

發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96121040

COTD 24/04 (2006.01)

※申請日期：96年06月11日

※IPC分類：

一、發明名稱：

(中) (S)-1-甲基-3-苯基哌啶之立體選擇性合成

(英) Stereoselective synthesis of (S)-1-methyl-3-phenylpiperazine

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) 歐嘉隆藥廠

(英) N.V. ORGANON

代表人：(中) 1. 赫 克拉克 2. 普 溫森比克

(英) 1. KRAAK, H. 2. VAN WEZENBEEK, P.M.G.F.

地 址：(中) 荷蘭奧斯市克魯斯特街六號

(英) Kloosterstraat 6, 5349 AB Oss, The Netherlands

國籍：(中英) 荷蘭 NETHERLANDS

三、發明人：(共 3 人)

1. 姓名：(中) 麥克 凡夫列特

(英) VAN VLIET, MICHIEL CHRISTIAN ALEXANDER

國 籍：(中) 荷蘭

(英) NETHERLANDS

2. 姓名：(中) 吉拉德斯 坎伯門

(英) KEMPERMAN, GERARDUS JOHANNES

國 籍：(中) 荷蘭

(英) NETHERLANDS

3. 姓名：(中) 史路德葛海 馬歇爾

(英) SCHREUDER GOEDHEIJT, MARCEL

國 籍：(中) 荷蘭

(英) NETHERLANDS

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

發明專利說明書

(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96121040

COTD 24/04 (2006.01)

※申請日期：96年06月11日

※IPC分類：

一、發明名稱：

(中) (S)-1-甲基-3-苯基哌啶之立體選擇性合成

(英) Stereoselective synthesis of (S)-1-methyl-3-phenylpiperazine

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓名：(中) 歐嘉隆藥廠

(英) N.V. ORGANON

代表人：(中) 1. 赫 克拉克 2. 普 溫森比克

(英) 1. KRAAK, H. 2. VAN WEZENBEEK, P.M.G.F.

地 址：(中) 荷蘭奧斯市克魯斯特街六號

(英) Kloosterstraat 6, 5349 AB Oss, The Netherlands

國籍：(中英) 荷蘭 NETHERLANDS

三、發明人：(共 3 人)

1. 姓名：(中) 麥克 凡夫列特

(英) VAN VLIET, MICHEL CHRISTIAN ALEXANDER

國 籍：(中) 荷蘭

(英) NETHERLANDS

2. 姓名：(中) 吉拉德斯 坎伯門

(英) KEMPERMAN, GERARDUS JOHANNES

國 籍：(中) 荷蘭

(英) NETHERLANDS

3. 姓名：(中) 史路德葛海 馬歇爾

(英) SCHREUDER GOEDHEIJT, MARCEL

國 籍：(中) 荷蘭

(英) NETHERLANDS

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 主張國際優先權：

200815370

852572

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】
1. 歐洲 ; 2006/06/16 ; 06115607.1 有主張優先權

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

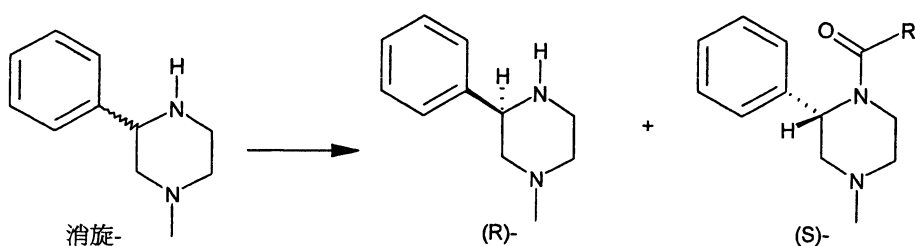
本發明係關於一種新穎起始物質及其在一種經由將消旋性 1-甲基-3-苯基哌啶的酯予以酶催化性水解以製備 (S) -1-甲基-3-苯基哌啶或 (R) -1-甲基-3-苯基哌啶所用方法中之用途。

【先前技術】

爲了得到供 S-米氮平 (S-mirtazapine) 的立體選擇性合成途徑所用的光學活性起始物 1-甲基-3-苯基哌啶 (參閱 Wieringa et al. WO 2005/005410)，有需要一種製造高鏡像異構純度的 (S) -1-甲基-3-苯基哌啶之高效率方法。生物催化爲一種製備光學活性化合物之優異工具。酵素常在非常溫和的條件下顯示出化學、鏡像-和 regio-選擇性。再者，生物催化也促成在有機化學中少有等效物的方法之使用。一個例子是在犧牲一些產率之下達到以中等鏡像選擇率消耗不想要的鏡像異構物到高達 99%ee (鏡像異構過量 (enantiomeric excess))。生物催化不總是絕對選擇性者。不過良好的結果可經由適當選擇酵素，繼之以需要瞭解基本機轉的最佳化而得到。最後結果可能比標準化學方法較不複雜。

