

Aminobenzylphosphonic Acid를 포함하는 Peptide의 합성에 관한 연구

盧萬均 · 洪錫引 · 金容駿
고려대학교 이공대학 화학공학과
(1975. 2. 4. 접수)

Synthesis of Dipeptides Containing Aminobenzyl- phosphonic Acid

Man Khyun Rho, Suck In Hong and Yong Joon Kim
Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul, Korea
(Received Feb. 4, 1975)

요 약. Aminobenzylphosphonic acid를 포함하고 있는 dipeptide들의 합성을 carbodiimide 법으로 시도하여 다음과 같은 새로운 화합물들을 얻었다.

Glycyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid, alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid, *L*-alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid, *N*-phthalyl-*L*-phenylalanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, *N*-carbobenzoxyglycyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, *N*-carbobenzoxy-alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, *N*-carbobenzoxy-*L*-alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, glycyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide, alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide 및 *L*-alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide.

ABSTRACT. Ten previously unreported dipeptides containing aminobenzylphosphonic acid were prepared by carbodiimide method. These are; Glycyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid, alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid, *L*-alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid, *N*-phthalyl-*L*-phenylalanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, *N*-carbobenzoxyglycyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, *N*-carbobenzoxyalanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, *N*-carbobenzoxy-*L*-alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, glycyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide, alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide and *L*-alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide. The first six compounds were characterized, and the last four compounds were obtained in the crude state.

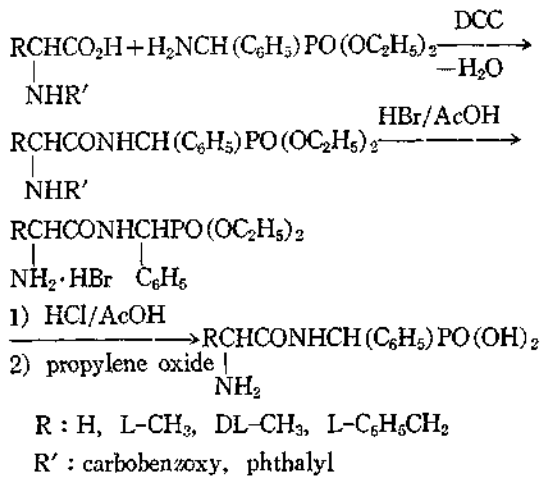
서 론

Aminophosphonic acid 들은 최근 인체¹ 및 여러 종류의 생물체^{2,4} 내에서 발견되어 중요한 생화학적인 기능을 갖고 있는 것으로 보고 되었다.

이러한 생화학적 기능에 관해 Horicuchi 등^{2,3}은 aminophosphonic acid 가 리피드구조 성분으로서 자연에 존재하는 것으로 생각하는 반면 Quin 등^{4,5}은 protein 구조 성분으로서 자연에 존재하며 일반 아미노산과의 아미드 결합 형성을 통한

polypeptide를 만드는 것으로 해석하고 있다. 또한 그 생화학적 역할에 대한 연구와 관련되어 이 화합물들의 유도체들에 관한 합성 및 물성에 관해서도 많은 연구^{2,4,6}들이 이루어지고 있다.

본 실험에서는 aminophosphonic acid가 protein 구조성분으로 자연에 존재할 수 있는 가능성에 대해 aminophosphonic acid를 포함한 polypeptide 합성에 관한 연구의 일환으로서 aminobenzylphosphonic acid (phenylglycine analogue)를 model compound로 선택하였으며 아직 아무도 합성한 바 없는 다음과 같은 dipeptide 합성을 carbodiimide 법¹²으로 시도하였고 aminophosphonic acid의 아민기에 대한 반응성도 검토하였다.



실 험

광학적 활성도는 Shimadzu Seikusho Ltd. Polarimeter type II를, pH 측정은 Beckman Zeromatic II pH meter, 용점은 Shimadzu Melting Point apparatus, IR spectra는 Hitachi IR spectrophotometer EPI-G2를, evaporator는 Mitamura Rotatory Vacuum evaporater를 사용하여 측정하였다.

