

固定化酵素を利用する フローインジェクション分析法

八尾 俊男

大阪府立大学 工学部 応用化学教室
〒591 堺市百舌鳥梅町4丁804

Flow Injection Analysis Using Immobilized Enzymes

Toshio YAO

Department of Applied Chemistry
College of Engineering

University of Osaka Prefecture

Mozu-Umemachi, Sakai-shi, Osaka 591

1. 緒言

フローインジェクション分析 (FIA) 法は、1975年に新しい概念に基づいた連続流れ分析法として提唱されて以来、応用範囲は拡大の一途をたどり、めざましい発展をとげてきている。

FIAではコイル内での反応による過渡的信号を測定することを特徴とするが(反応を伴わない場合もある。例えばイオン選択性電極による電位差測定、原子吸光測定など)、用いられる反応の多くは化学的な反応であり、被測定物質に対して選択性が高いこととなるべく反応速度の早いことが望ましい。特に医療計測や生化学分野では、複雑なマトリックスを含む生体試料中のある特定の微量成分を、選択的(時には特異的)に測定することが要望されている。従って、このような生体試料を測定対象とするFIAでは、複雑な分子構造を有する生体成分を分子レベルで識別し、その結果、反応がおこるような分子識別機能の優れた生体機能性物質を試薬として用いることが得策である。生体機能性物質には酵素、抗原、抗体などのほかに、微生物、生

物組織、結合タンパク質、オルガネラ、ホルモンレセプターも含まれるが、F I Aに利用されている反応としては、酵素反応と抗原-抗体反応に現在のところ限られている。¹⁾ 特に酵素は数多くのもので市販されているので入手しやすく、多種多様な反応特異性と基質特異性を有しているので、生体成分に対する特異的なF I Aシステムを設計することが可能である。特に臨床分析の分野では、酵素を含む試薬がキットとして市販されており、オートアナライザー方式の自動分析装置も多数市販されている。しかし、高価な酵素を分析のたびに使用するので、分析コストのほとんどを酵素が占めることになり、経済性に乏しい。そこで、酵素を固定化して水に不溶性にすることで再利用が可能になるので、いわゆる“固定化酵素(immobilized enzyme)”が実用上用いられるようになってきている。

本稿では、固定化酵素を利用したF I Aについてここ数年間の研究の動向を、著者らの研究を含めて解説することにした。

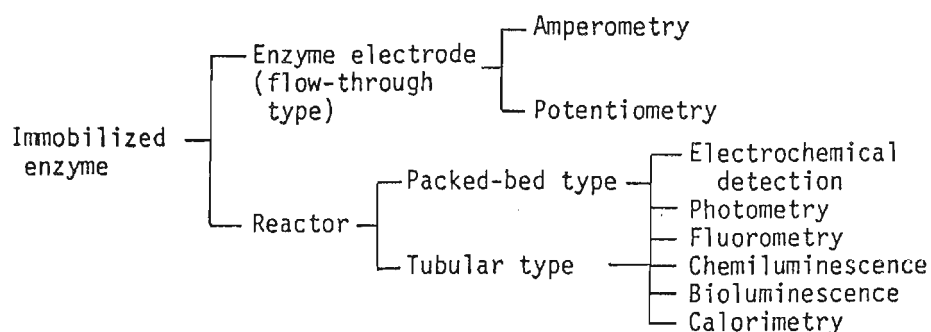


Fig. 1. FIA systems with immobilized enzymes

2. F I Aに用いられる固定化酵素の形状

固定化酵素をF I Aに利用するには、酵素電極型のものリアクター型のものに分類できる (Fig. 1)。酵素電極では、基質に対する分子認識と反応及び検出が同時に行えるので、F I Aにおける反応コイルを必要としない。リアクター型ものは、充てんカラム方式のものと中空のコイル (ナイロン管、ガラス毛细管など) を用いる場合に、さらに分類できる。酵素リアクターを用いる場合には、F I Aに用いられている検出法のほとんどを利用できるが、吸光、蛍光、化学発光による検出には、酵素反応生成物をさらに適当な化合物に変換するための化学反応流路がたいていの場合に必要な。

