

実験計画法を用いた医薬品合成プロセスの最適化に関する研究

2016年 9月 20日

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科

西村 晃一郎

## 目次

頁

1	緒言	3
1.1	製薬企業におけるプロセス化学の役割	3
1.2	プロセス化学と実験計画法	5
1.3	実験計画法概論—OVAT 法—	7
1.4	実験計画法概論—応答曲面法—	9
1.5	実験計画法概論—Factorial Design—	12
1.6	実験計画法概論—Fractional Factorial Design—	20
1.7	参考文献及び脚注	22
2	実験計画法を用いた最適化の導入研究	25
2.1	Mannich 反応への実験計画法の導入研究	25
2.2	Factorial Design	27
2.3	応答曲面法	35
2.4	再現性の確認	44
2.5	実験数の削減に対する考察	45
2.6	小括	48
2.7	実験	49
2.8	参考文献及び脚注	51
3	塩酸オロパタジン新規合成ルートへの実験計画法の適用	53
3.1	塩酸オロパタジン新規合成ルートの Feasibility study	53
3.2	環化前駆体 8 の合成	57
3.3	パラジウム触媒を用いた環化反応	61
3.4	実験計画法による環化反応の最適化	66
3.5	塩酸オロパタジンへの誘導	76
3.6	小括	77
3.7	実験	79
3.8	参考文献等	85
4	合成ルートの最適化と実験計画法の研究	86
4.1	合成ルートの最適化	86
4.2	メディシナル合成ルートの検証	88

4.3	メディシナル合成ルートの改良検討.....	90
4.4	各工程のテレスコーピング化の可能性の模索.....	100
4.5	各工程のテレスコーピング化検討.....	101
4.6	小括.....	103
4.7	実験.....	104
4.8	参考文献.....	107
5	総括.....	108
	略号表.....	110
	研究業績リスト.....	111
	謝辞.....	112

# 1 緒言

## 1.1 製薬企業におけるプロセス化学の役割

製薬企業における低分子医薬品の研究において、化学は多大な貢献を果たしているが、その役割はメディシナル化学とプロセス化学に大別できる。メディシナル化学の目的は、医薬品の有効成分となる候補化合物の探索であり、化学は手段である。一方、プロセス化学の目的は、開発候補が決まった候補化合物に対し、効率的な製造法（合成法）を確立することであり、新規な合成法を見出したり、化学反応のメカニズムを深く考察することが求められる<sup>1)</sup>。即ち、プロセス化学においては、化学そのものが研究対象となる（図 1.1-1）。

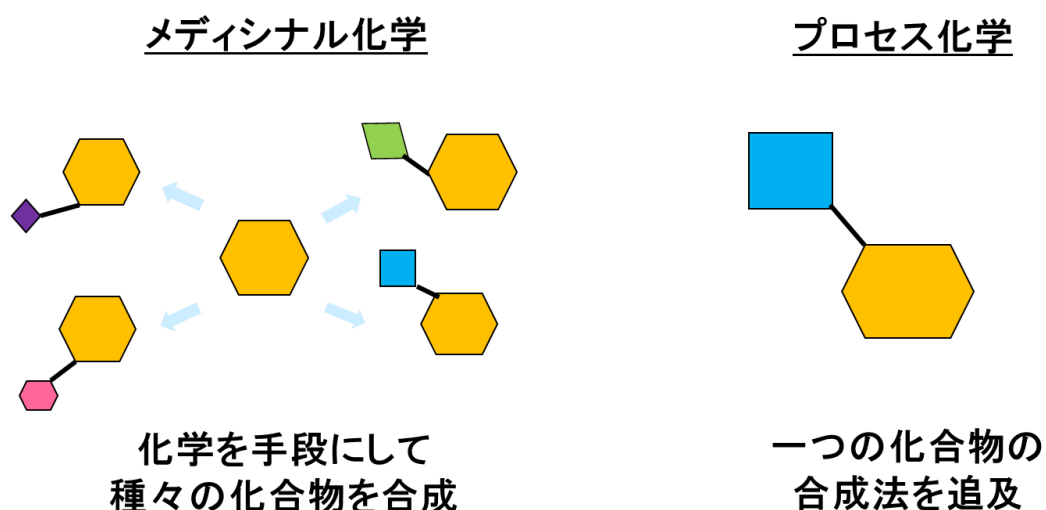


図 1.1-1 メディシナル化学とプロセス化学

前述したように、プロセス化学の目標は、医薬品開発候補化合物に対し効率的な製造法を構築することであるが、その内容は多義にわたっている。代表的なプロセス化学の研究で解決すべき課題を以下に示す。

- ① 合成ルートの探索
- ② 化学反応の最適化
- ③ 安全性評価
- ④ 操作性の向上
- ⑤ 頑健性の確保
- ⑥ スケールアップ

- ⑦ 製造コストの削減
- ⑧ 開発スピードへの貢献
- ⑨ GMP、ICH、各国局法（JP、USP、EP）など規制への対応

例えば、①の合成ルートの探索という課題に対するプロセス研究の進め方について具体的に述べる（図 1.1-2）。ある化合物に対し、二通りの合成ルート A と B が考えられたとする。合成ルート A は全工程で 2 工程。合成ルート B は全工程で 3 工程である。合成ルート A は、短工程であるが収率が 30% と低い工程が一つ含まれている。一方、合成ルート B は、合成ルート A よりも一工程長くなるが、全ての工程において収率は高い。この場合、合成ルート A では、低収率の工程の改善が最重要課題となる。一方、合成ルート B では、反応をワンポット化するなど改良できれば、一工程分の単離操作を解消することができる。プロセス化学では、これらの課題に対して開発スケジュールを意識しながら最適化を進め、合成ルート選択の最終的な判断を下す。このとき、安全性、コスト、規制も判断の基準となる。

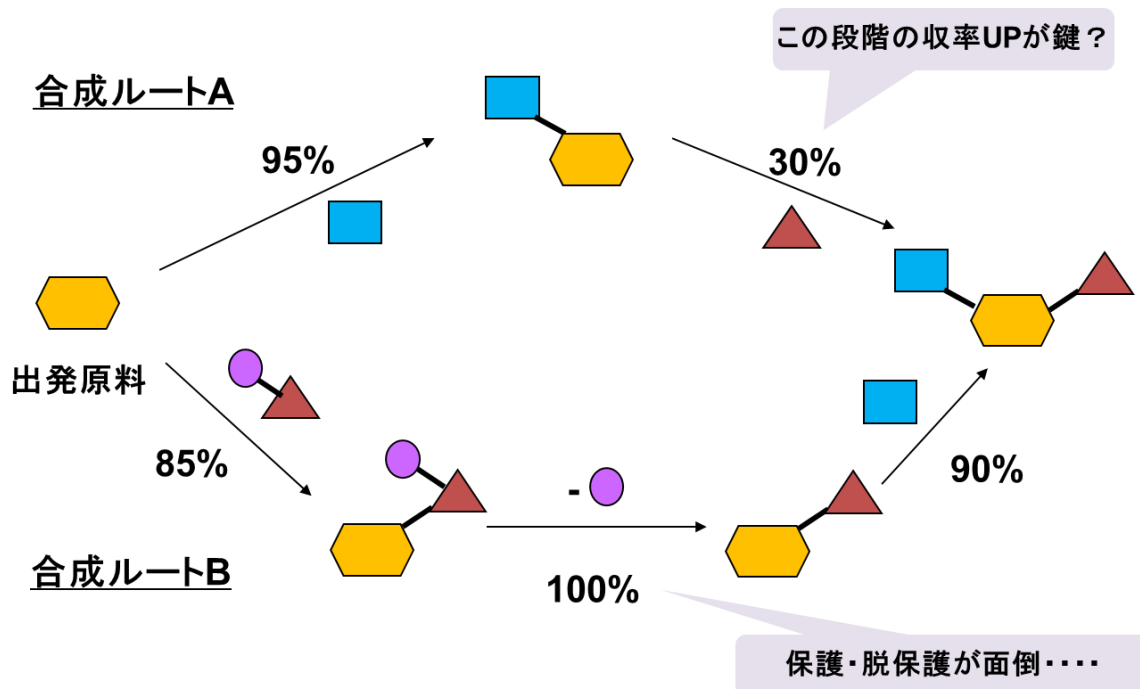


図 1.1-2 合成ルート検討の模式図

## 1.2 プロセス化学と実験計画法

近年、低分子医薬品の成功確率が下がり、かつ一つの薬剤に対する開発費が増大していることから、医薬品開発のハードルは以前よりも上がっている。このような状況下、製薬企業では、研究開発の効率化・迅速化を図ろうとする動きが盛んとなっている。医薬品原薬の製造及び大量供給に関わるプロセス化学においても例外ではない。

プロセス化学の主たる業務の一つに、化学反応の最適化が挙げられるが、そこでは、試薬の当量、反応温度、反応時間、攪拌速度など各種の因子（英語表記：Factor）<sup>2)</sup>の最適値を求め、再現性の高い頑健な工程を確立することが求められる。このとき、多くの因子が存在すると、最適化の操作は難しく勘と経験に頼ることも多かった。

そこで、最近では、効率的に化学合成のプロセスを構築するための手段として、実験計画法（英語表記：Design of Experiment、DoEとも略される）を用いた化学反応の最適化手法が用いられている<sup>3)</sup>。一例を図 1.2-1 及び図 1.2-2 に示す。図 1.2-1 は、脱シリル化反応に適用した例である<sup>3b)</sup>。温度、時間、溶媒量及び脱シリル化剤量の合計 4 因子を用いた実験計画法により最適化され、当初目標としていた収率 93%以上及び副生物 2%以下の条件を見出すことができている。一方、図 1.2-2 は<sup>3c)</sup>、パラジウム触媒を用いた Heck 反応に実験計画法を用いた例である。ここでは、温度、時間、溶媒量、触媒量（パラジウム触媒）及び塩基量の合計 5 因子を用いた最適化により、温度、溶媒量、触媒量がこの反応に大きく影響することが判明し、収率を 57%から 98%に向上できている。

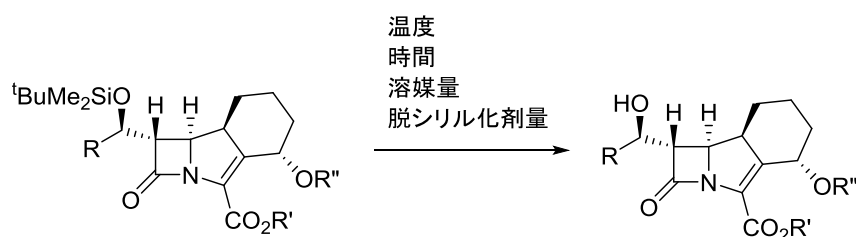


図 1.2-1 脱シリル化反応に用いた例

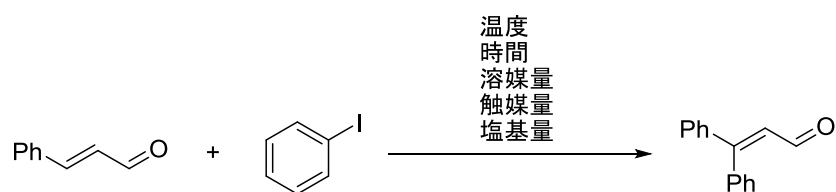


図 1.2-2 Heck 反応に用いた例

実験計画法とは統計的方法論の一種で、実験条件の最適化に威力を発揮する<sup>4)</sup>。実験計画法は、約 100 年ほど前に Fisher により体系が確立され長い歴史を有している<sup>5)</sup>。当初の目的は、再現性を確保することが困難だった農学の実験への適用が主であったが、今では、工学、医学、品質管理などあらゆる分野で汎用されている。

実験計画法による実験は、一見無意味といえる多量の実験をこなす必要があり、解析には膨大な計算を要した。そのため、比較的再現性が高く理論体系が整った合成化学の分野で用いられることは稀であった。しかしながら、近年では、汎用のソフトウェア<sup>6)</sup>の開発が進み、化学反応においても、反応条件の最適化などで実験計画法の有用性が見直されている。これまでの勘と経験に頼らず、一定の方法論に基づく最適化スキームがあれば、実験者間での結論の相違が解消でき、医薬品開発のスピードアップに貢献できると期待される。また、実験計画法で得られた結果は頑健性が高いため、商業生産時、継続的に製造を繰り返す場合に生じるトラブルの軽減にも役立てられると考える。

### 1.3 実験計画法概論—OVAT 法—

従来から最適化手法では、OVAT 法（One Variable at a Time 法の略）が汎用されてきた。OVAT 法とは、複数ある因子を一つずつ順番に最適化していく方法で、ある一つの因子を最適化する場合、他の全ての因子は一定の値に固定して最適化を進めていく手法である<sup>4a)</sup>。ここでは、ある化学反応（反応例 1）を想定し、反応温度と副原料の当量の 2 因子を変化させて、化合物 b の収率を最適化する場合を考える（図 1.3-1、表 1.3-1）。

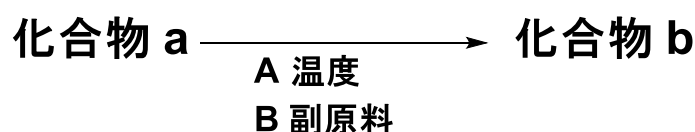


図 1.3-1 反応例 1

表 1.3-1 反応例 1 の最適化の結果

Run	温度 (°C)	副原料 (eq)	化合物 b の収率 (%)
1	30	1.0	70
2	50	1.0	77
3	70	1.0	81
4	90	1.0	77
5	70	2.0	87
6	70	3.0	76

まず、副原料の当量を 1.0 当量に固定して反応温度を変化させると、反応温度の最適値（Run 3、70°C）が求められる。次に、反応温度を 70°C に固定し、副原料の当量を最適化する。最終的に Run 5（反応温度：70°C、副原料：2.0 当量）が望む最適条件として得られる。

ここで、この OVAT 法による最適化アプローチを、座標上に表示してみる（図 1.3-2）。グラフ上の各点の番号は、表 1.3-1 の Run 番号を示す。仮に、化合物 b の収率を表す等高線が存在したとする（図 1.3-2 の点線）。このとき、表 1.3-1 の最適値である⑤は、真の最適点（▲点）と異なっている。即ち、OVAT 法による最適化では、出発点に依存した最適点が誘導されるため、常に真の最適点に辿り着けるわけではない。



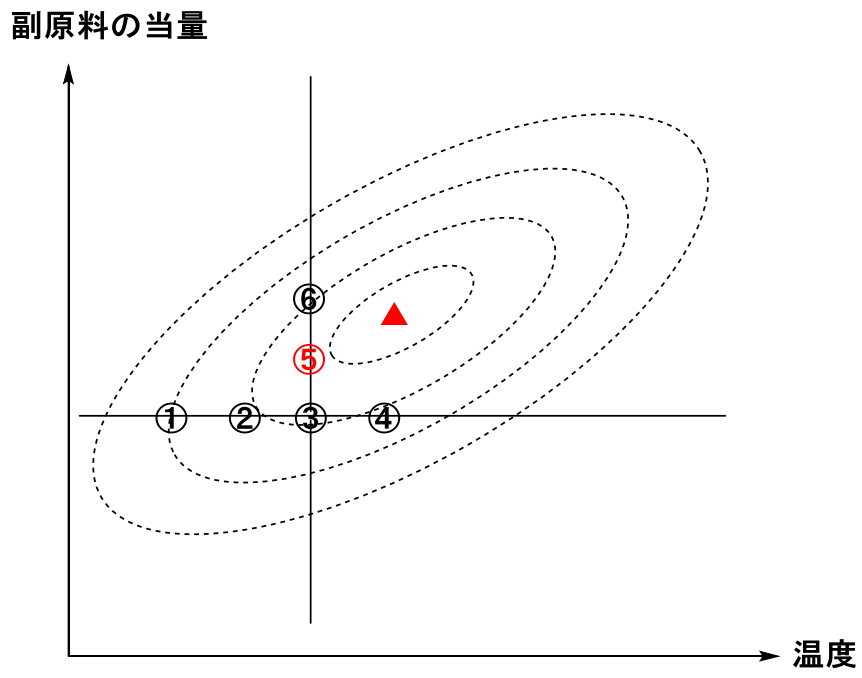


図 1.3-2 OVAT 法の座標表示

## 1.4 実験計画法概論—応答曲面法—

確実に真の最適点に辿り着くためには、OVAT法のように1次元的な線によるアプローチではなく、多次元的なアプローチが必要で、前項で言及したような収率の等高線を見つけることが最終目標である（図 1.4-1）。

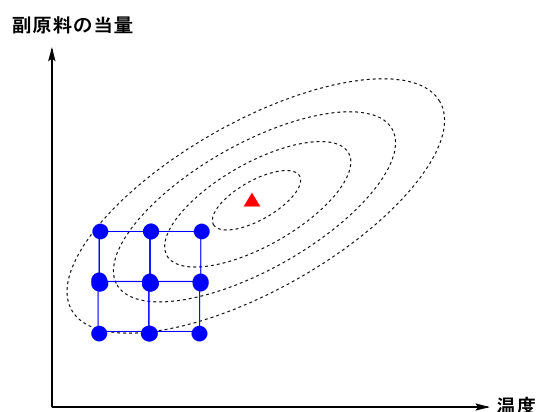


図 1.4-1 多次元的なアプローチにより等高線を求めるイメージ

とはいえ、収率の等高線を求めることは困難で、物理化学的法則から必ずしも誘導できるわけではない。そこで、実験結果を基に経験的な式を誘導し、これを利用できれば効率的である。実験範囲を狭い範囲に限定すれば、経験的な式の適用は可能と考えられ、仮に収率を表す式が複雑だとしても（図 1.4-2 の点線）、狭い範囲に限定すれば、実験結果を基に多項式で近似できる可能性がある（図 1.4-2 の実線）。

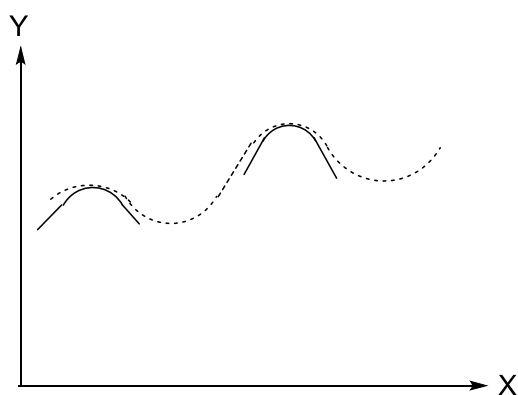


図 1.4-2 狭い範囲に限定して多項式を適用する場合のイメージ

実際に近似式を誘導する場合は、統計学の回帰分析で用いられる最小二乗法が適用される。このとき、収率は曲面（図 1.4-2 は 1 因子の例なので曲線）として表現できる。これを応答曲面（英語表記：Response Surface）という<sup>4a, 7)</sup>。応答曲面は、1 次式（Linear Model）、2 次式（Interaction Model や Quadra Model）、3 次式（Cubic Model）など次数の違いにより多種存在する、2 因子の場合には、下式（1）～（4）で記述できる。3 因子以上の場合も、応答曲面を算出することは可能であるが、因子数が増えると連立方程式で求める係数が多くなるため、多くの実験が必要となる。また、得られた式の解析も複雑となる<sup>4a)</sup>。

$$\text{Linear Model:} \quad y = ax_1 + bx_2 + c \quad - (1)$$

$$\text{Interaction Model:} \quad y = ax_1 + bx_2 + cx_1x_2 + d \quad - (2)$$

$$\text{Quadra Model:} \quad y = ax_1^2 + bx_2^2 + cx_1 + dx_2 + ex_1x_2 + f \quad - (3)$$

$$\text{Cubic Model:} \quad y = ax_1^3 + bx_2^3 + cx_1^2 + dx_2^2 + ex_1^2x_2 + fx_1x_2^2 + gx_1 + hx_2 + ix_1x_2 + j \quad - (4)$$

一般に、最高収率などの最大値を求める場合は、Quadra Model（2 次曲面モデル）を適用する。それは、一つの極値を有する 2 次曲面の式として表現できるため、最大値や最小値を見出しやすいからである。必要な実験についても適度な数で済ませることができる。

二つの因子の反応で Quadra Model を適用する場合、7 つ以上の実験が必要となる。このとき、実験はできるだけ均等に割り振って実施した方が良い。2 因子の実験を平面座標で表す場合、ある一つの実験を中心として、その点から均等な距離にある点（円周上の点）の実験を行うことにより、偏りのない結果を得ることができる。このような実験計画は、中心複合計画（英語表記：Central Composite Design）と呼ばれている（図 1.4-3）<sup>4a)</sup>。

以上で述べた手法は、応答曲面法（Response Surface Design）と呼ばれる<sup>4a, 7)</sup>。応答曲面法を利用することで、化学反応の収率等の等高線を描くことができる。具体的な実施例は、第 2 章以降で示す。

Design Expertに  
より描画した図

底面の点は、実  
験を実施する点

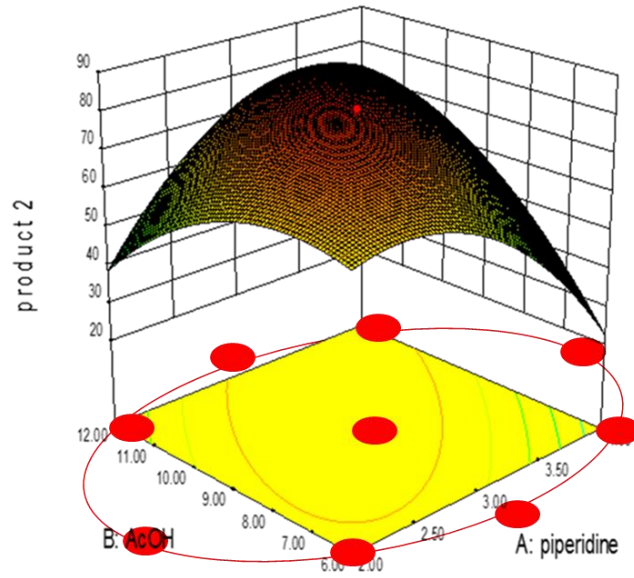


図 1.4-3 中心複合計画

## 1.5 実験計画法概論—Factorial Design—

化学反応では、温度、攪拌数、滴下時間など多くの因子を取り扱って最適化しなければならない場合がある。そのような場合、応答曲面法を真っ先に適用すると、一度に多くの実験が必要となる。多くの因子が存在する時は、まず反応に影響する因子のみを抽出した後に、応答曲面法を適用する方が得策である。数多くある因子の中から、影響力の大きな因子を抽出する手法として、Factorial Design<sup>4a)</sup>が知られている。Factorial Design の基本は、温度、副原料の当量など各因子について水準を設定し、全ての組み合わせの実験を行うことである。特に、2水準で行う実験を 2-Level Factorial Design<sup>8)</sup>という。2-Level Factorial Design では、二つの水準のうち、低い方を低水準、高い方を高水準と呼び、低水準を-1、高水準を+1 で表記する。

2-Level Factorial Design について理解するために、以下の反応例 2 を考える (図 1.5-1)。表 1.5-1 に示すように、温度は低水準に 10°C、高水準に 30°C、副原料の当量は、低水準に 1.0 当量、高水準に 3.0 当量とし、全ての組み合わせの 4 runs (=2<sup>2</sup>) の実験を行う。結果を表 1.5-2 示す。

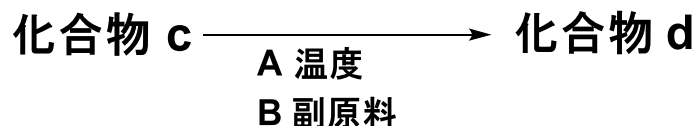


図 1.5-1 反応例 2

表 1.5-1 2-Level Factorial Design の水準 (2 因子)

因子	低水準(-1)	高水準(+1)
A : 温度	10°C	30°C
B : 副原料	1.0 eq	3.0 eq

表 1.5-2 2-Level Factorial Design の結果 (2 因子)

Run	A : 温度	B : 副原料	化合物 d の収率 (%)
1	- 1	- 1	60
2	+ 1	- 1	60
3	- 1	+ 1	40
4	+ 1	+ 1	90

表 1.5-2 を見ると、Run 4 の条件が最も良いことが判る。ところで、2-Level Factorial Design から得られる情報は単に最適な条件を知ることだけではな

い。温度と副原料の当量のうち、どの因子が反応に大きく影響しているかを知ることができる。ある因子について水準を変化させたとき、その影響を受け収率が変化するが、そのときの収率の変化量を効果（英語表記：Effect）といい、次式で計算できる。

$$\text{A の効果} = (+1) \times (\text{A が高水準での平均収率}) + (-1) \times (\text{A が低水準での平均収率}) \quad - (7)$$

$$\text{B の効果} = (+1) \times (\text{B が高水準での平均収率}) + (-1) \times (\text{B が低水準での平均収率}) \quad - (8)$$

計算で得られた効果の大きさを比較することにより、本反応への各因子の影響度をみることが出来る。表 1.5-2 の数値を式 (7)、(8) に代入し、A、B それぞれの効果計算できる。

$$\text{A の効果} : (+1) \times (60 + 90)/2 + (-1) \times (40 + 60)/2 = +75 - 50 = +25$$

$$\text{B の効果} : (+1) \times (40 + 90)/2 + (-1) \times (60 + 60)/2 = +65 - 60 = +5$$

以上より、A の効果は+25、B の効果は+5 と計算され、A の効果の方が大きいと判断できる。一方、基準となる数値、全平均（四つの実験で得られた収率全ての平均 =  $(60+60+40+90)/4 = 62.5\%$ ）と、効果の数値を用いれば、各点の収率を逆算することが可能と考えられる（式 (9)）。

$$\text{化合物 d の収率} = \text{全平均} + (\pm 1) \times (\text{A の効果})/2 + (\pm 1) \times (\text{B の効果})/2 \quad - (9)$$

実際に式 (9) にそれぞれの効果の値を代入して計算すると、以下のようになるが、これらの値は表 1.5-2 の値とは一致していない。

$$\text{Run 1} : 62.5 + (-1) \times (+25)/2 + (-1) \times (+5)/2 = 47.5$$

$$\text{Run 2} : 62.5 + (+1) \times (+25)/2 + (-1) \times (+5)/2 = 72.5$$

$$\text{Run 3} : 62.5 + (-1) \times (+25)/2 + (+1) \times (+5)/2 = 52.5$$

$$\text{Run 4} : 62.5 + (+1) \times (+25)/2 + (+1) \times (+5)/2 = 77.5$$

この理由は、相乗効果や相殺効果を表す交互作用<sup>9)</sup>（英語表記：Interaction）を考慮しなかったためである。A と B の交互作用は AB と表記し、交互作用

の水準は、各 Run の A と B との水準同士を掛け合わせた値を用いて計算できる。表 1.5-2 に対して交互作用も含めた表を表 1.5-3 に示す。この表の AB 列の数字が、交互作用 AB の水準を表す。

表 1.5-3 交互作用の列を含めた結果の記載

Run	A	B	AB	化合物 d の収率 (%)
1	- 1	- 1	+ 1	60
2	+ 1	- 1	- 1	60
3	- 1	+ 1	- 1	40
4	+ 1	+ 1	+ 1	90

交互作用 AB の効果は、式 (7) 、 (8) と同様の手順で次のように計算できる。

$$AB \text{ の効果} = (+1) \times (AB \text{ が高水準での平均収率}) + (-1) \times (AB \text{ が低水準での平均収率}) \quad - (10)$$

表 1.5-3 の AB 列を用い、実際に数値を式 (10) に代入すると、以下のようになる。

$$AB \text{ 交互作用の効果} = (+1) \times (60+90)/2 + (-1) \times (60+40)/2 = +75 - 50 = +25$$

AB の効果 (+25) は、A の効果 (+25) と同じ大きさであることが判る。本反応では、交互作用も反応に大きく影響している。そこで、式 (9) に交互作用 AB の効果も加算した式 (11) を用いて、各点の収率を計算する。

$$\begin{aligned} \text{化合物 d の収率} = & \text{全平均} + (\pm 1) \times (A \text{ の効果})/2 + (\pm 1) \times (B \text{ の効果})/2 \\ & + (\pm 1) \times (\text{交互作用 AB の効果})/2 \quad - (11) \end{aligned}$$

$$\text{Run 1 : } 62.5 + (-1) \times (+25)/2 + (-1) \times (+5)/2 + (+1) \times (+25)/2 = 60$$

$$\text{Run 2 : } 62.5 + (+1) \times (+25)/2 + (-1) \times (+5)/2 + (-1) \times (+25)/2 = 60$$

$$\text{Run 3 : } 62.5 + (-1) \times (+25)/2 + (+1) \times (+5)/2 + (-1) \times (+25)/2 = 40$$

$$\text{Run 4 : } 62.5 + (+1) \times (+25)/2 + (+1) \times (+5)/2 + (+1) \times (+25)/2 = 90$$

計算値をみると、表 1.5-2 の各 Run の実験結果と一致することが判る。なお、以降は、単一の因子による効果のことを主効果と記し、交互作用の効果

と区別する。また、単一の因子と交互作用を合わせた呼称を要因（英語名：Source）と記す。

以上で述べた手順に則り、ここでは、三つ以上の因子がある場合にも効果を計算できる。温度、副原料の当量の2因子に加えて、時間と攪拌数の2因子についても同時に調べることにする（反応例3：図1.5-2）。全部で4因子となるので、全ての組み合わせを考えると、16 runs (= 2<sup>4</sup>) 実験を行わなければならない。多い実験数であるができない範囲ではない。ここでは4因子で検討を行い、その中で本反応に影響する重要な因子を抽出することにする。

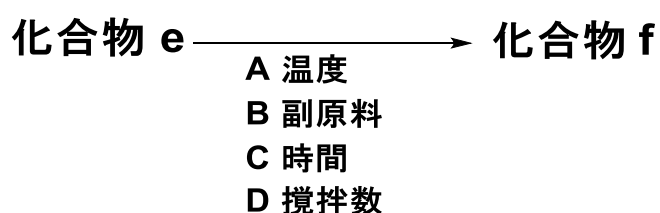


図 1.5-2 反応例 3

表 1.5-4 2-Level Fatorial Design の水準（4 因子）

因子	低水準(-)	副原料(+)
A：温度	10°C	30°C
B：副原料	1.0 eq	3.0 eq
C：時間	1 h	5 h
D：攪拌数	200 rpm	1000 rpm

表 1.5-5 2-Level Fatorial Design の結果（4 因子）

Run	A：温度	B：副原料	C：時間	D：攪拌数	化合物 f の収率
1	- 1	- 1	- 1	- 1	61%
2	+1	- 1	- 1	- 1	57%
3	- 1	+1	- 1	- 1	43%
4	+1	+1	- 1	- 1	88%
5	- 1	- 1	+1	- 1	62%
6	+1	- 1	+1	- 1	58%
7	- 1	+1	+1	- 1	43%
8	+1	+1	+1	- 1	94%
9	- 1	- 1	- 1	+1	65%
10	+1	- 1	- 1	+1	60%
11	- 1	+1	- 1	+1	38%
12	+1	+1	- 1	+1	89%
13	- 1	- 1	+1	+1	58%
14	+1	- 1	+1	+1	58%



表 1.5-5 2-Level Factorial Desing の結果（4 因子）（続き）

Run	A：温度	B：副原料	C：時間	D：攪拌数	化合物 f の収率
15	- 1	+1	+1	+1	48%
16	+1	+1	+1	+1	90%

16 runs の結果ともなると、一覧を一見しただけでは反応の傾向を把握することは難しい。前項の手順に従い、主効果及び交互作用の効果を算出してどの因子が本反応に影響しているかを把握する。この場合、4 因子存在することから、交互作用は 2 次の交互作用（AB、AC、AD、BC、BD、CD）から 3 次（ABC、ABD、ACD、BCD）及び 4 次の交互作用（ABCD）まで評価できる。各交互作用の水準を表 1.5-6 に記す。

