Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

フローリアクションを自動化する リアルタイムLCプロセスモニタリング

Tanya Jenkins and Ernie Hiller
Waters Corporation, Milford, MA, U.S.

アプリケーションの利点

PATROL UPLC® ラボアナライザーシステムは、製品の収量と純度を定量化することを目的とし試料の流れを自動的にオンライン LC モニタリングすることによって、連続的なフローリアクションをサポートします。反応条件が最適化されることにより、微量不純物や中間産物をはじめとしてあらゆる反応成分の動態を測定することが可能になりました。

ウォーターズのソリューション

Real-TIME LC™
UPLC®
PATROL UPLC ラボアナライザー
Empower® ソフトウェア
ACQUITY UPLC® カラム
Connections INSIGHT®

キーワード

オンライン、アットライン、フローリアクション、フローケミストリ、スケールアップ

はじめに

現在多くの製造の場で化学合成プロセスを最適なものとすることを目的として、コンティニアスフローケミストリシステムのような新しい技術が活用されています。コンティニアスフローケミストリの利点としては、バッチ反応よりも優れ、スループットおよび収量が改善され、拡張性が広がり、温度管理が良好になり、製造工程の安全性が高まることなどが挙げられます。フローリアクションの至適条件を決定することは、目的化合物の最高収量を確実に得るだけでなく、最終製品化を行なう上での、分離行程や精製行程を必要とする二次生成を最小限に抑えるために、きわめて重要です。フローリアクションを行なう上で、最終製品の反応動態について、温度、圧力、コイル滞留時間および化学量論に関する特徴が明らかにされています。しかし、この情報は液体クロマトグラフィー（LC）分析によって反応後に得られるのが一般的であり、非連続で時間のかかるオフライン分析となることが問題でした。オフライン分析では、空気への曝露により一部が反応し続けるかまたは変化するおそれがあるため、結果については妥協せざるを得ない可能性があります。分析のスケジュールおよび定量的信頼性を改善するには、オンラインモニタリング法を利用することが有益です。従来、主要産成物に関する定量的情報を得るためには分光光度法または吸光度法が用いられてきました。しかし、このような方法では、微量不純物または中間産物に関する定量的情報はほとんど得られません。オンライン LC のような定量的分析法を用いることによって、最終製品および微量不純物に関する情報を明らかにすることが可能になり、同時に、フローリアクションの最適化を自動化することができます。また、反応に関する理解を深めることによって、製造までのスケールアッププロセスに改善がもたらされます。これによって、確実に収量および純度が最大となります。

UltraPerformance LC®（UPLC）の利点は、フローリアクション最適化のためのモニタリングに非常に適していることです。このクロマトグラフィー技術によって、分離性能、感度およびスループットが改善されます。クロマトグラフィーカラムの充てん剤粒子径が小さくなるにつれて、分離能が増大します。さらに、粒子径が小さくなると、分離における至適速度が増大します。このため、クロマトグラフィー分離は、リアルタイム LC 分析に用いる技術に必要な注入間サイクル時間を確保した上で、分離能を損なうことなく速やかに行うことができます。これによって、フローリアクションの動態に関する特徴を迅速かつ正確に明らかにすることができ、最終反応条件に対する頑健性が確保されます。

オンラインセンサーとして UPLC の能力を示すために、連続コンティニュアスフローリアクションの最適化について説明します。反応最適化のセンサーとして UPLC を利用するには、まず反応の種類をモニタリングする分析法の自動作成化が必要です。これは、プラグフローリアクションよる溶出物を採取し、アットライン分析を用いて分析することによって達成されます。UPLC の分析条件が決定されれば、UPLC はオンラインサンプリングのためにフローリアクターに接続することが出来ます。最終製品および工程中の不純物の最終濃度に対する各変数の影響を定量化するための反応条件はさまざまです。次に、このデータを用いて最適なフローリアクション条件を検討しました。同じ UPLC 分析条件を用いて、実験スケールからパイロットスケール、最終的には製造スケールへとスケールアップするフローリアクションをモニタリングすることができます。

