

ウレアーゼの目視定量法

間中淳、日出島拓、五十嵐淑郎

Development of Visual Analysis for Urease

ATSUSHI Manaka, TAKU Hideshima and Shukuro Igarashi

*1 Department of Chemical and Biochemical Engineering, Toyama National College of Technology,
13 Hongo-machi, Toyama, 939-8630 Japan

*2 Department of Biomolecular Functional Engineering, Faculty of Engineering, Ibaraki University,
Nakanarusawa 4-12-1, Hitachi, Ibaraki 316-8511, Japan.

The reaction of urea to ammonia with hydrochloric acid provides the characteristic S-shaped pH vs. time curve, which contains the inflection time and the dynamic pH change at the end point. The inflection time shifts with the urease concentration. Furthermore, the pH change at the end point can be visualized using a pH indicator such as bromothymol blue. Based on these findings, using a stopwatch and the unaided eye, a simple and visual determination for $\mu\text{g mL}^{-1}$ levels of urease has been developed. The determination range of urease was from 5 to 50 mg/L, and the relative standard deviation was 8 % (8 determinations) for the blank. The detection limits (3σ) were 5 $\mu\text{g/mL}$.

Key Word: Visual analysis, Urease, S-shape pH vs. time curve

1. 緒言

資源、時間が限られている現代社会において高価な分析装置や煩雑な操作を用いない分析法の開発は大きな意義があり、これまで多くの簡易分析法が多数開発されてきた。特にスポットテスト¹⁾、比色法²⁾や試験紙法³⁾などに代表される目視定量法は迅速性・経済性に優れていることから、簡易分析法の主な手法として広く用いられている。しかしながら、人間の目は色の濃淡をはっきりとした数値基準で捕らえることができないため、測定者による分析値のずれ

が大きい等、精度の問題が残されていた。

また、これまでに、測定精度の高い簡易目視分析法として自己触媒反応の特性を利用した手法⁴⁾が報告されている。この反応は初期触媒濃度に依存する誘導期間を持つ特徴的なS字型濃度-時間反応曲線を与え、分析対象物の濃度は自己触媒反応の指示反応の時間(誘導期間)に変換することができることから、また、反応終点における急激な化学変化は目視によって容易に観察することができることから、この反応を用いることで人間の目とストップウォッチによ

る目視分析が可能となる。さらに、この反応曲線の形状は分析対象物の濃度に依存しないことから一定の感度での定量が可能である利点を有していた。これまでに、ピリジルアゾフェノールのコバルト錯体のペルオキソー硫酸ナトリウムによる自己触媒酸化分解反応を用いたコバルト(III)イオンの簡易目視計測法³⁾およびこの反応系に対する他の様々な触媒種やインファクターの目視計測への応用^{5),6)}が報告されている。また、著者らもこれまでに亜硫酸塩-過酸化水素系自己触媒反応を用いた標識酵素ペルオキシダーゼの目視計測法⁷⁾を報告している。しかしながら、これらの手法は生成物が自身の反応を促進する特殊な反応を利用することを前提とするため、この手法による分析法の報告数は多くない。また、反応速度を利用した分析法であるため、高い温度依存性、低い選択性の問題が残されている。

最近、著者らは、尿素のウレアーゼによる加水分解反応⁸⁾⁻¹¹⁾に塩酸を共存させることによって、この反応の pH-時間反応曲線が自己触媒反応の反応曲線と類似することを見出した。これらの知見から、尿素/ウレアーゼ/H⁺反応系を用いるウレアーゼの目視定量法を開発した。

2. 実験

2.1 試薬・装置

全ての試薬は特級のものを使用した。塩酸(関東化学製)、尿素(和光純薬製)、ウレアーゼ(和光純薬製)、プロモチモールブルー(和光純薬)の水溶液は蒸留水に希釈して調製した。恒温槽はアズワン製の THEMO MAX TM-1 を使用した。pH の測定はアズワン製の The Cyberscan PH1500 を使用した。

