

Agilent 1260 Infinity II Prime オンライン LC/MS システムによる低分子反応時の低濃度副生成物の高感度検出



著者

Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity II Prime オンライン LC と Agilent LC/MSD iQ シングル四重極質量分析計を組み合わせた LC/MS システムによる、生成された副生成物の化学反応のオンラインモニタリングについて検討します。MSD iQ を導入することにより、化学反応を高い信頼性で制御するための低濃度不純物の同定において、感度と選択性が向上します。このアプリケーションノートでは、反応容器から直接サンプルを抽出して自動的に希釈/クエンチする、Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャの機能について紹介します。抽出物の SIM モードでの MSD iQ による相対定量、および反応中の迅速な結果表示について示します。実験の設定、制御、および結果の表示はすべて、Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアで実行しました。

はじめに

最新の低分子医薬品の製造プロセスでは、反応過程の抽出物や最終製品だけではなく、反応過程で生成される可能性のある不純物も制御することが非常に重要になります。このような不純物は、有用な医薬品有効成分 (API) を汚染する場合があります。この場合、高いコストの精製ステップを製造プロセスに追加する必要があります。主生成物および副生成物を生成するアルドール縮合反応を例にして紹介します (図 1)。¹

このアプリケーションノートでは、LC/MSD iQ を含む、Agilent 1260 Infinity II Prime オンライン LC/MS システムと Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアを組み合わせ使用する方法を説明します。オンライン実験は、シームレスに統合された Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアにより完全に制御しました。このソフトウェアは、リアクタからのサンプル吸引、サンプルの測定、および反応状況の結果表示をスケジューリングします。

実験方法

装置

- Agilent 1260 Infinity II フレキシブルポンプ (G7104C)
- Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャセット (G3167AA) :
Agilent 1290 Infinity バルブドライブ (G1170A) と外部バルブ (5067-6680) が搭載された Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャ (G3167A) と Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア
- Agilent 1290 Infinity II MCT (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)

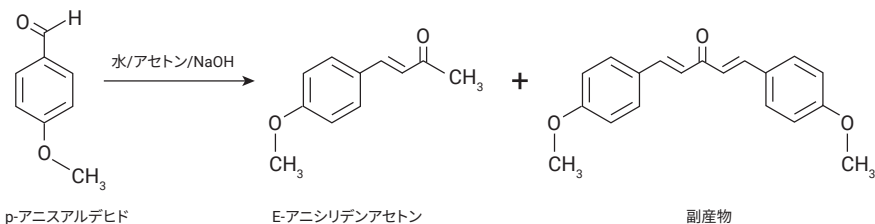


図 1. p-アニスアルデヒドおよびアセトンから主生成物 E-アニシリデンアセトンを生成するアルドール縮合反応と、二回のアルドール縮合によって生成する副生成物

カラム

Agilent InfinityLab Poroshell 120 カラム
EC-C18, 2.1 × 30 mm, 1.9 μm (部品番号
695775-302)

ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS リビジョン 2.6 以降
- Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア、v.1.0

分析メソッド

溶媒	A) 水 + 0.1 % ギ酸 (FA) B) アセトニトリル (ACN) + 0.1 % FA
カラム流量	1.3 mL/min
グラジエント	0.85 分で 40 % B ~ 90 % B ストップタイム: 1.0 分
カラム温度	45 °C
フィード注入 (自動)	流量の 80 %
フラッシュアウト溶媒 (S2)	水/ACN 10 % + 0.1 % FA
フラッシュアウト量	自動
注入量	1 μL
ニードル洗浄	3 秒、水/ACN 50 % + 0.1 % FA (S1)
サンプリング	サンプリングメソッドを参照
DAD	290 ± 4 nm、データレート 40 Hz

MSD iQ メソッド

自動メソッド設定値	ESI ソースおよびフラグメンタ電圧
極性	正
スキャンモード	m/z 100 ~ 500
SIM モード	m/z 137, 177, および 295

サンプリング (希釈)