表 1.5-6 交互作用（4 因子）

AB	AC	AD	BC	BD	CD	ABC	ABD	ACD	BCD	ABCD
+1	+1	+1	+1	+1	+1	- 1	- 1	- 1	- 1	+1
- 1	- 1	- 1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	- 1	- 1
- 1	+1	+1	- 1	- 1	+1	+1	+1	- 1	+1	- 1
+1	- 1	- 1	- 1	- 1	+1	- 1	- 1	+1	+1	+1
+1	- 1	+1	- 1	+1	- 1	+1	- 1	+1	+1	- 1
- 1	+1	- 1	- 1	+1	- 1	- 1	+1	- 1	+1	+1
- 1	- 1	+1	+1	- 1	- 1	- 1	+1	+1	- 1	+1
+1	+1	- 1	+1	- 1	- 1	+1	- 1	- 1	- 1	- 1
+1	+1	- 1	+1	- 1	- 1	- 1	+1	+1	+1	- 1
- 1	- 1	+1	+1	- 1	- 1	+1	- 1	- 1	+1	+1
- 1	+1	- 1	- 1	+1	- 1	+1	- 1	+1	- 1	+1
+1	- 1	+1	- 1	+1	- 1	- 1	+1	- 1	- 1	- 1
+1	- 1	- 1	- 1	- 1	+1	+1	+1	- 1	- 1	+1
- 1	+1	+1	- 1	- 1	+1	- 1	- 1	+1	- 1	- 1
- 1	- 1	- 1	+1	+1	+1	- 1	- 1	- 1	+1	- 1
+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

主効果と交互作用の効果を計算した結果を図 1.5-3 にまとめる。これはプレート図と呼ばれている<sup>4a)</sup>。

主効果と交互作用

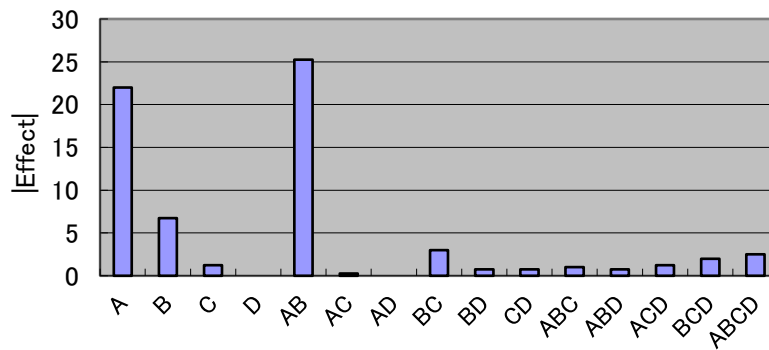


図 1.5-3 パレート図

パレート図から、A と AB の効果が大きいことが判る。続いて B と BC あたりが大きい。それ以外については小さく、本反応には殆ど影響しないものと考えられ、無視できそうである。特に因子 D やこれに関連する交互作用は、本反応にほとんど関与していないと考えられ、因子 D は最適化の因子から除外できそうである。しかし、主観的判断に基づいて各因子の効果の大小を判別することは危険である。統計的に客観的な判断を下すことが望ましい。一般には、Normal Probability Plot や Half Normal Plot<sup>4a)</sup>、または分散分析<sup>4b)</sup>が用いられる。

まず、Normal Probability Plot 及び Half Normal Plot について簡単に記す。Normal Probability Plot は、正規確率紙の横軸に効果、縦軸には下の計算式によって計算された値 ( $P_i$ ) をプロットしたグラフのことである<sup>10)</sup>。

$$P_i = 100 \times (i - 0.5) / m$$

- ・  $i$  : 効果の順位を示し、最も低いものから順に 1, 2, 3... の値を代入する。
- ・  $m$  : 全ての要因 (主効果、交互作用全て含む) の個数を代入する。

一方、Half Normal Plot は、横軸に効果の絶対値を示したもので、Normal Probability Plot よりも、使い勝手が良い。本項で述べた実験の Half Normal Plot を図 1.5-4 に示す。この Half Normal Plot は実験計画法のソフトウェア Design Expert を用いて得られたものである。Half Normal Plot の見方であるが、図中の直線は正規分布を表し、この直線上に存在する点は、誤差の変動とみなすことができる。A、B、AB の各点については、正規分布上から外れた点となっている。即ち、A、B、AB の各要因は、得られた結果対して誤差では説明

できない何らかの影響が現れたものと考えられる。Half Normal Plot により主観的判断を排除して必要な因子を抽出する判断ができる。

Design Expertにより描画した図  
直線より右にずれた点につき、効果がある要因(因子)と判断する

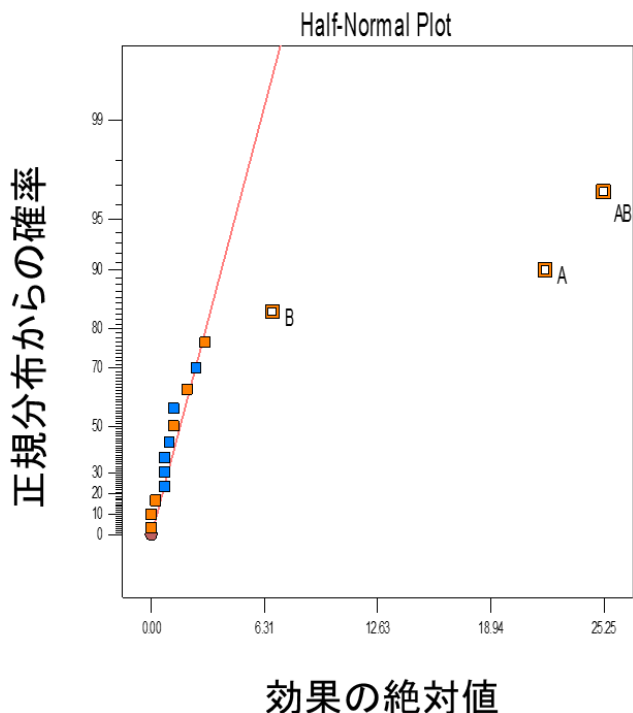


図 1.5-4 Half Normal Plot

一方、F 検定<sup>4b)</sup>に基づく分散分析は手法は、Half Normal Plot よりもより統計的に厳密な方法である。実際に計算した分散分析の結果（分散分析表）を表 1.5-7 に示す。分散分析によっても、A、B、AB の三つの要因が本反応に影響を与える要因として抽出できることが判る。分散分析表は、手計算及び F 表によっても求めることができるが、Design Expert によっても求められる。なお、分散分析の詳細は、教科書を参考にされたい<sup>4b)</sup>。

表 1.5-7 分散分析表

要因	平方和	自由度	分散	F 値	確率	有意判定 <sup>a</sup>
A	1936.00	1	1936.00	231.16	<0.0001	有意
B	182.25	1	182.25	21.76	<0.0001	有意
AB	2550.25	1	2550.25	304.51	<0.0005	有意
誤差	100.50	12	8.28	—	—	—

a 有意水準（危険率）1%

Half Normal Plot による方法と分散分析による方法の二つの方法を示したが、それぞれにおいて、同等の結果が得られている。第 2 章以降の研究においては、Design Expert により求めた Half Normal Plot を適用し、実験結果の解析を進めていく。

以上、Factorial Design を用いて、各因子や交互作用の効果を算出し比較することによって、反応に影響する因子を抽出することができることを示した。Factorial Design は、OVAT 法より優れた方法である。また、Factorial Design で特定の因子を絞り込んだ後、応答曲面法で詳細な最適化を行えば効率的である。

## 1.6 実験計画法概論—Fractional Factorial Design—

4 因子を扱う 2-Level Factorial Design では、合計 16 runs が必要であったが、さらに多くの因子を扱う場合、それに伴って多くの実験が必要となる。一方で、それだけ多くの実験を行うと、得られる情報は膨大となる。6 因子の実験では 64 runs ( $= 2^6$ ) もの実験を実施することで 6 次の交互作用までの情報が得られる。しかしながら、6 次の交互作用（六つの因子が同時に関与することで現れる効果）は実質的に意味のない情報で、一般には 3 次以上の交互作用は事実上無視することが多い<sup>4)</sup>。多因子を有する 2-Level Factorial Design では、直交表を用いて実験数を削減することができる<sup>4)</sup>。直交表を用いた Factorial Design を特に Fractional Factorial Design と呼ばれる。直交表は多種存在するが、代表例として  $L_8$  直交表を表 1.6-1 に示す。

表 1.6-1  $L_8$  直交表

1	- 1	- 1	- 1	+1	+1	+1	- 1
2	+1	- 1	- 1	- 1	- 1	+1	+1
3	- 1	+1	- 1	- 1	+1	- 1	+1
4	+1	+1	- 1	+1	- 1	- 1	- 1
5	- 1	- 1	+1	+1	- 1	- 1	+1
6	+1	- 1	+1	- 1	+1	- 1	- 1
7	- 1	+1	+1	- 1	- 1	+1	- 1
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

$L_8$  直交表を用いた実験計画について、図 1.5-2 の例を用いて説明する。この例は計 4 因子の実験なので、2-Level Factorial Design では、16 runs ( $= 2^4$ ) の実験を行う必要があるが、 $L_8$  の直交表を用いて、8 runs の実験に削減することが可能である。四つの因子を  $L_8$  直交表の左から順番に割り付けたものを表 1.6-2 に記す。

表 1.6-2 L<sub>8</sub>直交表への因子の割り付け

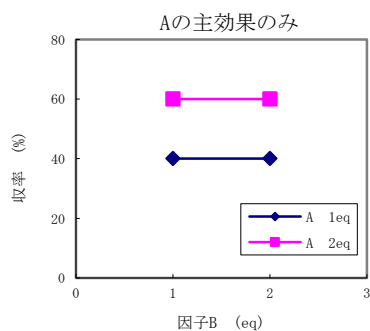
列番号→	1	2	3	4	5	6	7
因子の割り付け→	A	B	C	D			
交互作用→				AB	AC	BC	ABC
1	- 1	- 1	- 1	+1	+1	+1	- 1
2	+1	- 1	- 1	- 1	- 1	+1	+1
3	- 1	+1	- 1	- 1	+1	- 1	+1
4	+1	+1	- 1	+1	- 1	- 1	- 1
5	- 1	- 1	+1	+1	- 1	- 1	+1
6	+1	- 1	+1	- 1	+1	- 1	- 1
7	- 1	+1	+1	- 1	- 1	+1	- 1
8	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

ここで注目すべきことは、第 4 列に因子 D を割り付けた場合、交互作用 AB がこの列に現れることである（A 列と B 列のそれぞれの数字の積が第 4 列に現れる）。即ち、交互作用 AB と因子 D が同じ列に重複するため、得られた結果が交互作用 AB によるものか因子 D によるものかが区別できないことになる（これを交絡<sup>4, 11)</sup>いう）。この場合、因子 D は、第 7 列目に割り付けることが望ましい。第 7 列目には 3 次の交互作用 ABC が現れるが、2 次の交互作用に比べて高次となる 3 次の交互作用は重要度が低いためである。

以上でのべたように、直交表を用いると実験数を削減でき効率化できるという大きな魅力があるが、その反面、交互作用を含む要因同士の交絡というリスクが存在する。直交表を用いる際は、そのリスクをよく理解した上で実験を行わなければならない。

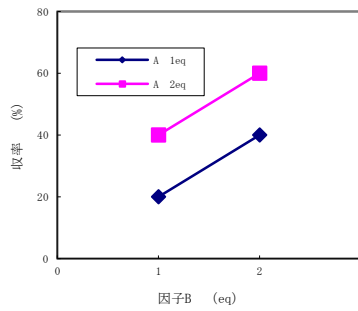
## 1.7 参考文献及び脚注

1. 日本プロセス化学会編，医薬品のプロセス化学，化学同人，2005.
2. 本論文では、一般にパラメータと呼ぶものを因子と記す.
3. a) Emiabata-Smith, D. F.; Crookes, D. L.; Sato, H.; Owen, M. R. *Org. Process Res. Dev.*, 1999, 3, 281.  
b) Owen, M. R.; Luscombe, C.; Lai-Wah,; Godbert S.; Crookes D. L.; Emiabata-Smith, D. F. *Org. Process Res. Dev.*, 2001, 5, 301.  
c) Aggarwal V. K.; Staubitz A. C.; Owen, M. *Org. Process Res. Dev.*, 2006, 10, 64.  
d) Weissman, S. A.; Anderson, N. G. *Org. Process Res. Dev.*, 2015, 19, 1605.
4. a) Tranter R. *Design and Analysis in Chemical Research*, CRC Press, 2000.  
b) 永田靖，入門実験計画法，日科技研，2000.
5. 東京大学教養学部統計学教室編，統計学入門，東京大学出版会，1991.
6. 本研究では、実験計画法のソフトウェアに Stat Ease 社製の Design Expert を用いた.
7. 相島鐵郎，ケモメトリックス，丸善，1992.
8. 3水準以上の実験計画も用いられるが実験量が増え解析が煩雑になるため、用いられることは少ない.
- 9 主効果と交互作用の効果の関係について、以下グラフで可視化した。  
①因子 A の主効果があり、因子 B の主効果及び交互作用 AB の効果がない場合



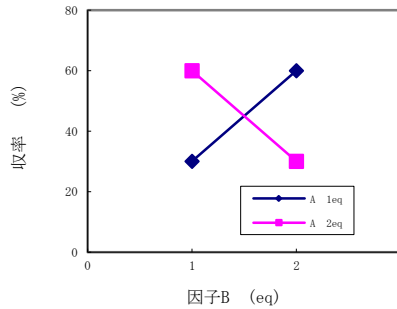
- ②因子 A の主効果及び因子 B の主効果があり、交互作用 AB の効果がない場合

A, B主効果有り交互作用なし



③交互作用 AB の効果があり、因子 A の主効果及び因子 B の主効果がない場合

A, B主効果なし交互作用有り



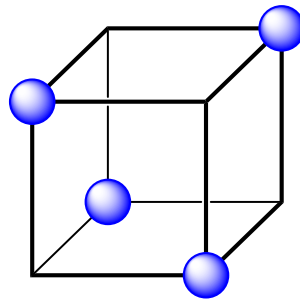
10. 永田靖, 入門統計解析法, 日科技研, 1992.

11. 交絡を視覚的にイメージすることは困難であるが、 $L_4$  の直交表に三つ目の因子を割り付けることを考える (下表) .

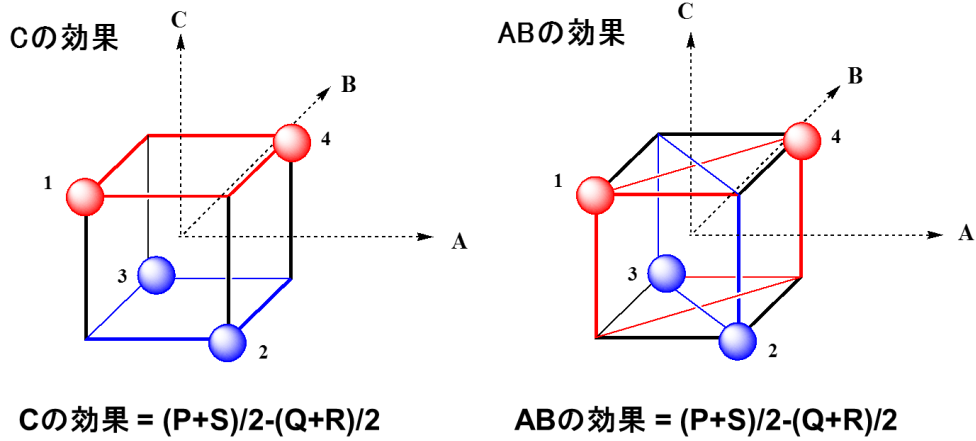
	一列目	二列目	三列目	応答値
	因子 A	因子 B	交互作用 AB 因子C	
点1	-1	-1	+1	P
点2	+1	-1	-1	Q
点3	-1	+1	-1	R
点4	+1	+1	+1	S

本来、 $L_4$  の直交表は、二つの因子であれば交互作用を全て計算できる。 $L_4$  の直交表は二次元空間に適したものであるが、 $L_4$  の直交表に三次元目の因子 C を割り付けた場合、三次元空間で表記すると、下図に示す点の実験の対象となる。





このとき、各点から因子 C と交互作用 AB の効果をそれぞれ計算するとき、それぞれの計算に用いる点は全く同じとなり、両者は区別できないことが判る。



## 2 実験計画法を用いた最適化の導入研究

### 2.1 Mannich 反応への実験計画法の導入研究

Mannich 反応は、酸性条件下、芳香族化合物をアミノメチル化する反応で、基質となるアミン化合物、メチレン部位となるホルムアルデヒド、酸、溶媒など多くの因子が存在する。さらに加熱条件が必要でかつ瞬時に完結する反応ではないため、反応温度や反応時間も重要な因子となる。過去に、アンジオテンシン II 阻害薬として開発されていた KW-3433 原薬の中間体である基質 1 を用いて Mannich 反応の収率を OVAT 法で最適化した際、難渋した経緯があった (図 2.1-1) <sup>1)</sup>。基質 1 が、目的物 2 以外にも、目的物 2 にメチルピペリジンユニットがもう一分子結合した副生物 3 が生成するため、副生物 3 を抑制し目的物 2 の収率を向上させることが困難であったためである。

そこで、本反応に実験計画法を適用し、目的物 2 の最適化が円滑に実行できるか、また過去と同等または同等以上の結果を得ることができるかについて検証した。ここでは、図 2.1-2 に示した実験計画法の検討の方針に従い、以下検討を進めた。

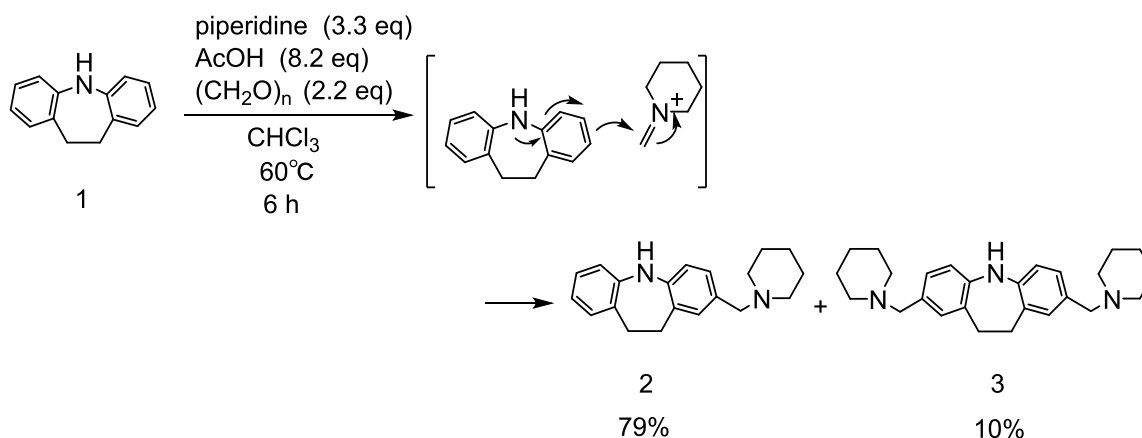


図 2.1-1 基質 1 を用いた Mannich 反応 (過去に OVAT 法で最適化した結果)

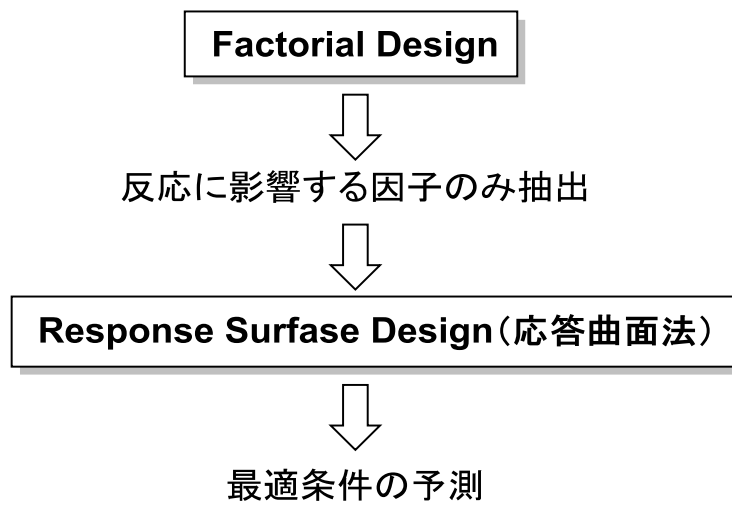


図 2.1-2 実験計画法研究の流れ

## 2.2 Factorial Design

### 1. 因子と水準の設定

最適な反応条件を探索するにあたっては、第1章でも述べたように、まず実験に関与する因子の中から反応に影響する因子のみを抽出することが早道となる。ここでは2-Level Factorial Design<sup>2)</sup>を用いた。

基質1を用いた Mannich の検討する因子として、ピペリジン、酢酸、パラホルムアルデヒドの各試薬当量と、攪拌数、反応温度、反応時間の合計6因子を取上げ(図2.2-1)、それぞれの因子に対して、表2.2-1に示すように水準を設定した。なお、酢酸については、本反応が酸性条件下で進行することから常にピペリジンよりも過剰になるように設定した。

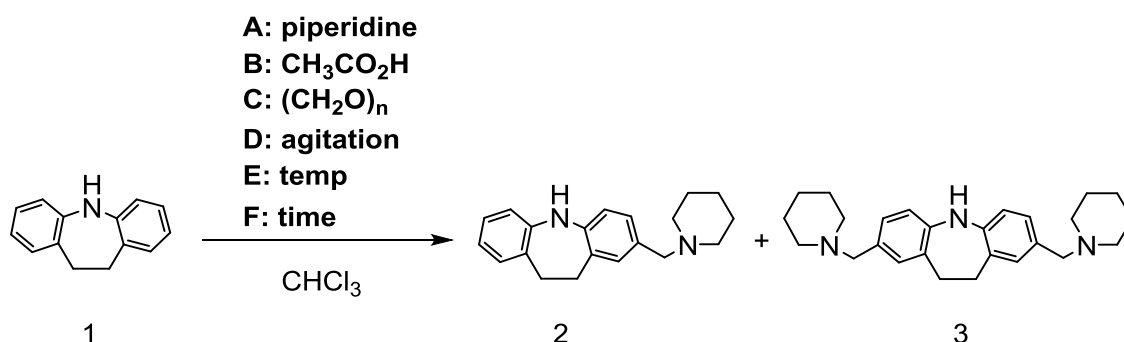


図 2.2-1 基質1を用いた Mannich 反応の最適化

表 2.2-1 水準の設定

因子	低水準 (-1)	高水準 (+1)
A: ピペリジン	1.0 eq	3.0 eq
B: 酢酸	3.1 eq	9.0 eq
C: パラホルムアルデヒド	1.0 eq	3.0 eq
D: 攪拌数	400 rpm	800 rpm
E: 反応温度	40°C	60°C
F: 反応時間	5 h	10 h

## 2. 実験結果

本検討では、合計 6 因子を取上げ、各因子につき 2 水準を設定するため、全ての組み合わせを行った場合、総数 64 runs (=  $2^6$ ) の実験が必要となる。ここでは、初めて実験計画法を経験するため、64 runs 全ての実験を実施し、結果を評価した。膨大な実験量となったが、Anachem 社製の自動合成装置 SK233 (図 2.2-2) を用いることにより、1 日 8 runs ずつ実験を行うことで全ての実験を 8 日で完了できた。64 runs の実験結果を表 2.2-2 に示すが、得られた情報量は膨大で直感的に傾向を把握することは不可能であった。この表だけを見ても収率が高くなる原因は推察できない。



図 2.2-2 自動合成装置 SK233

表 2.2-2 64 runs の実験結果 <sup>a</sup>

Run	A	B	C	D	E	F	収率 (%) <sup>b</sup>		
							2	3	1
1	-	-	-	-	-	-	29.3	0.5	65.1
2	+	-	-	-	-	-	0.4	0	96.7
3	-	+	-	-	-	-	52.2	1.0	21.1
4	+	+	-	-	-	-	29.4	0.5	77.0
5	-	-	+	-	-	-	45.6	0.4	54.0
6	+	-	+	-	-	-	3.6	0	95.9
7	-	+	+	-	-	-	37.2	0.8	0.9

表 2.2-2 64 runs の実験結果<sup>a</sup> (続き)

Run	A	B	C	D	E	F	収率 (%) <sup>b</sup>		
8	+	+	+	-	-	-	53.7	0.5	54.4
9	-	-	-	+	-	-	26.1	0.2	63.6
10	+	-	-	+	-	-	0.3	0	83.0
11	-	+	-	+	-	-	45.4	0.8	24.5
12	+	+	-	+	-	-	26.7	0.6	68.7
13	-	-	+	+	-	-	36.8	0.4	44.5
14	+	-	+	+	-	-	2.2	0	81.0
15	-	+	+	+	-	-	31.4	1.3	20.2
16	+	+	+	+	-	-	49.7	0.8	41.8
17	-	-	-	-	+	-	66.9	2.4	27.7
18	+	-	-	-	+	-	2.7	1.6	88.6
19	-	+	-	-	+	-	52.4	2.2	8.5
20	+	+	-	-	+	-	65.0	3.1	34.1
21	-	-	+	-	+	-	58.5	2.6	15.8
22	+	-	+	-	+	-	25.1	1.5	70.4
23	-	+	+	-	+	-	19.6	5.9	0.5
24	+	+	+	-	+	-	66.7	14.1	3.4
25	-	-	-	+	+	-	68.7	2.5	26.3
26	+	-	-	+	+	-	3.3	1.7	91.0
27	-	+	-	+	+	-	57.8	2.7	8.0
28	+	+	-	+	+	-	70.7	4.0	32.8
29	-	-	+	+	+	-	72.4	3.2	19.1
30	+	-	+	+	+	-	28.8	2.2	72.1
31	-	+	+	+	+	-	21.2	6.4	0.6
32	+	+	+	+	+	-	88.4	14.8	5.2
33	-	-	-	-	-	+	43.2	0.6	48.5
34	+	-	-	-	-	+	1.1	0	84.2
35	-	+	-	-	-	+	45.1	1.2	10.8
36	+	+	-	-	-	+	27.1	1.0	53.5
37	-	-	+	-	-	+	46.5	0.8	34.3
38	+	-	+	-	-	+	7.6	0	78.5
39	-	+	+	-	-	+	25.0	2.1	0.4
40	+	+	+	-	-	+	66.5	2.1	30.4
41	-	-	-	+	-	+	49.8	0.7	53.9
42	+	-	-	+	-	+	0	0	87.7
43	-	+	-	+	-	+	48.5	1.2	14.1
44	+	+	-	+	-	+	41.0	1.4	55.7
45	-	-	+	+	-	+	48.5	1.1	33.3
46	+	-	+	+	-	+	8.5	0	80.2
47	-	+	+	+	-	+	21.1	1.7	1.6
48	+	+	+	+	-	+	66.3	2.2	23.1
49	-	-	-	-	+	+	76.3	4.7	19.1
50	+	-	-	-	+	+	4.9	1.1	84.9
51	-	+	-	-	+	+	50.6	2.4	7.8

表 2.2-2 64 runs の実験結果 <sup>a</sup> (続き)

Run	A	B	C	D	E	F	収率 (%) <sup>b</sup>		
52	+	+	-	-	+	+	63.7	3.7	23.8
53	-	-	+	-	+	+	53.9	3.4	8.1
54	+	-	+	-	+	+	29.2	1.1	57.0
55	-	+	+	-	+	+	10.0	1.0	9.1
56	+	+	+	-	+	+	60.8	15.3	3.5
57	-	-	-	+	+	+	63.2	3.1	17.4
58	+	-	-	+	+	+	5.3	1.4	86.9
59	-	+	-	+	+	+	49.7	2.3	6.9
60	+	+	-	+	+	+	63.8	3.8	22.3
61	-	-	+	+	+	+	59.8	3.5	9.6
62	+	-	+	+	+	+	30.7	1.2	57.8
63	-	+	+	+	+	+	10.4	6.2	0.4
64	+	+	+	+	+	+	67.4	18.7	0.1

a 表の+は高水準 (+1)、-は低水準 (-1) を表す、b HPLC 定量による収率

### 3. 反応に影響する因子の抽出

まず、各因子の主効果及び交互作用の効果を計算した。ここでは、A、B、C、D、E、Fに対する六つの因子と、全ての交互作用を合わせて合計 63 個もの要因が存在する<sup>3)</sup>。それぞれを計算し比較することで、本反応に影響する因子を特定した。

目的物 2 の収率に影響を与える各要因の効果（絶対値）を示したパレート図を図 2.2-3 に示す。このグラフでは効果の大きな要因から順に並べた。その結果、交互作用 AB が最も効果の大きい要因と判った。次に B の主効果、交互作用 AC と続いた。その後、効果の大きさは減衰し、グラフの下の部分にあたる要因については、効果が小さく無視できると考えた。特に、交互作用については、高次になるほど、効果が小さくなる傾向にあることが確認できた。

ところで、ここでの目的は、63 個全ての要因の中から本反応に影響するものを絞り込むことである。第 1 章でも述べたように、パレート図による効果の絞り込みは主観的な判断が伴うため、より客観的である統計による判断として Half Normal Plot を評価した（図 2.2-4）。

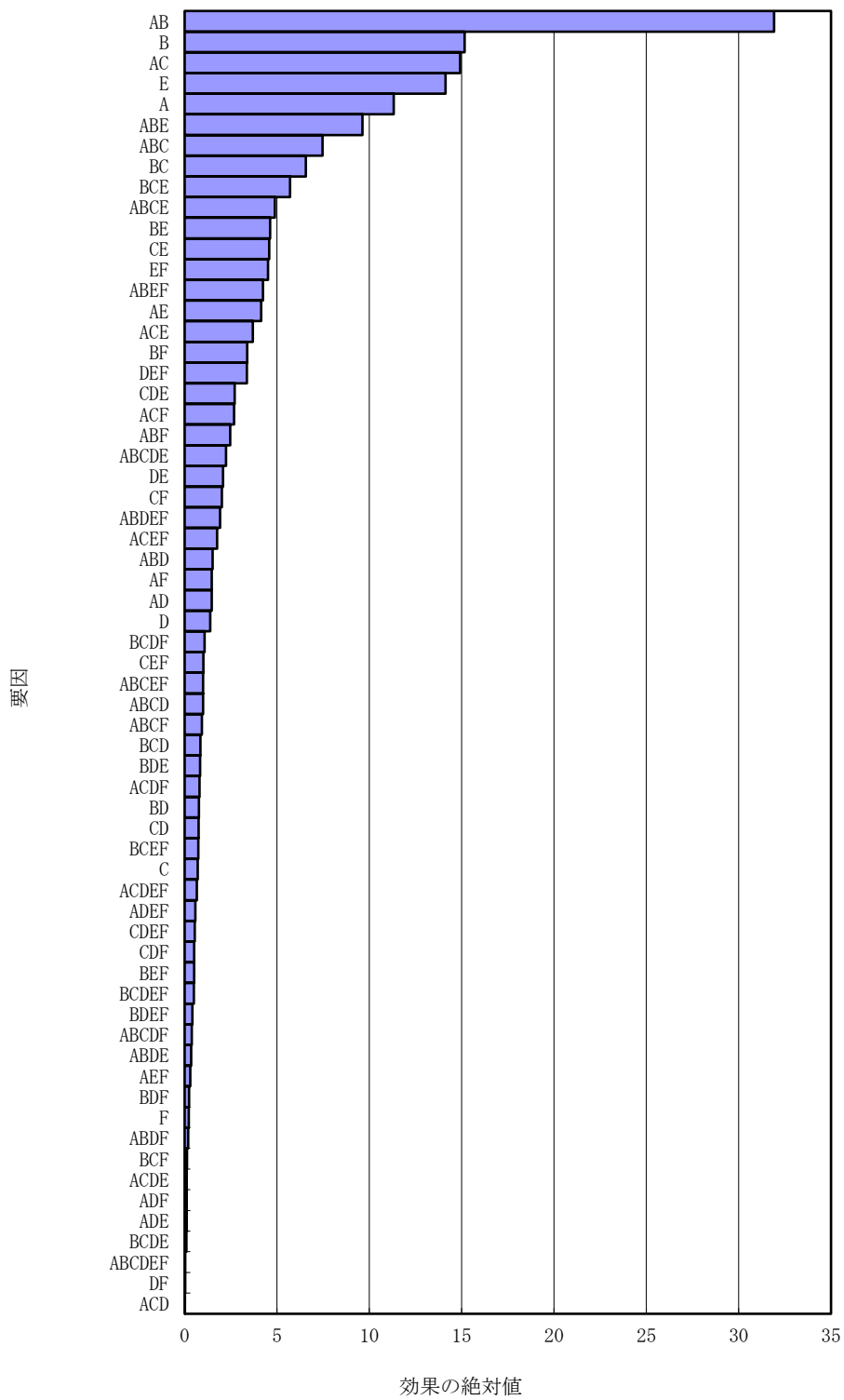


図 2.2-3 目的物 2 の収率の効果に対するパレート図



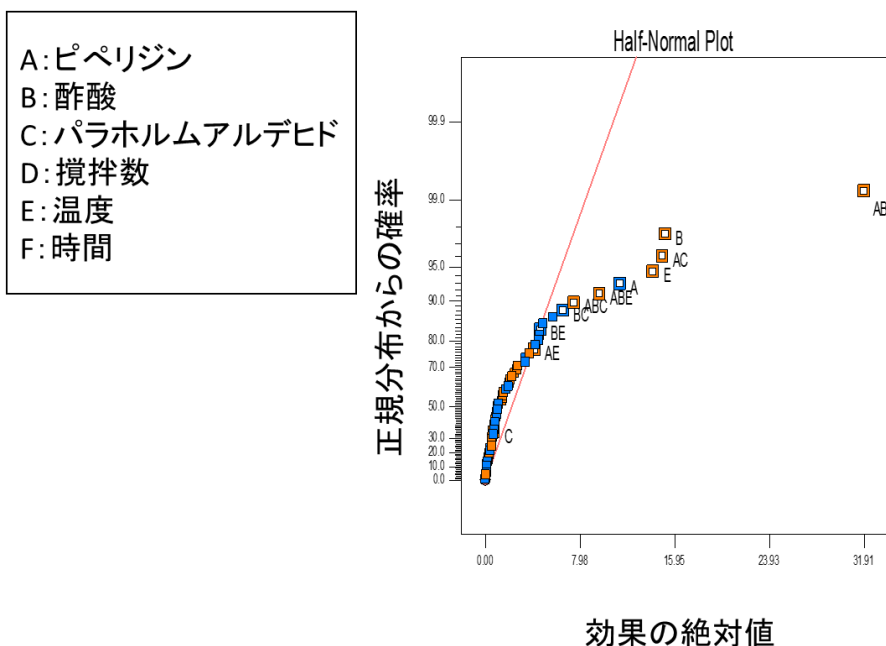


図 2.2-4 目的物 2 の収率の効果に対する Half Normal Plot

Half Normal Plot では、直線より右側に突出した点ほど大きな効果を有する要因を示す。この例では効果が大きい要因から順に、AB、B、AC、E、A、ABE、ABC、BC の 8 種類が抽出された<sup>4)</sup>。その内、交互作用が五つ存在していることから、本例は各因子が絡み合った複雑な反応であると考えた。一方、D と F についてはこの反応に全く影響していないことも判った。以上から、影響する因子の数は 6 から 4 に削減できると判断した。

