

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4390345号  
(P4390345)

(45) 発行日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(24) 登録日 平成21年10月16日(2009.10.16)

|                         |                      |
|-------------------------|----------------------|
| (51) Int. Cl.           | F I                  |
| GO 1 N 27/30 (2006.01)  | GO 1 N 27/30 B       |
| GO 1 N 27/416 (2006.01) | GO 1 N 27/46 3 3 6 G |
| GO 1 N 33/50 (2006.01)  | GO 1 N 33/50 A       |

請求項の数 7 (全 15 頁)

|  |                               |           |  |
|--|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号  | 特願2000-64360 (P2000-64360)    | (73) 特許権者 | 507134633<br>エレメントシックス株式会社<br>東京都中央区銀座8-8-5                    |
| (22) 出願日   | 平成12年3月9日(2000.3.9)           | (74) 代理人  | 100096459<br>弁理士 橋本 剛  |
| (65) 公開番号  | 特開2001-147211 (P2001-147211A) | (74) 代理人  | 100104938<br>弁理士 鶴澤 英久   |
| (43) 公開日   | 平成13年5月29日(2001.5.29)         | (72) 発明者  | 藤嶋 昭<br>神奈川県川崎市中原区中丸子710番地5                                    |
| 審査請求日  | 平成19年3月7日(2007.3.7)           | (72) 発明者  | ドナルド アレクサンダー トリック<br>東京都世田谷区代田4丁目24番17号<br>羽根木公園 ガーデンホーム 102号室 |
| (31) 優先権主張番号   | 特願平11-149143                  | (72) 発明者  | エレナ ポパ<br>東京都世田谷区瀬田5丁目5番8号                                     |
| (32) 優先日   | 平成11年5月28日(1999.5.28)         |           |  |
| (33) 優先権主張国  | 日本国(JP)                       |           |  |
| (31) 優先権主張番号   | 特願平11-184525                  |           |  |
| (32) 優先日   | 平成11年6月30日(1999.6.30)         |           |  |
| (33) 優先権主張国  | 日本国(JP)                       |           |  |
| 特許法第30条第1項適用 平成11年4月1日横浜国立大学において開催された社団法人電気化学会第66回大会において発表 |                               |           |  |
|  |                               |           | 最終頁に続く   |

(54) 【発明の名称】 陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用した尿酸測定方法とそのダイヤモンド薄膜電極及び陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用した尿酸測定センサと尿酸測定装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

尿酸を含んだ溶液を被測定液とし、陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を前記被測定液中に対極とともに浸漬した後、一定の電位掃引速度で操作してそのダイヤモンド薄膜電極の電気信号変化曲線から尿酸を識別するようにしたことを特徴とする陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用した尿酸測定方法。

【請求項2】

前記被測定液が酸性域の溶液であることを特徴とする請求項1記載の陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用した尿酸測定方法。

【請求項3】

酸またはアルカリの何れかの電解液中にダイヤモンド薄膜電極を入れ、そのダイヤモンド薄膜電極に酸化反応が起こる電気量を流して、そのダイヤモンド反応表面に陽極酸化処理を施したことを特徴とする陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極。

【請求項4】

前記酸はH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、HClO<sub>4</sub>、HClからなることを特徴とする請求項3記載の陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極。

【請求項5】

前記アルカリはKOH、NaOHからなることを特徴とする請求項3記載の陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極。

【請求項6】

セル本体と、このセル本体に形成され、被測定液が供給される空間部と、この空間部内の被測定液に浸漬されて設けられ、作用電極として動作する陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極と、このダイヤモンド薄膜電極から一定の間隔を隔てて空間部内の被測定液に浸漬された参照電極および対電極とを備えたことを特徴とする陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用した尿酸測定センサ。

【請求項7】

作用電極として動作する陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極、参照電極および対電極とを空間部に有する尿酸測定センサ本体と、このセンサ本体の空間部内に被測定液が供給され、陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極、参照電極および対電極からの信号を検出制御する信号制御検出部と、この検出部で検出制御された信号が供給され、この信号から物質を分析する分析装置とを備えたことを特徴とする尿酸測定装置。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この発明は、陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用した尿酸測定方法とそのダイヤモンド薄膜電極及び陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用した尿酸測定センサと尿酸測定装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

尿酸は、生体内プリン代謝の終末産物で、外因性に食事中的プリン体、内因性に体組織核酸の崩壊により生成するプリン体と核タンパクを経ずに直接合成されるプリン体などに由来する。血清中では、一部アルブミンと結合し、残りは遊離型として存在し、血球中の濃度は血清の約半分である。成人の体内尿酸プールは1g～2g程度で大部分は血管外に分布している。成人の尿中尿酸排泄量は、1日0.4g～0.8gであり、その量は体内のプリン代謝を反映している。

20

【0003】

尿酸は腎系球体から濾過されたのち、大部分尿細管で再吸収され、尿中尿酸は、主に尿管からの分泌によるものである。したがって、高尿酸血症は、体内における生成亢進（通風など）と腎からの排泄異常に起因するほか、高血圧症、肥満などにも見られることがあり、これらの高尿酸血症は代謝異常性疾患として注目されている。

30

【0004】

上記尿酸の測定方法には、下記に示す還元法とウリカーゼ（酵素）法が用いられている。（a）還元法

この還元法は、尿酸がアルカリ溶液中でリンタングステン酸を還元して青色のタングステンブルーを生成する反応を用いる方法で、感度の増大、呈色液の混濁の防止、呈色の安定化などの目的から、種々のアルカリ化剤が考案されている。これらの中で、炭酸ナトリウムを使用するCarawayらの方法とその変法が普及している。血清中の尿酸以外の反応物質として、アスコルビン酸・SH化合物・フェノールなどがある。アスコルビン酸は、試料または試料除タンパク液にアルカリを加え放置することによってほとんど影響がなくなる。次に、リンタングステン酸還元法について述べる。

40

【0005】

まず、原理について述べるに、血清のタングステン酸除タンパク濾液に $\text{Na}_2\text{CO}_3$ を加え、非尿酸性のクロモゲン（クロモゲン）を分解し、リンタングステン酸試薬を加え生成するタングステン青を比色測定する。なお、尿素は呈色混合液の混濁を防止するために添加する。

