

基質リサイクリングと過酸化水素検出に基づいた電流測定
フローインジェクション分析法によるピルビン酸の高感度、選択的検出

八尾俊男^{* **}, 小川泰州^{*}

* 大阪府立大学工学部 : 599-8531 大阪府堺市学園町1-1

** 大阪府立大学先端科学研究所 : 599-8570 大阪府堺市学園町1-2

Highly sensitive and selective detection of pyruvate by amperometric
flow-injection analysis based on enzymatic substrate recycling and
sensitive detection of hydrogen peroxide

Toshio YAO^{* **} and Hirokuni OGAWA^{*}

* Department of Applied Chemistry, College of Engineering, University of Osaka Prefecture, 1-1
Gakuencho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

** Research Institute for Advanced Science and Technology, University of Osaka Prefecture, 1-2
Gakuencho, Sakai, Osaka 599-8570, Japan

A highly sensitive and selective flow-injection system is proposed for amperometric determination of trace amounts of pyruvate. The enzyme reactor prepared by the coimmobilization of lactate dehydrogenase and lactate oxidase was here employed to enhance the sensitivity of pyruvate as an on-line amplifier based on the substrate recycling. In addition, L-lactate 2-monooxygenase immobilized reactor was positioned in series before the amplifier reactor to remove L-lactate, because the cycle was also initiated with L-lactate. When 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.2 mM reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) was pumped at a flow rate of 0.3 ml min⁻¹, a large amount of hydrogen peroxide was generated for trace of pyruvate in the amplifier reactor as a result of substrate recycling reaction. The osmium redox polymer / horseradish peroxidase modified electrode was used as an amperometric detector to detect hydrogen peroxide generated in the amplifier reactor. In the present flow-injection system, the peak current obtained for pyruvate injection (10 μl) was linearly related to the concentrations of pyruvate between 1 × 10⁻⁸ and 1 × 10⁻⁶ M with a 200- to 250-fold increase in sensitivity, without any interference from L-lactate below 10⁻⁶ M. The detection limit was 8 × 10⁻⁹ M (S/N=3) for pyruvate and the precision (coefficient of variation) was better than 1.8 % for the repeated injections (n=7) of 5 × 10⁻⁷ M pyruvate.

1 緒言

固定化酵素を用いたフローインジェクション分析(FIA)法は、迅速で分子認識特性に優れた選択的(時には特異的)な計測法として利用されてきている¹⁾²⁾。しかし、一般に10⁻⁶ M以下の微量分析には感度的に不十分な場合も多い。

そこで著者らは、酵素リアクターに基質リサイクリング反応に基づいた増幅機能を付与し、さらに検出器に比較的高感度なアンペロ

メトリー検出器や化学発光検出器などを用いて、このFIA法を高感度化する方法について検討してきた³⁾。この基質リサイクリング反応は Fig. 1 に示したように、Enz 1 による生成物 P が Enz 2 の基質になるような組み合わせの2つの酵素を、ガラスビーズなどの酵素固定化担体にランダムに同時固定化したものを、リアクターとして用いることで達成できた。キャリアー溶液に反応基質として、S₁ と S₂ を過剰に加えておくと、基質 S は両

酵素間でシャトルされ多量の生成物 P_1 と P_2 を生じる。この P_1 あるいは P_2 を下流にある検出器で検出すると、 S に対する増幅シグナルが得られる。しかし、 S と同様に P も両酵素間でシャトルされ、増幅されたシグナルを与えることになる。そこで、この増幅リアクターをHPLCのポストカラムとして用い、 S と P を分離して高感度に検出する方法を以前に提案した⁴⁾が、分析時間が長くなる欠点があった。

そこで本研究では、L-乳酸とピルビン酸の増幅リアクターとして以前に提案した乳酸脱水素酵素/乳酸酸化酵素同時固定化リアクター⁵⁾を用い、上流にL-乳酸を分解除去できる高活性な酵素リアクターを組み込み、ピルビン酸のみをオンラインで選択的に高感度検出できるFIA法について検討した。また、酵素反応によって最終的に生成した過酸化水素の検出には、メディエーションサイトにオスミウム(Os)を有する導電性ポリマー⁶⁾に西洋ワサビ起源ペルオキシダーゼ(HRP)を固定化して作製したクロスフロー型過酸化水素酵素電極を用いた。