#### 4. 結果の視覚化

次に、得られた実験結果を視覚化した。これまでの結果処理で六つの因子が四つまで削減できたため、実験結果を表すためには、4 次元の空間を考えればよい。しかし、4 次元空間を視覚化することは不可能なため、一つの因子の水準を固定して 3 次元空間として視覚化することとした。3 次元グラフ Cube Graph (3 次元空間を表したグラフ) の作成は、Design Expert を用いることで作成した。

温度 (E) を高水準 (60°C) に固定した場合の、ピペリジン (A)、酢酸 (B)、パラホルムアルデヒド (C) の 3 因子を各軸とした Cube Graph を図

2.2-5 に、温度 (E) を低水準 (40°C) に固定した場合の、Cube Graph を図 2.2-6 に示す。各頂点の数字は、化合物 2 の収率の計算値を指す。

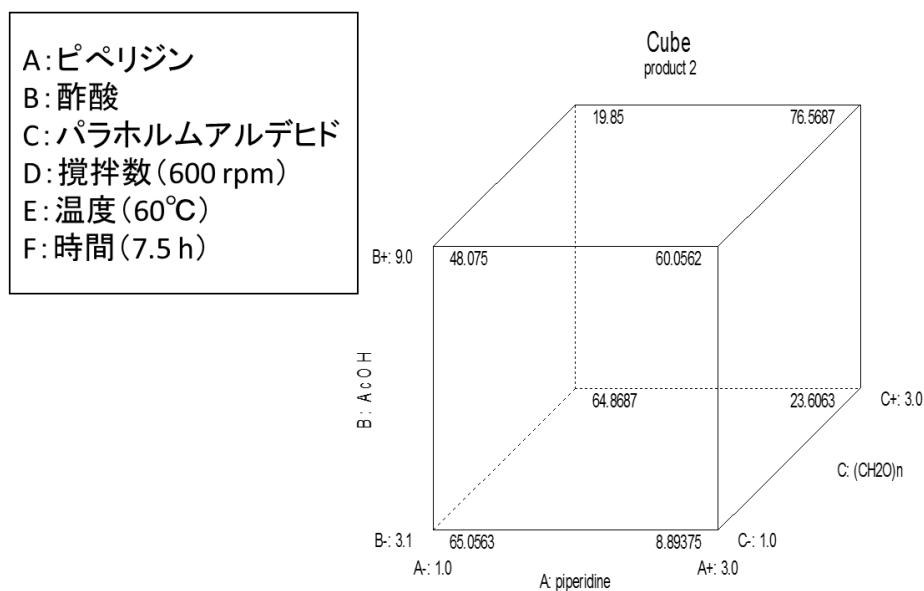


図 2.2-5 Cube Graph (温度 E が高水準の場合)

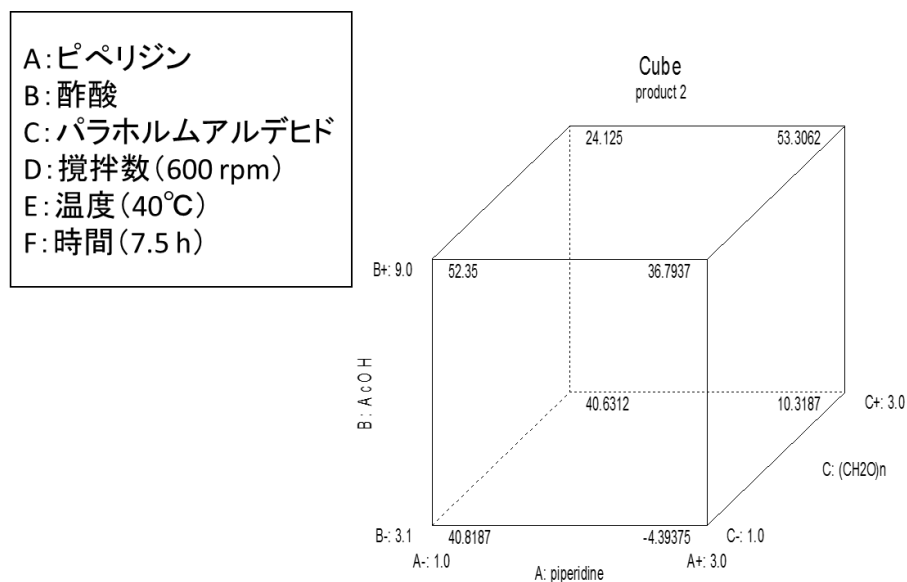


図 2.2-6 Cube Graph (温度 E が低水準の場合)

温度が高水準の場合、ピペリジン、酢酸、パラホルムアルデヒドの各当量がともに高水準のとき（以下、本条件を条件 1 と記す）、最も目的物 2 の収率が高くなった。一方、各試薬の当量がともに低水準のとき（以下、本条件を条件 2 と記す）、二番目に高い収率を示した。

温度が低水準の場合、ピペリジンが高、酢酸が高、パラホルムアルデヒドが高、またはピペリジンが低、酢酸が高、パラホルムアルデヒドが低の場合で良好な結果となったが、それぞれの条件とも温度が高水準の場合の結果には及ばなかった。

以上より、温度は高水準である方が、高収率の傾向にあることが判った。また、温度は他の因子との交互作用の効果が小さかったこともあり、60°C に設定することとし、条件 1 及び条件 2 について、応答曲面法により最適化をさらに進めることとした。

## 2.3 応答曲面法

### 1. 実験のデザイン

3 因子を用いる中心複合計画は、図 2.3-1 に示すような実験デザインとなる。検討範囲の中心となる点を設定し、その点から等距離にある 14 点の実験を行う<sup>2)</sup>。また、標準的な中心複合計画では、実験誤差を見積もるため中心点の実験を 6 回繰り返して行うことが推奨されている<sup>5)</sup>。ここでは、中心点 6 回の繰り返し実験を含め、合計 20 runs の実験を行った。

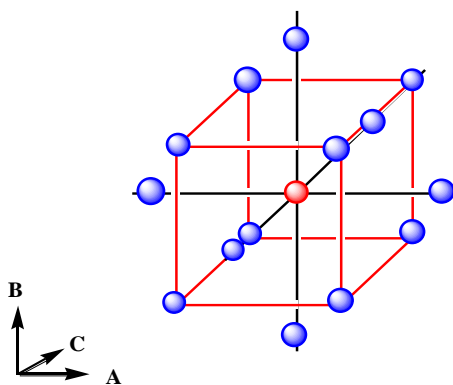


図 2.3-1 中心複合計画

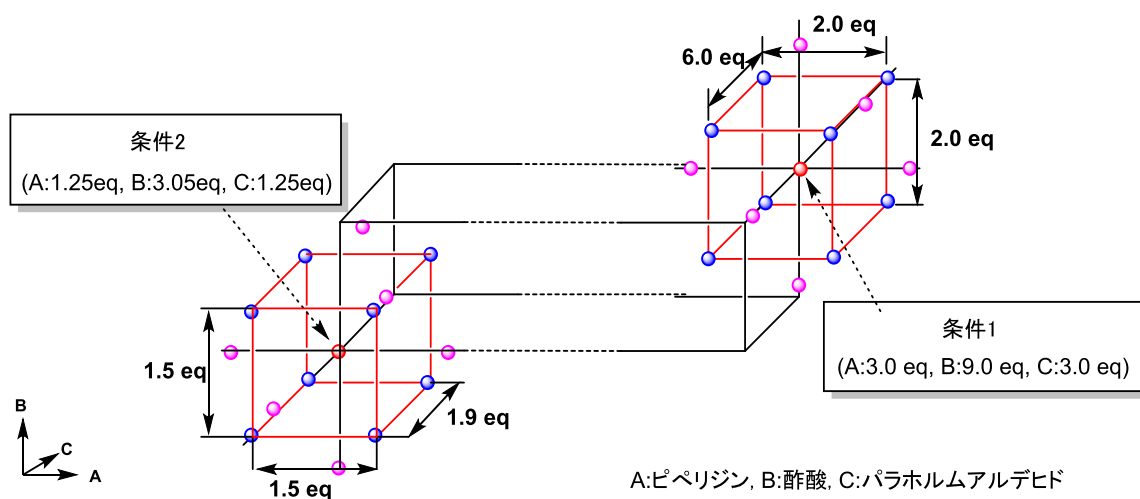


図 2.3-2 条件 1 及び条件 2 の実験デザイン

条件 1 及び条件 2 を中心点とする中心複合計画の検討範囲を図 2.3-2 に示す。条件 1 及び条件 2 とともに、目的物 2 の高収率とを狙う条件として検討を進めた。

## 2. 実験結果

条件 1 及び条件 2 に対してそれぞれ 20 runs ずつ実験を実施した。ここでも、自動合成装置 SK233 を用いることにより、一日に 10 runs ずつ実施し、全実験を 4 日で完了した。以下に実験結果を示す（表 2.3-1、表 2.3-2）。

表 2.3-1 条件 1 に対する実験結果

Run	A (eq)	B (eq)	C (eq)	収率 (%) <sup>a</sup>		
				2	3	1
1	2.0	6.0	2.0	75.7	5.8	9.2
2	4.0	6.0	2.0	9.6	2.4	86.4
3	2.0	12.0	2.0	57.4	16.6	0
4	4.0	12.0	2.0	64.7	3.8	30.6
5	2.0	6.0	4.0	77.2	8.0	6.3
6	4.0	6.0	4.0	40.5	1.6	51.5
7	2.0	12.0	4.0	32.8	20.5	0.4
8	4.0	12.0	4.0	78.1	8.4	6.6
9	1.32	9.0	3.0	19.1	4.6	0
10	4.68	9.0	3.0	32.3	2.6	60.0
11	3.0	3.95	3.0	22.9	1.5	66.5
12	3.0	14.05	3.0	54.7	26.0	0.5
13	3.0	9.0	1.32	72.7	3.9	21.8
14	3.0	9.0	4.68	75.3	11.7	9.2
15	3.0	9.0	3.0	77.4	11.6	3.5
16	3.0	9.0	3.0	80.9	9.0	5.7
17	3.0	9.0	3.0	77.2	10.7	3.1
18	3.0	9.0	3.0	80.3	10.7	3.5
19	3.0	9.0	3.0	77.6	10.2	3.1
20	3.0	9.0	3.0	81.1	10.9	3.4

a HPLC 定量による収率

表 2.3-2 条件 2 に対する実験の結果

Run	A (eq)	B (eq)	C (eq)	収率 (%) <sup>a</sup>		
				2	3	1
1	0.5	2.1	0.5	35.8	0.6	53.4
2	2.0	2.1	0.5	12.6	0.9	91.7
3	0.5	4.0	0.5	48.5	0.5	46.4
4	2.0	4.0	0.5	18.0	0.1	75.4
5	0.5	2.1	2.0	32.8	0.8	12.9
6	2.0	2.1	2.0	24.0	1.3	71.7
7	0.5	4.0	2.0	19.3	2.6	0.8
8	2.0	4.0	2.0	56.2	2.4	31.4
9	0.2	3.05	1.25	11.5	0.4	5.4
10	2.3	3.05	1.25	24.4	0.3	75.6
11	1.25	1.72	1.25	24.5	0.6	63.2
12	1.25	4.38	1.25	72.7	4.1	13.7
13	1.25	3.05	0.2	13.1	0.2	77.5
14	1.25	3.05	2.3	80.7	3.6	25.8
15	1.25	3.05	1.25	60.7	2.4	29.0
16	1.25	3.05	1.25	59.7	2.2	29.2
17	1.25	3.05	1.25	63.0	2.9	30.8
18	1.25	3.05	1.25	64.9	2.4	33.5
19	1.25	3.05	1.25	57.6	2.1	31.9
20	1.25	3.05	1.25	65.2	2.6	28.6

a HPLC 定量による収率

条件 1 の結果では、全体的に目的物 2 の収率が高く、基質 1 の残存を低く抑えられる条件が多いことが判った。

条件 2 の結果では、条件 1 と比較すると全体的に基質 1 の残存率は高くなるが、副生物 3 の生成を抑制できそうであることが判った。両条件とも一長一短あるが、次により詳細な考察ができるよう応答曲面で結果を視覚化した。

### 3. 結果の視覚化

Design Expert を用いて、条件 1 に対して目的物 2 の収率の応答曲面を描いた (図 2.3-3)。得られた応答曲面の式は以下のように計算され、寄与率 ( $R^2$ ) は 86% を示した。本応答曲面は、目的物 2 の収率を表すには良好なモデルであると考えた。

$$\text{目的物 2 の収率} = 7.2 + 14.6A + 12.2B - 9.4C - 16.7A^2 - 1.3B^2 + 0.4C^2 + 6.5AB + 8.4AC - 1.8BC$$

A:ピペリジン  
 B:酢酸  
 C:パラホルムアルデヒド  
 (4.0 eq)

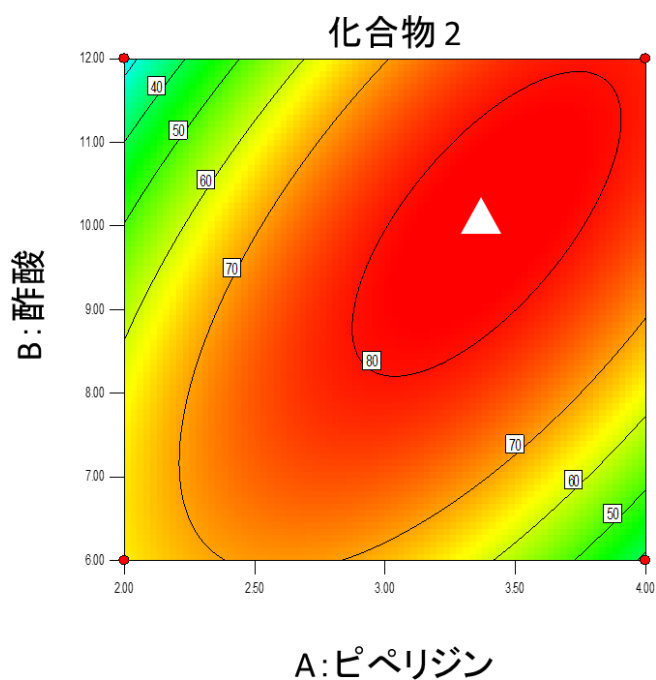


図 2.3-3 条件 1 における目的物 2 の収率の応答曲面 ( $R^2=86\%$ )

条件 1 では、Design Expert の計算結果により、ピペリジン 3.4 eq、酢酸 10.0 eq、パラホルムアルデヒド 4.0 eq のとき、目的物 2 の収率の最大値 82.4%と予想された (図 2.3-3 中の△点)。基質 1 の残存を抑制すべく、目的物 2 の収率 > 75%、基質 1 < 5%<sup>6)</sup>となる範囲を計算したところ、図 2.3-4 のようになり、比較的広い領域が得られ頑健な条件であることが判った。

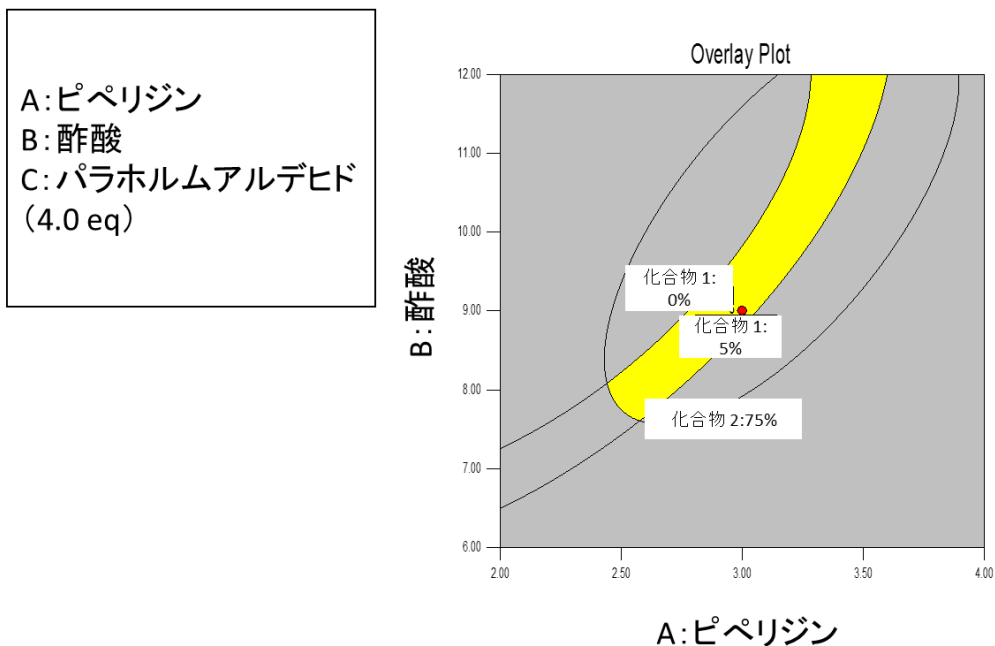


図 2.3-4 目的物 2 の収率 > 75%、基質 1 < 5% となる範囲

条件 2 で得られた応答曲面を図 2.3-5 に示す。得られた応答曲面の式は以下のように計算され、寄与率は 60% と中程度の値であった。

$$\text{目的物 2 の収率} = -51.6 + 47.2A + 34.0B + 15.9C - 36.6A^2 - 5.4B^2 - 10.4C^2 + 6.7AB + 18.1BC$$

この応答曲面では、ピペリジン 1.5 eq、酢酸 4.0 eq、パラホルムアルデヒド 2.0 eq のとき（図 2.3-5 中の△点）、目的物 2 の収率は最大値 70.8% が予想された。条件 1 と比べて目的物 2 の収率は 10% 以上も低かったが、各試薬の使用量は半分以下に抑えられた。

条件 2 は、試薬の使用量が少ないため当条件は反応条件が穏やかとなり、副生物 3 の生成は少なかった。そこで、副生物 3 の収率を抑制した条件を目指し、目的物 2 の収率 > 65%、副生物 3 の収率 < 5% <sup>7)</sup> となる範囲を図示したところ、図 2.3-5 に示すような広い領域が得られた。しかしながら、条件 2 の場合、最適点が検討領域の境界にあたるため、検討範囲外に最適点が存在すると考えた。そこで、この点を中心点とする検討を行った（以下、条件 2-2 と記す）。



A:ピペリジン  
 B:酢酸  
 C:パラホルムアルデヒド  
 (2.0 eq)

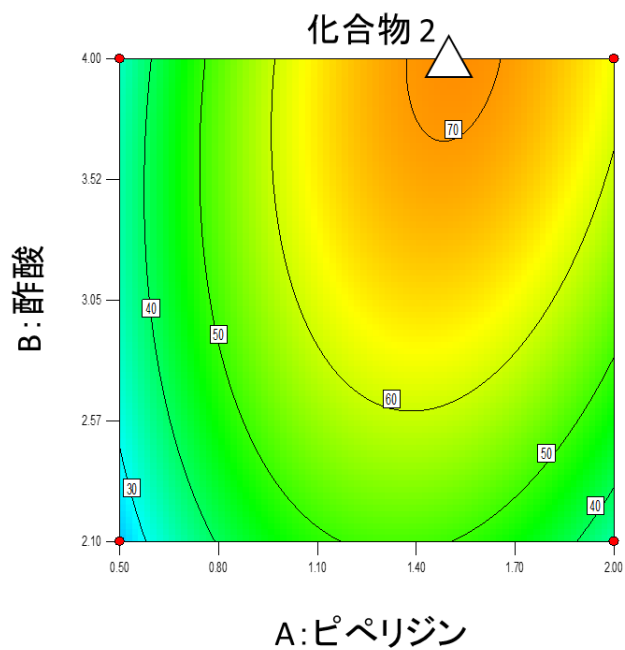


図 2.3-5 条件 2 における目的物 2 の収率の応答曲面 ( $R^2=60\%$ )

A:ピペリジン  
 B:酢酸  
 C:パラホルムアルデヒド  
 (2.0 eq)

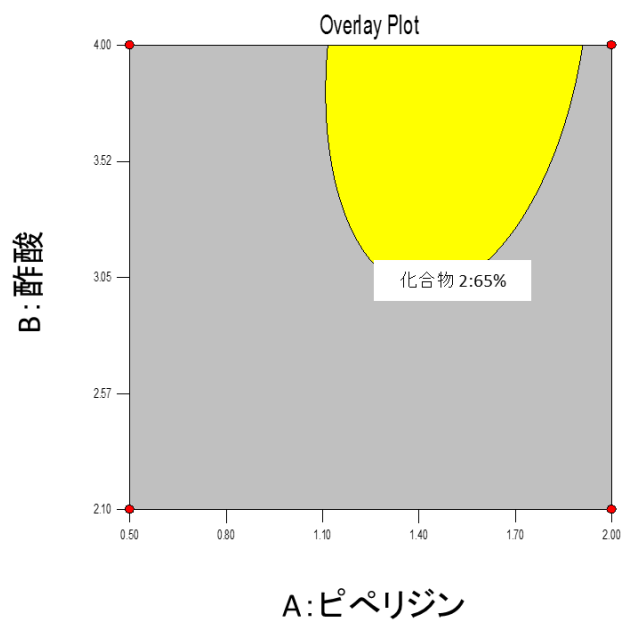


図 2.3-6 目的物 2 の収率 > 65%、副生物 3 < 5%となる範囲

### 2.3.1 条件 2-2 の応答曲面

ここでの検討では、実験の効率化を考慮し、パラホルムアルデヒドの当量を 2.0 eq に固定して、ピペリジンと酢酸の 2 因子で検討した。ここでは、2 因子の場合の標準的な中心複合計画となる中心から等距離の 8 点と中心点の繰返し 5 回を合わせた合計 13 runs を自動合成装置 SK233 を用いて 2 日で行った。検討範囲は図 2.3-7 に示した。Desing Expert で計算し、得られた結果及び応答曲面を表 2.3-3、図 2.3-8 及び図 2.3-9 に示す。

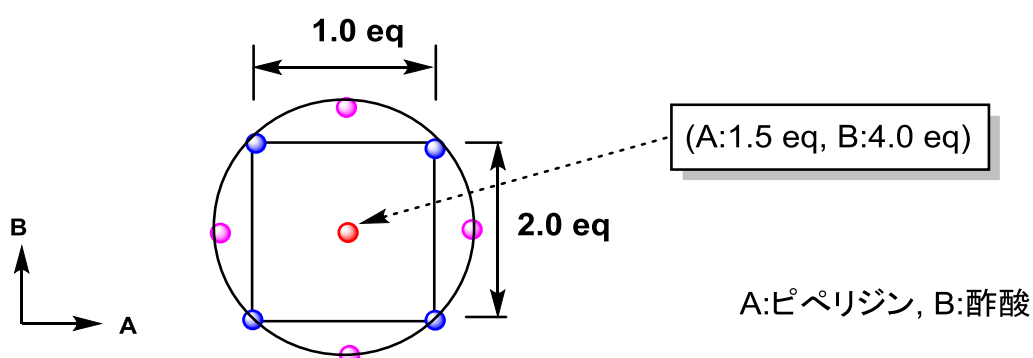


図 2.3-7 条件-2-2 の実験デザイン

表 2.3-3 条件 2-2 を中心とした実験の結果

Run	A (eq)	B (eq)	収率 (%) <sup>a</sup>		
			2	3	1
1	1.0	3.0	61.1	2.5	19.6
2	2.0	3.0	34.6	0.8	54.5
3	1.0	5.0	50.6	3.5	3.5
4	2.0	5.0	72.0	5.7	17.0
5	0.79	4.0	40.2	2.4	2.6
6	2.21	4.0	58.5	2.5	30.6
7	1.5	2.59	44.9	1.3	46.2
8	1.5	5.41	69.4	3.4	23.4
9	1.5	4.0	70.0	3.4	19.3
10	1.5	4.0	70.8	3.7	18.1
11	1.5	4.0	66.3	3.3	18.0
12	1.5	4.0	68.0	3.5	18.4

a HPLC 定量による収率

A:ピペリジン  
B:酢酸

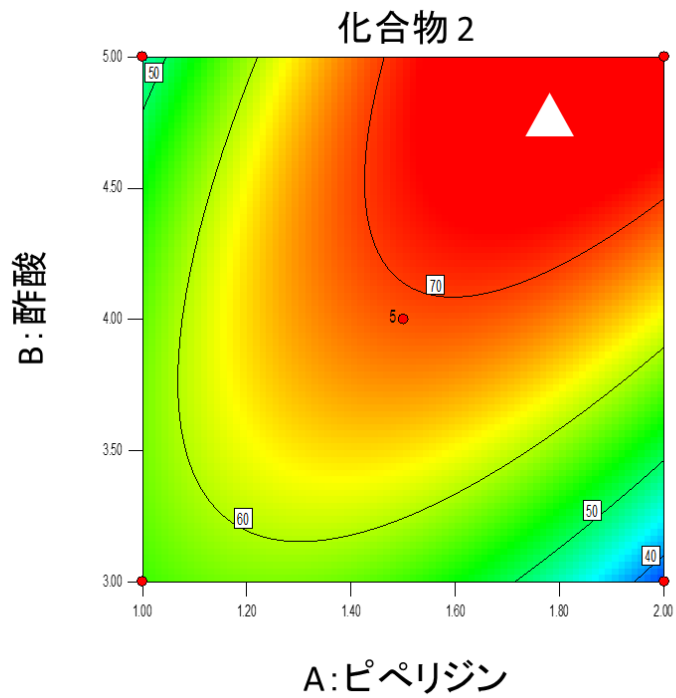


図 2.3-8 条件 2-2 における目的物 2 の収率の応答曲面 ( $R^2=92\%$ )

A:ピペリジン  
B:酢酸

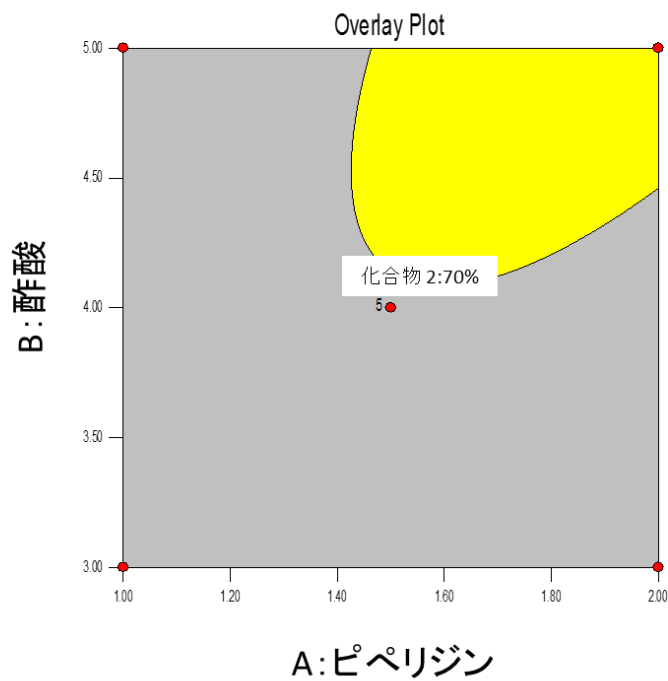


図 2.3-9 目的物 2 の収率>70%、副生物 3<5%となる範囲

表 2.3-3 から概観的に判断すると、条件 2 よりも、全体的に目的物 2 の収率が向上していることが判った。かつ副生物 3 の収率は 3~5%程度に抑えられており、条件 2 より良好な結果が得られたものと考えた。

また、得られた応答曲面の式は以下のように表せ、寄与率は 92%と良好な結果であった。

$$\text{目的物 2 の収率} = 69.04 + 2.60A + 7.69B - 9.51A^2 - 5.61B^2 + 11.98AB$$

ペペリジン 1.8 eq、酢酸 4.8 eq (図 2.3-8 中の△点) のとき、目的物 2 の収率は最大値 75.4%が予想され、条件 2 と比べて目的物 2 の収率は 5%程度向上した。試薬の使用量は条件 1 の半分程度には収まった。また、目的物 2 の収率 > 70% 及び副生物 3 の収率<sup>8)</sup> < 5% となる範囲を図示したところ(図 2.3-9)、広い領域が得られ、最適点もその範囲内に収まっていた。

## 2.4 再現性の確認

条件 1 と条件 2-2 の応答曲面より、それぞれ最適条件が得られたため、これらの最適条件に対し、実際に実験を行い再現性を確認した（図 2.4-1、表 2.4-1）。

その結果、条件 1 については、生成物 2、基質 1、副生物 3 のそれぞれに対し、計算値と実測値で非常に近い値が得られた。即ち、今回得られた応答曲面は、本反応を予測するための適当なモデルであると考えた。また、この条件 1 は、過去の OVAT 法による最適値と近く、実験計画法を用いて同等の結果を誘導できることを明らかにした。

条件 2-2 についても、生成物 2、副生物 3 のそれぞれに対しては、計算値と実測値で非常に近い値が得られた。基質 1 については、少し値は異なるものの近い値が得られていると考えた。また、条件 2-2 は、過去の OVAT による検討では辿り着かなかった条件であり、従来よりも試薬量を削減した条件においても、条件 1 に匹敵する結果を得ることができた。