Table 1 Use of immobilized enzymes in FIA

Substances measured	Enzymes	Detected species	Detection	References
L-asparagine	L-asparaginase	NH ₃	potentiometry	5
ATP	firefly-luciferase	ATP/photon	bioluminescence	6
cephalosporines	cephalosporinase	cleavage of β-lactam ring	photometry	7
choline	choline oxidase	H ₂ O ₂	amperometry	8
cholinesterase	choline oxidase	choline	enzyme electrode	9, 10
cholesterol	cholesterol-esterase and cholesterol oxidase and peroxidase	H ₂ O ₂	amperometry	8, 11
		H ₂ O ₂	photometry	13
		H ₂ O ₂ /photon	chemi-luminescence	14
		H ₂ O ₂	enzyme electrode	15
creatinine	creatininase	NH ₃	potentiometry	16
	and nitrifying bacteria	O ₂	enzyme electrode	17
ethanol	alcohol dehydrogenase	NADH	photometry	18
		NADH	fluorometry	12
		NADH	amperometry	19,20,21,22
	and diaphorase	Fe(CN) ₆ ⁴⁻	amperometry	23
	alcohol oxidase	O ₂	amperometry	24
		O ₂	enzyme electrode	25,26
		heat of reaction	calorimetry	25
galactose	galactose oxidase	H ₂ O ₂	photometry	27
		H ₂ O ₂	amperometry	8
glucose	glucose oxidase	H ₂ O ₂	amperometry	8,28
		heat of reaction	calorimetry	29
		H ₂ O ₂	enzyme electrode	30,31,32
		H ₂ O ₂ /photon	chemi-luminescence	33,34
	and peroxidase	H ₂ O ₂	photometry	35
		H ₂ O ₂	enzyme electrode	36,37

Table 1 continued

Substances measured	Enzyme	Detected species	Detection	References
	glucose dehydrogenase	NADH NADH	amperometry photometry	66 35
glutamate	glutamate dehydrogenase	NADH	amperometry	19,20
glycerol	glycerol dehydrogenase and diaphorase	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	amperometry	23
hypoxanthine	xanthine oxidase	O_2	enzyme electrode	38
H_2O_2	peroxidase	H_2O_2 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{photon}$	photometry chemi-luminescence	39,40,41,42, 43 44
inorganic phosphorus	pyruvate oxidase and peroxidase	H_2O_2	photometry	45
lactate	lactate dehydrogenase	NADH NADH NADH	photometry fluorometry amperometry	46 67 20,47
	and diaphorase	$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$	amperometry	23
	lactate oxidase	O_2	enzyme electrode	48
lactate	pyruvate oxidase	NADH pyruvate	photometry enzyme electrode	49 50
NAD(P)H	NAD(P)H:FMN oxidoreductase and bacterial luciferase	$\text{NAD(P)H}/\text{photon}$	bio-luminescence	6,51
oxalate	oxalate oxidase	H_2O_2	photometry	52
	oxalate decarboxylase	CO_2	FID	53,54
phospholipid	phospholipase D	lecithin	enzyme electrode	55
steroids	3α -hydroxysteroid dehydrogenase, β -hydroxysteroid dehydrogenase, 7α -hydroxysteroid dehydrogenase, and 12α -hydroxysteroid dehydrogenase	NADH	photometry	56

Table 1 continued

Substances measured	Enzyme	Detected species	Detection	References
	12 α -hydroxysteroid dehydrogenase, bacterial luciferase, and NAD(P)H:FMN oxidoreductase or diaphorase	NADH/photon	bioluminescence	6,57
triglyceride	lipase	heat of reaction	calorimetry	58
urea	urease	NH ₃ NH ₃ CO ₂	photometry potentiometry coulometry	59 60 61
		heat of reaction	calorimetry enzyme electrode	62 31,63
uric acid	uricase and peroxidase	O ₂ H ₂ O ₂	amperometry enzyme electrode	64 65

