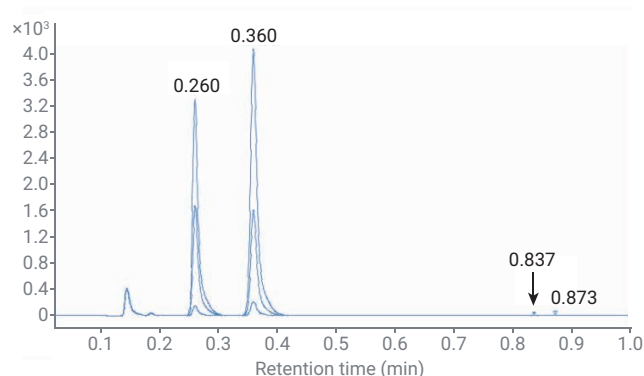


Agilent 1260 Infinity II Prime オンライン LC システムとハイダイナミックレンジ DAD による微量不純物のモニタリング



著者

Edgar Naegele
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、アジレントのハイダイナミックレンジ・ダイオードアレイ検出器（HDR-DAD）不純物分析ソリューションを含む、Agilent 1260 Infinity II Prime オンライン LC を用いた低分子反応のオンラインモニタリングを示します。異なる長さの Max-Light カートリッジフローセルを搭載した 2 つのクラスタ化されたダイオードアレイ検出器（DAD）である HDR-DAD を使用することで、高濃度の反応の出発化合物および生成物とともに、微量不純物の検出において、高いダイナミックレンジが実現します。広いダイナミックレンジにより、1 回のみの注入で、高濃度化合物および微量化合物の同時測定の時間を短縮することが可能です。直線範囲が広いので、検出器のオーバーロードなく、高濃度および微量の化合物の両方を定量できます。

はじめに

低分子医薬品有効成分 (API) の製造プロセスにおいては、反応の出発化合物と主生成物をモニタリングする必要がある一方で、多くの場合に化学反応条件下で生成される不純物をモニタリングすることも非常に重要です。低濃度の不純物とともに、高濃度の主成分が存在することから、分析を 2 回実行しなければならない場合があります。例えば、ダイオードアレイ検出による UHPLC 分析では、通常は 10 mm 光路長の検出器セルが使用されます。この場合、高濃度の化合物と低濃度の不純物を測定するために、別々の注入が必要になります。低濃度の化合物には、より大きな注入量が必要となり、これにより多くの場合に、高濃度の化合物では検出器のオーバーロードが生じます。このような問題を克服するために、HDR-DAD ソリューションでは、60 mm 高感度 Max-Light セル、および高含有量の化合物のための 3.7 mm Max-Light セルを搭載した 2 つの DAD を採用しています。両方の信号を組み合わせ、最大 6,500 mAU までのダイナミックレンジにより 10 mm セルに対しノーマライズします。標準の 10 mm DAD Max-Light セルを備えた Agilent 1290 Infinity II DAD で可能なダイナミックレンジと比較し、このダイナミックレンジはおよそ 3 倍の広さです。¹

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 と組み合わせた Agilent ハイダイナミックレンジダイオードアレイ検出器 (HDR-DAD) 不純物分析ソリューションにより、化学反応そのもののペースに対応しつつ、1 回の HPLC 分析で、発生する低濃度の不純物とともに高濃度の反応の出発化合物と生成物を測定し、このソリューションを使用することの利点について説明します。

実験

機器：

- 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 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャ (G3167A)、外部バルブ (部品番号 5067-6680) とクラスタ化した Agilent 1290 Infinity バルブドライバ (G1170A) および Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア
- Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- 2 台の Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)、60 mm Max-Light カートリッジセル (G4212-60007) と 3.7 mm Max-Light カートリッジセル (G4212-60032) を搭載
- Agilent ハイダイナミックレンジ DAD ソリューションキット (G2199AA)

カラム

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

ソフトウェア

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

試薬

p-アニスアルデヒド、アセトン、NaOH、ギ酸

その他

- Agilent 96 ディープウェルプレート、1 mL、ポリプロピレン (部品番号 5043-9305)
- Agilent シーリングマット、96 ウェル、丸型、スリット入り、シリコン (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) を装着した Milli-Q Integral システムで精製しました。

