

플로우 합성(Flow Synthesis)에서 용매 농도와 수분 함량의 정량적 모니터링

Yusuke Hattori*1 Yasuyuki Suzuki*1

이 연구에서는 합성 공정에서 용매의 농도와 수분의 함량을 정량적으로 모니터링하기 위해 마이크로 플로우 셀과 NIR(near infrared-근적외선) 스펙트럼의 회귀 모델을 개발하고 이를 펩타이드 합성을 모니터링하는 데 사용하였다. 이 플로우 셀은 압력에 충분히 견딜 수 있는 내구성과 반응 유체의 충분한 변위 효율을 가질 수 있도록 설계하였다. 회귀 모델은 부분 최소 제곱 회귀법(partial least squares regression method)을 사용하였다. 각 용매의 농도와 수분 함량을 정량화한 결과, 이들은 이론 값과 일치하였으며, 낮은 표준편차를 보였다. 수분 함량의 표준편차는 10ppm이었다. 소량의 물이라도 일부 화학 반응에는 치명적인 부정적 영향력을 미칠 수 있다. 따라서 수분 함량을 엄격하게 관리하는 것이 필수적이다. 제안된 용매 농도 및 수분 함량을 모니터링하는 방법은 반응 생성물과 같은 다른 반응 요소를 모니터링하는 작업과 동시에 수행할 수 있다. 이 연구의 결과는 합성 공정의 인라인 분광학적 모니터링에 있어 이 방법이 유용하다는 사실을 시사한다.

개요

현 재 의약품을 포함한 많은 화합물의 합성은 배치 합성 방식으로 진행되고 있고, 이 방식에서는 용매와 원료를 반응 용기에 투입한 후 반응이 완료되면 다음 생성물을 정제하는 방법을 사용하고 있다. 배치 합성은 여러 단계의 반응 과정을 통해 복잡한 구조를 가진 화합물을 합성할 수 있지만 각 단계에서 합성된 중간 화합물의 분리와 정제 및 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 분석 방법에 상당한 시간과 자원이 요구된다.

이에 반해 플로우 합성은 원자재의 흐름을 좁은 채널을 통해 통과시키고 채널 내에서 혼합 및 반응 공정을 수행함으로써 다단계의 반응을 지속적으로 실행할 수 있다⁽¹⁾. 또한 채널 내에서 액체 크로마토그래피 또는 분광학적 측정 작업을 수행함으로써 배치 합성에 비해 분석

분석 시간을 크게 단축할 수 있다. 분광학적 측정의 탁월한 실시간 성능은 특히 플로우 합성에서 연속적으로 진행되는 반응을 분석하는 데 적합하다.

배치 합성의 또 다른 문제는 대량 반응 용기를 사용함으로써 인하여 온도와 같은 반응 조건이 설정 값에 도달할 때까지 딜레이가 발생한다는 사실이다⁽²⁾⁽³⁾. 또한 용기의 부피에 비례하여 필요한 에너지의 양도 증가하게 된다⁽²⁾⁽³⁾. 이에 반해, 반응 용액이 좁은 채널을 통해 이동하는 플로우 합성의 경우, 단위 부피 당 액체의 표면적이 크기 때문에 그 결과 높은 열 교환율이 발생하게 된다. 따라서 온도와 같은 반응 조건은 에너지 소모가 적고 딜레이 없이 효율적으로 제어할 수 있게 된다.

그러나, 높은 열 교환율로 인하여 플로우 합성은 환경 변화에 더 민감하며, 엄격한 환경 관리가 필요하고, 반응 용액을 철저히 모니터링 및 조절해야 한다. 특히 온도 저하로 인해 용질 분자가 석출되면서 플로우 채널이 막힐 가능성이 있으므로 특별히 주의가 기울일 필요가 있다.

*1 Life Research & Development Department, Innovation Center, Marketing Headquarters

채널이 막히면 플로우 합성 공정을 중단해야 하고 이를 청소 및 복구하려면 상당히 많은 노력이 요구된다. 따라서 흐름 경로의 청소 및 온도 관리에 더하여 불순물의 생성 및 석출을 유도할 수 있는 요인들을 철저히 관찰하여 제거하는 작업이 필수적이다.

또 다른 석출의 원인은 용매의 변화이다. 예를 들어, 용질에 적합하지 않은 용매를 사용하거나 혼합 용매 조성의 변화는 용질 분자의 용해도를 감소시킬 수 있다. 이에 더하여 유기 리튬 화합물을 이용한 리튬화 반응에서 물이 침투하는 경우 수산화 리튬의 생성 및 석출로 이어져 플로우 채널이 막히게 되는 문제가 있다는 보고가 있었다⁽⁴⁾⁽⁵⁾. 따라서, 용매의 농도를 모니터링하는 것도 중요하지만, 이러한 작업을 수행하는 것은 어렵고, 적절한 모니터링 방법도 존재하지 않는 실정이다.

