

数種の光学活性医薬品の  
工業的製法に関する研究

乙第4号

1990年

瀬 沼 勝

# 目 次

## 序 論

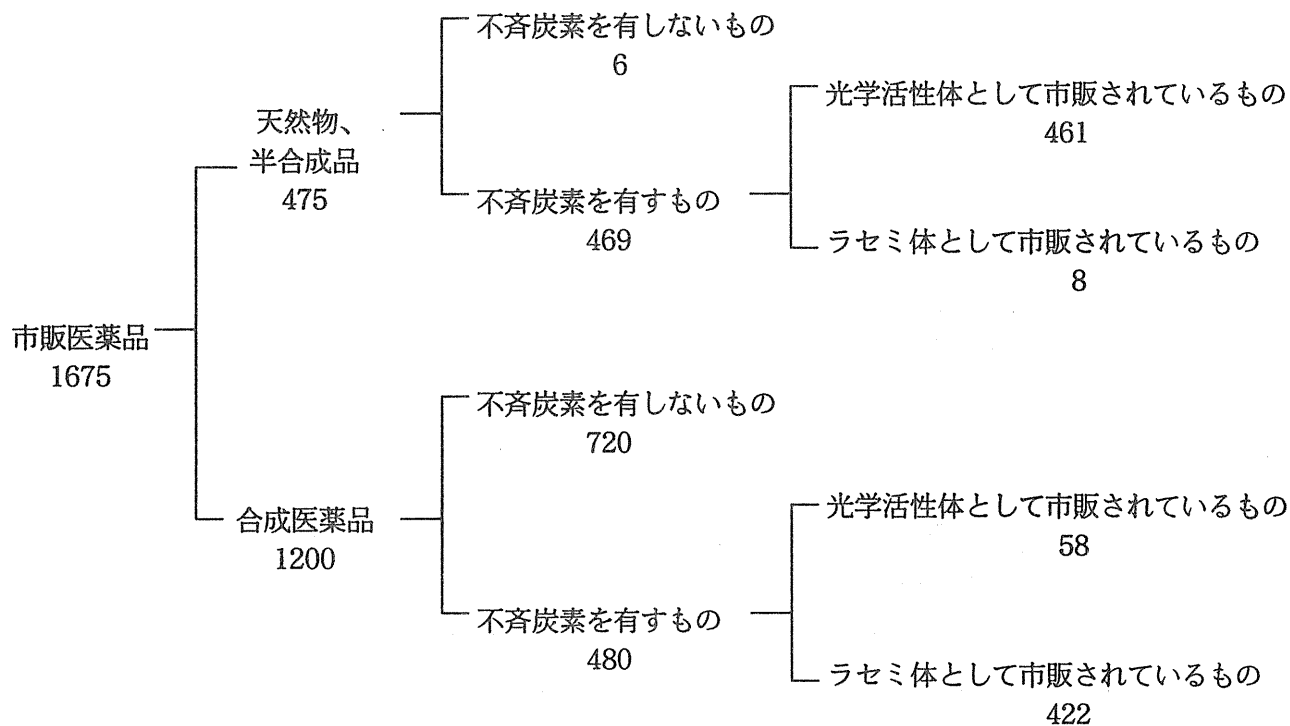
1. 光学活性医薬品の必要性	1
2. 光学活性化合物の研究の歴史と製法	4
3. 工業的生産の条件と本研究の目的	10
第1章 ビオチン合成中間体の工業的光学分割とラセミ化法	15
第1節 ビオチンの製法	16
第2節 新しい光学分割法と不用な対掌体の再利用	18
第2章 フェニルエタノールアミン誘導体 (デノパミン) の合成中間体の工業的ラセミ化およびエピメリ化法	31
第1節 デノパミンの合成法	31
第2節 ラセミ化による不用な対掌体の再利用の検討	33
第3節 エピメリ化による不用な対掌体の再利用	35
第3章 1, 5-ベンゾチアゼピン誘導体 (ジルチアゼム) の合成中間体の工業的光学分割法	38
第1節 ジルチアゼムの合成法	41
第2節 中間体ニトロカルボン酸の光学分割	43
第3節 不用な対掌体の再利用	49
第4章 新規合成ペニシリン (アスポキシシリン) の光学活性な側鎖の工業的製法	51
第1節 2つの光学活性アミノ酸	53
第2節 D-アスパラギン酸の工業的製法	54
第3節 D-p-ヒドロキシフェニルグリシンの工業的製法	59
第5章 トランスアミナーゼを利用する非天然型アミノ酸の工業的製法	66
第1節 ACE阻害剤の構造	68
第2節 エナラプリル類の合成法	69
第3節 L-2-アミノ-4-フェニル酪酸の工業的製法	70
総 論	75

謝 辞	-----	8 1
実験の部	-----	8 2
引用文献	-----	9 8

# 序 論

## 1. 光学活性医薬品の必要性

1984年、Ariensはヨーロッパにおける市販医薬品をその起源と構造から図・1に示すように分類した<sup>1)</sup>。それによると、医薬品の72%が化学合成品であって、その化学合成医薬品のうちの40%が不斉炭素を有しているが、そのうちの約90%がラセミ体のまま市販されている。



図・1 市販医薬品に占める光学活性体の数<sup>1)</sup>

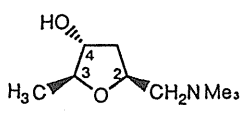
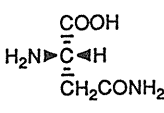
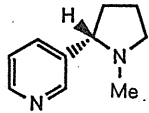
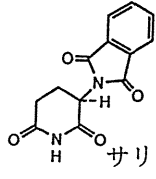
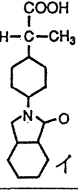
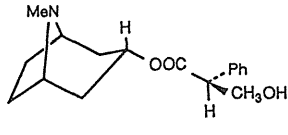
このように、医薬品として主にラセミ体が用いられてきた歴史的背景としては、一つには光学活性医薬品の工業的生産が極めて困難であることが理由に挙げられるが、何よりも医薬品としてラセミ体の投与で充分であるという安易な考え方が根底に存在していたからである。

しかし、医薬品としてのラセミ体の使用は最近サリドマイドの中毒事件を契機として再び大きな問題となってきた。

鏡像関係にある二つの光学対掌体は、旋光性以外のすべての物理的、化学的性質は等しい。しかし、同じ物理的、化学的性質を示す二つの光学対掌体の等量混合物であるラセミ体とその一方の対掌体である光学活性体とでは、融点、溶解度等の物理的性質は必ずしも一致しない。一方、化学反応性については、二つの光学対掌体の化学反応性は同じであるから、光学活性体ではラセミ化が進行する可能性があることを除けば光学活性体とラセミ体の化学反応性は全く同じであるといつてよい。

一組の対掌体が、薬理活性の面で表・1の例に示すように異なることが既に知られていたが<sup>2)</sup>、体内動態の面では全く同一の挙動をとるものと従来考えられていた。

表・1 立体異性薬物の生理活性の比較 <sup>2)</sup>

薬物	特性	異性体	効果又は比活性
ムスカリン 	コリン作動性	2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>S</i>	700
		2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>R</i>	1
アスパラギン 	味	<i>S</i>	苦味
		<i>R</i>	甘味
ニコチン 	神経生理作用	<i>S</i>	10
		<i>R</i>	1
 サリドマイド	催奇性	<i>S</i>	強い
		<i>R</i>	不活性
 インドプロフェン	消炎鎮痛作用	<i>S</i>	20
		<i>R</i>	1
ヒオシアミン 	抗緑内障	<i>S</i>	15~20
		<i>R</i>	1

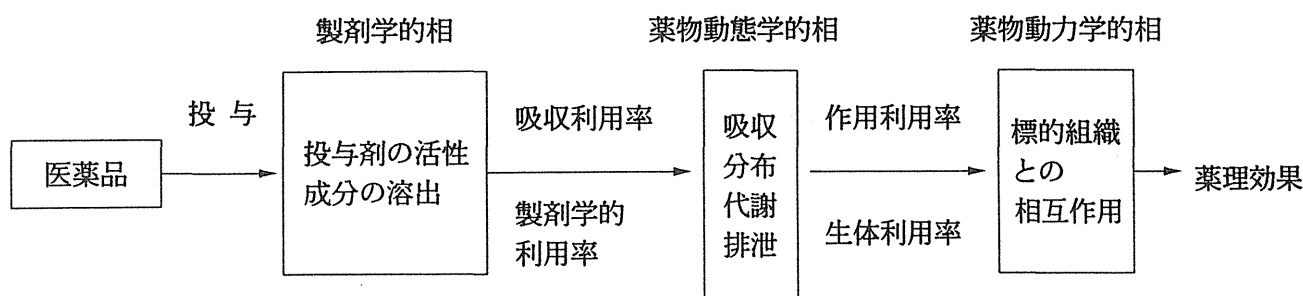
しかし、最近の薬物動態研究の進歩、特に高速液体クロマトグラフィーによる分析技術の進歩により光学異性体の分離が容易になってきた。その結果、体内で一方の光学異性体が対掌体に変換するナプロキセンの例<sup>3)</sup>、光学異性体間において吸収効率が異なるベラパミルの例<sup>4)</sup>、組織中へ移行する量（分布容積）の異なるプロプラノールの例<sup>5)</sup>、光学異性体間によって血中からの消失速度の差が認められるラタモキシフェルの例<sup>6)</sup> など、光学異性体間ではきわめて異なる体内動態をとることが明らかになってきた<sup>7)</sup>。

これらの現象は、生体内がL-アミノ酸からなる酵素の世界であり、非対称の光学活性の世界であることに起因している。したがって、前記のような対称の世界の中で同じ化学反応性を示す二つの光学対掌体であっても生体内での反応性は全く異なってくる。一对の光学対掌体とそれらの生物活性の関係について、山田<sup>8)</sup> は次のように理論的に明快に説明づけている。

生体内においては、生体内の作用中心と考えられている受容体と生物活性物質との立体化学的な反応が起こることが一般に認められている。この時受容体がキラルであるため、一組の対掌体のそれぞれが受容体に対して異なったジアステレオマーを生成して、一組の対掌体はお互いに異なった物質として化学反応性を生体に対して示す。このため、その生物活性もまた異なってくる。したがって、一組の対掌体は無生命の反応においては同じ反応性を示し同じ化合物と見做し得るが、生命ある光学活性の生体内では全く異なる物質と考えなければならない。

このように、ラセミ体を医薬品として使用することは、50%の不純物を含むものと考える以上に薬物動態を含めた生体との反応に著しい影響を及ぼし、かつ副作用発現の原因ともなることが明らかである。

したがって、キラリティーを有する化合物を医薬品として用いる場合、目標とする薬理作用を100%発揮し、かつ不必要な副作用（毒性）を排除して、満足する治療効果を得るためには、図・2に示すような立体特異性が薬効発現に及ぼす因子<sup>9)</sup> についてのエナンチオ選択性を十分に把握した上で、必要な絶対配置をもつ純度の高い光学活性体を投与することが不可欠である<sup>10)</sup>。



図・2 薬の立体特異性の薬効発現におよぼす諸因子<sup>9)</sup>

## 2・光学活性化合物の研究の歴史と製法

光学異性の概念の発展の歴史は、まず J. von. Liebig らのシアン酸銀と雷酸銀の比較から、分子の構造異性体の概念が生まれたのに端を発する。その後偏光現象が発見され、分子が三次元的な構造をもつことが示唆されるようになり、続いて、L. Pasteur が立体化学、不斉概念の基礎を築き発展させたといわれている。特に、Pasteur の酒石酸に関する結晶学的研究は、現代化学で利用されている最も基本的なラセミ体の光学分割法を完成させた。

更に、J. H. van, t Hoff と J. A. Le Bel による炭素正四面体説が有機化学構造論の発展を促し、E. Fisher の糖化学へと開花し、また J. F. W. A. Bayer の古典的張力説が立体配座の化学へと発展した。

このような分子の立体構造についての静的な側面の発展と同様に、1950 年以降は反応機構の解明に伴って新しい動的な側面の立体化学が著しく発展してきた。

現在、種々の置換反応、脱離反応、付加反応が立体化学的に検討されるとともに、光学活性化合物を選択的に合成する不斉合成の研究がめざましく発展しつつある。

一般に、光学活性化合物の製法は大別すると次の三種の方法に分類される<sup>10)</sup>。

- (I) 光学分割法
- (II) 誘導法
- (III) 不斉合成法

### (I) 光学分割法

ラセミ体を何らかの手段によって光学活性体に分離する方法であり、1848 年の Pasteur の実験以来、既に 1 世紀以上も研究が続けられ、非常に数多くの物質が光学分割されてきている。この方法は原理的にはもはや新しいものではないが、実用的な改良が加えられ光学活性物質の工業的製法として現在最も多用されているものである。この方法は分割剤の有無によって次ぎの二つの方法に分けられる。

#### (イ) 分割剤を必要とする光学分割

分割をしようとするラセミ体に他の光学活性体を作用させて、得られるジアステレオマーの性質の差により分割する方法が古来種々の物質について試みられている。分割剤についても有機酸、アミン類が多数検討され、1514 品目の事例が Newman により集約されている<sup>11)</sup>。ジアステレオマーの分離にあたっては、溶解度差のあることに基ずいた分別結晶法<sup>12)</sup>、溶液抽出法<sup>13)</sup> が知られている。

また、最近光学分割の際、易溶性のジアステレオマーを同時にラセミ化させることにより、すべてを難溶性の目的のジアステレオマーに転換する不斉転換法<sup>14)</sup> も試みられている。

しかし、実際には装置や操作面を考慮して分別結晶法による方法が現在最も多く用いられており、他の方法は数例に過ぎない。

この分別結晶法において、分割する物質と分割剤との組合せ方、溶媒の選択などが研究されてきているが、この分割法に関する普遍的な法則性は現在のところ見出されていない。

また、近年主としてシクロデキストリン、尿素、クラウンエーテルなどの包接化合物を用いて結晶化、抽出などによりラセミ体を分割する方法が報告されている<sup>15)</sup>。

一方、人工的に光学活性な吸着剤を作り、これによりラセミ体を選択吸着、脱離させ分割するクロマトグラフィ―法も研究されている<sup>16)</sup>。これらの方法は少量の分取や分離には適しているが、工業的には経済性や大量処理能力に問題があって実施例は少ない。

#### (ロ) 分割剤を必要としない光学分割

ラセミ体のある条件下で晶析させると、光学活性化合物とその対掌体とが別々に析出してくる。これを選び分ける分割法、およびラセミ体の過飽和溶液にいずれか一方の光学活性体の種晶を成長させることによる優先晶析法については、1848年 Pasteur により報告されている。これらの方法は原理的には可能であってもラセミ体がラセミ混合物として存在する場合にのみ適用可能であるため実用的ではない<sup>17)</sup>。このうち、優先晶析法については近年、工業的な研究も進み、分割可能なラセミ混合物結晶を形成する塩、および誘導体が次々と発見され、その数は250におよんでいるが<sup>18)</sup>、一般にラセミ体がラセミ混合物として結晶する確率は5~10%しかないと言われている<sup>19)</sup>。

優先晶析法を用いた例としては、DL-グルタミン酸の光学分割が知られている。アミノ酸は種類によっては結晶の晶析条件、すなわち過飽和度、温度あるいは共存物の影響などによって、ラセミ混合物となったりラセミ化合物になることがある。DL-グルタミン酸の場合、ラセミ混合物の他に、比較的高温で晶析する安定なラセミ化合物の結晶と結晶水を有するDL-グルタミン酸一水和物の結晶があり、これらの溶解度はいずれも光学活性体の溶解度より大きいため優先晶析による光学分割が可能で、工業的規模で実施されたことがある<sup>20)</sup>。しかし、優先晶析法は本来光学活性体とその対掌体が熱力学的不安定さのもとに存在する状態に、一方の活性体の種結晶を接種して目的の活性体を優先的に晶析させ、対掌体の起晶前に濾過操作を完了しなければならないため、工業的プロセスとしては大きく制約をうける。

#### (II) 誘導法

誘導法は、光学的に活性な天然物を出発原料としてこれを化学的に変換し、光学活性化合物の合成に応用しようとする方法である。この方法は天然から大量入手できる原料を選ぶことができれば出発原料の絶対構造が既知であり、目的の光学活性化合物を得るに有利な方法となる。しかし、安価で大量に得られる天然物は少なくしかも天然には一方の鏡像



体しか産出しないので合目的に利用できない場合もある

現在、ビタミンの一つであるビオチン<sup>21)</sup>、プロスタグランジンE<sub>2</sub><sup>22)</sup>、昆虫フェロモンのイプセノール<sup>23)</sup>などの合成に糖質がキラルプールとして利用されている。また、マクロライド化合物や放線菌の生産するポリエーテル系抗生物質など大きな分子の合成にも糖質由来のシントンが取り込まれている<sup>24)</sup>。

このように、糖をキラルプールとして糖以外の化合物の合成に用いる場合、多数存在する水酸基の保護基の選択によっては立体障害のために反応が進まないなどの問題もある。すなわち、この方法により目的を達成するためには、広くて深い合成化学の力が必要である。

### (Ⅲ) 不斉合成法

光学活性化合物を直接合成する、いわゆる不斉合成は理論的には100%の化学収率および光学収率を得られる可能性をもつ最も合理的な方法である。

不斉合成法は、一般的な分類法に従えば次の二つに大別できる。

(イ) 絶対不斉合成法

(ロ) 相対不斉合成法 (不斉誘起反応法)

#### (イ) 絶対不斉合成法

キラルな化学的試薬が全く存在しない反応過程で光学活性のない物質から光学活性な生成物を得る方法で、この例としては1929年、Kuhnが円偏光を用いて成功した方法<sup>25)</sup>が有名であるが、その他ヘキサヘリセン等の絶対不斉合成が最近報告されている<sup>26)</sup>。この方法は、ラセミ体に円偏光を照射することにより一方の対掌体を分解する不斉分解と考えられている。この方法は生成物の光学純度が極めて低いため実用的に採用されている例はないが、生命の起源としての光学活性化合物の生成を論ずるにあたっては極めて興味ある分野である。

#### (ロ) 相対不斉合成法

この方法は、反応のタイプから次のように分類されている<sup>27)</sup>。

(a) 基質がキラルであるタイプ

(b) 反応試薬がキラルであるタイプ

(c) 触媒または溶媒がキラルであるタイプ

(a)の方法は、ジアステレオ区別反応であり、基質中のキラルなグループの影響下に化学反応を進行させることにより新しいキラル中心を導入する方法である。例えば、アルデヒドに光学活性なアミンを結合させた Schiff 塩基にシアン化水素を付加させることにより新しいキラル中心をもつ光学活性なアミノニトリル誘導体を合成することができる<sup>27)</sup>。

一方、(b)の方法は、エナンチオ区別反応で、化学量論的な不斉源を必要とする方法ではあるが、立体相互作用を考慮することによりかなり高い光学収率で進行する不斉合成である<sup>28)</sup>。安価に入手できる光学活性アミノ酸を利用して光学活性天然物を合成する研究例も数多い<sup>10c)</sup>。

また、(c)の方法は、反応基質はアキラルであるが反応に利用される触媒がキラルである場合で、微量の不斉源から多量の光学活性化合物を得ることができるので、この不斉触媒反応は、化学的に最も有効でかつ一般的な手法と考えられる。

例えば、不均一系水素化反応では光学活性なアスパラギン酸、グルタミン酸などのキラルな修飾剤で処理したラネー・ニッケル触媒等を用いる方法が多用されている。また、均一系水素化反応の場合、キラルな修飾剤で処理した遷移金属が触媒として多数用いられ、現在、最も多くこの種の研究が行なわれている。一種の人工酵素である不斉金属錯体触媒は、次ぎに記す酵素の利用と競合する段階にまで進み、不斉触媒プロセスが企業化される状況になってきている。

1970年代には不斉水素化反応によるL-DOPAの生産<sup>29)</sup>が唯一の工業化プロセスであったが、1980年代に入り不斉触媒を用いての不斉異性化反応による(-)-メントールの製造<sup>30)</sup>、不斉シクロプロパン化反応による酵素阻害剤の製造<sup>31)</sup>等が次々と実用化されている。

特に、不斉触媒反応の工業化において第二番目の例となったミルセンから(-)-メントールの製造は、そのキー・ステップに野依ら<sup>32)</sup>によって合成された(R)-2,2'-ビス(ジ-p-トリルホスフィン)-1,1'-ビナフチル[BINAP]を配位子としたロジウム-キラルホスフィン錯体を用いることにより数時間でゲラニルジエチルアミンを99% eeの不斉収率で光学活性シトロネラルエナミンに不斉異性化することができる。この方法はまた触媒量が、Rh/基質 = 1/8000と少なく再使用も可能であることが見出されて実用化されるようになった。しかし、(c)の方法を工業的に利用するには、光学収率が高いことの他に、目的とする反応の化学収率が高く副反応が少ないこと、安価な不斉源を用いるか、不斉源の回収、再利用が可能のこと等の条件がすべて満たされなければならない。

一方、発酵法や酵素法のような生化学反応は、キラルな有機触媒である酵素を利用する一種のエナンチオ区別反応である。すなわち、酵素は特定の位置に特定のサイズの置換基をもつ基質だけをその活性部位に取り込んで、特異的に反応が進行する。

次の表・2に示す化学反応との比較から明らかなように、生化学反応は一般に水を溶媒として常温常圧で行なえるなど工業的生産に適する大きな利点を有する<sup>33)</sup>。

表・2 有機合成反応と生化学反応の特質<sup>33)</sup>

特 質		有機合成反応	生 化 学 反 応	
			酵 素 法	発 酵 法
反 応	条件	高温、高压	常温、常圧	常温、常圧
	消費エネルギー	大	小	小
	溶媒	水、有機溶媒	水	水
	反応系	単純	単純	複雑
	触媒の毒性	有	無	無
	特異性	低	高	高
	制御	易	易～中	難
生 成 物	濃度	高	中～高	低
	副生物	少～中	少	中～多
	分離精製	易～中	易～中	難
装 置	自動化	易	易～中	難
	大規模化利益	大	少～中	少～中
	汎用性	小	少～中	大
環境との調和		難	易	易

このような特長をもつ生化学反応を利用してアミノ酸<sup>34)</sup>、ペプチド、ステロイド、アルカロイド、有機酸<sup>35)</sup> など多くの有用な光学活性化合物が既に工業的に生産されている。

酵素反応は、C-C結合生成反応に用いられることはまれで現在では官能基変換に多く利用されている。その例は、主に加水分解や酸化還元反応であり、このうち加水分解反応は、アミノ酸の工業的製法に多用されている。この方法はラセミ型アミノ酸のエステル、アミド、N-アシル誘導体を酵素で不斉加水分解したのち、分離する方法で、工業的にはN-アセチル誘導体にアシラーゼを作用させる方法が主流を占めている。一方、酸化還元反応は種々の有機化合物への利用が最も期待されている方法であるが、高価な補酵素を必要とするので、その有効な再生、再利用方法の確立が工業化の条件となる。

このように、酵素法は、有効な酵素が発見できれば酵素の活性を保持しながら種々の単位操作と組み合わせ、酵素の耐久使用と目的物、副生物などの分離および連続化などが可能になり、光学活性化合物を得る工業化プロセスとして期待が大きい。

また、微生物の一次代謝物や二次代謝物を発酵生産で得る方法により、既に各種のL-アミノ酸や抗生物質などの合成が実用化されている。安価な窒素源や炭素源を用いて光学活性化合物を得る方法として非常に有利な方法であるが微生物の探索、発酵液の濃度、精製工程の煩雑さ等が難点である。

以上のように、光学活性化合物を合成する方法は種々知られているが、これらはそれぞれに長所と短所を有している。したがって光学活性医薬品の工業的生産に際していずれの方法を採用するかは、それぞれの化合物の性質をよく把握して、全工程の合成戦略を考慮した上で判断しなければならない。

### 3. 工業的生産の条件と本研究の目的

工業的生産に際して数多くの克服すべき条件と規制があり、研究室的に可能であるということと工業的に実施可能であるということとの間の距離はあまりにも大きい<sup>36)</sup>。

実験室レベルから工業プラントへの移行は、①規模の大型化、②操作の連続化、

③構成の高度化（原料の有効利用をはかるためのリサイクル方式、熱の有効利用のためのインテグレートプラント方式、製品の有効利用をはかるためのコンビナート方式）を計って、最適な経済設計が行なわれる。

しかし、反応装置内で起る化学反応は、装置、反応、運転に係わる次の3つの支配因子が同時に成立し得ないので、スケール・アップは単に実験室スケールの最適条件を相似形的に大きくしても同じ結果は得られない。

- 1) 幾何学的因子 : 装置の代表径（筒長と筒径の比、筒表面積と容積の比）
- 2) 化学的因子 : 反応温度、反応圧、反応流体の組成、反応時間、触媒等
- 3) 化学工学的因子 : 流体の線速度、気液2相流体の場合の流量モル比等

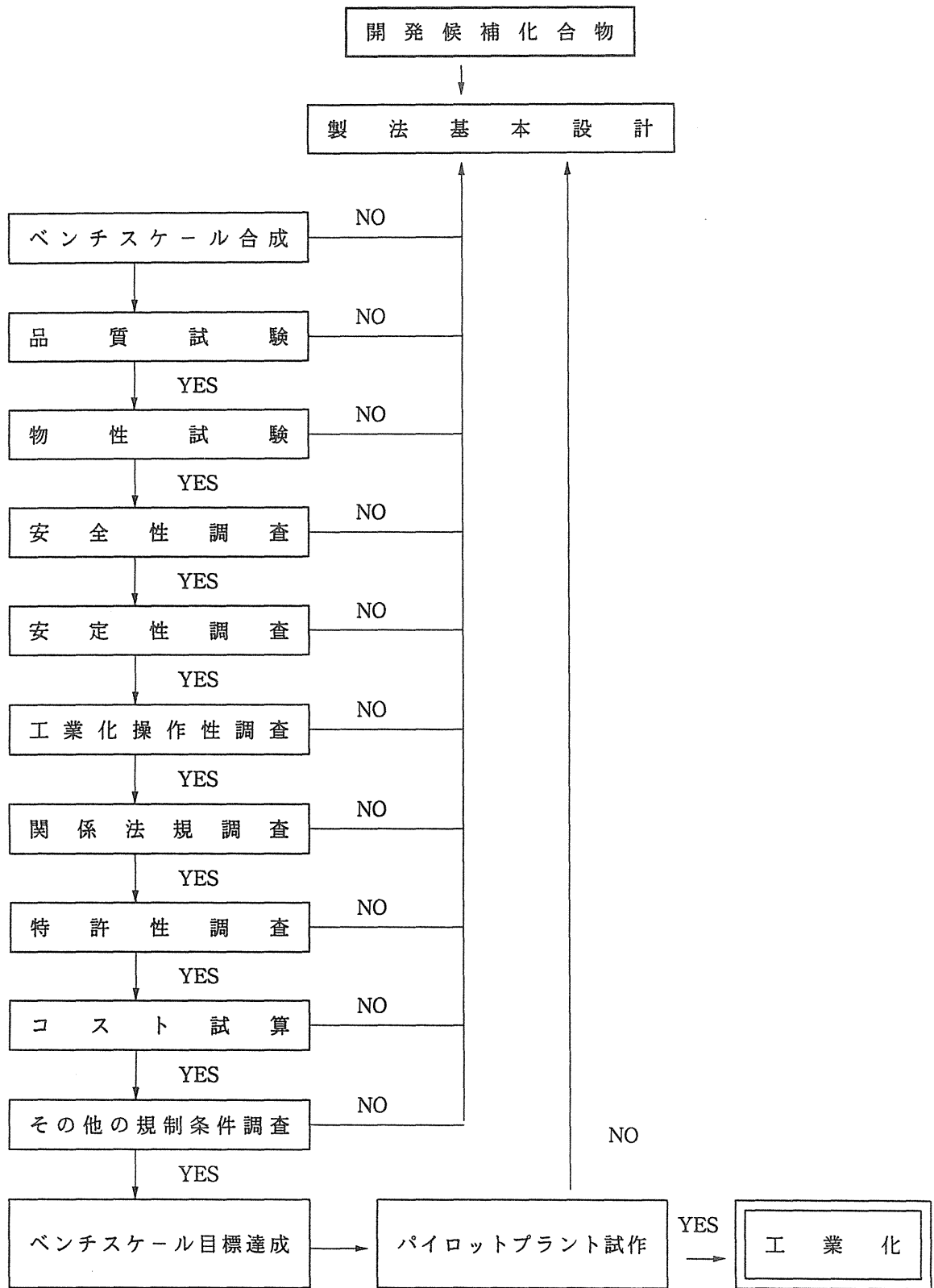
このように、工業化は装置が量的に大きくなるばかりでなく、質的關係も大幅に変わってしまう場合が多く、実験室レベルで予期しなかった問題が生じ、プロセスの大きな変更を余儀なくされることがある。

一方、医薬品の工業化に関連する法規は、表・3に示すように50種類以上もある。従って、以下の諸問題を充分考慮して図・3に示すような工業化設計を行い、満足できる条件が確立されてはじめて医薬品生産の工業化が可能となる<sup>37)</sup>。

- ・品質 : 高純度が要求され、不純物量、残留する再結晶溶媒などはppmオーダー以下に規制されている。
- ・物性 : 医薬品は一般に複雑な分子構造を有するので、工業的スケールの生産に際して実験室スケールでは全く経験しない結晶多形や種々の結晶水の問題が生じることが多い。これら結晶形の相違により、製剤操作における粉体流動性、充填性あるいはバイオアベラビリティ（生体有効性）、製剤の安定性などに違いが生じ、着目結晶形の単離法や転換法の検討が必要になってくる。
- ・安全性 : 合成に必要な原料、および中間体には爆発性や人体へ直接有害な影響を与えるものもあって、安全性の調査（危険の回避）が重要である。
- ・操作性 : コストへの重要な因子で、実験室レベルでは問題にならない反応操作が工業においては極めて大きな比重を占める事があり、反応時間や後処理に要する時間を短縮し、自動化しやすい操作条件を確立しないと実用化されない。

表・3 医薬品の工業化に関連する法規一覧

<ul style="list-style-type: none"> <li>・薬事法</li> <li>・薬剤師法</li> <li>・麻薬取締法</li> <li>・毒物及び劇物取締法</li> <li>・覚せい剤取締法</li> <li>・食品衛生法</li> <li>・農薬取締法</li> <li>・特許法</li> <li>・意匠法</li> <li>・化薬取締法</li> <li>・計量法</li> <li>・統計法</li> <li>・工場用水法</li> <li>・建築基準法</li> <li>・工場立地法</li> <li>・工場標準化法</li> <li>・化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律(化審法)</li> <li>・アルコール専売法</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・特定工場における公害防止組織の整備に関する法律</li> <li>・公害対策基本法</li> <li>・公害防止組織整備法</li> <li>・水質汚濁防止法</li> <li>・大気汚染防止法</li> <li>・騒音規制法</li> <li>・悪臭防止法</li> <li>・瀬戸内海環境保全特別措置法</li> <li>・公害健康被害補償法</li> <li>・作業環境測定法</li> <li>・廃棄物の処理及び清掃に関する法律(廃棄物処理法)</li> <li>・湖沼法</li> <li>・消防法</li> <li>・下水道法</li> <li>・河川法</li> <li>・海洋汚染及び海上災害の防止に関する法律</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・労働基準法</li> <li>・労働安全衛生法</li> <li>・じん肺法</li> <li>・放射性同位元素等による放射線障害防止法</li> <li>・医薬品副作用被害救済基金法</li> <li>・肥料取締法</li> <li>・海上運送法</li> <li>・船舶安全法</li> <li>・道路交通法</li> <li>・道路車両運送法</li> <li>・浄化槽法</li> <li>・ガス事業法</li> <li>・電気事業法</li> <li>・エネルギーの使用の合理化法</li> <li>・高圧ガス取締法</li> <li>・租税特別措置法</li> <li>・その他</li> </ul>
--	--	--



図・3 医薬原体の工業化設計<sup>37)</sup>

一方、光学活性医薬品の工業的製造にあたっては、これに加えて経済的採算性からラセミ体の場合とは全く異なった観点から下記の5条件を完全に満たすような製法設計を行なうことが必要になる。

1. キラル源として分割剤や触媒、酵素などを用いる場合はそれが安価で、汎用性があることが必須である。キラル源が高価であったり、特殊な化合物や触媒である場合には、経済的に採算が合わない上に原料としての安定した入手が困難となり、工業的規模での生産に使用できない。
2. 光学分割を行なうに当たっては、出来るだけ合成工程の初期段階、すなわち、最初の合成出発原料に出来るだけ近いラセミ体を分割対象に選ぶことが必要である。分割対象物質の選択は、光学活性医薬品の生産の成否を決定する大きな問題で、仮に、合成ルート of 最終工程で分割した場合、それまでの全工程に2倍以上の原料と時間を費し、また、2倍以上の容量の設備が必要である。
3. 得られた光学活性中間体は後の工程でラセミ化することがなく、最終目的の医薬品まで導かれるような反応工程を選択する必要がある。経済的な観点からは前記(2)の条件が不可欠であるが、以後の工程で酸、塩基を用いる強い条件があった場合などはラセミ化による光学純度の低下を招くこともあるので、強い反応条件の回避が必要になる。最終製品において対掌体の混在は不純物と見做されるので、通常医薬品として99.5%以上の光学純度が要求される。
4. 光学分割によって所望の光学活性体を得る場合、不用の対掌体がラセミ化またはエピメリ化等によって容易に再利用できることが必須である。ラセミ体の光学分割の理論収率は50%であり、経済的観点から必ず不用の対掌体は再利用しなければならない。
5. 酵素反応を利用する場合には、酵素を固定化し又安定化手段を講じて連続的な反応を可能にすることが必要である。

すなわち、光学活性医薬品の工業的生産に当たっては、前述したラセミ体医薬品の生産に比し、全く異なった観点からの製法設計が必要とされ、経済的採算に合う製法の完成には何倍かの困難が存在する。

このような背景の下、著者は不斉中心を有する医薬品は、必要な絶対配置をもつ光学活性体として開発すべきであるとの観点に立って、5種類の光学活性医薬品の工業化について実用的な製造法の開発を目的として研究を行ってきた。



本研究の結果、それぞれの方法は異なるが上記の工業化条件のすべてを満たすことができ、それらの工業的生産を可能にし、現在光学活性体として工業的に大量生産されているので、以下にそれらについて記述する。

---

#### [ 立体配置の表示 ]

本論文においては立体配置の表示は、R、S 命名法<sup>38)</sup> を用いるが、 $\alpha$ -アミノ酸については D、L 命名法を用いて表示する。

なお、一般に、 $\alpha$ -アミノ酸ではL-体がS構造に相当し、L-システインのみがR構造を有している。

#### [ 光学分割の収率 ]

本論文においては光学分割の収率は、ラセミ体から光学活性体への分割が定量的に進行した場合を50%として記載した。

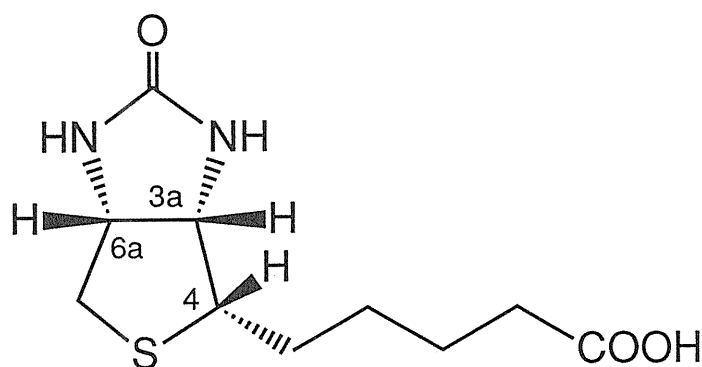
## 第1章 ビオチン合成中間体の工業的光学分割とラセミ化法

ビオチンは、動物の肉、卵黄、植物、酵母、ヒトの血中などに微量存在するビタミンB群の一種で、ビタミンHとも呼ばれる。

ビオチンは、生体内の種々の代謝経路において、補酵素として重要な役割を有し、脂肪酸合成にも関与している。したがって、これが欠乏すると、皮膚炎や脱毛症状、体重低下が起こることが知られている<sup>39)</sup>。

また、ビオチンは、動物性および植物性の飼料原料中にも広く存在している。しかしながら、飼料原料中に含有されるビオチンの生体内での利用率は、原料の種類や動物種によってかなり異なることが知られている。

このように、ビオチンは、栄養剤や医薬品としての利用だけでなく、肌荒れ防止や育毛効果といった化粧品分野、健康食品分野にも使用されている。一方、飼料用ビタミンとしての需要は、ビオチンの各動物における要求量が飼料1Kgあたり数 $\mu$ gと非常に小さいものとなっている。しかし、ここ数年の研究でビオチンの動物飼育における使用効果が認識され、繁殖成績や肉質への好影響等が明らかにされてきており、従来の水産養殖分野での使用と合わせてビオチンの世界の市場は年間20トンまで伸びている。



ビオチン (3a*S*, 4*S*, 6a*R*)

図・4

ビオチンの化学構造は、図・4に示すように3個の不斉炭素を有する。したがって、理論的には8個の立体異性体の存在が可能であるが、ビオチンはそのうちの(3a*S*, 4*S*, 6a*R*)の絶対配位を有するものである<sup>40)</sup>。すなわち、二つの5員環の結合は、シス配位をとっており、ウレイド環を構成する6個の原子は同一平面上にあり、ビオチン分子の環状部分は船形を形成している。化学合成によって得られる他の異性体には、ビタミンHとしてのビタミン活性や補酵素活性は全く認められない<sup>39)</sup>。

## 第1節 ビオチンの製法

ビオチンはその多彩な薬理作用と不斉炭素3個を含む特異な構造の故に、その合成法の研究が1940年代のHarrisの報告<sup>41) 42)</sup>を皮切りに多数行なわれてきた。