L-Alanine, dl-alanine, dicyclohexylcarbodiimide(DCC), diethylphosphite, glycine은 M. Matheson Coleman & Bell 회사, L-phenylalanine은 E. Merck 회사, carbobenzoxychloride는 Sigma Chemical Company의 제품을 사용하였다. Aminobenzylphosphonic acid diethyl ester의 hydroc-

hloride는 저자들이 이미 발표한 방법⁷에 의해 상압에서 benzaldehyde, diethylphosphite와 butyl alcohol의 혼합액을 암모니아로 처리하여 합성하였다(수득율 76%), 용점 159~160°C(분현치^{7,8} 159°C).

분석. 질소분석¹³은 Shimadzu Semimicro Kjeldahl 장치를 사용하여 분석했고, 인분석은 Smith와 Shriner¹⁴의 Semimicro법을 사용하였다.

N-Carbobenzoxyglycine의 합성. 교반기, 온도계, 적하깔때기가 장치된 300 ml 4구 플라스크에 glycine 7.5 g (0.1 mole)을 4 N 수산화나트륨 용액 25 ml에 녹여 넣었다. 반응온도는 0~5°C로 유지하면서 30~40분 동안에 carbobenzoxychloride 19.1 g (0.11 mole)을 가했다. 격렬하게 교반시키면서 반응액의 pH가 산성으로 변하지 않도록 4 N 수산화나트륨 용액을 수시로 가했다. 반응이 끝난후 반응액 증에 포함된 과량의 carbobenzoxychloride를 에테르 20~25 ml로 추출하여 제거하였다. 6 N 염산용액을 가해 pH를 1~2로 맞추고 냉장고에서 1시간동안 방치시켰다. 생성된 침상의 결정을 클로로포름으로 재결정하여 18.1 g(수득율 87%)의 주생성물을 얻었다. 용점은 119~120°C(분현치⁹ 120°C)이었다.

N-Carbobenzoxyglycyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester의 합성. N-Carbobenzoxyglycine 4.2 g (0.02 mole), diethyl-dl-1-aminobenzylphosphonate hydrochloride 5.7 g (0.02 mole), DCC 6.0 g(0.03 mole), triethylamine 2.1 g(0.02 mole), THF 45 ml를 150 ml 1구 플라스크에 넣고 무수 염화칼슘관으로 막은 후 20시간동안 교반하였다. 빙초산 2~3 ml를 가하고 2시간동안 더 교반한 후 반응혼합액을 여과하였다. 여액을 감압(20~25 mmHg)하에 가열하여 증발 농축하였다. 클로로포름 50 ml를 가해 희석시킨 용액을 분별깔때기에 옮긴 후 0.2 N 염산 70 ml, 물 70 ml, 8% NaHCO₃ 수용액 70 ml, 물 70 ml의 순서로 세척하였다. 클로로포름용액에 무수 황산나트륨을 넣고 하룻밤 방치한 후 여과하였다. 여액을 감압(35~40 mmHg)하에 증발시킨 후 남은 끈끈한 액을 에테르

석유에테르 (1:1, v/v) 용액에 재결정시켰다. 흰색결정의 주생성물은 4.5 g(수득율 52%)이었고 융점은 64~66°C, IR 스펙트럼은 Table 1과 같다.

Anal. Calcd. for $C_{21}H_{27}O_6N_2P$; N 6.45, P 7.14; Found. N 6.40, P 7.13.

Glycyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid의 합성. *N*-Carbobenzoxycarbonyl-glycyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester 4.34 g (0.01 mole)을 HBr 가스를 포화시킨 빙초산 9~10 g과 함께 상온에서 20~30분동안 방치시켰다. 방치시키는 동안 CO_2 가스가 분해되어 발생하였다. 반응액에 에테르 30 ml를 가하여 냉장고에 12~15시간 저장하였다. 생성된 glycyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide의 흰색결정은 흡수성이 매우 강했다. 이 고체를 빙초산 5 ml, 15% 염산 5 ml와 함께 환류냉각기와 온도계가 장치된 100 ml 2구 플라스크에 넣었다. 30~40분 동안 80~85°C의 온도에서 가열 환류시켰다. 감압하 (20~25 mmHg)에 증발 농축시킨후 남은 끈끈한 황색 액체에 95% 에탄올 10 ml를 가하였다. 더 이상의 결정이 생성되지 않을 때까지 propylene oxide를 가하였다. 생성된 흰색 결정을 에탄올과 물의 혼합액 (1:1, v/v)에 재결정하여 주생성물 1.22 g(수득율 50%)을 얻었다. 이 화합물은 ninhydrin 반응에 양성을 나타냈으며 융점은 280~283°C이

었다. 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 적정하여 얻은 중화당량은 123.5 (이론치 122)이었고 IR은 Table 1과 같다.

Anal. Calcd. for $C_9H_{13}O_4N_2P$; N 11.48, P 12.70; Found N 11.39, P 12.72.

***N*-Carbobenzoxycarbonyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid의 합성.** glycine과 같은 방법으로 alanine 8.98 g (0.1 mole)을 carbobenzoxycarbonyl chloride 19.1 g (0.11 mole)과 반응시켜 벤젠-석유에테르 (1:1, v/v) 용액에 재결정되는 흰색 침상 결정 18.34 g (82%)을 얻었다. 융점은 113~114°C(문헌치⁹ 114~115°C)이었다.

***N*-Carbobenzoxycarbonyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester의 합성.** *N*-Carbobenzoxycarbonyl-glycine과 같은 방법으로 *N*-carbobenzoxycarbonyl-alanine 2.23 g (0.01 mole)을 diethyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonate hydrochloride 2.8 g (0.01 mole)과 반응시켜 흰색 침상결정의 주생성물 1.64 g(수득율 37%)을 얻었다. 이 화합물의 융점은 114~116°C이었고 IR 스펙트럼은 Table 1과 같다.

Anal. Calcd. for $C_{22}H_{29}O_6N_2P$; N 6.25, P 6.93; Found. N 6.20, P 6.94.

Alanyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid의 합성. Glycyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid의 합성방법과 같은 방법으로 *N*-carbobenzoxycarbonyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester 4.48 g (0.01 mole)를 브롬화수소산가스가 포화된

Table 1. I. R. Absorptions of aminoacyl derivatives of *dl*-1-aminobenzylphosphonic acid¹⁰.

	NH		C=O	P=O	P-OEt
	str.	bend.			
CBZ-glycyl-ABeP(OEt)	3280	1550	1680	1220	1130
Glycyl-ABeP(H)	3250	1550	1670	1155	—
CBZ-alanyl-ABeP(OEt)	3235	1550	1680	1225	1165
Alanyl-ABeP(H)	3300	1540	1655	1150	—
Phthalyl- <i>L</i> -phenylalanyl-ABeP(OEt)	3250	1540	1710	1240	1160

CBZ; carbobenzoxy, ABeP(OEt); diethyl-*dl*-1-aminobenzylphosphonate, ABeP(H); *dl*-1-aminobenzylphosphonic acid.

빙초산과 반응시켰다. 이때 얻어진 *alanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide*의 흰색 결정을 가수분해하여 주생성물 1.36 g(수득율 53%)을 얻었다. 이 화합물은 ninhydrin 반응에 양성을 나타냈으며 융점은 279~281°C 이었고 IR 스펙트럼은 Table 1과 같다. 중화당량 123(이론치 123).

Anal. Calcd. for $C_{10}H_{15}O_4N_2P$: N 10.85 P 12.02; Found. N 10.78, P 12.06.

Carbobenzoxy-L-alanine의 합성. Glycine과 같은 방법으로 *L-alanine* 8.9 g(0.1 mole)을 carbobenzoxychloride 19.1 g(0.11 mole)과 반응시켜 benzene에 재결정되는 흰색 침상결정 15.6 g(수득율 80%)을 얻었다. 융점은 86~87°C(문헌치⁹ 87°C)를 나타냈고 $(\alpha)_D^{20} = -13.86^\circ$ (빙초산 $c=3.01$)(문헌치⁹ $(\alpha)_D^{27} = -13.9^\circ$, 빙초산 $c=2.0$)이었다.