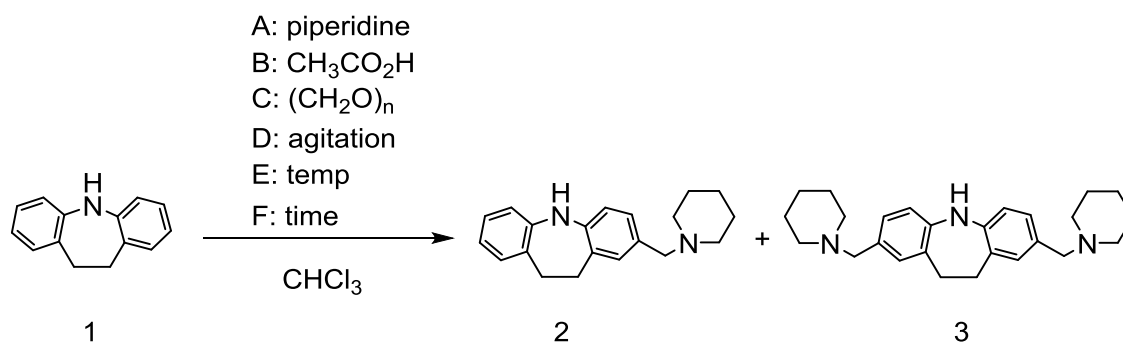


図 2.4-1 基質 1 を用いた Mannich 反応

表 2.4-1 再現性の確認

	A (eq)	B (eq)	C (eq)	D (rpm)	E (°C)	F (h)	収率 (%)		
							2	3	1
OVAT 法による最適値	3.3	8.2	2.2	—	60	6	79	10	—
条件 1	計算値	3.4	10.0	4.0	—	—	82	12	2
	実測値	3.4	10.0	4.0	600	60	5	80 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>
条件 2-2	計算値	1.8	4.8	—	—	—	75	5	18
	実測値	1.8	4.8	2.0	600	60	5	76 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>

a HPLC 定量による収率

## 2.5 実験数の削減に対する考察

以上の結果から、実験計画法を用いた場合においても、条件の最適化が可能であることを証明でき、さらに、試薬量を削減できる新たな条件も見出すことができた。しかしながら、合計の実験数を考えると、合計で 117 runs (2-Level Factorial Design : 64 runs、中心複合計画 : 20 + 20 + 13 runs) もの多くの実験を実施しており、自動合成装置を用いたとはいえ、効率的であるかどうかは疑問が残る。せめて、2-Level Factorial Design の 64 runs を、2-Level Fractional Factorial Design を用いて実験を 16 runs (=2<sup>6</sup>/4) までに削減すれば、今回の約半数の実験で同じ結論に達することができたかもしれない。

ここでは、既に得られた 2-Level Factorial Design の 64 runs に対し、2-Level Fractional Factorial Design を適用した場合について考察する。2-Level Factorial Design の 64 runs の結果のうち、16 runs (=2<sup>6</sup>/4) の結果を抜き出して、2-Level Fractional Factorial Design で同等の結果が得られるか検証した。また、ここでは、生成物 2 の結果のみを考察する。なお、16 runs の抽出は、ランダムではなく L<sub>16</sub> 直交表を考慮して抜き出した。実験計画と結果を表 2.5-1 に示す。このときの Half Normal Plot を図 2.5-1 に示す。

表 2.5-1 64 runs の結果から 16 runs の結果を抜き取った表

Run	A	B	C	D	E	F	化合物 2 の 収率 (%) <sup>a</sup>	図 2.2-4 の Run
1	-	-	-	-	-	-	29.3	1
2	+	-	-	-	+	-	2.7	18
3	-	+	-	-	+	+	50.6	51
4	+	+	-	-	-	+	27.1	36
5	-	-	+	-	+	+	53.9	53
6	+	-	+	-	-	+	7.6	38
7	-	+	+	-	-	-	37.2	7
8	+	+	+	-	+	-	66.7	24
9	-	-	-	+	-	+	49.8	41
10	+	-	-	+	+	+	5.3	58
11	-	+	-	+	+	-	57.8	27
12	+	+	-	+	-	-	26.7	12
13	-	-	+	+	+	-	72.4	29
14	+	-	+	+	-	-	2.2	14
15	-	+	+	+	-	+	21.1	47
16	+	+	+	+	+	+	67.4	64

a HPLC 定量による収率

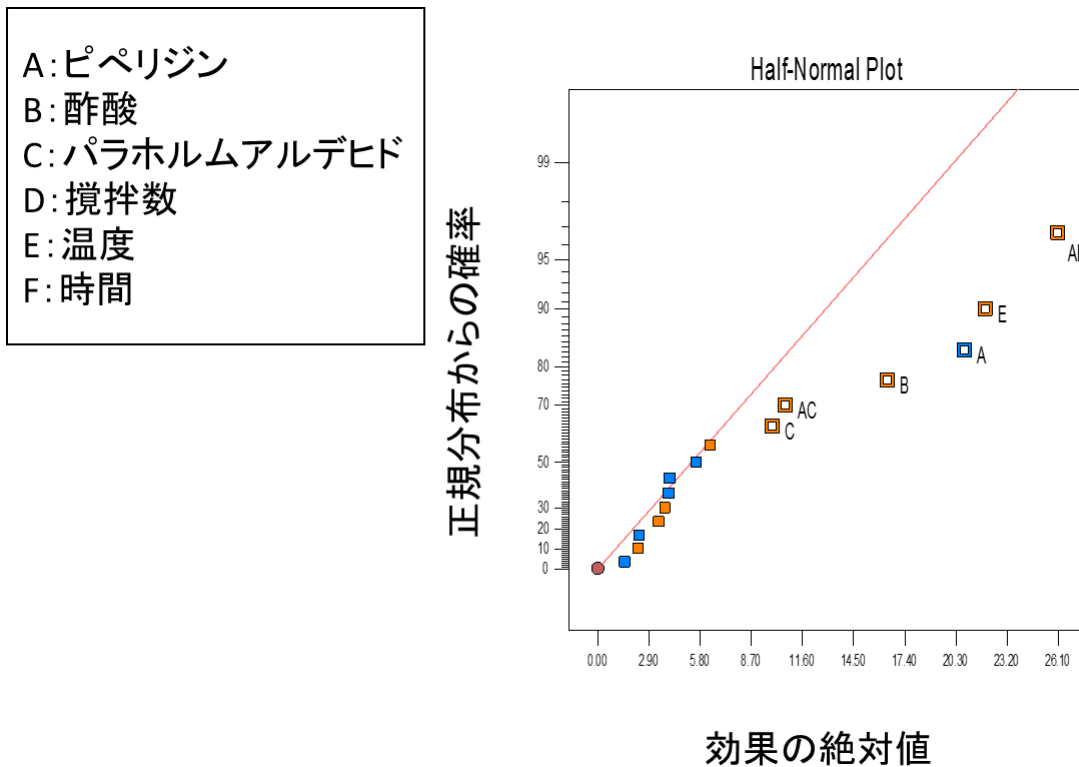


図 2.5-1 64 runs の結果から 16 runs の結果を抜き取った場合の Half Normal Plot

図 2.2-4 と図 2.5-1 の Half Normal Plot を見比べると、効果の大きさの順序は若干異なるものの、A、B、C、E といった必要な因子は全て取り上げられていることが判明した。また、交互作用においても、AB と AC については 16 runs まで削減しても抽出できることが判った。64 runs から 16 runs に削減しても必要な情報は漏らすことなく抽出できると考えた。

次に、結果を Cube Graph で視覚化した（図 2.5-2、図 2.5-3）。64 runs の結果から得られた図 2.2-5 と 16 runs の結果から得られた図 2.5-2 を比べた場合、それぞれの頂点の数値は異なるものの、同じ傾向を示していることが確認できた。同じく図 2.2-6 と図 2.5-3 を比較した場合も、両方で傾向は近いと考えた。また、図 2.5-2 と図 2.5-3 を比べた場合に、前者（温度が高い場合）の方が全体的に収率が高くなる結果も 64 runs の結果を再現していた。

以上から、64 runs から 16 runs まで実験を削減した場合でも、64 runs 実施した場合と同様のアプローチ（条件 1 と条件 2 を応答曲面法で最適化すること）に繋ぐことができると考えた。

A: ピペリジン  
 B: 酢酸  
 C: パラホルムアルデヒド  
 D: 攪拌数 (600 rpm)  
 E: 温度 (40°C)  
 F: 時間 (7.5 h)

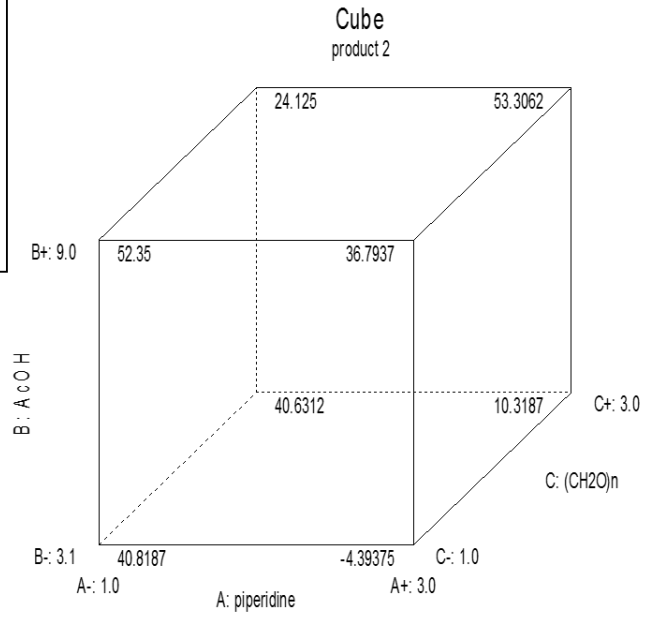


図 2.5-2 Cube Graph (温度 E が高い場合)

A: ピペリジン  
 B: 酢酸  
 C: パラホルムアルデヒド  
 D: 攪拌数 (600 rpm)  
 E: 温度 (40°C)  
 F: 時間 (7.5 h)

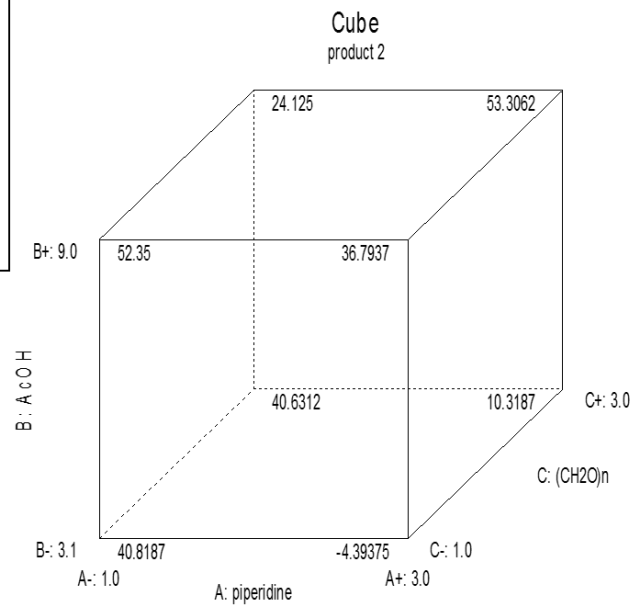


図 2.5-3 Cube Graph (温度 E が低い場合)



## 2.6 小括

実験計画法の導入研究に際し、過去に OVAT 法での最適化の経験がある基質 1 とピペリジンとの Mannich 反応を適用した（図 2.6-1、表 2.6-1）。

合計 64 runs の 2-Level Factorial Design の実験により、二つの条件（条件 1 及び条件 2）を見出した。さらに、目的物 2 の収率の最適値を見出すために、応答曲面法にて、条件 1 及び条件 2 に対しそれぞれ 20 runs の実験を実施した。条件 2 については、さらなる検討が必要であったため追加で 13 runs の応答曲面法を実施した。合計 117 runs の実験の結果、過去の最適値を再現する結果を得た。また、試薬の使用量を削減できる新たな条件も見出すことができた。以上の実験は、自動合成装置 SK233 を用いて約 1 ヶ月で実施した。

64 runs の 2-Level Factorial Design の実験結果から、16 runs ( $=2^6/4$ ) の結果を抜き出し 2-Level Fractional Factorial Design で解析したところ、64 runs の結果と遜色ない情報が得られることが分かった。

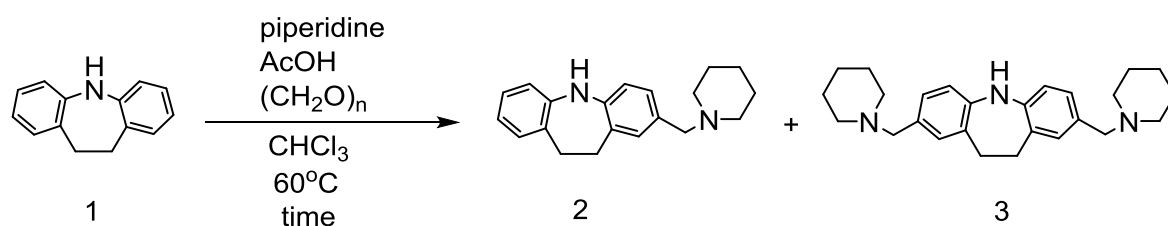


図 2.6-1 実験計画法の導入研究に用いた Mannich 反応

表 2.6-1 実験計画法の導入研究のまとめ

	過去の実績	今回の結果	
		条件 1 実験計画法	条件 2 実験計画法
最適化手法	OVAT 法		
ピペリジン	3.3 eq	3.4 eq	1.8 eq
酢酸	8.2 eq	10.0 eq	4.8 eq
パラホルムアルデヒド	2.2 eq	4.0 eq	2.0 eq
反応温度	$60^\circ C$	$60^\circ C$	$60^\circ C$
反応時間	6 h	5 h	5 h
目的物 2 収率	79%	80%	76%
副生物 3 収率	10%	12%	5%
基質 1 残存率	—	3%	10%
備考	—	過去の結果を再現した条件	新たに見出した条件

## 2.7 実験

本章で行った実験は全て Anachem 社製自動合成装置 SK233 を用いて実施した（図 2.7-1）。

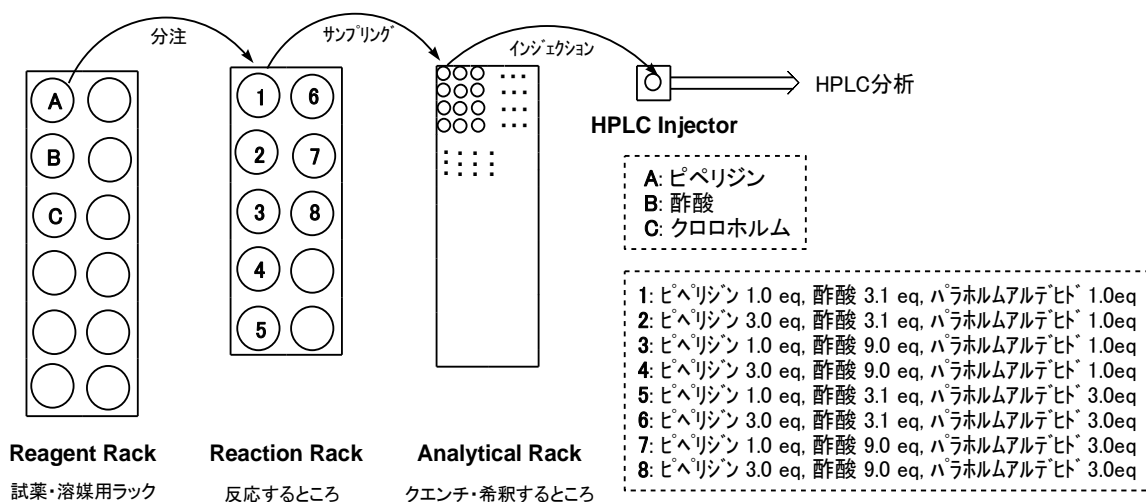


図 2.7-1 自動合成装置を用いた実験の模式図

実験操作は以下①～⑥の順に行った（Run 1～8の実験について）。そのうち、③～⑥の作業に関しては、予め作成したプログラムに基づき自動で実施した。

- ① 固体試薬である化合物 1 を 100 mg、内部標準（ビフェニル）を 100 mg とパラホルムアルデヒドを反応管に量りとり、Reaction Rack にセットした。
- ② 液体試薬であるピペリジン、酢酸、クロロホルム（溶媒）5 mL を Reagent Rack 専用の容器に適量仕込んだ。
- ③ 分注 needles により Reagent Rack の試薬溶液を Reaction Rack の反応管に分注した。
- ④ 攪拌を開始し 40°C まで加温した。
- ⑤ 5 時間後、分注 needles を用いてサンプリング、メタノール希釈を行った。
- ⑥ 上記の溶液を HPLC にインジェクトした。

< HPLC 条件 >

カラム：YMC-Pack AM-312 内径 6.0×150 mm

検出波長：254 nm

カラム温度：35°C

流速：1.5 mL/min

移動層：メタノール/Buffer 溶液<sup>a</sup> = 2/1

保持時間：

化合物 3	3.1 min
化合物 2	5.4 min
化合物 1	15.6 min
内部標準 <sup>b</sup>	19.8 min

a リン酸二水素カリウム水溶液 2.31 g とオクタンスルホン酸ナトリウム 3.6 g を 1 L の水に混合した溶液

b ビフェニルを使用

## 2.8 参考文献及び脚注

1. a) 特許公報，特許第 2526005 号。  
b) 毛利慎一郎，有機合成化学協会誌，2001，59，108.
2. Tranter R. Design and Analysis in Chemical Research, CRC Press, 2000.
3. ここでは、2 次の交互作用 ( ${}_6C_2=$ ) 15 個 (AB、AC、AD、AE、AF、BC、BD、BE、BF、CD、CE、CF、DE、DF、EF)、3 次の交互作用 ( ${}_6C_3=$ ) 20 個 (ABC、ABD、ABE、ABF、ACD、ACE、ACF、ADE、ADF、AEF、BCD、BCE、BCF、BDE、BDF、BEF、CDE、CDF、CEF、DEF)、4 次の交互作用 ( ${}_6C_4=$ ) 15 個 (ABCD、ABCE、ABCF、ABDE、ABDF、ABEF、ACDE、ACDF、ACEF、ADEF、BCDE、BCDF、BCEF、BDEF、CDEF)、5 次の相相互作用 ( ${}_6C_5=$ ) 6 個 (ABCDE、ABCDF、ABCEF、ABDEF、ACDEF、BCDEF)、6 次の相相互作用 ( ${}_6C_6=$ ) 1 個 (ABCDEF) が存在する。実験に用いた因子数により最高次数が決定する。
4. 参考までに本実験の分散分析表を以下に示す。

要因	平方和	自由度	分散	F 値	確率	有意判定 <sup>a</sup>
A	2053.22	1	2053.22	31.34	<0.0001	有意
B	3679.94	1	3679.94	56.18	<0.0001	有意
C	7.91	1	7.91	0.12	0.7296	
E	3193.66	1	3193.66	48.76	<0.0001	有意
AB	16291.33	1	16291.33	248.71	<0.0001	有意
AC	3556.63	1	3556.63	54.30	<0.0001	有意
AE	275.15	1	275.15	4.20	0.0455	
BC	688.41	1	688.41	10.51	0.0021	有意
BE	343.64	1	343.64	5.25	0.0261	
ABC	890.28	1	890.28	13.59	<0.0005	有意
ABE	1481.29	1	1481.29	22.61	<0.0001	有意
残差	3406.21	52	65.50	—	—	—

a 有意水準 (危険率) 1%

5. 予測モデルと実際の結果の差は、残差 (英語表記: Residual) と偶然誤差 (英語表記: Purr Error) に分けられる。残差は予測値と実測値の差を表し、偶然誤差は繰り返しによって起こる測定値の差を表す。偶然誤差は中心点の繰り返しを行うことにより、見積もることができる。
6. 基質 1 の残存率の応答曲面の式を以下に示す。寄与率は 97%であった。  

$$\text{基質 1 の残存率} = 65.0 + 21.4A - 16.1B - 10.4C + 8.4A^2 + 1.1B^2 + 3.4C^2 - 3.6AB - 7.1AC + 0.6BC$$
7. 副生物 3 の収率の応答曲面の式を以下に示す。寄与率は 77%であった。

$$\text{副生物 3 の収率} = -1.4 + 4.7A - 2.2B - 0.9C - 1.9A^2 + 0.6BC$$

8. 副生物 3 の収率の応答曲面の式を以下に示す. 寄与率は 87%であった.

$$\text{副生物 3 の収率} = 3.54 + 0.080A + 1.11B + 0.98C - 0.36A^2 - 0.41B^2$$

### 3 塩酸オロパタジン新規合成ルートへの実験計画法の適用

#### 3.1 塩酸オロパタジン新規合成ルートの Feasibility study

塩酸オロパタジン（製品名：アレロック<sup>®</sup>）は、協和発酵キリン株式会社が開発したアレルギー剤である（図 3.1-1）<sup>1)</sup>。

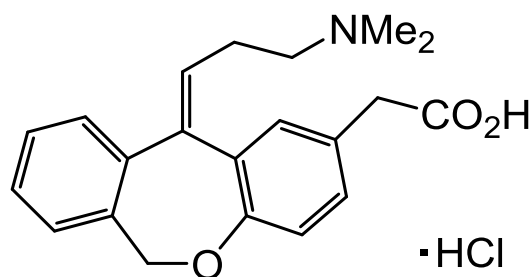


図 3.1-1 塩酸オロパタジン

塩酸オロパタジンは、化合物 4 を出発原料とし、図 3.1-2 に示す Wittig 反応を鍵反応とする合成ルートにて製造している<sup>2)</sup>。既存合成ルートは、工程数が少なくコンバージョンな合成ルートであるが、Wittig 反応の Z 異性体の選択性 (Z/E=3/2) と低いという難点を抱えていた。不要の E 異性体については、続く精製工程で除去し、高品質な Z 異性体を得ることは可能だが、最終工程が低収率であるという点で、作業面やコスト面で不利益となっていた。

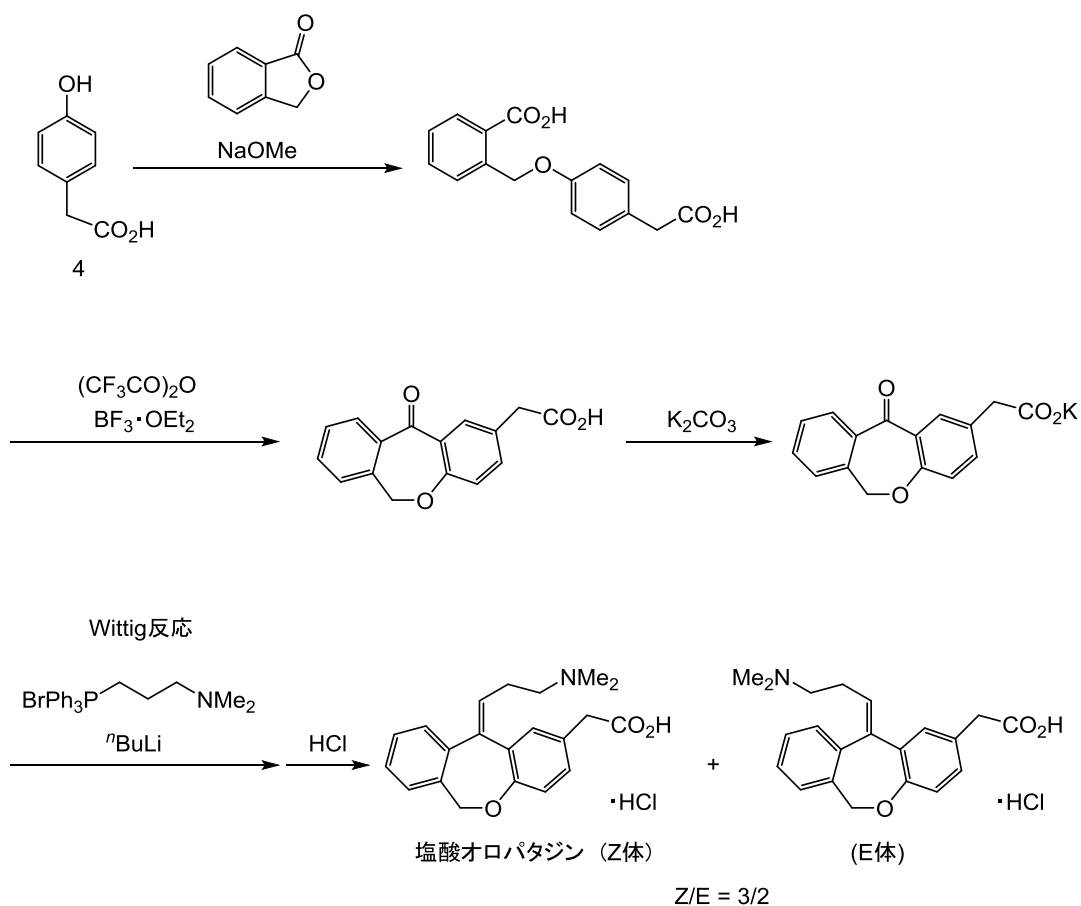


図 3.1-2 塩酸オロパタジンの既存合成ルート

塩酸オロパタジンのような三置換アルケンの Z 異性体を選択的に合成する課題に対して、Finch らが報告しているアルキン部位を有する基質とパラジウム触媒を用いた七員環形成反応（以下、環化反応と記す）<sup>3)</sup>が参考になった（図 3.1-3）。なお、Finch らは、Grigg らが報告している環化反応を参考にしている（図 3.1-4）<sup>4)</sup>。

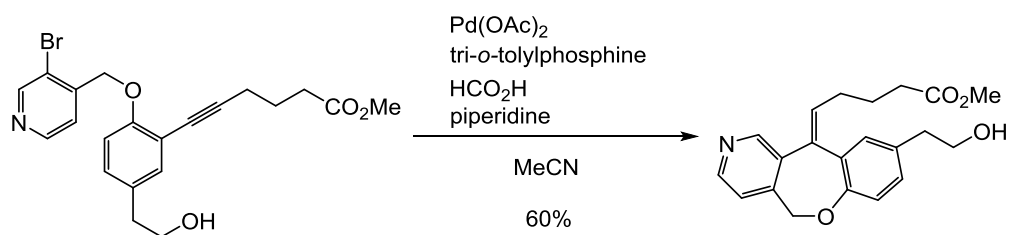


図 3.1-3 Finch らが報告したパラジウム触媒を用いた七員環形成反応

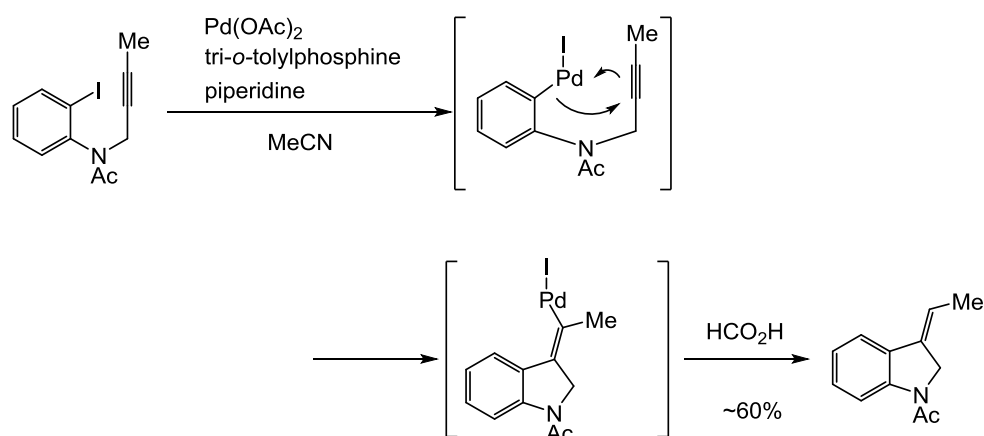


図 3.1-4 Grigg らのパラジウム触媒を用いた環化反応

本手法を塩酸オロパタジンに用いる場合、アルキン部位を有する環化前駆体を合成することも課題の一つとなる。立案した合成ルートを図 3.1-5 に示す。

既存製造法の出発原料 4 のメチルエステルである化合物 5 を出発原料とし、水酸基のオルト位をヨウ素化して化合物 6 を合成した後、水酸基を 2-ブロモベンジルブロミドと反応させ、化合物 7 を合成する。このとき化合物 7 の芳香環の臭素基は環化反応の反応部位となる。次に、化合物 7 のヨウ素に対し選択的に 3-ブチン-1-オールを菌頭カップリング反応させ、環化前駆体 8 を合成する。その後、パラジウム触媒による環化反応が Finch らの報告の通りに進行すれば、その後は、側鎖水酸基のメシル化とジメチルアミノ化、最後にメチルエステルの加水分解と塩酸塩化を経て塩酸オロパタジンへと誘導できる。当合成ルートで鍵となる反応は、以下の通りである。

- ①菌頭カップリング反応において、化合物 7 と 3-ブチン-1-オールがヨウ素の位置に選択的に反応するか
- ②Finch らが報告するパラジウム触媒を用いた反応条件で、環化前駆体 8 環化して七員環を形成するか

この合成ルートが成立すれば、全工程数として既存合成ルートとほぼ同等となり、かつ各工程が高収率で進行すれば、既存法よりも優れた合成ルートとなる。



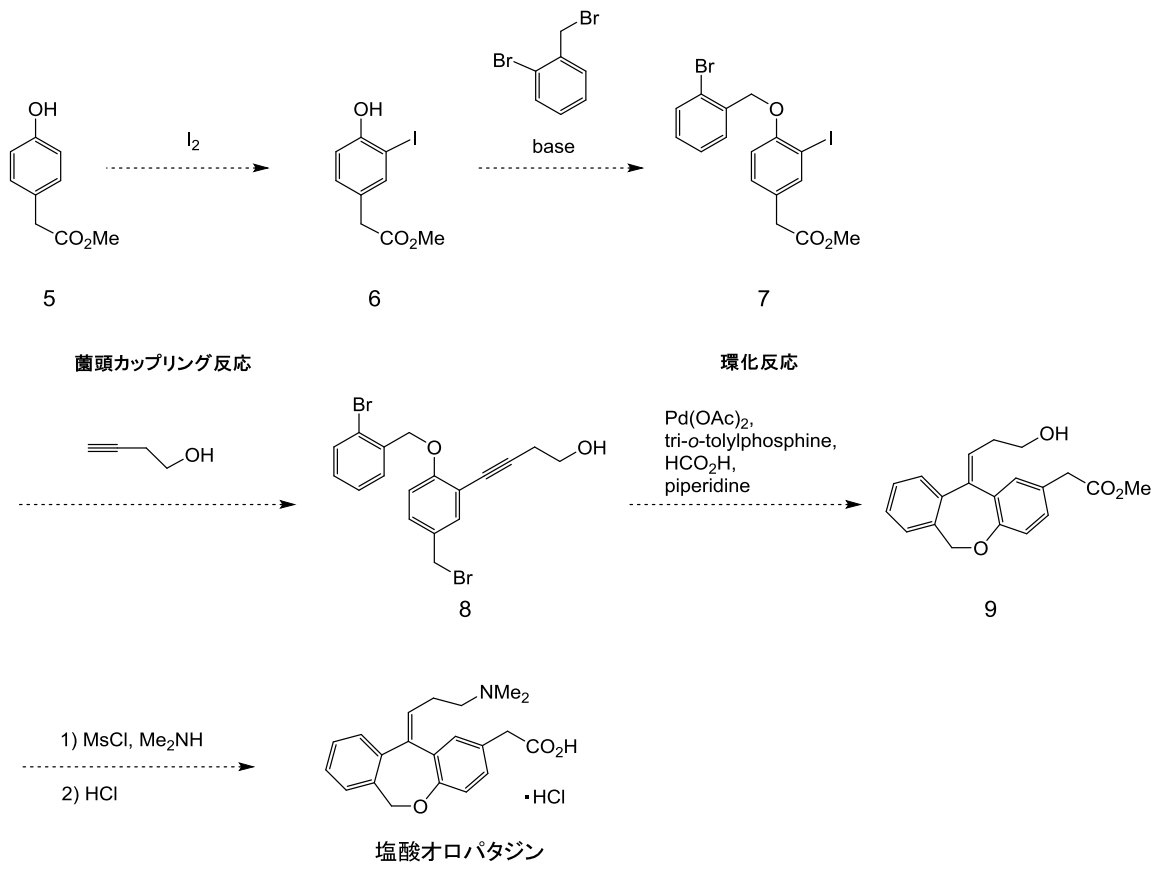


図 3.1-5 塩酸オロパタジンの新規合成ルート案

## 3.2 環化前駆体 8 の合成

### 1. ヨウ素化反応

化学文献検索ソフト Scifinder を用いて検索した結果、フェノールのオルト位に対して選択的にモノヨウ素化する反応の報告例は少なかった。まずは、ヨウ素化剤として塩化ヨウ素を用いて検討した。その結果、目的物であるヨード体 6 は生成したものの、反応系中に化合物 5 が残存するとともに、ヨード体 6 がさらにヨウ素化されたジヨード体 10 の生成も確認された。ジヨード体 10 については結晶化したため、三種の混合物を含む反応液からジヨード体 10 のみを結晶化させて濾別し、ヨード体 6 と基質 5 の油状混合物を単離した (図 3.2-1)。