一方、電気化学的検出の場合には、酵素反応で生成あるいは消費した物質をそのまま検出できるので、簡単な単一流路系で行える利点がある。Table 1 には、最近発表された論文を、用いた酵素、検出物質、検出方法に分類して示した。

酵素の固定化方法には、一般に共有結合法、架橋結合法、包括法、吸着法などがある。2) 固定化酵素を電極に使用する場合には膜状に、リアクター型で用いる場合には不溶性担体に固定化する方法がとられているが、いずれにしても機械的な強度を持ち、かつ長時間安定なものをなるべく簡単に、しかも安価に得られることが望ましい。また酵素は固定化することで、安定性や耐熱性が增大することが多い。3) 例えば Fig. 2 に、グルコースオキシダーゼとウリカーゼについて、溶液の場合と固定化した場合の安定性を比較した。このような固定化した場合の安定性の増加は、特に共有結合法(担体結合法)の場合に多くみられるが、これは酵素が担体と多点結合されることで、溶液状の酵素に比べて、堅い構造となり、その結果安定性や耐熱性が增大するものと考えられている。4)

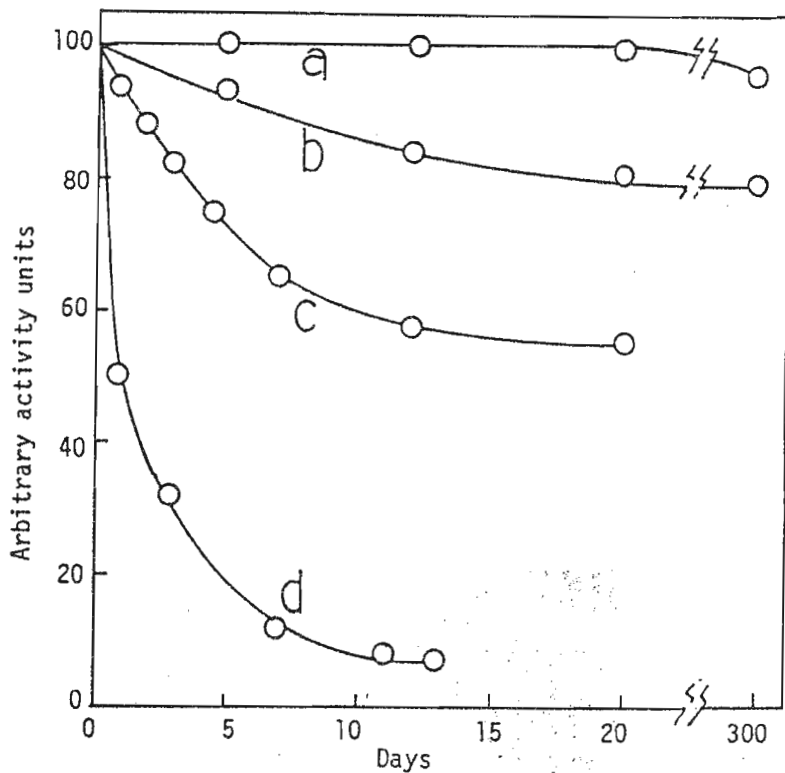


Fig. 2. Long-term operational stability of: (a) glucose oxidase immobilized on Lichrosorb-NH₂ by the glutaraldehyde method; (b) uricase immobilized on controlled-pore glass by the glutaraldehyde method; (c) glucose oxidase in solution; (d) uricase in solution. All curves normalized to 100% activity at the time of preparation.

3. 酵素電極を用いるFIA

酵素電極は通常バッチ方式で用いられている。基質溶液を加えてから、電気信号として一定の測定値が得られるまでの時間を応答時間といい、短いほどよい。応答時間は下地電極、酵素活性、基質濃度、温度やpHなどによって影響を受けるが、酵素膜の厚さと膜構造によって最も大きな影響を受ける。つまり基質の膜内への拡散が律速となり、通常の酵素電極では応答時間は1~10分と長い。酵素電極をFIAの検出器として用いる場合には、一種の速度法で測定が行われるため、定量速度と感度の点からなるべく応答時間の短い酵素電極を用いる必要がある。このためには酵素膜の酵素活性を高くし、しかもできるだけ薄いものを用いなければならないので、酵素電極を

