

利用液相色谱法实时监测自动流动反应的过程溶液

Tanya Tollifson, Ernie Hillier

Waters Corporation

摘要

PATROL UPLC过程分析系统非常适合用于分析流动反应的过程溶液，根据得到的分析结果绘制反应中所有物质（包括微量工艺杂质）的动力学图，以此来监测流动反应的开发和优化过程。该系统可轻松连接自动化台式流动反应器Uniqsis FlowSyn系统。我们可以将开发的连续流反应监测方法转移到PATROL UPLC过程分析系统，用于监测最终的流动反应，该系统具有简单的用户界面，可轻松部署到生产环境中。

优势

PATROL UPLC过程分析系统有助于开发连续流动反应。该系统采用灵活的部署方式，可对反应溶液进行自动化的在线LC监测，用于定量产品产率或纯度。通过优化反应条件确定所有反应组分（包括微量杂质和/或中间体）的动力学，从而减少商业化投资。

简介

为了优化化学合成工艺，制造商不断部署新技术，例如连续流动化学系统。连续流动反应的优势显著优于批处理反应，包括产品通量更高、产率更高、工艺可扩展性更强、温度更易控制、生产过程更安全等。确定流动反应的理想条件至关重要，不仅要确保目标化合物获得更高产率，还要尽量减少副产物的形成，避免可能需要对最终产

物进行分离或纯化步骤。在连续流反应的开发过程中，我们根据温度、压力、线圈驻留时间和反应物化学计量比来表征终产物的反应动力学。然而，这些信息通常是在反应后通过液相色谱(LC)分析获得的，导致开发过程不连续且往往非常耗时。离线分析可能会影响结果，因为样品可能会继续反应，或者由于暴露于空气中而发生变化。部署在线监测技术有助于缩短开发时间并提高定量可靠性。过去使用光谱或UV方法来获取主要产物的定量信息，但这些方法几乎无法对微量杂质或中间体及其形成的动力学提供定量信息。采用在线LC等定量分离技术，不仅可以了解终产物和微量杂质的相关信息，同时还能自动优化流动反应。此外，增加对反应的了解可以促进生产工艺的规模进一步扩大，确保尽可能提高产率和产品纯度。

UltraPerformance LC (UPLC)的诸多优势非常适用于监测流动反应的优化，这项色谱技术提供了更高的分离度、灵敏度和通量。色谱柱填充颗粒的直径越小，分析分离的效率越高。此外，粒径越小，分离时的优化线速度越高。因此，色谱分离的运行速度可以更快，且分离度不受影响，与此同时，进样之间的运行周期也能满足实时LC分析的需求。这有助于快速准确地表征流动反应的动力学，为最终反应条件提供稳定的设计空间。

本文通过说明连续流动反应的优化过程，来展示UPLC作为在线传感器的强大功能。在反应优化过程中部署UPLC作为传感器时，首先需要自动开发用于监测反应物质的分析方法。具体方法是收集平推流反应产生反应溶液进行旁线分析。确定UPLC方法条件后，可将UPLC系统直接配置到流动反应器上进行在线采样。通过改变反应条件来定量分析每个变量对终产物和任何可能存在的工艺杂质的终浓度的影响。然后使用这些数据确定流动反应的理想条件。从小试到中试，再到规模化生产，流动反应的放大过程都可以使用相同的UPLC分析方法进行监测。

PATROL UPLC过程分析系统具有自动化样品稀释功能，可在工艺方法开发过程中用于在线和/或旁线UPLC分析。所有方法都可以直接转移到生产环境中。

实验

自动开发的流动反应是在高温和二甲基甲酰胺(DMF)存在的条件下，向3,4-二氟硝基苯中加入吗啉，如图1所示。在Uniqsis FlowSyn系统上运行流动反应，使用PATROL UPLC过程分析系统对洗脱液进行采样和监测。在分析方法的开发过程中，FlowSyn系统的作用是进行平推流分析，具体做法是将反应物进样到反应线圈中，然后使用选配的分馏收集器来收集馏分（如图2所示）。随后对得到的样品进行旁线分析，开发出用于定量分析原料、终产物和潜在杂质的UPLC方法。完成分析方法的优化后，将中试规模的PATROL UPLC过程分析系统直接配置到FlowSyn系统的出口。系统会自动采集样品并进样到UPLC系统中进行在线分析，如图3所示。