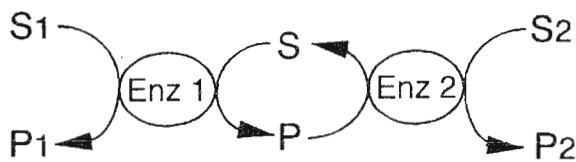


Fig. 1 Substrate recycling reaction
 S, P : substrate or product;
 S_1, S_2 : cosubstrate of Enz 1 and Enz 2;
 P_1, P_2 : product of Enz 1 and Enz 2

2 実験

2.1 装置

送液用ポンプには柳本製作所製ダブルプランジャー型L-5000を、電気化学検出器にはCB-100型クロスフロー型電気化学セルを内蔵したエイコム社製ECD-300を、データ処理装置にはSIC社製クロマトコーダー21を用いた。恒温槽には島津製作所製CTO-10A型カラムオ

ープンを用いた。

2.2 試薬

乳酸酸化酵素 (LODと略記: EC 1.1.3.2; 32 IU mg^{-1} ; *Pediococcus species* 起源)、乳酸脱水素酵素 (LDHと略記: EC 1.1.1.27; 5000 IU mg^{-1} ; タイプXI ウサギ筋肉起源)、乳酸2-モノオキシゲナーゼ (LMOと略記: EC 1.13.12.4; 50 IU mg^{-1} ; *Mycobacterium* 起源)とL-乳酸はSigma社製のものを用いた。西洋ワサビ起源ペルオキシダーゼ (HRPと略記: EC 1.11.1.7; 251 IU mg^{-1})、ピルビン酸、グルタルアルデヒド (20% 溶液、電子顕微鏡用)は和光純薬工業製のものを用いた。アミノプロピル化多孔性ガラス (アミノプロピル-CPGと略記: 平均孔直径 527 Å; 粒子径 127-200 メッシュ)はフナコシから、ポリエチレングリコール400ジグルシジルエーテル (PEGDGEと略記)はポリサイエンスから購入したのものを用いた。

2.3 固定化酵素リアクターの作製

アミノプロピル-CPGへの酵素の固定化は、既報⁵⁾の方法に準じて次のように行った。内径が3 mmで、長さが27 mmと18 mmのガラス製カラムにアミノプロピル-CPGを均一に充填し、4%グルタルアルデヒド (0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液)を1.5時間循環して、担体のスパーサー末端にホルミル基を導入した。蒸留水で洗浄後、27 mmカラムにLOD (19U)とLDH (600 U)の混合酵素溶液 (0.1 M, pH 7, リン酸緩衝液) 10 mlを、18 mmカラムにLMO溶液 (25 U; 0.1 M, pH 7, リン酸緩衝液) 10 mlをそれぞれ2時間循環することにより、LOD/LDH同時固定化リアクターとLMO固定化リアクターのそれぞれを作製した。

2.4 過酸化水素酵素電極の作製

Fig.2に示した構造のオスミウム含有導電性ポリマーを文献⁷⁾に記載された方法に従って合成した。合成したポリマーを0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) に溶解した溶液 (4 mg ml⁻¹) 120 μlに、HRP水溶液 (2 mg ml⁻¹)30 μlを加え、さらに架橋剤としてPEGDGE水溶液 (2mg ml⁻¹) 20 μlを加えて均一に混合する。この混合溶液 50 μl を、エイコム社製電気化学セルのグラッシーカーボン平板電極 (12×12 mm) 上に塗布し、室温で2日間乾燥させ、水に不溶な架橋被膜を形成させた。これを電気化学セルに装着し、pH 7.0の0.1 M リン酸緩衝液で十分洗浄して使用した。

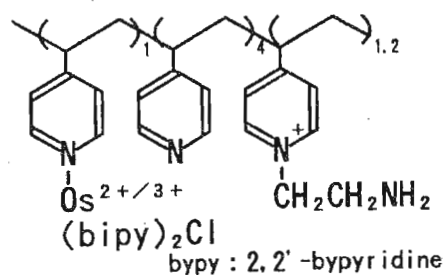


Fig. 2 Osmium (Os)-containing redox polymer

3 FIA システムと測定原理

用いたFIA システムの概略と各酵素リアクターで起こる酵素反応をFig.3に示す。キャリアー溶液としてNADHを含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を一定流量で送液する。インジェクターから注入された試料溶液中のL-乳酸は、乳酸除去リアクターR₁で酵素反応により、二酸化炭素と酢酸に分解される。従ってピルビン酸のみが下流の増幅リアクターR₂で基質リサイクリング反応を受け、多量の過酸化水素を生成する。これを下流の過酸化水素酵素電極Dで検出する。この過酸化水素電極の応答原理をFig.4に示す。HRPの活性中心は鉄錯体であるフェリプロトポルフィリンIXであることが知られているが、過酸化水素を認識すると同時にこれが還元型から酸化型になる。さらに近傍のOs(II)が酵素を元の還元状態に戻すと共に、導電性膜中での電子ホッピングに基づいて電極から電子を受け取り、結果として過酸化水素の濃度に比例した還元電流応答を、銀/塩化銀参照電極に対して0 V の検出電位で得ることができる。

