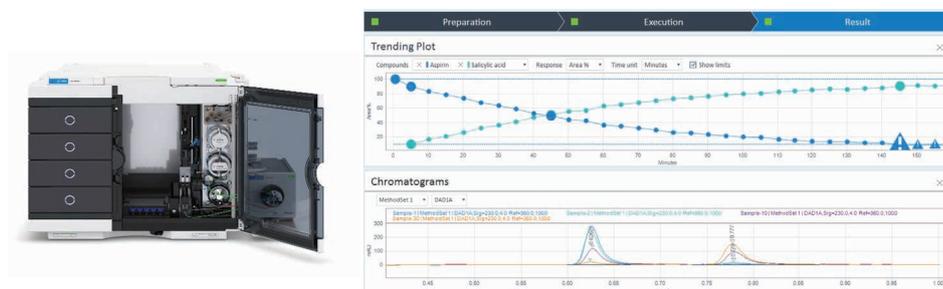


Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションによる オンライン反応モニタリング

反応速度が pH 値に依存するアスピリンの加水分解



著者

Edgar Naegele
Daniel Kutscher
Agilent Technologies, Inc.

概要

本アプリケーションノートでは、Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションを用いた低分子反応のオンラインモニタリングを実証します。高精度のサンプリングは、反応容器中の反応の定量モニタリング、および抽出物と生成物の濃度の正確な測定を実現します。InfinityLab オンライン LC モニタリングソリューションでは、注入前のサンプリングや希釈/クエンチングおよび高速化のための直接注入が可能です。これらの性能による反応モニタリングの最適化について紹介します。

はじめに

低分子医薬品およびバイオ医薬品の最新の製造工程では、例えば、オンラインでの反応モニタリング分析によって、反応を厳密にモニタリングする必要があり、可能な場合には制御も必要とされます。そのため、サンプリングデバイスを用いて UHPLC 機器を反応槽に接続することが有用です。InfinityLab オンライン LC ソリューションは、UHPLC を、Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャによる自動反応サンプル分析用の統合型リアクタサンプリングインタフェースと組み合わせて提供します。このデバイスでは、リアクタからサンプルを吸引し、注入前に希釈/クエンチングすることができます。

本アプリケーションノートでは、反応速度が異なる反応をモニタリングするための InfinityLab オンライン LC ソリューションの使用を紹介します。ここでは、サンプリングおよびクエンチングのための高速サンプリング速度、結果を最速で得るための直接注入が必要です。モデル反応として、アセチルサリチル酸（アスピリン）からサルチル酸への pH 依存の加水分解を取り上げます。

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) に取り付けられた外部バルブ (5067-6680) と組み合わせた Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャ (G3167A) と Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア
- Agilent 1260 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7115A)

機器のセットアップ (図 1)

Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションは Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャを特徴としています。このソリューションモジュールは、Agilent 1260 Infinity II マルチサンプラのハウジングをベースとしていますが、2 個の高度に同期したバルブ (モジュール内に 1 個と外に 1 個) などアジレント独自の新しいテクノロジーを使用しています。¹ 特別な切り替えモードを持つ新たに開発されたバルブコンセプトにより、アジレントの Feed 注入と従来型のフロースルー注入を可能としています。ポートおよび溝は、反応容器に対して直接的に吸引や注入ができ、注入前に希釈やクエンチングなどのサンプル処理ができるよう設計されています。1260 オンラインサンプルマネージャは別に独立したポンプユニット経由で反応容器に接続され、リアクタからの溶媒ストリームを提供します。ディレイボリュームを最少にするために、リアクタは内径 0.8 mm の PTFE チューブでポンプヘッドに直接接続されています。サンプリングおよび注入プロセス全体が、Agilent OpenLab CDS にシームレスに統合された専用の Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアによって制御されます。

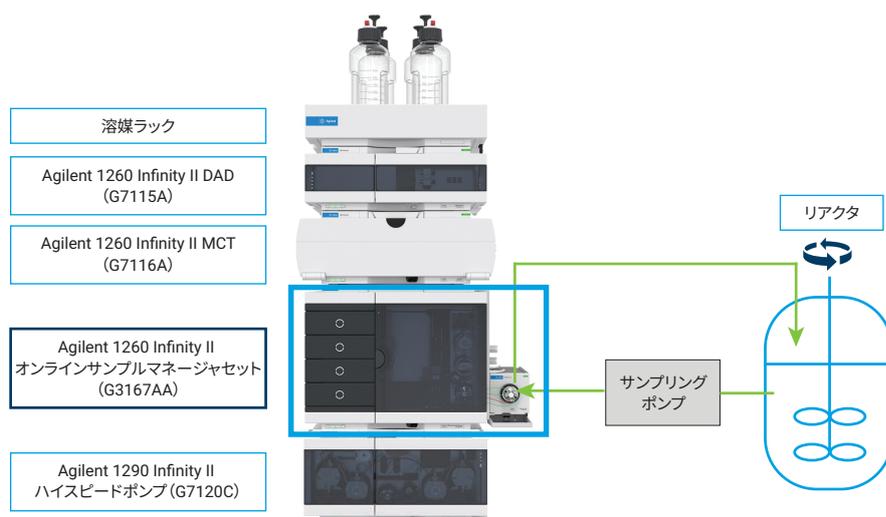


図 1. サンプリングポンプおよびリアクタを含む代表的な機器構成の概略図。

リアクタとポンプの接続：内径 0.8 mm の PTFE チューブ (p/n 5041-2191)、フェラル (p/n 5022-2154)、PTFE ナット (p/n 5022-2158)。ポンプとサンプリングインタフェースの接続：SST キャピラリー、内径 0.17 mm、長さ 900 mm (p/n 5500-1217) サンプリングインタフェースとリアクタの接続：内径 0.8 mm の PTFE チューブ、フィッティング、フェラル (p/n 5065-4454)

Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアの設定

オンライン LC モニタリングソフトウェアには、Configuration (設定)、Experiment Setup (実験の設定)、Experiment Run (実験の実行) の 3 つのセクションがあります。Configuration (設定) では、接続された CDS および機器を選択して表示できます。Experiment Setup (実験の設定) では、分析メソッドに、サンプルのハンドリング、スケジューリング、限界値を組み合わせます (図 2)。限界値として、反応化合物の面積パーセント率、濃度、補正済み濃度のいずれかを使用できます。反応の途中に限界値と交差すると、警告が表示されます。Experiment Run (実験の実行) セクションでは、サンプリング、キャリブレーション、品質管理、ブランク用のバイアルを選択して、実験を開始できます。実験の結果もこのセクションに表示されます。

Experiment Setup (実験の設定) の Samples (サンプル) タブでは、サンプリングメソッドと分析メソッドを選択して組み合わせることができます (図 3)。さらに、再キャリブレーション、QC サンプル、ブランクなどのコントロールを設定できます。直接注入の設定では、サンプルソースがリアクタストリームか

らまたはバイアルからのいずれかを選択でき、分析設定と組み合わせることができます (図 3A)。バイアルへのリアクタストリームからのサンプリングの設定では、希釈係数およびターゲットボリュームを設定でき、必要なサンプルの量が自動的に計算されます (図 3B)。希釈済み/クエンチング済みのサンプルは、後で分析するために保持されるか、または分析メソッドと組み合わせて直ちに分析されます。Pure to vial (そのままバイアルへ) 設定では、分析する場合もしない場合もそれぞれに応じて、バイアルへの未希釈のリアクタストリームサンプルのサンプリングを可能にします。

Schedule (スケジュール) タブには分析終了時にシャットダウンなどの選択済みのルールに基づいたイベントが表示され、時間ベースのモニタリングイベントをテーブルに設定できます (図 4)。Time based (時間ベース) の設定セクションでは、直接注入、バイアルサンプリング、QC サンプル、ブランク、再キャリブレーションのような事前に設定していた実験を選択できます。各行に、開始時間が間隔およびカウント数とともに表示されます。終了時間は自動的に計算されます。プレビューには、時間ベースのイベントがすべてリスト表示され、時間の重なりがないかチェックできます。

Limits (限界値) タブでは、濃度の上限值および下限値または面積パーセント率を設定できます。限界値に達すると、メッセージが結果に表示されます (結果と考察のセクションの Experimental Run (実験の実行) の項目を参照)。

ソフトウェア

- Agilent OpenLab CDS 2.6 以降のバージョン
- Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェア、バージョン 1.0.1

カラム

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18、2.1 × 50 mm、1.8 μm (部品番号 959757-902)



図 2. Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアの Experiment Setup (実験の設定) でのシステム設定の表示。メソッドを選択してメソッドセットと組み合わせることができます。ルールに基づいた動作、サンプル前処理メソッドを定義できます。

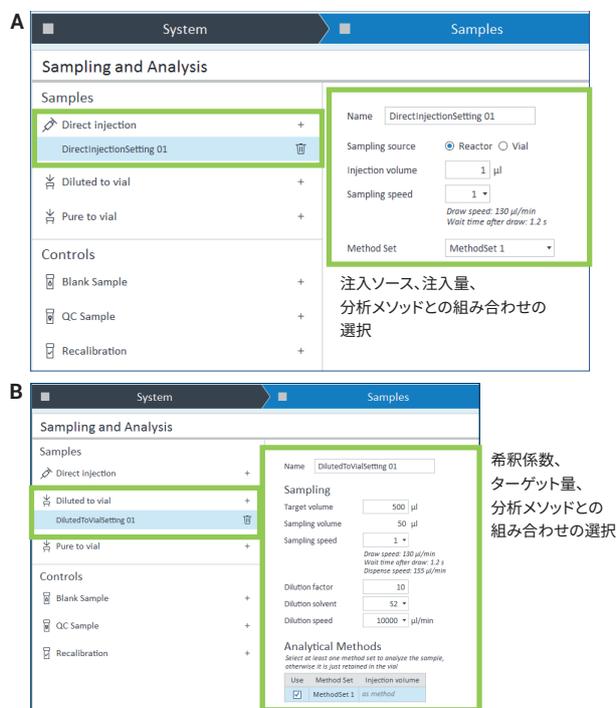


図 3. A) リアクタストリームまたはバイアルからの直接注入の設定。B) 注入ありまたは注入なしの場合のリアクタストリームサンプルの希釈/クエンチングのための設定