일반적인 유기 용매의 분자는 보통 반응성이 낮고 화학적으로 안정적이다. 이러한 분자는 자외선 또는 가시 광선을 흡수하지 않기 때문에 이 파장을 사용한 검출 및 정량화가 어렵다. 그 결과 적외선 분광법, 라만 분광법, 근적외선(NIR) 분광법과 같은 진동 분광법이 효과적이다⁽⁶⁾. 그러나, 비록 적외선 분광법은 매우 강한 흡수력을 측정할 수 있지만, 용매와 같은 매우 높은 농도로 존재하는 분석 물질의 경우 흡수가 너무 강해져서 포화 현상이 발생하게 되는 단점이 있다. 이와 대조적으로 라만 분광법은 측정 지점에 조사되는 여자 레이저를 필요로 하며, 이는 측정 가능 영역을 제한하게 된다. 따라서 이 연구에서는 NIR 분광법을 사용하여 용매 농도를 모니터링하는 방법을 실험하였으며 플로우 합성 중 실시간 측정에 적합한 컴팩트한 측정 전송 셀(마이크로 플로우 셀)을 개발하였다. 높은 압력 저항성과 변위 효율을 구현하기 위해 2mm의 광 경로의 길이를 사용하는 플로우 셀을 설계하였다. 데이터 분석에는 다수의 변량을 분석하는 방법인 PLSR(Partial least squares regression-부분 최소 제곱 회귀법)을 사용하여 용매 농도를 정량적으로 예측 및 모니터링하였다.

실험

샘플

모델 반응으로 액상 태깅법(STag-PS method)⁽⁷⁾을 사용한 디펩타이드 합성법을 사용하였다. 유기 용매로는 4-methyltetrahydropyran(MTHP; 25°C에서 밀도: 0.86g/cm³; 분자량: 100.16), N,N dimethylformamide(DMF; 25°C에서 밀도:0.95g/cm³; 분자량:73.09), 및 N,N-dimethylacetamide (DMA; 25°C에서 밀도: 0.94g/cm³; 분자량: 87.12)을 사용하였다. 이 때 초순수 물을 사용하였다.

STag-PS 방법에서, 소수성 긴 사슬의 알킬 그룹과 트리메틸실릴 그룹을 포함한 STag로 C 말단이 변형된 아미노산(PeptiStar, Osaka)이 합성되었다(H-Arg(Pbf)-O(-STag); 분자량1201.94)⁽⁸⁾. 응축 반응에 사용된 아미노산은 Fmoc-Oic-OH(분자량: 391.47; Ambeed, IL, USA)였다. 응축제로는 Ethyl 2-cyano-2-((dimethyliminio)(morpholino) methoxyimino)acetate hexafluorophosphate (COMU; 분자량: 428.27; Merck, NJ, USA)와 N,N diisopropylethylamine (DIEA; 분자량: 129.25; Tokyo Chemical Industry)가 사용되었다.

방법

NIR 스펙트럼 측정 시스템 스펙트럼 측정을 위해 푸리에 변환 근적외선 분광계(FTNIR-L1-025-2TE, ARCoptix, Neuchâtel, Switzerland)를 사용했으며, 이 때 광원으로는 할로겐 램프(ARCLight-NIR, 20 W, ARCoptix)를 사용하였다.

광원(SMA-905)의 방출 포트에는 OH 그룹으로 인적고 개구수가 0.22이며 코어 지름이 550 μm인 저 OH 실리카 광 섬유(Z37L01, Thorlabs, NJ, USA)를 연결하였다. 광섬유의 다른 끝은 분광학적 측정에 사용되는 플로우 셀에 연결하였다. 플로우 셀로부터 전송된 빛은 동일한 광섬유를 사용하여 분광계의 입구 포트(NA 0.25, SMA 905)에 연결되었다. 광학 경로의 길이가 2mm인 석영 셀이 장착된 플로우 셀을 개발하였다(그림 1 참조). 셀의 부피는 16 μL(채널 단면: 2mm × 2mm; 채널 길이: 4mm)이다. 플로우 셀과 플로우 채널은 바닥이 평평한 피팅(1/4-28 UNF, IDEX, IL, USA)을 사용하여 연결하였다. 압력 저항은 실험적으로 최대 6MPa까지 측정되었다.

