

7-Aminocephalosporanic acid를 포함하는 Aminophosphonate 유도체의 합성

김 상 범

한국가스공사 연구개발원
(1997년 5월 27일 접수, 1997년 6월 19일 채택)

Synthesis of Aminophosphonate Derivatives Containing 7-Aminocephalosporanic acid

Sang Bum Kim

R & D Center, Korea Gas Corporation, Ansan 425-150, Korea
(Received May 27, 1997, Accepted June 19, 1997)

요 약 : Phthalic anhydride를 출발물질로 halogenation, phosphorylation하여 diethyl phthalimidoalkylphosphonate를 합성하였다. 이 화합물을 chlorination하여 O-ethyl phthalimidoalkylphosphonochloridate를 만든후 diphenylmethyl 7- β -amino-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate와 coupling하여 지금까지 알려져 있지 않은 화합물 diphenylmethyl-7- β -[O-ethylphthalimidomethylphosphonyl]-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate와 diphenylmethyl-7- β -[O-ethylphthalimidoethylphosphonyl]-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate를 각각 19%, 43%의 수율로 합성하였다.

Abstract : 7-Aminocephalosporanic acid(7-ACA) was reacted with diphenyldiazomethane(DPM) to get diphenylmethyl 7- β -amino-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate. Diethyl phthalimidoalkylphosphonate was chloridated with a slight excess of phosphorus pentachloride to the O-ethyl phthalimidoalkylphosphonochloridate. Previously unreported two compounds, diphenylmethyl 7- β -[O-ethyl phthalimidomethylphosphonyl]-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate and diphenylmethyl 7- β -[O-ethyl phthalimidoethylphosphonyl]-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate were synthesized by coupling reaction of DPM 7-ACA and O-ethyl phthalimidoalkylphosphonochloridate. All of the compounds including starting materials and reaction intermediates were characterized by ^1H NMR and FT-IR spectroscopy.

1. 서 론

1959년 Horiguchi등이[1] 양의 전위에 있는 *ciliated protozoa*에서 2-amino-ethylphosphonic acid를 분리하여 생체내의 aminophosphonic acid의 존재를 최초로 확인한 이후 현재까지 약 26종의 탄소-인 화합물이 생체내에서 발견되었다[2].

탄소-인 화합물은 이것을 함유한 지질 혹은 당지질과 조계류 막계의 기능, 신경기능관계와 생체막계의 온도, 영양조건에 대한 적응관계에 많은 흥미를 불러일으키고 있으나, 그의 생합성과 분해에 관한 메카니즘은 아직까지 확실하게 규명되지 않고 있으며, 현재로는 리피드 또는 아미노산과의 관계로부터 이의 메카니즘과 생체내의 역할을 밝히려는 연구가 진행되고 있다[3].

2-Aminoethylphosphonic acid와 2-amino-3-phosphonopropionic acid의 생합성은 생체에서 phosphopyruvate의 분자내 재 배열

을 통해서 이루어지는 것으로 알려져 있으며 최근에는 amino-phosphonic acid와 그 유도체들의 합성과 더불어 이들이 가지는 생물학적인 활성에 대한 많은 연구가 진행되고 있다[4-6].

아미노포스폰산이 아미노산과 펩티드 결합을 통하여 생체내에서 단백질 구성 성분으로 존재할 가능성을 Quin[7]이 제안한 이래로, 아미노포스폰산을 포함하는 포스포펩티드의 발견과 합성 및 생체내에서의 작용에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

Okada등[8]은 1-AEPn과 alanine의 dipeptide를 합성하여 L-Ala-1-AEPn이 그램 음성균에 대해 항생효과가 있음을 보고 하였으며, Kafarski등[9]도 P-terminal 1-aminoalkylphosphonic acid와 alanine, leucine등의 dipeptide를 합성하여 항박테리아성이 있음을 보고하였다.

항생제로 널리 사용되고 있는 cephalosporin 유도체중 인화합

물이 치환된 cephalosporin화합물의 연구도 진행되고 있다. Pfizer 제약회사에서는 phosphonate기를 가진 알킬산을 cephalosporin의 7번 위치에 아미드결합시킨 α -(phosphonoalkyl) cephalosporin유도체를 합성하여 그램 음성균과 pseudomonas균에 활성이 있음을 확인 하였다[10]. Phosphonate기가 치환된 화합물과 함께 cephalosporin기본구조의 변형도 진행되었다. Campbell등[11]은 4-acetoxazetidin-2-one을 phosphite나 phosphonite로 Arbuzov반응시켜 4-oxoazetidin-2-yl phosphonate나 phosphinate를 얻은후 가수분해하여 aspartic acid의 α -phosphonic acid나 phosphinic acid의 유사체를 합성하고 alanine, alanine-alanine과 펩티드를 합성하여 박테리아에 활성이 있음을 보고하였다. Satoh등[12]은 cephalosporin핵의 sulfur를 전자흡입성 포스포네이트기로 치환시켜 광활성을 가진 7-substituted-1-phosphadethia-3-cephem-1-oxide를 합성 하였다.