4 結果及び考察

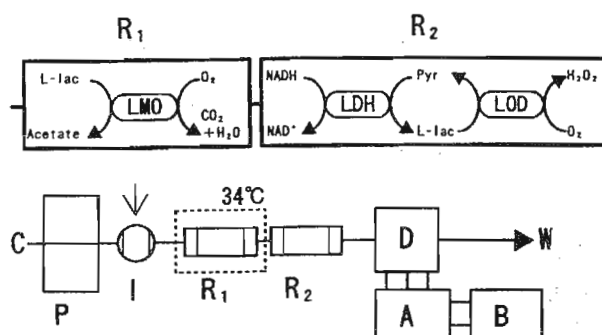


Fig. 3 Flow system and enzyme reactions used for selective and sensitive detection of pyruvate

A: potentiostat; B: chromatocorder 21; C: carrier solution (0.1 M, pH 7.2, phosphate buffer containing 0.2 mM NADH), P: pump; I: injector; D: enzyme electrode for H₂O₂; W: waste; R₁: L-lactate 2-monooxygenase immobilized reactor; R₂: lactate dehydrogenase/lactate oxidase coimmobilized reactor; L-lac: L-lactate; pyr: pyruvate.

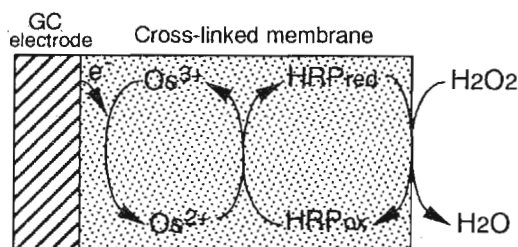


Fig. 4 Working principle of enzyme electrode for H₂O₂

HRP: horseradish peroxidase; Os: Osmium redox site

4.1 過酸化水素酵素電極の最適化と応答特性

Fig.4 に示した酵素電極の過酸化水素に対する応答は、① ポリマー膜に固定化されたHRPによる酵素反応速度、② ポリマー中の電子伝達速度、③ 電極基盤での電子授受速度、に影響される。そこで、酵素と電極基盤間の電子移動を効率よく発現するために、

電極の作製方法について検討した。そこで、酵素電極の膜厚をほぼ一定にし、HRPの含有量を4~28 wt %の間で変化させたところ、約11%の含有量のととき過酸化水素に対して最大の応答が得られた。これは、HRP量が少なければ①の酵素反応速度が減少し、逆に酵素量が多ければ電気的絶縁物質である酵素タンパク質により②と③の速度が減少するためであると考えられる。そこで、酵素含有量を10.8%と一定にし、2.4で述べたHRPとポリマー及びPEGDGEの混合溶液の塗布量を変えて膜厚の異なる電極を作製し、各電極の過酸化水素に対する応答を比較した。その結果、塗布量が50 μl の時に最大の応答電流が得られた。

次に、この最適化した酵素電極を用いて、過酸化水素の応答電流に対するキャリア溶液のpHの影響について検討した。溶液状態でのHRPの至適pHは6.0~6.5であるが、この酵素電極では6.5~8.0のpH範囲で応答電流はほとんどpHに依存しなかった。そこで、キャリア溶液のpHとしてLOD/LDH同時固定化リアクターの最適pHである7.2⁴⁾を選んだ。次に、キャリア溶液の流量を0.1~0.9 ml min^{-1} の範囲で変化させたところ、過酸化水素に対する応答にほとんど変化がなく、この酵素電極が流量にほとんど依存しないことがわかった。

この酵素電極を用い、Fig.3のシステムから2つの酵素リアクターを取り外したFIAシステムで、過酸化水素に対する検量線を作製したところ、キャリア流量が0.7 ml min^{-1} のとき、 $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ の濃度範囲で相関係数0.999の良好な直線関係が得られた。

電極感度は過酸化水素に対して $21.2 \mu\text{A mM}^{-1}$ であり、過酸化水素電極として従来から用いられている白金電極に比べても比較的高感度であった。測定の再現性は $1 \times 10^{-5} \text{ M H}_2\text{O}_2$ 溶液の7回測定に対して、相対標準偏差で1.4%

