

環境負荷低減材料の創製及び環境計測用バイオミメティックセンサーの開発

釘宮 章光

機能性モノマーの 1-アリル-2-チオウレアを使用することにより、リン酸イオン選択性をもつインプリントポリマーを合成し、このポリマーの結合能と選択性を評価した。このポリマーは水系でリン酸イオンに対して高い結合能と選択性を示した。また、このポリマーからのリン酸イオンの回収性を調べたところ、高濃度のリン酸イオンを回収することができた。

キーワード: 分子インプリント法、人工レセプター、リン酸イオン、選択的回収、抽出

1. 背景

河川中のリン酸イオンとアンモニウムイオン濃度の上昇はカビ臭の原因であるアオコの大量発生の原因となっている。そのうちアンモニウムイオンの除去については窒素分解菌に関する研究が盛んになされているが、リン酸イオンの除去についてはまだ開発段階であり効果的な方法がないのが現状である。その一方で、リンは有限の貴重な資源でもあり、リン酸イオンを効率的に回収する方法の確立が望まれており、このような問題については各自治体や大学等において精力的に研究、取り組みが行われている⁽¹⁾。

当研究所ではリン酸イオンに対して特異的結合能を有する人工ポリマー材料の創製及びその人工ポリマー材料を用いたリン酸イオン計測法に関する研究を行っている。人工ポリマー材料は、分子インプリント法と呼ばれる方法によりリン酸基に特異的結合性を有する分子認識ポリマーを合成した。そしてそのポリマーの結合能の評価を行った。分子インプリント法とは、目的とする分子に対して選択的結合能を有するポリマーをテーラーメイド的に、かつ比較的容易に合成する方法であり、目的とするポリマーを安価に大量合成することが可能であるというメリットがある。本研究においては、リン酸基に対して強い相互作用を示すチオウレア基を官能基にもつ機能性モノマーを用いて、リン酸インプリントポリマーを合成し、他の夾雑物質が存

在する水溶液中においてリン酸に結合性を示すポリマーの選択性をより高いものにすることを目指した。また、実際の河川水や下水処理水からリン酸イオンを回収する条件についても検討を行った。

2. 分子インプリント法

分子インプリント法とは、認識したい分子（本研究ではリン酸イオンやリン酸誘導体）を鋳型分子として用い、その鋳型分子に対して相補的な結合部位を有するポリマー材料をテーラーメイド的に得る手法である。インプリント (imprint) とは「刷り込む」と訳され、認識したい分子の型をポリマー材料の中に刷り込む、つまり石膏で認識したい分子の型を取って、その部位に目的の分子がピッタリとあてはまる、というようなイメージであると考えていただければわかりやすいと思う。

その原理は図 1（次頁）に示すように、
(a) 認識対象分子（鋳型分子）と、その分子と相互作用可能な官能基を持つモノマー（これを「機能性モノマー」と呼ぶ）を溶媒中で混合する。すると認識対象分子と機能性モノマーとの官能基同士の相互作用（水素結合や静電的相互作用など）により分子の自己集合が生じる。本研究においてはジフェニルリン酸(1)とアリルチオウレア(2)をアセトニトリル中で混合して相互作用させた。

(b) 次に、1分子内に2つのビニル基を持つ架橋のためのモノマー（架橋剤）を加えて認識対象分子ごと重合させる。本研究では架橋剤としてエチレングリコールジメタクリレートを添加して加熱により重合を行った。

(c) 認識対象分子を溶媒で洗浄してポリマーから除去することにより鑄型分子の形と化学的性質を保持した分子認識ポリマーが得られるというものである。つまり、本研究においてはリン酸イオンが結合するのに適した結合部位を有するポリマーが得られ、これがリン酸結合性人工レセプター型ポリマー（以下、ポリマー）である。

