

N-포밀 아스파르테임의 산화 탈포밀 반응에 의한 아스파르테임의 제조 방법

박 동 현 · 이 윤 식

서울대학교 공과대학 공업화학과
151-742 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1
(1990년 9월 6일 접수)

Synthetic Method of Aspartame *via* Oxidative Deformylation of N-Formyl Aspartame

Dong-Hyun Park and Yoon-Sik Lee

Department of Chemical Technology, Seoul National University
Seoul, 151-742 Korea

(Received September 6, 1990)

요 약

For- α -APM을 For-Asp anhydride와 Phe-OMe를 MEK, CH₃CN, 물 등의 용매를 사용하여 반응시켜 효율적으로 합성하였다. For- α -APM과 For- β -APM의 혼합물로부터 순수한 For- α -APM의 회수는 pH 4.00에서의 연속적인 분별추출로 분리 수거가 가능하였다. H₂O₂ 공급원으로 H₂O₂/THF, 과탄산소다, H₂O₂/HCl/MeOH 등의 다양한 산화계를 사용하여, H₂O₂에 의한 산화방법으로 탈포밀반응을 성공적으로 수행하여 높은 수율로 아스파르테임을 얻을 수 있었다. 이때, HCl이나 TsOH와 같은 산이 H₂O₂의 분해를 억제시키고 산화능을 증대시킴으로써 탈포밀 반응의 효율을 높일 수 있었다.

Abstract : For- α -APM was efficiently prepared by the reaction of For-Asp anhydride and Phe-OMe in methylethylketone, CH₃CN, and in water. The selective recovery of For- α -APM from the resulting For- α -APM and For- β -APM mixture was possible via repetitive extraction at constant pH of 4.00. The oxidative deformylation was successfully performed by using several oxidants including H₂O₂/THF, sodium percarbonate, and H₂O₂/HCl/MeOH giving APM in high yields. The efficiency of the oxidative deformylation was raised in acidic condition for all the deformylation reactions.

1. 서 론

L-Aspartyl-L-Phenylalanine Methyl Ester(L-Asp-L-

Phe-OMe)의 구조를 가진 아스파르테임(aspartame; α -APM: APM)[1]은 설탕의 약 200배 정도의 당도를 지닌 저 칼로리의 인공 감미료로서, 이미 구미 각국에는

방대한 시장이 형성되어 있다. 이 시장의 규모는 급속히 커지는 추세여서, 현재 국내에도 여러 기업들이 새로운 APM 합성법의 개발에 많은 연구비를 투자하고 있는 실정이다.

본 실험실에서도 N-Benzoyloxycarbonyl(Z)-Asp anhydride를 사용한 액상 및 고상법에 의한 APM 합성법에 대해 연구하여, 그 결과를 이미 발표한 바 있다[2]. 그러나 공업화라는 관점에서 볼 때, 펩티드 합성에 일반적으로 사용되는 Boc-, Z- 등의 아미노 보호기는 원가가 워낙 높기 때문에, 이들을 사용한 합성은 공업적으로 이미 의미가 없게 되어, 저가의 아미노 보호기를 이용한 합성법의 개발이 요구되었다. 포밀(Formyl)기[3]를 아미노보호기로 채택한 합성법은 이미 많은 문헌에 보고된 바 있는데, 그 이유는 포밀기가 우선 매우 저가의 보호기이고 도입 및 제거반응 조건이 비교적 온화하여 공업화에 적합한 좋은 물성을 지녔기 때문일 것이다.

이 방법은 대체로 Z-Asp anhydride를 이용한 방법과 비슷하여 N-포밀(For) Asp anhydride를 합성하고 L-Phenylalanine Methyl Ester(Phe-OME)와 적절한 용매 하에서 반응시켜 For-APM을 얻는 것이 보편화된 전략으로 되어 있다. 반응 결과 For- α -APM과 For- β -APM이 같이 생기게 되는데, 이 혼합물로부터 For- α -APM만을 분리한 후, 탈포밀시켜 α -APM을 합성하는 것이 일반적인 방법이다. 이때, 탈포밀반응 조건에 따라 AP(Asp-Phe, demethylated APM), Asp(OME)-Phe-OH 혹은 Asp(OME)-Phe-OME 등의 에스테르기의 이탈, 자리옮김 또는 이중 에스테르화 되어진 부산물 등의 생성이 부반응으로 진행된다. 이렇듯 포밀기는 경제적인 장점을 가지고 있는 반면 몇가지 문제점을 아울러 안고 있어 실제 APM 합성에 있어서는 세심한 주의가 따르게 된다. 지금까지 문헌에 발표된 탈포밀방법들은 많은 비효율적 요소를 지니고 있어서, 원재료, 특히 Phe의 가격이 계속 인하되는 현실에서 볼 때, 이미 경제적 가치를 상실한 방법들이 많이 있다. 즉, 현재까지 가수분해방법[4], 가알코올분해방법[5,12,13], hydrazine 유도체[6]나 hydroxylamine[7]을 사용하여 포밀기 전이를 유도하는 방법, 수소화반응[8]이나 산화에 의한 방법[9] 등이 알려져 있으나, 이들 모두가 조금씩 문제점을 안고 있다. 가수분해방법이나 가알코올분해방법의 경우, 산성 반응조건에서 진행되므로 APM의 메틸 에스테르 결합의 손상을 야

기하기 쉽고, hydrazine의 높은 친핵성 역시 APM의 메틸 에스테르에 친핵성 치환반응을 일으킴이 지적되었으며, 수소화방법도 촉매의 높은 가격과 공정화의 제약이 문제점으로 지적되고 있다. 산화에 의한 탈포밀 방법은 비교적 진보된 형태의 것이나, 기존의 산화제를 이용한 방법으로는 역시 아직은 만족할 만한 해답은 주지 못하고 있다.

