

Lipase를 이용한 합불소화합물의 광학분할

손 태 일 · 키타즈메 도모야 *

중앙대학교 산업대학 생물공학과
*동경공업대학 생물공학과

(1993년 11월 3일 접수, 1993년 11월 29일 채택)

Biochemical Resolutions of Organic Fluorine Compounds Using Lipase

Tae-II Son and Tomoya Kitazume*

Dept. of Biotechnology, Studies of Ind., ChungAng Univ., AnSung 456-831, Korea

*Dept. of Bioengineering, Tokyo Inst. of Tech., 4259

Nagatsuda-cho, Midori-ku, Yokohama 227, Japan

(Received November 3, 1993, Accepted November 29, 1993)

요 약 : 시판되고 있는 4종류의 Lipase(talpace, paratase M1000L, SP398, SP435)를 이용하여, 2-[1-(1-acetoxy-2, 2-trifluoroethyl)]-5-trimethylsilylfuran(1)을 속도론적 광학분할에 의해서 가수분해반응을 검토했다. 그 결과 Novo Nordish사의 SP435가 속도론적 광학분할능을 가진다는 것을 확인했으며, 본 실험에서는 광학순도 92.4% enantiomeric excess(ee)를 가지는 생성물 2-[1-(2, 2-trifluoro-1-hydroxyethyl)]-5-trimethylsilylfuran(2)를 얻었다.

Abstract: The hydrolysis of biochemical kinetic resolutions for 2-[1-(acetoxy-2, 2, 2-trifluoroethyl)]-5-trimethylsilylfuran(1) using four kinds of Lipase(talpace, paratase M1000L, SP398, SP435) was investigated. In the results, SP435 of Novo Nordish comp any was confirmed to show the capacity of biochemical kinetic resolutions, and 2-[1-(2, 2, 2-trifluoro-1-hydroxyethyl)]-5-trimethylsilylfuran(2) to have the optical purity expressed as 92.4% enantiomeric excess(ee) was produced in this studies.

1. 서 론

분자 내에 불소원자를 가지는 유기화합물 중에서 한 개부터 세 개의 수소를 불소로 치환한 화합물[1] (부분 불소화합물)에 있어서는, 불소원자가 그 근방의 관능기에 현저한 영향을 미치기 때문에, 원래 활성이 없던 모체분자에 불소원자를 도입했을 때 새로운 활성을 발현시키는 경우가 많이 관측된다.

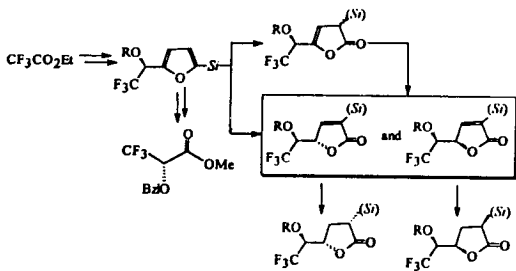
그래서 이와 같은 목적으로 수많은 불소계 생리활

성물질의 합성이 활발히 행해져 왔다[2]. 또, 이들 화합물은 불소원자를 도입한 탄소 근방에서 현저한 분극현상을 이용하여, 강유전성 액정 등의 기능성 재료로도 이용되게 되었다[3]. 한편 불소는 수산기와 등전자이기 때문에, 생리활성물질의 수산기를 불소원자로 치환하려고 하는 시도가 행해지고 있으며, 본래의 활성을 수식하려고 하는 목적 이외에 작용기구 해명의 열쇠로서도 이용되게 되었다[4].

이러한 불소원자의 특성을 이용해서, 부분불소화합

물[5]은 앞에서 설명한 분야뿐만 아니라, 더욱 광범위한 영역에서 이용되리라 예상된다. 생리활성물질[6]의 대부분은 최저 한 개 이상의 광학활성 중심을 가지며, 또 기능성 재료의 경우에는 분자의 입체배치가 중요시되기 때문에, 이러한 목적에 부분불소화합물을 사용하기 위해서는 입체를 고도로 제어할 필요가 있다. 그러나 천연에는 함불소화합물이 거의 존재하지 않을 뿐만 아니라, 광학활성체는 아직 발견되고 있지 않기 때문에[7] 이러한 화합물을 얻기 위해서는 인공적인 방법을 이용해서 합성할 필요가 있다.