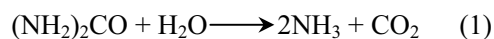
2.2 操作

濃度 2.0 mol dm^{-3} の尿素と 0.01 mol dm^{-3} 塩酸を含む水溶液 8 mL を用意する。この混合液を pH メーターおよび恒温機能を備えたスターラーにセット後、試料溶液 1 mL を加えて反応を開始させ、この反応の pH-時間曲線を測定した。ウレアーゼの濃度は反応開始から pH が急激に変化するまでの時間(誘導期間)により定量した。さらに、この誘導期間はプロモチモールブルーのような pH 指示薬を加えることにより、目視測定も可能であった。

3. 結果

3.1 指示反応・反応曲線

測定に用いた指示反応は(1),(2)の反応式に示すウレアーゼによる尿素の加水分解反応⁸⁾⁻¹¹⁾とアンモニアの中和から成る。



反応の初期では尿素とウレアーゼから生じるアンモニアが塩酸によって中和される。塩酸を全て消費した後、さらに発生するアンモニアによって水溶液の pH は急激に上昇する。そのため、この反応は Fig.1 のように誘導期間の後、急激な pH 変化を示す特徴的な S 字型の pH-時間曲線を描く。

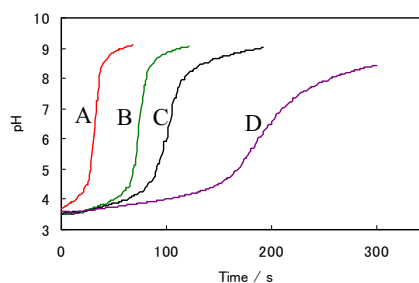


Fig.1 pH-時間曲線

[Urea]= 1.0 mol dm^{-3} , [HCl]= $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, 20°C
[Urease]=A:40, B:30, C:20, D:10 mg L^{-1}

3.2 定量条件の検討

測定における反応の最適条件を検討した。その結果を Fig.2, Fig.3 および Fig.4 に示す。この反応の誘導期間は塩酸の濃度の増加に伴い長くなり、反応曲線の形状が S 字型に保てなくなった。この結果から、塩酸の濃度は $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ を最適濃条件として選定した。さらに、尿素濃度の増加と測定温度の上昇に伴い、誘導期間は短縮し、試料添加時とブランク測定との誘導期間の差が短くなり、ウレアーゼの定量が困難となった。そのため、測定時間と感度を考慮し、尿素の濃度を 1.0 mol dm^{-3} に、反応温度を 20°C を測定条件として選定した。

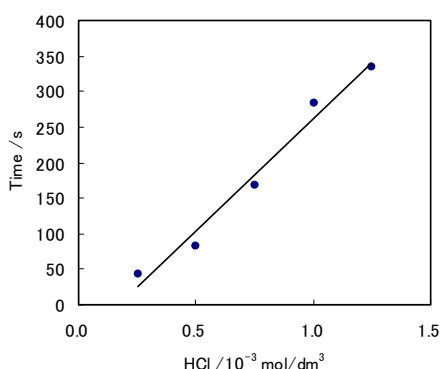


Fig.2 塩酸の濃度の影響
 [Urea]= 1.0 mol dm^{-3} , [Urease]= 50 mg L^{-1} , 20°C

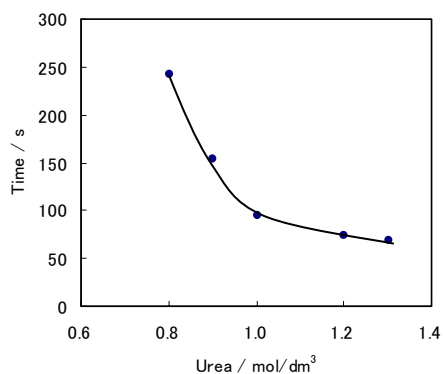


Fig.3 尿素の濃度の影響
 [HCl]= $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$,
 [Urease]= 50 mg L^{-1} , 20°C