한편, 최근 Ando등[10]은 산소계 표백제인 과탄산소다를 olefin이나 황화물의 산화반응에 산소원으로 이용할 수 있음을 보고한 바 있다. 그들의 연구에 의하면 과탄산소다는 그 어느 산화제보다도 저가라는 장점 외에, 높은 반응성과 적은 부반응의 장점을 아울러 갖춘 우수한 산소원이라 하겠다. 본 실험실에서는 이 과탄산소다를 탈포밀반응에 도입하여 APM제조에 응용한다면 지금까지 발표된 어떤 방법보다 경제적 가치가 있는 방법이 될 것이라는 데 착안하여, 포밀기가 효과적이며 경제적인 보호기로서 이용될 수 있기 위해서 효과적이면서도 부반응이 없는 탈포밀화방법을 찾고자 하였다. 본 연구에서는 우선 For- α -APM과 For- β -APM의 비율을 증대시킬 수 있는 조건들을 찾아내고 이로부터 For- α -APM을 순수한 형태로 일단 회수한 다음 산화반응에 의한 방법으로 탈포밀화하여 순수한 α -APM을 높은 수율로 얻는 새로운 방법을 찾아 내어 그 결과를 발표하고자 한다.

2. 실험방법

IR 스펙트럼은 Shimadzu IR-400 Spectrophotometer, NMR 스펙트럼은 Jeol JIM-MH-100 Spectrometer를 사용하였으며, UV 스펙트럼은 Shimadzu MPS-500을 이용하여 측정하였다. 녹는점은 Yamato MP-21로 측정하였으며 별도의 보정은 하지 않았다. Optical rotation은 Jasco DIP-360으로 측정하였다. 전기영동[18]은 2000V에서 Asp-Phe를 표준물질로 사용하여 탈포밀 반응물의 정성과 정량분석을 행하였는데, 분리 후의 발색과 정량은 Cd-ninhydrin 발색제와 UV 흡광도로 결정하였다.

요오드화적정은 H_2O_2 수용액을 AcOH- $CHCl_3$ (3:2, v/v), KI-녹말 포화수용액, 증류수로 만든 혼합용액으로 처리 후, 0.1N $Na_2S_2O_3$ 수용액을 사용하여 적정하였다. 박막크로마토그래피(TLC)는 Merck silica gel 60F F_{254} 를 흡착제로 사용하였으며, 시료를

분리한 후 I_2 증기, 2% ninhydrin/EtOH 용액 또는 UV (254 nm)로 분리된 시료의 위치를 확인하였다. For-APM 합성과 탈포밀 단계에서 부반응으로 생성되는 For- α -APM 및 For- β -APM, For- $\alpha\beta$ AP, For-Asp, $\alpha\beta$ APM, For-Asp(OMe)-Phe-OH 및 Asp(OMe)-Phe-OH 등을 TLC로 구별하기 위하여 전개 용매 조건을 찾았다. 사용된 전개용매의 종류와 약칭은 A(MEK-AcOH-H₂O=70:15:15), B(BuOH-AcOH-H₂O=40:4:12), C(BuOH-AcOH-H₂O-Pyr=15:3:12:10)의 3가지였다.

사용한 모든 아미노산과 아미노산 유도체들은 모두 L-형이었으며, 이들 중 Asp는 Fluka, Phe는 Chemical Dynamics 제품을 사용하였다. α -APM은 Sigma로부터 구입했으며 과탄산소다는 시판중인 세제인 (주)동양화학의 옥시크린의 원재료를 공급받아 사용하였다. 유기용매는 일급시약을 사용하였으며 실험에 사용된 유기용매는 모두 문헌[19]에 나와있는 방법대로 정제하여 사용하였다.

2. 1. Authentic Sample 들의 합성

L-Aspartic anhydride hydrochloride(HCl·Asp anhydride)를 다음과 같이 만들었다. Asp(10g, 75mmole)을 40ml의 프로피온산에서 교반하여 현탁시킨 후 PCl_3 (2.46ml, 43mmol)를 넣고 상온에서 90분 교반시키자 시간이 지남에 따라 점점 탁해졌다. 무수초산(5g, 4.88ml)을 천천히 넣었고 8시간 더 반응시켰다. 반응 혼합액을 여과하고 무수에테르로 세척한(30ml×4) 다음, 생성물을 NaOH 알갱이와 함께 진공에서 건조시켰다. 수율 9.74g(86%); TLC Rf 0.43(A); MP 138-140°C(dec).

L-Phenylalanine methyl ester(Phe-OMe)는 다음과 같이 만들었다. Phe(20g, 0.12mole)을 무수 MeOH(42ml)에 가하고, 상온을 유지하면서 황산(12ml, 22g)를 1시간 동안 적가하였다. 산을 적가한 후 상온에서 30분 더 교반시킨 후에 6시간 동안 환류시켰다. 반응 혼합액을 상온으로 냉각한 후, 찬 포화 NaCl 수용액(180ml)과 디클로로에탄 120ml를 가하고 잘 교반하였다. 10N NaOH를 사용하여 pH를 9.0으로 조정후, 물층과 유기용매층을 각각 분리하여 모으고, 물층을 매번 pH를 조정하면서 디클로로에탄으로 여러 번 추출하였다. 디클로로에탄층을 모두 모아 망초로 탈수 시킨 후 용매를 회전 증발시키고 고진공에서

3시간 동안 완전히 증발시켜 oil상 잔유물을 얻었다. 수율 19.8g(92%); TLC, Rf 0.48(B). 이렇게 얻은 Phe-OMe를 40ml의 CH_2Cl_2 에 녹인 후 13ml conc. HCl을 적가하여 HCl·Phe-OMe를 얻었다. 침전을 CH_2Cl_2 로 세척한 후 감압 건조하여 말린 다음 MeOH-에테르로 재결정하여 침상의 결정을 얻었다. 수율 21.2g(81.3%); TLC Rf 0.48(B); MP 159-160°C (lit[20] 158-162°C).