그래서 본 연구에서는 탄화수소계에 있어서 그 유용성이 잘 알려진 butenolide에 착안했다. butenolide는 α , β -불포화 환상에스테르이고, 이중결합과 카르보닐, 더욱이 개환했을 때의 말단 수산기 등 세계의 식별 가능한 관능기를 가지고 있으며 또 환상 구조이기 때문에 4위치에 치환기를 입체 선택적으로 도입해 두면, 이것을 실마리로 하여 광학활성유도가 간편하게 행해질 수 있는 매력적인 화합물이다[8]. 더욱이 butenolide는 6-deoxy-6, 6, 6-trifluoro 당류로 변환할 수 있는 구조를 가지고 있다. 6-deoxy 당류는, 다우노마이신 등 천연 생리활성 물질의 구성 당으로서 수 많이 존재하고 있음에도 불구하고[9], 다관능성으로 광학활성점을 다수 가지고 있기 때문에, tri-fluoromethyl기를 가진 유도체의 합성은 곤란하며 이제까지 보고된 예는 없었다. 그래서 다관능성의 새로운 활성 building block[10]로서 CF_3 기를 도입한 butenolide를 조제하고, 이것을 경유해서 6-deoxy-6, 6, 6-trifluoro당류를 합성할 목적으로 그 전단계로서 2-[1-(1-acetoxy-2, 2, 2-trifluoroethyl)]-5-trimethylsilylfuran(1)을 Lipase에 의해서 광학분할을 행했다.



Scheme 1. Syntheses of optical active butenolides containing CF₃ group.

2. 실험

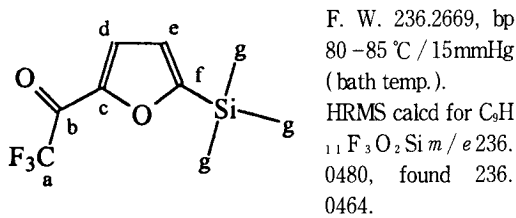
2. 1. General Methods

특별한 설명이 없으면, 시약은 시판되는 것을 더이상 정제과정없이 그대로 사용했다. 또 모든 실험과정은 N₂, Ar기류하에서 행했다. 에테르와 THF는 recirculating still 속에서 sodium benzophenone ketyl로부터 건조하여 증류한 것을 사용했으며 CH₂Cl₂는 calcium hydride로 건조하고, 에테르와 THF의 정제방법과 유사한 과정으로 증류하여 사용했다.

¹HNMR과 ¹³CNMR 스펙트럼은 특별한 설명이 없으면 CDCl₃를 용매로 하여 Varian Gemini-300 (300MHz), Varian VXR-500(500MHz)를 사용했으며, Chemical Shifts는 tetramethylsilane (Me₄Si)을 내부기준으로 하여 측정했다. ¹⁹FNMR은 특별한 설명이 없으면 CDCl₃를 용매로 하여 HitachiR-24F (56.4MHz) 또는 Hitachi R-1200F(56.451MHz)를 사용하였으며 Chemical shifts는 trifluoroacetic acid (TFA)를 외부기준으로 하여 측정했다. IR 스펙트럼은 JASCO FT/IR-5000을 사용했으며, polystyrene film의 1601.4cm⁻¹를 기준으로 하여 파수(cm⁻¹) 단위로 측정했다. 시광도는 JASCO DIP-140 digital polarimeter를 사용하여 21°C에서 측정했다.

