

利用 Agilent InfinityLab 在线液相色谱解决方案进行在线反应监测

阿司匹林的 pH 依赖性水解反应



作者

Edgar Naegele
Daniel Kutscher
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报旨在展示如何利用 Agilent InfinityLab 在线液相色谱解决方案在线监测小分子反应。高精度采样能够实现对反应的定量监测，以及反应容器中反应物和产物浓度的准确测定。InfinityLab 在线液相色谱解决方案通过采样并在进样前稀释/淬灭或直接进样，能够获得超高的分析速度，实现优化的反应监测。

前言

在小分子药物和生物药物的现代化生产中，必须密切监测反应，甚至需要通过在线反应监测分析等手段来控制反应。因此，通过采样装置将 UHPLC 仪器连接至反应容器可能更有利。InfinityLab 在线液相色谱解决方案结合了 UHPLC 与一体式反应器采样接口，可通过 Agilent 1260 Infinity II 在线样品管理器实现自动化反应样品分析。该装置能够从反应器中抽取样品，并在进样前进行稀释/淬灭。

本应用简报展示了使用 InfinityLab 在线液相色谱解决方案监测不同反应速度的反应，这些监测需要以高采样速度进行采样和淬灭或以直接进样快速获得结果。利用乙酰水杨酸（阿司匹林）水解为水杨酸的 pH 依赖性反应，作为模型反应。

实验部分

仪器

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1260 Infinity II 在线样品管理器组件 (G3167AA)：Agilent 1260 Infinity II 在线样品管理器 (G3167A)，与 Agilent 1290 Infinity 阀驱动器 (G1170A) 上的外部阀 (5067-6680) 组合，以及安捷伦在线液相色谱监测软件
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7115A)

仪器设置 (图 1)

InfinityLab 在线液相色谱解决方案包含了创新的 Agilent 1260 Infinity II 在线样品管理器。该模块设计基于 Agilent 1260 Infinity II Multisampler，但使用了新型专有技术，例如两个高度同步的阀，其中一个阀在模块内部，另一个在模块外部^[1]。新开发的阀概念采用特殊切换模式，能够实现安捷伦 FEED 进样和经典的流通式进样。接口和凹槽的设计允许从反应容器中直接抽取样品并进样，并可在进样前进行稀释和淬灭等样品处理。1260 在线样品管理器通过单独的独立泵单元连接到反应容器，可从反应器提供溶剂流。为获得超低的延迟体积，反应器通过 0.8 mm 内径的 PTFE 管线直接连接至泵头。完整的采样和进样过程由专用的安捷伦在线液相色谱监测软件进行控制，该软件可与 Agilent OpenLab CDS 无缝集成。

安捷伦在线液相色谱监测软件设置

在线液相色谱监测软件包括三个部分：配置 (Configuration)、实验设置 (Experiment Setup) 和实验运行 (Experiment Run)。在“配置”中，可选择并显示连接的 CDS 和仪器。在“实验设置”中，可设置分析方法、样品处理、采样计划和限值参数 (图 2)。可使用反应化合物的峰面积百分比、浓度和校正浓度作为限值。如果在反应过程中分析结果超过限值，将显示警告。在“实验运行”部分，可选择用于采样、校准、质量控制和空白的样品瓶，并可以启动实验。实验结果也将显示在这里。

在实验设置的“样品” (Samples) 选项卡中，可选择并组合采样和分析方法 (图 3)。此外，可配置重新校准、QC 样品和空白等对照品。针对直接进样 (Direct injection) 的设置，可选择样品

