

フローケミストリリアクタにおける 有機酸エステルの加水分解の オンライン LC モニタリング

Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューション

著者

Conor Burke, Eóin T. Bourke,
Brian Mangan, Melba Simon,
Damian Connolly, and
Brian Glennon
APC Ltd, Dublin, Ireland
Edgar Naegele and
Daniel Kutscher
Agilent Technologies, Inc

概要

このアプリケーションノートでは、フローケミストリリアクタと Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションを組み合わせることで可能となる機能について紹介します。高精度の直接注入およびサンプリングモードにより、反応全体やその特性に対するさまざまな反応パラメータの影響を測定できます。サンプリングと分析は、Agilent Online LC モニタリングソフトウェアによって完全に制御されます。これにより、安全かつ経済的な方法で実験モニタリングを完全に自動化できます。

はじめに

フローリアクタの使用により、化学反応による目的生成物を連続生産が可能となります。これは、バッチリアクタと異なり、反応の前後でロードと洗浄の必要がありません。フロー反応ケミストリは、低分子化合物を生成するのにより経済的な方法であるため、最近大きな関心を集めています。このアプリケーションノートでは、Agilent Infinity Lab オンライン LC ソリューションを使用してフローケミストリ反応をモニタリングする方法について説明します。例として、有機酸の加水分解を選択しました。Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションは、Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアとともに使用することで、実験のオンライン分析を制御できます。得られたデータを使用して反応を最適化し、目的の生成物を最大量得ることができるようになります。

実験方法

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 1290 Infinity パルプドライブ (G1170A) に配置された外部バルブ (部品番号 5067-6680) とクラスター化された Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャ (G3167A)、および Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア
- 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャ用サーモスタット (G7167-60005)
- 標準熱交換器 (G7116-60051) を備えた Agilent 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)
- Max-Light カートリッジセル (10 mm、G4212-60008) を備えた Agilent 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B)
- フローケミストリリアクタCorning アドバンスドフローリアクター低流量¹

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

カラム

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、4.6 × 50 mm、1.8 μm (部品番号 959941-902)

分析メソッド

パラメータ	設定値
溶媒	A) 水 +0.1 % 脂肪酸 (FA) B) アセトニトリル + 0.1 % FA
分析流量	2 mL/min
イソクラディック	30 % B
ストップタイム	1.5 分
カラム温度	50 °C
フロースルー注入	吸引スピード：100 μL/min 排出スピード：400 μL/min 吸引後待ち時間：1.2 秒
サンプル量	1 μL
ニードル洗浄	3 秒、水：ACN 1:1、0.1 % FA
内部洗浄と再コンディショニング	溶媒 S2
サンプリング	直接注入メソッドを参照
ダイオードアレイ検出器	243 ± 4 nm、参照：390 ± 100、データレート 40 Hz

リアクタストリームからの直接注入

- 吸引スピード：設定 2 (吸引スピード：100 μL/min、待ち時間：3.6 秒)
- 各タイムポイントで、システムは定常状態に到達 (H₂SO₄ およびアスピリンフィードは、それぞれの特定の対応する流量で供給)。
- オンライン HPLC によりこのプロセスの進行状況をモニタリング。関連する分析対象物がピーク面積のパーセント率に関して十分な一貫性を示したら、値を記録。

単一容器でのバッチ反応

- 硫酸 (H₂SO₄) 触媒を使用
- ベンチトップ反応容器を使用しマグネティックスターラーにより攪拌
- ホットプレート温度：75 ~ 100 °C
- 出発物質は 0.3 g/L アセチルサリチル酸 (H₂O 中)
- 反応フィードから直接注入
- Watson Marlow 120 シリーズ ペリスタルティックポンプ：ポンプに使用されている C-Flex チューブ (C-Flex 6424-13、内径 0.8 mm) により、反応容器を Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャのインタフェースバルブに接続。C-Flex には、多くの一般的な LC およびプロセス溶媒との強い化学的適合性があります。C-Flex は、PEEK チューブ (内径：0.13 ~ 0.8 mm) に接続することでオンライン LC システムとのインターフェースとなります。バルブドライブを保護するインラインフィルタを用います。25 rpm の速度で、Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューション のリアクタインタフェースへの連続流を生成しました。