2. 2. 2-Trifluoroacetyl-5-trimethylsilylfuran (1)의 합성

(1)의 합성법은 Fig. 1에 나타내었다. N₂기류하 -20°C에서 THF(150ml)에 furan(14.5ml, 199mmol)을 첨가하고 교반하면서 hexane 용액 중의 n-BuLi 2.5M(84ml, 210mmol)를 적하했다. -20°C에서 30분간 교반한 후, trimethylsilylchloride(25.4ml, 200mmol)을 이 용액에 첨가하고, 실온에서 1시간 교반했다. 다시 -20°C로 냉각한 후 hexane중의 n-BuLi 2.0M (84ml, 210mmol)를 적하하고, 그 혼합물을 30분간 교반했다. 반응물을 -78°C로 냉각한 후 THF(50ml) 중의 ethyltrifluoroacetate(26.2ml, 220mmol)을 첨가했다. 그 후 실온에서 3시간 동안 교반한 후, 목적으로 하는 생성물을 얻기 위해서 3N-HCl 수용액(80ml)를 첨가하고 용매는 evaporator를 사용하여 제거했다. 그 후 ethylacetate로 3회 추출하고 유기층은 NaHCO₃ 수용액과 소금물로 세척하고, MgSO₄로 건조시킨 후, 분석을 위해서 소량 진공증류했으며, 나머지의 crude product는 다음 단계에 그대로 사용했다.



1H NMR δ 0.32(9H, s, g), 6.79(1H, d, $J=3.68$ Hz, d), 7.46(1H, dq, $J=3.69, 1.38$ Hz, e), ^{13}C NMR δ -2.33(s, g), 116.5(q, $J=290.5$ Hz, a), 121.95(s, e), 124.17(q, $J=2.9$ Hz, d), 153.41 and 172.30(s each, c and f) peak b was not observed. ^{19}F NMR δ 4.5(s, a). IR(neat) ν 2950, 1690.

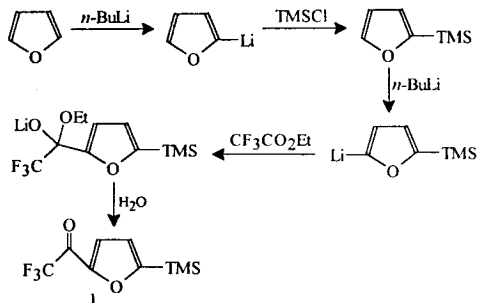
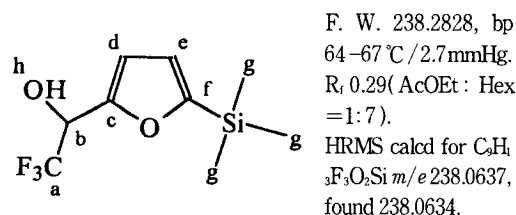


Fig. 1. Schematics of the synthesis of 2-trifluoroacetyl-5-trimethylsilylfuran(1).

2.3. 2-[1-(2, 2, 2-Trifluoro-1-hydroxyethyl)]-5-trimethylsilylfuran(2)의 합성

2.2에서 얻은 furylketone(1)을 에탄올 200ml에 용해시킨 용액에 0°C에서 $NaBH_4$ (2.27g, 60.0mmol)를 서서히 첨가하고 실온에서 12시간 동안 교반했다. 감압증류로 용매를 제거하고 ethylacetate(200ml)와 3N-HCl 수용액(200ml)로 3회 추출하고, 얻어진 유기층은 소금물로 세척한 후 $MgSO_4$ 으로 건조시킨 후, 진공증류했다(38.95g, 163.5mmol, yield 82.1%).



1H NMR δ 0.25(6H, s, g), 2.72(1H, dd, $J=1.71, 7.41$ Hz, h), 5.06(1H, dq, $J=6.75, 6.75$ Hz, b), 6.59(1H each, d, $J=3.30$ Hz, d and e). ^{13}C NMR δ -2.02(s, g), 67.36(q, $J=34.2$ Hz, b), 109.80(q, $J=1.5$ Hz, d), 120.50(s, e), 123.62(q, $J=282.9$ Hz, a), 151.19(q, $J=1.6$ Hz, c), 162.49(s,

f) ^{19}F NMR δ 0.5(d, $J=6.2$ Hz, a). IR(neat) ν 3400, 2975.

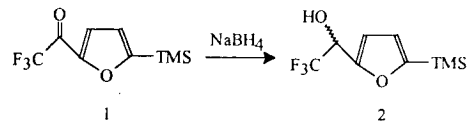
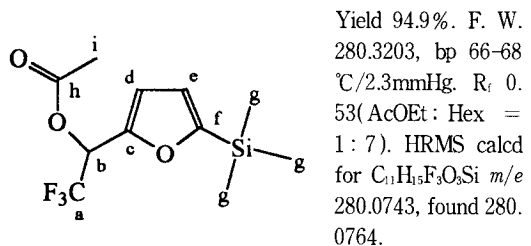


Fig. 2 Schematics of the synthesis of 2-[1-(2, 2, 2-trifluoro-1-hydroxyethyl)]-5-trimethylsilylfuran(2).