(d) これにリン酸イオンを加えるとポリマーと相互作用して結合する。再びポリマーを洗浄することで(c)、ポリマーは再度、リン酸イオンと結合可能となる(d)。

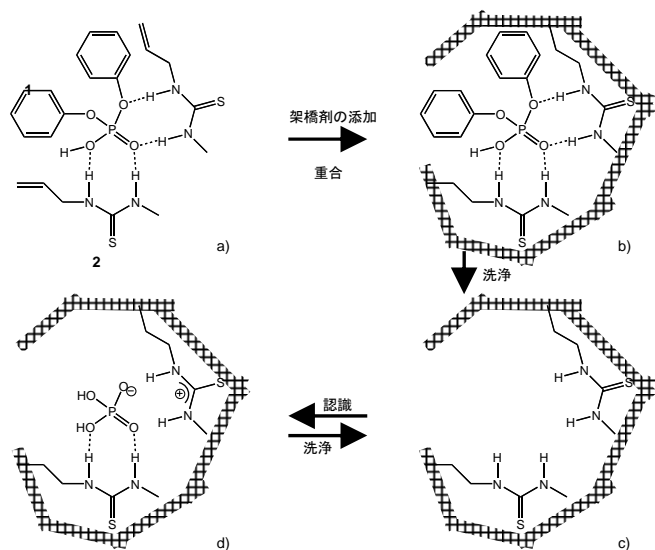


図1 分子インプリント法によるリン酸結合性人工レセプター型ポリマー合成の原理

このようにして得られたポリマーは、鑄型に用いた認識対象分子の形状と化学的性質、官能基の位置を記憶しており、分子インプリント法を用いると原理的には目的の分子に対して選択的結合性を示す人工レセプター型ポリマーが複雑な合成ステップを必要とせず比較的容易に、かつ、テーラーメイド的に安価に大量合成できるというメリットがある。

3. 実験方法と結果

チオウレア基は、水系においてリン酸基に対して相互作用を示すことが知られている。そこで本研究ではこの相互作用を利用するため機能性モノマーに1-アリル-2-チオウレアを用いてリン酸インプリントポリマーを合成した。

3.1 インプリントポリマーの調製

チオウレア基を有する機能性モノマーの1-アリル-2-チオウレア **1** (4.0 mmol) と鑄型分子のフェニルホスホン酸 **2** (またはジフェニルリン酸) (1.0 mmol)、架橋剤のエチレングリコールジメタクリレート (20 mmol) を 40.0 mL のアセトニトリルに溶解し (図1-a)、重合開始剤を加えて 50 °C で 16 時間重合させた (b)。得られた塊状のポリマーを粉砕して粒径を 80 μm にそろえた。鑄型分子を除去するため、メタノール/トリエチルアミン溶液で洗浄、続けてメタノールで洗浄後、乾燥させた (c)。塊状のポリマーは 97 % の収率で得られた。それを粉砕機で粉砕し、粒径が 80 μm 程度のものを篩いわけ、60 % のポリマー粒子を得た。

3.2 リン酸イオンの結合性評価

合成したポリマーについて、リン酸イオンを含む溶液 (25 μM , pH 7.2) と相互作用させることによるリン酸イオンのポリマーへの結合能を評価した。40 mg のポリマー粒子と各溶液 2.0 mL をマイクロチューブに加えて 1 時間攪拌した。そして結合量の評価は、ポリマーと相互作用させる前後のサンプル溶液を HPLC 装置に電気伝導度検出器 (島津製作所) を接続して、各イオンの濃度を計測することで行った。

その結果、リン酸誘導体をインプリントしたポリマーは水系において 90 % のリン酸を回収可能であった。一方、リン酸誘導体をインプリントしていないブランクのポリマーはほとんど結合性を示さなかった。得られたインプリントポリマーの理論結合部位は 20 nmol/mg、スキャッチャードプロットより解離定数 K_D は 10.3 μM と求められた。

3.3 夾雑物質存在下でのポリマーの選択性評価

合成したポリマーについて、それぞれ 50 μM のリン

酸二水素ナトリウム、フッ化ナトリウム、塩化ナトリウム、臭化ナトリウム、硝酸ナトリウム、亜硝酸ナトリウムの6種類のアニオンを含む溶液 (pH 7.1) と相互作用させて選択性の評価を行った (表1)。その結果、インプリントポリマーはリン酸イオンに対して83%の結合性を示したのに対し、他のアニオンに対しては18~38%程度とアフィニティーは低かった。また、リン酸をインプリントしていないブランクのポリマーについてはどのアニオンにもアフィニティーは低いという結果が出た。これはリン酸誘導体を鋳型分子に用いてインプリントポリマーを合成したことで、リン酸イオンがポリマーに結合するのに適した位置と角度を保って機能性モノマー由来の官能基であるチオウレア基が配置されたためであると考えられる。

