(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0059040
(43) 공개일자 2025년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 231/10 (2006.01) *A01N 37/48* (2006.01)
A01P 3/00 (2006.01) *C07C 231/24* (2006.01)
C07C 233/05 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 231/10 (2013.01)
A01N 37/48 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0142927
(22) 출원일자 2023년10월24일
심사청구일자 2023년10월24일

(71) 출원인
을지대학교 산학협력단
경기도 성남시 수정구 산성대로 553 (양지동, 을지대학교)
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
고영림
경기도 하남시 위례중앙로 185, 6301동 1202호
문봉진
경기도 고양시 일산동구 강송로 196, 108동 1202호
장승우
서울특별시 마포구 양화진길 37, 701호
(74) 대리인
한윤호

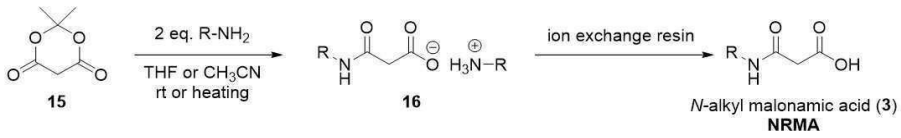
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **이소티아졸리논계 살균제 대사체 표준물질의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 살균제로 사용되는 MIT, CIT, OIT 계열의 대사체인 *N*-알킬 말론암산(*N*-alkyl malonamic acid)을 미량 스케일에서도 고수율로 쉽게 제조할 수 있는 이소티아졸리논계 살균제 대사체 표준물질의 제조방법을 제공한다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A01P 3/00 (2021.08)
C07C 231/24 (2013.01)
C07C 233/05 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1485019252
과제번호 2022002970005
부처명 환경부
과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원
연구사업명 생활화학제품 안전관리 기술 개발사업 / 생활화학제품사용 환경 기반 노출평가 기술 개발
연구과제명 생활화학제품 사용조건별 화학물질의 인체 노출평가기술 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 을지대학교 산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

플라스크에 교반 자석과 멜드럼산 및 1차 알킬 아민($R-NH_2$)을 투여하여 제조한 혼합물에 용매를 첨가하여 교반하는 단계;

상기 혼합물로부터 상기 용매를 제거하여 고체 상태의 알킬 암모늄염(alkyl ammonium salt)을 제조하는 단계;

상기 알킬 암모늄염에 증류수 또는 유기용매를 투여하여 희석한 용액을 양이온 교환수지에 통과시켜 용출시키는 단계;

상기 용출된 용액을 건조 및 농축시키는 단계를 포함하는, 이소티아졸리논계 살균제 대사체인 *N*-알킬 말론암산의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 *N*-알킬 말론암산은 *N*-메틸 말론암산(NMMA), *N*-메틸 말론암산-d3, *N*-옥틸 말론암산(NOMA), 또는 *N*-옥틸 말론암산(NOMA)-d2인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 이소티아졸리논계 살균제는 메틸이소티아졸리논(N-methylisothiazolinone; MIT), 클로로메틸이소티아졸리논 (5-chloro-2-methylisothiazolinone; CMIT), 옥틸이소티아졸리논(N-octylisothiazolinone; OIT), 벤즈아이소티아졸리논(Benzisothiazolinone, BIT)옥틸이소티아졸리논 (Octylisothiazolinone, OIT), 및 디클로로옥틸이소티아졸리논 (Dichlorooctylisothiazolinone, DCOIT)으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 1차 알킬 아민은 메틸 아민(H_2NCH_3), 중수소 표지 메틸 아민염(H_2NCD_3HCl), 옥틸 아민($CH_3(CH_2)_7NH_2$), 또는 중수소 표지 옥틸 아민($CH_3(CH_2)_6(CD_2)NH_2$)인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 용매는 증류수, 테트라하이드로푸란(THF) 또는 아세토나이트릴(acetonitrile)인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 알킬 암모늄염은 *N*-메틸 말론암산-메틸 아민염, *N*-메틸 말론암산-d3 염, *N*-옥틸 말론암산-옥틸 아민염, 또는 *N*-옥틸 말론암산-옥틸 아민염-d2인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 유기용매는 테트라하이드로푸란(THF), *N,N*-다이메틸포름아마이드(DMF), 다이메틸설폭사이드(DMSO), 아세토나이트릴, 다이클로로메탄(CH_2Cl_2), 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알코올 및 부탄올로 이루어진 군으로부터 선택

되는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 양이온 교환수지의 레진은 앰버라이트 FPC 3500, 앰버라이트 IR-120, 앰버라이트 IRP-64, 앰버라이트 IRP-67, 앰버라이트 IRP-69 및 앰버라이트 IRP-88로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 교반은 상온 또는 60 내지 70℃의 온도 조건에서 5시간 내지 12시간 동안 수행되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 살균제 대사체 표준물질의 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 이소티아졸리논계 살균제 대사체 표준물질의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 이소티아졸리논(isothiazolinone) 계열의 물질은 살균성이 강하여 냉각수, 목재, 샴푸, 세정제 등의 생활 용품의 방부제로 많이 쓰이는데 상기 성분들 중 MIT, CMIT는 가습기 살균제 원료 물질로 사용되어 사회적 문제를 일으킨 이후 2012년 9월 유해 화학물질 관리법(현재 화학물질관리법)에 의해 유독물질로 지정되었으며, 현재는 화장품 및 의약외품 중에서 세척 제품에 한해 0.0015%까지 사용이 가능하다. 그러나 흡입독성 때문에 안전 확인 대상 생활화학제품의 모든 분사형 제품에는 함유 금지 물질로 지정되어 관리되고 있다(도 1). 각종 생활화학제품에 이들 물질이 규정대로 사용되고 있는지, 그리고 인체에 노출되고 있는 정도를 모니터링하기 위해서는 크로마토그래피-질량분석법과 같은 미량 분석이 필요하다. 이를 위해 동위원소 등으로 표지되어 있는 대사체 표준물질이 필수적이다. CMIT, MIT 등은 하기 선행문헌에 기재된 대사 과정을 거쳐 분해되는 것으로 알려져 있다(Burnett, C. L. *et al., Int. J. Toxicol.* 29: 187S-213S,. 2010). 대사체 중에 가장 많이 관찰되는 것이 *N*-메틸 말론암산(N-methyl malonamic acid: NMMA)이다(도 2). 이를 입증하기 위해 종래 연구에서는 13C로 표지한 CMIT를 합성한 후, PBS 완충용액에서 *N*-아세틸-L-시스테인을 촉매와 넣어주었을 때, N-메틸 말론암산(1)이 형성되었다고 보고하였다(Alvarez-S몽nchez, *et al., Chem. Res. Toxicol.* 16(5): 627-636, 2003)(도 3). 또한 다른 연구에서는 어린이와 청소년의 소변 중 CMIT, MIT의 대사체로 NMMA를 분석하여 보고한 바가 있다(Murawski, A. *et al., Int. J. Hyg. Environ. Health*, 227: 113511. 2020). 상기 연구에서는 13C가 표지된 NMMA를 내부표준물질로 사용하였다고 언급하고 있으나, 그 합성 방법이나 13C가 표지된 위치 등은 공개하지 않고 있다(Schettgen, T. *et al., J. Chromatogr.* 1044-1045: 185-193, 2017). 또한 환경 중에 존재하는 이소티아졸리논계열 살균제는 물질별로 분해 과정과 조건이 다르고, 현재까지 생체지표 모니터링에 관한 연구가 상대적으로 부족한 편이다. 그러나 CMIT, MIT의 알려진 대사 과정을 유추해 볼 때, OIT나 DCOIT의 경우에도 NMMA에 상응하는 대사 물질 *N*-옥틸 말론암산(NOMA, 2)이 생성될 것으로 보이기 때문에 *N*-알킬 말론암산(NRMA, 3)의 보편적이고 효과적인 합성 방법이 요구된다(도 4).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 그러나 기존에 알려진 *N*-알킬 말론암산의 제조방법은 가수분해와 중화 과정에서 생기는 무기염을 NRMA 생성물과 분리하는데 어려움이 있고 특히 고가의 동위원소 표지 화합물을 원료로 쓰는 경우, 반응 규모가 매우 작기 때문에 효과적이지 않은 문제점이 있다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 살균제로 사용되는 MIT, CIT, OIT 계열의 대사체인 *N*-알킬 말론암산(*N*-alkyl malonamic acid)을 미량 스케일에서도 고수율로 쉽게 제조할 수 있는 이소티아졸리논계 살균제 대사체 표준물질의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, 플라스크에 교반 자석과 멜드럼산 및 1차 알킬 아민($R-NH_2$)을 투여하여 제조한 혼합물에 용매를 첨가하여 교반하는 단계;

[0006] 상기 혼합물로부터 상기 용매를 제거하여 고체 상태의 알킬 암모늄염(alkyl ammonium salt)을 제조하는 단계;

[0007] 상기 알킬 암모늄염에 증류수 또는 유기용매를 투여하여 희석한 용액을 양이온 교환수지에 통과시켜 용출시키는 단계;

[0008] 상기 용출된 용액을 건조 및 농축시키는 단계를 포함하는, 이소티아졸리논계 살균제 대사체인 *N*-알킬 말론암산의 제조방법이 제공된다.

발명의 효과

[0009] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 이소티아졸리논계 살균제 대사체 표준물질의 제조방법은 종래 방법과 달리 액상 추출법 대신 이온교환수지를 사용하기 때문에 *N*-알킬 말론암산(NRMA)을 미량으로 제조할 때 효과적이고 고가의 동위원소 표지물질을 사용해야 하는 표준물질 제조에 특히 활용가능하다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 이소티아졸리논 계열의 대표적인 살균제 화합물들에 대한 구조를 나타내는 그림이다.

도 2는 MIT가 대사 과정을 거쳐 *N*-메틸 말론암산(NMMA, 1)을 생성하는 과정을 나타내는 개요도이다.

도 3은 CMIT가 대사 과정을 거쳐 *N*-메틸 말론암산(NMMA, 1)을 생성하는 과정을 나타내는 개요도이다.

도 4는 OIT 또는 DCOIT가 대사 과정을 거쳐 *N*-옥틸 말론암산(NOMA, 2)을 생성하는 과정을 나타내는 개요도이다.

도 5는 일염화 말론산 에스터(4)에서 *N*-알킬 말론암산(NRMA, 3)의 제조 과정을 나타내는 개요도이다.

도 6은 멜드럼산 유도체(VI)에서 *N*,*N*-다이알킬 말론암산의 제조 과정을 나타내는 개요도이다.

도 7은 선행문헌(US 6,395,737 B1)에 기술된 *N*-벤질 말론암산 유도체 14의 제조 과정을 나타내는 개요도이다.

도 8은 멜드럼산으로 부터 *N*-알킬 말론암산(NRMA, 3)을 제조하는 과정을 나타내는 개요도이다.

도 9는 멜드럼산으로 부터 *N*-메틸 말론암산(NMMA, 1)을 제조하는 과정을 나타내는 개요도이다.