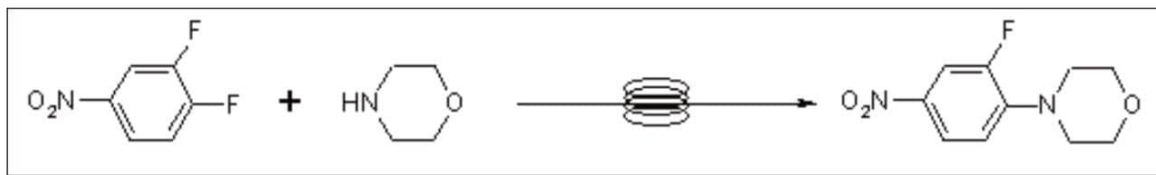


图1.向3,4-二氟硝基苯中加入吗啉。

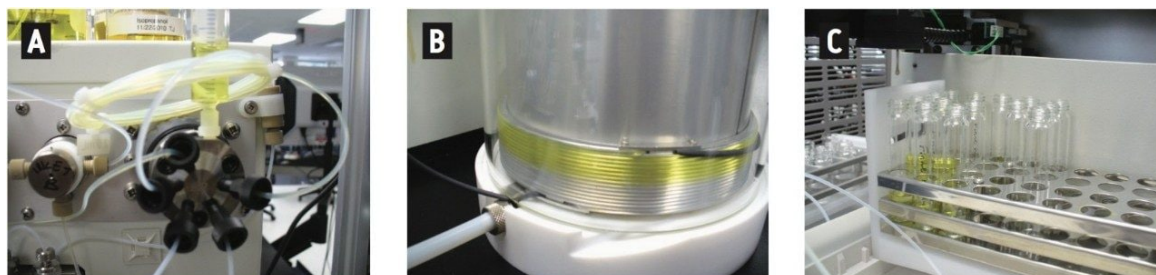


图2.在分析方法的开发过程中，配置UniQsis FlowSyn系统进行平推流分析。利用样品线圈(A)将得到的反应物进样到反应线圈(B)中。将洗脱液直接收集到馏分收集器的样品瓶(C)中。随后利用PATROL UPLC过程分析系统对这些馏分样品进行旁线分析，开发出用于在线监测的分析方法。

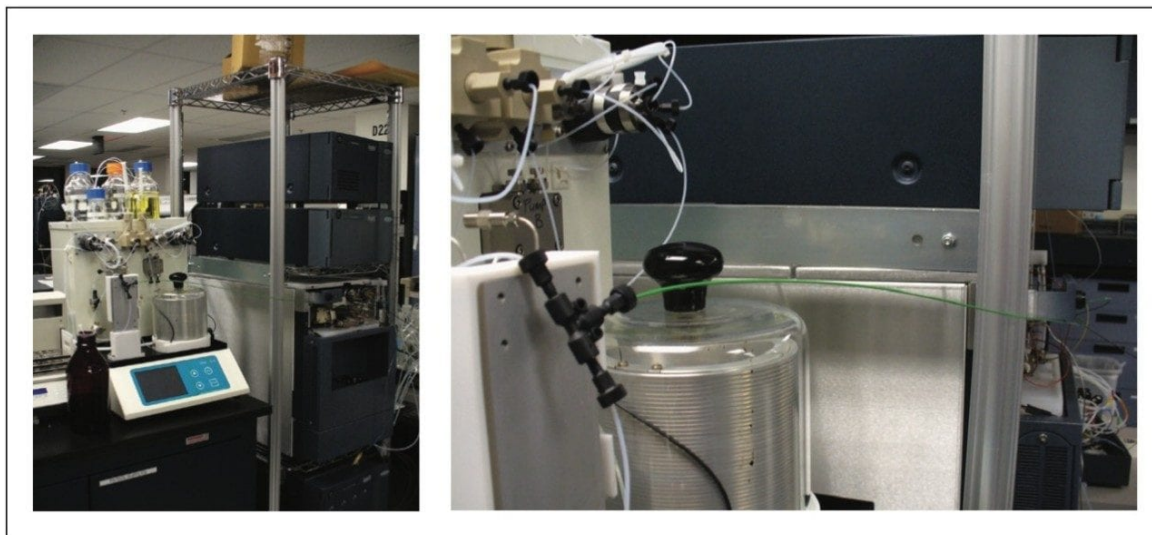


图3.为优化流动反应，将PATROL UPLC过程分析系统与UniQsis FlowSyn系统搭配使用，对流动反应器的洗脱液进行自动化的在线分析

分析方法开发的色谱条件

系统:	PATROL UPLC过程分析系统
数据:	Empower 2软件
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 2.1 mm x 50 mm, 1.7 μm ACQUITY UPLC BEH 苯基柱, 2.1 mm x 50 mm, 1.7 μm ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 mm x 50 mm, 1.8 μm ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ 2.1 mm x 50 mm, 1.8 μm
样品:	溶于DMF的反应样品