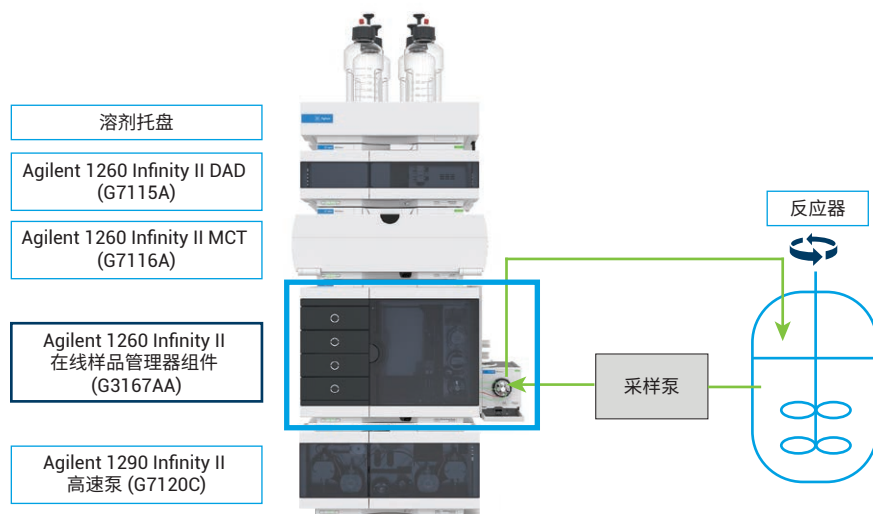


图 1. 仪器设置示意图，包括采样泵和反应器。反应器连接至泵：0.8 mm 内径的 PTFE 管线 (部件号 5041-2191)、密封垫圈 (部件号 5022-2154) 和 PTFE 螺帽 (部件号 5022-2158)。泵连接至采样接口：不锈钢毛细管内径 0.17 mm，长度 900 mm (部件号 5500-1217)。采样接口连接至反应器：0.8 mm 内径的 PTFE 管线、接头和密封垫圈 (部件号 5065-4454)

来源来自反应器流或样品瓶，并将其与分析方法设置相结合（图 3A）。针对从反应器流到样品瓶（Diluted to vial）的采样设置，可提供稀释倍数和目标体积，将自动计算所需的样品体积（图 3B）。稀释/淬灭后的样品可存留用于后续分析，也可以结合某一分析方法立即分析。从纯样品到样品瓶（Pure to vial）的设置可以将未稀释的反应器流样品采集到样品瓶中，相应地进行或不进行分析。

在“计划”（Schedule）选项卡中，将显示所选的基于规则的事件（例如分析结束时关机），并可以在表格中设置基于时间的监测事件（图 4）。在“基于时间的设置”部分，可选择先前配置的实验，例如直接进样、样品瓶进样、QC 样品、空白和重新校准样品。对于每一行，将提供开始时间以及间隔和计数。将自动计算结束时间。在预览中，将列出所有基于时间的事件，并可检查是否存在任何时间冲突。

在“限值”（Limits）选项卡中，可设置浓度或面积百分比下限和上限。如果达到这些限值，结果中将显示一条消息（参见“结果和讨论”部分的“实验运行”部分）。

软件

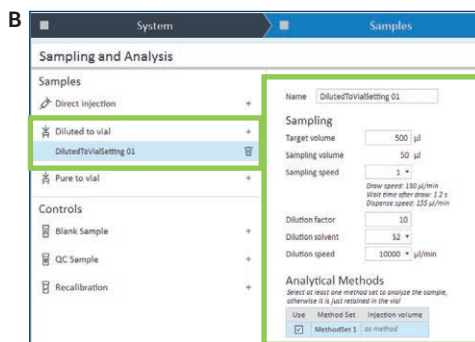
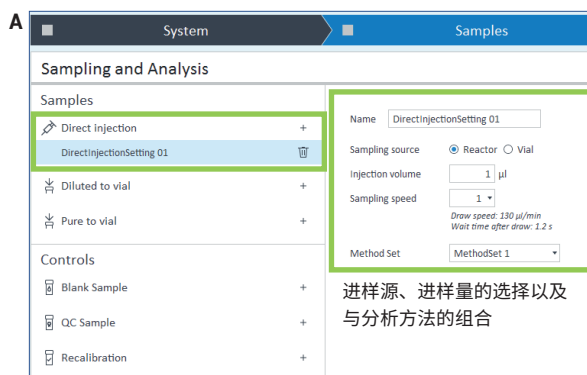
- Agilent OpenLab CDS 2.6 或更新版本
- 安捷伦在线液相色谱监测软件，1.0.1 版