【0006】

試薬としては、タングステン酸除タンパク試薬、リンタングステン酸試薬原液、リンタングステン酸試薬使用液、14%炭酸ナトリウム尿素溶液、100mg/dl尿酸標準液などを使用する。検量線として、100mg/dl尿酸標準液を水で希釈して数種類の使用標準液を臨用調製する。これらの使用標準液は血清尿酸濃度に相当する。検量線が、直線であることが確かめられれば、毎回の測定には、水（盲検）と0.5mg/dlの標準液について実施すればよい。

50

## 【0007】

実施には、まず、三角フラスコに血清1.0ml、水8.0mlおよび2/3N硫酸0.5mlをとり混和し、さらに10%タングステン酸ナトリウム0.5mlを加え、振盪混和し20分放置したのち、内容を中試験管にうつして、3000rpm、10分遠心する。次に、3本の中試験管A、S、Bを用意し、Aには濾液3.0ml、Sには使用標準液3.0ml、Bには盲検用として水3.0mlをとる。その後、各管へ炭酸ナトリウム、尿素溶液1mlづつを加えて混和し、20分放置する。各管へリンタングステン酸使用液0.5mlずつ加え、よく混和後、完全発色まで15分間放置する。30分以内に、盲検Bを対象に710nm(660nmでもよい)で試料Aおよび標準液Sの吸光度を測定し、それぞれを $E_A$ 、 $E_S$ とする。この $E_A$ 、 $E_S$ を用いて次式から血清尿酸濃度を求める。

$$\text{血清尿酸濃度} = (E_A / E_S) \times 5\text{mg/dl}$$

10

## (b) ウリカーゼ法

このウリカーゼ法は、尿酸を酸化してアラントインと $H_2O_2$ を生成する酵素で、特異性が高く、その定量に広く利用されるようになった。

## 【0008】

これには、1 尿酸が293nmに吸収極大をもつことを利用してウリカーゼ反応前後の試料293nmの吸収の減少を測定する方法、2 ウリカーゼとペルオキシダーゼを共役させて、 $H_2O_2$ による4-アミノアンチピリン-フェノール系(またはアニリン系)やMBTH-DMA系の酸化呈色を測定する方法、3 ウリカーゼとカタラーゼを共役させ、 $H_2O_2$ によりメタノールをホルムアルデヒドに酸化し、後者をアセチルアセトン法で呈色させる方法、4  $H_2O_2$ 選択透過性膜にウリカーゼを固定化して $H_2O_2$ 電極にかぶせた酵素膜電極法などがある。次に、ウリカーゼ-カタラーゼ法とウリカーゼ-ペルオキシダーゼ法について述べるに、まず、前者のウリカーゼ-カタラーゼ法について述べる。

20

## 【0009】

まず、この法の原理について述べる。この法は、尿酸にウリカーゼを作用させ、生成する $H_2O_2$ によりカタラーゼの存在下でメタノールを酸化してホルムアルデヒドとし、これをアセチルアセトンおよびアンモニウム塩で発色させ、生成する黄色調を410nmで比色する。この方法は、特異性と正確度がすぐれ、種々の干渉物質の影響も少ない優れた方法である。しかし、測定が短波長であるため、試料盲検が必要である。これには、除タンパクと直接法があるが、一般には後者が用いられる。

## 【0010】

試薬としては、メタノール・アセチルアセトン溶液、カタラーゼ・アンモニウム塩溶液、ウリカーゼ・カタラーゼ・アンモニウム塩溶液、100mg/dl尿酸保存標準液や10mg/dl尿酸標準液などがある。通常、100mg/dl尿酸保存標準液を水でうすめて2、4、6、8、10mg/dl標準液系列を作り、以下実施と同様にして検量線を作製し、その直線性が確かめられれば、毎回の測定には、10mg/dl標準液のみでよい。

30

## 【0011】

実施には、まず、4本の試験管A、B、S、SBを用意し、A、B両管には検体(尿の場合には水で10倍に希釈)0.2mlづつをとり、S、SB両管には10mg/dl標準液0.2mlづつをとる。その後、各管にメタノール・アセチルアセトン溶液1.0mlを加えて混和した後、本試験用のA、S両管に反応試薬2.0mlづつを、盲検用のB、SB管には、盲検試薬2.0mlづつを加えて混和し、各管を37、70分間加温する。そして、反応終了後水冷し、410nmで水を対照として各管の吸光度 $E_A$ 、 $E_S$ 、 $E_B$ 、 $E_{SB}$ を測定する。この測定結果から次式を用いて尿酸濃度を得る。

40

## 【0012】

$$\text{尿酸濃度 (mg/dl)} = 10 \times (E_A - E_B) / (E_S - E_{SB})$$

なお、上記式において、尿の場合は10倍する。

## 【0013】

次に、ウリカーゼ-ペルオキシダーゼ法について述べるに、まず、原理について述べる。この法は、尿酸をウリカーゼにより酸化し、生成した $H_2O_2$ により、POD存在下で4-アミノアンチピリンとカップリング試薬の酸化縮合を起こさせ、生成キノン色素を比色す

50

る。尿酸は血清中のモル濃度が低いから、測定感度を上げるとともに、試料中のヘモグロビンやビリルビンの色調の影響を少なくするために、生成キノン色素の最大吸収波長が550~600nmの長波長側にあるアニリン系やm-トルイジン系のカップリング試薬が利用されている。ここでは、m-トルイジン系のN-エチルN-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン(EMAE)を用いる方法について記す。

**【0014】**

試薬としては、緩衝液0.1Mリン酸緩衝液pH6.0, 色原体EMAEを1.2mMに含有、発色試液および10mg/dl尿酸標準液を用い、実施するには、3本の試験管A, S, Bを用意し、Aに試料、Sに標準液、Bに精製水のそれぞれ50 $\mu$ l(マイクロリットル)ずつとる。次に、各試験管に発色試液を3.0mlずつを加え、37 $^{\circ}$ Cで5分間加温する。その後、盲検用のB管を対照として、550nmでA, S管の吸光度を測定し、 $E_A$ ,  $E_S$ とし、次式で尿酸濃度を計算する。