分析メソッド

パラメータ	値
溶媒	A) 水 + 0.1 % 酢酸 (FA) B) アセトニトリル (ACN) + 0.1 % FA
分析流量	1.3 mL/min
グラジエント	0.85 分で 40 ~ 90 % B、ストップタイム：1.0 分
カラム温度	45 °C
Agilent Feed 注入 (自動)	分析流量の 80 %
溶媒のフラッシュアウト	水:ACN 9:1 + 0.1 % FA (S2)
フラッシュアウト容量	自動
注入量	1 µL
ニードル洗浄	3 秒、水:ACN 1:1 + 0.1 % FA (S1)
サンプリング	サンプリングからバイアルに関するサンプリングメソッドを参照
ダイオードアレイ検出器	A) 290 ±4 nm、参照波長オフ B) 360 ±4 nm、参照波長オフ、40 Hz データレート
サンプリングからバイアル (希釈)	
リアクタからシリコンマットで密閉したディープウェルプレートにサンプリング	
ターゲットボリューム	500 µL
希釈係数	10
サンプル量	50 µL
吸引スピード	設定値 2 (吸引スピード：100 µL/min、待機時間：3.6 秒、分注スピード：130 µL/min (希釈前にウェルにサンプルを排出))
希釈溶媒	S2
希釈排出スピード	10,000 µL/min (サンプル排出後に混合)
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	
使用ポンプ	Agilent 1260 Infinity II アイソクラティックポンプ (G7110B)
流速	5 mL/min
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溶媒ストリーム	
反応条件	
出発化合物	<i>p</i> -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	100 µL の NaOH 50 % 水溶液 (w/w) を添加

結果と考察

低分子反応の例として、*p*-アニスアルデヒドとアセトンのアルドール縮合を使用しました。² この反応で、主生成物 *E*-アニシリデンアセトンと、アセトンとの第 2 縮合から低濃度の不純物が生成されます (図 1)。

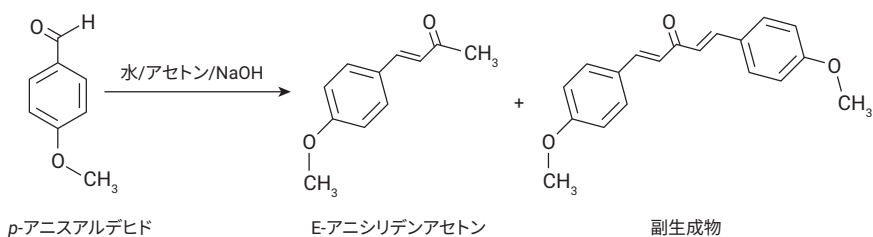


図 1. *p*-アニスアルデヒドとアセトンのアルドール縮合反応による主生成物 *E*-アニシリデンアセトンの形成。
2 番目のアルドール縮合により副生成物が形成されました。

この反応に対し、標準の 10 mm 光路長 Max-Light フローセルを搭載した DAD を用いて出発化合物と主生成物を簡単にモニタリングできました。³ 以前の研究では、Agilent LC/MSD iQ を使用して低濃度の不純物を測定しました。⁴ この構成は、より高い感度と質量選択性により、反応の発生段階と、反応条件の最適化のために最適です。ただし、生産条件下において、HDR-DAD ソリューションはより経済性が高く扱いやすく、高ダイナミックレンジにより 1 回の分析で、主要化合物とともに確認済みの低濃度の副生成物をモニタリングできます。

HDR-DAD クラスタは、60 mm および 3.7 mm 光路長のフローセルを搭載した 2 つの DAD で構成されています。長い光路長のセルを搭載した DAD は低濃度不純物を検出できるものの、高含有量の化合物は検出器の直線ダイナミックレンジを超えています。それに対し、短い光路長のセルを搭載した DAD は、直線ダイナミックレンジ内で高含有量の化合物を測定できます (図 2)。

ハイダイナミックレンジ (HDR) 信号の生成に対しては、2 つの DAD を電子的に結合し、10 mm 光路長に対してノーマライズします (図 3)。この信号を用いて、最大およそ 6,500 mAU までの優れた直線ダイナミックレンジにより、高含有量の化合物を定量することが可能です。並行して、HDR 信号には低濃度の化合物も存在します。減少する出発化合物 *p*-アニスアルデヒドは 0.26 分で溶出し、増加する生成物 E-アニシリデンアセトン は 0.36 分で溶出します。2 番目のアルドール縮合反応による低濃度の副生成物 (以前のアプリケーションノートで説明したようにすでに確認済み) は 0.837 分で溶出しました。⁴

