

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	固定化酵素を利用したシアン化物のフローインジェクション分析法
Author(s)	出口, 俊雄; 深浦, 康一; 則松, 成子; 南, 小百合; 田中, 明; 實政, 勲
Citation	Journal of Flow Injection Analysis, 13(2): 138-147
Issue date	1996-12
Type	Journal Article
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/11009">http://hdl.handle.net/2298/11009</a>
Right	

## 固定化酵素を利用した シアン化物のフローインジェクション分析法

出口俊雄, 深浦康一, 則松成子, 南小百合, 田中明, 實政勲

熊本大学理学部 〒860 熊本市黒髪2-39-1

---

Flow Injection Analysis of Cyanide Using Immobilized Enzyme

Toshio DEGUCHI, Kouichi FUKAURA, Shigeko NORIMATSU, Sayuri MINAMI,

Akira TANAKA and Isao SANEMASA

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kumamoto University,

2-39-1 Kurokami, Kumamoto 860, Japan

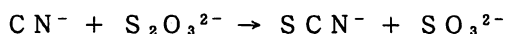
A flow-injection system with an immobilized enzyme reactor is proposed for the determination of cyanide. The system includes the rhodanese immobilized on aminopropyl-controlled pore glass beads, which acts as an enzyme reactor. In this system, cyanide is converted to thiocyanate in the presence of thiosulfate in the immobilized enzyme reactor, then the thiocyanate forms iron(II) thiocyanate complex, which is spectrophotometrically detected at 460 nm. The optimum conditions in the flow-injection system are proposed. Under the optimized condition, the detection limit(S/N=3) of cyanide was 15  $\mu$ M and the linear relationship was obtained in the range of 0-1 mM cyanide. The sample frequency was 20 /h. The precision of the method was 2.3 % relative standard deviation at 0.5 mM cyanide. The immobilized rhodanese was stable for at least 10 h of continuous operation. Also it retained 91 % of the initial activity after 1 week, 83 % after 1 month. Many kinds of anions which commonly interfere with the determination of cyanide except ascorbate did not interfere in the present method. The flow-injection system developed here is applicable to the determination of cyanide in environmental and clinical samples.

---

## 1 緒言

現在、工業の広い領域において、廃液中のシアン化物のモニタリングやコントロールが必要とされている。シアン化物は工業において広く用いられており、特にメッキ加工や金属の洗浄などにおいては大量に用いられている。シアン化物はその強い毒性のために公的に厳しい環境基準が定められており、常時分析されている。シアン化物の定量には普通、ピリジン-ピラゾロン吸光光度法、4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン吸光光度法またはイオン電極法を使用するが、これらの方法では多くの共存物質による妨害を受けやすく、シアン化物イオンを単離して定量を行うために面倒な前処理が必要である<sup>1)</sup>。

一方、臨床検査や食品分析などの分野においては、生体成分や代謝成分の正確かつ迅速簡便な分析方法の開発が望まれている。これらの分野では、酵素を用いる分析法が、その基質特異性による高い選択性のため広く利用されてきた。これまで、酵素を用いたシアン化物の定量法についても、いくつかの報告がある<sup>2-4)</sup>。それらは全てロダネーゼ (thio-sulfate : cyanide sulfurtransferase, EC 2.8.1.1) を使用したものであり、この酵素は下記の反応に触媒として作用する。



著者らは、先にロダネーゼのミカエリス定数をFIA法により、測定する方法を報告した<sup>5)</sup>。ロダネーゼは各種動物や細菌などに広く分布しており、中でも哺乳動物（特に牛などの反すう動物）の肝臓や腎臓のミトコンドリア中に高濃度で存在している。生体内でのこの酵素の働きは、主にシアン化物の解毒化の触媒であると考えられている<sup>6)</sup>。

Fonong はロダネーゼの存在下、シアン化物とチオ硫酸塩の反応で生成したチオシアン酸イオンと鉄(Ⅲ)イオンとの呈色反応を利用したシアン化物の定量法を報告した<sup>2)</sup>。この方法は、簡単な前処理は必要であるが、シアン化物イオンを予め単離する必要はない。しかし、分析ごとに酵素溶液を使用するためにコストがかかる。また、操作がバッチ法のために手間がかかる。Mattiasson らは、固定化したロダネーゼを用いた酵素サーミスターによるシアン化物の定量法を報告した<sup>3)</sup>。Groom と Luong は、固定化したロダネーゼと亜硫酸オキシダーゼを用いたバイオセンサーによるシアン化物の定量法を報告した<sup>4)</sup>。これらの定量法では固定化酵素の長期安定性が示されており、固定化酵素を用いた定量法の有用性が確かめられた。しかし、酵素サーミスターを用いる定量法では操作が繁雑であり、またバイオセンサーを用いる方法では、1試料当たり 30 分と測定に時間がかかる。