**【0015】**

尿酸濃度 =  $10 \times E_A / E_S$  mg/dl

**【0016】****【発明が解決しようとする課題】**

上述のような尿酸の測定には、熟練と検体の測定に時間を要するために、近年、熟練者でなくとも誰でも、簡単容易にその場で測定できる試みがなされて来ている。その1つに、酵素センサを使用する手段があるが、最近、ダイヤモンド薄膜電極が開発されるようになって、このダイヤモンド薄膜電極を使用して尿酸を測定する試みがなされるようになりつつある。

**【0017】**

ところが、上記ダイヤモンド薄膜電極で、尿酸を直接検出することができれば問題はないが、尿酸には、アスコルビン酸が生態学的流体中で共存している。例えば、尿中の尿酸濃度は、約2~2.5m(mol/l)であり、血清(血液)中では、約50~60 $\mu$ (mol/l)である。しかも、アスコルビン酸の濃度は、尿酸の濃度の約20~30倍も多い。このため、通常、尿酸測定に使用するサンプルは、全て100~5000倍程度に希釈した溶液が用いられる。このように希釈するのは、サンプルのマトリックス効果(例えば、ある種のタンパク質とか他の電気的活性生体物)を減ずるのに役に立つ。

**【0018】**

上記のように、尿酸にはアスコルビン酸が共存しているため、ダイヤモンド薄膜電極を使用した尿酸測定センサでも顕著に尿酸とアスコルビン酸とを識別して検出することが困難である。

**【0019】**

この発明は上記の事情に鑑みてなされたもので、経年変化もなくまた、尿酸とアスコルビン酸とを明確に識別できる陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極とを使用した尿酸測定方法とそのダイヤモンド薄膜電極及び陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用した尿酸測定センサと尿酸測定装置を提供することを課題とする。

**【0020】****【課題を解決するための手段】**

上記の課題を達成するために、第1発明は、尿酸を含んだ溶液を被測定液とし、陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を前記被測定液中に対電極とともに浸漬した後、一定の電位掃引速度で操作して陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極の電気信号変化曲線から尿酸を識別するようにしたことを特徴とするものである。

**【0021】**

第2発明は、前記被測定液が酸性域の溶液であることを特徴とするものである。

**【0022】**

このとき被測定液は、pH<2.7であることが好ましく、pH=1前後であることが更に好ましい。なお、被測定液のpHは、測定を行う装置等が強酸液の影響を受けることのないよう配慮して、適宜に下限の値を設定することが可能である。

10

20

30

40

50

## 【0023】

第3発明は、酸またはアルカリの何れかの電解液中にダイヤモンド薄膜電極を入れ、そのダイヤモンド薄膜電極に酸化反応が起こる電流量を流して、そのダイヤモンド反応表面に陽極酸化処理を施したことを特徴とするものである。

## 【0024】

第4発明は、前記酸が $H_2SO_4$ 、 $HClO_4$ 、 $HCl$ からなることを特徴とする請求項3記載の陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極。

## 【0025】

第5発明は、前記アルカリが $KOH$ 、 $NaOH$ からなることを特徴とするものである。

## 【0026】

第6発明は、セル本体と、このセル本体に形成され、被測定液が供給される空間部と、この空間部内の被測定液に浸漬されて設けられ、作用電極として動作する陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極と、このダイヤモンド薄膜電極から一定の間隔を隔てて空間部内の被測定液に浸漬された参照電極および対電極とを備えたことを特徴とするものである。

10

## 【0027】

第7発明は、作用電極として動作する陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極、参照電極および対電極とを空間部に有する尿酸測定センサ本体と、このセンサ本体の空間部内に被測定液が供給され、陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極、参照電極および対電極からの信号を検出制御する信号制御検出部と、この検出部で検出制御された信号が供給され、この信号から物質を分析する分析装置とを備えたことを特徴とするものである。

20

## 【0028】

## 【発明の実施の形態】

以下この発明の実施の形態を図面に基づいて説明する。まず、実施の形態を説明する前に、実施の形態で使用するボロンドープダイヤモンド薄膜の作製方法について述べる。

## 【0029】

ボロンドープ多結晶ダイヤモンド薄膜は、高圧力下（プラズマアシストCVDの場合、通常は133.322Paの数倍の圧力下）で2.45GHzのマイクロ波プラズマアシストCVD法を用いて以下のように作製した。なお、装置には、ASTEX社製のマイクロ波CVD成膜装置を用いた。

## 【0030】

基板には、シリコン基板{Si(100)}を用い、基板表面をテクスチャー処理（例えば、0.5 $\mu m$ のダイヤモンド粉で研磨した）した後、基板ホルダにセットした。成膜用ソースとしてアセトンとメタノールの混合物（混合比9：1体積比）を用い、その混合物に酸化ホウ素( $B_2O_3$ )を、ホウ素/炭素比(B/C比)で $10^4$ ppmとなる量を溶解したものをを用いた。

30

## 【0031】

この成膜用ソースにキャリアーガスとして、純 $H_2$ ガスを通した後、チャンバー内に導入し、あらかじめ別ラインで水素（例えば532cc/min）を流して所定の圧力（例えば、 $115 \times 133.322$ Pa）となるように調整した。そして、2.45GHzのマイクロ波電力を注入し、放電させた後、電力が5kWとなるように調整した。安定したところで、成膜用ソース（液体）にキャリアーガスとして、 $H_2$ （15cc/min）を流して成膜を行った。成膜速度は1~4 $\mu m/h$ であった。約30 $\mu m$ の厚みは時間で調整した。また、本装置では、特に基板を加熱することはしなかったが、定常状態では、ほぼ850~950 となる。

40

## 【0032】

このようにして作製したホウ素( $B^{3+}$ )をドープした多結晶ダイヤモンド薄膜のラマンスペクトルをとると、 $1333cm^{-1}$ に単一ピークのみ観測され、 $1400 \sim 1600cm^{-1}$ のアモルファス状炭素は認められなかった。また、電気伝導度は約 $10^{-3} \cdot cm$ 程度であり、0.5M  $H_2SO_4$ 中で、サイクリックボルタモグラムを測定した結果は、-1.25~+2.3V (vs.SHE)の広い電位窓を持つことが判明した。