色谱柱

Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 μm（部件号 959757-902）



图 2. 安捷伦在线液相色谱监测软件中的实验设置，显示了系统设置。可选择方法并组合成方法组。可定义基于规则的操作以及样品前处理方法



稀释倍数、目标体积的选择以及与分析方法的组合。

图 3. A) 用于从反应器流或样品瓶直接进样的设置。B) 用于稀释/淬灭反应器流样品的设置，进样或不进样

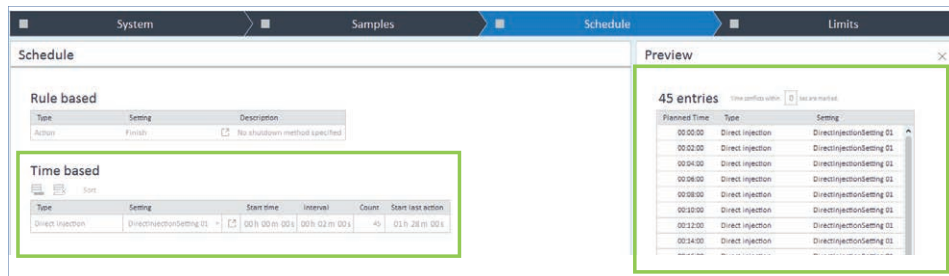


图 4. 实验设置中的“计划”选项卡。可设置基于时间的事件的多种组合，并可使用预览来识别并解决时间冲突

样品和稀释（用于校准）

- **反应物**：乙酰水杨酸，产物：水杨酸
- **1 g/L 乙酰水杨酸和 1 g/L 水杨酸的储备液**：将 100 mg 各化合物溶于 10 mL 乙醇 (EtOH) 中，用水定容至 100 mL
- **稀释系列**：1000、200、100、20、10 mg/L

样品输送泵

- **泵**：Agilent 1260 Infinity II 等度泵 (G7110B)
- **流速**：5 mL/min
- 溶剂流从反应容器流至在线样品管理器反应器接口，然后返回反应容器（另见仪器设置）

在线液相色谱监测软件中的实验设置

- 直接进样
 - **从反应器直接采样**：1 μ L（取决于方法）
 - **采样速度设置**：1
 - **计划**：间隔：2 分钟，分析时间 90 分钟
- 稀释至样品瓶
 - **稀释倍数**：1:10，稀释溶剂 (S2)：水 + 10% ACN + 0.1% FA
 - **目标体积**：500 μ L
 - **样品体积**：50 μ L
 - **采样速度设置**：1
 - **稀释样品推射速度**：10000 μ L/min
 - 用于采样的 Agilent InfinityLab 深孔板，31 mm，1 mL（部件号 5042-6454）
 - 用于微孔板的 Agilent InfinityLab 硅胶密封垫（部件号 5043-9317）
 - **计划**：间隔：5 分钟，分析时间 180 分钟

OpenLab CDS 2.6 中的色谱方法

参数	值
流速	A) 水 + 0.1% FA, B) ACN + 0.1% FA, 0.7 mL/min
等度条件	35% B, 停止时间 1.0 min
进样量	1 μ L
进样针清洗	3 s, 清洗溶剂 (S1): 水 + 50% ACN + 0.1% FA
FEED 进样	注入速度: 自适应 80% 流速 灌洗体积: 根据进样量自动计算 灌洗溶剂 (S2): 水 + 10% ACN + 0.1% FA
柱温	45 °C
DAD	230/4 nm, 参比 360/100 nm, 数据采集速率 20 Hz

OpenLab CDS 数据分析中的数据处理方法

参数	值
积分	
在 0.001 min 处关闭, 在 0.55 min 处打开, 在 0.95 min 处关闭	
最小峰面积	15.00
最低峰高	1.70
峰宽	0.02
最小峰面积%	0.00
斜率灵敏度	5.0
肩峰模式	关闭
鉴定	
乙酰水杨酸	信号 DAD1A, RT 0.638 min, 窗口 0.1 min
水杨酸	信号 DAD1A, RT 0.797 min, 窗口 0.1 min
校准	
浓度单位	mg/L
响应	峰面积
加权	无
曲线模型	线性, 忽略原点
浓度	1000、200、100、20、10 mg/L

反应设置

在磁力搅拌棒剧烈搅拌下，用注射器将含 100 mg 阿司匹林的 10 mL 乙醇溶液非常快速地加入 90 mL 处于选定 pH 值的甘氨酸缓冲液中。

化学品

乙酰水杨酸、水杨酸、甘氨酸、NaCl、NaOH、HCl、EtOH

缓冲液

- **溶液**:
 - 1) 0.1 mol/L 甘氨酸 + 0.1 mol/L NaCl, 溶于 1 L 水中
 - 2) 0.1 mol/L NaOH
- **pH 11**: 52 mL 溶液 1 + 48 mL 溶液 2
- **pH 12**: 45 mL 溶液 1 + 55 mL 溶液 2
- 利用 0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 调节 pH

溶剂和化学品

- 所有溶剂均购自德国 Merck 公司
- 化学品购自德国 VWR 公司
- 新制超纯水产自配备 LC-Pak Polisher 和 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统

