

# 反応のサンプリングと分析の平行な 実行による高速プロセスのオンライン LC リアクションモニタリング

Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアによる  
自動サンプリングおよび分析

## 著者

Edgar Naegele  
Agilent Technologies, Inc.

## はじめに

低分子反応および分子量の大きい生体分子プロセスの分野においては、分析に必要な時間と比較して、変化が短時間に進行する場合があります。これにより、サンプリング間隔が短くなるため、既存のプロセス分析技術では対応が困難になります。また、反応を制御するために初期分析データが必要とされる場合は、さらに難しくなります。

この種の高速反応の一例が、1,1-カルボニル-ジ-1,2,4-トリアゾール (CDT) とベンジルアミン (図 1) の反応による、誘導体化された尿素の形成です。CDT と 1 当量のベンジルアミンは即時に反応し、1 つのトリアゾール部が失われて、中間物であるベンジルトリアゾール尿素 (BTU) が生成されます。この中間生成物は、2 当量のベンジルアミンとの反応の進行中に検出できるだけの、十分な安定性を備えています。中間生成物、および最終生成物である 1,3-ジベンジル尿素 (DBU) の両方の形成を同時にモニタリングすることが可能です。

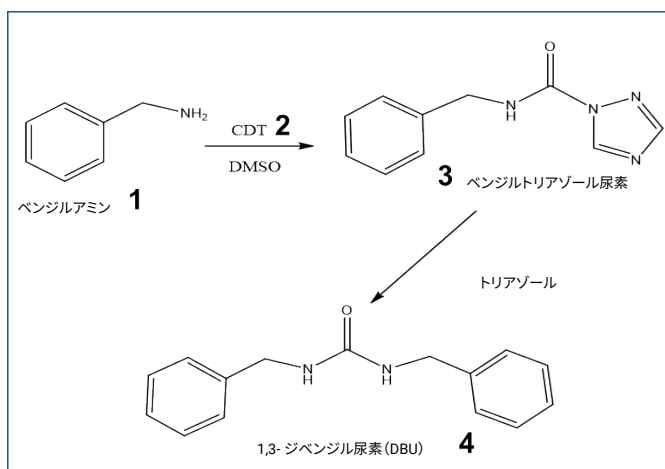


図 1. 中間生成物 BTU (3) および最終生成物 DBU (4) までのベンジルアミン (1) と CDT (2) の反応

高速サンプリングと時間がかかる分析との間の矛盾により、Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションでは、1 つのサンプルの分析中に他のサンプルを吸引し、サンプリングの完了後に残りのサンプルを分析できる必要があります (図 2、A ~ C)。

最初のサンプリングの完了後に、このサンプルの分析が開始されました。サンプル 1 の分析中に、サンプル 2 およびサンプル 3 を吸引しました。図 2A では、サンプル 2 の分析とサンプル 4 のサンプリングが実行されています。サンプル 3 はすでに分析を待機しており、サンプル 5 のサンプリングがスケジュールされています。図 2B のその後の段階では、吸引が済んだサンプル数は、分析されたサンプルの数を大幅に上回っています。図 2C では、サンプリングが完了しており、分析を待機中のサンプルが処理され、結果セットが生成されようとしています。