## 【0033】

50

ここで、上記のようにCVD法で成膜されたダイヤモンド薄膜を電極としてそのまま使用して、尿酸をアスコルビン酸の存在下で検出すると、後述する測定結果から尿酸が明確に検出できないので、ダイヤモンド薄膜電極に何らかの手段を施す必要がある。

【0034】

このため、上記のように作製されたダイヤモンド薄膜電極を陽極酸化処理したこの発明の実施の第1形態について述べる。この陽極酸化処理は、0.1M KOH溶液中にダイヤモンド薄膜電極をセットアップし、2.4V (vs.SCE) の電圧を75分間印加して、陽極酸化を行うものである。この場合、特に必要な時には、0.1M KOH溶液中で+4Vから-4V (vs.SCE) を0.1V/secの速さで、3回スイープしたのち、4Vで1分間保持する処理を行った。なお、本実施の形態においては、陽極酸化処理に0.1M KOH溶液を用いたが、これに代えて0.1MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液又はHClO<sub>4</sub>溶液等ダイヤモンド表面を陽極酸化できる酸(例えば、HCl)やアルカリ溶液(例えば、NaOH)を用いてもよい。

10

【0035】

図1はこの実施の第1形態である陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用したときのディファレンシャルパルスボルタングラム(DPV)で、この図1から尿酸(UA)のピークはシャープで明瞭であり、アスコルビン酸(AA)のピークはブロードで不明瞭である。この結果から尿酸の検出は陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用すると明確にできるようになる。

【0036】

1 図1の結果は50μMと高濃度のアスコルビン酸を入れたものを使用した結果である。

20

【0037】

2 実際に尿酸等の測定を行う場合には、極めて微量の試料で検出できることが必要である。

【0038】

3 そこで、極めて微量な試料での測定を試みた。

【0039】

図2は、この実施の第1形態による陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用したときのポテンシャルステップ・クロノアンペロメトリー(PSCA)の応答特性図で、この特性図から以下に示すように、この実施の第1形態のダイヤモンド薄膜電極を使用すると、非常に低濃度の尿酸を含むサンプル量でも、明確に測定が可能であることが判明した。例えば、アスコルビン酸5μMの共存下で50nMの尿酸を検出できる(濃度比は100倍と大きい)。上記PSCAは、平衡にある電極系に、外部回路によって電位を加えると平衡が破れ、電解電流が観察される。流れる電流は時間の関数で、時間とともに減少し、長時間後には、ついにゼロになる。PSCAは、このような電位ステップに対して得られる電流-時間応答を調べる方法である。

30

【0040】

図2において、曲線aは、0.1M HClO<sub>4</sub>溶液、曲線bは、5μM AA + 0.1M HClO<sub>4</sub>、曲線cは5μM AA + 50nM UA、0.1M HClO<sub>4</sub>のときの測定結果である。なお、ポテンシャルステップは、0V~0.92V (vs.SCE) {0.92V (vs.SCE)は、図7のデータにおいて確認したUAピークの値を使用している}、サンプリングタイムは500msである。

40

【0041】

図3は上記PSCAにおけるバックグラウンド電流の応答特性図で、条件は上記図2の場合と同様である。この応答特性図からa~cのデータには、ほとんど差がないことで信頼性が確保できる。

【0042】

上記のように信頼性が確保できた図3のデータを基に、図4に示す尿酸の検量線を得た。この図4に示す検量線図において、実線は、アスコルビン酸が含まれていない場合、破線は、1μMのアスコルビン酸が含まれている場合、一点鎖線は5μMのアスコルビン酸が含

50

まれている場合の検量線である。この検量線より、約0.7 n Mという極めて微量な試料の検出が可能であることが確認できた。

【0043】

なお、上記陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極は長期間安定して測定できることが実験により判明した。これにより、ダイヤモンド薄膜電極の信頼性と安定性は、実サンプル中の尿酸のルーチン分析法として使用できることも判明した。表1は、上記実験に使用した実サンプル(尿サンプル)中の濃度を示したもので、表中において、A, B, C, E, F, Gは男性の尿サンプル、D, Hは女性の尿サンプルである。この表1の濃度数値からも尿酸の測定が可能であることが明らかである。

【0044】

【表1】

| 尿サンプル  | 濃度 (mg/d l) |
|--------|-------------|
| A : 男性 | 33.9        |
| B : 男性 | 56.61       |
| C : 男性 | 39.4        |
| D : 女性 | 15.1        |
| E : 男性 | 34.2        |
| F : 男性 | 40.3        |
| G : 男性 | 70.5        |
| H : 女性 | 102.5       |

【0045】

上述した処理により陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を、この発明の実施の第2形態として、尿酸を検出する測定センサとして構成した概略構成説明図を図5に示す。この測定センサは、図5に示すように、セル本体10内の空間部11に被測定液である試料溶液12を入れ、その空間部11内の試料溶液12に、作用電極13(構成は後述する)、参照電極14および対電極15が浸漬されて構成されている。作用電極13は、シリコン基板13aの表面に陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極13bを形成した後、シリコン基板13aを取付基板13cに固着し、その取付基板13cをパイプ13dに固着

してシリコン基板 13 a、ダイヤモンド薄膜電極 13 b、取付基板 13 c およびパイプ 13 d の先端部をエポキシ樹脂 13 e で固めて構成されている。

【0046】

なお、ダイヤモンド薄膜電極 13 b が試料溶液 12 と接触する面にはエポキシ樹脂 13 e を付着させないようにする。16 はダイヤモンド薄膜電極 13 b に接続されたリード線で、このリード線 16 はパイプ 13 d 内を通して外部に導出する。また、セル本体 10 は箱状に形成されているので、カバー 17 により蓋をする。

