— 論 文 —

(日本化学会誌, 1985, (2), p.189~192)

© 1985 The Chemical Society of Japan

ウリカーゼ固定化リアクターとペルオキシダーゼ電極を用いた尿酸のフローインジェクション分析

(1984年9月10日受理)

八尾俊男*・佐藤実・和佐保

固定化酵素を利用した血清および尿中の尿酸のフローインジェクション分析法について検討した。本法はウリカーゼ固定化リアクターにより、尿酸を過酸化水素に変換し、ペルオキシダーゼ電極で最終的にヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸イオンとして電気化学的に電流測定する方法によるので、測定が低電位 ($-50\text{ mV vs. Ag/AgCl}$) で行なえる利点がある。 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 以上のアスコルビン酸と $0.3\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 以上のシステインが負の誤差を与えた以外、血清や尿中の被酸化性物質は電気化学的に妨害しなかった。ピーク幅は約 30 秒で、毎時 90~120 試料の定量速度で、血清や尿試料を連続定量できた。測定の再現性は相対標準偏差で 1~2% であった。本定量法とウリカーゼ紫外外部吸収法による尿中尿酸の定量値を比較したところ、相関係数が 0.995 とよく一致した。

1 緒 言

血中および尿中尿酸の定量は、高尿酸血症の診断において臨床分析的に重要である。尿酸の定量法は重量法または滴定法、還元法、酵素法の3種に大別されるが¹⁾、最近ではウリカーゼを用いた酵素法がしだいに普及してきている。また臨床分析では、多くの検体を短時間で計測することが望まれているため、フローインジェクション分析法などの連続流れ方式のものが有利である。しかし、この方法で溶液状態の酵素を使用する場合には、多量の酵素を消費することになるので、なんらかの方法で固定化し²⁾、再使用可能にすることが分析コストの面から重要になる。

本研究では、式(1)にしたがう反応を触媒する酵素、ウリカーゼを固定化したリアクターを用いて、尿酸を連続定量する方法について検討した。酵素反応により生成した過酸化水素の検出方法は多くの場合、ペルオキシダーゼ共存下での被酸化性試薬との反応を利用した分光法³⁾によっている。しかし、できるだけ単純な系に導くことが望ましいと考え、生成した過酸化水素を電気化学的に検出する方法について検討した。しかし、過酸化水素の検出加電圧 (0.6 V vs. Ag/AgCl) はかなり高いので、尿酸自体が酸化されるのみならず、血清や尿中の他の被酸化性物質 (アスコルビン酸など) による妨害があった⁴⁾。そこで、ペルオキシダーゼ-アルブミン橋かけ膜からなる化学修飾酵素膜電極⁵⁾を検出器として用いることにより、式(2)にしたがって最終的にヘキサシアノ

鉄(Ⅲ)酸イオンとして電気化学的にモニターすることにした。ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸イオンの検出は低電位 ($-50\text{ mV vs. Ag/AgCl}$) で行なえるので、共存物質による電気化学的な妨害が少ない利点があった。

2 実 験

2.1 試 薬

ウリカーゼ (EC. 1.7.3.3., 1.4 Umg^{-1}) はオリエンタル酵母社製を、ペルオキシダーゼ (EC. 1.11.1.7., Grade II, 100 Umg^{-1}) はベーリンガー・マンハイム山之内社製のものをを使用した。ウシ血清アルブミン (96~99%), グルタルアルデヒド (20% 溶液), (3-アミノプロピル)トリエトキシシランはそれぞれ Sigma 社製、和光純薬製、Aldrich 社製のものをを使用した。尿酸標準液は尿酸 (和光純薬, 特級品) 200 mg と炭酸リチウム 60 mg を蒸留水 100 ml に加温溶解して作製した。標準血清には ORTHO 正常管理血清を用いた。その他の試薬はすべて市販の特級品をそのまま使用した。

2.2 ウリカーゼ固定化リアクターの作製

シリカゲルの表面処理とウリカーゼの固定化は、以下のようにして行なった。

シリカゲル (Wakogel C-200) を $6\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 塩酸中で数時間煮沸後、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 臭化シアン溶液 (pH 11 に調整) 中で1時間かきまぜ、ついで 10% エチレンジアミン水溶液中で1時間反応させることにより、シリカゲル表面にスパーサー部としてアミノ基を修飾した。つぎに、5% グルタルアルデヒド水溶液中で30分間室温で反応させ、スパーサー部末端にホルミル基を導入し