表1 リン酸結合性ポリマーの選択性の評価

アニオン混合溶液 (pH 7.5、20 μM リン酸二水素ナトリウム、フッ化ナトリウム、塩化ナトリウム、臭化ナトリウム、亜硝酸ナトリウム、硝酸ナトリウムの混合溶液)

	リン酸インプリントポリマーの結合量[%]					
	H ₂ PO ₄ ⁻	F ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
P _{AT} (DP)	83	18	18	35	32	38
P _{AT} (none)	10	0	4	11	21	20

3.4 リン酸イオンの回収試験

得られたリン酸結合性人工レセプター型ポリマーの粒

子 (10 g) をカラム (300 mm×20 mm i.d.) に充填し、固相抽出の要領で分析物の溶液を流し込み、溶出物をイオンクロマトグラフィーにより分析することで結合能の評価を行った。つまり、20 μM リン酸水溶液 (pH 7.5) を1リットルずつ合計20リットルまで加えていき、リン酸イオンのポリマーへの結合量を評価した。その結果、15回、つまり15リットルのサンプル溶液の注入まではほぼ100%のリン酸イオンがポリマーに保持され、その後は保持能力が低下したものの20リットルのサンプル溶液の注入まで80%以上のリン酸イオンがポリマーに保持された (図2)。

