

解説

結晶化によるラセミ体の光学分割

土岐規仁・小川薫・佐々木茂子・横田政晶・清水健司

ラセミ体を熔融状態あるいは溶液状態から結晶化させると、ラセミ体は混合物、化合物、固溶体が、それぞれ等量(50 : 50)の組成比で析出するため、結晶化による光学分割は難しい。本報では、ラセミ体の結晶化による光学分割についての試みを紹介する。まず、大小の種晶添加(同時晶析法)によつての検討がある。この方法の利点は、核発生が生じなければ、種晶の成長により結晶化が進行し、大小の差を利用して、篩い分けにより、D体とL体の光学分割が機械的操作によりできることである。さらに、光学活性共溶質(テイラーメイド添加物)を共存させることで、核発生速度に差をもたせ、一方の鏡像異性体のみを優先的に晶析させた光学分割法についても同様である。種晶および添加物を用いる事により、結晶化による生成結晶に粒径の差を生じさせることができ、篩い分けによる機械的分離が可能な光学分割プロセスを構築可能であることも示されている。

1. 緒 論

研究開発の厳密・精密化にともない、医薬品、農業、香料、調味料、エレクトロニクスなどの分野で、光学活性体を扱うことの重要性が著しく高まっている。その要因は、生体構成物質の多くは不斉中心をもち、光学活性体が生命現象において重要な働きをしていることが強く認識されるようになったためといわれている。

医薬品分野では一方のエナンチオマー(鏡像異性体)は薬として作用し、他方が重大な副作用をもたらす場合や、有効なエナンチオマーに対して一方が競争阻害する場合には、有効な純エナンチオマーの投与が不可欠となる。これに対し、両エナンチオマーが同様な薬理活性を示す場合にはラセミ体を投与しても問題ないが、エナンチオマーの一方が全く薬理活性を示さない場合には、肝臓や腎臓への負担を考慮し、不必要なエナンチオマーの投与を避けて、薬理活性のある純エナンチオマーのみを投与することが望ましい。これらの観点から、従来ラセミ体(キラル化合物の2種類のエナンチオマーが等量存在することにより旋光性を示さなくなった状態の化合物)として投与してきた医薬品が、純エナンチオマーのかたちで使われるようになってきており、その光学分割法(ラセミ体をそれぞれのエナンチオマーに分離する操作)の確立が強く望まれている。

気体、液体あるいは溶液状態として存在しているラセミ体は、両エナンチオマーの等量混合物としての性質を示すが、結晶状態のラセミ体は結晶形態によって異なった性質を示す。あるラセミ体を熔融状態あるいは溶液状態から結晶化させると、ラセミ体は次に示す三つの結晶形態の一つをとりうる。

①ラセミ混合物

単結晶一つ一つは単一のエナンチオマーから成り立って

いるが、ラセミ体結晶全体では両エナンチオマー比が50 : 50(等量)になっている結晶。

②ラセミ化合物

一つ一つの単結晶が対をなした両エナンチオマーから成り立っており、したがって各単結晶中のエナンチオマー比は50 : 50になっている結晶。

③ラセミ固溶体

一つ一つの単結晶に存在する両エナンチオマーの比が一定ではないが、ラセミ体結晶全体のエナンチオマー比は50 : 50になっている結晶。

多くのラセミ体固体の中で、ラセミ化合物は90%以上、ラセミ混合物は5~10%、ラセミ固溶体は数%の割合で存在すると言われている。現在約300種類のラセミ混合物が見出されているが、これらのラセミ体で優先晶析法、不斉晶析法によって光学分割が可能であるのはラセミ混合物のみであり、ラセミ化合物及びラセミ固溶体では困難とされる¹⁾。

2. 結晶化による光学分割法

従来までに報告されている光学分割法には様々なものがある。以下に一般的に知られている結晶化による光学分割法について簡単に説明する。結晶化による光学分割法の利点としては、他に比べ簡単な操作で行うことができ、また、最終工程までの時間短縮が望めるといった利点がある。