도 10은 *N*-메틸 말론암산-메틸 아민염(17)의 1H NMR 스펙트럼 (500 MHz, DMSO-d6) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 *N*-메틸 말론암산-메틸 아민염(17)의 13C-NMR 스펙트럼 (125 MHz, DMSO-d6) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 12는 *N*-메틸 말론암산(NMMA, 1)의 1H NMR 스펙트럼 (400 MHz, DMSO-d6) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13은 *N*-메틸 말론암산(NMMA, 1)의 13C NMR 스펙트럼 (125 MHz, DMSO-d6) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 14는 *N*-메틸 말론암산(NMMA, 1)의 ESI-MS 스펙트럼 (음이온 모드) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 15는 *N*-메틸 말론암산-d3(NMMA-d3)(1-d3)의 제조과정을 나타내는 개요도이다.

도 16은 *N*-메틸 말론암산-d3 염(17-d3)의 1H-NMR 스펙트럼(400 MHz, D2O) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 17은 *N*-메틸 말론암산-d3(1-d3)의 1H-NMR 스펙트럼(400 MHz, DMSO-d6) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 18은 *N*-메틸 말론암산-d3(1-d3)의 ESI-MS 스펙트럼 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 19는 *N*-옥틸 말론암산(NOMA, 2)의 제조과정을 나타내는 개요도이다.

도 20은 *N*-옥틸 말론암산 옥틸 아민염(18)의 1H-NMR 스펙트럼(400 MHz, $CDCl_3$) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 21은 *N*-옥틸 말론암산(2)의 1H-NMR 스펙트럼(400 MHz, $CDCl_3$) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 22는 *N*-옥틸 말론암산(2)의 ESI-MS 스펙트럼(음이온 모드) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 23은 중수소로 표지된 *N*-옥틸 말론암산-d2(2-d2)의 제조과정을 나타내는 개요도이다.

도 24는 중수소로 표지된 *N*-옥틸 말론암산-d2 (2-d2)의 제조과정에서 필요한 중수소 표지된 옥탄올-d2와 그 시작 물질인 옥탄산(octanoic acid)의 1H-NMR 스펙트럼(400 MHz, $CDCl_3$) 비교 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 25는 중수소로 표지된 *N*-옥틸 말론암산-d2(2-d2)의 제조과정에서 필요한 중수소 표지된 옥틸아민-d2와 그 시작 물질인 옥틸 메탄설폰에스터-d2의 1H-NMR 스펙트럼(400 MHz, $CDCl_3$) 비교 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 26은 *N*-옥틸 말론암산 옥틸 아민염-d2(18-d2)의 1H-NMR 스펙트럼(400 MHz, $CDCl_3$)을 표지되지 않은 *N*-옥틸 말론암산 옥틸 아민염(18)과 비교하는 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 27은 *N*-옥틸 말론암산-d2(2-d2 또는 NOMA-d2)의 1H-NMR 스펙트럼(400 MHz, $CDCl_3$)을 표지되지 않은 *N*-옥틸 말론암산(2 또는 NOMA)과 비교하는 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] **용어의 정의:**

[0012] 본 문서에서 사용되는 "이소티아졸리논(Isothiazolinone)"은 헤테로고리 화합물로 이 물질의 유도체는 대다수가 살충제 및 살균제로 사용된다. 이소티아졸리논 살균제는 박테리아의 활동을 제어하고, 화장품 및 냉각수 시스템, 연료 저장 탱크, 펄프 등 산업 용도의 화학 첨가제로 사용된다.

[0013] 본 문서에서 사용되는 "이온교환수지(ion exchange resin)"는 미세한 3차원 구조의 고분자 비드에 이온교환 기능기(functional group)를 결합시킨 것으로, 용액 중에 녹아있는 이온성 물질을 교환, 정제하는 고분자 물질이다. 즉, 이온교환수지가 가지고 있는 가동이온이 용액 중의 다른 이온과 서로 치환되어 이온성 물질의 제거가 이루어지며, 이온교환기의 종류와 밀도, 가교도, 비표면적 등에 따라 이온교환수지의 성능과 특성이 결정된다. 주요 용도는 순수의 제조, 경수의 연화, 포도당이나 자당, 물질의 정량분석, 촉매 등이 있지만 공해방지용으로 널리 이용되는 종류는 양이온 수지, 음이온 수지, 양성 이온 수지가 있다.

[0014] **발명의 상세한 설명**

[0015] 본 발명의 일 관점에 따르면, 플라스크에 교반 자석과 멜드럼산 및 1차 알킬 아민($R-NH_2$)을 투여하여 제조한 혼합물에 용매를 첨가하여 교반하는 단계;

[0016] 상기 혼합물로부터 상기 용매를 제거하여 고체 상태의 알킬 암모늄염(alkyl ammonium salt)을 제조하는 단계;

[0017] 상기 알킬 암모늄염에 증류수 또는 유기용매를 투여하여 희석한 용액을 양이온 교환수지에 통과시켜 용출시키는 단계;

[0018] 상기 용출된 용액을 건조 및 농축시키는 단계를 포함하는, 이소티아졸리논계 살균제 대사체인 *N*-알킬 말론암산의 제조방법이 제공된다.

[0019] 상기 제조방법에 있어서, 상기 *N*-알킬 말론암산은 *N*-메틸 말론암산(NMMA), *N*-메틸 말론암산-d3, *N*-옥틸 말론암산(NOMA), 또는 *N*-옥틸 말론암산(NOMA)-d2일 수 있고

[0020] 상기 이소티아졸리논계 살균제는 상기 이소티아졸리논계 살균제는 메틸이소티아졸리논(*N*-methylisothiazolinone; MIT), 클로로메틸이소티아졸리논 (5-chloro-2-methylisothiazolinone; CMIT), 옥틸이소티아졸리논(*N*-octylisothiazolinone; OIT), 벤즈아이소티아졸리논(Benzisothiazolinone, BIT)옥틸이소티아졸리논 (Octylisothiazolinone, OIT), 및 디클로로옥틸이소티아졸리논 (Dichlorooctylisothiazolinone, DCOIT)으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0021] 상기 제조방법에 있어서, 상기 1차 알킬 아민은 메틸 아민(H_2NCH_3), 중수소 표지 메틸 아민염(H_2NCD_3HCl), 옥틸 아민($CH_3(CH_2)_7NH_2$), 또는 중수소 표지 옥틸 아민($CH_3(CH_2)_6(CD_2)NH_2$)일 수 있고 상기 용매는 증류수, 테트라하이드로푸란(THF) 또는 아세토나이트릴(acetonitrile)일 수 있다.

[0022] 상기 제조방법에 있어서, 상기 알킬 암모늄염은 *N*-메틸 말론암산-메틸 아민염, *N*-메틸 말론암산-d3 염, *N*-옥틸 말론암산-옥틸 아민염, 또는 *N*-옥틸 말론암산-옥틸 아민염-d2일 수 있고 상기 유기용매는 테트라하이드로푸란(THF), *N,N*-다이메틸포름아마이드(DMF), 다이메틸설폭사이드(DMSO), 아세토나이트릴, 다이클로로메탄(CH_2Cl_2), 메탄올, 에탄올, 이소프로필 알코올 및 부탄올로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0023] 상기 제조방법에 있어서, 상기 양이온 교환수지의 레진은 앰버라이트 FPC 3500, 엠버라이트 IR-120, 앰버라이트 IRP-64, 앰버라이트 IRP-67, 앰버라이트 IRP-69 및 앰버라이트 IRP-88로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있으나 양이온 교환 기능을 가진 레진이면 적용이 가능하다. 또한 상기 교반은 상온 또는 60 내지 70℃의 온도 조건에서 5시간 내지 12시간 동안 수행될 수 있다.

[0024] 생체독성이 있는 물질들의 체내 노출 정도를 추적 및 관리하기 위해서는 선택성과 감도가 매우 높은 분석 기술이 필요하며, 이에 적합한 방법으로는 크로마토그래피-질량분석법이 있다. 상기 방법으로 체내에 노출된 외부 물질을 정량 분석하기 위해서는 원물질 또는 그 물질의 대사체들의 표준물질이 필요하다. 표준물질은 질량분석 단계에서 검출하고자 하는 물질과의 겹침을 막기 위해 물리적/화학적 성질은 같아야 하기 때문에 주로 동위원소 표지를 한다. 살균제와 같은 물질이 인체에 노출되고 있는 정도를 모니터링하기 위해 분석에는 동위원소 등으로 표지되어 있는 대사체 표준물질이 필요하므로 효과적인 *N*-알킬 말론암산(NRMA)의 제조방법이 요구된다. 기존에 알려진 *N*-알킬 말론암산의 제조방법은 먼저, 일염화 말론산 에스터에서 합성하는 방법으로 일염화 말론산 메틸 또는 에틸 에스터(4; R1 = 메틸 또는 에틸)에 알킬 아민($R-NH_2$)을 반응시켜 그에 상응하는 *N*-알킬 말론암산 메틸 또는 에틸 에스터(5)를 얻은 후, 이를 다시 가수분해하여 얻는 방법이 있다(Jadhav, G. P. *et al., J. Med. Chem.* 54(9): 3348-3359, 2011)(도 5). 상기 방법은 수분에 민감한 일염화 말론산 에스터를 사용해야 하고 말론암산 에스터(5)를 얻은 후에 다시 가수분해 반응을 거쳐야 원하는 말론암산(3)을 얻는 2단계 반응이어서 효율적이지 않다. 또한 마지막 가수분해와 중화 과정에서 생기는 무기염(inorganic salt)을 NRMA 생성물과 분리하는 데 어려움이 있다. 특히 고가의 동위원소 표지 화합물을 원료로 쓰는 경우, 반응 규모가 매우 작기 때문에 효과적이지 않다.

[0025] 두 번째는 멜드럼산에서 합성하는 방법으로 Aventis Pharma Deutschland GmbH에서 2002년에 등록된 선행특허(US 6,395,737 B1)에서는 3번 위치에 알킬기 R(2) 및 R(3a)가 치환된 5-알킬 멜드럼산 VI를 알킬 아민 VII 또는 VIII와 반응시켜 2번 위치에 R(2) 및 R(3a)가 치환된 *N,N*-다이알킬 말론암산(IX 또는 X)을 제조하는 방법을 기재하고 있다. 그러나 그 발명에는 R(2)와 R(3a)가 모두 H이거나 아민 VII와 VIII이 일차 아민인 예가 없다(도 6). 또한 상기 선행특허 실시예(3-a)를 보면(도 7) 반응시키고자 하는 벤질아민(6)을 N,O-bistrimetylsilylacetamide(7)와 3시간 동안 CH_2Cl_2에서 환류시키면서 반응시킨 후, 다시 5번 위치에 4-시아노 벤질기(4-cyanobenzyl)가 치환된 멜드럼산 유도체(10)를 3시간 동안 환류 조건에서 가열하면서 반응시킨다. 상기 반응 조건은 첫 번째 단계에서 TMS가 치환된 벤질아민(8)을 형성하고, 이것이 10과 반응하여 O-TMS 멜드럼산 엔올에터(11)을 형성한 후에 열분해 되면서 케텐에스터(12)를 형성하며 벤질아민(6)과 반응하여 말론암산 TMS 에스터(13)을 형성한다. 멜드럼산이 엔올에터를 형성하면 낮은 온도에서도 쉽게 α-옥소 케텐 유도체가 형성된다는 사실은 기존 문헌(Sato, *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 38(38): 6689-6692, 1997)에 잘 나타나있다. 그러나 상기 방법 역시 첫 번째 단계에서는 직접 말론암산이 생기는 것이 아니라 말론암산 TMS 에스터(13)가 형성되므로, 이를 말론암산 14로 바꾸기 위해 반응 후처리 과정(work-up)에서 강산인 염산(HCl) 수용액으로 처리한 후, 유기용매(ethyl acetate)로 추출하고 농축하는 과정이 필요하다. 상기 두 가지 방법 모두, 반응 규모가 클 때는 상관없지만, 비싼 동위원소가 표지된 시약을 사용하는 미량 규모 반응(microscale reaction)에 적용하기에는 문제점이 많다. 특히 TEA와 같은 염기나 *N,O*-bistrimetylsilylacetamide와 같은 부가 시약을 사용하기 때문에 부가 생성물이 생기는 것을 피할 수 없고, 이들을 제거하여 순도를 높이는 추가적인 과정이 필요하다.