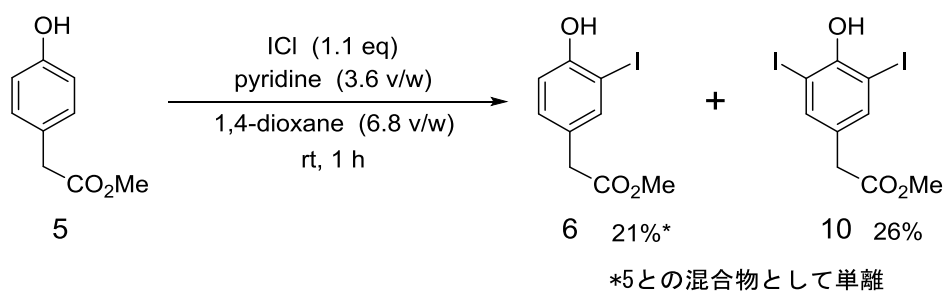
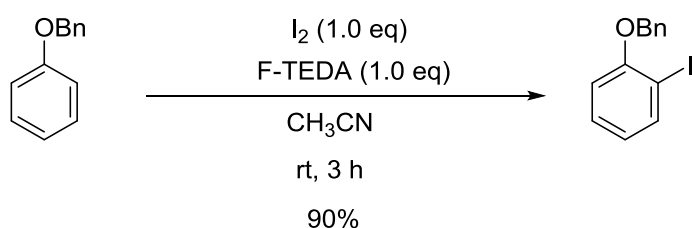


図 3.2-1 ヨウ素化

以上で述べたように、化合物 5 と塩化ヨウ素を用いたヨウ素化は、ジヨード体 10 が副生するなど反応の選択性が不良であった。これは、化合物 5 がフェノール性水酸基を有しているため反応性が高くなり、モノヨウ素化で反応が停止しなかったことが原因と推察した。一方、フェノール性水酸基をベンジルやメチルで保護し、そのオルト位を選択的にモノヨウ素化する例は、幾つか報告があった。その一部を以下に示す (図 3.2-2)。



F-TEDA: 1-chloromethyl-4-fluoro-1,4-diazoniabicyclo [2.2.2]octane bis(tetrafluoroborate)

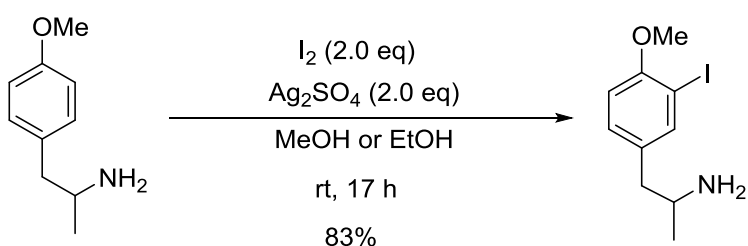


図 3.2-2 水酸基保護フェノールのモノヨウ素化例

第一の例<sup>5)</sup>は、高吸湿性の特殊な試薬のため、現実的な方法ではないと考えた。一方、第二のヨウ素と硫酸銀を用いる例<sup>6)</sup>は、これら試薬が比較的安価で大量に入手することができ、取り扱いも容易であることから興味深い方法と考えた。

以上の知見から、化合物7の合成ルートとして、化合物6を経由する方法よりも、化合物5を2-ブロモベンジル化した後にヨウ素化する方法(5→11→7)の方が効率的な合成ルートと考え、方針を変更した。まず、化合物5に対し炭酸カリウム存在下、2-ブロモベンジルブロミドを反応させることで、定量的に化合物11を油状物として単離した。得られた化合物11の油状物を用いて、ヨウ素と硫酸銀を用いたヨウ素化について条件検討を実施した(図3.2-3、表3.2-1)。

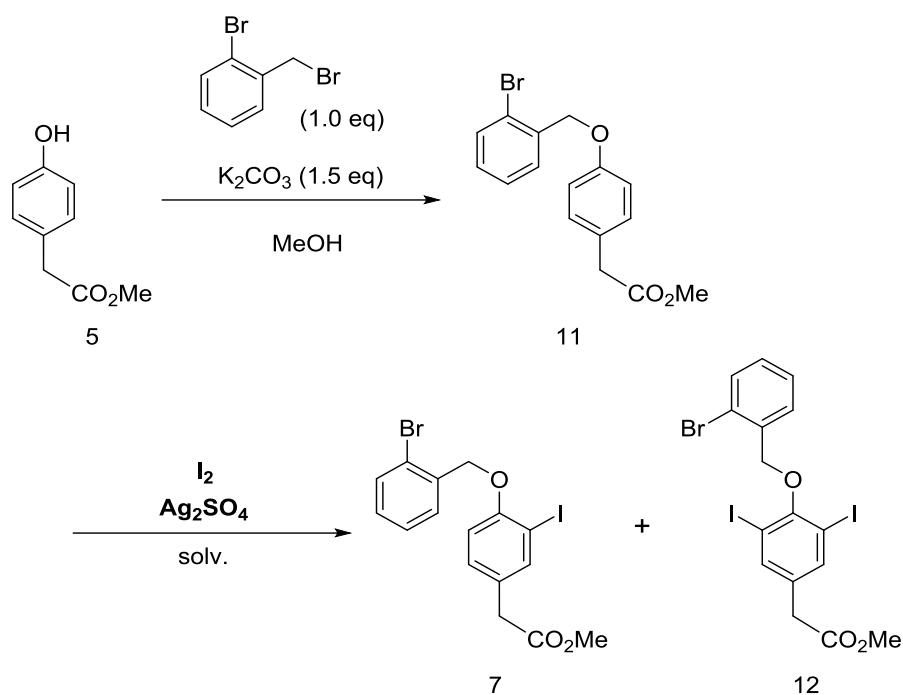


図 3.2-3 化合物 7 の合成

表 3.2-1 ヨウ素化の条件検討

Run	Scale (g)	I <sub>2</sub> (eq)	Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (eq)	溶媒 (v/w)	温度 (°C)	時間 (h)	収率 (%) <sup>a</sup>		
							7	11	12
1	0.335	2.0	2.0	EtOH (59)	rt	3	67	33	0
2	0.335	2.0	2.0	MeOH (59)	rt	3	98	0	0
3	0.335	1.0	1.0	MeOH (59)	rt	3	83	9	0
4	0.335	1.0	1.0	MeOH (15)	rt	3	93	trace	0
5	9.44	1.0	1.0	MeOH (15)	18	2	92	trace	0

a HPLC 定量による収率

まず、文献に記載されていたエタノールを溶媒に用いる条件で反応を行ったところ、ジヨード体 12 は生成せず、モノヨード体 7 が主に得られることが判った (Run 1)。Run 1 と同条件で溶媒をメタノールに変更したところ、反応性が向上した (Run 2)。ところで、本反応は理論的にはヨウ素及び硫酸銀とも当量で進行することから、これら試薬を等量まで削減したところ、基質 11 が若干残存するものの収率良くモノヨード体 7 が得られた (Run 3)。

さらに、溶媒量の削減を検討したところ、ほぼ定量的に反応が進行した (Run 4)。Run 4 と同条件でスケールアップしたが、再現性の良い結果を得た (Run 5)。

## 2. 菌頭カップリング反応

菌頭カップリング反応は、臭素化合物よりもヨウ素化合物の方が進行しやすい。多くの例において、ヨウ素化合物を用いた場合は、室温程度で反応が進行することが知られている<sup>7)</sup>。今回の検討では、パラジウムや銅触媒の使用量の最適化を検討した (図 3.2-4、表 3.2-2)。触媒量を 0.1 当量より 0.02 当量まで段階的に削減したところ、反応時間が若干延びるもののほぼ定量的に反応が進行することが判った。以上より、環化前駆体 8 を計画通りかつ高収率で得ることができた。

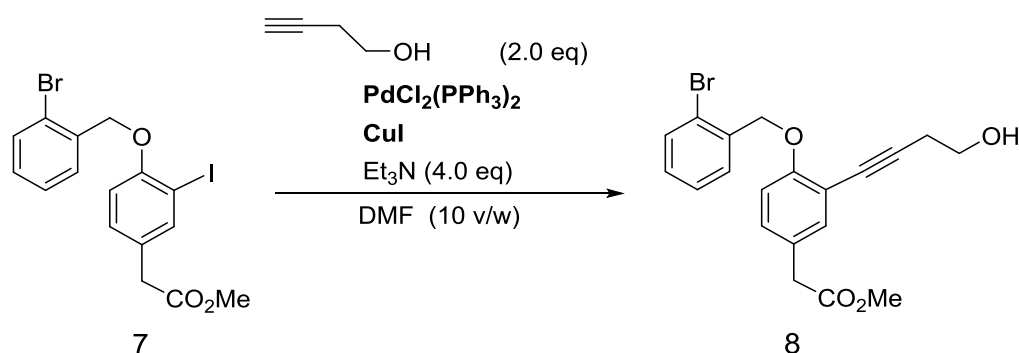


図 3.2-4 菌頭カップリング反応

表 3.2-2 菌頭カップリング反応

Run	Scale (g)	PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (eq)	CuI (eq)	温度 (°C)	時間 (h)	収率 <sup>a</sup> (%)
1	4.00	0.1	0.1	25	2.5	93
2	5.00	0.05	0.05	25	5.0	100
3	5.00	0.02	0.02	25~40	11.0	94

a シリカゲルクロマト精製

### 3.3 パラジウム触媒を用いた環化反応

#### 1. 初期検討と副生物

新規合成ルートの鍵である環化前駆体 8 を用いたパラジウム触媒による環化反応を検討した。環化反応の検討は、まず Finch らの文献<sup>2)</sup>に記載の条件をトレースすることから開始した。反応後の粗体を <sup>1</sup>H-NMR 分析したところ、目的物の環化体 9 が得られたことを確認した (図 3.3-1)。環化体 9 の E 異性体については全く検出されなかった。また、本反応では、<sup>1</sup>H-NMR により、環化前駆体 8 の臭素基が脱離した化合物 13 や、同じくアルキン部位が還元された 14、さらに 14 より脱ベンジル化した 15 が副生した。Finch らは、化合物 13 のような脱ハロゲン体の生成は示唆していたが、生成量など詳細な記述はなかった。本検証実験で、本環化反応では、Z/E 選択性の面では立体選択的に化合物 9 のみが生成することが明らかとなったが、還元体等の副生を回避し環化体の収率を向上させる必要があると考えた。

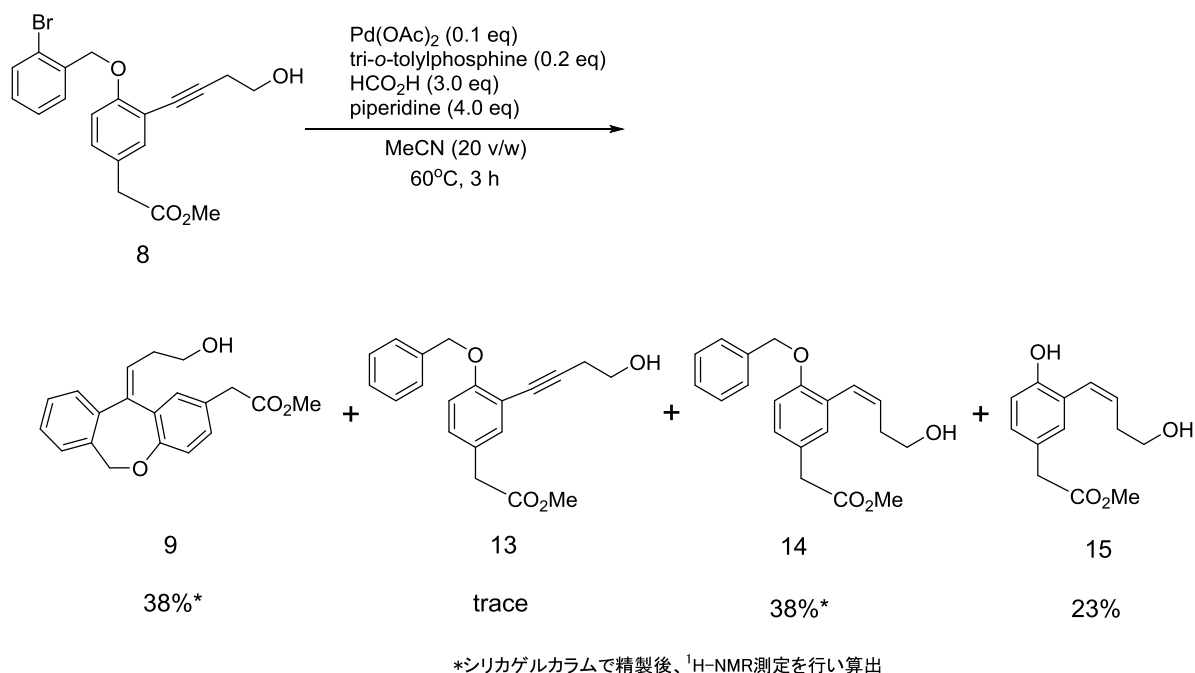


図 3.3-1 パラジウム触媒による環化反応

環化反応の際に環化体 9 とともに副生物 13~15 が経時的にどう生成するかを明らかにするため、反応液を経時的にサンプリングし HPLC 分析により観

察した。目的物ならびに各副生物を時間に対しプロットしたグラフを図 3.3-2 に示す。

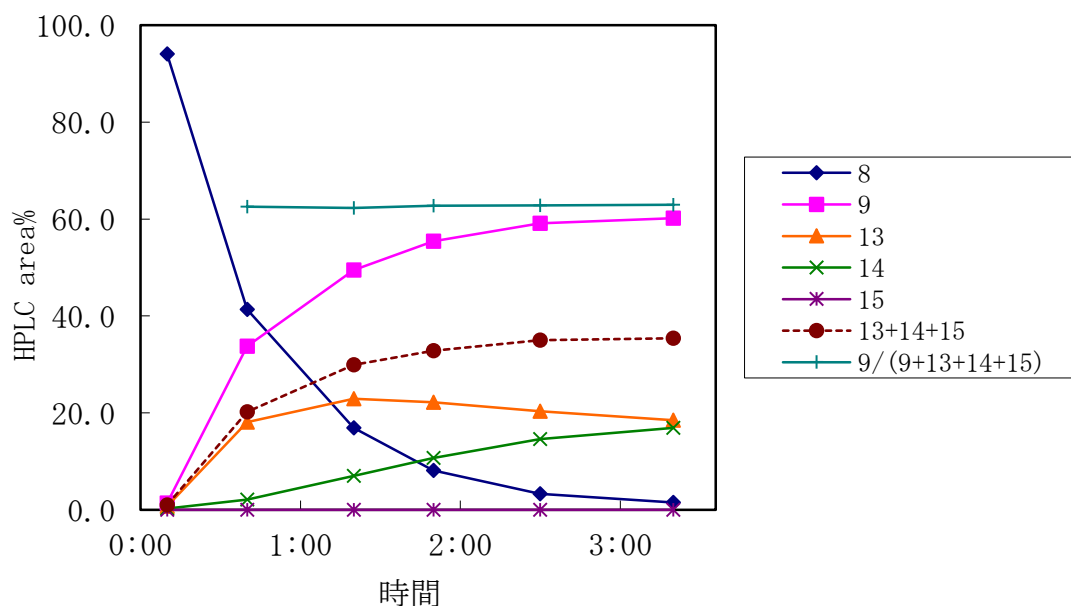


図 3.3-2 60°Cでの反応経時変化

上のグラフより、副生物 13、14 及び 15 の HPLC area% の合算値(13+14+15)が、環化体 9 とともに経時的に増加することが判った。また、副生物 13 が減少するにつれて副生物 14 が増加した。これは副生物 13 が還元されて副生物 14 になることを示していると考えた。ここでは、環化体 9 と副生物の 13~15 の合計に対する環化体 9 の占める生成比 ( $9/(9+13+14+15)$ ) にも着目したところ、反応の早い段階で生成比が決定した後、ほぼ一定の値で推移することが明らかとなった。

## 2. 配位子のスクリーニング

一般に、パラジウムを用いた反応は配位子に大きく依存するため、配位子やパラジウム錯体（計 18 種類）をスクリーニングした（図 3.3-3）。

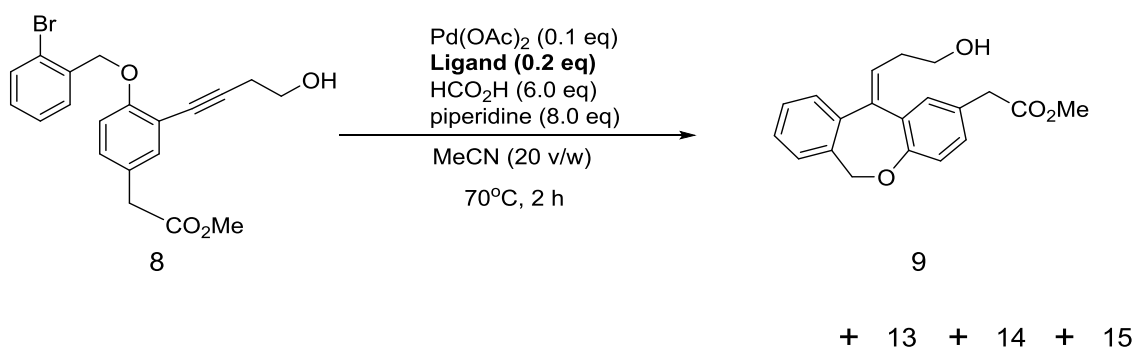


図 3.3-3 配位子のスクリーニング

表 3.3-1 配位子及び錯体のスクリーニング

Run	Ligand	HPLC area%					9 の生成比 <sup>b</sup>
		8	9 <sup>a</sup>	13	14	15	
1	$\text{PPh}_3$	15	24	49	3	<1	33
2	$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$	<1	20	64	9	1<	21
3	$\text{P}(o\text{-tolyl})_3$	1	50 (47)	20	21	3	53
4	$\text{P}(m\text{-tolyl})_3$	1	23	61	8	<1	25
5	$\text{P}(p\text{-tolyl})_3$	3	24	54	13	<1	26
6	$\text{P}(2,4\text{-dimethoxyphenyl})_3$	<1	14	34	24	<1	19
7	$\text{P}(p\text{-methoxyphenyl})_3$	17	16	38	17	<1	22
8	$\text{P}(\text{NMe}_2)_3$	19	22	40	15	<1	28
9	$\text{P}(t\text{Bu})_3$	<1	11	29	41	14	12
10	$\text{P}(\text{cyclohexyl})_3$	16	45 (45)	30	4	<1	57
11	dppe <sup>c</sup>	<1	45	22	24	<1	49
12	dppp <sup>c</sup>	<1	6	23	58	1	7
13	dppf <sup>c</sup>	<1	34	36	20	<1	38
14	BINAP <sup>c</sup>	0	9	68	17	3	10
15	配位子 A <sup>c</sup>	<1	33	7	49	<1	36
16	配位子 B <sup>c</sup>	<1	47 (48)	36	10	2	49
17	錯体 C <sup>c</sup>	2	13	46	24	10	14
18	錯体 D <sup>c</sup>	3	23	19	51	2	24

a 括弧内は HPLC 定量による収率、b 9/(9+13+14+15)、c 図 3.3-4 参照



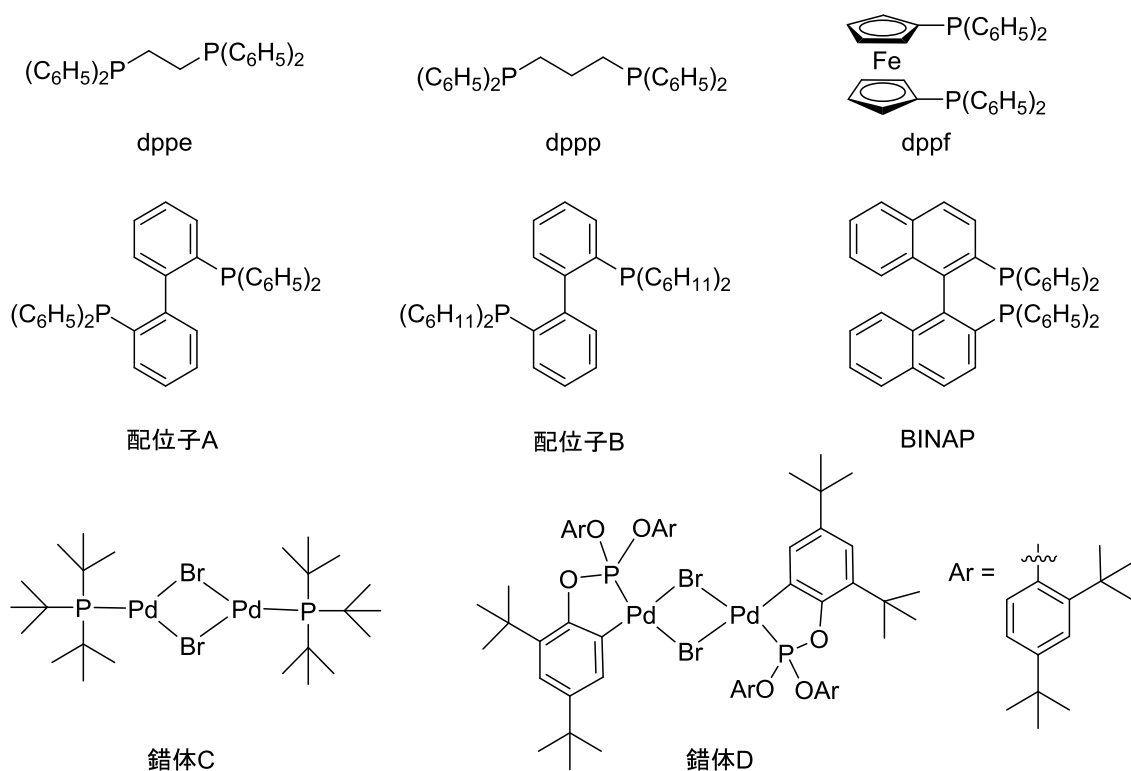


図 3.3-4 使用した配位子と錯体

検討の結果、環化体 9 の HPLC area%や生成比の結果から、 $P(o\text{-tolyl})_3$ 、 $P(\text{cyclohexyl})_3$ 、dppe、配位子 B が比較的良好な結果であった (Run 3、10、11、16)。Finch らは文献<sup>8)</sup>に基づき、立体障害の大きい配位子が本反応に適していると考えていたが、今回の実験からも確認することができた。その他の配位子については、原料の還元体である副生物群 13~15 の収率が高い結果になった。今回の検討で成績の良かった 4 つの配位子の中では、価格の安い  $P(o\text{-tolyl})_3$  が最も良いと判断した。

### 3. 溶媒のスクリーニング

次に、溶媒をスクリーニングした。スクリーニングの対象となる溶媒としては、本反応が加熱条件下でないと進行しないことから、沸点が  $70^\circ\text{C}$  以上のものを選択した (図 3.3-5、表 3.3-2)。

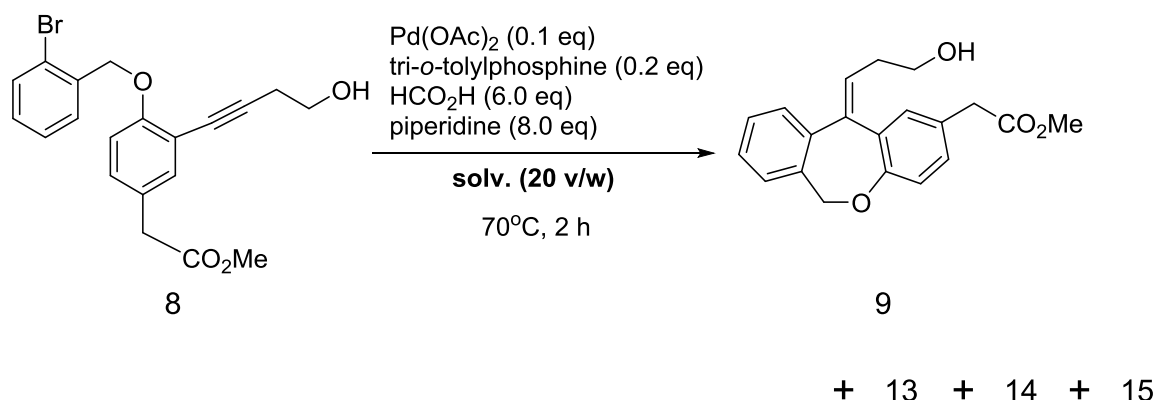


図 3.3-5 溶媒の検討

表 3.3-2 溶媒のスクリーニング

Run	Ligand	HPLC area%					9 の 生成比 <sup>b</sup>
		8	9 <sup>a</sup>	13	14	15	
1	MeCN	1	50 (47)	20	21	3	53
2	toluene	29	32 (39)	10	10	1	60
3	EtOH	29	23	13	12	1	48
4	EtOAc	26	40 (43)	15	9	1	63
5	DMF	<1	51 (59)	30	16	1	53
6	DMA	<1	53 (58)	32	12	<1	54
7	DMI	<1	51 (59)	36	9	<1	53
8	NMP	<3	34	23	30	5	37

a 括弧内は HPLC 定量による収率、b 9/(9+13+14+15)

スクリーニングの結果、アミド系溶媒 DMF、DMA、DMI において、環化体 9 の HPLC area% および生成比がともに高いことが判った (Runs 5, 6, 7)。検討当初用いていたアセトニトリルは、アミド系溶媒に匹敵する結果であったが、反応系が不均一となったため、スケールアップを想定すると適当でないと判断した。一方、トルエンや酢酸エチルでは、生成比は高かったものの原料 8 が多く残存し、未知の副生物も生成した。このように良好な三種の溶媒 (DMF、DMA、DMI) を見出すことができたが、その中から一つを選択する場合、ここでは溶媒の価格を考慮し DMF を選択した。

### 3.4 実験計画法による環化反応の最適化

#### 1. 重要な因子の抽出

前項までの検討で、配位子と溶媒を選定したので、2-Level Fractional Factorial Design により本反応の重要因子を抽出した (図 3.4-1)。酢酸パラジウムの量については、0.1 当量に固定し、検討する因子としては、配位子当量 (A)、ギ酸当量 (B)、ピペリジン当量 (C)、DMF 量 (D)、温度 (E) の五つを選定した。各因子の水準の設定については表 3.4-1 に示す。自動合成装置 SK233 を用いて合計 17 runs を行い二日で終了した。結果を表 3.4-2 に示す。

なお、今回の検討では、各因子の水準の設定において、中心点を設定した。即ち、各水準の中心の条件を実施した。ある因子において、高水準と低水準の間で得られた値にほとんど差がなかったとき、その因子の効果はないと判断される。しかしながら、図 3.4-2 の横軸に対し中心となる点で値が高かった場合、それは誤った判断となる。予め中心点の実験をしておくこと、このような極値が存在する場合において見誤る事態を避けることができる。一般に、中心点は 0 で表記され、効果の計算には使われない。

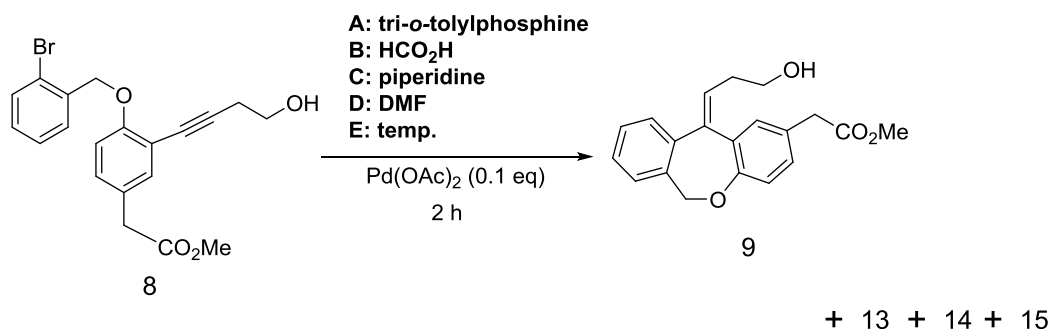


図 3.4-1 実験計画法による最適化

表 3.4-1 水準の設定

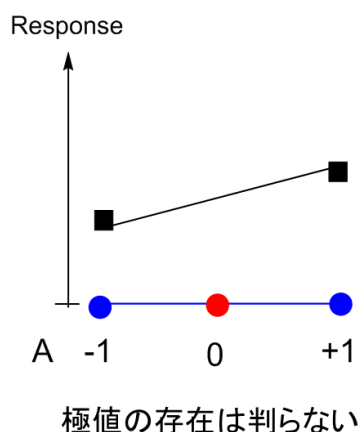
因子	低水準 (-1)	中心点 (0)	高水準 (+1)
A:配位子当量	0.1 eq	0.2 eq	0.3 eq
B:ギ酸当量	2.0 eq	3.0 eq	4.0 eq
C:ピペリジン当量	5.0 eq	6.0 eq	7.0 eq
D:DMF 量	10 v/w	20 v/w	30 v/w
E:温度	50°C	70°C	90°C

表 3.4-2 実験計画法による重要因子の抽出

Run	A	B	C	D	E	HPLC area%					9の生成比 <sup>b</sup>		
						8 <sup>a</sup>		9 <sup>a</sup>		13		14	15
1	-1	-1	-1	-1	+1	0	(0)	55	(54)	4	34	0	59
2	+1	-1	-1	-1	-1	62	(51)	16	(20)	14	1	0	53
3	-1	+1	-1	-1	-1	40	(33)	15	(18)	29	5	0	30
4	+1	+1	-1	-1	+1	0	(0)	44	(50)	25	26	0	47
5	-1	-1	+1	-1	-1	67	(57)	11	(14)	13	1	0	46
6	+1	-1	+1	-1	+1	0	(0)	66	(70)	11	16	0	71
7	-1	+1	+1	-1	+1	0	(0)	50	(50)	6	37	0	54
8	+1	+1	+1	-1	-1	57	(49)	15	(19)	16	2	0	46
9	-1	-1	-1	+1	-1	60	(48)	16	(19)	17	1	0	48
10	+1	-1	-1	+1	+1	0	(0)	63	(67)	16	15	0	67
11	-1	+1	-1	+1	+1	0	(0)	45	(44)	12	37	0	48
12	+1	+1	-1	+1	-1	42	(33)	19	(22)	26	4	0	38
13	-1	-1	+1	+1	+1	0	(0)	61	(55)	5	28	0	65
14	+1	-1	+1	+1	-1	64	(48)	18	(19)	11	0	0	60
15	-1	+1	+1	+1	-1	51	(42)	17	(21)	22	2	0	42
16	+1	+1	+1	+1	+1	0	(0)	56	(61)	19	19	0	59
17	0	0	0	0	0	2	(2)	49	(58)	34	10	0	53

a 括弧内は HPLC 定量による収率、b 9/(9+13+14+15)

中心点実験をしないと



中心点実験をすると

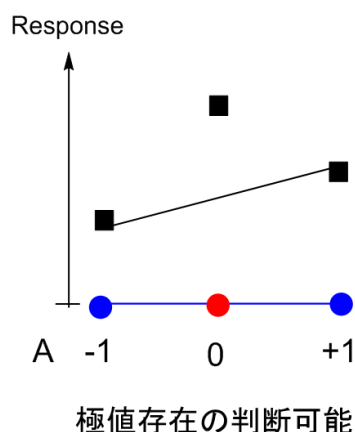


図 3.4-2 中心点の役割

Run 6にて最高収率 70%を達成し、Finchらの報告していた 60%を上回る結果を得た。このとき生成比は 71%であり、Run 6は環化体 9の選択性が良

い条件と考えた。環化体 9 の収率に対する Half Normal Plot を図 3.4-3 に示す。環化体 9 の収率に対しては、温度 (E) の効果が圧倒的に大きいことが判った。一方、生成比の Half Normal Plot (図 3.4-4) に着目すると、興味深い結果が得られた。温度以外にも、ギ酸 (B)、ピペリジン (C)、配位子 (A) の順に大きいことが判明した。