2.4. Furyl alcohol(2)의 에스테르화 반응에 의한 2-[1-(Acetoxy-2, 2, 2-trifluoroethyl)]-5-trimethylsilylfuran(3)의 합성

질소기류하 CH_2Cl_2 용매중의 furyl alcohol(2)의 0.5M 용액을 교반하면서 0°C에서 pyridine(1.2eq)과 acylchloride(1.2eq)을 첨가했다. 그 반응용액은 12시간 동안 교반한 후, 목적으로 하는 생성물을 얻기 위해서 1N-HCl 수용액을 첨가했다. 그 후 CH_2Cl_2 로 3회 추출한 후 소금물과 $NaHCO_3$ 수용액으로 충분히 씻은 후 $MgSO_4$ 로 건조하고, 감압증류로 용매를 제거했다. Crude product는 silicagel column chromatography 또는 진공증류에 의해서 정제했다.



1H NMR δ 0.24(9H, s, g), 2.15(1H, s, i), 6.33(1H, q, $J=6.72$ Hz, b), 6.48 and 6.53(1H each, d, $J=3.29$ Hz and 3.32 Hz, d and e). ^{13}C NMR δ -2.05(s, g), 65.62(q, $J=35.2$ Hz, b), 111.65(q, $J=1.3$ Hz, d), 12035(s, e), 121.60(q, $J=281.4$ Hz, a), 148.47(s, c) 163.14(s, f), 168.97(s, h). ^{19}F NMR δ 3.2(d, $J=6.6$ Hz, a). IR(neat) ν 2975, 1770.

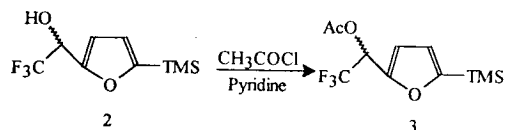


Fig. 3 Schematic of the synthesis of 2-[1-(acetoxy-2, 2, 2-trifluoroethyl)]-5-trimethylsilylfuran(3).

2. 5. Lipase를 이용한 에스테르의 가수분해반응에 의한 광학분할

H₂O(20ml)를 용매로 하여 에스테르(3)(0.62g, 2.0mmol) 용액을 교반하면서 Lipase SP435(12000U/mmol) 3.42g을 첨가했다. 그 혼합물은 40°C에서 pH 7을 유지시키기 위해서 1N-NaOH 수용액으로 중화시켰다. ¹⁹F NMR로 conversion을 측정된 결과 50%에 도달했을 때 flocculant(P-713, 第一製藥)을 반응 용액에 첨가했다. 그 후 celite-545를 이용하여 여과에 의해서 효소를 제거하고 ethyl acetate로 3회 추출했다. MgSO₄로 건조한 후 감압증류로 용매를 제거하고 silicagel column chromatography에 의해서 광학활성인 alcohol(2*)과 에스테르(3*)를 분리 정제했다(conversion은 57%).

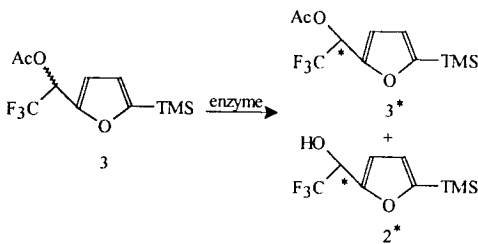


Fig. 4. Schematic of optically resolution of enantiomer (3) using lipase.