①自然分晶法

DL過飽和溶液から自然核発生させるだけで、D体とL体が別々の結晶として得られる。例として、アミノ酸ではDL-アスパラギン-水和物(DL-Asn · H₂O)、DL-グルタミン酸(DL-Glu)、DL-グルタミン酸塩酸塩(DL-Glu · HCl)、DL-スレオニン(DL-Thr)、DL-プロリン(DL-Pro)、DL-グルタミン(DL-Gln)などがある。

②優先晶析法

選択晶析法あるいは接種法ともいわれる方法であり、DL 過飽和溶液に D 体あるいは L 体の片方の成分の種晶を投入し、それぞれの成長面の鏡像体認識性により同型の結晶のみを成長させ、分離する方法である。またこの方法は、ラセミ混合物にのみ適用できる。この方法は他の不斉要素をまったく使わず、さらに両活性体を交互かつ連続的に得ることができる点が最大の特徴であり魅力である。

③ジアステレオマー法

本来溶解度差のない D 体と L 体を他の光学活性体と反応させることで、溶解度差のある物質に誘導し、難溶性成分を結晶化させることで分割する方法である。したがって、適切な結晶化条件を設定することによって効率的な分離が可能となる。しかし、分割剤や溶媒の選択については現在でも試行錯誤的などころがあり、より能率的に行うための検討が必要である。

④不斉晶析法

DL 過飽和溶液に他の光学活性共溶質（テイラーメイド添加物）を共存させることで、各エナンチオマー間の核発生速度に差をもたせ、一方の鏡像異性体のみを優先的に晶析させる方法である。晶析時間が非常に長いという欠点があるが、種晶を必要とせず、又、ラセミ体と光学活性共溶質との間でジアステレオマーを形成することなく光学分割を達成することができる。また、この方法も先に記した優先晶析法と同様、ラセミ混合物にのみ適用できるとされている。

⑤包接化合物法

光学活性な非環状ホスト分子がゲストの不斉の識別に優れていることを利用した光学分割法である。ホスト分子がゲスト分子を取り込んで錯体を形成する現象を取り込み現象という。ホスト分子には、シクロデキストリンのように分子内に空孔を有する環状ホストと空孔を持たない非環状ホストがある。非環状ホスト分子は水素結合やファンデルワールス力などの弱い相互作用を介してゲスト分子を取り込むので、アルコール、ケトン、エステル、エーテル、ハロゲン化合物などの中性有機化合物や、熱、酸、アルカリなどに不安定な有機化合物の光学分割に威力を発揮する。

このように、結晶化による光学分割法には様々な方法があるが、今回、主に、優先晶析法、不斉晶析法について述べる。

3. 優先晶析

優先晶析法は、過飽和状態にあるラセミ溶液に、例えば D 体の結晶を種晶（シード）として添加（シーディング）すると、その種晶をテンプレートとして、種晶の周りに同一構造の結晶層が積層する。そして、D 体成分が種晶の成長に使われ、その結果、溶液 D 体の濃度は減少する。この間 L 体は析出しない。したがって、この時で、結晶を系外に取り出してしまえば、D 体結晶を分離できる。しか

し、これは必ずしもうまく行くとは限らない。Profir and Matsuoka²⁾ は、その点について、DL-Threonine 溶液を用いて L 体の優先晶析をおこない検討した。晶析実験は、350 ml のジャケット付きガラス製晶析器を用いて行った。過冷却度 7 K、晶析温度 313 K、攪拌速度 350 rpm、L 体種晶量 2.0 g の条件でおこなった結果を図 1 に示した。4 時間までは L 体が優先的に析出、すなわち L 体シードが順調に成長しているが、それ以降は急激に光学純度が低下している。L 体種晶の表面に D 体の微結晶が多数観察されたことから、彼らは、「種晶表面でまず D 体が核発生し、次にその核が、L 体種晶の（溶液中の L 体の消費に伴う）成長停止と同時に、成長をはじめ急激に光学純度が低下する」と述べている。結局、彼らは優先晶析においては途中からの純度低下は避けられないと結論している。工業的に行われている優先晶析においては、結晶純度の低下が始まる前に運転を停止している。