図 1 に示されている PATROL UPLC ラボアナライザーは、プロセス反応の実行中にオンラインないしアットラインでの UPLC 分析を行うために設計されました。作成された分析条件は、ACQUITY UPLC ファミリーの一員である、試料の自動希釈機能を持つ、PATROL UPLC プロセスアナライザーに直接転送することができます。

図 1. PATROL UPLC ラボアナライザー

実験

フローリアクションの過程を示すために用いた反応は、図 2 のように、ジメチルホルムアルデヒド (DMF) を用いて高温下で 3, 4- ジフルオロニトロベンゼンにモルホリンを添加するものです。Uniqsis FlowSyn システムでフローリアクションを行い、溶出物を試料として採取し、PATROL UPLC ラボアナライザーを使用してモニタリングを実施しました。分析にあたっては、反応コイルに反応物を注入することによって、プラグフローリアクション分析用に FlowSyn を設定したのち、図 3 に示したようにオプションのフラクションコレクタを用いてフラクションを採取しました。次にアットラインで試料を分析し、出発物質、最終製品および不純物を定量するために UPLC 分析を行ないました。分析法が最適化されたのちに、PATROL UPLC ラボアナライザー FlowSyn システムのアウトレットに直接接続しました。反応物の一部を試料として自動的に採取し、図 4 に示しているようにオンラインモードで UPLC システムに注入しました。

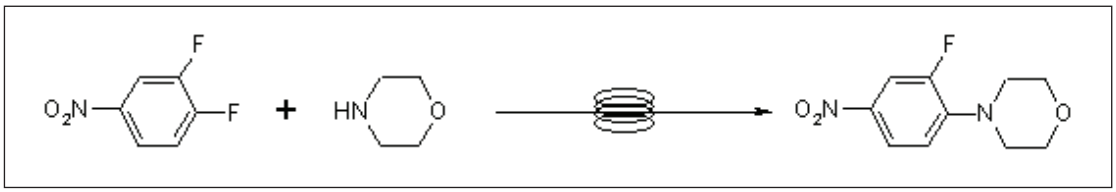

図 2. モルホリンを 3、4- ジフルオロニトロベンゼンに添加

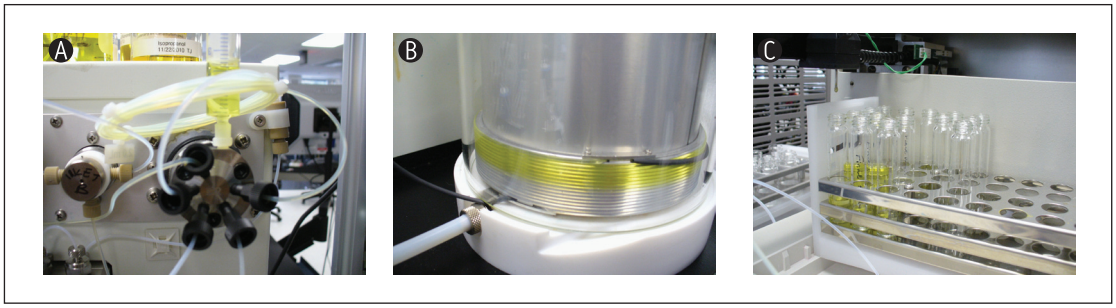

図 3. 分析法開発を実行するために、プラグフローリアクション用に Uniqsis FlowSyn システムを設定しました。(A) 試料コイルを用いて反応生成物を (B) 反応コイルへ注入しました。(C) フラクションコレクタの試料バイアルに直接溶出物を採取しました。次に、PATROL UPLC ラボアナライザーのアットライン試料として採取したフラクションを用い、オンラインモニタリング用に分析を行ないました。