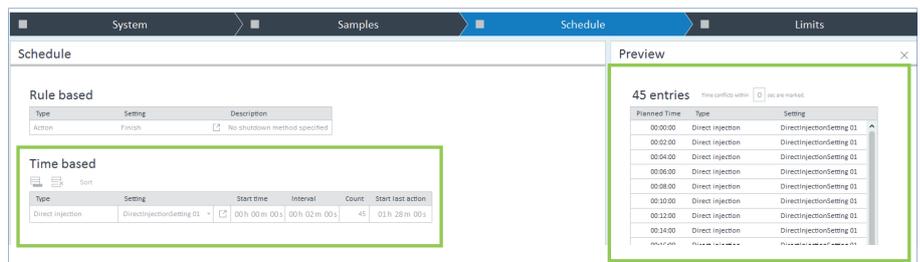


図 4. Experiment Setup (実験の設定) の Schedule (スケジュール) タブ。複数の組み合わせでタイムベースイベントを設定できます。プレビューを使用してタイミングの重なりを特定して解決できます。

サンプルおよびキャリブレーションのための希釈

- 抽出物：アセチルサリチル酸、生成物：サリチル酸
- **1 g/L アセチルサリチル酸と 1 g/L サリチル酸の原液**：それぞれ 100 mg を 10 mL のエタノール (EtOH) 液に溶解し、水を入れて 100 mL にしたもの
- 希釈系列：1000、200、100、20、10 mg/L

サンプル送液ポンプ

- **ポンプ**：Agilent 1260 Infinity II アイソクラテックポンプ (G7110B)
- **流量**：5 mL/min
- 反応容器からオンラインサンプルマネージャリアクティンタフェースへ、そして反応容器へ戻る溶媒ストリーム (機器のセットアップの項目も参照)

オンライン LC モニタリングソフトウェアでの実験の設定

- 直接注入
 - **リアクタからの直接サンプリング**：1 μ L (メソッドによる)
 - **サンプリング速度の設定**：1
 - **スケジュール**：間隔：2 分、分析時間 90 分
- パイアルでの希釈
 - **希釈係数**：1:10、希釈溶媒 (S2)：水 + 10 % ACN + 0.1 % FA
 - **ターゲットボリューム**：500 μ L
サンプルの量：50 μ L
 - **サンプリング速度の設定**：1
 - **希釈液排出スピード**：10,000 μ L/min
 - Agilent InfinityLab ディープウェルプレート、31 mm、1 mL (部品番号 5042-6454)、サンプル用
 - Agilent InfinityLab シリコンシーリングマット、ウェルプレート用 (部品番号 5043-9317)
 - **スケジュール**：間隔：5 分、分析時間 180 分

OpenLab CDS 2.6 でのクロマトグラフィーメソッド

パラメータ	設定値
流量	A) 水 + 0.1 % FA、 B) ACN + 0.1 % FA、 0.7 mL/min
イソクラテック条件	35 % B、ストップタイム 1.0 分
注入量	1 μ L
ニードル洗浄	3 s、洗浄溶媒 (S1)：水 + 50 % ACN + 0.1 % FA
フィード注入	フィード速度：流量の 80 % を適用 オーバーフィード容量：注入容量を基に自動計算 オーバーフィード溶媒 (S2)：水 + 10 % ACN + 0.1 % FA
カラム温度	45 °C
DAD	230/4 nm、リファレンス 360/100 nm、データレート 20 Hz

OpenLab CDS データ解析のデータ処理メソッド

パラメータ	設定値
積分	
	0.001 分でオフ、0.55 分でオン、0.95 分でオフ
面積リジェクト	15.00
高さリジェクト	1.70
ピーク幅	0.02
面積 % リジェクト	0.00
スロープ感度	5.0
ショルダーモード	オフ
同定	
アセチルサリチル酸	シグナル DAD1A、RT 0.638 分、ウィンドウ 0.1 分
サリチル酸	シグナル DAD1A、RT 0.797 分、ウィンドウ 0.1 分
キャリブレーション	
濃度単位	mg/L
応答	面積
重み付け	なし
カーブモデル	直線、原点無視
物質レベル	1,000、200、100、20、10 mg/L

反応の設定

選択した pH 値になるように、10 mL EtOH 溶液中の 100 mg アスピリンを 90 mL のグリシンバッファに、マグネティック棒で強く攪拌しながらシリンジを用いて非常に高速で加えました。

試薬

アセチルサリチル酸、サリチル酸、グリシン、NaCl、NaOH、HCl、EtOH

バッファ

- **溶液**
 - 1) 0.1 M グリシン + 0.1 M NaCl の 1 L 水溶液
 - 2) 0.1 M NaOH
- **pH 11**：52 mL の溶液 1 + 48 mL の溶液 2
- **pH 12**：45 mL の溶液 1 + 55 mL の溶液 2
- pH を 0.1 M NaOH または 0.1 M HCl のいずれかで調整

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 メンブレンフィルターカートリッジ (Millipak 社) を備えた Milli-Q Integral システムで精製しました。