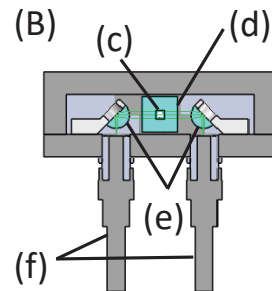
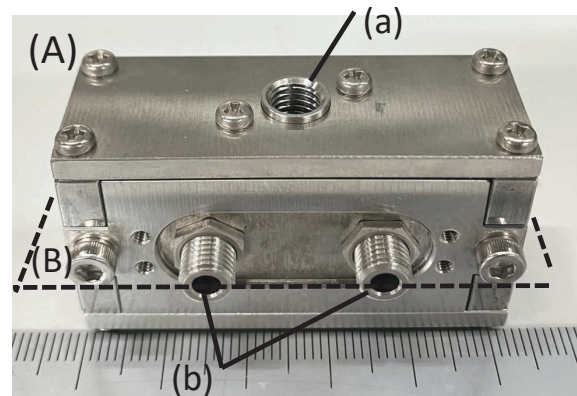


그림1 유동 셀 이미지: (a)1/4-28 UNF 유체 포트, (b)SMA905 광섬유 커넥터; (B)유동 셀 중앙 부분의 수평 단면 부 (광섬유 연결된 상태, (A)의 점선에 해당); (c)측정 채널 (2mm × 2mm), (d)석영 셀, (e)사파이어반구 렌즈, (f)광섬유

NIR 분광 측정 및 회귀 분석

앞서 언급한 바와 같이 평평한 피팅을 사용한 플로우 셀에 1/8인치 PTFE 튜브(내경: 1.59 mm, 외경: 3.2 mm)를 연결하였다. 플러저 펌프(UI-22-110, FLOM, Tokyo)를 사용하여 반응 용기(50mL 플라스크)로부터 플로우 셀로 테스트 용액을 이동시켰고 이 과정 중 분광 측정 작업을 수행하였다. 플로우 셀로 이동된 테스트 용액은 이와 마찬가지로 방식으로 연결된 PTFE 튜브를 통하여 용기로 회수하여 지속적으로 순환될 수 있게 하였다.

표 1과 같이, MTHP, DMF, DMA, 및 물의 농도 범위를 커버하기 위해 25가지 다른 성분으로 테스트 용액을 준비하였다. 각 성분에 대하여 분광 측정 작업을 3회 수행하였다. 스펙트럼은 8cm⁻¹의 파수 해상도와 측정 당 32 스캔으로 획득하였다. 모든 측정 작업은 40°C의 온도에서 수행하였다. 용매 농도와 수분 함량에 대한 회귀 분석은 PLSR을 사용하여 진행하였다.

표1 각 용매의 농도 범위

	Conc. Range	
	mol/L	Vol%
MTHP	3.46 ~ 7.73	40 ~ 90
DMF	1.29 ~ 5.23	10 ~ 40
DMA	0 ~ 2.38	0 ~ 22
Water	0 ~ 1.09	0 ~ 2.0

측정된 투과 스펙트럼(Sobs)은 참조 샘플(DMF:MTHP = 38.28:61.72[v/v])의 스펙트럼(Sref)을 사용하여 다음 방정식에 따라 흡광 스펙트럼(A)로 변환하였으며, 그 후 2차 미분 처리를 적용하였다.

$$A = -\log_{10} \frac{S_{obs}}{S_{ref}}$$

Savitzky-Golay법을 사용하여 이차 미분 공정을 수행하였고, 이 때 윈도우의 크기는 11포인트, 다항식 차수는 3으로 설정하였다.

펩타이드 배치 합성에서 용매 농도의 예측

용매 혼합물(DMF:MTHP = 10:90 (v/v))을 반응 용기(50-mL의 배형상 플라스크)에 시작 물질로 사용된 아미노산(H-Arg(Pbf)-O-STag)을 1.5mmol 첨가하여 총 18mL의 용액을 준비하였다. 앞서 설명한 바와 같이, 이 용액은 플로우 셀을 통하여 순환시켰다. 펌프의 유속은 9.0mL/min로 설정하였다. 시린지 펌프(ULTRA-P, Harvard, MA, USA)를 사용하여, DMA에 용해된 Fmoc-Oic OH (0.4M), MTHP와 혼합한 DIEA(1.76 M), 및 DMF에 용해된 COMU(0.4 M)를 각각 0.2mL/min, 0.1mL/min, 및 0.2mL/min의 유속으로 반응 용기에 첨가하였으며, 이에 합성 반응이 진행되었다. 이러한 조건 하에서 플로우 셀을 사용하여 분광 측정 작업을 수행하였으며, 합성 반응이 진행되는 중 용매 농도는 PLSR을 사용하여 획득한 회귀 모델을 사용하여 예측하였다.