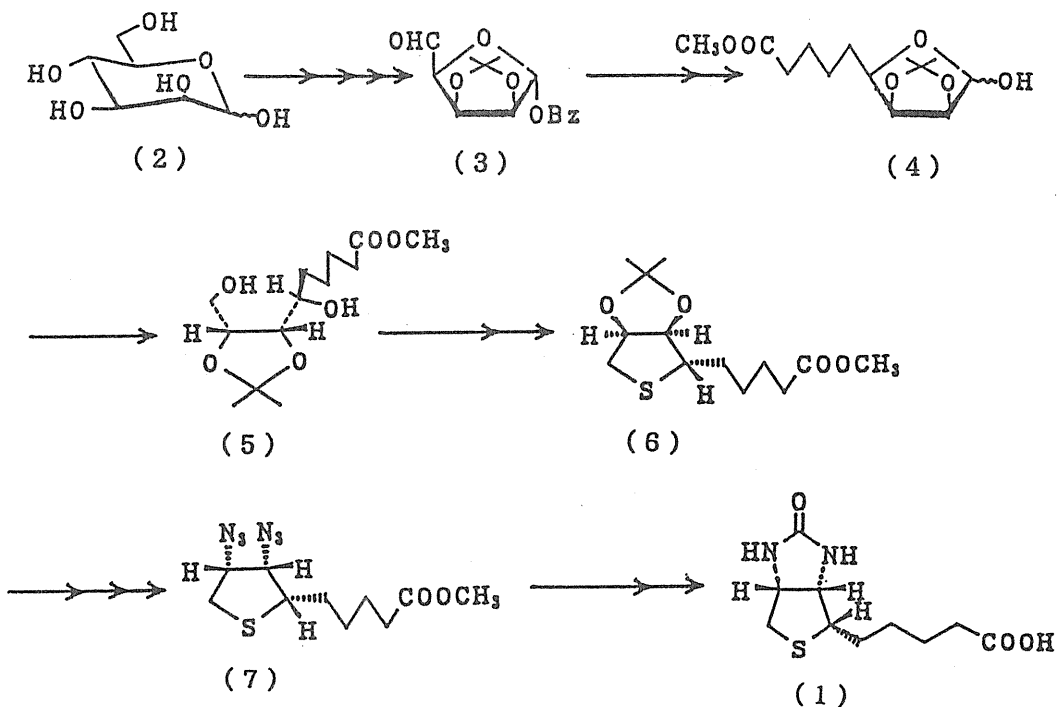
その主なものは大別すると次の3種類に要約される。

1. dl-ビオチン(あるいはその中間体)をジアステレオ選択的に合成し、光学分割によりビオチンを得る方法<sup>43) 44) 45)</sup>。
2. 光学活性化合物(d-マンノース、L-システイン)を出発原料としてそのキラリティーを利用することにより直接ビオチンを合成する方法<sup>21) 46)</sup>。
3. 安価な糖を原料として発酵法により一挙にビオチンを得る方法<sup>47)</sup>。

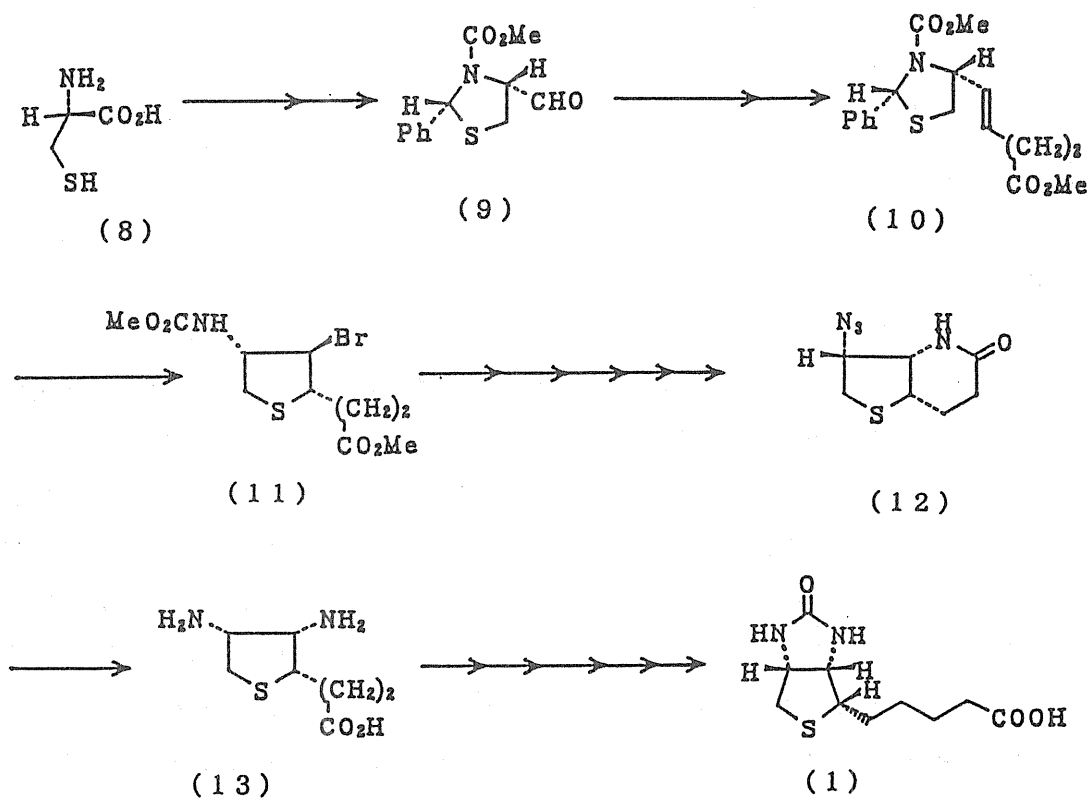
これらのうち第2の方法は、安価で入手が容易な光学活性化合物である糖やL-アミノ酸を出発原料に用いてビオチンを合成するものであり、光学分割を全く必要としない点が優れた特徴である。例えば、Ohriら<sup>46a)</sup>は図・5に示すようにd-マンノースより4行程を経てアルデヒド体(3)を得て、側鎖を導入後チオファン環を構築して6とし、S<sub>N</sub>2型反応でアジド基を導入しビオチンに導いた。

この合成法は、ビオチンのC<sub>3a</sub>, 4, 6a位の絶対配置がd-マンノースより導かれるというエレガントな方法であるが、その工程中アジド基の導入に用いられるアジ化ナトリウムはその危険性のために工業的に使用することが出来ない。更に本法は極めて工程が長く、かつ多くの高価な副原料が使用されているのも難点である。

Confaloneら<sup>46b)</sup>はL-システインを出発原料として図・6に示すようなビオチンの合成法を報告している。本法はL-システインの不斉炭素がビオチンのC<sub>6a</sub>位に取り込まれるものであるが、本法も前記D-マンノースよりの合成と全く同様の制約から工業的生産に応用することは出来ない。



図・5 d-マンノースからの合成法<sup>46a)</sup>



図・6 L-システインからの合成法<sup>46b)</sup>

また、第3の方法は、安価なD-グルコースなどを用いる発酵法である。この方法は、発酵途中で生成するビオチン類似物質により生合成酵素がフィードバック抑制を受け、また微量のビオチンによっても抑制を受けるため、微生物によるビオチンの発酵生産を可能にするためには、この制御機構の解除が必須となる<sup>48)</sup>。しかし、目的とするビオチンの蓄積量が上昇せず現在まで工業化された例がない。

これに対し、Goldbergらの開発した第1の方法<sup>43)</sup>は、図・7に示すように合成初期段階の中間体であるメゾージアミノ琥珀酸(15)がビオチン分子の二つの窒素原子のシス配位と同一の空間配置を有していること、またオレフィン体(20)の還元が立体選択的に進行することにより不用のジアステレオマーが副生しないという利点をもつ。また、安価な副原料が用いられることも工業的な利点である<sup>49)</sup>。

しかしながら彼らの方法は後述するように、光学分割が合成工程の後半の段階で行われており、かつ不用対掌体のラセミ化による再利用が行えない点が工業的製法として致命的な欠点である。

したがって著者は、ビオチンの生産には基本的にはGoldbergらの方法を用いるのが最も有望であると考え、その合成法を基礎として更に工業的に有利な方法、特にその光学分割法について詳細な検討を加え、工業的に有利な方法を完成し、ビオチンを安価に大量生産することに成功した。

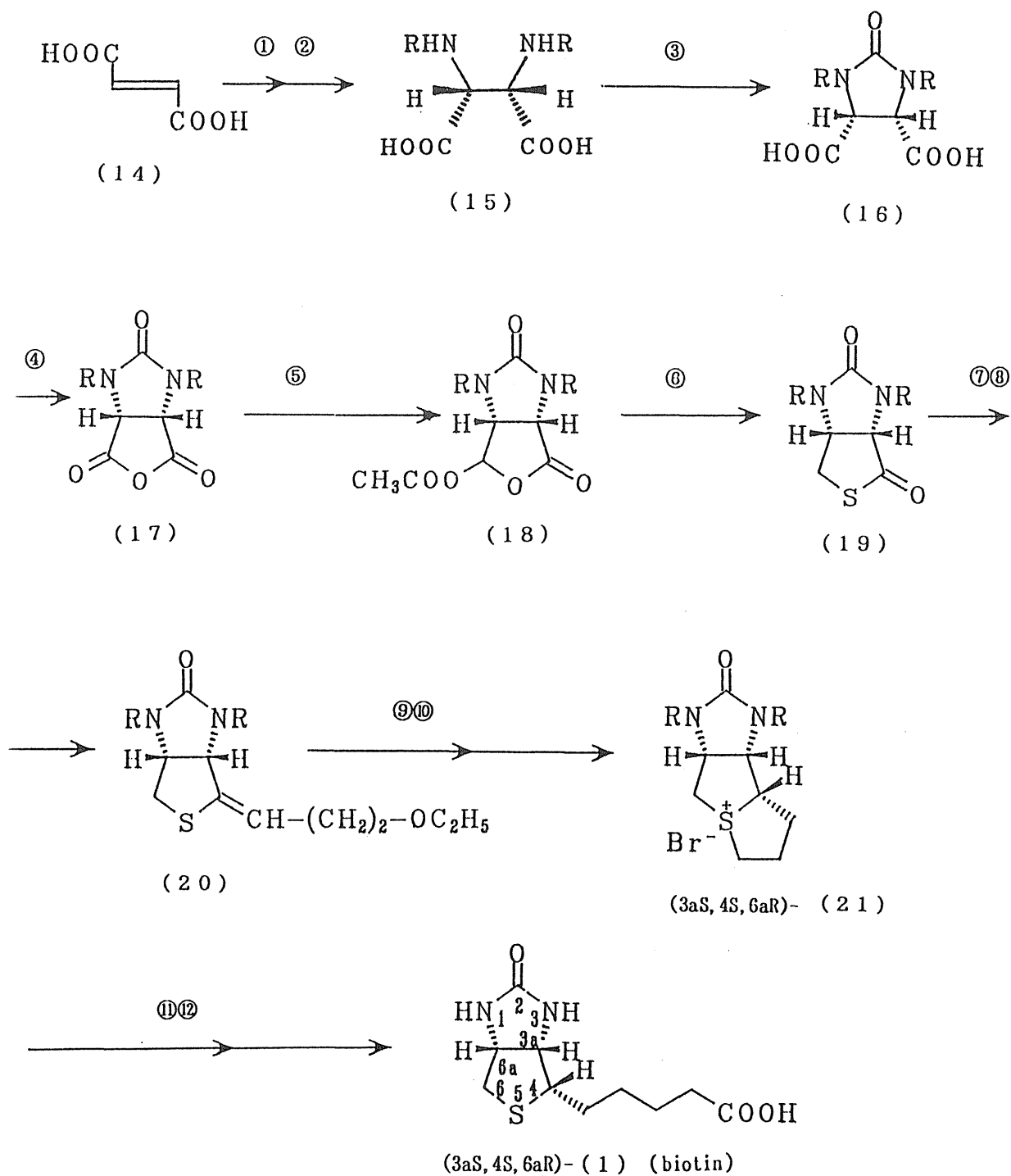
## 第2節 新しい光学分割法と不用な対掌体の再利用

### 1. 従来光学分割法

著者は、工業的なビオチンの合成法として最も有利な方法と考えられる図・7のGoldbergらの方法に着目し、その工程中でビオチンの光学活性中間体を安価に得る研究を行なった。

Goldbergらの方法の概略を次に示す。

フマル酸からメゾージベンジルアミノ琥珀酸(15)を経てシス-1,3-ベンジル-2-イミダゾリドン-4,5-ジカルボン酸(16)を得る。16の無水物(17)を還元し、無水酢酸で処理してアセトキシラクトン(18)とする。次いでチオ酢酸でチオラクトン(19)としこれに3-エトキシプロピルブロミドより製したグリニアル試薬を反応させて側鎖を導入し、得られたカルビノール体を脱水してオレフィン体(20)を得る。更に、立体選択的な還元を行なった後、臭化水素酸で処理し、ブロム体を経由してチオフアニウム塩とする。得られたラセミ型のチオフアニウム塩をd-カンファスルホン酸の銀塩により光学分割を行ない21とし、続いてジエチルマロン酸と処理した後脱炭酸して天然型ビオチン(1)に導く。



R = benzyl

- ① Br<sub>2</sub>    ② RNH<sub>2</sub>    ③ COCl<sub>2</sub>    ④ (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O    ⑤ Zn, (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH  
 ⑥ CH<sub>3</sub>COSK/HCl    ⑦ C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>MgBr    ⑧ H<sub>2</sub>/Raney-Ni    ⑨ HBr/CH<sub>3</sub>COOH  
 ⑩ d-カンファスルホン酸銀塩    ⑪ ジェチルマロン酸ナトリウム塩    ⑫ HBr

図・7 Goldbergらの合成法<sup>43)</sup>

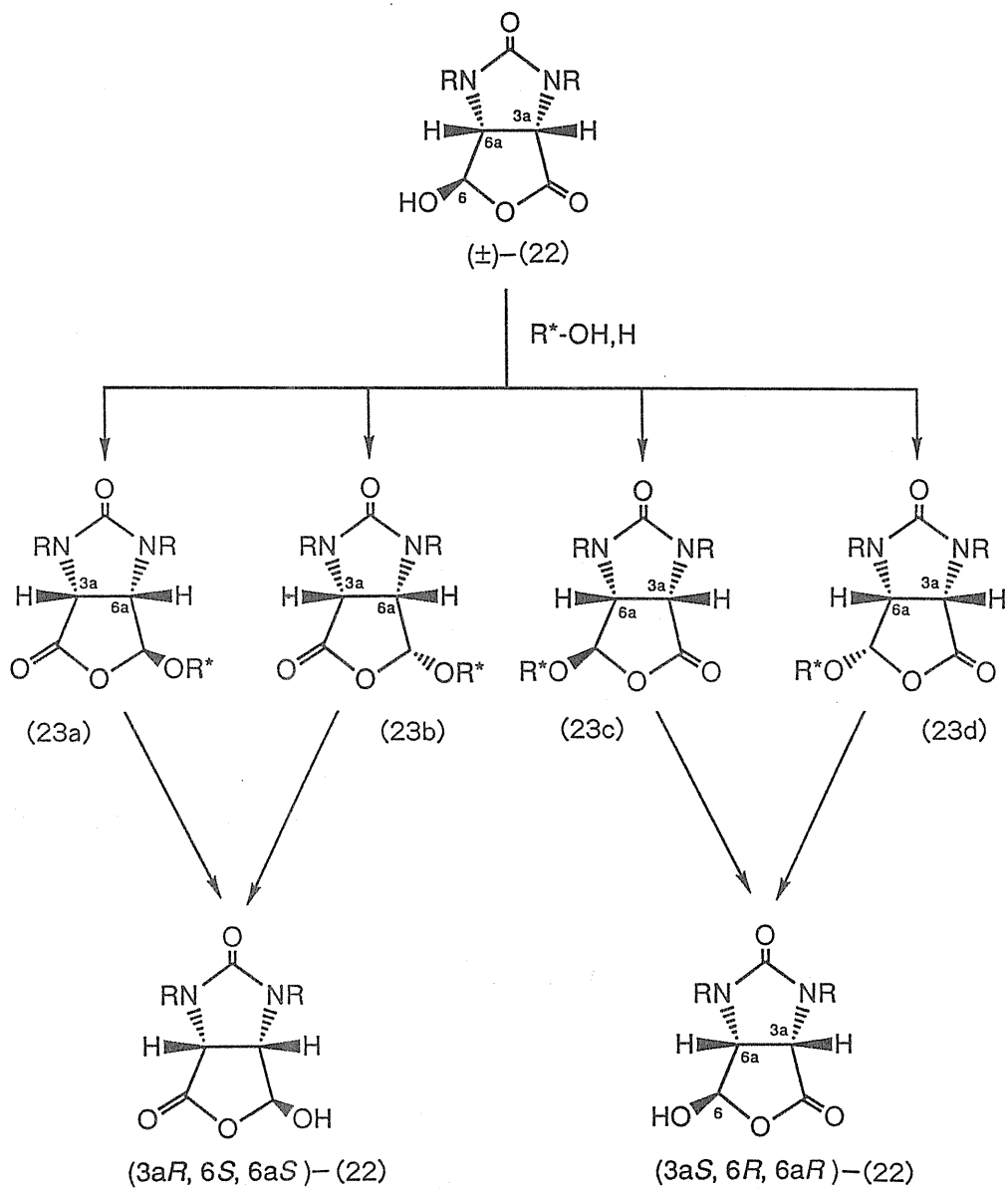
Goldbergらの方法は、その工程中の合成中間体として数多くの分割対象物が存在し、の光学分割が以下の様に試みられている。

- (I) 中間体 (チオフアニウム塩) をd-カンファスルホン酸塩として光学分割後、天然型ビオチンに導く方法<sup>50)</sup>
- (II) ラセミ型ビオチンのマンデル酸エステルを分別晶析させる方法<sup>51)</sup>
- (III) ラセミ型ビオチンをL-アルギニンで光学分割する方法<sup>42)</sup>
- (IV) アセトキシラクトン (18) を加水分解して得たヒドロキシラクトン (22) に光学活性アルコールを作用させアルコキシラクトンのジアステレオマーとして分離する方法<sup>52)</sup>
- (V) 中間体 (17) をコレステロールまたはヘキサノールによって半エステルに変換し分割する方法<sup>52)</sup>。

しかし、これらの方法はいずれも緒言に記した条件を満足するものではない。すなわち、(I)、(II)、(III)の方法は、最終工程またはそれに近い化合物を光学分割するため、それに到るまでに長工程を要して大量の原料を使用しなければならない。更に、ビオチンおよびチオフアニウム塩のラセミ化ないしはエピメリ化が出来ないため、本法では工業的生産によって最も大切な不用対掌体の再利用が不可能である。Gereckeらの報告している (IV)の方法は図・8に示すようにアルコキシラクトン体の生成に立体特異性がなく4種類のジアステレオマー (23a~d) を生じ、この混合物から所望の (3a*S*, 6a*R*) 配置の23c, dを得るには繁雑な分離操作が必要で収率が悪い。尚、23c, d は、酸処理で (3a*S*, 6*R*, 6a*R*) - 22を再生し、チオラクトン体 (19) を経てビオチンに導かれている。

一方、(V)の方法は、図・9に示すようにメゾ体である酸無水物 (17) を半エステル体に導きキラリティを発現させて光学分割する方法である。分子内に対称面をもつメゾ化合物はうまく分割基質として利用すれば、極めて有効に光学活性体の合成に利用できる<sup>10c)</sup>。山田らはメゾ化合物に光学活性化合物を作用させて得られる二つのジアステレオマーを化学変換により同じ絶対配置をもう一つの目的化合物に誘導する方法を考案し、プロスタグランジンおよびエストロンの中間体の合成に巧妙に応用している<sup>10b)</sup>。

しかしながら、Gereckeらによる無水物 (17) とコレステロールの反応は目的の (4*S*, 5*R*) - 24 (R':コレステリル)の収率が27%と低く、極めて高価なコレステロールを不斉源として用いる点で実用的でない。また、Gereckeらは無水物 (17) にシクロヘキサノールを反応させてラセミ体の (±) - 24 (R':シクロキシル)を得てこれをエフェドリンを用いて光学分割している。光学分割の収率は39%とまずまずであるが、エフェドリンも又高価であり汎用性がない。(V)の方法では不用の対掌体 (4*R*, 5*S*) - 24が容易に水解によりメゾ-ジカルボン酸 (16)に戻し再利用が可能であるが、上述のように使用される不斉源が極めて高価なために実用的でない。

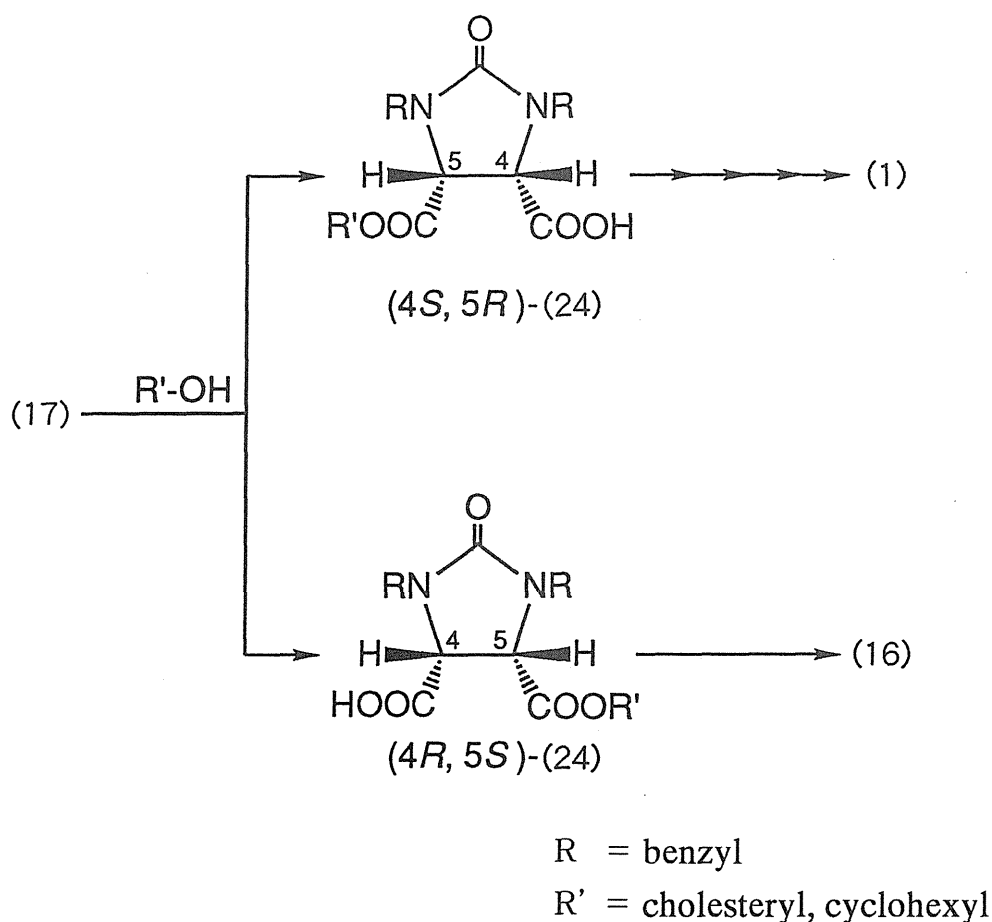


R = benzyl

R\* = optically active alcohol residue

図・8 Gereckeらの光学分割法<sup>52)</sup>



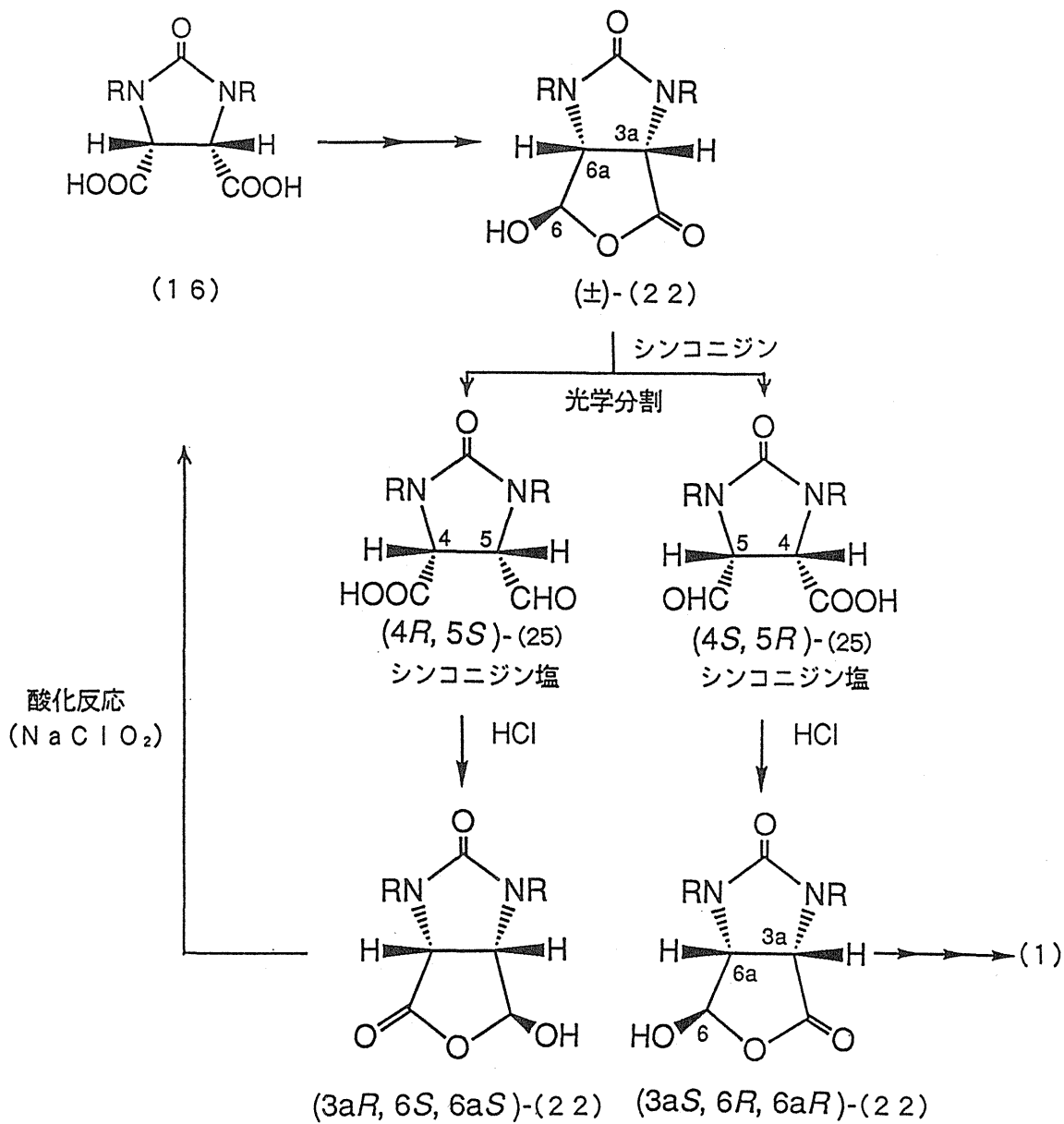


図・9 Gereckeらの半エステル法<sup>52)</sup>

## 2. ヒドロキシラクトン体 (22) の新しい光学分割法と不用の対掌体の再利用

著者は、Goldbergらの方法によるビオチンの合成工程において、工業的に実施可能な分割対象化合物を種々検討した結果、アセトキシラクトン (18) を水解して得られるヒドロキシラクトン [(±) - 22] が反応工程の比較的初期の中間体であり、かつ分子の対称性にも富み不用異性体の再利用も容易に行なえると考えてこのものの光学分割を検討した。その結果、(±) - 22 を直接光学活性アミンを用いて容易に光学分割することに成功した。

また、その結果得られる不用の対掌体 [(3aR, 6S, 6aS) - 22] の再利用について検討を行ない図・10のようなルートの工業的方法を開発することができた。



R = benzyl

図・10 ビオチン合成中間体の新しい光学分割と不用の対掌体の再利用

## 2-1. ヒドロキシラクトン体のアルカロイドによる光学分割

著者が光学分割の対象に選んだヒドロキシラクトン [(±) - 22] は一見その構造中に酸性官能基も塩基性官能基も有していないので光学分割には不適當な化合物と考えられる。

しかし、著者は、22は構造上アルデヒドカルボン酸 (25) と化学的に等価であると考え、光学活性塩基を用いることによって22は容易に開環して25の2種類のジアステレオマー塩を生成させることが可能であろうと予測した。

このような可能性をまず予試験的にNMRスペクトルを用いて検討した。(±) - 22と当モルのシンコニジンの混合物のNMRは、22に見られたC<sub>6</sub>-Hの特徴的なシグナルが消失して2種類のジアステレオマーの混合物と考えられるスペクトルを示し、特にδ : 8.97および9.03ppmにアルデヒドプロトンに帰属される2組のピークが観察された。このようにアルデヒドカルボン酸 (25) の2種類のジアステレオマー塩の生成が示唆されたので(±) - 22とシンコニジンの反応を検討した。

その結果、(±) - 22の含水アセトン溶液に1/2モルのシンコニジンを加えると、難溶性の塩として(4*S*, 5*R*) - 25のシンコニジン塩が45%の収率で得られた。このものはIRスペクトルにおいて、1691 cm<sup>-1</sup> (CHO及びイミダゾリジノン) および1618 cm<sup>-1</sup> (カルボン酸塩) に吸収を示し、質量分析 (FAB) では、m/z: 295と339にそれぞれシンコニジンおよびアルデヒドカルボン酸 (25) の [M + H]<sup>+</sup> が認められた。またNMRスペクトルは、δ : 8.97ppmにアルデヒド基のプロトンのピークを示し、予期の構造であることが確認された。また、NMRスペクトルにおいて、もう一方のジアステレオマーに由来するシグナルは全く認められないことから、その光学純度は98%以上の高いものと考えられる。このものを酸で処理すると、容易に閉環して所望の(3*aS*, 6*R*, 6*aR*) - 22が(±) - 22より通算42%という高収率で得られた。一方、(4*S*, 5*R*) - 25のシンコニジン塩を得た母液からは対掌体である(4*R*, 5*S*) - 25が36.5%の収率で回収された。

以上の結果から、著者の予期したように22に直接光学活性塩基を反応させることにより22の効率的な新しい光学分割法を完成することができた。ここに得られた(3*aS*, 6*R*, 6*aR*) - 22をGereckeら<sup>52)</sup>の方法に従い目的のビオチンに導いたところ、最終品の光学純度も極めて高く(3*aS*, 6*R*, 6*aR*) - 22以降のルートにおいてはラセミ化の起こらないことが明らかになった。

この方法は分割剤を半モル使用するので、不用の対掌体は塩を形成せず遊離の型で存在し、分割剤の回収が容易でありそのロスも少なく工業的に極めて有利な方法である。また、分割剤としてキニンを用いても収率30%で(±) - 22の光学分割に成功した。一方、同じキナ系アルカロイドのシンコニン、キニジン、あるいはブルシン、ストリキニン、エフェドリンなどの他の分割剤についても検討したが、いずれも好結果は得られなかった。

## 2-2. ヒドロキシラクトン体のD-グルカミン誘導体による光学分割

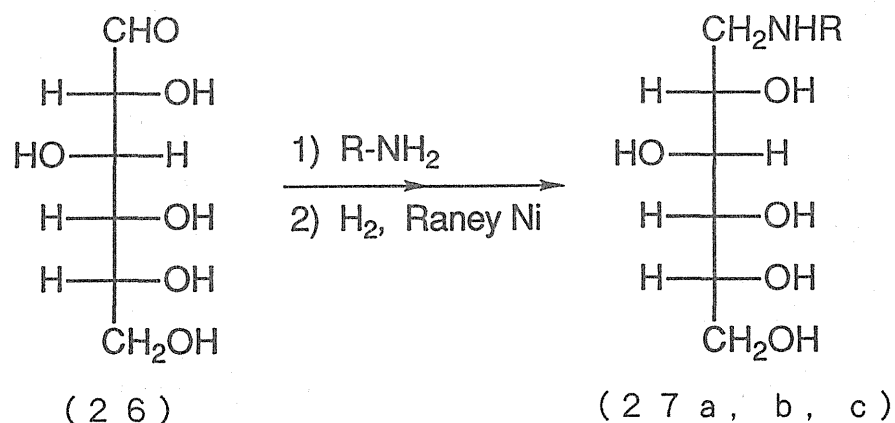
前項で述べたように、著者はシンコニジンによるヒドロキシラクトン [(±) - 22] の新しい効率的な光学分割に成功した。

しかし、シンコニジンのような天然物に由来する分割剤は、高価でありしかも大量の入手に限界があり、またその中に不純物として他のアルカロイドが混入し高純度品が入手し難いなどの欠点がある。

そこで、著者はビオチンの大量生産に更に有利な分割剤の探索を行なった結果、グルコースから容易に得られるD-グルカミン誘導体が工業化条件に見合う有利な光学分割剤であることを見出した。

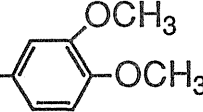
図・11に示したように、HoltonやKaganら<sup>53)</sup>の方法に従いグルコース(26)と各種アミン類をメタノール中還流下反応させ、得られる Schiff 塩基をラネーニッケルと水素で還元し、高収率で各種のN-置換グルカミン誘導体(27)を得た。

これらのうち、n-ブチルアミン、γ-ジメチルアミノプロピルアミン、3,4-ジメトキシフェネチルアミンから得られたD-グルカミン誘導体(27a-c)がヒドロキシラクトン [(±) - 22] の光学分割に好結果を与えることが判明した。



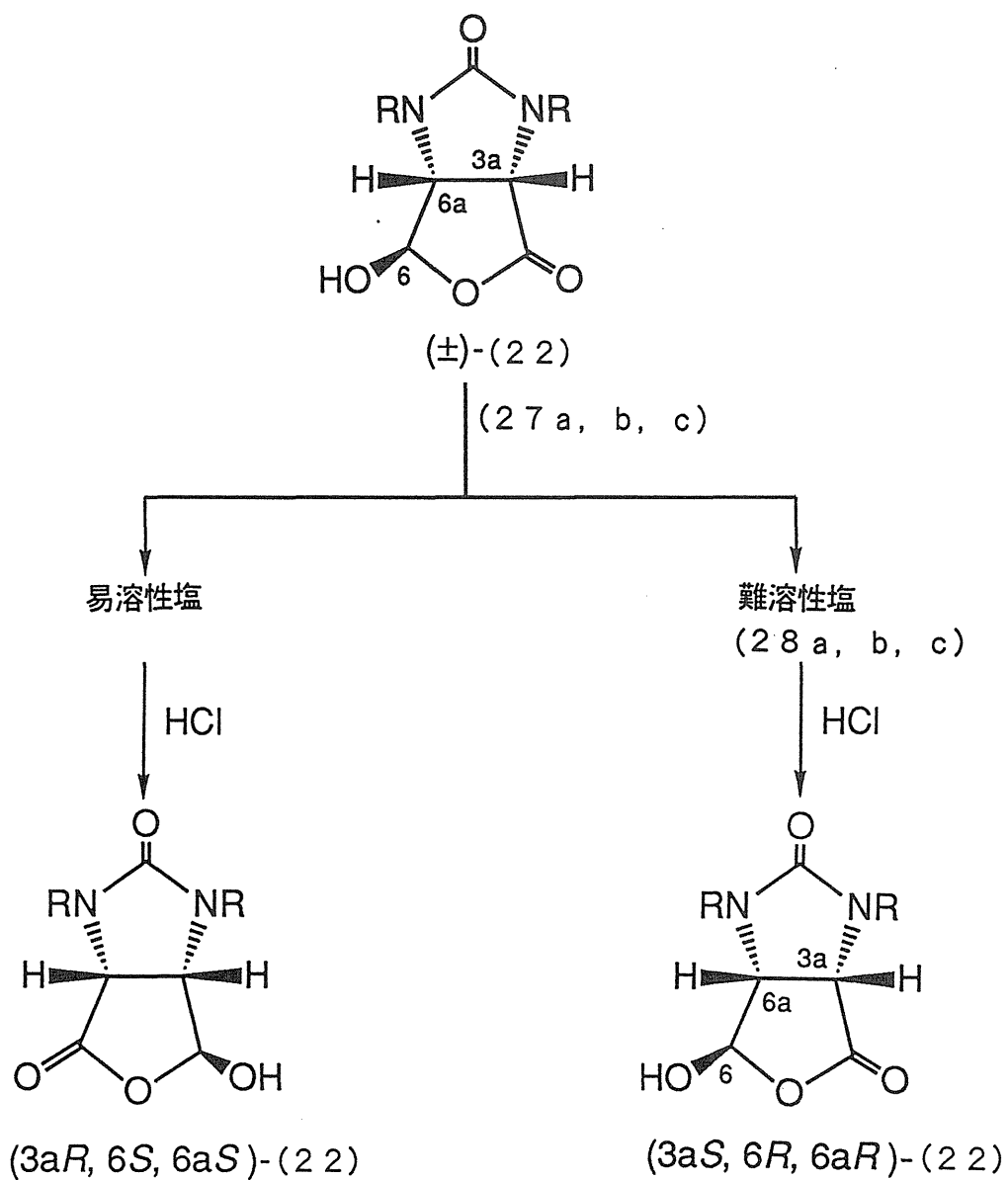
(27a) R=n-Bu

(27b) R=-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

(27c) R=-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>--OCH<sub>3</sub>

図・11 グルカミン誘導体の合成法<sup>53)</sup>

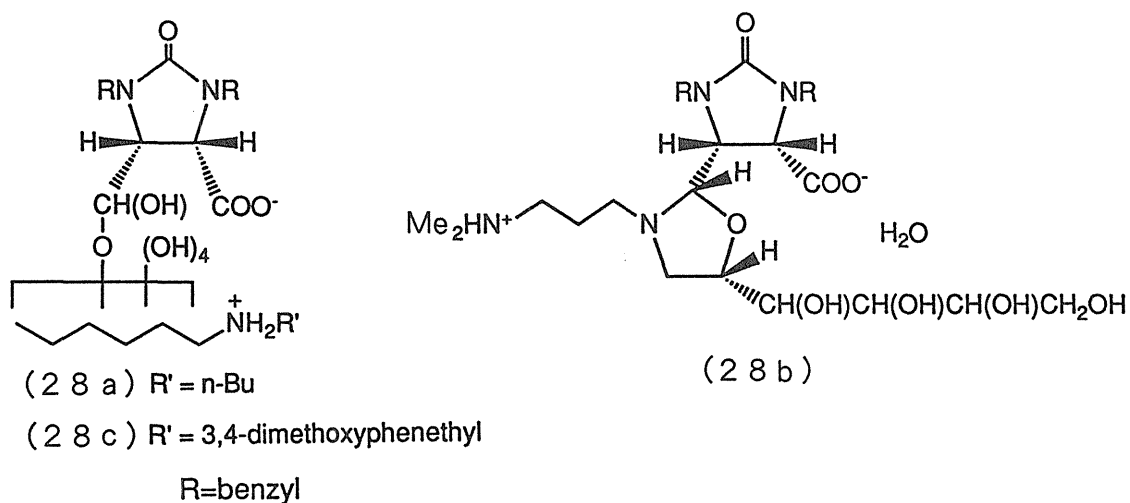
すなわち、27a, b, cと (±) - 22を反応させると、図・12に示すように容易に結晶性の塩 (28a, b, c) がそれぞれ46%、44%、43.5%の高収率で得られた。