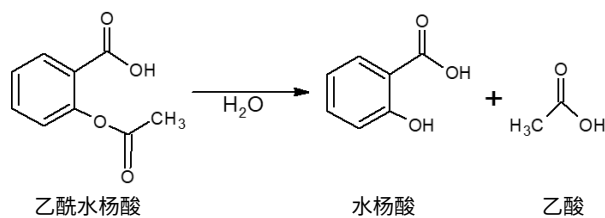


图 5. 乙酰水杨酸 (阿司匹林) 水解为水杨酸和乙酸

结果与讨论

选择乙酰水杨酸 (阿司匹林) 的水解作为模型反应, 以展示包含 1260 Infinity II 在线样品管理器和在线液相色谱监测软件的 InfinityLab 在线液相色谱解决方案的应用能力 (图 5)。该反应的速度受到所用水解缓冲液 pH 值的影响。因此, 使用该模型反应可以展示不同的采样、样品处理和速度性能。

在化学实验之前, 开发出一种快速分离乙酰水杨酸和水杨酸的方法 (见“实验部分”)。利用该方法生成一种数据处理方法, 对两种化合物进行校准, 以定量分析化学反应过程 (图 6)。

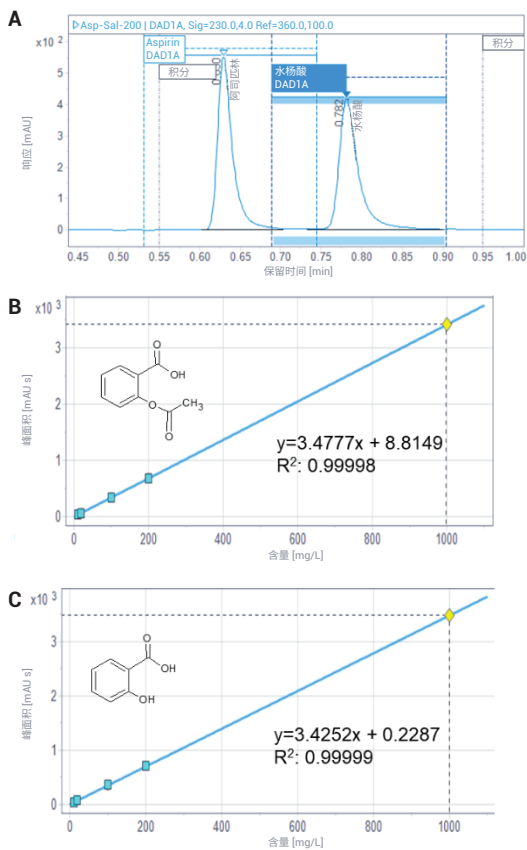


图 6. 校准乙酰水杨酸和水杨酸以生成数据处理方法。(A) 乙酰水杨酸和水杨酸的快速分离和积分范围 (200 mg/L)。(B) 乙酰水杨酸 (阿司匹林) 的校准曲线, $R^2: 0.99998$ 。(C) 水杨酸的校准曲线, $R^2: 0.99999$

乙酰水杨酸在 pH 11 下的水解

在设置实验时，将 90 mL pH 为 11 的甘氨酸缓冲液加入烧瓶中，并在持续搅拌下快速加入溶于 10 mL 乙醇中的 100 mg 乙酰水杨酸。将烧瓶连接至泵，以高流速向在线样品管理器的反应器接口输送恒定的反应溶液流。在实验开始前，必须定义采样位置。如有必要，可以定义其他位置，例如 QC、空白和校准标样（图 7）。从在线液相色谱监测软件开始实验后，每 5 分钟抽取一次样品进行稀释和后续分析。

各个样品的当前状态（包含所有信息）显示在**执行 (Execution)** 选项卡中所示的表格中（图 8）。在实验运行过程中，将以实时状态信息填充该表格。在这个屏幕上，还可以通过更改样品、方法和计划来