펩타이드 플로우 합성에서 용매 농도 예측

플러저 펌프를 사용하여 배치 합성과 동일한 방식으로 준비한 H-Arg(Pbf)-O(-STag), Fmoc-Oic-OH, DIEA, 및 COMU를 유동 합성 장치⁽⁸⁾에 전달하였고, 플로우 합성 반응이 진행되었다. Fmoc-Oic-OH은 DIEA 및 COMU에 의하여 활성화된 후(5초), H-Arg(Pbf)-O(-STag)와의 결합 반응이 진행되었다(40°C에서 60 초). 플로우 셀은 이 반응 직후에 위치하였고, 여기에서 스펙트럼 측정 작업을 수행하였다. 플로우 합성 후의 용매 농도는 PLSR에 의하여 획득한 회귀 모델을 사용하여 예측하였다.

결과 및 논의 사항

PLSR을 사용한 회귀 모델의 구축

그림 2는 회귀 모델을 구축하는 데 사용된 이차 미분 NIR 스펙트럼이다. PLSR에서 사용된 스펙트럼의 파수 범위는 각 용매와 물에 대하여 개별적으로 최적화되었다. 물의 경우, 5200cm⁻¹ 및 5300cm⁻¹에서 두 모두 특징적인 피크가 관찰되었으며, 이는 모두 O-H 스트레칭 및 굽힘 진동의 결합 대역에 기인하는 것이다⁽⁹⁾. 이는 반응 용액 내에 강하게 수소 결합된 물 분자(5200cm⁻¹에서 피크)와 약하게 수소 결합된 물 분자(5300cm⁻¹에서 피크)가 모두 존재한다는 사실을 시사하는 것이다. 물을 정량적으로 분석하기 위해 두 피크 모두를 포함하고 있는 회귀 분석 작업을 수행하였다. 물에 의한 흡수 피크는 온도에 따라 변화하는 것으로 알려져 있다⁽¹⁰⁾. 이러한 변화는 수소 결합 강도에 대한 온도에 의존적이기 때문에 이 연구에서 수행한 모든 측정 작업은 일정한 온도 조건 (40°C)하에서 수행하였다.

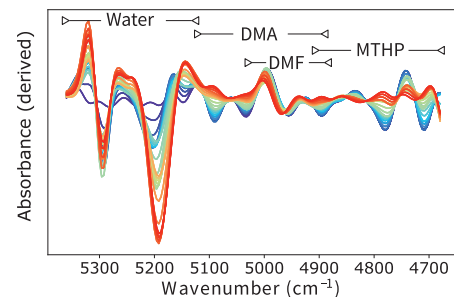


그림2 용매 농도의 회귀 분석을 위해 PLSR에서 사용된 NIR 스펙트라. 화살표로 표시된 범위는 각 화합물의 회귀 분석에 사용된 파수 영역을 나타낸다. 색상 차이는 구성 성분의 차이를 의미한다.

용매 농도의 회귀 분석 결과인 RMSE(root-mean-squared error-평균 제곱근 오차), 결정 계수(R²) 및 LV(latent variables-잠재 변수)의 수는 PLSR을 사용한 용매의 농도에 대한 회귀 분석의 결과로써 표 2에 요약하였다. 모든 경우 R² 값은 0.99보다 더 크게 나타났으며, 이 때 보정 에러는 MTHP, DMF 및 물의 경우 약 1%, DMA의 경우 약 2%였다. LV의 수는 모델 오류와 예측 정확도를 모두 고려하여 결정하였다. 모든 용매에 대하여 세 개의 LV가 사용되었지만 DMA의 경우에는 여섯 개의 LV가 사용되었다. 비록 DMA의 경우 LV의 수가 상대적으로 많았지만, 이는 배치 및 플로우 합성에서 용매 농도 예측 결과에 기초한 것이었다.

표2 PLSR에 의한 회귀 분석 결과

	RMSE, mol/L	R ²	LV
MTHP	0.0396	0.999	3
DMF	0.0743	0.996	3
DMA	0.0720	0.994	6
Water	0.0116	0.998	3

그림 3은 각 용매(MTHP, DMF, 및 DMA)에 대한 2차 미분 NIR 스펙트럼과 PLSR 회귀 벡터이다. MTHP의 경우 특징적인 피크가 4900cm⁻¹, 4860cm⁻¹ 부근에서, 및 4800~4780cm⁻¹의 범위에서 관찰되었다. 비록 4900cm⁻¹ 피크가 DMA 피크와 중첩되지만, 다른 피크들 특히 4800~4780cm⁻¹ 범위의 피크는 회귀에 크게 기여하였다. DMF의 경우 5000cm⁻¹에서 뚜렷한 피크가, 4930~4920cm⁻¹에서 넓은 피크가 관찰되었고, 둘 모두 회귀에 중요하게 기여하였다.

DMA의 경우, 특징적인 피크가 5020cm⁻¹, 4970cm⁻¹, 및 4900cm⁻¹에서 관찰되었다. 이러한 결과는 다른 용매의 존재에 영향을 받지 않으면서 각 용매의 농도를 해당 스펙트럼을 통해 예측할 수 있다는 사실을 시사하는 것이다.