図・12 ヒドロキシラクトン体のD-グルカミン誘導体による光学分割

28a, b, c は、いずれも酸処理により容易に定量的収率で目的の光学活性ヒドロキシラクトン (3a *S*, 6*R*, 6a *R*) - 22 を与えた。また、母液からは同じく酸処理により容易に対掌体 (3a *R*, 6*S*, 6a *S*) - 22 が高収率で回収された。

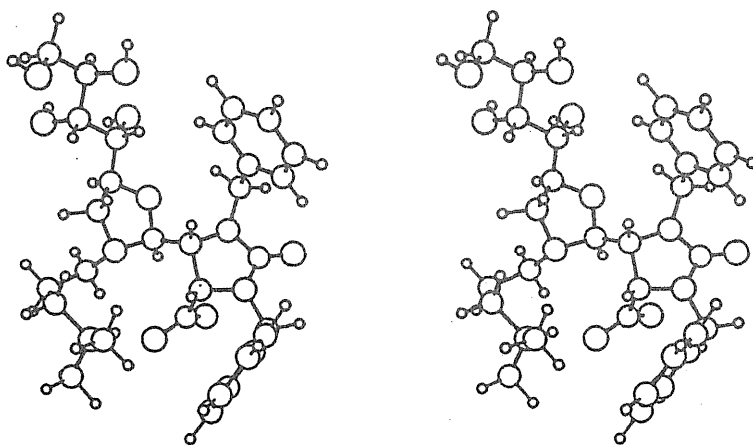
ここに得られた D-グルカミン誘導体の塩 (28a, b, c) の構造は、各種の機器分析の結果から先に述べたシンコニジン塩の場合のようなアルデヒドカルボン酸 (25) の単なる塩ではないことが判明した。



図・13 グルカミン塩の構造

まず、28bは質量分析 (FAB) において  $m/z$  587  $[(M+H)^+]$  が認められることから、25と27bの単なる塩ではなく両者が脱水を伴って結合した化合物であることが示唆された。また、IRおよびNMRスペクトルにおいてアルデヒド基の存在が否定され、後者においては  $\delta$  4.63ppm に  $-O-CH-O-$  又は  $-O-CH-N$  の構造に帰属しうるプロトンのピークが認められ、これらの部分構造の存在が推定された。28bの構造は、X線結晶解析により25のアルデヒド基とグルカミンのアミノ基および水酸基が脱水縮合し、図・13に示すようにオキサゾリジン環を生成した化合物であることが確定した。又、この化合物のイミダゾリジン環の4,5位が所望の絶対配置 (4*S*, 5*R*) を有することもあわせて確認された。

一方、28a および 28c は質量分析 (FAB) でそれぞれ  $m/z$  576 および 684 に  $[(M + H)^+]$  を示し、アルデヒドカルボン酸 (25) と 27a,c が共有結合で結合した化合物であることを示している。両者ともアルデヒド基の存在が IR、および NMR スペクトルで否定されることから、図・13 に示すようにグルカミンのいずれかの水酸基がアルデヒド基とヘミアセタールを形成しているものと推定される。なお、28a,c は溶液中容易に異性化して複雑な NMR スペクトルを与えることと、X 線結晶解析に適した結晶が得られないことからこれ以上の構造検討は行なうことが出来なかった。いずれにしても、ヒドロキシラクトン体 [(±) - 22] の光学分割が安価な不斉源である D-グルカミン誘導体を用いても容易に行なえることが明らかになった。D-グルカミン誘導体 (27a-c) のうち、特に N-ブチル誘導体 (27a) は極めて安価な原料を用いて容易に合成が可能であり、これを用いた (±) - 22 の分割収率も 46% と最も高く、シンコニジンに代わって工業的生産に使用できる優れた分割剤となった。



図・14 28b の X 線結晶解析による立体図

## 2-3. 不用な対掌体の酸化による再利用

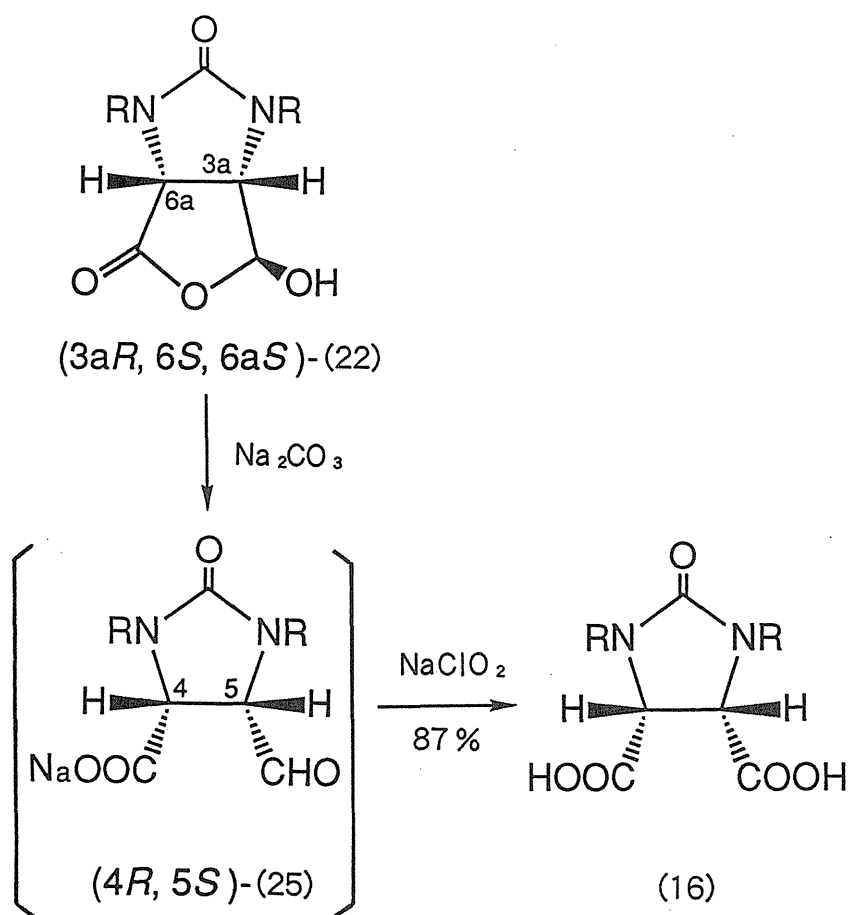
次に著者はヒドロキシラクトン [(±) - 22] の光学分割の際に回収される不用の対掌体 [(3*aR*, 6*S*, 6*aS*) - 22] の再利用について検討を加えた。本化合物は容易に開環してアルデヒドカルボン酸 [(4*R*, 5*S*) - 25] となるので、このものの再利用を考えれば良いことになるが、25は2個の不斉炭素を有するので、ラセミ化およびエピメリ化による再利用は困難と考えられる。

そこで著者は、図・15に示すようにこのものの4位のアルデヒド基を酸化して4、5-ジカルボン酸 (16) として前工程に戻して再利用する方法を検討することにした。このジカルボン酸は分子内に2個の不斉炭素を有しているにもかかわらず、メゾ酒石酸と同じように分子内に対称面をもつメゾ化合物である。

Gereckeらは (3*aR*, 6*S*, 6*aS*) - 22が無水クロム酸によりメゾ-ジカルボン酸 (16) に酸化されることを認めている。しかしながら、その反応は60時間という長時間を要し収率もわずか49%に過ぎない。しかも無水クロム酸は、公害の問題で工業的な使用が禁止されている。そこで著者は、メゾ-ジカルボン酸 (16) への酸化反応を種々検討した。アルカリの存在下 (3*aR*, 6*S*, 6*aS*) - 22は、臭素あるいは硝酸銀によってそれぞれ82%および59%の収率でジカルボン酸 (16) に酸化された。しかしながら、これらの方法は操作性や試薬の価格の面で工業的生産に用いることは困難である。

近年、Plauneらによって亜塩素酸ナトリウム (NaClO<sub>2</sub>) がアルデヒド基をカルボン酸に酸化する緩和な酸化剤であることが報告されている<sup>54)</sup>。亜塩素酸ナトリウムは繊維の漂白剤として広く用いられているもので、塩素酸ナトリウム (NaClO<sub>3</sub>) に塩酸と亜鉛などの還元剤を加え二酸化塩素 (ClO<sub>2</sub>) を発生させ、これを苛性ソーダ水溶液でトラップする方法によって大量に生産されており、極めて安価に入手が可能である。そこで、亜塩素酸ナトリウムによる (3*aR*, 6*S*, 6*aS*) - 22の酸化を検討した結果、炭酸ナトリウム水溶液と酢酸エチルエステルの混合溶媒中室温で容易に酸化が進行し、メゾ-ジカルボン酸 (16) を87%という高収率で得ることが出来た。ここに得られた16は図・10に示す通り前工程に組み入れられ反復して使用出来るので、不用な対掌体の工業的な再利用法を確立することができた。



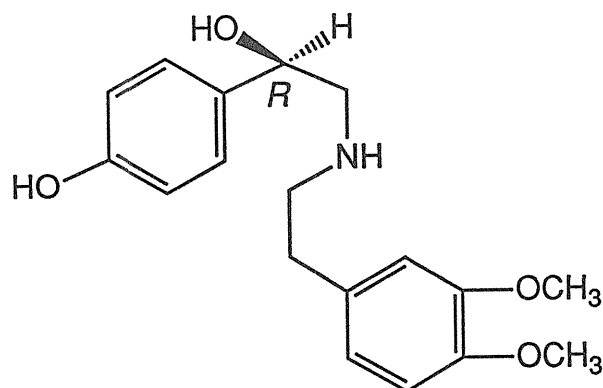


図・15 ヒドロキシラクトンの酸化反応

以上、著者は天然型光学活性ビオチンの生産において合成工程の初期の中間体であり、かつ分子の対称性の良いヒドロキシラクトン [(±) - 22] を光学分割の対象に選ぶことによって、これを安価な不斉源である N-ブチル-D-グルカミンを用いて直接光学分割する新しい方法を確立でき、又不用の対掌体をメゾーシカルボン酸 (16) に導き工業的方法で再利用することに成功した。これによって、ビオチンの工業的生産が可能になった。

## 第2章 フェニルエタノールアミン誘導体（デノパミン）の合成中間体の工業的ラセミ化及びエピメリ化法

デノパミン (29) は、ジギタリス以来初めて開発された経口強心薬であり、慢性心不全に対して経口で長期投与が可能な治療剤として世界で最初に承認された薬剤である<sup>55)</sup>。経口強心薬としては、現在種々のジギタリス配糖体が主として使用されており、うっ血性心不全の治療剤として欠くことのできない薬剤となっている。しかし、ジギタリスは心房細動時の脈を遅くする作用以外に効果がなく、更に不整脈、頭痛、嘔吐等の副作用が強く、そのため臨床の場からジギタリスに代わる強力で、しかも安全域の広い経口強心薬の開発が求められていた。田辺製薬株式会社において、強心剤としての多数のフェニルエタノールアミン誘導体の研究が進められ、強力で経口投与が可能であり、しかも安全域の広い新規化合物としてデノパミンが見出された<sup>55)</sup>。



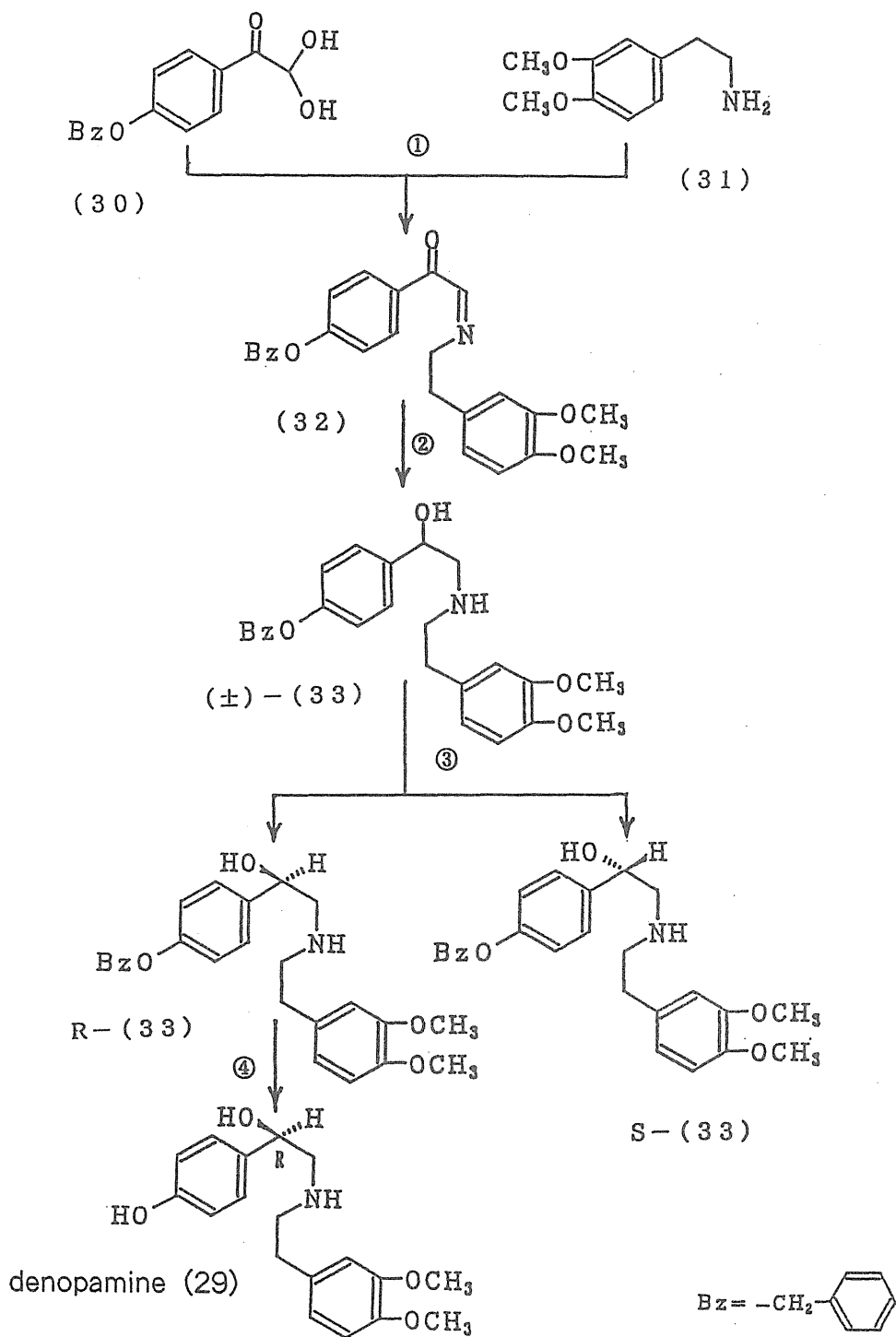
デノパミン (29)

図・16

デノパミンの構造は、図・16に示すようにその構造中に不斉炭素1個を有するので、2個の光学異性体が存在する。デノパミンはこのうちのR体であり、S異性体には強心作用が殆ど認められない<sup>56)</sup>。

### 第1節 デノパミンの合成

デノパミンの製造は、図・17に示す合成経路により行われる<sup>57)</sup>。



- 1) DMSO    2)  $\text{NaBH}_4 / \text{CH}_3\text{OH}$     3) 光学分割: N-Acetyl-D-phenylalanine  
 4)  $\text{H}_2/\text{Pd-C}, \text{NH}_3$

図・17 デノパミンの合成法<sup>57)</sup>

池崎ら<sup>57)</sup>はこの合成経路において、デノパミンの前駆体である1-(p-ベンジルオキシフェニル)-2-[(3,4-ジメトキシフェネチル)アミノ]エタノール[(±)-33]をN-アセチル-D-フェニルアラニンを用いて光学分割し得られたR-(33)をデノパミンに導いている。

著者は、デノパミンの工業的生産にあたって不可欠な不用の光学異性体[S-(33)]の再利用の検討に着手した。

## 第2節 ラセミ化による不用対掌体の再利用

著者は光学分割の際に得られる不用の対掌体[S-(33)]のラセミ化による再利用法をまず検討した。

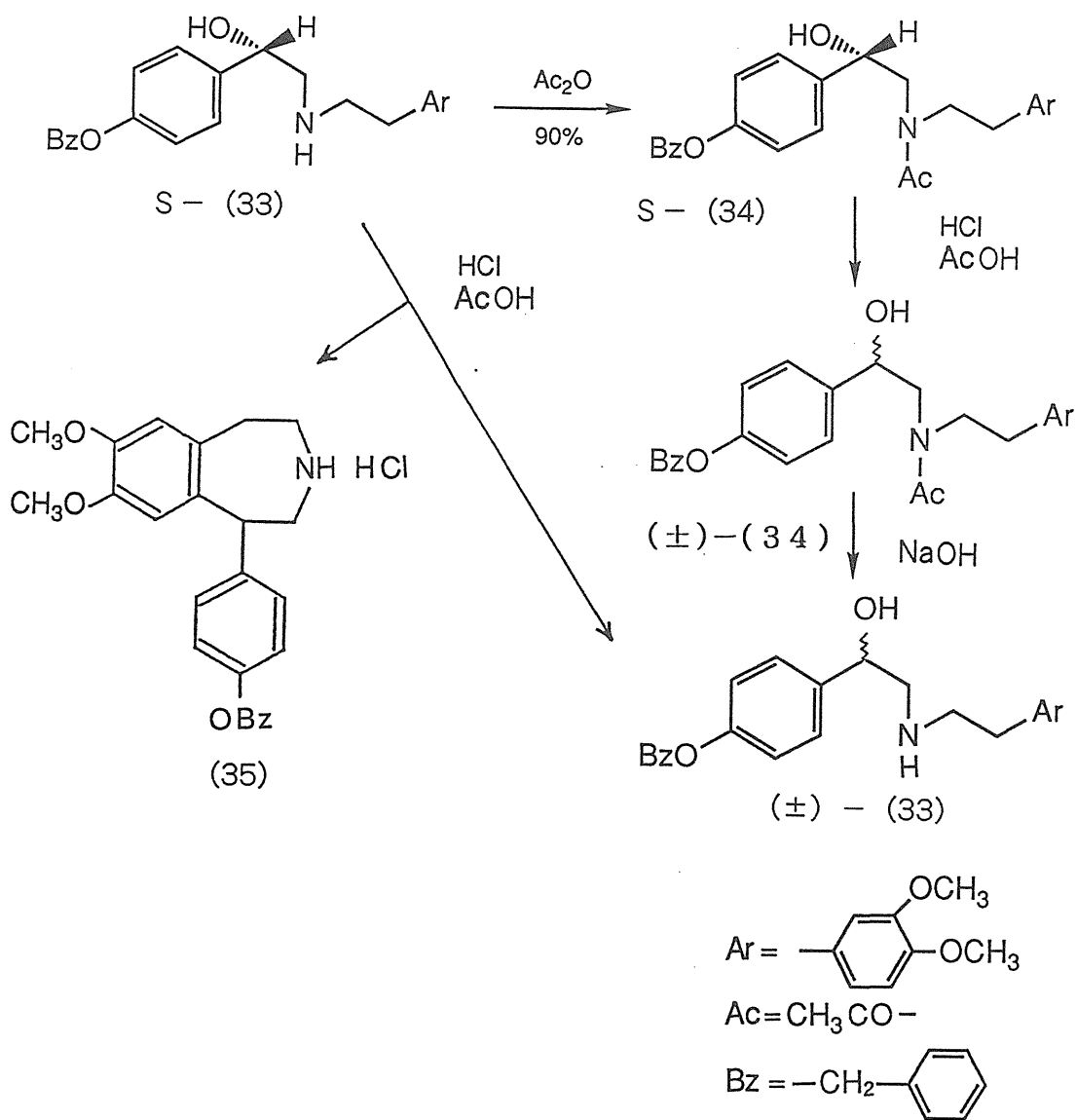
33の不斉炭素は、水酸基をもち、またベンジル位にある。一般に、このような化合物は酸性条件下でのラセミ化が可能であることが知られている<sup>58)</sup>。そこで、図・18に示すような有機酸および無機酸を用いるS-33のラセミ化を検討した。

このラセミ化の反応機構は、S-33を水溶液中プロトン酸で処理するとベンジル位カルボニウムイオンが生成し、続いてS<sub>N</sub>1型の水和反応が起こって、ラセミ化が進行するものと考えられる。

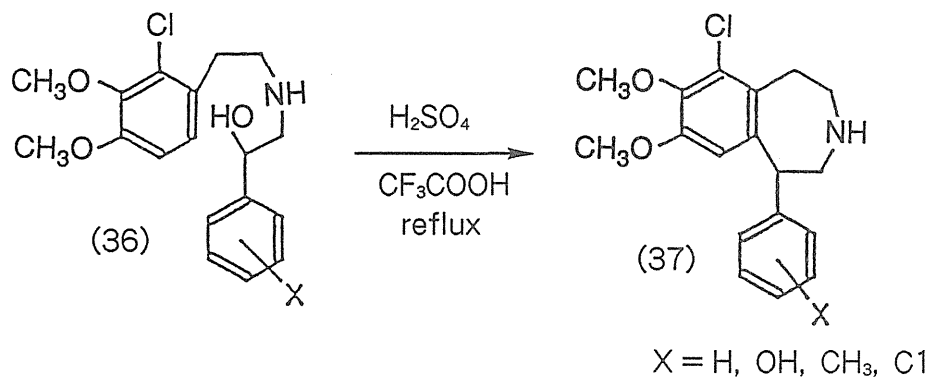
Pfeifferらは図・19に示すようにフェニルエタノールアミン誘導体(36)が苛酷な酸処理によって容易にベンズアゼピン誘導体(37)へ閉環することを報告している<sup>59)</sup>。従って、著者はS-33のラセミ化を出来るだけ緩和な条件で行なうべく反応温度、プロトン酸の有無、溶媒としての低級脂肪酸の影響について検討した。その結果、S-33を85%酢酸中、2.2当量の塩酸の存在下50℃に8時間加熱するという条件で目的のラセミ体[(±)-33]を60%の収率で得ることが出来た。しかしながら、この際閉環したベンズアゼピン誘導体(35)も20%の収率で副生した。溶媒を酢酸から蟻酸に変えると、一方的に閉環体(35)のみが83%の収率で得られた。35への閉環を避け、ラセミ化のみを進行させることを目的に種々条件を検討したが目的を達することは出来なかった。このように、S-33を直接ラセミ化して再利用する方法は閉環反応との競合のために好結果を得ることが出来なかった。

一方、S-33をN-アセチル体(S-34)に導き、これを塩酸の存在下、80%酢酸中加熱し、次いでアルカリ加水分解を行なうとラセミ体[(±)-33]を通算86%の収率で得ることが出来た。

このように、N-アセチル体を經由することにより不用な対掌体であるS-33のラセミ化に成功したが、この方法では得られたラセミ体を再び光学分割しなければならず、次節に述べるようにS-33をエピメリ化によって必要なR-33に直接変換することを検討した。



図・18 ラセミ化による不用の対掌体の再利用



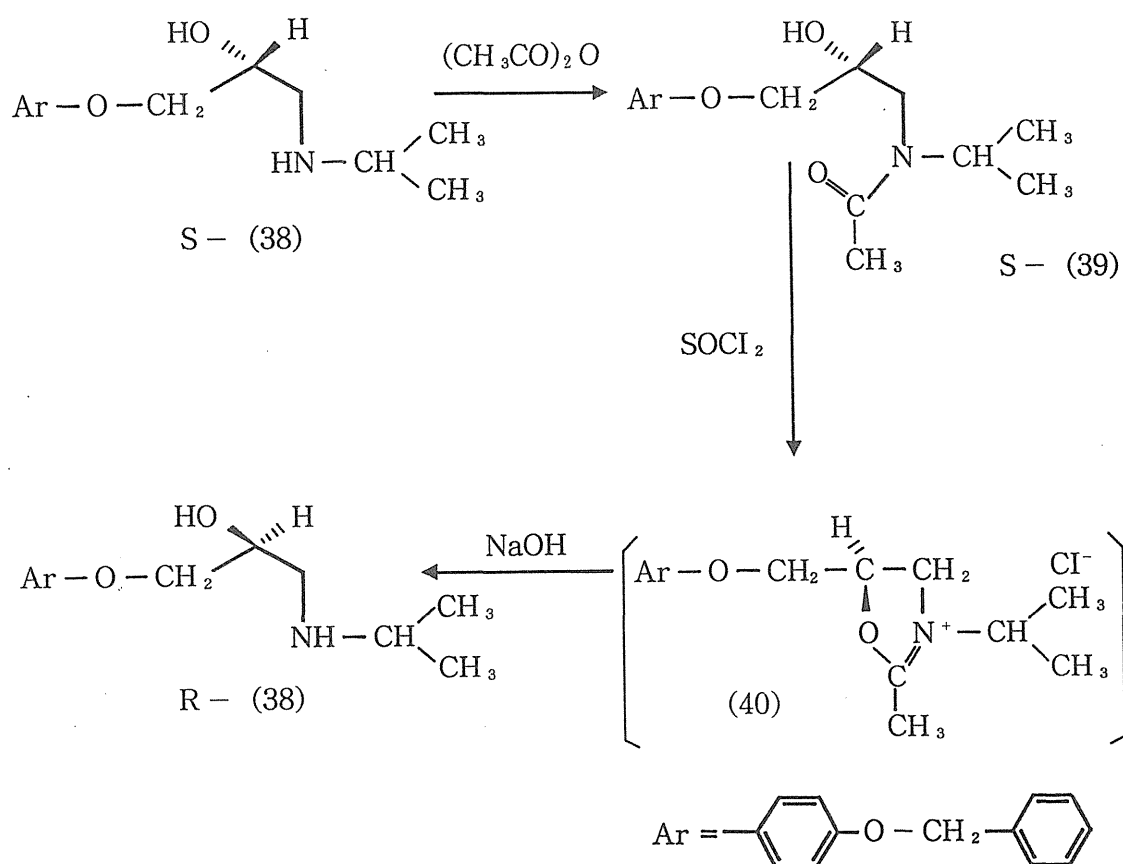
図・19

### 第3節 エピメリ化による不用な対掌体の再利用

前節において、不用な対掌体 (*S*-33) の再利用法とし *N*-アセチル体に導きラセミ化する方法を見出したが、*S*-33 を直接必要な *R*-33 に転換できれば再利用として一層有利であることは明らかである。

光学活性な  $\beta$ -アミノアルコール類の水酸基の立体配置を反転させる方法としては、*N*-アシル誘導体としたのち無水酢酸と濃硫酸で処理して *N*-アセチル基の  $S_N2$  型攻撃によって反転したオキサゾリン誘導体を生成させ、これを水解する方法が知られている<sup>61)</sup>。しかし、この方法によって得られた反転生成物の光学純度は、わずか 65% ee であり、これは苛酷な反応条件による影響と考えられる。

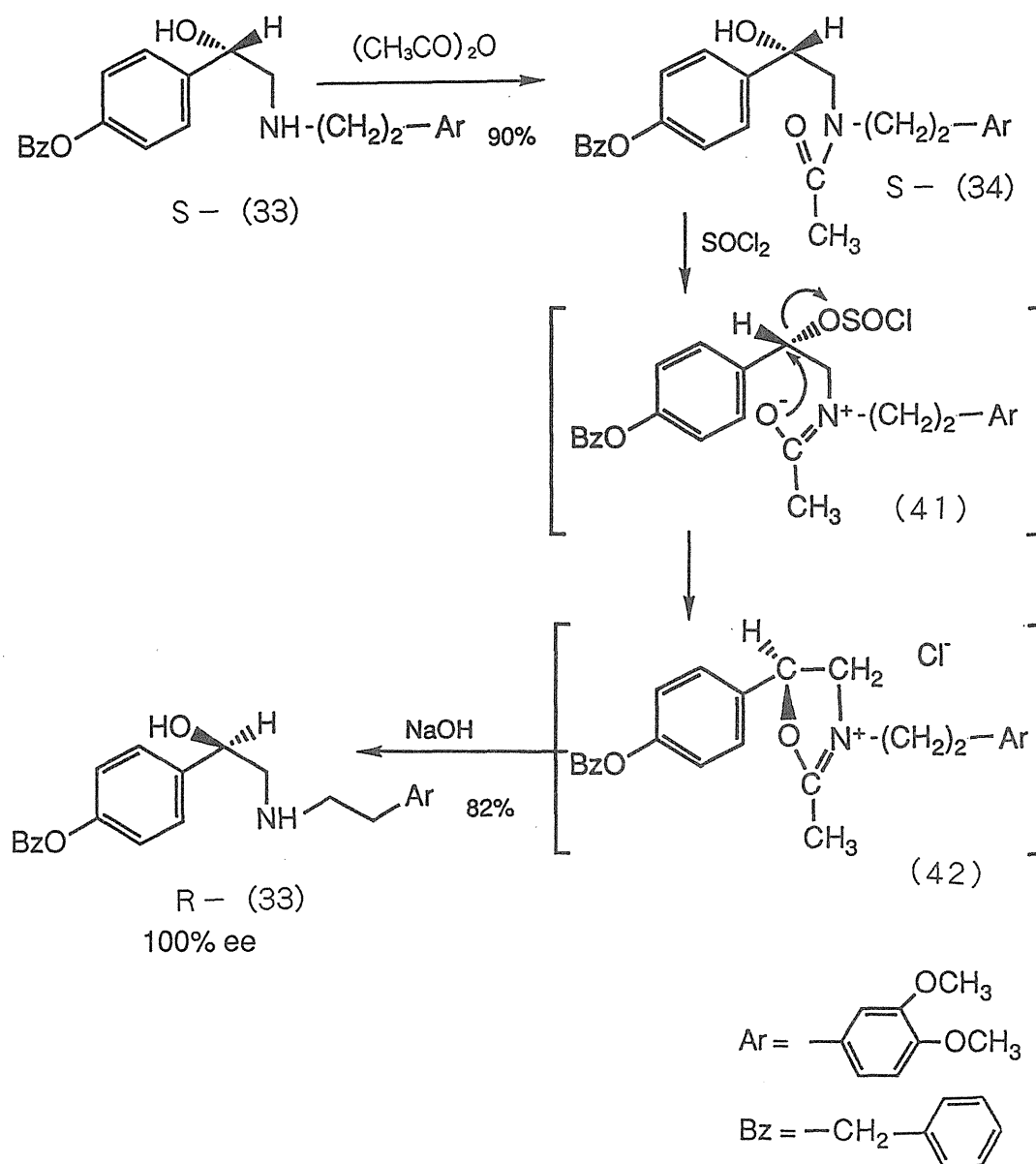
近年、Zergenyi<sup>63)</sup> は光学活性なアリルオキシプロパノールアミン誘導体 (*S*-38) を *N*-アセチル体とし、図・20 に示すように、塩化チオニルで処理した後、加水分解することにより、光学純度 87% の反転成績体 (*R*-38) を得ている。



図・20 Zergenyiのエピメリ化法<sup>63)</sup>

そこで著者は、このような反転反応をデノパミン合成時の不用な対掌体 (*S*-33) に利用することを試み、種々の条件を検討した結果、図・21 に示すように高収率で高品質の反転成績体を得る方法を確立した。

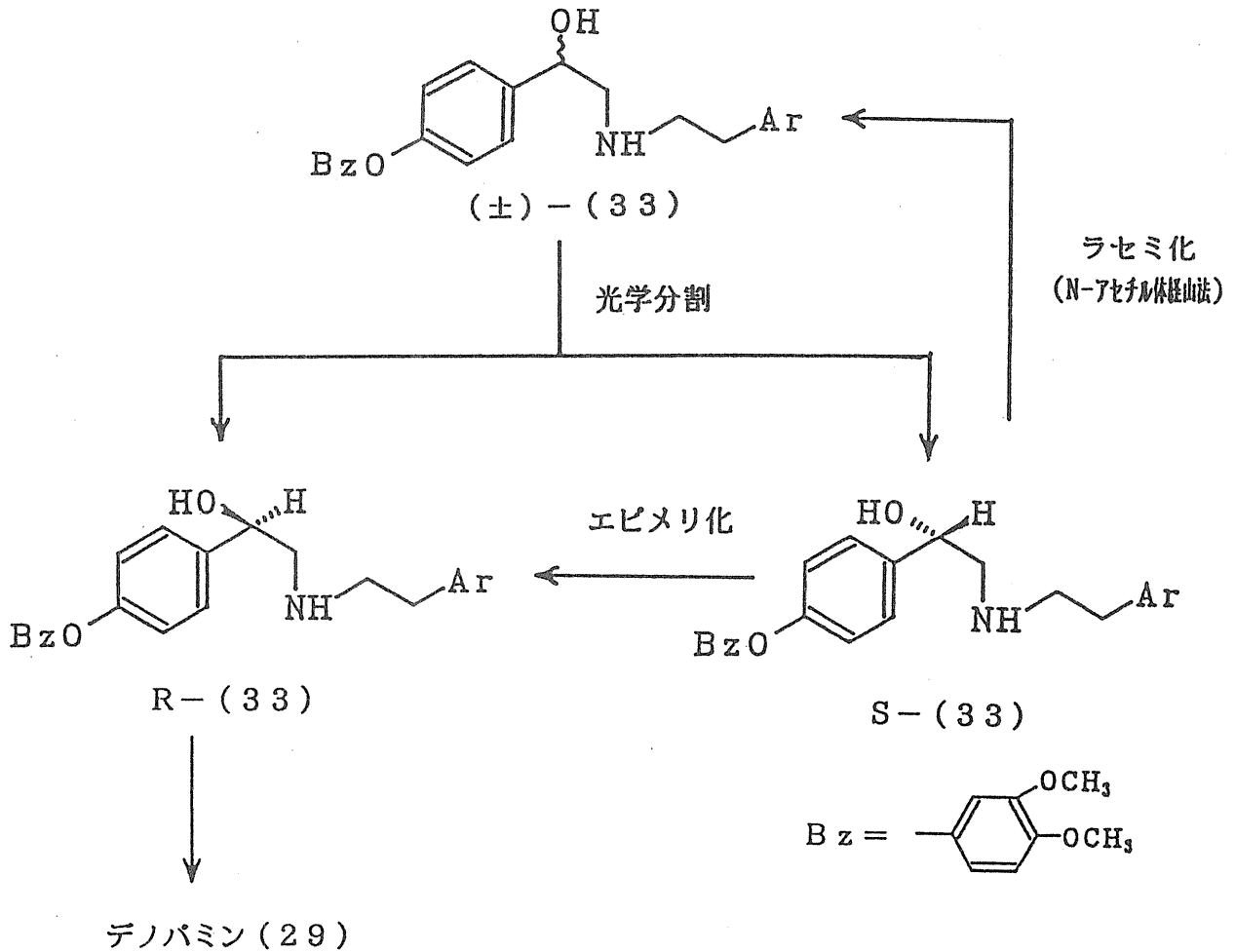
まず、回収した不用な *S*-33 を炭酸カリの存在下、無水酢酸で *N*-アセチル化して *S*-34 を 90% の収率で得た。このものを塩化チオニルと反応させ次いで苛性アルカリで加水分解すると、ベンジル位炭素上での立体配置の反転を伴って、高純度 (~100% ee の *R*-33 が 82% という高収率で得られた。



図・21 エピメリ化による不用の対掌体 [*S*-33] の再利用

このように、光学分割の際に得られる不用な対掌体 (*S*-33) は図・22に示すように、*N*-アセチル体に誘導してラセミ化ができる上に、エピメリ化によって高収率で必要な *R* 体に直接変換することができた。

これによって、光学活性化合物の工業的生産にとって不可欠な不用な対掌体のリサイクルが可能となり、デノパミンの工業的生産が実施できるようになった。



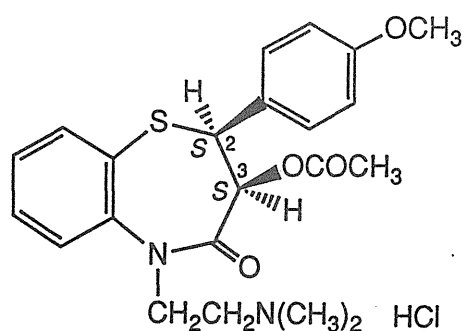
図・22 不用の対掌体 [*S*-33] の再利用法



### 第3章 1、5-ベンゾチアゼピン誘導体（ジルチアゼム）の合成中間体の工業的光学分割法

ジルチアゼム (43) は、田辺製薬株式会社によって1,5-ベンゾチアゼピン誘導体の中から見出された典型的なカルシウム拮抗剤であり、既に日本薬局方に収載され、狭心症のほか高血圧、不整脈の治療剤として、国内はもとより100ヶ国にわたって使用され、世界的に高い評価を受けている<sup>64)</sup>。

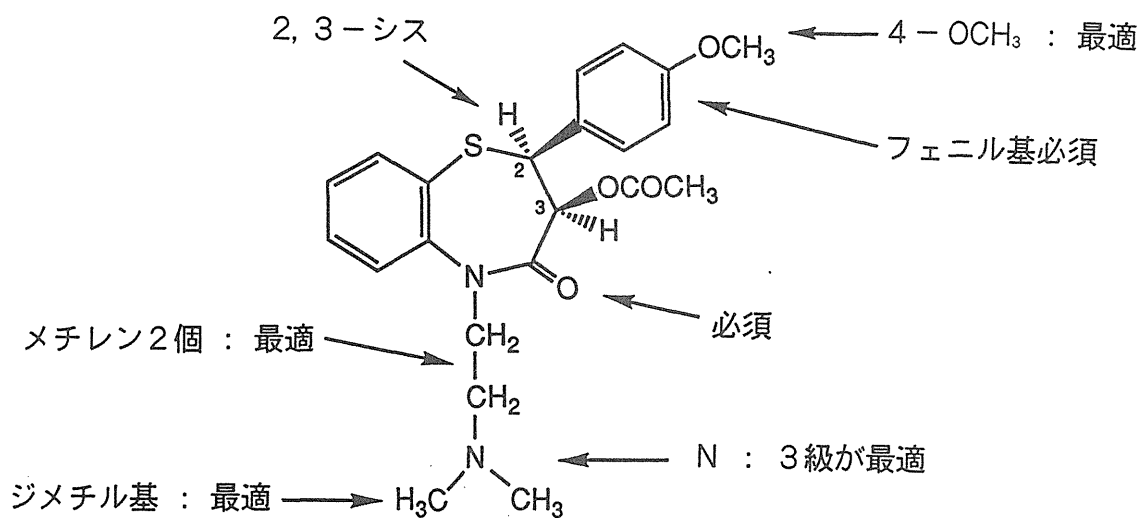
ジルチアゼムは、2位と3位に不斉炭素2個を有するため、その平面構造から考えられる異性体として2,3-シスおよびトランス体の2種のジアステレオマーが存在し、それぞれについて光学活性体が存在する。ジルチアゼムは図・23に示すように、このうちの2,3-シス体の右旋性異性体であって、その絶対配置は2*S*, 3*S*である<sup>65)</sup>。