2. 6. 광학순도의 결정

N₂ 기류하 THF를 용매로 하여 화합물3*(0.3mmol)을 -78°C로 냉각한 후 n-BuLi(1eq)를 첨가한 후 0°C까지 승온한 후 30분 동안 교반했다. 그 후 다시 -78°C로 냉각한 후(S)-(+)-MTPACK(0.36mmol)을 첨가한 후 0°C로 승온한 후 1시간 동안 교반했다. 그 후 ethyl acetate로 2회 추출한 후 얻어진 유기층은 MgSO₄로 건조하고, 감압증류로 용매를 제거했다. 단, 화합물 2*의 경우는 methylalcohol용매 중 K₂CO₃ 처리에 의해서 alcohol형으로 변환시킨 후 화합물 3*과 같은 방법으로 (S)-(+)-MTPACK로 처리하여 편광계와 ¹⁹F NMR로 광학순도를 결정했다.

2. 7. E값의 결정[11]

Substrate(A, B)와 각각의 생성물(P, Q)는 속도정수 k_i를 이용하면

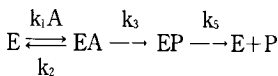
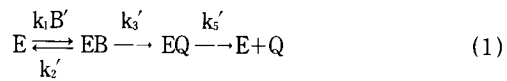


Table 1. Determination of Enantiomeric Excess of 2*

	rate ¹⁹ F(ppm)	enantiomeric excess(% ee)
	113.2 (d)86.99	92
	1.00 (d)87.11	



로 된다. 2종류의 기질의 반응속도(ν_A, ν_B)의 비는 다음식으로 나타낸다.

$$\frac{\nu_A}{\nu_B} = \frac{V_A}{V_B} \frac{K_A}{K_B} \cdot \frac{A}{B} \quad (2)$$

V; maximal valocity

K; Michealis constant

첨자는 속도가 빠른쪽을 A, 느린쪽을 B로 한다.

(2)식을 적분하면 다음식을 얻는다.

$$\frac{\ln(A/A_0)}{\ln(B/B_0)} = \frac{V_A/K_A}{V_B/K_B} = E \quad (3)$$

효소에 의한 enantiomer(A & B) 사이의 속도차는 E로 나타낸다. Conversion(c)와 recovered substrate fraction의 enantiomeric excess(ee(S))와의 관계는

$$\frac{\ln[(1-c)(1+ee(S))]}{\ln[(1-c)(1-ee(S))]} = \frac{V_A/K_A}{V_B/K_B} = E \quad (4)$$

$$c = 1 - \frac{A+B}{A_0+B_0} \quad ee(S) = \frac{B-A}{A+B}$$

로 나타낸다. A₀, B₀는 각각의 초기 농도이다. E값은 V/K에 의해서 변화하지만, 기질의 농도에는 의존하지 않는 값이다. Conversion(c)와 생성물의 분율의 enantiomeric excess(ee(P))의 관계는

$$\frac{\ln[1-c(1+ee(P))]}{\ln[1-c(1-ee(P))]} = \frac{V_A/K_A}{V_B/K_B} = E \quad (5)$$

$$c = 1 - \frac{A+B}{A_0+B_0} \quad ee(P) = \frac{P-Q}{P+Q}$$

로 나타낸다.

본 실험에서 얻은 $c=0.48$, $ee(P)=0.95$ 를 (5)식에 대입하여 E값을 구하면 $E=113.2$ 를 얻는다.

산출한 E값을 (4)식과 (5)식에 대입하고 각각의 conversion과 enantiomeric excess(P & S)의 값을 Newton-Raphson method를 이용해서 구했다(Fig. 5).

Table 2

c	ee(P)	ee(S)
0.1	0.981	0.109
0.2	0.978	0.244
0.3	0.974	0.417
0.4	0.966	0.644
0.5	0.930	0.939
0.6	0.818	0.999

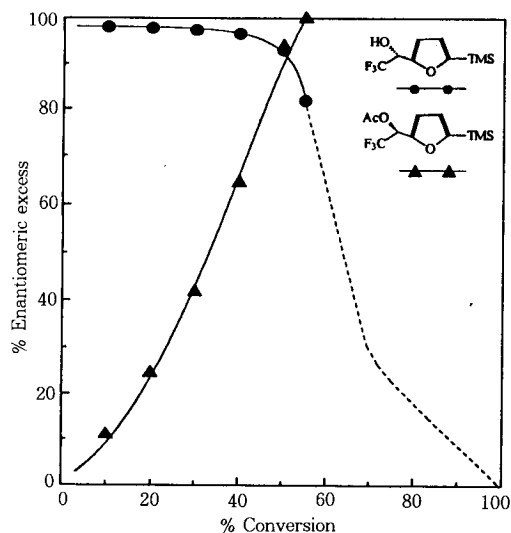


Fig. 5. Corelation between enantiomeric excess(ee) vs. conversion.