優先晶析においては、このように、対掌体の核発生を避けることがポイントである。そのためには、L 体および D 体を同時に晶析させて対掌体の過飽和を解消する、あるいは、対掌体の過飽和を化学的に解放するなどの方法がある。

対掌体の核発生を避ける方法として、DL-Asparagine の光学分割を大小の種晶の添加（同時晶析法）によつての検討がある。種晶の効果については、引用文献³⁻⁸⁾を参照していただきたい。この方法の利点、核発生が生じなければ、種晶の大小の差を利用して、篩い分けにより、D 体と L 体の分割ができることである。50 °C の DL-Asparagine 飽和水溶液に、328 μm の L 体種晶と 125 μm の D 体種晶を同時に添加し晶析を行った。10 °C/h の直線冷却で、20 °C まで冷却している。得られた結晶の粒度分布を図 2 に示す。粒度分布は二つのピークを持ち、大粒径側の結晶の殆どは L 体結晶であり、小粒径側の結晶は D 体結晶であった。特に 200 μm 以下と 500 μm 以上に篩い分けしたところ、200 μm 以下の粒子は純度 100 % の L 体であり、500 μm 以上の粒子は純度 100 % の D 体であった。この

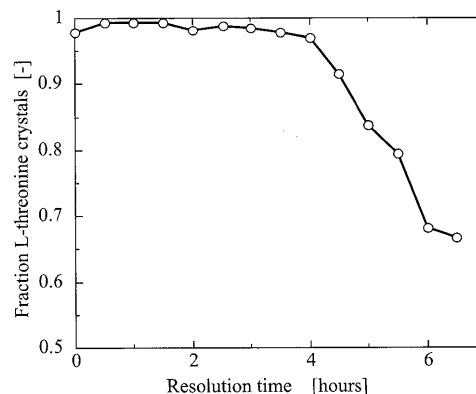


図 1 Threonine の優先晶析過程における L 体純度の変化 (文献³⁾ のデータを用いて作図)

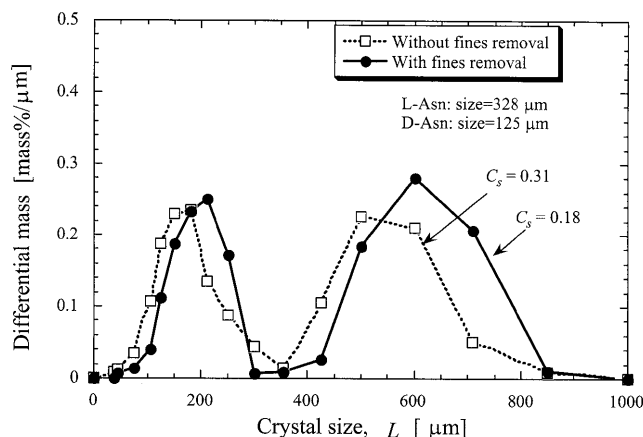


図2 同時晶析法によって得られた Asparagine 結晶の粒度分布 (大粒径側は L 体, 小粒径側は D 体結晶)