实时影响实验。从图 8 中可以看出，由于乙酰水杨酸的下降峰降至数据处理方法中的峰面积排除限值以下，因此还在采集后对数据进行了重新处理。

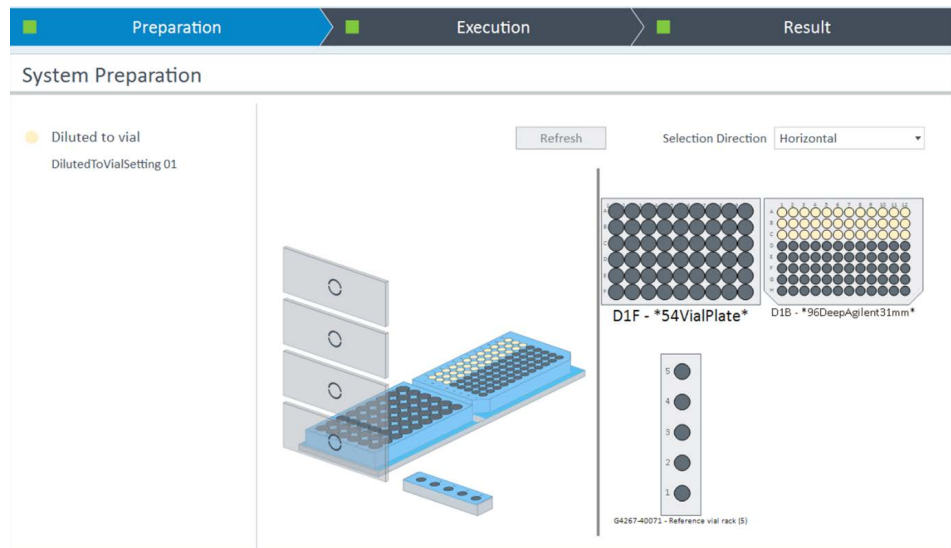


图 7. 显示所选采样位置的实验准备屏幕。此外，可在此处定义 QC、空白和校准标样的必要位置

Status												
Preparation Execution Result												
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	

图 8. 执行表，包含采样和分析时间、应用的方法和采样位置等信息

在运行过程中，可以在“结果” (Result) 选项卡的数据可视化工具（例如在线液相色谱监测软件的趋势图）中实时查看进展结果。最终结果也可以显示在**实验运行**选项卡中（图 9）。此处，将显示交互式链接的图形和表格。可配置的表格将汇总反应过程中所选样品的结果。该表格可显示保留时间、峰面积、峰面积百分比、浓度或校正浓度等，其中考虑了采样稀释倍数（图 9A）。将标记超出或低于限值的结果。另外，可显示反应物减少和产物增加的叠加色谱图（图 9B）。

图 9 中的所选样品表明，大约 45 分钟后，样品 10 的反应物和产物浓度相等；145 分钟后，乙酰水杨酸的浓度低于初始浓度的 10%。

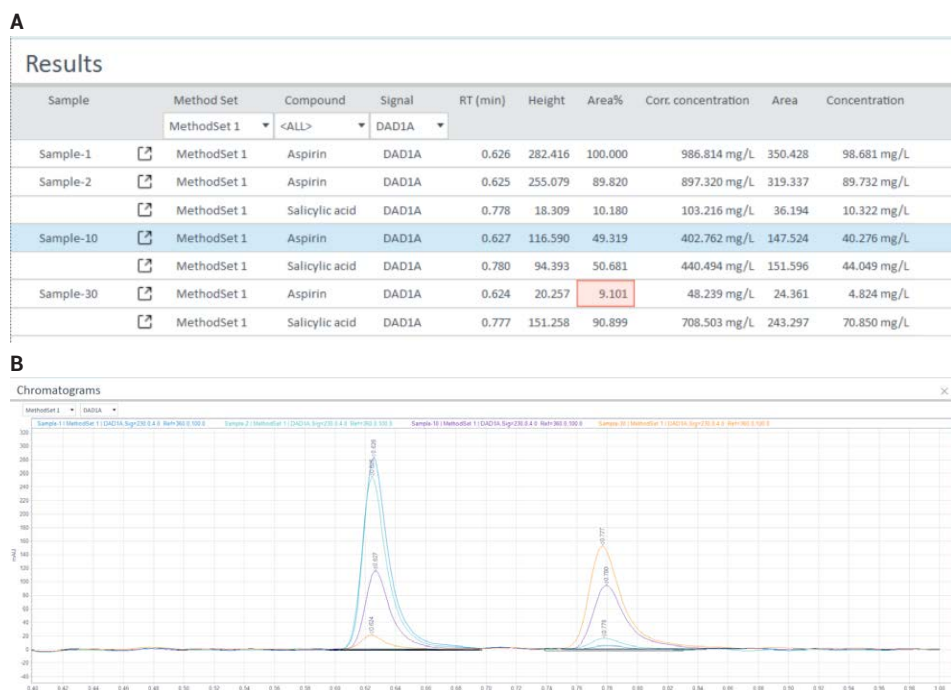


图 9. 结果选项卡中最终实验结果的可视化。(A) 突出显示反应数据点的结果表，显示出保留时间、峰高、峰面积、峰面积百分比、浓度和校正浓度。(B) 0.626 分钟处不断减小的乙酰水杨酸峰和 0.777 分钟处不断增加的水杨酸峰

