

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25502003

研究課題名(和文) 環境水中の有毒化学物質の計測のための分子鑄型の開発と応用

研究課題名(英文) Preparation of molecularly imprinted polymers for harmful chemical substances and application to their measurements in the environmental water

研究代表者

中村 有加里 (NAKAMURA, Yukari)

武庫川女子大学・薬学部・助教

研究者番号：20581424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：まず、分子認識能を有する還元型グルタチオンに対する MIP の調製に成功した。次に、ワルファリン(WF) およびその塩素置換体であるクマクロール(CC) に対する MIP (MIPWF および MIPCC) を調製したところ、MIPCC は MIPWF よりも WF を選択的に認識した。さらに、安息香酸(BA) およびその塩素置換体に対する MIP について検討したところ、3- および 4-Cl BA、3,4- および 3,5-diCl BA に対する MIP は、BA に対する MIP よりも BA を選択的に認識したことから、テンプレート分子の置換基の数および位置が分子認識能に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：First, a molecularly imprinted polymer (MIP) for a glutathione reduced form was successfully prepared by precipitation polymerization. Next, MIPs for warfarin (WF) and its chloro-substituted compound, coumachlor (CC), were prepared by multi-step swelling and polymerization. They were termed MIPWF and MIPCC, respectively. MIPCC could selectively recognize WF than MIPWF. Furthermore, MIPs for benzoic acid (BA) and its mono-, di-, tri-chloro derivatives were prepared by multi-step swelling and polymerization. MIPs for 3- and 4-chloro BAs, and 3,4- and 3,5-dichloro BAs could selectively recognize BA than the MIP for BA. These results suggest that the position and the number of substituent(s) for a template molecules could play an important role in the molecular recognition properties.

研究分野：化合物に対する分子インプリントポリマーの調製とその応用

キーワード：分子インプリントポリマー 沈殿重合法 多段階膨潤重合法 分子認識 液体クロマトグラフィー グルタチオン ワルファリン 安息香酸

### 1. 研究開始当初の背景

分子インプリント法は、鋳型分子の存在下、それと相補的に相互作用するモノマーを重合させることにより、テンプレート分子に対する特異的認識部位を得る方法である。分子インプリント法により得られた分子鋳型ポリマー (molecularly imprinted polymer、MIP) は、人工レセプターあるいは人工抗体とも呼ばれ、目的物質の特異的認識に利用されている。しかし、従来の MIP は塊状重合法により調製されるため、1) 重合後、粉碎・分級する必要がある、2) 得られたポリマーのサイズおよび形状が不均一である、3) 非水系での認識能は優れているが、水系での認識能は劣る、などの欠点を有していた。 ) 球状で、粒子径の均一な MIP、 ) 水系で優れた認識能を持つ MIP の調製法を開発することは、高性能、高機能な MIP を得るために有用である。そこで、我々は多段階膨潤重合法 (Uniformly sized molecularly imprinted polymer for (S)-nilvadipine. Comparison of chiral recognition ability with HPLC chiral stationary phases based on a protein. Qiang Fu, Haruyo Sanbe, Chino Kagawa, Ko-Ki Kunitomo, Jun Haginaka. Anal. Chem., 75, 191-198 (2003). ) により粒子径単分散の MIP を調製する方法を開発した。しかしながら、多段階膨潤重合法では、比較的疎水性の化合物に対する MIP の調製が可能であったが、親水性の化合物に対する MIP の調製が難しかった。そこで、親水性の化合物に対しては沈殿重合法 (Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization. Haruyo Sanbe, Kaori Hoshina, Ruin Moaddel, Irving W. Wainer, Jun Haginaka. J. Chromatogr. A., 1134, 88-94 (2006). ) により、粒子径単分散の MIP の調製を行ってきた。

MIP は、レセプターあるいは抗体のように、交差反応性および群特異性をもっている。申請者らにより調製された MIP は、水系での分子認識能に優れていることおよび高い群特異性を示すことが確認された。そこで、1) 水系で優れた分子認識能および高い群特異性を発現する、MIP の調製法である多段階膨潤重合法あるいは沈殿重合法を用いて、MIP の調製を行う、2) さらに、得られた MIP の群特異性を利用して、環境水中の有毒化学物質の選択的濃縮分析システムに適用可能な MIP を開発するという本研究の着想を得た。

