

Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションを用いたデュアルリアクタサンプリング

Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブによる 2 つのリアクタの切り替え

著者

Edgar Naegele and
Vladimir Suvorkin
Agilent Technologies, Inc.

概要

このアプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションとシームレスに一体化したサンプリング機器としての Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブの機能について説明します。この機能により、Agilent OpenLab CDS と Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアを用いて、サンプリングを完全にコントロールすることが可能です。簡単に操作できるため、ユーザーのニーズに合わせて反応容器からサンプリングし、反応容器をオンライン LC に接続できます。例として、2 つの異なる pH 条件で加水分解反応に関して、2 つのリアクタをモニタリングしました。

はじめに

化学反応や生物学的変換のオンライン LC 分析において、関連のサンプリング機器を用いた反応容器から行う効率的で再現性に優れたサンプリングは、プロセスワークフローにおける重要な構成要素です。サンプリングの最も簡単な方法は、サンプリング機器として、シンプルなピストンポンプ、ペリスタルティックポンプ、プログラマブルシリンジポンプ¹、または単純にイソクラティック HPLC ポンプを使用することです。より複雑なサンプリング機器を使用することで、オンライン LC に反応溶液を送液できるだけでなく、異なる反応容器からサンプルを採取したり、HPLC に注入する前に反応溶液を希釈またはろ過したりすることが可能です。したがって、多くの場合にこれらのモジュールは、個別の制御ソフトウェアと、オンライン LC へのカスタマイズされた接続が必要となります。

1290 Infinity フレキシブルキューブは、内部ピストンポンプを使用することで、(リアクタ)測定場所から反応溶液を吸引できます。2つの内蔵型スイッチングまたはストリーム選択バルブを組み合わせることで、柔軟性が向上し、アプリケーションに応じてサンプリングストリームを転換できます。フレキシブルキューブは内部圧力モニタリングとキャリーオーバーを防ぐフラッシング機能でサポートされており、複数の測定場所や反応容器からサンプリングを実行できます。4/2 ウェイ溶媒選択バルブ (SSV) を取り付けるオプションにより、3 種類の溶媒にまでフラッシング機能が拡張され、さまざまな測定場所からの反応溶媒に対応できます (図 1)。さらに、フレキシブルキューブは標準的な CAN インタフェース経由で InfinityLab オンライン LC ソリューションに接続されるため、OpenLab CDS ソフトウェアにより完全にコントロールでき、LC 取り込み

メソッドの一部となります。OpenLab CDS 取り込みメソッドと一体化することで、フレキシブルキューブは、オンライン LC モニタリングソフトウェアでスムーズに使用することが可能です。

このアプリケーションノートでは、お客様のアプリケーションに合わせた柔軟で高度なサンプリング機器として、フレキシブルキューブを InfinityLab オンライン LC ソリューションセットアップに組み込んで使用する方法を説明します。サンプルは、異なる pH 値でアセチルサリチル酸の加水分解を実行する 2 つのリアクタから採取します。² 実験は、オンライン LC モニタリングソフトウェアによって調整します。取得結果は対応するトレンドプロットで視覚化します。