大阪府立大学工学部応用化学教室, 591 堺市百舌鳥梅町

- 1) 日本分析化学会編, “臨床化学分析Ⅱ”, 第2版, 東京化学同人 (1979) p.88.
- 2) A. Iob, H. A. Mottola, *Anal. Chem.*, **52**, 2332(1980).
- 3) M. Takayama, S. Itoh, T. Nagasaki, I. Tanimizu, *Clin. Chim. Acta*, **79**, 93(1977).
- 4) 八尾俊男, 小林義昭, 分析化学, **32**, 253(1983).
- 5) T. Yao, *Anal. Chim. Acta*, **148**, 27(1983).

た。これを内径 4 mm のガラス管に長さ 5 mm 充填し、ウリカーゼ 4 mg を $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 5 ml に溶解した酵素溶液を、2~3 時間循環することにより、ウリカーゼ固定化リアクターを作製した。作製したリアクターの酵素活性は 0.11 U であった。

2.3 ペルオキシダーゼ電極の作製

既報⁵⁾の方法でアミノシリル化した白金板 ($10 \times 20 \times 0.1 \text{ mm}$) 上で、10 wt% ウシ血清アルブミン $2 \mu\text{l}$, 4 wt% ペルオキシダーゼ溶液 (pH 7.0, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ リン酸緩衝液) $4 \mu\text{l}$ (16 U) と 2 vol% グルタルアルデヒド溶液 $2 \mu\text{l}$ を均一に混合し、室温で数時間放置して、酵素膜を橋かけ形成させた。この場合、白金板表面に導入されたアミノ基は酵素橋かけ膜中のホルミル基とアゾメチン結合を形成し、酵素膜と白金板との密着性が高まると考えられる。実際、白金板をアミノシリル化することにより、酵素膜のはく離はほとんどの場合に観察されなくなった。

作製した酵素膜修飾白金板を柳本製作所製マイクロフローセルにはめこみ、フロー型の酵素電極として用いた。

2.4 装置および操作法

本研究で用いたフローシステムの概略を図 1 に示す。破線で囲んだ部分は柳本製作所製 L-2000 高速液体クロマトグラフであり、試料はマイクロシリンジで試料インジェクターから系内に注入した。キャリアー溶液として、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ヘキサシアノ鉄(II)酸カリウムと $0.2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 塩化ナトリウムを含むホウ酸緩衝液 (pH 9.0, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) を用い、一定流量 ($1.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) で送液した。ウリカーゼ固定化リアクターで生成した過酸化水素を、ポテンシostat (柳本製作所製 VMD-101) で一定電圧 (-50 mV vs. Ag/AgCl) を与えたフロー型酵素電極でヘキサシアノ鉄(III)酸イオンに変換し、その還元電流をピーク電流として記録した。

3 結果と考察

3.1 キャリヤー溶液の pH と組成

ウリカーゼリアクターと酵素電極の酵素活性は溶液の pH に依存するので、キャリアー溶液の pH と応答電流との関係について検討し、結果を図 2 に示す。尿酸に対する応答電流は pH 9.0 で最大の、ベル型の pH 依存性を示した。一方、ペルオキシダーゼ電極の過酸化水素に対する応答電流は、pH が高くなると減少したが、2.5~10.5 の広い pH 範囲で活性を保持した。

またウリカーゼはホウ酸緩衝液中で活性化されることが知られているので⁶⁾、キャリアー溶液として用いた緩衝液の種類を変えて、同じ pH 9.0 で検討した。その結果、ホウ酸緩衝液をキャリアーとして用いた場合の酵素活性は、ピロリン酸緩衝液と Tris-HCl 緩衝液の場合のそれぞれ 1.3 倍と 1.4 倍であった。

またペルオキシダーゼ電極で過酸化水素を検出するには、反応基質としてのヘキサシアノ鉄(II)酸塩をキャリアー溶液に加える必要がある。そこで、キャリアー溶液中のヘキサシアノ鉄(II)酸塩の濃度と応答電流との関係を検討した結果、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ までは濃度の増加とともに応答電流が増加したが、それ以上の濃度ではほぼ一定になった。