F I Aの検出器に用いた例は
17, 25, 30, 31, 38, 48, 50, 63)
意外と少ない。

著者はF I A用酵素電極
として、化学修飾酵素膜電極
(Chemically modified enzyme
membrane electrode)を提
案した。⁶⁸⁾この電極の作製法
を模式的に示したのがFig. 3
である。つまり、白金板を
0.1 M硫酸溶液中で陽極酸

化し表面酸化物を生
成させ、3-アミノ
プロピルトリエトキ
シシランでアミノシ
リル化する。このア
ミノシリル化した白
金板上で牛血清アル
ブミンと酵素をグル
タルアルデヒドで架
橋すると、白金表面
のアミノ基も共に架
橋され、膜の一部が
電極に結合した安定
な酵素の薄膜を形成
させることができ

る。このような方法
によりグルコース電
極を試作したところ、
応答時間は数秒と早
く、また高感度で
あった(Fig. 4(a))。

この電極をフロー

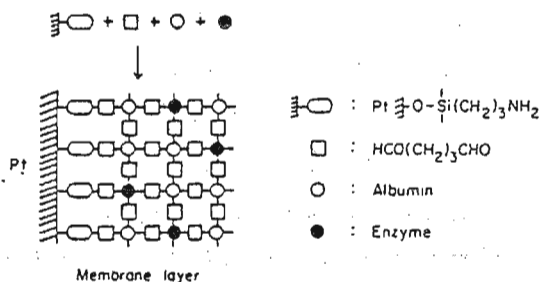


Fig. 3. Schematic representation of
the chemically modified enzyme
membrane electrode

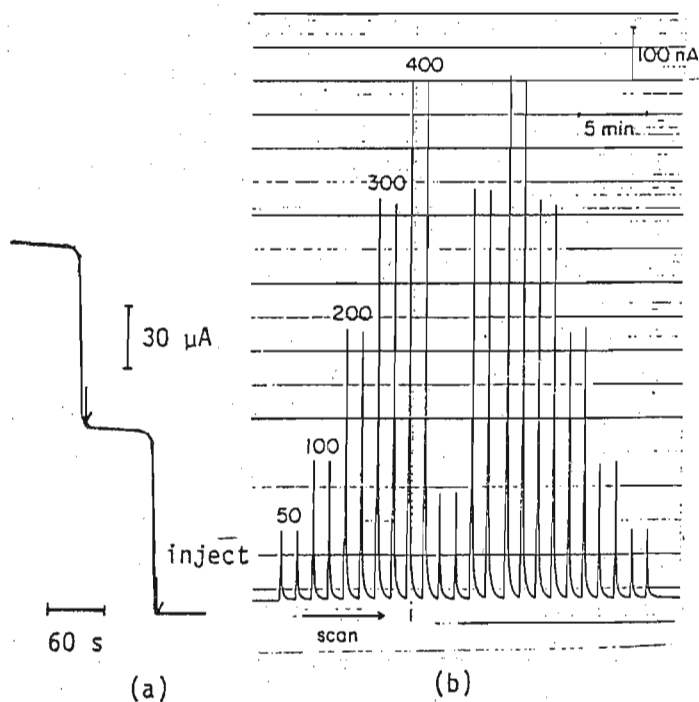


Fig. 4. Response for glucose of chemically
modified enzyme membrane electrode

- (a): steady-state response, 10^{-5} M glucose
(b): FIA signals for duplicate injections
(5 μ l) of five standard solutions of
glucose (50 - 400 mg/dl) followed by
two sera and repetition of the five
standard solutions

ルー型に改造し、グルコースの特異的検出器として用いたところ、100～120試料/時間の定量速度で血清及び尿中のグルコースを連続定量できた (Fig. 4(b))。同様の原理に基づいて、血清コリンエステラーゼ活性の迅速測定法、^{9,10)}ならびに複合酵素膜電極を用いた血清リン脂質⁵⁵⁾とグルコース³²⁾のFIAについて報告した。