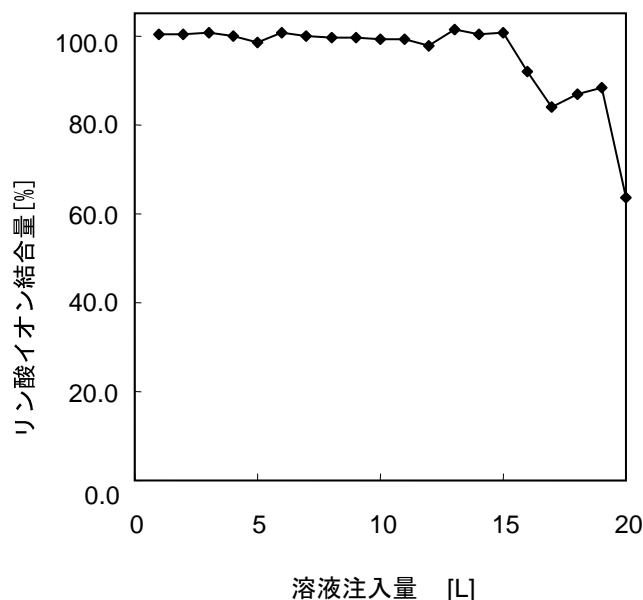


図2 リン酸結合性ポリマーのリン酸イオンへの結合試験結果

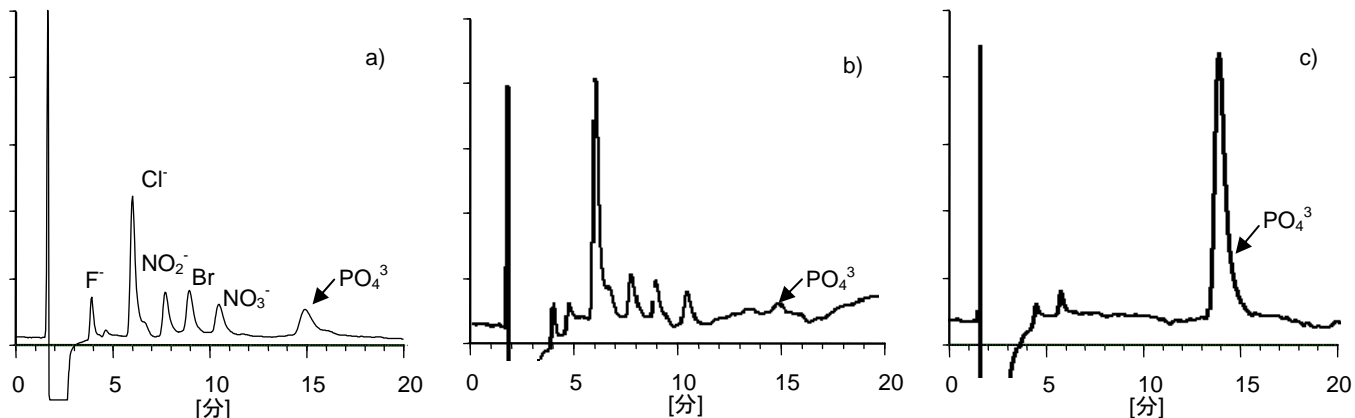


図3 リン酸結合性ポリマーにおけるアニオン混合溶液との相互作用前後のクロマトグラム

(a) リン酸結合性ポリマーと相互作用前の6種類のアニオン混合溶液のクロマトグラム

(b) 相互作用後のクロマトグラム、(c) リン酸結合性ポリマーから濃縮されて回収した溶液のクロマトグラム

さらに、そのポリマーを 50 mL のメタノールでソックスレー抽出法により洗浄し、濃縮して得られたリン酸イオン濃度の評価を行った。すると図 3 (c) (前頁) に示すように純度の高いリン酸イオンが抽出され、その濃度は 6.0 mM であり、注入した溶液が各 20 μ M リン酸水溶液であることから、約 300 倍に濃縮されたリン酸水溶液が得られたことになる。

4. まとめ

本研究では、河川水などから選択的にリン酸イオンを捉える人工分子認識材料を創製することを目的としており、今後は水系においてリン酸イオンに対してより選択的で、夾雑物質の影響を受けない高い結合能をもつポリマーの創製を目指す。さらに現在は、ISFET (イオン感応性電界効果型トランジスタ) 電極という pH 変化を検出する電極を用い、その上にリン酸結合性インプリントポリマーを薄膜状にコートし、ポリマーがリン酸イオンと特異的結合をすることによる局所的な pH 変化を検出するというシステムを検討している⁽⁴⁾。現在のところ河川やダム水中のリン酸イオンの計測は、深水を採取してモリブデンブルー吸光度法で人的に計測が行われているため、自動的にかつ長期にわたってリン酸イオン濃度をモニタリングする方法が望まれているが、リン酸に特異性を有する酵素を用いるバイオセンサーでは酵素の安定性に問題があり、長期間の使用には不向きである。よって安価にかつ大量供給可能で、安定性にも優れ、取り扱いも容易なリン酸イオンに特異的結合性を示すポリマーのセンサーの開発が求められている。下水処理場においても高度

下水処理システムの構築を目的としてリン酸イオンの計測や回収も検討されており、本研究が実現することで将来的に下水処理場や河川などにおいて長期わたるリン酸イオンのモニタリング及び選択的回収が可能になると考えられる。

謝辞

本研究の一部は、(独) 科学技術振興機構研究成果活用プラザ広島「実用化可能性試験」、(独) 科学技術振興機構「シーズ発掘試験」、及び(財) 中国電力技術研究財団「国際交流活動(海外渡航) 助成金」の各補助を受けて行った。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

参考文献

- (1) 釘宮章光、*再生と利用*、Vol. 30, No. 117 (2007)、社団法人日本下水道協会
- (2) Akimitsu Kugimiya, Hideo Takei, "Selectivity and recovery performance of phosphate-selective molecularly imprinted polymer", *Analytica Chimica Acta*, 606, 252-256 (2008).
- (3) Akimitsu Kugimiya, Hideo Takei, "Selective Recovery of Phosphate from River Water Using Molecularly Imprinted Polymers", *Analytical Letters*, 41, 302-311 (2008).
- (4) Akimitsu Kugimiya, Fumie Babe, "Phosphate ion sensing using biomimetic artificial polymer receptor", Submitted.