以上の検討の結果、キャリアー溶液として、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ヘ

Fig. 1 Block diagram of flow injection system

---: Yanagimoto L-2000 high-performance Liquid chromatograph; A: Vessel for carrier solution, B: Pump, C: Damper, D: Sample injector, E: Immobilized uricase-reactor, F: Peroxidase electrode, G: Potentiostat, H: Recorder

Fig. 2 Effect of pH on the peak current

Injected sample ($5 \mu\text{l}$):

○; Uric acid ($20 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$), ●; H_2O_2 ($91 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

Carrier solution: Borate buffers ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) containing $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and $0.2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl

キサシアノ鉄(II)酸塩と電解質としての $0.2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 塩化ナトリウムを含む pH 9.0 のホウ酸緩衝液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) が最適であった。

3.2 キャリヤー流量と検出加電圧

キャリアー溶液の流量はピーク幅とピーク電流に関係し、低流量で感度は高くなったが、拡散によるピークの広がりが大きくなった (図 3)。そこで、検出感度と定量速度とを考慮に入れ、流量を $1.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ とした。この流量におけるピーク幅は 26 秒で、1 時間あたり 90~120 回の連続定量が可能であった。

本定量システムでは、最終的にヘキサシアノ鉄(III)酸塩の還元電流を測定することになるので、酵素電極への加電圧はヘキサシアノ鉄(III)酸塩の電流-電圧曲線のプラトー部であることが望ましい。そこでプラトー部電圧であり、かつベースライン電流がもっとも低い -50 mV (vs. Ag/AgCl) を検出加電圧とした。

3.3 検量線

図 4 に尿酸に対する検量線を示す。直線範囲は比較的狭く、ま

6) K. Arima, K. Nose, *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 54 (1968).

Fig. 3 Effect of flow rate on peak current (○) and time to return to base line (t_{rb} , ●)
Injected sample: $10 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ uric acid ($5 \mu\text{l}$)

Fig. 4 Calibration curves for uric acid
Sample size: ○; $5 \mu\text{l}$, ●; $2 \mu\text{l}$

た試料径によっても異なった。 $2 \mu\text{l}$ の試料径で、 $0.2 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ の濃度範囲で式 (3) にしたがう直線関係があった。

$$I(\text{nA}) = 7.07 C(\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}) - 0.807, \quad r = 0.9997 \quad (3)$$

人血清中の尿酸濃度は通常 $2.5 \sim 7 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ であるので、希釈などの前処理なしに、血清をそのまま用いて定量できる。しかし、尿中の尿酸濃度は血清中のそれよりも 10 数倍以上であるので、尿を 20 倍程度に希釈する必要がある。検出下限は $S/N=2$ のとき、 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ であった。

3.4 選択性と妨害物質

尿酸に対する応答の選択性を調べるため、尿酸の類似化合物である核酸塩基類 (アデニン, グアニン, キサンチン, ヒポキサンチン, プリン, チミン, シトシン, ウラシル) とそれらのヌクレオシドに対する応答について検討した。これらの尿酸類似化合物はまったく応答を示さず、ウリカーゼリアクターは尿酸にはほぼ特異的に作用することがわかった。

一方、過酸化水素電流検出法で電気化学的な妨害を与えた⁴⁾ 血清および尿中のアスコルビン酸、システイン、グルタチオン、チロシン、ビリルビンなどの被酸化性物質は、本定量システムでは -50 mV (vs. Ag/AgCl) の低電位で検出が行なえるので、電気化

Fig. 5 Effect of addition of reducing substances on the response to $8.0 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$ uric acid solution ($5 \mu\text{l}$)

Added substances:
○; Ascorbic acid, ●; L-Cysteine

学的に妨害とならなかった。しかし、図 5 に示したように、 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 以上のアスコルビン酸と $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 以上のシステインは検知物質であるヘキサシアノ鉄(III)酸塩を(II)価に還元するので、負の誤差を考えた。正常人血清中のアスコルビン酸濃度は $0.01 \sim 0.1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ であるので妨害とならないが、高濃度レベルのアスコルビン酸を含む試料の場合には、アスコルビン酸酸化酵素 (EC. 1.10.3.3.) で前もって分解させておく必要がある。また尿を試料とする場合には、20 倍程度に希釈するので、アスコルビン酸はほとんど妨害とならない。また血清および尿中システインは極微量であるので、これもほとんど問題にならない。

