

## 分子インプリントポリエチレンイミンビーズによる尿素の選択的回収

日大生産工(院) ○丸 駿祐 日大生産工 高橋 大輔  
山田 和典

## 1. 緒言

尿素は保湿剤の角質軟化剤、尿素樹脂および肥料に用いられる有用な化学物質である。日本の尿素の主な入手方法は、中国からの輸入である。現在、中国の政策によって中国の尿素的輸出量は、制限されている。中国の輸出制限に伴って、日本の尿素製品の生産量も減少した場合、皮膚疾患の増加や食糧難が懸念される。そこで脊椎動物から排出された尿に含まれる尿素の選択的回収に注目した。

現在、尿素の吸着に関してアミン系ポリマーであるキトサンを吸着材のベースとする研究が行われている<sup>[1]</sup>。キトサンは、尿素と強い相互作用を示すことおよび生体との高い適合性を有していることから、尿素の吸着に適していることが報告されている。

ポリエチレンイミン(PEI)は、Fig.1の構造式からキトサンよりもアミン含有量が高いことが分かる。尿素は、アミン基と相互作用して吸着をする。そのため、アミン含有量が高いPEIは、これまでのアミン系尿素吸着材よりも大きな吸着量となる可能性がある。我々は、キトサンと同じアミン基を有しているため、尿素との高い相互作用が期待でき、高い生体適合性が報告されているPEIを尿素の吸着材のベースとして吸着を検討する。

尿素を選択的に回収する方法として、我々は、分子インプリント法に注目した。分子インプリント法とは、モノマーまたはポリマーを標的分子と共に架橋し、標的分子の鑄型をポリマー中に作る手法である。標的分子の鑄型には、標的分子を認識して選択的に吸着する特性がある。この特性を利用して尿素の吸着について検討する。

本研究では、尿素インプリントポリエチレンイミンビーズ(Urea-MIP)を調製し、Urea-MIPへの尿素の吸着量を尿素の残存濃度から決定した。また、鑄型の量が異なるビーズを調製し、尿素吸着量の鑄型への依存性について検討した。

本講演会では、尿素の吸着が報告されているキトサンと同じアミン基をもつポリエチレ

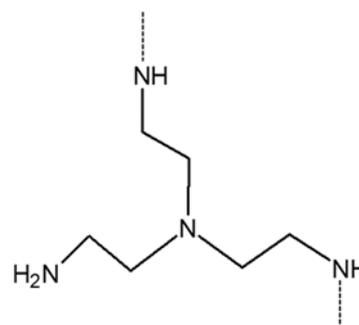


Fig.1. Structure of branched Polyethyleneimine.

ンイミンビーズの尿素の選択的吸着へのインプリント量、溶液pH、吸着温度、ビーズの添加量および選択性等の影響について報告し、尿素の選択的回収について検討する。

## 2. 実験方法

## 2-1 ポリエチレンイミンビーズの調製

Urea-MIPは、Xu<sup>[2]</sup>らの方法を参考に調製した。尿素吸着量の分子認識空間の量による変化について検討するために尿素濃度の異なる3種類のビーズを作製したPEIに含まれるアミン基と尿素のモル比が100:10になるように作製したポリエチレンイミンビーズをUrea-MIP[100:10]とする。ポリエチレンイミンに含まれるアミン基と尿素のモル比が100:1になるように作製したポリエチレンイミンビーズをUrea-MIP[100:1]とする。尿素を添加せずに作製したポリエチレンイミンビーズをノンインプリントポリエチレンイミンビーズ(Urea-NIP)とする。

メタノール3.01 mL、尿素 0.288 g、PEI 2.025 g とエピクロロヒドリン 0.067 g を30 mL 蓋つきガラス器具内で混合した後、恒温槽(35°C)で20分間プレ架橋させた。プレ架橋した溶液を10 mL シリンジに充填した。次に、この溶液を、シリンジポンプを用いて流速3.2 mL/h で貧溶媒であるドデカンとナタネ油で満たしたポリエチレンイミンビーズ調製装置に3.2 mL 滴下した。このときポリエチレンイミンビーズ調製装置のガラス管内部をドデカンで満たし、三角フラスコ部分をナタネ油で満たした。200mL 三角フラスコの底部は、

Selective removal of urea with molecularly imprinted polyethyleneimine beads.