图 9B 中显示的结果表允许通过一键快捷方式直接获取 OpenLab CDS 数据分析中所示的数据 (图 10)。图 10 中的样品 1 显示了反应的起点, 此时反应刚刚开始, 反应产物的浓度低于检测限。反应容器中乙酰水杨酸的初始浓度为 986.8 mg/L。在反应时间为 5 分钟时抽取的样品 2 已经显示出一些反应产物, 反应容器中水

杨酸的浓度为 103.3 mg/L (峰面积% 为 10.18%)。在 45 分钟后抽取的样品 10 具有大致相等的乙酰水杨酸和水杨酸浓度和峰面积百分比。在 145 分钟后抽取的采样点 30 是第一个被标记的时间点, 因为乙酰水杨酸的峰面积百分比低于定义的限值 (10%)。通过访问 OpenLab CDS 数据分析中的数据, 也可以对数据分析方法进行

更改。例如, 可更改积分限值以检测丰度较低的峰, 例如反应开始时最初形成的产物的杂质。新方法可通过其内置的重新处理功能对在线液相色谱监测软件中生成的数据进行重新处理, 即使实验仍在运行时也适用。

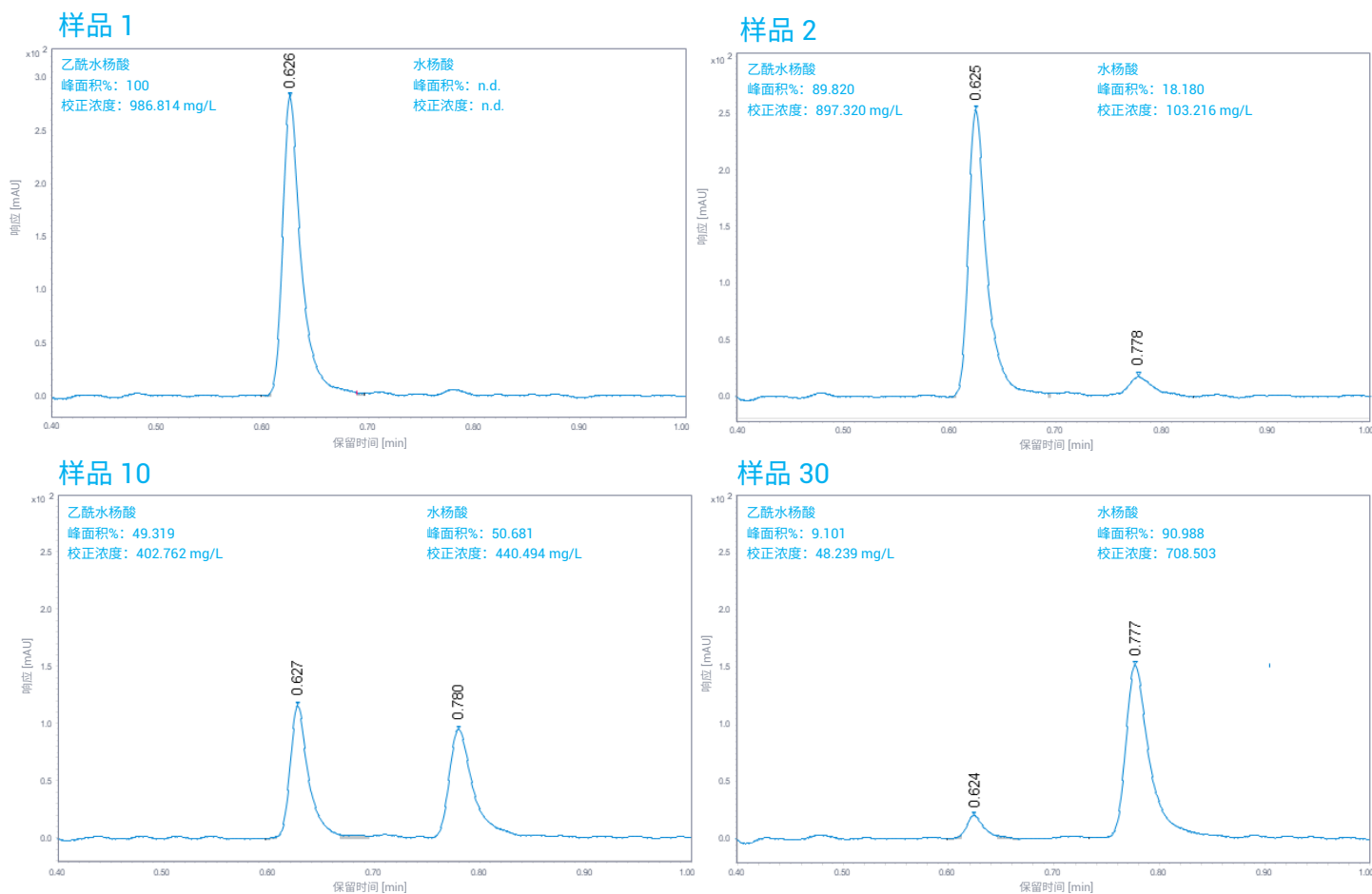


图 10. Agilent OpenLab CDS 数据分析中显示的单次运行的数据。(样品 1) 在反应开始时抽取的第一个样品仅显示出反应物。(样品 2) 在 5 分钟后抽取的第二个样品开始显示出一些反应产物。(样品 10) 在反应开始后 45 分钟抽取的样品表现出相等的反应物和产物峰面积和浓度。(样品 30) 第一个被标记的样品, 因为反应物浓度低于定义的峰面积% 限值 (10%)