実験方法

表 1 に、本研究で使用する機器とソフトウェアの詳細を示します。表 2 にメソッドパラメータを、表 3 に反応条件を示します。

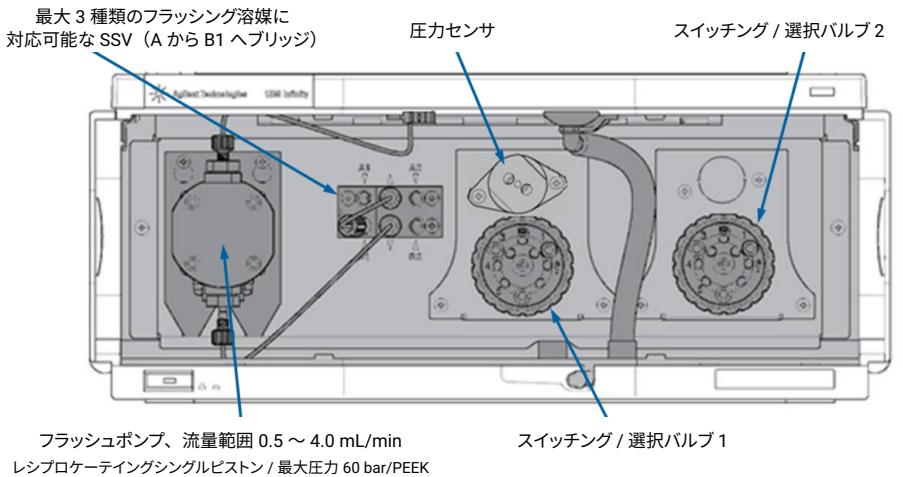


図 1. Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブの構成例

表 1. 機器および制御ソフトウェア

製品タイプ	製品概要
機器	- Agilent 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A) - 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)、Agilent 1290 Infinity バルブドライバ (G1170A) の外部バルブ (p/n 5067-6680) でクラスタ化、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) - Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B) と Agilent InfinityLab Max-Light カートリッジセル、10 mm (G4212-60008) - Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブ (G4227A) に選択バルブ (G4235A) を 1 個または 2 個取り付け
カラム	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、3.0 × 30 mm、1.9 μm (p/n 691775-302)
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 1.1

表 2. メソッドパラメータ

パラメータ	設定値
分析メソッドの条件：Agilent OpenLab CDS	
移動相溶媒	A) 水 + 0.1 % ギ酸 (FA) B) アセトニトリル (ACN) + 0.1 % FA
移動相流量	1.0 mL/min
イソクラティック分離の条件	35 % B、ストップタイム：0.5 分
カラム温度	45 °C
フィード注入（自動）	分析流量の 80 %
溶媒のフラッシュアウト	水 (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、1:1 水：ACN + 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	230 ± 4 nm、リファレンス：360 ± 50 nm、20 Hz データ範囲
サンプリングからバイアル（希釈）：Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア	
サンプリング	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 1 – 吸引スピード：130 µL/min – 待ち時間：1.2 秒 – 分注スピード：155 µL/min (希釈前にウェルにサンプルを排出)
希釈溶媒	S2 (水)
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	表 3 を参照
サンプル供給メソッドの条件：Agilent OpenLab CDS および Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブ	
ポンプ	Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブのピストンポンプ
流量	3 mL/min、(リアクタからのサンプリングおよびフラッシングにそれぞれ) タイムベース 0.5 分
リアクタの選択（図 2 を参照）	– 「PrerunBlank 01」サンプルで使用する OL CDS メソッドのための選択バルブポジション 1（注入なし） – 「PrerunBlank 02」サンプルで使用する OL CDS メソッドのための選択バルブポジション 2（注入なし） – 「DilutedToVialSetting 01 and 02」サンプルで使用する OL CDS メソッドのための選択バルブポジション 12（表 4）

表 3. リアクタおよび反応条件

反応条件	
リアクタ	Mettler Toledo EasyMax 102、2 つの 50 mL 反応容器を装着、Julabo クーラーと接続
反応物質	アセチルサリチル酸、50 mg/50 mL
溶媒	pH 9 および pH 10 のグリシンバッファ (45 mL)
攪拌	25 °C
反応開始	抽出物を添加することにより反応が開始：5 mL の EtOH に 50 mg のアセチルサリチル酸

機器構成

1290 Infinity フレキシブルキューブに、選択バルブを 1 個または 2 個取り付けました。3 種類の洗浄溶媒のいずれかを送液するために、1 番目のストリーム選択バルブをポート 12 で内部 4/2 ウェイ SSV に接続しました。洗浄溶媒は、サンプリング間のキャリーオーバーを防ぐために、それぞれの溶出性能を考慮して選択する必要があります。1 番目のストリーム選択バルブのポート 1 とポート 2 は適宜、反応容器 1 と反応容器 2 に接続しました。対応のリアクタから Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャの外部サンプリングインタフェースへサンプルを吸引するために、1 番目のストリーム選択バルブの中央の共通ポートは内蔵ピストンポンプに接続しました（図 2）。この設定では、吸引されるサンプルストリームの一部が、ダウンストリームで接続されている外部サンプリングインタフェースを通じて、別のリアクタ廃液容器へと廃棄されます。