본 연구에서는 포스포노펩티드의 구조 및 생물학적 활성과의 상관관계를 규명하기 위한 연구의 일환으로 cephalosporin의 7번 위치에 아미노알킬포스포산을 도입하여 생물학적 활성이 기대되는 새로운 화합물을 합성하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

반응에 사용된 시약중 triethyl phosphite(purum급), anisole, benzyl bromide, thionyl chloride는 Aldrich제이며 diethylphosphite, trifluoroacetic acid, phosphorus tribromide는 Fluka제(G.R.급)를 사용하였다. Amberlite weakly basic anion exchange resin(IRA-68)은 Sigma제를 사용하였고 용매는 1급시약을 사용하였으며 필요에 따라 재증류 하였다.

녹는 점은 Mettler F 61 M. P. apparatus(Orion Res. Inc.), 핵자기공명 스펙트럼은 JNM-PMX 60NMR spectrophotometer, 적외선 분광스펙트럼은 Beckman acculab T.M.I spectrophotometer, 원소분석은 Perkin-Elmer model 240을 사용하여 측정 하였다.

2.2. 출발 물질의 합성

2-Chloroethyl phthalimide는 phthalic anhydride와 monoethanolamine을 기름 중탕에서 반응시켜 합성한 2-hydroxyethyl phthalimide와 thionyl chloride를 2시간 환류시켜 합성 하였으며[13], N-chloromethyl phthalimide는 phthalimide와 포르말린, 물을 환류시켜 만든 N-hydroxymethyl phthalimide와 thionyl chloride를 2시간 환류시켜 합성 하였다[14]. Diphenyldiazomethane(DPM)은 benzophenone hydrazone과 무수 황산 마그네슘, 무수 에탄올을 상온에서 30시간 격렬하게 교반시켜 얻었다.

2.3. Diethyl phthalimidoethylphosphonate의 합성

2-Chloroethyl phthalimide 105 g(0.05 mol)과 triethylphosphite 83.1 g(85.7 ml, 0.5 mol)을 질소를 통과시키면서 4시간 30분 반응시켰다. 이때 Dean-Stark trap에는 ethyl chloride가 이론량의 80%인 25.6 g이 생성 되었다. 반응혼합물을 헥산으로 25 ml씩 5회 추출하여 미반응물인 2-chloroethyl phthalimide를 제거

시켜 정제된 기름상의 생성물 50 g(32%)을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3); δ (ppm) 7.8(s, 4H, C_6H_4 -), 4.25(m, 4H, $-\text{CH}_2-$), 3.97(m, 2H, $\text{CH}_2\text{N}-$), 1.81-2.55(m, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.35(t, 6H, $-\text{CH}_3$); IR (neat): 1240 cm^{-1} (P=O), 1050 cm^{-1} (P-O-C)

2.4. Diethyl phthalimidomethylphosphonate(Pht-AMP)의 합성

N-Chloromethyl phthalimide 11 g(0.056 mol)과 triethyl phosphite 9.3 g(9.6 ml, 0.056 mol)을 증류관이 장치된 100 ml 2구 플라스크에 넣고 150-160°C의 기름중탕에서 2시간 환류시켰다. 얻어진 노란색 용액을 클로로포름 30 ml로 3회 추출한 후 Drierite로 수분을 제거하고 여과하여 여과액을 감압농축 시켰다. 얻어진 노란색의 잔유물을 헥산으로 재결정하여 흰색의 결정 8 g(48%)을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3); δ (ppm) 7.15(s, 4H, C_6H_4 -), 4.42(m, 4H, $-\text{CH}_2-$), 4.3(d, 2H, $\text{CH}_2\text{PO}-$), 1.4(t, 6H, $-\text{CH}_3$); IR (neat): 1710 cm^{-1} (C=O), 1240 cm^{-1} (P=O), 1050 cm^{-1} (P-O-C); 녹는점: 68°C