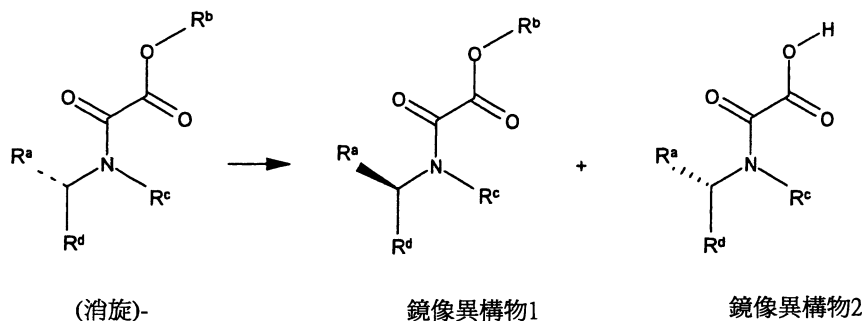
根據反應流程 1 將消旋-1-甲基-3-苯基哌啶予以鏡像選擇性酶催醯化之嘗試都付諸失敗，因爲儘管有已公開的使用酵素和醯基予體 (acyl donor) 的充分平衡組合達到

成功鏡像選擇性醯化之例子，但在高達 55°C 的溫度下，使用非常反應性的丁酸三氟乙酯和大量的各種酵素，仍沒有可觀測到之反應 (Orsat, et al, J. Am. Chem. Soc. 1996 (118) 712; Morgan et al.; J. Org. Chem. 2000(65) 5451; Breen, Tetrahedron: Asymmetry 2004(15) 1427)。



反應流程 1

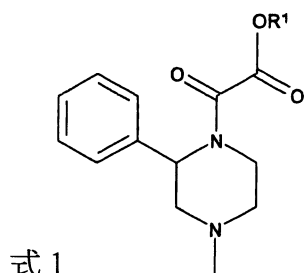
Hu 等人發現 (Org. Lett. 2005 (7) 4329)，使用草胺酸酯基的酶催化性水解來解析二級胺係可行者 (反應流程 2)。在分離酯和酸產物且切斷草胺酸系基團之後，可得到該胺的兩種鏡像異構物。其特點在於使用遠端草胺酸酯基團於此解析中，而低反應性醯胺鍵則未轉化。



反應流程 2

【發明內容】

本發明提供一種式 1 的化合物



其中 R^1 為甲基、乙基、正丙基、異丙基、苯甲基或 2-鹵乙基（諸如 2-氯-乙基和 2,2,2-三氟乙基）；該化合物係獨特地用於經由此等化合物的酶催化性水解製備個別的（S）-和（R）-1-甲基-3-苯基哌啶之新穎方法中。雖然 Hu 等人觀察到灰色鏈黴菌（*Streptomyces griseus*）的蛋白酶較不可用於苯基哌啶，不過本發明提供一種製備（S）-和（R）-1-甲基-3-苯基哌啶之方法，其包括將上面定義的化合物予以酶催化性水解，接著分離水解產物及切斷草胺酸系基團，其中係使用灰色鏈黴菌的蛋白酶作為該酶催化性水解所用的酵素。起始化合物可以使用消旋性 1-甲基-3-苯基哌啶的（C1-C3）烷基-、苯甲基-或 2-鹵乙基-草胺酸酯或任何程度的光學活性混合物以得到高光學活性純度的（S）-和（R）-1-甲基-3-苯基哌啶。（C1-C3）烷基意指甲基、乙基、正丙基和異丙基。

使用最佳化方案，於此可在 36% 總產率，99.8% ee 和約 98% 的純度之下得到（S）-1-甲基-3-苯基哌啶。

灰色鏈黴菌的蛋白酶為非常大族之水解酶中的一種酵素。水解酶能實施與水的反應，不過也可在近於無水的有

機溶劑中反應。某些水解酶的例子為脂酶（脂肪水解）- 蛋白酶（蛋白質水解）及酯酶（酯類水解）。

使用灰色鏈黴菌的蛋白酶作為水解酶具有許多優點。其為相當穩定的酵素，可以用濃縮水溶液或冷凍乾燥粉末之形式貯存。該酵素不需任何輔因子（cofactor）；若需要輔因子，不僅在經濟上不具吸引力，而且許多輔因子可能比酵素本身更脆弱。該酵素具有大活性部位，且儘管有小變異可能給出在反應速率上的大幅差異之事實，仍可很好地處理此反應所需的基質。最後，該酵素在水/共-溶劑混合物或甚至無水有機溶劑中具有高度穩定性。

於生物催化中，反應的選擇性常表為鏡像異構比例或 E 。鏡像異構比例代表兩種鏡像異構物在相同濃度時的起始反應速率之間的比例（對大部份反應而言， $t=0$ ）。若下列三種參數中有二種為已知：轉化率、產物 ee 和基質 ee ，則可在反應中的任何點計算鏡像異構比例。在理想情況下，反應從頭到尾， E 為常數。在公式中有許多假設不總是正確者。再者，在非常高或非常低的轉化率下， E 會隨著轉化率或 ee 的小變異而大幅改變。此意味著該值變得對測量準確性較為敏感。由於選擇率在事實上不是絕對值，因此在 100% 轉化率下，會再度得到消旋物。此意味著朝向反應結束時， E 值似乎常會下降。所以， E 應用為指標值而非絕對值。下列實用法則常可用到：

$E=1$ 沒有選擇性；對兩種鏡像異構物的速率相同。

$E=1-5$ 低選擇性；只有在不要的鏡像異構物於反應中消

耗掉且只在轉化率 >90%時，才達到高 ee。

E=5-25 經由消耗錯的鏡像異構物之下對程序有良好可能性。只在低轉化率下才得到高產物 ee。

E=25-100 在中等轉化率下得到高基質 ee 及產物 ee。

E>100 近於絕對選擇性。反應常在 50%轉化率時"停止" (大幅的反應速率減低)。動態動力學解析可得到在 100%產率下約 100% ee。不僅基質可得到高 ee，而且產物可在理想值 (50%) 產率附近顯示高 ee。