本研究では、固定化したロダネーゼを用いたシアン化物の新しいフローインジェクション定量法 (FIA) を検討した。ロダネーゼを多孔性ガラスビーズに固定化し、これを充填したカラムを固定化酵素リアクターとしてフロー系に導入した。本法は、この固定化酵素リアクターでシアン化物が変換されて生成したチオシアン酸イオンと鉄(Ⅲ)イオンとの

呈色反応を利用したF I A法である。固定化酵素を利用することによる、高選択性で迅速かつ簡便なシアン化物の定量法の開発を目的とした。

## 2 実験

### 2・1 試薬

ロダナーゼ (thiosulfate : cyanide sulfurtransferase, E C 2.8.1.1, Type I : From Bovine Liver, 11-13 units/mg solid) はS I G M A社より購入した。トリス緩衝溶液 (pH 8.6)調製にはトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン (和光純薬工業, 生化学用)を使用した。グルタルアルデヒド溶液調製には 50 % グルタルアルデヒド水溶液(関東化学)を使用した。その他の試薬は全て試薬特級品を使用した。また溶液調製には, Milli-Q超純水製造装置 (日本ミリポア)で製造した水を使用した。また, 酵素を固定化するための担体として, 粒子サイズ 200/400 メッシュのアミノプロピル-C P G (Controlled Pore Glass), (フナコシ)を用いた。このガラスビーズの平均孔径は 585 Å (±3.9 %), 表面積は 45.1 m<sup>2</sup>/gである。

### 2・2 装置

シアン化物定量に使用したフローインジェクション系の概略図をFig. 1に示す。フロー系を構成するP T F Eチューブは, 特にことわらない限り, 内径 0.5 mm のものを使用した。ポンプはプランジャー型4連送液ポンプ 4 P 2 M-4 0 1 6 (サヌキ工業), サンプル注入にはオートサンプラーK M T-6 0 A-II (協和精密, 注入量 100 μl), 吸光度の測定には高速液体クロマトグラフ用 紫外-可視分光光度検出器 S P D-6 A V (島津製作所)を使用し, 波長 460 nmで測定した。

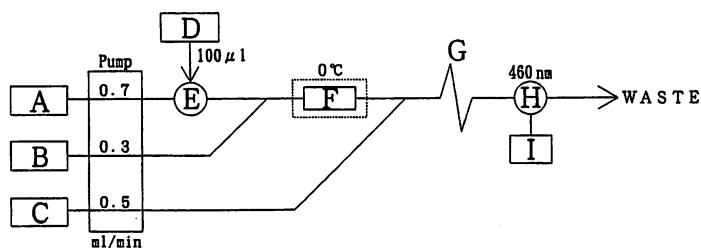


Fig. 1. Flow diagram for cyanide determination: A, 10 mM tris buffer (pH 8.6); B, 5 mM sodium thiosulfate solution; C, 50 mM iron(II) nitrate solution (2 M HNO<sub>3</sub>); D, potassium cyanide sample (0.1 M tris buffer (pH 8.6)); E, injector; F, immobilized enzyme reactor (2 mm i.d., 4 cm length); G, reaction coil (0.5 mm i.d., 2 m length); H, spectrophotometer; I, recorder.

