

第3章

L-アスパラギン酸の晶析における D-, 及び L-アスパラギンの影響

3.1. はじめに

医薬品原薬製造において粗原薬を晶析で単離精製する工程は、原薬の品質（晶癖、粒子径、結晶多形、結晶純度等）を決める最重要工程である。通常、精製前の粗原薬には、合成過程で副生する不純物や原料・試薬由来の不純物が含まれ、それらの混入を避けることは困難で、粗原薬を精製する際に晶析系に存在する不純物が原薬の品質へ影響を及ぼす可能性がある。また、合成中間体も晶析で単離することが一般的で、通常不純物の含有量は粗原薬よりも多いため、不純物の影響はより顕著である。

Ritonavir は 1996 年に AIDS 治療薬として製品化されたが、1998 年に半固型カプセル製剤の溶出試験が不適となり、その原因が従来の結晶形である I 形とは異なる II 形 (*cis* 配座) の生成に基づくことが判明した (Figure 3-1, 3-2)。単結晶構造解析などから II 形は I 形より安定なパッキング配列を有することが示されたが、溶液中では *trans* 配座の方が安定であり II 形の核が自発的に発生するとは考えられず、分解物である *cis* 配座を有する環状カルバメートが核となり、II 形の生成を促進すると推測された¹⁾。

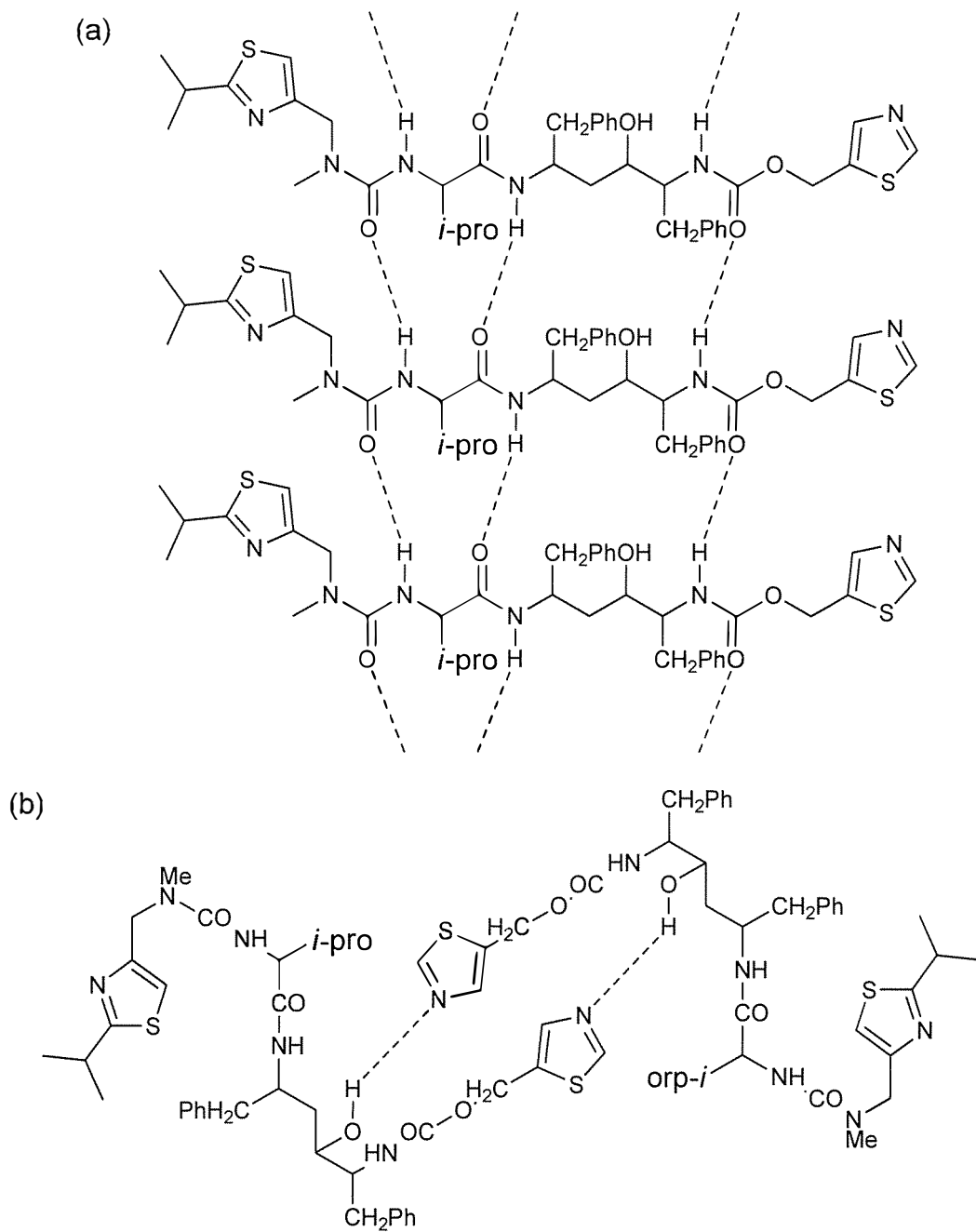


Figure 3-1. Hydrogen bonding network for ritonavir form I. (a) Beta like stacks.

(b) 2-fold screw axis.

(出典 : Bauer, J. et al. *Pharm. Res.*, **2001**, *18*, 859–866. ¹⁾)

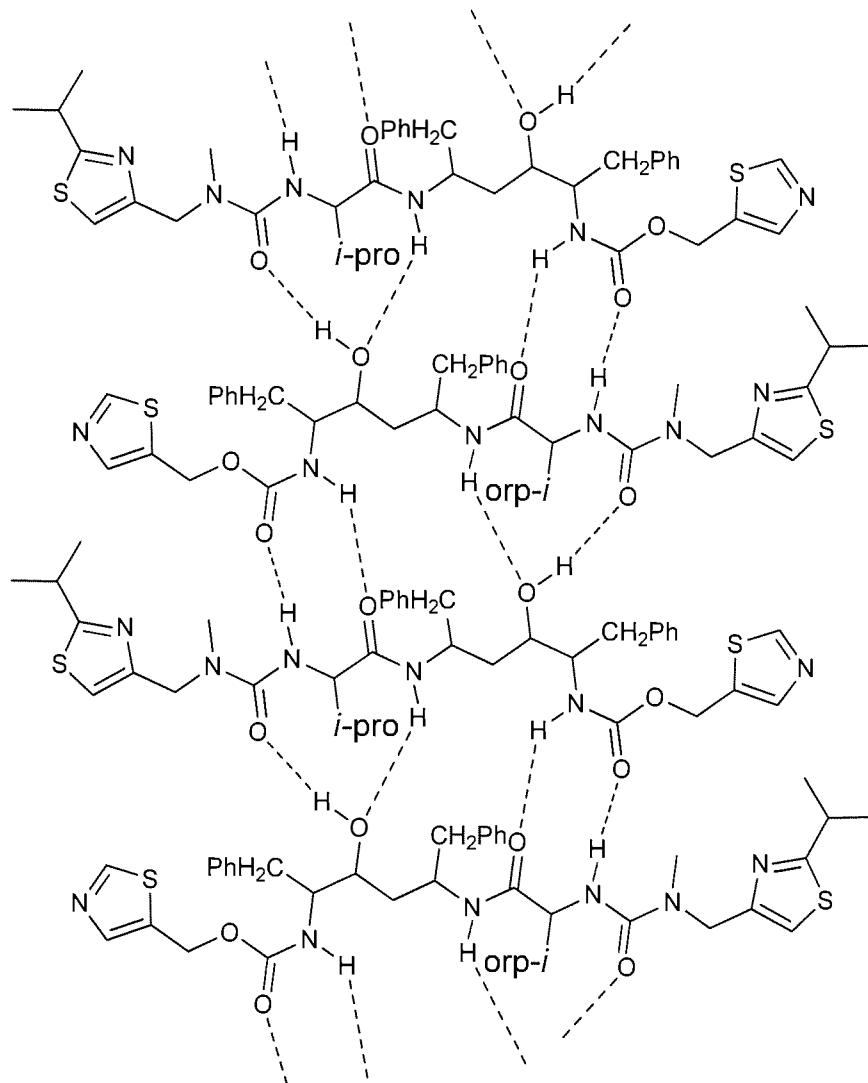


Figure 3-2. Hydrogen bonding network for ritonavir form II (needle growth is aligned with hydrogen bonding).

(出典：Bauer, J. et al. *Pharm. Res.*, **2001**, *18*, 859–866. ¹⁾)

また、抗細菌薬である Sulphathiazole では合成の最終過程で生成する 0.5–1 mol % の反応中間体が準安定形を安定化して溶媒媒介転移を阻害すると報告されており ²⁾、頻尿抑制剤 AE1-923 では 0.5 wt % の合成中間体が安定結晶形である C 形の核発生を完全に抑制すると報告されている ³⁾。このように、僅かに存在する不純物が結晶多形の析出や転移速度に重要な影響を与えることがあるため、頑健な医薬品原薬又は中間体の晶析プロセスを構築するために、不純物の影響を明らかにすることは重要な課題である。

第 2 章では Orantinb 原薬の晶析に関する研究結果を述べたが、当該研究においては同等の不純物レベルの原料 (Orantinb カリウム塩) を使用しているため

不純物の影響については議論していない。また、開発品原薬の不純物は構造が同定されていない場合があり、同定されていたとしても通常市販されておらず合成が難しいことが多く入手が困難である。そこで、本章では入手が容易な有機化合物としてアミノ酸を使用して不純物が晶析に及ぼす影響に関する研究を計画した。

アミノ酸は生命現象の重要な担い手である生体高分子のタンパク質の構成成分である。アミノ酸は低分子であり、その結晶化は生体高分子と比べて容易である。アミノ酸はアミノ基 ($-\text{NH}_2$) とカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) を持つ化合物の総称である。通常、単にアミノ酸といえば、これら両基が同じ炭素 (α -炭素) についた α -アミノ酸のことであり、化学式は $\text{R}-\text{C}^\alpha\text{H}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ となる。R は水素原子あるいは原子■を示し、側鎖と呼ばれる。R が水素のグリシンを除けば α -炭素は不斉であり、鏡像異性体が存在する。タンパク質の構成アミノ酸は全て L 体である⁴⁾。アミノ酸の製造法には、抽出法、化学合成法、酵素法、発酵法が知られており、それぞれのアミノ酸の製造に最もコスト的に有利な方法が選択されている⁵⁾。工業的に最も汎用されている方法は発酵法であるが、発酵法でアミノ酸を製造した場合、発酵液には目的とするアミノ酸以外に微生物菌体、培地成分、及び微生物の代謝副生物のように多様な不純物を含有し、目的とするアミノ酸のみを分離することは困難である。従って、高純度のアミノ酸を分離生成するためには、それら不純物が晶析系に与える効果を明確にする必要がある。

晶析母液に溶解した特定の不純物は、核発生、結晶成長に影響を及ぼし、製品結晶のモルフォロジーを劇的に変化させることがあり、意図的に“テーラーメイド添加物”を晶析系に共存させることで、核発生や晶癖をコントロールする方法が研究されている。Weissbuch らによると、結晶成分以外のアミノ酸は、対象とするアミノ酸結晶の軸方向を慎重に選択すれば、すべてテーラーメイド添加物となりえる⁶⁾。つまり、結晶成分以外のアミノ酸は、アミノ酸基 ($\text{NH}_3^+-\text{CH}-\text{COO}^-$) を介して結晶に吸着し、構造の異なる側鎖を有するため、テーラーメイド添加物としての効果が期待できる。

Addadi らは、アミノ酸結晶の晶癖に対するアミノ酸添加物の影響について研究しており、L-Asn \cdot H₂O 及び L-グルタミン酸塩酸塩結晶は、他のアミノ酸を添加することによって、純粋系とは異なる晶癖が現れることを報告している⁷⁾。つまり、アミノ酸添加物がテーラーメイド添加物としての効果を発揮し、晶癖が変化したのである。

また、L-Asn 水溶液からの晶析において L-Asp が存在すると固溶体を形成し、L-Asn 結晶格子の一部が L-Asp に置換することが知られている^{8), 9), 10)}。このことから、L-Asp の晶析において L-Asn はテーラーメイド添加物として作用すると推

測した。そこで、本研究においては L-Asp の晶析に及ぼす不純物 (L-Asn, 及び D-Asn) の影響に関する研究を行うこととした。Figure 3-3 に、L-Asp, L-Asn, 及び D-Asn の分子構造を示す。

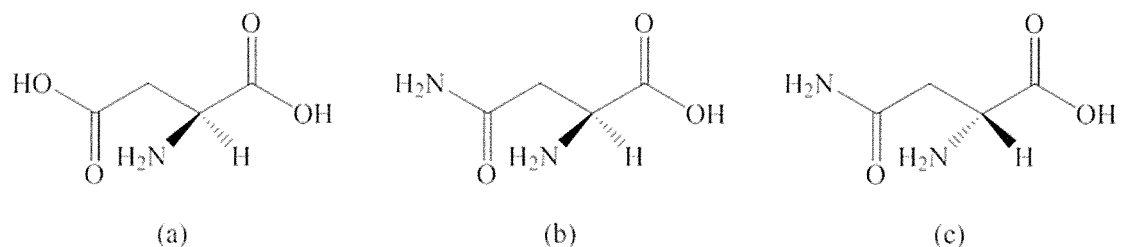


Figure 3-3. Molecular structures. (a) L-Asp, (b) L-Asn, and (c) D-Asn.

3.2. 実験

3.2.1. 原料, 試薬, 溶媒

実験に使用した原料, 試薬, 溶媒を以下に示す.

- L-Asp : 和光純薬工業株式会社, $\geq 99.0\%$
- L-Asn \cdot H₂O : 和光純薬工業株式会社, $\geq 99.0\%$
- D-Asn \cdot H₂O : 和光純薬工業株式会社, $\geq 98.5\%$
- L-Asp 種晶 : 和光純薬工業株式会社, $\geq 99.0\%$, 150–300 μm (篩過品)
- 水 : 大鵬薬品工業株式会社, 精製水

3.2.2. L-Asp の晶析

L-Asp の晶析は, 半月形攪拌翼, 温度センサー, 及び FBRM プローブを装着した 1 L 丸底フラスコを晶析槽として使用し, 温度制御には外部恒温槽を使用した. 晶析槽に精製水 (500 mL, サンプルング実験では 800 mL), L-Asp 50°C飽和量 (6.00 g, サンプルング実験では 9.60 g), 及び L-Asn \cdot H₂O (又は D-Asn \cdot H₂O) を加え, 60°Cで 30 分間攪拌して溶解した. 溶液を 1 時間かけて 30°Cまで冷却し, 冷却途中 45°Cで L-Asp 種晶 (L-Asp に対して 1%) を加えた. 晶析は冷却開始から 19 時間 (サンプルング実験では 26 時間) まで継続した. 晶析プロセスは, FBRM プローブ及び温度センサーを用いて, 粒子数と温度を in-situ でモニタリングした. 製品結晶は, 懸濁液から吸引ろ過で分離し, 室温で減圧乾燥した.

3.2.3. 分析装置及び条件

(1) 晶析プロセスの粒子数モニタリング

晶析プロセスの粒子数は FBRM を用いて in-situ モニタリングした. 装置及び条件を以下に示す.

- 装置 : G400 (メトラー・トレド株式会社)
- Cord Selection Models : Primary V. 1.1.11 (No Weight, No Averaging)
- Stuck Particle Correction : Off
- Probe diameter : 14 mm
- Scan Circle Diameter : 5.05 mm
- Scan Speed : 2 m/s
- Interval : 10 s

(2) 晶析プロセスの温度モニタリング

晶析プロセスの温度は温度センサー用いて in-situ モニタリングした. 装置及び条件を以下に示す.