フレキシブルキューブに取り付けられた 2 番目のストリーム選択バルブは、吸引されたサンプルを反応容器に戻して、反応溶液の損失を防ぐオプションを提供します（図 3）。したがって、チューブに残っているフラッシング溶媒によりリアクタが汚染されないように、接続用チューブのデッドボリュームを考慮する必要があります。

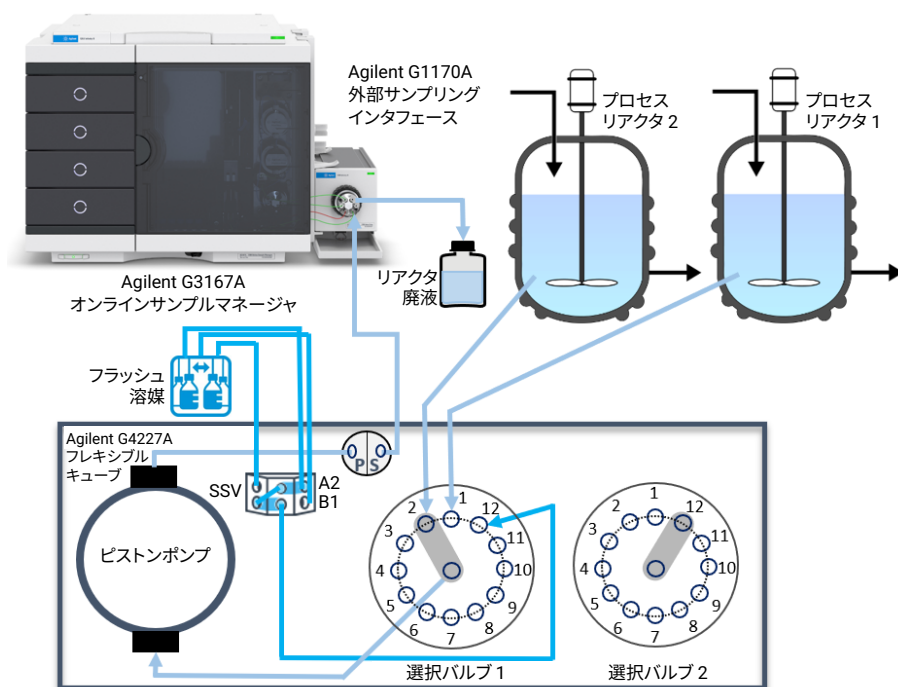


図 2. Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブを 2 つの反応容器のためのサンプリング機器として、Agilent InfinityLab オンライン LC システムに接続した配管図