进样体积:	2 μ L
温度:	40 $^{\circ}$ C
流速:	iKey 600 μ L/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:	流动相B在2 min内从5%增至95%
检测:	245 nm, 20 Hz (正常)
样品冲洗:	30 s
稀释:	100倍
洗针液:	5 s, 60:20:20乙腈/DMF/水

最终的色谱方法

系统:	PATROL UPLC过程分析系统
数据:	Empower 2软件
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3 2.1 mm x 50 mm, 1.8 μ m
样品:	溶于DMF的反应样品

进样体积:	2 μ L
温度:	60 $^{\circ}$ 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:	流动相B在30 s内从35%增加到75%; 保持15 s
检测:	245 nm, 40 Hz (正常)
样品冲洗:	30 s
稀释:	100倍
洗针液:	5 s, 60:20:20乙腈/DMF/水

结果与讨论

自动开发流动反应的第一步是开发用于监测流动反应液流的UPLC方法。在流动反应器中设置管路用于执行平推流实验, 该实验将两种反应物都进样到反应线圈中, 并将反应溶液直接收集到样品瓶中。本实验的反应条件不一定是理想条件, 但一定包含未反应的原料、终产物和任何反应副产物(这些条件通常可以根据批处理反应条件进行估计)。将装有洗脱液的样品瓶贴上条形码放入PATROL UPLC过程分析系统中。该系统选配色谱柱管理器, 能够在四种不同的色谱柱填料之间进行选择。ACQUITY UPLC二元溶剂管理器(BSM)为方法开发提供了四种不同的溶剂(两种水性洗脱液和两种有机洗脱液)。使用现有的ACQUITY UPLC四元溶剂管理器(QSM)配置提供四元溶剂组合, 并在第四条溶剂管路中加配额外的六元溶剂选择阀, 可在方法开发中进一步探索分离条件。将样品进样到系统中进行旁线分析时, 系统会读取样品瓶上的条形码, 并在Empower软件中启用预先设计的分析筛选方案, 来考察方法pH、有机改性剂和色谱柱填料对反应组分最终分离的影响。条形码还指示了样品的自动稀释水平, 确保进样

的样品组分的浓度在PATROL UPLC过程分析系统的线性范围内。我们可以通过处理筛选方案得到的色谱图来确定使反应组分达到最佳分离度的条件，如图4所示。选择色谱柱和洗脱液后，将运行二次筛选方案，优化分离温度、梯度条件和流速。基于这两种筛选方案，我们开发出一种快速的UPLC方法，可定量分析所有反应组分（包括高浓度终产物和微量杂质）。在该分析中，吗啉不含发色团，因此无法通过UV检测进行分析。但是，由于吗啉添加过量，因此并非一定要在流动反应中予以监测，可通过添加互补检测技术进行分析，例如蒸发光散射(ELS)检测或质谱检测。对于该反应，初步筛选结果表明，使用HSS T3填料、低pH缓冲液，并以甲醇作为有机洗脱液时，样品实现了最佳分离。使用二次筛选方案进一步优化，得到运行时间为45 s的方法，如图5所示。

