N-Trifluoroacetyl-dipeptide methyl ester 類の合成 (その 2)*

富田一郎, 徳田卓郎, 大橋準一, 中島 稔
(京都大学農学部農芸化学科農薬化学研究室)

昭和 40 年 5 月 28 日 受 理

Synthesis of N-Trifluoroacetyl-dipeptide Methyl Esters. Part II.

By Ichiro TOMIDA, Takuro TOKUDA, Jun-ichi OHASHI and Minoru NAKAJIMA

Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University

The Synthesis of the N-trifluoroacetyl- α - and - γ -L-glutamyl-L-amino acid methyl esters, starting from the corresponding N-carbobenzoxy alkyl ester derivatives, is described. γ -Methyl N-carbobenzoxy-glutamate was condensed with amino acid methyl esters by the mixed anhydride, dicyclohexyl carbodiimide or *p*-nitrophenyl ester method to give N-carbobenzoxy- α -glutamyl-amino acid dimethyl esters. These substances were decarboxylated with hydrogen bromide in acetic acid and trifluoroacetylated with methyl trifluoroacetate in the presence of triethyl amine to the corresponding N-trifluoroacetyl- α -glutamyl-amino acid dimethyl esters.

α -Ethyl N-carbobenzoxy-glutamate was condensed with amino acid methyl esters by the same procedures as described above to yield N-carbobenzoxy- γ -glutamyl (- α -methyl ester)-amino acid methyl esters which on hydrolysis with sodium hydroxide solution followed by the decarboxylation and trifluoroacetylation as above gave the corresponding N-trifluoroacetyl- γ -glutamyl-amino acid dimethyl esters.

N-carbobenzoxy-glutamyl anhydride was refluxed in methanol and resulted γ -half methyl ester was isolated from the reaction mixture by the differential extraction with sodium hydroxide solution. This half ester was condensed with amino acid methyl esters to yield N-carbobenzoxy- γ -glutamyl-amino acid dimethyl esters, which were converted by the same way to the corresponding N-trifluoroacetyl-methyl ester derivatives.

(Received May 28, 1965)

N-TFA- α -L-glutamyl-L-amino acid dimethyl ester は F. Weygand ら⁽¹⁾により γ -methyl N-TFA-L-glutamate と 6 個の L-amino acid methyl ester から DCC 法により得られている。一方, 相当する γ -peptide については, N-TFA-L-glutamic anhydride に L-amino acid methyl ester を作用せしめて α - および γ -peptide の混合物を得ているが, 単離は行っていない。著者らは前報⁽²⁾と同様の方法で, N-Cbz-dipeptide ester を経

て N-TFA 誘導体に導く系路により, α - および γ -L-glutamyl-amino acid の N-TFA-methyl ester の合成を行った。

α -Peptide の合成には γ -methyl N-Cbz-L-glutamate を用いたが, これは L-glutamic acid をゆるやかにエステル化して γ -methyl L-glutamate hydrochloride を得⁽³⁾, これを N-Cbz 化して得た。これを他の L-amino acid methyl ester hydrochloride と混酸無水物法, DCC 法, あるいは PNP 法で縮合して N-Cbz- α -L-glutamyl (- γ -methyl ester)-amino acid methyl ester を得る。このものを HBr/AcOH で脱 Cbz 化し, methyl trifluoroacetate で TFA 化する。

γ -Peptid の合成に必要な N-Cbz-L-glutamic acid の α -ester としては, 従来主として ethyl ester が使

* 第 1 報は文献 (2) 参照。

本論文で使用了略語

TFA: trifluoroacetyl, Cbz: carbobenzoxy,

DCC: dicyclohexyl carbodiimide,

DCU: dicyclohexyl urea,

PNP: *p*-nitrophenylester

アミノ酸は慣例に従って略記する。

用されている⁽⁴⁾。したがって従来の方法でこの化合物を合成し, 他の L-amino acid methyl ester hydrochloride と混酸無水物法で縮合して N-Cbzo- γ -L-glutamyl (- α -ethyl ester)-L-amino acid methyl ester (III) とし, これを加水分解して N-Cbzo- γ -L-glutamyl-L-amino acid に導く。さらに脱 Cbzo 化し, 塩化チオニル/メタノールでメチル化後, 前報と同様の方法で TFA 基を導入し, N-TFA- γ -L-glutamyl (- α -methyl ester)-L-amino acid methyl ester (V) を得る。