[0026] 본 발명자들은 상기 문제점을 인식하여 멜드럼산과 아민을 사용하나 그 외의 부시약을 사용하지 않고, 생성된 말론암산 아민염을 말론암산으로 전환하기 위해 용액상 산으로 처리하는 것이 아닌 이온교환수지를 사용함으로써 수 mg의 시약으로도 높은 수율의 말론암산을 수득하는 것이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다. 본 발명자들은 N-알킬 말론암산(3, NRMA)을 얻기 위하여 치환이 되지 않은 멜드럼산(15)을 2당량 이상의 1차 알킬 아민 $R-NH_2$와 반응시켜 N-알킬 말론암산을 알킬암모늄 염 상태(16)로 얻은 후 이를 간단히 이온교환수지에 통과시켜 농축시키면 *N*-알킬 말론암산(3, NRMA)을 수득할 수 있다(도 8). 동위원소가 표지된 NRMA를 얻고자 할 때는 동위원소가 표지된 알킬 아민 $R-NH_2$이나 동위원소가 표지된 멜드럼산(15)을 사용하면 된다.

[0027] 결론적으로 본 발명은 살균제로 많이 쓰이는 메틸이소티아졸리논(*N*-methylisothiazolinone; MIT), 클로로메틸이

소티아졸리논(5-chloro-2-methylisothiazolinone; CMIT), 옥틸이소티아졸리논(*N*-octylisothiazolinone; OIT) 등의 대사체인 *N*-알킬 말론암산(*N*-alkyl malonamic acid; NRMA)을 미량 규모에서도 고수율로 쉽게 제조할 수 있는 기술을 제공한다. 본 발명은 고가의 동위원소 표지물질을 사용해야 하는 표준물질 제조에 특히 유용하다. 특히 상기 방법은 치환되지 않은 멜드럼산을 직접 사용하고 부가 시약을 쓰지도 않고, 액상 추출법 대신 이온교환 수지를 사용하기 때문에 *N*-알킬 말론암산(NRMA)을 미량으로 제조할 때 효과적이다. 동위원소가 표지된 고가의 표준품 합성에서 본 발명의 효과가 두드러지게 나타난다. MIT, CIT, OIT 계열의 대사체인 *N*-알킬 말론암산 및 이들의 표준물질 제조에 본 발명이 제공하는 방법이 특히 바람직하고 효과적이다.

[0028] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0029] **실시예 1: N-메틸 말론암산(1)의 제조**

[0030] **1-1: N-메틸 말론암산-메틸 아민염**

[0031] 본 발명자들은 먼저 N-메틸 말론암산(N-methyl malonamic acid; NMMA)을 하기의 방법으로 제조하였다(도 9). 구체적으로, 1구 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 교반자석과 메틸아민-THF 용액(2.0 M, 10.4 mL, 20.8 mmol)을 넣은 후, 중성 상태의 메틸아민 시약은 휘발성이 강하여 0℃로 냉각시켰다. 여기에 멜드럼산(15)(300 mg, 2.08 mmol)을 첨가하고 플라스크 입구를 고무마개로 막은 다음 상온에서 교반하였다. TLC로 반응을 모니터링하고 12시간 후에 반응이 종결됨을 확인하였고 반응 혼합물을 회전 증발 농축기로 농축시켰다. 이어서, 남아 있는 미량의 THF를 제거하기 위해 농축 잔여물에 CH_2Cl_2를 2 mL 정도 넣어 희석 후 저어준 다음 다시 진공에서 농축시켜 하얀 고체 상태의 N-메틸 말론암산-메틸 아민염(17)을 수득하였다(279 mg, 90%). R_f = 0.05 (Hex:EtOAc = 3:1); 1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) : δ 8.88 (s, 1H), 2.75 (s, 2H), 2.58 (d, J = 4.6 Hz, 3H), 2.33 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6) : δ 170.89, 169.28, 44.65, 25.19, 24.49(도 10 및 11).

[0032] **1-2: N-메틸 말론암산**

[0033] 눈금 피펫 10 mL의 아랫쪽을 솜으로 막고 양이온 교환수지 Amberlite IR-120 레진을 4 mL 채운 후 2.74 M HCl 수용액으로 3번 세척하였다(10 mL x 3회). 이후 흘러나오는 수용액이 중성을 띨 때까지 증류수로 반복하여 세척하였다. 상기 실시예 1-1에 따라 제조된 N-메틸 말론암산-메틸 아민염(17)(279 mg, 1.88 mmol)을 증류수 1 mL에 희석한 후 레진 컬럼 상부에 점적한 후 증류수를 사용하여 용출시켰다. 용출된 용액 30 mL를 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 모은 후 냉각시킨 다음, 고진공에서 동결건조로 물을 제거하여 N-메틸 말론암산(N-methyl malonamic acid; NMMA)(1)을 하얀색 고체로 수득하였다(201 mg, 91%) ^{1}H NMR: (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.51 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 3.10 (d, *J* = 10.9 Hz, 2H), 2.69 - 2.52 (m, 3H) ; ^{13}C NMR: (125 MHz, DMSO-d6) δ 169.57, 166.28, 42.52, 25.70 ; HRMS: (ESI, negative mode): m/z calculated for $C_4H_6NO_3^-$ $[M-H]^-$ =116.03532, found 116.03519(도 12 내지 14).

[0034] **실시예 2: N-메틸 말론암산-d3(1-d3)의 제조**

[0035] **2-1: N-메틸 말론암산-d3 염**

[0036] 본 발명자들은 N-메틸 말론암산-d3(N-methyl malonamic acid; NMMA-d3)(1-d3)를 하기의 방법으로 제조하였다(도 15). 구체적으로, 1구 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 교반 자석과 멜드럼산(15)(144 mg, 1.00 mmol)을 첨가한 후 중수소 표지 메틸 아민염($NH_2CD_3 \cdot HCl$, 73 mg, 1.10 mmol)을 플라스크에 넣고, 탄산 포타슘(Potassium carbonate)을 약한 염기로 작용하도록 차례로 넣어주었다. 증류수 2 mL를 용매로 플라스크에 추가한 상태로 혼합물을 70℃ 조건에서 5시간 동안 교반시켰다. 처음에는 NMR로 반응을 모니터링하고, 그 이후에는 증량하여 플라스크에서 실험하였다. 이어서 용매를 제거하기 위해 동결건조하였고, N-메틸 말론암산-d3 염(17-d3) (267 mg, quant.)에 해당하는 하얀색 고체를 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO): 3.33 (s, 2H) (도 16).

[0037] **2-2: N-메틸 말론암산-d3**

[0038] 눈금 피펫 10 mL에 양이온 교환 수지에 해당하는 엠버라이트 IR-120(Amberlite IR-120) 4 mL를 채워 넣고, 이어서 2.74 M 염산 용액을 이용해 눈금 피펫에 채워져 있는 수지의 부피만큼 용액을 부어 3번 세척하였다. 염산

용액으로 씻어준 후에, 수지는 증류수를 이용해 반복적으로 세척하여 산성조건에서 중성조건으로 만들어주었다. 그 후, 수지는 재사용이 가능하며, N-메틸 말론암산-d3 염(17-d3)(267 mg, 1.69 mmol)을 증류수에 녹인 다음 혼합물을 수지가 채워져 있는 피펫 관 맨 위에 로딩하였고, 수지를 이온 교환 크로마토그래피로 사용하여, 수지가 채워진 피펫에 혼합물을 통과시켰다. 상기 수지를 통과한 용액은 수집한 후, 1구 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 모으고, 용액을 0℃까지 온도를 낮추었다. 그 후 용매를 동결건조를 하기 위해 진공 펌프와 플라스크를 연결하고, 생성물만 남을 때까지 펌프와 연결하여 N-메틸 말론암산-d3(1-d3)(113 mg, 94%)를 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6): δ 7.95 (s, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.10 (s, 2H); HRMS: (ESI, negative mode) m/z calculated for $C_4H_3D_3NO_3^-$ $[M-H]^-$ =119.05415, found 119.08334(도 17 및 18).

[0039] **실시예 3:N-옥틸 말론암산(2)의 제조**

[0040] **3-1: N-옥틸 말론암산-옥틸 아민염**

[0041] 본 발명자들은 N-옥틸 말론암산을 하기의 방법으로 제조하였다(도 19). 구체적으로 1구 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 교반 자석과 옥틸 아민(1.30 g, 10.0 mmol)을 넣은 후, 아세토나이트릴 7.5 mL를 용매로 사용하여 플라스크에 첨가하였다. 여기에 멜드럼산(15) (144 mg, 1.00 mmol)을 넣고, 플라스크 입구를 고무마개로 막은 다음 60℃에서 12시간 동안 교반하였다. 그 후, TLC로 반응을 모니터링하고 12시간 후에 반응이 종결됨을 확인하였다. 이어서, 반응 혼합물을 회전 증발 농축기로 농축시켰고 과량으로 사용한 옥틸 아민과 기타 불순물을 고진공에 연결하여 제거하였다. 고진공에서 12시간이 경과한 후, 노란색 고체 상태의 N-옥틸 말론암산-옥틸 아민염(18)(379 mg, quant.)을 수득하였다(도 20). Rf = 0.06 (Hex:EtOAc = 3:1) (379 mg, quant.). R_f = 0.06 (Hex:EtOAc = 3:1); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ7.62(s, 1H), 3.26-3.19(m, 2H), 3.11(s, 2H), 2.83(t, J=7.7Hz, 2H), 1.65-1.56(m, 2H), 1.54-1.44(m, 2H), 1.38-1.20(m, 22H), 0.87(t, J=6.6Hz, 6H)

[0042] **3-2: N-옥틸 말론암산 NOMA**

[0043] 피펫 눈금 10 mL에 양이온 교환수지인 엠버라이트 IR-120(Amberlite IR-120) 4 mL를 첨가한 후, 차례로 2.74 M 염산 용액을 이용해 쌓여 있는 교환 수지의 부피만큼 3번 세척하였다. 염산 용액으로 세척한 후, 수지는 반복적으로 증류수로 씻어주어 산성 조건에서 중성 조건으로 만들어주었다. 수지는 재사용이 가능하고, N-옥틸 말론암산-메틸 아민염(18) (34 mg, 0.10 mmol)을 건조된 테트라하이드로푸란(Tetrahydrofuran, THF) 2 mL에 녹여 용액을 생성하였다. 수지가 채워진 컬럼 피펫 관 맨 위에 용액을 로딩한 후, 수지를 이온 교환 크로마토그래피로 사용하여 용액을 통과시켰다. 그 후, 용출되는 용액을 따로 수집한 후, 회전 증발 농축기를 이용해 용매를 증발시켜 농축시켰다. 남아 있는 미량의 THF를 제거하기 위해 농축 잔여물에 CH_2Cl_2를 1 mL 정도 넣어 희석한 후 저어주고 다시 진공에서 농축시켜 노란색의 고체 생성물에 해당하는 N-옥틸 말론암산 NOMA(2)(20 mg, 92%)를 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, CDC13) δ 6.35 (br s, 1H), 3.31 (s, 4H), 1.54 (s, 2H), 1.28 (d, J = 11.8 Hz, 10H), 0.94 - 0.77 (t, 3H). LRMS: (ESI, negative mode): m/z calculated for $C_4H_6NO_3^-$ $[M-H]^-$ =214.14487, found 214.16667(도 21 및 22).