L-Alanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid의 합성. *N-Carbobenzoxy-L-alanine* 2.23 g(0.01 mole)과 diethyl-dl-1-aminobenzylphosphonate hydrochloride 2.8 g(0.01 mole)을 *N-carbobenzoxyglycine*과 마찬가지로 반응시켜 얻어진 점성이 큰 액체 *N-carbobenzoxy-L-alanyl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester*를 클로로포름, 에테르, dioxane, 물, 에탄올, 석유에테르, 아세트니트릴에 재결정시키려 시도했으나 결정을 얻지 못해 HBr 가스를 포화시킨 빙초산으로 가수분해하여 흰색결정인 *L-alanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide*를 얻었다. 이 화합물을 glycyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid의 합성과 같은 방법으로 처리하여 ninhydrin test에 양성을 나타내는 흰색 침상결정 0.88 g(수득율 33%)을 얻었다. 이 화합물의 융점은 277~279°C 이었고, 중화당량은 130(이론치 129), IR 스펙트럼은 Table 1과 같다.

Anal. Calcd. for $C_{10}H_{15}O_4N_2P$: N 10.85, P 12.02; Found. N 10.80, P 11.98. $(\alpha)_D^{20} = +6.60^\circ$ (물, $c=2.15$)

N-Phthalyl-L-phenylalanine의 합성. *L-Phenylalanine* 9.90 g(0.06 mole)과 phthalic an-

hydride 8.95 g(0.06 mole)을 막자사발을 사용하여 분말상태로 완전히 섞은 후 100 ml 1구플라스크에 넣고 기름중탕 상에서 15~30분동안 145~150°C를 유지시켰다. 반응이 끝난 후 냉각시켰을 때 얻어진 황색 고체를 에탄올과 물로 재결정시켜 흰색 침상결정 16.4 g(수득율 93%)을 얻었다. 이 화합물의 융점은 183~184°C(문헌치 183~185°C)이었고 광학적 활성도는 $(\alpha)_D^{20} = -210.9^\circ$ (무수에탄올, $c=3.51$)(문헌치 $(\alpha)_D = -212^\circ$, 에탄올 $c=1.9$)이었다.

N-Phthalyl-L-phenylalanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester의 합성. *N-Phthalyl-L-phenylalanine* 2.95 g(0.01 mole)과 diethyl-dl-1-aminobenzylphosphonate hydrochloride 2.83 g(0.01 mole)을 *N-carbobenzoxyglycine*을 반응시킨 carbodiimide법으로 반응시켜 흰색 침상 결정인 주생성물 2.90 g(수득율 56%)을 얻었다. 이 화합물의 융점은 152~155°C 이었으며 IR 스펙트럼은 Table 1과 같다. $(\alpha)_D^{15} = -64.1^\circ$ (클로로포름 $c=1.72$).

Anal. Calcd. for $C_{23}H_{29}O_6N_2P$: N 5.01, P 11.07; Found N 4.98, P 11.15.

결과 및 고찰

Aminobenzylphosphonic acid를 포함하는 peptide의 합성을 위해 glycine, *DL-alanine*, *L-alanine*, *L-phenylalanine* 등의 아미노산들을 선택하였고 이 아미노산들의 아민기는 carbobenzoxy와 phthalyl의 두가지 group으로 masking하였다. Glycine, *DL-alanine*, *L-alanine*은 Bergman과 Zervas의 방법⁹을 그대로 사용하여 *N-carbobenzoxy* 유도체들을 합성하였다. 또한 *L-phenylalanine*과 phthalic anhydride를 Sheehan이 발표한 방법에 따라 140~145°C에서 30분동안 반응시켜 *N-phthalyl-L-phenylalanine*을 합성하였다.