- 装置 : testo735-2 (株式会社テストー), K 型熱電対センサー (株式会社ネツシン)

- 測定間隔：1分

(3) L-Asn（又はD-Asn）含有率

製品結晶中のL-Asn（又はD-Asn）含有率は *o*-phthaldialdehyde (OPA) 誘導化法^{11), 12)}によりHPLCで検量線を作成し定量した。装置及び条件を以下に示す。

- 装置：1260（アジレント・テクノロジー株式会社）
- 検出器：紫外吸光光度計（測定波長：338 nm）
- カラム：ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6×100 mm, 3.5 μm（アジレント・テクノロジー株式会社）
- カラム温度：40℃付近の一定温度
- 移動相 A：10 mM Na₂HPO₄, 10 mM Na₂B₄O₇, pH 8.2（塩酸で調製）
移動相 B：MeCN/MeOH/水（45/45/10）
- 注入希釈剤：移動相 A 100 mL + H₃PO₄ 0.4 mL
- 誘導化試薬：ホウ酸塩緩衝液, OPA（アジレント・テクノロジー株式会社）
- 試料溶液：1 mg/mL in 0.1 N HCl
- 注入量：1 μL
- 流量：1.5 mL/min
- グラジエント：

0.0 min	A: 98%	B: 2%
1.0 min	A: 98%	B: 2%
5.0 min	A: 75%	B: 25%
5.1 min	A: 0%	B: 100%
7.3 min	A: 0%	B: 100%
7.4 min	A: 98%	B: 2%

測定時間：7.5分

(4) 結晶形状

製品結晶の結晶形状は光学顕微鏡を用いて分析した。装置を以下に示す。

- 装置：BX53-33P-OC, DP21（オリンパス株式会社）

(5) 固溶体形成の確認

製品結晶の固溶体形成の確認はPXRDを用いて行った。装置及び条件を以下に示す。

装置：X'Pert PRO MPD（スペクトリス株式会社 パナリティカル事業部）

線源：CuKα

電圧：40 kV

電流：30 mA

スキャンスピード：0.2°/min

測定範囲：2θ = 5–40°

3.3. 結果と考察

3.3.1. L-Asn 及び D-Asn が L-Asp 晶析に及ぼす影響

L-Asn 及び D-Asn がテーラーメイド添加物として効果を発揮するかを確認するため、L-Asp 晶析において L-Asn 又は D-Asn 0, 10, 20 mol % を添加し実験を行った。FBRM を使用して粒子数を in-situ で測定した結果、Figure 3-4 に示すように、冷却開始から数時間後に著しい粒子数の増加が観測され、急激に核発生していることがわかった。

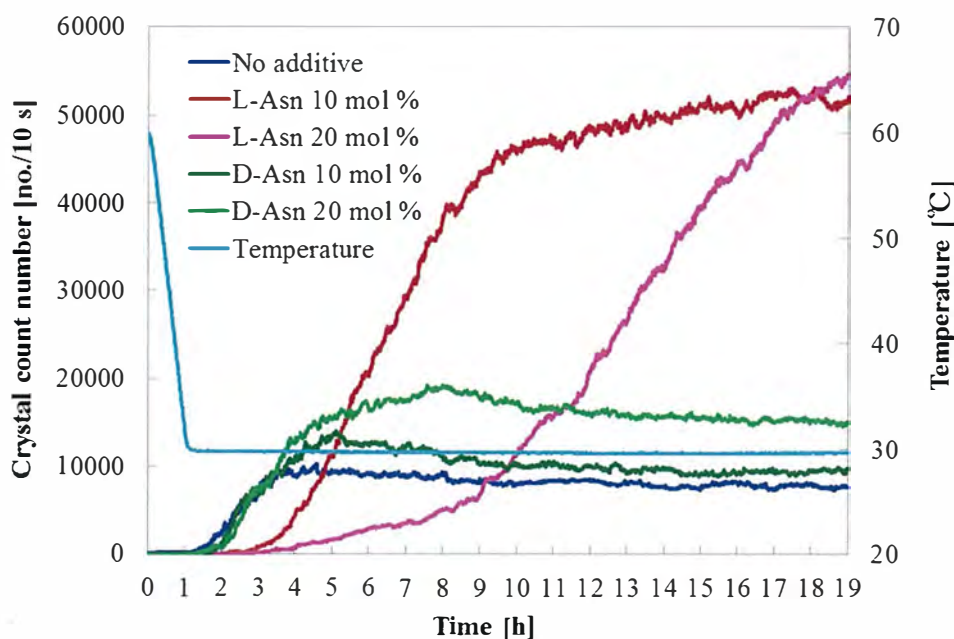


Figure 3-4. Crystal count number monitored in situ by FBRM during L-Asp crystallization in the presence of L-Asn or D-Asn (0, 10, 20 mol %).

興味深いことに、L-Asn を添加した場合、添加量の増量に応じて核発生の遅れが観測された。一方、D-Asn を添加した場合は核発生のタイミングに顕著な影響は認められず、Asn の効果はキラリティー特異的であった。核発生の遅れはおそらく、Weissbuch らが報告しているように¹³⁾、L-Asp クラスター成長が L-Asn の吸着によって阻害されたためと考えられる。また、L-Asn 添加系では、純粋系及び D-Asn 添加系に比べて、最終懸濁液の粒子数が著しく多くなった。これは、得られた製品結晶サイズの違いに起因するものと考えられる。即ち、製品結晶を光学顕微鏡で観察すると、Figure 3-5 に示すように、L-Asn 添加系で析出した結晶は、純粋系及び D-Asn 添加系から析出した結晶に比べて著しく小さく微細であったため、相対的に粒子数が多くなったと考えられる。

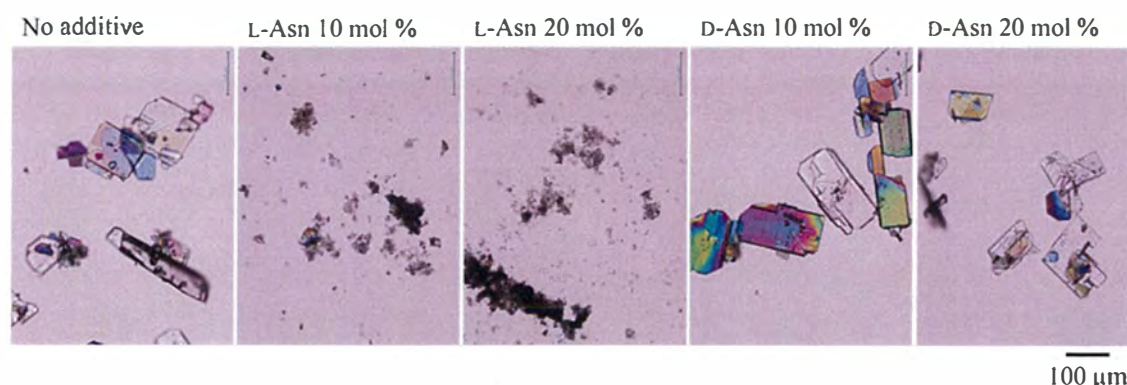


Figure 3-5. Optical microscope images of L-Asp product crystals crystallized in the presence of L-Asn or D-Asn (0, 10, 20 mol %).

L-Asn 添加系で得られた製品結晶の粒子が微細になった原因は、L-Asn が L-Asp 結晶格子に取り込まれたことに起因すると推測した。Addadi らは L-Asn 結晶格子に取り込まれた L-Asp は軸方向の変化をもたらし、その結果純粋な L-Asn と比べて晶癖が変化すると報告している⁷⁾。そこで、L-Asp 結晶への L-Asn の取り込みの有無を確認するため、L-Asn 又は D-Asn (0, 5, 10, 15, 20 mol %) 存在下で得られた製品結晶に含まれる Asn 含有率を測定した。その結果、Figure 3-6 に示すように、L-Asn 添加系で得られた製品結晶には L-Asn が取り込まれており、添加量に応じて L-Asn 含有率が増加する傾向が認められ、L-Asn 20 mol% 添加系で得られた製品結晶中の L-Asn 含有率は 5.0 mol% であった。対して、D-Asn 20 mol% 添加系で得られた製品結晶中の D-Asn 含有率は 0.2 mol% と僅かであった。従って、L-Asp は L-Asn と固溶体を形成するが、D-Asn とは固溶体を形成しないと考えられた。

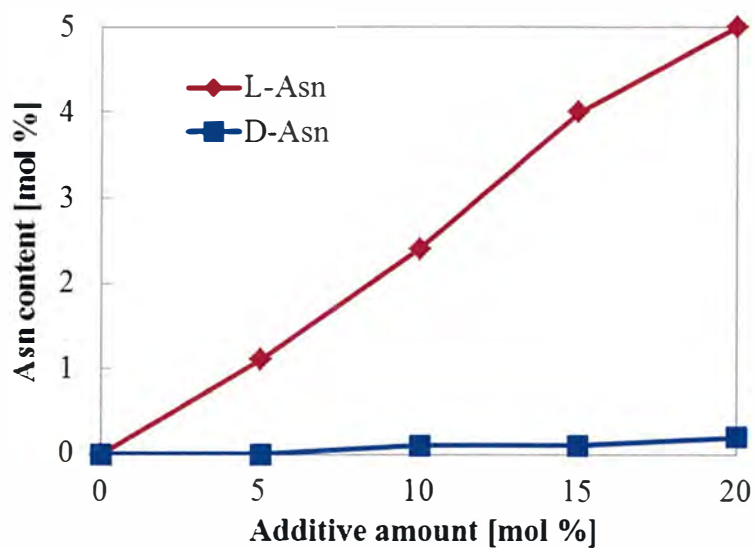


Figure 3-6. L-Asn or D-Asn content in L-Asp product crystals crystallized in the presence of L-Asn or D-Asn (0, 5, 10, 15, 20 mol %).

固溶体の形成を確認するために L-Asn (0, 5, 10, 15, 20 mol %) 存在下で得られた製品結晶の PXRD を測定した結果, Figure 3-7 に示すように, L-Asn を含有するにも関わらず純粋系で得られた製品結晶, 即ち純粋な L-Asp と同じ回折パターンを示し, L-Asn に特異的な回折ピークは検出しなかった. 従って, L-Asn は L-Asp の結晶格子の一部を置換し, 固溶体を形成していることが示唆された.

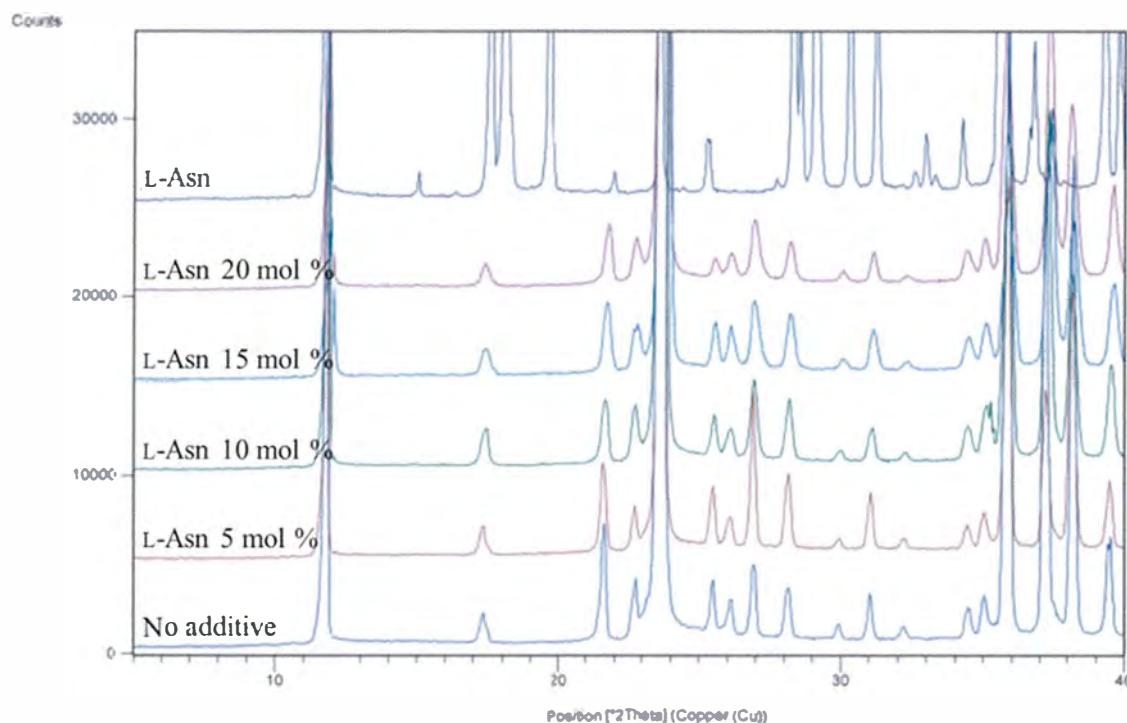


Figure 3-7. PXRD patterns of L-Asn and L-Asp product crystals crystallized in the presence of L-Asn (0, 5, 10, 15, 20 mol %).

また、L-Asn は製品結晶の収量にも影響を与えた。0, 5, 10, 15, 20 mol % L-Asn 添加系では、収量はそれぞれ 2.93, 2.36, 1.90, 1.49, 0.95 g であった。対して、5, 10, 15, 20 mol % D-Asn 添加系では、収量はそれぞれ 2.70, 2.66, 2.80, 2.82 g であった。このデータは、L-Asn の添加量の増量に伴い水への固溶体の溶解度が増加したことを示唆していると考えられる。即ち、L-Asp と L-Asn の固溶体の溶解度は純粋な L-Asp より高く、固溶体中の L-Asn 含有率の増加に伴い溶解度が増加すると推測される。

3.3.2. L-Asn 存在下での L-Asp 晶析で得られる結晶の経時変化

上述したようにL-Asnによって引き起こされたL-Aspの核発生の遅れは、L-Asp クラスタ成長がL-Asnの吸着によって阻害されたためと考えられた。つまり、水溶液中でL-AspとL-Asnの固溶体のクラスタを形成していると考えられた。そこで、L-Asn 20 mol%添加系において析出した結晶を経時的にサンプリングしL-Asn含有率の推移を確認した。その結果、冷却開始から9時間後、即ち析出初期から3.9 mol%のL-AsnがL-Asp結晶中に取り込まれていることが明らかとなった。即ち、水溶液中でL-AspとL-Asnの固溶体のクラスタを形成しており核発生の瞬間にL-AsnがL-Asp結晶格子に組み込まれていることが示唆された。冷

却開始から 14 時間後, 26 時間後では, L-Asn 含有率はそれぞれ 4.5 mol %, 5.2 mol %まで増加した. 析出初期に L-Asn 含有率が低かったのは, 結晶全体に占める L-Asp 種晶の割合が大きかったためと推測する. さらに, サンプルングした結晶を光学顕微鏡で観察すると, Figure 3-8 に示すように, 析出初期は大きな結晶であったが, 徐々に小さくなっていることがわかった. このことから, L-Asn 添加系で得られた製品結晶が微細になった理由は, L-Asp と L-Asn の固溶体結晶が徐々に破碎されたためと考えられる. また, L-Asp と L-Asn の固溶体結晶は, 純粋な L-Asp 結晶 (Figure 3-5) とは結晶形状が異なることが示された. このことから, L-Asp 晶析において, L-Asn がテーラーメイド添加物として作用し, 結晶成長に影響を及ぼしたと考えられる. L-Asp 結晶成長に及ぼす L-Asn の作用メカニズムについては, 第 5 章で議論する.

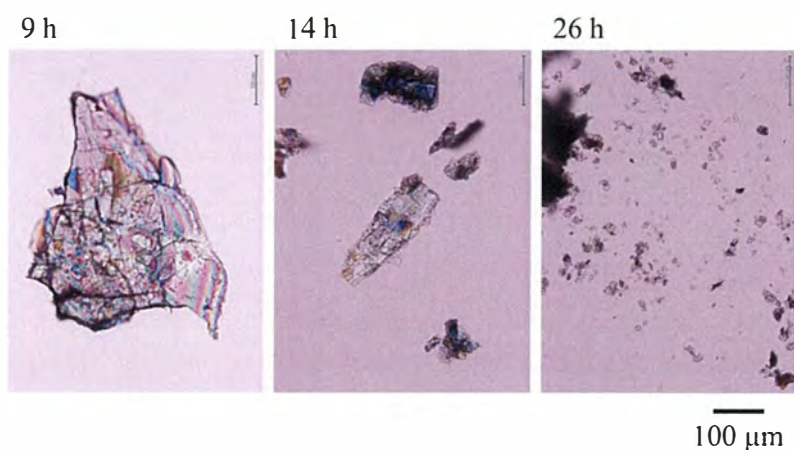


Figure 3-8. Optical microscope images of L-Asp crystals sampled over time (9, 14, 26 h) in the presence of L-Asn 20 mol %.

3.4. まとめ

L-Asn（又は D-Asn）存在下において、L-Asp の晶析を検討した。その結果、L-Asn 添加系では純粋系に比べて顕著な核発生の遅れが FBRM で観測され、得られた製品結晶の分析結果から L-Asn は L-Asp 結晶格子に取り込まれ固溶体を形成していることが示唆された。対して、D-Asn 添加系では純粋系に比べて顕著な差は認められなかった。また、L-Asn と L-Asp の■溶体は、純粋な L-Asp と結晶形状が異なることが示された。従って、L-Asp 晶析において、L-Asn がキラリティー特異的な効果を示し、テーラーメイド添加物として作用することがわかった。

3.5. 参考文献

- 1) Bauer, J.; Spanton S.; Henry, R.; Quick, J.; Dziki, W.; Porter, W.; Morri, J. “Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism” *Pharm. Res.*, **2001**, *18*, 859–866.
- 2) Blagden, N.; Davey, R. J.; Rowe R.; Roberts, R. “Disappearing polymorphs and the role of reaction by-products: the case of sulphathiazole” *Int. J. Pharm.*, **1998**, *172*, 169–177.
- 3) Okamoto, M.; Hamano, M.; Igarashi, K.; Ooshima, H. “The Effects of Impurities on Crystallization of Polymorphs of a Drug Substance AE1-923” *J. Chem. Eng. Japan*, **2004**, *37*, 1224–1231.
- 4) 平山令明 有機化合物結晶作製ハンドブック, 丸善株式会社, 東京都, **2008**.
- 5) 味の素株式会社 アミノ酸ハンドブック, 株式会社工業調査会, 東京都, **2003**.
- 6) Weissbuch, I.; Leiserowitz, L.; Lahav, M. ““Tailor-Made Additives” and Impurities” *Crystallization Technology Handbook Second Edition Revised and Expanded*, Mersmann, A., Ed., Marcel Dekker, New York, **2001**, 526–579.
- 7) Addadi, L.; Berkovitch-Yellin, Z.; Domb, N.; Gati, E.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. “Resolution of Conglomerates by Stereoselective Habit Modifications” *Nature* **1982**, *296*, 21–26.
- 8) Nishizawa, J.; Tanno, T.; Yoshida, T.; Suto, K. “Consequence of a Defect on the Terahertz Spectra of L-Asparagine Monohydrate” *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 134–135.
- 9) Meenan, P. A.; Anderson, S. R.; Klug, D. L. “The Influence of Impurities and Solvents on Crystallization” *Handbook of Industrial Crystallization Second Edition*, Myerson, A. S., Ed., Butterworth Heinemann, Oxford, **2001**, 67–100.
- 10) Wang, J. L.; Berkovitch-Yellin, Z.; Leiserowitz, L. “Location of ‘Tailor-Made’ Additives in the Crystal and their Effect on Crystal Habit. A Study on the Host-Additive System L-Asparagine-L-aspartic Acid Monohydrate” *Acta Crystallogr., Sect. B*, **1985**, *41*, 341–348.
- 11) Henderson Jr., W. J.; Brooks, A.; “Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals” *Agilent Technologies App. Note, Pub.# 5990–4547EN*, **2010**.
- 12) Schuster, R. “Determination of Amino Acids in Biological, Pharmaceutical, Plant and Food Samples by Automated Precolumn Derivatization and High-performance Liquid Chromatography” *J. Chromatogr.*, **1988**, *431*, 271–284.
- 13) Weissbuch, I.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. “Toward Stereochemical Control, Monitoring, and Understanding of Crystal Nucleation” *Cryst. Growth Des.* **2003**, *3*,

125–150.

