifar M., Javidan A., Khalikov Sh. Synthesis of ethyl and phenyl amido(ethoxyphenylalaninyl)phosphate compounds // *Asian J. Chem*. 2012. V. 24. P. 1097–1100.
11. Kruithof C.A., Dijkstra H.P., Lutz M. et al. Non-tethered organometallic phosphonate inhibitors for lipase inhibition: positioning of the metal center in the active site of cutinase // *Eur. J. Inorg. Chem*. 2008. P. 4425–4432.
9. Briseno-Roa L., Hill J., Notman S. et al. Analogues with fluorescent leaving groups for screening and selection of enzymes that efficiently hydrolyze organophosphorus nerve agents // *J. Med. Chem*. 2006. V. 49. P. 246–255.
10. Jalalifar M., Javidan A., Khalikov Sh. Synthesis of ethyl and phenyl amido(ethoxyphenylalaninyl)phosphate compounds // *Asian J. Chem*. 2012. V. 4. P. 1097–1100.
11. Kruithof C.A., Dijkstra H.P., Lutz M. et al. Non-tethered organometallic phosphonate inhibitors for lipase inhibition: positioning of the metal center in the active site of cutinase // *Eur. J. Inorg. Chem*. 2008. P. 4425–4432.

#### Authors

Federal State Budgetary Establishment «27 Scientific Centre» of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Brigadirskii Lane 13, Moscow 105005, Russian Federation.

Vladislav Igorevich Krylov. Researcher of the Department.

Igor Ivanovich Krylov. Senior Researcher of the Department. Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor.

Vadim Anatolyevich Yashkir. Senior Researcher of the Department. Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor.

Igor Vladimirovich Rybalchenko. Leading Researcher of the Department. Doctor of Chemical Sciences, Professor.

**Contact information for all authors:** 27nc\_1@mil.ru

**Contact person:** Krylov Vladislav Igorevich; 27nc\_1@mil.ru