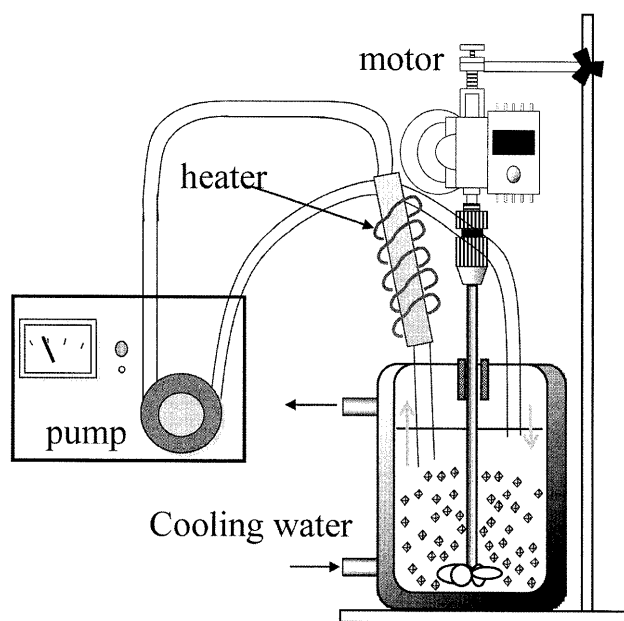


図3 加熱微結晶溶解循環回路 (fines removal circuit) を装着した装置の概略図

同時晶析法において重要なのは、種晶添加量である。実験において、種晶は理論析出量に対して、D および L とも 31 mass % 添加している。この大量の種晶の成長により晶析中の D, L の過飽和が低く抑えられ、種晶の存在に起因した 2 次核発生が抑制されたと考えられる。種晶添加量が少なかったとしたら、このような 2 次核の抑制は期待できず、同時に種結晶表面での対掌体の核発生も避けられなかったのではないかと考えられる。しなしながら、種晶添加量が多いことが、難点である。

そこで、次に、添加する種晶添加量を減少させる方法について紹介する。その方法は、装置に発生した核 (添加した種晶より、発生した核は小さいため、先に溶解するはず

である) を溶解させる過熱微結晶溶解循環回路 (fines removal circuit) を装着し、晶析を進めるものである (装置は、図 3 参照)。その結果、種晶添加量を、微結晶溶解除去回路を設置しない場合、31 mass % 添加しているものを、回路の設置により、18 mass % の添加で、種晶の大小の差を利用して、篩い分けにより、D 体と L 体の分割ができる同時晶析を、達成することができた。本方法は、種晶添加量を減少させる一つの方法論として有効であることが示唆された。

4. 不斉晶析法

本方法は、DL 過飽和溶液に他の光学活性共溶質 (テイラーメド添加物) を共存させることで、各エナンチオマー間の核発生速度に差をもたせ、一方の鏡像異性体のみを優先的に晶析さようとするものである。テイラーメド添加物は、結晶化主成分に類似した構造を有し、その立体化学的吸着が、添加剤が結合できる結晶表面の成長と溶解の両方に影響を及ぼし、修正部分に基質分子が吸蔵可能である。結晶成分と構造が類似し、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抑制効果あるとするものであり、テイラーメド添加物がドラステックに D 体のクラスターの成長を抑制し、L 体には影響しないとすれば、L 体を選択的に結晶化出来ると考えている⁹⁻¹¹⁾。Addadi ら¹⁰⁻¹²⁾ は、種々のアミノ酸を添加物として加え、L-グルタミン酸塩酸塩、スレオニン、アスパラギンなどの光学分割を検討した。一方の対掌体の核発生を遅らせることにより、得られる結晶の D, L の間に粒径差が生じ、分離が可能になるのである。アミノ酸に関して、このテイラーメド添加物は重要である。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、すべてテイラーメド添加剤と成りえる。結晶成分以外のアミノ酸、アミノ酸基 ($\text{NH}_3^+ \text{COO}^-$) を介して結晶に吸着し、構造の異なる側鎖を有するため、テイラーメド添加物としての効果が期待できる。しかし、彼らの実験は非常に小規模で工業的製造条件とはほど遠い条件で行われていた。