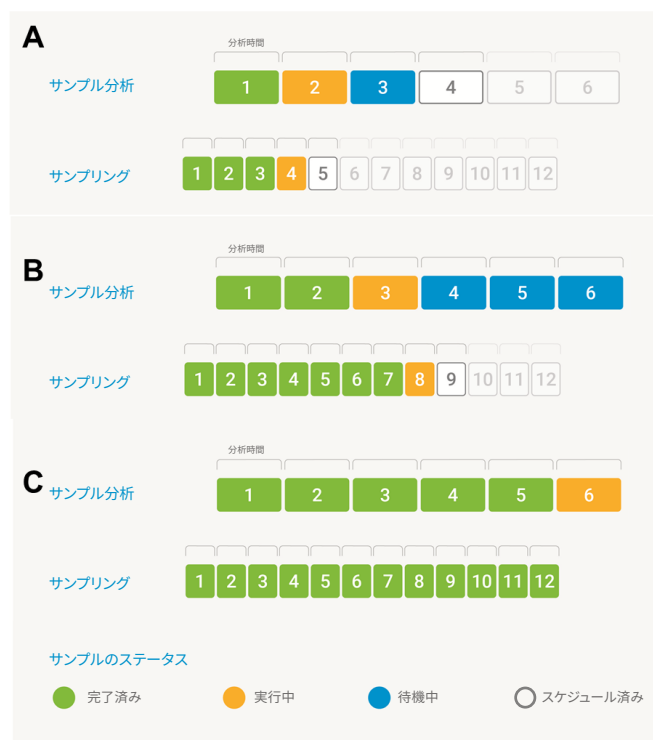


図 2. 迅速なサンプリングとより遅いサンプル分析を組み合わせたワークフローの概略図

この技術概要では、サンプル分析には緩やかなグラジエントを使用しつつ、高速化学反応からサンプリングを行う、Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションの性能について説明します。さらに、クエンチングと希釈により化学反応サンプルを保存し、保管されたサンプルを後で再分析することも可能です。また、サンプリングポイントが省略されないこと、および Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアによりサンプリングと分析を平行にスケジュールできることも示します。ソフトウェアによるサンプリングと分析の自動スケジューリングで反応に関する情報が失われることはありません。無人稼働に対応し、時間とコストを削減する方法で、1 回の実験ですべての情報を得ることができます。

## 実験方法

本研究で使用する機器を表 1 に、メソッドパラメータの概要を表 2 に示します。

表 1. 装置構成

製品タイプ	アジレント製品名
装置	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1290 Infinity II ハイスピードポンプ (G7120A)</li> <li>- 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャセット (G3167AA) : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャ (G3167A)、1290 Infinity パルプドライブ (G1170A) の外部バルブ (p/n 5067-6680) とクラスタ化、オンライン LC モニタリングソフトウェア</li> </ul> </li> <li>- 1290 Infinity II マルチカラムサーモスタット (G7116B)</li> <li>- 1290 Infinity II ダイオードアレイ検出器 (G7117B) と InfinityLab Max-Light カートリッジセル、10 mm (G4212-60008)</li> </ul>
カラム	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18、2.1 x 50 mm、1.9 µm (p/n 699675-902)
ソフトウェア	<ul style="list-style-type: none"> <li>- OpenLab CDS、バージョン 2.6 以降</li> <li>- 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</li> </ul>

表 2. メソッドパラメータ

パラメータ	値
<b>分析メソッドの条件</b>	
溶媒	<b>A)</b> 水 + 0.1 % 酢酸 (FA) <b>B)</b> アセトニトリル (ACN) + 0.1 % FA
分析流量	0.5 mL/分
ジェネリックグラジエント	5 分で 3 ~ 95 % B、ストップタイム : 5 分、ポストタイム : 2 分
カラム温度	50 °C
Agilent 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	3 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	210 ± 16 nm、リファレンス : 310 ± 40 nm、20 Hz データ範囲
<b>サンプリングからバイアル (希釈)</b>	
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	250 µL
希釈係数	5
サンプル量	50 µL
吸引スピード	<b>設定 1</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 吸引スピード : 130 µL/min</li> <li>- 待ち時間 : 1.2 秒</li> <li>- 分注スピード : 155 µL/min</li> </ul> (希釈前にウェルにサンプルを排出)
希釈溶媒	S2
希釈排出スピード	10,000 µL/min (サンプル吐出後に混合)
スケジュール	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 間隔 : 1.5 分</li> <li>- 14 のサンプルのサンプリングに対する算出時間 : 19.5 分</li> </ul>