フローケミストリ反応：Corning アドバンスドフローリアクター低流量。¹ Corning アドバンスドフローリアクターは、専用のマイクロ流体セクションを備えた構成可能なモジュール式マイクロ流体デバイスで、反応物を後続のコンタクトマイクロ流体チップで混合して反応を最適化します。マイクロ流体チップセット全体がサーモスタットで温度制御され、反応物はシリンジポンプによって混合チップに供給されます（図 1）。

熱交換器は、すべての実験で 86 °C に設定しました。アセチルサリチル酸の濃度は 0.016M としました。硫酸の濃度を、0.16、0.375、0.75、および 1.5M で変化させました。滞留時間は 1、5、10、30、および 60 分で変化させました（対応するリアクタへの供給流量については、表 1 を参照してください）。

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。

その他

- Agilent 96 ウェルプレート、0.3 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）
- Agilent 茶色広口バイアル（部品番号 5182-0716）、Agilent コニカルインサート（部品番号 5181-1270）、および Agilent スクリューキャップ（部品番号 5182-0721）

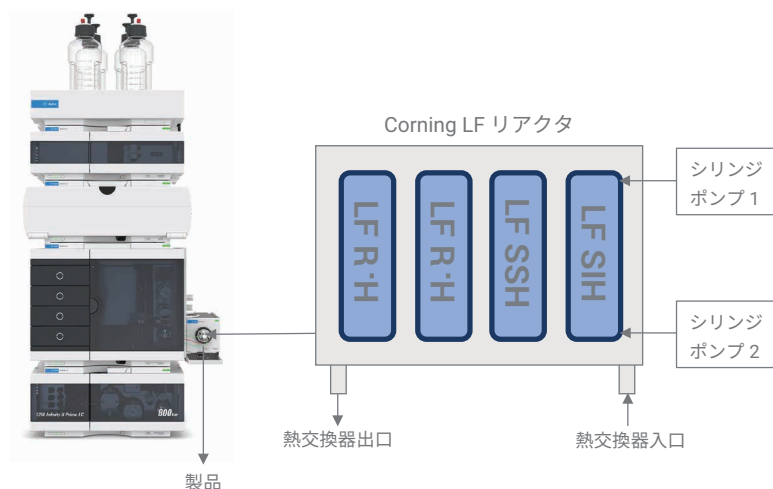


図 1. Corning 低流量リアクタを Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションに接続した場合の概略図。（LF-SHH：0.5 mL、2 つの反応物に接触する 1 つの注入ゾーン。
LF-R×H、0.5 mL ミキシングチップ、「ワン・イン・ワン・アウト」）

表 1. フローリアクタ内のアセチルサリチル酸と HCl の滞留時間に応じて、2 つのシリンジポンプによって提供されるリアクタ供給流量

滞留時間（分）	シリンジポンプ 1 アセチルサリチル酸 フィード（mL/min）	シリンジポンプ 2 H ₂ SO ₄ フィード（mL/min）	合計流量（mL/min）
1	1.0	1.0	2.0
5	0.2	0.2	0.4
10	0.102	0.102	0.204
30	0.034	0.034	0.068
60	0.017	0.017	0.034

結果と考察

信頼性の高い反応モニタリングを行うには、ピーク面積とリテンションタイムを高精度で測定可能な機器をセットアップする必要があります。セットアップした機器が高品質のデータを生成できることを確認するために、0.2 mg/mL のアセチルサリチル酸とサリチル酸の混合物を反応容器から Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションにポンプで送り、サンプルを 3 分ごとに採取して直ちに分析しました。その結果、2 つの成分を高分離かつ、高速で分離することができました。アセチルサリチル酸とサリチル酸のピーク面積の精度はそれぞれ 1.1 % と 1.3 % であり、リテンションタイム精度はそれぞれ 0.07 % と 0.06 % でした（図 2）。アセチルサリチル酸とサリチル酸の間のピーク分離能が 5.8 であるため、クロマトグラフィーとして 30 秒未満で分離できる能力もあります。これらの結果は、ピーク面積

