

フォトダイオードアレイと ACQUITY QDa 質量検出器と組み合わせて Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS バイナリーシステムを用いた、合成反応モニタリング

Chris Henry, Paul D. Rainville

日本ウォーターズ株式会社



要約

反応モニタリングは、新薬候補の合成における極めて重要なステップです。さまざまな溶媒や触媒など、多様な異なる条件下での化学反応の進行を評価するには、複数の分析が必要な場合があります。反応モニタリングのためのサンプル分析の迅速な処理により、迅速な意思決定とラボの効率向上が可能になります。この一連の研究で、ACQUITY PDA および ACQUITY QDa 質量検出器と組み合わせた ACQUITY UPLC H-Class PLUS バイナリーシステムを用いて、アテノロール、その中間体である 4-ヒドロキシフェニルアセトアミド（4-HPA）、および反応副生成物の 4-ヒドロキシフェニル酢酸を分離できることを実証しました。情報が豊富な質量スペクトルおよび UV データを提供すると同時に、合計分析時間 1.2 分でこれらの重要な分離を実現できることで、分析経験の多少に関わらず、医薬品化学者が簡単に信頼性の高い反応モニタリングにアクセスできるようになります。

アプリケーションのメリット

- 1 分未満の迅速なグラジエントによる、高いサンプルスループットと迅速な結果
- PDA 検出による、より豊富なサンプル情報
- 質量検出による質量確認と迅速な意思決定

はじめに

医薬品設計の創薬化学ワークフローでの SAR（構造活性相関）研究で、医薬品化学者は、既知の生物活性分子にさまざまな官能基を導入することにより、ターゲット化合物の特性を最適化します。これらの実験の目的は、最適な生物活性を持つ最適な薬剤候補を得ることです。

有効な化合物が見つかって検証されると、化合物の目的の特性の最適化が行われます。このステップでは、新しい化合物の合成と反応性測定の反復プロセスが行われ、この医薬品候補をさらにリードフェーズに進めます¹。

これらの反応には長時間かかることがあるため、化学者は、合成が望みどおりに進行しているかをできるだけ早く確認する必要があります。これは、必要なサンプル前処理が最小限で、所定の低い検出限界で迅速なレスポンスが得られる測定機能を利用することを意味します。この選択した分析技術の別の有利な特性は、複数のパラメーター（例えば、不純物生成および最適な最終生成物の収率）を同時に測定する機能でしょう²。

このアプリケーションノートの目的は、高速液体クロマトグラフィー分析のために、短いバリスティックグラジエントを実行する ACQUITY UPLC H-Class PLUS バイナリーシステムの機能の有用性を実証することです。フォトダイオードアレイと質量検出の直交検出技術に組み合わせることで、ACQUITY UPLC H-Class PLUS バイナリーシステムは、反応モニタリングワークフローにおいて、反応の進行状況、可能性のある副生成物、および起こることがあるその他のあらゆる問題に関する情報を入手できる、簡単にアクセス可能なソリューションを提供します。

実験方法

クロマトグラフィー分離は、ACQUITY UPLC H-Class PLUS バイナリーシステムで実施しました。PDA 検出器と ACQUITY QDa 質量検出器を使用して収集したデータを用いて、0.7 分のグラジエント（合計分析時間 1.2 分）でサンプルを溶出しました。

サンプルの説明

アテノロール（最終生成物）、4-ヒドロキシフェニルアセトアミド(4-HPA)（反応中間体）、4-ヒドロキシフェニル酢酸(4-HPAA)（反応副生成物）を調製して、アテノロール合成の進行をシミュレートしました。すべての標準品は、Sigma Aldrich chemicals（Poole、Dorset、英国）から調達しました。

分析条件

LC 条件

LC システム:	ACQUITY UPLC H-Class PLUS バイナリーシステム
検出:	ACQUITY フォトダイオードアレイ(PDA)
バイアル:	ウォーターズトータルリカバリーバイアル
カラム:	ACQUITY BEH C ₁₈ (30 mm × 2.1 mm、1.7 μm)
カラム温度:	45 °C
サンプル温度:	10 °C
注入量:	0.5 μL
流速:	0.8 mL/分
移動相 A:	0.1% (v/v) ギ酸水溶液
移動相 B:	0.1% (v/v) ギ酸アセトニトリル溶液
グラジエント:	5 ~ 95% B/0.7 分

MS 条件

MS システム:	ACQUITY QDa 質量検出器
イオン化モード:	ESI+
取り込み範囲:	100-800 Da
キャピラリー電圧:	1.5 kV
コリジョンエネルギー:	N/A
コーン電圧:	20 V