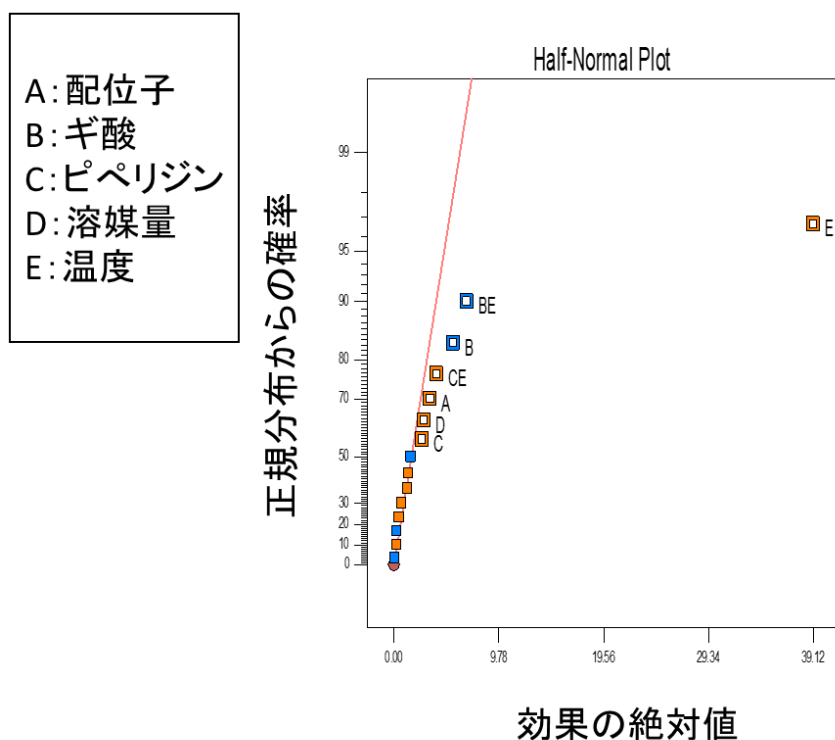


図 3.4-3 環化体 9 収率に対する Half Normal Plot

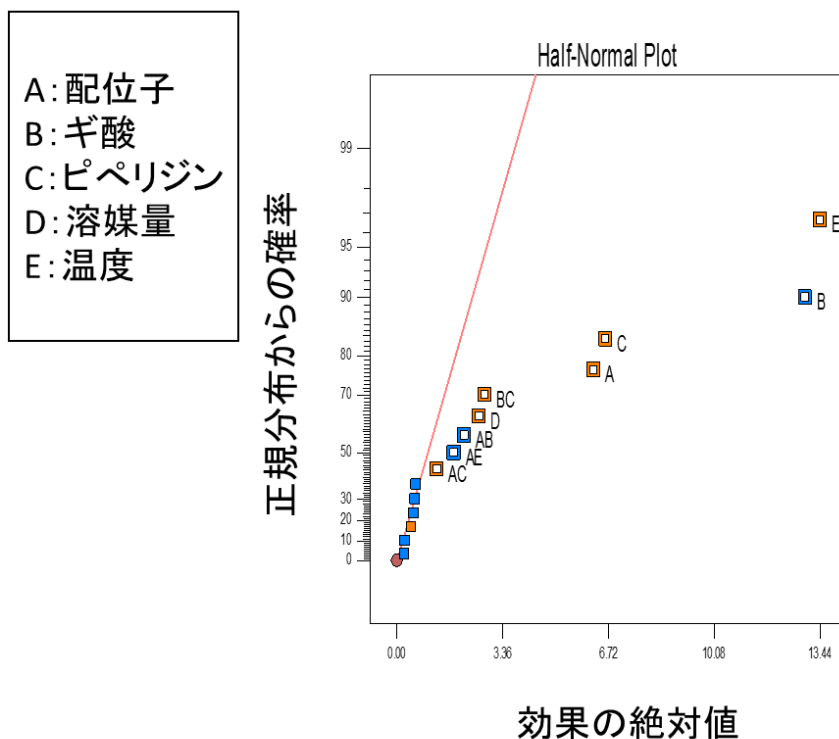


図 3.4-4 環化体 9 の生成比に対する Half Normal Plot

以上の結果について表 3.4-3 にまとめた。ここでは、環化体 9 の収率および生成比に対する各因子の効果の大きさについてまとめている。以後の検討は、本表に示した結果を参考に最適化した。

表 3.4-3 環化体 9 の収率と生成比に対する各因子の効果の大きさ

因子	収率	生成比
A : 配位子	効果は非常に小さい	効果は中程度に大きい
B : ギ酸	効果は非常に小さい	効果が二番目に大きい
C : ピペリジン	効果は非常に小さい	効果は中程度に大きい
D : DMF	効果は非常に小さい	効果は非常に小さい
E : 温度	効果は最も大きい	効果は最も大きい

最も効果の大きい因子は収率と生成比ともに温度（E）であることは一目瞭然であったが、二番目に大きな効果はともにギ酸であったものの、その大きさは両者で異なっていた。環化体 9 の収率において、温度の効果と比べる

と格段に小さかった。一方、生成比の方は、温度に匹敵するくらいの大きな効果を有していた。前者については、温度が低い場合に反応が進行せず未反応の環化前駆体 **8** が多く残存するため、その影響が強く結果に反映したのと考えた。後者については、未反応の原料の残存の影響を排除でき、純粋に生成した化合物の中で環化が進行した割合だけを評価できている。この生成比の結果については、本環化反応の機構を考えれば次のように説明することができる (図 3.4-5)。

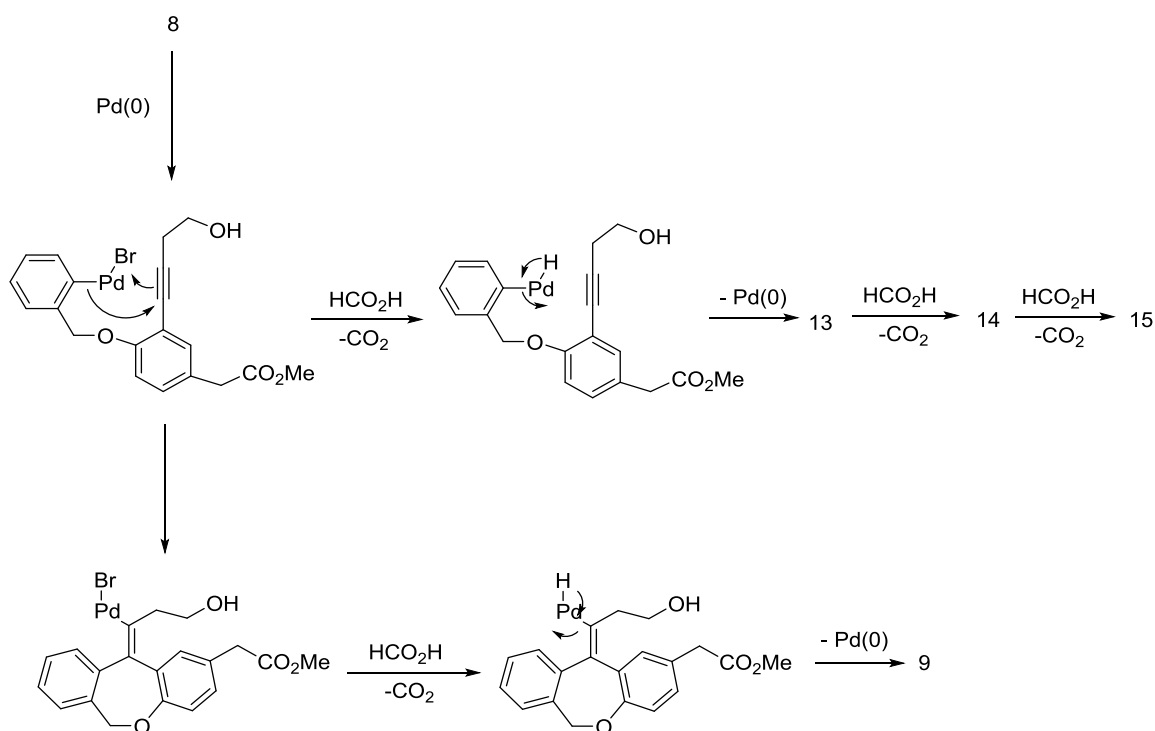


図 3.4-5 環化反応の機構

副生物 **13** は、パラジウムの酸化的付加の後、環化が進行する前に還元剤と反応することで生成するが、還元剤の量が多いと、環化する前の段階で還元剤と衝突する確率が高くなり、副生物が多く生成すると考えた。実際、還元剤が多いと生成比が低下することは、ギ酸の量と生成比の関係を表す図 3.4-6 からも理解できた。なお、このとき中心点はほぼ直線上で中心点付近に極値がなかったことから、ギ酸の量と生成比の関係はリニアな関係にあると考えた。さらに、副生物 **13** の生成に対する Half Normal Plot (図 3.4-7) を見ると、最も影響の大きな因子がギ酸 (B) であることも、以上の結果を裏付けている証拠と考えた。

以上、収率のみならず生成比にも着目することにより、本環化反応について理解を深め、収率向上への道筋を明らかにした。

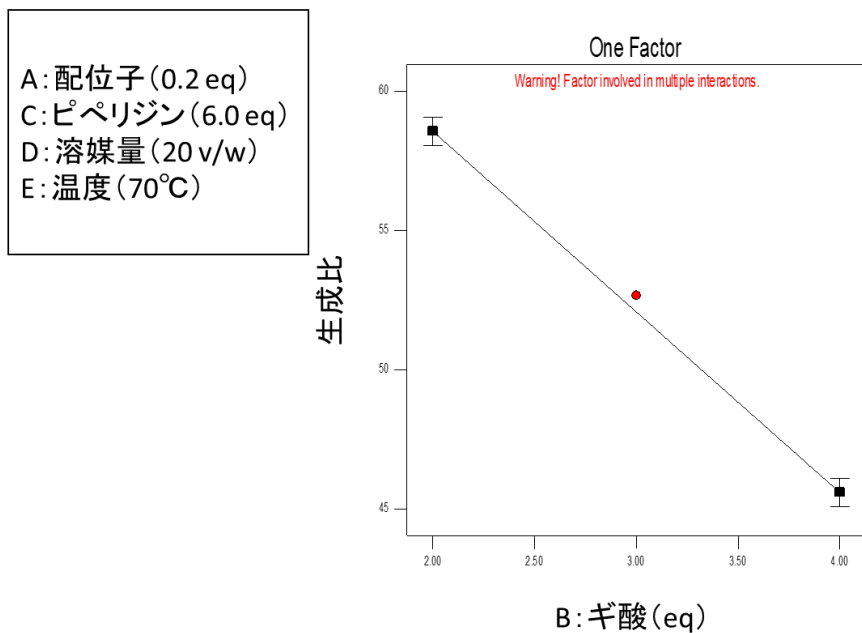


図 3.4-6 ギ酸と生成比の関係

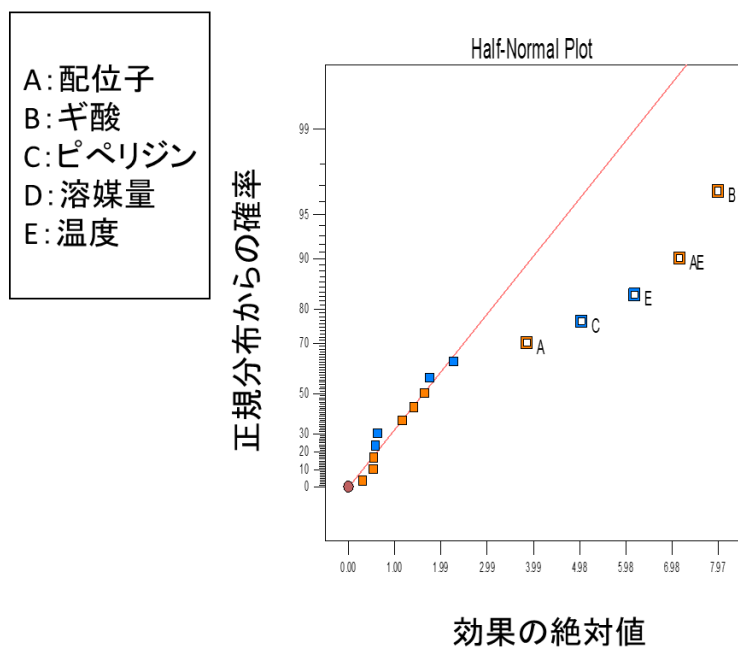


図 3.4-7 副生物 13 に対するのギ酸と生成比の関係



## 2. ギ酸当量の検討

次に、中心複合計画による応答曲面を用いた最適化を実施した。表 3.4-3 を参考にし、検討すべき因子を絞り込んだ。

まず、溶媒である DMF (D) については、本反応への影響は非常に少ないと考え、使用量を低水準の 10 v/w に設定することにした。ギ酸 (B) とピペリジン (C) については、酸と塩基の関係にあり、生成比においてこれらの交互作用 BC の効果が小さいながらも見られていた。図 3.4-8 にギ酸量及びピペリジン量と生成比の関係を表すグラフを示す。ピペリジンが多い場合に生成比が高くなっているが、特にギ酸が少なくピペリジンが多い場合に生成比が高くなっていることが判明した。これら両者については、ギ酸を削減するかピペリジンを多くする、即ち反応系の塩基性を上げることで生成比は改善できると考えた。

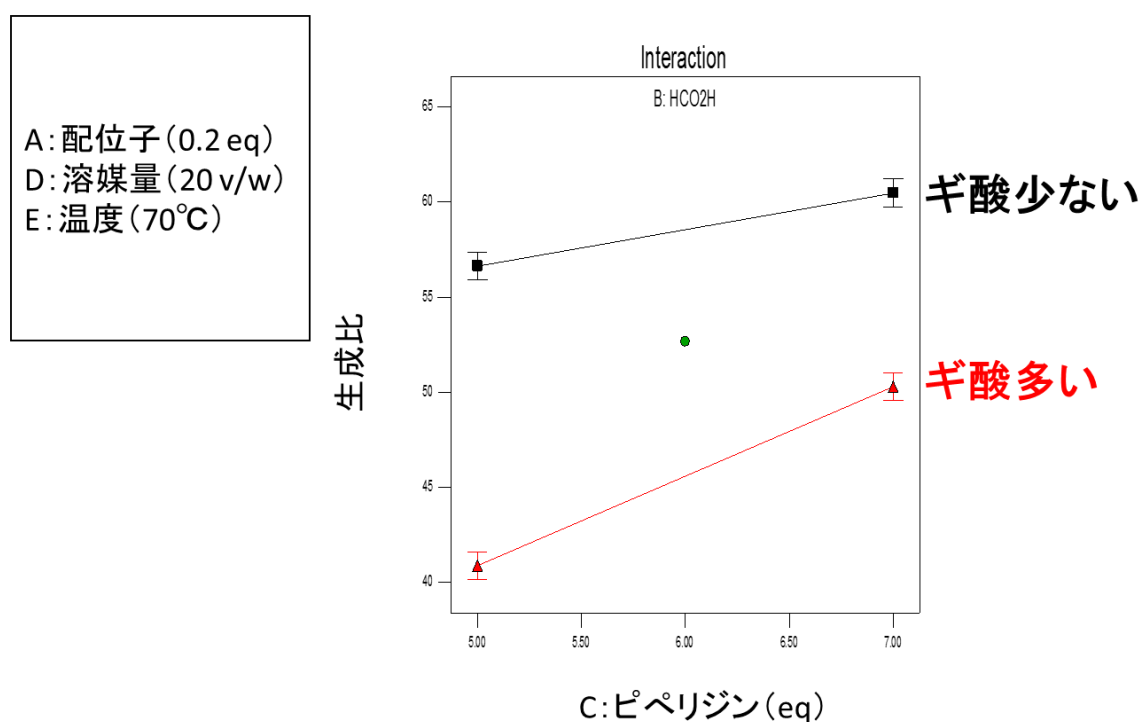


図 3.4-8 ピペリジンと生成比の関係

以上の考察及び前項の結果を踏まえ、ピペリジンは高水準の 7.0 当量に設定し、ギ酸の削減を検討した。ここでは、2.0 当量から順次削減する検討を実施した。結果は表 3.4-4 に示す。

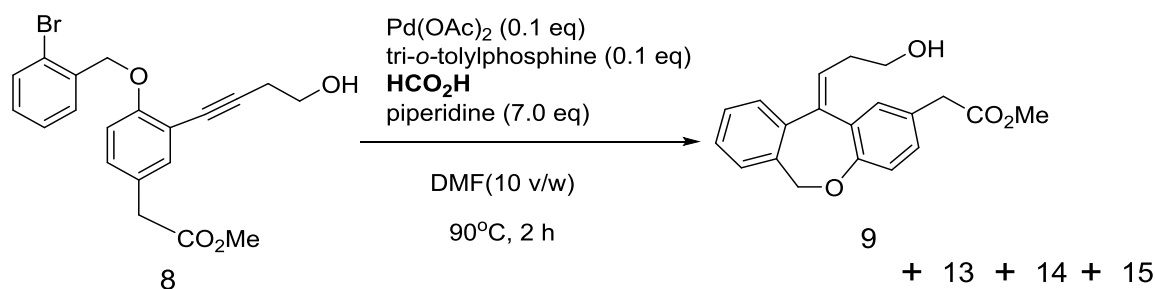


図 3.4-9 ギ酸の削減

表 3.4-4 ギ酸当量の削減

Run	ギ酸 (eq)	HPLC area%					9 の生成比 <sup>b</sup> (%)
		8	9 <sup>a</sup>	13	14	15	
1	2.0	0	58 (59)	12	26	0	61
2	1.6	0	59 (62)	20	13	0	64
3	1.2	3	64 (71)	20	6	0	72
4	1.1	3	70 (80)	15	3	0	79
5	1.0	10	65 (72)	14	2	0	80

a 括弧内は HPLC 定量による収率、b 9/(9+13+14+15)

ギ酸当量の削減により、生成比が増加するとともに収率も向上することが実証された。最高で収率 80%を達成でき、このとき生成比は 79%であった。一方、ギ酸を 1.0 当量まで削減すると、基質 8 が多く残存する結果となったため、ここでは、Run 2~6 の中で最も良い 1.1 当量にギ酸量を設定することにした。

以上より、ギ酸、ピペリジン、DMF の最適値を決めることができたことから、残る温度と配位子の二つの因子について中心複合計画による応答曲面を用いた環化体 9 の収率の最適化を検討した。2 因子であれば、繰り返しを一回含めても合計 10 runs の検討で済ませることができる (図 3.4-10)。結果を表 3.4-5 に示す。

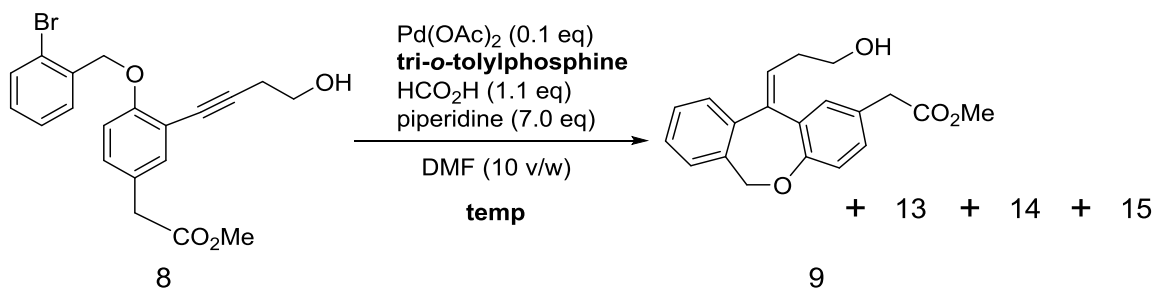


図 3.4-10 応答曲面法による最適化

表 3.4-5 応答曲面法による最適化

Run	配位子 (eq)	温度 (°C)	HPLC area%				
			8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	13	14	15
1	0.150	80	15 (12)	57 (68)	17	3	0
2	0.300	80	9 (7)	64 (75)	14	2	0
3	0.225	80	11 (9)	62 (78)	14	2	0
4	0.150	90	5 (4)	66 (73)	16	4	0
5	0.300	90	2 (2)	70 (78)	14	4	0
6	0.225	90	4 (3)	69 (78)	15	3	0
7	0.225	90	5 (5)	69 (78)	17	3	0
8	0.150	100	<1 (0)	68 (73)	15	6	0
9	0.300	100	1 (1)	73 (75)	11	4	0
10	0.225	100	2 (1)	71 (78)	13	4	0

a 括弧内は HPLC 定量による収率

全ての実験において、環化体 9 の収率は、6~8 割の結果を示すことが判った。また、Run 7 は Run 6 と全く同じ条件である繰り返しの実験であるが、その結果は良好な再現性を示した。環化体 9 の収率に対する温度と配位子の結果の応答曲面を図 3.4-11 に示す。この応答曲面の寄与率は  $R^2$  値が 97% と極めて高い値を示した。

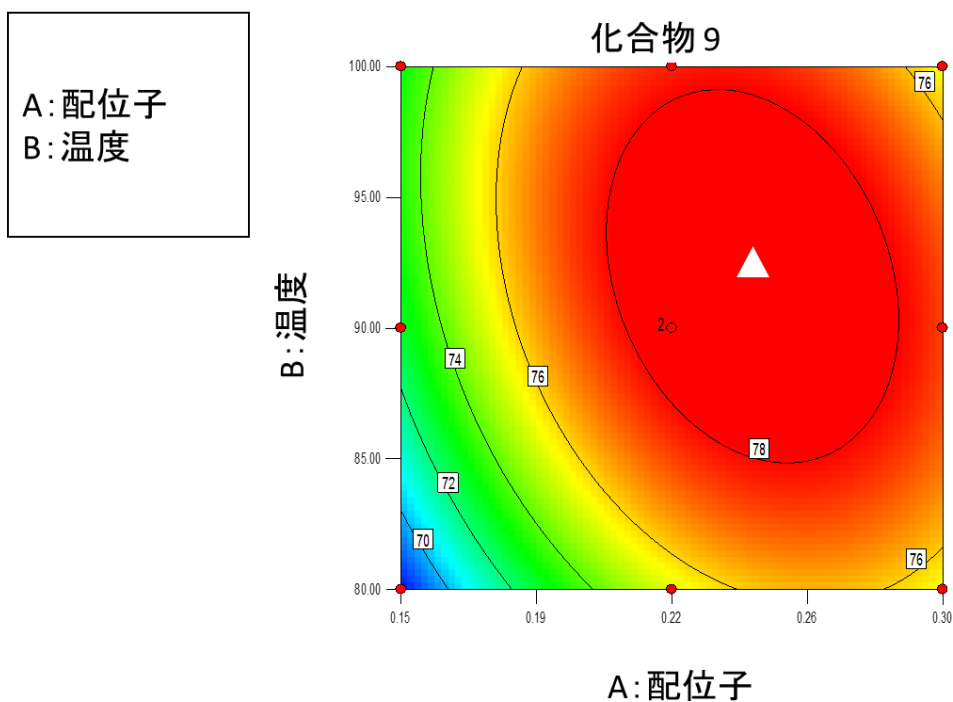


図 3.4-11 応答曲面法による最適化 ( $R^2=97\%$ )

得られた応答曲面は、配位子 0.25 eq、温度 92°C を極値にもつ上に凸の二次曲面であった。この条件の時、計算値では 79% の収率が予想された。また、この応答曲面は滑らかな曲面となっており、最適値周辺の条件は頑健性が高いと考えられ、収率 78% 以上の範囲は広いことが判った。

最後に、今回得られた最適条件（配位子量：0.25 eq、温度：92°C）にて、再現性を確認した。結果を表 3.4-6 に記す。得られた結果は、予測値を再現する結果となっており、当条件は頑健性の高い条件であることが、実際の実験からも確認できた。

表 3.4-6 再現性の確認

	配位子 (eq)	温度 (°C)	HPLC area%				
			8 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	13	14	15
予測値	0.25	92	2 (2)	70 (79)	15	4	0
再現実験	0.25	92	4 (3)	69 (79, 71 <sup>b</sup> )	15	3	0

a 括弧内の数値は HPLC 定量による収率、b 括弧内のイタリック体の数値は単離収率を表す

今回の一連の最適化では 80%以上の収率は達成できなかった。しかしながら、Finch らと用いる基質は異なるものの、本反応の詳細を明らかにすることができ、彼らが報告していた 60%を大きく上回ることができた。

### 3.5 塩酸オロパタジンへの誘導

最後に、化合物 9 をメタンスルホン酸クロリドで水酸基をメシル化した後、ジメチルアミンを作用させ、その後、メチルエステルの加水分解及び塩酸塩化を経て塩酸オロパタジンに誘導できることを確認した<sup>9)</sup>。

### 3.6 小括

パラジウム触媒を用いた立体特異的な七員環形成反応（以下、環化反応）を鍵反応とした塩酸オロパタジンの新規合成ルートを確認した（図 3.6-1）。

本合成ルートを成功させるための課題として、環化前駆体 8 の合成ルート確立と、環化反応の収率向上が挙げられていたが、前者は、化合物 7 を用いたヨウ素位置選択的な菌頭カップリング反応により実現した。後者は、配位子と溶媒のスクリーニングと実験計画法による反応機構の考察及び最適化で収率 80%を達成した（表 3.6-1）。

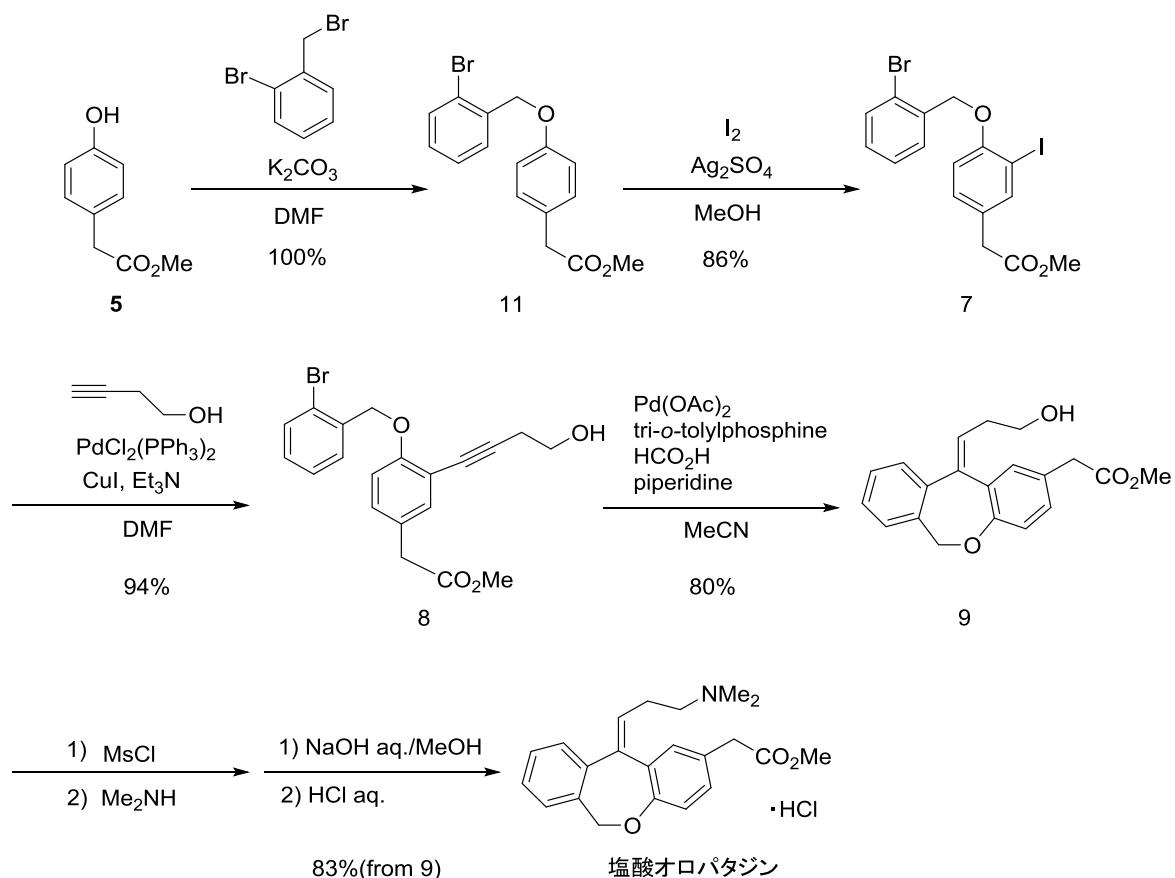


図 3.6-1 塩酸オロパタジンの新規合成ルート

表 3.6-1 塩酸オロパタジン新規合成ルート検討まとめ

工程		要点
ヨウ素体の合成	化合物 5 →化合物 7	<ul style="list-style-type: none"> <li>・化合物 11 を経る方法を見出す</li> <li>・ヨウ素と硫酸銀によるヨウ素化にて選択的なモノヨウ素化を達成</li> </ul>
菌頭カップリング	化合物 7 →化合物 8	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ヨウ素位置選択的に反応が進行することを確認</li> </ul>
環化反応	化合物 8 →化合物 9	<ul style="list-style-type: none"> <li>・配位子スクリーニングにより、<b>tri-<i>o</i>-tolylphosphine</b> が最適と判断</li> <li>・溶媒のスクリーニングにより、<b>DMF</b> が最適と判断</li> <li>・実験計画法より、反応機構を考察し、80%程度の収率を達成</li> </ul>
塩酸オロパタジンまで	化合物 9 →塩酸オロパタジン	<ul style="list-style-type: none"> <li>・特筆事項なし</li> </ul>

### 3.7 実験

スペクトルデータについては、新規化合物のみ記載した。既知化合物については、得られたスペクトルデータと文献情報を基に同定した。測定機器は、 $^1\text{H-NMR}$  及び  $^{13}\text{C-NMR}$  の測定では日本電子 JNM-LA-300 を使用した。MS 測定では Micromass LCT を使用した。シリカゲルカラムクロマト精製では、Wakogel<sup>®</sup> C-200 を使用した。

#### 化合物 6 及び 10 の合成

室温下、化合物 5 (4.70 g, 28.3 mmol) にピリジン 17 mL を加えて溶解し、氷浴で冷却した。その液に、氷冷下、塩化ヨウ素 (5 g, 31.1 mmol, 1.1 eq) を 1,4-ジオキサン 32 mL に溶かした液を、30 分かけて滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、酢酸エチル、水を順次添加して分液操作を行った後、有機層を 1 mol/L 塩酸及び飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。濃縮の後、酢酸エチル 8 mL を添加し再結晶を行い、化合物 10 を濾別した (白色結晶, 3.05 g, 26%)。濾液については、濃縮後、シリカゲルカラムクロマト精製 (酢酸エチル/ヘキサン = 1/2) にて、化合物 6 と 5 の混合物 (淡紫色油状物, 6:1.73 g, 21%, 5:1.28 g, 27%) を得た。

化合物 6:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.57 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.12 (dd,  $J = 8.3, 2.0$  Hz, 1H), 6.90 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 5.45 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.55 (s, 2H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz): 173.0, 155.0, 138.9, 131.0, 127.6, 115.0, 85.2, 52.2, 40.2; MS ESI (-)  $m/z$  291 [ $\text{M-H}$ ]<sup>-</sup>.

化合物 10:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.60 (s, 2H), 5.71 (s, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.52 (s, 2H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz): 171.2, 152.8, 139.9, 129.8, 82.1, 52.3, 38.9; MS ESI (-)  $m/z$  417 [ $\text{M-H}$ ]<sup>-</sup>.