於更特定的具體實例中，本發明提供上述方法，其中該水解係在無緩衝劑的介質中實施。於反應介質中不需添加緩衝劑之情況不僅簡化該方法，而且甚至經由得到更高的鏡像異構比而改良該方法。於不受理論所約束之下，威信在哌啶環中的 1 位置上之氮係促成此者。

本發明一更特定具體實例為在上述方法中使用 1-甲基-3-苯基哌啶的甲基草酸酯以及包含甲苯或甲基-第三丁基醚的介質。

本發明另一特定具體實例為在上述方法中使用 1-甲基-3-苯基哌啶的乙基草酸酯以及包含環己烷之介質。

有了本說明中的資料，諳於此技者即可經由選擇適當的介質、濃度和草胺酸酯而進一步將方法條件最佳化或找到該方法的接近替代法。

【實施方式】

實施例

甲基/乙基草胺酸酯衍生物之酶催化性水解

使用市售氯草酸甲酯將 1-甲基-3-苯基哌啶醯化而製備消旋性基質，得到可經由再結晶化予以純化之結晶草胺酸酯。對一範圍的市售蛋白酶進行檢驗（表 1）。於觀察一種鏡像異構物增濃之下，只有 *Esperase* 顯示出任何活性。絕對構型係經由與已確定的 (S)-鏡像異構物樣品相比對而測定。之後進行反應條件的短篩選（表 2）。E 值係以轉化率和起始物與產物的 ee 值為基礎計算。轉化率係使用在起始物中的小雜質（已存在於起始哌啶中者）作為內標準物而估計者。

表 1：乙基草胺酸酯解析中蛋白酶之篩選

酵素	ee(43 小時)	ee(65 小時)	ee(85 小時)
1 無	0	n.d.	-
2 0.1 毫升 <i>Esperase</i>	5%	13%(R)	21%(R)
3 0.1 毫升 <i>Everlase</i>	<1%	<1%	-
4 250 毫克 <i>Polarzyme</i>	<1%	1%	-
5 25 毫克 <i>Savinase</i> CLEA	2%	3%	-
6 25 毫克 <i>Alcalase</i> CLEA	4%	6%	-
7 25 毫克蛋白酶 N (fluka)	<1%	1%	-

條件：於 7 個管瓶內填充酵素、1 毫升草胺酸酯溶液（0.1 M 1-甲基-3-苯基哌啶 乙基草胺酸酯在甲基第三丁基醚（MTBE）中）和 2 毫升 0.1 M 磷酸鹽緩衝液（pH 7.3）。在室溫下攪拌三天，反應 2 則在 40°C 再攪拌 20 小時。以掌性 GC（chiral GC）分析。

表 2：對 Esperase 的短條件篩選

	酵素	緩衝劑	溶劑	ee	轉化率
1	0.25 毫升 Esperase	0.5M pH9.0	MTBE	6%	3.3%
2	0.25 毫升 Esperase	0.1M pH9.0	MTBE	15%	0%(?)
3	0.25 毫升 Esperase	0.5M pH9.0	ACN	16.2%	17%
					(R,E=10)
4	0.25 毫升 Esperase	0.1M pH9.0	ACN	22%	40%(R)
5	0.25 毫升 Esperase	0.1M pH8.2	MTBE	13%	7%
6	0.25 毫升 Esperase	0.1M pH10	MTBE	16%	2%
7	1 毫升 Esperase	0.1M pH9.0	MTBE	23%	<0
8	1 毫升 Alcalase	0.1M pH9.0	MTBE	20%	<0

條件：於 8 個管瓶內填充酵素、1 毫升草胺酸酯溶液（0.1 M 1-甲基-3-苯基哌啶 乙基草胺酸酯在 MTBE 或乙腈（ACN）中）和 2 毫升磷酸鹽緩衝液。攪拌 18 小時。以掌性 GC 分析。

使用粗製甲基草胺酸酯和相當純的乙基草胺酸酯，進行廣範圍的蛋白酶篩選（表 3）。Esperase 的原型 CLEA 沒有得到更好的結果。一範圍的其他酵素在甲苯/碳酸氫鹽緩衝液中顯示出根本沒有選擇性（表 4）。

表 3：甲基/乙基草胺酸酯的更廣泛蛋白酶篩選

	酵素	m	起始物	GC(ee 草胺酸酯)
1	胰蛋白酶 Novo	50 毫克	Me*	0%
2	Europa 蛋白酶 2	50 毫克	Me*	-3%
3	Europa 蛋白酶 7	50 毫克	Me*	0
4	Europa 蛋白酶 12	50 毫克	Me*	0
5	Europa 酯酶 2	50 毫克	Me*	-3%
6	Esperase CLEA	50 毫克	Me*	11%
7	Esperase CLEA	250 毫克	Me*	12%
8	Alcalase CLEA	50 毫克	Me*	15%
9	Alcalase CLEA	250 毫克	Me*	43%(R)
10	微生物蛋白酶 Fluka	10 毫克	Me*	37%(R)
11	枯草桿菌蛋白酶 A	10 毫克	Me*	11%
12	Esperase CLEA	250 毫克	Et	4%
13	Alcalase CLEA	250 毫克	Et	9%
14	微生物蛋白酶 Fluka	10 毫克	Et	6%
15	枯草桿菌蛋白酶 A	10 毫克	Et	<2%