一方, α -methyl L-glutamate を得るために, N-Cbzo-L-glutamic anhydride (I) をメタノールで還流し, α -(VI) および γ -methyl ester (VI') の混合物を得る⁽⁵⁾。これを炭酸ソーダ水溶液で分別抽出を行い, おのおのの留分についてベンゼン/アセトン/酢酸 (80:30:5) の溶媒系による薄層クロマトグラフを行って, α -methyl ester (VI) ($R_F=0.58\sim0.61$) と γ -methyl ester (VI') ($R_F=0.54\sim0.56$) との分離を確認し, 後の方の留分より純粋の α -methyl N-Cbzo-L-glutamate (VI) を得る。両者の分離はカラムクロマトグラフでも試みたが, 完全な分離は困難であった。VI は油状物であり, dicyclohexyl amine (VII) (m. p. 172°) 塩として結晶化せしめ, DCC 法によって他の L-amino acid methyl ester hydrochloride と直接 (第三級アミンを添加することなく) 縮合し, γ -peptide (VIII, V) の合成を行った。

最近 E. Klieger ら⁽⁶⁾ によって N-Cbzo-L-glutamic acid の γ -halfester の合成について報告がなされている。

実験の部

(m. p. の補正は行っていない)

(I) N-Cbzo- および N-TFA- α -L-glutamyl-amino acid methyl ester の合成

1. γ -methyl L-glutamate hydrochloride : L-glutamic acid より文献⁽³⁾に従って合成。収量 68%。m. p. 157~158° (文献 m. p. 161°⁽³⁾, 154°⁽⁷⁾)

計算値 : C 36.25, H 6.08%.

分析値 : C 36.15, H 6.07%.

2. γ -methyl N-Cbzo-L-glutamate : 文献⁽⁸⁾の方法に従って γ -methyl L-glutamate hydrochloride より合成。生成物は *n*-ヘキサンより再結晶。収量 58%。m. p. 68~9° (文献⁽⁸⁾ 72~3°).

計算値 : C 56.94, H 5.80%.

第1図 N-TFA- γ -glutamyl-amino acid methyl ester の合成系路 (M. A.: 混酸無水物法, DCC: dicyclohexyl carbodiimide 法)

分析値 : C 56.80, H 5.91%.

3. α -*p*-Nitrophenyl N-Cbzo-L-glutamate (- γ -methyl ester)⁽⁹⁾ : 3.00 g (0.01 mole) の γ -methyl N-Cbzo-L-glutamate と 1.40 g (0.01 mole) の *p*-nitrophenol を 30 ml の酢酸エチルに溶解し, 氷冷下 2.06 g (0.01 mole) の DCC を加え, 2時間攪拌後室温に1夜放置する。酢酸を少量加えて未反応の DCC を分解し, DCU を濾別し, 濾液を濃縮, さらに析出してくる少量の DCU を濾別し, 溶媒を留去する。エタノールより結晶化および再結晶する。m. p. 109°. 収量 3.25 g (78%)..

計算値 : C 57.69, H 4.84%.

分析値 : C 57.69, H 4.94%.

4. N-Cbzo- α -L-glutamyl (- γ -methyl ester)-amino acid methyl ester (amino acid=L-Ala) (混酸無水物法) : γ -methyl N-Cbzo-L-glutamate (1.50 g, 5 mmole) および triethyl amine (0.7 ml, 5 mmole) を乾燥トルエン (30 ml) に溶解し, 0° に冷却して攪拌しながらクロル炭酸エチル (0.5 ml, 5 mmole) を加える。