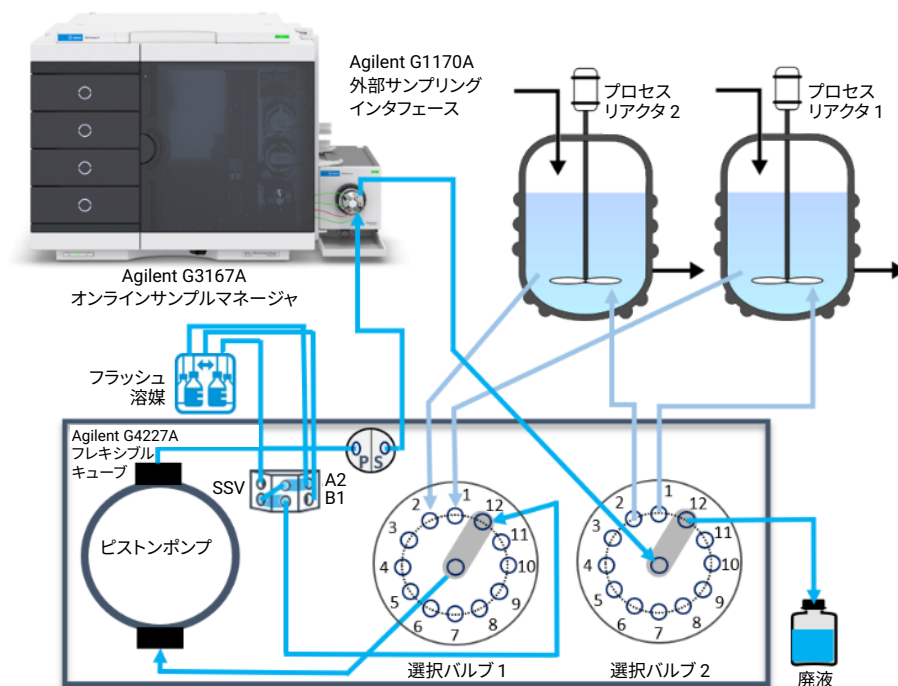


図 3. Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブを 2 つの反応容器のためのサンプリング機器として、Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションに接続した配管図（サンプルがリアクタへ戻るための 2 番目のストリーム選択バルブを含む）

試薬

- アセチルサリチル酸
- サリチル酸
- ギ酸
- グリシン
- NaCl
- NaOH
- EtOH

グリシン緩衝液

- 原液
 - **A) グリシン**：0.1 mol/L + NaCl
0.1 mol/L (グリシン 7.507 g、NaCl 5.844 g)
 - **B) NaOH**：0.1 mol/L
(3.999 g NaOH)
- **グリシンバッファ pH 9**：溶液 A 884 mL + 溶液 B 116 mL
- **グリシンバッファ pH 10**：溶液 A 625 mL + 溶液 B 375 mL

その他の材料

- 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）
- 選択バルブへのリアクタの接続：外径 1.6 mm PTFE チューブ（部品番号 5041-2191）、フェラル（部品番号 5022-2154）、PTFE ナット（部品番号 50222158）
- サンプリグインタフェースへのフレキシブルキューブ加圧バルブの接続：SST キャピラリ内径 0.17 mm、長さ 900 mm（部品番号 5500-1217）
- 廃液容器または 2 番目の選択バルブへのサンプリグインタフェースの接続：外径 1.6 mm PTFE チューブ、フィッティングとフェラル（部品番号 5065-4454）

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

このアプリケーションノートでは、最近発表された他のアプリケーションノートのとおりに、異なる 2 つの pH 値で塩基性条件下の、アセチルサリチル酸からサリチル酸への加水分解を一例として用いました²。加水分解は 2 つの独立した反応容器を使用して、同じ温度で pH 値 10.0 および 9.0 で実行しました。反応容器は pH 10.0（リアクタ 1）および pH 9.0（リアクタ 2）の 45 mL のグリシンバッファで充填しました。リアクタ 1 では、5 mL のエタノールに溶解した 50 mg のアセチルサリチル酸を添加することで反応が開始され、同時にオンライン LC モニタリングソフトウェアによって最初のサンプリグを開始しました。フレキシブルキューブで 1 番目のストリーム選択バルブのポート 1 に接続されたリアクタ 1 からサンプルを採取し、オンライン LC サンプルマネージャの外部サンプリグインタフェースに反応溶液を移送するために、バルブをポジション 1 に切り替えました。

最初の「PrerunBlank 01」サンプル分析実行で定義したパラメータ（表 4、開始時間：00 時間 00 分）に従い、リアクタ溶液の移送はフレキシブルキューブのピストンポンプで実行しました。次に、後続の「DilutedToVialSetting 01」サンプル分析実行（表 4、開始時間：00 時間 01 分）のパラメータの一部として、リアクタ 1 の溶液を希釈して分析しました。次に、ストリーム選択バルブをポジション 12 に切り替えました。このポジションをフレキシブルキューブ 4/2 ウェイ SSV に接続し、サンプリグパスのフラッシングのための適切な溶媒を用いて、2 つの異なるリアクタから採取された反応溶液のキャリーオーバーを防止しました。リアクタ 1 の説明のとおり、5 分の時点で、反応が始まるのと同時に、「PrerunBlank 02」サンプル分析実行（表 4、開始時間：00 時間 05 分）の一部として、リアクタ 2 から最初のサンプリグを開始しました。ポート 2 に接続されたリアクタ 2 からサンプルを採取し、1 番目のストリーム選択バルブをポジション 2 に切り替えて、前述のサンプリグおよびフラッシングのステップを繰り返しました。両方のリアクタの 1 回のサンプリグサイクルを実行するこの一連のステップを 30 分ごとに 21 回繰り返しました。実験を完了するのに約 10 時間を要しました。