であった。

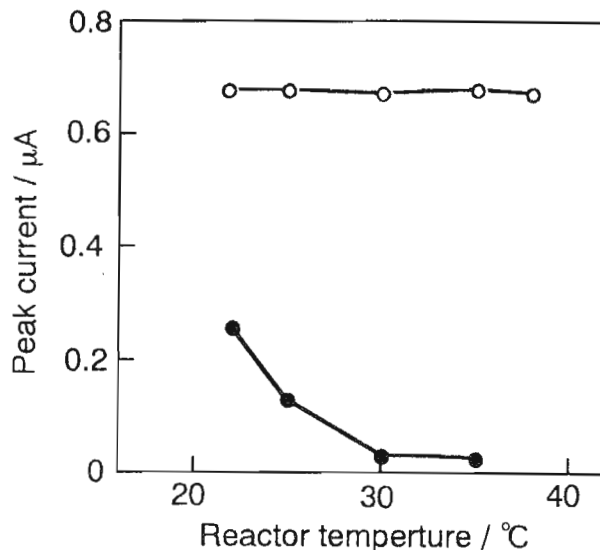


Fig. 5 Removal of L-lactate by reactor R₁ at a variety of temperatures

○: $1 \times 10^{-4} \text{ M H}_2\text{O}_2$; ●: $1 \times 10^{-4} \text{ M L-lactate}$.
carrier solution: 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2);
carrier flow-rate: 0.5 ml min^{-1} .

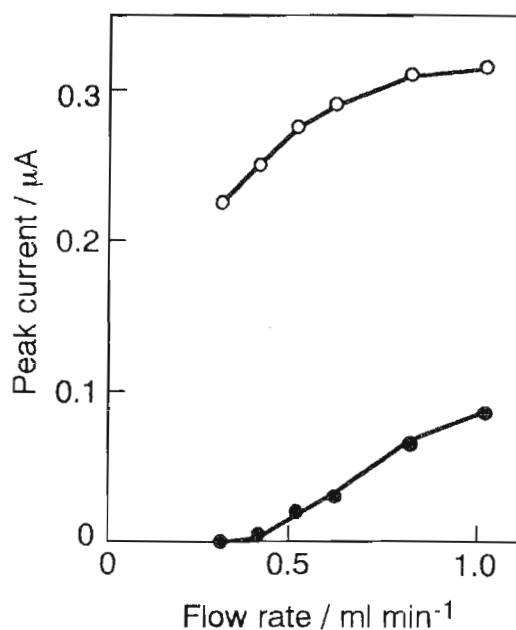


Fig. 6 Removal of L-lactate by reactor R₁ at a variety of carrier flow-rates

○: $5 \times 10^{-5} \text{ M H}_2\text{O}_2$; ●: $1 \times 10^{-4} \text{ M L-lactate}$

4.2 LMO固定化リアクターのL-乳酸除去効率

Fig.3に示したFIAシステムを用いて、リアクターR₁でのL-乳酸の除去効率について検討した。リアクターR₂での基質リサイクル

グ反応にはNADHを必要とするが、ここではリアクターR₁で除去されなかったL-乳酸を検出するため、キャリアー溶液には基質リサイクリング反応が起こらない 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を用いて実験を行った。

一般に、酵素反応速度は温度に大きく影響を受ける。Fig.5には、キャリアー溶液の流量を 0.5 ml min⁻¹ と一定にし、リアクター温度を変化させた場合のL-乳酸と過酸化水素に対する応答電流を比較した。リアクター温度が上昇しても、過酸化水素に対する応答電流はほとんど変化しなかったが、L-乳酸に対する応答電流は温度の上昇と共に減少し、30~35℃で同濃度の過酸化水素に対して応答電流比は2~3%であった。しかし、38℃以上になると、リアクターR₂のLOD活性が徐々に低下したので、リアクター温度を以後の実験では34℃にした。

一方、LMOのK_m値は 34 mM と酵素反応速度が比較的遅いため（例えば、LDHはピルビン酸に対して K_m = 0.1 mM）、LMO固定化リアクターでのL-乳酸除去効率はキャリアー溶液の流量に大きく依存すると考えられる。Fig.6には、キャリアー溶液の流量を変化させた場合のL-乳酸除去効率について検討した結果を示す。キャリアー溶液の流量が減少すると、過酸化水素に対するL-乳酸の応答電流比が減少し、除去効率が増加していることがわかる。0.3 ml min⁻¹ の流量で、その電流比は1%以下にまで減少した。