とゼリー状になる。30 分後に L-alanine methyl ester hydrochloride (0.7 g, 5 m mole) および triethyl amine (0.7 ml, 5 m mole) のクロロホルム溶液 (20 ml) を加え, 同温度でなお 1 時間激しく攪拌し, 1 夜放置する。溶液を濃縮し, 酢酸エチル (50 ml) を加え, 水, 5%-重曹水, 0.5%-HCl, ついで再び水で洗浄し, 芒硝で乾燥後溶媒を留去する。残分に *n*-ヘキサンを加えると結晶化する。酢酸エチル/*n*-ヘキサンから再結晶する。

5. N-Cbzo- α -L-glutamyl (γ -methyl ester)-amino acid methyl ester (amino acid=L-Val) (DCC 法)⁽¹⁰⁾: γ -Methyl N-Cbzo-L-glutamate (1.50 g, 5 m mole) をメチレンクロライド (40 ml) に溶解し, 氷冷下攪拌しながら DCC (1.50 g, 7.3 m mole) を加える

と 3~5 分後に DCU が析出しはじめる。20 分後に L-valine methyl ester hydrochloride (1.67 g, 10 m mole) および triethyl amine (0.75 ml, 5 m mole) のクロロホルム溶液 (20 ml) を加えて 1 時間攪拌をつづけ, 氷室に 1 夜放置する。少量の酢酸を加えて DCC を分解してから DCU を除去し, *n*-ヘキサンを加えて結晶化する。同溶媒系より再結晶する。

6. N-Cbzo- α -L-glutamyl (γ -methyl ester)-amino acid methyl ester [amino acid=L-glutamic (γ -methyl ester) acid] (PNP 法)⁽¹¹⁾: α -*p*-Nitrophenyl N-Cbzo-L-glutamate (γ -methyl ester) (0.42 g, 1 m mole) および triethyl amine (0.14 ml, 1 m mole) をアセトニトリル (20 ml) に溶解し, 室温で 20 時間攪拌

第 1 表 N-Cbzo- α -glu-X-OMe

化 合 物 X	縮合方法	収量 (%)	m. p. (°C)	旋 光 度*			元 素 分 析			
				$[\alpha]_D^{25}$ (°)	温度 (°C)	濃度 (c)	組 成 式 (分子量)	計算値C	H	N
Gly	M. A. **	60	101	-18.0	20	3.2	C ₁₇ H ₂₂ O ₇ N ₂ (366.36)	55.73 55.88	6.05 6.11	
L-Ala	M. A.	50	106~107	-21.1	15	1.0	C ₁₈ H ₂₄ O ₇ N ₂ (380.39)	56.83 56.63	6.36 6.53	7.37 7.60
L-Val	DCC	71	75	—	—	—	C ₂₀ H ₂₈ O ₇ N ₂ (408.44)	58.81 58.89	6.91 6.97	6.86 6.58
L-Leu	M. A.	74	77	-25.6	20	1.6	C ₂₁ H ₃₀ O ₇ N ₂ (422.47)	59.70 60.01	7.16 7.28	
L-Pro	M. A.	89	Oil	—	—	—	—	—	—	—
L-Glu(γ -OMe)	PNP	73	108~109	-19.8	20	1.6	C ₂₁ H ₂₈ O ₉ N ₂ (452.45)	55.74 55.88	6.24 6.34	6.19 6.23
L-Phe	PNP	82	97	-11.8	20	1.9	C ₂₄ H ₂₈ O ₇ N ₂ (456.48)	63.13 62.99	6.18 6.13	

* 旋光度はすべてメタノール中で測定。 ** M. A. は混酸無水物法を意味する。第 2 表以下においても同じ。

第 2 表 N-TFA- α -Glu-X-OMe

化 合 物 X	m. p. (°C)	旋 光 度*			元 素 分 析			
		$[\alpha]_D^{25}$ (°)	温度 (°C)	濃度 (c)	組 成 式 (分子量)	計算値C	H	N
Gly ¹⁾	Oil	—	—	—	—	—	—	—
L-Ala ²⁾	105~106	-30.5~ -31.0	27	8.8	C ₁₂ H ₁₇ O ₆ N ₂ F ₃ (342.27)	42.11 42.02	5.01 5.02	
L-Val ³⁾	92~93	-35.0	25	2.4	C ₁₄ H ₂₁ O ₆ N ₂ F ₃ (370.33)	45.41 45.90	5.72 5.95	
L-Leu	35	—	—	—	C ₁₆ H ₂₃ O ₆ N ₂ F ₃ (384.35)	46.87 47.18	6.03 6.11	
L-Pro	Oil	—	—	—	—	—	—	—
L-Glu(γ -OMe)	Oil	—	—	—	—	—	—	—
L-Phe ⁴⁾	82	-17.3~ -17.7	24	5.5	C ₁₈ H ₂₁ O ₆ N ₂ F ₃ (418.37)	51.68 51.78	5.06 5.26	