2.5. O-Ethylphthalimidomethylphosphonochloridate(1a)의 합성

용량 200 ml 1구 플라스크에 Pht-AMP 43.5 g을 벤젠 125 ml에 녹이고 오염화인 30.6 g을 첨가하여 15시간 동안 환류시킨다. 냉각후 감압농축하여 잔유물을 방치하면 결정이 생성되며 이를 무수 THF-에테르로 재결정하여 38 g(90.45%)의 순수한 생성물을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3); δ (ppm) 8.2 (s, 4H, C_6H_4), 4.5 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{P}$, $-\text{POCH}_2$), 1.5 (q, 3H, CH_3); 녹는점[15]: 90-92°C

2.6. O-Ethylphthalimidoethylphosphonochloridate(1b)의 합성

Diethyl phthalimidoethylphosphonate 31.1 g(0.1 mol)을 벤젠 100 ml에 녹이고 오염화인 20.8 g(0.1 mol)을 가한 후 기름중탕에서 24시간 환류시켰다. 이때 생긴 반응 혼합물을 감압농축하고 실온에서 방치하여 흰색결정 27.4 g(91%)을 얻었다. 이것을 무수 THF-에테르로 재결정하여 순수한 생성물을 얻었다.

녹는점 : 87 °C

2.7. Diphenylmethyl 7- β -amino-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate (2)의 합성

7-Aminocephalosporanic acid(7-ACA) 4.35 g(0.0159 mol)을 50 ml(dichloromethane : methanol = 3 : 2, v/v)에 녹이고 15 ml dichloromethane에 DPM 3.1 g(0.0159 mol)이 녹아있는 용액을 서서히 가하면서 교반한다. 실온에서 색이 열어질 때까지 반응을 지속시킨다. 탁한 혼합액을 sodium hydrogen carbonate 30 ml로 씻어내고 15 ml 증류수로 3회 세척한 후 무수황산 마그네슘으로 건조시킨다. 이 용액을 여과하면 적색의 오일을 얻을 수 있다. 에테르로 과량의 DPM을 제거하면, cephalosporanate가 고체화된다. 관 크로마토그래피(silica gel, 염화메틸렌 : 초산 에틸 = 1 : 1, Rf = 0.35)로 분리하여 4.18 g(60%)을 얻었다.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3); δ (ppm) 7.26(s, 10H, $2\text{C}_6\text{H}_5$ -), 6.90 (s, 1H,

-COOCHPh), 4.80-5.15 (m, 4H, C-6, C-7, -CH₂-OC(=O)CH₃), 3.36(t, 2H, C-2H), 1.96(s, 3H, -OC-CH₃); 녹는점: 124°C

2.8. Phosphonoamide결합을 가지는 7-ACA유도체의 합성

2.8.1. Diphenylmethyl-7-β-(O-ethylphthalimidomethylphosphonyl)-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate(3a)의 합성

무수 클로로포름 15 ml에 (2)번 화합물 390 mg(0.8892 mmol)을 얼음-물 증탕에서 녹인후 triethylamine 0.12 ml(1.0 eq)를 가하고 O-ethylphthalimidomethylphosphonochloridate 198 mg을 천천히 가한다. 같은 온도에서 36시간 반응시킨후 물 10 ml로 3회 세척하고 무수 황산마그네슘으로 건조시킨다. 여액을 감압하에서 증발시킨 뒤 관 크로마토그래피(silica gel, 초산에틸:헥산 = 1:1, R_f = 0.3)로 분리하여 120 mg(19%)을 얻었다.

¹H NMR (CDCl₃); δ(ppm) 7.45-7.35 (br s, 4H, C₆H₄), 7.3-7.2 (br s, 10H, 2C₆H₅), 7.0 (s, 1H, -OCHPh₂), 4.9-4.7 (q, 2H, -P-OCH₂-), 3.6, 3.38 (dd, 2H, -SCH₂), 2.0 (m, 5H, -OC(=O)CH₃, -NCH₂), 1.2 (t, 3H, -OCH₂CH₃)

2.8.2. Diphenylmethyl-7-β-(O-ethylphthalimidoethylphosphonyl)-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate(3b)의 합성

무수 염화메틸렌 12 ml에 (2)번 화합물 300 mg(0.684 mmol)을 얼음-물 증탕에서 녹인후 triethylamine 0.095 ml(1.0 eq)를 가하고 O-ethylphthalimidoethylphosphonochloridate 213 mg을 천천히 가한다. 같은 온도에서 24시간 반응시킨후 물 10 ml로 3회 세척하고 무수 황산마그네슘으로 건조시킨다. 여액을 감압하에서 증발시킨 뒤 관 크로마토그래피(silica gel, 초산에틸:클로로포름 = 1:1, R_f = 0.4)로 분리하여 207 mg(43%)을 얻었다.