リアクタからシリコンマットで密閉されたディープウェルプレートへのサンプリング	
ターゲット量	600 μL
希釈係数	100
サンプル量	6 μL
吸引スピード	設定値 2 (吸引スピード: 100 μL/min、待ち時間: 3.6 秒、 分注スピード: 130 μL/min (希釈前 のサンプルのウェルへの排出))
希釈溶媒	S2
希釈排出 スピード	10,000 μL/min (混合のためのサンプル 排出後)
スケジュール	間隔: 3 分、分析時間 90 分

サンプル送液ポンプ

ポンプ	Agilent 1260 Infinity II アイソクラティックポンプ、G7110B
流量	5 mL/min
溶媒の流路	反応容器からオンラインサンプル マネージャリアクタインタフェースへ、 そして反応容器へ戻る

反応条件

抽出物	p-アニスアルデヒド、1 mL
溶媒	100 mL アセトン:水 2:1 (v/v)
室温で攪拌	
反応開始	水に 100 μL NaOH 50 % を追加 (w/w)

試薬

- p-アニスアルデヒド
- アセトン
- NaOH
- ギ酸

その他の器具

- Agilent InfinityLab ディープウェルプレート、サンプリング用、31 mm、1 mL (部品番号 5042-6454)
- Agilent InfinityLab シリコンシーリングマット、ウェルプレート用 (部品番号 5043-9317)

溶媒と試薬

すべての溶媒はドイツの Merck 社から購入しました。試薬はドイツの VWR 社から購入しました。超純水は、LC-Pak Polisher および 0.22 μm メンブレンユースポイントカートリッジ (Millipak 社) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。

結果と考察

UV ベースの反応モニタリングと比較して²、Agilent 1260 Infinity II Prime オンライン LC システムにシングル四重極質量分析計を追加することにより、反応中のそれぞれの化合物の特異的かつ高感度な制御が可能になります。最も簡単に使用できるように設計されている LC の質量検出器である Agilent MSD iQ はこの目的に最適です。p-アニスアルデヒドおよび E-アニシリデンアセトンそれぞれについて、 m/z 133 および m/z 177 で SIM トレースをモニタリングすることにより、反応中の抽出物と製品を制御しました (図 2)。減少している化合物 p-アニスアルデヒドを図 2A に、増加している E-アニシリデンアセトンを図 2B に、ピーク面積のトレンドプロットとして示します。SIM のトレースは別の信号として取り込まれています。これらの化合物ではそれぞれのイオン化のしやすさが異なることでピーク面積が大きく異なっているため、相対ピーク面積パーセンテージは表示できません。

これらの化合物ではそれぞれイオン化のしやすさが異なることでピーク面積が異なるため、相対ピーク面積のパーセント率は信頼性のある反応の進捗状況の指標として使用することができません。この問題を克服するために、

p-アニスアルデヒドの初期濃度を 100 % の値とした 1 点キャリブレーションにより、抽出サンプルの SIM トレースの相対定量を実行しました。OpenLab Data Analysis で、水酸化ナトリウムを追加する前に吸引された最初のサンプルを使用してキャリブレーションを行いました。

した。キャリブレーションは、Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアのデータ解析メソッドによりすぐに適用されました。反応容器の相対量の下限を 5 % p-アニスアルデヒドに設定し、この値を下回った際に警告するようにしました (図 3)。