포밀 α -아스파르테임(For- α -APM)의 합성을 위해 α -APM(400mg, 1.4mmol)을 포름산(2.03ml)에 녹이고 온도를 5°C 정도로 유지하면서 Ac_2O (0.815ml)를 1시간 동안 가하였다. 다 가입한 후 상온에서 4시간 더 교반하였고, 진공에서 증발시켜 oil상 잔유물을 얻었다. 이 oil상 잔유물에 THF를 가하여 미반응 α -APM을 침전시켰고, 여과하여 이를 제거하였다. 다시 여액을 증발시켜 같은 조작을 되풀이 하여 TLC 상에 α -APM이 나타나지 않을 때까지 하였다. 이와같이 얻은 순수한 N-For- α -APM(oil)을 무수 초산에테르에서 재결정하여 방사상의 침상결정을 얻었다. 수율 200mg(46%); TLC Rf 0.60 (B);MP 112-113°C(lit[4a] 123°C). NMR (D_2O) δ 2.80(broad, 2H), 3.30(broad, 2H), 3.60(d, 2H), 3.80(s, 3H), 4.24(t, 1H), 6.00(broad, 1H), 7.40(s, 5H), 8.50(s, 1H).

β -아스페르테임(β APM)은 다음과 같이 만들었다. Phe-OMe(15g, 84mmol)을 무수 아세톤(185ml)에 넣어 녹인 후 용액의 온도를 -30°C부근으로 낮춘 후 격렬하게 교반하면서 HCl·Asp anhydride(6.0g, 42mmol)을 1시간에 걸쳐 넣어 주었다. 1시간 동안 -30°C에서 더 교반한 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응혼합액을 농축시켜 침전을 얻었다. 여기에 물(213ml)과 $NaHCO_3$ (5.44g)를 넣어 녹인 후 물층을 디클로로에탄으로 추출(50ml×5회) 하여 과량의 Phe-OMe를 제거한 후 1N HCl로 용액의 pH를 4.8로 맞추었다. 진공으로 물의 양을 반으로 줄인 다음 냉각조에 밤새 방치하여 결정을 얻었고, 이를 여과한 후 EtOH로 세척하였다. 물에서 재결정하여 순수한 β -APM을 얻었다. 수율 5.39g(44%); TLC Rf 0.48(A), MP 194-196°C (lit[20] 196-197°C); NMR(D_2O) δ 2.78(t, 2H), 3.21(t, 2H), 3.80(s, 3H), 4.24(t, 1H), 7.40(s, 5H).

이와 같이 합성한 β APM(2g, 6.8mmol)을 포름산(10.2ml)에 녹이고 Ac_2O (4.1ml)를 1시간 동안 가하였다. 이때의 반응온도는 5°C를 유지하였다. 다시 상온에서

4시간 더 반응 시키고 진공에서 solvent를 완전히 제거하여 얻은 oil상 잔유물을 THF에 완전히 녹인 후 냉장실에 밤새 방치하여 β APM을 침전시켜 여과, 제거하였다. 다시 여액을 증발시켜 같은 조작을 되풀이하여 TLC 상에 β APM이 나타나지 않을 때까지 하였다. oil상 For- β APM을 초산에틸에 가열하여 녹인 후 냉장실에 보관하여 순수한 For- β APM의 결정을 얻었다. 수율 0.68g(31%); TLC Rf 0.40(B); MP 105–110°C; NMR(D₂O) δ 2.79(broad, 2H), 3.24(broad, 2H), 3.60(d, 2H), 3.80(s, 3H), 4.30(t, 1H), 6.00(broad, 1H), 7.40(s, 5H), 8.52(s, 1H).