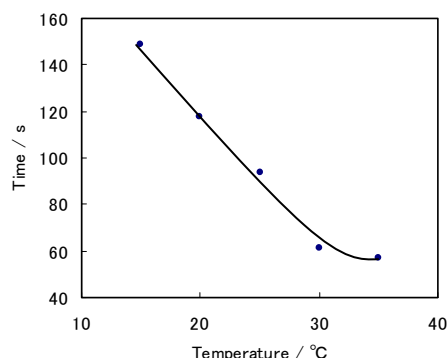


Fig.4 温度の影響
 [Urea]= 1.0 mol dm^{-3} , [HCl]= $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$
 [Urease]= 50 mg L^{-1} , 20°C

ウレアーゼの定量

pH メーターを用いることで、本法は $5 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ の範囲のウレアーゼを定量することが可能であった。また、検出限界は $5.0 \mu\text{g/ml}$ であった。

また、この反応の指示反応の pH のシグナルは変色域が $\text{pH}=4.5 \sim 8.0$ 程度の pH 指示薬(試験紙)を用いることで可視化することが可能であった。さらに、シグナルとして用いる色はコントロールすることができる。黄色(酸性)から青(塩基性)に変色するプロモチモールブルー(変色域 $\text{pH } 6.0 \sim 7.6$)、赤(酸性)から青(塩基性)に変色するリトマス紙(変色域 $\text{pH } 5.0 \sim 8.0$)を用いることで目視判定が可能となった。このことから、ウレアーゼの目視定量が可能となった。

共存物質の影響

共存物質の影響を検討した結果を Table.1 に示す。ほとんどの金属イオンおよび、アニオンは反応に影響しなかった。Fe(II)イオン、Cu(II)イオンは微量の存在で大きな妨害を示した。しかしながら、こ

これらの妨害は EDTA やクエン酸等のマスク剤を用いることで除去することが可能であった。

Table 1 Influence of coexisting materials

Foreign substances	Tolerance limits ($\pm 5\%$) ^{a)}
Na ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Co ²⁺ ,	×50000
Ni ²⁺ , Cl ⁻	
SO ₄ ²⁻	×5000
Zn ²⁺ , H ₂ PO ₄ ⁻	×500
Fe ²⁺	×50
Al ³⁺	×5
Cu ²⁺	×0.5

a) for the 50mgL⁻¹ of urease concentration

まとめ

本法は、ウレアーゼの目視定量による簡単な操作とマスク剤による高選択性によって特徴付けられる。本法の測定原理に基づく手法によって、多くの重要な生物学的成分の簡易分析法が確立されることを期待したい。

(2008. 12. 26 受理)

参考文献

1. E.Kaneko, *Anal.Sci*, **20**, 247-254 (2004).
2. 笠原一世、孫恵峰、ぶんせき p615-618 (2001).
3. 大田宜秀、ぶんせき p661-667 (2001).
4. M.Ishihara, M.Endo, S.Igarashi and T.Yotsuyanagi, *Chem. Lett.*, **24**, 349-350 (1995).
5. M.Endo, M.Ishihara and T.Yotsuyanagi *Analyst*, **121**, 391-394(1996).
6. M.Endo, S.Abe, Y.Deguchi and T.Yotsuyanagi. *Talanta*, **47**, 349-353 (1998).
7. A. Manaka, S. Igarashi. *Analytical Letters*, **36**, 135-144 (2003).
8. Rachana Sahney, S. Anand, B.K. Puri and A.K. Srivastava, *Analytica Chimica Acta*, **578**, 156-161 (2006).
9. H. Barhoumi, A. Maaref, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrezic, C. Mousty, S. Vial and C. Forano, *Materials Science and Engineering: C*, **26**; 328-333 (2006)
10. K. Ravi Charan Reddy and Arvind M. Kayastha, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **38**, 104-112 (2006).
11. Katarzyna Sawicka, Perena Gouma and Sanford Simon. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **108**, 585-588 (2005).