Shunsuke Maru, Daisuke Takahashi and Kazunori Yamada

オイルバスで、装置ガラス管外部を循環型恒温槽で80℃を維持した。4時間反応させたビーズをトルエン、エタノール、蒸留水の順序で洗浄した後、40℃で24時間乾燥させた。乾燥後、デシケーター中にビーズを保存した。

Urea-MIP[100:1]とUrea-NIPは、上記と同様の方法で尿素 0.0288g を添加する条件と、尿素を添加しない条件で調製した。

## 2-2 残存尿素濃度の評価方法

尿素的残存濃度を決定するためにインドフェノール法により、検量線を作成した。0～2.0mM 尿素溶液 0.1mL にウレアーゼ溶液 0.5mL を加え、37℃ の恒温槽で 15 分反応させた。反応後、フェノール溶液 2.0mL と次亜塩素酸ナトリウム溶液 2.0mL を添加した後、攪拌した。37℃ で10分間反応させ、蒸留水で 10mL に定容した。定容後、インドフェノールの極大吸収波長である 625nm で吸光度を測定し、尿素的検量線を作成した。

## 2-3 種々のインプリント量の吸着量

リン酸緩衝液 (pH7.4,  $I = 0.900 \text{ mol/dm}^3$ ) を溶媒として濃度 2.5mM の尿素溶液 50mL を調製した。10mLのリン酸緩衝液で膨潤させたUrea-MIP[100:10], Urea-MIP[100:1] および Urea-NIP 0.1g に尿素溶液 40mL を加え、吸着を開始した (0分)。その後、37℃ に設定した恒温槽中で尿素的を吸着させた10分毎に90分まで、尿素溶液をそれぞれ 0.1mL 量り取り、インドフェノール法により各時間における尿素的濃度の吸光度を求めた。得られた吸光度から検量線を用いて尿素的の残存濃度を決定した。吸着量  $q_t$  (mg/g) は、以下の式(1)より算出した。

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t) \times V \times 60.06}{m} \dots \text{式(1)}$$

$C_0$  ... 吸着開始時の尿素的濃度 (mM)

$C_t$  ... 時間  $t$  における尿素的濃度 (mM)

$V$  ... 尿素的溶液の体積 (L)

$m$  ... ポリエチレンイミンビーズの質量 (g)

## 2-4 選択性

尿素的の吸着量は、2-3 と同様の方法で算出した。マレイン酸・トリス緩衝液 (pH7.4,  $I = 0.900 \text{ mol/dm}^3$ ) を溶媒として濃度 2.5 mM のチオ尿素的溶液100 mLを調製した。20 mLのマレイン酸・トリス緩衝液で膨潤させたUrea-MIP[100:10] 0.1 g に尿素溶液80 mLを加え、吸着を開始した (0分)。その後、37℃ に設定した恒温槽中でチオ尿素的を吸着させた。10分毎に90分まで、チオ尿素的溶液をそれぞれ

1mL 量り取り、各時間におけるチオ尿素的濃度の吸光度を求めた。得られた吸光度から検量線を用いてチオ尿素的の残存濃度を決定した。吸着量  $q_t$  (mg/g) は、式(2)より算出した。

$$q_t = \frac{(C_0 - C_t) \times V \times 76.12}{m} \dots \text{式(2)}$$

$C_0$  ... 吸着開始時のチオ尿素的濃度 (mM)

$C_t$  ... 時間  $t$  におけるチオ尿素的濃度 (mM)

$V$  ... チオ尿素的溶液の体積 (L)

$m$  ... ポリエチレンイミンビーズの質量 (g)