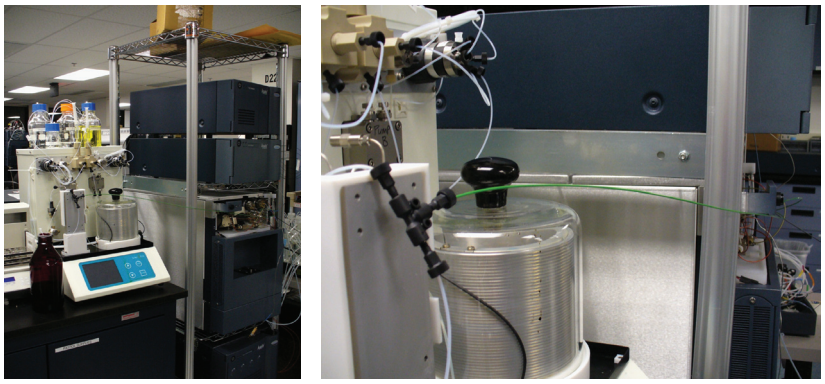

図 4. フローリアクションの最適化では、Uniqsis FlowSyn システムとあわせて、自動オンライン溶出物分析用に PATROL UPLC ラボアナライザーを使用しました。

条件

分析法開発を行なう際のクロマトグラフィー条件

システム：	PATROL UPLC ラボアナライザー
データ：	Empower 2 ソフトウェア
カラム：	ACQUITY UPLC BEH C_{18} 2.1 × 50 mm, 1.7 µm ACQUITY UPLC BEH フェニル 2.1 × 50 mm, 1.7 µm ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 × 50 mm, 1.8 µm ACQUITY UPLC HSS C_{18} 2.1 × 50 mm, 1.8 µm
試料：	DMF を含む反応物アリコート
注入量：	2 µL
温度：	40℃
流量：	600 µL/ 分
移動相 A1：	10 mM ギ酸アンモニウム pH 3
移動相 A2：	10 mM 重炭酸アンモニウム pH 10
移動相 B1：	アセトニトリル
移動相 B2：	メタノール
グラジエント：	B　2 分で 5% から 95% へ
検出：	245 nm, 20 Hz
サンプルフラッシュ：	30 秒
希釈：	100 倍
ニードル洗浄：	60 : 20 : 20 の ACN/DMF/ 水で 5 秒間

最終的に得られたクロマトグラフィー条件

システム：	PATROL UPLC ラボアナライザー
データ：	Empower 2 ソフトウェア
カラム：	ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 × 50 mm, 1.8 µm
試料：	DMF を含む反応物アリコート
注入量：	2 µL
温度：	60℃
流量：	1 mL/ 分
移動相 A：	10 mM ギ酸アンモニウム pH 3
移動相 B：	メタノール
グラジエント：	B　30 秒で 35% から 75% へ 15 秒保持
検出：	245 nm, 40 Hz
サンプルフラッシュ：	30 秒
希釈：	100 倍
ニードル洗浄：	60 : 20 : 20 の ACN/DMF/ 水で 5 秒間

結果および考察

自動フローリアクションの最初のステップは、フローリアクションを UPLC を用いてモニタリングするためのメソッドを作成することです。プラグフロー実験について、総ての反応生成物を、リアクションコイルからの直接注入と、試料バイアルにコレクションする両方の方法で検討しました。反応条件はこの実験にとって理想的である必要はありませんが、未反応の出発物質、最終製品および反応による副生成物を含有していなければなりません（通常このような条件はバッチ反応の条件から推定することができます）。溶出物の入った試料バイアルにバーコードを付け、PATROL UPLC ラボアナライザーに設置します。オプションのカラムマネージャを用いて、4 種類のカラムケミストリーを選択することが可能です。バイナリーソルベントマネージャでは 4 種類の溶媒をセットすることが可能です（水系移動相 2 種および有機溶媒系移動相 2 種）。アットラインで試料をシステムに導入するとき、試料バイアルのバーコードを読み取り、Empower ソフトウェアを用いて事前にプログラムされた分析スクリーニングプロトコルを用いて、pH、移動相に占める有機溶媒の組成比およびカラムケミストリーが反応生成物の最終的な分離に及ぼす影響を検討することができます。さらに、注入した試料成分の濃度が確実に PATROL UPLC ラボアナライザーの直線性範囲内となるように、試料の自動希釈濃度がバーコードによって認識されます。図 5 に示されているように、スクリーニングプロトコルから得られたクロマトグラムを処理して、反応生成物の最適な分離が与えられる条件を決定することができます。カラムおよび移動相が選択されていれば、二次スクリーニングプロトコルを実行、分離温度、グラジエント条件および流速を最適化します。このような 2 種類のスクリーニングプロトコルから、（高濃度最終製品および微量不純物を含む）全反応生成物を定量する高速 UPLC メソッドが作成されます。この測定法では、モルホリンに吸収がないため、UV 検出によって分析することはできません。しかし、モルホリンは過剰に添加されているため、このフローリアクションでモニタリングを実施することはそれほど重要ではありません。蒸発性光散乱（ELS）または質量分析法などのオプションの検出法を追加することによって分析が可能となりました。この反応では、最初のスクリーニング結果から、移動相の有機溶媒としてメタノールおよび低 pH 緩衝液を用い、HSS T3 カラムによって、最適な分離が達成されることが示されました。二次スクリーニングプロトコルをさらに最適化することによって、図 6 に示されているように分析時間を 45 秒とするメソッドが得られました。