データ管理

MS ソフトウェア:	MassLynx v4.1
------------	---------------

結果および考察

創薬ワークフローのターゲット化合物最適化の段階で、創薬化学者が意思決定を加速し、最適な親和性と選択性で化合物を迅速に同定するためには、迅速なスクリーニングが不可欠です。あらゆる場合に、最大の収率を得るために反応を抑えるには、正しい生成物が合成されているか、および反応がそのエンドポイントに到達しているかを、化学者が迅速に評価できるようにする必要があります。

この段階には多くの時間と労力を費やす場合があるため、実験の進行状況をモニターするための迅速で信頼性の高い手段が望まれます。このワークフローを実証するために、アテノロールの合成（図 1）を反応モデルとして使用しました。

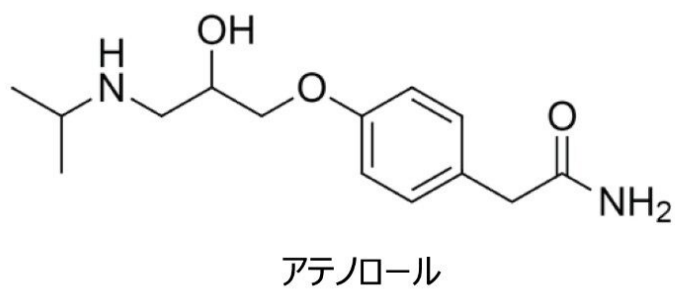
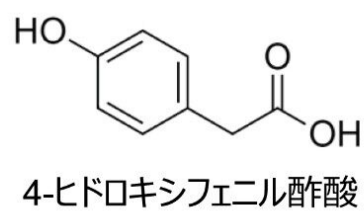
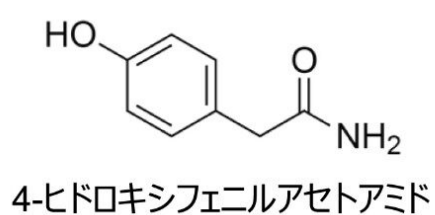


図 1. 4-HPA、アテノロール、4-HPAA の構造

アテノロール形成の増加と、中間体 4-ヒドロキシフェニルアセトアミドの減少がモニターされました（図 2）。反応副生成物である 4-ヒドロキシフェニル酢酸も認められました。