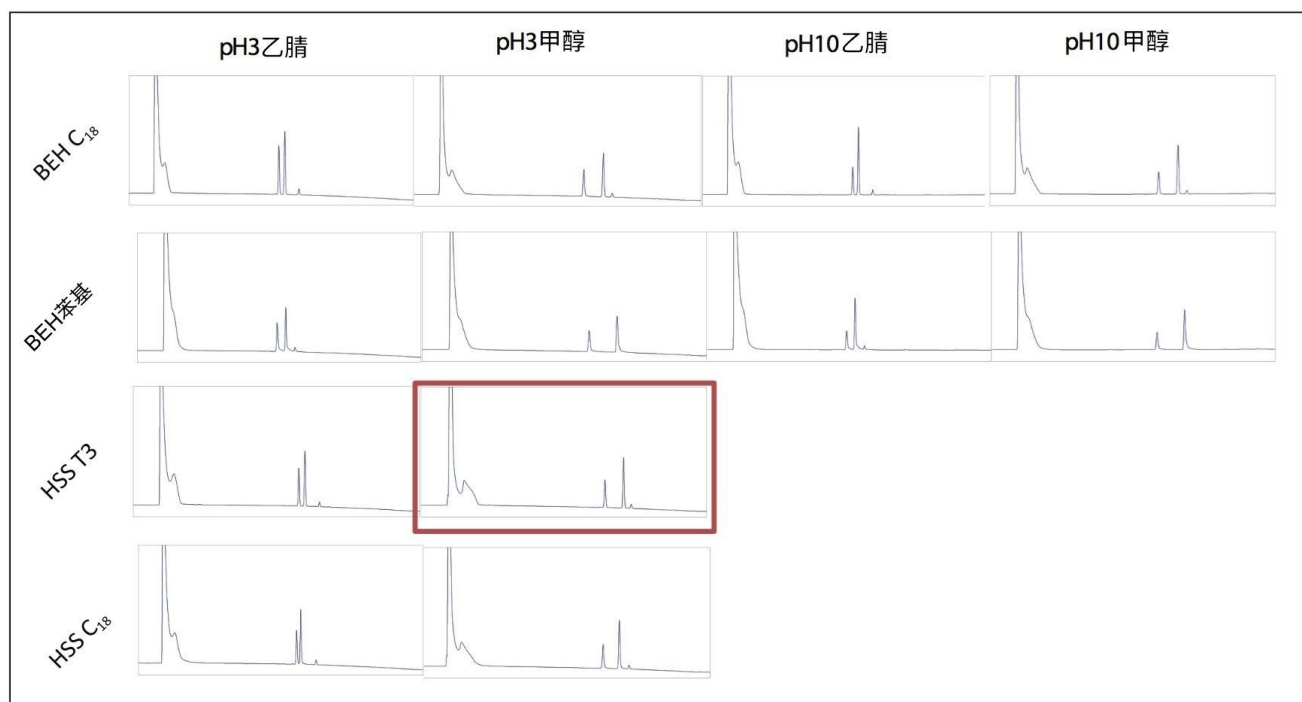


图4. 平推流实验样品分析的筛选结果。根据这些数据进一步优化分离条件，以获得最佳峰形和分离度。

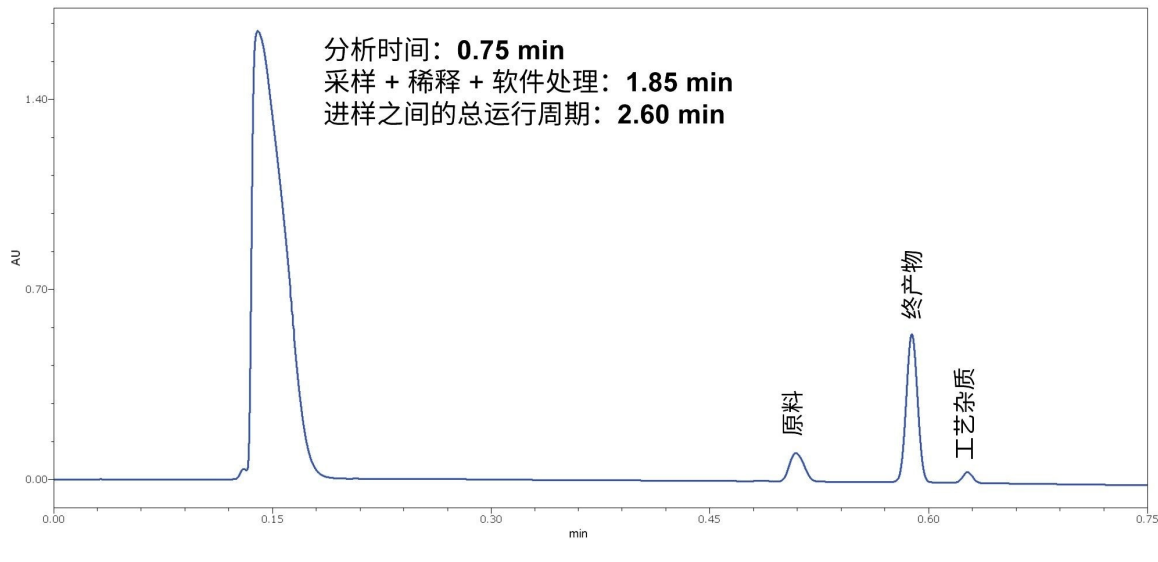


图5.流动反应介质的最终梯度分离。

Uniqsis FlowSyn系统专为自动开发流动反应而设计。用户可以通过设置实验矩阵来评估线圈温度、反应化学计量比、线圈驻留时间对终产物产率和纯度的影响。通过将该系统与PATROL UPLC过程分析系统连接，可以完全自动化地考察每种不同的反应条件。要确保实现可重复的定量，务必在反应稳态下为每组条件收集足够数量的样品，如图6所示。这样做可以为数据的化学计量学分析产生理想结果。达到反应稳态的时间取决于反应线圈的几何形状（长度和内径），因为在实验开始和结束时，液体层流经过开口管会分散反应物。