のパーセント率とリテンションタイムの両方で堅牢な再現性を示し、さらに両方の分析対象物の分離能とピーク形状で堅牢な再現性があることを示しました。使用したペリスタルティックポンプは、反応容器からの供給機構として高い信頼性を示しました。

Infinity II オンライン LC システムの使用について評価するためのモデル反応として、フローケミストリリアクタと組み合わせて、酸性触媒を用いたアセチルサリチル酸（アスピリン）の加水分解を選択しました（図 3）。以前のアプリケーションノートで説明したように、この反応は、基本的な条件下で Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションを評価するために、バッチリアクタとも組み合わせました。³ サンプルをリアクタストリームから直接取り出し、その後クエンチング/希釈し分析が行えることが実証されています。反応が高速の場合でも、直接注入が可能であることが実証されています。

反応の最初のテストとして、実験のセクションで説明したように、パッチリアクタを使用しました。図 4 は、パッチリアクタで反応が進行する際のアセチルサリチル酸とサリチル酸の高速分離を示しています。リテンションタイムの精度は、上記と同じ順序で示されています。

フロー反応条件下での反応を最適化するために、滞留時間と酸濃度をより詳しく調べました。フローリアクタでの滞留時間を変化させるために、硫酸とアセチルサリチル酸溶液を供給するシリンジポンプの流量を適宜変更しました。アセチルサリチル酸の温度と濃度は、それぞれ 86 °C と 0.016 M で一定に保ちました。フローリアクタから出るフローストリームをオンライン LC システムに接続し、3 分ごとにサンプルを抽出しました。抽出物と生成物の面積パーセントが一定となった際に定常状態に達したと判断しました。その時点で、結果を計算するために 6 つのサンプルを抽出しました。

