

ヘモグロビン存在下におけるアクリルアミド/アクリル酸 共重合ゲルへの尿素の吸着挙動

日大生産工(院) ○中山 雄詞

日大生産工

高橋 大輔

山田 和典

1 緒論

腎不全患者は、タンパク質の最終代謝物である尿素の血中濃度が上昇すると尿毒症となり、腎臓の機能を人工的に補うために人工透析を行う必要がある。人工透析に用いられる半透膜は、血液中の尿素を除去するとともに血中有効成分も除去されるため、本研究では、対象物質に対する鋳型を有することによって対象物質を選択的に認識、吸着する分子インプリント法に着目した(Fig. 1)¹⁾。本報では、ヘモグロビン(Hem)存在下における尿素インプリントアクリルアミド/アクリル酸共重合ゲル(Urea-MIP)への尿素の吸着について報告する。

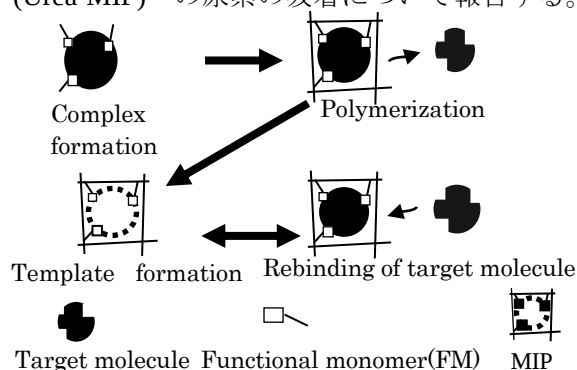


Fig. 1 Schematic representation of molecular imprinting method

2 実験方法

2-1 Urea-MIPの調製

KH₂PO₄/NaOH緩衝溶液(pH 7.4, I=0.05)に種々の濃度の機能性モノマーと尿素 0.1 mmolを溶解させた。ここで対象物質である尿素と水素結合するモノマー(機能性モノマー)には、4-ビニルピリジン(4-VP), 4-ビニルアニリン(4-VA), アクリル酸(AAc)を用いた。その後、モノマーとしてアクリルアミド(AAm), 架橋剤としてN,N'-メチレンビスアクリルアミド(BIS) 0.4 mmolを溶液中のAAmと機能性モノマーの総量が1.0 M, AAm+機能性モノマー:BISのモル比が25:1となるように加えた。さらに重合

促進剤としてN,N,N',N'-テトラメチレンジアミン(TEMED) 3.0 mmol, 重合開始剤として過硫酸アンモニウム(APS) 0.2 mmolを加え、KH₂PO₄/NaOH緩衝溶液(pH 7.4, I=0.05)で10.0 cm³に定容した。25 °Cで6時間ゲル化させた後、直径10.0 mm, 高さ1.0 mmのディスク状に成型した。成型したゲルを蒸留水で洗浄し、尿素を取り除くことでUrea-MIPを得た。また、尿素をインプリントしていないゲル(Urea-NIP)も同様に調製した。その後、Urea-MIPおよびUrea-NIPを凍結乾燥した。4-VP, 4-VAまたは, AAcを加え、調製したUrea-MIPをそれぞれUrea-MIP(4-VP), Urea-MIP(4-VA), Urea-MIP(AAc)とし、機能性モノマーを加えずに調製したUrea-MIPをUrea-MIP(-)と表記する。

2-2 Urea-MIPへの尿素の吸着実験

乾燥したUrea-MIP 0.1 gをKH₂PO₄/NaOH緩衝溶液5.0 cm³で膨潤させた。Urea-MIPに2.0 mM尿素溶液10.0 cm³を添加し、Urea-MIPへの尿素の吸着実験を行った。その後、インドフェノール法を用いて尿素濃度を測定した²⁾。採取した上澄み溶液0.1 cm³にpH 7.0 1.0 U/cm³ウレアーゼ溶液0.5 cm³を添加し、37.0 °Cで15分間放置した。さらに0.1 Mフェノール溶液2.0 cm³および活性塩素 0.1 %以上になるように調製した次亜塩素酸ナトリウム溶液2.0 cm³を添加し、攪拌した。10分放置後、混合溶液の吸光度(625 nm)を測定した。吸着開始時と吸着平衡時の試料溶液の尿素濃度の差から時間tにおけるUrea-MIPへの尿素の吸着量q_t(μmol/g)を(1)式より算出した。

$$q_t = (C_0 - C_t) \times V \times 10^6 / m \quad (1)$$

ここで、C₀, C_t, Vおよびmはそれぞれ吸着開始時0分の尿素濃度(M), 時間tにおける尿素濃度(M), 尿素溶液の体積(dm³)および乾燥したUrea-MIPの質量(g)である。

2-3 Hem存在下におけるUrea-MIPへの吸着実験

膨潤したUrea-MIPに尿素およびHemの濃度がそれぞれ2.0 mMおよび0.8 g/dm³となるよう

Adsorption of urea on molecularly imprinted acrylamide/acrylic acid copolymer gels in the presence of hemoglobin

Katsushi NAKAYAMA, Daisuke TAKAHASHI, and Kazunori YAMADA

に調製した尿素混合溶液10.0 cm³を添加した。その後、インドフェノール法を用いて尿素濃度からUrea-MIPへの尿素吸着量 $q_t(\mu\text{mol/g})$ を算出した。また、上澄み溶液の吸光度(500 nm)からUrea-MIPへのHemの吸着量 $q_{\text{Hem}}(\mu\text{mol/g})$ を算出した。