第4章

テトラメード添加物 L-, 又は D-アスパラギン存在下における DL-アスパラギン酸ラセミ化合物の晶析での光学分割

4.1. はじめに

1960年代に発生した Thalidomide 薬禍事件を受けて、光学活性医薬品の重要性が広く認識されるようになり、現在開発されている医薬品の大半がキラル化合物で占められるようになってきている。生命体の大部分はキラル物質で構成され、薬物と相互作用する酵素や受容体などがキラル識別能力を有していることから、光学異性体間で生理活性（薬効・毒性）が異なることは当然である。Thalidomide は、Figure 4-1 に示すように、*R* 体と *S* 体が存在し両者の薬効は同様であったためラセミ体として開発された。しかし、*S* 体に奇形が発生することが報告されたため、大きな波紋を拡げることになった。さらにその後、本薬物は体内で *R* 体が *RS* 体にラセミ化しやすいことが判明した。今日では、ラセミ化にとどまらず、体内酵素によって立体配置が反転する薬物が存在することも明らかになって来ており、キラル医薬化合物の開発では、早い開発ステージで両光学異性体の ADME [Absorption (吸収), Distribution (分布), Metabolism (代謝), Excretion (排泄)] を検証することが必要となっている¹⁾。

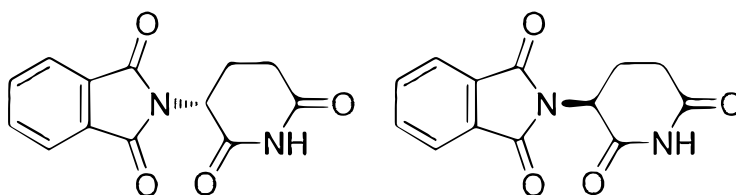


Figure 4-1. Chemical structures of (*R*)-Thalidomide (left) and (*S*)-Thalidomide (right).

このような状況から、一方のエナンチオマーのみを製造する技術が求められる。一方のエナンチオマーを得る方法としては、ラセミ体の光学分割に代表される古典的な分離・分割法と、不斉合成に代表される直接合成法の 2 つに大別される。近年直接合成法は著しく進歩したものの未だ万能ではなく、古典的な分離・分割法も重要な技術として位置づけられている。古典的な分離・分割法には、晶析法、クロマトグラフィー分離法等が知られているが、経済性、操作性の面から工業的には晶析法が採用されることが多い。晶析法による光学分割の歴史は古く、Pasteur が酒石酸ナトリウムアンモニウム (Figure 4-2) のラセミ体をゆっくりと結晶化させ、生成した一対のエナンチオマーをルーペとピンセットで分離した実験に端を発する^{2),3)}。晶析法による光学分割⁴⁾の代表としては、優先晶析法とジアステレオマー法⁵⁾がある。ジアステレオマー法は、主にラセミ体に光学活性な分割剤を作用させて生成する一対のジアステレオマー塩を溶解度の差を利用して分離する方法である。従って、適用範囲は酸性又は塩基性の官能基を有する化合物に限定される。また、ジアステレオマー塩を形成する

当量の分割剤が必要であり，塩形成とフリー化の余計な操作が必要となるため，優先晶析で光学分割できるプロセスの方が簡便であり経済的メリットは大きい．優先晶析法は一方のエナンチオマーの種晶を使用して目的とするエナンチオマーを優先的に晶析させる方法である．しかし，通常の優先晶析では望まないエナンチオマーも析出してしまい，目的のエナンチオマーのみを完全に選択的に晶析させることは簡単ではない⁶⁾．

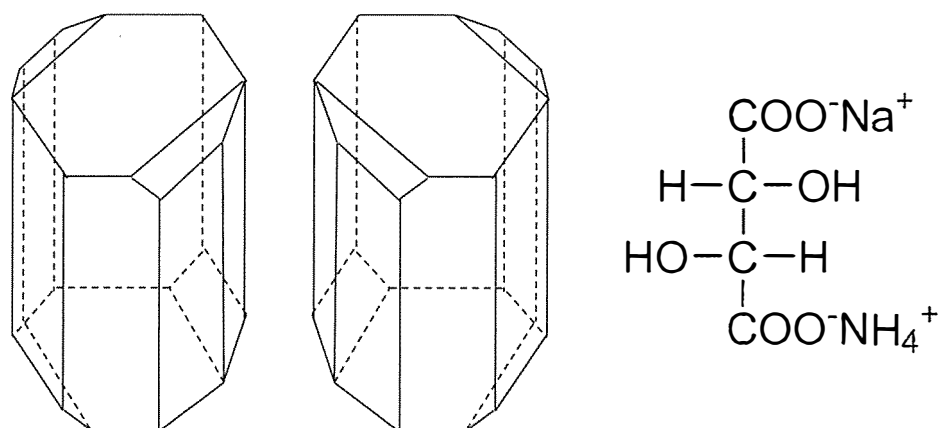


Figure 4-2. Sodium ammonium tartrate. Pictures of crystals (left) and molecular structure (right).

(出典：McMurry, J. (著)，伊藤ショウら (訳) マクマリー有機化学 (上) 第3版, 株式会社東京化学同人³⁾)

Addadi らは，一方のエナンチオマーにのみに選択的に作用するテーラーメード添加物を使用して望まないエナンチオマーの核発生を抑制し目的のエナンチオマーを優先晶析させて分離する方法，また一方のエナンチオマー結晶のモルフォロジーを変化させて機械的に分離する方法を報告している^{7), 8), 9)}．本方法はバッチ晶析にも応用されている¹⁰⁾．しかし，優先晶析法の致命的な欠点は，ラセミ混合物，即ち純粋なエナンチオマーの機械的な混合物にしか適応できないことである．ラセミ混合物は自然界に存在するラセミ体全体の約5-10%で，80%以上がラセミ化合物，即ち結晶格子中に2つのエナンチオマーが規則的に配列している結晶と言われている¹⁾．従って，ラセミ体の大部分を占めるラセミ化合物は直接優先晶析法による光学分割は不可能であり，塩形成¹¹⁾，テーラーメード添加物¹²⁾の作用により一旦ラセミ混合物へと誘導化して分割する必要があった．

第3章で述べたように，L-Asp 晶析において，L-Asn がキラリティー特異的な効果を示し，テーラーメード添加物として作用することがわかった．即ち，L-Asp はD-Asn とは固溶体を形成せず，L-Asn とのみ固溶体を形成することが示唆され

た。この結果を受けて、DL-Asp ラセミ化合物を構成する L-Asp のみを選択的に L-Asn に置換させた■溶体を形成させることができると考え、本章ではテラーメード添加物を用いてラセミ化合物を直接光学分割する新しい光学分割方法への応用を検討した。本方法のコンセプトは、ラセミ化合物の一方のエナンチオマーをテラーメード添加物に置換し、遊離するエナンチオマーを晶析により分離する方法である。

本研究では DL-Asp を用いて、提案するエナンチオマー置換光学分割プロセス指針の確立を目指した。DL-Asp 水溶液からは、ギ酸アンモニウムなどの有機塩を共存させることでラセミ混合物として析出することも知られているが¹³⁾、通常はラセミ化合物として析出する。

4.2. 実験

4.2.1. 原料, 試薬, 溶媒

実験に使用した原料, 試薬, 溶媒を以下に示す.

- DL-Asp : 和光純薬工業株式会社, $\geq 98.0\%$
- L-Asn \cdot H₂O : 和光純薬工業株式会社, $\geq 99.0\%$
- D-Asn \cdot H₂O : 和光純薬工業株式会社, $\geq 98.5\%$
- L-Asp 種晶 : 和光純薬工業株式会社, $\geq 99.0\%$, 150–300 μm (篩過品)
- D-Asp 種晶 : 和光純薬工業株式会社, $\geq 98.0\%$, 150–300 μm (篩過品)
- 水 : 大鵬薬品工業株式会社, 精製水

4.2.2. DL-Asp の晶析

DL-Asp の晶析は, 半月形攪拌翼, 温度センサー, 及び FBRM プローブを装着した 1 L 丸底フラスコを晶析槽として使用し, 温度制御には外部恒温槽を使用した. 晶析槽に精製水 (500 mL, サンプルング実験では 800 mL), DL-Asp 50°C 飽和量 (9.45 g, サンプルング実験では 15.12 g), 及び L-Asn \cdot H₂O を加え, 60°C で 30 分間攪拌して溶解した. 溶液を 1 時間かけて 30°C まで冷却し, 冷却途中 45°C で D-Asp 種晶 (DL-Asp に対して 1%) を加えた. 晶析は冷却開始から 19 時間 (サンプルング実験では 22 時間) まで継続した. 晶析プロセスは, FBRM プローブ及び温度センサーを用いて, 粒子数と温度を in-situ でモニタリングした. 製品結晶は, 懸濁液から吸引ろ過で分離し, 室温で減圧乾燥した.

4.2.3. DL-Asp から遊離した L-Asp (又は D-Asp) の晶析

DL-Asp から遊離した L-Asp (又は D-Asp) の晶析実験は, 半月形攪拌翼, 及び温度センサーを装着した 1 L 丸底フラスコを晶析槽として使用し, 温度制御には外部恒温槽を使用した. 晶析槽に精製水 (500 mL), DL-Asp 50°C 飽和量 (9.45 g), 及び L-Asn \cdot H₂O (又は D-Asn \cdot H₂O) (DL-Asp に対して 40 mol %) を加え, 60°C で 30 分間攪拌して溶解した. 溶液を 1 時間かけて 30°C まで冷却し, 冷却途中 45°C で D-Asp (又は L-Asp) 種晶 (DL-Asp に対して 1%) を加えた. 晶析は冷却開始から 19 時間まで継続し, 懸濁液から吸引ろ過で固液分離した. ろ液を晶析槽に移し 60°C で 30 分間攪拌して析出した結晶を溶解した. 溶液を 1 時間 20 分かけて 20°C まで冷却し, 冷却途中 30°C で L-Asp (又は D-Asp) 種晶 (DL-Asp に対して 1%) を加えた. 晶析は冷却開始から 24 時間まで継続し, 製品結晶は, 懸濁液から吸引ろ過で分離し, 室温で減圧乾燥した.

4.2.4. 分析装置及び条件

(1) 晶析プロセスの粒子数モニタリング

晶析プロセスの粒子数は FBRM を用いて in-situ モニタリングした。装置及び条件を以下に示す。

- 装置：G400（メトラー・トレド株式会社）
- Cord Selection Models：Primary V. 1.1.11 (No Weight, No Averaging)
- Stuck Particle Correction：Off
- Probe diameter：14 mm
- Scan Circle Diameter：5.05 mm
- Scan Speed：2 m/s
- Interval：10 s

(2) 晶析プロセスの温度モニタリング

晶析プロセスの温度は温度センサー用いて in-situ モニタリングした。装置及び条件を以下に示す。

- 装置：testo735-2（株式会社テストー），K 型熱電対センサー（株式会社ネツシン）
- 測定間隔：1 分

(3) L-Asn（又は D-Asn）含有率

製品結晶中の L-Asn（又は D-Asn）含有率は OPA 誘導化法^{14), 15)}により HPLC で検量線を作成し定量した。装置及び条件を以下に示す。

- 装置：1260（アジレント・テクノロジー株式会社）
- 検出器：紫外吸光光度計（測定波長：338 nm）
- カラム：ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6×100 mm, 3.5 μm（アジレント・テクノロジー株式会社）
- カラム温度：40℃付近の一定温度
- 移動相 A：10 mM Na₂HPO₄, 10 mM Na₂B₄O₇, pH 8.2（塩酸で調製）
移動相 B：MeCN/MeOH/水（45/45/10）
- 注入希釈剤：移動相 A 100 mL + H₃PO₄ 0.4 mL
- 誘導化試薬：ホウ酸塩緩衝液, OPA（アジレント・テクノロジー株式会社）
- 試料溶液：1 mg/mL in 0.1 N HCl
- 注入量：1 μL
- 流量：1.5 mL/min

- グラジエント： 0.0 min A: 98% B: 2%
- 1.0 min A: 98% B: 2%
- 5.0 min A: 75% B: 25%
- 5.1 min A: 0% B: 100%
- 7.3 min A: 0% B: 100%
- 7.4 min A: 98% B: 2%

- 測定時間：7.5 分

(4) L-Asp 含有率

製品結晶中の L-Asp 含有率はキラルカラム¹⁶⁾を用いて HPLC で検量線を作成し定量した。装置及び条件を以下に示す。

- 装置：アライアンス 996-2690 (日本ウォーターズ株式会社)
- 検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：200 nm)
- カラム：CROWN PAC CR (+), 4.0×150 mm, 5 μm (株式会社ダイセル)
- カラム温度：0°C 付近の一定温度
- 移動相：HClO₄ aq. (pH 2.0)
- 試料溶液：1 mg/mL in 移動相
- 注入量：10 μL
- 流量：0.4 mL/min
- 測定時間：15 分

(5) D-Asp 含有率

D-Asp 含有率は、D-Asp と L-Asn が上記 (4) の条件ではクロマトグラム分離しないため、100 mol% から L-Asn 及び L-Asp の含有率を差し引いて計算した。

(6) 結晶形状

製品結晶の結晶形状は光学顕微鏡を用いて分析した。装置を以下に示す。

- 装置：BX53-33P-OC, DP21 (オリンパス株式会社)

(7) 固溶体形成の確認、L-Asp (又は D-Asp) と DL-Asp の識別

製品結晶の固溶体形成の確認、L-Asp (又は D-Asp) と DL-Asp の識別は PXRD を用いて行った。装置及び条件を以下に示す。

装置：X'Pert PRO MPD (スペクトリス株式会社 パナリティカル事業部)

線源：CuKα

電圧：40 kV

電流：30 mA

スキャンスピード：0.2°/min

測定範囲：2θ = 5–40°

4.3. 結果と考察

4.3.1. L-Asn が DL-Asp 晶析に及ぼす影響

上述のように、L-Asp が D-Asn とは固溶体を形成せず L-Asn とのみ固溶体を形成したことから、DL-Asp ラセミ化合物を構成する L-Asp のみを選択的に L-Asn に置換させた固溶体を形成させることができると考えた。その仮説を検証するため、L-Asn 0, 20, 40, 60, 100 mol % 添加系で DL-Asp 晶析実験を行い、得られた製品結晶中の L-Asn, L-Asp, 及び D-Asp の組成変化を確認した。その結果、Figure 4-3 に示すように、L-Asn 添加量の増量に応じて、L-Asn 含有率が増加、L-Asp 含有率が低下した。一方、D-Asp 含有率は L-Asn 添加量に影響を受けず約 50 mol % で一定であった。一例として、L-Asn 100 mol % 添加系で得られた製品結晶の組成は、L-Asn 含有率が 13.6 mol %, L-Asp 含有率が 34.5 mol %, D-Asp 含有率が 51.9 mol % であった。

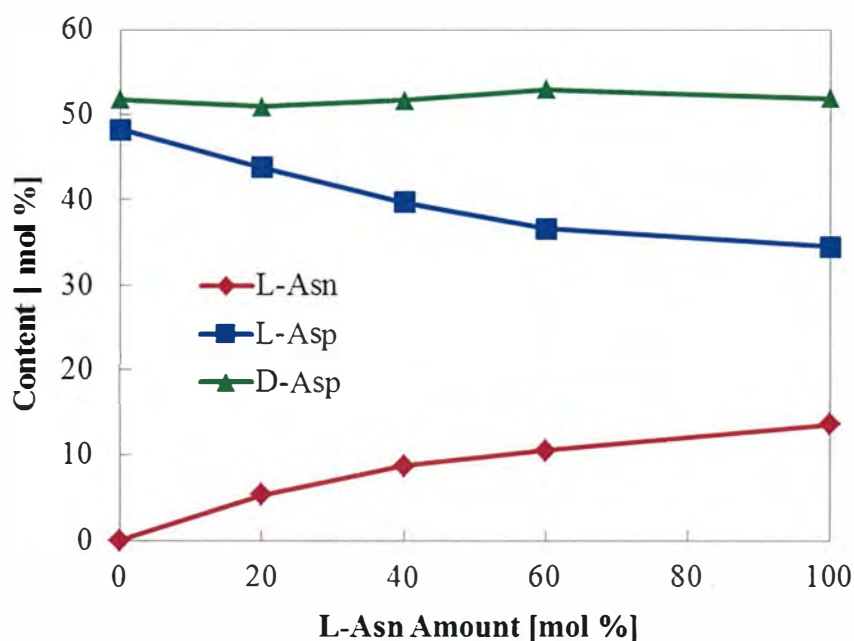


Figure 4-3. Composition (L-Asn, L-Asp, D-Asp) of DL-Asp product crystals crystallized in the presence of L-Asn (0, 20, 40, 60, 100 mol %).