[0044] **실시예 4:N-옥틸 말론암산-d2(2-d2)의 제조**

[0045] 본 발명자들은 N-옥틸 말론암산-d2를 하기의 방법으로 제조하였다(도 23).

[0046] **4-1: 옥탄올-d2의 제조**

[0047] 구체적으로 1구 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 교반 자석과 옥트산(octanoic acid, 0.50 g, 3.5 mmol), 무수 다이에틸 에터(diethyl ether, 20 mL)를 넣은 후, 용액을 교반하면서 $LiAlD_4$ (0.44 g, 10.4 mmol)을 조심스럽게 넣어주었다. 상온에서 1시간 교반 후, 물 (0.40 mL), 10% NaOH 수용액 (0.40 mL), 물 (1.20 mL)를 차례대로 5분 간격으로 넣어주었다. 생성된 회색 침전물을 다공성 유리 필터와 거름 종이로 걸러준 후, 회색 침전물을 에터로 세척하였다. 모아진 여과액을 농축하여 옥탄올-d2(20)을 수득하였다 (0.42 g, 93%) ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ1.55 (m, 2H), 1.36-1.27(m, 10H), 0.88 (t, 3H) (도 24 상단)

[0048] **4-2: 옥틸아민-d2**

[0049] 1구 100 mL 둥근 바닥 플라스크에 교반 자석과 옥탄올-d2 (0.40 g, 3.05 mmol), 피리딘 (0.24 g, 3.05 mmol),

무수 CH_2Cl_2 (15 mL)를 넣은 후, 용액을 교반하면서 메탄설폰일클로라이드(methanesulfonyl chloride, 0.38 g, 3.35 mmol)을 천천히 넣어주었다. 상온에서 3시간 교반시킨 후, 물 (15 mL)을 넣어 반응을 종결시킨 후 에터로 추출하였다(15 mL x 3). 에터 추출물을 포화 NaCl 수용액으로 씻어주고, 무수 $MgSO_4$로 수분을 제거한 후 진공회전증발기로 농축시켜 옥탄올-d2-메탄설폰에스터 (21) (0.34 g, 1.6 mmol, 54%)를 얻었다. 이를 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다(도 25 하단).

[0050] 2 구 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 교반 자석과 다이에틸 에터 (50 mL), 옥탄올-d2-메탄설폰에스터 (21) (0.34 g, 1.6 mmol)를 넣고 고무 마개로 밀봉한 후, 암모니아 가스 탱크에 연결하였다. 반응 플라스크를 드라이아이스-아세톤 냉각조에 넣어 -78℃로 냉각시킨 후 암모니아 가스통을 열어 암모니아 가스가 플라스크 안에 액화되어 축적되도록 하였다(약 20 mL). 암모니아 가스통을 잠그고 플라스크를 분리한 후, 고무마개에 빈 풍선을 주사바늘로 꼽아 연결하였다. 천천히 온도를 0℃로 올린 후 0℃에서 3시간 교반하고, 이후 상온에서 45시간 교반하였다. 일부 반응 시료를 농축하여 NMR 스펙트럼으로 분석한 결과 반응이 완결되었음을 확인하고, 반응용액을 진공회전증발기로 농축하여 크루드(crude) 옥틸아민-d2(**21**)을 얻었다(도 25 상단) (0.50 g). 옥틸아민-d2(**21**)는 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ1.4-1.1 (br m, 12H), 0.84 (br t, 3H)

[0051] **4-3: N-옥틸 말론암산-옥틸 아민염-d2**

[0052] 1구 50 mL 둥근 바닥 플라스크에 교반 자석과 옥틸 아민-d2 (0.5 g, 3.9 mmol)을 넣은 후, 아세토나이트릴 10 mL를 용매로 사용하여 플라스크에 첨가하였다. 여기에 멜드럼산(15) (144 mg, 1.00 mmol)을 넣고, 플라스크 입구를 고무마개로 막은 다음 70℃에서 48시간 동안 교반하였다. 그 후, TLC로 반응을 모니터링하고 반응이 종결됨을 확인하였다. 이어서, 반응 혼합물을 회전 증발 농축기로 농축시켰고 과량으로 사용한 옥틸 아민과 기타 불순물을 고진공에 연결하여 제거하였다. 고진공에서 12시간이 경과한 후, 노란색 고체 상태의 N-옥틸 말론암산-옥틸 아민염-d2(18-d2)(50 mg, quant.)을 수득하였다(도 26). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ2.00 (s, 2H), 1.72 (t, 4H), 1.40~1.25, (br m, 20H), 0.87(t, J = 6.8 Hz, 6H)

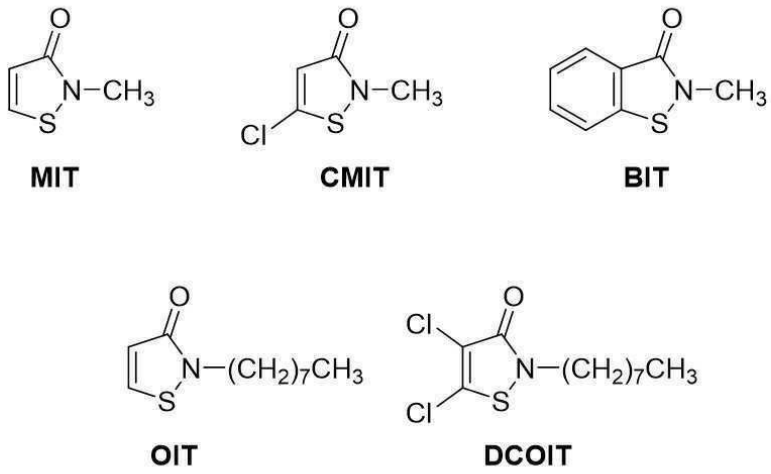
[0053] **4-4: N-옥틸 말론암산-d2(2-d2)**

[0054] 피펫 눈금 10 mL에 양이온 교환수지인 엠버라이트 IR-120(Amberlite IR-120) 4 mL를 첨가한 후, 차례로 2.74 M 염산 용액을 이용해 쌓여 있는 교환 수지의 부피만큼 3번 세척하였다. 염산 용액으로 세척한 후, 수지는 반복적으로 증류수로 씻어주어 산성 조건에서 중성 조건으로 만들어주었다. 수지는 재사용이 가능하고, N-옥틸 말론암산-메틸 아민염-d2 (18-d2) (45 mg, 0.13 mmol)을 건조된 테트라하이드로푸란(Tetrahydrofuran, THF) 2 mL에 녹여 용액을 생성하였다. 수지가 채워진 컬럼 피펫 관 맨 위에 용액을 로딩한 후, 수지를 이온 교환 크로마토그래피로 사용하여 용액을 통과시켰다. 그 후, 용출되는 용액을 따로 수집한 후, 회전 증발 농축기를 이용해 용매를 증발시켜 농축시켰다. 남아 있는 미량의 THF를 제거하기 위해 농축 잔여물에 CH_2Cl_2를 1 mL 정도 넣어 희석한 후 저어주고 다시 진공에서 농축시켜 노란색의 고체 생성물에 해당하는 N-옥틸 말론암산 NOMA-d2(2-d2)(25 mg, 0.12 mmol, 92%)를 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.99 (s, 2H), 1.74 (t, 2H), 1.4-1.1 (br, 10H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H)(도 27 상단).

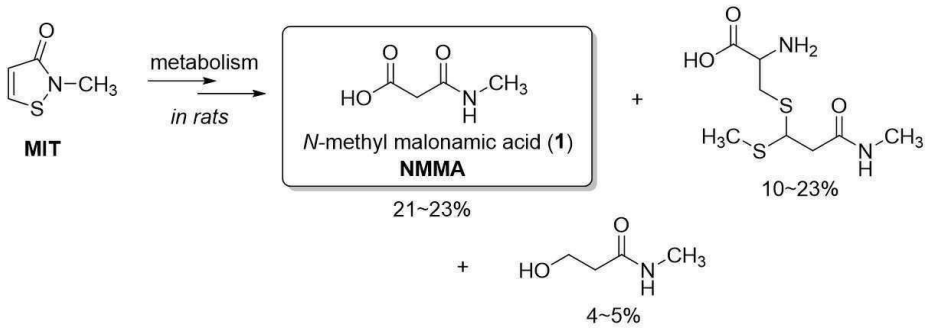
[0055] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