パラメータ	値
<b>サンプル送液ポンプ</b>	
ポンプ	Agilent 1260 Infinity II アイソクラティックポンプ (G7110B)
流速	5 mL/min
溶媒ストリーム	反応容器からオンラインサンプルマネージャリアクタインタフェースへ、そして反応容器へ戻る溶媒ストリーム
<b>反応条件</b>	
反応物質	82 mg CDT/45 mL DMSO (最終濃度 10 mmol)
溶媒	無水 DMSO
攪拌	20 °C
反応開始	抽出物を添加することにより反応が開始 : 120 µL ベンジルアミン/5 mL DMSO (2.2 mol 相当)

## 試薬

- ベンジルアミン
- CDT
- 無水 DMSO
- 酢酸

## 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)

## 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。

## 結果と考察

例として適用した高速化学反応は、反応容器の CDT にベンジルアミンを添加することで開始しました (図 1)。同時に、オンライン LC モニタリングソフトウェアと実行リストを作成して実験を開始しました (図 3A)。このリストには、すべての予測サンプリング時間、スケジュールされたサンプルのステータス、一般情報、実験中に入力される空のフィールドが、最初に表示されています。図 3A では、9 秒と 1 分 31 秒のそれぞれで、2 つのサンプルがすでにサンプリングされています。Info (情報) フィールドに、最初のサンプルの分析がすでに実行中であり、2 番目のサンプルのサンプリングが完了しており、リアクタラインから 3 番目のサンプルの吸引が開始されていることを説明するステータスが表示されています。これは、最初のサンプルの分析中に、予定時間にサンプリングが継続されたということです。

図 3B に実験時間の 12 分経過後の状況を示します。ここで、3 分 20 秒に最初のサンプルが注入されことを確認できます。オンライン LC モニタリングソフトウェアにより、サンプル 3 の実測のサンプリング時間 3 分 42 秒を用いて、この注入が自動で調整されました。サンプル 2 の分析中、リアクタからのサンプリングは若干遅れたものの続行されました。例えば、4 分

20 秒にスケジュールされたサンプル 4 は、4 分 55 秒にサンプリングされました。6 分にスケジュールされたサンプル 5 は、6 分 9 秒に吸引されました。このソフトウェアによるスケジューリングでは、分析がパラレルに実行されるため、適宜、自動スケジューリングを用いて、必要なすべての反応サンプルのサンプリングを実行できます。最も重要な点は、いずれのサンプリングポイントも失われることがないということ、また最悪の場合でも、1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャによって同時に実行されている他の操作により、サンプリングが数秒遅れるだけであるということです。

図 3C に実験の終了までの状況を示します。最後にスケジュールされたサンプルのリアクタからのサンプリングは 19 分 30 秒に完了し、オンラインサンプルマネージャに保存されたサンプルが順番に分析される予定になっています。例えば、13 分 56 秒に吸引されたサンプル 10 は、1 時間 18 分に分析のために注入されました。現在分析中のサンプル 11 は 15 分 10 秒にサンプリングされました。

従来のフロースルー注入モードとは対照的に、サンプリングと分析をパラレルに実行するこの機能は、流路にサンプルループを維持する必要がないフィード注入により使用が可能となりました。

A

State	Type	Name	Expected Time	Start Time	Info	Sample	Location	Sampling Time	Injection Time	Analytical Method Set
Completed	Action	Start	00:00:00	00:00:00						
Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:00:00	00:00:00	Running - Sample-1 - MethodSet...	Sample-1	D1B-D1	00:00:09		
Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:01:30	00:01:30	Sampling finished	Sample-2	D1B-D2	00:01:31		
Sampling	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:03:00	00:03:00	Start sampling	Sample-3	D1B-D3			
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:04:30							
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:06:00							
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:07:30							
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:09:00							
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:10:30							
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:12:00							
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:13:30							
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:15:00							
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:16:30							
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:18:00							
Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:19:30							

図 3A. 実験開始時の状況を示した Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアの実行リスト。最初のサンプルはすでに分析中で、2 番目のサンプルのサンプリングは完了しており、最初のサンプルの分析と並行して 3 番目のサンプルのサンプリングが開始されています。