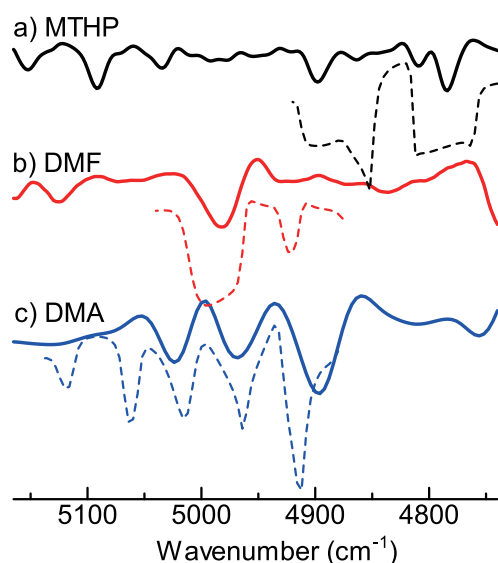


그림3 각 용매에 대한 2차 미분 NIR 스펙트럼(실선) 및 회귀 벡터(점선)

배치 합성에서 용매 농도의 예측

배치 합성에서 STag 시작 물질은 DMF:MTHP = 10:90의 혼합 용매에 용해되어 반응 용기에 처음으로 추가되었다. COMU, Fmoc-Oic-OH, 및 DIEA는 각각 DMF, DMA, 및 MTHP에 용해되어 시린지 펌프를 사용하여 일정한 유량으로 반응 용기에 첨가되었다. 아미노산 간의 결합 반응은 시간이 지남에 따라 진행되었으며, 용매 농도도 변화하였기 때문에 용매에 기인한 피크도 시간이 지남에 따라 다르게 나타나게 되었다.

반응이 시작하기 전, 5160~5300 cm⁻¹ 범위에서 물 분자에 기인한 두 개의 피크가 관찰되었다. 물에 시약을 첨가하지 않았기 때문에 STag 시작 물질의 합성과 정제 과정에서 잔류한 물로 추정된다. 추가적으로 시린지 펌프를 통해 첨가된 시약들은 물을 포함하지 않았기 때문에 이러한 피크는 시간이 지남에 따라 감소하였다. 다른 피크는 MTHP에 기인하는 것이었다. 첨가된 MTHP의 양이 적었기 때문에 초기 농도가 감소했고, 피크의 강도 역시 감소하였다.

그림 4(A)는 PLSR을 사용하여 구한 회귀 모델을 배치 합성 중에 획득한 스펙트럼에 적용하여 용매의 농도를 예측한 결과이다. 비교를 위해 MTHP, DMF, 및 DMA의 이론적 농도가 계산되었다. 이러한 이론 상의 농도는 초기농도, 시린지 펌프를 사용한 투여 속도, 그리고 용질 분자의 농도를 기반으로 결정되었다. 용질 농도를 계산하기 위해서는 각 용질 분자의 밀도 정보가 필요하다. 그러나, 이러한 데이터가 제공되지 않았기 때문에 각 용질의 밀도는 1.0g/cm³ 일 것이라고 가정하였고, 이론 상의 농도는 해당 화합물의 분자량을 사용하여 계산하였다.

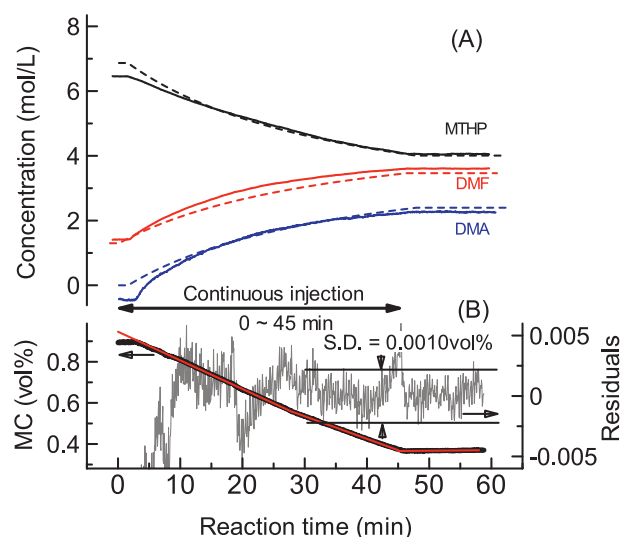


그림4 (A)PLSR에 의해 예측된 용매 농도(실선)와 이론적 농도(점선); (B)수분 함량(MC) 예측 결과(검정색), 수분 변화의 적합선(적색), 그리고 예측 값과 적합선 사이의 차이(회색)

액체의 전달이 시작된 후 처음 1.4분 동안 반응 용기로 이어지는 흐름 경로의 보류 현상으로 인하여 농도의 변화에 딜레이가 있었다. 그 이후 MTHP의 농도가 감소한 반면 DMF 및 DMA는 증가하였다. 예측 결과는 이론 값과 동일한 경향을 보였고, MTHP의 예측 농도는 이론 상의 값과 매우 근접하게 일치하였다. DMF 및 DMA의 예측 값 역시 이론 상의 값에 근접했으며, 액체 전달이 중단된 지점(45분에)의 농도 역시 성공적으로 예측되었다.