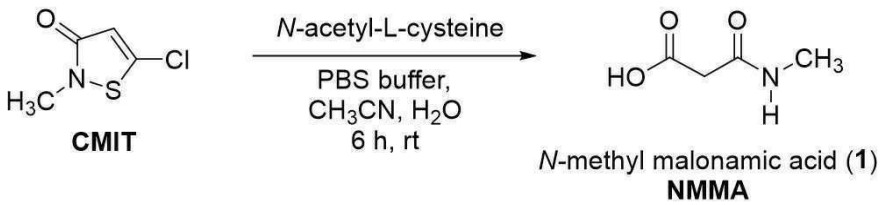
도면1



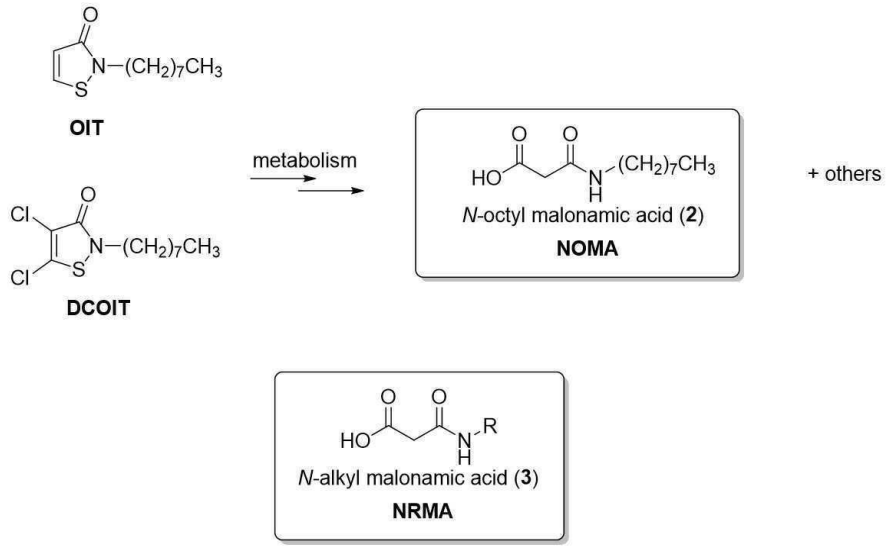
도면2



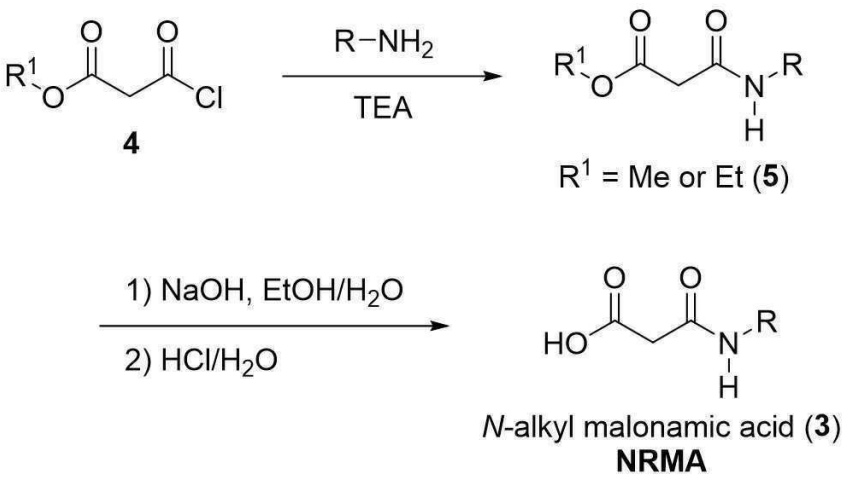
도면3



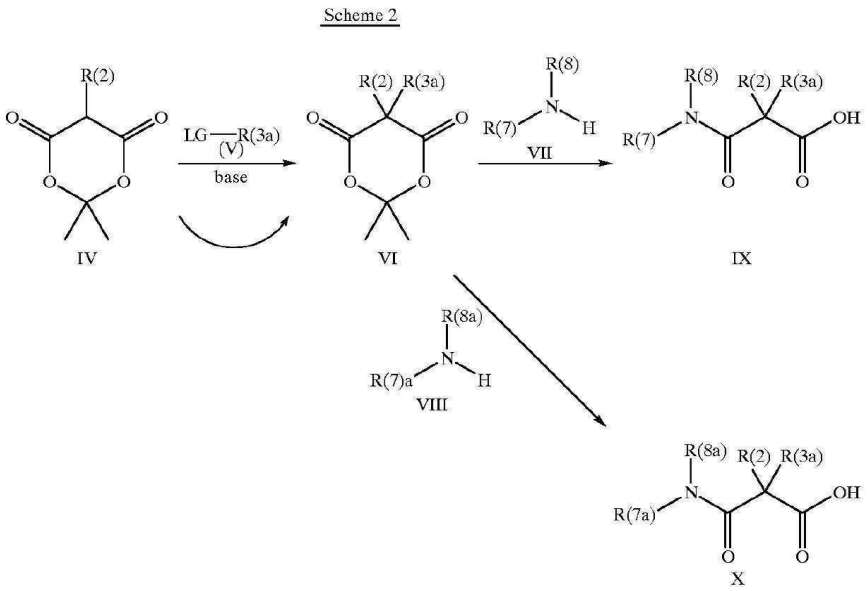
도면4


OIT
DCOIT
metabolism
N-octyl malonamic acid (2)
NOMA
+ others
N-alkyl malonamic acid (3)
NRMA

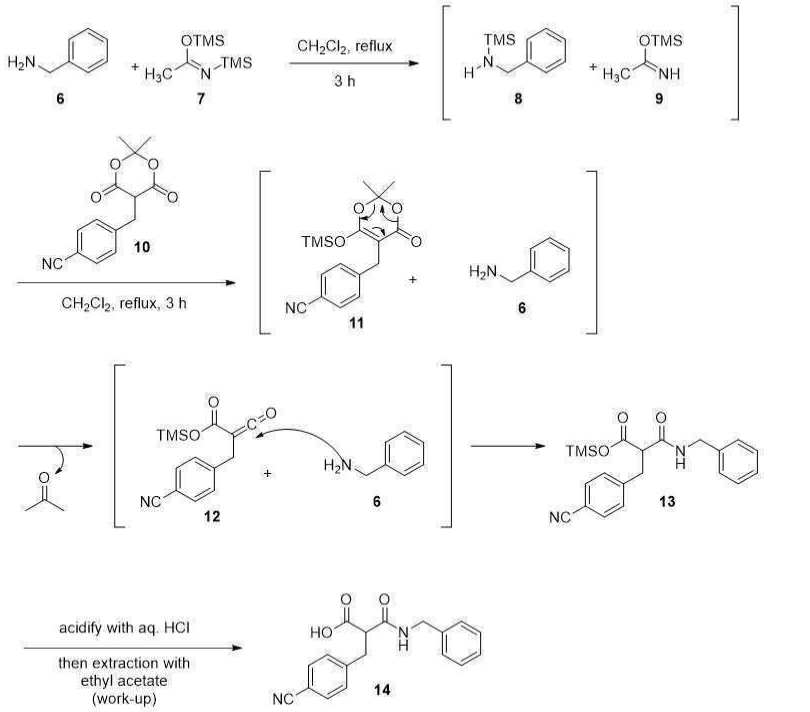
도면5


4
R−NH2
TEA
R1 = Me or Et (5)
1) NaOH, EtOH/H2O
2) HCl/H2O
N-alkyl malonamic acid (3)
NRMA

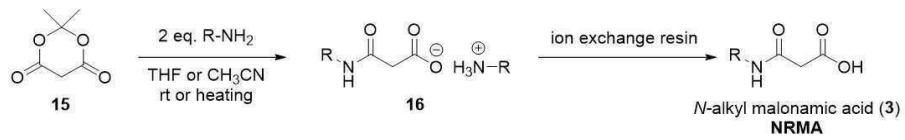
도면6


Scheme 2
R(2)
LG—R(3a)
(V)
base
R(2) R(3a)
R(8)
R(7)
H
VII
R(8) R(2) R(3a)
OH
IV
VI
IX
R(8a)
R(7a)
VIII
X

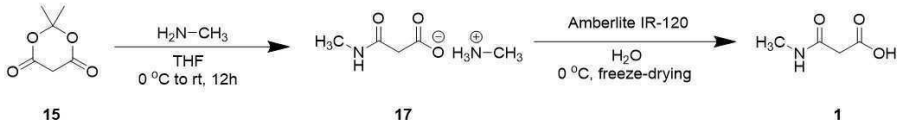
도면7


OTMS
TMS
CH2Cl2, reflux
3 h
6
7
8
9
10
CH2Cl2, reflux, 3 h
TMSO
NC
11
12
13
acidify with aq. HCl
then extraction with
ethyl acetate
(work-up)
14

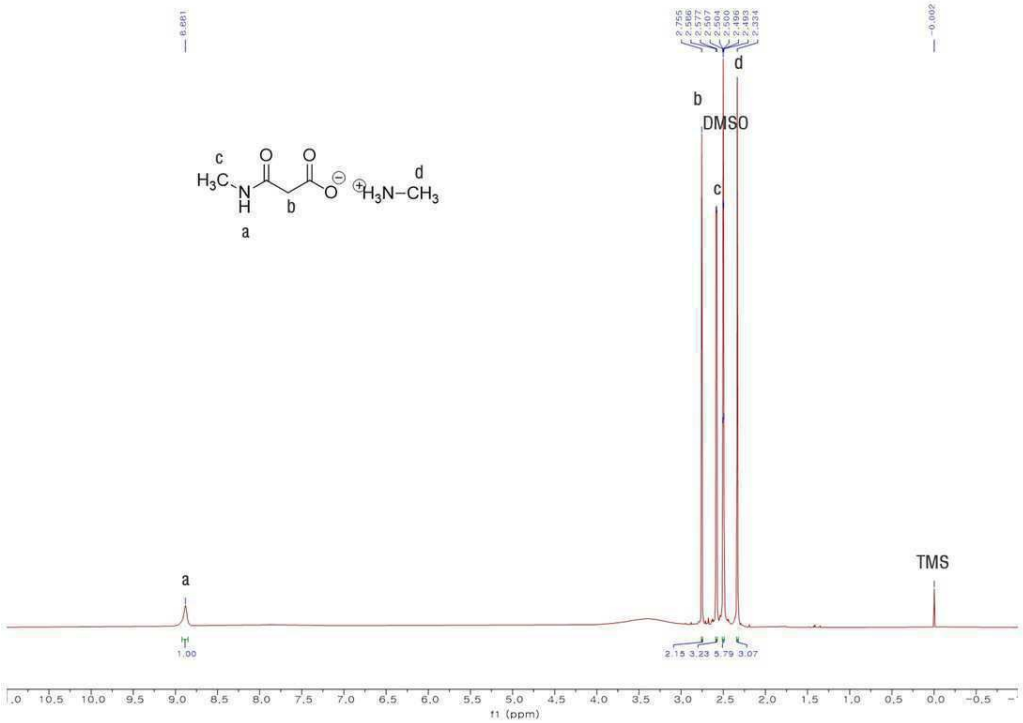
도면8


2 eq. R-NH2
THF or CH3CN
rt or heating
15
16
ion exchange resin
N-alkyl malonamic acid (3)
NRMA

