(昭和50年2月26日受理)

トリクロロメチルクロロホーマイト (TCF) によるグルタミン酸 γ -メチルエステルの NCA 化反応機構†

小岩 洋一*・辰川 敬三*・寺西 正行*・藤本 康夫**

Mechanism of Formation of γ -Methyl L-Glutamate NCA by
Use of Trichloromethyl Chloroformate

Yoichi Koiwa*, Keizo TATSUKAWA*, Masayuki TERANISHI* and Yasuo FUJIMOTO**

The mechanism for the formation of γ -methyl-N-carboxy-L-glutamate anhydride (MLG-NCA) by use of trichloromethyl chloroformate (TCF) was studied in a solvent system of chlorobenzene-dioxane (15:1 volume ratio). The reaction was followed by measuring the reaction temperature, the amount of remaining MLG and formed NCA at time intervals. The results revealed that the reaction was composed of two stages; the first stage was the reactions [1]~[3] and the subsequent stage was the reactions [4] and [5].

概 要

トリクロロメチルクロロホーマイト (TCF) によるグ

† この報文を「ポリアミノ酸の合成(第4報)」とする
第三報 有化 投稿中

* 協和醗酵工業(株)東京研究所 ()

* Tokyo Reserch Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. ()

ルタミン酸 γ -メチルエステル (MLG) の NCA 化反応機構を検討した結果、この反応は、ホスゲンによる NCA 化反応¹⁾と同様に、初期反応と後期反応に分けられることがわかった。初期反応は、本文中 [1], [2] および [3]

** 日本ケミファ(株)研究所 ()

** Research Laboratory, Nippon Chemiphar Co., Ltd. ()

式に示されるものであり、極めて迅速に、かつ、定量的に進行する。後期反応は、〔5〕および〔6〕式で示され、〔5〕式の反応の方が遅い。〔5〕式の反応は、〔6〕式の反応の場合（ホスゲンによる NCA 化反応）と同様に、アミノ酸塩酸塩のアミノ基と分子間水素結合を作り、アミノ酸塩酸塩を溶媒和することによって、平衡関係を遊離アミノ基を有するアミノ酸の方へずらすような溶媒（たとえば、ジオキサンあるいはテトラヒドロフラン等のエーテル類）の添加によって、著るしく促進されることがわかった。

1. 緒 言

Trichloromethyl chloroformate (TCF) と α -アミノ酸を反応させることによって、 α -アミノ酸 N-カルボン酸無水物 (NCA) を高純度、高収率で合成し得ることをすでに報告した^{2,3)}。われわれは、さらに、この反応の反応機構を検討した結果、 α -アミノ酸のアミノ基と TCF とが脱塩化水素反応を行って、N-トリクロロメトキシカルボニル- α -アミノ酸が生成し、この中間体が閉環すると共に、塩化水素とホスゲンを生じ、このホスゲンは α -アミノ酸と直ちに反応して、従来知られている NCA 化反応が同時に起きていることを確認した。

この二つの反応中、 α -アミノ酸とホスゲンの反応は、80°C 以上で極めて速く、中間体として生成した α -アミノ酸 N-カルバミルクロリドは極めて容易に閉環して、NCA を生成することが報告されている⁴⁾が、 α -アミノ酸と TCF の反応も全く同様に極めて迅速に進行し、このとき発生する塩化水素は、定量的に α -アミノ酸のアミノ基を中和し、 α -アミノ酸塩酸塩が生成することが分った。

α -アミノ酸塩酸塩と TCF の反応は、遊離アミノ基を持った α -アミノ酸との反応に比較して極めて緩慢であり、反応速度は著るしく低下する。したがって、ホスゲンによる NCA 化反応の場合と同様、アミノ基と分子間水素結合を作り、塩酸塩を溶媒和することによって、平衡関係を遊離アミノ基を有するエステルの方へずらすような溶媒系、あるいは、このような溶媒の添加によって反応を著るしく促進させることが可能である。

2. 実 験

2.1. 原料

2.1.1. L-グルタミン酸 γ -メチル エステル (MLG)
既報²⁾の方法によって調製した。

2.1.2. L-グルタミン酸 γ -メチル エステル 塩 酸 塩 (MLG·HCl) MLG 200 g (1.24 モル) をメタノール 2 l

に懸濁させ、40°C 以下に保ちつつ乾燥塩化水素ガスを吹き込み、約10分後に透明になった溶液を自然ろ過し、ロータリーエバポレーターで濃縮して、白色の MLG·HCl を得た。ベンゼンで洗浄し、ろ過後真空乾燥した。収量 240.4 g, 収率 98%。この結晶を乳糖によって充分粉碎し、60メッシュの篩を通ったものを水酸化ナトリウム上で一夜真空乾燥した。