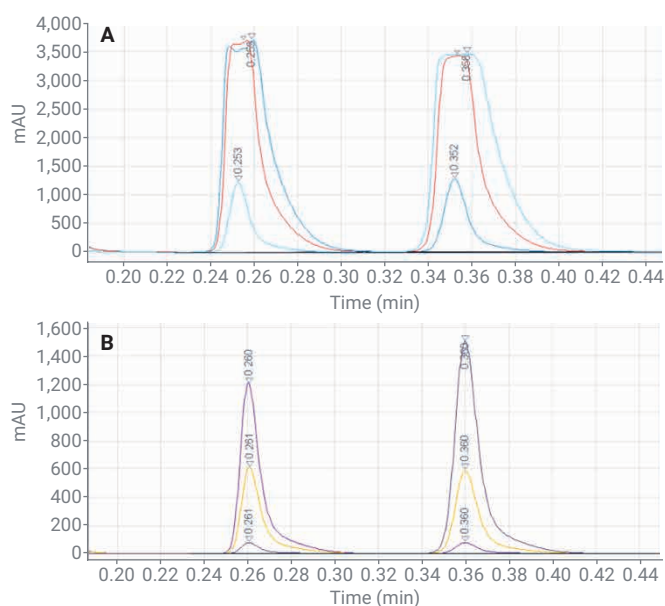


図 2. (A) 長い光路長 (60 mm) のフローセルを搭載した DAD の信号。高含有量の化合物はダイナミックレンジを超過し、定量できません。より低い含有量の化合物は検出可能です。(B) 短い光路長 (3.7 mm) のフローセルを搭載した DAD の信号。高含有量の化合物は DAD の直線ダイナミックレンジを超過せず、定量が可能です。

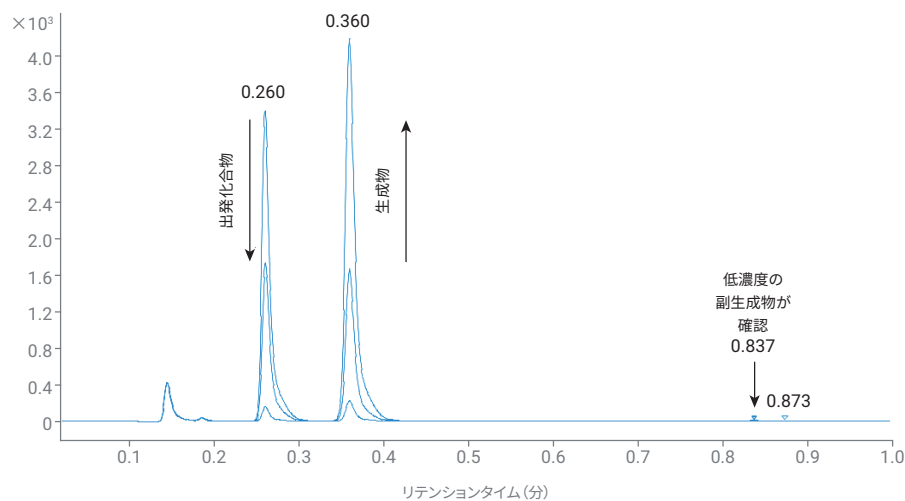


図 3. この図は、長い光路長と短い光路長のフローセルを組み合わせたハイダイナミックレンジ信号 (290 nm) を示しています。この複合信号は、高含有量の主要化合物の測定に対して広いダイナミックレンジを、低濃度の不純物の測定に対しては十分な感度を提供します。

HDR-DAD 信号に基づき、出発化合物、生成物、副生成物の面積パーセント率のトレンドプロットは、オンラインモニタリングソフトウェアによって作成しました。このプロットは、リアルタイム分析の結果を使用して即時にレビューできます (図 4)。3 分に吸引された 2 番目のサンプルは、出発化合物から生成物へのある程度の変換を示していますが、副生成物には変換されていません。副生成物は、15 分の反

応時間に吸引されたサンプル 6 で初めて登場します。90 分の反応時間の最後には、出発化合物はほぼ完全に生成物に変換されており、副生成物は低濃度のまま維持されています。