### 2. 研究の目的

本研究では、まず、塩化ビニル製品やプラスチック製品の可塑剤として広く用いられているが、日本では一部使用が規制されており、環境水中への溶出が懸念されているフタル酸エステル類の一種である、フタル酸イソノニルに対する MIP の調製を試みた。沈殿

重合法および多段階膨潤重合法を用いて、重合条件 (機能性モノマー、架橋剤、希釈剤、重合時間・温度など) を検討した。しかしながら、分子認識能を有する MIP を調製することが出来なかったため、以下の(1)-(3)の MIP を調製し、検討することとした。(1) 親水性化合物である還元型グルタチオンに対する MIP を調製し、評価する。(2) 近年、医薬品による環境水汚染が問題となっているため、抗凝固薬として頻用されているワルファリンおよびその塩素置換体であるクマクロールに対する MIP を調製し、評価する。(3)(2) で得られた結果より、テンプレート分子となる化合物の置換基が分子認識能に影響を与える可能性が推察された。そこで、テンプレート分子に対してより特異的な分子認識能を有する MIP の調製法を開発するために、安息香酸およびその塩素置換体に対する MIP を調製して、置換基が分子認識能に与える効果について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 還元型グルタチオンに対する MIP の調製と評価

MIP の調製には沈殿重合法を用いた。テンプレート分子に少量の水に溶解した還元型グルタチオン (0.75-1.5 mmol) 機能性モノマーにメタクリル酸 (1.5-6 mmol) 架橋剤にジビニルベンゼン (28.8 mmol) 重合開始剤に 2,2'-アゾビス (イソブチロニトリル) (1.9 mmol) 希釈剤にアセトニトリルとトルエンの混液 (3:1) を用いて、60 °C で 16 時間重合した。また、比較のためにテンプレート分子を用いないで同一条件下で重合したノンインプリントポリマー (NIP) も調製した。調製した MIP および NIP をステンレス製カラム (50 mm × 2.0 mm i.d.) に充填し、移動相に水/アセトニトリル混液を用いて還元型グルタチオンに対する保持能および分子認識能を順相モードで HPLC (column temperature, 25 °C; flow rate, 0.2 mL/min; detection, 210 nm; loaded amount, 250 μg) により評価した。なお、MIP の分子認識能の評価には、保持係数 (k) の比で定義したインプリント係数 ( $IF = k_{MIP}/k_{NIP}$ ) を用いた。また、MIP および NIP 10 mg に 0.5 - 1.5 mmol/L に調製した還元型グルタチオンのリン酸塩緩衝液 (pH 5.0) /アセトニトリル (30/70) 溶液 1 mL を加え、4 時間振とう混和後、ろ過したものをサンプルとして、還元型グルタチオンの吸着量を Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS-II カラム (150 mm × 4.6 mm i.d., ナカライテスク) で 0.05% TFA/水混液を用いて HPLC (column temperature, 25 °C; flow rate, 1.0 mL/min; detection, 210 nm) により評価した。

#### (2) ワルファリンおよびクマクロールに対する MIP の調製と評価

MIP の調製には多段階膨潤重合法を用いた。種粒子にポリスチレン粒子 (粒子径、約

1  $\mu\text{m}$  )、テンプレート分子にワルファリン (4-6 mmol) またはクマクロール (6 mmol) 機能性モノマーに 4-ビニルピリジン (3-18 mmol) 架橋剤にエチレングリコールジメタクリレート (25 mmol) 重合開始剤に 2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル) (1.5 mmol) 希釈剤にトルエンを用いて、50  $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間重合した。また、比較のために同一条件下で重合した NIP も調製した。得られた MIP および NIP をステンレス製カラム (50 mm  $\times$  4.6 mm i.d.) に充填し、ワルファリンとその構造類似化合物 (クマクロール、クマリン) に対する保持能および分子認識能を逆相モードで HPLC (column temperature, 25  $^{\circ}\text{C}$ ; flow rate, 0.2 mL/min; detection, 210 nm; loaded amount, 250  $\mu\text{g}$ ) により評価した。