2. 2. 포밀 α -아스파르테임(For- α -APM)의 대표적 합성방법

Asp(5g, 38mmol)를 포름산(80ml)에 넣고 격렬하게 교반하였다. 온도를 5°C 부근으로 유지시키면서 무수초산(33ml, 349mmol)을 40분간 적가했다. 상온에서 3시간 더 반응시킨 후 용매를 회전 증발시켜 농축한 후, 다량의 무수 에테르를 가하여 침전을 생성시켰다. 침전을 거르고 무수 에테르로 세척한 후 고진공에서 건조시켰다. 수율 5.36g(98%); MP 135–136°C (lit[3e] 141°C). 이렇게 합성한 For-Asp anhydride (3.48g, 24mmol)을 MEK(24ml)에 현탁시킨 뒤 AcOH(5.6ml)를 넣고 30분간 상온에서 교반시킨 뒤 반응용액의 온도를 5°C로 유지하면서 Phe-OMe(8.7g, 48mmol)을 100ml의 MEK에 녹인 용액을 1시간에 걸쳐 적가하였다. 적가를 끝냈을 때 반응 혼합액은 투명한 용액이 되었고 다시 상온에서 6시간 더 교반하여 반응을 끝냈다. 3시간이 지난 다음부터 흰침전이 생기기 시작하여 반응 종결시에는 반응 용기 전체에 꽂았다. 침전을 거르고 30ml의 MEK로 2번 세척한 후 건조시켜 3.4g의 For-APM(CO₂-). ⁺NH₃-Phe-OMe의 첨가 생성염을 얻었다. 여과액을 회전 증발시키고 남은 오일 잔류분을 130ml의 물에 녹이고 10N NaOH로 pH를 9.5로 조정하고 첨가생성염을 넣어 녹였다. 다시 pH를 9.5로 유지하면서 과량의 Phe-OMe를 CH₂Cl₂로 (50ml×4) 추출하여 없애고 TLC로 Phe-OMe이 제거됐음을 확인하였다. TLC Rf 0.80(For- α APM)(A), Rf 0.68(For- β APM)(B). 물층의 pH를 매번 4.00으로 조절하면서 초산에틸(100ml)로 10회 추출하여 초산에틸 용액을 모아 망초로 탈수시키고 회전 증발시켜 흰색 고체(For- α APM)를 얻었다. 수율(For- α APM)을 얻었다. 수율(For- α APM) 4.74g(For-Asp anhydride 기준하여

61%); TLC Rf 0.60(B) mp 116–118°C (lit[4a] 123°C). 같은 방법으로 pH 3.00이하에서 추출한 유기층을 모두 날려 보낸 다음 연황색 고체를 얻었는데 TLC 결과 For- β APM으로 확인되었다. 수율(For- β APM) 1.64g(For-Asp anhydride 기준하여 23%); TLC Rf 0.40(B); MP 102–107°C.

물을 사용한 합성도 전반적으로 같은 방법을 따랐다. Phe-OMe를 물에 녹인 다음 용액의 온도를 0–5°C로 유지하면서 For-Asp anhydride를 45분 동안 조금씩 가하여 주었다. 이때 반응액의 pH를 7.00으로 계속 유지시켰다. For- α APM은 pH 4.00에서 추출하여 회수하였다. 수율 14.2g(For-Asp anhydride 기준하여 63%); TLC Rf 0.80(주생성물, For- α APM)(A). 남은 물층을 진공하에서 회전 증발시켜 물의 양을 30ml 정도로 농축시킨 후 진한 HCl로 pH를 1.80으로 낮추어 For- β APM의 침상 결정을 얻었다. 여과한 뒤, 소량의 얼음물, acetone, 에테르로 세척하고 감압건조하였다. 수율: 5.2g(For-Asp anhydride 기준하여 23%); TLC Rf 0.70(For- β APM)(A).

2. 3. H₂O₂/THF를 이용한 대표적 탈포밀 방법

10–15%의 H₂O₂/THF용액을 다음 방법에 의해 제조하여 사용하였다. 100ml의 H₂O₂(30% in H₂O) 용액을 50ml의 에테르로 10회씩 추출하여 최종부피 500ml의 에테르 용액을 만들었다. 이 용액을 망초(200g)로 5시간, CaCl₂(110g)로 5시간 각각 건조시킨 후 여기에 잘 건조된 THF 약 300ml를 넣어준 다음 분별 증류하여 최종 부피 약 200ml의 H₂O₂/THF 용액을 만들었다. Na₂S₂O₃ 수용액에 의한 요오드화 적정 결과 약 13% H₂O₂가 함유되었음을 알았다. 이와 같이 제조한 13% H₂O₂/THF용액의 농도를 7%로 조정하였다. For- α -APM(1.5g, 4.65mmol)을 7% H₂O₂/THF(30ml)에 넣어 녹이고, 약 10분 후에 무수 TsOH(0.80g, 4.65mmol)를 넣고 60°C를 유지하면서 교반하였다. 약 6시간만에 TLC상으로 For- α APM이 완전히 없어졌음을 확인하였다. TLC Rf 0.64(TsOH, UV에 양성, ninhydrin에 음성)(A), Rf 0.58(α APM)(A), Rf 0.34(AP, 미량)(A). Zeolite로 3시간 처리하여 요오드화 적정으로 잔류 과산화물이 없음을 확인한 후, 회전 증발기로 농축하여 TsOH AP를 침전시켜서 여과하였으며, 여액을 에테르로 추출하여 미반응 For- α APM, TsOH·APM-diester를 제거했다. 물층을 농축하여 흡수성이 강한 흰색 고체를 얻었다. TLC Rf 0.63(TsOH)(A), Rf 0.58(α APM, 주생성물)(A), Rf 0.34

(AP, 미량)(A). TsOH-APM 형태로 결정을 얻기 힘들었으므로 반대이온을 다음 방법으로 바꾸어 주었다. Dewex 1X4 수지(Cl⁻ 형태)를 Funatsu의 방법대로 반대이온을 acetate 형태로 바꾸어 준 다음 Dowex 1X4 컬럼에 TsOH·APM을 소량의 물에 녹여 용출시켰다. 물로 계속 세척하여 용출된 최종물질을 모아 냉동 건조하여 순수한 APM을 얻었다. 수율 1.11g(81%); TLC Rf 0.59(α -APM)(A); mp 235-236°C(dec)(lit[20] 235-237°C(dec)).