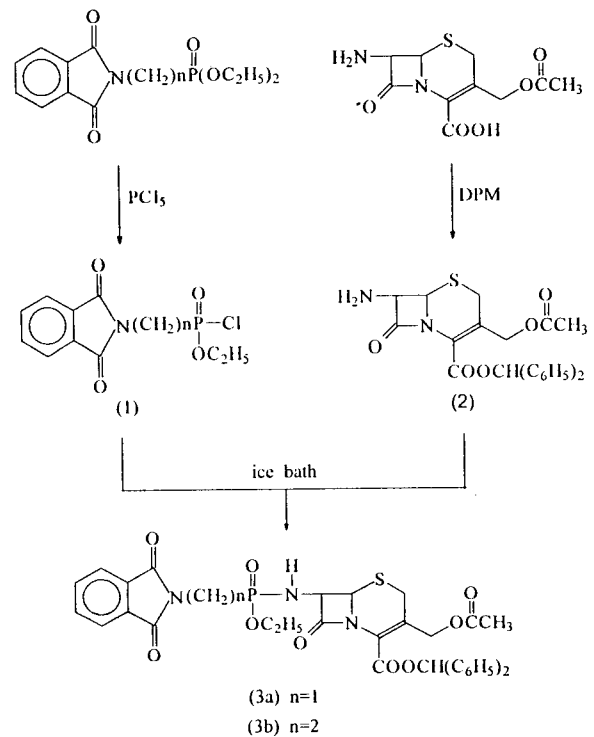
¹H NMR (CDCl₃); δ(ppm) 7.45-7.35 (br s, 4H, C₆H₄), 7.3-7.23 (br s, 10H, 2C₆H₅), 7.0 (s, 1H, -OCHPh₂), 4.9-4.7 (m, 4H, -CH₂O(O)CH₃, -SCHCN-, -S(CH-)₂CHNH-), 4.1 (m, 2H, -P-OCH₂-), 3.52, 3.41 (dd, 2H, -SCH₂), 2.0 (m, 5H, -OC(=O)CH₃, -NCH₂), 1.7 (m, 2H, -CH₂-), 1.2 (t, 3H, -OCH₂CH₃)

3. 결과 및 고찰

Soine과 Buchdahl[13]의 방법에 따라 mono ethanolamine과 phthalic anhydride를 반응시켜 2-hydroxyethyl phthalimide를 얻었고, 여기에 Nefkens[14]의 방법으로 thionyl chloride를 반응시켜 2-chloroethylphthalimide를 합성 하였다.

2-Chloroethylphthalimide와 triethylphosphite를 Dean-Stark trap을 사용하여 반응시켜 diethyl phthalimidoethylphosphonate를 32%의 수율로 합성 하였으며 질소가스를 통과시켜 반응도중 생성되는 ethyl chloride를 제거, 부반응을 방지하였다.

Pht-AMP는 Imoto[16]와 Kosolapoff등[17]의 방법으로 합성 하였으며 분해되기 쉬운 N-bromomethyl phthalimide대신 N-chloromethyl phthalimide를 이용하여 합성 하였다. 이렇게 합성한 Pht-AMP는 결정상태가 상이한 3가지의 결정형과 액체로 얻었으며 이 네가지 Pht-AMP는 IR 분석 결과 같은 물질임이 확인 되었다. 이 결정의 차이는 약간의 불순물이 섞인 영향으로 추측되며 헥산으로 수회 반복하여 재결정화 시켜 한가



Scheme 1. Synthesis of Diphenylmethyl 7-β-[O-ethylphthalimidoalkylphosphonyl]-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate.

지의 순수한 결정으로 얻을수 있었다. Pht-AMP를 오염화인과 60°C에서 15시간 반응시켜 91%의 수율로 화합물 (1a)를 얻을수 있었다. 이 화합물은 재결정화 하지않고 다음 반응에 바로 사용하였다. 이는 재결정시 THT와 ether에 미량의 수분만 있어도 화합물 (1a)가 쉽게 분해되기 때문이다. 화합물 (1b)도 위와 마찬가지로 Pht-AMP와 오염화인을 24시간 환류시켜 91%의 수율로 얻었다. Cephalosporin을 에스테르화 시키려면 수 소화촉매로 인한 황의 피독효과때문에 산성조건하에서 제거가 능한 화합물로 에스테르화 시켜야 한다. 본 연구에서는 Micetich 등 [18]과 같이 diphenyldiazidomethane(DPM)을 사용하여 7-ACA를 에스테르화 시켰다.