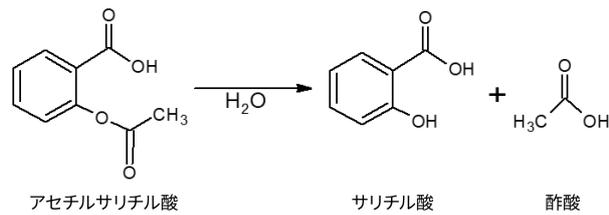


図 5. アセチルサリチル酸 (アスピリン) のサリチル酸および酢酸への加水分解

結果と考察

モデル反応として、アセチルサリチル酸 (アスピリン) の加水分解を選んで、1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャとオンライン LC モニタリングソフトウェアで構成される InfinityLab オンライン LC ソリューションの性能を実証しました (図 5)。反応の速度は、加水分解するために適用されるバッファ溶液の pH 値に影響されます。このモデル反応を使用して、サンプリング、サンプルハンドリング、速度のさまざまな機能を実証できます。

実験の前に、アセチルサリチル酸およびサリチル酸を高速分離するためのメソッドを開発しました (実験を参照)。このメソッドと 2 種類の化合物のキャリブレーションを使用して、化学反応の過程を定量するためのデータ処理メソッドを作成しました (図 6)。

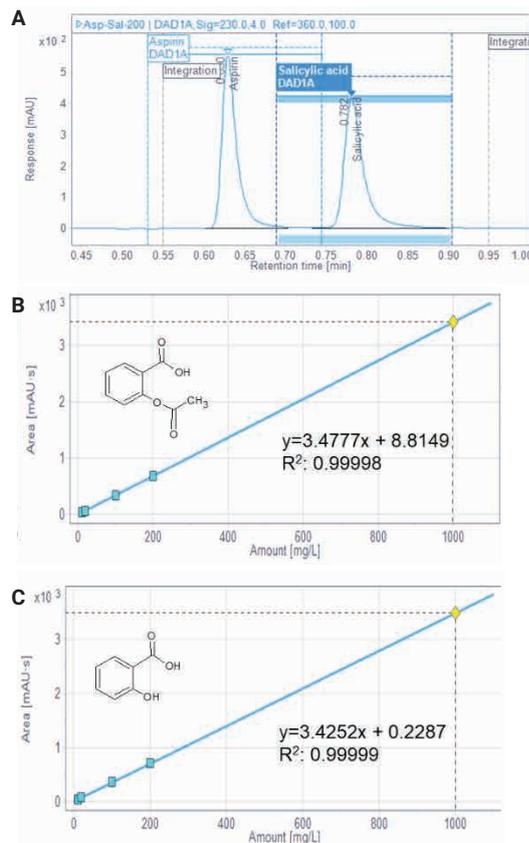


図 6. データ処理メソッド作成のためのアセチルサリチル酸およびサリチル酸のキャリブレーション。

- (A) アセチルサリチル酸とサリチル酸の高速分離と積分範囲 (200 mg/L)。
 (B) アセチルサリチル酸 (アスピリン) の検量線、 R^2 : 0.99998。
 (C) サリチル酸の検量線、 R^2 : 0.99999

pH 11 でのアセチルサリチル酸の加水分解

実験をセットアップするために、pH 11 のグリシンバッファ 90 mL をフラスコに充填して攪拌し続けながら、10 mL エタノール溶液中のアセチルサリチル酸 100 mg をすばやく加えました。フラスコをポンプに接続して、反応溶液の連続的なストリームをオンラインサンプルマネージャのリアクティブインターフェイスに高流量で提供しました。実験を開始する前に、サンプルリングの位置を定義しておく必要があります。QC、ブランク、キャリブラントなどのためのその他の位置も必要に応じて定義できます (図 7)。オンライン LC モニタリングソフトウェアから実験を開始した後、サンプルが 5 分ごとに吸引され希釈され、続いて分析されました。

個々のサンプルの最新ステータスがすべての情報とともに **Execution** (実行) タブのテーブルに表示されます (図 8)。実験の進行中、このテーブルにステータス情報がリアルタイムで入力されます。この画面では、サンプル、メソッド、スケジュールを変え、その場で実験を変更

することもできます。図 8 に示すように、アセチルサリチル酸のピークが低下し、データ処理メソッドの面積リジェクトの限界値未満に減少したため、データは取り込み後にも再処理されました。