## 2・3 操作

### 2・3・1 酵素の固定化

50 % グルタルアルデヒド水溶液 (0.5 ml) と 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 7.0) (9.5 ml) を混合して 2.5 % グルタルアルデヒド溶液を調製した。この溶液 (10 ml) にアミノプロピル-CPG (0.5 g) を加え、真空吸引しながら超音波浴内に浸してガラスビーズの細孔内の空気を追い出し、時々振り混ぜながら1時間放置した。これをガラスフィルターを用いて汙別し、水で十分に洗浄した後、室温乾燥した。この活性化したガラスビーズ (0.4 g) にロダネーゼ (20 mg) を 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 6.0) (3 ml) に溶かしたものを加え、真空吸引しながら氷の入った超音波浴内で時々振り混ぜながら30分間放置した。その後、冷蔵庫内 (4 °C) で一夜放置し、酵素の固定化を行った。この固定化酵素ガラスビーズをガラスフィルターを用いて汉別し、冷却した 0.1 M リン酸緩衝溶液 (pH 6.0)、次に冷水で洗浄した<sup>7)</sup>。これを注射器を用いて PTFE チューブ (内径 2 mm, 長さ 4 cm) に詰め、固定化酵素リアクターとしてフロー系に導入した。測定後のリアクターは、そのまま測定時の溶液 (トリス緩衝溶液 (pH 8.6) とチオ硫酸溶液の混合溶液) に浸した状態で 4 °C で保存した。

### 2・3・2 フロー系の最適化

Fig. 1 のフロー系では、インジェクターにより注入されたシアン化物サンプルは、ポンプ A からのトリス緩衝溶液流 (pH 8.6) によって運ばれ、ポンプ B からのチオ硫酸溶液流と合流後、固定化酵素リアクター内へと導かれる。ここでシアン化物イオンはチオシアン酸イオンへと変換され、このチオシアン酸イオンがポンプ C からの鉄(III)溶液流と混合して生成したチオシアン酸鉄(III)錯体を分光光度計によって検出する。

最終的に Fig. 1 のフロー系を用いてシアン化物の定量を行ったが、それに先立ち、まずフロー系の最適化を行った。Fig. 1 のフロー系から固定化酵素リアクターを外したフロー系にチオシアン酸サンプルを注入し、鉄(III)溶液中の硝酸濃度と鉄(III)溶液の濃度の検出ピークに及ぼす影響を調べた。次に、固定化酵素リアクターの組み込まれた Fig. 1 のフロー系にシアン化物サンプルを注入し、チオ硫酸溶液の濃度による影響を調べた。なお、注入するチオシアン酸サンプルとシアン化物サンプルは共に 0.1 M トリス緩衝溶液 (pH 8.6) を用いて調製した。

### 2・3・3 シアン化物の定量

フロー系の最適条件の決定後、Fig. 1 のフロー系にシアン化物サンプルを注入し、固定化酵素の安定性、シアン化物の定量範囲、検出限界および共存イオンの影響を調べた。

共存イオンの影響は、シアン化物イオンに陽または陰イオンを共存させて、応答ピークの高さを比較することにより調べた。陰イオンは 2.6 ppm (0.1 mM) のシアン化物イオンに対して 0.1, 1, 10 倍量 (それぞれ 0.26, 2.6, 26 ppm) 共存させ、一方、カルシウムおよび亜鉛の陽イオンについては 0.1 mM シアン化物イオンに対して 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mM の濃度で共存させて影響を調べた。共存陰イオンは全てナトリウム塩を使用し、カルシウムイオンは塩化物、亜鉛イオンは硝酸塩を使用した。注入するシアン化物イオンの pH は、他種イオンが共存しても変化しないよう注意した。

### 3 結果と考察

#### 3・1 フロー系の最適化

##### 3・1・1 鉄(III)溶液中の硝酸濃度の影響

鉄(III)溶液中の硝酸濃度が検出ピークに及ぼす影響を調べるため、鉄(III)溶液中の硝酸濃度を变化させたものを使用して、Fig. 1 のフロー系にチオシアン酸サンプルを注入し、検出されるピークの高さを比較した。鉄(III)溶液の濃度は全て 10 mM とした。その結果、Fig. 2 に示すように、0.5 M 硝酸の場合が最も感度が良かった。しかし、この場合ブランクにダブルピークが現れるため (Fig. 3)、以後の鉄(III)溶液中の硝酸濃度は、これが現れなくなる 2.0 M とした。

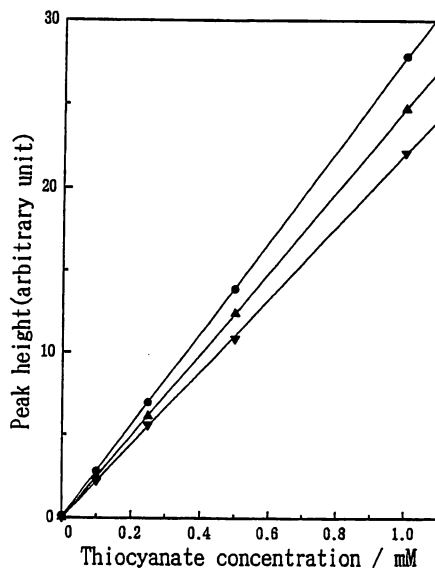


Fig. 2. Effect of nitric acid concentration in iron(III) nitrate solution on peak height. Thiocyanate samples were injected into the FIA system without the immobilized enzyme reactor; (●) 0.5 M, (▲) 1.0 M, (▼) 2.0 M nitric acid were in 10 mM iron(III) solution.