이와같이 합성한 *N-carbobenzoxy*와 *N-phthalyl* 아미노산 유도체들을 Sheehan과 Hess의 방법¹²에 따라 처리하였다. 즉 이 아미노산 유도체들과 diethyl-dl-1-aminobenzylphosphonate hydrochloride, DCC, triethylamine을 tetrahydrofu-

ran 용매 속에서 12~15 시간 동안 반응시켰다. 이때 합성된 carbobenzoxy-aminoacyl-dl-1-aminobenzyl phosphonic acid diethyl ester는 HBr가스를 포화시킨 빙초산 용액과 함께 상온에 방치하면 carbobenzoxy group이 분해되고 CO₂ 가스가 발생하였다. Carbobenzoxy group이 분해된 diethyl ester 상태의 HBr 염은 너무 흡습성이 강하였으므로 재결정하여 정제하지 않고 빙초산과 묽은 염산으로 가수분해 시킨 후 propylene oxide로 처리하여 glycyl-dl-alanyl-, L-alanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid 들을 얻었다. 이 peptide 들은 그 용점이 277°C 이상으로 diethyl ester 상태의 것보다 훨씬 높았고 ninhydrin 반응에 양성을 나타냈다.

결 론

Aminophosphonic acid 중 phenyl기를 갖고있는 가장 간단한 화합물인 aminobenzylphosphonic acid (phenylglycine analogue)를 일반 아미노산들과 carbodiimide method로 반응시킨 결과 그 아민기는 일반 아미노산의 아민기와 매우 비슷한 반응성을 보여주었으며 다음과 같은 새로운 peptide들이 합성되었다.

Glycyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid, dl-alanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid, L-alanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid, N-phthalyl-L-phenylalanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, N-carbobenzyglycyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, N-carbobenzyalanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, N-carbobenzy-L-alanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester, glycyl-dl-1-aminobenzyl phosphonic acid diethyl ester hydrobromide, dl-alanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide and L-alanyl-dl-1-aminobenzylphosphonic acid diethyl ester hydrobromide.

REFERENCES

1. a) J. A. Alhadeff and G. D. Davies, Jr., *Biochemistry*, **9**, 4866(1970); b) J. A. Alhadeff and G. D. Davies, Jr., *Biochim. Biophys. Acta*, **244**, 211(1971).
2. M. Halman, "Analytical Chemistry of Phosphorus Compounds," p. 703~721, John Wiley & Sons, Inc., N. Y., 1972.
3. a) M. Horicuchi and M. Kandatsu, *Nature*, **184**, 901(1959); b) E. Baer and N. Z. Stanacev, *J. Biol. Chem.*, **239**, 3209(1964).
4. L. D. Quin, "Topics in Phosphorus Chemistry", Vol. 4, M. Grayson and E. J. Griffith Ed., Interscience, New York, N. Y., 1966.
5. L. D. Quin, *Science*, **144**, 1133(1964).
6. a) J. R. Chambers and A. F. Isbell, *J. Org. Chem.*, **29**, 832(1964); b) K. Y. Cho, D. C. Kim and Y. J. Kim, *J. Korean Chem. Soc.*, **15**, 275(1971); c) M. K. Rho and Y. J. Kim, *J. Korean Chem. Soc.*, **17**, 136(1973); d) C. H. Rho, M. K. Rho and Y. J. Kim, *Science and Technology(Korea University)*, **14**, 33(1973).
7. M. K. Rho and Y. J. Kim, *J. Korean Chem. Soc.*, **19**, in press.
8. M. E. Chalmers and G. M. Kosolapoff, *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5278(1953).
9. M. Bergmann and L. Zervas, *Ber.*, **65**, 1192(1932).
10. L. J. Bellamy, "The Infrared Spectra of Complex Molecules," John Wiley & Sons, Inc., New York, 1958.
11. J. C. Sheehan, D. W. Chapman and R. W. Roth, *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 3882(1952).
12. J. C. Sheehan and G. P. Hess, *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 1067(1955).
13. E. C. Wagner, *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **12**, 771(1940).
14. W. T. Smith and R. L. Shriner, "The Examination of New Organic Compounds," p. 59, John Wiley & Sons, Inc., N. Y. 1956.