2.1.3. 溶媒 クロロベンゼン、ジオキサン (DOX)、テトラヒドロフラン (THF)、アセトンおよびメチルクロロホーマイト (MCF) は常法により、脱水精製したものを用いた。1,2-ジクロロエタン (EDC) は、希水酸化ナトリウム水溶液で洗浄したのち、乾燥後蒸留し、暗所に保存したものを用いた。いずれの溶媒も使用前にカールフィッシャー水分測定装置 (筒井理化学器材製) によって、水分含量が 50 ppm 以下であることを確認した。

2.1.4. トリクロロメチル クロロホーマイト (TCF)

保土ヶ谷化学 (株) で試作されたものを、硬質ポリエチレン製容器に入れ密封し、冷暗所に保存して、必要に応じてそのまま使用した。

2.1.5. メチルクロロホーマイト (MCF) 試薬特級品をそのまま使用した。

2.2. 実験装置 温度制御された加熱油浴中に保持された四口フラスコに攪拌装置、温度計、還流冷却器、滴下ロートおよび必要に応じてガス導入管をそれぞれ装備し、ガス導入管からは、浮遊式微小流量計 (草野科学器械製作所製, KT-1) により窒素ガスを一定流量で通気できるようにした。反応により生成する塩化水素ガスおよび逃散するホスゲンガスは還流冷却器を経、アルコール性アルカリ中に送り込まれ吸収される。

2.3. MLG (または MLG·HCl) の NCA 化反応

MLG 40.0 g (0.248 モル) または MLG·HCl 55.4 g (0.248 モル) を EDC, クロロベンゼンまたはクロロベンゼン-DOX (15:1 容積比) 800 ml に懸濁させ、90°C に温度制御された加熱油浴中に保持し、反応系内の温度が定常になってから、TCF を滴下ロートより添加した。

2.4. NCA および未反応原料 (MLG または MLG·HCl) の単離 反応を所定時間継続後、反応系を冷却し、すばやくガラスフィルターで未反応原料をろ過し、付着した NCA は脱水したアセトンで洗浄、溶出した後、ろ液と洗液を合せて、ロータリーエバポレーターで乾固し、NCA の結晶を得た。未反応原料は、真空乾燥機中 60°C で 48 時間乾燥し、吸着塩化水素を除いた。

2.5. NCA の含有塩素量および着色度の測定 前報²⁾と同一の方法によった。

3. 結果および考察

3.1. クロロベンゼン中での NCA 化反応 加熱油浴の温度を 90°C ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) に制御し、この中へ、四口フラスコをセットした。約 30 分後に反応系内温度が 83.5°C で定常になるのを確認した後、TCF を原料 MLG に対して 1.33 当量/hr になるように滴下ロートから滴下し、反応系内温度の変化および反応系から出てくる塩化水素ガスおよびホスゲンガスを流量計により測定した。

結果を 図 1 に示す。経時的に NCA の収率あるいは MLG の反応率を定量していないが、約 60 分後から反応系の着色が認められ、120 分後には、反応系全体が褐色に着色し、3 時間反応を継続した後にも未反応原料が残存していた。

Fig. 1 NCA forming reaction by use of TCF in chlorobenzene.

● : Temperature of reaction mixture, + : Exhaust gas from outlet, 40g (0.248mol) of MLG, 800ml of solvent. TCF was added at the rate of 0.165 mol/hr. Oil bath temperature was kept at 90°C .

クロロベンゼン-DOX (15:1, 容積比) 混合溶媒中での MLG のホスゲン化反応に関する実験¹⁾と対応させるために、反応系の定常状態での内温を 88°C に設定した場合には、反応初期から著しい着色物質の生成が認められた。

反応系中に副生した塩化水素が溶解し、NCA の生成が抑制され副反応が増加している可能性があるため、反応系に乾燥窒素ガスを通気し、塩化水素を系外に除きながら NCA 化反応を行ってみたが、着色物質の生成はほとんど同じであった。

以上の反応経過は、既報のクロロベンゼン-DOX (15:1, 容積比) 混合溶媒系中、 88°C でホスゲンガスを通

気して反応させた場合に、約 150 分で、NCA が収率 82% で得られる¹⁾のに比較して、かなりの差異を示しているが、図 1 に示されるように、反応初期に著しい反応系の温度上昇が起る現象は共通しており、遊離アミノ基を持った原料 MLG と TCF との NCA 化反応が極めて迅速に進行していることを示唆している。

