ノ ー ト

スクシンイミドエステルの化学 (第18報)*¹ *N, N'*-ジスクシンイミジルオキサレート (DSO) を用いた *N*-スクシンイミジルカルボキシレートの合成

山科 孝雄・樋口 勝彦・平田 博文
 化学技術研究所 (〒305 つくば市東 1-1)

Chemistry of Succinimido Esters. XVIII.

Preparation of *N*-Succinimidyl Carboxylates with the Use of *N, N'*-Disuccinimidyl Oxalate (DSO)

Takao YAMASHINA, Katsuhiko HIGUCHI, and Hirofumi HIRATA
 National Chemical Laboratory for Industry
 (Higashi 1-1, Tsukuba-shi, 〒305)

A method was devised for preparation of *N*-succinimidyl carboxylates (*N*-succinimidyl esters of fatty, benzoic and arylacetyl acids) using *N, N'*-disuccinimidyl oxalate (DSO). Reaction of acids with DSO in the presence of pyridine in acetonitrile gave the corresponding esters in good yields. *N*-Hydroxysuccinimide which was formed during the reactions and pyridine in the reaction mixtures could be easily removed by treatment with water. This method was compared with those previously reported using *N, N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and *N, N'*-disuccinimidyl carbonate (DSC).

1 緒 言

N-スクシンイミジルカルボキシレート (1) はペプチド合成の縮合剤である *N, N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) の存在下, *N*-ヒドロキシスクシンイミドと相当するカルボン酸 (2) との反応から合成することができる¹⁾。しかし, この方法では副生成物が生ずることが知られている。例えば, 短鎖の *N*-アシロキスクシンイミド (1a) の合成では, 分別結晶やカラムクロマトグラフィーによる精製が必要である²⁾。この欠点を補うものとして *N, N'*-ジスクシンイミジルカルボネート (DSC) を用いる方法が開発されている³⁾。この方法では副生成物はほとんどなく, しかも, 反応物の処理が極めて容易であるという利点がある⁴⁾。

また, 上記の DSC と並んでペプチド合成用試薬として *N, N'*-ジスクシンイミジルオキサレート (DSO) も開発されており⁵⁾, 最近それが市販されるようになった。そこで本報では, DSO を各種の *N*-スクシンイミジルカルボキシレート (1a)~(1c) の合成に応用し, DCC

法^{1), 2)} 及び DSC 法⁴⁾ との比較を行った。

2 実 験

2.1 原 料

Scheme-1 Synthetic strategy of *N*-succinimidyl carboxylates (1)

*1 第17報, 文献9)。

N-ヒドロキシスクシンイミド(HOSu), DCC, DSC, DSO はすべてペプチド合成用(SP)を, 炭素鎖の異なる脂肪酸(2 a), 各種の置換基を持つ安息香酸(2 b), 及びフェニル酢酸(2 c)は市販特級試薬あるいは純度 97 % 以上のものを用いた。アセトニトリル, ヘキサンはHPLC 分析用(SP)を用い, 他の溶媒は常法⁶⁾に従って精製したものを用いた。

2.2 分析方法

HPLC 分析は日本分光(JASCO) Twinkle 高速液体クロマトグラフを用いて行い, 化合物は UVIDEC-100-Ⅲ波長可変型 UV モニター(JASCO)で検出した。カラム: 逆相 HPLC 分析の場合は Finepak SIL C₁₈ (粒径 10 μm) 250×4.6 φ mm (JASCO) を, 順相 HPLC 分析の場合は Finepak SIL (粒径 5 μm) 250×4.6 φ mm (JASCO) を用いた。移動相: 逆相 HPLC の場合は 0.1 % リン酸を含む 50 % H₂O-CH₃CN を, 順相 HPLC の場合は 5 vol % のエタノールを含むヘキサンを用いた。流速: 1.0 mL/min, 検出波長: (1) の λ_{max} 及び 210 nm。

UV 分析は JASCO-430 型紫外分光光度計を用いて行い, セル温度は JASCO-EHC-360 型セルホルダーを用い, 25℃ で測定した。

2.3 *N*-スクシンイミジルカルボキシレート (1)

2.3.1 DSO 法

カルボン酸(2) (50 mmol), DSO (50 mmol), アセトニトリル (300 mL), ピリジン (10 mL) の混合物を 60℃ で 5 h かくはん後^{*2}に熱時汙過で不溶物を除去した。エバポレーターで汙液の溶媒を除去した後, 水浴で冷却しながら冷水 (300 mL) を加えてかくはんした。析出した結晶を汉過し, 冷水 (50 mL で 5 回) で洗浄, 真空乾燥後に再結晶することにより目的のエステル (1) が得られた。

2.3.2 DSC 法

DSC (50 mmol), (2) (50 mmol), アセトニトリル (300 mL), ピリジン (10 mmol) の混合物を 60℃ で 5 h かくはん後, 2.3.1 と同様に処理した。なお, この場合は不溶物の存在は認められなかった。