ジルチアゼム (43)

図・23

ジルチアゼムの開発にあたり、合成された約70種の化合物について構造と冠血管拡張作用の相関が検討された<sup>66)</sup>。その結果は図・24に示すように要約される。

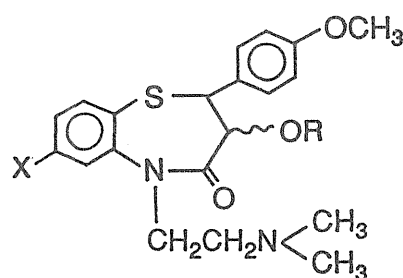


図・24 ジルチアゼム誘導体の構造活性相関

また、立体構造と薬理活性の相関については、表・4、表・5、表・6に示すような結果が得られ、総括すると次のようになる。

- ①ジアステレオマーのうち一般に2, 3-シス体は強い活性を示すが、対応するトランス体には殆ど作用が認められず、両者の差は極めて明瞭である。(表・4)
- ②シス体を光学分割して得られる光学活性体についての冠血管拡張作用は、選択的に右旋性異性体(2*S*, 3*S*)に強く認められ、対掌体(2*R*, 3*R*)には殆ど作用が認められない。(表・5)
- ③急性毒性に関しては、右旋性異性体であるジルチアゼム(2*S*, 3*S*)とそのラセミ体はほぼ同等であり、したがって右旋性異性体(2*S*, 3*S*)はラセミ体の約2倍の安全域を有する。(表・6)

表・4 ジルチアゼム誘導体のジアステレオマーの冠血管拡張作用<sup>66)</sup>



X	R	塩	異性体	冠血管拡張作用(比活性)*
H	H	HBr	シス	1. 9
H	H	HCl	トランス	0. 1
H	COCH <sub>3</sub>	HCl	シス	3. 5
H	COCH <sub>3</sub>	HCl	トランス	0. 1
Cl	H	HCl	シス	0. 8
Cl	H	HCl	トランス	0. 1
Cl	COCH <sub>3</sub>	HCl	シス	3. 3
Cl	COCH <sub>3</sub>	HBr	トランス	0. 1

\*麻酔犬静脈投与(0.2mg/Kg), パパベリン=1とした

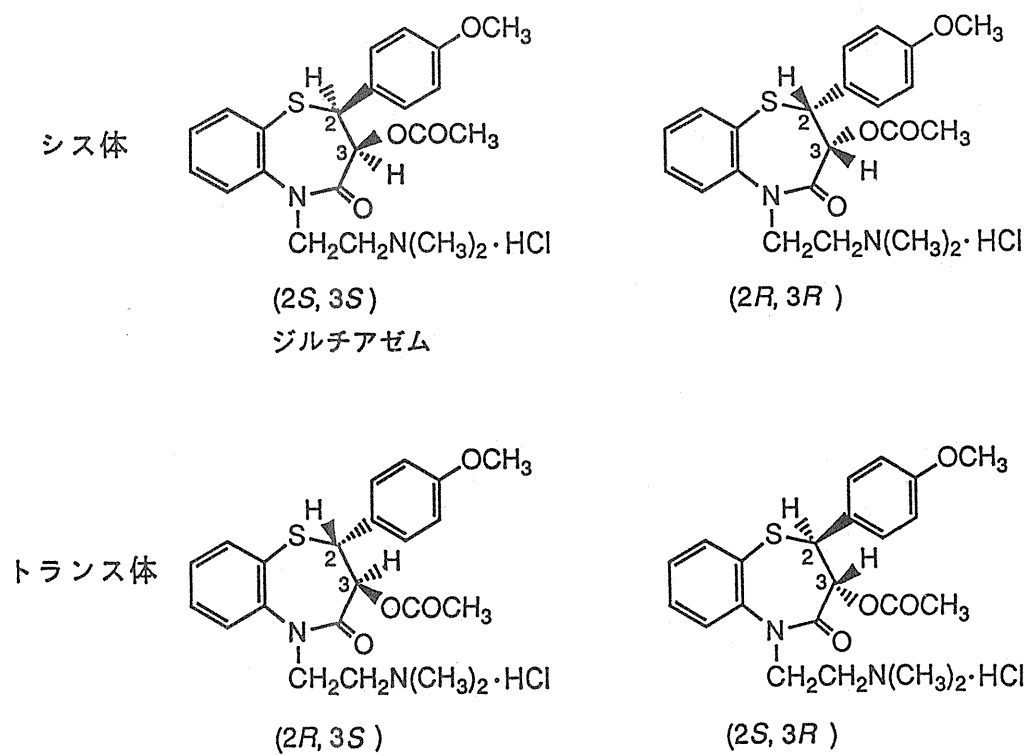
表・5 ジルチアゼムの光学異性体の冠血管拡張作用<sup>66)</sup>

光学異性	塩	冠血管拡張作用
(±) - (2 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i> ) ラセミ体	HCl	3. 5
(+) - (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> ) ジルチアゼム	HCl	5. 8
(-) - (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )	HCl	0. 1

表・6 ジルチアゼムの光学異性体の薬理作用<sup>67)</sup>

作用	活性
血管拡張作用	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> ) > (2 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i> ) > (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )
平滑筋弛緩作用	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> ) > (2 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i> ) > (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )
局所麻酔作用	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> ) = (2 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i> ) = (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )
LD <sub>50</sub>	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> ) = (2 <i>RS</i> , 3 <i>RS</i> ) ≥ (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )

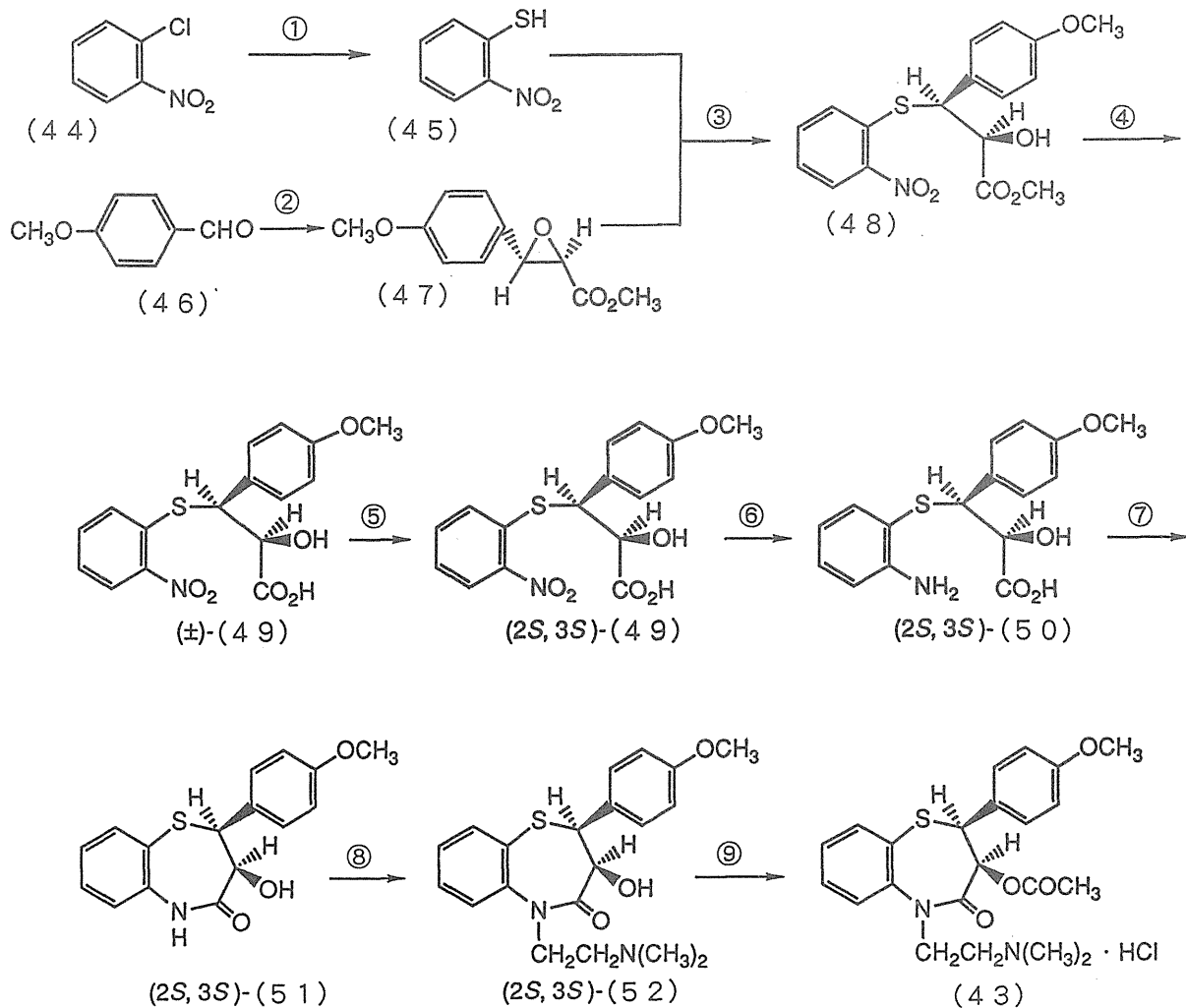
これらの結果から、平面構造から考えられる図・25に示す4個の立体異性体のうち、右旋性のシス体 (2*S*, 3*S*)、すなわち、ジルチアゼムが冠血管拡張剤として選択された。



図・25 ジルチアゼムの4つの立体異性体

## 第1節 ジルチアゼムの合成法

ジルチアゼムの合成は、当初図・26に示す方法で行なわれた。そのキー・ステップである2-ニトロチオフェノール(45)とトランス-グリシッド酸エステル(47)の反応については、その後詳細な立体化学的検討が行なわれた。その結果、ルイス酸を触媒に用いることにより、立体選択的に47のオキシラン環のシス開裂が進行して、シス-ラクタム体(51)の前駆体として必要な(±)-スレオ-ニトロエステル体(48)が高い立体選択性をもって得られることが明かにされた<sup>68)</sup>。したがって、ジルチアゼムの工業的生産にあたっては効率的な光学活性体(2*S*, 3*S*)の取得が残された問題である。



- 1)  $\text{Na}_2\text{S}$ , S, NaOH /  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
- 2)  $\text{ClCH}_2\text{COOCH}_3$ ,  $\text{NaOCH}_3$  /  $\text{CH}_3\text{OH}$  3)  $\text{CH}_3\text{CN}$  4)  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$  /  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
- 5) cinchonidine /  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , HCl
- 6) Pd - C,  $\text{H}_2$  /  $\text{CH}_3\text{COOH}$  7) xylene
- 8)  $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$
- 9)  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ , HCl

図・26 ジルチアゼムの合成法

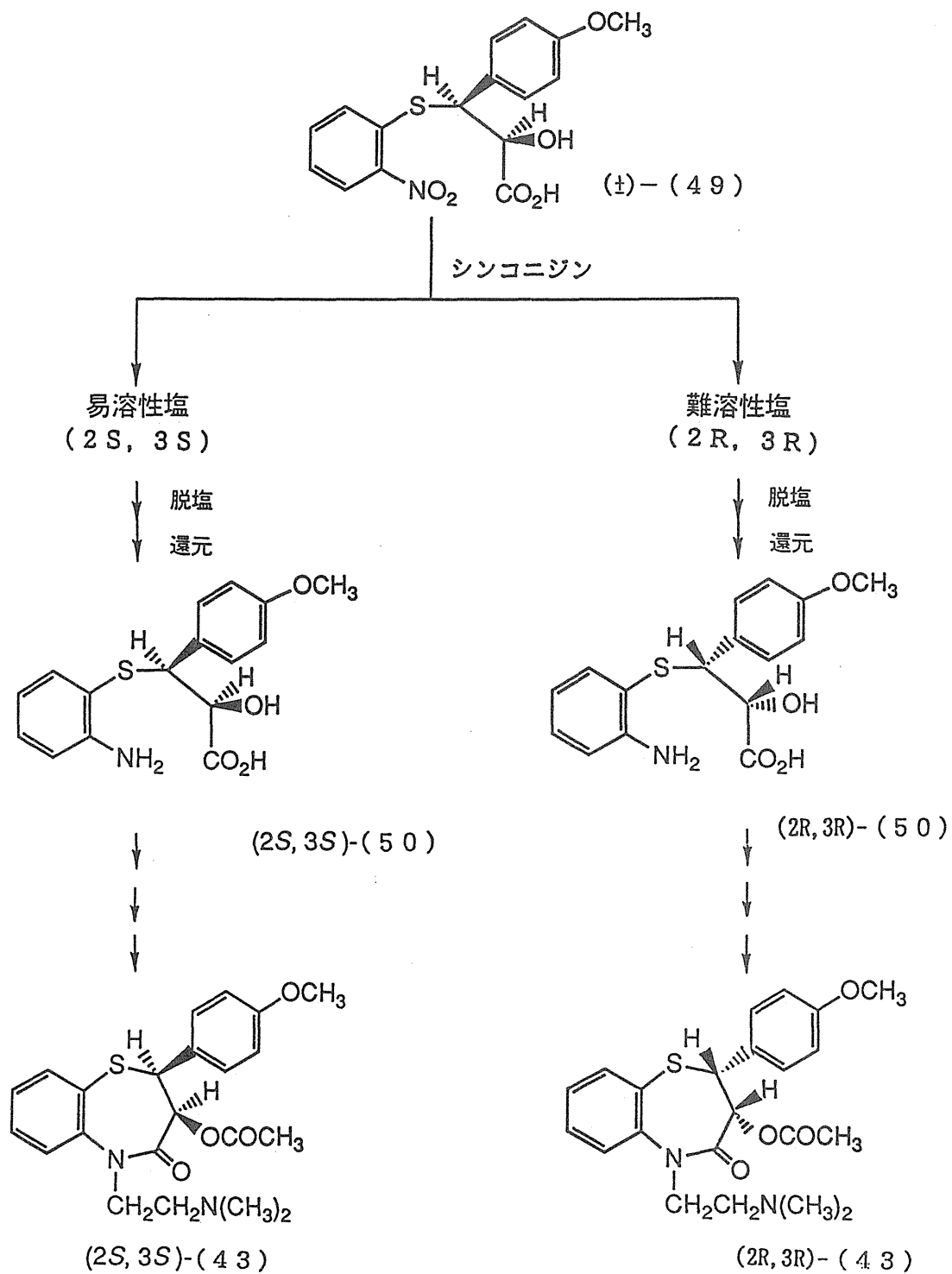
## 第2節 中間体ニトロカルボン酸の光学分割

井上ら<sup>65)</sup>は、図・27に示すようにジルチアゼムの合成ルートのうち出発原料に近い分割対象中間体として(±)-スレオ-ニトロカルボン酸(49)を選び、天然型アルカロイドのシンコニジンとブルシンを用いてその光学分割に一応成功している。しかしながら、分割剤として用いられたブルシンおよびシンコニジンはいずれも高価で大量に入手できるものではなく、また天然物由来のため他のアルカロイドが夾雑して品質的に問題がある。その上、ブルシンを用いた場合には、得られた(2*S*, 3*S*)-ニトロカルボン酸の光学純度が低く、またシンコニジンを用いた場合には、難溶性塩として先に析出するジアステレオマーは不用の(2*R*, 3*R*)-ニトロカルボン酸のシンコニジン塩であるため、一旦これを除き母液から所望の(2*R*, 3*R*)体を取得しなければならず、いずれも工業的に適用できる方法ではない。

また、ラセミ型のジルチアゼムを合成し、1*S*-10-カンファスルホン酸、*S*-リンゴ酸、あるいは*S*-マンデル酸を分割剤として光学分割する方法が特許上に報告されている<sup>69)</sup>。

しかし、ラセミ型のジルチアゼムの光学分割は、緒言に記した「出発物質に近い分割対象体を選ぶ」条件に適合せず、光学分割を行なう工程まで2倍の原料を用いるために経済的でない。さらに、合成の最終工程で分割剤を用いると、分割剤の混入を避けるための高度な分離精製が必要であり、また不用の対掌体[(2*R*, 3*R*)-43]のラセミ化による再利用も困難である。

そこで、著者は(±)-スレオ-ニトロカルボン酸(49)の工業的な光学分割の検討に着手し、第1選択試剤である天然型塩基性アミノ酸による分割を種々検索した結果、次に示すようなL-リジンによる新しい極めて効率的な分割方法を見出すことに成功した。



図・27 シンコニジンによる光学分割<sup>65)</sup>

ラセミ型ニトロカルボン酸 (±) - 49) を 15 倍量のメタノールに溶かし、50% L-リジン水溶液を滴下すると所望の (2*S*, 3*S*) - ニトロカルボン酸の L-リジン塩が容易に析出する。まず L-リジンのモル比が析出する塩の収率と光学純度に対する影響を検討し表・7 に示す結果を得た。

表・7 L-リジンのモル比と分割収率

L-リジンモル比	ジアステレオマー塩				分割率 <sup>4)</sup> (%)
	得量 <sup>1)</sup> (g)	収率 <sup>2)</sup> (%)	旋光度 (25°C) (1% 1/10-NaOH)	光学純度 <sup>3)</sup> (%)	
0.15	1.5	100.0	- 100.2°	97.1	14.7
0.30	2.6	87.5	- 98.6°	95.6	25.1
0.38	3.6	95.6	- 99.5°	96.4	35.0
0.50	4.6	92.7	- 94.5°	91.6	42.0
0.60	5.3	89.2	- 70.2°	69.1	37.0
0.70	6.3	90.8	- 41.6°	42.6	27.1
0.85	7.9	93.8	- 14.3°	17.3	13.8
1.00	9.1	91.8	- 0.2°	4.2	3.9

1) (±)-ニトロカルボン酸7.0g(0.02モル)を使用した場合の光学分割

2) 使用したL-リジン量より(%)

3) 標準品の旋光度より計算(%)

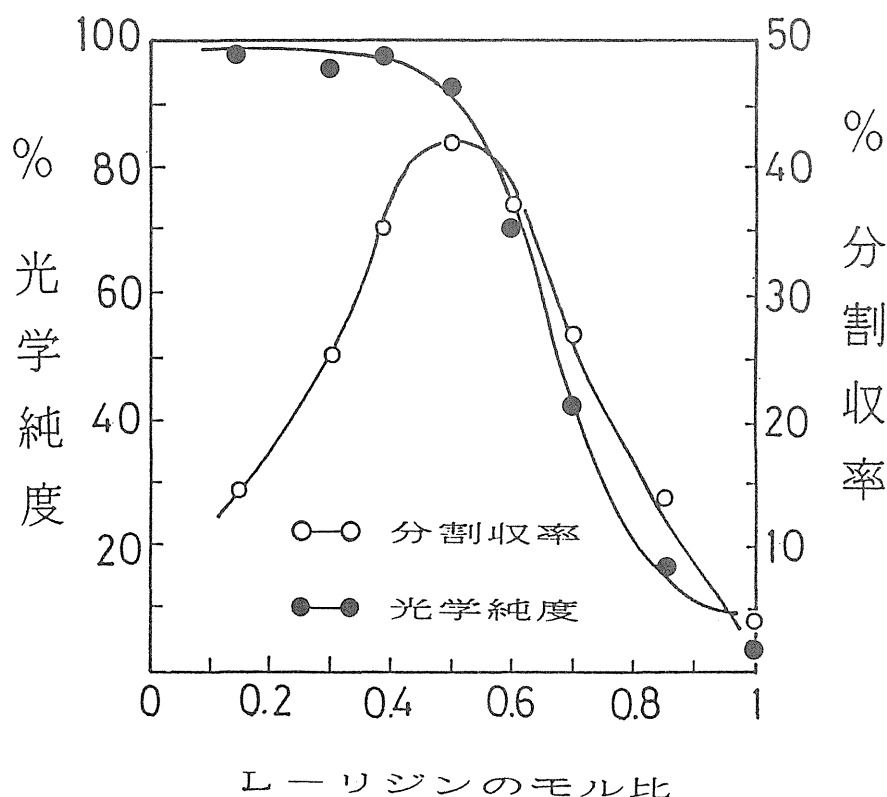
4) (2*S*, 3*S*)-49のL-リジン塩の理論値より(%)



この際、使用するL-リジンのモル比に変化なく析出する塩は常にニトロカルボン酸とL-リジンの1:1の組成比であった。表・7に示すように、析出塩の対リジンの収率は常に約90%であるので、光学純度を無視したリジン塩の収量はL-リジンのモル比の増加に正比例する。しかしながら、その光学純度はL-リジンのモル比が0.5を過ぎると急激に低下する。

このことは、ラセミ型ニトロカルボン酸に対しL-リジンのモル比が0.5近くになるまで2種の光学異性体のうち所望の方だけが優先的に反応してジアステレオマー塩を形成し、使用モル比が0.5に達する付近からジアステレオマー塩のもう1つの方の育晶が急激に始まり、極めて効率的な動力学的分割 (Kinetic resolution) が起っていることを示している。従って、所望の光学活性ニトロカルボン酸に対して等モル比、すなわちラセミ体に対し0.5モル比のL-リジンを作用させた場合に最も良い分割収率が得られた。

この結果は表・7をグラフ化した図・28に明瞭に示される。



図・28 L-リジンのモル比と光学純度および分割収率

ところで、分割剤を用いて2種のジアステレオマー塩を生成させこれを分離するには、一般に2種のジアステレオマー塩の溶解度差を利用する。そこで、このL-リジンによって生成する2種のジアステレオマー塩の溶解度差を測定したところ表・8に示すような結果が得られた。

表・8 ニトロカルボン酸・L-リジン塩の溶解度

(溶媒：メタノール、温度：30℃)

	ニトロカルボン酸・L-リジン塩	g/100mlメタノール
単 独	難溶性塩；(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> )ニトロカルボン酸	0.11
	易溶性塩；(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )ニトロカルボン酸	0.45
共 存	難溶性塩；(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i> )ニトロカルボン酸	0.13
	易溶性塩；(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )ニトロカルボン酸	0.31

a) リジン塩それぞれの溶解度      b) 他のジアステレオマー塩が同量混在した場合の溶解度

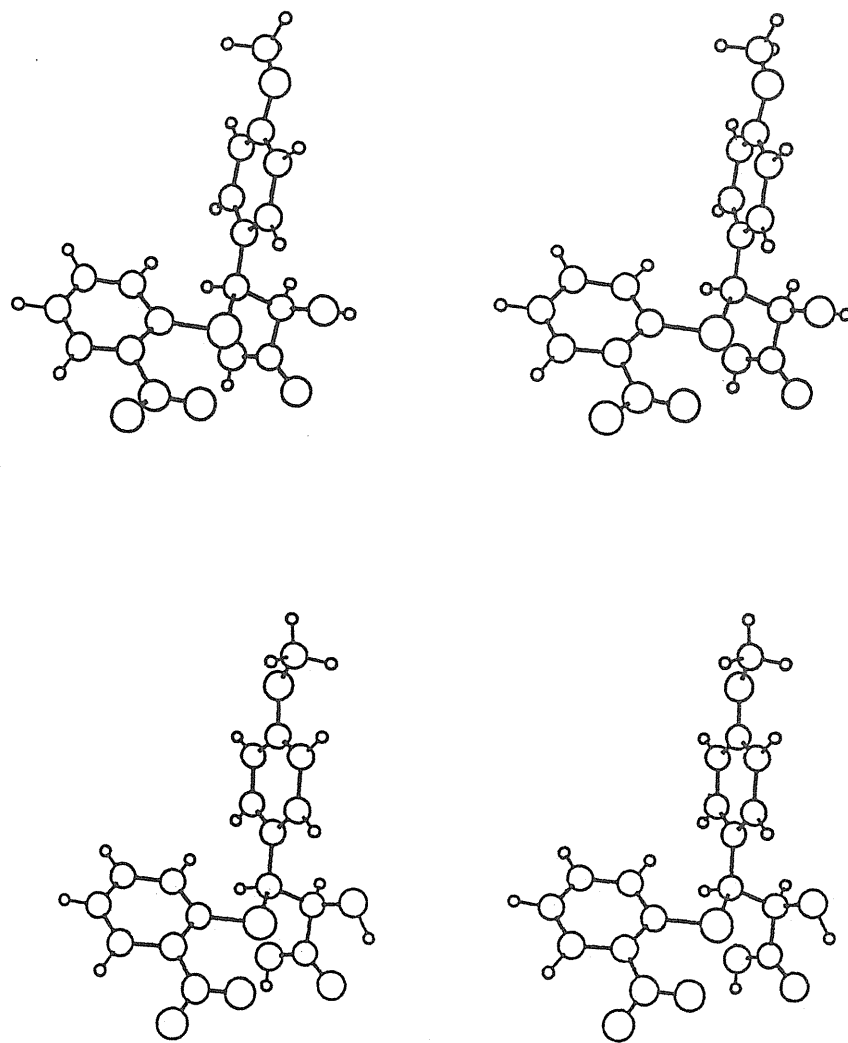
すなわち、両者の単独での溶解度差は約4倍であるが、両者共存の場合は約2.4倍となり分離に利用される溶解度差としては決して大きなものではない。

近年、ジアステレオマー塩による光学分割のメカニズムをX線結晶解析により解明しようとする試みがなされつつある<sup>70)</sup>。このL-リジンによる極めて効率的な動力学的分割の機構を2種類のジアステレオマー塩の結晶構造の差異から解明したいと考えたが残念ながらこれらについてX線結晶解析が可能な結晶を得ることは出来なかった。

以上の検討の結果をもとにして、(±)-49の光学分割を0.5モル比のL-リジンを用いることによって極めて容易に効率良く行なうことができた。すなわち、ラセミ体 [(±)-49] を含水メタノールに溶かし0.5モル比のL-リジン水溶液を滴下した。

室温で1時間攪拌後冷却して析出する結晶を濾取、含水メタノールで温浸精製して(2*S*, 3*S*)-ニトロカルボン酸・L-リジン塩を得る。このL-リジン塩を水に溶かし、希塩酸でpH2.1に調整してL-リジンを除き、ニトロカルボン酸 [(2*S*, 3*S*)-49] を42%の収率で得た。このものの光学純度は光学活性カラム(キラルパック：ダイセル社)を用いた高速液体クロマトグラフィーによって99.7%という極めて高いものであることが明らかになった。また、このものの絶対配置は所望の2*S*, 3*S*配置であることをX線結晶解析により

確認した。この結晶は図・29に示すように、結晶学的独立単位内に光学活性ニトロカルボン酸2分子と結晶水2分子を含むものであった。



図・29 ニトロカルボン酸 [(2S, 3S) - 49] の結晶構造

一方、同じ塩基性アミノ酸であるL-アルギニンを分割剤として用いた場合、L-アルギニンのモル比が 0.1~1.0の間ではモル比が変化しても良好な結晶性塩が得られ、その組成はニトロカルボン酸とL-アルギニンとが 1:1のモル比で構成されている。しかし、L-リジンに示したような選択的な育晶特性は全くなく、ジアステレオマーの分別は殆んど起こらなかった。

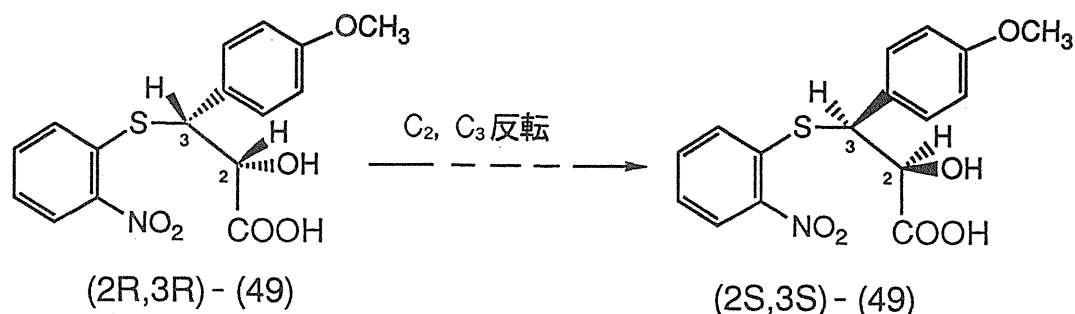
また、L-リジンの類縁アミノ酸であるL-オルニチンを用いた場合、得られた塩の光学純度は最高で38%と低くジアステレオマーの効率的な分離は認められなかった。

このように、極めて安価な天然型アミノ酸であるL-リジンを、目的とする(2*S*, 3*S*)-ニトロカルボン酸のL-リジン塩を難溶性塩として簡単な操作で純度よく得ることに成功した。さらに、これを脱塩して得られたニトロカルボン酸を井上ら<sup>65)</sup>の方法に準じてジルチアゼム(43)にまで誘導した所、ラセミ化も全く起らず高品質のジルチアゼムが得られた。

この方法の開発によって、ジルチアゼムの工業的生産が初めて可能になり、100ヶ国にのぼる世界的な需要に応える量産体制が確立された。

### 第3節 不用な対掌体の再利用

ニトロカルボン酸[(±)-49]の光学分割の際に得られる不用の対掌体[(2*R*, 3*R*)-49]の再利用については、C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>の双方を同時に異性化しなければならないために経済的な方法を見出すことは極めて困難と考えられる。



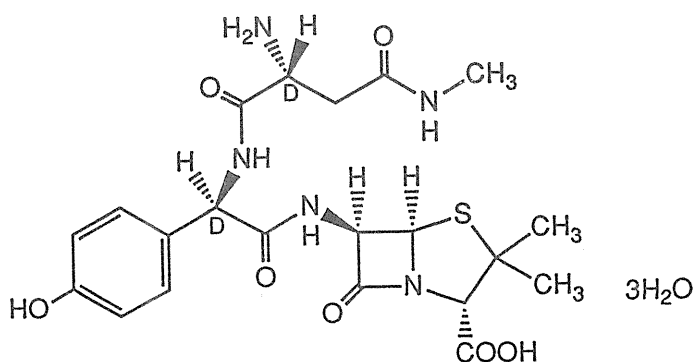
図・30 不用な対掌体 [(2*R*, 3*R*) - 49] の異性化による再利用

一方、このものから導かれるジルチアゼムの光学対掌体 [(2*R*, 3*R*) - 43] またはその誘導体に強力な血小板凝集抑制作用が見出され、詳細な検討の結果、脳血栓症、一過性脳虚血症、冠動脈血栓症、肺塞栓症、末梢血管塞栓症等の血栓症の治療、改善または予防に用いる有望な医薬品として開発が進められるに至った。したがって (2*R*, 3*R*) - ニトロカルボン酸はこの目的に使用することとして、ジルチアゼムの製造への再利用の検討は中止した。

## 第4章 新規合成ペニシリン（アスポキシシリン） の光学活性な側鎖の工業的製法

田辺製薬株式会社において開発されたアスポキシシリン (53) は、図・31 に示すように3個の光学活性化合物のユニットから構成されるユニークな光学活性アミノ酸型ペニシリン剤であり次のような薬理学的特徴を有している<sup>71)</sup>。

- ①溶菌的殺菌作用
- ②ペニシリン剤中最も長い血中濃度、半減期
- ③良好な体液、組織への移行性
- ④優れた臨床効果



アスポキシシリン (53)

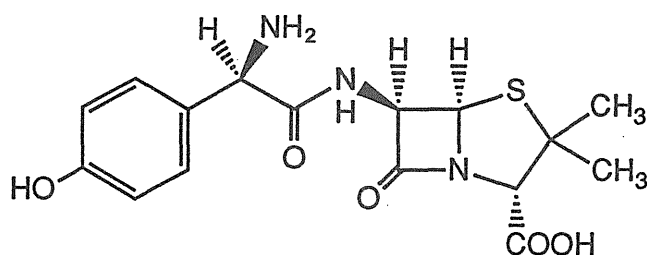
図・31

開発にあたり、アモキシシリン (54) のフェニル基に結合した水酸基に着目し、本誘導体についても水酸基の導入により体内動態の改善が計られた。また我妻らにより54のアミノ基に各種のアスパラギン酸誘導体が導入され、それらの化合物について抗菌活性と急性毒性の比較が行なわれた<sup>71)</sup>。その結果を表・9に示す。

まず、側鎖アスパラギン酸部分の光学異性体を比較すると、大腸菌 *Escherichia coli* と緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* に対する抗菌力はD-異性体の方が優れており、また側鎖のアルキル基の長さは黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* に対する抗菌力においてあまり影響がないが、グラム陰性菌に対して大きく影響することが明らかにされた。なおフェニルグリシン部の立体構造としてD型が必要であることは従来からのペニシリン誘導体の研究によってすでに明らかにされている<sup>72)</sup>。

一方、急性毒性については、ベンゼン環の水酸基とアスパラギン酸のN<sub>4</sub>位のアルキル基の形状が大きく作用した。

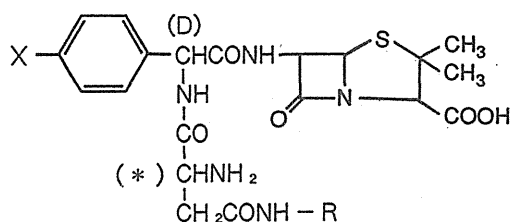
このことから、アモキシシリンのアミノ基にD-N<sub>4</sub>-メチルアスパラギンを導入した化合物がアスポキシシリンとして開発品に選択された。



アモキシシリン (54)

図・32

表・9 アスポキシシリン各誘導体の抗菌活性と急性毒性<sup>71)</sup>

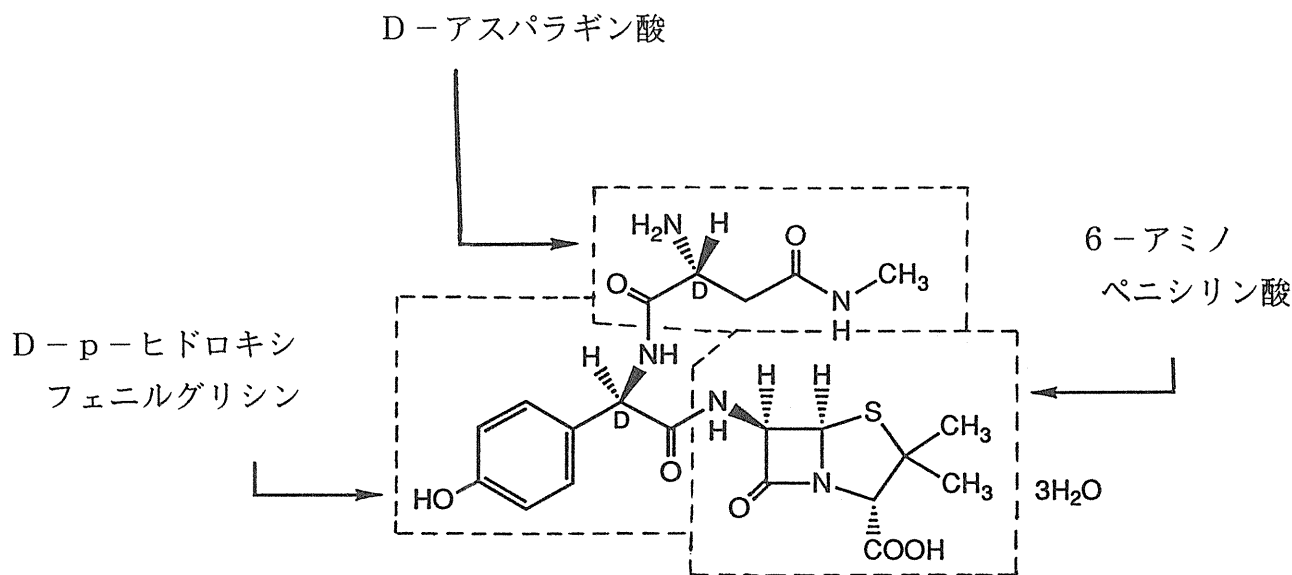


X	R	(*)	抗 菌 活 性			急 性 毒 性
			最小阻止濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}, 10^6\text{CFU}/\text{ml}$ )			LD <sub>50</sub> (mg/kg, mice, i.v.)
			黄色ブドウ球菌	大腸菌	緑膿菌	
※OH	CH <sub>3</sub>	D	0.78	0.19	6.25	> 10.000
OH	CH <sub>3</sub>	L	0.78	25	12.5	5.475
OH	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	D	0.78	6.25	25	6.000
OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	D	0.78	3.13	25	
OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	D	0.39	25	25	
OH	H	D	0.78	3.13	25	4.610
OH	H	L	1.56	25	> 100	3.840
H	CH <sub>3</sub>	D	0.78	6.25	12.5	2.280
H	CH <sub>3</sub>	L	0.39	25	50	
H	H	D	3.13	6.25	6.25	2.310
H	H	L	3.13	25	25	2.310

※アスポキシシリン

## 第1節 2つの光学活性アミノ酸

アスポキシシリンの構造は、6-アミノペニシリン酸 (6-APA) と2つのD-アミノ酸で構成されている。



図・33 アスポキシシリンの構成化合物

ペニシリン系抗生物質の母核となる6-APAは、発酵法で安価に大量得られるペニシリンGまたはペニシリンVを原料として、大腸菌から抽出した酵素(ペニシリンアシラーゼ)を用いて生産する方法が広く行なわれている。また、6-APAはペニシリン剤以外にもセファロsporin剤の骨格への用途もあって大量に製造、販売されている。

一方、アスポキシシリンを構成するD-p-ヒドロキシフェニルグリシン(D-HPG)とD-アスパラギン酸(D-Asp)は、いずれも非天然型アミノ酸である。最近、非天然型アミノ酸は、抗生物質の構成単位としてだけでなく、農薬や人工甘味剤としての用途も増加している。

