

用于自动进行流动反应的过程流实时LC监测

Tanya Jenkins 及 Ernie Hillier
沃特世公司，美国马萨诸塞州米尔福德

应用效益

PATROL UPLC®实验室分析系统（PATROL UPLC® Laboratory Analyzer System）通过增加自动化的样品流在线LC监测以定量产物产率/纯度，帮助进行连续流动反应。可以为所有反应组分确定动力学特征，包括反应条件被优化时的低含量杂质和/或中间产物。

沃特世解决方案

Real-TIME LC™
UPLC®
PATROL UPLC Laboratory Analyzer系统
Empower™ 2软件
ACQUITY UPLC® 色谱柱化学品
Connections INSIGHT®

关键词

在线，生产线取样，流动反应，流动化学品，扩展

引言

为了优化化学合成工艺，制造商们都在采用一些新技术，如连续流动化学系统。连续流动反应的效益明显超过批量反应，包括提高了产物的产量和产率，更容易扩展，温度控制更好，以及制造过程更安全。确定一个流动反应的最佳条件对于确保产率最高的目标化合物和尽量减少需要对最终产物进行离析和净化步骤的二级产物的生成都是至关重要的。作为流动反应过程的一部分，最终产物反应动力学特征按温度、压力、线圈停留时间和反应物计量来描述。然而，这些信息都是通过液相色谱（LC）分析在反应后获得的，这就使得反应过程不连续，通常非常费时。离线分析会影响到结果，因为原料可能会继续反应，或者可能因暴露于空气而被改变。为了改善反应时间线和定量的可靠性，采用在线监测技术更为有利。光谱法或紫外法一直被用于获得有关主要产

物的定量信息。然而，这些方法产生的低含量杂质或中间产物以及形成动力学方面的信息很少。通过采用定量分离技术，例如在线LC，可显示关于最终产物和低含量杂质，同时自动化流动反应。另外，更多地了解反应情况，可改善制造业扩展的流程。这就保证了最大产率和最高纯度。

超高效液相（UPLC）非常适合监测流动反应的优化过程。这种色谱技术可提供高分离度、高灵敏度和高通量。随着色谱柱中颗粒直径的减小，分析分离所取得的效率会增加。另外，随着颗粒尺寸的变小，该分离过程的优化线性速度会增加。因此，色谱分离的运行会更快速且不影响分离度，同时可提供该技术用于实时LC分析所需的进样到进样循环时间。这样就允许快速和准确地描述流动反应的动力学特征，为最终反应条件提供了稳健的设计空间。

为了证明UPLC作为一种在线传感器的能力，描述了对连续流动反应的优化过程。UPLC作为反应优化的传感器，首先要求自动开发用于监测反应物种的分析方法。这是通过收集来自塞流反应的洗脱液和通过生产线取样分析来完成的。一旦UPLC方法的条件成立，UPLC系统就会直接配置为在线取样流式反应器。反应条件被改变，以量化有关最终产物和任何可能的过程杂质的最终浓度的每一个变量的影响。然后，利用该数据来确定最佳的流动反应条件。同样的分析UPLC方法也可以用来监测流动反应从台式规模到试验规模最终到制造规模的扩展情况。

PATROL UPLC实验室分析器系统（如图1所示），专门设计用于过程方法开发过程中的在线和/或生产线取样UPLC分析。带自动样品稀释的完全集成系统是ACQUITY UPLC系列产品的组成部分，所有方法可直接迁移至制造车间的PATROL UPLC过程分析器系统上。



图1 PATROL UPLC实验室分析器系统。

试验

用于证明自动流动反应进行的反应就是在二甲基甲酰胺 (DMF) 中温度升高的情况下向3,4-二氟硝基苯中加入吗啉, 如图2所示。流动反应在Uniqsis FlowSyn系统上进行, 并通过PATROL UPLC实验室分析器系统对洗脱液进行取样和监测。为了分析方法的开发, 通过将反应剂进样到反应线圈然后再收集流份收集器上的流份将FlowSyn配置为适用于塞流分析 (如图3所示)。然后在生产线取样进行分析, 以开发用于原始材料、最终产物和可能的杂质的定量的UPLC方法。一旦分析方法经过优化, PATROL UPLC实验室分析器系统就会直接配置为FlowSyn系统的出口。等份原料被自动采样并于在线模式下进样到UPLC系统 (如图4所示)。



图2. 向3,4-二氟硝基苯中加入吗啉。



图3. 为开发分析方法, Uniqsis FlowSyn系统被配置为适用于塞流分析。反应剂通过样品线圈 (A) 进样到反应线圈 (B)。洗脱液被直接收集到流份收集器 (C) 的样品瓶中。然后, 流份被作为PATROL UPLC实验室分析器系统中的生产线取样样品, 为在线监测开发分析方法。