【0047】

上記のように構成された尿酸測定センサは、次に述べるようなシステムに使用される。

【0048】

図 6 は、この発明の実施の第 3 形態を示す尿酸測定装置の概略構成説明図で、図 5 に示した第 2 形態と同一部分には、同一符号を付して説明する。図 6 において、21 は図 5 で説明した尿酸測定センサ本体で、この尿酸測定センサ本体 21 を構成するセル本体 10 の空間部 11 内には、尿酸を含む試料溶液 12 が入れられる。尿酸測定センサ本体 21 には、作用電極 13、参照電極 14 および対電極 15 が設けられ、これら各電極 13、14 および 15 からはリード線 16、23 および 24 が、引き出される。リード線 16 ~ 24 はポテンショガルバノスタットからなる信号制御検出部 25 に導かれる。信号制御検出部 25 は、各電極で検出した電気信号を、コンピュータからなる分析装置 26 に送り、ここで、試料溶液中の物質、すなわち尿酸が分析される。

【0049】

図 7 は上記図 6 の尿酸測定センサシステムを使用して測定した結果のサイクリックボルタングラムで、この測定には、0.2mM の尿酸と 1mM のアスコルビン酸の混合物を 0.1M HClO<sub>4</sub> の溶液に入れた被測定液を使用した。図 7 において、図中破線は酸化処理をしていないダイヤモンド薄膜電極で測定した結果であり、実線はこの発明の実施の形態による測定結果である。なお、電位掃引速度は、100mV/s である。この図 7 の実線から、陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極を使用すると、尿酸とアスコルビン酸とを明確に識別することができた。

【0050】

そこで、酸化処理していないダイヤモンド薄膜電極と、陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜電極との比較を行った。図 8 A、B 及び図 9 A、B は、後述するディファレンシャルパルスボルタングラム (DPV) による陽極酸化処理前のダイヤモンド薄膜電極と陽極酸化処理後のダイヤモンド薄膜電極による尿酸 (以下 UA と略称する) とアスコルビン酸 (以下 AA 略称する) の測定結果である。

【0051】

前記 DPV は、図 10 に示すように、パルス幅 ( $E = |E_{i,n} - E_{s,n}|$ ) は一定であり、 $E_{i,n}$  が変化している。通常、パルス幅は 10 ~ 100mV、パルス電解時間  $t$  は 5 ~ 100ms、待ち時間は 0.5 ~ 180s である。さらに、電流のサンプリングを 2 点で行う。すなわち、電位ステップする直前  $t_{s1}$  と電位ステップが終わる直前  $t_{s2}$  であり、出力としては、この 2 点で測定した電流の差  $i$  を電位に対して取り出すと図 11 に示すようになる。このようにして得られる電流 - 電位曲線を DPV と称している。

【0052】

図 8 A は陽極酸化処理前のダイヤモンド薄膜電極においてもピークが得られるが、この発明の実施の形態による陽極酸化処理後のダイヤモンド薄膜電極の方がピークの値も高くなるので、より明確に検出できるようになる。また、図 9 A はアスコルビン酸の測定結果で陽極酸化処理前のダイヤモンド薄膜電極では、0.68V のピーク電圧  $E_p$  が生じるが、図 9 B の陽極酸化処理後のダイヤモンド薄膜電極の場合には、明確なピークがなくなる。このため、図 8 B、図 9 B から尿酸とアスコルビン酸の識別が、この実施の形態を使用すると明確にできるようになる。

【0053】

図 8 A、図 9 A では、UA と AA とで各々明確なピーク電圧  $E_p$  が確認できるが、その時

10

20

30

40

50

の電位が何れも約0.7V ( $v_{S,SCE}$ ) 前後で重なるため、UAとAAが混在している場合には、各々分離したピーク電圧を確認することは困難であり、微量の試料では確認することができない。一方、図8B、図9Bの陽極酸化処理したダイヤモンド薄膜電極を用いた測定結果では、何れの場合も電位がシフトしていることが確認でき、特に、図9Bでは陽極酸化処理していない電極(0.7V  $v_{S,SCE}$ )と比較して、明確なピークがなく、且つ電位が1.15V ( $v_{S,SCE}$ )までシフトしていることが確認された。

#### 【0054】

これらの結果から、陽極酸化処理したダイヤモンド薄膜電極を用いることにより、UAとAAの混在する被測定液についてもUAとAAとを分離して検出可能であることが確認できた。なお、測定に使用した溶液は、0.1M  $HClO_4$ の溶液中に、図8では50 $\mu$ MのUAを、図9では50 $\mu$ MのAAを入れたものを使用した。電位掃引速度は10mV/sである。

10

#### 【0055】

次に、尿酸とアスコルビン酸各々のピーク電圧 $E_p$ とpHとの関係を確認するため、尿酸、アスコルビン酸を含む溶液を被測定液とし、被測定液のpHを変えてDPVにより各々ピーク電圧 $E_p$ の測定を行った。その結果を図12に基づいて説明する。図12の結果から、一般に酸性域とされる $pH < 7$ のほとんどの範囲で尿酸とアスコルビン酸とを分離して測定できることが確認でき、特に $pH < 2.70$ においては、尿酸とアスコルビン酸各々のピーク電圧 $E_p$ の値の差が大きくなっていくことが確認できた。このことから尿酸等の測定を行う際には、被測定液が酸性域の溶液であることが好ましく、 $pH < 2.70$ とすることで尿酸とアスコルビン酸との分離をより明確とすることができる。また、pH 2、特に $pH = 1$ 前後においては、尿酸とアスコルビン酸との分離が極めて明確となることが確認できたことから、実際に測定を行う際には、 $pH = 1$ 前後に設定することが好ましい。なお、pHの下限の値としては、測定装置等が強酸液の影響を受けることの無いように配慮して、適宜に設定することができる。

20

#### 【0056】

更に、陽極酸化処理を行ったダイヤモンド薄膜電極を、フローセルの作用電極として用い、尿酸とアスコルビン酸のフローインジェクション分析を行ったところ図13に示す測定結果が得られ、フローインジェクション分析においても尿酸、アスコルビン酸を各々異なるピーク電流として測定できることが確認できた。

