フタル酸法によるペプチドの合成 (第 2 報)

Glycyl-peptides 及び DL-Alanyl-peptides の合成

山下 恭平, 佐橋 佳一 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 29 年 5 月 10 日 受 理

The Syntheses of Peptides by the Phthaloyl Method. Part 2. The Syntheses of Glycyl-peptides and DL-Alanyl-peptides.

By Kyohei YAMASHITA and Yoshikazu SAHASHI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

1948 年フタル酸法が考案されて以来ペプチド結合の生成の方法は種種改良されてきた。しかしながら Carbobenzoxy 法に匹敵する一般法として利用されるためにはなお充分検討せねばならない。Phthaloyl-amino acid chlorides とアミノ酸エステルとの縮合⁽¹⁾⁽²⁾は一般性に於て優れているが中間にえられる phthaloyl peptide esters の鹼化条件が劃一的でないのとアミノ酸をエステル化せねばならないのが欠点である。そこでもし遊離のアミノ酸との縮合が一般的に行われうるならば極めて有用である。この種の SCHOTTEN-BAUMANN 型縮合の例としては最初 SHEEHAN ら⁽³⁾ は phthaloyl-amino acid chlorides のデオキサン溶液を MgO の存在下にアミノ酸の水溶液と反応させ簡単なペプチドを合成した。又 GRASSMANN ら⁽⁴⁾ はクロロホルム溶液, EMERSON⁽⁵⁾ はベンゼン溶液をアミノ酸のアルカリ溶液に滴下して若干の glycyl-peptides その他を合成した。然し未だどの程度の応用範囲があるか全く不明の状態である。現在迄にこの種の方法でえられたペプチドは glycyl-peptides, β -alanyl-peptides⁽⁶⁾, 以外は phenylalanyl-glycylglycine と leucyl-glutamic acid のみである。そこで著者らは各種の glycyl-peptides の他 DL-alanyl-peptides の合成に此の方法を応用してみた。その結果 glycyl-peptides では殆んどすべてのものに適用できるが DL-alanyl-peptides では数種のものを合成しえな過ぎなかつた。

実 験 の 部

1. 原料の合成 HARTUNG⁽⁷⁾の方法で phthaloyl-amino acid を合成し, SHEEHAN⁽³⁾, EMERSON⁽⁵⁾らに従い PCl_5 又は SOCl_2 で chloride として使用した。

2. Phthaloyl-amino acid chloride とアミノ酸の縮合 Phthaloyl-glycyl chloride 2.14 g ($M/100$) を 20 cc ベンゼンに溶かす。縮合させるアミノ酸 $M/100$ 及び NaHCO_3 2.25 g ($2.5/100 M$) を 50 cc の水に溶解し氷冷攪拌しつつ chloride 溶液を 15 分間に加える。添加終了後尚 60 分間攪拌を続け反応を完結させる。後分液漏斗でベンゼン層を除去し水層を $2N \text{ HCl}$ で congo red 酸性とする。簡単な phthaloyl peptides はここで結晶として析出してくるが多くは一旦飴状に分離してくる。水, アルコール-水, アセトン-水, 酢酸エチル-石油エーテル等の適当な溶剤から再結すれば結晶化する。

Phthaloyl-DL-alanylchloride を用いる時は 2.28 g ($M/100$) を用いれば全く同様である。但し phthaloyl glycyl peptide に比し結晶し難いので酢酸エチル-石油エーテルで再結する必要がある。

この方法でえた phthaloyl peptides を Table 1, 2 に示す。

Table 1. Syntheses of Phthaloyl Peptides

Phthaloyl-peptides	Yield (%)	m. p. of crude product ($^{\circ}\text{C}$)	m. p. after recrystallization ($^{\circ}\text{C}$)	Solvent for recrystallization
Phthaloyl-glycyl-DL-valine	70	193~194	198 ~198.5	$\text{EtOH-H}_2\text{O}$
Phthaloyl-glycyl-DL-leucine	73	180~182	184.5~185.5	"
Phthaloyl-glycyl-L-leucine	71	99~100	105 ~106	"
Phthaloyl-glycyl-L-glutamic acid	65	174~176	192.5~193.5	$\text{AcOEt-petr. ether.}$
Phthaloyl-DL-alanyl-DL-valine	36	160~165	193.5~195.5	"
Phthaloyl-DL-alanyl-L-leucine	50	85~ 86	91 ~ 92	"
Phthaloyl-DL-alanyl-DL-phenylalanine	80	148~150	158 ~160	"
Phthaloyl-DL-alanyl-DL-glutamic acid	60	oil	oil	"