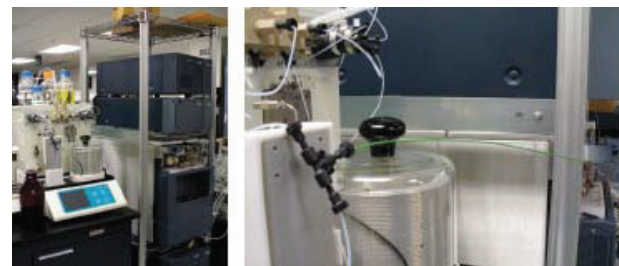


图4. 为了流动反应优化, PATROL UPLC实验室分析器系统通过Uniqsis FlowSyn系统进行配置, 用于流式反应器洗脱液的自动在线分析。

方法条件

分析方法开发的色谱条件

系统:	PATROL UPLC实验室分析器系统
数据分析:	Empower 2软件
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ , 2.1 x 50 mm, 1.7 μm ACQUITY UPLC BEH Phenyl 2.1 x 50 mm, 1.7 μm ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 x 5mm, 1.8 μm ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ 2.1 x 50 mm, 1.8 μm
样品:	DMF中的反应等份物
进样量:	2 μL
温度:	40°C
流速:	600 μL/min
洗脱液A1:	10 mM 甲酸铵, pH 3
洗脱液A2:	10 mM碳酸氢铵, pH 10
洗脱液B1:	乙腈
洗脱液B2:	甲醇
梯度:	5% ~ 95%B, 洗脱2分钟以上
检测:	245 nm, 20 Hz 正常
样品冲洗:	30秒
稀释:	100倍
针洗:	5 秒, 60:20:20 乙腈/二甲基甲酰胺/水溶液

最终色谱法

系统:	PATROL UPLC实验室分析器系统
数据分析:	Empower 2软件
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3, 2.1 x 5mm, 1.8 μm
样品:	DMF中的反应等份物
进样量	2 μL

温度: 60 °C
 流速: 1 mL / min
 洗脱液A: 10 mM 甲酸铵, pH 3
 洗脱液B: 甲醇
 梯度: 35% ~ 75%, 洗脱30秒以上; 保持15秒
 检测: 245 nm, 40 Hz 正常
 样品冲洗: 30 秒
 稀释: 100倍
 针洗: 5秒, 60:20:20 乙腈/二甲基甲酰胺/水溶液

结果与讨论

流动反应自动进行的第一步是开发用于监测流动反应流的UPLC方法。连接流式反应器进行塞流实验, 其中, 两种反应剂均进样到反应线圈, 而洗脱液则直接收集到样品瓶中。反应条件不必非常适合该实验, 但必须含有未反应的初始原料、最终产物以及任何反应副产物(通常, 这些条件可以通过批量反应条件估算)。含有洗脱液的样品瓶被加上条码, 并放入PATROL UPLC实验室分析器中。通过可选购的色谱柱管理器, 系统可以在不同的色谱柱化学品之间进行选择。二元溶剂管理器有四种可用于方法开发的不同溶剂(二种水溶液和二种有机洗脱液)。当生产线取样样品被加入系统中时, 样品瓶上的条码被读取, 系统启用在Empower软件中事先设计的分析筛选方案, 它可以检查方法pH值、有机修饰剂和色谱柱化学品对反应组分的最终分离的影响。样品的自动稀释程度也由条码指示, 以确保已进样样品组分的浓度在PATROL UPLC实验室分析器系统的线性范围之内。可以对通过筛选方案得到的最终色谱进行处理, 以确定可产生最佳反应组分分离度的条件(见图5)。一旦选定了色谱柱和洗脱液, 便启动二次筛选方案, 对分离温度、梯度条件和流速进行优化。通过这两种筛选方案, 便开发出一种能定量所有反应组分(包括高浓度终产物和低含量杂质)的UPLC方法。对于该分析, 吗啡没有发色团, 因此无法通过UV检测来进行分析。然而, 由于它是过量添加的, 在该流动反应中对其进行监测并不太重要。它可以通过增加补充的检测技术来进行分析, 如蒸发光散射(ELS)或质谱。对于这种反应, 初始筛选结果表明, 最佳结果是在以低pH值缓冲液和甲醇作为有机洗脱液的HSS T3化学品上取得的。通过二次筛选方案进行进一步优化产生的方法的运行时间为45秒(如图6所示)。