#### 【0057】

このときの測定条件としては、フローセル容積20 $\mu$ lに、移動相として0.1Mの $HClO_4$  ( $pH = 0.9$ )を1ml/minの流速で流し、UA = 50nM、AA = 1 $\mu$ Mを各々注入した。測定電位は、+0.93V (vs Ag/AgCl)とした。この結果、図13に示すように尿酸とアスコルビン酸各々について、注入を行わないブランク(blank)の電流値と比較しても、明確に識別できるピーク電流を測定することができた。なお、この測定結果から、このダイヤモンド薄膜電極を用いることで、 $pH < 1$ である $pH = 0.9$ においても、尿酸とアスコルビン酸とを分離して測定できることが確認できた。

30

#### 【0058】

##### 【発明の効果】

以上述べたように、この発明によれば、陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜を使用すると、尿酸とアスコルビン酸とを明瞭に識別して検出することができ、しかも長期間安定して測定することもできる利点があり、また、極めて低濃度の尿酸を検出が可能となり、しかも、熟練者でなくとも簡単にかつその場で尿酸の測定が可能となるなどの優れた利点がある。

40

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の実施の第1形態による方法における尿酸とアスコルビン酸との測定検出結果を示す特性図。

【図2】ポテンシャルステップクロノアンペロメトリーによる極めて少ないサンプル量での応答特性図。

【図3】ポテンシャルステップクロノアンペロメトリーによるバックグラウンド電流の応答

50

特性図。

【図 4】尿酸濃度の検量線図。

【図 5】この発明の実施の第 2 形態を示す尿酸測定センサの概略構成説明図。

【図 6】この発明の実施の第 3 形態を示す尿酸測定装置の概略構成説明図。

【図 7】陽極酸化処理されていないダイヤモンド薄膜と陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜による尿酸とアスコルビン酸の検出結果の特性図。

【図 8】A は陽極酸化処理されていないダイヤモンド薄膜による尿酸の検出結果、B は陽極酸化処理されたダイヤモンド薄膜による尿酸の検出結果を示す特性図。

【図 9】A は陽極酸化処理されていないダイヤモンド電極によるアスコルビン酸の検出結果、B は陽極酸化処理されたダイヤモンド電極によるアスコルビン酸の検出結果を示す特性図。