TsOH 없이 H₂O₂/THF 만으로 같은 실험을 수행하였다. TLC 결과 반응이 매우 느렸으며 수율도 낮았다. For- α -APM과 α -APM 과 거의 같은 양으로 AP가 미량으로 존재하였다. 잔류 과산화물을 제거한 후 여과한 다음 여액을 얻었고, 감압 건조하여 흡수성이 있는 고체를 얻었다. 고체를 물에 녹여 pH를 4.0으로 조정 후 초산에틸로 For- α -APM을 추출하여 물층을 잔류 For- α -APM이 없음을 TLC로 확인한 후 물층을 냉동 건조하여 α -APM의 흰색 고체를 얻었다. 수율 170mg(37%); TLC Rf 0.60(α -APM)(A); mp 237-238°C(dec)(lit[20] 235-237°C(dec)). TsOH만에 의한 탈포밀반응 실험은 TLC 결과 For- α -APM의 대부분이 반응하지 않은 채 남아 있었고 α -APM 및 기타 물질이 소량 발견되었다. 별도의 분리조작은 하지 않았다.

2. 4. 과탄산소다(2Na₂CO₃·3H₂O₂)를 이용한 대표적 탈포밀 방법

For- α -APM(1.5g, 4.65mmol)을 75ml의 무수 THF에 녹이고 1.51g의 과탄산소다와 3.21g(18.6mmol)의 무수 TsOH를 넣었다. 반응 온도는 60°C로 유지했고 7시간 동안 교반시켰다. TLC 결과로부터 For- α -APM이 전혀 없음을 확인할 수 있었다. TLC Rf 0.64(TsOH)(A), Rf 0.58(α -APM, 주생성물)(A), Rf 0.33(AP, 미량)(A); 반응을 중지한 후 알맹이 상태로 남아 있는 과탄산소다와 침전된 NaOTs를 여과한 다음(과탄산소다, 0.61g; NaOTs, 1.31g), zeolite를 사용하여 50°C에서 3시간 처리하여 잔류 과산화물을 제거하였다. 여과한 후 여액을 회전 증발, 감압 건조하여 oil상 잔류물을 얻었다. 소량의 초산에틸에 oil상 잔류물을 녹인 다음, 냉각시켜서 잔류하는 NaOTs와 TsOH를 제거시켰다. 여과하여 얻은 여액을 다시 감압 건조하여 얻은 oil상 잔류물을 소량의 물에 녹인 후 냉각하여 소량의 TsOH·AP의 침전을 얻었으며, 여과하여 제거하였

다. 여액을 냉동건조하여 흡수성이 강한 흰색 고체를 얻었다. 흰색 고체를 물에 녹여 Dowex 1X4 수지(acetate 형태)에 용출시키고 냉동건조시켜 APM을 얻었다. 수율 1.03g(76%); TLC Rf 0.59(α -APM)(A); TLC Rf 0.60(α -APM)(A); mp 238-239°C(dec)(lit[20] 235-237°C(dec)).

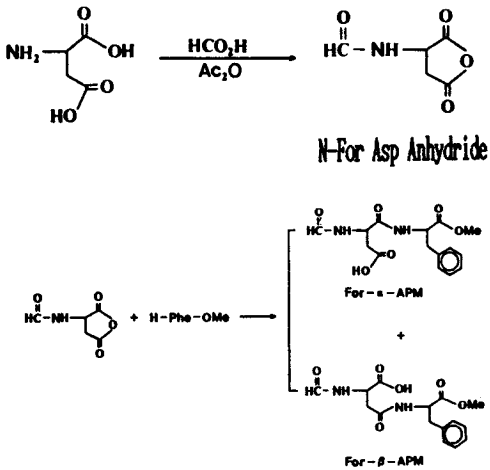
2. 5. H₂O₂ 수용액을 이용한 대표적 탈포밀 방법

For- α -APM 1g당 1N HCl:MeOH:10% H₂O₂=4:13:30(47ml)의 혼합용액에 For- α -APM을 녹이고 40°C에서 4시간 반응시켰다. 반응 종료 후 zeolite로 잔류 과산화물을 제거하였고, 냉동건조하여 얻은 고체를 THF에서 6시간 교반하여 미반응의 For- α -APM을 추출하였다. 여과하고 남은 고체를 THF로 세척한 후 감압건조하여 순수한 α -APM을 HCl염 상태로 얻을 수 있었다. 수율 75%. 같은 반응을 50°C, 60°C, 70°C로 바꿔가면서 실험하였다. 반응시간은 50°C에서 4시간, 60°C 3시간, 70°C에서 2시간씩 진행하였다. 수율 70%(50°C, 4h), 51%(60°C, 3h) 61%(70°C, 2h). TLC Rf 0.34(α -APM·HCl)(B); mp 105-106°C(lit[1], 105-110°C). 또한, MeOH 없이 30% H₂O₂/H₂O를 THF로 희석하여 약 7% H₂O₂용액으로 만든 다음 역시 40°C, 50°C, 60°C, 70°C에서 각각 실험하였다. 그 결과, 탈메틸화된 부산물이 많았고 탈포밀반응도 완전하게 되지 않았으므로 별도의 분리조작은 하지 않았다.

3. 결과 및 고찰

For-APM을 합성하는데 필요한 물질들인 For-Asp anhydride, Phe-OMe를 다음과 같이 합성하였다. Phe-OMe는 알려진 방법대로 H₂SO₄ 촉매하에서 Phe와 MeOH의 에스테르화 반응을 통해서 제조하였다. For-Asp Anhyd는 무수초산과 포름산을 이용하여 만들었다. 이렇게 준비한 For-Asp anhydride와 Phe-OMe를 반응시켜 For-APM을 합성하였다. 이 합성반응을 scheme 1에 도시하였다.

