

実施課題名 超高磁場NMRを用いた化学反応のリアルタイムモニタリング手法の基盤技術評価

【背景】

化学プロセスのリアルタイムモニタリングは産業において製品開発ステージだけではなく、生産・品質管理ステージでも重要な役割を果たす。開発の現場では反応経路や反応速度論を正しく理解することで反応効率の追求や不要な副産物の生成を抑える条件の検討をおこない、生産・品質管理の現場では正しく反応がおこなわれていることを確認し、品質や収量をコントロールする。本課題ではNMRを使った化学反応のリアルタイムモニタリングのアプリケーションとして、現在弊社で開発されているNMRフローセルを950MHzで利用可能かを検証する。とくに超高磁場での分解能の維持やロックのない条件での測定の安定性などが課題になる。950MHzのような高磁場で実験できることが確認できれば感度の面での改善が見込まれ、新しいアプリケーションへの適用が目指せるものと考えられる。

【実施内容】

本実験では950MHzにおいてフローセルを利用し反応をリアルタイムで追跡することが可能であるかどうか、確認することが目的であった。フローセルは図1のようにテフロンチューブをつかいプランジャーポンプにより外部から送液をおこない、NMRプローブ内に送液し、循環させるものを使った(Figure 1)。フローセル先端部はそのままプローブに挿入できる形になっており、送液された反応液はセルの先端まで伸びるチューブに吸われ、外部の反応容器に戻り、循環する形状をとる(Figure 2)。実験系としては単純なものを利用し、Invertase酵素(イースト由来、和光純薬より購入)によるsucrose(Sigma-Aldrichより購入)の加水分解実験をおこなった。Invertaseはsucroseをfructoseとglucoseに加水分解するため、それぞれの成分の変化をNMRで追跡した。反応条件は軽水のみpH6.5のリン酸バッファー中に1 mg/mlに調整し、Invertaseのstock solutionを1 ul加えた。1 ulのstock solutionは酵素4μunitに相当し、和光純薬の規定では30 min.でsucrose 1mgを加水分解する酵素量に相当する。送液は1ml/minでおこない、NMR測定には¹Hの1Dをexcitation sculpting法による溶媒除去をしながらおこない、一回の測定を4回積算(30秒の測定時間)でおこない経時変化を追跡した。反応開始から1min程度のデッドタイムはあったものの、time courseを正確に測定することができた(Figure 3)。

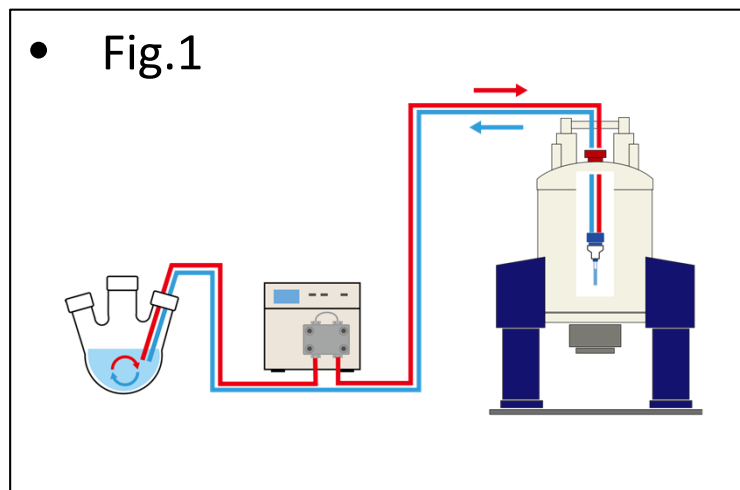


Fig.1 フローセル構成模式図

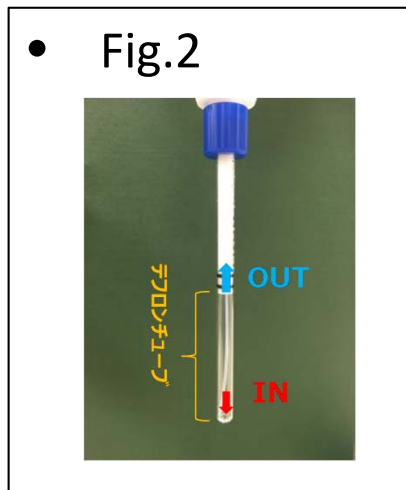


Fig.2 フローセル先端部

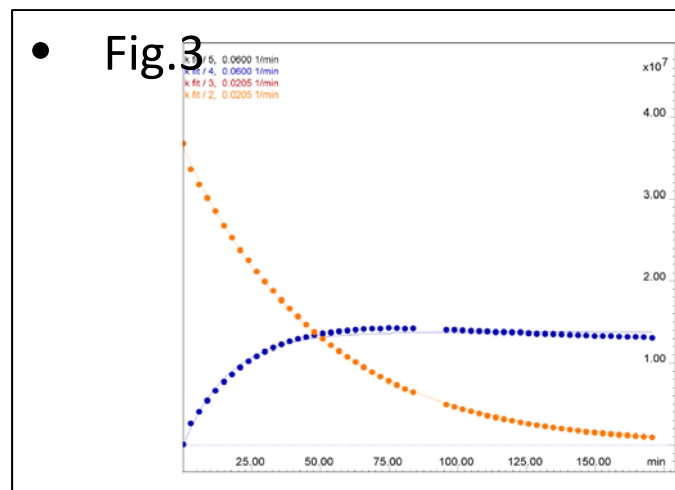


Fig.2反応の解析結果(オレンジはsucroseのアノメリック位の信号強度変化、青はglucoseのアノメリック位の信号強度変化。)