因此，必须了解达到稳态条件所需的时间。然后用该时间加上在稳态下实现足够的重复进样所需的时间，即可确定在自动化实验中改变反应条件的频率。UPLC方法的最终运行时间为45 s，但是采样和稀释所需的额外时间使进样之间的运行周期增加到2.6 min。在自动化实验中，每组反应条件保持25.0分钟，以确保在稳态下有足够的进样次数。

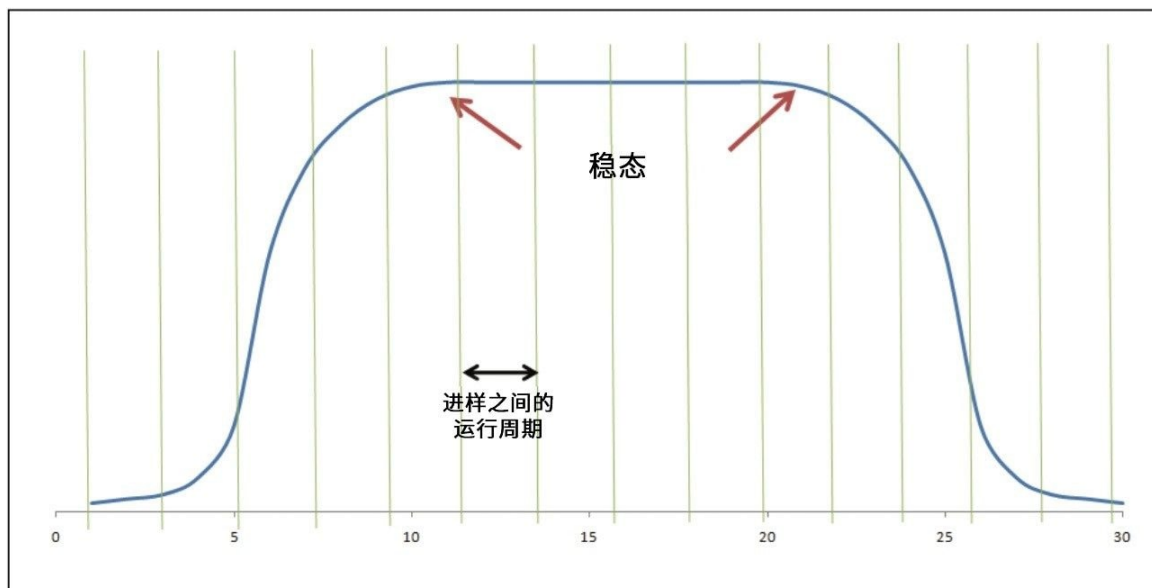


图6.务必确保每组反应条件在稳态下分析足够数量的样品。稳态下至少有三个样品能够使每种反应组分都实现可重复的定量。

我们创建了一个反应变量矩阵来考察线圈驻留时间、反应温度和反应化学计量比的影响。表1列出了方法开发矩阵。在Uniqsis FlowSyn系统中设置这些变量，然后启动序列。我们还启动了PATROL UPLC过程分析系统的在线样品自动采集功能，并让系统无人值守地运行。