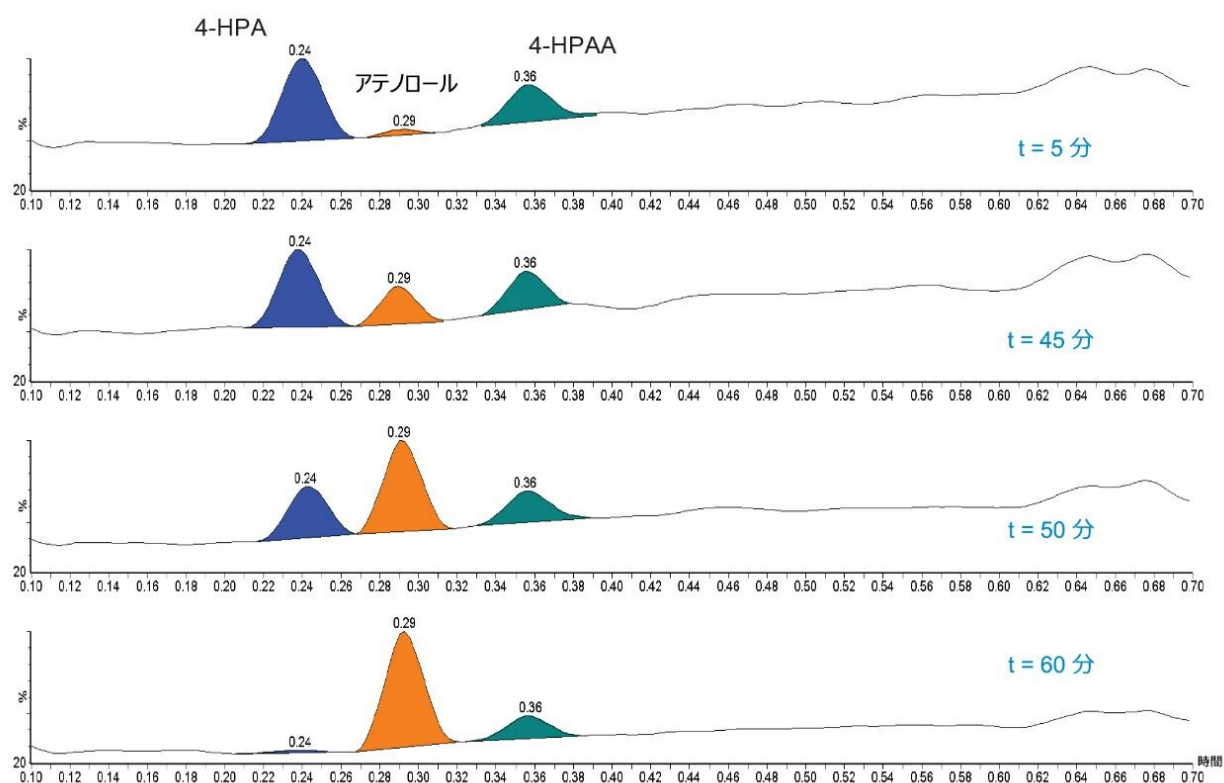


図 2. 時間の経過とともにアテノロール（オレンジ色）のレベルが増加し、4-HPA（青色）のレベルが低減することを示す反応混合物の TIC クロマトグラム

PDA と ACQUITY QDa 検出器の組み合わせにより、さまざまな物理化学的特性の化合物をモニターするための簡単な直交検出システムが得られます。副生成物 4-HPAA は、UV で強い反応を示し、アテノロールと 4-HPA は比較的弱い UV 反応を示します。ACQUITY QDa 検出 (ESI+ モード) では、アテノロール/4-HPA のレスポンスは極めて良好です (図3)。

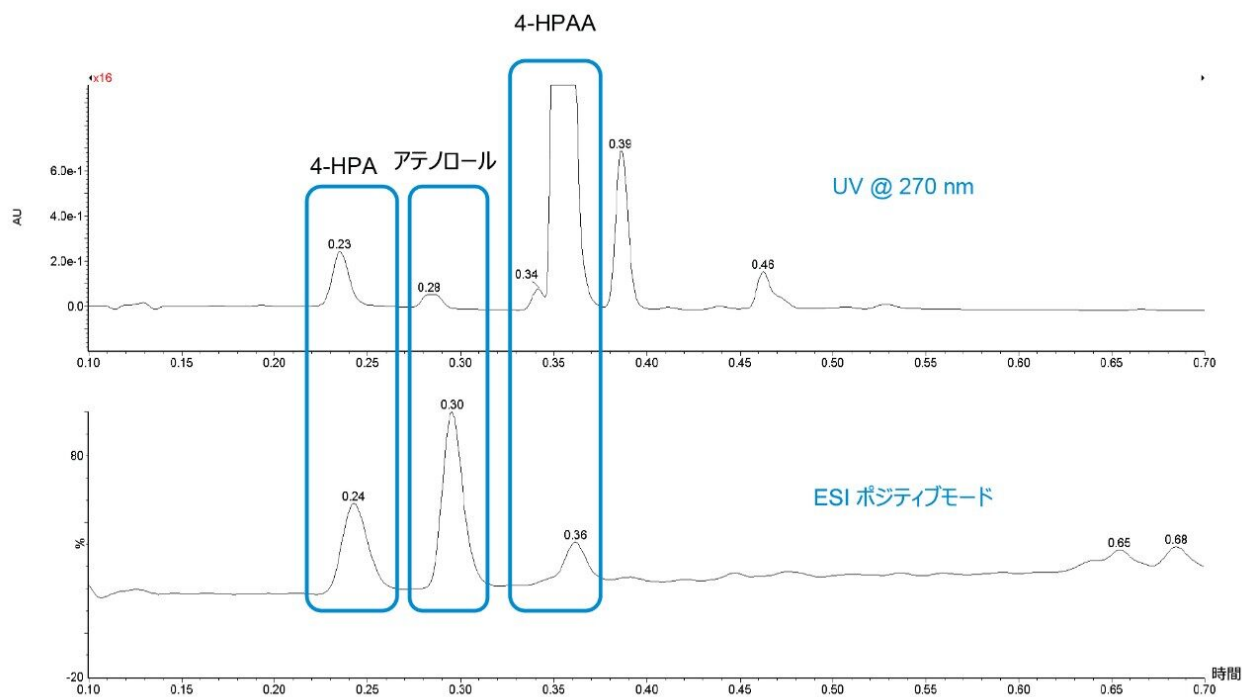


図 3.3 種類の化合物すべてに対する PDA および ACQUITY QDa のレスポンスの比較

組み込まれた ACQUITY QDa 質量検出器により、質量確認へのアクセスがしやすくなります。これによって化学者が、反応が成功したと確信を持って言えるという大きな利点があります。生成されたデータのマススペクトルの解析により、 m/z 値が予測化合物に対応していることが分かります (図 4)。