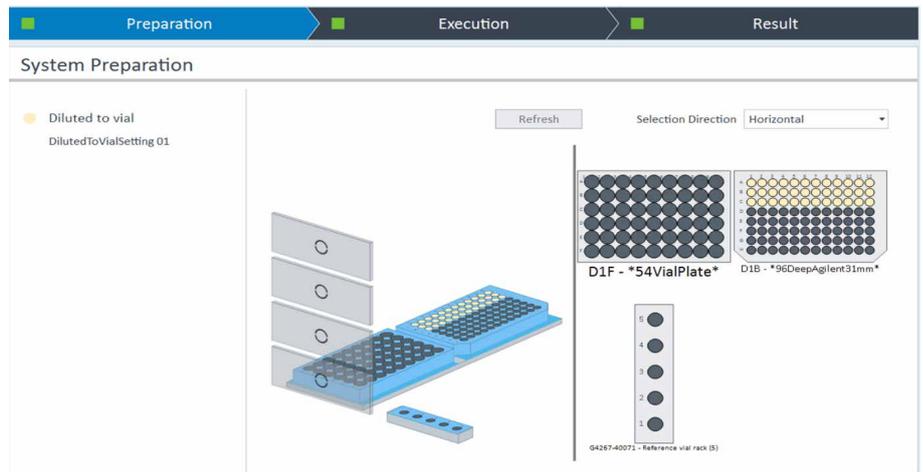


図 7. 選択済みのサンプリング位置を示す実験の準備画面。QC、ブランク、キャリブラントのための必要な位置もこの画面で定義できます。

Preparation Execution Result											
Status											
Experiment Run Start Time		2021-03-24 13:30:02+01:00			Run Time		02:59:25				
Schedule [0 pending analytical jobs]											
State	Type	Name	Expected Time	Start Time	Info	Sample	Location	Sampling Time	Absolute Sampling Time	Injection Time	Analytical Method Set
Completed	Action	Start		00:00:00							
Reprocessed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:00:00	00:00:00		Sample-1	D1B-A1	00:00:31	2021-03-24 13:30:34+01:00	00:03:11	MethodSet 1
Reprocessed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:05:00	00:05:00		Sample-2	D1B-A2	00:05:01	2021-03-24 13:35:04+01:00	00:07:39	MethodSet 1
Reprocessed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:10:00	00:10:00		Sample-3	D1B-A3	00:10:08	2021-03-24 13:40:11+01:00	00:12:48	MethodSet 1
Reprocessed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:15:00	00:15:00		Sample-4	D1B-A4	00:15:08	2021-03-24 13:45:11+01:00	00:17:48	MethodSet 1
Reprocessed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:20:00	00:20:00		Sample-5	D1B-A5	00:20:08	2021-03-24 13:50:11+01:00	00:22:49	MethodSet 1
Reprocessed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:25:00	00:25:00		Sample-6	D1B-A6	00:25:08	2021-03-24 13:55:11+01:00	00:27:48	MethodSet 1
Reprocessed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:30:00	00:30:00		Sample-7	D1B-A7	00:30:08	2021-03-24 14:00:11+01:00	00:32:48	MethodSet 1
Reprocessed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:35:00	00:35:00		Sample-8	D1B-A8	00:35:08	2021-03-24 14:05:11+01:00	00:37:48	MethodSet 1
Reprocessed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:40:00	00:40:00		Sample-9	D1B-A9	00:40:08	2021-03-24 14:10:11+01:00	00:42:48	MethodSet 1
Reprocessed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:45:00	00:45:00		Sample-10	D1B-A10	00:45:08	2021-03-24 14:15:11+01:00	00:47:50	MethodSet 1

図 8. サンプリングおよび分析時間、適用メソッド、サンプリング位置などの情報を含む実行テーブル

分析中、処理結果は、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のように、Result (結果) タブのデータ視覚化ツール内でリアルタイムで監視できます。最終結果は、**Experiment Run** (実験の実行) タブに表示することも可能です (図 9)。相互に関連付けられたグラフとテーブルが表示されます。設定可能なテーブルには、反応過程の選択されたサンプルの結果がまとめて示されます。テーブルには、例えば、リテンションタイム、ピーク面積、面積パーセント率、濃度、またはサンプルリング希釈を考慮した補正済み濃度が表示されます (図 9A)。限界値を超えた場合や限界値に届かない場合はマークが付けられます。減少する抽出物と増加する生成物のクロマトグラムを重ねて表示できます (図 9B)。

図 9 で選択した各サンプルから、約 45 分後となるサンプル 10 では反応物の濃度が等しくなり、145 分後にはアセチルサリチル酸の濃度は最初の 10 % 未満となることが分かります。