これに対して我々は、DL-アスパラギンの光学分割に添加物効果を応用した¹³⁾。工業操作への適用性を考え、500 ml の攪拌槽を用いて実験した。スクリーニングテストによって見いだした有効添加物 L-システインを加えて光学分割実験を行った。この場合、種晶は添加していない。図 4 に、添加物無添加および L-Cys 添加系における析出結晶の結晶内の D-Asn 組成 (D-Asn 光学純度) の経時変化、そして、図 5 に 24 h 後の製品結晶の顕微鏡写真を示す。添加物無添加で、析出結晶は、D-Asn : L-Asn の比率が、ほぼ 1 : 1 で推移していることから、D-Asn と L-Asn が同時に析出していることが分かる。L-Cys 添加系の場合、その濃度により、光学純度変化の様子が異なっている。1 mol % 添加の場合、析出初期に、D-Asn 純度がおおよそ

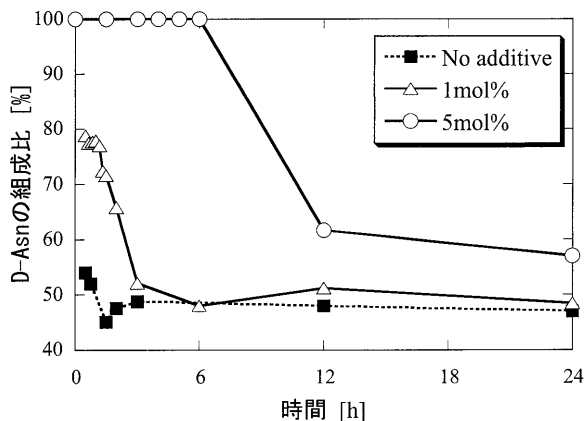


図4 添加物無添加および L-Cys 添加系における析出結晶の結晶内の D-Asn の組成 (D-Asn 光学純度) の経時変化

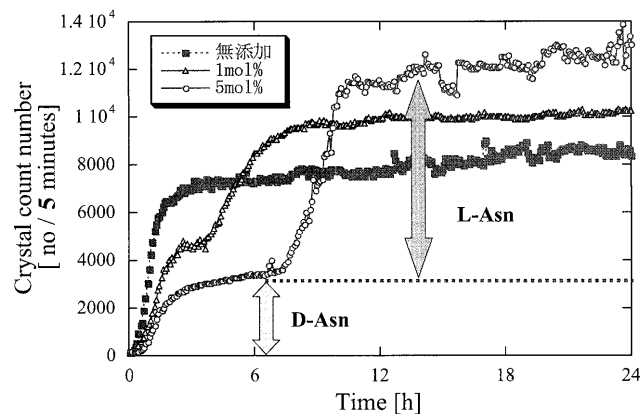


図6 結晶個数の経時変化

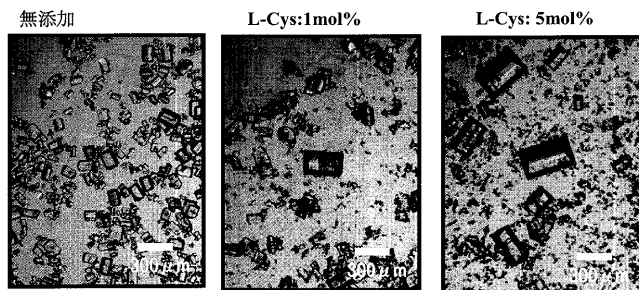


図5 結晶純度の経時変化と生成結晶 (24 h) の顕微鏡写真

80%であり、1.2時間後に純度の低下が始まっている。3時間以降では、50%のD-Asn純度になっている。5mol/l添加の場合、6時間までは、100%のD-Asn純度で結晶が析出し、それ以降で、純度が低下し、最終的に、およそ50%のD-Asn純度になっている。このように、L-Cys添加濃度の増加により、L-Asnの核発生時間が遅れることから、L-CysがL-Asnの核発生を抑制していることが分かる。図5中に示される生成結晶の写真を見ると、無添加系では種々の大きさの結晶が存在している。1mol%添加系では、大きな結晶と小さな結晶が存在し、その中間の大きさの結晶があまりないことが分かる。更に、5mol%添加系では、明らかに小さな結晶と大きな結晶に二極化し、その中間の大きさの結晶が存在していないことが分かる。