10

【図 10】DPV における電位パルスの印加モードおよび得られる電流のサンプリング方法説明図。

【図 11】ディファレンシャル パルス ボルタモグラム。

【図 12】DPV によるピーク電圧  $E_p$  と pH の関係特性図。

【図 13】フローインジェクション分析結果による特性図。

【符号の説明】

10 ... セル本体

11 ... 空間部

12 ... 試料溶液

13 ... 作用電極

13 a ... シリコン基板

13 b ... ダイヤモンド薄膜電極

13 c ... 取付基板

13 d ... パイプ

13 e ... エポキシ樹脂

14 ... 参照電極

15 ... 対電極

21 ... 尿酸測定センサ本体

16、23、24 ... リード線

25 ... 信号制御検出部

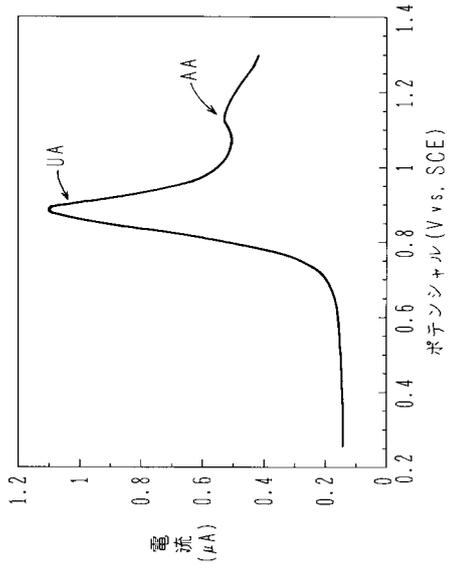
26 ... 分析装置

20

30

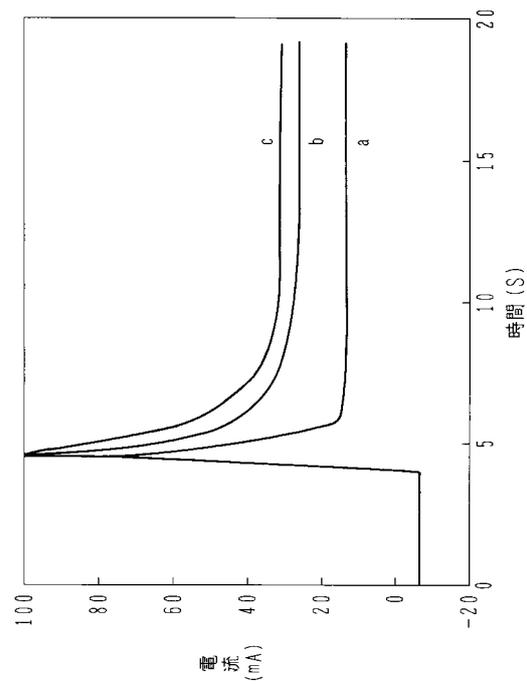
【 図 1 】

実施の第1形態による尿酸(UA)とアスコルビン酸(AA)の測定検出結果を示す特性図



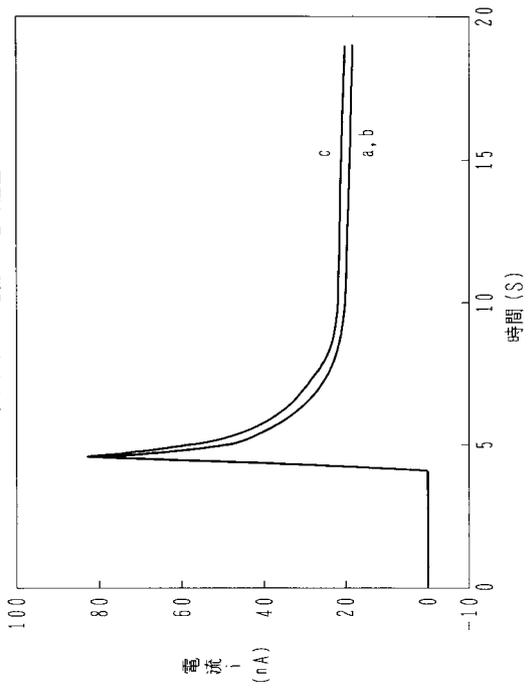
【 図 2 】

極めて少ないサンプル量での応答特性図



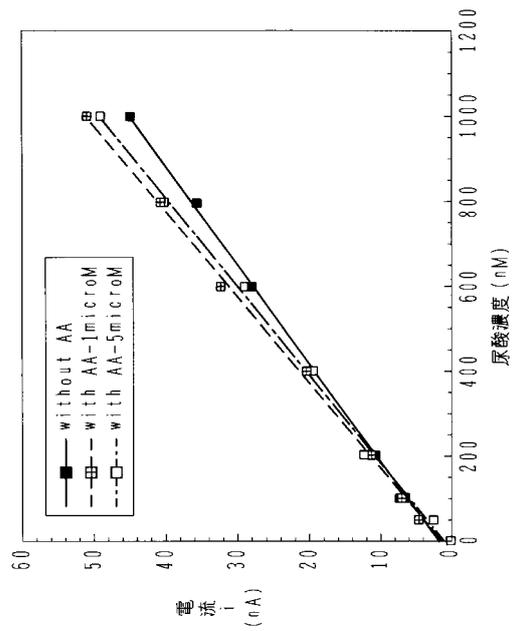
【 図 3 】

バックグラウンド電流の応答特性図



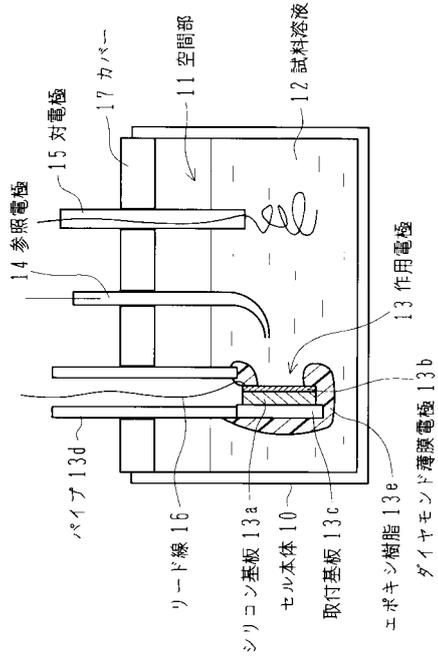
【 図 4 】

尿酸濃度の検量線図



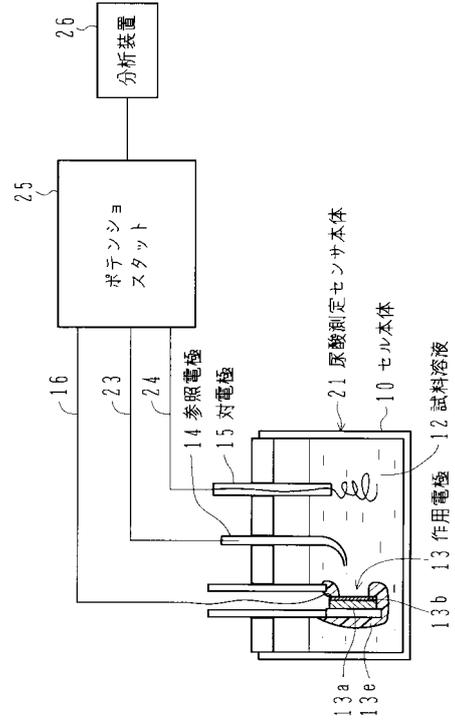