图5 塞流实验样品分析的筛选结果通过这些数据, 选定产生最佳波峰形状和分离度的分离条件进行进一步优化。

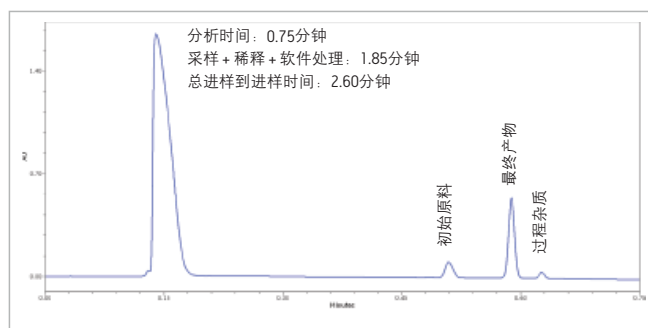


图6 流动反应媒介的最终梯度分离。

Uniqsis FlowSyn System专门设计用于自动流动反应的进行。可以对实验矩阵进行设置, 以评估线圈温度、反应计量、线图停留时间对最终产物的产率和纯度的影响。通过将本系统与PATROL UPLC实验室分析器系统连接, 可以全自动地检查这些不同反应条件中的任何一项。重要的是, 在反应稳态下为每一组条件收集足够数量的样品, 以确保实现可重复的定量(如图7所示)。这样会产生最佳的数据计量学分析结果。达到反应稳态的时间取决于反应线圈的几何参数(长度和内径), 因为通过开口管的液体的层流在实验开始和结束时都会使反应物分散。因此, 了解达到稳态条件所需的时间量是非常重要的。然后, 将该时间与在稳态下实现充分重复进样所需的时间相加, 以确定在自动化实验中反应条件多久改变一次。UPLC方法的最终运行时间为45秒, 采样和稀释额外需要的时间使进样到进样循环时间增加到2.6分钟。在自动化实验中, 每组反应条件都保持25分钟, 以确保稳态下足够的进样次数。

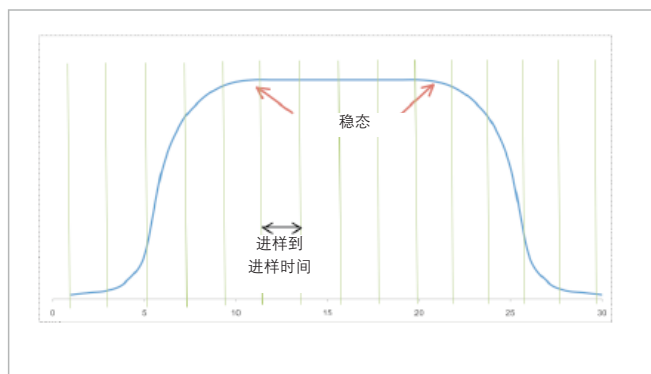


图7 确保在稳态下对每组反应条件下充足的等份物数量进行分析至关重要。在稳态下最少三个样品就支持对每个反应组分的可重复定量。

生成一个反应变量矩阵，以检查线圈停留时间、反应温度和反应物计量的影响。方法开发矩阵列示在表1中。这些变量可以编程至Uniqsis FlowSyn系统中，对序列进行初始化。通过PATROL UPLC实验室分析器进行的在线样品自动采集也开始了，支持无人值守运行。

序列完成时，两个系统均被程控为自动冲洗并停机。对最终色谱数据进行分析，以确定每个反应变量对终产物和过程杂质产率的影响。每种终产物和过程杂质的最终相对数量列于表1。这些变量的变化趋势如图8所示。该数据可以用于计量学分析，以确定最佳反应条件。最终的反应条件确定为1.5倍过量的吗啉、11分钟线圈停留时间和100°C的线圈温度。

这就导致终的产物的产率最大，形成的过程杂质最少。

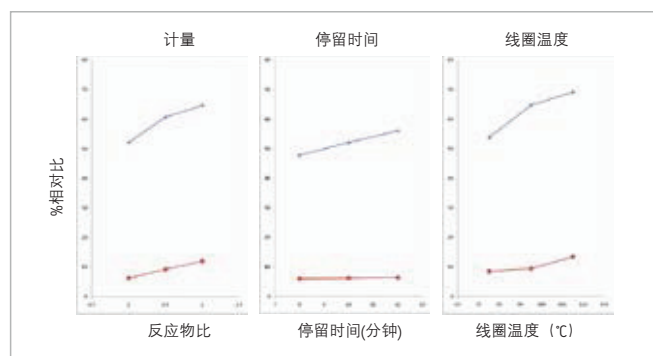


图8 每个流动反应变量及其对终产物（蓝）和过程杂质（红）形成的影响趋势图。

	停留时间 (分钟)	线圈温度 (°C)	反应物比	终产物比	过程杂质比
试验1	10	100	1:1	52.13	6.25
试验2	10	100	2:1	64.71	11.99
试验3	10	100	1.5:1	60.71	9.20
试验4	8	100	1:1	47.82	6.04
试验5	12	100	1:1	56.11	6.41
试验6	12	80	1.5:1	53.86	8.51
试验7	12	100	1.5:1	64.80	9.47
试验8	12	120	1.5:1	69.16	13.46

表1 流动反应优化变量及其对终产物和过程杂质相对数量的影响。

最终的流动反应条件可轻松地扩展至试验、工厂或制造规模，且PATROL UPLC过程分析器系统可用于在制造车间进行监测。通过监测使用UPLC的扩展过程和生产车间的最终过程，流动反应进行过程中收集到的信息可直接转移，以了解制造过程中的过程偏差。

结论

PATROL UPLC实验室分析器系统非常适合通过分析反应洗脱液的等份物来监测流动反应的进行和优化。结果可用于反映反应过程中所有物种的动力学特征，包括低含量过程杂质。系统可轻松地与Uniqsis FlowSyn系统连接，后者是一个自动台式流反应器。开发出的用于监测流动反应的方法可以迁移至PATROL UPLC过程分析器系统中，用于监测生产车间最终的流动反应。