3.5 血清および尿中の尿酸の定量

尿酸標準溶液、管理血清および尿のそれぞれを、くり返し測定した場合の再現性を表 1 に示す。どの場合にも、相対標準偏差で 1~2% の再現性で測定ができる。

表 2 には、管理血清および採取した尿に尿酸の既知量を添加したのについて、本法により回収率を求めた結果を示す。ほぼ 100% に近い回収率が得られ、血清および尿中尿酸の測定に十分適用できるものと考えられる。

なお、本法による尿中尿酸の定量値と従来の酵素法 (ウリカーゼ紫外吸収法) による結果の比較を図 6 に示す。両者の方法による定量値の相関係数は 0.995 であり、よく一致した結果が得ら

Table 1 Reproducibility^{a)} of measurement for uric acid solution ($6 \text{ mg} \cdot \text{dl}^{-1}$), control serum, and urine diluted with carrier solution by a factor of 20

	Uric acid solution	Control serum	Urine
N	10	10	10
Mean	27.3	26.5	23.1
S. d.	0.34	0.25	0.37
R. s. d. (%)	1.25	0.96	1.61

a) Mean and standard deviation (S. d.) given in nA, with relative standard deviation for N measurements.

Table 2 Recovery of uric acid added either to control serum or to urine

Sample	Uric acid ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)			Recovery (%)
	Added	Expected ^{a)}	Found	
Control serum	0	—	4.95	—
	1.00	5.95	5.98	100.5
	1.98	6.93	7.01	101.2
	2.96	7.91	7.95	100.5
	3.92	8.87	8.80	99.2
Urine	0	—	55.0	—
	25.0	80.0	80.0	100.0
	50.0	105.0	104.5	99.5
	100.0	155.0	155.5	100.3
	200.0	255.0	255.0	100.0

a) 4.95 and 55.0 $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ originally present in control serum and urine, respectively.

れた。

3.6 安定性

ウリカーゼ固定化リアクターとペルオキシダーゼ電極はともに、キャリアーとして用いた緩衝液を満たしておけば、毎日使用しても、室温でかなり安定であり、1ヵ月後の酵素活性は固定化時の

Fig. 6 Comparison of results obtained by present method and by Uricase-UV method

Slope obtained by linear regression is 0.993.
Intercept is $1.4 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$, $r=0.995$.

90%以上を維持した。しかも、冷蔵庫内に $4\sim 5^\circ\text{C}$ で保存すると、1ヵ月後の酵素活性の低下はほとんど認められなかった。

Flow Injection Analysis for Uric Acid by the Combined Use of an Immobilized Uricase Reactor and a Peroxidase Electrode

Toshio YAO*, Minoru SATO and Tamotsu WASA

Department of Applied Chemistry, College of Engineering, University of Osaka Prefecture ; Mozu-memachi, Sakai-shi 591 Japan

A flow injection method for uric acid determination was examined. In this method, the hydrogen peroxide generated by injecting a $2 \mu\text{L}$ sample into an immobilized uricase reactor is converted to hexacyanoferrate(III) with a peroxidase electrode, in the presence of hexacyanoferrate(II) as a mediator. As the electrode operates at a low potential (*ca.* -50 mV vs. Ag/Ag^+), there is little interference from other constituents normally present in serum and urine. A borate buffer ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, pH 9.0) containing $0.2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ sodium chloride and $1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ potassium hexacyanoferrate(II) served as the carrier solution and was pumped at a constant flow rate of $1.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The peak current was linearly related to the uric acid concentration in the range $0.2\sim 8 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$. The peak width was *ca.* 30 s, and so the determinations could be performed at a $90\sim 120 \text{ samples}\cdot\text{h}^{-1}$ rate with satisfactory precision ($1\sim 2\%$ R. S. D.). Results obtained by the proposed method showed excellent agreement with those obtained with the Uricase-UV method.