化学修飾酵素膜電極は簡単に作製でき膜の強度もかなりあることから、FIA用酵素電極としてのみならず、HPLCの検出器としての応用も考えられ、著者らはアセチルコリン電極をアセチルコリンとコリンの検出に適用した。⁶⁹⁾

4. 酵素を固定化した中空反応管を用いるFIA

キャリアー溶液に酵素を溶解させておき、反応コイル内で酵素反応を行わせるFIAも報告されているが、⁷⁰⁾酵素を前もってコイルの内壁に固定化しておき、酵素を繰り返し使用できるFIAシステムが報告されている。中空管として、ガラス毛細管とナイロン管がよく用いられている。

森下らはガラス毛細管 (内径0.25～0.5mm) の内表面積を増すためにシリカウイスキーを生成させ、アミノシリル化した後、グルタルアルデヒドを介して酵素を固定化し、エタノール²⁾とL-乳酸⁶⁷⁾に対するFIAシステムを提案した。

一方、ナイロン管はガラス毛細管に比べて機械的衝撃に強く、これを酵素固定化用中空管として用いた研究例は多い。また一部の酵素は固定化して市販されているものもある (例えば、Miles Laboratoriesからグルコースオキシダーゼを固定化したナイロン管が市販されている)。しかし、ナイロン管はそのままでは酵素固定化用担体とはなりえないので、活性基導入のためのいろいろな前処理方法が提案されてきている。^{71,72)} 現在までに、酵素固定化ナイロン管を用いたFIAが、グルコース、^{1,33,73)} エタノール、²⁴⁾ しゅう酸、⁵²⁾ 尿素、⁷³⁾ 尿酸、⁷³⁾ クレアチニン、^{16,74,75)} ステロイド⁵⁶⁾ などの定量に対して報告されており、主として臨床分析への応用が期待されている。

5. 固定化酵素カラムを用いるFIA

酵素を不溶性担体 (多孔性ガラス、シリカゲル、金属酸化物、天然高分子、合成高分子など) に固定化し、カラムに充てんしたものをリアクターと

して用いたF I Aシステムが、多くの基質の測定に用いられている。不溶性担体への酵素の固定化で最もよく用いられる方法は、多孔性ガラス表面をアミノシリル化した後、グルタルアルデヒドを介して酵素を固定化する方法である。一般に基質の分子量が大きい場合には、担体と酵素との間にスペースをいれ、酵素分子の動きに自由度を持たせる工夫が必要である。また最近では、HPLC用充てん剤として各種の化学結合型シリカゲルが市販されており、酵素固定化用担体として用いられている。^{26,76)}

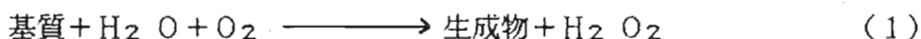
このような充てんカラム式の固定化酵素リアクターの場合には、注入された試料中の基質のすべてを酵素変換することもでき、また各種の検出器を組み合わせることで、高感度な分子認識型のF I Aシステムを設計することができる。ここでは、酵素リアクターを用いたF I Aシステムを、検出法で分類して、それぞれについて概説することにする。

5-1 光化学的検出法によるF I A

固定化酵素リアクターを用いた光学的検出システムを最初に提案したのは、Hicks とUpdikeである。⁷⁷⁾彼らは酵素リアクターで生成した酵素反応生成物を、反応コイル内で呈色反応試薬と混合し、発色させ、吸光度測定する方法を提案した。この測定原理は、固定化酵素を利用した種々の生体成分のF I Aに適用され、吸光光度法のみならず蛍光光度法、化学発光法、生物発光法などに分岐し、発展してきている。