その製法は、L-アミノ酸と同じように、DL-アミノ酸を一旦Bucherer法やStrecker法で合成し、分割剤を用いて光学分割する方法とN-アセチル-DL-アミノ酸や5-置換ヒダントインを基質とする酵素反応による方法に分類される。

著者は、アスポキシシリンの合成に必要なD-Aspと、D-HPGについて、次節以降に示すような工業的生産に有利な製法を確立した。

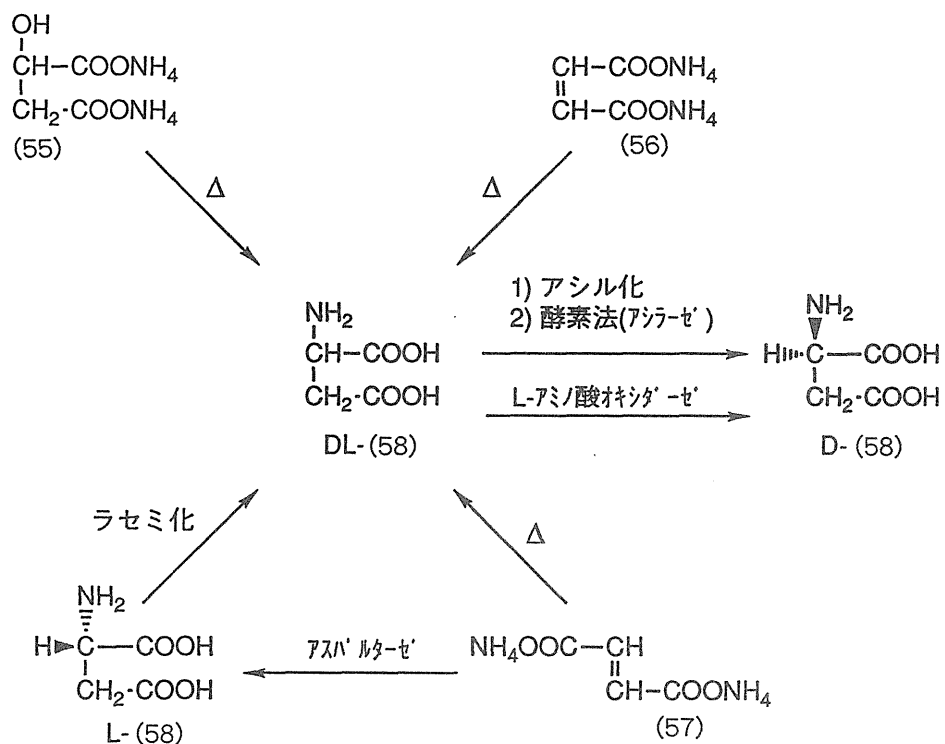


## 第2節 D-アスパラギン酸の工業的製法

DL-およびL-アスパラギン酸の製法は古くから研究されているが、D体(58)を目的とした方法は少ない。

まず、DL体(58)の合成法としては、図・34に示すようにリンゴ酸(55)、マレイン酸(56)、フマル酸(57)の各アンモニウム塩を加熱する方法<sup>73)</sup>、フマル酸から酵素法によって一旦L-アスパラギン酸として、次いでラセミ化する方法がある<sup>74)</sup>。更に、フマル酸のジエチルエステルを出発原料とする方法<sup>75)</sup>、あるいはベンジルエステル化して収率を高めようとする改良法<sup>76)</sup>も検討されているが、高圧下フマル酸に直接アンモニアを作用させる方法<sup>72)</sup>が工業的に最も有利な方法である。

また、D体(58)の合成は、DL体をクロロアセチル化後酵素(アシラーゼ)を作用させL体を取得し、母液からD体を得る方法<sup>77)</sup>と、DL体に直接L-アミノオキシダーゼを作用させる方法<sup>78)</sup>がある。また、DL体を優先晶析させる方法<sup>79)</sup>、ラセミ化を同時に行なう不斉転換法<sup>80)</sup>がある。このうち、酵素アシラーゼ法はL体を得た母液から回収することによってD体を得られるため品質的に問題があり、またL-アミノ酸オキシダーゼ法は、L体を分解してしまうので再利用ができない。また、優先晶析法、不斉転換法についても得られたD-アスパラギン酸の光学純度が低く経済的に大量生産には問題があつて、それぞれ工業化に適した方法でない。



図・34 D-アスパラギン酸の製法

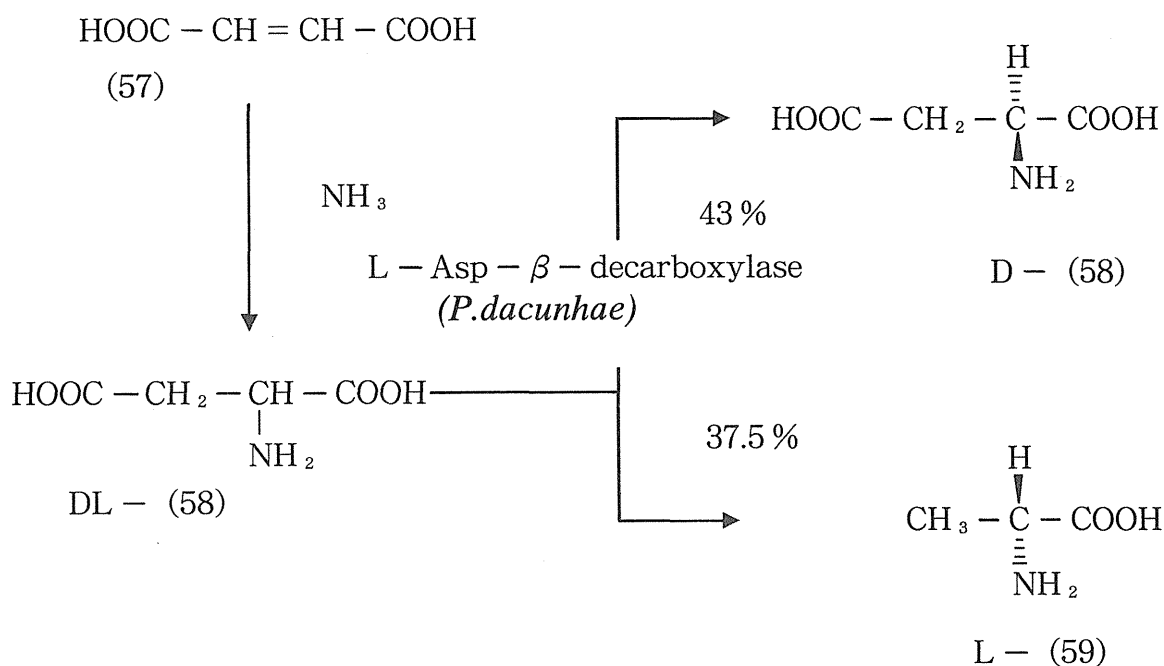
そこで、著者はDL-アスパラギン酸を経るD-アスパラギン酸の製法として、合成法と酵素法を組み合わせた次のような工業的方法を検討した。

まず、DL-アスパラギン酸の合成は、フマル酸にアンモニアを直接作用させる前記Wolffらの方法<sup>73)</sup>(条件：アンモニア水2モル比、10atm、180℃、1hr)を改良して比較的マイルドな条件(Liq. NH<sub>3</sub>2モル比、2atm、130℃、16hr)を確立し、従来法では50~60%であった収率を5000スケールで75%まで上昇させることができた。

次に、DL-アスパラギン酸からD-アスパラギン酸の製法は、L-アスパラギン酸β-脱炭酸酵素を作用させる方法を工業的に検討した。

この方法は、L-アスパラギン酸からL-アラニンを得る千畑ら<sup>81)</sup>の方法と同じ酵素(*Pseudomonas dacunhae*より得られたL-アスパラギン酸β-脱炭酸酵素)を図・35に示すように、DL-アスパラギン酸に応用したものである。

従って、この方法では酵素はL-アスパラギン酸にのみ作用して脱炭酸を行なうので、目的のD-アスパラギン酸(58)を未反応体として好収率で得ることができる。しかも一方では、脱炭酸により生成するL-アラニン(59)は医薬品や食品添加物として有用であることから本法は工業的にも極めて有利である。なお、この二つのアミノ酸は等電点の差により容易に分離することができる。

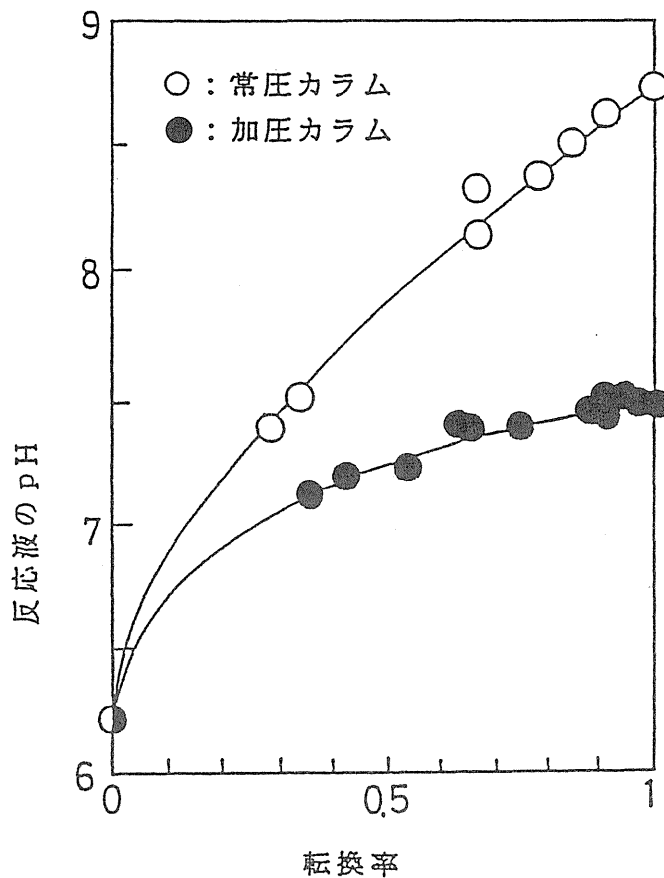


図・35 酵素法によるD-アスパラギン酸とL-アラニンの製法

酵素反応の工業化に際し、いうまでもなく長時間連続的に反応を行なうことが有利となる。そこで、本酵素を含んだ *Pseudomonas dacunhae* の菌体をそのまま天然高分子である  $\kappa$ -カラギーナン中に入れ、菌体を高分子中に包み込み、固体触媒として使用することによりこの反応を連続化することができた。

しかし、このようにして行った連続反応に次のような問題が生じた。①基質としてDL-アスパラギン酸アンモニウムを用いるので、反応の進行に伴って副生するアンモニウムイオンによって反応液の液性がアルカリ側に移行し、この酵素反応系の至適pH (6.0近傍) から大きく外れる。また、②脱炭酸によって発生するCO<sub>2</sub>ガスにより酵素反応系が、固・液・気の3相反応となるため、固定化酵素 (*Pseudomonas dacunhae*) を通常の充填層型リアクターに詰めて行なった場合、基質溶液の流れがチャネリングにより乱れるため、反応効率が低下する。

これらを解決するため、古井ら<sup>82</sup>の開発した加圧型リアクターを利用した。その結果 図・36に示すように、pHの上昇防止、基質の流れの向上が可能になり、反応効率を常圧法に比べて50%以上高めることができた。



図・36 反応液のpH上昇比率

表・10 基質濃度の反応率への影響

基質濃度 (M)	初速反応率( $\times 10^4$ ) (mol / g <sup>-</sup> gel · hr)
2.0	8.10
2.5	7.31
3.0	6.64

表・11 基質の種類と反応率への影響

基質の種類	初濃度 (M)	初速反応率( $\times 10^4$ ) (mol / g <sup>-</sup> gel · hr)
DL-Asp結晶 <sup>a)</sup>	2.5	7.31
DL-Asp溶液 <sup>b)</sup>	2.5	7.02

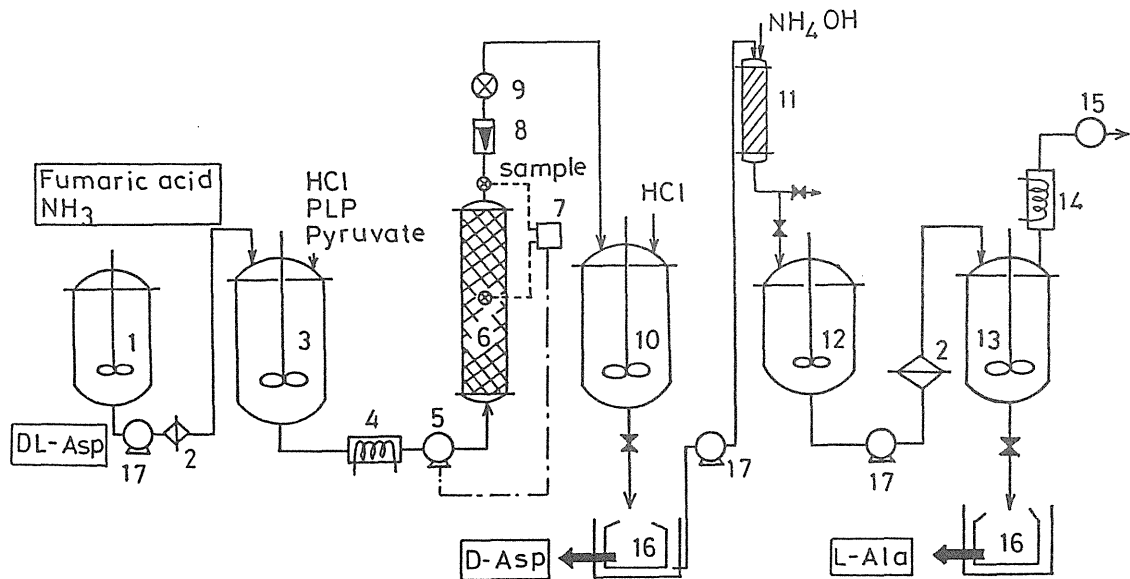
a) L-Aspのラセミ化により製造    b) フマル酸とアンモニアから合成

また、この酵素は生成するD-アスパラギン酸によって阻害を受けるので、表・10に示すように最適基質濃度の決定や表・11に示す仕込み基質条件の影響も検討した。

これらの結果をもとにして、次のようなフマル酸からの直接・連続法による一貫したD-アスパラギン酸の製法を確立することができた。

フマル酸とアンモニアから得られた反応液(DL-アスパラギン酸アンモニウム塩溶液)を下部より流速 77 ml/Hr で予め固定化酵素を充填した加圧型カラムに通した。流液を35%塩酸で中和後晶析したD-アスパラギン酸を濾取、水洗し、80℃で乾燥した。母洗液は、25%アンモニア水で中和後濃縮し、10℃に冷却した。晶析したL-アラニンも濾取、80%含水メタノールで洗浄、80℃で乾燥した。

このようにして、DL-アスパラギン酸からD-アスパラギン酸を43%、L-アラニンを37.5%の高収率で同時に製造できたので、図・37に示したような装置を設置し工業化を行なった。



1. オートクレーブ 2. フェルター 3. 基質タンク 4. 熱交換器 5. ブランジャーポンプ 6. 加圧型カラム反応器  
 7. アスパラギン酸センサー 8. 流量計 9. 圧調節バルブ 10. D-アスパラギン酸晶析タンク 11. イオン交換樹脂  
 12. pH調整タンク 13. L-アラニン晶析タンク 14. コンデンサー 15. 真空ポンプ 16. 遠心機 17. ポンプ

図・37 D-アスパラギン酸とL-アラニンの工業的生産システム

反応の進行をチェックするには、反応液中の残存L-アスパラギン酸濃度を反応槽からサンプルを採取してアミノ酸分析装置で測定するのが一般的で、このため結果が判明するのに1~2時間を要していた。

一方、大腸菌 (*Esherichia coli*) は溶液中のL-アスパラギン酸をアンモニアとフマル酸に分解するアスパルターゼ活性を有するので、この時発生するアンモニアガスの量を測定することにより溶液中のL-アスパラギン酸濃度を知ることができる。

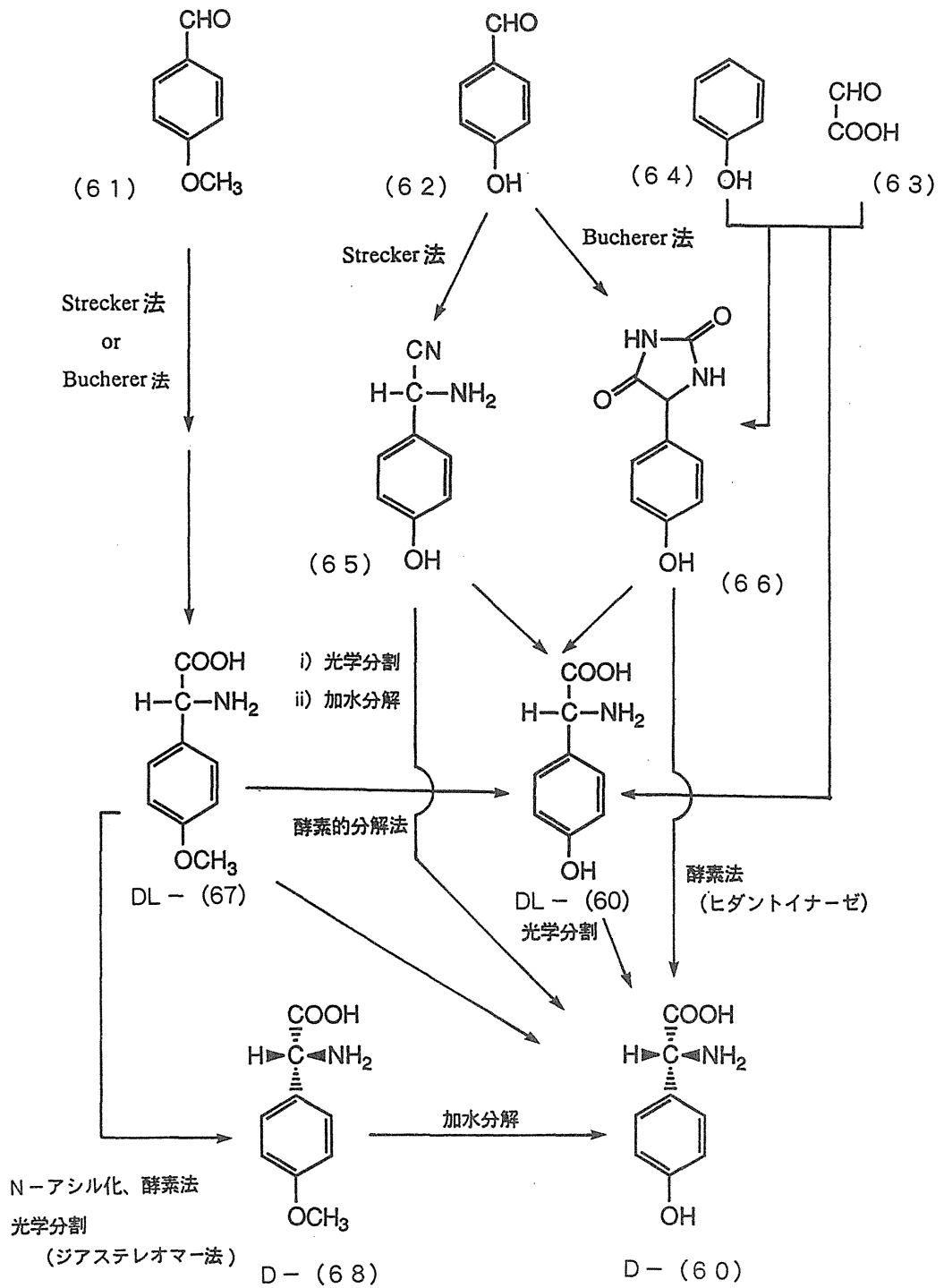
そこで、著者らは大腸菌を海藻類から得られる前記 $\kappa$ -カラギーナンに包み込み、固定化膜を調整した。この膜をアンモニア電極の先端に取り付け、アスパラギン酸センサー (生物感知器) を作成した<sup>83)</sup>。このバイオセンサーをD-アスパラギン酸の製造時に使用することにより測定時間が20~30分に短縮され容易に反応の進行がチェックできるようになり、この反応の工業化を可能にすることができた。

### 第3節 D-p-ヒドロキシフェニルグリシンの工業的製法

従来、D-p-ヒドロキシフェニルグリシン (60) (D-HPG) の製法は図・38に示すように主にDL-体を合成後光学分割する方法と5-置換ヒダントインを基質とする酵素法による方法が検討されている。

- (I) p-メトキシベンズアルデヒド (61) またはp-ヒドロキシベンズアルデヒド (62) を用いて Bucherer法、Strecker法でDL体を合成し、次いで光学分割する方法<sup>84)</sup>
- (II) グリオキシル酸 (63)、フェノール (64) およびアンモニアからDL体を合成し<sup>85)</sup>、光学分割する方法
- (III) アミノニトリル体 (65) を合成し光学分割後、加水分解する方法<sup>86)</sup>
- (IV) DL体にL-アミノ酸分解酵素を作用させる方法<sup>87)</sup>
- (V) 光学活性p-メトキシフェニルグリシン (D-68) を得たのち脱メチル化する方法<sup>88)</sup>
- (VI) 5-p-ヒドロキシフェニルヒダントイン (66) にジヒドロピリミジナーゼ (ヒダントイナーゼ) を作用させる方法<sup>89)</sup>

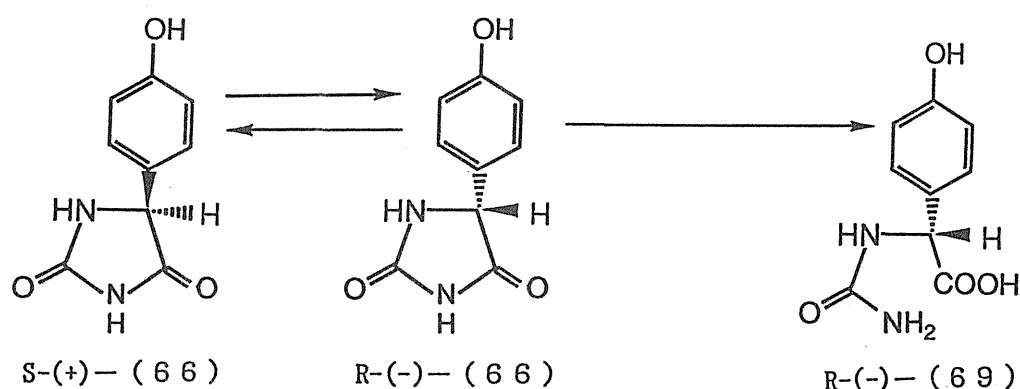
(I) の方法は、出発原料が高価であり、また Bucherer法によるヒダントインの加水分解は苛酷な条件が必要であるため、水酸基の保護が必要であり、そのために後工程で脱保護操作が増え、工程が長くなり経済的でない。(III) の方法は、合成法で得るアミノニトリル体が不安定である上に、着色が著しく加水分解後煩雑な精製操作を必要とする。(IV) の方法は、L体を分解して除去する方法であり、L体の再利用が全く出来ない。(V) の方法は、D-p-メトキシフェニルグリシンの取得はラセミ体から酵素法等で容易に行うことが出来るが、強酸 (例えば48% HBr) で脱メチル化を行うのでラセミ化による品質低下が防止できない。



図・38 D-HPG (60) の製法

また、(VI)の方法は、図・39に示すようにDL-ヒダントイン誘導体(66)を原料とし、塩基触媒による非酵素的ラセミ化と平行してD-体のエナンチオマーのみがジヒドロピリミジナーゼによって加水分解され、結果としてDL-体からほぼ定量的にD-体のカルバモイル誘導体(69)を得る理想的な方法である。

しかし、カルバモイル体(69)の単離は一旦ジシクロヘキシルアミン塩として精製が必要な上に、D-HPGを得るには脱カルバモイル化反応後、イオン交換樹脂の精製を経るなど操作が非常に煩雑になる。



図・39 酵素によるN-カルバモイル-D-HPGの製法

このように、D-HPGを得るためにはまず安価なDL体の合成法の確立が基本であると考えられる。

そこで、著者は工業的に可能なD-HPGの合成法としてグリオキシル酸を用いるDL体の合成法と光学分割法を組合せた(II)の方法を検討することにした。

#### (イ) DL-HPGの合成

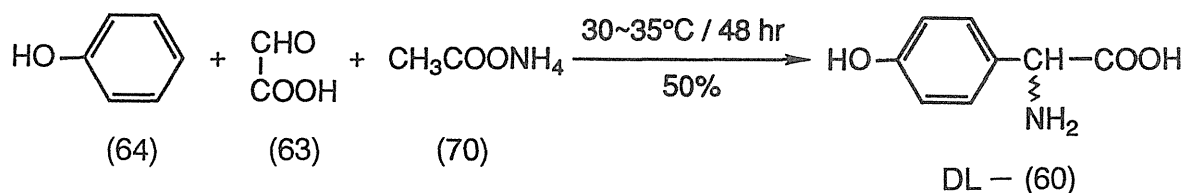
前記(II)のエルトンらによる方法はグリオキシル酸モノ水和物とアンモニアをフェノールとともに塩基性水溶液中で反応させるものである。この方法は工業的に入手し難いグリオキシル酸モノ水和物を用いる点で難点がある。その上取り扱い不便な濃厚アンモニア水を大過剰に使用するために、DL体を単離するには大過剰のアンモニアを溜去するか、鉍酸で中和する必要がある。したがって大規模なアンモニア回収設備を設置しなければならず、又中和した場合には無機アンモニウム塩が混入するために精製を必要とするな



どの欠点がある。また、塩基性下での反応のため着色も著しい。そこで、著者はこれらの欠点の無い方法を検討し脂肪族カルボン酸アンモニウム塩、または無機酸のアンモニウム塩をアンモニウム源として用い中性付近で反応すると目的のDL-HPGが結晶として析出してくる全く新しい方法を見出すことができた<sup>90)</sup>。

すなわち、図・40に示すように、まずグリオキシル酸水溶液に酢酸アンモニウムとフェノールを加え、30~35°C、48hr 攪拌する。析出する結晶を濾取、水洗することによりDL-HPG (60) を50%の収率で得ることができた。

この方法によると、濃厚アンモニア水を使用せず、また反応の進行につれて析出するDL体を濾取するだけの極めて簡単な操作で高品質のDL体(60)を得ることができ工業的なDL-HPGの製法を確立することができた。



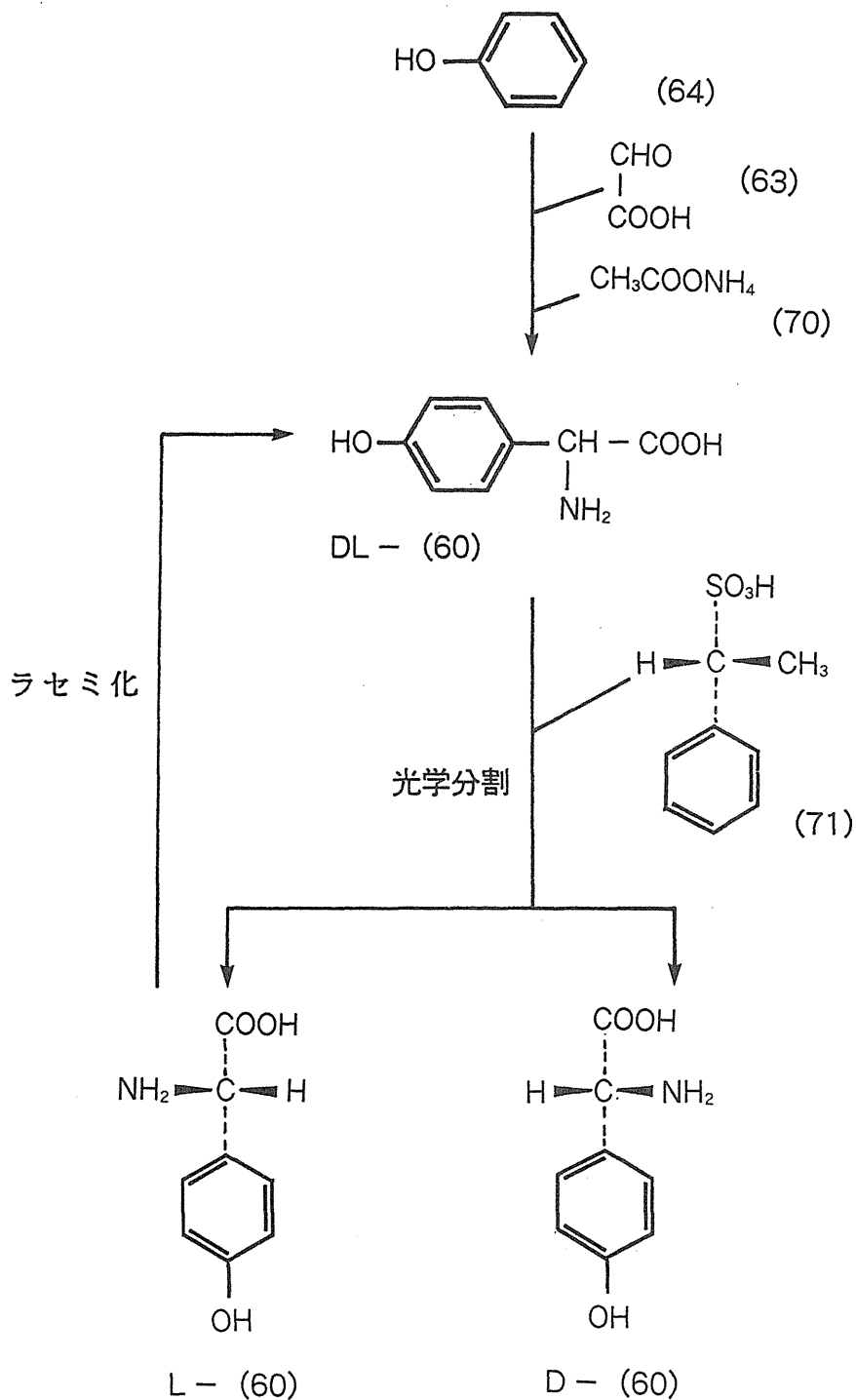
図・40 DL-HPGの工業的製法

#### (ロ) D-HPGの合成

吉岡ら<sup>91)</sup>は $\alpha$ -メチルベンジルアルコールをスルホン化したのち、光学分割して得られる(R)-(-)- $\alpha$ -フェニルエタンスルホン酸(71)が安価で、ラセミ化を起こし難くい汎用性のある光学分割剤であることを見出している。通常アミノ酸の光学分割には、カルボキシル基を保護して酸性分割剤を用いるか、またはアミノ基を保護して塩基性分割剤を用いるのが一般的であるが、R-71はこれらの保護を必要とせず、直接各種のアミノ酸の光学分割に好適に用いることができる<sup>92)</sup>。彼らはDL-HPGの光学分割に於いてもR

－71を用いることによって、99.8%の高い光学純度をもつD－HPGを44%の高収率で容易に得ることができる方法を確立している<sup>91)</sup>。また、この際の不用の対掌体であるL－HPGは山田ら<sup>93)</sup>の方法によって容易にラセミ化ができるので再利用が可能である。

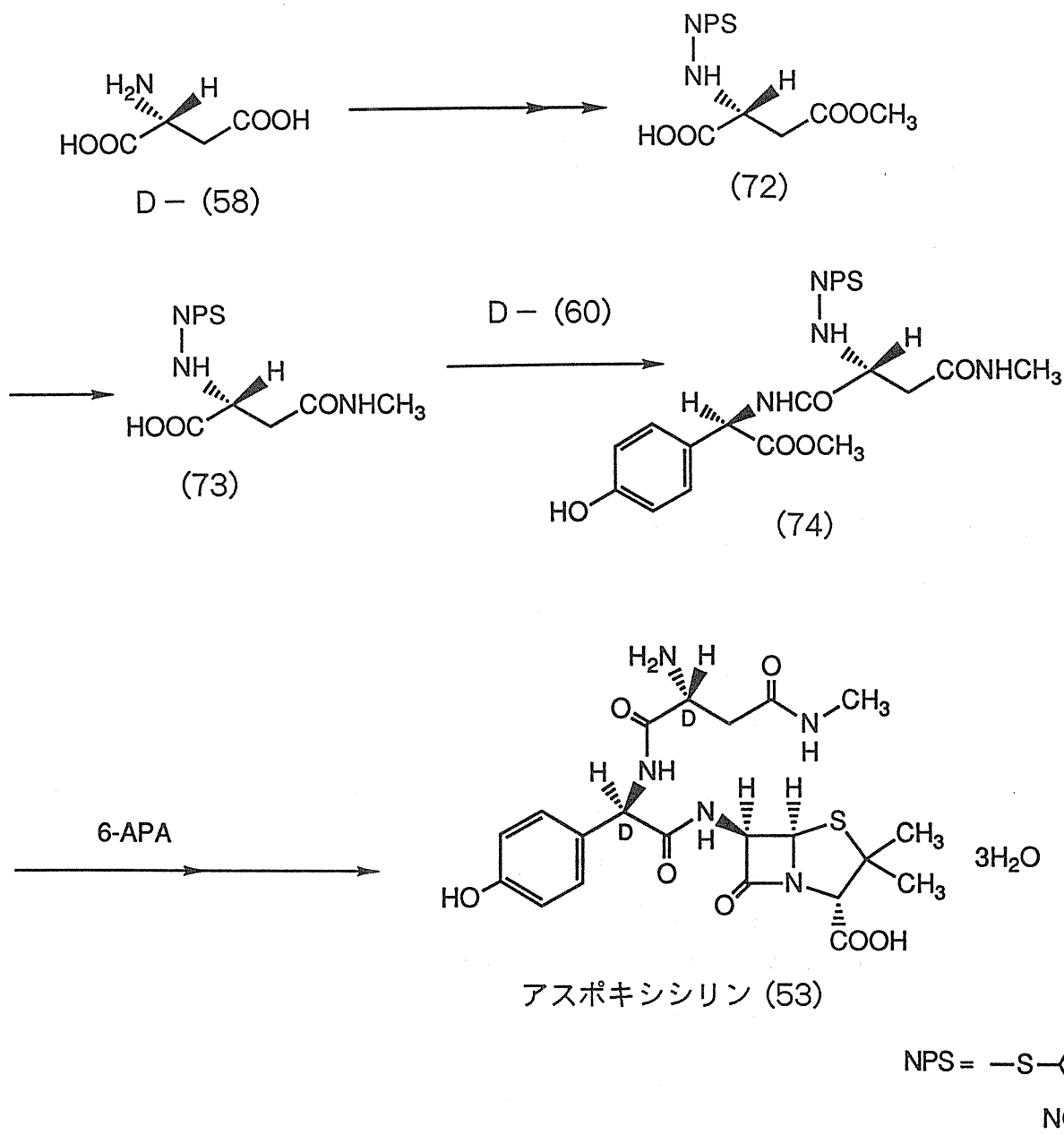
したがって、著者の行った工業的生産に適したDL－HPGの合成法の確立によって、D－HPGの工業的生産を可能にすることができた。



図・41 D-HPGの工業的製法

以上のように、アスポキシシリンの生産に必要なD-アスパラギン酸とD-p-ヒドロキシフェニルグリシンの工業的製法を確立した。これによって、アスポキシシリンの工業的生産を可能にすることができた。

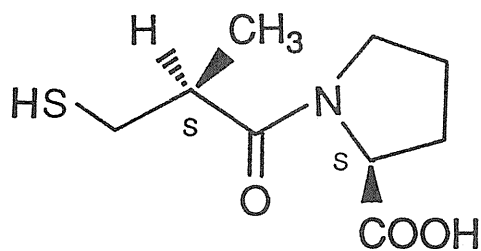
アスポキシシリンはこの二つのD-アミノ酸と6-APAにより次のように合成されている。



図・42 アスポキシシリン (53) の製法<sup>71)</sup>

## 第5章 トランスアミナーゼを利用する 非天然アミノ酸の工業的製法

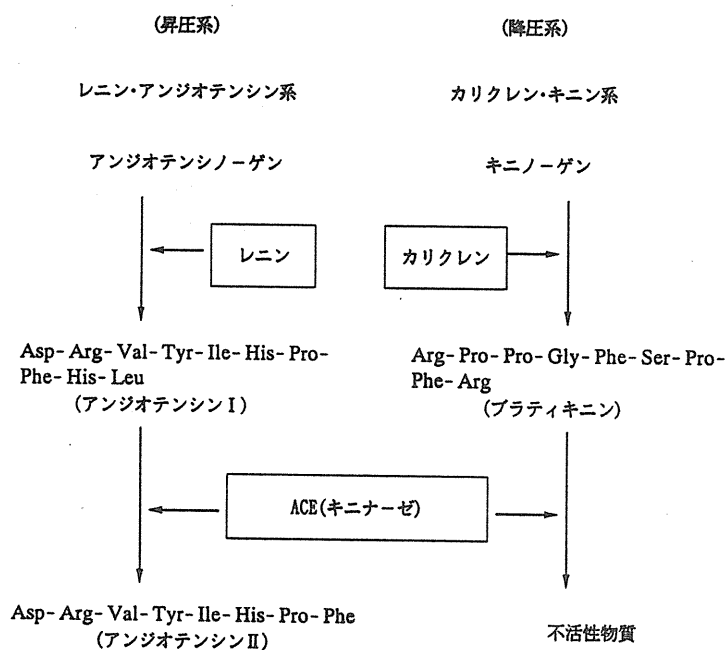
1977年、Ondettiら<sup>94) 95)</sup>により開発されたアンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害薬カプトプリル(75)は酵素活性中心の仮想モデルを想定してデザインし発見された経口投与可能な降圧剤である。



カプトプリル (75)

図・43

生体内における血圧の維持機構には、図・44に示すように昇圧系であるレニン・アンジオテンシン系と降圧系であるカリクレン・キニン系がある。



図・44 生体内における血圧の維持機構

このうち、レニン・アンジオテンシン系は本態性高血圧の重要な要因の一つであると考えられている。まず、血漿中のアンジオテンシノーゲンが蛋白分解酵素レニンによりアンジオテンシン I を産生する。このデカペプチド自身は不活性であるが、さらにアンジオテンシン変換酵素 (ACE) により C 末端からジペプチドユニット (His - Leu) を遊離してオクタペプチドであるアンジオテンシン II に変換される。このアンジオテンシン II は、生体内で最も強力な血管収縮作用をもつ昇圧物質とされている。一方、ACE は比較的非特異的酵素であり、降圧作用を有するブラディキニンをも水解して不活性化する。