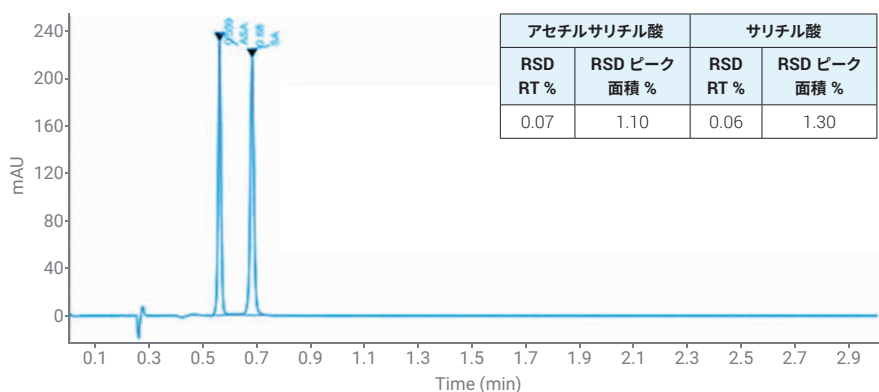


図 2. パッチリアクタとペリスタルティックサンプルポンプを含む機器セットアップの性能テスト

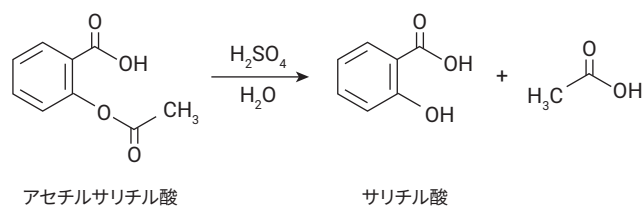


図 3. アセチルサリチル酸（アスピリン）のサリチル酸と酢酸への酸触媒加水分解

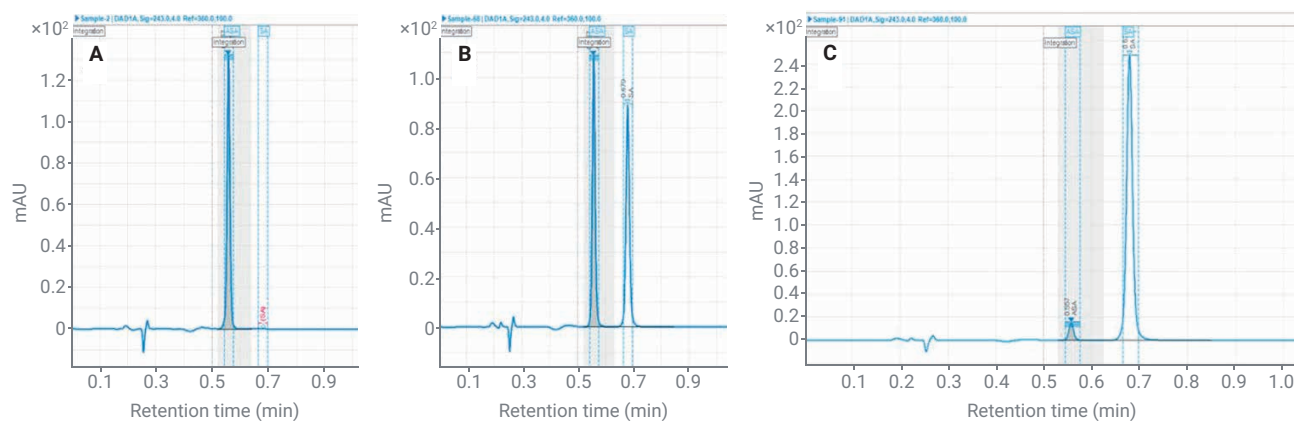


図 4. パッチリアクタ内のアセチルサリチル酸の酸触媒加水分解の進行。(A) アセチルサリチル酸との反応の開始。(B) アセチルサリチル酸の約半分はすでに加水分解されてサリチル酸が生成。(C) ほぼ反応終了

評価した最初のパラメータは、フローリアクタ内の抽出物の滞留時間です。シリンジポンプの流量は、1、5、10、30、および60分の滞留時間となるように設定しました（表1）。達成されたピーク面積パーセントの精度は、定常状態に達した後の6回の測定から計算しました（表2）。例えば、滞留時間30分で、アセチルサリチル酸のピーク面積は70.10面積

パーセントであり、サリチル酸の値は29.90面積パーセントでした。RSD値はそれぞれ0.01%と0.02%でした。

実験で得られた抽出物面積パーセントが減少する様子と生成物面積パーセントを図5に示します。例えば、60分の滞留時間で、抽出物のアセチルサリチル酸のピーク面積は54.81

%減少し、生成された生成物であるサリチル酸の面積パーセントは52.80%であり、2.01%の不純物がリアクタを出る混合物中に生成されました（表2）。

表2. 測定されたピーク面積パーセントに対する Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションの性能

滞留時間 (分)	面積 % ASA Avg	面積 % ASA StDev	面積 % ASA RSD	面積 % SA Avg	面積 % SA StDev	面積 % SA RSD	面積 % Imp. Avg	面積 % Imp. StDev	面積 % Imp. RSD
1	95.02	0.27	<0.01	4.98	0.27	0.05	N/A	N/A	N/A
5	89.84	0.19	<0.01	9.82	0.20	0.02	0.34	0.01	0.02
10	84.30	0.27	<0.01	15.70	0.27	0.02	N/A	N/A	N/A
30	70.10	0.52	0.01	29.90	0.52	0.02	N/A	N/A	N/A
60	45.19	0.23	0.01	52.80	0.18	<0.01	2.01	0.06	0.03