【 図 5 】

第2形態を示す尿酸測定センサの概略構成説明図



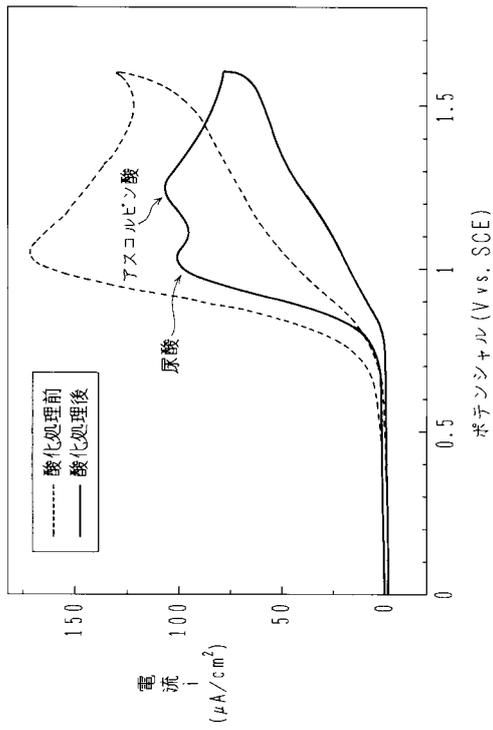
【 図 6 】

第3形態を示す尿酸測定装置の概略構成説明図



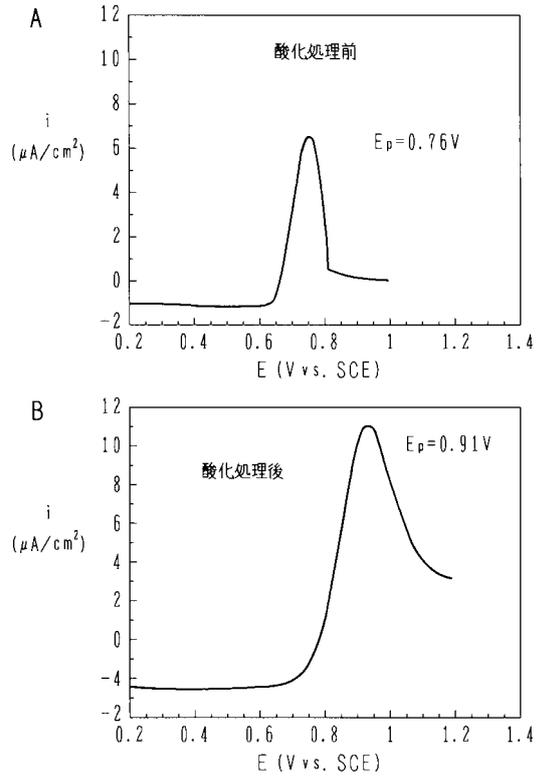
【 図 7 】

尿酸とアスコルビン酸の検出結果特性図

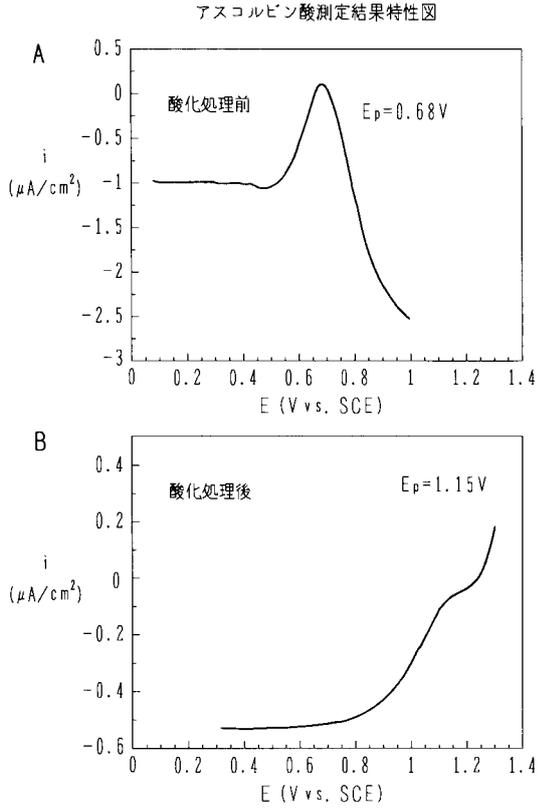


【 図 8 】

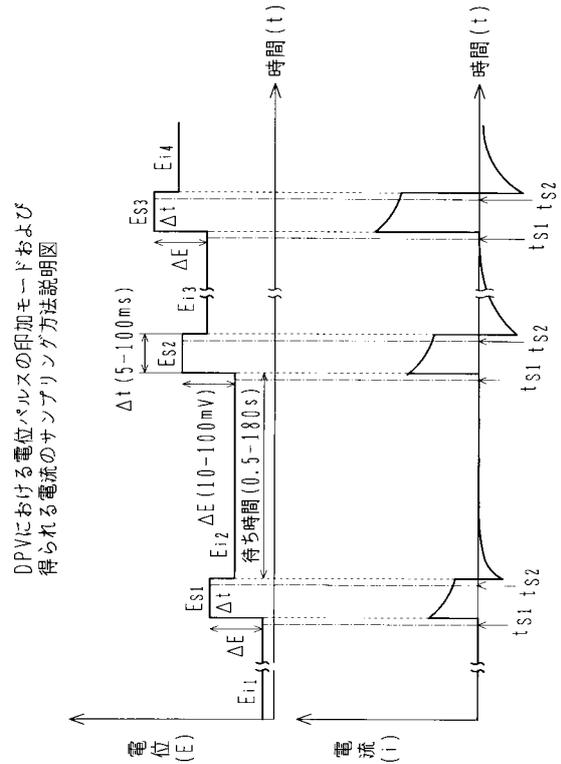
尿酸測定結果特性図



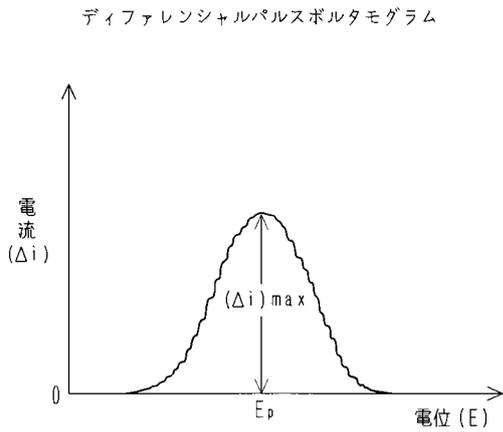
【 図 9 】



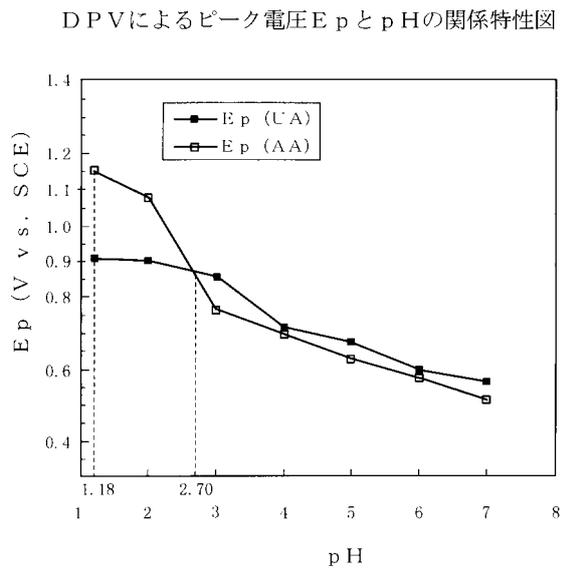
【 図 10 】



【 図 11 】

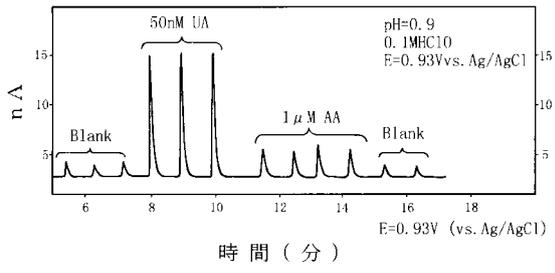


【 図 12 】



【図13】

フローインジェクション分析結果による特性図



---

フロントページの続き

審査官 柏木 一浩

- (56)参考文献 特開平 1 1 - 0 8 3 7 9 9 ( J P , A )  
国際公開第 8 7 / 0 0 6 7 0 1 ( W O , A 1 )  
特開平 0 8 - 1 9 9 3 9 9 ( J P , A )  
特開平 0 9 - 0 1 3 1 8 8 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 27/30

G01N 27/416

G01N 33/50