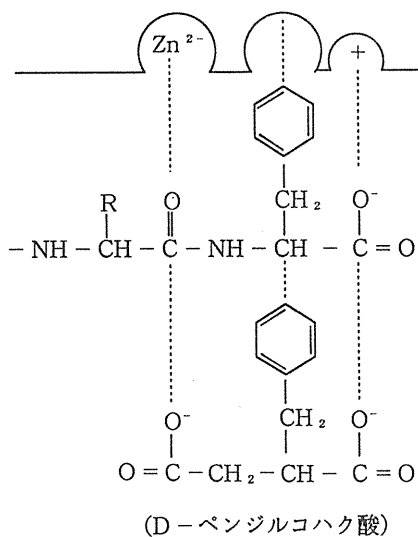
このように、ACE の活性を阻害すれば、ACE 起因のアンジオテンシン II の形成やブラディキニンの分解を阻止でき、高血圧症の治療に有効に使用しうるとの考えから ACE 阻害剤の研究が開始された。

Ondetti らは、(イ) 蛇毒中にブラディキニンの降圧作用を増強する物質 (ポリペプチド) があること、(ロ) 2 - (S) - ベンジルコハク酸が蛋白分解酵素カルボキシペプチターゼを阻害し、この酵素の三次構造や活性部位が明らかにされて ACE と似ていることなどから、酵素活性中心の仮想モデルを想定して ACE 阻害剤の開発研究を行なった。特に、カルボキシペプチターゼと ACE の類似性について、両者共亜鉛を含む酵素であることから ACE が C 末端からアミノ酸 2 個を切断するのに亜鉛が関与している活性部位のモデルを考えた。

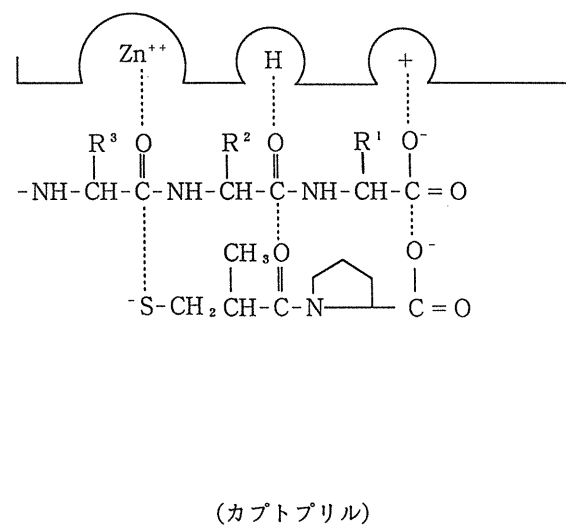
このようにして、モデルにフィットする阻害分子の探求の中からカプトプリル<sup>95)</sup> が開発された。

その後、このカプトプリルの出現は、ACE 阻害作用にもとづく降圧剤の開発に大きなインパクトを与え、仮定した酵素モデルに新しい知見が加えられエナラプリル<sup>96)</sup> (76) をはじめとして多数の降圧剤が開発されている。

### カルボキシペプチダーゼ A



### アンジオテンシン転換酵素



図・45 カルボキシペプチダーゼ A と ACE の活性部位と基質及び阻害物質の結合模式図<sup>95)</sup>

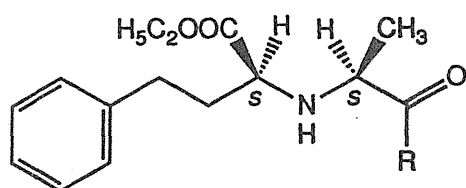
## 第1節 ACE阻害剤の構造

多くのACE阻害剤は、アンジオテンシンIの構造から生まれたものであるため、いずれもC末端のプロリンまたはそれに類似のアミノ酸構造をもっている。

また、構造的にカプトプリル(75)に代表されるように、末端にメルカプト基をもつアシルアミノ酸を含み亜鉛イオンに強く結合する型と、エナラプリル(76)に代表されるように、生体内で二つのカルボキシル基により亜鉛イオンに強く結合する型の二つの種類がある。

しかし、カプトプリルは、SH基に由来する発疹、発熱、味覚障害などの副作用がありそれを回避するため、近年表・12に示すようなエナラプリル型のACE阻害剤の開発研究が盛んである。

表・12 エナラプリル型のACE阻害剤



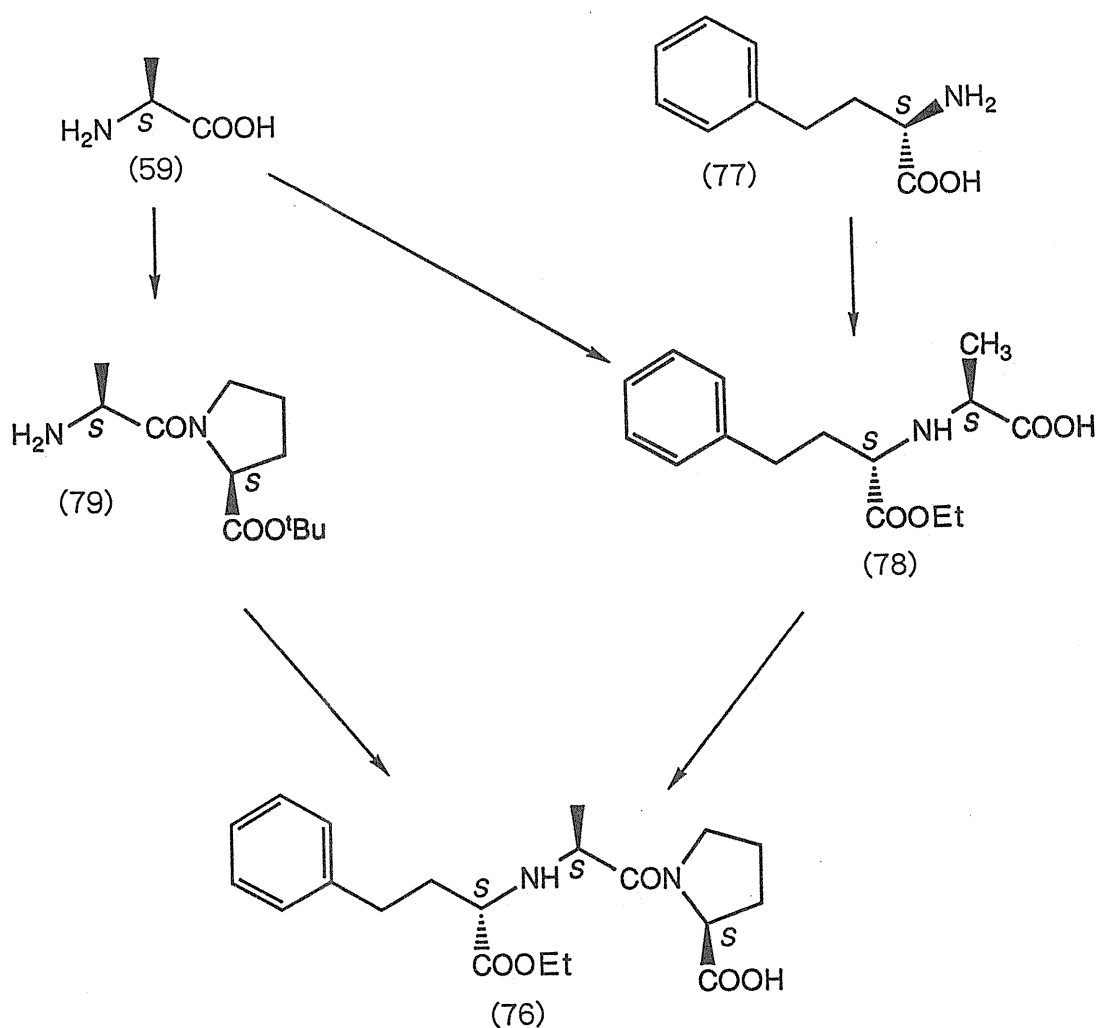
ACE阻害剤	R
Enalapril <sup>96)</sup>	
Ramipril <sup>97)</sup>	
Spirapril <sup>98)</sup>	
Delapril <sup>99)</sup>	
Quinapril <sup>100)</sup>	

## 第2節 エナラプリル類の合成法

エナラプリルを例にあげると、この化合物は①プロリン部、②アラニン部、③アミノ酪酸部から構成されているので、その組み合わせによって種々の合成法が考えられる。

エナラプリル型の側鎖部分  $N - [(1S) - 1 - \text{ethoxycarbonyl} - 3 - \text{phenylpropyl}] - (S) - \text{alanine}$  (78) の絶対配位は  $(S,S)$  であることが ACE 阻害活性発現のために必須条件である。したがって、その有利な合成法としては立体選択的合成法、あるいは光学活性な原料を用いることができる合成法を選択しなければならない。

そのような理由から、図・46に示すように L-アラニン (59) を出発原料とする Patchett ら<sup>101)</sup> や Hoefle ら<sup>102)</sup> の方法、および光学活性のアミノフェニル酪酸 (77) を出発原料とする林ら<sup>103)</sup> や高瀬ら<sup>104)</sup> の方法が検討されている。



図・46 エナラプリル類の合成法



これらの方法のうち、L-アラニンを用いるルートは高価な還元剤 (NaBH<sub>3</sub>CN) を使用しなければならないことやラセミ化が起こりやすく、また立体選択性に問題があって光学的精製を繰り返さなければならない等の工業化上致命的な欠点がある。他方、L-アミノフェニル酪酸を用いるルートは安価な副原料 (R-乳酸) を使用でき、高収率で立体選択的合成が可能であるので工業的見地から一番有利な方法と云える。

そこで、著者はACE阻害剤合成のキー化合物となるL-2-アミノ-4-フェニル酪酸(77)の工業的合成法を検討した。

### 第3節 L-2-アミノ-4-フェニル酪酸の工業的製法

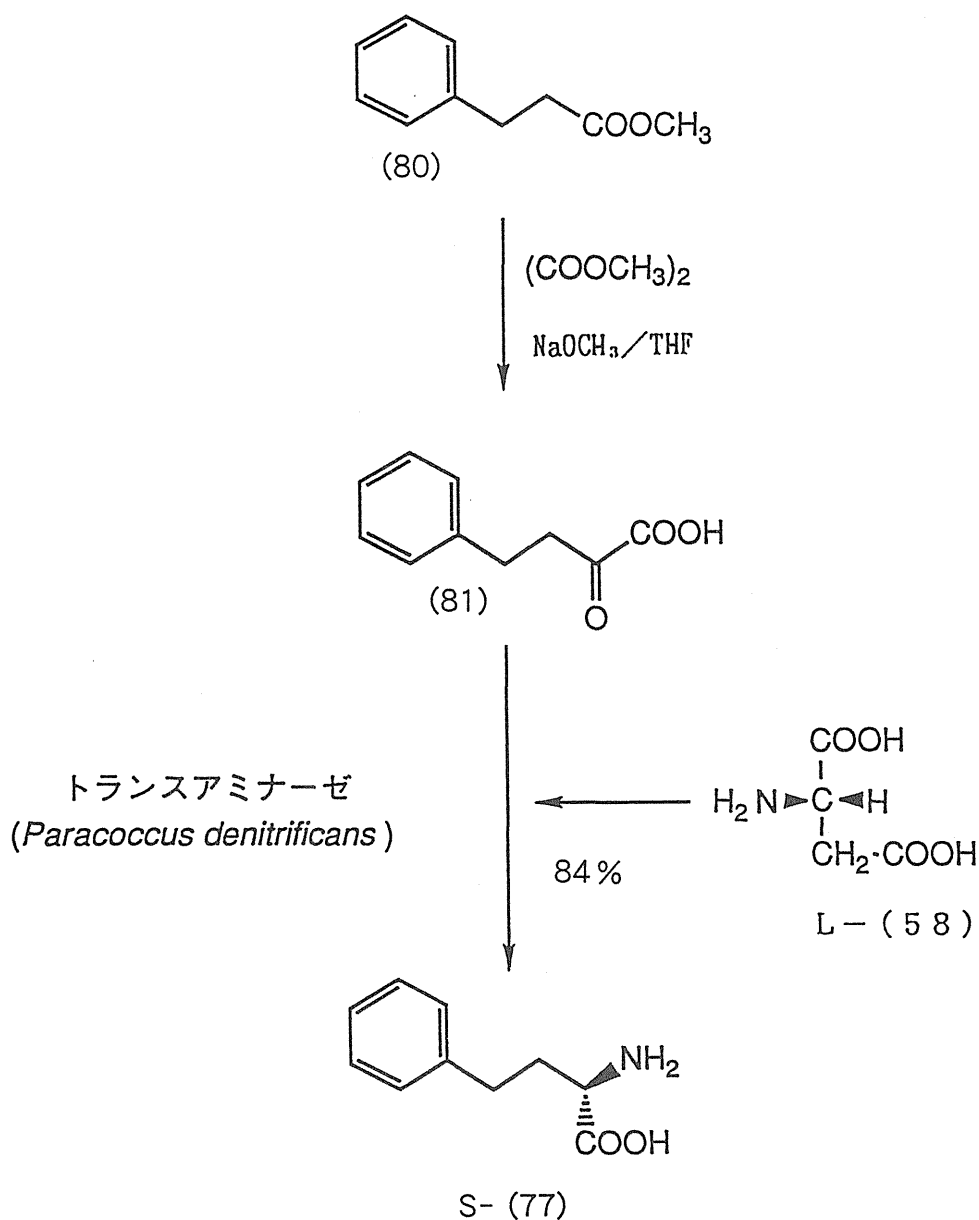
L-2-アミノ-4-フェニル酪酸の製法は、次の三方法が知られている。

- (I) フェニルプロピオン酸から化学合成して得たDL-アミノフェニル酪酸をN-ホルミル化後、ブルシンで光学分割する方法<sup>105)</sup>
- (II) DL-アミノフェニル酪酸をエステル化後アンモニアでカルボン酸アミド体とし、酵素によって不斉加水分解する方法<sup>106)</sup>
- (III) DL-アミノフェニル酪酸を光学活性マンデル酸で光学分割する方法<sup>107)</sup>

これらのうち (I)、(II) の方法は、ホルミル化やアミド化により一旦誘導体に変換しなければならず、(III) の方法は、収率が25%と低く実用的な方法ではない。

そこで著者は、酵素(トランスアミナーゼ)を用いて $\alpha$ -ケト酸に他のL-アミノ酸のアミノ基を転位させることによってL-2-アミノ-4-フェニル酪酸を製造する方法を検討した。その結果、図・47に示すような経済的にも有利な工業的製造法を確立できた。

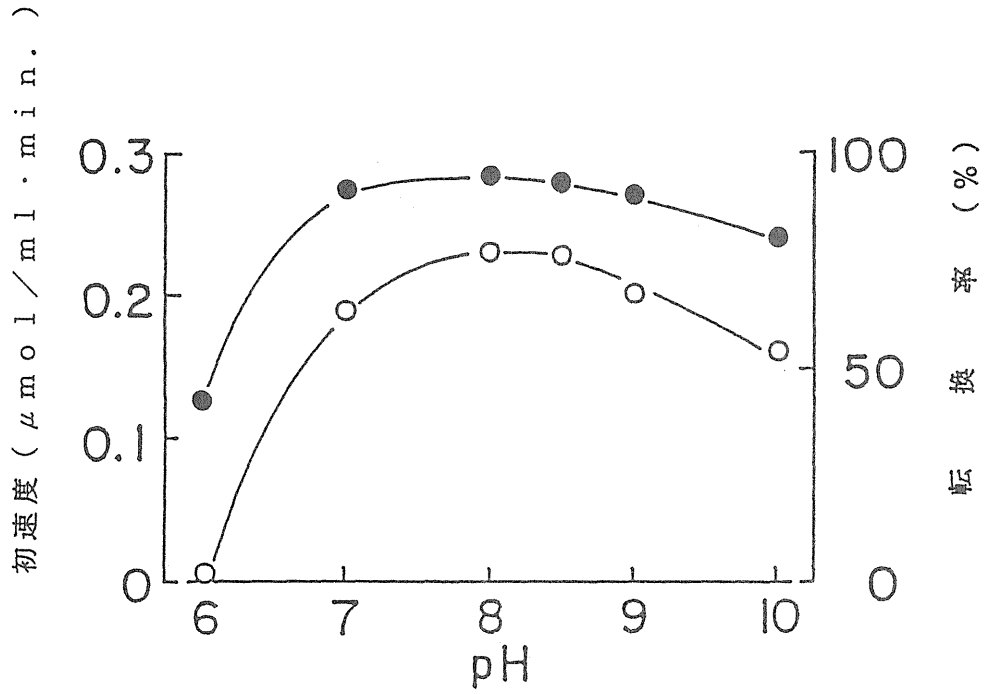
$\alpha$ -ケト酸を生化学的に直接相当するL-アミノ酸に変換する代表的な方法として、酵素を利用して還元的にアミノ化する方法、あるいは他のL-アミノ酸のアミノ基を転位させる方法等があるが、このような生化学反応を利用する場合には、例えば、ピルビン酸をL-アラニンに変換させる酵素が、オキザロ酢酸をL-アスパラギン酸へは変換することができない等、使用酵素に高い基質特異性が認められる。そのため、生体物質の変換にはその反応を触媒する酵素が存在するとしても、生体物質でない2-オキソ-4-フェニル酪酸を処理しうるか否かは予想できなかった。又、トランスアミネーションは可逆反応でその平衡定数は、一般に、 $k_1/k_2 = 1.0$ 付近にあるため目的とするアミノ酸の収率が50%を越えないことが多い。



図・47 L-2-アミノ-4-フェニル酪酸の工業的製法

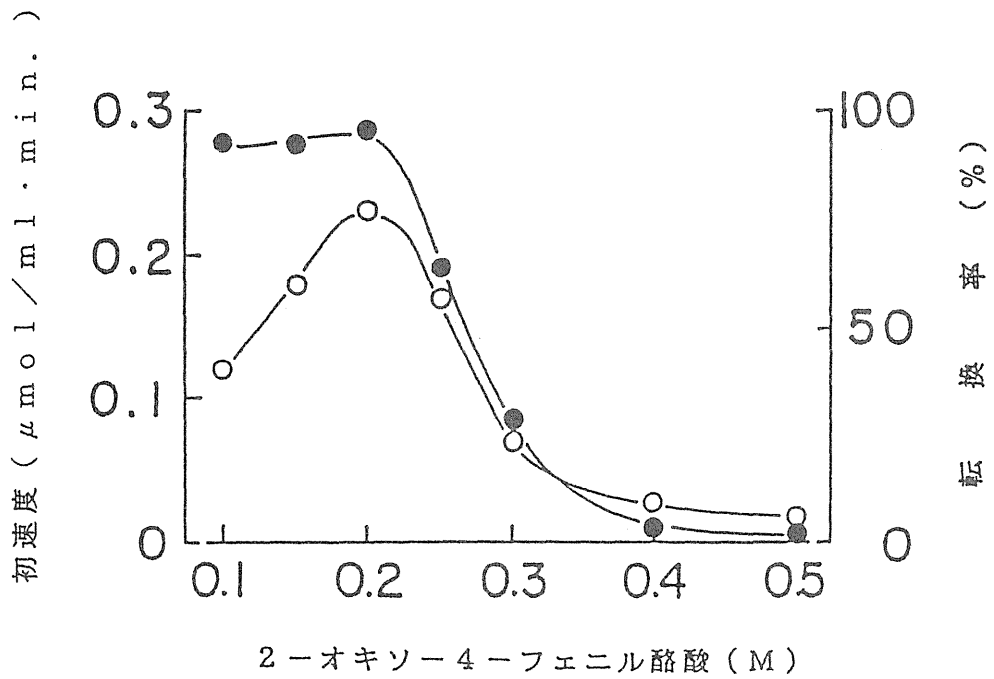
そこで著者は、各種微生物を検索した結果、アクロバクター属、バチルス属、パラコッカス属に属する微生物の培養液から得られた菌体、または菌体の抽出物にヒドロ桂皮酸から合成した2-オキソ-4-フェニル酪酸(81)を基質として用い、工業化上必須な酵素反応の初速度および反応転換率に及ぼす各パラメーター(pH、基質濃度、アミノ供与体の種類)の影響について詳細な検討を行なった。

これらの結果、図・48、図・49、表・13に示すような事実が判明した。



図・48 初速度および転換率に対する pH の影響

○ : 初速度      ● : 転換率



図・49 初速度および転換率に対する基質濃度の影響

○ : 初速度      ● : 転換率

表・13 初速度および転換率に対するアミノ供与体（種類）の影響

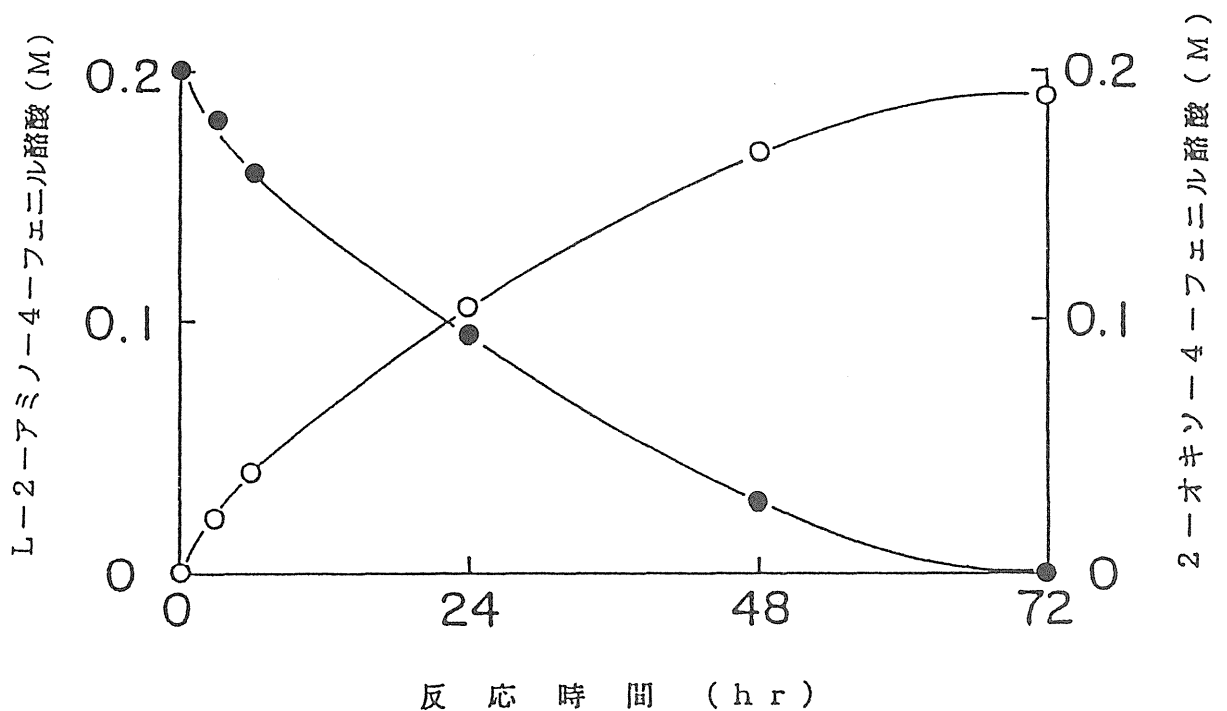
アミノ供与体の種類	初速度 ( $\mu\text{mol}/\text{ブロスml}\cdot\text{min.}$ )	転換率 (%)
L-アスパラギン酸	0. 2 3	95. 0
L-グルタミン酸	0. 5 2	85. 0
L-アラニン	0. 1 1	7. 5
その他のアミノ酸*	0~0. 1	5. 0

\*L- Arg,L- Gys, GLY,L- His,L- Ile,L- Leu,L- Lys,L- Met,  
L- Pro,L- Ser,L- Thr,L- Val.

- ・ pH : 8.0~8.5の間で最も高い活性を示し、転換率はpHが8.0の場合に最高値がえられた。
- ・ 基質濃度 : 0.2M以上では初速度が激減し、また転換率も大幅に低下する。したがって0.2Mが最適であった。
- ・ アミノ供与体 : 検討した16種のアミノ酸のうちL-アスパラギン酸、L-グルタミン酸が他のアミノ酸に比較して圧倒的に高い転換率を示した。  
また、L-グルタミン酸はL-アスパラギン酸に比較して初速度が約2倍であったが、理論量の85%で反応は停止し、一方L-アスパラギン酸は95%まで転換することが認められた。これは、副生する各々のケト酸の分解の難易の差に比例している。従って、アミノ供与体としてはL-アスパラギン酸が最も良い結果を与えた。

以上のように最適な条件を確立できたので、工業的スケールでの生産をおこなった。

まず、培養液にL-アスパラギン酸を溶かし、2-オキソ-4-フェニル酪酸をpHが6.0以下にならないように苛性ソーダ液で調整しながら添加する。30℃、3日間反応し析出晶を濾取、精製して84%の収率で高純度（~100% ee）のL-2-アミノ-4-フェニル酪酸を得た。この時の反応のタイム・コースを図・50に示す。



図・50 L-2-アミノ-4-フェニル酪酸製造時のタイム・コース

○ : L-2-アミノ-4-フェニル酪酸

● : 2-オキソ-4-フェニル酪酸

このようにして、エナラプリル等の ACE 阻害剤の合成に必要な L- (77) の製法を検討し、アミノ供与体として安価な L-アスパラギン酸を用いる工業的に有利な方法を確立した。すなわち、生体内物質でない 2-オキソ-4-フェニル酪酸へのアミノ基転位が酵素によって触媒されることを見出し、非天然型アミノ酸である L- (77) の合成に成功した。

また、この方法は、連続的に長時間微生物を使用するための安定化法として菌体を κ-カラギーナン等に包み込み固体触媒 (固定化微生物) とし使用することも可能で、工業的生産に適した極めて実用的な方法である。これによって降圧剤として有用なエナラプリル型の ACE 阻害剤の工業的生産を可能とすることが出来た。

## 総論

緒言で述べたように現在臨床に用いられている医薬品のうち、かなりのものがキラリティを有しているが、天然物由来のものを除いた合成医薬品においてはそのほとんどがラセミ体として用いられている。その歴史的背景には、従来光学活性化合物のエナンチオマー間における薬理作用の差異についての科学的な解明が遅れていたことと、工業的スケールで効率的に光学活性化合物を製造することが極めて困難であったことが原因として挙げられる。

しかしながら近年、光学活性化合物のエナンチオマー間における薬理作用、薬物動態、代謝経路、毒性等の差異が明らかにされるにおよんで、キラリティーをもつ医薬品の開発にあたってはラセミ体ではなく、目的とする薬理作用を100%発揮し、かつ安全性に優れたエナンチオマーを選択することが要望されるようになった。

我が国の新薬製造申請指針においても各エナンチオマーの吸収、分布、代謝、排泄のデータの添付が要望されるに到っている。また最近米国食品医薬品局（FDA）においてもキラリティを有する医薬品の申請に関するガイドラインが発表され、ラセミ体を開発するか、エナンチオマーを開発するかの決定はそれぞれの物理化学的、薬理的、さらには臨床試験成績の比較データにもとずいての判断が必要となろうとされている。

医薬品の開発研究における国際化の進行は近年目覚ましいものであり、光学活性医薬品の必要性に関するこのような動向は、ただちにグローバルな趨勢として定着しつつある。

一方、光学活性化合物の合成に関する研究の発展も近年目覚ましいものがあり、特に不斉触媒を用いる不斉合成等によって極めて高純度の光学活性化合物を得る方法が報告されつつある。しかしながらその多くは高価な汎用性に乏しい不斉源や危険性のある試薬を使用し、反応条件も厳しい制約を必要とする等、その適用は実験室的レベルにとどまるものが殆どである。それらの研究の発展は光学活性化合物の合成についての学問的発展に大きく寄与し、将来の実用化への基盤を築くものであるが、直ちに工業的に適用できるものではない。

医薬品産業の国際化に伴って、光学活性化合物医薬品の生産に際してもそのコストには常に世界的な競争下におかれるので、経済性をそなえた工業的に実施可能な製造法の確立が必須となる。

本研究はこのような背景の下に、不斉中心を有する医薬品は、必要な絶対配置をもつ光学活性体として開発すべきであるとの観点に立って、5種類の光学活性医薬品の工業的生産についてあくまで実用的な製法の開発を目的として行ったものである。これら光学活性医薬品の製法設計において、著者が掲げた基本的理念はつぎの5項目に要約される。

1. 不斉源として分割剤や酵素を用いる場合はそれが安価で、容易に入手でき汎用性があること。
2. 光学分割をおこなうにあたっては、合成工程のなかで、できるだけ初期のステップの中間体を分割の対象として選択すること。
3. 得られた光学活性体が工程でラセミ化されず、高い光学純度を有する目的の医薬品にまで導かれるような反応条件を選択すること。
4. 光学分割の際に得られる不用の対掌体を、ラセミ化またはエピメリ化によって容易に再利用する方法を確立すること。
5. 酵素反応を利用する場合は、酵素を固定化し連続的な反応を可能にすること。

工業的生産にとって必須なこれらの基本理念にもとづき、5種類の光学活性医薬品の製造法を検討した結果、以下に要約するような製造法を確立することに成功し、それらの工業的生産を可能にすることができた。

#### [1] ビオチン

ビオチンの工業的製法として、Goldbergらの方法に着目し、その製造工程中、工業的に有利な光学分割法を検討した。Goldbergらは最終工程に近いチオフェニウム塩をカンファースルホン酸銀を用いて分割しているが、この方法は分割剤に汎用性がなく、更に不用の対掌体が再利用できない。又 Gereckeらは工程の初期の中間体の光学分割をエフェドリンやコレステロールを用いて行っているが、収率も低く分割剤が極めて高価である。

そこで著者は工程の初期の中間体であり、分子の対称性の良いヒドロキシラクトン体 (22) に着目し、このものに直接光学活性アミンを作用して開環させ、アルデヒド-カルボン酸のアミン塩として光学分割する全く新しい方法を開発した。この塩は酸処理によって容易にヒドロキシラクトン体を再生した。

この方法によって、シンコニジンを用いて高収率でヒドロキシラクトン体の光学分割に成功したが、更に著者はより汎用性のある分割剤を求めて検討した結果、D-グルコースから容易に得られるN-アルキル-D-グルカミン誘導体が同様に効率の良い分割剤であることを見出すことが出来た。

このうち、特にN-n-ブチル-D-グルカミン (27a) は容易に、しかも安価に合成することができ、分割収率も最も高く、工業的な使用に最も適した分割剤であることを明らかにした。このものを用いて得られる光学活性ヒドロキシラクトン体 [(3a S, 6 R, 6a R)-22] は後の工程でラセミ化することなく高い光学純度のビオチンに導かれた。

一方、この光学分割の際に得られる不用の対掌体 [(3a *R*, 6 *S*, 6a *S*) - 22] の再利用については、このものを酸化してメゾージカルボン酸 (16) に戻してリサイクルして再利用することを考え、種々の酸化剤を検討した。その結果、極めて安価な酸化剤である亜塩素酸ナトリウムを用いてアルデヒド基を酸化し、容易に高収率でメゾージカルボン酸 (16) を得る方法を完成することができた。

このように、合成工程の初期の中間体であり、分子の対称性の良いヒドロキシラクトン体 (22) を巧みに利用することにより、効率的な光学分割と不用の対掌体の再利用に成功した。

これによって、ビオチンの工業的製造が可能になり、現在大量生産が実施されている。

## [2] デノパミン

ジギタリス以来はじめて開発された経口強心剤であるデノパミンは、*R*配置の水酸基を有するフェニルエタノールアミン誘導体であり、対応する*S*体には強心作用がない。

デノパミンはその前駆体である*O*-ベンジル体 (33) を*N*-アセチル-*D*-フェニルアラニンを用いて容易に光学分割することができる。

そこで著者は、デノパミンの工業的生産にとって不可欠な不用の対掌体 (*S*-33) の再利用法の検討を実施した。

その結果、*S*-33を*N*-アセチル体 (*S*-34) に導き、酸処理することによりラセミ化することに成功した。

更に、著者は、ラセミ化による再利用よりも*S*-33を必要な*R*体に直接変換することが出来れば、より有効な再利用法となると考え、*S*-33のエピメリ化を検討した。

$\beta$ -アミノアルコール類の*N*-アセチル誘導体は、塩化チオニルとの反応により $S_N2$ 型の反転反応を起こし、オキサゾリン環を形成し、次いでこれを加水分解することにより、水酸基の反転が行われることが知られている。

そこで、*N*-アセチル体 (*S*-34) を塩化チオニルと処理し、次いでアルカリ加水分解を行った所、水酸基の完全な反転反応が進行し、光学的に純粋な*R*-33を高収率で得ることに成功した。

これにより光学分割の際に得られる不用の対掌体 (*S*-33) は、簡単な操作で必要な*R*-33に変換し再利用することができた。

この工業的な再利用法の確立によって、デノパミンの工業的生産が可能になった。



### [3] ジルチアゼム

ジルチアゼムは、二つの不斉炭素を有する1,5-ベンゾチアゼピン誘導体であって、抗カルシウム作用にもとづく狭心症、高血圧症の治療剤として世界的な評価を受けている。その絶対配置は2*S*, 3*S*であり対掌体である2*R*,3*R*体に比し2倍の安全域をもつ。

井上らはジルチアゼムの合成工程中、出発原料に近い中間体であるスレオ-ニトロカルボン酸(49)をシンコニジンによって光学分割している。

しかしながら、この方法では先に析出する難溶性塩は、不用の2*R*, 3*R*体のシンコニジン塩であるために、必要な2*S*, 3*S*体の塩はあらためて母液から取得することによって得られていた。また、シンコニジンは高価であり、工業的原料として高純度のものを大量に安定して入手することは極めて困難である。

そこで著者は、スレオ-ニトロカルボン酸(49)の光学分割において安価で、しかも所望の立体配置をもつジアステレオマーが難溶性塩として得られるような分割剤を探索、検討した結果、天然型アミノ酸の一種であるL-リジンによる工業的分割法を確立することができた。

このL-リジンによる分割法は、二種のジアステレオマー塩の溶解度差が非常に小さいにもかかわらず目的の塩が選択的に育晶するものであり、このように極めてまれな動力学的分割に成功し、ラセミ体に対して1/2モルのL-リジンを用いることによって高純度の目的の2*S*, 3*S*体の塩を高収率で得ることができた。

この結果、ジルチアゼムの工業的生産が初めて可能になり、現在世界100ヶ国にわたって輸出されており、グローバルな需要に応える生産体制を確立することができた。

なお、光学分割の際に得られる不用の対掌体[(2*R*, 3*R*) - 49]の再利用については、このものから導かれるジルチアゼムの対掌体の誘導体が優れた血小板凝集抑制作用を有し、有望な抗血栓剤としての開発が進められるに到ったので、ジルチアゼム生産への再利用の検討は中止した。

### [4] アスポキシシリン

新しい合成ペニシリン剤であるアスポキシシリンは、6-アミノペニシリン酸の側鎖にD-アスパラギン酸とD-p-ヒドロキシフェニルグリシンをもつユニークな構造を有し、この二つのアミノ酸のD-型配置がアスポキシシリンの優れた抗菌作用には必須である。従って、この二つの非天然型アミノ酸の工業的製法を確立することがアスポキシシリンの生産にとって必須であった。

D-アスパラギン酸については、酵素法による合成が簡便であると考えて、まず、フマル酸にアンモニアを付加させるDL-アスパラギン酸の合成を検討した。その

結果、従来の方法を改良し、液体アンモニアを用いる緩和な条件を確立し、大幅な収率の上昇を達成した。

次に、DL-アスパラギン酸からD体の製造には、L-アスパラギン酸脱炭酸酵素を用いる方法を検討した結果、DL体のうちL体のみこの酵素が作用して脱炭酸を行い、L-アラニンを生じ、一方、D-アスパラギン酸が未反応物として容易に得られることを見出した。すなわち、本法によって目的のD-アスパラギン酸が高収率で得られるとともに、医薬品や食品添加物として有用なL-アラニンを同時に得ることができた。

さらに著者はこの反応の連続化を試み、酵素を含む菌体を $\kappa$ -カラギーナン中に包み込み固定化して、固体触媒として連続使用することに成功した。これによってフマル酸から一貫してD-アスパラギン酸とL-アラニンを製造する工業的生産システムを確立した。

一方、D-p-ヒドロキシフェニルグリシンの製造については、これまで工業的に満足すべき方法のなかったDL体の合成法について検討を重ねた結果、フェノールとグリオキシ酸とアンモニア水を用いる従来の合成法を大幅に改良し、アンモニア源として酢酸アンモニウムを用い中性付近で反応を行うことにより、反応の進行につれて目的物が結晶として析出してくるという極めて操作性に優れた方法を確立することができた。

このDL体の光学分割については、汎用性に優れたR-フェニルエタンスルホン酸(71)による効率的な分割法と、不用の対掌体のラセミ化による再利用が既に完成されており、著者のこの工業的に有利なDL体の合成法の確立によってD-p-ヒドロキシフェニルグリシンの工業的製造法が完成された。

このように、アスポキシシリンの合成に必要な二つの非天然型アミノ酸の工業製法を確立することができ、アスポキシシリンの工業的生産を可能にした。

#### [5] L-2-アミノ-4-フェニル酪酸 (ACE阻害剤合成中間体)

エナラプリルに代表されるACE阻害剤は、いずれもその側鎖にホモフェニルアラニン残基を有しており、その絶対配置はSであることが酵素阻害作用の発現に必須である。

そこで著者は、これらに共通する重要な中間体であるL-2-アミノ-4-フェニル酪酸(77)の工業的製法の検討を行った。

本化合物の製法としては、従来、ラセミ体を光学分割するか、対応するアミド体を酵素によって不斉加水分解する方法が知られているが、いずれも効率的な工業的製法ではない。

そこで著者は、 $\alpha$ -ケト酸にトランスアミナーゼを用いて、他のL-アミノ酸のアミノ基を転位させる酵素法を検討した。一般にトランスアミナーゼの作用には、高い

基質特異性が存在することが知られており、生体物質ではない $\alpha$ -ケト酸に適用できるか否かは予想できなかった。しかしながら著者は各種微生物を検索した結果、パラコッカス属の *Paracoccus denitrificans* の培養液から得られるトランスアミナーゼを2-オキソ-4-フェニル酪酸に作用させ、アミノ供与体として安価なL-アスパラギン酸を用いることによって、一挙に目的のL-2-アミノ-4-フェニル酪酸を高い光学純度で、しかも84%という高収率で得ることに成功した。