図6に、添加物無添加およびL-Cys添加系における結晶個数の経時変化を示す。本測定は、FBRM (= 収束ビーム反射測定法) LASENTEC社, Scan speed: 12m/sで行われている。添加物無添加では、結晶個数は一度増加しその後は変化がなく、種々の大きさの結晶が存在している。1mol%添加系では、結晶個数は二回の増加挙動を示していることが分かる。更に、5mol%添加系では、結晶個数は二回の増加挙動を示し、一回目の増加数が少ない。そして、得られた結晶を篩い分けし、それぞれの粒径における、

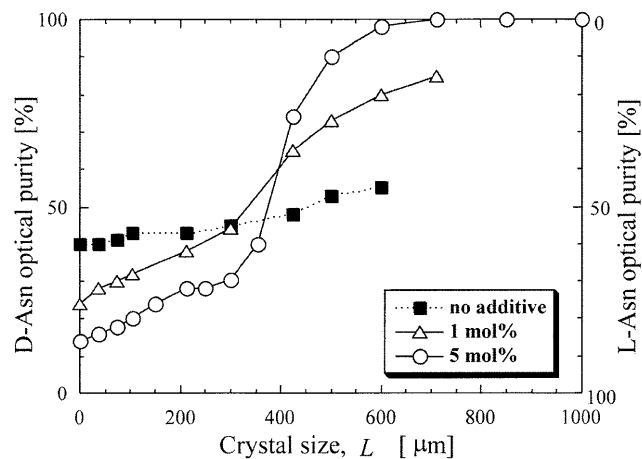


図7 結晶粒径と光学純度の関係

光学純度を測定した結果を、図7に示す。添加物を無添加の場合は、粒径によらず、ほぼ、50%であった。しかしながら、添加物濃度を増加させるに従い、小粒径ほどL体純度が増加し、大粒径ほどD体純度が増加していることが分かった。これは、先に予想した、はじめにD-Asnが核発生し、遅れてL-Asnが核発生していることを支持している。さらに、一回目と二回目の増加個数の違いが、粒径と結晶純度 (D-Asn 組成比) の関係に違いを生じさせている起因であると考えている。また、一回目の個数増加が少ない分、溶液内のD-Asn濃度 (過飽和) の減少は少ないことも、予想できる。そして、結果的に、大きく二極化した製品結晶が得られていることから、その核発生しなかったD-Asn過飽和は、発生した核の成長に使われているものと考えている。

しかしながら、小粒径側では、L-Asn組成比が高いが、100%ではなく、D-Asn成分も含んでいる。そこで、次に、装置内の結晶個数を実時間で測定し、その個数変化を検証し、加熱操作をタイミングよく加え、結晶化による光学分割を達成しようとする試みを紹介する。小粒径を優先的に