이때 scheme 1에서 보듯이 For-Asp anhydride가 Phe-OMe와 반응할 장소는 α β 카르보닐의 두 곳이기 때문에 For- α -APM과 For- β -APM 두 종류의 반응 생성물이 나오게 된다. 우리는 우선 For- α -APM의 생성을 최대한 높이기 위해 여러 반응조건들을 변화



Scheme 1

시켜 보았고, For- α -APM 만을 선택적으로 회수하는 방법을 찾아보았다.

우선 For-APM의 합성에서 전체적인 수율과 For- α -APM과 For- β -APM의 비율에 영향을 줄 것으로 예상되는 용매와 Phe-OMe의 양, 그리고 용액의 pH를 변화시키면서 전체 수율 및 α/β 비율을 비교하였으며, 반응조건에 따른 For- α -APM과 For- β -APM의 비율과 수율 등의 결과를 Table 1에 요약하였다.

Table 1. The Yield of For- α -APM under Various Reaction Conditions

Run	Solvent	Phe-OMe	For-APM ($\alpha + \beta$)	For- α -APM	α/β
1	MEK/AcOH ^a	2eq	89%	66%	2.85
2	MEK/AcOH ^a	1eq	80%	44%	1.22
3	CH ₃ CN/AcOH ^a	2eq	91%	65%	2.02
4	CH ₃ CN	2eq	39%	b	b
5	H ₂ O	1.1eq	86%	62%	2.60
6	H ₂ O	1.5eq	86%	63%	2.74
7	H ₂ O	2.2eq	85%	63%	2.86

^aThe amount of AcOH was 5%~20%(v/v) of the total solvent.

^bBecause of low yield, extra workup was omitted.

반응 용매로 methylethylketone(MEK)[11], CH₃CN[12]등을 사용한 경우, 대부분 반응 초기에 투명하던 반응 용액이, 반응이 진행됨에 따라 첨가생성염[13]

(For-APM(CO₂⁻) · ⁺NH₃-Phe-OMe)을 형성함에 따라 흰 침전이 생겼다. 첨가생성염에서 Phe-OMe를 CH₂Cl₂로 추출하여 회수한 후, 생성된 For- α -APM과 For- β -APM의 혼합물로부터, For- α -APM의 분리 수거는 추출 방법으로 수행하였다. 반응 혼합액을 농축시켜 만든 oil 상 잔유물을 물에 녹이고, 물층의 pH를 낮춰 가면서 초산에틸로 추출하여 pH에 따른 For- α -APM, For- β -APM의 선택적 분리 가능성을 TLC로 조사한 결과, pH 4.00이상에서 추출한 유기용액층으로부터 거의 순수한 For- α -APM를 얻을 수 있었으며, pH 3.00이하에서 추출한 유기층으로부터는 순수한 For- β -APM만을 얻을 수 있었다. 즉, pH 4.00에서 초산에틸에 의한 연속추출방법으로 For- α -APM과 For- β -APM의 분리 수거가 가능함을 알 수 있다.

Table 1에서 보는 바와 같이 용매의 종류가 일반적으로 For- α -APM과 For- β -APM의 총수율과 α/β 비율에 별 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났으나, Phe-OMe의 양과 AcOH의 존재가 큰 영향을 주고 있음을 알 수 있다. 그러나 별도의 실험을 통해서 밝혀진 바로는 Phe-OMe가 1.2eq 정도 이상만 되면 별 차이가 없었으며, AcOH의 양도 특별한 비례성은 보이지 않았다. 이밖에도 초산에틸, THF를 이용하여 같은 실험을 반복하였으나, MEK, CH₃CN에 못 미치는 결과를 얻었다.

한편 물[14]을 용매로 사용한 경우, 위와 같은 조작을 통하여 For- α -APM과 For- β -APM을 더욱 간편하게 분리 수거할 수 있었는데, 반응이 끝난 후 별도의 조작없이 pH를 4.00이상으로 낮추고 For- α -APM을 직접 추출할 수 있었으며 추출하고 남은 물층을 진공에서 농축시킨 후 pH를 1.80으로 낮출 경우, For- β -APM의 침상 결정을 선택적으로 얻을 수 있어 보다 간편한 방법임을 알 수 있었다. 이밖에도 Phe-OMe의 양에 따른 전체 수득량과 α/β 의 비율을 조사하기 위하여, Phe-OMe의 양을 변경시켜서 비교하였으나, 그 결과는 비슷하였다. 다른 조건은 모두 같이 유지하면서 Phe-OMe를 1.1eq. 넣어준 실험에서는 For- α -APM 62%, For- β -APM 24%의 수율을 얻었으며, 이 때 α/β 의 비율은 2.60이었고 α , β 를 합한 전체 수율은 86%이었다. Phe-OMe를 2.2eq. 사용한 실험에서는 For- α -APM 63%, For- β -APM 22%의 수율로 α/β 비율은 2.86, 전체수율은 85%이었다.

한편, 과량으로 넣어준 Phe-OMe의 회수율은 제조

공정상 매우 중요하므로 이의 회수율도 아울러 조사하였으며, 2당량 첨가반응의 경우, 평균 회수율은 과량으로 첨가된 Phe-OME에 대해 평균 75%의 회수율을 보였다.