そして、製品結晶の PXRD を測定したところ、Figure 4-4 に示すように、L-Asn 添加系で得られた製品結晶は、L-Asn を含有するにも関わらず純粋系で得られた製品結晶、即ち純粋な DL-Asp と同じ回折パターンを示し、L-Asn に特異的な回折ピークは検出しなかった。従って、狙い通り DL-Asp ラセミ化合物の結晶格子を形成する L-Asp の一部が L-Asn に置換された固溶体を形成したと考えられた。

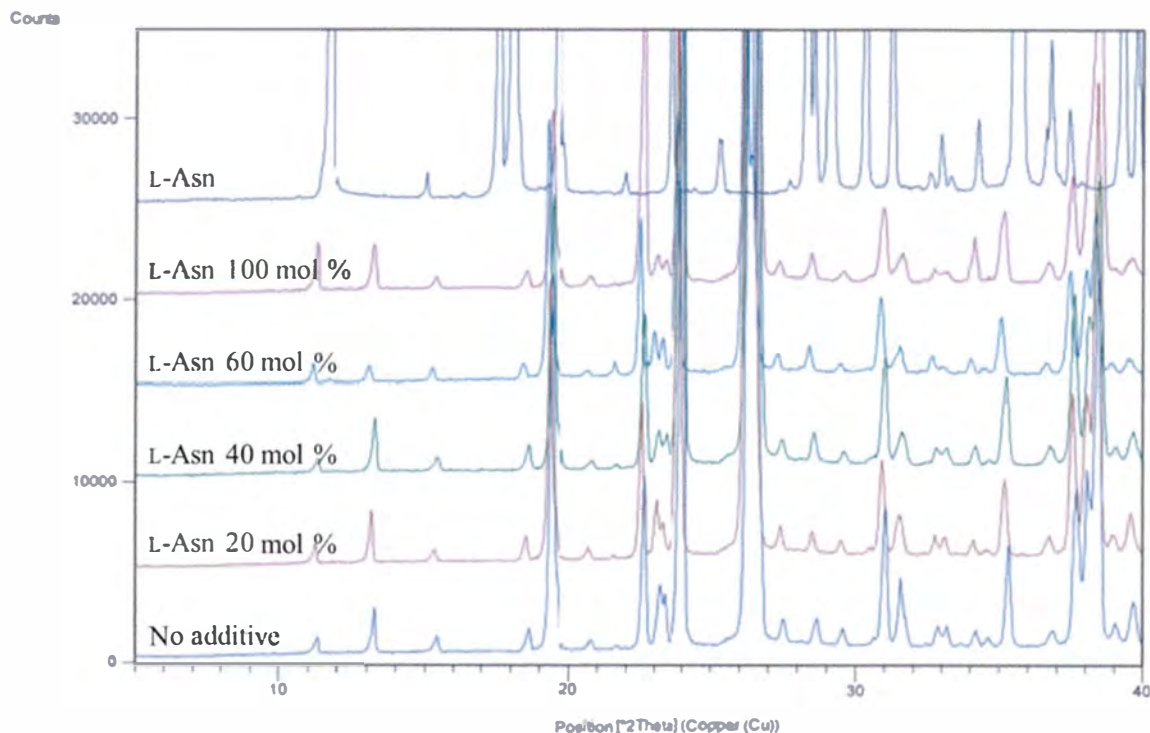


Figure 4-4. PXRD patterns of L-Asn and DL-Asp product crystals crystallized in the presence of L-Asn (0, 20, 40, 60, 100 mol %).

また、L-Asn は製品結晶の収量にも影響を与えた。0, 20, 40, 60 mol % L-Asn 添加系では、収量はそれぞれ 4.51, 3.95, 3.63, 3.19 g であった。このデータは、L-Asn の添加量の増量に伴い水への固溶体の溶解度が増加したことを示唆していると考えられる。即ち、DL-Asp と L-Asn の固溶体の溶解度は純粋な DL-Asp より高く、固溶体中の L-Asn 含有率の増加に伴い溶解度が増加すると推測される。しかし、100 mol % L-Asn 添加では、収量は 3.42 g で、60 mol % 添加系に比べて増加した。これは、おそらく多量の L-Asn を添加することで過飽和度が増加したためと推測する。

Figure 4-5 に、製品結晶の光学顕微鏡写真を示す。DL-Asp 晶析で得られた製品結晶は、L-Asp 晶析で得られた製品結晶（第 3 章）と異なり、何れも同様の結晶形状を示した。また、Figure 4-6 に、L-Asn 40 mol % 添加系で晶析中に懸濁液からサンプリングした結晶の光学顕微鏡写真を示す。

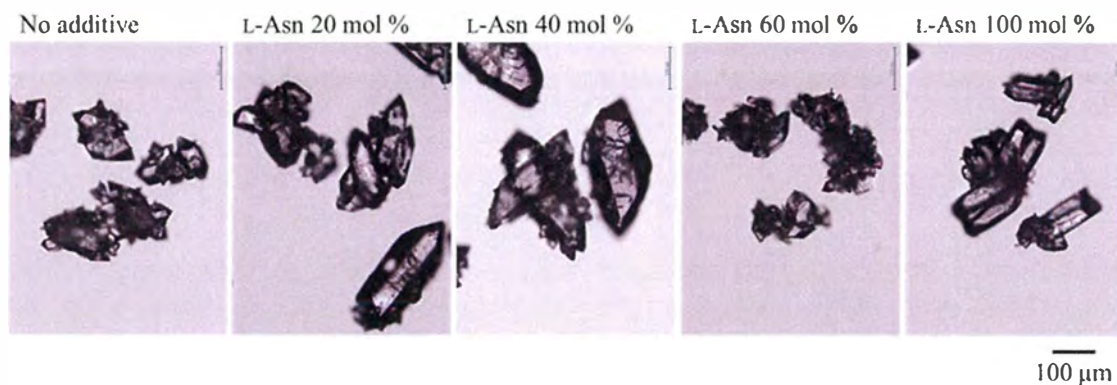


Figure 4-5. Optical microscope images of DL-Asp product crystals crystallized in the presence of L-Asn (0, 20, 40, 60, 100 mol %).

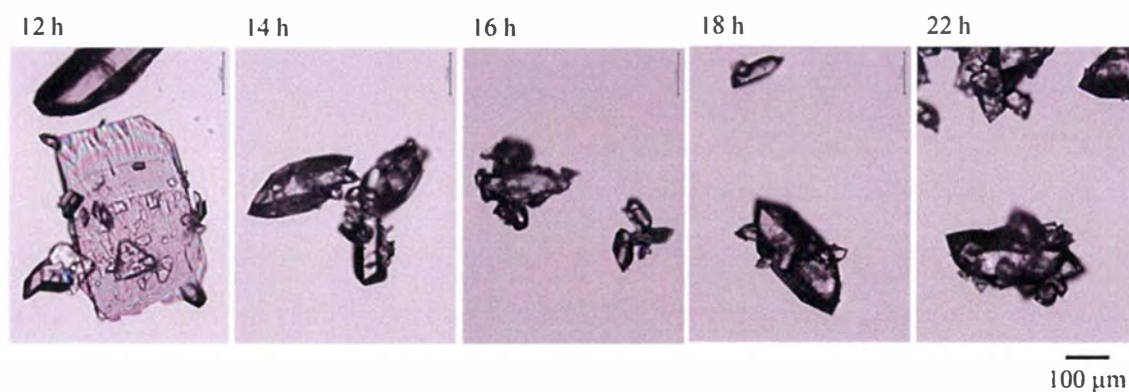


Figure 4-6. Optical microscope images of DL-Asp crystals crystallized in the presence of 40 mol % L-Asn (12, 14, 16, 18, 22 h).

冷却開始から 12 時間後，即ち析出初期（Figure 4-7 に示す FBRM データを参照）の結晶は，板状結晶である D-Asp 種晶と両錐状結晶である DL-Asp の混合物であった（Figure 4-6）．そして興味深いことに，その結晶には L-Asn が含まれていた（6.7 mol % L-Asn, 20.6 mol % L-Asp, 72.7 mol % D-Asp）．この結果は，水溶液中で DL-Asp と L-Asn の固溶体のクラスターを形成しており，核発生の瞬間に L-Asn が DL-Asp 結晶格子に組み込まれていることを示唆した．14, 16, 18, 22 h でサンプリングした結晶は何れも両錐状結晶であり，結晶の組成はそれぞれ 7.8 mol % L-Asn, 33.2 mol % L-Asp, 59.1 mol % D-Asp; 9.0 mol % L-Asn, 35.5 mol % L-Asp, 55.6 mol % D-Asp; 8.9 mol % L-Asn, 35.5 mol % L-Asp, 55.7 mol % D-Asp; and 9.1 mol % L-Asn, 38.2 mol % L-Asp, 52.8 mol % D-Asp であった．

晶析挙動を確認するため，L-Asn 添加系（0, 20, 40, 60 mol %）において，FBRM を用いて粒子数を in-situ でモニタリングした．その結果，Figure 4-7 に示すよう

に、L-Asn の添加は核発生のタイミングに影響を与え、40 mol % L-Asn を添加した場合が最も核発生が遅くなった。L-Asn 60 mol % 添加系において、L-Asn 40 mol % 添加系に比べて、核発生が速くなったのは L-Asn 添加量が一定以上になると見かけ上の過飽和度が上昇し逆に核発生が促進されたためと推測される。

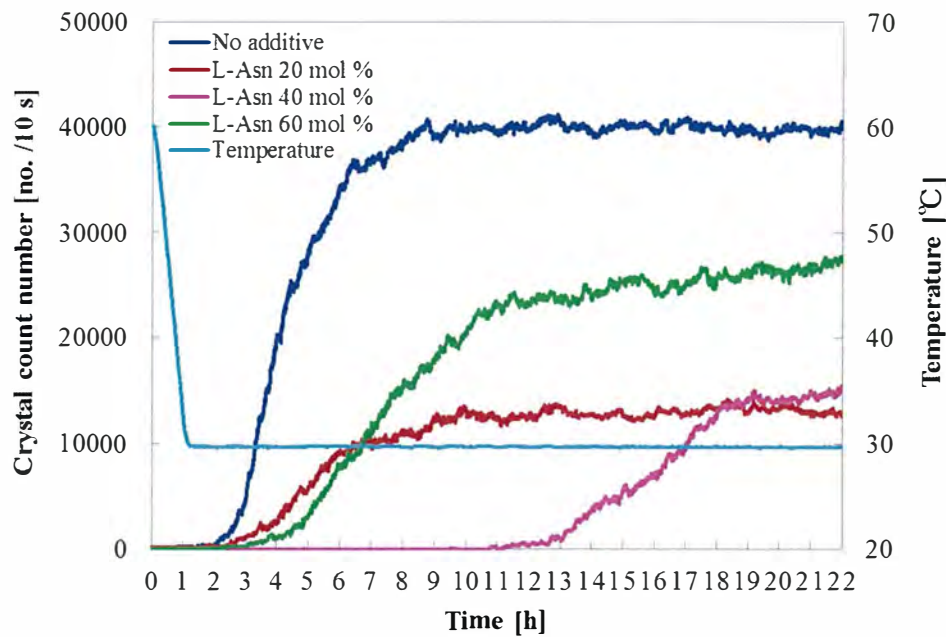


Figure 4-7. Crystal count number monitored in situ by FBRM during DL-Asp crystallization in the presence of L-Asn (0, 20, 40, 60 mol %).

4.3.2. DL-Asp ラセミ化合物の光学分割

DL-Asp の晶析において L-Asn を共存させることで、DL-Asp ラセミ化合物の結晶格子を形成する L-Asp の一部が L-Asn に置換された固溶体を形成した。溶液中には置換された L-Asp が遊離していると考えられたため、その L-Asp を晶析させることを検討した。これまでと同様に DL-Asp と L-Asn の固溶体を析出させ、ろ過により固液分離し、ろ液に L-Asp を種晶として添加し、冷却して晶析させた。実験は、DL-Asp の晶析を抑制し、遊離した L-Asp を晶析させるため、DL-Asp の核発生を最も遅らせた L-Asn 40 mol% 添加系 (Figure 4-7) において実施した。Table 4-1 に、L-Asn 添加系水溶液から晶析した一次晶、及びそのろ液から析出した二次晶の組成を示す。

Table 4-1. Composition (L-Asn, D-Asn, L-Asp, D-Asp) of the first and second crop crystals obtained from DL-Asp crystallization in the presence of 40 mol % L-Asn or D-Asn.

Additive	Crystals	Component [mol %]			
		L-Asn	D-Asn	L-Asp	D-Asp
L-Asn ^a	First crop ^b	8.5	-	41.7	49.9
	Second crop ^c	8.5	-	50.4	41.2
D-Asn ^a	First crop ^d	-	8.5	49.7	41.9
	Second crop ^e	-	5.7	27.9	66.4

^a Additive amount is 40 mol %.

^b 3.75 g, ^c 0.49 g, ^d 3.94 g, ^e 0.23 g

一次晶は DL-Asp 結晶中の L-Asp が 8.5 mol % L-Asn に置換した固溶体であった。二次晶は、L-Asp と L-Asn の固溶体、及び DL-Asp と L-Asn の固溶体の混合物であると推測された。二次晶の組成は以下のように計算した。DL-Asp 含有率は、D-Asp は理論上析出しないため D-Asp 含有率(41.2 mol %)を 2 倍して 82.4 mol % と見なし、残り 17.6 mol %を L-Asp と見なした。また、L-Asp 又は DL-Asp の結晶格子を構成する L-Asp の 8.5 mol %が L-Asn に置換していると考えられる。

同様に、D-Asn 40 mol%添加系において、DL-Asp 晶析のろ液に D-Asp を種晶として添加し、冷却して晶析させた。ろ液から析出した二次晶の組成分析結果 (Table 4-1) から、得られた結晶は D-Asp と D-Asn の固溶体、及び DL-Asp と D-Asn の固溶体の混合物であると推測された。二次晶の組成は以下のように計算した。DL-Asp 含有率は、L-Asp は理論上析出しないため L-Asp 含有率(27.9 mol %)を 2 倍して 55.8 mol %と見なし、残り 44.2 mol %を D-Asp と見なした。また、D-Asp 又は DL-Asp の結晶格子を構成する D-Asp の 5.7 mol %が D-Asn に置換していると考えられる。L-Asn 40 mol%添加系の二次晶と D-Asn 40 mol%添加系の二次晶の組成の違いは、添加量の違いによるものと考えられる (L-Asn 40 mol%添加系: 0.49 g, D-Asn 40 mol%添加系: 0.23 g)。

Figure 4-8 に示すように、ろ液から晶析させた二次晶の光学顕微鏡写真において L-Asp (又は D-Asp) 特有の板状結晶と DL-Asp 結晶特有の両錐状結晶が観察され、それらの結晶の混合物であることを支持した。

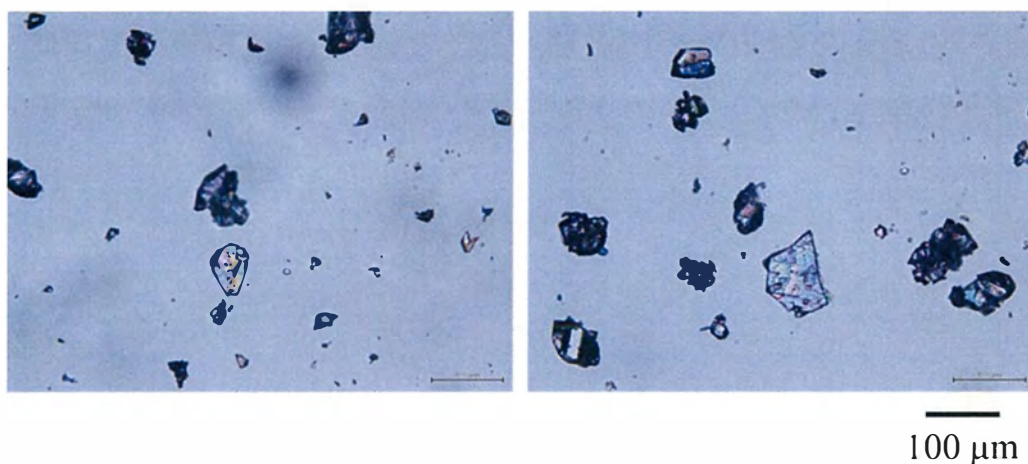


Figure 4-8. Optical microscope images of second crop crystals crystallized from the filtrate of DL-Asp crystallization in the presence of 40 mol % L-Asn (left) or D-Asn (right).

さらに、Figure 4-9 に示すように、ろ液から晶析させた二次晶の PXRD 回折パターンは、L-Asp（又は D-Asp）と DL-Asp の回折ピークを検出し、L-Asn（又は D-Asn）に特異的なピーク（Figure 4-4）は検出しなかった。

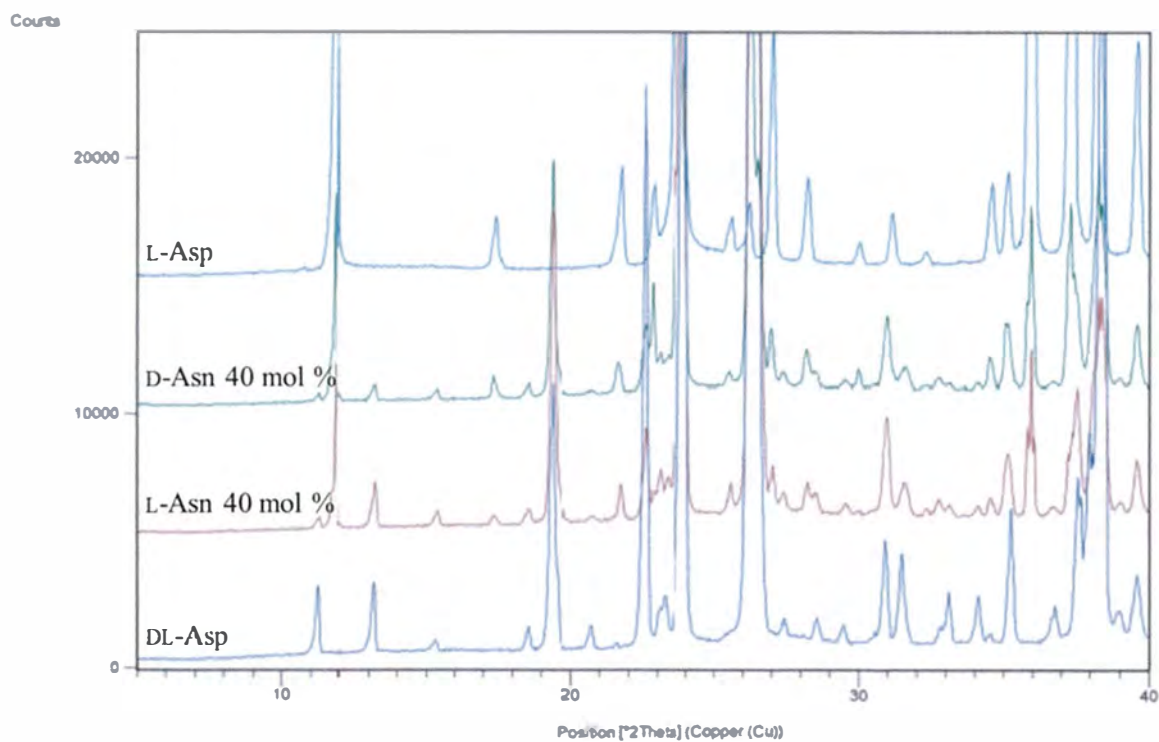


Figure 4-9. PXRD patterns of L-Asp, DL-Asp, and second crop crystals crystallized from filtrates of DL-Asp crystallization in the presence of 40 mol % L-Asn or D-Asn.