얼음-물 증탕에서 용매에 녹인 DPM 7-ACA(2)에 triethylamine을 첨가하고 화합물(1a)를 10분에 걸쳐 적가한후 온도를 상온으로 서서히 올리면서 36시간 교반시켰다. 이 반응 혼합물을 증류수로 3회 세척하고 무수 황산마그네슘으로 건조시켰다. 여과후 여액을 관 크로마토그래피 (silica gel, 초산에틸:헥산 = 1:1)로 분리하여 diphenylmethyl-7-β-[O-ethylphthalimidomethylphosphonyl]-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate(3a)를 19%의 수율로 얻었다. P-N결합은 산성조건에서 상당히 불안정 하므로 반응후 즉시 분리하여야 한다. 헥사기 공명스펙트럼에서 DPM 7-ACA의 특징적인 4번 위치 DPM proton이 δ 7.0에서, Pht-AMP의 P-OCH₂CH₃가 δ 4.1에서 확인되었다.

생물학적 활성을 갖는 것으로 알려진 Diethyl 2-aminoethylphosphonate (2-AEPn)을 DPM 7-ACA의 7번 위치에 도입하는 반응도 수행하였다. 2-AEPn을 벤젠 용매하에서 오염화인

으로 chlorination하여 Pht-AEP-Cl를 얻은후 이를 분리하지 않고 (3a)의 합성과 같은 반응조건으로 화합물을 합성하였다. 단, 반응시간은 12시간으로 (3a)합성시간보다 짧았고, 판 크로마토그래피 (silica gel, 초산에틸:클로로포름 = 1:1)로 분리하였다. 핵자기 공명스펙트럼에서 DPM 7-ACA의 2번 위치에 있는 두개의 proton이 각각 δ 3.48, δ 3.52에서 이중선으로, Pht-AEP의 P-OCH₂CH₃가 δ 1.2에서 확인되었다.

4. 결 론

Phthalic anhydride를 출발물질로 halogenation, phosphorylation하여 diethyl phthalimidoalkylphosphonate를 합성하였다. 이 화합물을 chlorination하여 O-ethyl phthalimidoalkylphosphonochloridate를 만든후 diphenylmethyl 7- β -amino-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate와 coupling하여 지금까지 알려져 있지 않은 화합물diphenylmethyl-7- β -[O-ethylphthalimidomethylphosphonyl]-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate와 diphenylmethyl-7- β -[O-ethylphthalimidoethylphosphonyl]-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylate를 각각 19%, 43%의 수율로 합성하였다.

참 고 문 헌

1. M. Horiguchi and M. Kandatsu, *Nature*, **184**, 901(1959).
2. J. A. Alhadeff and G. D. Davies, *J. Biochem*, **9**, 4866 (1970).
3. M. Hoiguchi, *Biochem, Biophys. Acta.* **261**, 102(1967).
4. Bernard Bioulac, *Gen. Pharmaceu.*, **10**, 121(1979).
5. H. Tamari, M. Horiguchi and M. Kandatsu, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **23**, 49(1977).
6. S. B. Kim, Y. J. Kim, S. I. Hong, *J. Kor. Chem. Soc.*, **38**, 682(1994).
7. Quin, *Science*, **144**, 1133(1964).
8. Y. Okada, S. Iguchi, M. Mimura and M. Yagyu, *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1320(1980).
9. B. Lejczak, P. Kafarski, H. Sztajer and P. Mastalertz, *J. Med. Chem.* **29**, 2212(1986).
10. T. Takaya and T. Chiba, *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP* 55-115, 892(1980).
11. M. M. Campbell, N. I. Carruthers and S. J. Mickle, *Tetrahedron*, **38**, 2513(1982).
12. H. Satoh and T. Tsuji, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 1733(1984).
13. T. D. Soine and Buchdahl, *Org. Syn. Coll.*, **4**, 106(1967).
14. H. H. L. Nefkens, *Nature*, **193**, 974(1962).
15. K. Yamauchi, S. Ohtsuki and M. Kinoshita, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 1158(1984).
16. K. Yamauchi, M. Kinoshita and M. Imoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **45**, 2531(1972).
17. G. M. Kosolapoff, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 109(1944).
18. R. G. Micetich and R. Singh, *Synthesis*, 693(1985).