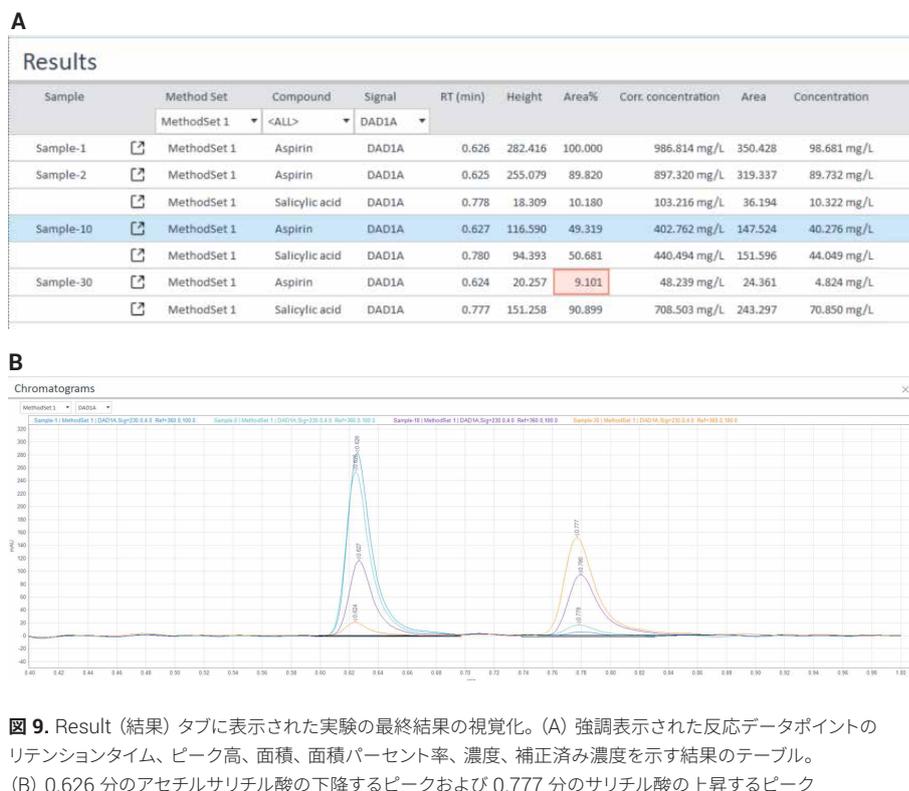


図 9. Result (結果) タブに表示された実験の最終結果の視覚化。(A) 強調表示された反応データポイントのリテンションタイム、ピーク高、面積、面積パーセント率、濃度、補正済み濃度を示す結果のテーブル。(B) 0.626 分のアセチルサリチル酸の下降するピークおよび 0.777 分のサリチル酸の上昇するピーク

図 9B の結果テーブルでワンクリックでショートカットすることにより、OpenLab CDS データ解析に表示されるデータに直接アクセスすることができます (図 10)。図 10 のサンプル 1 は反応の開始ポイントを示し、反応のターンオーバーが始まったばかりで反応の生成物は検出下限未満です。反応容器中のアセチルサリチル酸の初期濃度は 986.8 mg/L でした。5 分の反応時間の後に吸引したサンプル 2 には反応生成物がすでに見られ、反応容器

中でサリチル酸は 103.3 mg/L (10.18 面積%) で存在します。45 分後に吸引したサンプル 10 では、アセチルサリチル酸とサリチル酸の濃度およびピーク面積パーセント率がほぼ等しいことがわかります。145 分後に吸引したサンプリングポイント 30 で、アセチルサリチル酸の面積パーセント率が定義した限界値 10% 未満となったために、初めてフラグが付けられます。OpenLab CDS データ解析のデータにアクセスして、データ解析メソッドを変更

することも可能です。例えば、積分限界値を変更して、反応の開始時の初期に形成される生成物の不純物など、より低いアバンドンスのピークを検出することができます。オンライン LC モニタリングソフトウェアの内蔵の再処理機能により、実験を継続して実行させながら、生成済みデータに新しいメソッドを適用することも可能です。