條件：於 15 個管瓶內填充酵素、1 毫升草胺酸酯溶液（0.1 M 1-甲基-3-苯基哌啶 甲基/乙基草胺酸酯在 MTBE 中）和 2 毫升 0.1 M 磷酸鹽緩衝液（pH 9.0）。攪拌 18 小時。以掌性 GC 分析。

表 4：在甲苯 / 碳酸氫鹽緩衝液中的酵素篩選

E9/	酵素	pH 終端	ee 殘留基質
1	Alcalase CLEA	8.0	0
2	Esperase CLEA	8.1	0
3	Savinase CLEA	8.1	<3
4	Novo 枯草桿菌蛋白酶	8.1	<2
5	CaL-A CLEA	8.1	0
6	CaL-B CLEA	8.1	3
7	CR CLEA	8.3	0
8	Amano 醃化酶	8.4	2
9	醃化酶 1	8.4	2
10	Alcalase CLEA	7.6	1

(pH 8 K-磷酸鹽緩衝液)

表 4 條件：將乾酵素（50 毫克）與 1 毫升儲液（1-甲基-3-苯基吡啶 甲基草胺酸酯（16 克）不純的粗製漿液溶解在 600 毫升甲苯）和 1 毫升 0.2 M 碳酸氫鹽緩衝液混合。在室溫下反應 22 小時。

使用灰色鏈黴菌蛋白酶得到良好的結果。表 5 顯示該結果；在對的條件之下，可以得到所欲鏡像異構物的優異 ee。

最佳結果係在無緩衝液的介質內得到，其使用基質中的額外氮作為鹼。即使在 $\text{pH} \ll 7$ 時，用此蛋白酶也能得到非常好的結果。

表 5：灰色鏈黴菌蛋白酶和乙基草胺酸酯的條件篩選

	溶劑	pH 終端	ee	E 估計值*
1	90% ACN/水	7.3	0	-
2	10% ACN/水	6.4	100%(S)	E=60
3	50% ACN/水	6.7	31%(S)	-
4	50%二氧雜環己烷/水	6.6	29%(S)	-
5	50% t-BuOH/水	5.9	90%(S)	E=27
6	50% MTBE/水	5.9	約 98%(S)	E=500
7	50% MTBE/pH 8 0.1 M 緩衝液	7.1	50%(S)	E=7

條件：於 7 個管瓶內填充 8 毫克灰色鏈黴菌蛋白酶，28 毫克（0.1 毫莫耳）油狀乙基草胺酸酯和 2 毫升所示溶劑。在室溫下攪拌 20 小時。以掌性 GC 分析。*使用 3.8m 雜質估計的轉化率。

使用（於此處為純的）甲基草胺酸酯和乙基草胺酸酯在一範圍的條件中進一步檢驗此酵素（表 6）。使用無共溶劑的條件之下，該甲基草胺酸酯固體化，導致明顯擴散限制的濃稠懸浮液，其在相當高轉化率下會阻礙完全光學純度。只需要小量的酵素。

這兩種酯類在最佳解析條件中顯示出差異。

表 6：灰色鏈黴菌蛋白酶和甲基/乙基草胺酸酯的進一步條件篩選

	酯	毫克酵素	溶劑	pH 終端	ee(全部 S)	E 估計值*
1	Me	0.1	H ₂ O	6.2	24%	高
2	Me	1	H ₂ O	6.0	97.4%	60
3	Me	10	H ₂ O	6.0	95.2%	高
4	Me	1	5% ACN	6.2	87%	9
5	Me	1	5% t-BuOH	6.0	89%	12
6	Me	1	5%丙酮	6.1	77%	12
7	Me	1	MTBE	5.6	100%	高
8	Et	0.1	H ₂ O	6.3	91%	8.6
9	Et	1	H ₂ O	6.2	100%	>21
10	Et	10	H ₂ O	6.1	100%	>12
11	Et	1	5% ACN	6.4	95.1%	12
12	Et	1	5%丙酮	6.3	95.6%	9
13	Et	1	MTBE	6.0	49%	慢?5

條件：於 13 個管瓶內填充灰色鏈黴菌蛋白酶、26/28 毫克（0.1 毫莫耳）油狀甲基/乙基草胺酸酯和 2 毫升所示溶劑。在室溫下攪拌 64 小時。於鹼化後以掌性 GC 分析。*使用 3.8m 雜質估計的轉化率。

對另一範圍的市售蛋白酶進行檢驗（表 7）。對於該兩種酯類，使用表 6 中的最佳條件；甲酯（此處為固體）係在雙相 MTBE 混合物內，乙酯係在純水中的懸浮油狀物。於此實驗期間，油狀乙基草胺酸酯也開始固化，其可能意味著表 6 的有希望之結果（實驗 8）不會重現。

於酵素篩選中，只有乙基酯給出兩個可能的候選條件，對此等以更實際的酵素載量進一步驗驗（表 8），雖然並不成功。添加少量醋酸來改良固體基質的溶解度之舉也沒有成功，即使酵素似乎在頗低的 pH 下有作用。