在线样品管理器可使用不同的溶剂进行注射针清洗、流路清洗以及稀释和淬灭。能够在采样后通过用淬灭溶剂进行稀释来停止反应。在本例中，用水 + 10% 乙腈 + 0.1% 甲酸进行稀释，由此会减慢反应速度（图 11）。24 小时后，乙酰水杨酸峰有少许下降，而水杨酸峰有少许提高，表明阿司匹林在 1:10 稀释/淬灭环境中仅发生了轻微降解。这使得利用其他分析技术进行实验后分析或额外的质量控制成为可能。

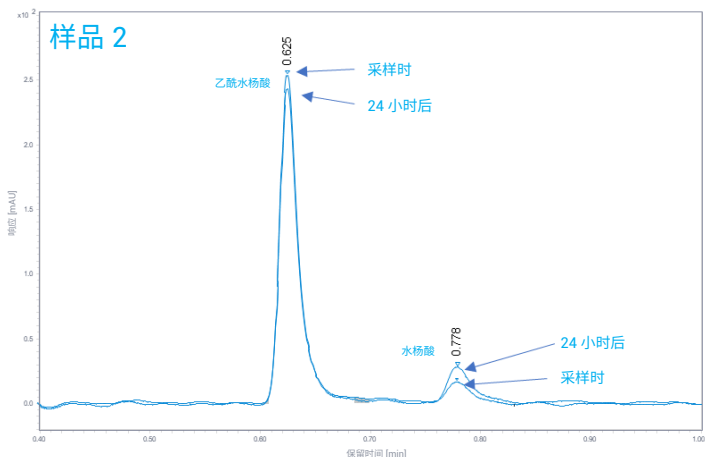


图 11. 采样并稀释/淬灭后立即进样的稀释样品结果与 24 小时后结果的叠加图

乙酰水杨酸在 pH 12 下的水解

为展示在线液相色谱应对快速反应的能力，通过将 pH 值提高到 12 来加快乙酰水杨酸的水解反应速度。为监测快速反应，通过直接从反应器流中将样品吸入针头来进样，其中不包括任何机械运动，只需切换反应器接口阀即可。1 分钟的色谱分析时间加上所有其他过程，使所选方法设置可实现每个数据点 2 分钟的分析周期。所得趋势图（图 12A）显示了每隔两分钟的样品数据点。乙酰水杨酸的峰面积减小曲线与水杨酸的峰面积增加曲线在 20 分钟后相交，表明两者此时具有相等的峰面积百分比和浓度。78 分钟后，反应几乎完成，反应物的峰面积% 降低到给定的限值 (10%)。结果表（图 12B）显示了保留时间、峰面积、峰高、峰面积百分比和浓度等详细信息。色谱图（图 12C）显示了在 0.772 分钟处水杨酸不断增加的峰和 0.622 分钟处乙酰水杨酸不断减小的峰的叠加图。最初，反应开始非常快，即使在第一个抽取的样品中也形成了产物（图 12B）。在反应过程中，产物形