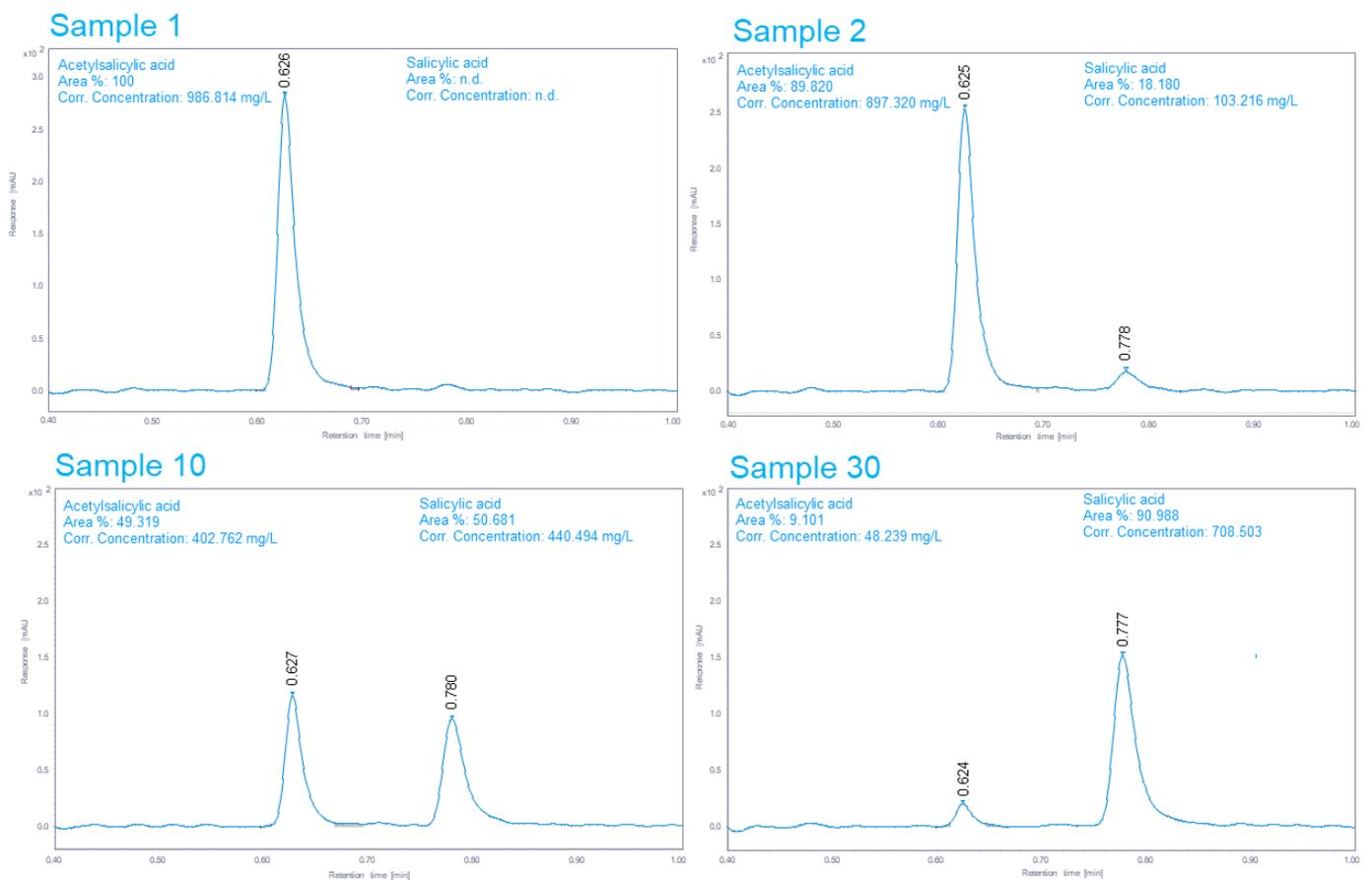


図 10. Agilent OpenLab CDS データ解析に表示された個々の分析のデータ (サンプル 1) 抽出物のみを示す、反応開始時に吸引された最初のサンプル。(サンプル 2) 反応の生成物を示し始める、5 分後に吸引された 2 番目のサンプル。(サンプル 10) ピーク面積と濃度がほぼ等しいことを示す、反応開始後 45 分に吸引されたサンプル。(サンプル 30) 抽出物の濃度が定義した限界値の 10 面積% を下回ったために初めてフラグが付けられたサンプル

オンラインサンプルマネージャでは、希釈用およびクエンチング用に加え、ニードル洗浄用や流路洗浄用のさまざまな溶媒を適用できます。このため、クエンチング溶媒で希釈することによってサンプリング後に反応を止めることができます。この例では、水 + 10 % ACN + 0.1 % ギ酸で希釈し、反応を減速させました (図 11)。1:10 希釈/クエンチングでは 24 時間後にアセチルサリチル酸のピークが低くなりサリチル酸のピークが高くなって、アスピリンの分解はわずかです。このため、実験後に解析したり、他の分析技法を用いた品質管理を追加したりできます。

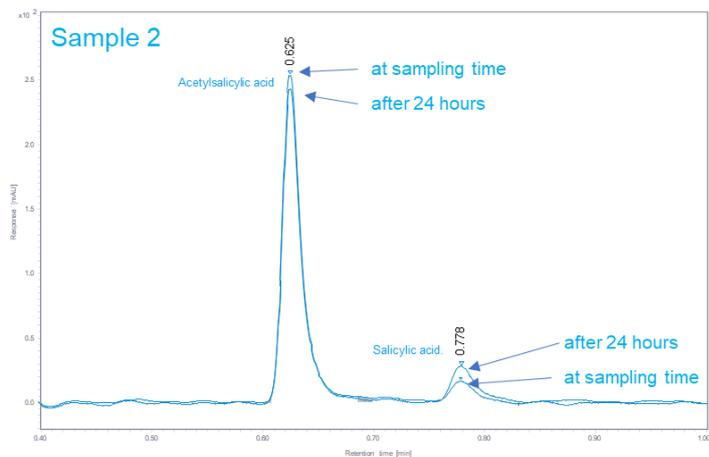


図 11. サンプリング直後および希釈/クエンチングし 24 時間後の希釈済みサンプルの重ね表示

pH 12 でのアセチルサリチル酸の加水分解

高速反応に対応可能なオンライン LC の機能を示すために、pH 値を 12 に上げてアセチルサリチル酸の加水分解反応の速度を上げました。高速反応のモニタリングの場合、サンプルは機械的な動作なしに、リアクタ接続バルブの切り替えだけで、リアクタストリームから直接吸引されてニードルに注入されました。選択したメソッド設定では、1 分のクロマトグラフィー分析とすべての他の処理とを合わせて、1 データポイントあたり 2 分のサイクル時間を可能にしました。結果のトレンドプロット (図 12A) は 2 分ごとのサンプルデータポイントを示します。アセチルサリチル酸の下降するピーク面積曲線とサリチル酸の上昇するピーク面積曲線は、ほぼ等しい面積パーセント率と濃度で 20 分後に交差しています。78 分後、反応はほぼ完了し、抽出物は設定した限界値の 10 面積 % を下回ります。結果のテーブル (図 12B) に、リテンションタイム、ピーク面積、ピークの高さ、面積パーセント率、濃度などの詳細が示されています。クロマトグラム (図 12C) には、0.772 分にあるサリチル酸のピークの増大と 0.622 分にあるアセチルサリチル酸の