表 7：甲基/乙基草胺酸酯的進一步蛋白酶篩選

	酯	酵素	溶劑	pH 終端	ee
1	Me	2.8 毫克灰色鏈黴菌蛋白酶	MTBE*	6.5	100%(S)
2	Me	10 毫克 Fluka 枯草桿菌蛋白酶 A	MTBE	6.3	0
3	Me	10 毫克 Fluka 細菌蛋白酶	MTBE	6.0	約 5%(R)
4	Me	25 毫克蛋白酶:蜂蜜曲霉(<i>A. melleus</i>)	MTBE	6.4	0
5	Me	10 毫克蛋白酶:多黏芽孢桿菌 (<i>B. polymyxa</i>)	MTBE	7.2	0
6	Me	10 毫克蛋白酶:崙藤曲黴(<i>A. saitoi</i>)	MTBE	6.5	0
7	Me	100 微升 <i>B. amyliquefaciens</i>	MTBE	6.1	0
8	Me	100 微升米曲黴(<i>A. oryzae</i>)蛋白酶	MTBE	5.9	約 5%(S)
9	Me	100 微升 Esperase	MTBE	6.4	0
10	Et	2.8 毫克灰色鏈黴菌蛋白酶	H ₂ O*	6.5	100%(S)
11	Et	10 毫克 Fluka 枯草桿菌蛋白酶 A	H ₂ O	6.8	0
12	Et	10 毫克 Fluka 細菌蛋白酶	H ₂ O	6.6	11%(S)
13	Et	25 毫克蛋白酶:蜂蜜曲霉	H ₂ O	6.5	56%(S)
14	Et	10 毫克蛋白酶:多黏芽孢桿菌	H ₂ O	7.0	0
15	Et	10 毫克蛋白酶:崙藤曲黴	H ₂ O	7.0	0
16	Et	100 微升 <i>B. amyliquefaciens</i>	H ₂ O	6.5	0
17	Et	100 微升米曲黴蛋白酶	H ₂ O	6.4	57%(S)
18	Et	100 微升 Esperase	H ₂ O	6.8	0

條件：於 18 個管瓶內填充 28 毫克油狀乙基草胺酸酯或 1 毫升 0.1 M 甲基草胺酸酯在 MTBE/5% 異丙醇中的溶液（否則沒有溶解性）。加水到 2 毫升反應體積（包括酵素的體積）。所示量的酵素。*實驗 1 和 10 含有 1 毫升 0.1 M pH 8 tris 緩衝液。

表 8：兩種其他蛋白酶候選物在乙基草胺酸酯中的篩選

酵素	酸	終端	ee
1 2.5 毫克 Amano 蛋白酶 M	0	懸浮液	0
2 蜂蜜曲霉(A. melleus)	0.1 當量 HOAc	懸浮液	0
3	0.2 當量 HOAc	懸浮液	0
4	0.35 當量 HOAc	懸浮液	-3%
5	0.5 當量 HOAc	透明	+3%
6 10 微升米曲黴 (A. oryzae)蛋白酶	0	懸浮液	-2%
7	0.1 當量 HOAc	懸浮液	3%
8	0.2 當量 HOAc	懸浮液	3%
9	0.35 當量 HOAc	懸浮液	0
10	0.5 當量 HOAc	懸浮液	0

條件：於 10 個管瓶內填充 28 毫克油狀乙基草胺酸酯。加入 1 毫升水。所示量的醋酸以改善基質的溶解度。

灰色鏈黴菌蛋白酶催化的反應之規模放大

主要目標在於降低酵素裝載量及增加基質濃度而不損及產物的最終鏡像純度。在沒有緩衝的水中之反應期間，pH 顯著下降到明確超出酵素的最佳 pH 之外。所以，第一檢驗為 pH 篩選，使用一恆定 pH 同時將其與未緩衝反應相比較（表 9）。沒有 pH 控制的反應顯示在反應較早階段中有較高的 ee。離析出的草胺酸產物（R-鏡像異構物）之 ee 也較為高，顯示為一種遠較高選擇性的反應（較高的 E）。相同的效應也在乙基草胺酸酯上看到，不過基質的固化使結果的比較變得稍許複雜（表 10）。

表 9：pH-控制對甲基草胺酸酯的影響

	pH 控制	ee(16 小時)	pH(40 小時)	ee(40 小時)	產率	ee(R-產物)	E
A	pH 恆定為 7.0	74%	6.6	100%	42%	-71%	48
B	無	87%	5.5	100%	47%	-84%	68

條件：10 毫莫耳固體 1-甲基-3-苯基哌啶甲基草胺酸酯，25 毫升水，25 毫升 MTBE，50 毫克灰色鏈黴菌蛋白酶（2 重量%）。實驗 A 在前 24 小時反應期間有 pH 控制。

表 10：pH-控制對乙基草胺酸酯之影響

	pH 控制	起始 pH	ee(S)	ee(R)	E
A	無	8.0	99.7	-92%	155
B	無	5.9(HOAc)	99.2	-91%	112
C	pH 恆定為 7.0	8.1	99.3	-79%	45

條件：10 毫莫耳油狀 1-甲基-3-苯基哌啶乙基草胺酸酯，50 毫升水，50 毫克灰色鏈黴菌蛋白酶（2 重量%）。實驗 C 在前 24 小時反應期間有 pH 控制。