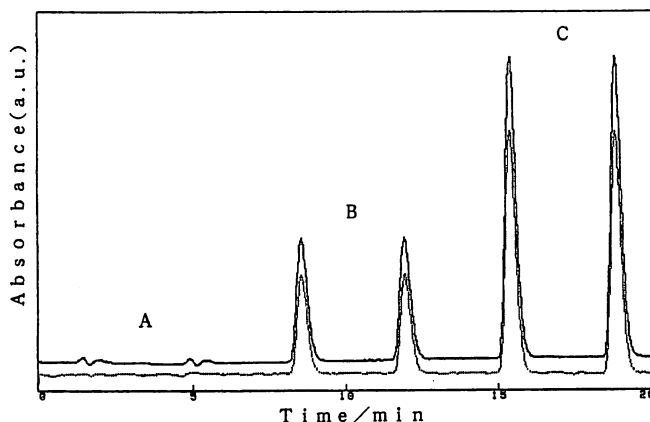


Fig. 3. FIA profiles for thiocyanate. Thiocyanate samples were injected into the FIA system without the immobilized enzyme reactor. Concentrations of thiocyanate: A) 0, B) 0.1, C) 0.25 mM. (—) 0.5 M, (---) 2.0 M nitric acid were in 10 mM iron(III) solution.

### 3・1・2 鉄(Ⅲ)溶液の濃度の影響

鉄(Ⅲ)溶液の濃度が検出ピークに及ぼす影響を調べるため、鉄(Ⅲ)溶液の濃度を変化させたものを使用してFig. 1のフロー系にチオシアン酸イオンを注入し、検出されるピークの高さを比較した。鉄(Ⅲ)溶液中の硝酸濃度は全て 2.0 Mとした。その結果、Fig. 4に示すように、鉄(Ⅲ)溶液が高濃度になるほど感度が良かった。しかし、50 mM より高濃度ではベースラインの乱れが無視できなくなるので、以後は 50 mM 鉄(Ⅲ) 溶液を使用することにした。

### 3・1・3 チオ硫酸溶液の濃度の影響

チオ硫酸溶液の濃度が検出ピークに及ぼす影響を調べるため、チオ硫酸溶液の濃度を変化させたものを使用してFig. 1のフロー系にシアン化物イオンを注入し、検出されるピークの高さを比較した。その結果、Fig. 5に示すように、10 mM チオ硫酸溶液を使用した場合に最も感度が良かった。しかし、チオ硫酸溶液が高濃度になるほど、チオ硫酸の分解による硫黄の析出が見られ、ベースラインが不安定になった。従って以後は、やや感度は劣るがベースラインの安定した 5 mM チオ硫酸溶液を使用することにした。また、2 mM チオ硫酸溶液では、酵素反応における基質としてのチオ硫酸イオンが不足するため、高濃度 (0.5 mM) 以上のシアン化物イオンをチオシアン酸イオンへと変換できなかった。

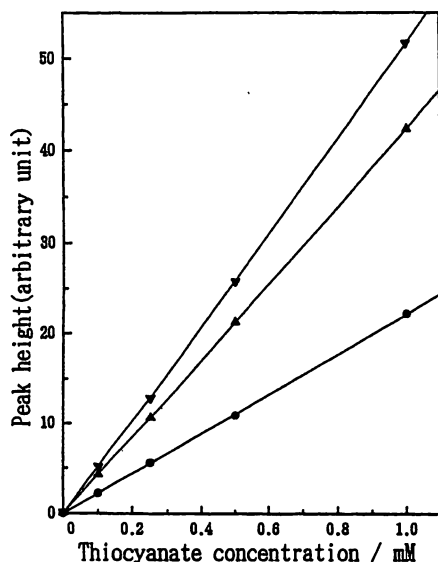


Fig. 4. Effect of iron(Ⅲ) nitrate concentration on peak height; (●) 10 mM, (▲) 30 mM, (▼) 50 mM  $\text{Fe}^{3+}$ . Thiocyanate samples were injected into the FIA system without the immobilized enzyme reactor.