表 4. Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア実験設定で使用された、2 つのリアクタからのサンプリグスケジュール

Type	Setting		Start time	Interval	Count	Start last action
Blank Sample	PrerunBlank 01	▼	00h 00m	00h 30m	21	10h 00m
Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	▼	00h 01m	00h 30m	21	10h 01m
Blank Sample	PrerunBlank 02	▼	00h 05m	00h 30m	21	10h 05m
Diluted to vial	DilutedToVialSetting 02	▼	00h 06m	00h 30m	21	10h 06m

両方の反応容器の結果は、オンライン LC モニタリングソフトウェアのトレンドプロットで曲線として表示され、反応成分がリアルタイムで反映されています（図 4）。この目的のために、リアクタ 1 から取得されたデータと、リアクタ 2 から取得されたデータに対し、2 つの OpenLab CDS のデータ解析メソッドを適用しました。どちらのリアクタでモニタリングした成分も同じであるため、成分名に、リアクタ識別子 1 または 2 に基づく異なるサフィックスを付けました（表 5、図 5）。モニタリング実験の間に収集されたサンプル中のアセチルサリチル酸とサリチル酸の組成に対し、結果を「Area %」の単位で示しました。リアクタ 1 に

おける pH 10.0 のアセチルサリチル酸（図 4、青曲線）からサリチル酸（図 4、緑曲線）への加水分解はすばやく発生し、約 70 分で 50 % 変換されました。一方、リアクタ 2 における pH 9 のアセチルサリチル酸（図 4、紫曲線）からサリチル酸（図 4、オレンジ曲線）への加水分解は、10 時間後の時点でも 50 % の変換に達していません。

サンプルは交互に取得されたため、奇数のサンプル番号はリアクタ 1 に、偶数のサンプル番号はリアクタ 2 に属します。表 5 に、サンプル 5（60 分の時点におけるリアクタ 1）の組成と、サンプル 42（約 10 時間の時点におけるリアクタ 2）の組成を示します。これらの組

成は、「Area %」の単位で類似の変換率を示しており、リアクタ 2 の pH 9.0 では反応がより遅いことが実証されています。

アセチルサリチル酸とサリチル酸の高速イソクラティッククロマトグラフィーによる分離では、アセチルサリチル酸のリテンションタイムは 0.250 分、サリチル酸のリテンションタイムは 0.310 分でした（図 5）。