B

State	Type	Name	Expected Time	Start Time	Info	Sample	Location	Sampling Time	Injection Time	Analytical Method Set
✔	Completed	Action	Start	00:00:00	00:00:00					
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:00:00	00:00:00	Sample-1	D1B-D1	00:00:09	00:03:20	MethodSet 1
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:01:30	00:01:30	Running - Sample-2 - MethodSet...	Sample-2	D1B-D2	00:01:31	
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:03:00	00:03:00	Sampling finished	Sample-3	D1B-D3	00:03:42	
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:04:30	00:04:53	Sampling finished	Sample-4	D1B-D4	00:04:55	
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:06:00	00:06:08	Sampling finished	Sample-5	D1B-D5	00:06:09	
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:07:30	00:07:30	Sampling finished	Sample-6	D1B-D6	00:07:31	
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:09:00	00:09:00	Sampling finished	Sample-7	D1B-D7	00:09:01	
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:10:30	00:10:30	Sampling finished	Sample-8	D1B-D8	00:10:31	
▶ 🔄	Sampling	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:12:00	00:12:00	Start sampling	Sample-9	D1B-D9		
○	Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:13:30						
○	Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:15:00						
○	Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:16:30						
○	Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:18:00						
○	Scheduled	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:19:30						

C

State	Type	Name	Expected Time	Start Time	Info	Sample	Location	Sampling Time	Injection Time	Analytical Method Set
✔	Completed	Action	Start	00:00:00	00:00:00					
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:00:00	00:00:00	Sample-1	D1B-D1	00:00:09	00:03:20	MethodSet 1
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:01:30	00:01:30	Sample-2	D1B-D2	00:01:31	00:12:20	MethodSet 1
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:03:00	00:03:00	Sample-3	D1B-D3	00:03:42	00:21:19	MethodSet 1
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:04:30	00:04:53	Sample-4	D1B-D4	00:04:55	00:30:20	MethodSet 1
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:06:00	00:06:08	Sample-5	D1B-D5	00:06:09	00:38:43	MethodSet 1
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:07:30	00:07:30	Sample-6	D1B-D6	00:07:31	00:46:40	MethodSet 1
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:09:00	00:09:00	Sample-7	D1B-D7	00:09:01	00:54:39	MethodSet 1
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:10:30	00:10:30	Sample-8	D1B-D8	00:10:31	01:02:35	MethodSet 1
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:12:00	00:12:00	Sample-9	D1B-D9	00:12:42	01:10:33	MethodSet 1
✔	Completed	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:13:30	00:13:55	Sample-10	D1B-D10	00:13:56	01:18:31	MethodSet 1
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:15:00	00:15:09	Running - Sample-11 - MethodSe...	Sample-11	D1B-D11	00:15:10	
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:16:30	00:16:30	Sampling finished	Sample-12	D1B-D12	00:16:31	
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:18:00	00:18:00	Sampling finished	Sample-13	D1B-E1	00:18:01	
🔄	Analysis	Diluted to vial	DilutedToVialSetting 01	00:19:30	00:19:30	Sampling finished	Sample-14	D1B-E2	00:19:31	

図 3B、C. (B) 12 分後の実験状況サンプル 2 の分析と並行してサンプリングは自動で続行されます。サンプリングが失われることなく、数秒の遅れで実行されました。  
 (C) 実験の終了までの状況すべてのスケジュールされたサンプルがリアクタから吸引され、分析のために Agilent 1260 Infinity II オンラインサンプルマネージャに保存されています。

オンライン LC モニタリングソフトウェアによって生成された反応のトレンドプロットは、実験全体の結果を示しています (図 4)。中間物である BTU は急速に形成されて減少する一方、生成物の DBU は反応中に徐々に生成されます。したがって、サンプリングポイント 1 における初期の構成では、すでに BTU/DBU が 80/20 となっています。クロマトグラムの最初の部分の大きなピークと、使用した波長での CDT の小さなピークにおけるベンジルアミンと DMSO の共溶出により、試薬であるベンジルアミンと CDT はモニタリングできません。