使用在比先前遠較為高的濃度下已知為最佳的條件下重複最後的溶劑篩選。由於兩種草胺酸酯都固化，因此都需要使用共溶劑。令人訝異地，最佳條件再度地不相同（表 11）。

表 11：對甲基/乙基草胺酸酯的最後溶劑篩選

	起始物	溶劑	T	pH	ee(全為 S)
1	甲基	甲苯	21 小時		99.3%
			24 小時	5.3	99.85%
2	甲基	MTBE	21 小時		94%
			24 小時	5.5	48%(!)
3	甲基	環己烷	21 小時		39%
			24 小時	5.6	82%
4	乙基	甲苯	21 小時		75%
			24 小時	5.3	82%
5	乙基	MTBE	21 小時		82%
			24 小時	5.3	89%
6	乙基	環己烷	21 小時		99.89%
			24 小時	5.4	99.92%

條件：2.6 或 2.8 克（10 毫莫耳）固體甲基/乙基草胺酸酯，10 毫升水，5 毫升溶劑，50 毫克（約 2 重量%）灰色鏈黴菌蛋白酶。在室溫攪拌。2、3 和 6 皆為懸浮液。24 小時後，使用 EtOAc 將此等均質化，將 pH 調整到 9 且用掌性 GC 分析。

由於對乙基草胺酸酯的選擇率頗高，熔點頗低，且所述對灰色鏈黴菌蛋白酶的最佳溫度頗高，乃使用環己烷共溶劑對粗製乙基草胺酸酯進行一次較高溫的反應。

於 50°C 下，只用 1 重量%的灰色鏈黴菌蛋白酶的 16 小時反應就足以完成到 99.8% ee 的轉化。使用此等條件來製造下面大規模用樣品。

最後樣品 (S) -1-甲基-3-苯基哌啶之製備

使用 1 重量%灰色鏈黴菌蛋白酶在 1 升容器內解析

170 克粗製乙基草胺酸酯樣品。該乙基草胺酸酯的 R-鏡像異構物係經選擇性水解。於反應停止後，得到 47%粗產率之留存的 1-甲基-3-苯基哌啶乙基草胺酸酯之 S-鏡像異構物。經由在過量 15% HCl 中沸騰而將乙基草胺酸酯水解，在 1 小時中得到轉化成 (S)-1-甲基-3-苯基哌啶之完全轉化。後續收拾處理產生頗大量的不溶性未知組成之沉澱物。產物的萃取和 kugelrohr 蒸餾產生 42 克白色固體 (36% 總產率；99.8% ee)。起始物中 0.5% 的初始雜質增加到 1.5%。

使用經再結晶化的甲基草胺酸酯進行遠較為小量的規模放大提供出更純的樣品，因起始物中 0.5% 雜質在最後產物中並不濃縮之故。

加添的實驗細節

材料

氯草胺酸甲酯	Aldrich 公司
氯草胺酸乙酯	Acros 公司
三氟乙酸酐	Acros 公司
乙酸酐	Merck 公司
丙醯氯	Aldrich 公司
丁醯氯	Aldrich 公司
苯甲醯氯	Aldrich 公司
灰色鏈黴菌蛋白酶	Sigma 公司
溶劑	採購代理

分析

樣品係在 chirasil-DEX CB GC 上分析 (氮氣載氣；1 : 20 分流)。溫度程序：140°C，2 分鐘；5°C /分至 180°C

； 180℃，10 分鐘。哌啶在 GC 上不能解析。需要衍化成三氟乙醯胺才能達到鏡像異構物的良好分離。取少量哌啶（10-50 毫克）溶解在 CH_2Cl_2 中且用三乙胺和三氟乙酸酐處理之。反應後使用 10%碳酸鈉予以鹼化。於分析前將樣品乾燥。

使用氧化矽板， $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 混合物（典型地為 90：10）作為溶析劑及 UV 螢光和 I_2 偵測兩者實施 TLC。

醯基化消旋物之合成

1-甲基-3-苯基哌啶 甲基草胺酸酯

將 1-甲基-3-苯基哌啶（17.6 克；0.1 莫耳）溶解在 100 毫升二氯甲烷中。加入三乙胺（5 毫升；約 0.03 莫耳）。於冷卻下慢慢加入氯草酸甲酯（10 毫升；0.10 莫耳）/二氯甲烷溶液。於完全添加後，形成白色懸浮液。TLC 顯示完全轉化。用 10%碳酸鈉驟止反應混合物。有機層再經碳酸鹽清洗，乾燥及蒸發成油狀物（25.5 克；97%）。TLC：非常純，有某些少量極性雜質。GC：可作到掌性分離 15.7/16.0 分鐘（含有約 0.4% 3.8 分鐘處的雜質（包含在起始哌啶中者），可用為內標準）。該物質在靜置下固化。嘗試在 CH_2Cl_2 /己烷中再結晶化。此舉得到 20 克淡棕色固體（76%）。熔點 103-5℃。GC：移除 3.8 分鐘處的雜質。