* 旋光度はすべてメタノール中で測定。

文献値⁽¹⁾ 1) m. p. 64~65°, $[\alpha]_D^{22} = -39.6$, $c = 1.3$ (メタノール); 2) m. p. 107~108°, $[\alpha]_D^{22} = -42.0$, $c = 1.2$ (メタノール);

3) m. p. 90°, $[\alpha]_D^{25} = -37.5$, $c = 1.4$ (メタノール); 4) m. p. 82~83°, $[\alpha]_D^{26} = -20$, $c = 1$ (メタノール)

する。反応終了後溶媒を留去し、酢酸エチル (50 ml) に溶解し、水、0.5 N-HCl、飽和重曹水 (黄色溶液となるが、着色しなくなるまで洗う) および水で洗浄し、*n*-ヘキサンで結晶化、同溶媒系より再結晶する。

7. N-Cbzo- α -L-glutamyl (- γ -methyl ester)-amino acid methyl ester: 第 1 表参照。

8. N-TFA- α -L-glutamyl (- γ -methyl ester)-amino acid methyl ester (amino acid=L-Ala): N-Cbzo- α -L-glutamyl (- γ -methyl ester)-amino acid methyl ester (amino acid=L-Ala) (500 mg, 1.3 m mole) に HBr/AcOH (2 ml, 33% HBr) を加えると炭酸ガスを発生しつつ溶解してゆく。室温に 30 分放置後エーテルを白濁するまで加えて放置し、結晶化せしめる。析出物を濾集し、エーテルで洗浄する (収量 330 mg)。これをメタノール (1 ml) に溶解し、triethyl amine (0.5 ml) および methyl trifluoroacetate (2 ml) を加えて室温に 1 夜放置する。溶媒留去後、酢酸エチル (50 ml) を加え、水、0.5 N-HCl および水で洗浄し、芒硝で乾燥する。濾液を濃縮し、*n*-ヘキサンで結晶化する。メチレンクロライド、ジイソプロピルエーテル、*n*-ヘキサンより再結晶する (収量 210 mg)。

他の化合物については第 2 表参照。

(II) N-Cbzo- および N-TFA- γ -L-glutamyl-amino acid methyl ester の合成

1. α -Ethyl N-Cbzo-L-glutamate: 文献⁽⁴⁾の方法により合成。収量 31%。m. p. 102° (文献⁽⁴⁾ 46~48°)。

計算値: C 58.24, H 6.19%。

分析値: C 57.77, H 6.15%。

HBr/AcOH で処理後ペーパークロマトグラフで展開 (ブタノール/酢酸/水=4:2:1) して、 α -ester とごく微量の遊離酸を検出したが、後者は ester の加水分解により生成したものと考えられる。

エタノール中で hydrazine hydrate と反応せしめて N-Cbzo-L-glutamic acid α -hydrazide とする。m. p. 165~166° (文献⁽¹²⁾ 168~170°)

計算値: C 52.87, H 5.80%。

分析値: C 53.18, H 5.88%。

2. α -methyl N-Cbzo-L-glutamate (VI): 5.20 g (0.02 mole) の N-Cbzo-L-glutamic anhydride⁽⁴⁾ を 40 ml の無水メタノールに溶解し、1.28 g の Na_2CO_3 を水