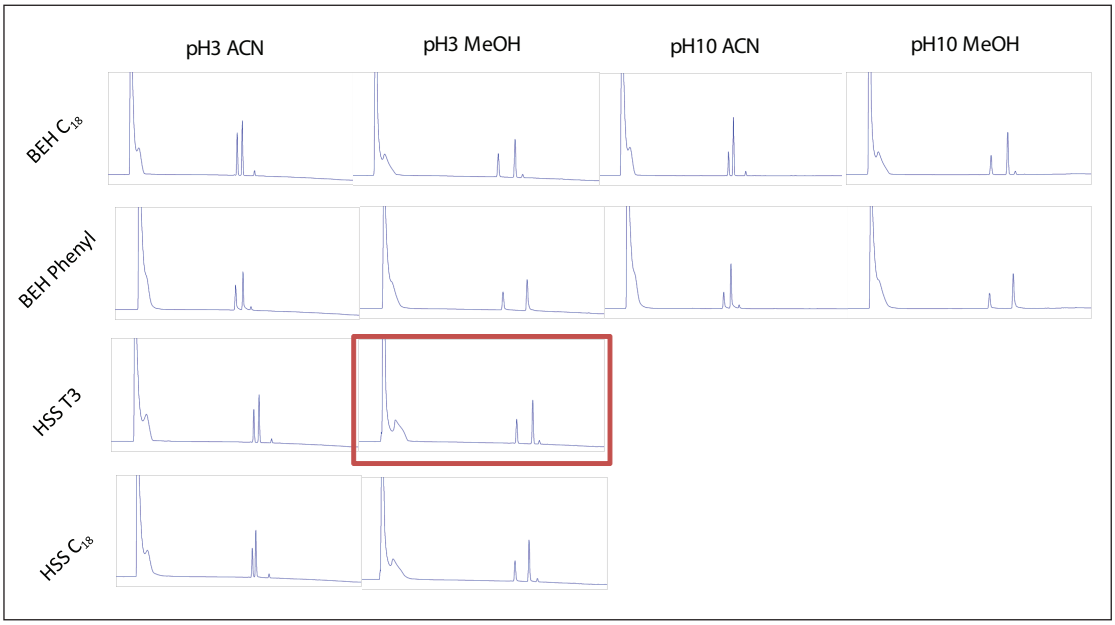

図 5. プラグフローリアクションの分析から得られたスクリーニング結果。このデータから、さらに最適化を行うために最良のピーク形状および分離をもたらす分離条件を選択します。