그림 4(B)는 수분 함량에 대한 예측 결과이다. STag 시작 물질 용액에 사용된 MTHP에는 소량의 물이 용해돼 있었고, 반응 중 계속 존재해 있었다. 이 연구에서는 수분 함량을 직접 측정하지 않았기 때문에 정확한 농도를 정량화 할 수 없었다. 그러나, 일반적으로 수분 함량은 약 1.0 vol%로 간주되며, 예측한 값인 0.5mol/L(0.9vol%)도 비슷한 수준이었다. 또한 반응 중 시약 용액이 추가됨에 따라 수분 함량이 선형적으로 감소하게 되었는데, 이는 추가된 시약에 물이 포함되어 있지 않았다는 사실과 일치하는 것이다. 반응 전 초기 농도가 0.50mol/L(0.90vol%, 부피 18mL) 이었다고 가정하면, 액체 전달 과정이 중단될 때의 최종 농도는 최종 부피 40.5mL를 기준으로 0.22mol/L (0.40vol%)일 것으로 결정된다. 이는 예측값인 0.20mol/L (0.36 vol%)와 거의 일치하는 값이다.

또한 그림 4(B)는 최소 제곱법을 사용하여 수분 함량에 선형으로 맞춘 결과 및 이러한 선형으로 맞춘 값과 예측한 값 사이의 차이를 보여준다. 이러한 차이는 예측 값의 변동성을 보여주는 것이다. 표준편차(S.D.)는 0.0010vol%(10ppm)이었다. 이 값은 문헌⁽¹¹⁾에 보고된 결과와 비교하더라도 높은 정확도를 보여주는 것이다.

플로우 합성에서 용매 농도의 예측

NIR 분광 측정 작업을 시작한 후 DIEA 용액(MTHP에 용해된)과 COMU 용액(DMF에 용해된)은 각각 1.0mL/min 및 1.5mL/min의 속도로 전달되기 시작하였다. 약 3분 후 Fmoc-Oic-OH(DMF에 용해된) 및 STag 시작 물질(DMF/MTHP에 용해된)의 전달이 각각 3.0 mL/min 및 12 mL/min의 속도로 시작되었다.

그림 5는 플로우 합성 중 획득한 NIR 분광 측정 데이터이다. 측정을 시작한 지 2.5분 후 4980 cm⁻¹ 부근에서 DMF에 기인한 강한 흡수 피크가 관찰되었다. 이 시점에 용매 혼합물은 MTHP와 DMF 모두를 포함하고 있었고, DMF는 과잉 존재하였다. 5분 지점에서는 더 높은 유속으로 전달되고 있던 STag 시작 물질이 흐름에 합류하여 플로우 셀에 도달하면서 MTHP 피크를 관찰할 수 있었다(4700cm⁻¹ and 4780cm⁻¹). 7분 부터는 Fmoc-Oic-OH와 혼합되면서 결합 반응이 시작되었으며 안정적인 스펙트럼을 획득할 수 있었다.

그림 6은 획득한 스펙트럼과 PLSR을 통하여 구축한 회귀 모델을 사용하여 플로우 합성 중 각 용매의 농도를 예측한 결과이다. 측정 작업을 시작한 직후, 이 예측 값은 안정적이지 못했는데, 그 이유는 플로우 합성 시스템 내에 잔류 용매(물과 이소프로판올)와 기포가 존재했기 때문이다. 그러나 측정작업을 시작한 후 2.5분에 DMF가 검출되었다. 모든 용매에 대한 예측 값의 정확도는 낮은 수준을 보였는데, 이는 DMF의 농도가 이 회귀 모델의 범위를 초과하였을 뿐 아니라 유속이 아직 안정화되지 않았기 때문인 것으로 보인다. 5분 지점에도 2.5분 지점과 마찬가지로 유속이 아직 안정적이지 못하였기 때문에 예측 값의 정확도는 낮은 수준을 유지하였다. 그러나 7분 이후부터는 유동 속도가 안정화되었고, 예측한 용매의 농도 역시 일관성을 띄기 시작하였다.