クロマトグラフィーによる分離よりもサンプリングの方が迅速である場合、サンプリングと分析の平行な実行には、最初のサンプリングポイントの結果を早期に確認でき、早く意思決定できるという利点があります。ソフトウェアによる、サンプリングおよび分析のための注入のスケジューリングの効果は、サンプル 2 とサンプル 3、およびサンプル 8 とサンプル 9 の間で確認できます。自動スケジューリングにより失われたサンプリングポイントはありません。

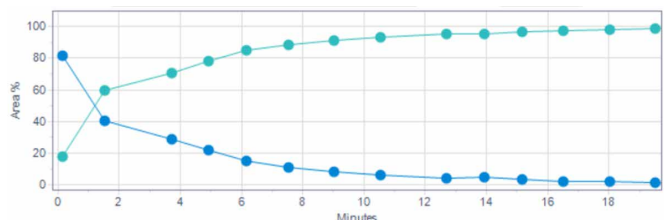


図 4. サンプリング時間と、BTU (青) および DBU (緑) の対応する領域 (%) を示した、CDT とベンジルアミンの反応のトレンドプロット

サンプル 1、サンプル 2、サンプル 10 のクロマトグラムの重ね表示を図 5 に示します。1.80 分で溶出している中間生成物の BTU は、反応中に 81.715 ~ 4.659 % 領域で減少しています (表 3)。2.32 分で溶出している主生成物の DBU は、18.285 ~ 95.341 % 領域で増加しています。

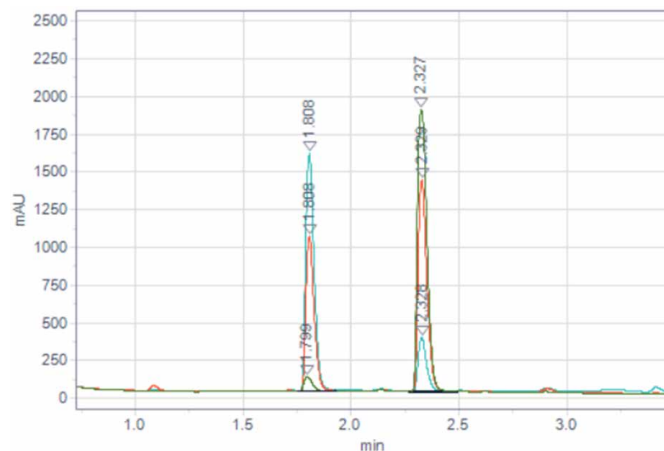


図 5. 中間生成物 BTU と主生成物 DBU のクロマトグラフィーによる分離。BTU は 1.808 分に溶出し、反応中に減少しています。DBU は 2.327 分に溶出し増加しています。

表 3. サンプル 1、サンプル 2、サンプル 10 の BTU と DBU の % ピーク面積、ピーク面積、ピーク高さ、リテンションタイム (RT) に対し取得された値

サンプル	化合物 (複数)	RT (分)	面積 %	面積	高さ
1	BTU	1.808	81.715	4,254.787	1,571.218
	DBU	2.328	18.285	952.047	352.121
2	BTU	1.808	40.670	2,700.315	1,028.197
	DBU	2.329	59.330	3,939.274	1,398.267
10	BTU	1.799	4.659	284.761	99.714
	DBU	2.327	95.341	5,827.224	1,870.620

## 結論

この技術概要では、Agilent InfinityLab オンライン LC ソリューションを使用した、高速低分子反応からの迅速なサンプリングと、並行して収集したサンプルの分析について説明しました。サンプリングと分析のスケジューリングはすべて Agilent オンライン LC モニタリングソフトウェアにより実行されました。この手法では、高頻度のサンプリングでサンプリングポイントを失うことなく、早い段階からほぼリアルタイムで高速反応の情報を得られます。そのため、1 回の実験設定でサンプリングと分析を実行でき、コストと時間を削減できます。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://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](mailto: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。

DE26049924

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, December 6, 2022

5994-5583JAJP