以上の結果から、LMO固定化リアクターはリアクター温度が34℃、キャリアー流量が 0.3 ml min⁻¹ で、99%以上のL-乳酸を分解除去できることがわかった。

4.3 ピルビン酸の選択的な高感度検出

増幅応答を得るための最適なキャリアー溶液として、以前の研究⁴⁾の結果から、0.2 mM NADH を含む 0.1 M リン酸緩衝溶液(pH 7.2)

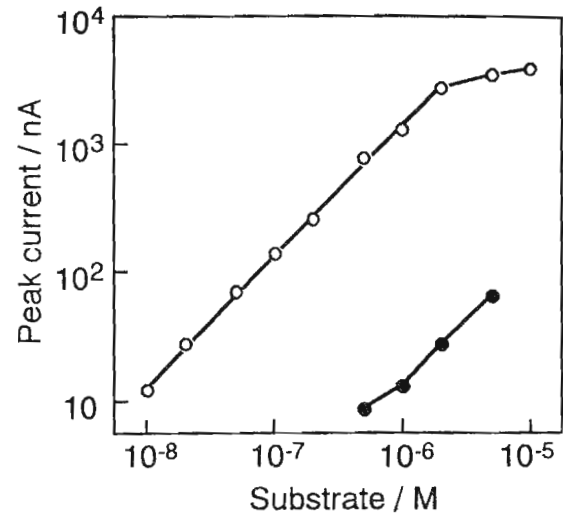


Fig. 7 Calibration graph for pyruvate obtained by the present FIA system

○: pyruvate; ●: L-lactate

を選んだ。また、4.2で検討した結果から、リアクター温度を34℃、キャリアー流量を 0.3 ml min⁻¹ として、ピルビン酸に対する検量線を作製した。結果をFig.7に示す。

Fig.2のFIAシステムからリアクターR₁を取り除いた系では、L-乳酸とピルビン酸は同一の検量線を与えた。しかし、リアクターR₁をL-乳酸除去カラムとして用いた本FIAシステムでは、1 × 10⁻⁸ ~ 1 × 10⁻⁶ M の濃度範囲でピルビン酸を選択的に、高感度検出できる。しかし、10⁻⁶ M 以上のL-乳酸は10⁻⁸ M 濃度レベルのピルビン酸の測定に妨害となった。

ここで提案したFIAシステムでは、ピルビン酸に対する検出下限が8 × 10⁻⁹ M (S/N=3) であり、過酸化水素に対する応答電流と比較すると、ピルビン酸に対する増幅率は200~250倍であった。測定の再現性は5 × 10⁻⁷ M のピルビン酸の測定に対して、相対標準偏差で1.8% (n=7) であった。

5 結語

2 酵素間での基質リサイクリング反応に基

づいた酵素リアクターは、オンラインでの増幅リアクターとしてFIAの高感度化への1つの有効な方法となり得るが、原理的に2つの基質に対して増幅機能を有するため、それぞれを選択的に検出することができない。しかし、ここで提案した方法は一方の基質を選択的に分解できる酵素リアクターを連結し、他方の基質をオンラインで選択的に増幅して検出する方法であり、本研究で述べたピルビン酸の選択的な高感度検出に有効であった。この方法は、酵素反応がある特定の基質に対して高い選択性を示すので、いろいろな組み合わせの場合が考えられ、種々の特定成分の高感度検出への応用が期待できる。また、本研究で提案した導電性ポリマー/HRP電極は比較的高感度であり、キャリアー溶液のpHや流量に大きな影響を受けないことから、酵素反応で生成した過酸化水素のFIA用電気化学検出器とし

て利用できる。

文献

- 1) 八尾俊男 : *J. Flow Injection Anal.*, **2**, 115 (1985).
- 2) 八尾俊男 : *イオン電極研究*, **5**, 27 (1988).
- 3) 八尾俊男 : *J. Flow Injection Anal.*, **9**, 2 (1992).
- 4) T. Yao, N. Kobayashi, T. Wasa: *Electroanalysis*, **3**, 493 (1991).
- 5) T. Yao, M. Satomura, T. Nakahara: *Electroanalysis*, **7**, 395 (1995).
- 6) Y. Degani, A. Heller: *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 2357 (1989).
- 7) L. Ye, M. Hammerrle, A. J. J. Olsthoorn, W. Schuhmann, H. L. Schmidt, J. A. Duine, A. Heller: *Anal. Chem.*, **65**, 238 (1993).

(Received February 12, 2000)

(Accepted February 28, 2000)