この方法は、微生物の安定化法として $\kappa$ -カラギーナン等に包み込み、固定化して連続的に使用することも可能であり、工業化条件に適した製造法を確立することができた。

この結果、各種のACE阻害剤の製造に必須なL-2-アミノ-4-フェニル酪酸の工業的製法を確立し、新しいACE阻害剤の開発を容易にすることができた。

以上、著者は不斉中心を有する医薬品は必要な絶対配置をもつ光学活性体として開発すべきであるとの観点に立って、5種類の光学活性医薬品の工業的製造法の研究を行い、いずれについても著者が掲げた基本理念にもとづいた製造法を確立することに成功し工業的生産を可能とし、それらを光学活性体として医療の場に提供することができた。

## 謝 辞

本論文をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御教示を戴きました城西大学薬学部教授 菊川靖雄先生に深甚なる感謝の意を表します。

また、種々有益な御助言を賜りました城西大学薬学部教授 渡辺利郎先生、同山内昌茂先生、同土屋勝躬先生に深く感謝致します。

本論文の御校閲、御指導を賜りました東京大学名誉教授 山田俊一先生に心から感謝申し上げます。

本研究は田辺製薬株式会社で行われたものであり、本研究の機会を与えてくださり、過分の御便宜、御鞭撻を戴きました代表取締役会長 足立慶次郎氏、代表取締役社長 千畑一郎博士、代表取締役副社長・生産本部長 木之下八郎氏、専務取締役・研究開発本部長 齋藤清一博士、取締役・大阪工場長 長尾祥介氏、取締役・製品研究所長 山田茂樹博士に深く感謝致します。

さらに本研究の遂行にあたり、終始多大なる御指導と御教示を戴きました取締役・有機化学研究所長 武田幹男博士に深謝致します。

また本研究の当初から御指導と御助言を戴きました前 製薬技術室長 大城進博士、応用生化学研究所長 土佐哲也博士、製薬技術室長 井上一三博士に心から感謝申し上げます。

本研究に際し御助力を賜りました応用生化学研究所 佐藤忠司博士、松本和男博士、有機化学研究所 飯島郁夫博士、製薬技術室 大和英作博士、西本茂氏、瀬戸正彦博士、古井正勝博士、中道勝彦博士に感謝致します。

本研究に御協力戴きました絹卷明生博士、伊達忠正氏、岡村公生氏、柴崎昌隆氏をはじめとする応用生化学研究所、有機化学研究所、製薬技術室、大阪工場の諸氏に心からお礼申し上げます。

## 実験の部

融点はすべて未補正である。赤外線吸収 (IR) スペクトルは島津 IR - 420 型分光計、質量分析 (MS) スペクトルは日本電子 JEOL JMS - HX - 100 型、旋光度は Perkin - Elmer <sup>1</sup>H 243 型、<sup>1</sup>H - 核磁気共鳴 (<sup>1</sup>H - NMR) スペクトルは日立 R - 90 型、又は日本電子 JEOL JNM - GSX - 400 型を用いて測定した。化学シフトは、tetramethylsilane (TMS) より  $\delta$  値 (ppm) で示し、J 値はヘルツ (Hz) で示した。(略記 : s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad)。

液体クロマトグラフィ (HPLC) は、島津 LC - 6A 型および LC - 3A 型を、アミノ酸の分析は、既知アミノ酸を内部標準とした HPLC 法 (島津 LC - 6A 型) および大腸菌 (*Esherichia coli*) の固定化膜にアンモニアガス電極を組合せた田辺製薬 (株) 製 バイオセンサーを用いて測定した。

有機溶媒層の乾燥にはすべて芒硝を用いた。

### 第 1 章の実験

(3a RS, 6 SR, 6a SR) - 1, 3 - Dibenzyl - 6 - hydroxy - 3, 3a, 6, 6a - tetrahydro - 1 H - furo [3, 4 - d] imidazole - 2, 4 - dione (22) の合成 —— (3a RS, 6 SR, 6a SR) - 1, 3 - dibenzyl - 6 - acetoxy - 3, 3a, 6, 6a - tetrahydro - 1 H - furo [3, 4 - d] imidazole - 2, 4 - dione (18)<sup>43</sup> (50g, 0.13mol) を conc. HCl (50ml) と dioxane (150ml) の溶液に加え、室温で 2 時間 30 分攪拌した。反応後 H<sub>2</sub>O (500ml) で希釈し、AcOEt で抽出した。有機層を水洗し濃縮した。残渣 (43.6g) を Me<sub>2</sub>CO - Et<sub>2</sub>O - petroleum ether で再結晶し hydroxylactone 体 [(3aRS, 6SR, 6aSR) - 22] (37.4 g, 84%) を得た。mp 113 - 116°C (*Lit.*<sup>52</sup> mp 110 - 113°C). IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{Nujol}}$  cm<sup>-1</sup>: 3205, 1795, 1660, 1230, 1110, 915, 700. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3.87 (1H, d,  $J$  = 8.6Hz, C<sub>6a</sub>-H), 4.04 (1H, d,  $J$  = 8.6Hz, C<sub>3a</sub>-H), 4.29 (1H, d,  $J$  = 14.8Hz, 3-N-CH<sub>2</sub>), 4.37 (1H, d,  $J$  = 15.2Hz, 1-N-CH<sub>2</sub>), 4.51 (1H, d,  $J$  = 15.2Hz, 1-N-CH<sub>2</sub>), 4.94 (1H, d,  $J$  = 14.8Hz, 3-N-CH<sub>2</sub>), 5.1 (1Hbr, s, C<sub>6</sub>-OH), 5.47 (1H, s, C<sub>6</sub>-H), 7.2 ~ 7.4 (10H, m, aromatic). 等モル量の cinchonidine の存在下で NMR を測定すると、C<sub>6</sub> - H のピークが消失し、 $\delta$ : 8.97 ppm と 9.03 ppm にアルデヒド基のプロトンに帰属される 2 組のピークが観察された。

Cinchonidine を用いる (3a RS, 6 SR, 6a SR) - 22 の光学分割 —— (3a RS, 6 SR, 6a SR) - 22 (43.6g, 0.13mol) を Me<sub>2</sub>CO (193ml) に溶かし、cinchonidine (19.5g, 0.066 mol) と H<sub>2</sub>O (64.4ml) を室温に加えた。一旦透明な溶液となったのち結晶の析出が始まる。3 時間後 10°C 以下に冷却し、析出した結晶をろ取、Me<sub>2</sub>CO で洗浄して (4 S, 5 R) - 1, 3 - dibenzyl - 5 - formyl - 2 - oxo - 4 - imidazolidinecarboxylic acid (25) の cinchonidine 塩 (36.7g, 45%)

を得た。mp 138.5-142.5°C.  $[\alpha]_D^{24} - 55.8^\circ$  (  $c = 0.5$ , MeOH ). *Anal.* Calcd for  $C_{38}H_{40}N_4O_5 \cdot H_2O$ : C, 70.13; H, 6.51; N, 8.61; O, 14.75. Found: C, 70.07; H, 6.65; N, 8.56; O, 14.97. IR  $\nu_{\text{Max}}^{\text{Nujol}} \text{cm}^{-1}$ : 3080, 2715, 1691, 1618, 1585, 1220, 1065, 1047, 704. MS (FAB)  $m/z$ : 295  $[(M+H)^+]$ ; cinchonidine], 339  $\{[M+H]^+$ ; (25)  $\}$   $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.91 (1H, dd,  $J = 9.7$  and 2.5 Hz,  $C_5\text{-H}$ , changed to d ( $J = 9.7$  Hz by irr. at  $\delta 8.97$ ), 4.15 (1H, d,  $J = 9.7$  Hz,  $C_4\text{-H}$ ), 4.21 (1H, d,  $J = 14.9$  Hz, 3-N- $\text{CH}_2$ ), 4.29 (1H, d,  $J = 14.9$  Hz, 1-N- $\text{CH}_2$ ), 4.8 (overlapped with  $\text{H}_2\text{O}$ , 1-N- $\text{CH}_2$ ), 5.01 (1H, d,  $J = 14.9$  Hz, 3-N- $\text{CH}_2$ ), 8.97 (1H, br, s, CHO), 7.26 (10H, m, aromatic). Cinchonidine 部分の  $\delta$  値 (H数): 1.28 (1H), 1.76 (1H), 2.03 (3H), 2.60 (1H), 2.97 (1H), 3.11 (1H), 3.34 (2H), 4.99 (1H), 5.02 (1H), 5.55 (1H), 6.23 (1H), 7.58 (1H), 7.71 (1H), 8.02 (1H), 8.13 (1H), 8.90 (1H).

(4*S*, 5*R*)-25 の cinchonidine 塩 (36g, 0.057mol) を 6.25% HCl に溶かし、分離した油分を AcOEt で抽出した。抽出液を水洗後、乾燥し濃縮した。残渣を  $\text{Me}_2\text{CO-Et}_2\text{O}$ -petroleum ether で再結晶して (3*a S*, 6*R*, 6*a R*)-22 (17.9g, 42%) を得た。

mp. 129-130°C (*Lit.*<sup>52)</sup> mp 130-131°C).  $[\alpha]_D^{25} + 28.1^\circ$  ( $c = 1$ , benzene). (*Lit.*<sup>52)</sup>  $[\alpha]_D^{25} + 28.0^\circ$  ( $c = 1$ , benzene)). 本品の NMR スペクトルは、前記ラセミ体 [(±)-22] に一致した。

(4*S*, 5*R*)-25 の cinchonidine 塩の母液を濃縮し、残渣に 10% HCl (25ml) を加えた。AcOEt で抽出、水洗後、乾燥し濃縮した。残渣を  $\text{Me}_2\text{CO-Et}_2\text{O}$ -petroleum ether から再結晶して (3*a R*, 6*S*, 6*a S*)-22 (15.9g, 36.5%) を得た。mp 129-130°C  $[\alpha]_D^{25} - 27.8^\circ$  ( $c = 1$ , benzene)

Quinine を用いる (3*a RS*, 6*SR*, 6*a SR*)-22 の光学分割 MeCOEt 22ml と  $\text{H}_2\text{O}$  2ml の混液に quinine (3.24g, 0.01mol) と (3*a RS*, 6*SR*, 6*a SR*)-22 (3.38g, 0.01mol) を室温で加えた。析出した結晶をろ取、MeCOEt (4ml) と petroleum ether (2 ml) の混合液で洗浄し、(4*S*, 5*R*)-25 の quinine 塩 (2.23g, 33.6%) を得た。mp 94-97°C.  $[\alpha]_D^{25} - 86.4^\circ$  ( $c = 1$ , MeOH). この quinine 塩 (2.0g, 3mmol) を cinchonidine 塩の場合と同様の処理を行って脱塩し、(3*a S*, 6*R*, 6*a R*)-22 (0.88g, 30%) を得た。mp 128-129°C.  $[\alpha]_D^{25} + 27.9^\circ$  ( $c = 1$ , benzene).

N-n-Butyl-D-glucamine (27a) の合成 D-glucose (54g, 0.3mol)、n-butyl-amine (21.9g, 0.3mol) を MeOH (120ml) に加え 1 時間還流した。 $\text{H}_2\text{O}$  (7.5ml) を加えたのち、Raney-Ni (W-5, 10.8g) を用いて常法通り水素化した (60°C, 10 atm.)。触媒をろ過し、ろ液を濃縮後残渣を EtOH で再結晶して N-n-butyl-D-glucamine (27a) (49.8g, 70%) を得た。mp 130-133°C (*Lit.*<sup>53a)</sup> mp 129-131°C).  $[\alpha]_D^{25} - 15.3^\circ$  ( $c = 1$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) [*Lit.*<sup>53a)</sup>  $[\alpha]_D^{25} - 14.3^\circ$  ( $c = 1$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ )]

N-[3-(Dimethylamino)propyl]-D-glucamine (27b) の合成—— 27a と同様の方法で N,N-dimethyl-1,3-propanediamine より 68.4 % の収率で 27b を得た。

mp 110-112°C.  $[\alpha]_D^{25} - 18.7^\circ$  (c = 1, MeOH). *Anal.* Calcd for  $C_{11}H_{26}N_2O_5$ : C, 49.61; H, 9.84; N, 10.52. Found: C, 48.95; H, 9.87; N, 9.77. IR  $\nu_{\text{Max}}^{\text{Nujol}} \text{cm}^{-1}$ : 3310, 3240, 1090, 1050, 1015.  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 1.55 (2H, m, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.10 (6H, s, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.2 (2H, t,  $J = 7\text{Hz}$ , CH<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub>), 2.5 (2H, m, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.59 (2H, m, NH-CH<sub>2</sub>CH), 3.3~3.4 (3H, m, CHOH, CH<sub>2</sub>OH), 3.48 (1H, m, CHOH), 3.59 (1H, dd,  $J = 10.8$  and  $3.5\text{Hz}$ , CHOH), 3.64 (1H, m, CHOH).

N-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-D-glucamine (27c) の合成—— 27a と同様の操作で 27c を 63.7 % の収率で得た。mp 134-135°C  $[\alpha]_D^{25} - 8.3^\circ$  (c = 1, MeOH)

*Anal.* Calcd for  $C_{11}H_{26}N_2O_5$ : C, 55.64; H, 7.88; N, 4.06. Found: C, 55.73; H, 7.96; N, 3.96. IR  $\nu_{\text{Max}}^{\text{Nujol}} \text{cm}^{-1}$ : 3340, 3240, 1590, 1520, 1265, 1050.  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2.63 (2H, m, NHCH<sub>2</sub>CH), 2.7 (4H, m, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.35 (2H, m, CH<sub>2</sub>OH), 3.4 (1H, br, d,  $J = 8.5\text{Hz}$ , CHOH), 3.48 (1H, m, CHOH), 3.58 (1H, m, CHOH), 3.65 (1H, m, CHOH), 3.71 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.73 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 6.70 (1H, dd,  $J = 8.1$  and  $1.8\text{Hz}$ , aromatic), 6.80 (1H, d,  $J = 1.8\text{Hz}$ , aromatic), 6.84 (1H, d,  $J = 8.1\text{Hz}$ , aromatic)。

27a による (3a RS, 6 SR, 6a SR)-22 の光学分割—— 7% 含水 CH<sub>3</sub>CN (189ml) に (3a RS, 6 SR, 6a SR)-22 (31.5g, 0.09mol) と 27a (11.0g, 0.046mol) を加えた。10 - 25°C で 24 時間攪拌し、沈殿した結晶をろ取、7% 含水 CH<sub>3</sub>CN で洗浄して 28a (24.65g, 46%) を得た。mp 84-87°C.  $[\alpha]_D^{25} - 14.0^\circ$  (c = 1, DMF). *Anal.* Calcd for  $C_{29}H_{41}N_3O_9$ : C, 60.51; H, 7.30; N, 7.1. Found: C, 59.67; H, 7.21; N, 7.11. MS (FAB) m/z: 576 [M+H]<sup>+</sup>. IR  $\nu_{\text{Max}}^{\text{Nujol}} \text{cm}^{-1}$ : 3280, 3030~3080, 1672, 1627, 1245, 1050.  $^1\text{H-NMR}$  (CD<sub>3</sub>OD:DMSO- $d_6 = 10:1$ )  $\delta$ : 4.38 and 4.40 (1H, d,  $J = 15\text{Hz}$ , 1-N-CH<sub>2</sub>), 4.67 and 4.82 (1H, d,  $J = 15\text{Hz}$ , 1-N-CH<sub>2</sub>), 3.95 and 4.01 (1H, d,  $J = 15\text{Hz}$ , 3-N-CH<sub>2</sub>), 4.94 (1H, d,  $J = 15\text{Hz}$ , 3-N-CH<sub>2</sub>), 3.78 (1H, d,  $J = \text{ca. } 10\text{Hz}$ , C<sub>4</sub>-H), 3.50 and 3.51 (1H, dd,  $J = \text{ca. } 10\text{Hz}$  and  $2.5\text{Hz}$ , C<sub>5</sub>-H), 4.65 and 4.76 (1H, d,  $J = 2.5\text{Hz}$ , O-CHOH), 7.26 (10H, m, aromatic). N-n-butyl-D-glucamine 部分の  $\delta$  値 (H 数): 0.96 (3H, -CH<sub>3</sub>), 1.40 (2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.67 (2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.99 (2H, N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.12 and 3.16 (2H, CH-CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>), 4.04 (1H, CH-CH<sub>2</sub>), 3.81 (1H, CHOH), 3.25 (1H, CHOH), 3.66 (1H, CH<sub>2</sub>-CHOH), 3.63 (2H, -CH<sub>2</sub>OH).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta_c$ : 96.0 and 97.8 (O-CHOH).

H<sub>2</sub>O (300ml) と AcOEt (300ml) の混液に 28a (24g, 0.04mol) を攪拌しながら加え、10% HCl (50ml) を滴下した。分離した有機層を水洗、乾燥後濃縮した。残査を Me<sub>2</sub>CO-Et<sub>2</sub>O-petroleum ether から再結晶して (3a S, 6 R, 6a R)-22 (13.7g, 44.7%) を得た。

mp 129-130°C.  $[\alpha]_D^{25} + 27.9^\circ$  (c = 1, benzene)。本品の NMR スペクトルは (±)-22 と一致した。

28aの母液は濃縮し、残渣に10% HCl(25ml)を加え AcOEtで抽出した。AcOEt層を水洗、乾燥し濃縮した。残渣をMe<sub>2</sub>CO-Et<sub>2</sub>O-petroleum etherで再結晶し(3a *R,S*, 6a *S*)-22 (13g, 41.5%)を得た。mp 128-130°C [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> - 27.8° (c = 1, benzene).

27bによる(3a *R,S*, 6a *S,R*)-22の光学分割—— EtOH (20ml)とMe<sub>2</sub>CO (20ml)の混合液に(3a *R,S*, 6a *S,R*)-22 (10g, 0.03mol)と27b(7.9g, 0.03mol)を加え55°C 30分攪拌したのち、25°Cで1夜放置した。析出した結晶をろ取、28b(7.9g, 44.2%)を得た。mp 148-149°C. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> - 60.6° (c = 1, MeOH). *Anal.* Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>·H<sub>2</sub>O: C, 59.59; H, 7.33; N, 9.27; O, 23.81. Found: C, 59.88; H, 7.37; N, 9.01; O, 23.66. (1分子の結晶水が加熱重量熱分析・TGAと示差熱分析・DTAで確認された。) MS(FAB) m/z: 587 [M + H]<sup>+</sup>. IR  $\nu_{\text{Max}}^{\text{Nujol}} \text{cm}^{-1}$ : 3420, 3240, 1697, 1612, 1220, 1025. <sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4.55(1H, d, *J* = 15.6Hz, 1-N-CH<sub>2</sub>), 4.71(1H, d, *J* = 15.6Hz, 1-N-CH<sub>2</sub>), 3.77(1H, d, *J* = 14.8Hz, 3-N-CH<sub>2</sub>), 4.74(1H, d, *J* = 14.8Hz, 3-N-CH<sub>2</sub>), 3.46(1H, d, *J* = 8Hz, C<sub>4</sub>-H), 3.13(1H, br, t, *J* = 8Hz, C<sub>5</sub>-H), 4.63(1H, d, *J* = 9Hz, -O-CH-N), 7.2 ~ 7.4(10H, m, aromatic). *N*-[3-(dimethylamino)propyl]-*D*-glucamine部分の $\delta$ 値(H数); 1.72(2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.39 and 2.95 (1H×2, CH-CH<sub>2</sub>-N), 2.58(2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.62(6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.65(2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.33(1H, CHOH), 3.36(2H, CH<sub>2</sub>-NMe<sub>2</sub>), 3.5(1H, CHOH), 3.54(1H, CHOH), 3.97(1H, -O-CH-CH<sub>2</sub>).

28b(7.7g, 0.013mol)をH<sub>2</sub>O(100ml)にけん濁し、10% HCl(17ml)を加え、分離した油状物をAcOEtで抽出した。有機層を水洗を行って濃縮した。残渣をMe<sub>2</sub>CO-Et<sub>2</sub>O-petroleum etherで再結晶して、(3a *R,S*, 6a *S,R*)-22(4.1g, 42.0%)を得た。mp 128-129°C. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 28.1° (c = 1, benzene). 本品のNMRスペクトルは(±)-22と一致した。

27cによる(3a *R,S*, 6a *S,R*)-22の光学分割—— Me<sub>2</sub>CO(50ml)とH<sub>2</sub>O(6ml)の混液に(3a *R,S*, 6a *S,R*)-22(8.46g, 0.025mol)と27c(4.32g, 0.0125mol)を加えた。25°C 48時間攪拌後析出した結晶をろ取し、含水Me<sub>2</sub>COで洗浄して28c(7.44g, 43.5%)を得た。mp 109-111°C. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> - 2.7° (c = 1, MeOH). *Anal.* Calcd for C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>11</sub>: C, 61.48; H, 6.63; N, 6.15; O, 25.74. Found: C, 61.39; H, 6.81; N, 6.07; O, 25.75. MS(FAB) m/z: 684 [M + H]<sup>+</sup>. IR  $\nu_{\text{Max}}^{\text{Nujol}} \text{cm}^{-1}$ : 3280, 1671, 1631, 1615, 1520, 1240, 1055, 1035. <sup>1</sup>H-NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 4.6(1H, 1-N-CH<sub>2</sub>), 4.75(1H, 1-N-CH<sub>2</sub>), 4.3(1H, 3-N-CH<sub>2</sub>), 4.8(1H, 3-N-CH<sub>2</sub>), 4.2(1H, d, *J* = 9Hz, C<sub>4</sub>-H), 3.9(1H, C<sub>5</sub>-H), 4.7(1H, -O-CHOH), 7.3(10H, m, aromatic). *N*-(3,4-dimethoxyphenethyl)-*D*-glucamine部分の $\delta$ (H数); 2.6(2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ar), 2.8(2H, N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.95 and 3.15(2H, N<sup>+</sup>H<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH), 3.9(1H, CHOH), 3.9(1H, CHOH), 3.3~3.6(4H, CHOH×2, CH<sub>2</sub>OH).



28c (7.0g) を10% HClで処理し、分離した油分を AcOEtで抽出した。有機層を水洗後濃縮して、残査をMe<sub>2</sub>CO-Et<sub>2</sub>O- petroleum etherで再結晶を行い、(3a S, 6 R, 6a R)-22 (3.35g、42.1%)を得た。mp 129.5-131°C。[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> + 28.0° (c = 1, benzene)。

(3a R, 6 S, 6a S)-22 より meso-1, 3-Dibenzyl-1, 3, 3a, 6a-tetrahydro-2 H-furo [3, 4-d] imidazole-2, 4, 6-trione (17) の合成——硝酸銀(44.8g, 0.26mol)をH<sub>2</sub>O(100ml)に溶かし、EtOH (400ml)に溶かした(3a R, 6 S, 6a S)-22 (40.6g, 0.12mol)の溶液に加え、室温で1N-NaOH (600ml)を滴下、5時間同温で攪拌後1夜放置した。不溶物をろ別し、ろ液を10% HClで酸性とし、AcOEtで抽出した。有機層は H<sub>2</sub>O洗、乾燥したのち濃縮した。残査にAc<sub>2</sub>O(60ml)を加え5分間還流を行った。冷却後析出した結晶をろ取、乾燥して無水物(17) (23.6g、58.5%)を得た。mp 233-234°C. (Lit.<sup>43a</sup>) mp 236-237°C.)

(3a R, 6 S, 6a S)-22 より meso-1, 3-Dibenzyl-2-oxo-imidazolidine-4, 5-dicarboxylic acid (16) の合成 a) 臭素による酸化——Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(11.5g)、H<sub>2</sub>O (44ml)、及びAcOEt (44ml) を攪拌し(3a R, 6 S, 6a S)-22 (10g, 0.03mol)を加えた。次いで、Br<sub>2</sub> (5.67g, 0.035mol)を 25°Cで滴下した。同温で4時間30分攪拌後分離した上層を水洗、乾燥し濃縮した。残査にEt<sub>2</sub>Oを加え析出した結晶をろ取、乾燥してジカルボン酸(16) (8.58g、82%)を得た。mp 163-165°C. (Lit.<sup>43a</sup>) mp 167°C).

(b) 亜塩素酸ナトリウムによる酸化——Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(23.3g)、H<sub>2</sub>O (132ml)、(3a R, 6 S, 6a S)-22 (30g, 0.089mol)、及びAcOEt (132 ml)を混合し、NaClO<sub>2</sub>(16.1g, 0.178mol)をH<sub>2</sub>O (127 ml)に溶解した液を 25°Cで滴下した。6時間30分攪拌、35% HClで酸性 (pH 5.0)にし、分離した水層に更に35% HClを加えて pH 1.2とした。油状物をAcOEtで抽出し、有機層を水洗、次いでNa<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>の水溶液で洗い、乾燥して濃縮した。残査にEt<sub>2</sub>Oを加え析出した結晶をろ取、乾燥してジカルボン酸(16) (27.4g、87%)を得た。mp 163-164°C.

*Anal.* Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : C, 64.40; H, 5.12; N, 7.90. Found: C, 63.99; H, 5.14; N, 7.87.

## 第2章の実験

(R,S)-1-(4-Benzyloxyphenyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenethyl) amino] ethanol [(R,S)-33] の光学分割——池崎らの方法<sup>57)</sup> に準拠して次のように実施した。(R,S)-33<sup>57)</sup> (39.5g, 0.097mol) を EtOH(400ml) に加え70°Cで溶解した。これに *N*-acetyl-D-phenylalanine (21.1g, 0.1mol) を攪拌しながら加えた。活性炭(2g) を添加し脱色ろ過を行い、ろ液を冷却し10°Cで2時間攪拌した。析出結晶をろ取、EtOH(50ml) で洗い、(R)-ベンジル体 [(R)-33] の *N*-acetyl-D-phenylalanine 塩 (21.1g, 35.4%) を得た。mp 154~154.2°C. (*Lit*<sup>57)</sup> mp 156~158°C) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> - 45.2° (c = 1, MeOH). [*Lit*<sup>57)</sup> [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> - 44.6° (c = 0.74, MeOH) ]

この *N*-acetyl-D-phenylalanine 塩 (18.2g, 0.0296mol) を MeOH(120ml) に加熱溶解後、4% NaOH 水溶液 (29.6g, 0.0296mol) を滴下した。滴下後減圧下 MeOH を留去し、残渣に水(120ml) を加え、20°C 1時間攪拌した。析出結晶をろ取、水洗、乾燥して (R)-33 (11.84g, 98.18%) を得た。mp 109~110.0°C. (*Lit*<sup>57)</sup> mp 109~110°C) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> - 23.0° (c = 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [*Lit*<sup>57)</sup> [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> - 22.9° (c = 0.72, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)].

母液は減圧下濃縮し、H<sub>2</sub>O(175ml) を加え 45~50°Cに加熱し 25% NH<sub>4</sub>OH(5ml) を滴下して pH を 8.7 とした。1時間同温で攪拌し析出した結晶をろ取、水洗後 AcOEtで再結晶して (S)-ベンジル体 [(S)-33] (19.8g, 33.2%) を得た。mp 108~111°C. (*Lit*<sup>57)</sup> mp 108~109.5°C) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> + 20.8° (c = 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [*Lit*<sup>57)</sup> [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> + 23.8° (c = 0.92, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)]. NMRスペクトルは (R,S)-33 に一致した。

一方、*N*-acetyl-D-phenylalanine の代わりに *N*-acetyl-L-phenylalanine を用いて (R,S)-33 を同様に光学分割すると (S)-ベンジル体の *N*-acetyl-L-phenylalanine 塩 (収率: 35.5%) を得た。mp 154.5~155.5°C. (*Lit*<sup>57)</sup> mp 157~159°C) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>24</sup> + 45.6° (c = 1, MeOH). [*Lit*<sup>57)</sup> [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> + 45.8° (c = 0.9 MeOH)].

(S)-1-(4-Benzyloxyphenyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenethyl) amino] ethanol [(S)-33] のラセミ化 (a) 酢酸溶媒中でのラセミ化——(S)-33 (5.0g, 0.012mol) を酢酸 (50ml) に溶解し、10% HCl(10ml) を滴下した。攪拌しながら50°C、8時間加熱した。冷却後、10%食塩水 (125ml) を加え1夜室温で放置した。析出した結晶をろ取、冷水(25ml) で洗浄し、50°C 5時間減圧乾燥した。得られた結晶(4.66g) を EtOH (22.5ml) と28%アンモニア水(1ml) に加え加熱し溶解した。活性炭(0.45g) を用いて脱色ろ過を行い冷却した。析出した結晶をろ取、冷EtOH (10ml) で洗い、70°C減圧乾燥してラセミ体 [(R,S)-33] (3.0g, 60%) を得た。mp 115~116°C (*Lit*<sup>57)</sup> mp 114~115°C). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> ± 0 (c=1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). 純度 96.7% [HPLC; カラム: DEVELOSIL、移動相: 0.05Mリン酸 Buffer (pH 3.0)/MeOH = 1/1、流速: 1.5ml/min. 検出波長: 210nm ]

最初の母液を濃縮後、10% HCl(10ml)を加えたのち10%食塩水(100ml)を滴下した。析出した結晶をろ取、水洗後乾燥して 7, 8- dimethoxy-1-(4- benzyloxyphenyl)-2, 3, 4, 5-tetrahydro-1*H*-3-benzazepine hydrochloride [閉環体 (35)] (0.96g, 20%)を得た。

mp 251~254°C (dec.)。Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>C1NO<sub>3</sub>: C, 70.49; H, 6.6; N, 3.28。

Found: C, 70.55; H, 6.7; N, 3.31。MS (m/e): 389 (M<sup>+</sup>)。NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O) δ: 2.90~3.02(2H, m), 3.17~3.59(4H, m), 4.62(1H, d, *J* = 7.3Hz), 5.13(2H, s), 6.25(1H, s), 6.90(1H, s), 7.07, and 7.11(2H, d, *J* = 9.0Hz), 7.28~7.49(5H, m)。(b)ギ酸溶媒中でのラセミ化の後のせん(*S*)-33 (5.0g, 0.012mol)をギ酸(50ml)に溶解し、10% HCl(10ml)を滴下した。攪拌しながら50°Cで5時間加熱した。冷却後、10%食塩水(125ml)を加え析出した結晶をろ取、冷水(25ml)で洗浄し、50°C 5時間減圧乾燥し閉環体(35)(4.15g, 83%)を得た。mp 250~252°C (dec.)。純度 96.7% (HPLC)

(c) *N*-アセチル体を経由するラセミ化——(*S*)-33 (25.0g, 0.06mol)を AcOEt(625ml)にけん濁させ、冷却下 10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(625ml)を加えた。攪拌しながら 15°Cで Ac<sub>2</sub>O (62.5ml、0.66mol)を滴下した。1時間後有機層を分取し、水洗を繰り返して洗液の pH を 5~5.5としてから有機層を濃縮した。残渣として得た *N*-acetyl-*O*-benzyl体(35.0g)を酢酸(156ml)に溶解し、10% HCl(37ml)を加え 30°Cで4時間反応を行った。反応液を水中に注ぎ冷却下 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(272g)を加え、pH を 8~9 とした。分離した油状物を AcOEt(650ml)で抽出後濃縮した。残渣(28.1g)を MeOH に溶解し、10% NaOH(270ml)を加えた後5時間還流した。反応後 MeOHを留去し、析出した結晶をろ取水洗、乾燥してラセミ体 [(*R,S*)-33] (21.5g, 86%)を得た。mp 115~116°C。(Lit<sup>57)</sup>, mp 114-115°C)。

(*S*)-1-(4-Benzyloxyphenyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenethyl) amino] ethanol [(*S*)-33] のエピメリ化 —— (a) —— (*S*)-1-(4-Benzyloxyphenyl)-2-[(3,4-

dimethoxyphenethyl) amino] ethanol·*N*-acetyl-*L*-phenylalanine 塩 (122.9g, 0.2 mol) を 2% NaOH(500ml)とCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500ml)の混合液に加え、2~6°Cで攪拌しながら AcCl (18.8g, 0.24mol)の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml)溶液および 10% NaOH(100ml)を同時に滴下した。0~5°Cに40分、室温に1時間攪拌した後有機層を分取した。水層をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で抽出し有機層と合わせ水洗後、乾燥し濃縮した。得られた油状物に (i-Pr)<sub>2</sub>O を加えて結晶化させ、ろ取した。次いで(i-Pr)<sub>2</sub>O とAcOEtの混合液で再結晶を行い、無色板状晶の(*S*)-*N*-Acetyl-1-(4-benzyloxyphenyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenethyl) amino] ethanol [(*S*)-34] (81.3g, 90%)を得た。mp 97~98°C。[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> - 12.77° (c = 1, MeOH)。MS m/z: 449。

Anal. Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>5</sub>: C, 72.13; H, 6.95; N, 3.11。Found: C, 72.04; H, 6.88; N, 3.17。IR ν<sub>max</sub><sup>Neu</sup> cm<sup>-1</sup>: 3230, 1620, 1600, 1515, 1460, 1380, 1250, 1145, 1075, 1030。

NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.87 and 1.99 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO, 回転異性), 2.55-2.89 (2H, m, ArCH<sub>2</sub>-), 3.28-3.80 (4H, m, N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 3.83 (6H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.53 (1H, br, s, OH, D<sub>2</sub>Oで消失), 4.81-5.11 (1H, b Ar-CHOH-), 5.03 (2H, s, PhCH<sub>2</sub>O), 6.54-7.49 (12H, m, aromatic)。

(b) — (S)-34 (31.5g, 0.07 mol) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (120ml) に溶解し、1~3°Cで攪拌しながら  $\text{SOCl}_2$  (12.5g, 0.105mol) の  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20ml) 溶液を滴下した。同温に15分間攪拌後、溶媒および過剰の  $\text{SOCl}_2$  を減圧下に留去した。得られた油分を EtOH (220ml) に溶解し、NaOH (22.4g, 0.56 mol),  $\text{H}_2\text{O}$  (28ml), および EtOH (60ml) の混合液に 3~5°Cで加えた。室温で30分攪拌後3時間還流した。溶媒を減圧下留去し、残査を  $\text{CHCl}_3$  で抽出した。 $\text{CHCl}_3$ 層を 5% HCl で洗浄した後、乾燥して溶媒を留去した。残査を EtOH-(i-Pr)<sub>2</sub>O の混合液で再結晶すると (R)-1-(4-Benzyloxyphenyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenethyl)amino] ethanol hydrochloride [(R)-33·HCl] (25.4g, 82%) を無色針状晶として得た。mp 174~174.5°C。  $[\alpha]_D^{20} - 30.1^\circ$  (c = 1, MeOH)。光学純度: 100% ee. (HPLC条件: *Lit*<sup>108)</sup> に準じキラル試薬法; キラル試薬: L-(-)-β-ナフトレニルホルヒドールクロリド、波長: 254nm, カラム: シリカゲル・4mm×250 mm、移動相: 水飽和ジクロルメタン/酢酸メチル混合液=5/1, カラム温度: 40°C。) *Anal.* Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClNO}_4$ : C, 67.63; H, 6.81; Cl, 7.98; N, 3.15。 Found: C, 67.76; H, 6.76; Cl, 8.05; N, 3.17 IR  $\nu_{\text{Max}}^{\text{Nujol}} \text{cm}^{-1}$ : 3560, 2790, 1605, 1515, 1460, 1380, 1250, 1130, 1030。 NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 2.75-3.43 (6H, br, -CH<sub>2</sub>×3), 3.72 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.74 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.85-5.15 (1H, br, Ar-CHOH-), 5.10 (2H, s, PhCH<sub>2</sub>O), 6.09 (1H, br, OH, D<sub>2</sub>O で消失), 6.63-7.54 (12H aromatic), 9.23 (2H, br, NH<sub>2</sub>)。 (c) — この HCl 塩 (13.32g, 0.03mol) を EtOH (120ml) に加熱溶解後、4% NaOH 水溶 (30.0g, 0.03mol) を滴下した。滴下後減圧下 EtOH を留去し、残査に水 (120ml) を加え、20°C、1時間攪拌した。析出結晶をろ取、水洗、乾燥して (R)-33 (11.86g, 97.0%) を得た。mp 109~110.0°C. (*Lit*<sup>57)</sup> mp 109~110°C)  $[\alpha]_D^{20} - 23.1^\circ$  (c = 1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )。 [*Lit*<sup>57)</sup>  $[\alpha]_D^{27} - 22.9^\circ$  (c = 0.72,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ]。

### 第3章の実験

(2*S*, 3*S*)-2-Hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-3-(2-nitrophenylthio) propionic acid [(2*S*, 3*S*)-49] · L-Lysine 塩の合成—— (2*S*, 3*S*)-49<sup>65</sup> (14g, 0.04mol)をMeOH (280ml)に溶解し、L-lysine (5.8g, 0.04mol)とH<sub>2</sub>O(5.8ml)を30°Cで加えた。同温で30分攪拌後、析出した黄色沈殿物をろ取、含水MeOHで再結晶し、(2*S*, 3*S*)-49のL-lysine塩 (17.1g, 86.5%)を得た。mp 222-223.5°C.  $[\alpha]_D^{25} -103.4^\circ$  (c = 1.0, 1*N* NaOH)。IR  $\nu_{\text{Max}}^{\text{Nujol}} \text{cm}^{-1}$  : 3275, 1590, 1519, 1075 *Anal. Calcd* for C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S : C, 53.32; H, 5.90; N, 8.48; S, 6.47。 *Found*: C, 53.36; H, 5.83; N, 8.44; S, 6.53。<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  : 1.30-2.00 (6H, m), 3.02(2H, t, *J* = 4Hz), 3.70(3H, s), 3.75(1H, t, *J* = 3Hz), 4.35(1H, d, *J* = 2Hz), 4.89(1H, d, *J* = 2Hz), 6.74-7.96(8H, m)。

同様の方法により(2*R*, 3*R*)-49のL-lysine塩を得た。 mp 217.5-220°C。  
 $[\alpha]_D^{25} +112.0^\circ$  (c = 1.0, 1*N* NaOH)。 IR  $\nu_{\text{Max}}^{\text{Nujol}} \text{cm}^{-1}$  : 3276, 1590, 1510, 1075。  
*Anal. Calcd* for C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S : C, 53.32; H, 5.90; N, 8.48; S, 6.47。 *Found*: C, 53.35; H, 5.85; N, 8.45; S, 6.45。