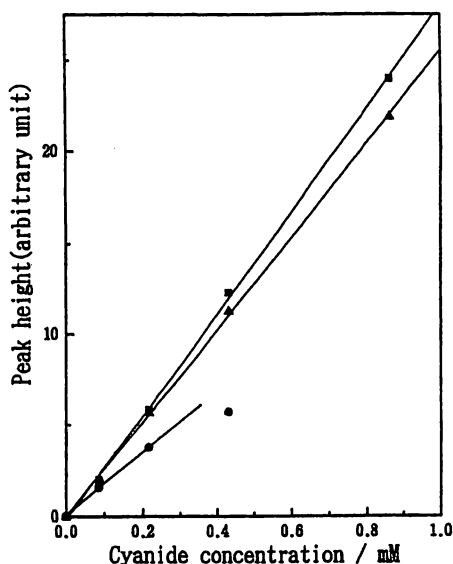


Fig. 5. Effect of thiosulfate concentration on peak height; (●) 2 mM, (▲) 5 mM, (▲) 10 mM  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . Cyanide samples were injected into the FIA system with the immobilized enzyme reactor.

### 3・1・4 固定化酵素リアクターの温度の影響

固定化酵素にとって最適な温度を調べるため、Fig. 1のフロー系における固定化酵素の温度環境を変化させ、シアン化物サンプルを注入したとき検出されるピークの高さを比較した。ロダネーゼは牛の肝臓から抽出されており、体温に近い温度環境において高い活性を示すと考えられた。しかし、固定化酵素は 37 °Cにおいて失活し、シアン化物イオンをチオシアン酸イオンへと変換しなかった。固定化酵素は 20 °Cにおいても徐々に失活し、シアン化物の変換率は時間が経つにつれ低くなった。一方、氷水に浸して 0 °C に保つと固定化酵素は安定であった。従って、固定化酵素リアクターは 0 °Cに保つことにした。

## 3・2 シアン化物の定量

### 3・2・1 検量線

以上の検討によって得られた最適条件下でシアン化物の定量を行った。シアン化物定量における検量フローシグナル例をFig. 6に示す。シアン化物イオン標準溶液から得られた検量線は、0-1.0 mMの濃度範囲で直線となり、検出限界 (S/N=3) は 15  $\mu$ Mであった。また、1時間に 20 試料の測定が可能であった。酵素を利用する他のシアン化物定量法と本法の性能を比較した (Table 1)。本法は、Fonong により報告された、チオシアン酸イオンと鉄(III)イオンとの呈色反応を利用するバッチ法による定量法<sup>2)</sup>や、Mattiasson らにより報告された酵素サーミスターによる定量法<sup>3)</sup>、および Groom と Luong により報告されたバイオセンサーによる定量法<sup>4)</sup>と比較して、検量線の直線範囲および検出限界ではほぼ同等の結果が得られた。分析速度は、酵素サーミスターと同等であるが、バイオセンサーと比べて 10 倍も迅速であり、迅速かつ簡便な点では優れた定量法であることが分かった。

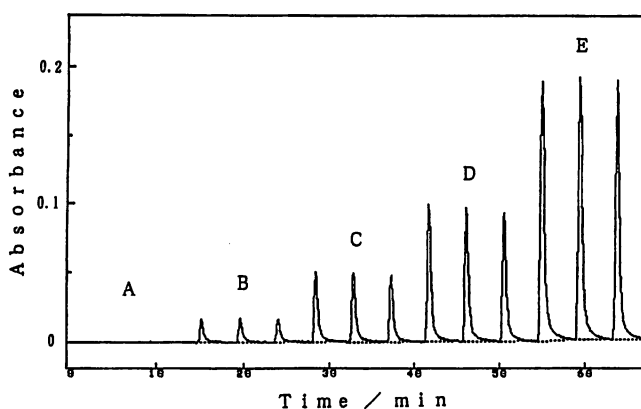


Fig. 6. FIA calibration profile for cyanide. Concentrations of cyanide: A) 0, B) 0.1, C) 0.25, D) 0.5, E) 1.0 mM.