これらの結果から、ろ液から晶析させた二次晶は、L-Asp (又は D-Asp) と L-Asn (又は D-Asn) の固溶体、及び DL-Asp と L-Asn (又は D-Asn) の固溶体の混合物であることが確認された。Figure 4-10 に、L-Asn (又は D-Asn) 存在下における DL-Asp の晶析による光学分割の簡略スキームを示す。

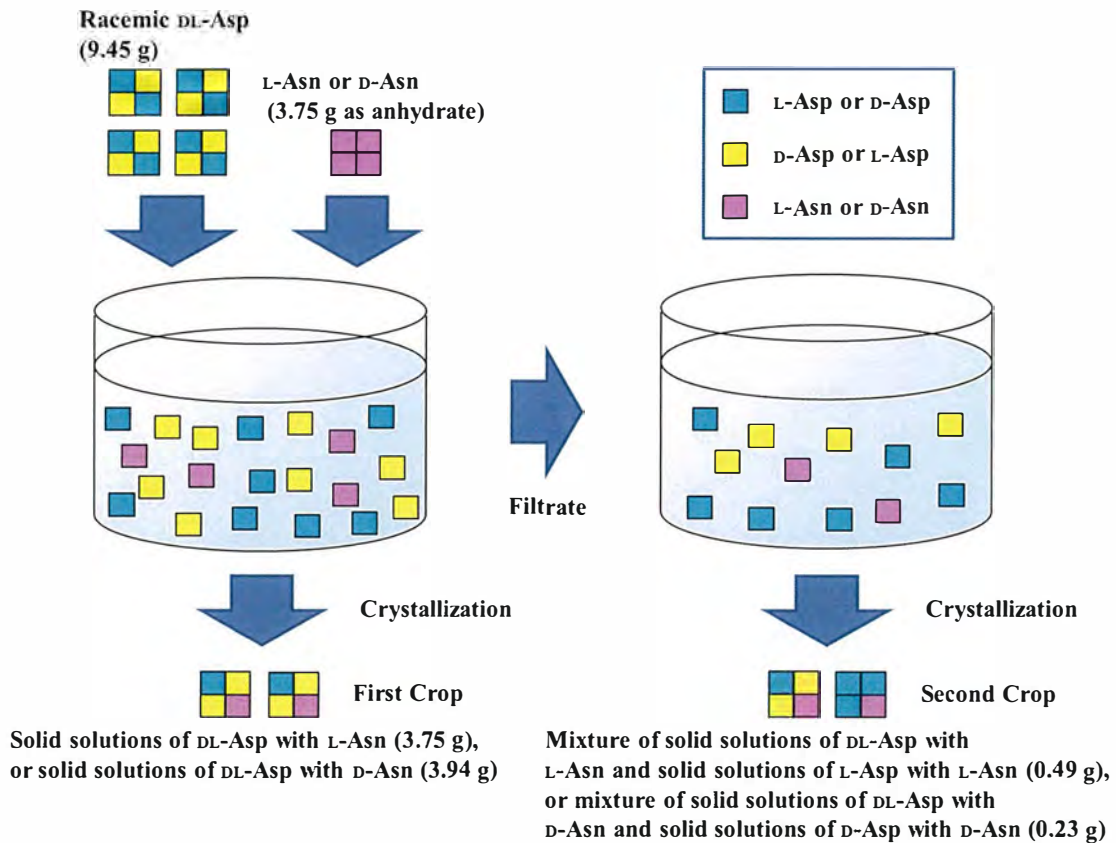


Figure 4-10. Simplified optical resolution scheme for DL-Asp crystallization in the presence of L-Asn or D-Asn.

本実験では純粋な L-Asp (又は D-Asp) 結晶は単離していないが、L-Asp (又は D-Asp) と L-Asn (又は D-Asn) の固溶体、及び DL-Asp と L-Asn (又は D-Asn) の固溶体の混合物はモルフォロジーが異なるため機械的な分離が可能と考えられ、Asn は加水分解により Asp へ変換することができる¹⁷⁾。従って、テーラーメイド添加物として L-Asn (又は D-Asn) 存在下で DL-Asp ラセミ化合物の晶析を行うことで、DL-Asp ラセミ化合物の結晶格子を構成する L-Asp (又は D-Asp) の一部を L-Asn (又は D-Asn) に置換した固溶体を形成させ、遊離する L-Asp (又は D-Asp) を晶析で分離する新たな方法を見出したと言える。また、本実験での結晶回収量は十分ではないが、DL-Asp と L-Asn (又は D-Asn) の固溶体は Asn の加水分解により DL-Asp として再利用することができると考えられる。

最後に、本研究において提案するエナンチオマー置換光学分割プロセス指針の確立を目指し、DL-Asp 及びテラーメード添加物として L-Asn（又は D-Asn）を用いて検討を行った。本プロセスのコンセプトは、ラセミ化合物の一方のエナンチオマーをテラーメード添加物に置換し、遊離するエナンチオマーを晶析により分離する方法である。自然界に存在するラセミ体の大半はラセミ化合物であり優先晶析法では光学分割できない。また、ジアステレオマー法は塩を形成するための酸性又は塩基性の官能基が必要である。対して、本研究において提案する方法はラセミ化合物の一方のエナンチオマーと置換する適切なテラーメード添加物を選択すればラセミ化合物を直接、簡便な晶析操作により光学分割することができると考えられる。純度及び回収量において改善の余地があるが、今後様々な化合物への応用が期待される。

4.4. まとめ

テラーメード添加物として L-Asn (又は D-Asn) 存在下において, DL-Asp ラセミ化合物の晶析による光学分割を検討した. DL-Asp の晶析において, L-Asn (又は D-Asn) 存在下から晶析した結晶は DL-Asp 結晶格子を構成する L-Asp (又は D-Asp) の一部が L-Asn (又は D-Asn) に置換した固溶体を形成していることが分析結果により示された. そして, 遊離した L-Asp (又は D-Asp) をろ液から晶析させることを試みた結果, 得られた結晶は, L-Asp (又は D-Asp) と L-Asn (又は D-Asn) の固溶体, 及び DL-Asp と L-Asn (又は D-Asn) の固溶体との混合物であった. 純粋な L-Asp (又は D-Asp) は得られていないものの, 本研究において考案する新しい方法でラセミ化合物の光学分割が可能であると考えられた.

4.5. 参考文献

- 1) 平山令明 有機化合物結晶作製ハンドブック, 丸善株式会社, 東京都, 2008.
- 2) Pasteur, L. “Sur les Relations qui Peuvent Exister entre la Forme Cristalline, la Composition Chimique et le Sens de la Polarisation Rotatoire” *Ann. Chim. Phys.* **1848**, 24, 442–459.
- 3) McMurry, J. (著), 伊藤シヨウ, 児玉三明 (訳) マクマリー有機化学 (上) 第3版, 株式会社東京化学同人, 東京都, 1994.
- 4) Secor, M. R. “Resolution of Optical Isomers by Crystallization Procedures” *Chem. Rev.* **1963**, 63, 297–309.
- 5) Pope, J. W.; Peachey, S. J. “The Application of Powerful Optically Active Acids to the Resolution of Externally Compensated Basic Substance. Resolution of Tetrahydroquinoline” *J. Chem Soc.* **1899**, 75, 1066–1093.
- 6) Profir, M. V.; Matsuoka, M. “Processes and Phenomena of Purity Decrease during the Optical Resolution of DL-Threonine by Preferential Crystallization” *Colloids Surf., A* **2000**, 164, 315–324.
- 7) Addadi, L.; Weinstein, S.; Gati, E.; Weissbuch, I.; Lahav, M. “Resolution of Conglomerates with the Assistance of Tailor-Made Impurities. Generality and Mechanistic Aspects of the “Rule of Reversal”. A New Method for Assignment of Absolute Configuration” *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4610–4617.
- 8) Addadi, L.; Berkovitch-Yellin, Z.; Domb, N.; Gati, E.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. “Resolution of Conglomerates by Stereoselective Habit Modifications” *Nature* **1982**, 296, 21–26.
- 9) Addadi, L.; Berkovitch-Yellin, Z.; Weissbuch, I.; Linda, J. M.; Shimon, J. W.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. “Growth and Dissolution of Organic Crystals with “Tailor-Made” Inhibitors—Implications in Stereochemistry and Materials Science” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 466–485.
- 10) Doki, N.; Yokota, M.; Kido, K.; Sasaki, S.; Kubota, N. “Simultaneous Crystallization of D- and L-Asparagines in the Presence of a Tailor-Made Additive by Natural Cooling Combined with Pulse Heating” *Cryst. Growth Des.* **2004**, 4, 1359–1363.
- 11) Yamada, S.; Yamamoto, M.; Chibata, I. “Optical Resolution of DL-Amino Acid by Preferential Crystallization Procedure” *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 4408–4412.
- 12) Yokota, M.; Doki, N.; Shimizu, K. “Chiral Separation of a Racemic Compound Induced by Transformation of Racemic Crystal Structures: DL-Glutamic Acid” *Cryst. Growth Des.* **2006**, 6, 1588–1590.
- 13) Harada, K. “The Optical Resolution of DL-Aspartic Acid, DL-Glutamic Acid,

- DL-Asparagine and DL-Glutamine by Preferential Crystallization” *Bull. Chem. Soc. Japan*. **1965**, *88*, 1552-1555.
- 14) Henderson Jr., W. J.; Brooks, A.; “Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals” *Agilent Technologies App. Note, Pub.# 5990-4547EN*, **2010**.
 - 15) Schuster, R. “Determination of Amino Acids in Biological, Pharmaceutical, Plant and Food Samples by Automated Precolumn Derivatization and High-performance Liquid Chromatography” *J. Chromatogr.*, **1988**, *431*, 271-284.
 - 16) Shinbo, T.; Yamaguchi, T.; Nishimura, K.; Sugiura, M. “Chromatographic Separation of Racemic Amino Acid by Use of Chiral Crown Ether-coated Reversed-phase Packing” *J. Chromatogr.*, **1987**, *405*, 145-153.
 - 17) Vickery, H. B.; Pucher, G. W. “L-Aspartic Acid” *Biochem. Prep.* **1952**, *2*, 71-73.

第5章

L-アスパラギン存在下における L-アスパラギン酸の面選択的結晶成長挙動

5.1. はじめに

晶析母液に溶解した特定の不純物は、核発生、結晶成長速度に影響を及ぼすことが知られている。Weissbuch らは、不純物が核発生に及ぼす影響について研究しており、核発生の遅れは結晶化成分のクラスター成長が不純物の吸着によって阻害されるためと考えられている¹⁾。Eerden らは、不純物が結晶成長速度に及ぼす影響について研究しており、不純物が結晶表面のテラスに吸着し成長に伴うステップの進行をピン留めすることで、結晶成長が阻害されると考えられている²⁾。しかし、添加物の分子構造により添加物が特定の結晶面だけに高い選択性を示して吸着し晶癖を変化させることがあるが、これについては詳しい考察がなされていない。結晶化成分と不純物の分子構造的な相互作用に基づく化学的メカニズムを利用して、晶析挙動や晶癖をコントロールするために、意図的に不純物を添加することがあり、テーラーメイド添加物と呼ばれている³⁾。結晶化分子と構造が類似し、結晶表面に現れる側の官能基を結晶成分とは異なる官能基に置換した添加物を選択すれば、特定の結晶面の成長を阻害することができる。しかしながら、結晶成長に及ぼす不純物効果の速度論的メカニズムについては、十分に研究がされていない。

Addadi ら⁴⁾、及び Sano ら⁵⁾は、テーラーメイド添加物がアミノ酸の晶癖に及ぼす影響について研究しており、結晶化成分のアミノ酸とは異なる他のアミノ酸がテーラーメイド添加物として作用し、アミノ酸結晶の晶癖を変化させることを報告している。従って、結晶化成分のアミノ酸の晶癖をデザインするために、他のアミノ酸をテーラーメイド添加物として利用することができる。そのためには、結晶成長の特定の結晶面の挙動、添加剤、それらの濃度、及び過飽和度などの様々な要因が関与する速度論的メカニズムを議論することは重要である。しかし、添加剤効果の速度論的メカニズムに関する研究がいくつか報告されているものの^{6), 7), 8)}、汎用性の高いモデルは現在のところ提案されていない。

第3章で述べたように、L-Asp 晶析において、L-Asn がテーラーメイド添加物として作用することが明らかとなった。また、L-Asn 添加系で晶析した結晶は、純粋系で晶析した結晶とはモルフォロジーが異なった。そこで、テーラーメイド添加物としてL-Asn 存在下におけるL-Asp の結晶成長挙動について研究を行うこととした。L-Asn はL-Asp と同様の分子構造を有するため (Figure 5-1)、アミノ酸基 ($\text{NH}_3^+ - \text{CH} - \text{COO}^-$) を介してL-Asp の上に吸着することができる。本章では、晶癖を制御するために、L-Asn がL-Asp 結晶成長に及ぼす速度論的作用メカニズム、即ち、L-Asp の結晶成長速度に及ぼすL-Asn の面選択的効果について研究を行った。

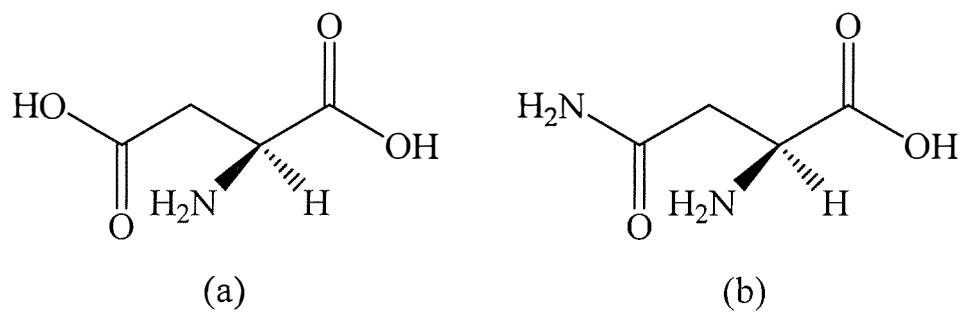


Figure 5-1. Molecular structures. (a) L-Asp and (b) L-Asn.

5.2. 理論と実験

5.2.1. 添加物存在下における結晶成長速度理論

Kubota と Mullin は、添加物存在下における結晶の面成長速度 (G) を式 (5-1) で表した⁹⁾.

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \alpha\theta_{eq} \quad (5-1)$$

ここで、 G_0 は純粋系における面成長速度、 α は添加物有効係数、 θ_{eq} は添加物が占有している結晶表面上の吸着活性点被覆率の平衡値である。式 (5-1) によれば、 $\alpha > 1$ のときは、添加物の吸着量が少なくても結晶成長速度は十分低下する。対して、 $\alpha < 1$ のときは、添加物の吸着量が最大 ($\theta_{eq} = 1$) の場合でも結晶成長速度は低下するものの停止はしない。式 (5-1) は、 $\alpha\theta_{eq} \leq 1$ の場合のみ適用される。 $\alpha\theta_{eq} > 1$ のときは、 $\alpha\theta_{eq}$ の値に関わらず常に $G/G_0 = 0$ となる。

そして、 α は式 (5-2) で表される。

$$\alpha = \frac{\gamma a}{kT\sigma L} \quad (5-2)$$

ここで、 γ はエッジエネルギー、 a は成長単元の表面積、 k はボルツマン定数、 T は成長温度、 σ は相対過飽和度、 L は吸着活性点間隔である。従って、 α は、結晶の特性 (γ 及び a)、結晶成長の環境 (T 及び σ)、そして結晶と添加物間の相互作用 (L) によって決まる。また、 θ_{eq} は、式 (5-3) で表される Langmuir の吸着等温式により添加物濃度 (c) と関係づけられる。

$$\theta_{eq} = \frac{Kc}{1+Kc} \quad (5-3)$$

ここで、 K は Langmuir 定数である。従って、式 (5-1) は、式 (5-4) のように表すことができる (Kubota-Mullin model)。

$$\frac{G}{G_0} = 1 - \frac{\alpha Kc}{1+Kc} \quad (5-4)$$

本研究では、L-Asp 結晶の G 及び G_0 を測定し、 G/G_0 とテラーメード添加物である L-Asn の c との関係を表 (5-4) にフィッティングし、さらに L-Asp 結晶成長速度に対する L-Asn の K を決定し、L-Asp 結晶への L-Asn の吸着力について検討した。

5.2.2. 原料, 試薬, 溶媒

実験に使用した原料, 試薬, 溶媒を以下に示す.

- ・ L-Asp : 和光純薬工業株式会社, $\geq 99.0\%$
- ・ L-Asn \cdot H₂O : 和光純薬工業株式会社, $\geq 99.0\%$
- ・ *n*-ヘキサン : 関東化学株式会社, $> 96.0\%$
- ・ 塩酸 : 関東化学株式会社, 35.0–37.0 %

5.2.3. L-Asp 結晶成長速度の測定

L-Asp 結晶は結晶多形を有し, α 形と β 形の存在が知られている. α 形は単斜晶系 (空間群 $P2_1$)^{10), 11), 12), 13)}, β 形は斜方晶系 (空間群 $P2_12_12_1$) に属している¹⁴⁾. これらの結晶の外観は, α 形は板状結晶, β 形は柱状結晶を呈している¹⁵⁾. 結晶成長速度の測定実験では, L-Asp α 形結晶を種晶として使用した. Figure 5-2 は, L-Asp α 形結晶の光学顕微鏡写真及び軸方向を示す. L-Asp α 形結晶は, *a* 軸に対して垂直に最も大きな板状面を持つ板状結晶で, *c* 軸方向には尖ったエッジが見られる. 結晶の方位 (面指数) は薄膜 X 線回折装置を使用して決定した.