3.2. クロロベンゼン-DOX 混合溶媒系中での NCA 化反応 すでにホスゲンによる NCA 化反応において、反応溶媒により溶媒効果が認められることが報告されている¹⁾。ここでは、ホスゲン化反応を促進する溶媒として知られている DOX をクロロベンゼンに対して、容積比で 15:1 の割合で添加し、定常状態での反応系の温度が 83.5°C になるように温度制御し、3.1 と同様にして反応を行った。反応の進行状態を反応系の温度変

化、MLG の反応率、NCA の生成率および着色度、発生ガス量等を経時的に測定することによって観察した。

結果を 図 2 に示す。

ホスゲン法による NCA 化反応の場合と比較して、発生ガス量が少ないのは、反応温度が前者の 88°C に対して、後者が 83.5°C で約 5°C 低いことと、ホスゲン法の場合にはホスゲンガスの通気が塩化水素ガスを追い出す効果を持っていることに起因している。

反応初期の著しい発熱ピークは、ホスゲンによる NCA 化反応¹⁾の場合の発熱ピークと一致し、かつ、ピークの頂点で NCA が約 33% 生成し、このとき未反応原料の含有塩素量は、18.3% であった。これは MLG-

Fig. 2 NCA forming reaction by use of TCF in chlorobenzene and dioxan.

● : Temperature of reaction mixture, ● : Rate of reaction of MLG, ○ : Yield of NCA, ▲ : Optical density (OD) of unreacted MLG or MLG·HCl, + : Exhaust gas from outlet, 40 g (0.248 mol) of MLG, 800 mol of solvent. TCF was added at the rate of 0.165mol/hr, Oil bath temperature was kept at 90°C.

HCl の理論含有塩素量 18.0% に対応している、未反応 MLG が定量的に MLG·HCl となっていることを示している。また、このときの MLG·HCl の残存率は 67% であり、中間体はほとんど存在していないことがわかる。

すなわち、1モルの TCF が1モルの α -アミノ酸と反応して、1モルの NCA、1モルのホスゲンおよび2モルの塩化水素を生成し、このときできた1モルのホスゲンが、他の1モルの α -アミノ酸と反応して、1モルの NCA と2モルの塩化水素を生成する。発生した4モルの塩化水素は、4モルの α -アミノ酸と反応して、4モルの α -アミノ酸塩酸塩を生じる。結局、1モルの TCF が反応すると、2モルの NCA と4モルの α -アミノ酸塩酸塩ができると仮定すると前述の実験で観察され

た現象は無理なく説明され、かつ、ホスゲンによる NCA 化反応の場合と矛盾しない。従って、TCF と α -アミノ酸の反応は次の〔1〕から〔3〕式で示される。

(1) と (3) との反応による〔4〕式の反応も考えられる。

しかし、NCA の生成率が 33% のときに、MLG・HCl の残存率が 67% であることから、[1] 式の間体 (3) は容易に閉環して、NCA (4) とホスゲンを定量的に生じていることを示している。すなわち、(3) から NCA への閉環速度が、アミノ酸との反応速度よりも速いということであり、[4] 式のような反応の可能性は少ない。

[1], [2], [3] の反応が定量的に進行していると仮定したときにのみ実験事実は合理的に説明される。

しかし、[1] 式において、(1) と (2) が反応するのではなく、1 モルの TCF がまづ熱分解して、2 モルのホスゲンとなり、従来のホスゲン法による NCA 化反応と同じことが起きている可能性が残されている。TCF は活性炭や酸化鉄で接触分解されてホスゲンを生じることが知られている⁵⁾ し、紫外線を照射することによっても同じ分解反応が起きる。したがって、ここで行った NCA 化反応系中でも、ホスゲンへの分解反応は否定できない。

この点を確認するために、TCF による NCA 化反応と同一の条件下での TCF の分解の程度を測定した。すなわち、クロロベンゼン-DOX (15:1, 容積比) 800 ml に TCF を 49.1 g (0.248 モル) 加え、内温を 83.5°C に保持しながら窒素ガスを通気し、系から出てくるガスを、ドライアイス-メタノール (約 -35°C) で冷却した、直列に連がれた二つのトラップで冷却した。4 時間後に、トラップ中には、痕跡程度のホスゲンしか捕収されず、TCF は、ほとんど分解されていないことが確認された。したがって、TCF がホスゲンに分解してから反応している可能性は否定される。

3.3. EDC 中での MLG・HCl の NCA 化反応における TCF 法とホスゲン法の比較 TCF と遊離アミノ基を有する α-アミノ酸との [1]~[3] 式の反応 (これを初期 NCA 化反応と呼ぶ) が終了した後は、アミノ酸塩酸塩と TCF およびホスゲンの反応 (これを後期 NCA 化反応と呼ぶ) になる。すなわち、後期 NCA 化反応は [5] 式および [6] 式で示される。