2.3.2 DCC 法

前報¹⁾に従って反応を行い, 得られた粗生成物をヘキサンから再結晶して精製した。

3 結果と考察

DSO 法, DSC 法, DCC 法の三者の比較のため, *N*-

*2 DSO はアセトニトリル中での溶解度が低いため, 室温での反応は遅い。また, (2 b) の中にはアセトニトリルに対する溶解度が低いものもあるため, 本報では DSO 法及び DSC 法はすべて 60℃ で反応を行った。前者の反応は CO₂ と CO の発生・停止で, 後者では CO₂ の発生・停止での反応の様子を見ることができた。

アシロキシスクシンイミド (1 a) 及び *N*-スクシンイミジルベンゾエート (1 b) の合成を行った。結果は Table-1 に示す通りであった。

この表からは, DSO 法や DSC 法では, 反応によって生ずる HOSu や反応に加えたピリジンは水処理によって容易に除去することができ, 一回の再結晶により 99 % 以上の純度の (1 a) が得られるが, DCC 法では再結晶後でも純度が 96~98 % と低いことが分かった。ところが, 結晶性のよい (1 b) の合成ではいずれの方法でも再結晶により 99 % 以上の純度の目的のエステルが得られた。また, DSO 法及び DSC 法では水処理 (2.3) 後に得られたエステル (1) 中の不純物は未反応のカルボン酸 (2) あるいはその中に含まれる不純物 (主に異性体) のエステルのみであり, 副生成物は認められなかったが, DCC 法ではそれ以外に副反応物が含まれていた。なお, DSO 法の方が DSC 法 (ほとんど定量的に反応) に比べて未反応の (2) が多く検出された。Table-1 から分かるように, (1) の合成ではいずれの場合も収率は DSC>DSO>DCC 法の順であった。DSO 法では反応後に不溶性物質が残存したが, DSC 法では全く認められなかったことから, これは原料である DSO の純度が (1) の収率に反映されたものと考えられる。

上記^{*2}のように, DSO は溶解度が低く, アセトニトリルやクロロホルム中で還流してもごくわずかの量しか溶解させることができなかった。しかし, DSC はアセトニトリルにはかなりの溶解度を有し, 再結晶も可能であった。従って, 本報では反応を 60℃ で行っているものの, DSO 法では不均一系の反応となるため, その速度は DSC 法に比べて遅くなると考えられる。事実, 反応の進行に伴って生ずる CO₂ や CO の発生やその停止, さらに DSO あるいは DSC の消失を比較すると, DSC 法では CO₂ の発生停止, DSC の消失は 0.5~1 h 位で完全に終了したが, DSO 法では CO₂ 及び CO の発生の停止は 3 h 以上の時間を要した。なお, DSO 法では不溶物が存在するため, DSO の消失は確認できなかったが, 残存する不溶物の量は CO₂ 及び CO の発生停止後はほとんど減少しないことが分かった。また, 室温でアセトニトリルに可溶な酸 (2) とのカップリング反応で, DSC 法では室温でも反応は充分起こったが, DSO 法ではほとんど反応が起こらなかったことから, Table-1 の収率は DSO や DSC の溶解度に大きく支配されていることが分かった。

次に, 副生成物の少ない DSO 法及び DSC 法を *N*-スクシンイミジルアリアルアセタート (1 c) の合成に応用した (Table-2)。(1 a) 及び (1 b) の合成と同様, 収率は DSO 法の方が DSC 法よりも低かったのが, いずれの場合も水処理後一回の再結晶により 99 % 以上の純度で (1 c) が得られた。

Table-1 Preparation of *N*-acyloxysuccinimides (1 a) and *N*-succinimidyl benzoates (1 b) with use of DSO, DSC, and DCC.

Z in (1)	R or X in Ar	Yield (%) ^{a)}		
		DSO method ^{b)}	DSC method ^{c)}	DCC method ^{d)}
(1 a) R=Alkyl	<i>n</i> -C ₁₁ H ₂₃	60~75	75~85	45~55
	<i>n</i> -C ₁₃ H ₂₇	68~82	77~83	60~65
	<i>n</i> -C ₁₅ H ₃₁	75~80	75~88	62~70
	<i>n</i> -C ₁₇ H ₃₅	75~88	80~92	65~75
(1 b) Ar	H	65~82	80~88	58~65
	<i>o</i> -Cl	66~78	68~75	47~57
	<i>p</i> -Cl	64~73	73~84	61~73
	<i>p</i> -Br	65~75	71~88	54~66
	<i>p</i> -CH ₃ O	67~88	85~93	58~65
	<i>p</i> -NO ₂	67~75	73~85	58~70

a) After recrystallization. Physical properties were in accordance with those in the literatures [Ref. 1) and 4)].

b) Purity >99%. Above 81% of the esters (purity >96%; impurity : acid) were obtained after the water treatment.

c) Purity >99%. Above 91% of the esters (purity >97%; impurity : acid) were obtained after the water treatment.

d) Purities were 96~98% and >99% for (1 a) and (1 b), respectively.