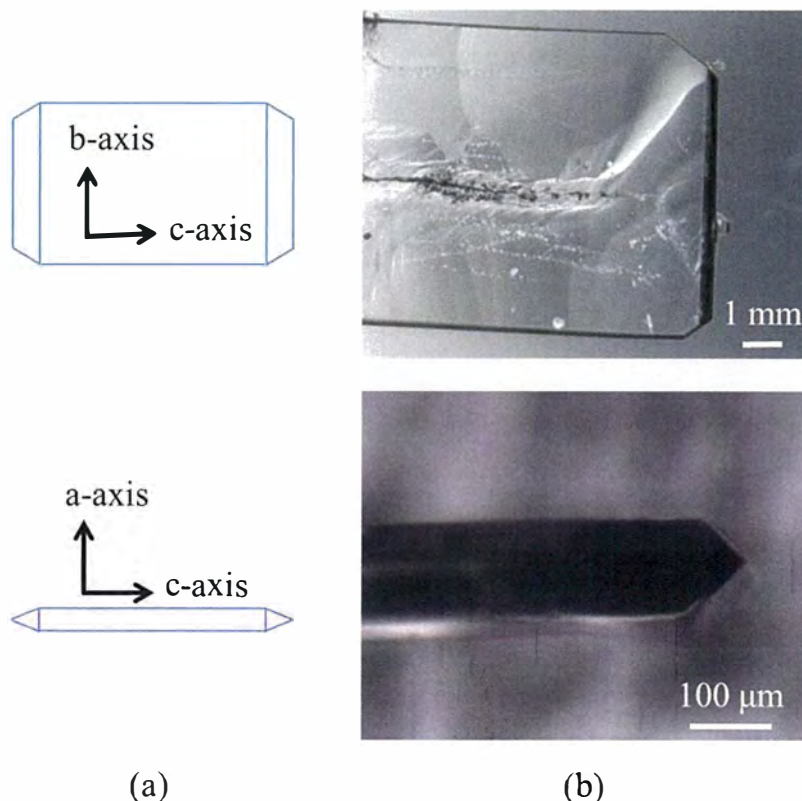


Figure 5-2. Crystal of L-Asp in the α form. (a) Axis directions and (b) optical micrographs.

L-Asp 種晶は以下の手順で作製した. 500 mL のガラス製ビーカーに L-Asp (2.54

g) と蒸留水 (300 mL) を加え、溶媒の蒸発を防ぐために蓋をした。そして、45°C に保持した恒温槽で攪拌し試料を完全に溶解させて、40°C 飽和相当の L-Asp 水溶液を作製した。この溶液を晶析皿に移し、5°C/h で 20°C まで冷却した。溶液を 20°C で 2-4 日静置し、析出した結晶の中から形が良い結晶をピンセットで採取して種晶とした。

L-Asp 結晶成長速度 (静置系) は、軸方向毎に以下の手順で測定した。35°C での L-Asp 飽和水溶液、溶媒の蒸発を防ぐための *n*-ヘキサン、そしてスライドガラスに固定した L-Asp 種晶をジャケット付晶析槽に入れ、溶液が 25°C で安定したところで添加物無添加系 (純粋系) での 1 回目の結晶成長速度 (G_0) を測定した。測定時間は 120-180 分とし、結晶成長の観察には光学顕微鏡 (VM200) を用いた。純粋系における測定終了後、L-Asn (0, 3, 5, 7, 10 mol %) を含む 35°C での L-Asp 飽和水溶液に入れ替え、同一の種晶について L-Asn 添加系で 2 回目の結晶成長速度 (G) を 1 回目と同様の操作で測定した。得られた結晶について、各成長面の成長部分 (用いた種晶部分は含まない) を削り取り、L-Asn の含有率を測定した。また、得られた結晶の構造は PXRD で確認した。

L-Asp 結晶成長速度 (攪拌系) は、以下の手順で測定した。攪拌翼、温度計を装着した 500 mL のジャケット付晶析槽に、L-Asn (0, 1, 3, 5, 7, 10 mol %) を含む 35°C での L-Asp 飽和水溶液 (300 mL)、同様の形状の L-Asp 種晶 20 個を加え、25°C で 2 時間攪拌した。成長した全ての種晶をピンセットで採取し、各軸方向の結晶成長速度 (G) を測定し、平均値を採用した。得られた代表的な結晶について、各成長面の成長部分 (用いた種晶部分は含まない) を削り取り、L-Asp 純度を測定した。

5.2.4. pH 測定及び pH 制御下における L-Asp 結晶形状の観察

L-Asn 存在下における L-Asp 水溶液の pH は以下の手順で測定した。100 mL のガラス製ビーカーに L-Asp (0.356 g)、L-Asn (0, 3, 7, 10 mol %), 及び蒸留水 50 mL を加え、溶媒の蒸発を防ぐために蓋をした。そして、40°C に保持した恒温槽で攪拌し試料を完全に溶解させて、35°C 飽和相当の L-Asp 純粋系水溶液及び L-Asn 添加系水溶液の pH を測定した (pH メーター: D-51, 株式会社堀場製作所)。

pH 調整前の結晶形状は以下のように観察した。500 mL のガラス製ビーカーに L-Asp (2.14 g)、L-Asn (0, 3, 7 mol %), 及び蒸留水 (300 mL) を加え、溶媒の蒸発を防ぐために蓋をした。そして、40°C に保持した恒温槽で攪拌し試料を完全に溶解させて、35°C 飽和相当の L-Asp 水溶液を作製した。この溶液を晶析皿に移し、5°C/h で 20°C まで冷却した。溶液を一晩静置した後、L-Asp (1 mg) を添加し、さらに一晩 20°C で静置し、析出した結晶の中からは形が良い結晶をピンセットで採取して光学顕微鏡 (BX51) で観察した。

pH 調整後の結晶形状は以下のように観察した。500 mL のガラス製ビーカーに pH 1.95 における 35℃ 飽和相当の L-Asp (3.34 g), L-Asn (0, 3, 7 mol %), 及び蒸留水 (300 mL) を加え, 溶媒の蒸発を防ぐために蓋をした。35℃ に保持した恒温槽で 3 時間攪拌し, この溶液に 1 mol/L HCl を滴下して pH 1.95 に調整し, 40℃ に保持した恒温槽で攪拌し試料を完全に溶解させた。pH 調整前の結晶作製法と同様の操作で結晶を析出させ, 析出した結晶の中からは形が良い結晶をピンセットで採取して光学顕微鏡 (BX51) で観察した。さらに, pH 調整後に生成した結晶は, PXRD にて L-Asp 塩酸塩形成有無の確認を行った。

5.2.3. 分析装置及び条件

(1) L-Asp 結晶方位の決定

L-Asp 結晶方位の決定は薄膜 X 線回折装置を用いて行った。装置及び条件を以下に示す。

- 装置：試料水平型多目的 X 線回折装置 Ultima IV (株式会社リガク)
- 線源：CuK α
- 電圧：50 kV
- 電流：300 mA

(2) L-Asp の各成長面の L-Asn 含有率, 及び L-Asp 純度

L-Asp の各成長面の L-Asn 含有率, 及び L-Asp 純度は日立高速アミノ酸分析計を用いて測定した。装置及び条件を以下に示す。

- 装置：L-8900 (株式会社日立ハイテクノロジーズ)
- 樹脂：日立カスタムイオン交換樹脂
- 流量：0.10 mL/min
- 試料注入量：20 μ L
- 設定温度：35℃
- 波長：570 nm, 440 nm

(3) L-Asp 結晶の構造確認, 及び L-Asp 塩酸塩形成の確認

L-Asp 結晶の構造確認, 及び L-Asp 塩酸塩形成の確認は PXRD を用いて行った。装置及び条件を以下に示す。

- 装置：RINT-2200 X-Ray Diffractometer (株式会社リガク)
- 線源：CuK α
- 電圧：40 kV
- 電流：20 mA
- スキャンスピード：2°/min
- 測定範囲：2 θ = 2–40°

5.3. 結果と考察

5.3.1. L-Asp 結晶の各軸方向への結晶成長速度（静置系）¹⁶⁾

Figure 5-3 に、一例として、3 mol % L-Asn 存在下における各軸方向への L-Asp 結晶成長量の経時変化を示す。L-Asp 結晶成長量は経時的に直線的に増加したため、L-Asp 結晶成長速度は直線の傾きから求めた。ここで、上述したように、 G_0 は純粋系での 1 回目の結晶成長速度であり、 G は L-Asn 添加系での 2 回目の結晶成長速度である。L-Asp 結晶成長速度は、使用する L-Asp 種晶によって異なったため、L-Asp 種結晶の違いによる影響を排除し L-Asn の効果を定量的に議論するために L-Asp 結晶成長速度の比 (G/G_0) について検討した。

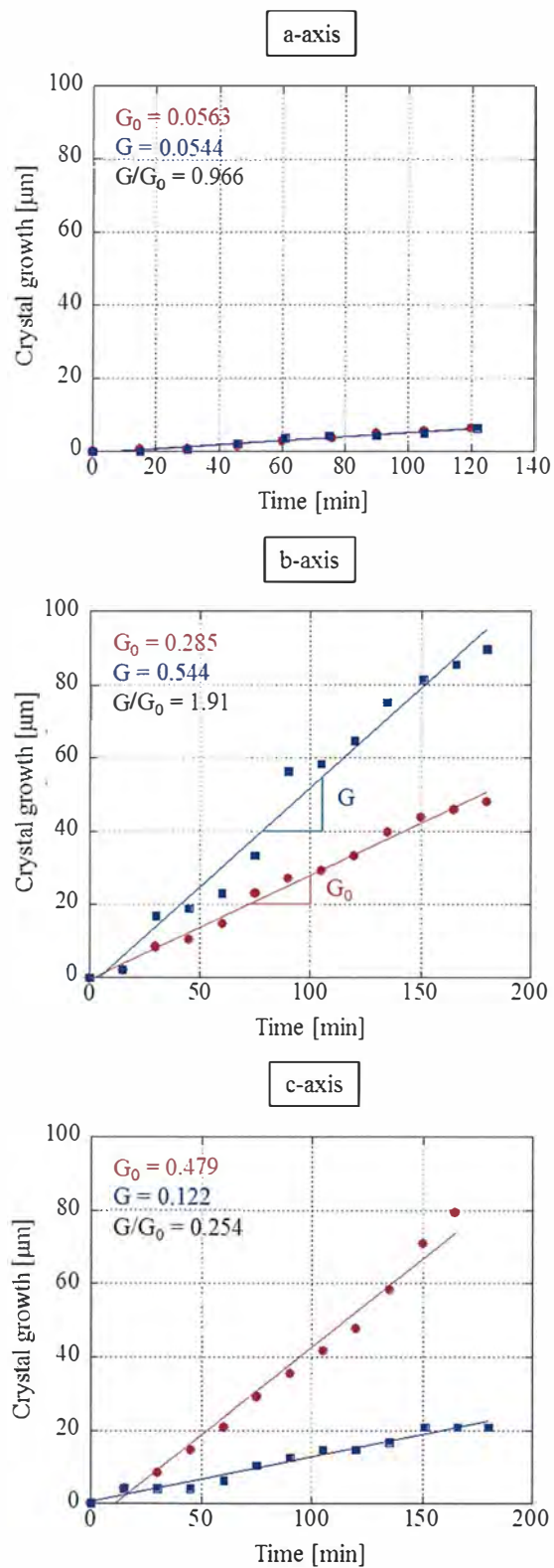


Figure 5-3. Changes in L-Asp crystal growth over time. The rate in the presence of 3 mol % L-Asn is shown in each axis direction.

異なった L-Asn 濃度 (0, 3, 5, 7, 10 mol %) における G/G_0 も同様に測定した. Figure 5-4 には, L-Asn 濃度 (c , L-Asp に対する L-Asn のモル比) と G/G_0 の関係を示す.

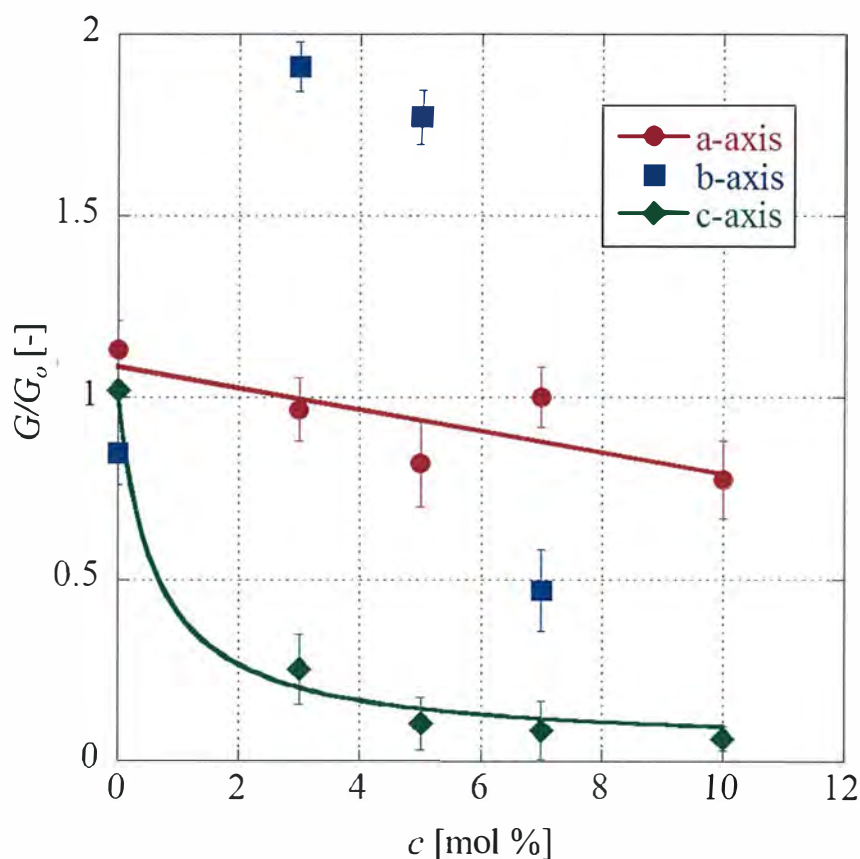


Figure 5-4. Relationship between the L-Asn concentration (c) and L-Asp crystal growth rate ratio (G/G_0). The L-Asn concentration is expressed as the mole ratio of L-Asn to L-Asp. The mean values and error bars of five times measurements are shown.

a 軸方向については, G/G_0 が 1 に近似したため, L-Asn による L-Asp 結晶成長速度への影響が小さいことがわかった.

b 軸方向については, $c = 3, 5$ mol % のとき G/G_0 は 1 より大きくなったため L-Asp 結晶成長速度が増加し, $c = 7$ mol % のとき G/G_0 は 1 より小さくなったため L-Asp 結晶成長速度が減少した. 興味深いことに, $c = 10$ mol % のとき L-Asp 結晶の b 軸方向について結晶面の溶解が観察された.

c 軸方向については, L-Asn 濃度の増加に伴い, L-Asp 結晶成長速度が減少した. そして, c 軸方向への L-Asp 結晶成長速度の実験結果は, 式 (5-4) で示した Langmuir の吸着等温式にフィットし, 相関係数 0.995 となった. 従って, L-Asn

が L-Asp 結晶の c 軸方向に及ぼす影響は、Langmuir の吸着モデルを適用できると考えられる。このときの Langmuir 定数 (K) は 1.61, 添加物有効係数 (α) は 0.979 となった。 K は吸着過程の速度定数 k_a と脱着過程の速度定数 k_d の比 (k_a/k_d) である。即ち, L-Asn は L-Asp 結晶に対して脱着よりも吸着が優先的に起こっていることが示唆された。

なお, Kubota-Mullin model に従い, 高過飽和度においては結晶成長速度に及ぼす不純物の影響は低下すると考えられる。

5.3.2. L-Asn が L-Asp 結晶成長に及ぼす作用メカニズム

L-Asp α 形結晶は Figure 5-2 に示すように板状結晶を呈するため, 本実験における a 軸方向への結晶成長速度は Figure 5-3 に示すように最も小さいと考えられる。側鎖のコンフォメーションに応じて L-Asp 分子が L-Asn 分子に置換した場合 ($\text{CH}_2\text{-COOH}$ vs CH_2CONH_2), b 軸又は c 軸の何れかに沿ってテラス及びレジが影響を受ける。

Figure 5-5 (a) に, b 軸に沿った L-Asp 結晶の充填配列¹⁰⁾を示す。Figure 5-5 (b) (c) には, b 軸及び c 軸のステップとして 020 及び 001 のスライス図をそれぞれ示す。L-Asp 分子は, アミノ基とカルボキシル基の $\text{NH}\cdots\text{O}$ 水素結合を形成し, b 軸方向への結晶成長に関与する。

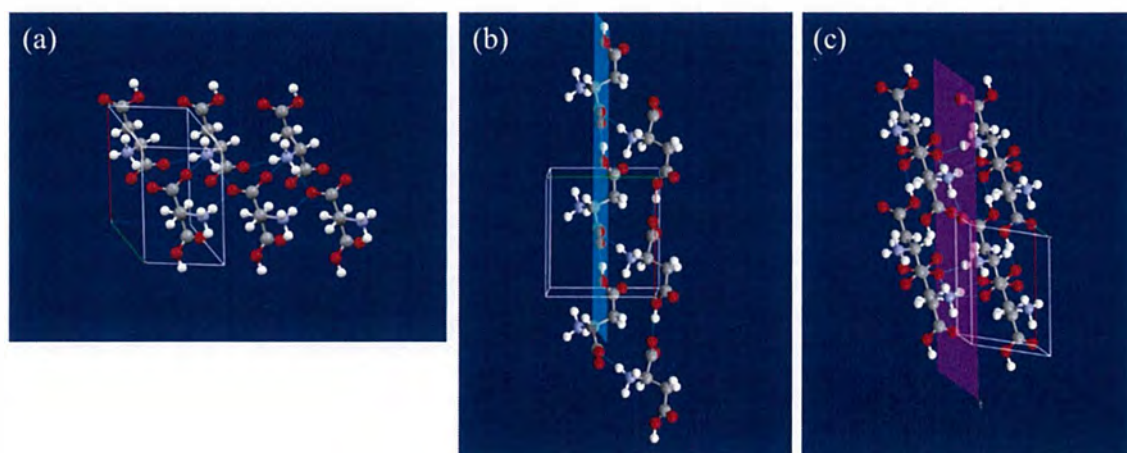


Figure 5-5. L-Asp crystal structure.¹⁰⁾ (a) The packing arrangement in a perspective view along the b-axis, (b) the view of the 020 slice as step of b-axis, and (c) the view of the 001 slice as step of c-axis are shown.