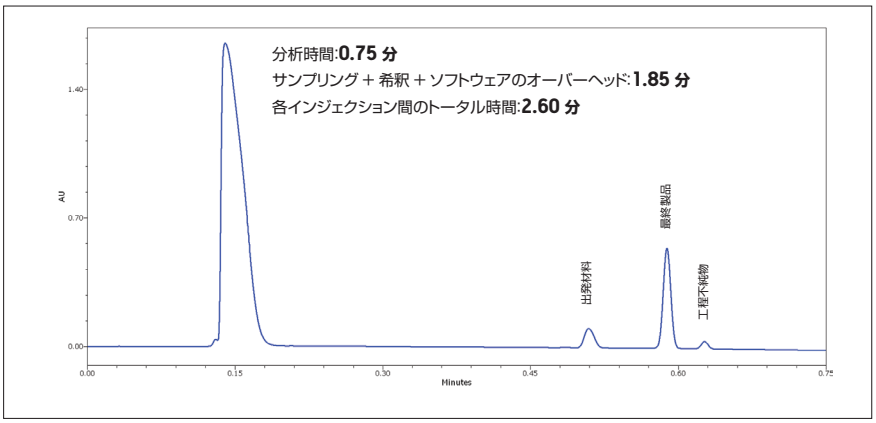

図 6. フローリアクション生成物の最終的なグラジエント分離

Uniqsis FlowSyn システムは自動フローリアクションシステムとして設計されています。コイル温度、反応の化学量論およびコイル滞留時間が収量ならびに最終製品の純度に及ぼす作用を評価するために、実験のマトリックスのプログラムを作成することができます。このシステムを PATROL UPLC ラボアナライザーと接続することによって、このようなさまざまな反応条件それぞれの検討を完全に自動化することができます。図 7 に示しているように繰り返し再現可能な定量試験を確実に行うには、反応定常状態での一連の条件について十分な数の試料を採取することが重要です。これによってデータのケモメトリクス分析を行なうのに最良の結果が得られます。チューブ開口部を通過した液体の層流は、試験開始時および終了時に反応生成物の拡散をもたらすので、反応定常状態へ達するまでの時間は反応コイルの形状やサイズ（長さおよび内径）に左右されます。このため、定常状態の条件を達成するのに必要な時間を把握することが重要になります。次に、自動化実験ではどの程度の頻度で反応条件を変化させることができるのかを明らかにするために、定常状態で十分な繰り返し注入を行うのに必要な時間に、上記の時間を加えます。UPLC 法の最終分析時間は 45 秒でしたが、サンプリングおよび希釈に必要な追加時間によって注入間サイクル時間が 2.6 分まで増大しました。自動化実験では、定常状態で十分な数の注入を確実に行うために、各一連の反応条件を 25.0 分維持しました。

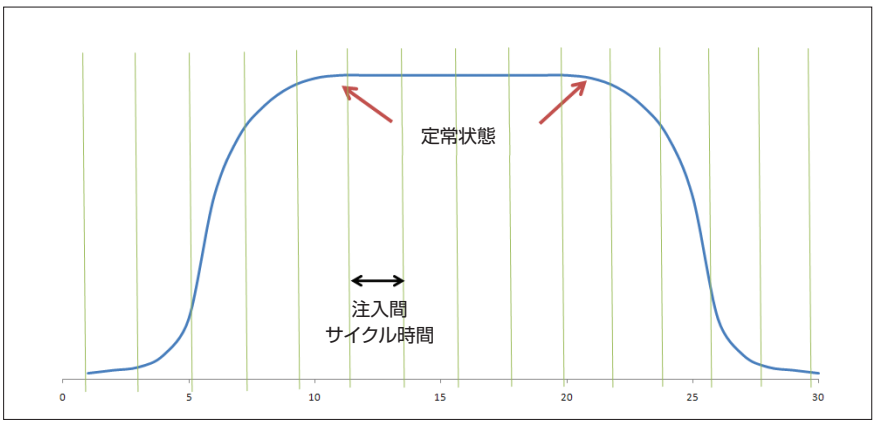

図 7. 各一連の反応条件で十分な数のアリコートを定常状態で確実に分析することが重要です。定常状態で最低 3 個の試料を用いれば、各反応成分の繰り返し定量を行うことができます。

反応変数のマトリックスを作成して、コイル滞留時間、反応温度および反応化学量論による影響を検討しました。表 1 に実験方法のマトリックスを一覧としてまとめました。このような変数のプログラムを Uniqsis FlowSyn システムに作成し、シーケンスを開始しました。PATROL UPLC ラボアナライザーによるオンライン試料の自動分析も開始し、無人で実行が可能になりました。