3. 결 론

본 실험에서 산출한 $E=113.2$ 를 이용하여 구한 각각의 conversion과 enantiomeric excess(P & S)의 값을 (4)식과 (5)식에 대입하여 산출하여 graph로 나타내면 Fig. 5와 같다. 이 결과로부터 99% ee의 화합물을 얻기 위해서는 (4)식을 이용해서 계산하면 $c=0.551$ 을 얻는다. 따라서 conversion이 55.1% 진행하면 99% ee(S)를 얻을 수 있다는 것을 알게 되었다.

참고 문헌

- (a) M. Kuroboshi and T. Hiyama, Abstracts of papers, 15th Meeting of Fluorine Chemistry, Nagoya, Japan(1991).
(b) T. Kitazume and N. Ishikawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5186(1985).
(c) G. S. K. Prakash, R. Krishnamurti, and G. Olah, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 393(1989).
(d) R. Krishnamurti, D. R. Bellow, and G. S. K. Prakash, *J. Org. Chem.*, **56**, 984(1991).
- (a) R. Filler and Y. Kobayashi, "Biomedical Aspects of Fluorine Chemistry," Kodansha and Elsevier Biomedical, Tokyo(1982).
(b) J. T. Welch, *Tetrahedron*, **43**, 3123(1987).
(c) D. Seebach, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1990, **29**(1320).
(d) C. Walsh, *Tetrahedron*, **38**, 871(1982).
- (a) T. Kitazume, T. Ohnogi, and K. Ito, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6608(1990).
(b) M. Kodon, M. Shiromi, K. Nakagawa, F. Funada, K. Awane, T. Yamazaki, and T. Kitazume, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **30**, 1300(1991).
- C. P. J. Glaudemans, P. Kováč, and K. Rasmussen, *Biochemistry*, **23**, 6732(1984).
- (a) W. J. Middleton, *J. Org. Chem.*, **40**, 574(1975).
(b) M. Hudlicky, *Org. React.*, **35**, 513(1988).
(c) S. C. Sondej and J. A. Katzenellenbogen, *J. Org. Chem.*, **51**, 3508(1986).
- A. El-Langhdach, R. Raouf, M. I. Matheu, M. I. Barrena, and S. Castillon, *J. Org. Chem.*, **56**, 4556(1991).
- (a) J. T. Welch and S. Eswarakrishnan, "Fluorine in Bioorganic Chemistry," John Willey & Sons, New York(1991).
(b) P. Bravo and G. Resnati, *Tetrahedron Asymmetry*, **1**, 661(1990).
- (a) J. A. Vekemans, C. W. M. Dapperens, R. Claessen, A. M. J. Koten, and E. F. Godefroi, *J. Org. Chem.*, **55**, 5336(1990).
(b) G. Casiraghi, and L. Colombo, *J. Org. Chem.*, **56**, 2135(1991).

- (c) J. P. Vigneron, and R. Méric, *Tetrahedron*, **40**, 3521(1984).
9. (a) S. Omura, N. Sadakane, Y. Tanaka, and H. Mayubara, *J. Antibiotics*, **36**, 927(1983).
(b) F. Arcamore, G. Franceschi, P. Orenzi, G. Cassinelle, W. Barbieri, and R. Mondelli, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5334(1964).
(c) A. H. Hunt, M. Debono, K. E. Merkei, and M. Barnhart, *J. Org. Chem.*, **49**, 635(1984).
10. (a) I. Ojima, *Actual Chem.*, 171(1987).
(b) O. Kitagawa, T. Taguchi, and Y. Kobayashi, *Tetrahedron Let.*, **29**, 1803(1988).
(c) T. Yamazaki, T. Yamamoto, and T. Kitazume, *J. Org. Chem.*, **54**, 83(1989).
11. C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, and C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294(1982).