L-Asp 分子構造に類似する L-Asn は, b 軸方向において L-Asn の CO 基と L-Asp の NH 基の水素結合, 又は \bar{b} 軸方向において L-Asn の NH 基と L-Asp の CO 基の水素結合を形成し, L-Asp 結晶に吸着する。b 軸方向又は \bar{b} 軸方向から L-Asn が吸

着した場合、NH₂は結晶の内部方向を向く。そのため、L-Asp分子は阻害されずに吸着することができ、吸着したL-Asn分子は結晶内に取り込まれてしまう。

このように、L-AsnはL-Aspの結晶表面に吸着することができ、OH基がb軸方向へのL-Asp結晶成長に関与しないため、結晶内に取り込まれる。つまり、L-Asn ($c = 3, 5 \text{ mol } \%$)の添加により見かけ上の過飽和度が増加し、その結果b軸方向へのL-Asp結晶成長速度が増加したと考えられる。しかしながら、L-Asn濃度が増加すると ($c = 7 \text{ mol } \%$)、L-AspとL-Asnの立体配座に違いによりパッキングがひずみ、結晶成長が抑制されたと考えられる。さらに、L-Asn濃度が最高するとき ($c = 10 \text{ mol } \%$)、結晶表面近傍ではL-Asn濃度の増大により、バルク溶液と比較してL-Asp濃度が低下し、その結果、L-Asp結晶は固液平衡を保つために溶解したと考えられる。

Figure 5-6に、L-Asp結晶の成長部分におけるL-Asn含有率を示す。a軸方向とb軸方向の区別が難しかったため、c軸及びa+b軸方向の成長部分について測定した。その結果、L-AsnはL-Asp結晶に取り込まれており、取り込み量は結晶成長速度比 (Figure 5-4) と相関性があることが示唆された。

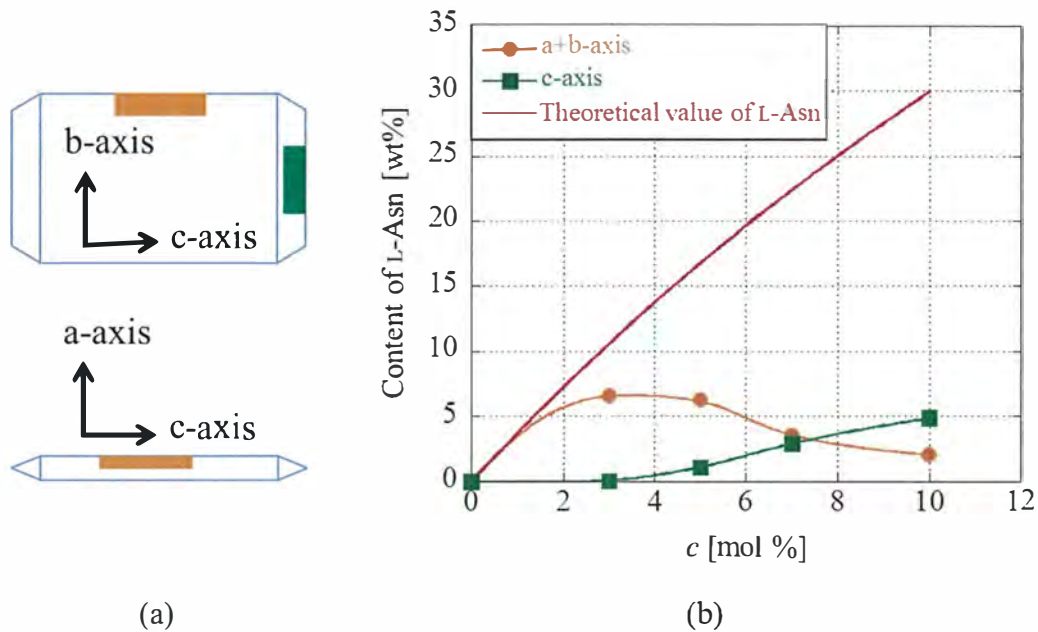


Figure 5-6. Content of L-Asn in the grown part of the L-Asp crystal. (a) Axis directions and measured part of the crystal, and (b) relationship between the L-Asn concentration (c) and L-Asn content (wt%) incorporated into the L-Asp crystal. The L-Asn concentration is expressed as the mole ratio of L-Asn to L-Asp. The theoretical value of L-Asn is expressed as the weight ratio of the added amount of L-Asn to the sum of the theoretically crystallized amount of L-Asp and added amount of L-Asn.

また、L-Asn (3, 5, 7 mol %) 存在下で得られた結晶の PXRD パターンは L-Asp と同様の回折パターンを示した (Figure 5-7). 言い換えると、得られた結晶には L-Asn が含まれるにも関わらず、L-Asn の回折ピークは認められなかった。これらの PXRD データは、L-Asp 結晶格子の一部が L-Asn に置換したことを示唆した。

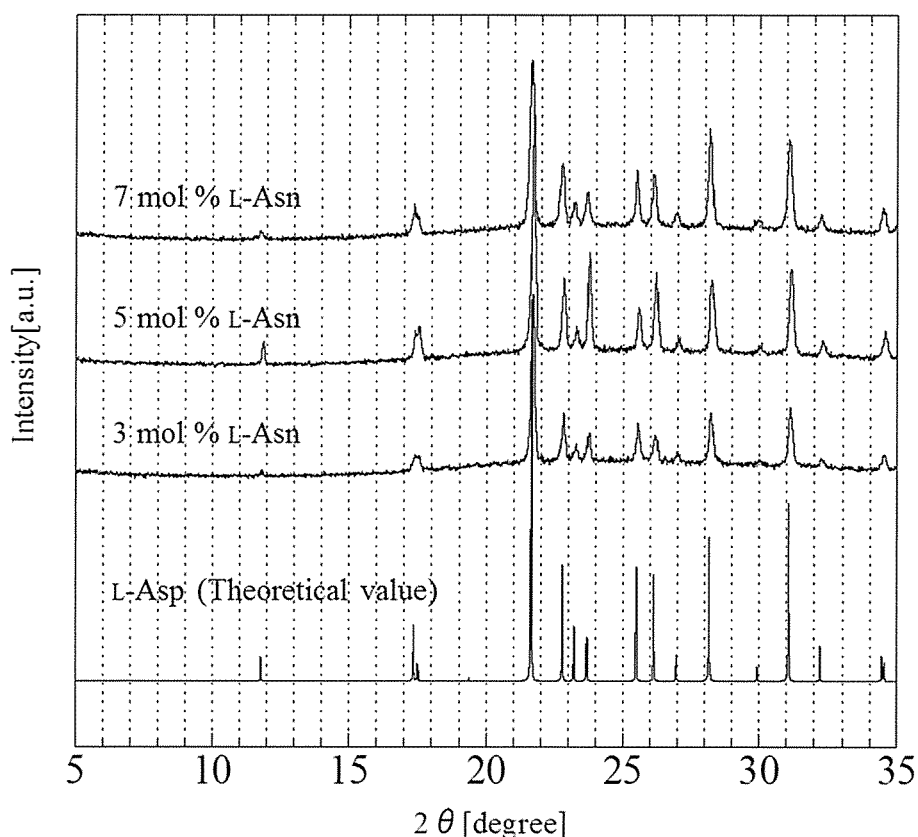


Figure 5-7. PXRD patterns of the obtained crystals in the presence of L-Asn (3, 5, 7 mol %) and L-Asp (theoretical value).

c 軸方向においては、COOH と OOC の OH \cdots O 水素結合、又は COO $^-$ と NH $_3^+$ の O \cdots H 水素結合の形成が、結晶成長に関与する。L-Asn は、L-Asn の CO 基と L-Asp の OH 基又は NH 基の水素結合を形成することで、L-Asp 結晶に吸着する。L-Asn が吸着した場合、NH $_2$ が結晶表面に現れ、L-Asp 分子の吸着を阻害することでピン留めが起り、c 軸方向への成長が抑制されたと考えられる。

5.3.3. L-Asp 結晶の各軸方向への結晶成長速度 (攪拌系)

上記実験と同条件において、攪拌系、即ち回分晶析で L-Asp 結晶成長速度 (G) を測定した。結果を Figure 5-8 に示す。b 軸方向については、 $c = 1, 3, 5$ mol % のとき添加物無添加系に比べて L-Asp 結晶成長速度は増加し、 $c = 7, 10$ mol % のと

きは減少した。c 軸方向については、L-Asn 濃度の増加に伴い、L-Asp 結晶成長速度が減少した。よって、静置系での結晶成長と同様の挙動を示し、回分晶析においても L-Asn の効果は面選択的に作用することがわかった。

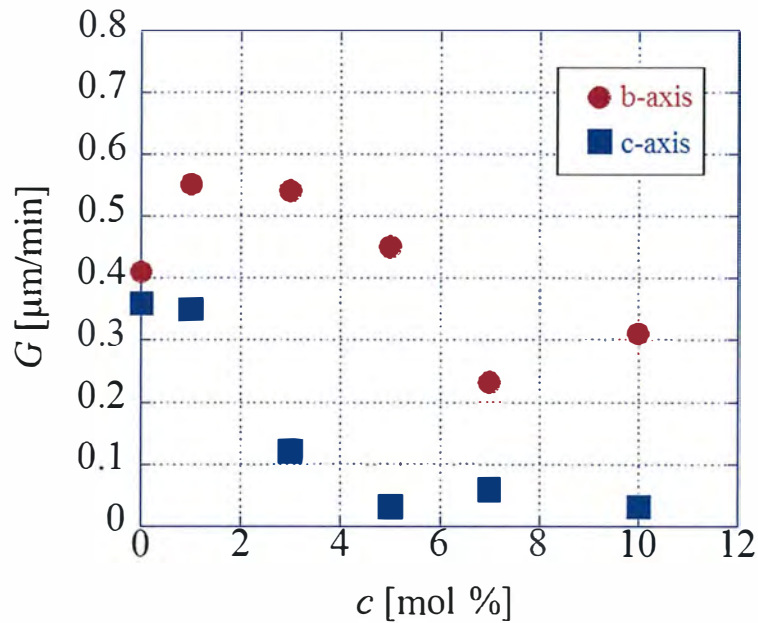


Figure 5-8. Relationship between the L-Asn concentration (c) and L-Asp crystal growth rate (G) under agitation. The L-Asn concentration is expressed as the mole ratio of L-Asn to L-Asp.

また、Figure 5-9 に示すように、各成長面の成長部分の L-Asp 純度は L-Asn 濃度の増加に伴い低下した。即ち、L-Asn が成長面に取り込まれていることが示唆された。なお、a 軸と b 軸は区別が難しかったため、両方を含めた純度を測定した。

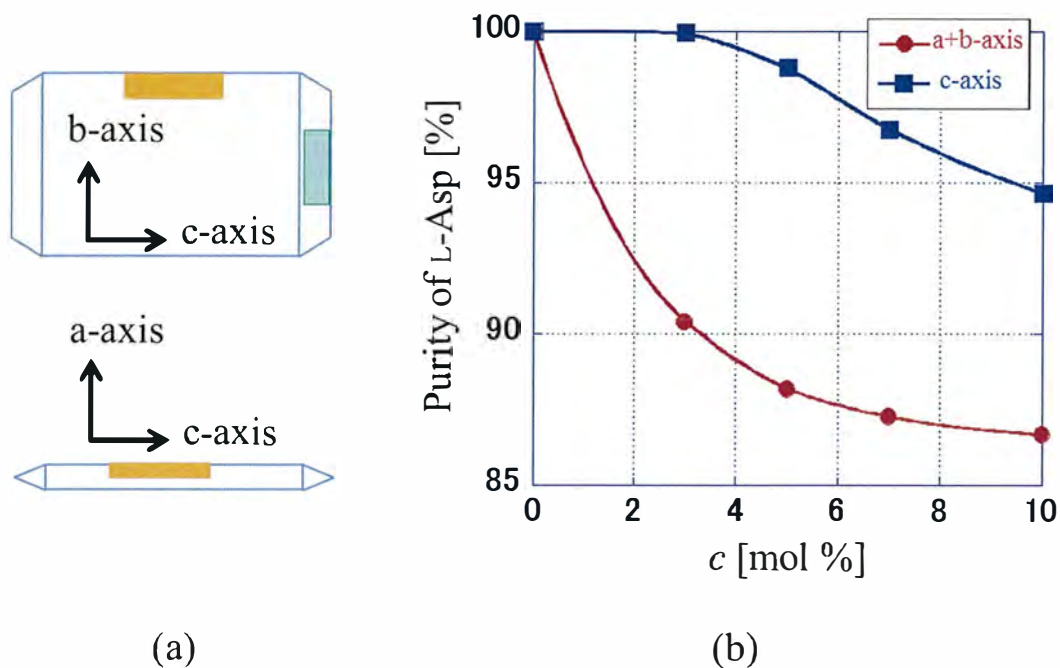


Figure 5-9. (a) Axis directions and measured faces. (b) Relationship between the L-Asn concentration (c) and L-Asp purity (%) of grown faces. The L-Asn concentration is expressed as the mole ratio of L-Asn to L-Asp.

5.3.4. pH 制御下における L-Asp 結晶成長への L-Asn の影響¹⁶⁾

アミノ酸は両性分子構造を有するため、解離又は溶解性は pH に依存する。そこで本節では、pH の影響について議論する。本研究で採用した濃度範囲の L-Asn (0–10 mol %) を含む L-Asp 水溶液の pH を測定した結果、pH 2.89–2.91 とほぼ一定であった。従って、本研究の成長速度の変化は、L-Asn 効果のみを考慮すればよいと考えられる。

次に、pH 制御下における L-Asp 結晶成長への L-Asn の影響について議論する。Figure 5-10 には、L-Asp 及び L-Asn の解離状態を示す。酸性アミノ酸である L-Asp は、酸性条件下ではカチオン A で存在し、塩基性になるにつれて双性イオン B、一価のアニオン C、そして二価のアニオン D に変化する。中性アミノ酸である L-Asn は、酸性条件下ではカチオン A で存在し、塩基性になるにつれて双性イオン B、一価のアニオン E に変化する。

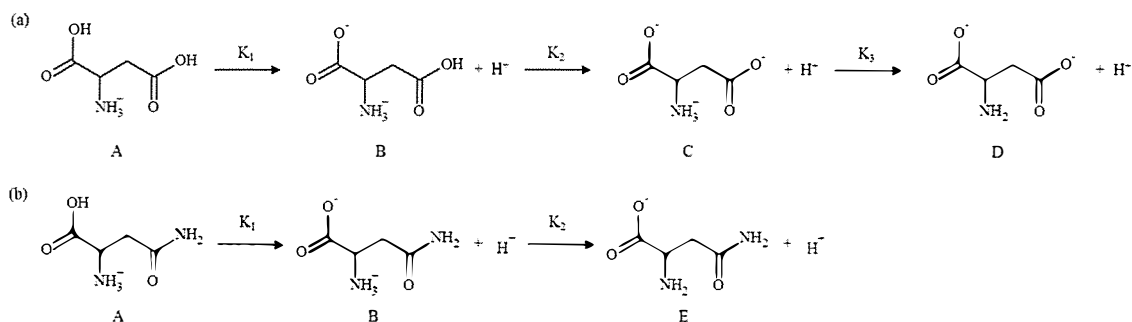


Figure 5-10. Dissociation states. (a) L-Asp and (b) L-Asn.

Table 5-1 に、L-Asp 及び L-Asn の酸解離定数 (pKa)、等電点 (pI)、並びに pH 2.90 及び pH 1.95 における各イオンの存在率を示す. 本研究の実験条件は pH 2.90 であったため、ほぼ L-Asp の等電点付近である. 一方、L-Asn は等電点が pH 5.41 であるため、双性イオンの存在率が低下していることが考えられたが、酸解離定数を用いて pH 2.90 における各イオンの存在率を求めたところ、双性イオン (Figure 5-10 (b), B) は L-Asn の主成分であり、その存在比率は 88.4% であることがわかった (Table 5-1). L-Asp α 形結晶は、L-Asp 双性イオンが水素結合を形成し、3次元構造をとっている¹²⁾. よって L-Asp 結晶成長に参与するのは L-Asp 双性イオンと考えられ、L-Asp 結晶成長抑制に参与するのは同様に L-Asn 双性イオンと考えられる. L-Asp の結晶成長及ぼす L-Asp 及び L-Asn の解離状態の影響を確認するために、L-Asp 双性イオン (Figure 5-10 (a), B)、及び L-Asn カチオン (Figure 5-10 (b), A) がそれぞれ主成分となるように溶液の pH を 1.95 に調整し (Table 5-1)、結晶形状の比較実験を行った.

Table 5-1. Isoelectric point (pI), acid dissociation constant (pKa), and presence ratio of individual ions of L-Asp and L-Asn at pH 2.90 and 1.95.