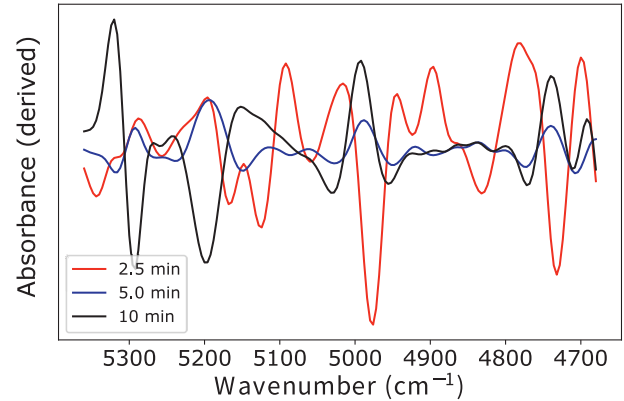


그림5 흐름 합성 중 NIR 스펙트라: 측정 시작 후 2.5분(적색), 측정 시작 후 5분(청색), 측정 시작 후 10분(검정색)

이러한 값은 각 시약 용액의 유속과 1.0g/cm³로 가정한 용질 밀도를 기반으로 추정된 이론 상의 농도에 근접한 값이었다.

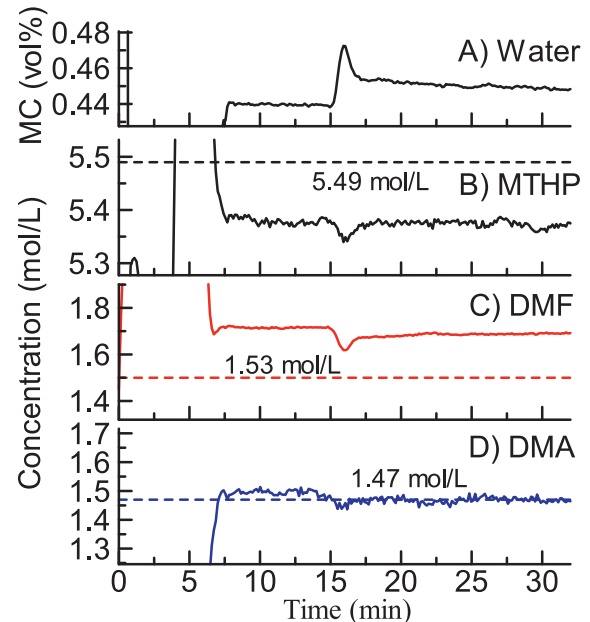


그림6 흐름 합성 동안 예측된 용매 농도(mol/L) 및 수분 함량(MC, vol%)(실선)과 이론적 농도(점선)

측정 작업을 시작한 후 16분 지점에서 약간의 농도 변화가 관찰되었기 때문에 20~30분 사이의 측정 값에 대한 표준편차(S.D.)를 계산하였다. 표 3에서 확인할 수 있는 바와 같이 모든 용매의 변화는 0.1vol% 이내였다. 유량계 데이터를 확인한 결과 각 용매의 유량 및 압력 모두 안정적이었는데, 이는 용매 농도가 일정하며 NIR을 통해 구한 예측 값 역시 안정적이라는 사실을 의미한다.

플로우 합성 중 수분 함량은 0.45vol%였다. 측정 작업을 시작한 후 16분 지점에서 수분이 약간 증가하였다는 사실을 관찰하였다. 이는 STag 시작 물질에 포함된 미세 물방울이 통과하기 때문인 것으로 보인다.

표3 흐름 합성 동안 예측된 용매 농도(mol/L) 및 수분 함량

	Average		S.D.	
	mol/L	vol%	mol/L	vol%
MTHP	5.37	62.5	0.0063	0.073
DMF	1.69	13.0	0.0032	0.025
DMA	1.47	13.6	0.010	0.093
Water	0.25	0.45	0.00057	0.0010

수분 함량의 비정상적인 증가는 합성에 현저한 영향을 미칠 수 있다. 이는 지용성 화합물의 용해도 감소 및 반응 억제와 같은 품질 문제를 일으킬 수 있으며 또한 흐름 경로가 막히는 결과를 가져올 수 있다. 따라서 모니터링 작업이 필수적이다. 그림 4 및 6의 결과에 따라 예측된 수분 함량의 표준편차는 약 10ppm이었다. 이는 플로우 합성 중 수분 함량이 미세하게 변동한다 하더라도 검출해 낼 수 있다는 의미이며, 합성 공정에 있어 이 모니터링 방법의 효과를 증명하는 것이다.

결론

이 연구에서는 배치 및 플로우 합성 공정에서 실시간 NIR 측정을 위한 마이크로 플로우 셀을 개발하였으며, PLSR을 사용한 용매 농도 및 수분 함량의 예측 방법을 조사하였다. 용매 농도와 수분 함량을 높은 정확도로 예측할 수 있다는 사실을 입증하였고, 용매의 농도는 반응이 정상적으로 진행되고 있는지 여부를 확인하는 지표로써 사용할 수 있다. 예를 들어, 반응 공정 중 생성물의 수율 감소나 불순물의 증가와 같은 비정상적인 상황이 발생하는 경우, 용매의 농도는 원인을 파악하는 데 중요한 정보를 제공할 수 있다.