ASA：アセチルサリチル酸、SA：サリチル酸、Imp：不純物、Avg：平均、StDev：標準偏差、RSD：相対標準偏差

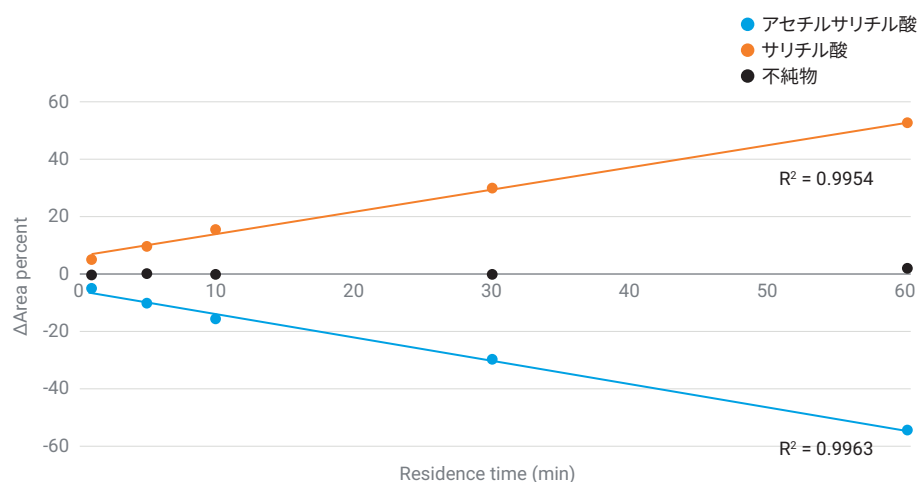


図5. 選択した滞留時間後にリアクタを出る反応成分の組成。発生する不純物も示されています。

フローリアクタ内での反応混合物の滞留時間が1時間となる条件は一定に保ち、硫酸の濃度を変化させて反応の進行への影響を調べました。図6に示すように、1.5 M 硫酸を使用すると、抽出物の加水分解反応はほぼ完了しますが、発生する不純物の濃度が高くなるという欠点があります。これらの条件下では、アセチルサリチル酸は95.55%減少し、サリチル酸への転化率は78.88%、副生成物の生成が15.87%という結果でした。(表3)。

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションとマイクロフローリアクタとの組み合わせによる、反応条件の最適化について示しました。3分ごとに1回のサンプリングサイクルで、ピーク面積とリテンションタイムの優れた精度が達成されました。これらの結果から、Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションは、反応最適化のために反応の特性パラメータを調べるための優れた選択肢となることが実証されました。これは、フローケミストリによって生成される貴重な製品の収量を最大化するのに役立ちます。

参考文献

1. www.corning.com
2. https://www.corning.com/media/worldwide/Innovation/documents/LF_WEB.pdf
3. 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

カスタマコンタクトセンタ

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。

DE76194294

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2022
Printed in Japan, June 02, 2022
5994-4733JAJP

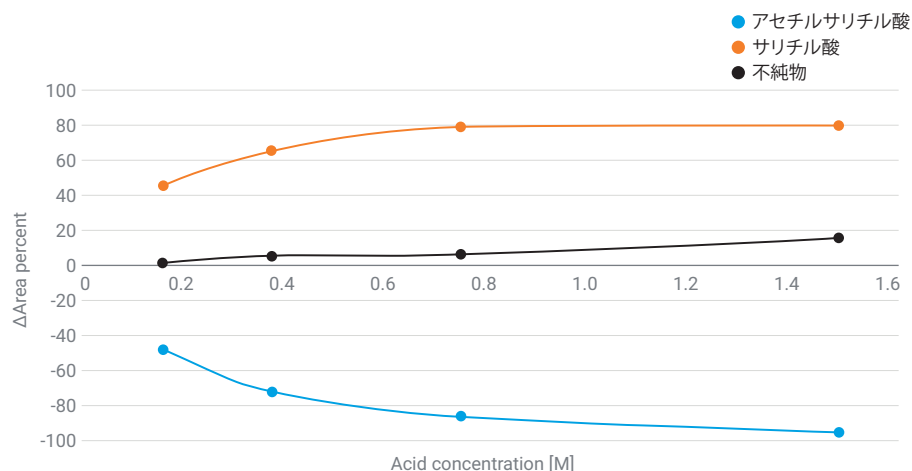


図6. リアクタを出る反応成分の組成（選択した硫酸濃度による違い）。発生する副生成物も示されています。

表3. 抽出物アセチルサリチル酸と生成物サリチル酸の組成（フローリアクタ内の硫酸の濃度による違い）。発生する不純物も示されています（AP = 面積パーセント）。

酸濃度 (M)	Δ (AP) アセチルサリチル酸	Δ (AP) サリチル酸	Δ (AP) 不純物
0.16	-47.57	45.71	1.86
0.38	-71.32	65.59	5.73
0.75	-85.59	79.03	6.56
1.50	-95.17	79.88	15.87