グルコースオキシダーゼなど、酸化酵素の多くは式(1)の反応を触媒し、過酸化水素を生成する。過酸化水素の検出方法は多くの場合、ペルオキ

酸化酵素

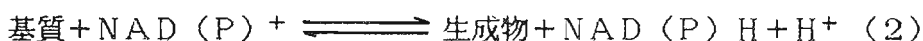


シダーゼ共存下での被酸化性試薬との反応を利用した吸光光度法によっており、³⁹⁻⁴³⁾ コレステロール、¹³⁾ ガラクトース、²⁷⁾ グルコース、³⁵⁾ シュウ酸などの測定に応用されてきている。また、酵素反応で生成した過酸化水素を、ルミノールとの反応を利用した化学発光法⁴⁴⁾ で検出する試みが、最近さかんに行われるようになってきている。化学発光法は生成物の発光を受けているため増幅しやすく、一般に吸光光度法に比べて高感度である。Worsfoldらは固

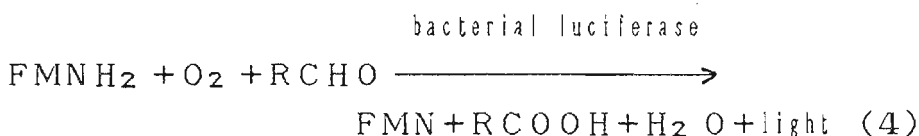
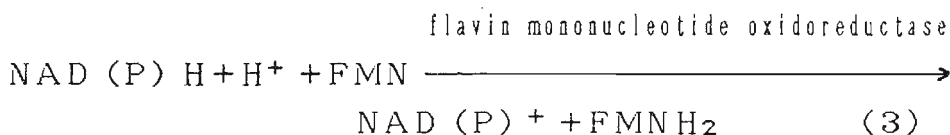
定化酵素/FIAによる血しょう中のグルコースの測定に、吸光度法と化学発光法による結果を比較した。³³⁾またNiemanらはmicroporous膜を用いた化学発光用フローセルを試作し、グルコース ($5 \times 10^{-8} \text{ M}$)³⁴⁾とコレステロール ($5 \times 10^{-6} \text{ M}$)¹⁴⁾を高感度に検出した。この化学発光検出によるFIAシステムは、測定の精度と感度が極めて高く、少量の試料で測定が可能である利点がある。

一方、多くの脱水素酵素(dehydrogenase)は式(2)のように対応する基質を生成物に酸化すると共に、補酵素NAD(P)⁺をNAD(P)Hに変換する反応を触媒する。従って生成したNAD(P)H量を定量することで、基質濃度をもとめることができる。

脱水素酵素



一般にNAD(P)Hは吸光度法^{18,35,46,49,56)}か蛍光光度法^{12,67)}で直接的に検出されているが、より高感度測定を指向する場合には、生物発光法が最近注目されている。生物発光法に用いられている酵素(ルシフェラーゼ)には、bacterial luciferaseとfirefly luciferaseがある。前者の酵素は式(4)の反応を触媒するので、式(3)の反応を連続的に行わせることによ



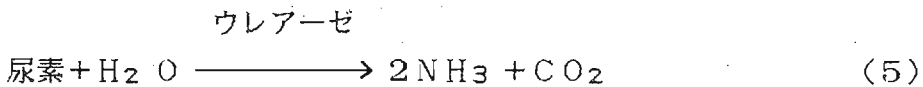
り、NAD(P)Hを高感度検出できる。^{6,51)}後者の酵素はホタルの発光に関与するもので、ルシフェリンとATPの共存下で作用するが、発光量からATP濃度を測定することができる。⁶⁾NAD(P)HとATPはいろいろな酵素反応に関与しているので、それらの酵素反応とルシフェラーゼによる

発光反応を連結させることにより、発光量から各種の基質濃度を測定する高感度なF I Aシステムが設計できるので、光ファイバーなどの光応用技術の発展と相まって、今後の発展が期待されている。

5-2 電気化学的検出法によるF I A

酵素反応で電気化学的に測定可能な物質が消費または生成する場合には、酵素リアクターとフロースルー型の電極とを組合わせたF I Aシステムを、簡単な流路構成で設計することができる。このようなF I Aシステムは着色試料液の適用も可能であり、また比熱的高感度である。

