

● インライン NMR 分析を用いた有機化学

核磁気共鳴 (NMR) 分光法は、様々な化合物の構造決定および定量評価に欠かせない分析手法である。近年では、有機合成化学分野において、インライン NMR 分析を取り入れた反応開発が注目されている。ここで、「インライン」とは、反応系中の化合物を常時観測する手法を指す。特に、分子が持つ水素原子核を分析対象とするインライン ^1H NMR 法は、クロマトグラフィーと比較して得られる情報量が多いうえ、測定時間が短い点が魅力的である。一般に、従来のオフライン分析では反応溶液の一部を採取した後に NMR 測定する必要がある、刻一刻と変わる反応器内を高精度で観察することは困難である。それに対し、インライン NMR 分析では非破壊的かつリアルタイムで反応系中の生成物を検出し、単離操作の手間を省くことで反応条件を速やかに最適化できる。このように、インライン NMR 法は反応開発を加速させる革新的手法であるが、次の二つの弱点を抱えている。

- ① NMR 測定部位を反応溶液が絶えず通過し続けるため、緩和時間が長い ^1H のシグナルを検出し難い。
- ② 重溶媒中で反応を行わない限り、溶媒ピークの強度が大き過ぎるため、これを抑制しなければならない。

上記の課題に対し、Bazzoni らはメントールのトシル化反応をモデルとして解決策を提案している¹⁾。まず、実験系は、NMR 装置の外部で反応進行中のフラスコから溶液の一部がポンプにより NMR プロブへと連続的に送液され、測定後に元のフラスコに戻るものである。すなわち、原料が反応器と NMR 測定部位の間を循環する過程で生成物へと転化する。この条件下、筆者らは Zangger-Sterk (ZS) 法による ^1H NMR のホモデカップリングとパルス磁場勾配法を組み合わせることで問題点①を克服している。また、 ^1H NMR では重水素 (D) 化溶媒を用いるのが一般的であるが、WET (water suppression enhanced through T_1 effect) パルスシーケンスにより、インライン分析においても軽水素溶媒のピークを消去できることを見いだした (問題点②の解決)。これらの方策により、得られた ^1H NMR スペクトルのピーク面積比から反応物/生成物の相対量が求められることも実証済である。今後、本研究の成果は、管型の反応器に溶液を流しながら行うフロー合成法にも適用される見込みである。具体的には、フローリアクターの出口から NMR プロブへと流路を延ばすことで、反応中間体の観測・反応機構解析に役立てられる。最終的には、深層学習およびベイズ統計等によるデータフィードバックを

活用した自動反応化に展開すると予想される。

- 1) M. Bazzoni : A. Régheasse, E. Caytan, F.-X. Felpin, P. Giraudeau, A. Bernard, R. W. Adams, G. A. Morris, M. Nilsson, J.-N. Dumez : *Chem. Eur. J.*, e202403385 (2024).

[北海道科学大学 神尾 慎太郎]

● 細菌毒素 Lipopolysaccharide の新たな
検出法による感度向上の取り組み

グラム陰性菌の細胞壁の構成成分である糖脂質 Lipopolysaccharide (LPS) はエンドトキシンとしても知られ、微量でも人体の血液に混入すると発熱をもたらす。環境中に普遍的に存在していることから、注射剤の製造などにおいて pmol/L (分子量 10000 として 10 pg/mL) オーダーでの厳重な管理が要求されている。現在 LPS は主に、ウサギにサンプルを注射しその体温変化を測定する方法や、カプトガニの血球抽出物を試薬原料とした *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) 試験により検査もしくは定量される。しかし、いずれも生物資源に由来した方法であり、動物愛護などの観点から、新たな LPS 検出法の確立に向けて盛んに研究がなされている。その中には、管理濃度が非常に低いゆえに測定感度向上のための特別な工夫がなされているものも多い。

Sheng らは、ゲノム編集ツールである CRISPR/Cas12a と、糖を認識可能なフェニルボロン酸を利用し、検出限界が 44.86 pg/mL の高感度な LPS 検出を可能にした¹⁾。この方法では、フェニルボロン酸修飾磁気ビーズと LPS アプタマーが、LPS を介して複合体を形成する。ここにポリメラーゼとプライマーを加えると、アプタマーが複合体から解離し、自身を鋳型とした二本鎖 DNA が合成される。この二本鎖 DNA により活性化された CRISPR/Cas12a が、蛍光団 (フルオレセイン) と消光団のそれぞれを末端に修飾した一本鎖 DNA を切断し、蛍光が回復する。磁気ビーズ/LPS 複合体へのアプタマーの結合と解離のサイクルが循環し、二本鎖 DNA が持続的に合成されることで、蛍光シグナルが増幅する。

Hu らは、原子移動ラジカル重合を利用して、LPS の検出限界が 1.2 fg/mL というさらなる高感度化を実現した²⁾。この方法では、まず LPS が電極上に修飾された LPS アプタマーに捕捉される。次に、LPS の糖鎖部がフェニルボロン酸部位を含むラジカル重合開始剤と結合する。ここにフェロセンを含むモノマーが重合し、電気化学シグナルが増幅する。LPS 1 分子に数百のフェニルボロン酸と結合可能な糖が存在すること、また、それぞれの糖から重合により数百から数千のフェロセンが付加されることから、二段階のシグナル増幅機構を有する。

これらの研究に代表されるように、近年新規 LPS 検出法の高感度化が進んでいる。今後、感度の高さだけでなく簡便さも兼ね備えた検出法の確立が期待される。

- 1) A. Sheng, J. Yang, L. Cheng, J. Zhang : *Anal. Chem.*, **94**, 12523 (2022).
- 2) Q. Hu, J. Wan, Z. Liang, S. Li, W. Feng, Y. Liang, Y. Luo, X. Cao, Y. Ma, D. Han, L. Niu : *Anal. Chem.*, **95**, 5463 (2023).

[野村マイクロ・サイエンス株式会社 木本 洋]