Table 2. Elementary Analysis of Phthaloyl-dipeptides

	C%		H%		N%	
	observed	theoretical	observed	theoretical	observed	theoretical
Phthaloyl-glycyl-DL-valine	59.28 59.29	59.20	5.46 5.26	5.30	8.85 8.91	9.21
Phthaloyl-glycyl-DL-leucine	60.56 60.58	60.37	6.01 6.09	5.70	8.64 8.77	8.80
Phthaloyl-glycyl-L-leucine	60.30 60.53	60.37	6.02 5.76	5.70	8.58 8.58	8.80
Phthaloyl-glycyl-L-glutamic acid	53.17 53.28	53.87	4.11 4.31	4.22	8.12 7.99	8.38
Phthaloyl-DL-alanyl-DL-valine	60.50 60.32	60.37	5.54 5.70	5.70	8.38 8.52	8.80
Phthaloyl-DL-alanyl-DL-phenylalanine	65.53	65.56	5.02	4.95	7.42	7.65

Table 1 に示した如く glycyl-peptides ではいずれもかなりの収量でえられるが alanyl-peptides では収量は悪くなり, phthaloyl-DL-alanyl-glycine, phthaloyl-DL-alanyl-DL-alanine は共に得られなかつた. なおグルタミン酸との縮合には NaHCO_3 3.5 当量を用いた.

3. Phthaloyldipeptides の hydrazinolysis Phthaloyl-DL-alanyl-DL-phenylalanine を例にとり hydrazine 分解の一般法を記す. Phthaloyl-dipeptide $M/100$ を約 50 cc の 99% アルコールに溶解し 2M/100 の hydrazine-hydrate (60%) を加え湯煎上で 1 時間還流加熱し, 次いで減圧下に濃縮乾涸する. 残渣に 30 cc の水を加え稀酢酸にて pH 5~6 に調節し 30~60 分湯煎上で加熱する. 冷後濾過し phthaloyl hydrazide を除き濾液を減圧濃縮しシラップ状とする. 残渣は 99% アルコールで triturate すれば容易に結晶化する. 収量 92%.

一般に hydrazinolysis の収量は 85~95% であり, かくしてえられるペプチドは殆んど chromatographically pure であり, 水-アセトン, 水-アルコールから再結される.

Phthaloyl-alanyl-glutamic acid の如く中間物の結晶し難いものも容易に hydrazinolysis を行いうる. 本法で合成した 2, 3 のペプチドの R_F 値を示す.

Table 3. R_F values of some glycyl- and alanyl-peptides*

Peptide	Solvent BuOH:Ac: OH:H ₂ O (4:1:1)	Phenol: H ₂ O (9:1)
Glycyl-glycine	0.19	0.32
Glycyl-DL-alanine	0.32	0.41
Glycyl-L-leucine	0.63	0.69
DL-Alanyl-DL-phenylalanine	0.70	0.83
DL-Alanyl-DL-glutamic acid	0.30	0.13
Glycine	0.18	0.31
DL-Alanine	0.30	0.56
L-Leucine	0.66	0.81
DL-Glutamic acid	0.19	0.18
DL-Phenylalanine	0.61	0.80

* conditions; filter paper: Toyo filter paper No. 2
color detection: 0.2% ninhydrin in water
saturated *n* butanol.

考 察

以上の結果より考えると phthaloyl-amino acid chloride とアミノ酸水溶液との SCHOTTEN-BAUMANN 型縮合はグリシル系列では容易に行われるがアラニル系列ではかなり反応し難くなる. ロイシンその他の長鎖アミノ酸を用いた場合も好結果はえられていない. 但し縮合時の chloride の溶剤としてデオキサソ, アルカリとして MgO を用いると或る程度の一般性があるようであるが充分なものではない. 従つてフタル酸法でペプチドを合成する場合 glycyl-peptide 及び 2, 3 の alanyl-peptide 以外はエステル型縮合その他別の方法によるのが望ましい.