3 結果および考察

AAMのみで調製したUrea-MIP(-)(○)およびUrea-NIP(-)(●)への尿素的吸着量の経時変化をFig. 2に示す。吸着平衡時のUrea-NIP(-)への尿素的吸着量は、4.6 $\mu\text{mol/g}$ であった。Urea-MIP(-)への尿素的吸着量は、14.3 $\mu\text{mol/g}$ となりUrea-NIPよりも3.1倍高い値を示したことからUrea-MIPの尿素的の鑄型は、尿素的の吸着に対して有効であることが明らかとなった。

種々の機能性モノマーで調製したUrea-MIPへの尿素的吸着量をFig. 3に示す。モノマー総量に対する4-VPおよび4-VAのモル分率の増加するほどUrea-MIP(4-VP)(◇)およびUrea-MIP(4-VA)(△)への尿素的の吸着量は減少した。一方、Urea-MIP(AAc)(□)への尿素的の吸着量は、モノマー総量に対するAAcのモル分率が高くなるほど増加し、0.04以上で19.4 $\mu\text{mol/g}$ と一定となった。モノマー総量に対するAAcのモル分率が0.04で調製したUrea-MIP(AAc)への尿素的の吸着量は、Urea-MIP(-)(○)およびUrea-NIP(AAc)(■)(6.0 $\mu\text{mol/g}$)に比べそれぞれ1.4および3.3倍高い値を示したため、機能性モノマーとしてAAcが有効である。

Table 1にHem存在下におけるUrea-MIP(AAc)への尿素的の吸着量を示す。Hem存在下におけるUrea-MIP(AAc)への尿素的吸着量は、14.5 $\mu\text{mol/g}$ となり、Hem不在下におけるUrea-MIP(AAc)への尿素的吸着量の75 %の値を示した。また、Hem存在下におけるUrea-MIPへの尿素的吸着量は、Hem不在下におけるUrea-NIP(AAc)よりも高い吸着量を示した。さらにUrea-MIP(AAc)へのHemの吸着量は、起こらなかった。以上の結果より、Hem存在下においても尿素的の鑄型は尿素的の吸着に有効であると考えられる。

4 まとめ

尿素インプリントアクリルアミド/アクリル酸共重合ゲル(Urea-MIP)への尿素的の吸着を評価した結果、以下のことが明らかとなった。

1. アクリルアミドゲルへの鑄型の導入は、尿素的の吸着に有効である。
2. 尿素的の吸着において4-VPおよび4-VAよりもAAcが機能性モノマーとして有効である。
3. ヘモグロビン存在下においてもUrea-MIP(AAc)は、尿素的を吸着する。

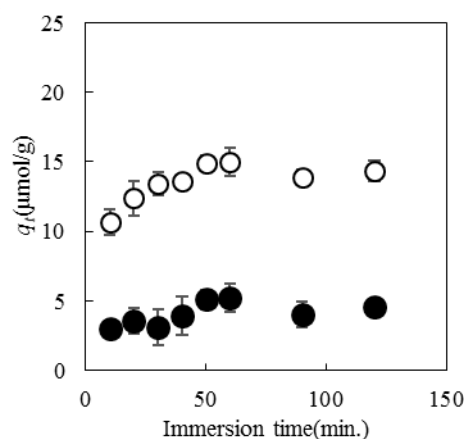


Fig. 2 Changes in the amount of adsorbed urea onto Urea-MIP(-)(○) and Urea-NIP(-)(●) with the immersion time at 25 °C and pH 7.4

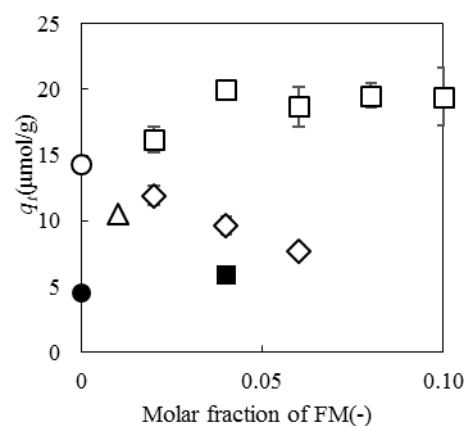


Fig. 3 Changes in the amount of adsorbed urea with the molar fraction of functional monomer at 25 °C and pH 7.4 (○:Urea-MIP(-), □:Urea-MIP(AAc), ◇:Urea-MIP(4-VP), △:Urea-MIP(4-VA), ●:Urea-NIP(-), ■:Urea-NIP(AAc))

Table 1 The amount of adsorbed urea on Urea-MIP(AAc) in the presence of Hem at 25 °C and pH 7.4

	$q_t(\mu\text{mol/g})$		$q_{\text{Hem}}(\mu\text{mol/g})$
	—	Hem	
Urea-MIP(AAc)	19.4	14.5	0

「参考文献」

- 1) T. Alizadeh, "Preparation of molecularly imprinted polymer containing selective cavities for urea molecule and its application for urea extraction", *Anal. Chim. Acta* 669 (2010) 94-101.
- 2) 北村元仕, 「実践医療化学」 医歯薬株式会社 (1980) p.236-241.