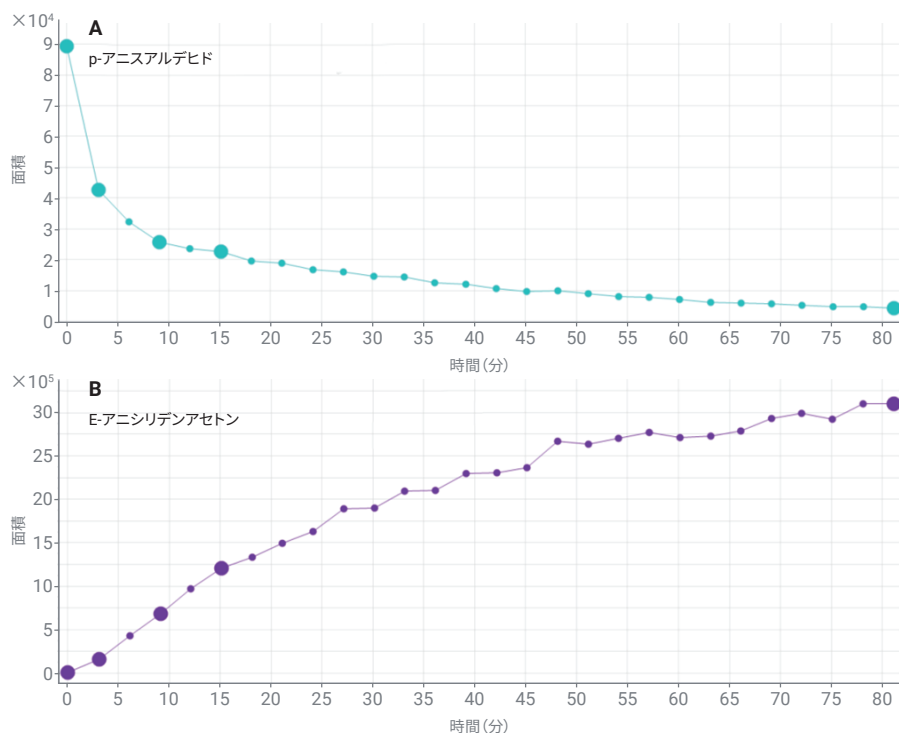


図 2. SIM モードで測定された反応抽出物 p-アニスアルデヒドおよび反応製品 E-アニシリデンアセトンのピーク面積のトレンドプロット。(A) 反応抽出物の面積が減少。(B) 反応製品のピーク面積が増加 (各ドットは、リアクタから吸引されたサンプルを表しています)。

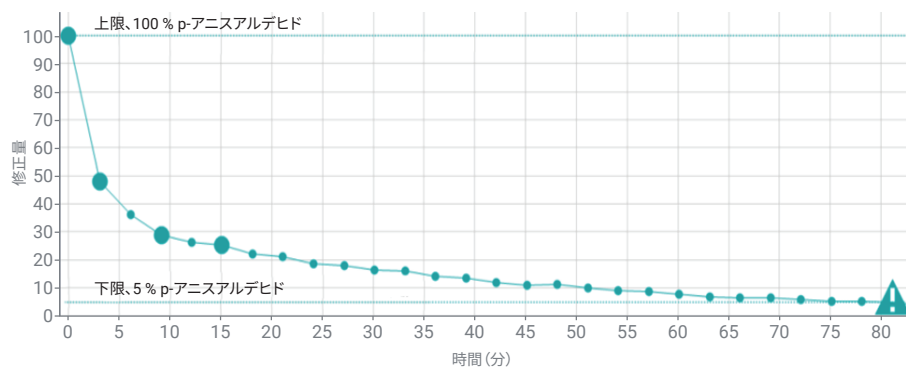


図 3. SIM のトレースによる反応抽出物 p-アニスアルデヒドの相対定量 (各ドットは、リアクタから吸引されたサンプルを表しています)。

反応開始時の最初に吸引されたサンプルでは、検出できたのは抽出物のみで、製品は検出できていません（図 4A の緑色のピーク、図 4B の赤色のベースライン）。反応時間 3 分に吸引された 2 番目のサンプルでは、抽出物は反応開始時の約半分の量に減少しており、一方で製品が検出されました（図 4A の青色のピーク、図 4B の緑色のピーク）。製品は非常に良好なイオン化挙動を示し、レスポンスが抽出物よりも約 5 倍高くなっています。反応時間 6 分ののに吸引された 3 番目のサンプルでは、抽出物の SIM トレースで約 1.8×10^4 の応答性を示しており、製品では約 0.1×10^6 でした。サンプル 28 では残留抽出物が 5% の下限を下回ったため、反応が完了したと見なしました。