1-甲基-3-苯基哌啶 乙基草胺酸酯

將 1-甲基-3-苯基哌啶 (123.2 克 ; 0.70 莫耳) 溶解在 500 毫升二氯甲烷中。加入三乙胺 (30 毫升 ; 約 0.2 莫耳)。在冷卻下慢慢加入氯草酸乙酯 (107 克 ; 0.78 莫耳) / 二氯甲烷溶液。在總添加約 2/3 時, 形成濃稠懸浮液。即使在添加更多溶劑之後, 攪拌仍有困難。用 10% 碳酸鈉驟止該混合物。有機層再經碳酸鹽清洗, 乾燥及蒸發, 得到橘色油狀物 (191.2 克 ; 0.69 莫耳 ; 99%)。用品種結晶化有困難。予以深度蒸發且以油狀物貯存。TLC : 非常純, 在基線處有少量的有色極性物質。沒有微量的二草醯胺 (從草醯氯與哌啶製成者)。GC : 18.0/18.2 分, 0.36 面積%的 3.8 分鐘處雜質。取小樣品 (20 克) 與水攪拌以誘發結晶化。熔點約 45°C。在靜置數天後, 油狀物主體固化。使用之前需要熔化。

乙醯基 1-甲基-3-苯基哌啶

將 1-甲基-3-苯基哌啶 (17.6 克 ; 0.1 莫耳) 溶解在 100 毫升二氯甲烷中。加入乙酸酐和三乙胺。水性處理產生 >100% 的臭味油狀物 (過剩的 Ac_2O)。在 160°C / 0.05 毫巴進行 kugelrohr 蒸餾得到 20.6 克的油狀物 (94%)。掌性 GC : 10.3/10.6 分。

丙醯基 1-甲基-3-苯基哌啶

將 1-甲基-3-苯基哌啶 (17.6 克 ; 0.1 莫耳) 溶解在 100 毫升二氯甲烷中。加入三乙胺 (15 毫升 ; 0.1 莫耳)

。在冷卻下慢慢加入丙醯氯（10 克；0.11 莫耳）/二氯甲烷溶液。於完全添加後，形成白色懸浮液。用 10%碳酸鈉驟止混合物。有機層再用碳酸鹽清洗，乾燥及蒸發而得油狀物（23.34 克；100%）。在 187 °C /0.05 毫巴的 kugelrohr 蒸餾得到 21.6 克油狀物（93%）。掌性 GC：10.25/10.39 分。

丁醯基 1-甲基-3-苯基哌啶

將 1-甲基-3-苯基哌啶（17.6 克；0.1 莫耳）溶解在 100 毫升二氯甲烷中。加入三乙胺（5 毫升；0.05 莫耳）。於冷卻下慢慢加入丁醯氯（11.6 克；0.11 莫耳）溶液。於完全添加後，形成白色懸浮液。用 10%碳酸鈉驟止混合物。有機層再用碳酸鹽清洗，乾燥及蒸發而得油狀物（24 克）。在 >200 °C /0.05 毫巴的 22.5 克 kugelrohr 蒸餾得到 22.0 克油狀物（95%）。掌性 GC：12.87/12.98 分，嚴重重疊。

苯甲醯基 1-甲基-3-苯基哌啶

將 1-甲基-3-苯基哌啶（17.6 克；0.1 莫耳）溶解在 100 毫升二氯甲烷中。加入三乙胺（15 毫升；0.1 莫耳）。於冷卻下慢慢加入苯甲醯氯（16 克；0.114 莫耳）/二氯甲烷溶液。於完全添加之後，形成白色懸浮液。用 10%碳酸鈉驟止該混合物。有機層再經碳酸鹽清洗，乾燥及蒸發成油狀物（約 30 克）。使用 CH₂Cl₂/MeOH（95：5）以氧

化矽過濾純化。將適當液份蒸發得到 26.2 克油狀物 (94%)。掌性 GC：使用多種方法都沒有分離。

三氟乙醯基 1-甲基-3-苯基哌啶

將 1-甲基-3-苯基哌啶 (1.8 克 ; 0.01 莫耳) 溶解在 50 毫升二氯甲烷中。加入三乙胺 (1 毫升 ; 0.07 莫耳)。加入純三氟乙酸酐 (2 毫升)。用 10% 碳酸鈉驟止混合物。有機層再經碳酸鈉清洗、乾燥及蒸發而得油狀物 (2.5 克 ; 92%)。TLC：非常純。掌性 GC：5.9/6.2 分。

篩選反應

篩選反應係按各表的備註中所述而進行。使用 5-毫升容器於 1-4 毫升反應，30 毫升管瓶用於較大的最佳化反應。結束時太酸性的反應皆經中和到 $\text{pH} > 8$ 以便萃取鹼性哌啶 (衍生物)。

(S) -1-甲基-3-苯基哌啶之樣品製備

將 170 克 (0.62 克) 固體草胺酸乙酯熔化且轉移到 1 升燒瓶中。加入 180 毫升環己烷和 700 毫升水，接著加入 1.7 克 (1 重量%) 灰色鏈黴菌蛋白酶。在電熱板上於 50 °C 攪拌 23 小時。上層的氣體層析術 (GC) 顯示 $>99.9\%$ ee。使用 1M NaOH 將 5.22 的 pH 調整到 9。

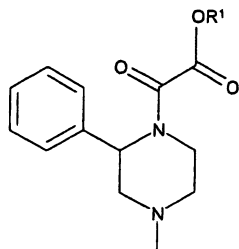
用乙酸乙酯萃取反應混合物三次。將有機相脫水和蒸發之後，得到 80 克棕色油狀物 (47% ; $E > 160$)。經由在