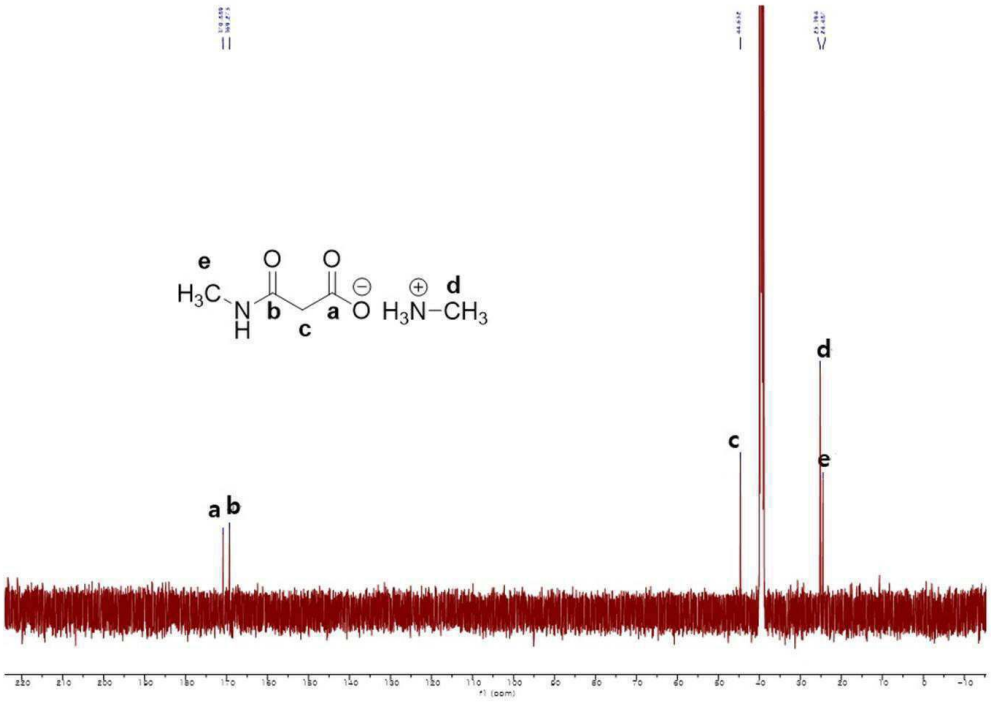
도면9


H2N−CH3
THF
0 °C to rt, 12h
Amberlite IR-120
H2O
0 °C, freeze-drying
15
17
1

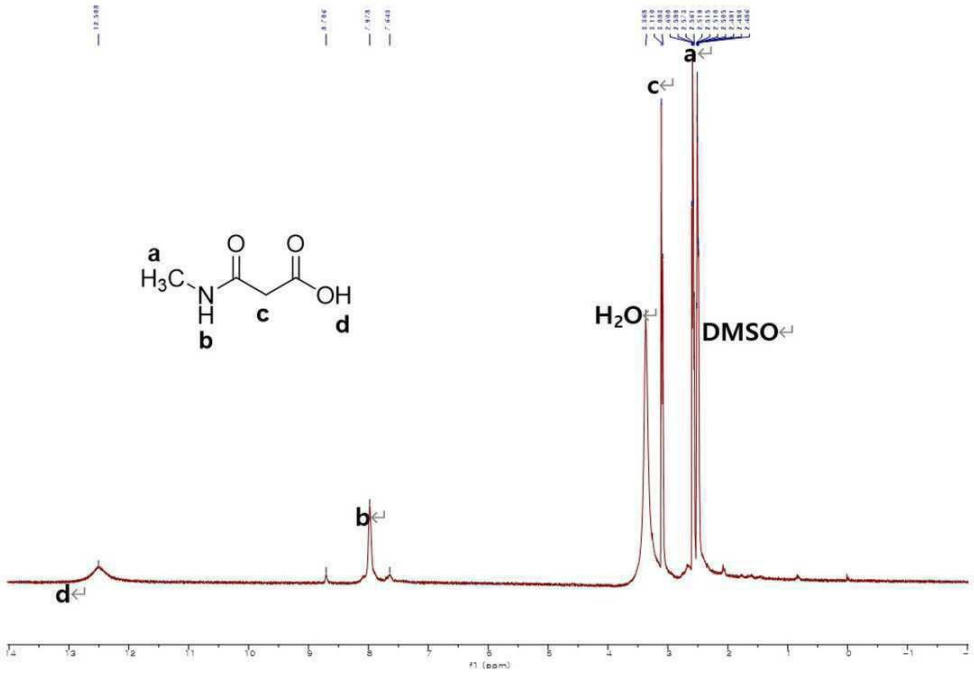
도면10


a
b
c
d
DMSO
TMS
f1 (ppm)

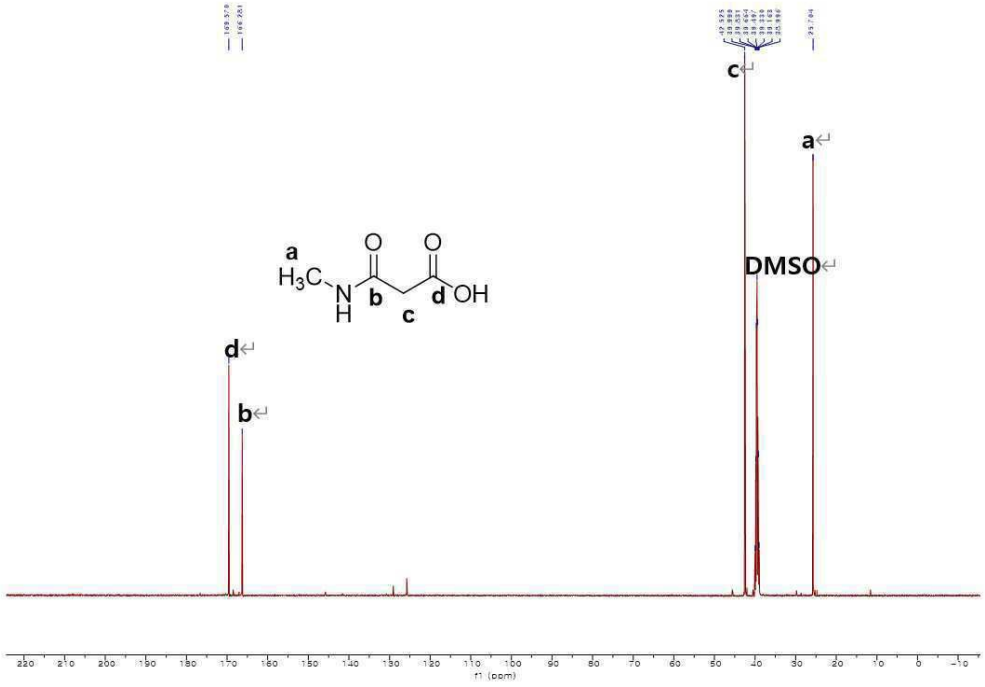
도면11



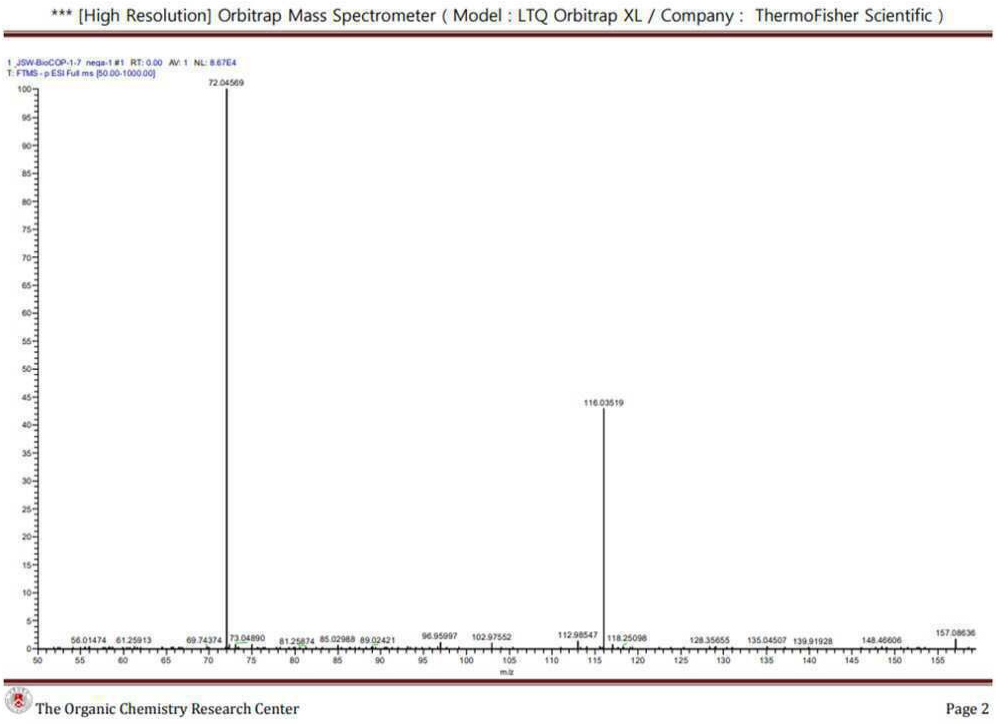
도면12



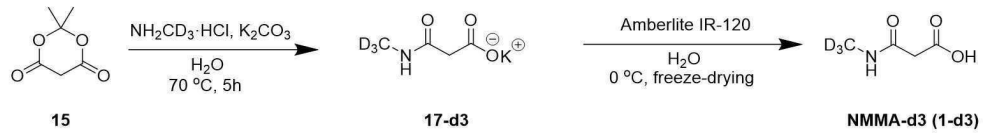
도면13


c
a
DMSO
d
b
a
b
c
d
OH
f1 (ppm)

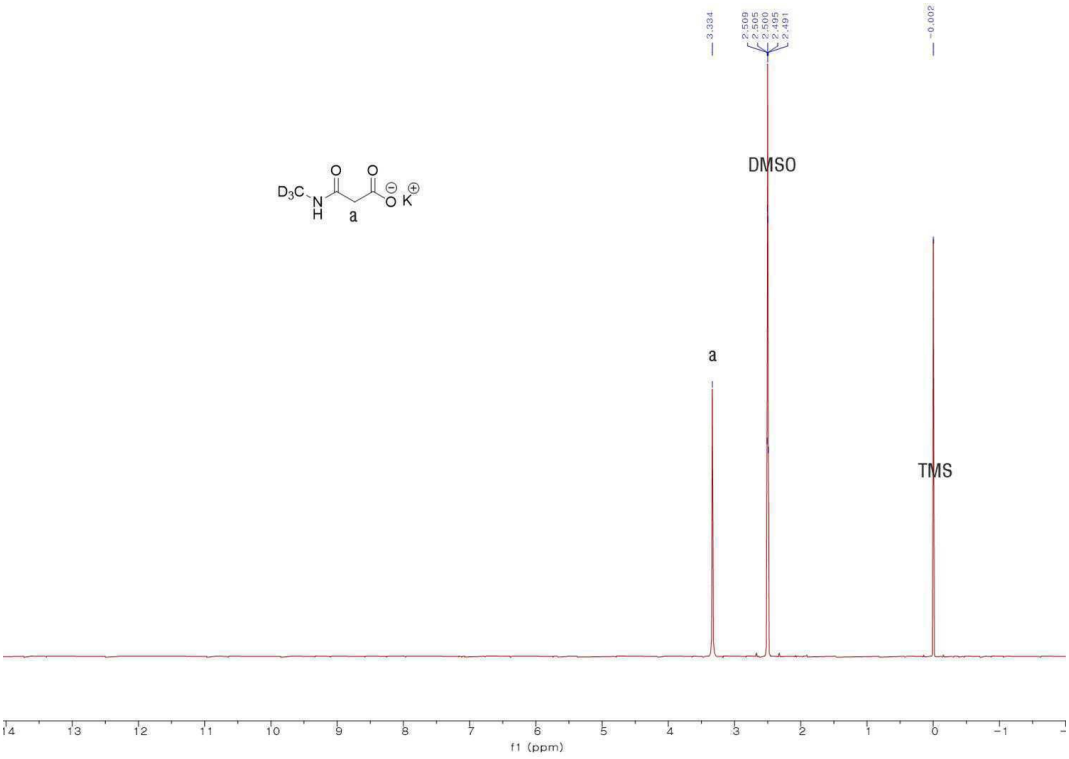
도면14


*** [High Resolution] Orbitrap Mass Spectrometer (Model : LTQ Orbitrap XL / Company : ThermoFisher Scientific)
72.04569
116.03519
m/z
The Organic Chemistry Research Center
Page 2