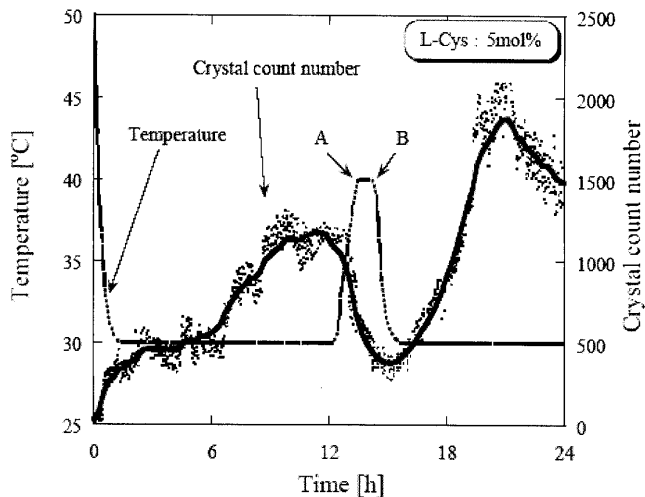


図8 加熱操作を加えた結晶化プロセスでの温度と結晶個数 (FBRM™ particle counterで測定) の経時変化

溶解させ、溶解した D-Asn 成分を残った D-Asn 結晶 (100%) の成長に使わせる意図がある。その操作は、まず、所定温度まで一度冷却する。そして、二度目の個数増加が定常に達したところで、加熱操作を加え、小粒径を優先的に溶解させる。そして、一回目の結晶個数に達したところで、再び冷却操作をする。その温度および結晶個数の経時変化を、図8に示す。本条件および操作を具体的に示すと、まず、L-Cys 添加濃度 5 mol% で、50℃の飽和溶液調製し、その溶液を、30℃まで冷却している。そして、40℃に一度過熱操作を加え、再び、30℃に冷却し、製品結晶を評価している。得られた結晶の粒度分布、結晶組成比、および、顕微鏡観察写真を、図9に示す。200 μm から 400 μm の結晶が、ほとんど存在しない、大きく二極化した粒度分布となっていることが分かる。さらに、その

結晶組成は、200 μm 以下では、L-Asn100%であり、400 μm 以上では、D-Asn100%であることから、加熱操作が光学分割に非常に有効であることが示されている。

このように、種晶および添加物を用いる事により、結晶化による生成結晶に粒径の差を生じさせることができ、篩い分けによる機械的分離が可能な光学分割プロセスを構築することができることが分かった。

5. 結 論

現在、医薬品の 90%以上が固体の粒子、そして、ほとんどは結晶で、晶析操作により行われることが多い。しかし、この分野の技術は、あまり進歩していないと見なされている⁸⁾ ようであるが、これは見方を変えれば、晶析操作を、もう一度見直すことにより、大きな進歩が期待できるものと思われる。そこで、本報で、医薬品製造におけるラセミ体の光学分割について既往の研究を紹介し、シンプルな方法として、種晶添加および添加物添加により、結晶粒径差を生じさせ、製品結晶を得ることが可能であることを示した。その結果、生成結晶の篩い分けによる機械的分離を可能とするラセミ体の光学分割が、晶析操作により達成可能であることが分かり、本方法の役割は工業的に重要なプロセスとなることも示唆された。今後、よりシンプルな機械的分離が可能な結晶化による光学分割のような、医薬品の分野における今後の晶析操作を発展させる方法論を検討していきたいと考えている。

参 考 文 献

- 1) J.W. Mullin, "Crystallization" 4th ed. Butterworth-Heinemann, Oxford (2001)
- 2) V.M. Profir and M. Matsuoka, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **164** (2000) 315-324
- 3) N. Doki, H. Seki, K. Takano, H. Asatani, M. Yokota, N. Kubota "Process control of seeded batch cooling crystalliza-