200 ml に溶解した溶液 25 ml (Na_2CO_3 0.16 g 含有) あてを用いて 8 回抽出する。2 N-HCl で酸性化すると 7 回目までの抽出液から油分が沈殿する⁽⁵⁾。おのおのの油分をエーテル抽出し、シリカゲル薄層クロマトグラフで展開 (ベンゼン/アセトン/酢酸=85:30:5) する。発色剤は 100 ml あたり 30% の NaOH 液を 8 滴滴下した水/メタノール (2:8) の溶液の中に 0.3% の濃度で bromcresol green を溶解したものを用いた。酸性物質は青色面に黄色スポットとして現れる。4 番目までは α - および γ -ester の混合物であるが、5~7 番目抽出物は単一スポットであり、 α -ester に相当することを確認した。収量 1.45 g (24%)。

これを酢酸エチルに溶解し、dicyclohexyl amine を加えて塩を作り、結晶として単離した。酢酸エチル/*n*-ヘキサンより再結。収量 2.02 g (VI に関して 86%)。m. p. 172° (文献⁽⁶⁾ 172~173°)

計算値: C 65.52, H 8.46%。

分析値: C 65.44, H 8.09%。

3. N-Cbzo- γ -L-glutamyl (- α -ethyl ester)-amino acid methyl ester [amino acid=L-Glu (- γ -OMe)] (混酸無水物法): α -Ethyl N-Cbzo-L-glutamate (1.60 g, 5 m mole), dimethyl L-glutamate (1.06 g, 5 m mole), triethyl amine (0.7 ml $\times$ 2, 5 m mole $\times$ 2) およびクロル炭酸エチル (0.5 ml, 5 m mole) より (I) 4 の場合と同様にして合成。収量 2.33 g。

4. N-Cbzo- γ -L-glutamyl (- α -methyl ester)-amino acid methyl ester (amino acid=L-Val) (DCC 法): α -Methyl N-Cbzo-L-glutamate γ -cyclohexyl ammonium salt (950 mg, 2 m mole), L-valine methyl ester hydrochloride (340 mg, 2 m mole) をメチレンクロライド中で DCC (1.0 g, 5 m mole) を用いて (I) 5 の場合と同様に処理、ただこの場合には triethyl amine は使用しない。収量 640 mg。

5. N-Cbzo- γ -L-glutamyl (- α -alkyl ester)-amino acid methyl ester: 第 3 表参照。

6. N-TFA- γ -L-glutamyl(- α -methyl ester)-amino acid methyl ester [amino acid=L-Glu (- γ -OMe), (V)]: N-Cbzo- γ -L-glutamyl (- α -ethyl ester)-amino acid methyl ester [amino acid=L-Glu (- α -OMe)] (2.0 g, 4.3 m mole) をメタノール (30 ml) に溶解し、1 N-NaOH (15 ml, 1.2 当量) を加え、室温に 1 時間放

第 3 表 N-Cbz- γ -Glu(- α -OR)-X-OMe

化 合 物		縮合方法	収量 (%)	m. p. (°C)	旋 光 度*			元 素 分 析			
X	R				$[\alpha]_D$ (°)	温度 (°C)	濃度 (c)	組 成 式 (分子量)	計算値C 分析値C	H H	N N
L-Ala	Et	M. A.	70	95	+9.1	23	0.77	C ₁₉ H ₂₆ O ₇ N ₂ (394.41)	57.86 57.74	6.64 6.71	7.10 6.93
L-Val	Me	DCC	78	118	-16.8	15	0.95	C ₂₀ H ₂₈ O ₇ N ₂ (408.44)	58.81 59.00	6.91 7.21	
L-Leu	Me	M. A.	81	Oil	—	—	—	—	—	—	—
L-Glu	Et	M. A.	93	81~83	+126.0	23	0.17	C ₂₂ H ₃₀ O ₉ N ₂ (466.48)	56.64 56.34	6.48 6.59	6.01 6.27
L-Phe	Me	M. A.	46	109	+16.5	23	0.66	C ₂₄ H ₂₈ O ₇ N ₂ (456.48)	63.14 63.31	6.18 6.08	

* 旋光度はすべてメタノール中で測定.