さらに、生成される可能性のある不純物をモニタリングすることが可能です。ここで、 m/z 295 における溶出が遅い化合物、二段階のアルドール縮合により生成する副生成物が検出されました。このトレースも、SIM モードでモニタリングしました。測定したピーク面積をトレンドプロットに示しました。サンプル 4 の反応時間 9 分に副生成物が最初に検出されています（図 5）。トレンドプロットで強調表示されているサンプル中の副生成物の SIM トレースを図 6 に示します。二段階のアルドール縮合による副生成物は、グラジエントの 0.831 分に溶出しました。質量分析による検出の結果を表 2 にまとめて示します。抽出物では測定したピーク面積と高さは減少していますが、主生成物と少量の副生成物汚染は増加していました。

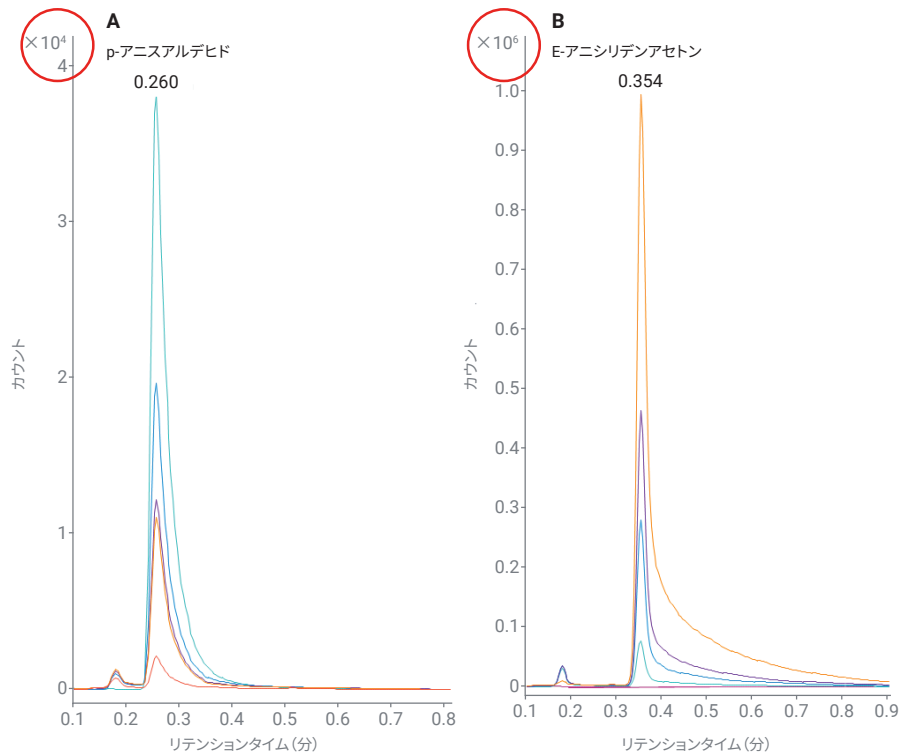


図 4. 反応過程の SIM トレース。(A) 抽出物 p-アニスアルデヒド (サンプル 1: 緑色、サンプル 2: 青色、サンプル 4: 紫色、サンプル 6: 赤色、サンプル 28: オレンジ色)。(B) 製品 E-アニシリデンアセトン (サンプル 1: 赤色ベースライン、サンプル 2: 緑色、サンプル 4: 青色、サンプル 6: 紫色、サンプル 28: オレンジ色)