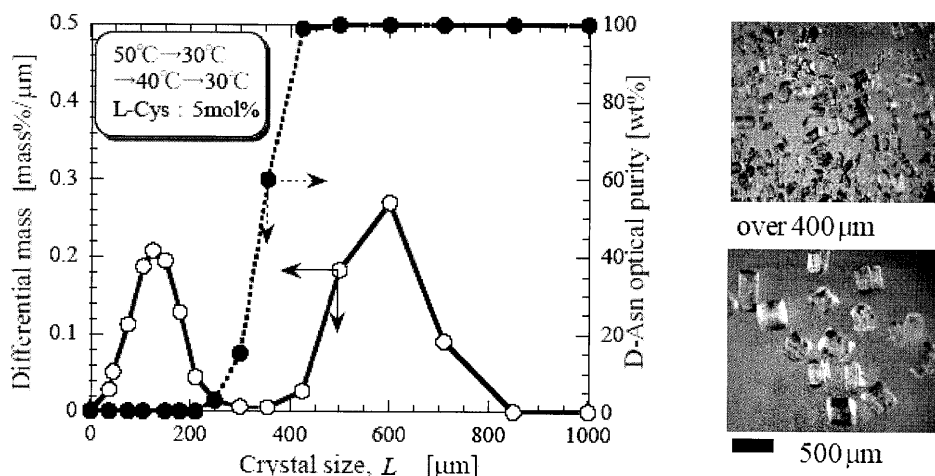


図9 製品結晶の粒度分布、D-Asn 組成比および顕微鏡写真

- tion of the metastable α -form glycine using an in-situ ATR-FTIR spectrometer and an in-situ FBRM™ particle counter,” *Crystal Growth & Design*, **4** (5) (2004) 949-953
- 4) N. Doki, M. Yokota, K. Kido, S. Sasaki and N. Kubota “Reliable and selective crystallization of the metastable α -form glycine by seeding,” *Crystal Growth & Design*, **4** (1) (2004) 103-107
- 5) N. Doki, M. Yokota, S. Sasaki N. Kubota “Size Distribution of Needle-Shape Crystals of Monosodium L-Glutamate obtained by Seeded Batch Cooling Crystallization,” *J. Chem. Eng. Japan*, **37** (2004) 436-442
- 7) N. Doki, N. Kubota, A. Sato, M. Yokota, O. Hamada, and F. Masumi, “Scaleup Experiments on Seeded Batch Cooling Crystallization of Potassium Alum,” *AIChE J*, **45** (1999) 2527-2533
- 8) N. Doki, N. Kubota, M. Yokota and A. Chianese, “Determination of Critical Seed Loading Ratio for the Production of Crystals of Uni-Modal Size Distribution in Batch Cooling Crystallization of Potassium Alum,” *J. Chem. Eng. Japan*, **35** (2002) 670-676
- 9) I. Weissbuch, M. Lahav and Leslie Leiserowitz, *Crystal Growth & Design*, **3** (2003) 125-150
- 10) L. Addadi, S. Weinstein, E. Gati, I. Weissbuch and M. Lahav, *J. Am. Chem. Soc.*, **104** (1982) 4610-4617
- 11) L. Addadi, Z. Berkovitch-Yellin, N. Deomb, E. Gati, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Nature*, **296** (1982) 21-26
- 12) L. Addadi, Z. Berkovitch-Yellin, I. Weissbuch, J. M. Linda, J.W. Simon, M. Lahav and L. Leiserowitz, *Angew. Chem. Intl. Ed, Engl.*, **24** (1985) 466-485
- 13) N. Doki, M. Yokota, S. Sasaki N. Kubota “Simultaneous Crystallization of D- and L-Asparagines in the Presence of a

Tailor-Made Additive by Natural Cooling Combined with Pulse Heating” *Crystal Growth & Design*, **4** (6) (2004) 1359-1363

(2008年2月13日受理)

Review

Optical Resolution of Racemic Compound by Cooling Crystallization

Norihito Doki,* Kaoru Ogawa, Shigeeko Sasaki, Masaaki Yokota, and Kenji Shimizu

We review two methods of optical resolution using the crystal size difference between D- and L-crystals. As a first optical resolution technique, seeded cooling crystallization was performed with the L-Asn seeds of large size and the D-Asn seeds of small size. This method was experimentally proved as a useful method. The product crystals had a bi-modal distribution. The large crystals were L-Asn of 100 % purity and the small crystals were D-Asn of 100 % purity. As a second optical resolution technique, a “tailor-made” additive was used as a separation agent. As a model chiral compound, the conglomerate of asparagine was examined. By a batch cooling operation, the primary nucleation of L-Asn was delayed significantly by adding L-Cysteine at 5 mol %, while that of the other enantiomer, D-Asn, remained almost unchanged. The distribution of the product crystals was found to be bi-modal. The large crystals were D-Asn with 100 % optical purity.

Dept. Chem. Eng., Iwate University, Jpn., 4-3-5 Ueda, Morioka, 020-8551, E-mail: doki@iwate-u.ac.jp