第 4 表 N-TFA- γ -Glu(- α -OMe)-X-OMe

化 合 物 X	m. p. (°C)	旋 光 度*			元 素 分 析			
		$[\alpha]_D$ (°)	温度 (°C)	濃度 (c)	組 成 式 (分子量)	計算値C 分析値C	H H	
Gly	149~150	≈ 0	24	0.6				
L-Ala	83	—	—	—	C ₁₂ H ₁₇ O ₆ N ₂ F ₃ (342.27)	42.11 42.19	5.01 4.97	
L-Val	72	-36.5	24	4.3	C ₁₄ H ₂₁ O ₆ N ₂ F ₃ (370.33)	45.41 45.13	5.72 5.86	
L-Leu	107~108	-41~ -43	24	0.75	C ₁₅ H ₂₃ O ₆ N ₂ F ₃ (384.35)	46.87 47.12	6.03 6.19	
L-Glu(- γ -OMe)	62	-13.2~ -13.8	24	6.6	C ₁₅ H ₂₁ O ₆ N ₂ F ₃ (414.34)	43.85 43.75	5.11 5.49	
L-Phe	117	-16.0	27	9.0	C ₁₈ H ₂₁ O ₆ N ₂ F ₃ (418.37)	51.68 51.50	5.06 5.06	

* 旋光度はすべてメタノール中で測定.

置する. 2 N-HCl を正確に加えて中和後 (pH 試験紙でも確認), 浴温 30° で減圧濃縮すると油分が沈殿する. 酢酸エチルで抽出し, 2 N-HCl および水で洗浄後, 芒硝で乾燥して溶媒を留去する. HBr/AcOH で脱 Cbz 化し, 減圧下溶媒を留去するとカラメル状の物質がとれる. これを少量の無水メタノールに溶解し, これに無水メタノール 20 ml に冷時 5 ml の塩化チオニルを加えて作った SOCl₂/MeOH 溶液を加え, 室温に 1 夜放置する. 溶媒を減圧留去し, つづいて無水エタノールに溶解し, methyl trifluoroacetate および triethyl amine を加えて常法に従って N-TFA 化する. 生成物はメチレンクロライド/イソプロピルエーテル/*n*-ヘキサンより再結する. (収量 200 mg).

7. N-TFA- γ -L-glutamyl (- α -methyl ester)-amino acid methyl ester: 第 4 表参照.

要 約

N-Cbz-L-glutamic acid の α - および γ -half ester と L-amino acid methyl ester (hydrochloride) との

縮合により, 7 種の α - および 5 種の γ -dipeptide の Cbz-ester 誘導体を合成した. これらを脱 Cbz 化後 TFA 化して 7 種の α - および 6 種の γ -dipeptide の TFA-methyl ester を合成した.

本研究を行うに当たり, アミノ酸の贈与を受けた味の素株式会社に対し, また元素分析をしていただいた京都大学農学部農産製造学研究室三井哲夫教授に対し, 深甚なる謝意を表します.

- (1) F. Weygand, A. Prox, E. G. Jourgenon, R. Axén, P. Kirchner: *Z. Naturforsch.*, **18 b**, 93 (1963).
- (2) 富田一郎, 大橋準一, 徳田卓郎, 中島 稔: 本誌, **39**, 378 (1965).
- (3) R. A. Boissonnas, St. Guttmann, P.-A. Jaquenoud, J.-P. Waller: *Helv. Chim. Acta*, **38**, 1941, 1946 (1955).
- (4) St. Goldschmidt, C. Jutz: *Chem. Ber.*, **86**, 1116 (1953).
- (5) 松川泰三, 増田克忠: 薬誌, **73**, 397 (1953).

- (6) E. Klieger, H. Gibian : *Ann. d. Chem.*, **655**, 195 (1962).
(7) S. G. Waley : *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3244.
(8) W. E. Hanby, S. G. Waley, J. Watson : *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3239.
(9) G. Losse, H. Jeschkeit, W. Layenbeck : *Chem. Ber.*, **96**, 204 (1963).
(10) J. C. Sheehan, G. P. Hess : *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1067 (1955).
(11) M. Bodenszky : *Nature*, **175**, 685 (1955).
(12) W. J. Le Quesne, G. T. Young : *J. Chem. Soc. (London)*, **1950**, 1959.
-