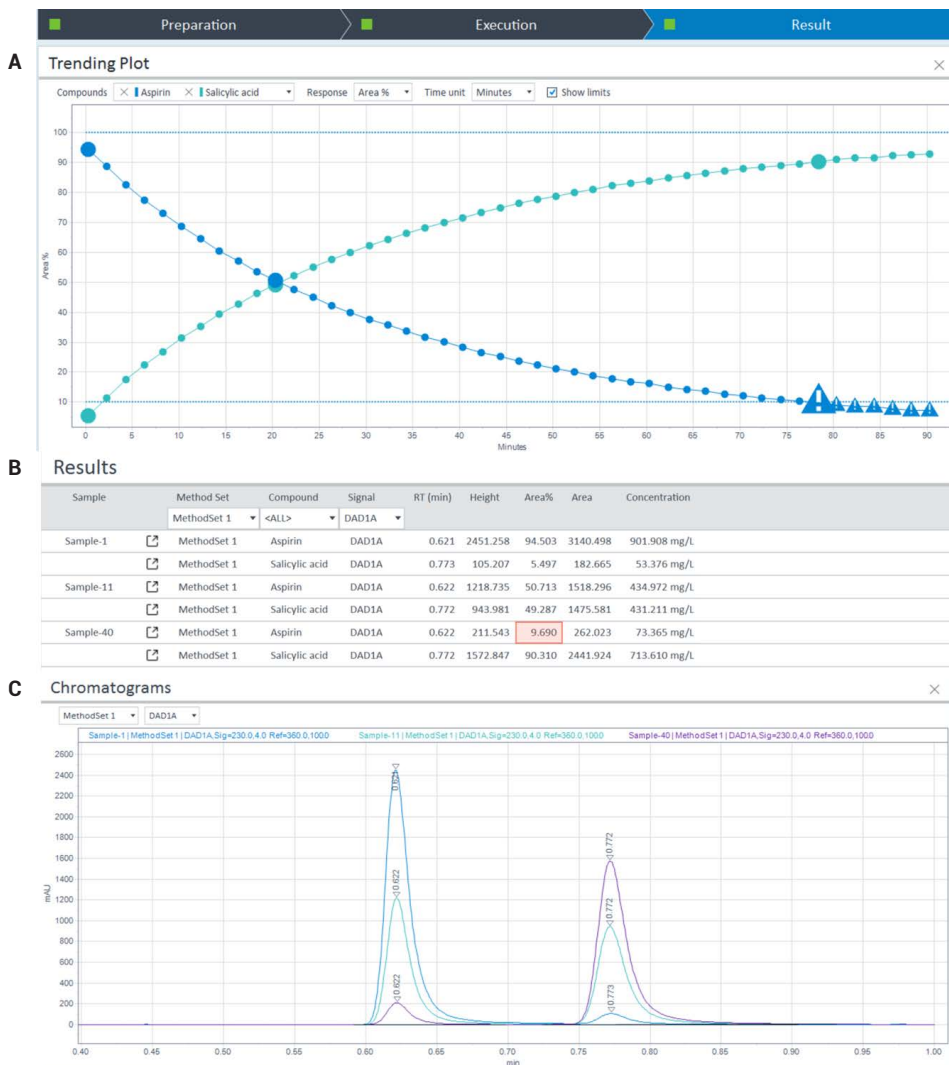


图 12. 结果选项卡中快速反应的实验结果的可视化。(A) 反应物乙酰水杨酸和水杨酸的峰面积趋势图。(B) 突出显示反应数据点的结果表，显示出峰面积、峰面积百分比和浓度。(C) 0.622 分钟处不断减小的乙酰水杨酸峰和 0.772 分钟处不断增加的水杨酸峰

成和反应物转化的速度减慢。这表示可以考虑降低采样频率，可通过引入额外的基于时间的事件来实现（图 4）。例如，前 30 分钟的采样间隔为 2 分钟，随后至第 60 分钟的采样间隔为 6 分钟，其余反应时间的采样间隔则为 10 分钟。这一灵活的采样间隔设置与反应过程一致，起始阶段需要较高的采样速率，随着反应速度降低则降低采样速率。

结论

本应用简报展示了 Agilent InfinityLab 在线液相色谱解决方案（包括 Agilent 1260 Infinity II 在线样品管理器和安捷伦在线液相色谱监测软件）可用于小分子合成这类非常快速反应的过程监测。

反应样品可直接从反应器流中抽取并稀释或淬灭以停止反应，供立即或后续分析。

对于非常快速的反应，可以在从反应器流中抽取样品后直接进样分析。这使得监测快速反应的分析周期非常短。高精度样品抽取和稀释/淬灭可准确定量反应容器中的反应物和产物，从而优化高价值产物的收获。

参考文献

1. Performance Characteristics of the Agilent 1260 Infinity II Online Sample Manager (Agilent 1260 Infinity II 在线样品管理器的性能特点)，安捷伦科技公司技术概述，出版号 5994-3529

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

DE44320.1899305556

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021 年 6 月 18 日，中国出版
5994-3528ZHCN