尿素はウレアーゼにより式(5)のように加水分解される。



Ögrenらはウレアーゼを固定化したリアクターとアンモニア電極とから成るFig. 5に示したF I Aシステムにより、血清中の尿素を定量した。⁶⁰⁾ ウレアーゼやクレアチニナーゼ¹⁶⁾のように、アンモニアを生成物とする酵素反応は多数知られているので、対応する基質を類似のF I Aシステムで測定できる。

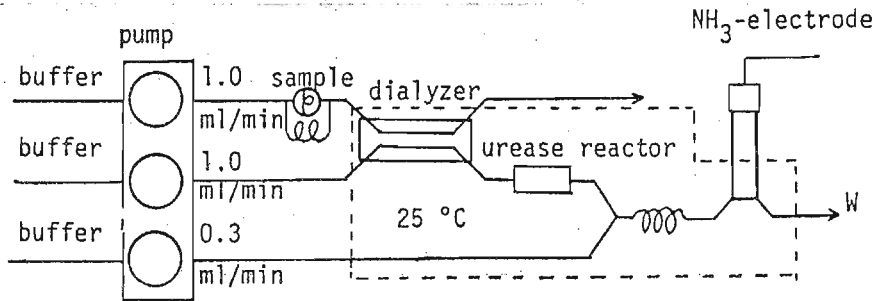
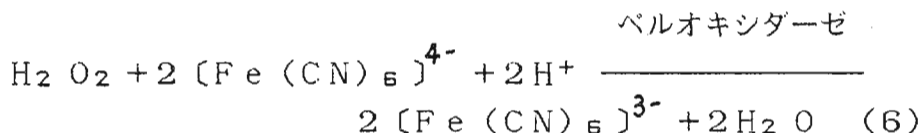


Fig. 5. Flow injection systems for detection of urea

酸化酵素を利用する場合には、酵素反応で消費した酸素量を酸素電極で測定するか、^{24,38,64)} 生成した過酸化水素を検出するか^{8,11,28)} のいずれかの方法が用いられている。後者の過酸化水素の電流測定の場合には、検出加電圧が白金電極で0.5 V (vs. Ag/AgCl)と比較的高く、血清などの生体試料を測定

対象とする場合には、共存するアスコルビン酸や尿酸などの被酸化性物質による妨害がある。そこで著者らは、酵素反応で生成した過酸化水素をペルオキシダーゼ電極でヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸イオンに変換して(式(6))、³⁷⁾ 0 V (vs. Ag/AgCl)で電流測定できるFIAシステムを提案し、グルコース、



尿酸、⁶⁵⁾ 総コレステロールと遊離型コレステロール、¹⁵⁾ エタノール、²⁶⁾ とL-乳酸の測定に応用した。

Fig. 6 はコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼ固定化リアクターを連結したFIAシステムで、コレステロールのエステル型と遊離型を過酸化水素に変換し

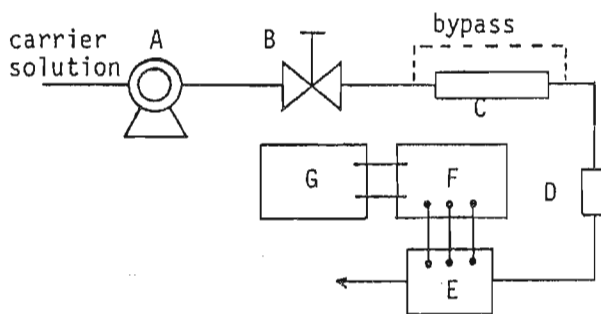


Fig. 6. Block diagram of flow system for the assay of total cholesterol
A, pump; B, sample injector; C, immobilized cholesterol esterase reactor; D, immobilized cholesterol oxidase reactor; E, immobilized peroxidase electrode; F, potentiostat; G, recorder. Carrier solution: 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5, 2.5 % (V/V) in Triton X-100 and 1 mM in potassium hexacyanoferrate(II)

て、ペルオキシダーゼ電極で検出する総コレステロール測定システムの概略を示したものである。一方、遊離型コレステロールの定量はコレステロールエステラーゼリアクターをフロー系から取り外すか、図のようにバイパスをいれることにより行うことができる。