(3) 安息香酸およびその置換体に対する MIP の調製と評価

MIP の調製には多段階膨潤重合法を用いた。種粒子にポリスチレン粒子 (粒子径、約 1  $\mu\text{m}$  )、テンプレート分子に安息香酸およびその置換体 (2-, 3- および 4-クロロ安息香酸、2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- および 3,5-ジクロロ安息香酸、2,4,6-トリクロロ安息香酸) (6 mmol) 機能性モノマーに 4-ビニルピリジン (18 mmol) 架橋剤にエチレングリコールジメタクリレート (25 mmol) 重合開始剤に 2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル) (1.5 mmol) 希釈剤にトルエンを用いて、50  $^{\circ}\text{C}$  で 24 時間重合した。また、比較のために同一条件下で重合した NIP も調製した。得られた MIP および NIP をステンレス製カラム (50 mm  $\times$  4.6 mm i.d.) に充填し、安息香酸およびその置換体に対する保持能および分子認識能を移動相にリン酸ナトリウム塩緩衝液/アセトニトリル混液を用いて 逆相モードで HPLC (column temperature, 30  $^{\circ}\text{C}$ ; flow rate, 0.5 mL/min; detection, 230 nm; loaded amount, 500  $\mu\text{g}$ ) により評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 還元型グルタチオンに対する MIP の評価

調製した MIP および NIP は、走査型電子顕微鏡画像より、粒子径約 4  $\mu\text{m}$  の単分散なポリマーであった。還元型グルタチオンは、逆相モードでは MIP および NIP に全く保持されなかったため、順相モードでの評価を試みた。テンプレート分子に還元型グルタチオンを 1.5 mmol、機能性モノマーにメタクリル酸を 6 mmol 用いて調製した MIP で還元型グルタチオンの保持は最大であり、優れた分子認識能を有することが明らかとなった ( $IF=19.1$ )。MIP の還元型グルタチオンの保持に対するアセトニトリル含量の影響を、アセトニトリル含量 91-95% で検討したところ、アセトニトリル含量を増加させると還元型グルタチオンの保持は増加した。

このことから、MIP の還元型グルタチオンの保持および分子認識には、形状認識に加えて、親水性相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、得られた MIP は酸化型グルタチオンに対して分子認識能はみられず、還元型グルタチオンを選択的に認識できることがわかった。また、MIP および NIP に対する還元型グルタチオンの吸着量をスキッチャード解析したところ、解離定数はそれぞれ  $1.8 \times 10^{-6}$  および  $3.7 \times 10^{-6}$  mol/L、最大結合量はそれぞれ  $2.1 \times 10^{-4}$  および  $1.9 \times 10^{-4}$  mol/g であり、MIP は NIP よりも還元型グルタチオンに対して高い結合能を示した。

(2) ワルファリンおよびクマクロールに対する MIP の評価

調製したワルファリンおよびクマクロールに対する MIP (MIP<sub>WF</sub>、MIP<sub>CC</sub>) および NIP は、粒子径約 6  $\mu\text{m}$  の均一なポリマーであった。MIP<sub>WF</sub> では、テンプレート分子にワルファリンを 6 mmol、機能性モノマーに 4-ビニルピリジンを 18 mmol 用いて調製したものがワルファリンに対する保持およびインプリント係数が最大となった。MIP<sub>WF</sub> のワルファリン ( $pK_a = 6.33$ ) の保持に対する移動相 pH の影響を pH 2.4 - 10.1 で検討したところ、ワルファリンは、pH 5.9 - 6.8 で最大の保持を示した。一方、移動相中のアセトニトリル含量を 40 - 80% で変化させたところ、アセトニトリル含量の減少とともにワルファリンの保持は増加した。さらに、調製した MIP<sub>WF</sub> は、クマリンに比し、ワルファリンとクマクロールを選択的に認識できることがわかった。これらの結果から、多段階膨潤重合法により、ワルファリンに対する MIP の調製が可能であり、調製した MIP<sub>WF</sub> におけるワルファリンの保持および分子認識には、形状認識に加えて、水素結合、イオン交換および疎水性相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、MIP<sub>CC</sub> はワルファリン ( $IF = 4.6$ ) とクマクロール ( $IF = 6.7$ ) を選択的に認識することができ、MIP<sub>WF</sub> のワルファリン ( $IF = 1.6$ ) とクマクロール ( $IF = 1.6$ ) に対するインプリント係数よりも高いインプリント係数を示した。このことから、テンプレート分子の置換基が分子インプリント効果に影響を与える可能性が示唆されたため、次に、テンプレート分子に安息香酸を用いて、クロロ基が分子インプリント効果に与える影響について検討することとした。