シーケンスを終了したときに、両システムのプログラムを自動的にフラッシュおよびシャットダウンを行うように作成しました。最終製品および工程不純物の収量に対する各反応変数の影響を明らかにするために、試験の結果得られたクロマトグラフィーデータを分析しました。表 1 に、各最終製品および工程不純物の相対量を一覧としてまとめてあります。図 8 に、このような変数それぞれの傾向を記載しています。最適な反応条件を明らかにするために、このデータをケモメトリクス分析に用いることができます。最終反応条件は、モルホリンが 1.5 倍、コイル滞留時間が 11 分、コイル温度が 100℃であることがわかりました。これによって、工程不純物の生成を最小限に抑え、最も多い最終製品の収量を得ることができました。

	滞留時間（分）	コイル温度（℃）	反応物の比率	最終製品の比率	工程不純物の比率
試験番号 1	10	100	1:1	52.13	6.25
試験番号 2	10	100	2:1	64.71	11.99
試験番号 3	10	100	1.5:1	60.71	9.20
試験番号 4	8	100	1:1	47.82	6.04
試験番号 5	12	100	1:1	56.11	6.41
試験番号 6	12	80	1.5:1	53.86	8.51
試験番号 7	12	100	1.5:1	64.80	9.47
試験番号 8	12	120	1.5:1	69.16	13.46

表 1.　フロー反応最適化変数と最終製品と工程不純物に及ぼすその影響

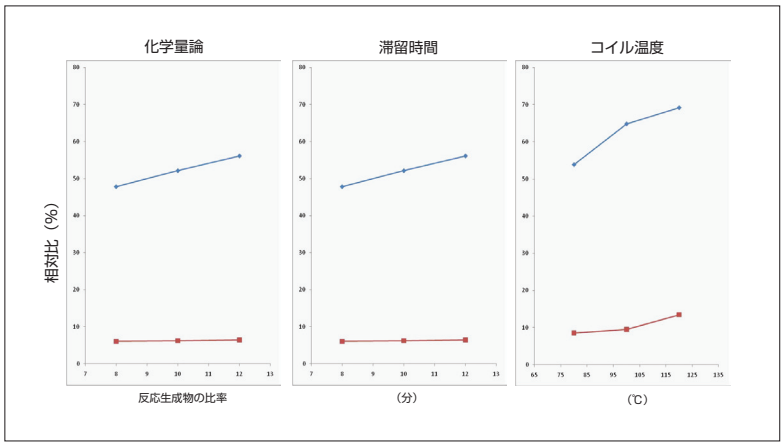

図 8. 各フロー反応変数と最終製品（青）および工程不純物（赤）の生成に対するその影響それぞれにみられる傾向のプロット。

最終的なフローリアクション条件は、パイロットスケール、プラントスケールまたは製造スケールまで容易にスケールアップすることができ、PATROL UPLC プロセスアナライザーシステムを製造現場でのモニタリングに用いることができます。UPLC を用いたスケールアッププロセスおよび製造現場での最終プロセスをモニタリングすることによって、製造工程でのプロセスからの逸脱を理解するために、フロー反応実行時に収集された情報を直接転送することができます。

結論

PATROL UPLC ラボアナライザーシステムは、反応溶出物のアリコートを分析することによって、フロー反応の実行および最適化をモニタリングするのに適した理想的なものです。その結果を用いて、微量工程不純物など、あらゆる種類の反応にみられる動態のマッピングを行います。このシステムは自動卓上フローリアクション装置 Uniqsis FlowSyn システムに容易に接続することができます。フローリアクションをモニタリングするために行なわれた方法は、製造現場での最終フローリアクションをモニタリングするために PATROL UPLC プロセスアナライザーに転送することが可能です。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社　www.waters.com
東京本社 〒140-0001　東京都品川区北品川1-3-12第 5 小池ビル　TEL 03-3471-7191　FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011　大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F　TEL 06-6304-8888　FAX 06-6300-1734
ショールーム　東京　大阪
テクニカルセンター　東京　大阪　名古屋　福岡　札幌

Waters、PATROL UPLC、UPLC、UltraPerformance LC、Connections INSIGHT、Empower および
ACQUITY UPLC は Waters Corporation の登録商標です。
Real-Time LC および The Science of What's Possible は Waters Corporation の商標です。
その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2013 Waters Corporation. Printed in Japan.　2013年1月 720004101JA　PDF