		L-Asp		L-Asn	
Acid dissociation constant (pKa)	pK1	1.88		2.02	
	pK2	3.65		8.80	
	pK3	9.60		-	
Isoelectric point (pI)		2.77		5.41	
		pH 2.90	pH 1.95	pH 2.90	pH 1.95
Presence ratio of individual ion [%]	A	7.50	45.5	11.6	53.9
	B	78.5	53.4	88.4	45.9
	C	14.0	1.07	-	-
	D	0.00	0.00	-	-
	E	-	-	0.00	0.00

Figure 5-11 に、pH 2.90 (pH 調整前) 及び pH 1.95 (pH 調整後)、L-Asn 存在下 ($c = 0, 3, 7 \text{ mol } \%$) において得られた L-Asp 結晶の光学顕微鏡写真を示す。pH 1.95 において、L-Asn 無添加系、及び L-Asn 3 mol % 存在下で得られた L-Asp の結晶形状は同様であった。これは、pH 1.95 に調整したとき、L-Asn 双性イオン (Figure 5-10 (b), B) の存在率が約半分に減少したためと考えられる (Table 5-1)。対照的に、L-Asn 3 mol % 存在下で得られた L-Asp の結晶形状は、pH 調整前後で明らかに変化が認められた。また、pH 1.95 で得られた L-Asp 結晶の PXRD パターンは、pH 2.90 で得られたパターンと同じであり、塩酸塩は形成していないことが示された (Figure 5-12)。pH 1.95 において、L-Asn 7 mol % 存在下で得られた L-Asp の結晶形状は、L-Asn 無添加系及び 3 mol % L-Asn 存在下で得られた結晶から変化が認められた。これは、L-Asn 濃度の増加に伴い、L-Asn 双性イオン (Figure 5-10 (b), B) が増加したためであると考えられる。これらの結果は、結晶化成分 (L-Asp 双性イオン) と分子構造が類似する L-Asn 双性イオンが、L-Asp 結晶成長抑制に関与していることを示唆した。従って、結晶表面への添加物の吸着は、分子構造の類似性により生じると考えられる。

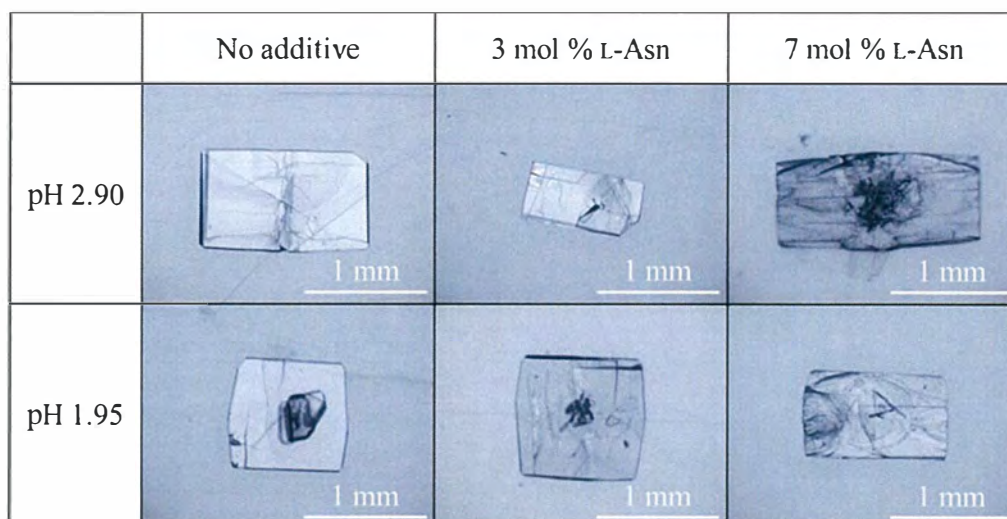


Figure 5-11. Optical micrographs of L-Asp crystals grown in the presence of L-Asn. The crystals were grown at $c = 0, 3, \text{ or } 7 \text{ mol } \%$ at pH 2.90 (before pH adjustment) and pH 1.95 (after pH adjustment).

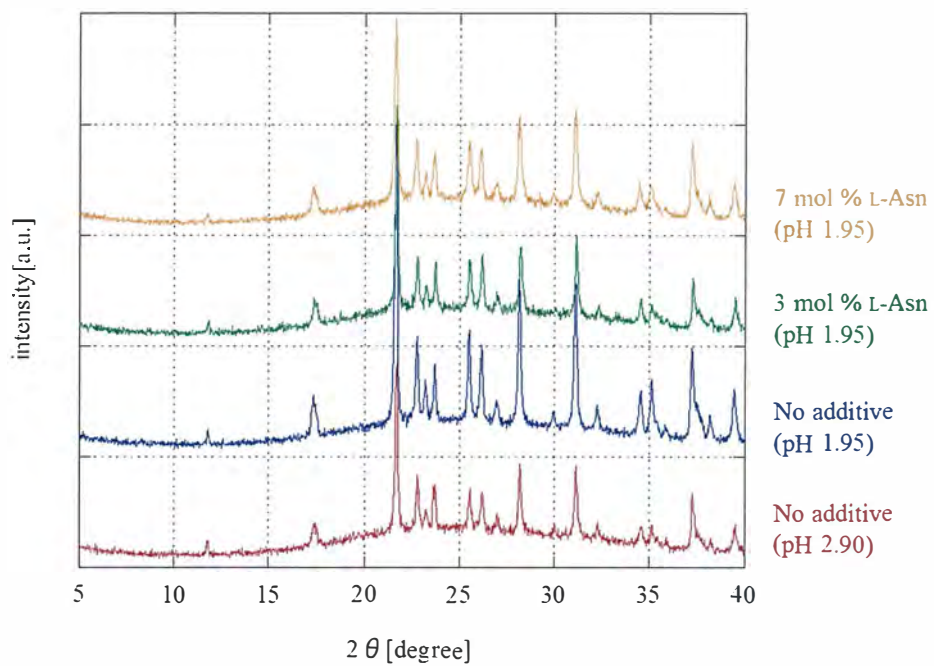


Figure 5-12. PXRD patterns of L-Asp crystals grown in the presence of L-Asn. The crystals were grown at $c = 0, 3, \text{ or } 7$ mol % at pH 2.90 (before pH adjustment) and pH 1.95 (after pH adjustment).

5.4. まとめ

L-Asn が L-Asp 結晶成長に及ぼす速度論的作用メカニズム、即ち、L-Asp の結晶成長速度に及ぼす L-Asn の面選択的効果について研究を行った。a 軸方向においては、L-Asp 結晶成長に及ぼす L-Asn の影響は小さかった。b 軸方向においては、3, 5 mol % L-Asn 存在下では L-Asp 結晶成長速度が増加、7 mol % L-Asn 存在下では L-Asp 結晶成長速度が低下し、そして 10 mol % L-Asn 存在下では L-Asp 結晶の b 軸面の溶解が観測された。c 軸方向においては、L-Asp 結晶成長速度は L-Asn 添加量の増量に伴い低下した。そして、c 軸方向への L-Asp 結晶成長速度の実験結果は、Langmuir の吸着等温式にフィットした。興味深いことに、成長結晶と類似構造を持つ添加物存在下において、結晶成長を促進及び抑制、そして抑制及び結晶面溶解が共存する条件があることがわかった。さらに、L-Asp 結晶成長方向による L-Asn の多様な効果について分子構造に基づき考察し、各軸方向における異なる水素結合ネットワークが結晶面成長速度に影響を及ぼすと考えた。

さらに、攪拌系、即ち回分晶析においても静置系での結晶成長と同様の挙動を示した。よって、回分晶析においても L-Asn の効果は面選択的に作用することがわかった。

pH 制御下 (pH 1.95) において、3 mol % L-Asn 存在下では L-Asp 結晶形状に及ぼす影響は認められなかったが、7 mol % L-Asn 存在下では結晶形状に変化が認められた。これらの結果は、結晶表面への添加物の吸着が分子構造の類似性により生じることを示唆した。

5.5. 参考文献

- 1) Weissbuch, I.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. "Toward Stereochemical Control, Monitoring, and Understanding of Crystal Nucleation" *Cryst. Growth Des.* **2003**, *3*, 125–150.
- 2) Eerden, J. P.; Muller-Krumbhaar, H. "Formation of macrosteps due to time dependent impurity adsorption" *Electrochim. Acta*, **1986**, *31* 1007–1012.
- 3) Weissbuch, I.; Leiserowitz, L.; Lahav, M. "Tailor-Made Additives" and Impurities" *Crystallization Technology Handbook Second Edition Revised and Expanded*, Mersmann, A., Ed., Marcel Dekker, New York, **2001**, 526–579.
- 4) Addadi, L.; Berkovitch-Yellin, Z.; Domb, N.; Gati, E.; Lahav, M.; Leiserowitz, L. "Resolution of Conglomerates by Stereoselective Habit Modifications" *Nature* **1982**, *296*, 21–26.
- 5) Sano, C.; Nagashima, N.; Kawakita, T.; Iitaka, Y.; "The effects of additives on the crystal habit of monosodium L-glutamate monohydrate" *J. Cryst. Growth*, **1990**, *99*, 1070–1075.
- 6) Black, S. N.; Davey, R. J.; Halcrow, M. "The kinetics of crystal growth in the presence of tailor-made additives" *J. Cryst. Growth*, **1986**, *79*, 765–774.
- 7) Bliznakov, G.; Nikolaeva, R. "Über den einfluß der aliphatischen carbonsäuren auf die wachstumsgeschwindigkeit von KBr-kristallen" *Kristall Tech.*, **1967**, *22*, 161–166.
- 8) Cavey, R. J.; Mullin, J. W. "Growth of the {100} faces of ammonium dihydrogen phosphate crystals in the presence of ionic species" *J. Cryst. Growth*, **1974**, *26*, 45–51.
- 9) Kubota, N.; Mullin, J. W. "A kinetic model for crystal growth from aqueous solution in the presence of impurity" *J. Cryst. Growth*, **1995**, *152*, 203–208.
- 10) Derissen, J. L.; Endeman, H. J.; Peedeman, A. F. "The crystal and molecular structure of L-aspartic acid" *Acta Cryst.*, **1968**, *B24*, 1349–1354.
- 11) Zhang, Y.; Cao, C.; Lin, Q.; Yang, L.; Wei, T. "Research of hydrogen bonding in L-Asp" *Huaxue Yanjiu Yu Yingyong*, **2006**, *18*, 952–954.
- 12) Bendeif, E.; Jelsch, C. "The experimental library multipolar atom model refinement of L-aspartic acid" *Acta Cryst.*, **2007**, *C63*, o361–o364.
- 13) Li, J.; Li, C.; Li, S. "The Research of IR and Crystal Structure in DL-Aspartic Acid" *Guangdong Huagong*, **2009**, *8*, 27–29.
- 14) Suresh, C.G.; Vijayan, M. "X-ray structure analysis of a crystal form of L-aspartic acid with a neutral α -carboxyl group and a deprotonated side chain carboxyl group" *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1983**, *22*, 176–178.

- 15) 川喜多哲哉, “アスパラギン酸の晶癖に及ぼす不純物の影響” *日本結晶成長学会誌* **1996**, 23, 430–435.
- 16) 吉田咲, “アスパラギン酸結晶成長におよぼす添加物の影響” *岩手大学 工学部 応用化学・生命工学科 卒業論文* **2013**.

第 6 章

総括

原薬の固体状態の特性（晶癖，粒子径，結晶多形等）は，製剤化，安定性，バイオアベイラビリティ等に影響を及ぼすため，医薬品製造においては非常に重要であり，それらは通常原薬の晶析工程で決まる．また，原薬製造工程において，晶析操作のトラブルは多く，また晶析に起因するろ過や乾燥のトラブルも多い．従って，結晶を設計し晶析をコントロールすることは，原薬製造において極めて重要な課題である．本研究では，医薬品原薬製造への応用を目指し，Orantinib 原薬及び Asp を用いて，晶析現象と操作に関する検討を行った．

第 2 章では，Orantinib 原薬を用いて，残留溶媒量及び粒子径分布コントロールを両立する晶析プロセスの DoE による最適化を検討した．Orantinib 原薬の晶析方法は酸塩基反応による中和晶析であるため粒子径分布のコントロールは一般的に難しく，また残留溶媒は化合物の性質によって様々であるため一般的な理論に当てはめることが難しいと考えられた．本研究では，DoE を使用して全 36 実験で，Orantinib 原薬晶析のプロセスパラメータのスクリーニング，最適化，及び検証実験を行い，粒子径分布及び残留 IPA 量のコントロールを両立できるプロセスを見出した．

第 3 章では，L-Asp 晶析における不純物（L-，又は D-Asn）の影響について検討した．その結果，L-Asn 存在下では添加物無添加系又は D-Asn 存在下に比べて顕著な核発生の遅れが FBRM で観測され，得られた製品結晶形状にも変化が認められた．さらに，製品結晶の分析結果から L-Asn は L-Asp 結晶格子に取り込まれ固溶体を形成していることが示された．従って，L-Asp 晶析において，L-Asn がキラリティー特異的な効果を示し，テーラーメイド添加物として作用することがわかった．

第 4 章では，第 3 章の結果を応用し，テーラーメイド添加物として L-Asn（又は D-Asn）存在下における DL-Asp の晶析による光学分割を検討した．DL-Asp ラセミ化合物結晶格子を構成する L-Asp（又は D-Asp）の一部が L-Asn（又は D-Asn）に置換した固溶体を形成させ，遊離した L-Asp（又は D-Asp）をろ液から晶析させた．得られた結晶は，L-Asp（又は D-Asp）と L-Asn（又は D-Asn）の固溶体，及び DL-Asp と L-Asn（又は D-Asn）の固溶体との混合物であったが，本研究において考案する新しい方法でラセミ化合物の光学分割が可能であると考えられた．

第 5 章では，第 3 章の結果を基礎的に研究し，速度論的作用メカニズム，即ち，L-Asp の結晶成長速度に及ぼす L-Asn の面選択的効果について検討した．a 軸方向においては L-Asn の影響は小さく，b 軸方向においては L-Asn 濃度によって L-Asp 結晶成長を促進，抑制，また結晶面が溶解する現象が認められた．c 軸方向においては，L-Asp 結晶成長速度は L-Asn 添加量の増量に伴い低下し，実験結果は Langmuir の吸着等温式にフィットした．また，結晶表面への添加物の吸

着は、分子構造の類似性により生じることが示唆された。さらに、攪拌系、即ち回分晶析においても静置系での結晶成長と同様の挙動を示し、L-Asn の効果は面選択的に作用することがわかった。

以上のように、様々な角度から晶析現象と操作を研究した。第 2 章では DOE を使用して晶析のプロセスパラメータをシステムティックに検討し目的とする品質の原薬が得られるプロセスを開発した。第 3 章及び第 4 章では晶析における不純物の影響を検討し、不純物が引き起こす核発生が遅れを FBRM で観察した。第 5 章では結晶成長に及ぼす不純物の影響を速度論的に検討した。これらの技術を組み合わせることで、所望の結晶を設計し、晶析をコントロールできるようにになると期待される。そして、これらの技術を医薬品の原薬製造プロセス開発へ応用し、工業化を考慮して高品質の原薬が安定して得られる頑健な製法の確立に活かすことができると考える。

原著論文

題目： Optimization of a Crystallization Process for Orantinib Active Pharmaceutical Ingredient by Design of Experiment To Control Residual Solvent Amount and Particle Size Distribution

著者名： Hiroyasu Sato, Shotaro Watanabe, Daisuke Takeda, Shingo Yano, Norihito Doki, Masaaki Yokota, and Kenji Shimizu

学術雑誌名： Organic Process Research & Development

発行年月： In press

題目： New Optical Resolution Method for Racemic DL-Aspartic Acid by Crystallization in the Presence of D- or L-Asparagine as a Tailor-Made Additive

著者名： Hiroyasu Sato, Norihito Doki, Masaaki Yokota, Kenji Shimizu, and Shingo Yano

学術雑誌名： Journal of Chemical Engineering of Japan

発行年月： In press

題目： Face-selective crystal growth behavior of L-aspartic acid in the presence of L-asparagine

著者名： Hiroyasu Sato, Norihito Doki, Saki Yoshida, Masaaki Yokota, and Kenji Shimizu

学術雑誌名： Journal of Crystal Growth

発行年月： 投稿中 (Publish after minor revisions)

学会発表

題目： Optical Resolution Using the Difference of Crystal Face Selective Behavior on Aspartic Acid Crystal Growth in the Presence of Additive
発表者名： Hiroyasu Sato, Norihito Doki, Saki Yoshida, Masaaki Yokota, and Kenji Shimizu
学会名： 10th International Conference on Separation Science and Technology (ICSST14)
日時： October 30 – November 1, 2014
会場： Nara Prefectural New Public Hall, Nara, Japan

題目： 添加物共存下アスパラギン酸結晶の面選択的成長挙動の違いを利用した光学分割
発表者名： 吉田咲，佐藤弘康，土岐規仁，横田政晶，清水健司
学会名： 化学工学会新潟大会 2014
日時： 2014年11月22日-23日
会場： 新潟大学附属図書館，総合教育研究棟

題目： 医薬品製造プロセスへの応用を目指した結晶多形制御に関する産学連携事例
発表者名： 佐藤弘康，土岐規仁，小川薫，横田政晶，清水健司
学会名： 産学連携学会 第11回大会
日時： 2013年6月20日-21日
会場： いわて県民情報交流センター（アイーナ）

謝辞

本論文を作成するにあたり、多くの方々のご支援ご協力を賜りました。謹んでお礼申し上げます。

3年間の博士後期課程におきまして終始懇切丁寧なるご助言及びご指導を頂きました清水健司教授，本論文作成及び本研究を進めるにあたり適切なご助言及びご指導いただきました土岐規仁准教授，貴重なご意見をいただきました横田政晶准教授に心より感謝いたします。先生方には公私共にお世話になり，大変多くのことを学ばせて頂きました。また，社会人ドクターとして快く受け入れていただき，研究に関するご協力をいただきました結晶工学研究室の大学院生，4年生，並びに卒業生の皆様に心より感謝いたします。

社会人ドクターコース進学への理解と支援をいただきました大鵬薬品工業株式会社に感謝申し上げます。博士後期課程への入学から在学中の活動において全面的なご支援，また心強い励ましをいただきました，矢野伸吾 合成技術研究所長，渡邊正太郎 元合成技術研究所長，馬場一彦 CMC 本部長に心より感謝いたします。また，本研究を進めるにあたり業務のサポートをいただきました合成技術研究所の皆様にも心より感謝いたします。

最後に陰ながら支えてくれた家族に心より感謝いたします。