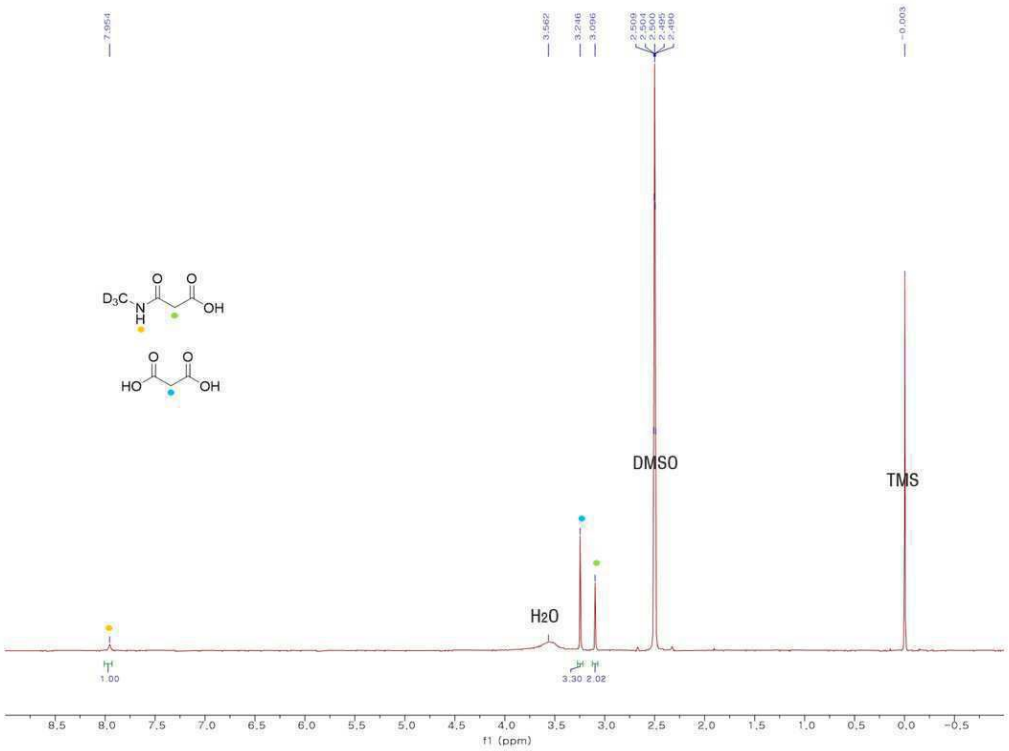
도면15


NH2CD3·HCl, K2CO3
H2O
70 °C, 5h
Amberlite IR-120
H2O
0 °C, freeze-drying
15
17-d3
NMMA-d3 (1-d3)

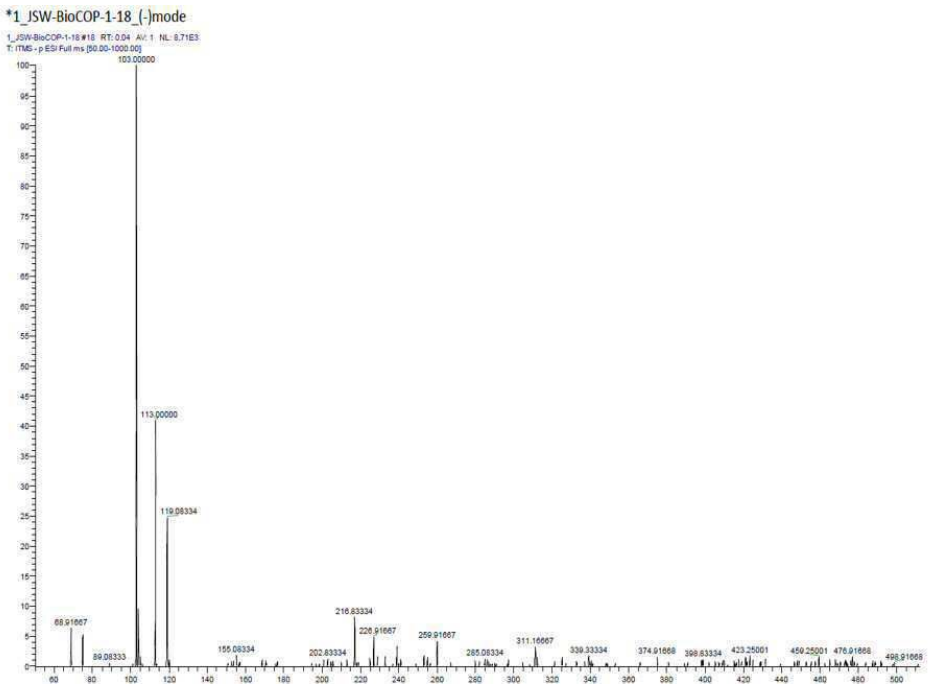
도면16


DMSO
a
TMS
f1 (ppm)