한편, H₂O₂나 기타 과산화물에 의한 탈포밀 반응 조건을 찾기에 앞서, 반응종료 후 H₂O₂가 잔존하여 후처리될 때 폭발의 위험성을 제거하기 위해 경제적이고 효율적인 잔류 H₂O₂ 처리방법을 찾아보았다. 시도했던 제거제로는 Na₂S₂O₃, MnO₂, zeolite, 활성탄등이다. 이중 Na₂S₂O₃는 H₂O₂제거에는 좋았으나, 산화물인 망초가 다량 생성되어 오히려 망초가 반응 생성물보다 많아져 생성물의 손실이 심했다. MnO₂는 매우 격렬한 산소 생성반응으로 공정화에는 적합치 않았다. Zeolite를 이용한 방법은 약 7% H₂O₂/THF(20 ml)에 zeolite(1.5g)을 넣고 3시간 동안 각각 50°C로 가열한 후 요오드화적정^[15]한 결과 0.08%의 H₂O₂밖에 측정되지 않았으며, 제거과정도 매우 안전하게 진행되었다. 따라서, 산화방법이 공정화 될 경우, 반응종료 후에 zeolite 컬럼의 통과만으로 잔류 H₂O₂가 제거될 수 있을 것으로 보인다. 잔류 H₂O₂제거반응 결과들을 모아 Table 2에 나타내었다.

Table 2. The Amount of Residual H₂O₂ after Treating with Various Reagents

Reagent	Condition	Residual H ₂ O ₂ Conc.(%) ^a
Na ₂ S ₂ O ₃ ^b	3h, 50°C	0.0
charcoal	〃	6.8
zeolite	〃	0.08
MnO ₂	〃	c
none	〃	6.3

^aInitial concentration was 7% H₂O₂ / THF.

^bMore than 5g of Na₂S₂O₃ was required for treating 20ml of 7% H₂O₂ / THF.

^cTitration was not possible.

과산화물에 의한 For- α -APM의 탈포밀반응은 7% 혹은 13%의 H₂O₂가 포함된 유기용매(THF)나 30% H₂O₂ 수용액등을 이용하였다. 7% H₂O₂/THF의 경우 60°C를 유지하면서 6시간 동안 교반한 후 TLC로 확인한 결과, For- α -APM, α -APM이 거의 같은 양으로 존재함이 관찰되었고, AP도 미량 존재하였다. 반응용액에 zeolite를 넣고 40°C로 교반하면서 잔류 과산

화물을 제거하고 후처리하여 얻은 α -APM의 수율은 37%였다.

한편, Duke^[16] 등은 강한 산성 조건하에서는 H₂O₂의 분해가 지연되고 산화능이 강해짐을 밝힌 바 있는데, 여기에 착안하여 p-toluenesulfonic acid(TsCH)를 사용하여 같은 실험을 수행하였다. 그 결과 6시간 후에는 For- α -APM이 완전히 없어지고 AP의 생성은 감소되었음을 확인하였다. 이로 보아 TsOH가 H₂O₂의 안정제 역할을 하여 염기촉매성 H₂O₂의 분해^[16]를 방지하고, 산화능을 강화시킨 것으로 보인다. 생성된 α -APM은 tosylate염의 형태였기 때문에 Dowex 1X4 수지^[17]를 이용하여 TsOH를 제거하여 81%의 수율로 순수한 α -APM을 얻을 수 있었다. H₂O₂/THF system에서의 TsOH의 기여도를 알아보기 위해 TsOH만에 의한 탈포밀을 시도하였으나 For- α -APM의 대부분이 반응하지 않은 채 남아 있었고 α -APM 및 기타 물질이 미량 발견 되었다.

한편, 과탄산소다(2Na₂CO₃ · 3H₂O₂)의 발생원(發生源)으로 이용한 새로운 탈포밀방법을 시도하여 보았다. 과탄산소다는 물에서는 녹아서 발생기 산소를 발생시키는 것으로 되어 있으나, 거의 모든 유기용매에서는 녹지 않으므로 유기용매에서 직접 사용은 불가능했다. 따라서 유기용매에 과탄산소다를 넣고, 여기에 산을 첨가하여 탄산소다와 산염기반응을 일으켜 H₂O₂를 유리시키는 방법을 시도하였다. Dowex 50WX4나 포름산 존재 아래서는 H₂O₂가 잘 유리되지 않았고, AcOH에서는 어느정도 반응이 진행되었으나 만족할 만한 결과는 얻지 못하였다. 그러나 TsOH를 첨가했을 때는 H₂O₂가 잘 유리되었다. For- α -APM을 무수 THF에 녹이고 과탄산소다(2당량)와 무수 TsOH(3당량)를 넣은 후 60°C로 7시간 동안 처리한 결과 For- α -APM이 전혀 없음을 확인할 수 있었다. 남아 있는 과탄산소다와 침전된 NaOTs를 여과한 다음 zeolite로 처리하여 잔류 과산화물을 제거한 후 얻은 α -APM의 수율은 76%였다.

이밖에 30% H₂O₂수용액을 이용한 탈포밀방법도 찾아 보았다. For- α -APM을 THF에 녹이고 H₂O₂수용액을 첨가하여 반응시켰으나 탈포밀반응이 잘 진행되지 않았다. 산성 분위기를 제공하기 위해 HCl을 첨가하여 보았으나, 탈메틸화된 부산물이 많았다. 에스테르의 형성 및 분해반응은 산(酸)평형반응이므로 반응액에 적당한 양의 MeOH이 존재할 경우 For-

α -APM의 탈포밀반응을 수용액상에서 진행시켜도 α -APM의 메틸 에스테르분해반응이 지연될 수 있을 것으로 예상할 수 있다. 10% H_2O_2 수용액에 MeOH, 1N HCl 등을 다양한 비율로 섞어 만든 용액에 For- α -APM을 녹이고 온도 조절을 40°C, 50°C, 60°C, 70°C로 변화시키면서 실험한 결과, 가장 좋은 결과를 보인 조건은 For- α -APM 1g당 1N HCl:MeOH:10% H_2O_2 =4 : 13 : 30(47ml)의 혼합산화계였으며, 순수한 HCl염 상태의 α -APM을 50-75%의 수율로 얻을 수 있었다. HCl을 넣지 않았을 경우 탈메틸화된 부산물이 많았고 탈포밀반응도 완전하게 진행되지 않았다. 이 역시 앞서 언급한 강산성 분위기에서의 과산화물의 안정성과 산화능의 향상에 기인한 것으로 보인다. 이상에서 시도한 각종 과산화물에 의한 탈포밀반응의 결과들을 모아 Table 3에 제시하였다.

