ISSN 2186-5647

P-50

分子インプリントしたアクリルアミドゲルへの尿素の吸着評価

日大生産工(院)　○中山 雄詞
日大生産工　高橋 大輔　山田 和典

1 緒言

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，尿毒症となるため，人工透析を行う必要がある。腎臓の機能を人工的に補うためのものである人工透析は，尿素を除去する上で分子の大きさによる選択性がない。そのため，目的物質に対する鋳型を有することによって目的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 (図 1)[1]。本研究では，尿素と水素結合する官能基を有したモノマー(機能性モノマー)を用いて分子インプリントゲル(Urea-MIP)を調製し，機能性モノマー濃度の尿素吸着量への影響を評価した。

2 実験方法

2-1 試薬

Urea-MIP の調製には，目的物質として尿素，モノマーとしてアクリルアミド(AAm),機能性モノマーとして 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), 架橋剤として *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(BIS), 重合促進剤として *N,N,N',N'*-テトラメチレンジアミン(TEMED), 重合開始剤として過硫酸アンモニウム(APS)を使用した。

インドフェノール法では，尿素分解酵素であるウレアーゼ溶液(pH 7.0), 発色試薬として 0.1 M フェノール溶液，次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 5%以上)を使用した。

2-2 Urea-MIP の調製

KH_2PO_4/NaOH 緩衝溶液(pH 7.4, I=0.05 M)に種々の濃度の機能性モノマーと 0.1 mmol の尿素を混ぜた。その後, AAm, BIS 0.4 mmol, TEMED 3.0 mmol, APS 0.2 mmol を添加し, KH_2PO_4/NaOH 緩衝溶液(pH 7.4, I=0.05)で 10.0 cm^3 に定容した。溶液中の AAm と機能性モノマーの総量が 1 M, AAm と機能性モノマー：BIS のモル比が 25：1 となるように調製した。25 ℃で 6 時間ゲル化させたのち，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，目的物質である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 を凍結乾燥した。機能性モノマーとして 4-VP, 4-VA, AAc を導入した Urea-MIP をそれぞれ Urea-MIP(4-VP), Urea-MIP(4-VA), Urea-MIP(AAc)とする。

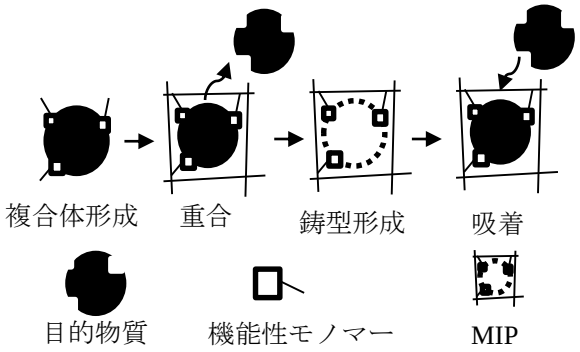

図 1 分子インプリント法の概念図

2-3 Urea-MIP への尿素の吸着実験

KH_2PO_4/NaOH 緩衝溶液 5.0 cm^3 で乾燥した Urea-MIP 0.1 g を膨潤させた。膨潤したゲルを，2.0 mM 尿素溶液 10.0 cm^3 に入れ, 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，以下のように尿素濃度を測定した [2]。経時的に採取した上澄み溶液 0.1 cm^3 に pH 7.0 ウレアーゼ溶液 0.5 cm^3 を添加し, 37.0 ℃で 15 分間放置した。さらにフ

Adsorption of urea on molecularly imprinted acrylamide gels

Katsushi NAKAYAMA, Kazunori YAMADA, and Daisuke TAKAHASHI

ェノール溶液 2.0 cm^3 および次亜塩素酸ナトリウム溶液 2.0 cm^3 を添加し，撹拌した。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 Urea-MIP への尿素の吸着量 q_e (μmol/g)を(1)式から算出した。

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

ここで C_0, C_e, V, m はそれぞれ吸着開始時の尿素濃度(M), 吸着平衡時の尿素濃度(M), 尿素溶液の体積(cm^3)および Urea-MIP の質量(g)である。