終りに試料の元素分析を担当された当教室のマイクロ分析室の方に厚く感謝します なお本研究を御援助された味の素株式会社にも厚く感謝します

(1953年 8 月, 日本農芸化学会臨時大会に於て講演発表)

- (1) SHEEHAN, J. C., CHAPMANN, D. W., and ROTH, R. W. : *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3822 (1952).
- (2) 山下, 若松, 佐橋 : 農化, **27**, 649(1953).
- (3) SHEEHAN, J. C., and FRANK, V. S. : *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 1856 (1949).
- (4) GRASSMANN, W., and UEBBING, E. S. : *Chem. Ber.*, **83**, 244 (1950).
- (5) EMERSON, O. H. : *U. S. Pat.* **2**, 498, 665 (1950).
- (6) TURNER, R. A. : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2388 (1953).
- (7) BILLMANN, J. H., and HARTUNG, W. F. : *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1473 (1949).

Summary

We synthesized several phthaloyl-glycyl- and -DL-alanyl peptides by the acylation of amino acids with phthaloyl-amino acid chlorides. In the presence of NaHCO_3 phthaloyl amino acid chlorides reacted with amino acid in aqueous solution to give phthaloyl peptides. By this method phthaloyl-glycyl-DL-valine, -glycyl-DL-leucine, -glycyl-L-leucine, -glycyl-L-glutamic acid, -DL-alanyl-DL-valine, -DL-alanyl-L-leucine, -DL-alanyl-DL-phenylalanine and -DL-alanyl-DL-glutamic acid were prepared. By the hydrazinolysis of these phthaloyl peptides, corresponding dipeptides were obtained in high yield.

フタル酸法によるペプチドの合成 (第3報)

SCHOTTEN-BAUMANN 型新縮合反応に就て

山下 恭平, 屋代 光良 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 29 年 5 月 10 日 受理

The Syntheses of Peptides by the Phthaloyl Method. Part 3. On the Modified SCHOTTEN-BAUMANN Acylation

By Kyohel YAMASHITA and Mitsuyoshi YASHIRO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

ペプチドの合成法としてフタル酸法が考案されて以来その簡単な方法が次第に重要視されてきたが未だ一般法として確立するに至っていない。Phthaloyl amino acid chloride の方は問題ないとしても、これとアミノ酸との縮合がグリシン系等を除いてはそれ程円滑に進行しない。SHEEHAN⁽¹⁾, 著者ら⁽²⁾の用いたエステルとの縮合法は一般性はよいが中間の phthaloyl peptide ester の水解条件が劃一的にきめ難く又アミノ酸をエステル化しなければならないのが欠点である。これに対し SHEEHAN⁽³⁾, GRASSMANN⁽⁴⁾, EMERSON⁽⁵⁾, 著者ら⁽⁶⁾の用いた遊離アミノ酸の SCHOTTEN-BAUMANN 型縮合は操作は極めて簡単であるが現在迄のところ glycyl-peptide, β -alanyl-peptide⁽⁷⁾, DL-alanyl-peptide⁽⁶⁾ その他 2, 3 の簡単なペプチドにのみ有効に利用され、一般のペプチドでは余り好結果がえられない。これはアミノ酸のアルカリ水溶液に chloride を加えるため縮合と同時に chloride が一部加水分解されるため生成物が不純となり分離が困難となるためである。

そこでこの縮合を円滑ならしめるためには無水の条件で SCHOTTEN-BAUMANN 型縮合を行えば好結果がえられるであろうことは容易に推察される。アミノ酸は一般に非極性有機溶剤には溶けないが中性アミノ酸は氷酢酸の如き脂肪酸に溶解する。そこでアミノ酸を氷酢酸溶液として縮合で生ずる HCl を除くため酢酸アルカリを用い、又 chloride はジオキサン、ベンゼンに溶かして添加し反応を行わせたところ極めて円滑に反応の進むことが判つた。

Table 1. Properties of Phthaloyl Derivatives.

	Phthaloyl-amino acid -		Phthaloyl-amino acid chloride	
	m. p. u	yield	m. p.	yield
Glycine	191~3	90~92	82~4	81
DL-Alanine	162~3	90~92	70~3	75
DL-Phenylalanine	177~9	90	124~6	84

実験の部

1. 原料の合成 Phthaloyl amino acid は BILLMANN, HARTUNG⁽⁸⁾の方法に従い無水フタル酸とアミノ酸を混合熔融して作つた。これを chloride とするには EMERSON らに準じて thionyl chloride で塩素化した。これら原料の性質を Table 1 に示す。

2. 縮合条件の検討 Phthaloyl-glycyl chloride とグリシンとの縮合について反応温度、時間、chloride の溶剤の種類、縮合で生ずる HCl の受容体等につき検討した。すなわちグリシン 0.01 M, 酢酸アルカリ 0.01