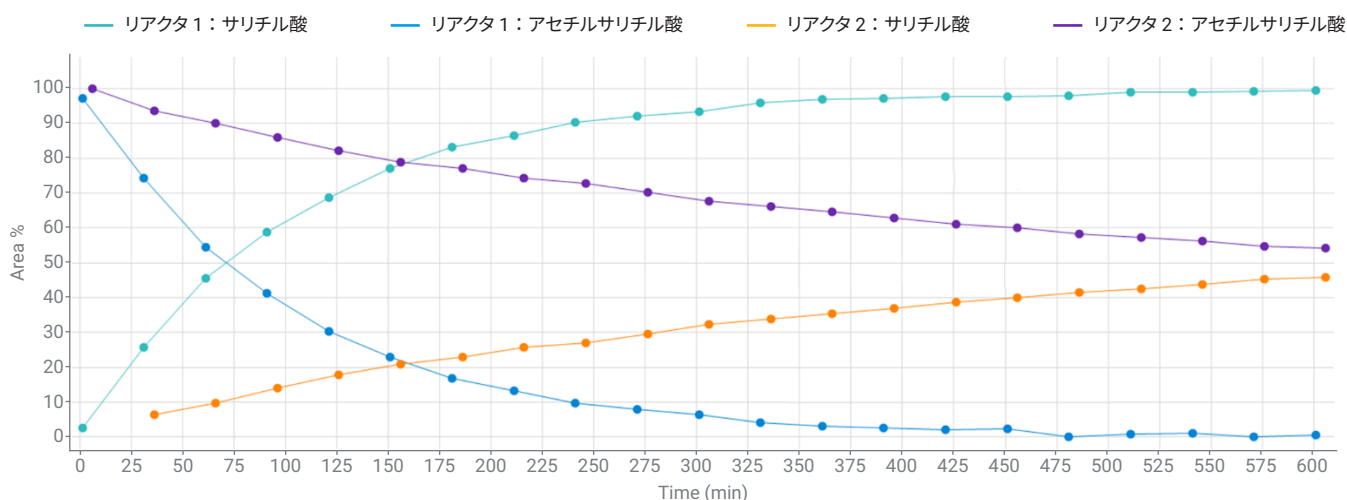


図 4. アセチルサリチル酸の加水分解に関する 2 つの反応容器のモニタリング結果のトレンドプロット：リアクタ 1 は pH 10.0（青と緑の曲線）、リアクタ 2 は pH 9.0（オレンジと紫の曲線）

表 5. サンプル 5 およびサンプル 42 のリアクタ 1 およびリアクタ 2 の組成

Results

Sample	Compound	RT (min)	Area%
	<ALL>		
Sample-5	Acetylsalicylic acid 1	0.259	54.450
	Salicylic acid 1	0.310	45.550
Sample-42	Acetylsalicylic acid 2	0.259	54.250
	Salicylic acid 2	0.309	45.750

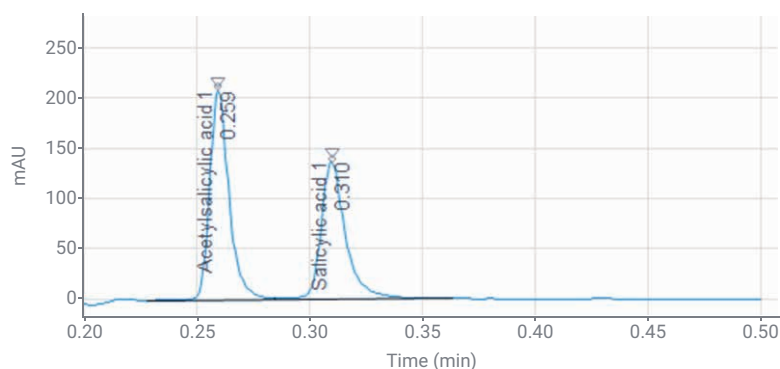


図5. アセチルサリチル酸 (0.259 分) およびサリチル酸 (0.310 分) のイソクラティック分離のクロマトグラム。クロマトグラムは、60 分の反応時間におけるリアクタ 1 の組成を示しています (サンプル 5)。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent 1290 Infinity フレキシブルキューブと Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションを使用して、2 つの反応容器からサンプリングを行う方法を説明しました。シームレスに統合されたフレキシブルキューブを含め、分析メソッド全体は、Agilent OpenLab CDS データ取り込みソフトウェアによってコントロールされます。Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアによって実験を管理でき、両方の反応容器から取得したデータはリアルタイムで表示されます。実験後に、より短時間で、評価を完了することが可能です。したがってユーザーは、サンプル測定、分析、データ解析を、1 つのシステムで簡単に処理することができます。

参考文献

1. Naegele, E.; Herschbach, H. Delivery of Reactants from a Batch Reactor Using the Agilent InfinityLab Online LC Solutions. Agilent Technologies technical overview, publication number 5994-5658EN, **2023**.
2. Naegele, E.; Kutscher, D. Online Reaction Monitoring by the Agilent InfinityLab Online LC Solutions. Agilent Technologies application note, publication number 5994-3528EN, **2021**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

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。

DE68741828

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, February 21, 2023

5994-5811JAJP