3 結果および考察

AAm のみで調製した Urea-MIP(-)および Urea-NIP への尿素の吸着量の経時変化を図 2 に示す。図 2 より Urea-MIP(-)への尿素の吸着は, 1 時間で平衡に達した。Urea-NIP(-)への尿素の吸着量が 4.6 μmol/g であるのに対し，調製時に 0.1 mmol 尿素を添加した Urea-MIP(-)への尿素の吸着量は, 14.3 μmol/g となり 3.1 倍高い値を示した。以上の結果から Urea-MIP の尿素の鋳型が尿素の吸着に対して有効であることを示している。

種々の機能性モノマー濃度で調製した Urea-MIP への尿素吸着量を図 3 に示す。図 3 より調製時の 4-VP 濃度が増加するほど Urea-MIP(4-VP)への尿素の吸着量は，減少した。これは, 4-VP 同士の疎水性相互作用により Urea-MIP(4-VP)の鋳型が収縮したと考えられる。また, Urea-MIP(AAc)調製時の AAc 濃度が 0.4 mmol 以上の時, Urea-MIP(AAc)への尿素の尿素吸着量が 19.4 μmol/g になり, AAm のみで調製した Urea-MIP(-)よりも 1.4 倍高い値を示した。以上の結果から Urea-MIP への尿素の吸着に機能性モノマーとして AAc を用いることが有効であることを示している。

4 まとめ

種々の機能性モノマー濃度で調製した Urea-MIP への尿素吸着量を評価した結果，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鋳型の導入は，尿素の吸着に有効である。

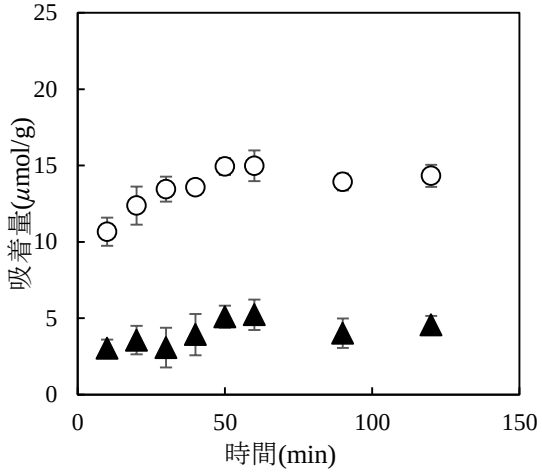

図 2 Urea-MIP(-)および Urea-NIP への尿素の吸着量の経時変化（○:Urea-MIP(-), ▲:Urea-NIP）

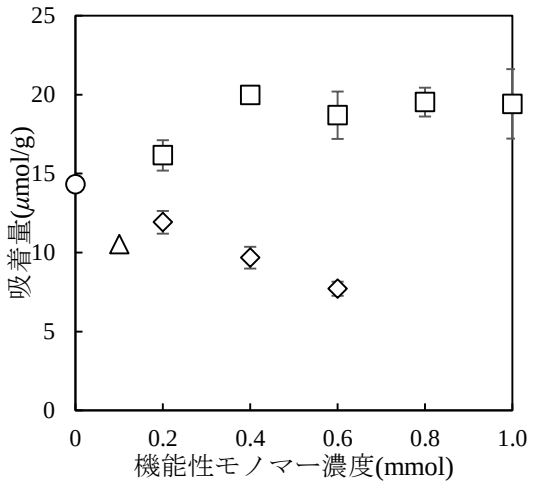

図 3 Urea-MIP への尿素の吸着量変化（○:Urea-MIP(-), □:Urea-MIP(AAc), ◇:Urea-MIP(4-VP), △:Urea-MIP(4-VA)）

2. 4-VP および 4-VA で調製した Urea-MIP への尿素の吸着量は, Urea-MIP(-)に比べ減少した。

3. 尿素の吸着において AAc を導入した Urea-MIP(AAc)が有効である。

「参考文献」

1) Taher alizadeh, *Analytica Chimica Acta*, **669** (2010), 94-101
2) 北村元仕，実践臨床化学，医歯薬出版株式会社, (1980), 236-241