Table 3. The Result of Deformylation with Various Oxidation Conditions

Run	Deformylation Condition	Reaction Temp & Time	Yield(%)
1	7-13% H_2O_2 / THF	60°C, 6h	37
2	7-13% H_2O_2 / THF, TsOH	60°C, 6h	81
3	과탄산소다 / THF, TsOH	60°C, 7h	76
4	10% H_2O_2 / H_2O / THF	40-70°C, 4h	a
5	10% H_2O_2 / H_2O / MeOH / HCl	40°C, 4h	75
6	〃	50°C, 4h	70
7	〃	60°C, 3h	51
8	〃	70°C, 2h	61
9	TsOH / THF	60°C, 6h	no reaction

^aThe yield was not calculated because of sluggish reaction and by product formation.

Table 3에서 보인 바와 같이 각 산화제별로 각기 비슷한 수율로 비교적 우수한 반응성을 나타내고 있다. 이들 방법 중 특히 과탄산소다/THF/TsOH 산화계는 수율, 가격 및 공정화에 유리한 점을 갖고 있다고 생각되며 아직까지 시도된 바 없는 탈포밀방법으로, 앞으로의 유사 연구에 많은 관심을 가질 예정이다.

4. 결 론

1. For- α -APM은 For-Asp anhydride와 Phe-OMe를 반

응시켜 약 90%의 수율로 합성하였으며, 용매로는 MEK, CH_3CN , 물 등을 사용하였다. For- α -APM과 For- β -APM의 혼합물로부터 순수한 For- α -APM의 회수는 pH 4.00에서의 연속적인 분별추출로 분리 수거가 가능하였으며, 과량으로 넣어 준 Phe-OMe를 75%이상 회수할 수 있었다.

- H_2O_2 에 의한 산화방법으로 탈포밀반응은 비교적 잘 진행되었으며, 이때의 H_2O_2 공급원으로 H_2O_2 /THF, 과탄산소다, H_2O_2 /HCl/MeOH 등의 다양한 산화계를 사용하였다. 또한, HCl이나 TsOH와 같은 산이 H_2O_2 의 분해를 억제시키고 산화능을 증대시킴으로써 반응의 효율을 높일 수 있음을 알 수 있었다.
- 반응종료 후 zeolite를 첨가하면 잔류 H_2O_2 가 매우 효율적으로 안전하게 제거되어, 산화방법의 공정화에 있어 후처리 과정을 제시하였다.

참 고 문 헌

- R.H. Mazur, J.M. Schlatter, and A.A. Goldkamp, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2684(1966).
- Y. S. Lee, *SNU Engineering Report*, **17**, 313(1985).
- (a) Japan Kokai, 48-18249 (1973).
(b) Japan Kokai, 48-61451 (1973).
(c) Japan Kokai, 48-76835 (1973).
(d) Japan Kokai, 49-14217 (1974).
(e) Japan Kokai, 50-58025 (1975).
(f) Japan Kokai, 51-13737 (1976).
(g) Japan Kokai, 51-113841 (1976).
(h) Japan Kokai, 55-167267 (1980).
- (a) Ger. off., 2,107,411 (1971).
(b) US Patent, 3,879,372 (1975).
(c) US patent, 3,948,971 (1976).
(d) Euro. pat. Appl., 0.048.051 (1981).
- (a) J. C. Sheehan, D-D. H. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1154(1958).
(b) US Patent, 1,243,169(1971).
(c) Ger. Off., 2,635,948(1977).
- (a) 대한민국 특허공보 82-2080(1982).
(b) R. Geiger and W. Siedel, *Chem. Ber.*, **101**,

- 3386 (1986).
7. Ger. off., 2,554,421(1976).
 8. G. Losse, D. Nadolski, *J. Prak. Chem.*, 4(24), 118 (1964).
 9. (a) G. Losse, W. Zönnchen, *Chem. Ber.*, 636, 140 (1960).
(b) G. Losse, *Z. Chem.*, 5, (6), 225(1965).
(c) Japan Kokai, 51-39602(1976).
 10. W. Ando, *Chem. Lett.*, 664(1986).
 11. Euro. Pat. Appl., 0,058,063(1982).
 12. US Patent, 4,071,511(1978).
 13. US Patent, 4,173,562(1979).
 14. Y. Isowa, M. Ohmori, T. Ichikawa, and K. Mori, *Tetrahedron Lett.*, 28, 2611(1979).
 15. B. Park, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 3, 77(1931).
 16. F. R. Duke and T. W. Haas, *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 704(1960).
 17. G. Funatsu, *Biochem.*, 3, 1351(1964).
 18. M. Bier, ed., "Electrophoresis", Academic Press, New York, Vol I, (1959).
 19. D. D Perrin, W. L. F. Armarego, and D. R. Perrin, "Purification of Laboratory Chemicals", 2nd ed., Oxford, Pergamon Press(1980).
 20. Y. Ariyoshi, T. Yamatini, and N. Uchiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 46, 1893(1973).