表 1 に、図 4 に表示されたサンプルのリテンションタイム、面積、高さ、面積パーセント率、補正済み量 (1:10 希釈) の測定値を詳細に示します。サンプル 6 において、出発化合物と生成物の面積パーセント率は同程度です。

サンプル 6 は、0.023 という非常に低い面積パーセント率で副生成物を示す最初のサンプルでもあります。出発化合物と生成物の UV レスポンスは異なるため、広い直線ダイナミックレンジで HDR-DAD により測定した出発化合物 *p*-アニスアルデヒドに対してのみ、相対 1 ポイント検量線を作成しました。そのために、サンプル 1 の出発化合物の濃度を 100 % としました (図 5)。サンプル 2 では、残留出発

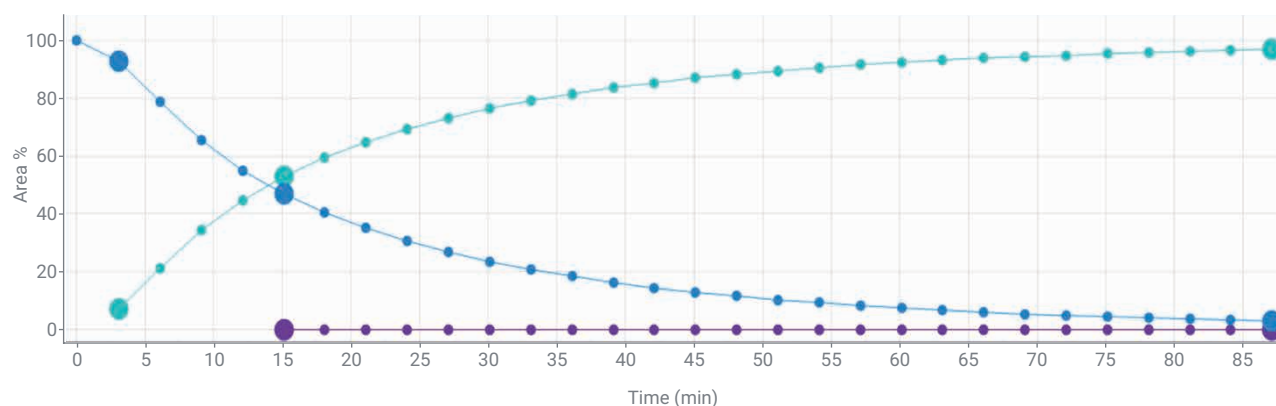


図 4. 出発化合物 (青)、生成物 (緑)、副生成物 (紫) の面積パーセント率のトレンドプロット

表 1. サンプル 1、2、6、および 30 のリテンションタイム、面積、高さ、面積パーセント率、補正済み量の詳細な測定値

サンプル	化合物	RT (分)	面積 %	補正済み量 (%)	面積	高さ
1	アニスアルデヒド	0.260	100.000	100.000	4,712.930	6,320.723
2	アニスアルデヒド	0.260	92.956	50.386	2,374.678	3,269.193
	アニシリデンアセトン	0.360	7.044		179.961	211.639
6	アニスアルデヒド	0.261	46.971	25.275	1,191.190	1,661.330
	アニシリデンアセトン	0.360	52.913		1,341.879	1,606.135
	副生成物	0.837	0.023		0.585	0.762
30	アニスアルデヒド	0.261	3.005	2.284	107.655	149.913
	アニシリデンアセトン	0.360	96.818		3,468.538	4,050.824
	副生成物	0.837	0.122		4.354	5.719

化合物が 50.3 %、サンプル 6 が 25.3 % と示されています。下限として、5 % の規制値を入力しました。この限界値はサンプル 22 で達しておらず、反応時間の終了時に、サンプル 30 で 2.3 % にまで低下しました。

トレンドプロットと検量線は、290 nm の波長で取得しました。すべての化合物がこの波長でレスポンスを示すからです。ただし、この波長は、副生成物の検出に対しては最適ではありません。最適な波長は 360 nm です。あいにくにも、この波長において出発化合物はレスポンスを示しません。したがって、360 nm

の波長は HDR-DAD により第 2 チャンネルでモニタリングしました。これにより、出発化合物の検出に対し、より高いピークで優れたレスポンスが得られました (図 6)。