NMR 共用プラットフォーム 特定課題利用
利用報告書

申請番号	PF027	課題受付番号	PF15-200-009
実施機関名	ブルカー・バイオスピン株式会社		
実施部署名	アプリケーション部		
実施責任者管理職名・氏名	職名	氏名	堤 遊
実施部署所在地	神奈川県横浜市神奈川区守屋町 3-9		
利用課題名	超高磁場 NMR を用いた化学反応のリアルタイムモニタリング手法の基盤技術評価		
本課題の概要・目的	<p>化学プロセスのリアルタイムモニタリングは産業において製品開発ステージだけではなく、生産・品質管理ステージでも重要な役割を果たす。開発の現場では反応経路や反応速度論を正しく理解することで反応効率の追求や不要な副産物の生成を抑える条件の検討をおこない、生産・品質管理の現場では正しく反応がおこなわれていることを確認し、品質や収量をコントロールする。本課題では NMR を使った化学反応のリアルタイムモニタリングのアプリケーションとして、現在弊社で開発されている NMR フローセルを 950MHz で利用可能かを検証する。とくに超高磁場での分解能の維持やロックのない条件での測定の安定性などが課題になる。950MHz のような高磁場で実験できることが確認できれば感度の面での改善が見込まれ、新しいアプリケーションへの適用が目指せるものとする。</p>		
利用実施時期、及び期間	<p>平成 28 年 2 月 25 日～平成 28 年 3 月 24 日</p> <p>総利用日数：7 日</p> <p><u>当初計画どおり</u> 当初計画変更 (変更理由)</p>		
利用施設 横浜市立大学	NMR 装置 (該当部分に ○)	<p>利用装置①</p> <p>・ () 溶液 500MHz、() 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、 () 溶液 800MHz、() 溶液 900MHz、(●) 溶液 950MHz、 () 固体 900MHz、() 固体 950MHz</p> <p>利用期間 1：平成 28 年 2 月 25 日～平成 28 年 3 月 4 日</p>	
その他の 利用施設			

<p>成果の概要</p>	<p>実施内容</p>	<p>本実験では 950MHz においてフローセルを利用し反応をリアルタイムで追跡することが可能であるかどうか、確認することが目的であった。フローセルは図 1 のようにテフロンチューブをつかいプランジャーポンプにより外部から送液をおこない、NMR プロープ内に送液し、循環させるものを使った (Figure 1)。フローセル先端部はそのままプロープに挿入できる形になっており、送液された反応液はセルの先端まで伸びるチューブに吸われ、外部の反応容器に戻り、循環する形状をとる (Figure 2)。実験系としては単純なものを利用し、Invertase 酵素 (イースト由来、和光純薬より購入) による sucrose (Sigma-Aldrich より購入) の加水分解実験をおこなった。Invertase は sucrose を fructose と glucose に加水分解するため、それぞれの成分の変化を NMR で追跡した。反応条件は軽水のみ pH6.5 のリン酸バッファー中に 1 mg/ml に調整し、Invertase の stock solution を 1 ul 加えた。1 ul の stock solution は酵素 4 μunit に相当し、和光純薬の規定では 30 min. で sucrose 1mg を加水分解する酵素量に相当する。送液は 1ml/min でおこない、NMR 測定には ^1H の 1D を excitation sculpting 法による溶媒除去をしながらおこない、一回の測定を 4 回積算 (30 秒の測定時間) でおこない経時変化を追跡した。</p> <div data-bbox="579 875 1401 1301" data-label="Diagram"> </div> <p>Figure 1 フローセル構成模式図</p> <div data-bbox="826 1402 1147 1823" data-label="Image"> </div> <p>Figure 2 フローセル先端部</p>
--------------	-------------	---

本課題により得られた成果と当初目標との比較

反応開始から 1min 程度のデッドタイムはあったものの、time course を正確に測定することができた (Figure 3 および 4)。

実験開始当初は予想通り分解能調整に問題はあったものの、セル内のテフロンチューブの調整やフローセルのガラス部の長さの調整などにより、良好な分解能を得ることができた。またロックのない条件下においても安定して水消しをおこなった状態で測定をおこなうこと、またフロー状態でもグラジエントを使った水消しが十分に効果を上げることなどが確認できた。