Table-2 Yields and physical properties of *N*-succinimidyl arylacetates (1 c) with use of DSO and DSC.

(1 c) X in Ar	Yield (%)		mp (°C)	Solvent for recrystallization ^{a)}	$\lambda_{\max}$ (nm) (log ϵ) ^{b)}
	DSO method	DCC method			
H	68~78	72~87	117~118	Ethanol	252 (4.00)
<i>o</i> -CH ₃ O	75~82	85~93	95~ 96	Ethanol	272 (4.33)
<i>m</i> -CH ₃ O	73~80	79~82	73~ 74	Ethanol	274 (4.41)
<i>p</i> -CH ₃ O	75~85	82~90	106~107	Ethanol	280 (4.10)
<i>o</i> -F	69~78	74~87	134~135	Ethanol	263 (3.90)
<i>m</i> -F	57~79	71~83	88~ 89	Ethanol	264 (3.68)
<i>o</i> -Cl	64~74	69~78	112~113	Ethanol	265 (4.00)
<i>p</i> -Cl	77~86	85~94	135~136	Ethanol	219 (3.76)
<i>o</i> -Br	80~91	87~94	102~103	Ethanol	262 (3.91)
<i>m</i> -Br	63~75	66~79	72~ 73	Ethanol	262 (3.79)
<i>p</i> -Br	80~92	87~93	136~137	Ethanol	221 (4.04)
<i>o</i> -NO ₂	81~92	83~91	169~170	A+E (30 : 13 vol/vol)	259 (3.77)
<i>m</i> -NO ₂	82~91	85~94	171~172	A+E (10 : 7 vol/vol)	261 (3.90)

a) A : Acetonitrile, E : Ethanol.

b) In acetonitrile at 25°C.

以上の結果から、DSO法の長所としては①副反応が起らないこと、②反応混合物の処理が容易であること、さらに、③DSOはDCCと比べて刺激性がなく安全性が高いことが挙げられ、DSC法と同様にDCC法に代わる(1)の合成法であることが分かった。しかし、DSO

法はDSC法に比べると原料であるDSOの方がDSCよりも廉価であるが、①反応溶媒であるアセトニトリルに対する溶解度が低いため、反応速度が遅い、②原料の純度が低い(ただし、不純物は合成の妨害にはならない)という欠点を有しており、DSC法の方がDSO法よりも

優れていることが分かった。著者らは既に (1 a) や (1 b) が酵素タンパクの修飾剤⁷⁾や脂肪族アミノ化合物のラベル化剤^{8), 9)}等に利用できることを報告している。本報で合成した (1 c) もまた同様の利用法が可能であり、現在検討中である。

本報の一部は第 19 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (1988) に報告した。

〔平成 2 年 (1990 年) 7 月 4 日受理〕

文 献

- 1) a) H. Gross, L. Bilk, *Tetrahedron*, **24**, 6935 (1966);
b) 平田博文, 油化学, **33**, 12 (1984); **29**, 2 (1980); c)
H. Hirata, K. Higuchi, S. Nakasato, G.J. Schroepfer, Jr., *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **35**, 18 (1986)
- 2) H. Hirata, K. Higuchi, K. Ishikawa, S. Nakasato, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **35**, 96 (1986)
- 3) a) 小倉治夫, 武田収功, 日化, **1982**, 836; b) K. Takeda, Y. Akagi, A. Saili, T. Tsukahara, H. Ogura, *Tetra. Lett.*, **24**, 4569 (1983)
- 4) K. Higuchi, T. Yamashina, K. Ishikawa, H. Hirata, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **36**, 16 (1987)
- 5) K. Takeda, I. Sawada, A. Suzuki, H. Ogura, *Tetra. Lett.*, **24**, 4451 (1983)
- 6) J.A. Riddick, W.B. Bunger, "Organic Solvent", 3rd Ed., Wiley-Interscience, New York, London, Sydney, Toronto (1970) IV p. 552.
- 7) a) 平田博文, 樋口勝彦, 石川一彦, 油化学, **36**, 783 (1987); b) K. Ishikawa, H. Hirata, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **37**, 171, 458 (1988); **38**, 60 (1989)
- 8) 山科孝雄, 樋口勝彦, 平田博文, 油化学, **37**, 349 (1988); **38**, 280 (1989)
- 9) K. Higuchi, T. Yamashina, H. Hirata, *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (Yukagaku)*, **38**, 923 (1989); Proceedings on ISF-JOCS World Congress 1988, II (1989) p. 950