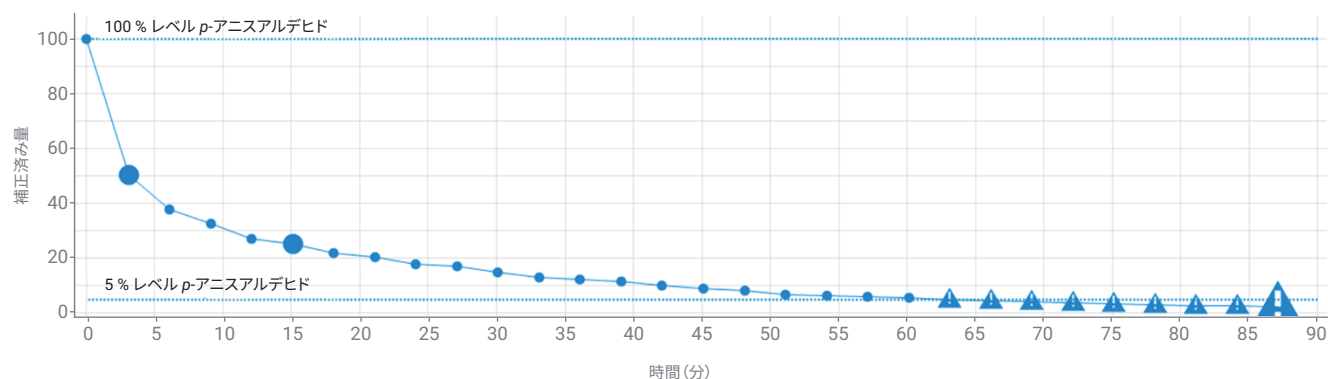


図 5. この図は、HDR-DAD による *p*-アニサアルデヒドの相対定量を示しています。下限スレッショルド未満の値には、警告マークのある三角形が記されています。

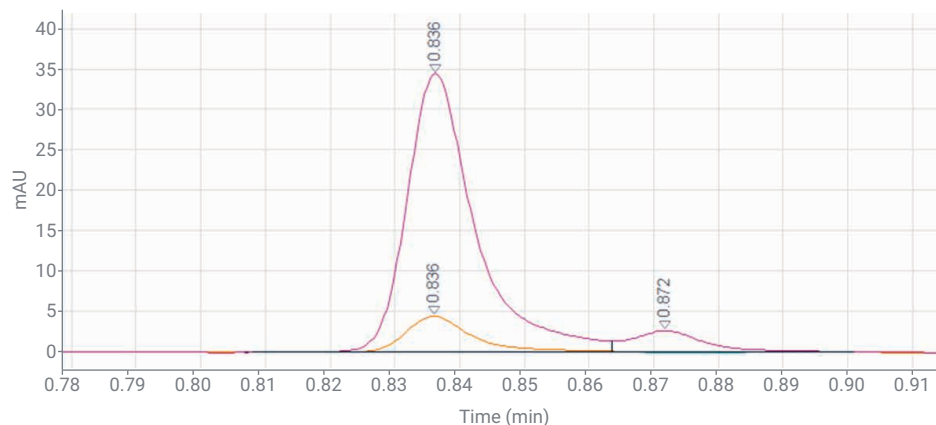


図 6. このグラフは、二重縮合からのアルドール反応の副生成物のピークを重ね表示したものです。反応時間の開始時と終了時におけるサンプル 6 (オレンジ) とサンプル 30 (紫) (360 nm)

結論

このアプリケーションノートでは、HDR-DAD 搭載のアジレント機器が、優れたダイナミックレンジにより、低分子反応における低濃度不純物を高濃度の出発化合物や生成物と同時に 1 回の分析で検出する性能を示しました。高濃度化合物と微量化合物の測定において、優れたダイナミックレンジにより、1 回のみの注入で時間を短縮することが可能です。広い直線ダイナミックレンジにより、高濃度化合物の絶対定量および相対定量を実現できます。

参考文献

1. Agilent 1290 Infinity II HDR-DAD 不純物分析ソリューションを用いた合剤の不純物分析. アジレント・テクノロジーアプリケーションノート、資料番号 5991-5743JAJ, **2015**.
2. 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.
3. Automated Reaction Monitoring by the Agilent 1260 Infinity II Prime Online LC System. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-3980EN, **2021**.
4. 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. アジレント・テクノロジーアプリケーションノート、資料番号 5994-3981JAJ, **2021**.

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おりません。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。

DE78075468

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2021

Printed in Japan, December 9, 2021

5994-4391JAJ