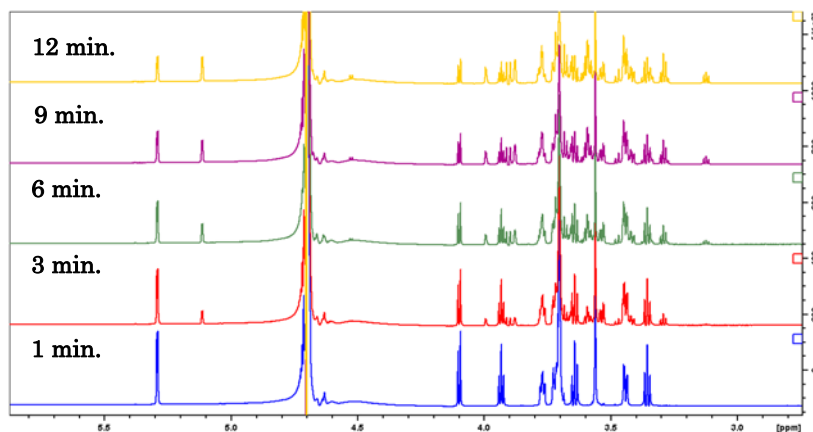


Figure 3 Invertase による sucrose の加水分解の経時変化スペクトル

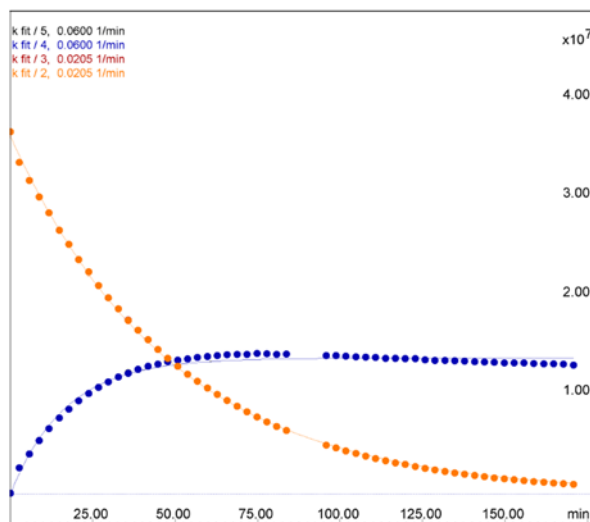


Figure 4 反応の解析結果 (オレンジは sucrose のアノメリック位の信号強度変化、青は glucose のアノメリック位の信号強度変化。)

計画当初はもう少し实际的な化学反応の追跡と解析を目的としていたが、実際にはフローセルを超高磁場で使えるようにするまでに時間がかかってしまった。とくにフローセルの構造上上下に不均質な部分があるため、小さな信号がきれいに少ない積算回数で見える程度までに分解能をあげることが困難であった。このような問題は 600 MHz 程度の装置で見られなかったことであり、子磁場になって初めて見られた。しかし今回の特定課題利用で課題が解決できたため、今後は他の化学反応に適用し、解析をおこなっていきたい。

成果発表

	今後の展開	結果でも触れたように今回の特定課題利用でフローセルの持つ課題が概ね解決できたため、今後は当初の目的であったもう少し実践的な化学反応の解析をおこなっていききたい。とくに 950 MHz NMR の超高分離能とクライオプローブの ^{13}C 超高感度を用いることでより未同定の化合物の同定と反応追跡はいままで解析が困難だった化学反応への応用が期待される。
社会・経済への波及効果の見直し		<p>今回の特定課題利用ではとくに高磁場でオンフローかつロックのない条件で安定したスペクトルの測定とフローセルの形状に要る磁場の不均質さが課題であった、いずれも問題がなく、通常の試料管を使って測定するように溶媒除去をおこない測定することができることが分かった。またこのような課題は一般的に磁場が上がるほど難しいことが知られているが、950MHz もの高磁場でも問題なくリアルタイムにオンフローで反応を観測することができることが確認できた。これにより高磁場でもこのような実験がルーチン的におこなえることが分かったため、高磁場装置の高感度を生かして、より濃度が低い反応系やより速い反応（積算回数を減らして測定）の系などでも利用できると考えられる。</p> <p>また、今回実験を行うことができなかったが、濃度が高い条件での ^{13}C 観測の実験による反応の追跡・解析などもできればさらに解析の幅を広げると考えられる。</p> <p>一方で超伝導磁石を用いた NMR は工場の製造ライン上でのオンラインモニタリングに設置要件上やや不向きであるのも事実である。このため今後の本課題の成果の産業利用を見据えて、赤外分光による反応の同時モニタリングをおこなうことによって、NMR スペクトルから得た構造・速度論に関する情報を赤外スペクトルの解釈・帰属・キャリブレーションに用い、実際の製造ラインに今回の実験結果を適用できるように拡張していくことも必要である。</p>
利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望		<p>装置の管理が行き届いており、使いやすかった。</p> <p>また実験スペースが広く確保できたため、持ち込みの実験器具を組みやすかった。</p>
今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待		
成果公開延期の希望の有無		<p>() あり : (●) なし</p> <p>「あり」の場合理由 :</p>
その他		