## 2-5 尿素的吸着量に対するpHの影響

リン酸緩衝液 (pH4.00～8.00,  $I = 0.090 \text{ mol/dm}^3$ ) を溶媒として濃度 2.5mM の尿素溶液50 mL を調製した。10mL のリン酸緩衝液で膨潤させた Urea-MIP[100:10] 0.1g に尿素溶液 40mL を加え、吸着を開始した (0分)。その後、37℃ に設定した恒温槽中で尿素的を吸着させた。10分毎に90分まで、尿素溶液をそれぞれ 0.1mL 量り取り、インドフェノール法により各時間における尿素的濃度の吸光度を求めた。得られた吸光度から検量線を用いて尿素的の残存濃度を決定した。吸着量  $q_t$  (mg/g) は、式(1)より算出した。

## 2-6 尿素的吸着量に対する温度の影響

リン酸緩衝液 (pH6.00,  $I = 0.090 \text{ mol/dm}^3$ ) を溶媒として濃度2.5 mMの尿素溶液50 mL を調製した。10mLのリン酸緩衝液で膨潤させたUrea-MIP[100:10] 0.1 gに尿素溶液40 mLを加え、吸着を開始した (0分)。その後、25, 30, 37 および 40℃ に設定した恒温槽中で尿素的を吸着させた10分毎に90分まで、尿素溶液をそれぞれ0.1 mL量り取り、インドフェノール法により各時間における尿素的濃度の吸光度を求めた。得られた吸光度から検量線を用いて尿素的の残存濃度を決定した。吸着量  $q_t$  mg/g は、式(1)より算出した。

## 2-7 尿素的吸着量に対するビーズの添加量の影響

リン酸緩衝液 (pH7.4,  $I = 0.900 \text{ mol/dm}^3$ ) を溶媒として濃度2.5 mMの尿素溶液50 mL を調製した10 mLのリン酸緩衝液で膨潤させたUrea-MIP[100:10] 0.05, 0.1および0.2g に尿素溶液 40 mL を加え、吸着を開始した (0分)。その後、37℃ に設定した恒温槽中で尿素的を吸着させた。10分毎に90分まで、尿素溶液をそれぞれ0.1 mL量り取り、インドフェノール法により各時間における尿素的濃度の吸光度を求めた。得られた吸光度から検量線を用いて尿素的の残存濃度を決定した。吸着量  $q_t$  mg/g は、式(1)より算出した。

### 3. 実験結果

#### 3-1 ポリエチレンイミンビーズの調製

得られたポリエチレンイミンビーズは、直径約 1mm の球体で、色が薄い黄色であった。

#### 3-2 尿素の吸着量の評価

各尿素濃度における吸光度から検量線である式 (3) が得られた。

$$ABS = 0.3866C + 0.0182 \dots \text{式(3)}$$

ここで  $ABS$  は吸光度 (-) を、 $C$  は尿素の濃度 (mM) を示す。得られた尿素の検量線の相関係数 ( $R^2$  値) は、0.9999 となった。

#### 3-3 種々のインプリント量の吸着量

Fig.2にポリエチレンイミンビーズへの尿素の吸着量の経時変化を示す。Urea-MIP [100:10]、Urea-MIP[100:1] および Urea-NIPへの尿素の吸着量は、50 分まで増加し、その後、吸着量は変化しなかった。このことから ポリエチレンイミンビーズ は、50 分で吸着量が飽和に達することが示唆された。Urea-MIP[100:10]、Urea-MIP [100:1] および Urea-NIPの尿素の最大吸着量は、それぞれ 5.10 mg/g、2.11 mg/g と 1.87 mg/g であった。Urea-MIP[100:10]の尿素の最大吸着量は、最も大きくなり、Urea-NIP の尿素の最大吸着量は、最も小さくなった。この結果から、Urea-MIP は、尿素に対する鑄型が形成され、分子インプリント方が尿素の吸着量の増加において有効であることが示唆された。

#### 3-4 選択性

Fig.3に Urea-MIP[100:10]、NIP への尿素およびチオ尿素の吸着量を示す。MIP[100:10] と NIP の尿素およびチオ尿素への最大吸着量の差から分子認識空間の有効性が示唆された。