400 毫升 15% HCl (約 2 莫耳) 中回流 1 小時，將此 (S)-乙基草胺酸酯 (+4.7 克之稍早 10 克規模解析所得產物) 水解。該水解經 GC 測定為約 99.5%。將反應混合物冷卻且將 pH 調整到 pH>11。用 3 × 250 毫升 CH₂Cl₂ 萃取水相。在中和後形成大量不溶性沉澱物且經過濾取出。將有機萃出物乾燥且蒸發而得 41 克油狀 (S)-1-甲基-3-苯基哌啶。使用乙酸乙酯 (100 毫升)、甲苯和乙醚進一步萃取該水相，得到另一份 6 克 (S)-1-甲基-3-苯基哌啶 (總產率為約 41%)。在 kugelrohr 上高抽真空蒸餾 (140°C / 0.05 毫巴) 產生 41.8 克無色油狀物，其在種晶後結晶化 (238 毫莫耳；36%總產率)。蒸餾殘渣重 0.8 克。產物熔點為 52°C 且其 ee 為 99.8%。GC 顯示起始消旋物中所含雜質從 0.5% 增加到 1.5%。

五、中文發明摘要

發明之名稱：(S)-1-甲基-3-苯基哌啶之立體選擇性合成

本發明提供根據式 1 的化合物



式 1

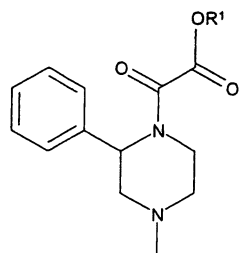
其中 R^1 為甲基、乙基、正丙基、異丙基、苯甲基或 2-鹵乙基；及其在製備 (S)-1-甲基-3-苯基哌啶的方法中之用途；該方法包括將該式 1 化合物酶催化性水解，接著分離及切斷草胺酸素基團，其中係使用灰色鏈黴菌 (*Streptomyces griseus*) 的蛋白酶作為該酶催化性水解所用的酵素。

六、英文發明摘要

發明之名稱：

STEREOSELECTIVE SYNTHESIS OF (S)-1-METHYL-3-PHENYLPYPERAZINE

This invention provides for a compound according to formula 1,

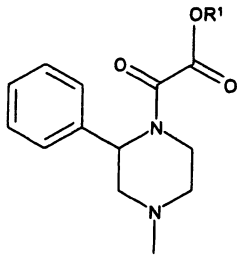


Formula 1

wherein R^1 is methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, benzyl or 2-haloethyl and the use thereof in a method to prepare (S)-1-methyl-3-phenylpiperazine by enzymatic hydrolysis of the compound, followed by separation and cleavage of the oxalamic groups, whereby the protease of *Streptomyces griseus* is used as enzyme for the enzymatic hydrolysis.

十、申請專利範圍

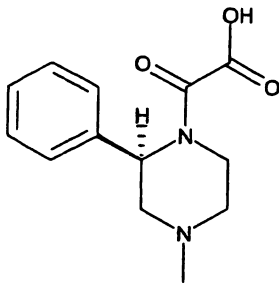
1. 一種式 1 的化合物



式 1

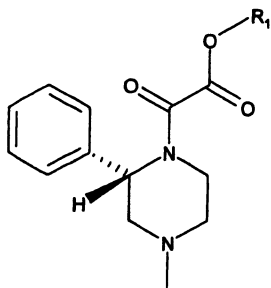
其中 R^1 為甲基、乙基、正丙基、異丙基、苯甲基或 2-鹵乙基。

2. 一種式 2 的 (R) -1-甲基 -3-苯基哌啶之草胺酸衍生物



式 2。

3. 一種式 3 的 (S) -1-甲基 -3-苯基哌啶之草胺酸酯衍生物



式 3

其中 R^1 為甲基、乙基、正丙基、異丙基、苯甲基或 2-鹵乙基。

4. 一種製備 (S)-1-甲基-3-苯基哌啶之方法，其包括將申請專利範圍第 1 項之化合物予以酶催化性水解，接著分離及從反應產物切斷草胺酸酯基團，其中係使用灰色鏈黴菌 (*Streptomyces griseus*) 的蛋白酶作為該酶催化性水解所用的酵素。

5. 一種製備 (R)-1-甲基-3-苯基哌啶之方法，其包括將申請專利範圍第 1 項之化合物予以酶催化性水解，接著分離及從反應產物切斷草胺酸基團，其中係使用灰色鏈黴菌 (*Streptomyces griseus*) 的蛋白酶作為該酶催化性水解所用的酵素。

6. 根據申請專利範圍第 4 項之方法，其中該水解係在無緩衝劑的介質內實施。

7. 根據申請專利範圍第 5 項之方法，其中該水解係在無緩衝劑的介質內實施。

8. 根據申請專利範圍第 4-7 項中任一項之方法，其中該水解係 1-甲基-3-苯基哌啶的甲基草酸酯之水解且該水解所用介質包含甲苯或甲基第三丁基醚。

9. 根據申請專利範圍第 4-7 項中任一項之方法，其中該水解係 1-甲基-3-苯基哌啶的乙基草酸酯之水解且該介質包含環己烷。

10. 一種製備 S-米氮平 (S-mirtazapine) 之方法，其

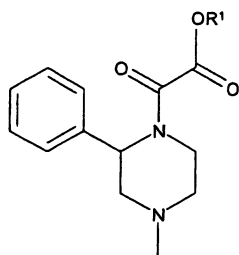
包括申請專利範圍第 4、6、8 或 9 項中任一項之步驟。

七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：無

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：式 1



式 1