Table 1. Comparison of the performance of the proposed method and other enzyme methods in the determination of cyanide.

	Linear range	Detection limit	Sample frequency
Proposed method	to 1 mM	15 $\mu$ M	20 samples / h
Batch method <sup>2)</sup>	to 0.8 mM	4 $\mu$ M	—————
Enzyme thermistor <sup>3)</sup>	to 1 mM	20 $\mu$ M	20 samples / h
Biosensor <sup>4)</sup>	to 1 mM	5 $\mu$ M	2 samples / h

### 3・2・2 固定化酵素リアクターの酵素反応効率

Fig. 1 のフロー系にシアン化物イオンの代わりにチオシアン酸イオンを注入し、この時検出されるピークの高さを、同じ濃度のシアン化物イオンが完全にチオシアン酸イオンへと変換された場合の検出ピーク高であると仮定して、固定化酵素リアクターによるシアン化物イオンからチオシアン酸イオン生成反応の酵素反応効率を求めた。

同じ濃度の両イオンが、それぞれ 0.25 および 0.50 mM のとき、リアクターの酵素反応効率はいずれも 47% であった。

### 3・2・3 共存イオンの影響

本法によるシアン化物定量における共存陰イオンの影響の結果を Table 2 に示す。酢酸イオン、リン酸イオン、硫酸イオンおよび亜硫酸イオンはロダネーゼを阻害することが知られているが<sup>8)</sup>、本法において、これらのイオンによる阻害の影響は見られなかった。また、アスコルビン酸イオン、クエン酸イオンは一般に尿や血漿中に存在し、それらのイオンの血漿中での標準量はそれぞれ 2-20, 9-25 ppm である<sup>9)</sup>。この濃度範囲において、クエン酸イオンは妨害しないが、アスコルビン酸イオンは妨害を示すことが分かった。一方、Fonong によれば、酢酸イオン、アスコルビン酸イオン、クエン酸イオン、ヨウ化物イオンおよび硫化物イオンは、ロダネーゼの触媒作用の下で生成するチオシアン酸イオンと鉄(Ⅲ)イオンとの呈色反応を利用するシアン化物定量法では妨害を示すと報告している<sup>2)</sup>。しかし、本法においては、アスコルビン酸イオンを除いて、これらのイオンは妨害を示さなかった。このように、一般的にシアン化物の定量において妨害を示す多くのイオンが、本法においては妨害を示さなかった。

一方、本法によるシアン化物定量における金属イオンの影響の結果を Fig. 7 に示す。

Nok らは、カルシウムイオンまたは亜鉛イオンの存在下では、ポリアクリルアミドゲルに固定化したロダネーゼの活性の向上を報告している<sup>10)</sup>。本研究ではカルシウムイオンはやや正の妨害を示し、亜鉛イオンはシアン化物イオンより高濃度存在するとき大きく負の妨害を示し、更にロダネーゼを失活させた。亜鉛イオンによる酵素の失活は、おそらく

ロダネーゼの活性部位である -S H 基と亜鉛イオンの結合によるものであろう。Nokらの結果と比較すると、カルシウムイオンについては似たような傾向があるものの、亜鉛イオンについては全く異なった結果となった。本研究では、多孔性ガラスビーズにロダネーゼを固定化して使用しており、この違いは酵素の固定化方法の違いによるものであろう。酵素は、固定化方法によってその性質が変化することが知られている。その原因として、酵素自身の変化、固定化に用いる担体の物理的あるいは化学的性質の影響が考えられるが、実際は複雑な因子が影響しあって生じた結果であり、どの原因によってどのような変化が生じたかを正確に知ることは困難である。

Table 2. Effect of foreign ions on the determination of cyanide. Cyanide concentration was 2.6 ppm.