#### 化合物 11 の合成

室温下、化合物 5 (5.00 g, 30.1 mmol) に DMF 50 mL を加えて溶解し、その液に、2-ベンジルブロミド (7.50 g, 1.0 eq) と炭酸カリウム (6.28 g, 1.5 eq) を添加した。25°C で 4 時間攪拌した後、酢酸エチル、水を順次添加して分液操作を行った後、有機層を水で洗浄した。50°C で濃縮の後、化合物 11 (淡黄色油状物, 10.25 g, quant.) を得た。



化合物 11:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.58 (dd,  $J = 7.7, 1.1$  Hz, 1H), 7.53 (dd,  $J = 7.7, 1.3$  Hz, 1H), 7.32 (td,  $J = 7.7, 1.3$  Hz, 1H), 7.21 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.17 (td,  $J = 7.7, 1.1$  Hz, 1H), 6.93 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 5.17 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.57 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  172.3, 157.6, 136.3, 132.6, 130.3, 129.2, 128.9, 127.6, 126.7, 122.2, 115.0, 69.5, 52.0, 40.3; MS ESI (+)  $m/z$  337, 335  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### 化合物 7 の合成

室温下、ヨウ素 (7.28 g, 1.0 eq) と硫酸銀 (8.71 g, 1.0 eq) をメタノール (15 mL) に溶解し、ヨウ素が溶解するまで攪拌した。この溶液に、メタノール (15 mL) に溶解した化合物 11 (9.44 g, 28.1 mmol) を添加した。18°C で 2 時間攪拌し、不溶物を濾別し酢酸エチルで洗浄した。濾液を 50°C で濃縮乾固し黄色の固体を得た。この個体をメタノールでリソラリーし、化合物 7 (白色結晶、11.00 g, 86%) を得た。

化合物 7:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.78 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 7.75 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.59 (dd,  $J = 7.9, 1.1$  Hz, 1H), 7.37 (td,  $J = 7.9, 1.0$  Hz, 1H), 7.25-7.21 (m, 2H), 6.83 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.55 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  171.7, 156.1, 140.2, 135.8, 132.6, 132.4, 130.4, 129.1, 128.7, 127.7, 121.5, 112.4, 86.5, 70.3, 52.1, 39.6; MS ESI (-)  $m/z$  461, 459  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

### 化合物 8 の合成

窒素雰囲気下、化合物 7 (5.0 g, 10.8 mmol) に、 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (381 mg, 0.05 eq)、CuI (103 mg, 0.1 eq)、3-ブチン-1-オール (1.84 mL, 2.0 eq) 及びトリエチルアミン (6.06 mL, 4.0 eq) を DMF (50 mL) に溶解し、25°C で 5 時間攪拌した。この溶液に水を添加し反応を停止させた後、酢酸エチルを添加して分液操作した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、濾過し触媒の残渣を濾別した。濾液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマト精製 (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) にて、化合物 8 (褐色油状物、4.34 g, 100%) を得た。

化合物 8:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.64 (dd,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.57 (dd,  $J = 7.7, 1.1$  Hz, 1H), 7.34 (td,  $J = 7.7, 1.1$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 7.18 (td,  $J = 7.7, 1.7$  Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J = 8.6, 2.2$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.80 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 2.73 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  171.9, 158.1, 136.1, 134.1, 132.5, 130.1, 129.2,

128.6, 127.6, 126.6, 121.8, 113.4, 112.7, 91.0, 78.7, 70.0, 61.1, 52.1, 40.0, 24.2;  
MS ESI (+)  $m/z$  405, 403 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 化合物 9 の合成

窒素雰囲気下、化合物 8 (200 mg, 0.496 mmol) に、Pd(OAc)<sub>2</sub> (11.1 mg, 0.1 eq)、トリ-*o*-トリルホスフィン (37.7 mg, 0.25 eq)、ピペリジン (3.44  $\mu$ L, 7.0 eq) 及びギ酸 (20.5  $\mu$ L, 1.1 eq) を DMF (2.0 mL) に溶解し、92°C で 3 時間攪拌した。この溶液に水を添加し反応を停止させた後、酢酸エチルを添加して分液操作した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、濃縮し、シリカゲルカラムクロマト精製 (酢酸エチル/ヘキサン = 1/2) にて、化合物 9 (白色結晶、114 mg, 71%) を得た。

化合物 9: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  7.34-7.23 (m, 4H), 7.17 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.04 (dd,  $J$  = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 6.80 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.74 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 5.18 (brs, 2H), 3.80 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 2.68 (dt,  $J$  = 7.5, 6.1 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):  $\delta$  172.4, 154.6, 145.3, 141.4, 133.6, 132.1, 130.0, 129.1, 127.5, 126.2, 125.7, 124.0, 119.7, 70.5, 62.6, 52.1, 40.1, 33.3; MS ESI (+)  $m/z$  325 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 塩酸オロパタジンの合成

氷冷下、ピリジン (160 mL) に溶解した化合物 9 (21.0 g, 64.7 mmol) に、メタンスルホニルクロリド (28.0 g, 3.8 eq) をゆっくりと添加し、室温で 2 時間攪拌した。この溶液に水を添加し、酢酸エチルを添加し分液操作した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、濃縮した。得られた油状物にメタノール (400 mL) を添加し、50%ジメチルアミン水溶液 (120 mL, 18.0 eq) を添加し、還流下、3 時間攪拌した。この溶液に 2 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を添加し、還流下、2 時間攪拌した。水と酢酸ブチルを添加した後、2 mol/L 塩酸を添加して水層を pH 2 に調整した。分液後、有機層を濃縮し、塩酸オロパタジン<sup>1)</sup> (白色結晶、21.4 g, 88.4%) を得た。

#### 化合物 13 の合成 (HPLC 分析のための標品)

1) 室温下、化合物 5 (10.8 g, 6.50 mmol) に酢酸 (200 mL) を加えて溶解し、臭素の酢酸溶液 (臭素 : 3.7 mL, 7.15 mmol, 1.1eq, 酢酸:150 mL) を 30 分かけて滴下した。室温で 1 時間攪拌後、酢酸エチル及び水を順次添加して分液

操作を行い、有機層を濃縮し、3-ブロモ-4-ヒドロキシ安息香酸メチル（無色透明油状物、16.7 g、100%）を得た。

2) 室温下、3-ブロモ-4-ヒドロキシ安息香酸メチル（1.07 g、4.37 mmol）に DMF（10 mL）を加えて溶解し、炭酸カリウム（911 mg、6.55 mmol、1.5 eq）、ベンジルブロミド（571  $\mu$ L、4.80 mmol、1.1 eq）を順次添加した。室温で2時間攪拌後、酢酸エチル、水を順次添加して分液操作を行った後、有機層を濃縮し、シリカゲルカラムクロマト精製（酢酸エチル/ヘキサン = 1/5）にて、化合物 4-ベンジルオキシ-3-ブロモ安息香酸メチル（無色透明油状物、1.32 g、96%）を得た。

3) 室温、窒素雰囲気下、4-ベンジルオキシ-3-ブロモ安息香酸メチル（1.04 g、3.10 mmol）に、PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>（218 mg、0.310 mmol、0.1 eq）、CuI（59 mg、0.310 mmol、0.1 eq）を添加し、DMF（10 mL）を加えて溶解した。室温で攪拌した後、トリエチルアミン（1.73 mL、12.4 mmol、4.0 eq）、3-ブチン-1-オール（470  $\mu$ L、6.20 mmol、2.0 eq）を順次添加した。80°Cで4時間攪拌後、酢酸エチル及び水を順次添加して分液操作を行った後、有機層を濃縮し、シリカゲルカラムクロマト精製（酢酸エチル/ヘキサン = 1/5）にて、化合物 13（褐色油状物、485 mg、49%）を得た。

化合物 13: <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$  7.46-7.30 (m, 6H), 7.13 (dd,  $J$  = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 6.83 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 3.76 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.52 (s, 2H), 2.70 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 2H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz):  $\delta$  171.2, 158.5, 136.8, 134.0, 130.0, 128.5, 127.9, 127.7, 127.0, 113.4, 112.7, 91.0, 78.7, 70.6, 61.0, 52.0, 40.0, 21.0; MS ESI (+)  $m/z$  352 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 化合物 14 及び 15 の合成（HPLC 分析のための標品）

室温、窒素雰囲気下、化合物 8（467 mg、1.16 mmol）に、Pd(OAc)<sub>2</sub>（25.9 mg、0.116 mmol、0.1 eq）、Tri-*o*-tolylphosphine（70.5 mg、0.232 mmol、0.2 eq）を添加し、アセトニトリル（9.3 mL）を加えて溶解した。室温で攪拌した後、ピペリジン（459  $\mu$ L、4.63 mmol、4.0 eq）、HCO<sub>2</sub>H（131  $\mu$ L、3.47 mmol、3.0 eq）を順次添加した。60 °Cで3時間攪拌後、酢酸エチル、水を順次添加して分液操作を行った後、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を濃縮し、シリカゲルカラムクロマト精製（酢酸エチル/ヘキサン = 1/2）にて、化合物 9 と 14 の 1:1 混合物（褐色油状物、9: 142 mg、38%、14: 142 mg、38%）と化合物 15（褐色油状物、62 mg、23%）を得た。

化合物 14:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.43-7.24 (m, 5H), 7.23 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz), 7.09 (dd, 1H,  $J = 8.4, 2.2$  Hz), 6.87 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 6.72 (d, 1H,  $J = 11.3$  Hz), 5.73 (dt, 1H,  $J = 11.3, 7.5$  Hz), 5.07 (s, 2H), 3.70 (t, 2H,  $J = 5.3$  Hz), 3.69 (s, 3H), 3.57 (s, 2H), 2.54 (dt, 2H,  $J = 7.5, 5.3$ , Hz); MS ESI (+)  $m/z$  327  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

化合物 15:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  7.05 (dd, 1H,  $J = 2.2, 8.2$  Hz), 6.99 (d, 1H,  $J = 2.2$  Hz), 6.84 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz), 6.48 (d, 1H,  $J = 11.3$  Hz), 5.85 (dt, 1H,  $J = 11.3, 7.7$  Hz), 3.76 (t, 1H,  $J = 5.9$  Hz), 3.69 (s, 3H), 3.54 (s, 2H), 2.35 (dt, 2H,  $J = 7.7, 5.9$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz): 172.5, 151.8, 132.2, 129.4, 126.7, 125.4, 123.6, 116.2, 61.5, 52.0, 40.2, 32.0; MS ESI (+)  $m/z$  237  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### <HPLC 条件>

一部の工程については HPLC 分析を行った。以下に条件を記載する。

カラム : Intact CD-003 内径 4.5×75 mm

検出波長 : 254 nm

カラム温度 : 30°C

流速 : 1.0 mL/min

移動層 : アセトニトリル/Buffer 溶液 <sup>a</sup> = 1/1

保持時間 :

化合物 8	5.9 min
化合物 5	8.3 min
化合物 11	14.7 min
化合物 9	29.9 min
内部標準 <sup>b</sup>	12.0 min

a 0.05 mol/L リン酸二水素カリウム水溶液をリン酸で pH = 3 に調整した溶液、b ビフェニルを使用

カラム : Intact CD-003 内径 4.5×75 mm

検出波長 : 254 nm

カラム温度 : 30°C

流速 : 1.0 mL/min

移動層 : アセトニトリル/Buffer 溶液 <sup>a</sup> = 10/17

保持時間 :

化合物 15	1.7 min
化合物 9 の幾何異性体	11.2 min

化合物 9	12.4 min
化合物 13	13.4 min
化合物 14	29.8 min
化合物 8	31.2 min
内部標準	51.5 min

a 0.05 mol/L リン酸二水素カリウム水溶液をリン酸で pH = 3 に調整した  
溶液、b ビフェニルを使用

### 3.8 参考文献等

1. Ohshima, E.; Otaki, S.; Sato, H.; Kumazawa, T.; Obase, H.; Ishii, A.; Ishii, H.; Ohmori, K.; Hirayama, N. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 2074.
2. a) 佐野隆宏, *ファルマシア*, 2002, 38, 224.  
b) Sano, T.; Sugaya, T.; Kasai, M. *Org. Process. Res. Dev.* 1998, 2, 169.
3. Finch, H.; Pegg, N. A.; Evans, B. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 8353.
4. Burns, B.; Grigg, R.; Sridharan, V.; Worakun, T. *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 4325.
5. Zupan, M.; Iskra J.; Stavber, S. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 6305.
6. Sy, W. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 6223.
7. Amatore, C.; Blart, E.; Genet, J. P.; Jutand, A.; Lemaire-audoire, S.; Savignac, M. *J. Org. Chem.* 1995, 60, 6829.
8. Arcadi, A; Bernocch, E.; Burini, S.; Cacch, F.; Marinelli, F.; Pirtroni, B. *Tetrahedron* 1988, 44, 481.
9. Nishimura, K.; Kinugawa, M. PCT Int. Appl. WO/2006/129781A1, 2006.

## 4 合成ルート最適化と実験計画法の研究

### 4.1 合成ルート最適化

医薬品原薬製造においては、多工程な合成ルートになるほどコストが増大する。単離操作で代表的なものを表 4.1-1 に示すが、単離する工程の数が増えればその分の日数を費やし、試薬や溶媒のコストも増大する。

表 4.1-1 単離操作における作業

作業名	標準日数 <sup>a</sup>	備考
分液	1~2	分液性が不良だと界面が現れるまで時間を要する
晶析	1~2	十分に結晶を析出させないと収率のロスにつながる
濾過	1~2	濾過性が悪いと、数日要する場合もある
乾燥	1~7	乾燥性が悪いと、一週間程度要する場合もある

<sup>a</sup> 200~500 Lスケールでの標準日数を示す。スケールが上がると日数は増大する傾向にある

また、単離操作を重ねる度に、濾過時の濾液へのロスが積み重なり全工程の単離収率は減っていく。例えば、全ての工程において収率が 95% であっても、全工程で 10 工程あれば、全収率は約 60% ( $= 0.95^{10}$ ) まで落ち込む。以上の観点から、プロセス化学者は、最適な出発原料を探索し、できる限り短工程の合成ルートを構築しようと努める。

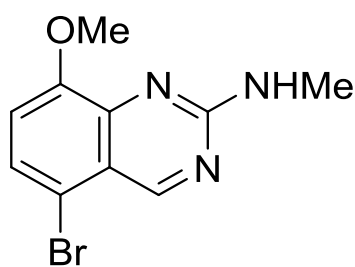
一方、冗長に長い合成ルートであっても、一部の単離操作を回避するだけでも作業効率は大きく改善する。前後の工程をテレスコーピング（英語名：Telescoping）化<sup>1)</sup>できれば、単離の操作を省略でき、効率は格段に上昇する。テレスコーピングとは、単離操作を省略し、次の工程を連続して反応を行う操作を意味し、代表的なものとしてワンポット反応がある。ワンポット反応は、一つのフラスコに複数の試薬が混在することになるため、常に実現できるとは限らないが、単離した結晶を乾燥せずに次工程に用いることができるだけでも、数日の作業削減が可能となる。以上の理由から、工程をテレスコーピング化することは有意義と考える。

プロセス化学者は、単にスマートな反応を用いて短工程な合成ルートを目指すだけでなく、テレスコーピングな工程も視野に入れた合成ルートの最適化も考えており、種々の例が報告されている<sup>2)</sup>。



## 4.2 メディシナル合成ルートの検証

2 位にモノアミノメチル基を有し、5 位に臭素基、そして 8 位にメトキシ基を有するキナゾリン化合物 16 は、COPD（慢性閉塞性肺疾患）の治療薬として探索が進められてきた化合物群の中間体である。メディシナル化学の部門では、この化合物 16 を中間体として、種々の候補化合物を合成していた。



16

図 4.2-1 メディシナル合成ルートの重要中間体

化合物 16 をメディシナル化学の部門へ迅速に供給できれば、候補化合物の合成も円滑に実施できる。化合物 16 は比較的単純な化合物であるが、メディシナル化学部門では、化合物 17 に対しグアニジンと反応させキナゾリン環を構築した後、化合物 18 の 2 位アミノ基のモノメチル化を達成するために、アセチル基による保護工程を導入している。その結果、アセチル基の脱保護を含めて合計 4 工程が必要であった（図 4.2-2、以下、メディシナル合成ルートと記す）。

プロセス化学の部門は、上記合成ルートの改良検討を支援し、候補化合物の創出のスピードアップを図った。まず、化合物 17 とモノメチルグアニジンを用いたキナゾリン環の構築により、一気に化合物 16 を得る合成ルートに取り組んだが、全く化合物 16 は得られなかった（図 4.2-3）。

一方、メディシナル合成ルートでは、各工程の収率は比較的高収率であった。また、特殊な試薬や反応条件が必要ではなかったため、致命的な問題点も見当たらなかった。そこで、メディシナル合成ルートを改良し、テレスコーピングな工程の構築も視野に入れ、合成ルートの最適化検討を開始した。



### 4.3 メディシナル合成ルートの改良検討

#### 1. 第一工程について

第一工程は、グアニジンを用いたキナゾリン環化反応<sup>3)</sup>であるが、ほぼ定量的に進行し既に良好な条件が確立していた。ただし、結晶の単離時に濾液へのロスが多かった。ここでは、反応の最適化は実施せず既知の方法を用いることとし、化合物 18 の単離を回避した第二工程とのテレスコーピング化を模索することで、濾液へのロスの問題の解決を図ることにした(図 4.3-1)。

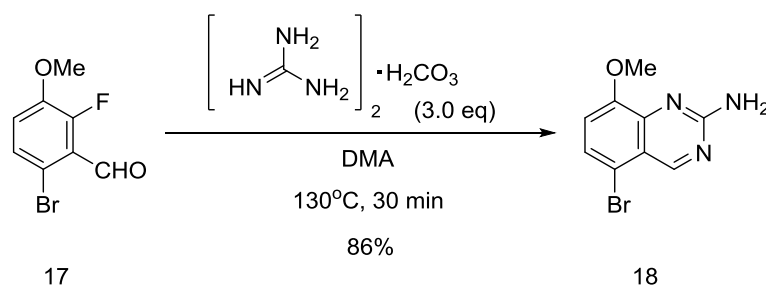


図 4.3-1 第一工程

#### 2. 第二工程について

メディシナル合成ルートの第二工程では、アセチル化反応の塩基として、作業性及び安全性に懸念のあるピリジンを大量(約 31 当量)に用いていた。本工程では、溶媒を用いておらず、ピリジンが溶媒の役目も担っていた。

そこで、新たに溶媒を選定し、過剰なピリジンを削減できるか検討した。同時に、ピリジンの代替となる塩基についても簡単にスクリーニング検討した。ここで検討する溶媒及び塩基は、前後する工程(第一工程、第三工程)とのテレスコーピング化を意識し、かつ入手が容易で安価なものを選択した。

溶媒としては、前工程とのテレスコーピング化を考慮し DMA、後工程とのテレスコーピング化を考慮し DMF を選択肢に挙げた。塩基の候補としては、ピリジン以外に、トリエチルアミンと第三工程で用いられる炭酸カルシウムを選択肢に挙げた。

図 4.3-2 及び表 4.3-1 に検討の結果を示す。DMA とピリジンの組合せの条件において、化合物 19 の収率が最も高くなった。ピリジンの使用回避は達成できなかったが、使用量を 4 当量まで大きく削減できることが判った。

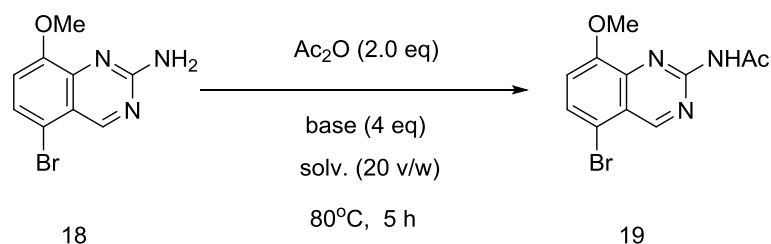


図 4.3-2 溶媒と塩基のスクリーニング

表 4.3-1 溶媒と塩基のスクリーニング<sup>a</sup>

Run	溶媒	塩基	収率(%) <sup>a</sup>	
			19	18
1	DMA	ピリジン	80	20
2	DMA	トリエチルアミン	49	29
3	DMA	炭酸カルシウム	1	92
4	DMF	ピリジン	58	26
5	DMF	トリエチルアミン	41	33
6	DMF	炭酸カルシウム	1	94

<sup>a</sup> HPLC 定量による収率

次に、各試薬（無水酢酸及びピリジン）の量と溶媒量、温度の 4 因子から、本反応への影響が大きい重要な因子の抽出を目的に、8 runs (= 2<sup>4</sup>/2) の 2-Level Fractional Factorial Design を検討した（図 4.3-3）。実験結果を表 4.3-2 及び表 4.3-3 に、Half Normal Plot を図 4.3-4 に示す。

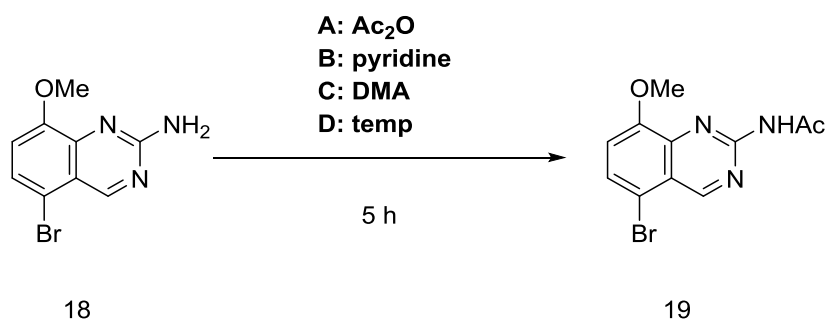


図 4.3-3 第二工程の実験計画法検討

表 4.3-2 水準の設定

因子	低水準 (-1)	高水準 (+1)
A:無水酢酸当量	1.0 eq	3.0 eq
B:ピリジン当量	2.0 eq	6.0 eq
C:DMA 当量	10 v/w	30 v/w
D:温度	60 °C	100 °C

表 4.3-3 実験計画法による重要因子の抽出

Run	A	B	C	D	収率(%) <sup>a</sup>	
					19	18
1	-1	-1	-1	-1	15	78
2	+1	-1	-1	+1	95	2
3	-1	+1	-1	+1	61	35
4	+1	+1	-1	-1	39	58
5	-1	-1	+1	+1	47	48
6	+1	-1	+1	-1	23	73
7	-1	+1	+1	-1	8	8
8	+1	+1	+1	+1	86	7

a HPLC 定量による収率

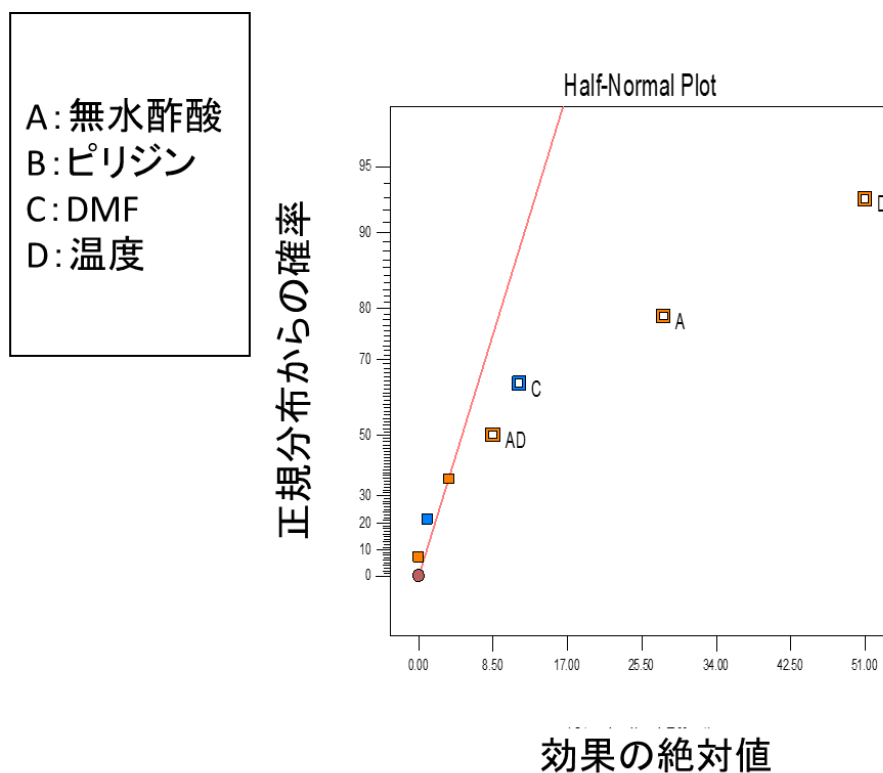


図 4.3-4 化合物 19 の収率に対する Half Normal Plot

図 4.3-4 より、温度 (D)、無水酢酸 (A)、DMA (C) の順に効果が大きいことが判った。若干ではあるが、温度と無水酢酸の間に交互作用 AD が見られた。一方、ピリジン (B) は直線より右に点がなく、本反応に全く影響を与えていないことが示唆された。今回実施した検討範囲内での最適点は Cube Graph (図 4.3-5) にて表すことができ、無水酢酸が高、DMA が低、温度が高の場合に予測収率 96%を示した。この条件は図 4.3-5 の Run 2 の条件に相当した。

Run 2 の条件の再現性を確認するために、同条件で 2.6 g までスケールアップし確認実験を実施したところ、小スケールを再現する結果となった (表 4.3-4)。

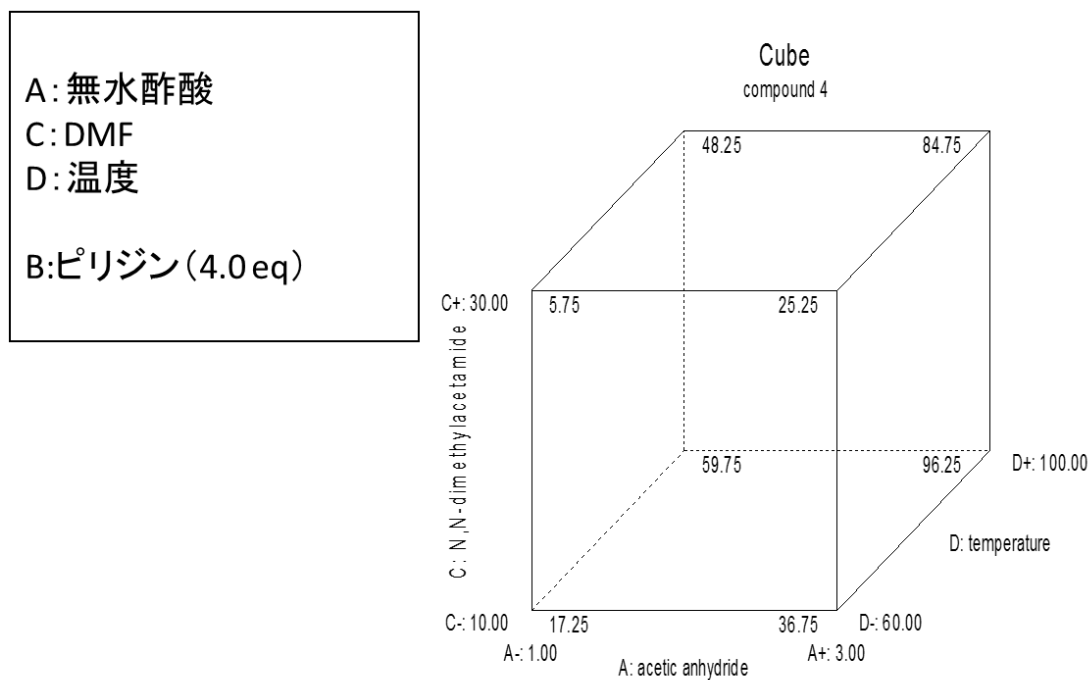


図 4.3-5 化合物 19 の収率に対する Cube Graph

表 4.3-4 再現性の確認

	スケール(g)	収率(%) <sup>a</sup>	
		19	18
表 4.3-3 の Run 2	0.1	95	2
予測値	—	96	—
再現実験	2.6	92	1

a HPLC定量による収率

ところで、Half Normal Plot を振り返ると、ピリジンは、今回検討した範囲内（2.0～6.0 当量）で、収率の増減に全く影響しないという結果であった。この結果は、一般にアセチル化反応には塩基性条件が必要と考えていたが、本反応ではピリジンのような塩基を必要としない可能性が示唆された。そこで、ピリジンを全く使用せず、反応が進行するかどうか検証した（図 4.3-6、表 4.3-5）。その結果、ピリジンを使用しない場合においても、単離収率は92%を示し、このアセチル化反応にピリジンは不要であることが判った。この理由については、現在のところ不明であるが、基質 18 または生成物 19 がキナゾリン環を有しており塩基性を示すこと、または溶媒である DMA が塩基として作用していること<sup>4)</sup>、以上のいずれかが原因と推察した。

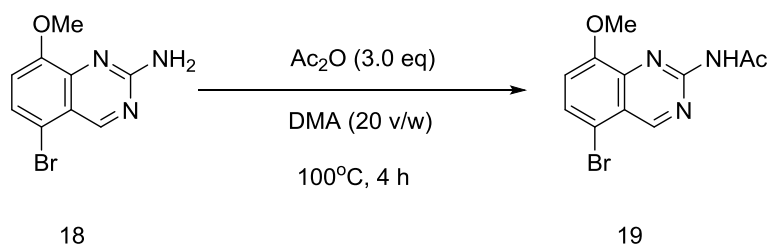


図 4.3-6 ピリジンを使用しない場合の実験

表 4.3-5 ピリジンを使用しない場合の実験

ピリジン	スケール(g)	19 の収率(%) <sup>a</sup>
2.0 eq <sup>b</sup>	2.6	92
使用せず	1.0	96

a HPLC 定量による収率、b 表 4.3-4 の再現実験より

### 3. 第三工程について

メディシナル合成ルートでは、第三工程のメチル化反応の収率が不安定であった。反応途中で反応が停止することもしばしばあった。この原因の一つとして、反応温度をヨードメタンの沸点（41°C）よりも高い 60°C に設定されていたことと考え、反応途中でヨードメタンが揮発し、反応に必要な量のヨードメタンが反応系中に確保されないためと推察した。また、ヨードメタンは特定化学物質であり毒性も高いため積極的に揮発を促すような沸点を超える反応温度は不適切であると考えた。

そこで、高い反応温度が本反応に本当に必要であるか、また適切なヨードメタンの量はどの程度必要であるか検証するため、反応に関与する各因子の最適化を実施した。ここでは、前項と同様の 8 runs (=  $2^4/2$ ) の 2-Level Fractional Factorial Design を適用し、各試薬（ヨードメタンと炭酸カリウム）、溶媒量、温度の四つの因子を選択した。温度の水準については、ヨードメタンの沸点以下で設定した（表 4.3-6）。実験結果及び Half Normal Plot を表 4.3-7 及び図 4.3-8 に示す。

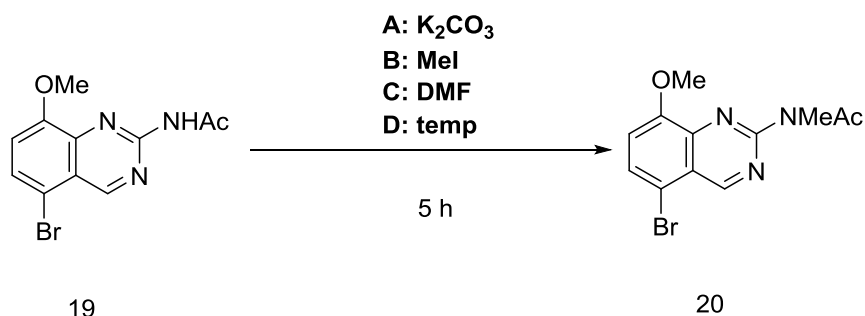


図 4.3-7 第三工程の実験計画法検討

表 4.3-6 水準の設定

因子	低水準 (-1)	高水準 (+1)
A: 炭酸カリウム当量	1.0 eq	3.0 eq
B: ヨードメタン当量	1.0 eq	3.0 eq
C: 温度	20°C	40°C
D: DMF 量	10 v/w	30 v/w