	驻留时间 (min)	线圈温度 (°C)	反应物 比率	终产物的 比率	工艺杂质 比率
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工艺杂质相对含量的影响。

序列运行完成后，两套系统均设置为自动冲洗和关机。分析所得的色谱数据，确定每个反应变量对终产物和工艺杂质产率的影响。表1列出了每种终产物及工艺杂质的相对含量。各变量的趋势如图7所示。这些数据随后可用于化学计量学分析，以确定理想反应条件。确定的最终反应条件为：吗啉过量1.5倍、线圈驻留时间11 min、线圈温度100 °C。此条件可大幅提高终产物的产率，并尽可能减少工艺杂质的形成。

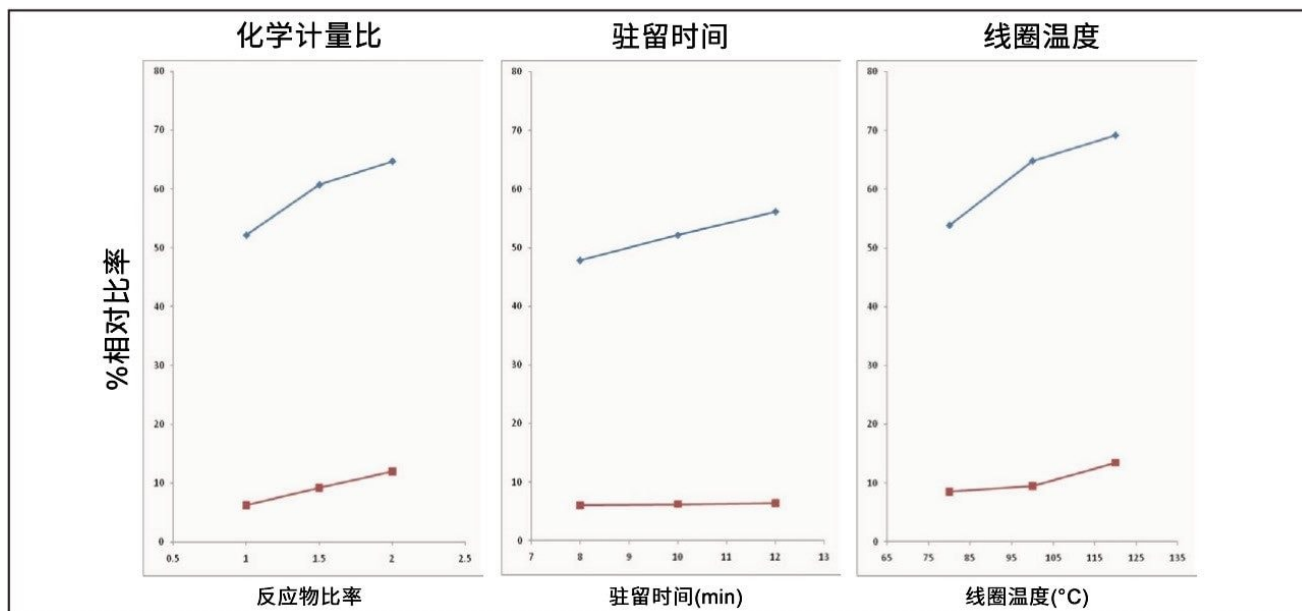


图7.每个流动反应变量对终产物（蓝色）和工艺杂质（红色）形成的影响的趋势图。

我们可以将最终的流动反应条件轻松放大至中试、工厂或生产规模，并使用PATROL UPLC过程分析系统在生产环境中进行监测。通过使用UPLC监测放大过程和生产车间的最终工艺，流动反应开发过程中收集的信息可直接用于了解生产过程中的工艺偏差。

结论

PATROL UPLC过程分析系统非常适合用于分析流动反应洗脱液，根据得到的分析结果绘制反应中所有物质（包括微量工艺杂质）的动力学图，以此来监测流动反应的开发和优化过程。该系统可轻松连接自动化台式流动反应器 Uniqsis FlowSyn系统。我们可以将开发的流动反应监测方法转移到PATROL UPLC过程分析系统，用于监测最终的流动反应，该系统具有简单的用户界面，可轻松部署到生产环境中。

特色产品

[PATROL UPLC过程分析系统 <https://www.waters.com/10046886>](https://www.waters.com/10046886)

[Empower 3色谱数据软件 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720004101ZH, 2014年5月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)