Foreign ion	Added / ppm	Recovery / %
Acetate	26	104
	2.6	103
	0.26	103
Ascorbate	26	82
	2.6	95
	0.26	108
Citrate	26	99
Iodide	26	100
Nitrate	26	103
Phosphate	26	103
Sulphate	26	103
Sulphide	26	96
Sulphite	26	100

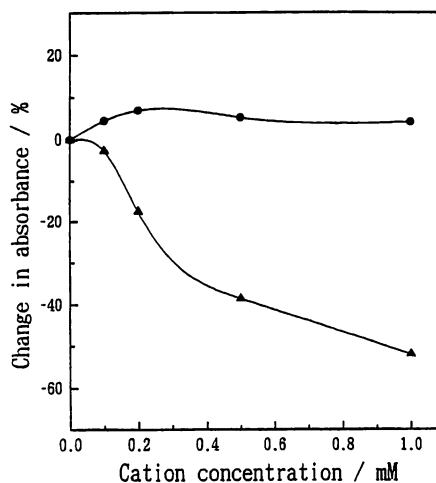


Fig. 7. Effect of foreign cations on the determination of cyanide: (●) Ca<sup>2+</sup>, (▲) Zn<sup>2+</sup>. Cyanide concentration was 0.1 mM.

### 3・2・4 固定化酵素の安定性

固定化酵素の安定性を調べるため、Fig. 1のフロー系に 0.5 mM シアン化物サンプルを連続的に注入した。その結果、Fig. 8に示すように、連続的な分析において、固定化酵素は少なくとも 10 時間は安定であった。0.5 mM シアン化物サンプルを連続 15 回注入したときの相対標準偏差は 2.3 % であった。また、測定後の固定化酵素はそのまま測定時の溶液（トリス緩衝溶液 [pH 8.6] とチオ硫酸溶液の混合溶液）に浸した状態で 4℃ で保存していたが、1 週間後まで 91 %、1 カ月後まで 83 % の活性を保っていた。チオ硫酸イオンはロダネーゼを安定化することが知られており<sup>11)</sup>、保存時に固定化酵素を浸しておく溶液にこれが含まれていることが、肝要であると思われる。

固定化酵素を利用したシアン化物の新しいフローインジェクション定量法が確立された。本法では、酵素を利用した他のシアン化物定量法と比較して、検量線の直線範囲および検

出限界ではほぼ同等の結果が得られ、迅速かつ簡便な点では優れた定量法であることが分かった。また、固定化酵素を利用することで、シアン化物定量における妨害の影響を減少させることができた。固定化酵素の安定性および保存性の結果も良好なものであり、本法は環境または臨床サンプルの分析への応用が期待できる。

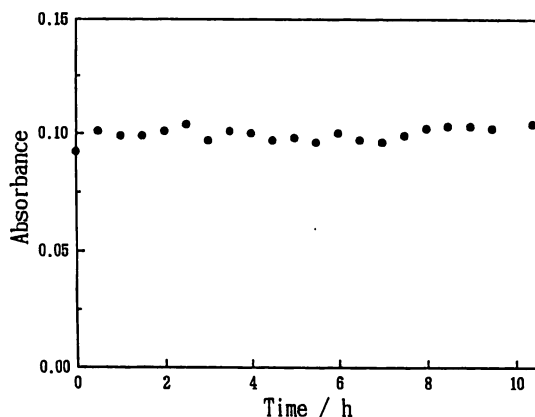


Fig. 8. Stability of the immobilized enzyme reactor. 0.5 mM cyanide samples were injected into the FIA system repeatedly.

#### 参考文献

- 1) JIS K 0102, 工業排水試験方法(1994).
- 2) T. Fonong : *Analyst*, 112, 1033(1987).
- 3) B. Mattiasson, K. Mosbach and A. Svenson : *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1643(1977).
- 4) C. A. Groom and J. H. T. Luong : *J. Biotechnol.*, 21, 161(1991).
- 5) T. Deguchi, K. Fukaura, A. Tanaka and I. Sanemasa : *J. Flow Injection Anal.*, 13, 15(1996).
- 6) L. Weng, J. Russell and R. L. Henrikson : *J. Biol. Chem.*, 253, 8093(1978).
- 7) M. E. Leon-Gonzalez and A. Townshend : *Anal. Chim. Acta*, 236, 267(1990).
- 8) H. Zollner : "Handbook of enzyme inhibitors", p. 207(1989), (VCH, Weinheim).
- 9) R. J. Henry, D. C. Cannon and Winkelman(Ed.) : "Clinical Chemistry Principles and Techniques", 2nd Ed., p. 1348 and 1938(1974), (Harper and Row, Hagerstown).
- 10) A. J. Nok, S. M. Nasir and Y. Sa' Adatu : *J. Biochem. Toxicology*, 8, 57(1993).
- 11) B. Sorbo : *Acta Chem. Scand.*, 7, 1137(1953).

(Received September 2, 1996)

(Accepted September 9, 1996)