表 4.3-7 実験計画法による重要因子の抽出

Run	A	B	C	D	収率(%) <sup>a</sup>	
					20	19
1	-1	-1	-1	-1	36	66
2	+1	-1	-1	+1	90	8
3	-1	+1	-1	+1	37	65
4	+1	+1	-1	-1	91	8
5	-1	-1	+1	+1	39	66
6	+1	-1	+1	-1	97	1
7	-1	+1	+1	-1	35	68
8	+1	+1	+1	+1	92	7

a HPLC 定量による収率

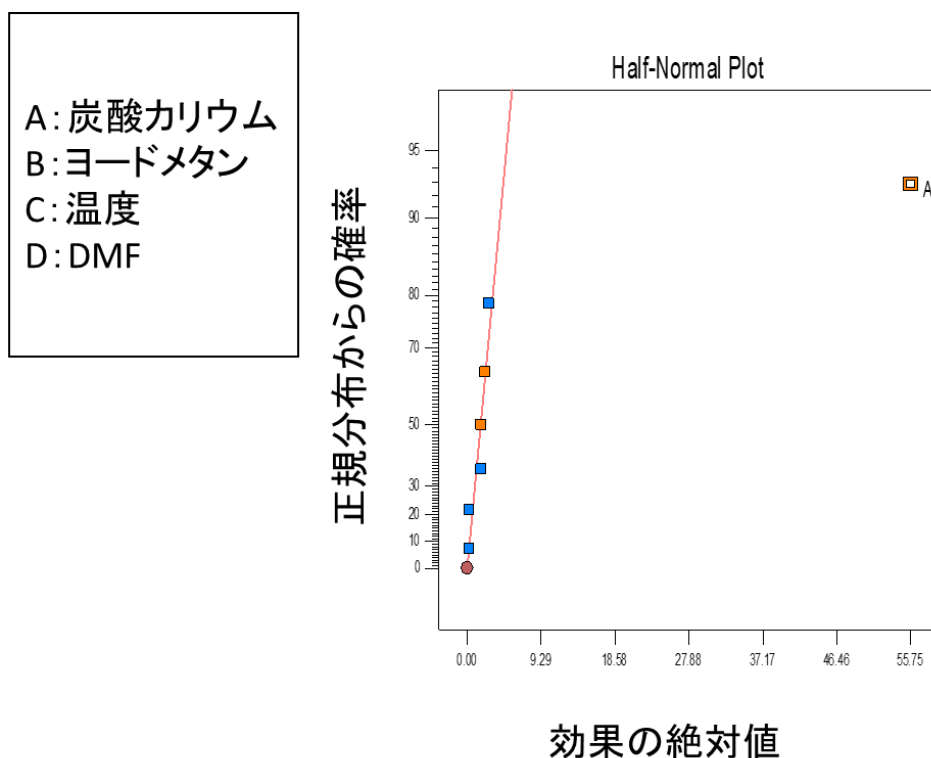


図 4.3-8 化合物 20 に対する Half Normal Plot

本反応の Half Normal Plot を見ると、驚くべきことに唯一炭酸カリウムのみが本反応に強く影響していることが判った。温度とヨードメタンの量は本反応に影響していなかった。即ち、温度やヨードメタンの量は、このメチル化反応には全く影響していないことが判った。化合物 20 の収率と炭酸カリウムの量との関係を表したグラフ（図 2.3-9）より、炭酸カリウムの量が多

い場合に化合物 20 の収率が高くなることが判った。この実験結果を受けて、本反応の炭酸カリウムの量は 3.0 当量とした。

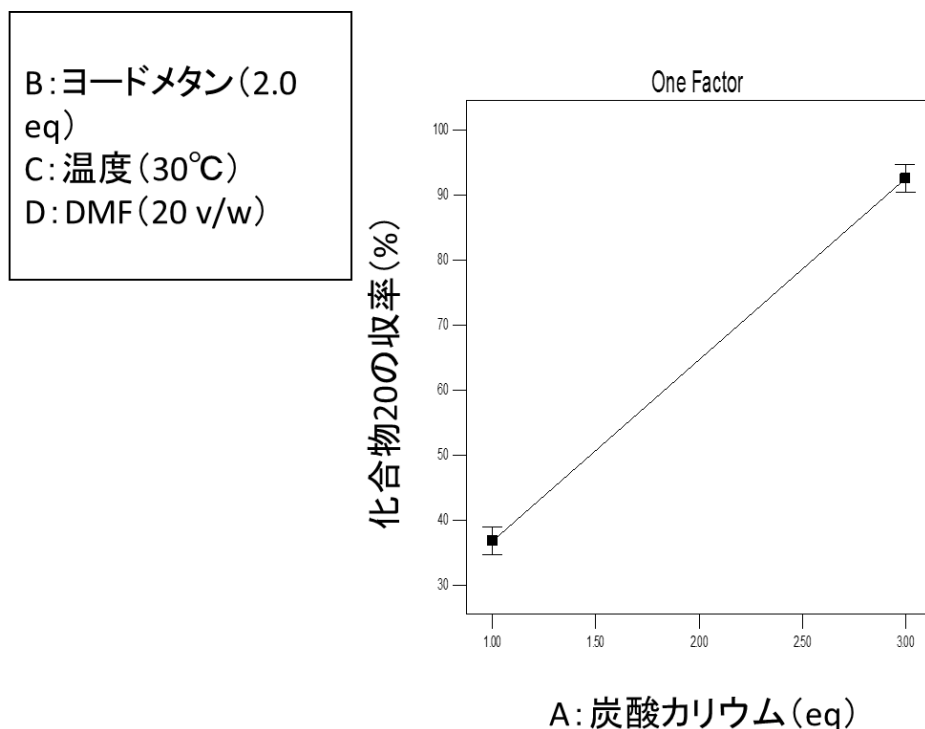


図 4.3-9 炭酸カリウムと化合物 20 の収率の関係

一方、他の因子については今回検討した範囲内である限り、任意の条件に設定できることが判った。ヨードメタンについては、使用量を 1.0 当量まで減らすことが可能であったが、ここでは仕込み時の誤差の影響も考慮し若干の安全域を設けて 1.1 当量に設定した。DMF については、生産性を考えて低水準に設定した。温度については、本反応がヨードメタンの沸点以下でも問題なく反応が進行することが判ったが、ここでは 35°C とした。この温度であれば、室温にコントロールされた部屋を使用する場合、水浴で温度制御が可能と考えたからである。

#### 4. 第四工程について

第四工程の脱アセチル化反応は、炭酸カリウム存在下、メタノールなどの求核剤が存在することにより進行する。第三工程のメチル化反応については炭酸カリウムを用いていることから、第三工程の反応が終了した溶液に直接

メタノールを添加すれば、第三工程からワンポットで化合物 16 に誘導できると考えた。

まず、第三工程からのワンポット反応を想定した場合の脱アセチル化反応の条件を決めるため、モデル実験を行うこととした。この実験では、メチル化反応液のモデルとして、第三工程が終了した反応液を想定し、化合物20をDMFに溶解させた溶液を用意した。この溶液に、炭酸カリウムと求核剤であるメタノールまたは水を添加して反応が進行するかどうか検証した。結果を表4.3-8に示す。

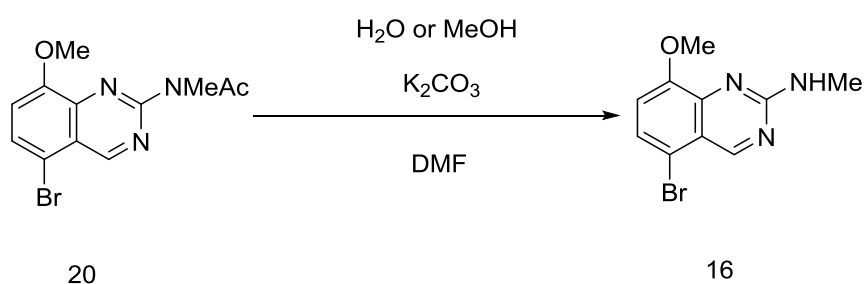


図 4.3-10 求核剤（水、メタノール）の検討

表 4.3-8 求核剤（水、メタノール）の検討

Run	求核剤	炭酸カリウム (eq)	収率
1	水	1.5	図 4.3-11 参照
2	水	3.0	
3	水	6.0	
4	水	9.0	
5	メタノール	1.5	

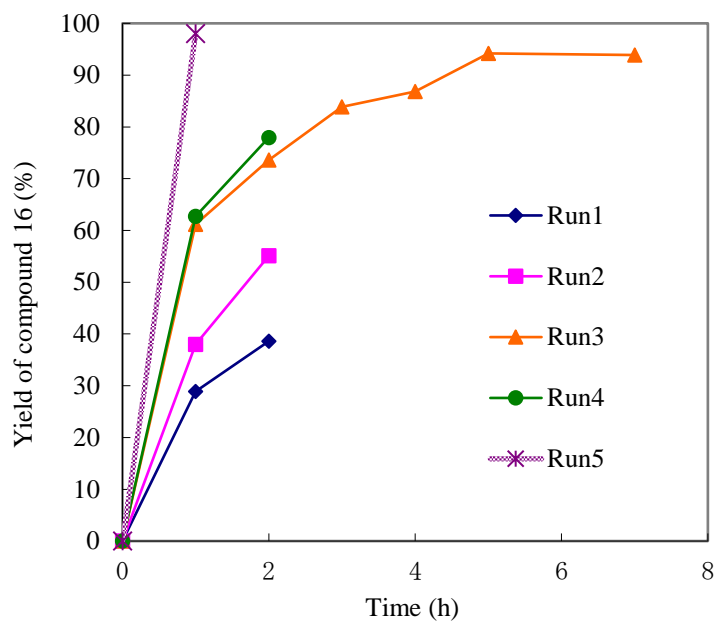


図 4.3-11 求核剤（水またはメタノール）の検討

求核剤に水を用いた場合（Runs 1~4）、反応が遅く、炭酸カリウムを6.0当量用いても反応完結には7時間を要した（Run 3）。一方、メタノールを用いた場合は、炭酸カリウム1.5当量で反応は1時間で完結した（Run 5）。以上の実験により、ワンポットでの脱アセチル化には、水よりもメタノールの方が適していると判断した。また、DMFが脱アセチル化反応に共存しても、問題なく反応が進行することも判った。

#### 4.4 各工程のテレスコーピング化の可能性の模索

前項で得られたメディシナル合成ルートの改良検討の結果を表4.4-1にまとめる。

表 4.4-1 メディシナル合成ルートの改良検討まとめ

工程	前項の結果	使用溶媒	使用試薬
第一工程	・既存法で問題ないと判断	DMA	・グアニジン炭酸塩
第二工程	・塩基のピリジンは不要 ・無水酢酸は多い方がよい ・DMAは少ない方がよい ・温度は高い方がよい	DMA	・無水酢酸
第三工程	・炭酸カリウムは多い方がよい ・ヨードメタン、温度、DMFは検討した範囲で任意に設定してよい	DMF	・炭酸カリウム ・ヨードメタン
第四工程	・求核剤には水よりもメタノールが良い	DMF	・メタノール

表4.4-1から判るように、第一工程と第二工程はDMAに溶媒が統一され、第三工程と第四工程はDMFに溶媒が統一されたことにより、それぞれテレスコーピング化ができる見込みが得られた。特に後者については、前項の検討結果により、第三工程の反応液にメタノールを添加することでワンポット化の可能性を確認している。一方、前者については、第一工程において、グアニジンの塩が大量に残存するため反応終了時には反応系が不均一となっていた。そこで、これらの塩を濾過する操作を導入し、両工程をテレスコーピング化させることを試みることにした。

上記テレスコーピング化が達成できた場合に、全ての工程をテレスコーピング化することは理想的であると考えたが、第二工程で得られる化合物19のDMAやDMFに対する溶解度が、他の中間体化合物17、18に比べて低かったため、単離の際に濾液へのロスが少なかった。この理由から、全ての工程のテレスコーピング化については検討しなかった。

## 4.5 各工程のテレスコーピング化検討

### 1. 第一工程と第二工程のテレスコーピング化

第一工程の反応が終了した溶液について、副生するグアニジンのフッ化水素塩や残存するグアニジン炭酸塩を濾過する操作を導入した。室温では、化合物18が析出するため、60°Cで濾過する操作を設けた。この濾液に無水酢酸を加え、アセチル化反応を行ったところ、問題なく反応が進行することを確認した。アセチル化反応が終了した後、冷却及び晶析し、化合物19を得た。

テレスコーピング化により第一工程での化合物18の結晶の単離による収率のロス（濾液への逃げ）が解消され、第一工程と第二工程の通算収率は、それぞれ単独で単離した場合の通算収率に比べ6%も向上した。テレスコーピング化で得られた化合物18の結晶の品質は、テレスコーピング化しなかった場合と同等であった。

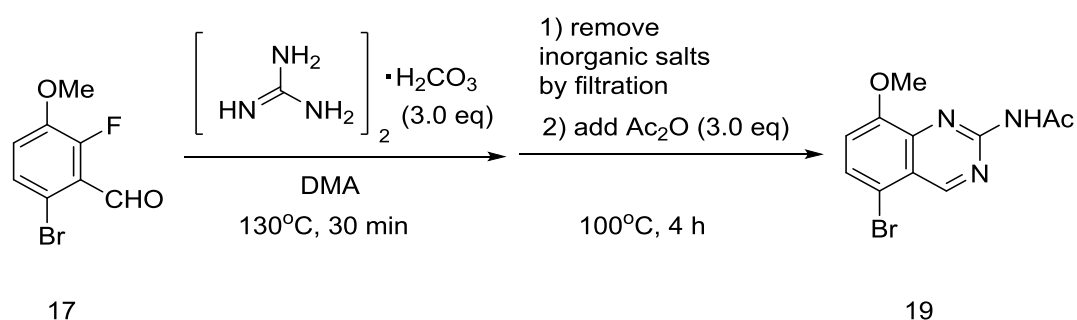


図 4.5-1 第一工程と第二工程のテレスコーピング化

表 4.5-1 テレスコーピング化前後の化合物 19 の品質

	スケール(g)	収率(%) <sup>a</sup>	結晶の純度(%) <sup>b</sup>
テレスコーピング化しない場合	3.0	83	99.6
テレスコーピング化した場合	3.0	89	99.5

a 第一工程と第二工程の通算の単離収率、b HPLC area (%)

### 2. 第三工程と第四工程のテレスコーピング化

第三工程の前項で決定した最適条件にてメチル化反応を実施し、その反応が終了した溶液に対し、メタノールを添加して脱アセチル化を試みた。その

結果、追加の炭酸カリウムを添加しなくても脱アセチル化が完結した。反応終了後、不溶の無機塩（炭酸カリウム及びヨウ化カリウム）が結晶中に取り込まれないようにするため、水を添加した。また、水は化合物16の反応終了後の溶液に対する溶解度を下げ単離収率を増やすためにも必要であった。結果を表4.5-2に示す。0.1 gおよび2.0 gの二つの条件で実施したが、いずれのスケールにおいても、化合物19からワンポットで化合物16をほぼ定量的に得ることができ、収率は8%も向上した。

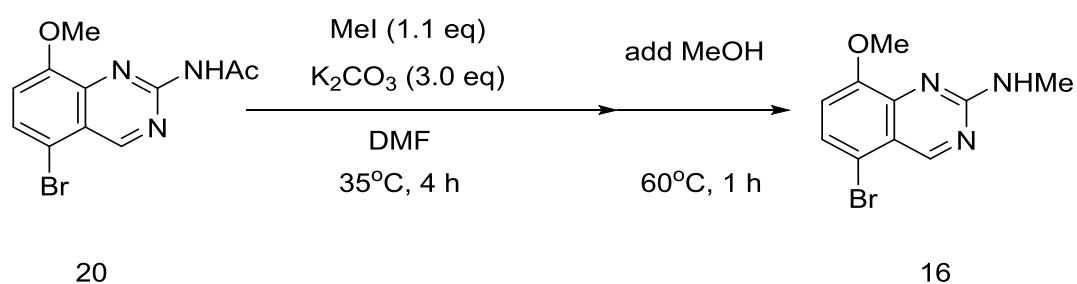


図 4.5-2 第三工程と第四工程のテレスコーピング化

表 4.5-2 テレスコーピング化前後の化合物 16 の品質

	スケール(g)	収率(%) <sup>a</sup>	結晶の純度(%) <sup>b</sup>
テレスコーピング化しない場合	2.0	86	98.6
テレスコーピング化した場合	0.1	94	98.3
	2.0	94	98.8

a 第一工程と第二工程の通算の単離収率、b HPLC area (%)

## 4.6 小括

メディシナル合成ルートによる化合物16の合成に対し、実験計画法により最適化を実施した。さらに、これらの結果を基に、第一工程と第二工程、及び第二工程と第三工程をテレスコーピング化した改良合成ルートを確認した（図4.6-1）。

この改良合成ルートは、メディシナル合成ルートと比較して、単離操作を必要とする工程数が半減し、全収率はメディシナル合成ルートに対して18%も向上した。また、得られた化合物16の品質に関しても、同等であることが確認できた（表4.6-1）。

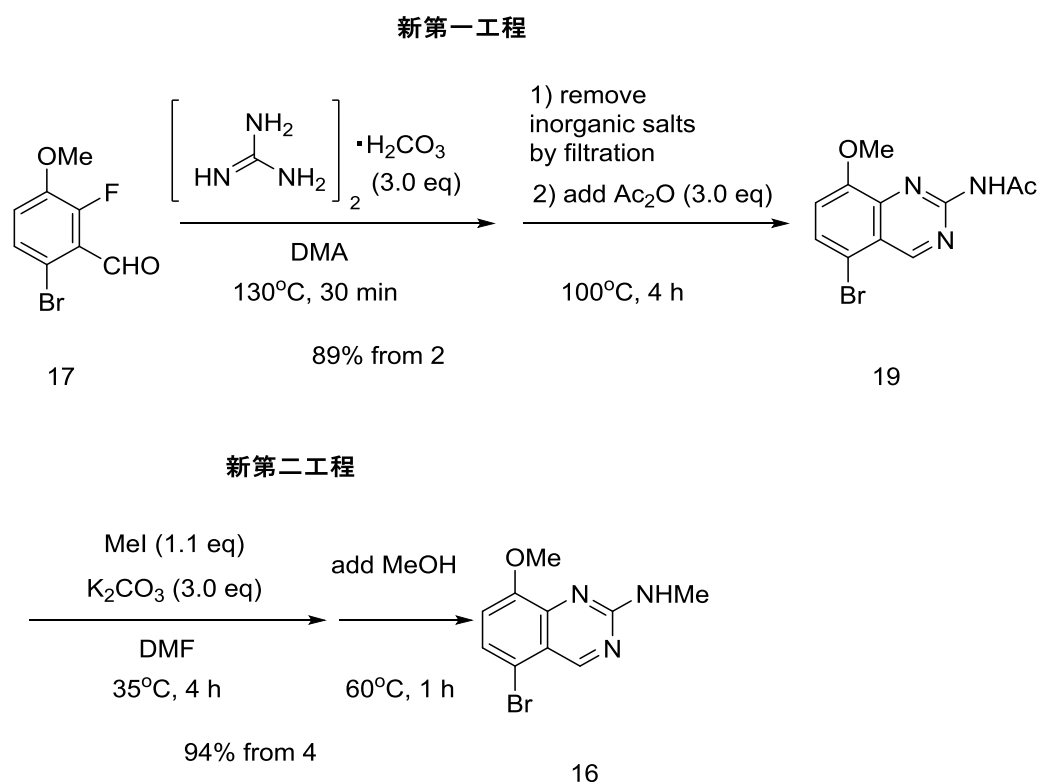


図 4.6-1 改良合成ルート

表 4.6-1 メディシナル合成ルートと改良合成ルートの比較

	工程数	通算収率 (%)	化合物 16 の純度 (%)
メディシナル合成ルート	4	66	98.8
改良合成ルート	2	84	98.6



## 4.7 実験

スペクトルデータについては、新規化合物のみ記載した。既知化合物については、得られたスペクトルデータと文献情報を基に同定した。測定機器は、<sup>1</sup>H-NMR の測定では日本電子 JNM-LA-300 を使用した。MS 測定では Micromass LCT を使用した。

### 化合物18の合成

炭酸グアニジン (3.48 g、19.3 mmol、3.0 eq) を DMA (16.5 mL) 溶液に懸濁し、アルゴン雰囲気下、130°C に昇温した。この溶液に化合物17 (3.00 g、12.9 mmol) の DMA (15.0 mL) 溶液を15分かけて滴下し、130°C で30分攪拌した。反応終了後、内温60°Cまで冷却し、水 (66 mL) を加えた。室温まで放冷し、0°C で1時間晶析した後、結晶を濾取し、40°C で減圧乾燥して化合物18 (淡黄土色結晶、2.78 g、86%) を得た。

化合物18: <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ 9.29 (s, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.47 (brs, 2H), 4.01 (s, 3H); MS ESI (+) *m/z* 254, 256 [M+H]<sup>+</sup>.

### 化合物19の合成

化合物18 (1.02 g、3.94 mmol) を DMA (10.0 mL) に懸濁させ、無水酢酸 (1.10 mL、11.8 mmol、3.0 eq) を添加し、アルゴン雰囲気下、100°C で4時間攪拌した。反応後、室温に放冷した後、0°C で1時間晶析した。析出した結晶を濾取し、40°C で減圧乾燥して化合物19 (白色結晶、1.08 g、96%) を得た。

化合物19: <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ 10.9 (brs, 1H), 9.46 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.29 (s, 3H); MS ESI(+) *m/z* 296, 298 [M+H]<sup>+</sup>.

### 化合物20の合成

化合物19 (2.00 g、6.76 mmol) の DMF (68.0 mL、34 v/w) 懸濁液に、炭酸カリウム (2.80 g、3.0 eq)、ヨードメタン (1.05 mL、2.5 eq) を順次に添加し、60°C で6.5時間攪拌した。反応液を室温まで冷却後、水 (20 mL、10 v/w) を添加し、氷冷下で1時間晶析した。析出した結晶を濾取し、50°C で減圧乾燥することにより、化合物20を (白色結晶、1.92 g、92%) 得た。

化合物 20:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz)  $\delta$  9.54 (s, 1H), 7.87 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.40 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 2.49 (s, 3H); MS ESI(+)  $m/z$  310, 312  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物 16 の合成

化合物 20 (1.00 g, 3.22 mmol) をメタノール (33.0 mL, 33 v/w) に懸濁し、炭酸カリウム (0.67 g, 1.5 eq) を添加して、60°C で 1 時間攪拌した。その後、水 (10.0 mL, 10 v/w) を添加し、氷冷下で 2 時間晶析した。析出した結晶を濾取し、50°C で減圧乾燥することにより、化合物 16 (黄色結晶、828 mg, 96%) を得た。

化合物 16:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 300 MHz)  $\delta$  9.26 (s, 1H), 7.29 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 5.46 (brs, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.17 (d,  $J = 5.1$  Hz, 3H); MS ESI(+)  $m/z$  268, 270  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 化合物 19 の合成 (化合物 17 からのテレスコーピング反応)

炭酸グアニジン (3.48 g, 19.3 mmol, 3.0 eq) の DMA (16.5 mL) 懸濁液を、アルゴン雰囲気下、130°C に昇温した。この溶液に化合物 19 (3.00 g, 12.9 mmol) の DMA (15.0 mL) 溶液を 15 分かけて滴下し、130°C で 30 分攪拌した。反応終了後、内温 60°C まで冷却してグアニジン塩を濾過し、DMA (11.0 mL) で洗浄した。その後、濾液を室温まで放冷し、無水酢酸 (3.64 mL, 38.6 mmol, 3.0 eq) を添加し、アルゴン雰囲気下、100°C で 4 時間攪拌した。反応終了後室温に放冷し、0°C で 1 時間晶析した。結晶を濾取し、40°C で減圧乾燥して化合物 4 (白色結晶、3.35 g, 89%) を得た。

#### 化合物 16 の合成 (化合物 19 からのテレスコーピング反応)

化合物 16 (2.00 g, 6.76 mmol) の DMF (20.0 mL, 10 v/w) 懸濁液に、炭酸カリウム (2.80 g, 3.0 eq)、ヨードメタン (462  $\mu\text{L}$ , 1.1 eq) を順次に添加し、35°C で 5 時間攪拌した。その後、メタノール (10.0 mL, 5 v/w) を添加し、60°C で 1 時間攪拌した。次いで、水 (20.0 mL, 10 v/w) を添加し、氷冷下で 1 時間晶析した。析出した結晶を濾取し、50°C で減圧乾燥することにより、化合物 16 (黄色結晶、1.76 g, 94%) を得た。

#### < HPLC 条件 >

全ての工程において HPLC 分析を行った。以下に条件を記載する。

カラム：Intact CD-C18 内径 4.6×75 mm

検出波長：254 nm

カラム温度：35°C

流速：1.0 mL/min

移動層：アセトニトリル/Buffer 溶液<sup>a</sup> = 2/5

保持時間：

化合物 19	4.0 min
化合物 18	5.3 min
化合物 16	10.0 min
化合物 20	12.2 min
内部標準	15.4 min

a 0.01 mol/L リン酸二水素カリウムと 0.01 mol/L リン酸水素二カリウムの混合水溶液、b 4-ヒドロキシ安息香酸プロピルを使用

#### 4.8 参考文献

1. Anderson, N. G. *Practical Process Research & Development*, Academic Press, 2000.
2. a) Kuroda, K.; Tsuyumine S.; Kodama, T. *Org. Process Res. Dev.*, 2016, 20, 1053.  
b) Bhalendo, D. S.; Arkala A. K. R.; Madhavi Y. V.; Nagaraju M.; Gade S. R.; Kumar U. K. S. Bandichhor R.; Dahanukar V. H. *Org. Process Res. Dev.*, 2015, 19, 1559.  
c) Dale D. J.; Draper J.; Dunn P. J.; Hughes M. L.; Hussain F.; Levett P. C.; Ward G. B.; Wood A. S. *Org. Process Res. Dev.*, 2002, 6, 767.
3. Hynes, J. B.; Cambell J. P.; Hynes, J. D. *J. Heterocyclic Chem.* 1995, 32, 1185.
4. Cvetovich, R; DiMichele, L. *Org. Process Res. Dev.* 2006, 10, 944.

## 5 総括

医薬品のプロセス化学の研究において、実験計画法を用いた最適化手法を導入し、以下の三つの事例について論じた。

1. 実験計画法による化学反応の最適化研究を実施するにあたり、過去に OVAT 法で経験のある Mannich 反応を検討した。2-Level Factorial Design 及び応答曲面法を実施することにより、過去の実績条件を再現するとともに、過去の OVAT 法による最適化では見いだせなかった新たな条件も見出すことができた。
2. 塩酸オロパタジンの新規合成ルートにおいて、鍵反応となるパラジウム触媒を用いた七員環形成反応に対して実験計画法を適用した。2-Level Factorial Design による結果から、副生物を含めた生成比に着目することにより反応のメカニズムを明らかにし、試薬量の最適化により最高収率 80%を達成する条件を見出した。また、応答曲面法により頑健な条件であることも確認した。
3. 2 位にアミノ基を有するキナゾリン化合物の既存合成ルートに対し、一部の工程について実験計画法を適用し反応の最適化を検討した。2-Level Factorial Design により得られた Half Normal Plot の情報を基に、一部の中間体の単離を省略したテレスコーピングな合成ルートを構築した。単離プロセスが全 4 工程が全 2 工程に削減され、品質を維持させつつ収率を 18%向上させた。

プロセス化学の分野では、反応の最適化においていわゆるチャンピオンデータが得られたとしても、再現性がなければ意味がないと考える。収率、純度などの得られた数値に対して深い考察を必要とする実験計画法や統計学的手法は、恒常的な生産を最終目標とするプロセス化学では必要なツールと考える。特に、最近では、ICH Q11 などの規制面からデザインスペースの活用が推奨されている。デザインスペースとは、恒常的に生産可能な製造条件を示すスペースのことで、これを求めるためにも実験計画法は必須となる。

海底に沈む山の頂をどのように見つければよいだろうか。海に長い棒を差し込むなどして山の頂を見つめようとすることになると思うが、闇雲に行っても労力がかかるだけである。OVAT法で臨んだとしても、本文中で記載した通り最高峰の頂に辿り着くとは限らない。この場合は、実験計画法的なアプローチにより海底の地図をつくることが重要となる。本研究では、実験計画法を用いて化学反応の地図（収率など）を描いて最適値を誘導できることを明らかにし、また、地図を描かないまでも統計的な情報から最適化のヒントを得て効率的に実験を進めることもできた。

実験計画法を用いたプロセス研究において、本研究で習得した使用時の注意点について以下に記す。

実験計画法に用いる因子の選択と、水準の設定は慎重にすべきである	選択していない因子の情報は得られない。水準の設定を誤ると最適化への道のりは遠回りとなる。
実験計画法による膨大な情報を解読する訓練は必要である。	実験計画法では、一つの実験のパッケージで膨大な情報が得られる。そこから必要な情報を抽出して解読する能力が求められる。
実験計画法には種々の計画が存在するが、どのように使うかは実験者の自由である。	<b>Factorial design</b> から応答曲面法の流れにこだわる必要はない。目的に応じて必要な計画を用いればよい。特に、 <b>Half Normal Plot</b> から得られる情報は重要で、影響の大きな因子を抽出し解析するだけでも対象とする化学反応の特徴を簡単に知ることができる。
化学が対象である場合、化学の知識は必要である。	得られた結果を解釈するには、化学の知識がないとできない。
少しは統計の知識が必要である。	最近では、ソフトウェアによって初心者でも実験計画法が使えるが、ある程度統計の内容が理解できないと、解析に困難をともなう。化学の分野に限らず、実務と統計の両方に造詣が深い研究者は少ない。

実験計画法のような統計的に得られた情報は、不偏的で網羅的である。また、この情報は計画に基づく統計的な結果であるため、第三者へ伝えやすい情報になっている。プロセス化学者にとって実験計画法による最適化手法は今後一層有用なツールになると考える。

## 略号表

DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacetamide
DMI	1,3-Dimethyl-2-imidazolidinone
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamide
EP	European Pharmacopeia
GMP	Good Manufacturing Practice
ICH	International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Resistration of Pharmaceutical for Human Use
ICH Q11	ICH の Quality に関する 11 番目のガイドライン：原薬の開発と製造（化学薬品及びバイオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品）ガイドライン
JP	Japanese Pharmacopoeia
USP	United States Pharmacopeia

## 研究業績リスト

### 主要論文

本論文は下記の論文をまとめたものである。

1. “A New Efficient Synthetic Route for the Synthesis of the Antiallergic Drug, Olopatadine Hydrochloride, via Stereospecific Palladium-Catalyzed Reaction”  
**Koichiro Nishimura** and Masahiko Kinugawa  
*Org. Process Res. Dev.*, **2012**, *16* (2), 225-231.
2. “Introducing telescoping process to synthesis of a key intermediate of drug discoveries using design of experiment”  
**Koichiro Nishimura** and Toshikazu. Saitoh  
*Chem. Pharm. Bull.*, **2016**, *64* (7), 1043-1046.

### 参考論文等

1. ジベンズオキセピン誘導体の製造方法  
**西村晃一郎**、衣川雅彦  
WO 2006/129781（本特許は、日本 5099830、中国 ZL200680010698.9、韓国 1001129 で成立）。
2. 書籍 最新医薬品製造プロセスにおけるスケールアップ事例集 「第3章 スケールアップに使用する実験計画法(DOE)による最適化手法」  
**西村晃一郎**  
技術情報協会、2004年、147-174。
3. 書籍 製造プロセスのスケールアップー正しい進め方とトラブル事例集  
「第7章 第1節 実験計画法を利用した製造プロセスのスケールアップ検討」  
**西村晃一郎**  
技術情報協会、2012年、305-328。



## 謝辞

本研究の発表の機会をお与え下さるとともに、本論文のご高閲とご指導を頂きました、奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 反応制御科学講座 垣内喜代三教授に深甚なる謝辞を表します。

また本論文の審査をお引き受け頂き、数々の有益なご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 菊池純一教授、上久保裕生准教授、森本積准教授に深く感謝いたします。

本研究を開始するにあたりご尽力頂きました、協和発酵工業株式会社 元堺研究所 所長 菅谷亨博士、元堺研究所 主任研究員 毛利慎一郎氏に深く感謝いたします。

本論文の発表の機会を与えて頂きました、協和発酵キリン株式会社 元合成技術研究所 所長 新井仁博士、元合成技術研究所 所長 因間寛哲氏、元合成技術研究所 主任研究員 今井栄一郎氏に深く感謝いたします。

本研究の共同研究者である、協和発酵工業株式会社 元堺研究所 プロセス開発研究グループ 主任研究員 衣川雅彦博士、元堺研究所 渥美敏幸氏、協和発酵キリン株式会社 元合成技術研究所 齋藤敏一博士、小川暁氏に深く感謝いたします。

英語論文作成の際に、ご助言頂きました奈良先端科学技術大学院大学 技術英語教師 中山裕木子氏に深く感謝いたします。

最後に、本論文作成を支えて頂いた、家族に深く感謝いたします。