수분 함량은 NIR 또는 IR 스펙트럼을 사용하여 정량화 할 수 있으며, 이 방법은 이미 실용화되었으나, 합성 공정에 대하여 이러한 기술을 적용한 사례는 많지 않다. 물분자는 분자량이 낮아 비록 소량이라 하더라도 반응에 영향을 미칠 수 있으며, 높은 정밀도의 검출 기술을 사용할 필요가 있다. 이 연구 결과의 예측 값의 표준 편차는 약 10ppm이었고, 이는 실제로 사용하기에 적합한 수준의 검출 정확도이다.

일반적으로 NIR 스펙트럼이나 이와 유사한 방법을 사용하는 실시간 인라인 분광 분석 방법의 주요 목적은 원자재와 반응 생성물을 모니터링하는 것이다. 이 연구에서는 획득한 스펙트럼을 통해 용매의 농도와 수분의 함량도 예측할 수 있다는 사실을 입증하였다.

이는 적용 방식에 따라 인라인 분광 분석 시스템이 반응에 대한 많은 정보를 제공할 수 있으며, 이를 반응 메커니즘, 반응 조건의 검토 및 이상 반응의 탐지와 같은 작업에 유용하게 사용할 수 있다는 사실을 시사하는 것이다. 앞으로 인라인 분광 분석 방법의 잠재력을 완전히 인식하고 그 가치를 향상시키기 위해 다양한 영역에 확대 적용하기 위한 노력을 기울일 것이다.

감사의 말

이 연구는 PeptiStar, Inc.와의 협업을 통해 수행되었습니다.

참고문헌

(1) Joshua Britton and Colin L. Raston, “Multi-step continuous-flow synthesis,” Chemical Society Reviews, Vol. 46, No. 5, 2017, pp. 1250-1271

(2) Shu Kobayashi, “Flow “Fine” Synthesis: High Yielding and Selective Organic Synthesis by Flow Methods,” Chemistry—An Asian Journal, Vol. 11, No. 4, 2015, pp. 425-436

(3) Naoto Sugisawa, Hiroyuki Nakamura, et al., “Recent Advances in Continuous-Flow Reactions Using Metal-Free Homogeneous Catalysts,” Catalysts, Vol. 10, No. 11, 2020, p. 1321

(4) Toshiyuki Kawabe, et al., ed. by Technical Information Institute, Scale-up and Continuous Operation of Chemical Processes, Technical Information Institute, Japan, 2019 (in Japanese)

(5) Koji Machida, Hideo Kawauchi, et al., “Development and Implementation of Innovative Technologies for Continuous Pharmaceutical Production,” Proceedings of the Summer Symposium of the Japanese Society for Process Chemistry, 2024, pp. 58-59 (in Japanese)

(6) Yusuke Hattori, “Raman and near-infrared spectroscopy for in-line sensors,” Analytical Sciences, Vol. 38, No. 11, 2022, pp. 1455-1456

(7) Shinya Yano, Toshihiro Mori, et al., “Silylated Tag-Assisted Peptide Synthesis: Continuous One-Pot Elongation for the Production of Difficult Peptides under Environmentally Friendly Conditions,” Molecules, Vol. 26, No. 12, 2021, p. 3497

(8) Daisuke Kubo, Yuma Otake, et al., “Development of a Continuous-Flow Manufacturing Device for Peptide Active Pharmaceutical Ingredients,” Yokogawa Technical Report English Edition, Vol. 66, No. 1, 2023, pp. 11-16

(9) V. Fornés, J. Chaussidon, “An interpretation of the evolution with temperature of the $\nu_2+\nu_3$ combination band in water,” The Journal of Chemical Physics, Vol. 68, No. 10, 1978, pp. 4667-4671

(10) Harvey Franklin Fisher, William C. McCabe, et al., “Near-infrared spectroscopic investigation of the effect of temperature on the structure of water,” The Journal of Physical Chemistry, Vol. 74, No. 25, 1970, pp. 4360-4369

(11) Salvador Garrigues, Máximo Galignani, et al., “Flow-injection determination of water in organic solvents by near-infrared spectrometry,” Analytica Chimica Acta, Vol. 281, No. 2, 1993, pp. 259-264

* STag and STag-PS are registered trademarks or trademarks of Sekisui Medical Co., Ltd. in Japan and other countries.

* All other company names, organization names, product names, service names, and logos that appear in this paper are either registered trademarks or trademarks of Yokogawa Electric Corporation or their respective holders.