#### 3-5 尿素吸着量に対するpHの影響

Fig.4に Urea-MIP[100:1]への尿素の吸着量と溶液 pH の関係を示す。吸着量は、pH4.00 ~ pH6.00 間で増加し、pH6.00 ~ pH8.00 間で減少した。このことから MIP[100:10]への尿素吸着は pH に依存することが示唆された。

#### 3-6 尿素吸着量に対する温度の影響

Fig.5に Urea-MIP[100:1]への尿素の吸着量と吸着温度の関係を示す 20 °C から 40°C への上昇に対して、飽和吸着量 4.42 mg/g から 5.22 mg/g に増加したことから温度依存性があると示唆された。また、Urea-MIP への尿素の吸着エンタルピー変化( $\Delta H^\circ$ )は、35.5 kJ/mol であった。Barka<sup>[3]</sup>らは、

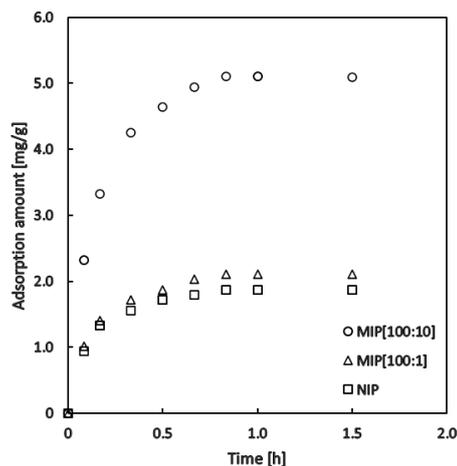


Fig.2. Changes in the amount of urea adsorbed on PEI beads with time. (Phosphate buffer:pH7.40, Ionic strength : 0.09 mol/L , Temperature : 37°C.)

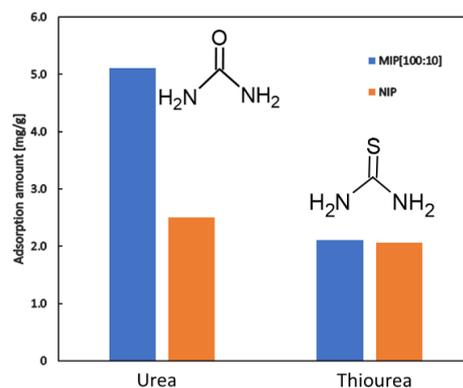


Fig.3. Selectivity of urea for MIP. (Phosphate buffer:pH7.40, Ionic strength : 0.09 mol/L , Temperature : 37°C.)

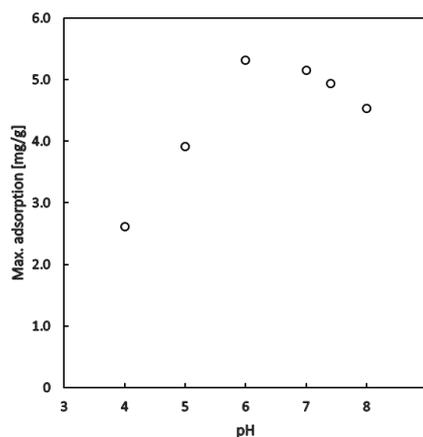


Fig.4. Relation urea adsorption and solution pH. (Phosphate buffer:pH7.40, Ionic strength : 0.09 mol/L , Temperature : 37°C.)

hydroxyapatiteへのYellow 84の吸着の温度依存性から、 $\Delta H^\circ$ 値が正の数値を示し、吸熱反応であることを報告している。Urea-MIPへの尿素の吸着の吸熱反応から、Urea-MIPと尿素の間の相互作用がより高い温度で有利に働いていることが示唆された。また、Urea-MIPへの尿素の吸着の活性化エネルギーは、10.9 kJ/mol であった。Hsiheng<sup>[4]</sup>らの報告より化学吸着の条件は、 $E_a > 4.4$  kJ/mol である。よってこの吸着は、化学吸着であることが示唆された。