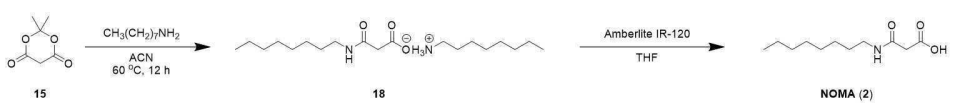
도면17



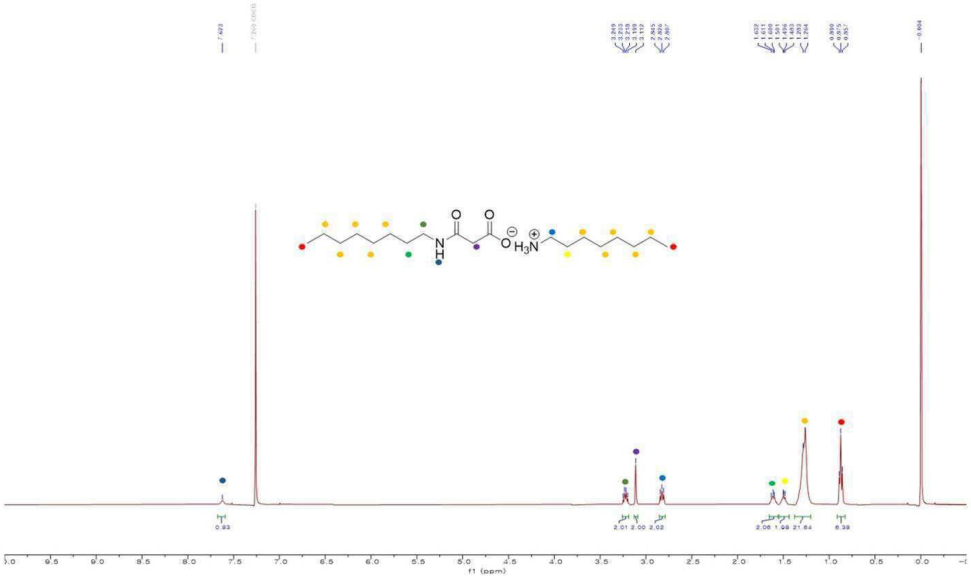
도면18



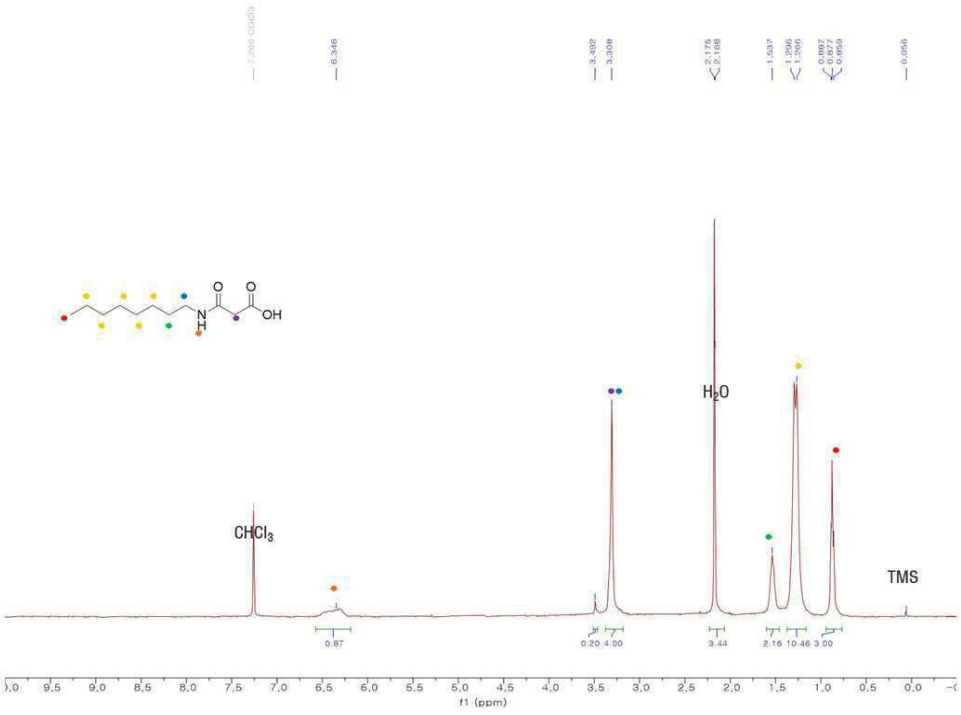
도면19



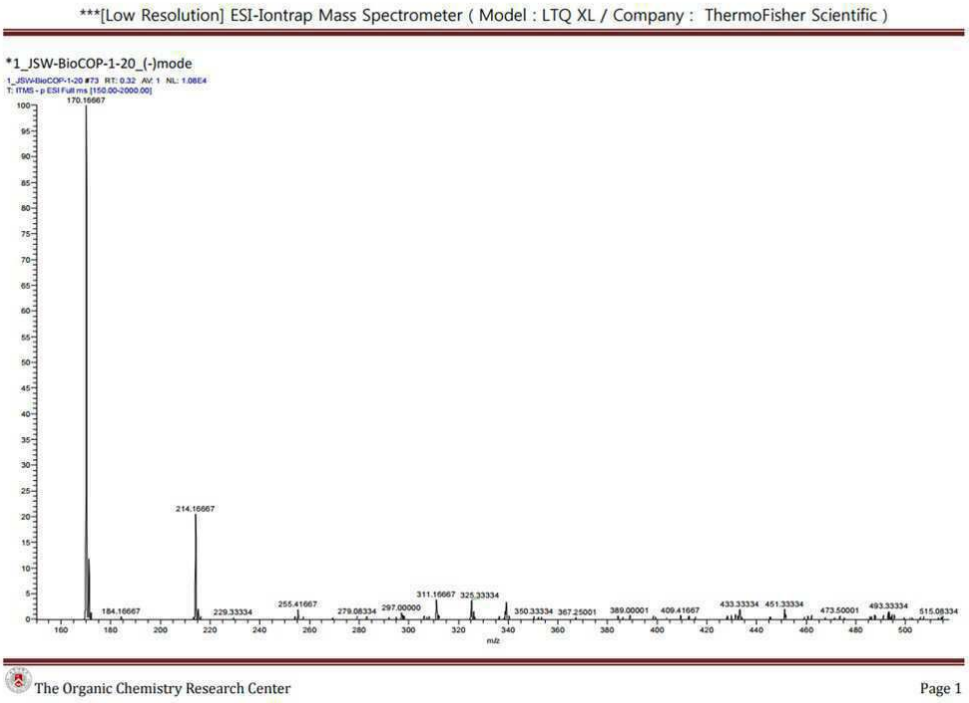
도면20



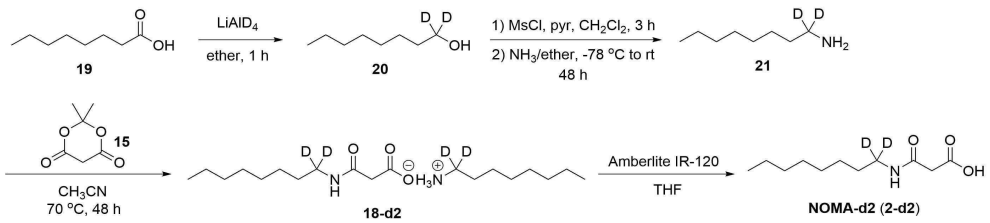
도면21



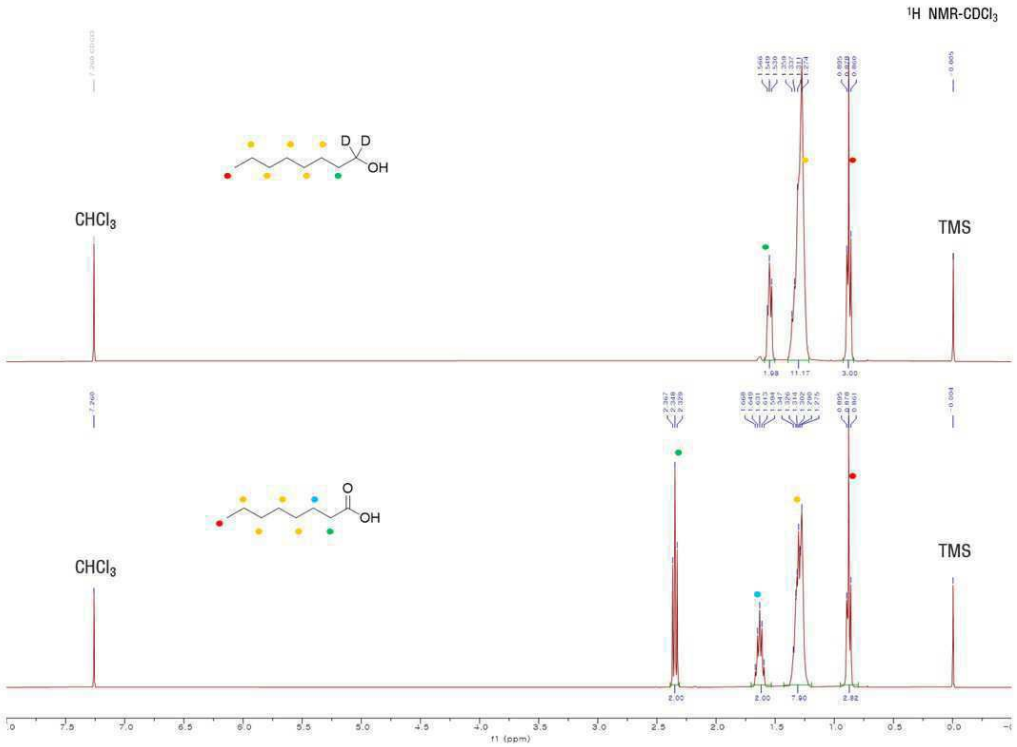
도면22


***[Low Resolution] ESI-Iontrap Mass Spectrometer (Model : LTQ XL / Company : ThermoFisher Scientific)
*1_JSW-BioCOP-1-20_(-)mode
The Organic Chemistry Research Center
Page 1

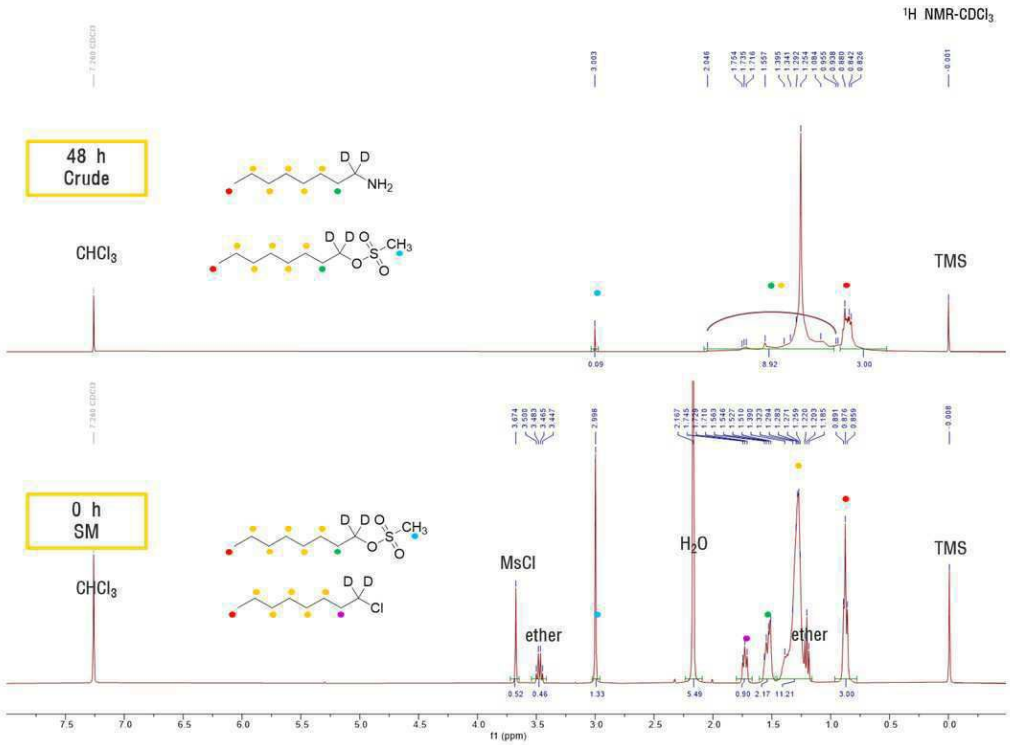
도면23


LiAlD4
ether, 1 h
19
20
1) MsCl, pyr, CH2Cl2, 3 h
2) NH3/ether, -78 °C to rt
48 h
21
15
CH3CN
70 °C, 48 h
18-d2
Amberlite IR-120
THF
NOMA-d2 (2-d2)

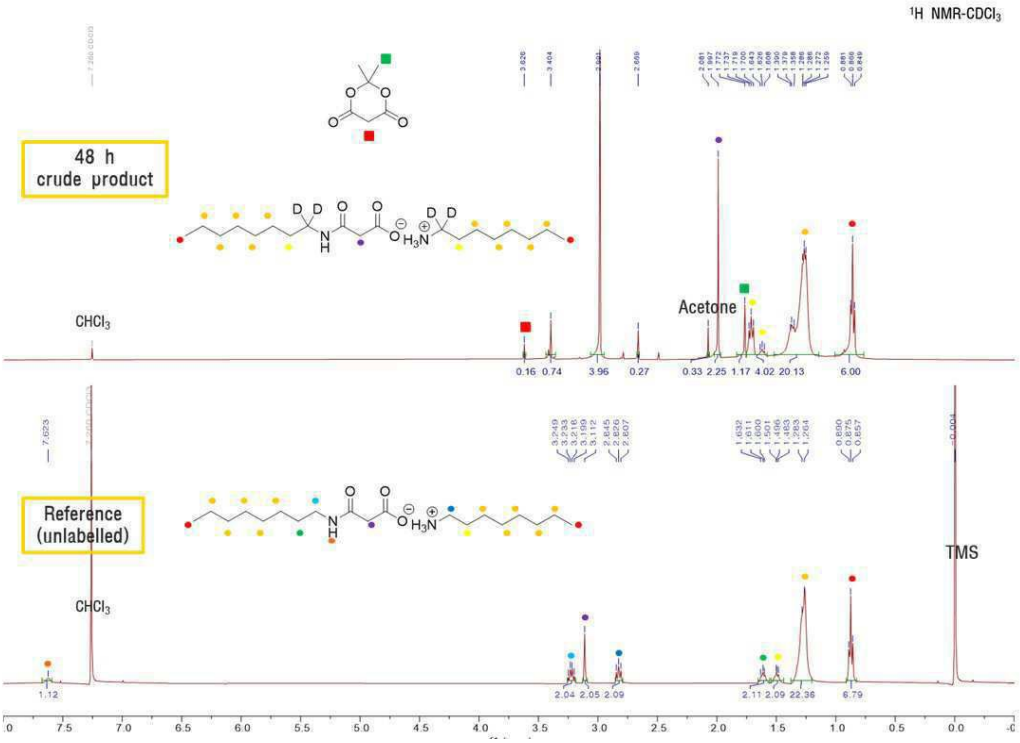
도면24


^{1}H NMR-CDCl$_3$
CHCl$_3$
TMS
D D
OH
O
OH
CHCl$_3$
TMS
f1 (ppm)

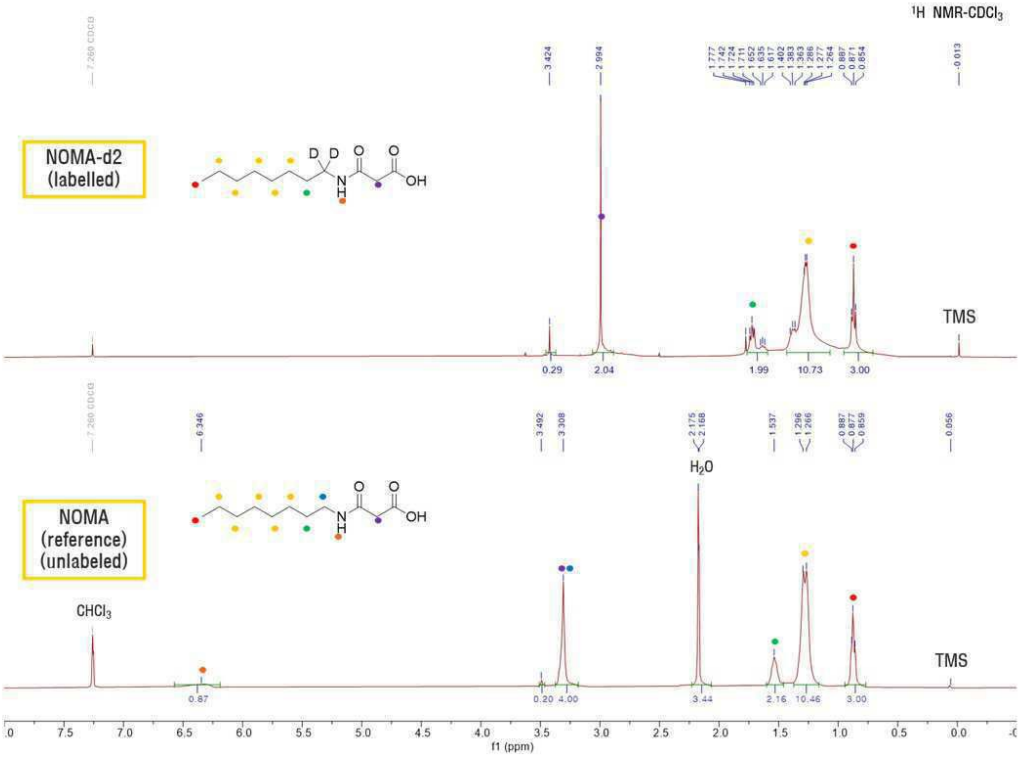
도면25


^{1}H NMR-CDCl$_3$
48 h
Crude
CHCl$_3$
TMS
D D
NH$_2$
D D O
CH$_3$
S
O
0 h
SM
CHCl$_3$
MsCl
ether
H$_2$O
ether
TMS
D D
Cl
f1 (ppm)

도면26


^{1}H NMR-CDCl$_3$
48 h
crude product
CHCl$_3$
Acetone
Reference
(unlabelled)
CHCl$_3$
TMS

도면27


^{1}H NMR-CDCl$_3$
NOMA-d2
(labelled)
TMS
NOMA
(reference)
(unlabeled)
CHCl$_3$
H$_2$O
TMS
f1 (ppm)