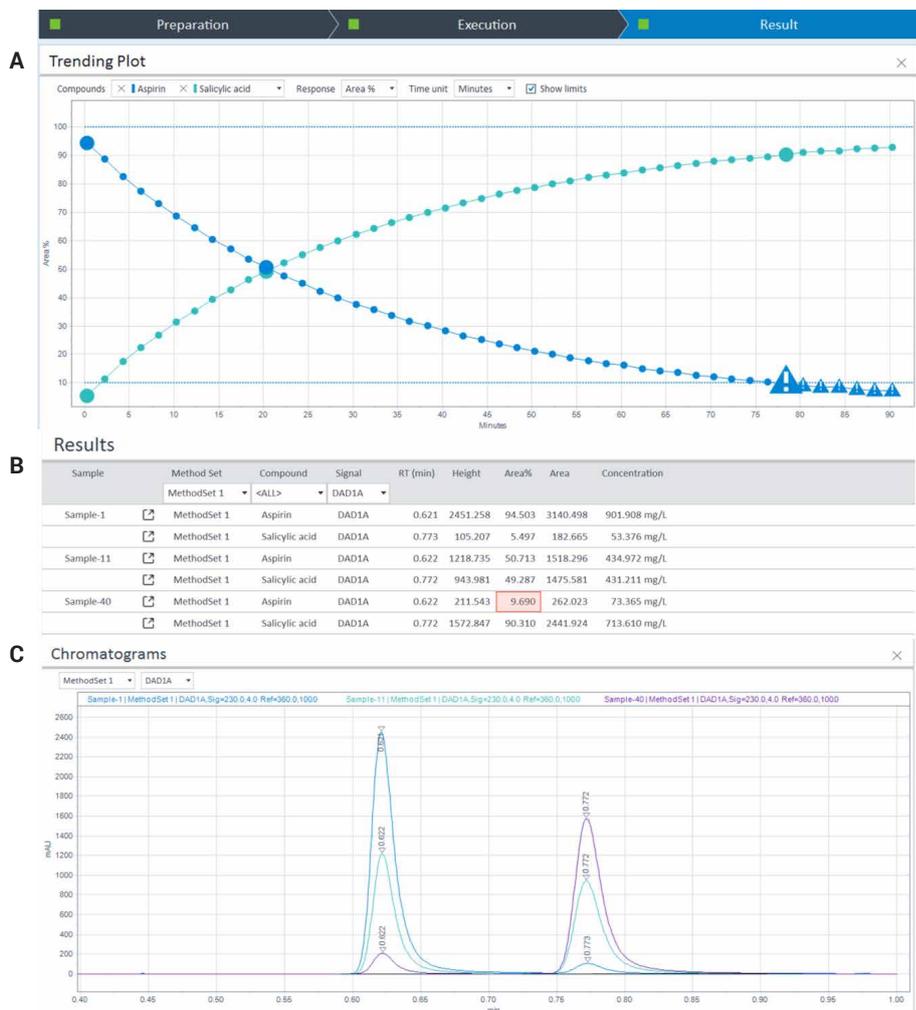


図 12. Result (結果) タブに表示された高速反応速度での実験の結果の視覚化。
 (A) 反応物質のアセチルサリチル酸とサリチル酸のピーク面積のトレンドプロット。
 (B) 強調表示された反応データポイントの面積、面積パーセント率、濃度を示す結果テーブル。
 (C) 0.622 分のアセチルサリチル酸の下降するピークおよび 0.772 分のサリチル酸の上昇するピーク

酸のピークの減少が重ね表示されています。最初に反応が非常に高速に開始し、結果として最初の吸引サンプルにも生成物が形成されています (図 12B)。反応中に、生成物の形成と抽出物の変換は減速していきます。これは、追加のタイムベースイベントの導入により、サンプリング頻度を低減することで検討できます (図 4)。例えば、サンプリング間隔を 30 分までは 2 分、60 分までは 6 分、残りの反応時間は 10 分に設定するなどです。このように、反応の開始段階では要求されるより速いサンプリング速度で、反応ターンオーバーが進むとより遅いサンプリング速度で、反応を柔軟に追跡できます。

結論

本アプリケーションノートでは、Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャと Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアで構成される Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションを使用して、非常に高速な反応 (例えば、低分子の合成) をモニタリングする方法を示しました。

反応サンプルは、リアクタストリームから直接吸引し、希釈またはクエンチングして反応を停止させ、直ちにまたは後で分析することができます。

非常に高速な反応に対処するために、リアクタストリームから吸引した後にサンプルを直接注入することも可能です。この場合、高速反応をモニタリングするためにサイクル時間を非常に短くできます。高精度のサンプルの吸引および希釈/クエンチングにより、反応容器に固有の反応物の正確な定量が実現し、価値ある生成物の収量を最適化できます。

参考文献

1. Performance Characteristics of the Agilent 1260 Infinity II Online Sample Manager. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-3529.

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。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2021
Printed in Japan, June 18, 2021
5994-3528JAJP
DE44320.1899305556