### 3-7 尿素吸着量に対するビーズの添加量の影響

Fig.6にビーズの添加量と尿素吸着率の関係を、Fig.7にビーズの添加量と吸着速度の変化の関係を示す。溶液中のビーズ添加の量の増加に伴って尿素吸着率が増加することと吸着速度が一定であることからUrea-MIP[100:10]への尿素吸着は、吸着サイトの数に依存することが示唆された。

### 4. まとめ

ビーズ調製時に添加する尿素の増加に伴って尿素の吸着量が増加する点や尿素およびチオ尿素の最大吸着量の差から分子認識空間の形成が示唆された。pH依存性やUrea-MIP[100:10]への尿素吸着が高い温度で有利に働いている点からこの吸着は、化学吸着であることが示唆された。ビーズ添加量の増加に伴って吸着速度が増加した点からUrea-MIP[100:10]への尿素吸着は、吸着サイトの数に依存することが示唆された。これらのことからUrea-MIP[100:10]は、尿素の選択的回収が可能であることが示唆された。

### 参考文献

- 1) Y. Cheng, K. Xu, H. Li, Y. Li, L. Bing, *Analytical Letters*, **2014**, *47*, p1063-p1078.
- 2) X. Xu, B. Pejcic, C. Heath, C. D. Wood, *JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY A*, **2018**, *21*, 21468-21474.
- 3) N. Barka, S. Qourzal, A. Assabbane, A. Nounah, Y. A. Ichou, *Journal of Saudi Chemical Society*, **2011**, *15*, 263-267.
- 4) T. Hsiheng, H. Cien-To, *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, *38*, 292-297.

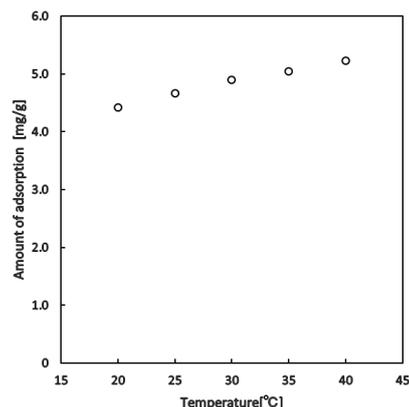


Fig.5. Relation to urea adsorption and temperature.

(Phosphate buffer:pH7.40, Ionic strength : 0.09 mol/L , Temperature : 37°C.)

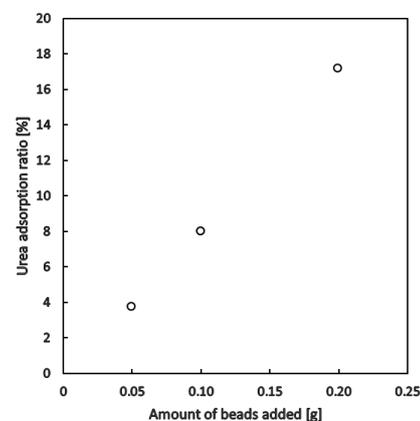


Fig.6. Relation to the amount of beads added and urea adsorption ratio.

(Phosphate buffer:pH7.40, Ionic strength : 0.09 mol/L , Temperature : 37°C.)

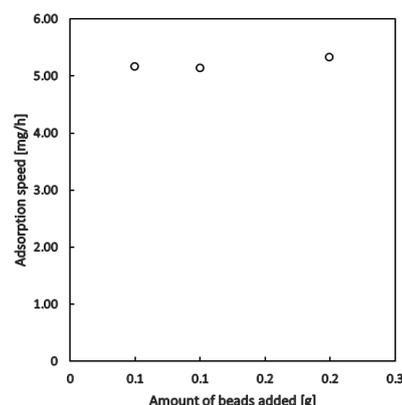


Fig.7. Relation to the amount of beads added and adsorption rate.

(Phosphate buffer:pH7.40, Ionic strength : 0.09 mol/L , Temperature : 37°C.)