(3) と (6) の反応による [7] 式も考えられるが、(3) から (4) への閉環反応が (3) と (6) の反応よりもずっと速いから、[7] 式の反応の可能性は少ない。

[5] および [6] 式の反応は、[1] および [2] 式の反応に比較して著しく緩慢であることは前述したが、いずれの場合にも、80°C 以上の高温 NCA 化反応においては、中間体から NCA への閉環反応は遊離アミノ基を有するアミノ酸へのホスゲンあるいは TCF の攻撃よりも速い。したがって、アミノ酸塩酸塩とホスゲンあるいは TCF との反応よりも、閉環反応の方がずっと速い。

われわれは、ホスゲンと TCF による NCA 化反応を比較するため、MLG について、20~80°C の温度範囲において、各々 NCA 化反応を行い反応率を比較した。NCA 化反応溶媒としては、MLG について最も一般的である EDC を用いることにした。

反応原料としては、MLG のアミノ基を塩酸塩とした、MLG・HCl を使用し、[5] および [6] 式の反応のみが起きるようにして反応を単純化した。ホスゲンあるいは、TCF 原料に対して過剰量 (3 倍当量) 使用する

ることとした。ホスゲンを通気法を採用しないで、反応前に反応系に低温で所定重量吸収させる方法により添加し、TCF による反応の場合と対応させた。

各温度で3時間ずつ NCA 化反応を行った場合の MLG·HCl の反応率を比較した。

結果を図 3 に示す。

Fig. 3 Relationship of reaction temperature and the rate of reaction of MLG·HCl in ethylenedichloride (EDC).

○: Reaction with phosgene. ●: Reaction with TCF. 49 g (0.248 mol) of MLG·HCl, 800 ml of EDC, 0.744 mol of phosgene, 0.372 mol of TCF, Reaction time: 3 hrs.

勿論、ここで TCF による反応の場合には、[5] 式と [6] 式の反応が同時に起きているから、図 3 の二つのカーブの違いは、[6] 式の反応が起きている系と [5] および [6] 式の反応が同時に起きている系との差ということになる。

図 3 より、[5] 式の反応が [6] 式よりも遅いことが明らかとなったが、反応の各過程での比較を行うには、より詳細な実験を必要とする。

3.4. TCF による NCA 化反応における反応溶媒効果 TCF による MLG の NCA 化反応において、NCA 化反応溶媒として、DOX, THF 等の環状エーテルを加えた系を用いると、EDC 等ハロゲン化炭化水素溶媒を使用する場合に比較して、著るしく反応速度が上昇することをすでに報告した²⁾。

このような現象は、ホスゲンによる NCA 化反応においても観察されており、溶媒効果によるものであると予想されるが、この点を確認するために、メチルクロロホルマイト (MCF) を用いてモデル実験を行った。

3.3 と全く同じ条件下、EDC, EDC-DOX (15:1, 容積比) および DOX 中で、おのおの、MCF と MLG·HCl の反応 ([8] 式に示す。) を行い、各種の温度で

MLG·HCl の反応率を比較した。

結果を図 4 に示す。

Fig. 4 Solvent effect on the rate of reaction of MLG·HCl in the reaction of MLG·HCl and methyl chloroformate.

○: in DOX, ●: in EDC-DOX (15:1 in volume ratio), ●: in EDC, 49 g (0.248 mol) of MLG·HCl, 0.744 mol of Methyl chloroformate, 800 ml of solvent.

図 4 に示されるように、[8] 式の反応において、ジオキサンの添加効果が認められる。これは、ホスゲンによる NCA 化反応の場合と同様に、ジオキサンがアミノ基と分子間水素結合を作り、アミノ酸塩酸塩を溶媒和することによって、平衡関係を遊離アミノ基を有するアミノ酸の方へずらし、MCF のアミノ基への攻撃を容易にしたものと解釈できる。

したがって、TCF による NCA 化反応の場合 ([5] 式) についても、ジオキサンの添加効果は、主に、アミノ酸塩酸塩のアミノ基に対する TCF の攻撃を促進する溶媒効果のためであると推定される。

付記 TCF を提供して下さいました保土ヶ谷化学(株)に感謝します。

文 献

- 1) 小岩洋一, 寺西正行, 辰川敬三, 藤本康夫, 日化誌 1975 (4) 678
- 2) 小岩洋一, 辰川敬三, 三池 彰, 寺西正行, 藤本康夫, 有合化 33 624 (1975)
- 3) 同上, 「ポリアミノ酸の合成 (第3報)」有合化投稿中
- 4) 寺西正行, 小岩洋一, 辰川敬三, 藤本康夫, 第19回高分子討論会講演要旨集 21 A 17 (1970)
- 5) H.P. Hood, H.R. Murdock, J. Phys. Chem. 23 498 (1919)