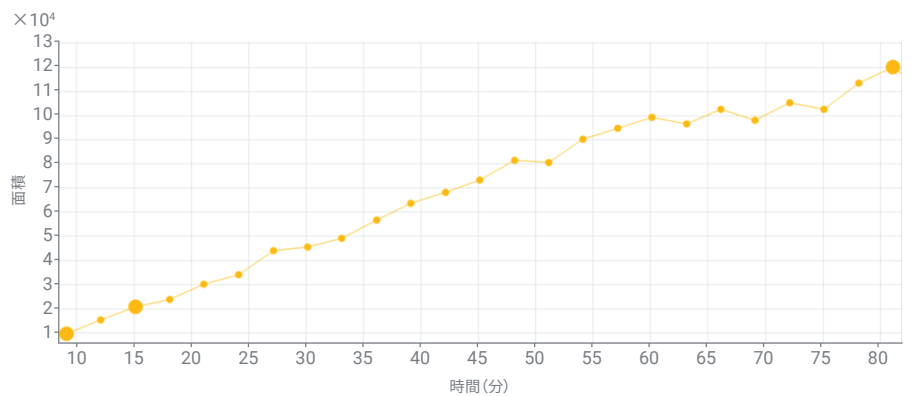


図 5. アルドール反応の途中に生成される少量の不純物の SIM ピーク面積のトレンドプロット (m/z 295) (サンプル 4、6、および 28 が強調表示されています)。

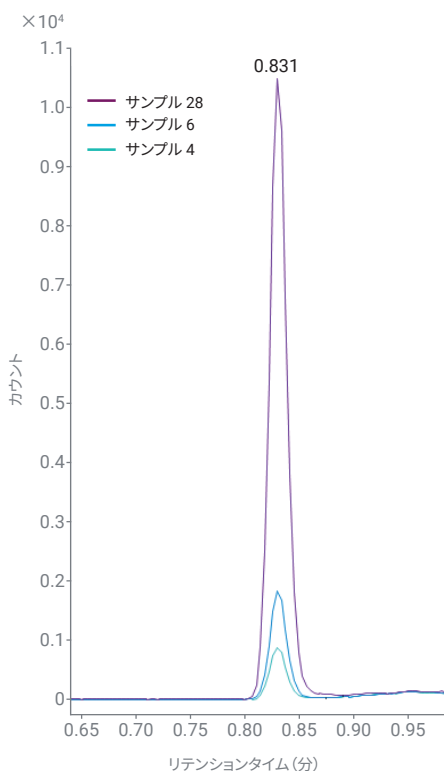


図 6. 二段階のアルドール縮合で生成された副産物の SIM トレース (m/z 295)

表 2. 反応の開始時、約 50 % の変換時、および終了時における選択したサンプルのアニスアルデヒドのアルドール縮合に関する質量分析モニタリングの結果

サンプル	化合物	RT (分)	修正量 (%)	面積	高さ
1	p-アニスアルデヒド	0.260	100.00	89,301	34,892
2	p-アニスアルデヒド	0.261	47.83	42,710	17,742
	E-アニシリデンアセトン	0.354		160,588	73,606
4	p-アニスアルデヒド	0.260	28.86	25,789	11,002
	E-アニシリデンアセトン	0.355		680,244	269,326
	アルドールダイマー	0.831		972	832
6	p-アニスアルデヒド	0.261	25.25	22,549	9,951
	E-アニシリデンアセトン	0.355		1,211,467	443,855
	アルドールダイマー	0.831		2,095	1,756
28	p-アニスアルデヒド	0.261	4.76	4,256	1,842
	E-アニシリデンアセトン	0.356		3,095,747	956,425
	アルドールダイマー	0.831		12,015	12,015

結論

Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャおよび低分子反応のモニタリング用の Agilent MSD iQ で構成される、Agilent 1260 Infinity II Prime オンライン LC/MS の使用方法について紹介しました。反応制御では、SIM のトレースに相対定量メソッドを使用し、指定した抽出物で下限値のアラームを使用しました。実験全体は、Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアで制御しました。化合物および生成された副生成物の同一性を、接続した Agilent MSD iQ により確認しました。リアクタからのサンプリングプロセスは、希釈/クエンチおよび分析で構成されており、完全に自動化されています。得られたサンプルは、他の分析手法なども含めて、後の確認で使用できます。反応分析時間では、信頼性の高いデータと迅速な結果が得られています。

参考文献

1. Viviano M. et al. A Scalable Two-Step Continuous Flow Synthesis of Nabumetone and Related 4-Aryl-2-butanones. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, 15, 858–870.
2. Automated Reaction Monitoring by the Agilent 1260 Infinity II Prime Online LC system. Agilent Technologies application note, publication number 5994-3980EN.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE44455.0872106481

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, March 16, 2022

5994-3981JAJP