(3) 調製した安息香酸およびその塩素置換体に対する MIP および NIP は、粒子径約 6  $\mu\text{m}$  の均一なポリマーであった。安息香酸をテンプレート分子として調製した MIP は、安息香酸に対して分子認識能 ( $IF = 1.2$ ) を示した。また、3- および 4-クロロ安息香酸、3,4- および 3,5-ジクロロ安息香酸をテンプレート分子として調製した MIP では、安息香酸をテンプレート分子とした MIP に

比して、安息香酸に対して高いインプリント係数を与え ( $IF$  は、それぞれ 1.4、1.4、1.5、1.5)、3,5-ジクロロ安息香酸をテンプレート分子として調製した MIP で、最も高いインプリント係数を与えた。一方、2-クロロ安息香酸、2,4-, 2,5- および 2,6-ジクロロ安息香酸、2,4,6-トリクロロ安息香酸をテンプレート分子として調製した MIP では、安息香酸に対する分子認識能はみられないか、わずかであった ( $IF$  は、それぞれ 1.0、0.9、1.0、0.8、0.9)。これらの結果より、テンプレート分子の置換基の位置および数が、テンプレート分子の電子状態に影響し、異なる分子認識能を与えたことが示唆された。今後、クロロ基以外の他の置換基が、MIP の分子認識能に与える影響についても検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yukari Nakamura, Hisami Matsunaga, Jun Haginaka, Preparation of molecularly imprinted polymers for strychnine by precipitation polymerization method and multi-step swelling and polymerization method, and its application for the selective extraction of strychnine from *Nuxvomica* extract powder, *Journal of Separation Science*, 査読有, 39(8), 2016, pp.1542-1550  
DOI:10.1002/jssc.201600027

〔学会発表〕(計 10 件)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、安息香酸およびその置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価：置換基が分子認識能に与える影響、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、安息香酸およびその塩素置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価、日本分析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 9 日、九州大学伊都キャンパス (福岡県福岡市)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、ワルファリンに対する分子インプリントポリマーの調製と評価、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日、神戸サンボーホール (兵庫県神戸市)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、多段階重合法によるワルファリンに対する分子インプリントポリマーの調製と評価、第 25 回クロマトグラフィー科学会議、2014 年 12 月 12 日、京都大学桂キャンパス (京都府京都市)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、還元型グルタチオンに対する分子インプリントポリマーの調製と応用、日本分析化学会第 63 年会、2014 年 9 月 19 日、広島大学東広島キャンパス (広島県東広島市)

中村 有加里、松永 久美、萩中 淳、沈殿重合法による還元型グルタチオンに対する分子インプリントポリマーの調製と評価、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本市総合体育館 (熊本県熊本市)

中村 有加里、三浦 ちとせ、松永 久美、萩中 淳、ストリキニーネに対する分子インプリントポリマーの調製：沈殿重合法と多段階膨潤重合法の比較、第 24 回クロマトグラフィー科学会議、2013 年 11 月 12 日、東京大学本郷キャンパス (東京都文京区)

中村 有加里、三浦 ちとせ、松永 久美、萩中 淳、ストリキニーネに対する分子インプリントポリマーの調製とその応用、日本分析化学会第 62 年会、2013 年 9 月 12 日、近畿大学東大阪キャンパス (大阪府東大阪市)

〔その他〕

ホームページ

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/research/labo/chemistry/03.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 有加里 (NAKAMURA, Yukari)  
武庫川女子大学・薬学部・助教  
研究者番号：20581424

(2) 研究分担者

萩中 淳 (HAGINAKA, Jun)  
武庫川女子大学・薬学部・教授  
研究者番号：20164759