L-Lysine量 (mol比) の分割率への影響—— (±)-49 (7.0g, 0.02mol)をMeOH(105ml)に溶解し、L-lysine (1.1g, 0.0076mol)とH<sub>2</sub>O(1.1ml)を加え、30°C 30分攪拌した。析出した結晶をろ取、MeOH(10ml)で洗浄し、乾燥後(2*S*, 3*S*)-49のL-lysine塩(3.6g, 95.6%)を得た。mp 220-222°C.  $[\alpha]_D^{25} -99.5^\circ$  (c = 1.0, 1*N* NaOH)。この塩の光学純度を前記実験で得た(2*S*, 3*S*)-49、(2*R*, 3*R*)-49 両L-lysine塩の旋光度を基準旋光度として次式によって求めると、96.4%であった。

$$\frac{-99.5 + \frac{-103.4 + 112.0}{2}}{103.4 + \frac{-103.4 + 112.0}{2}} \times 100$$

従って、純度換算の光学分割率は 35.0% となった。同様にして、用いるL-lysineのモル比を変化させ、析出する塩の収率と光学純度に対する影響を調べた。その結果は表・7および図・28に示した。

L-Lysine による (2RS, 3RS)-49 の光学分割 —— (2RS, 3RS)-49 (69.8g, 0.2mol) を MeOH (700ml) に溶かし、L-lysine 水溶液 (L-lysine 14.6g, 0.1mol: H<sub>2</sub>O 14.6ml) を加え室温で1時間攪拌した。析出した結晶をろ取り、黄色結晶 {45.5g,  $[\alpha]_D^{25} -98.0^\circ$  (c = 1.0, 1N NaOH)} を得た。この粗結晶に MeOH (645ml) を加え30分還流した。冷却後結晶をろ取、MeOH で洗浄し (2S, 3S)-49 の L-lysine 塩 (43.2g, 44%) を得た。 $[\alpha]_D^{25} -103^\circ$  (c = 1.0, 1N NaOH) 次いで、熱湯 (1200ml) に溶かし、dil. HCl を加え酸性 (pH 2.1) にした。析出した結晶をろ取り、H<sub>2</sub>O 洗を行って乾燥後 (2S, 3S)-49 [29g, 41.8% from (±)-49] を得た。mp 111°C。(Lit<sup>65</sup> mp 106-109°C)。 $[\alpha]_D^{25} +121^\circ$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>)。{ Lit<sup>65</sup>  $[\alpha]_D^{22} +119.5^\circ$  (c = 1.0 CHCl<sub>3</sub>) }  
光学純度 : 99.7% { HPLC 法 カラム: CHIRALPAK WM (4.6φ × 250mm)、カラム温度: 50°C、移動相: 0.5M 硫酸銅水溶液とアセトリル (4:1) の混液、流速: 0.9-1.0ml/min. 検出: UV230nm }

(2S, 3S)-49 および (2R, 3R)-49 両 L-Lysine 塩 の溶解度 —— (2S, 3S)-49 の L-lysine 塩 (5g) を MeOH (50ml) にけん濁し 30°C、5時間攪拌した。得られた過飽和溶液をろ過し、ろ液から 5ml をサンプリングして 50°C で減圧濃縮、乾固し恒量になるまで乾燥した。残渣の重量 (5.5mg) から (2S, 3S)-49 · L-lysine 塩の溶解度は 0.11g/MeOH · 100ml (at 30°C) となった。同様にして測定した (2R, 3R)-49 · L-lysine 塩の溶解度は 0.45g/MeOH · 100ml (at 30°C) となった。次に、(2S, 3S)-49 · L-lysine 塩 (5.0g) と (2R, 3R)-49 · L-lysine 塩 (5.0g) を MeOH (100ml) にけん濁し 30°C、5時間攪拌した。得られた過飽和溶液をろ過し、ろ液を上記条件の HPLC を用いて両塩が共存した時のそれぞれの溶解度を測定した。その結果は表・8 に示した。

L-Ornithine による (2RS, 3RS)-49 の光学分割 —— (±)-49 (3.5g, 0.01 mol) と NaOH (0.4g, 0.01 mol) を MeOH (30ml) に溶解し、L-ornithine · HCl (0.85g, 0.005 mol) を H<sub>2</sub>O (5ml) に溶かした溶液に攪拌下 30°C で滴下した。1時間後 MeOH (22ml) を加え、析出した結晶をろ取り (2S, 3S)-49 · L-ornithine 塩 (1.46g, 60.6%) を得た。 $[\alpha]_D^{25} -51.8^\circ$  (c = 1.0, 1N NaOH)。光学純度 : 63.1% (HPLC) 分割率 : 38.2%。  
同様に、L-ornithine のモル比を変化させ光学分割を検討した。その結果を次に示す。

L-Ornithine のモル比	分割率
0.1	結晶析出せず
0.3	21.4%
0.7	17.9%
1.0	15.6%

## 第4章の実験

フマル酸 (57) から DL-アスパラギン酸 (DL-58) の合成—— 1 ℓ オートクレーブに H<sub>2</sub>O (456g)、フマル酸 (300g, 2.59mol) を加え、冷却下 Liq. NH<sub>3</sub> (96.72g, 5.69mol) を導入し 130°C に加熱後 16 時間攪拌反応した。(その時の内圧は 3.0~3.3kg/cm<sup>2</sup> であった。) 冷却後減圧下アンモニアを留去し、残渣に H<sub>2</sub>O を加え DL-アスパラギン酸溶液 { 833g、含量 (HPLC) : 31%、DL-アスパラギン酸 として 258.2g (75.1%) } を得た。

{HPLC条件; カラム: ZORBAX BP-NH<sub>2</sub> (4mm X 250mm)、カラム温度: 40°C、検出波長: 220nm、移動相: ベンタンスルフォネート 0.05% 含有のリソ酸 buffer 0.01M (pH 3.0)、流速: 1.0-1.5ml/min. Retention time: DL-アスパラギン酸 = 3.6 min. フマル酸 = 13.8min. }

反応温度と反応時間の収率への影響 —— アンモニア水 (530g, 7.04 mol)、フマル酸 (371.4g, 3.2mol)、H<sub>2</sub>O (136g) を用いて反応温度、時間の収率への影響を検討した。その結果を次表に示す。

反応温度 (°C)	反応時間 (Hr)	反応圧力 (Kg/cm <sup>2</sup> )	DL-アスパラギン酸 (%)
160	1.5 ~ 3	5.3 ~ 6.0	69 ~ 71
150	1.5 ~ 3	4.3 ~ 4.8	69 ~ 73
140	6.0 ~ 9	2.5 ~ 3.9	~ 72
135	9.0 ~ 16	2.3 ~ 2.7	67 ~ 70
130	12 ~ 20	1.6 ~ 3.0	71 ~ 74
120	29 ~ 70	1.4 ~ 1.8	67 ~ 69

DL-アスパラギン酸から D-アスパラギン酸の合成 —— DL-アスパラギン酸水溶液 (1000g, DL-アスパラギン酸として 265.4g: 2.0mol、2M/ℓ) に塩酸 (62.5g) を加え pH を 5.3 としたあと、予め山本らの方法<sup>81a)</sup> で得た L-アスパラギン酸 β 脱炭酸酵素 (*Pseudomonas dacunhae*) の濃縮液 (39.8ml, 2123 U/DL-Asp 265.4g) と α-ケトグルタル酸 (0.11g)、ピリドキサル-5'-リン酸 (5.7mg) を加え 30~40°C、47 時間攪拌反応を行った。反応液を 95°C、10 分間殺菌を行い、25°C 迄冷却した。限外ろ過膜によってろ過後、ろ液に塩酸 (193.5g) を加え pH を 2.8 とし、90°C に加熱した。1 時間後 20°C に冷却し、析出した結晶をろ取、H<sub>2</sub>O 洗 (530ml)、50°C で乾燥して D-アスパラギン酸 (D-58) (99.27g, 37.4%) を得た。[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> - 25.0° (c = 8, 6N HCl)

\* 酵素濃縮液は DL-アスパラギン酸 1g に対して 8 単位 (U) (但し、54.79 U/ml) を使用した。(1 単位; 1 分間に 1 μmol の L-アラニンを生産する活性)

反応率に影響を及ぼす諸因子の検討 (最適条件の設定) —— (a) 実験操作: 反応はプランジャーポンプ、保圧弁付きの加圧型カラム<sup>82)</sup> (5.35  $\phi$   $\times$  50cm, 実容量: 730ml) を使用した。固定化菌体<sup>81a)</sup> (*P.dacunhae*, wet 470g) を加圧型カラムに詰め、ピリドキサーール-5'-リン酸 ( $10^{-4}$  M)、ピルビン酸 ( $10^{-3}$  M) を含有する DL-アスパラギン酸アンモニウム溶液 (pH 6.2) を種々の流速 (37°C) でカラム圧を 8Kg/cm<sup>2</sup> に保ちながら通液した。L-アスパラギン酸、L-アラニンの濃度はカラム出口で測定した。反応形式として加圧反応、常圧反応で比較した。(b) 基質の種類: ① DL-アスパラギン酸 (結晶) {L-アスパラギン酸 (200g) と水 (400ml) を 150°C、2時間 (5 Kg/cm<sup>2</sup>) 加熱しラセミ化を行った。次いで 35% HCl (265ml) を加え 7時間加水分解しアンモニア水で中和、結晶化、乾燥して取得}、② DL-アスパラギン酸溶液 (II) {フマル酸 (348g), 28% アンモニア水 (445ml), H<sub>2</sub>O (400ml) を加熱 (5時間、150°C) して得た溶液} (c) 測定法: L-アスパラギン酸の測定には *Esherichia coli* の固定化膜にアンモニア電極を組合せたバイオセンサーを使用した。L-アラニンは HPLC 法 (条件: 次項記載) で測定した。これら①基質濃度の影響、②基質の種類、③ pH の影響等の検討結果は、表・10、表・11、図・36 に示した。

#### DL-アスパラギン酸から D-アスパラギン酸 (D-58) と L-アラニン (59)

の合成 —— DL-アスパラギン酸溶液 (1848ml、DL-アスパラギン酸含有量: 614.9g、4.6mol) に  $\alpha$ -ケトグルタル酸 (0.311g)、ピリドキサーール-5'-リン酸 (0.05g) を溶解し 35% HCl (31g) を加えて pH を 6.2 に調整し、基質溶液を作成した。一方、山本らの方法<sup>81a)</sup> で得た固定化菌体 (*Pseudomonas dacunhae* /  $\kappa$ -カラギーナン) (1100g, 15U/g $\cdot$ gel) を加圧型カラム<sup>82)</sup> に詰め、カラム下部より 77ml/Hr の流速、8Kg/cm<sup>2</sup> の加圧下で基質溶液を通液した。最初の流出液 (1000ml) を廃棄後、得られたカラム流出液 (1848ml) を H<sub>2</sub>O (647ml) で希釈し、次いで活性炭を加えて脱色ろ過を行った。ろ液を 90°C に加熱し 35% HCl (740g) を加え酸性 (pH = 2.8) とし 15°C に冷却した。析出した結晶をろ取、水洗後 50°C で 24時間乾燥して D-アスパラギン酸 (D-58) (264.4g, 43.0%) を得た。[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> - 25.1° (c = 8, 6N HCl)。[Lit<sup>78)</sup> [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>24</sup> - 24.6° (c = 2, 5N HCl)]。

純度 (HPLC法): 99.7% (HPLC条件: 次項 L-アラニンと同じ)。

母洗液にアンモニア水 (480ml) を加えて pH を 6.0 とし、減圧下濃縮した。析出した結晶をろ取、80% MeOH (190ml) で洗浄後 80°C 1夜乾燥して L-アラニン (59) (154.3g, 37.5%) を得た。[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 12.8° (c = 8, 5N HCl) 光学純度: 97.2% (HPLC)。

[ HPLC条件; カラム/島津 1SC-07/S1507 (強酸性陽イオン交換樹脂、4mm  $\times$  150mm) カラム温度/55°C /L-グルタミン酸 移動相/0.01% n-カプリン酸、0.2% メルカプトエタノール、0.6% 過塩素酸を含有する 2% クエン酸ナトリウム液 流速/0.5ml (min.) 検出法/OPA ]



DL-p-Hydroxyphenylglycine (DL-60) の合成 (NH<sub>4</sub>OH 法) —— (エルトンら<sup>85)</sup> の方法の追試。—— オートクレーブ中 *Liq.* NH<sub>3</sub>とH<sub>2</sub>Oで35% NH<sub>4</sub>OH(700ml) を作成し、phenol (800g, 8.5mol) を加えた後 攪拌しながら 45°C、11時間を要して Glyoxylic acidの水溶液 (glyoxylic acid monohydrate: 92.0g, 1.0mol, H<sub>2</sub>O: 92ml) を滴下した。次いで、1時間同温で攪拌反応後、20°Cに冷却した。(i-Pr)<sub>2</sub>Oで2回 (600ml, 300ml)抽出し、水層を200mlまで減圧下濃縮した。35% HCl(375ml)とH<sub>2</sub>O(25ml)を加えた後5°Cに冷却した。茶褐色の析出した沈殿物(69.52g, 34.1%)をろ取した。この粉末をH<sub>2</sub>O(160ml)に溶解し、活性炭(6g)を加え50°C、15分攪拌した。ろ過後25% NH<sub>4</sub>OHを加えてpH 7.0とし、90°Cに加熱した。10°Cに冷却後、析出した結晶をろ取、H<sub>2</sub>O(500ml)で充分洗浄して乾燥を行ってDL-(60)(47.4g, 28.4%)を得た。mp 225-226°C。純度: 97.1% (HClO<sub>4</sub> 滴定法)。TLC: 1spot (TLC条件; 溶媒:n-BuOH/H<sub>2</sub>O/AcOH = 5/2/1、plate: Kieselgel 60F、検出:UV and 0.2% ninhydrin soln.)

DL-p-Hydroxyphenylglycine (DL-60) の合成 (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>法) —— 40% glyoxylic acid (70.3g, 0.38mol)をH<sub>2</sub>O(130ml)に溶解し攪拌しながらCH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>(75g, 0.97mol)とphenol(60g, 0.64mol)を加えた。35 ~ 35°C、48時間反応後析出した結晶をろ取、H<sub>2</sub>OおよびMeOHで洗浄し50°C 16時間乾燥してDL-(60)(32.3g, 50.4%)を得た。mp 225-228°C。純度: 98.5% (HClO<sub>4</sub> 滴定法)。TLC: 1 spot. (条件:前項記載)CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>に代わり他のアンモニウム塩を用い同様の操作で反応を行った場合のDL-60の収率を次に示す。

HCOONH <sub>4</sub> .....	34.2%
NH <sub>4</sub> Cl .....	30.8%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	27.5%
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> .....	33.7%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	24.0%

## 第5章の実験

2-Oxo-4-phenylbutyric acid (81) の合成 —— THF(183ml)に sodium methyolate (11.85g, 0.22mol) と methyl 3-phenylpropionate (30g, 0.18mol) をけん濁し、冷却下 diethyl oxalate (25.9g, 0.22mol) を加えた。内温37~40°Cで4時間攪拌反応後10°C以下に冷却した。反応液を冷却した3N HCl(90ml)中へ攪拌しながら注入した。有機層を分取し sat. NaCl液(234ml)およびsat. NaHCO<sub>3</sub>液(30)で洗浄した。有機層を減圧下濃縮し、得られたシロップ状の残渣(39g)を7N HCl(240ml)中へ攪拌しながら加え、110°Cまで徐々に加熱しMeOHを留去した。留去後10°Cに冷却し析出した結晶をろ取、氷水(50ml)で洗浄し乾燥を行って 2-oxo-4-phenylbutyric acid (81) (28.54g, 88.1%) を得た。mp 48°C (*Lit*<sup>109</sup>) mp 48-50°C) 純度: 91.7% {HPLC条件; カラム: ナーゲル社製 Nucleocil 10C18(4φ×250mm) 移動相: 0.5%AcOH 含有40%MeOH 流速: 1.0ml/min. 検出: 島津製紫外分光光度計SPD-2A/275nm} TLC: 1 spot {TLC条件; Plate: Kieselgel GF<sub>254</sub>, Solvent: ① toluene/AcOEt=4/1 ② CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH = 85/15/3, 検出: UV 254nm.}

菌体の調製 —— グルコース(1%)、カゼイン加水分解物(1%)、酵母エキス(1%)、リン酸水素2アンモニウム(0.2%)、リン酸水素2カリウム(0.1%)、硫酸マグネシウム(0.05%) 硫酸第一鉄(0.001%), 塩化カルシウム(0.01%)、および カラリン102(0.003%)からなる培地(50ml、pH 7.0)を 120°Cで10分間滅菌した。この培地に *Paracoccus denitrificans* pFPr-1を1白金耳接種後、30°Cで18時間振盪培養した。培養後培養液を遠心分離して集菌したのち、菌体を凍結乾燥し凍結乾燥菌体(0.5g)を得た。

L-2-Amino-4-phenylbutyric acid [(S)-77] の合成 —— 2-oxo-4-phenylbutyric acid (81) (4.0g, 0.0023mol)、L-aspartic acid(L-58) (3.2g, 0.024mol) およびピリドキサルリン酸(0.003g)を H<sub>2</sub>O に溶解し、NH<sub>4</sub>OH で pH を 8.0 としたあとH<sub>2</sub>Oを加えて全体を 100ml とし、この基質溶液に凍結乾燥菌体(1.0g)を加え30°C、48時間反応した。反応液に HCl を加えて生成物を溶解させ、活性炭(2.0)で脱色ろ過した。ろ液をNaOH aq. で pH 5.5 とし、析出結晶をろ取、水洗後減圧下乾燥して (S)-77 (3.4g, 83.7%)を得た。mp 286-288°C (*Lit*<sup>106</sup>) mp 310-313°C) [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>28</sup> +47° (c = 1, 1N HCl) [*Lit*<sup>106</sup>] [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>28</sup> +48.1° (c = 1, 1N HCl) *Anal. Calcd* for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 67.02; H, 7.31; N, 7.82 *Found*: C, 67.09; H, 7.27; N, 7.76 純度: 93.4% {HPLC条件; カラム: ナーゲル社製 Nucleocil 10C18(4φ×250mm); 移動相30%MeOH 流速; 0.7ml/min. 検出; 0-フタルアルデヒド / 蛍光スペクトロメーター}

反応率に影響を及ぼす諸因子の検討（最適条件の設定）—— (a) pHの影響；培養液(100ml)から集菌した菌体と 2-oxo-4-phenylbutyric acid (81) (3.564g, 0.2mol)、L-aspartic acid (L-58) (3.98g, 0.03mol) およびピリドキサル-5'-リン酸(0.026g, 0.1mmol)を含む基質溶液をNaOHaq. で各pHに調整し30°C、48時間反応した。(b) 基質濃度の影響；培養液(100ml)から集菌した菌体に各濃度の 2-oxo-4-phenylbutyric acid (81)、L-aspartic acid (L-58) [(81)に対し1.5倍mol] およびピリドキサル-5'-リン酸(0.1mmol)を含む基質溶液をpH 8.0 としたあと30°C、48時間反応した。(c) アミノ供与体（種類）の影響；培養液(100ml)から集菌した菌体と 2-oxo-4-phenylbutyric acid (81) (0.2mol)、各アミノ酸(0.3mol) およびピリドキサル-5'-リン酸(0.1mmol)を含む基質溶液をpH 8.0 としたあと30°C、48時間反応した。これらの結果を図・48、図・49、表・13に示した。

本論文は下記の報文をまとめたものである。

第1章：

Highly Effective Resolution of 1,3-Dibenzyl-6-hydroxy-3,3a,6,6a-tetrahydro-1*H*-furo[3,4-*d*]imidazole-2,4-dione, an Intermediate for Biotin, with Optically Active Amines and Reutilization of the Unwanted Epimer.

Masaru Senuma, Takehiko Fujii, Masahiko Seto, Kimio Okamura, Tadamasa Date and Akio Kinumaki, *Chem.Pharm.Bull.*, submitted (accepted for publication : October 11, 1989)

第2章：

Reutilization of the Unwanted (*S*)-Isomer of (*R*)-(-)-1-(4-Hydroxyphenyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenethyl) amino] ethanol (DENOPAMINE).

Masaru Senuma, Eisaku Yamato, Tadayuki Koumoto, Mitsunori Gaino, Takayuki Kawaguchi and Takeo Iwakuma, *Chem.Exp.*, 4, 245 (1989)

第3章：

The Practical Resolution of (2*RS*, 3*RS*)-2-Hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-3-(2-nitrophenylthio)propionic Acid, a Key Intermediate for Diltiazem, with L-Lysine.

Masaru Senuma, Masataka Shibasaki, Shigeru Nishimoto, Keijiroh Shibata, Kimio Okamura and Tadamasa Date, *Chem.Pharm.Bull.*, 37, 3204(1989)

第4章：

Industrial Production of D-Aspartic Acid and L-Alanine from DL-Aspartic Acid using a Pressurized Column Reactor containing Immobilized *Pseudomonas dacunhae* Cells.

Masaru Senuma, Osamu Otsuki, Nobuyuki Sakata, Masakatsu Furui and Tetsuya Tosa, *J.Ferm.Bioeng.*, 67, 233 (1989)

第5章：

Industrial Production of L-2-Amino-4-phenylbutyric Acid from 2-Oxo-4-phenylbutyric Acid by *Paracoccus denitrificans* containing Aminotransferase Activity.

Masaru Senuma, Katsuhiko Nakamichi, Koichi Nabe, Shigeru Nishimoto and Tetsuya Tosa, *Appl.Bio.Biotech.*, 22, 141 (1989)

## 引用文献

- 1) E. J. Ariens, *Eur.J.Clin.Pharmacol.*, 26, 663 (1984)
- 2) a) 森 謙治、生物と化学 20, 84 (1982)  
b) A. Gringauz, *Drugs-How they act and Why*, Table 3.2, The C.V. Mosby Co., (1978)  
c) D. Enders, *Chemtech.*, 11, 504 (1981)
- 3) J. Goto, *J.Chromatogr.*, 239, 559 (1982)
- 4) a) H. Echizen, *Clin.Pharmacol.Ther.*, 38, 71 (1985)  
b) B. Volgergesang, *J.Clin.Pharmac.*, 18, 733 (1984)
- 5) L. S. Olanoff, *Clin.Pharmacol.Ther.*, 35, 755 (1984)
- 6) H. Yamada, T. Ichihashi, K. Hirano, H. Kinoshita, *J.Pharm.Sci.*, 70, 112 (1981)
- 7) D. E. Drayer, *Clin.Pharmacol.Ther.*, 40, 125 (1986)
- 8) 山田 俊一、*Pure Chemical Daiichi* ” 12, 1 (1981)
- 9) 加藤 隆一、*医薬ジャーナル* 25, 81 (1989)
- 10) a) 山田 俊一、生物と化学 11, 70 (1973)  
b) 山田 俊一、古賀 憲司、有合化 33, 535 (1975)  
c) 山田 俊一、化学総説 19, 163 (1978)
- 11) P. Newman, *Optical Resolution Procedure for Chemical Compounds*, Vol.1, 2 (1981) Optical Resolution Information Center, Manhattan
- 12) E. Fischer, *Ber.*, 33, 2451 (1899)
- 13) E. Shapiro, R. F. Newton, *J.Am.Chem.Soc.*, 65, 777 (1943)
- 14) 吉岡 龍藏、大槻 理、土佐 哲也、*分離技術* 16 (6), 350 (1986)
- 15) G. D. Y. Sogah, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 3035 (1979)
- 16) a) 大井 尚文、生物と化学 24, 600 (1986)  
b) Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J.Am.Chem.Soc.*, 106, 5357 (1984)
- 17) a) L. F. Fieser, " *Textbook of Organic Chemistry* " p.294 (1950)  
b) 日本化学会編 *実験化学講座* 18巻 上 p.503 (1957)
- 18) A. Collet, J. J. Brienne, J. Jacques, *Chem.Rev.*, 80, 215 (1980)
- 19) J. Jacques, " *Enantiomer, Racemates and Resolution* " John Wiley & Sons (1981)
- 20) 明石 武和、*日化* 83, 417 (1962)
- 21) a) H. Ohru, S. Emoto, *Tetrahedron Lett.*, 1975, 2765  
b) T. Ogawa, T. Kawano, M. Matsui, *Carbohydrate Res.*, 57, C31 (1977)
- 22) G. Stork, T. Takahashi, I. Kawamoto, T. Suzuki, *J.Am.Chem.Soc.*, 100, 8272 (1978)
- 23) K. Mori, *Tetrahedron Lett.*, 1976, 1609

- 24) a) S. Masamune, C. U. Kim, K. E. Wilson, G. O. Spessard, P. E. Georghiou, G. S. Bates, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 3512 (1975)  
 b) S. Hanessian, *Acc. Chem. Res.*, 12, 159 (1979)
- 25) W. Kuhn, E. Braun, *Naturwissenschaften*, 17, 227 (1927)
- 26) A. Moradpour, J. F. Nicoud, G. Balavoine, H. Kagan, G. Tsoucaris, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2353 (1971)
- 27) 原田 馨、日高 才、立体化学 P. 168 (日本化学会編)
- 28) R. Noyori, I. Tanino, M. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 5843 (1979)
- 29) W. S. Knowles, *Acc. Chem. Res.*, 16, 106 (1983)
- 30) K. Tani, T. Yamagata, Y. Tatsuno, Y. Yamagata, K. Tomita, S. Akutagawa, H. Kumobayashi, S. Otsuka, *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.*, 24, 217 (1985)
- 31) a) T. Aratani, *Pure & Appl. Chem.*, 57, 1839 (1985)  
 b) 巖谷 忠俊、有合化, 43, 1134 (1985)
- 32) a) K. Tani, T. Yamagata, S. Akutagawa, H. Kumobayashi, T. Taketomi, H. Takaya, A. Miyashita, R. Noyori, S. Otsuka, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 5208 (1984)  
 b) K. Tani, T. Yamagata, S. Otsuka, S. Akutagawa, H. Kumabayashi, T. Taketomi, H. Takaya, A. Miyashita, R. Noyori, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 600 (1982)
- 33) 千畑 一郎、土佐 哲也、化学増刊 97、p. 145
- 34) a) I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, *Appl. Microbiol.*, 27, 878 (1974)  
 b) T. Tosa, T. Sato, T. Mori, I. Chibata, *ibid.*, 27, 886 (1974)
- 35) a) K. Yamamoto, T. Tosa, K. Yamashita, I. Chibata, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 3, 169 (1976)  
 b) K. Yamamoto, T. Tosa, K. Yamashita, I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1101 (1977)
- 36) 千畑 一郎、化学工学 49、579 (1985)
- 37) 瀬沼 勝、品質管理 39、39 (1988)
- 38) American Chemical Society, *J. Org. Chem.*, 35, 2849 (1970)
- 39) B. W. Langer, Jr., P. Gyorgy, "The Vitamins" Vol. II, p. 306, Academic Press, New York (1968)
- 40) J. Trotter, J. A. Hamilton, *Biochemistry* 5, 713 (1966)
- 41) a) S. A. Harris, D. E. Wolf, R. Mazingo, K. Folkers, *Science*, 97, 477 (1943)  
 b) S. A. Harris, D. E. Wolf, R. Mazingo, R. C. Anderson, G. E. Arth, N. R. Easton, D. Heyl, A. N. Wilson, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 1756 (1944)  
 c) S. A. Harris, N. R. Easton, D. Heyl, A. N. Wilson, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 1757 (1944)  
 d) S. A. Harris, D. E. Wolf, R. Mazingo, G. E. Arth, R. C. Anderson, N. R. Easton,

- K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 2096 (1945)
- 42) D. E. Wolf, R. Mazingo, S. A. Harris, R. C. Anderson, K. Folkers, *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 2100 (1945)
- 43) M. W. Goldberg, L. H. Sternbach, U. S. Patents 2,489,233 [*C.A.*, 45, 184b (1951)]  
2,489,235 [*C.A.*, 45, 186g (1951)], 2,489,238 [*C.A.*, 45, 186a (1951)]
- 44) a) P. N. Confalone, G. Pizzolate, M. R. Uskokovic, *J. Org. Chem.*, 42, 135 (1977)  
b) P. N. Confalone, E. D. Lollar, G. Pizzolate, M. R. Uskokovic, *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 6291 (1978)
- 45) a) S. Lavielle, S. Bory, B. Moreau, M. J. Luche, A. Marquet, *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 1558 (1978)  
b) M. Marx, F. Marti, J. Reisdorff, R. Sandmeier, S. Clark, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 6754 (1977)
- 46) a) H. Ohrui, N. Sueda, S. Emoto, *Agric. Biol. Chem.*, 42, 865 (1978)  
b) P. N. Confalone, G. Pizzolate, E. D. Lollar, E. Baggoiolini, M. R. Uskokovic, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 7020 (1977)  
c) E. J. Corey, M. M. Mehrotra, *Tetrahedron Lett.*, 29, 57 (1988)
- 47) 伊福 欧二、柳 光男、発酵と工業 46, 26 (1988)
- 48) 和泉 好計、農化誌, 58, 891 (1984)
- 49) 日本ビタミン学会編、ビタミン学Ⅱ (東京化学同人社、1980)
- 50) M. W. Goldberg, L. H. Sternbach, U. S. Patent 2,489,232 (1949)
- 51) モーゼス・ウォルフ・ゴールドバーグ、レオ・エッチ・スタンバッハ、日本特許 : 昭27 - 1420
- 52) M. Gerecke, S. P. Zimmerman, W. Achwanden, *Helv. Chim. Acta.* 53, 491 (1970)
- 53) a) パーシー・ジョージ・ホルトン、日本特許 : 特開昭 60 - 126244 [*C. A.*, 95, 6907j, (1981)]  
b) F. Kagan, M. A. Rebenstorf, R. V. Heinzelman, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 3541 (1957)
- 54) a) S. Plaune, D. Heisoler, *Tetrahedron Lett.*, 28, 1404 (1987)  
b) E. Dalcanale, F. Montanari, *J. Org. Chem.*, 51, 569 (1986)  
c) B. S. Bal, W. E. Childers, H. W. Pinnick, *Tetrahedron* (1981) 37, 2091
- 55) a) T. Nagao, *Prog. Med.*, 8, 467 (1988)  
b) 長尾 拓、第9回メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集 P. 111
- 56) a) T. Nagao, T. Ikeo, S. Murata, H. Nakajima, *Jpn. J. Pharmacol.*, 35, 415 (1984)  
b) T. Ikeo, T. Nagao, T. Suzuki, H. Yamada, H. Nakajima, *Jpn. J. Pharmacol.*, 39, 191 (1985)
- 57) 池崎 宗克、海野 徳英、我伊野 三徳、青江 啓一、岩隈 建男、大石 篤郎、*薬誌*, 106, 80 (1986)
- 58) E. D. Hughes, C. K. Ingold, A. D. Scott., *Nature.* 138, 120 (1936)

- 59) F. R. Pfeiffer, J. W. Wilson, J. Weinstock, G. Y. Kus, P. A. Chambers, K. G. Holden, R. A. Hakn, *J. Med. Chem.*, 25, 352 (1982)
- 60) Ger. Pat. 585,164
- 61) W. H. Nagai, S. Kanao, *Ann. Chem.*, 470, 157 (1929)
- 62) H. K. Muller, *Ann.*, 599, 211 (1956)
- 63) J. Zergenyi, U. S. Pat. 4,391,980 (1983)
- 64) *Diltiazem; From Birth to Today* (Tanabe Seiyaku Co. Ltd., 1987)
- 65) 井上 博純、竹尾 聰、河津 光高、釘田 博至、薬誌、93, 729 (1973)
- 66) T. Nagao, M. Sato, H. Nakajima, A. Kiyomoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 21, 92 (1973)
- 67) a) T. Nagao, M. Sato, H. Nakajima, A. Kiyomoto, *Jpn. J. Pharmacol.*, 22, 1 (1972)  
b) T. Nagao, M. Sato, Y. Iwasawa, T. Takada, R. Ishida, H. Nakajima, A. Kiyomoto, *Jpn. J. Pharmacol.*, 22, 467 (1972)
- 68) a) T. Hashiyama, H. Inoue, M. Konda, M. Takeda, *J. Chem. Soc.*, Parkin Trans. 1, 1984 1725  
b) 井上 博純、橋山 富樹、日本特許：特公昭61-18549
- 69) a) 東川 哲郎、釜野 徳明、日本特許：特開昭59-110668  
b) 前田 貞行、光盛 直道、畝田 敬、篠尾 恭隆、高谷 昌弘、日本特許：特公昭63-24511
- 70) a) E. Fogassy, M. Acs, F. Faigl, *J. Am. Soc., Perkin Trans. II*, 1986, 1881  
b) *ibid, idem*, 1988, 1355  
c) A. M. G. Kok, H. Wynberg, *Acta Cryst.*, D43, 1336 (1987)
- 71) M. Wagatsuma, M. Seto, T. Miyagishima, M. Kawazu, Y. Yamaguchi, S. Ohshima, *J. Antibiotics.*, 36, 147 (1983)
- 72) K. E. Price, *Structure-Activity Relationship Among the Semisynthetic Antibiotics* (ed. D. Perlman), P. I. Academic Press (1977)
- 73) J. Wolff, *Ann.*, 75, 293 (1850)
- 74) a) I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, *Appl. Microbiol.*, 27, 878 (1974)  
b) T. Tosa, T. Sato, T. Mori, I. Chibata, *Appl. Microbiol.*, 27, 886 (1974)  
c) T. Sato, T. Mori, T. Tosa, I. Chibata, M. Furui, K. Yamashita, A. Sumi *Biotechnol. Bioen.*, 17, 1797 (1975)  
d) Y. Nishida, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, *Enzyme Microb. Technol.*, 1, 95 (1979)  
e) A. Michael, J. F. Wing, *Ber.*, 17, 2984 (1884)  
f) F. Ehrlich, *Biochem. Z.*, 63, 379 (1914)  
g) C. C. Barker, *J. Chem. Soc.*, 1953, 453
- 75) M. S. Dunn, S. W. Fox, *J. Biol. Chem.*, 493, 101 (1933)



- 76) M. Franke, Y. Liwshitz, Y. Amiel, *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 330 (1953)
- 77) S. M. Birnbaum, L. Levintow, R. B. Kingsley, J. P. Greenstein, *J. Biol. Chem. Soc.*, 194, 455 (1952)
- 78) J. P. Greenstein, J. Parikh, M. Winitz, S. M. Birnbaum, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 953 (1958)
- 79) 依源 太郎、渡辺 テイ子、日本特許：特公昭54-25006
- 80) 吉岡 龍蔵、大槻 理、土佐 哲也、日本薬学会第108回年会講演要旨集 P. 36 (1987)
- 81) a) K. Yamamoto, T. Tosa, I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.*, vol. XXII p. 2045 (1980)  
b) 柿本 俊雄、土佐 哲也、千畑 一郎、発酵と工業 40, 552 (1982)
- 82) M. Furui, K. Yamashita, *J. Ferment. Technol.*, 61, 587 (1983)
- 83) 森本 友章、伊藤 博、瀬沼 勝、土佐 哲也、昭和63年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p. 358
- 84) a) 杉山 晴彦、木村 裕一、日本特許：特公昭58-57420  
b) 千畑 一郎、山田 茂樹、本郷 主税、日本特許：特公昭56-36185
- 85) マイケル・ジョン・エルトン、ジョン・ライトソン・ハリソン、アーサー・ジャクソン、日本特許：特公昭53-43950
- 86) ゲーリー・ジェイ・マシューズ、日本特許：特公昭53-28423
- 87) 武田 英夫、日本特許：特開昭50-40787
- 88) a) 千畑 一郎、日本特許：特開昭50-58285  
b) 白井 忠、日本特許：特開昭50-69039  
c) 浜口 弘幸、日本特許：特開昭50-116434
- 89) a) H. Yamada, S. Shimizu, H. Shimada, Y. Tani, S. Takahashi, T. Ohashi, *Biochimie.*, 62, 395 (1980)  
b) H. Yamada, *Enzyme Engineering.*, 6, 97 (1982)
- 90) 瀬沼 勝、石原 宜彦、西本 茂、大和 英作、日本特許：特公昭59-17104
- 91) R. Yoshioka, M. Tohyama, S. Yamada, O. Ohtsuki, I. Chibata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 60, 432 (1987)
- 92) 吉岡 龍蔵、大槻 理、瀬沼 勝、昭和63年度日本化学会第57秋季年会講演予稿集II p. 524 (1988)
- 93) S. Yamada, C. Hongo, R. Yoshioka, I. Chibata, *J. Org. Chem.*, 48(6), 873 (1983)
- 94) M. A. Ondetti, B. Rubin, D. W. Cushman, *Science*, 196, 441 (1977)
- 95) D. W. Cushman, H. S. Chenug, E. F. Sabo, M. A. Ondetti, *Biochemistry*, 16, 5484 (1977)
- 96) A. A. Patchett, E. H. Haris, M. J. Tristram, *Nature* 288, 280 (1980)
- 97) *Drugs Fur.* 1985: 10 (5), 400
- 98) *Drugs Fur.* 1987: 12 (9), 400

- 99) *Drugs Fur.* 1984: 9 (5), 324
- 100) *Drugs Fur.* 1983: 8 (12), 1014
- 101) A. A. Patchett, M. J. Wyvratt, M. S. Lohr, E. W. Tristram, T. J. Ikeler, H. Joshua, J. P. Springer, B. H. Arison, *J.Org.Chem.*, 49, 2816 (1984)
- 102) M. L. Hoefle, S. Klutchko, *Eur.Pat.Appl.*, 49, 605
- 103) K. Hayashi, K. Nunami, J. Kato, N. Yoneda, M. Kubo, T. Ochiai, R. Ishida, *J.Med. Chem.*, 32, 289 (1989)
- 104) a) 高瀬 一郎、佐藤 和夫、後藤 幸久、山崎 則次、日本特許：特開昭63-170344  
b) 佐藤 和夫、後藤 幸久、山崎 則次、高瀬 一郎、日本特許：特開昭63-174955(105)
- 105) V. Du Vigneaud, O. J. Irish, *J.Biol.Chem.*, 122, 349 (1938)
- 106) A. Tanaka, N. Izumiya, *Bull.Chem.Soc.Jap.*, 31, 529 (1958)
- 107) 宮沢 嘉延、大石 紀子、前原 喜好、日本特許：特開昭63-145256
- 108) R. Shimizu, T. Kakimoto, K. Ishii, Y. Fujimoto, H. Nishi, N. Tsumagari, *J.Chromatogr.*, 357, 119 (1986)
- 109) J. Anatol, A. Medete, *Synthesis* 10, 538 (1971)