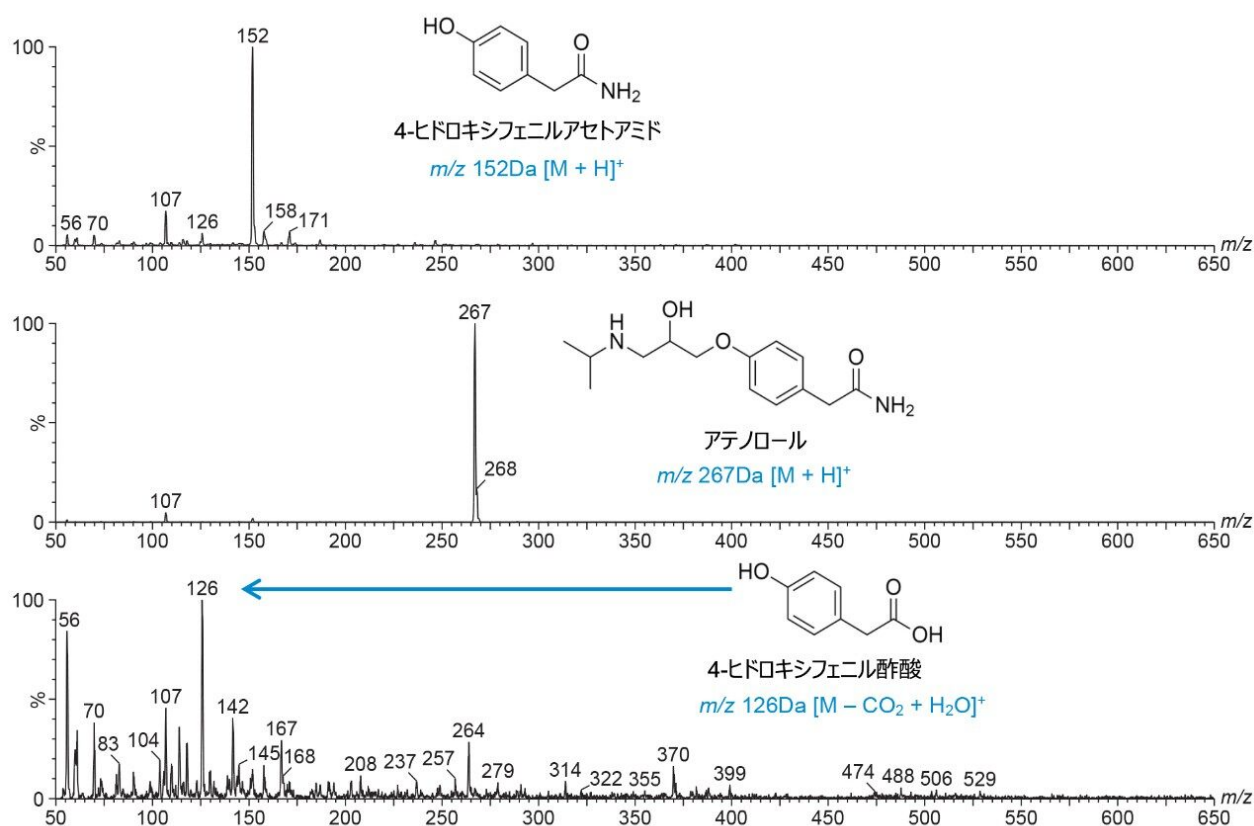


図 4. ACQUITY QDa 質量検出器を使用して得られた 3 種類の化合物のマススペクトル

結論

PDA/ACQUITY QDa 検出を搭載した ACQUITY UPLC H-Class PLUS バイナリーシステムを使用することにより、このワークフローでは、目的の反応生成物、反応中間体、副生成物の化合物の分離を、1.2 分の UPLC のサイクル時間で達成できました。

質量検出により、すべての化合物を PDA を使用して簡単に質量確認することができ、同じ注入で追加の UV スペクトル情報が得られます。

このプラットフォームを使用すると、専門家でない質量分析ユーザーでも反応モニタリングの進行中に重要な質量スペクトル情報にアクセスすることができ、創薬のプロセスが加速されます。

参考文献

1. Twohig, M.; Shave, D.; LeFebvre, P.; Plumb, R. Synthetic Reaction Monitoring Using UPLC-MS. Waters Application Note, 2007, 720002258EN. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2007/synthetic-reaction-monitoring-using-uplc-ms.html>>
2. Analytical and Purification methods in Combinatorial Chemistry, *Wiley-Interscience* (5): 87–123.
3. Dahlin, J.; Walters, M. The Essential Roles of Chemistry in High Throughput Screening Triage. *Future Med Chem.*, 2014, July; 6(11): 1265–1290.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY UPLC PDA 検出器 <<https://www.waters.com/514225>>

ACQUITY QDa 質量検出器 <<https://www.waters.com/134761404>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

720007074JA、2020 年 10 月