脱水素酵素の基質となる物質を高選択的に定量しようとする場合、対応する脱水素酵素を固定化したリアクターを用いて、アンペロメトリーで計測できるFIAが提案されている。この方法で著者らはL-乳酸⁴⁷⁾とエタノール²²⁾を定量した。しかし、この方法では、酵素反応で生成したNADHをグラッシーカーボン電極で直接電流測定しているため、検出加電圧が高い(0.8

V vs. Ag/AgCl) 欠点があった。そのため、NADHの検出をより低電位で行おうとする試みがなされている。^{19,20,66)}つまり、グラファイト電極にMeldola blue (MB⁺) を吸着させた化学修飾電極を、酵素反応で生成したNADHの検出器として用いる試みである。このMB⁺ 修飾電極はNADHの酸化に対して、MB⁺ がmediatorとして働くので、低電位(-50~0mV vs. SCE) で測定できる利点がある。

以上のように、固定化酵素を用いたFIAの検出系には、吸光光度法などの光学的検出法と電気化学的検出法が一般によく利用されているが、そのほかにサーミスタを利用した熱計測検出器を用いている例もある。^{25,29,58,62)} 酵素反応は熱量変化を伴うので(一般に0.01°C程度)、熱量変化を指標とする各種生体成分のFIAシステムを設計できる。熱量変化を伴う反応には、酵素反応に限らず免疫反応などのいろいろな生物化学反応があるので、このFIAシステムは各種の基質の測定のみならず抗原や抗体の測定など、多方面に適用できる特徴を持っているので、今後の研究の発展が期待されている。

6. 多成分同時定量FIAシステム

FIAは単一成分の迅速定量法として発展してきたが、固定化酵素を利用した複数成分の同時定量法についても検討がなされている。

6-1 2成分同時定量FIA

Fig. 7の(a)と(b)は2つの検出器を直列または並列に配した流路系で、2成分の同時定量が可能である。(a)の流路で検出器として酵素電極を用い、グルコースと尿素を同時測定した例がある。³¹⁾ (c)は分岐点と

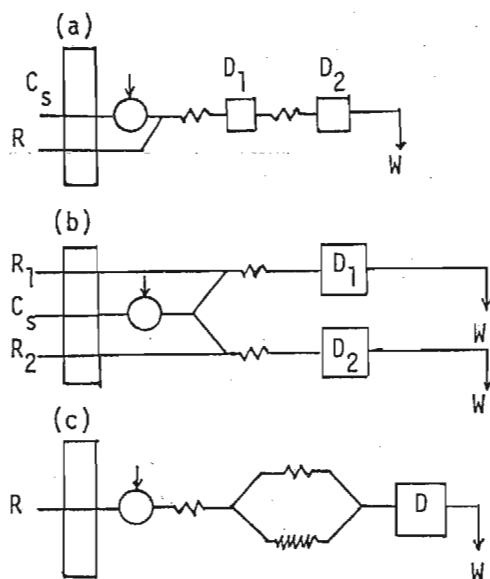


Fig. 7. Schematic diagrams of FIA manifolds for simultaneous determinations
D, D₁ and D₂: detector; C_s: sample;
R, R₁ and R₂: reagents; W: waste

合流点を持ったもので1つの検出器で測定できる流路系であり、

Townsendらはこれと類似のFIG. 8に示した流路系を用いて、グルコースとショ糖を同時定量した。⁷⁸⁾ 試料ゾーンは2流路に分割され、aの流路でグルコースが検出され、bの流路でグルコースとショ糖の総量が検出される。遅延コイル

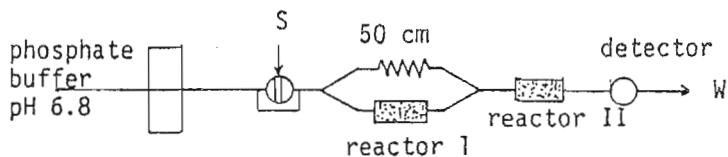


Fig. 8. Manifold for simultaneous determination of sucrose and glucose
reactor I: (invertase/mutarotase) immobilized reactor; reactor II: glucose oxidase immobilized reactor

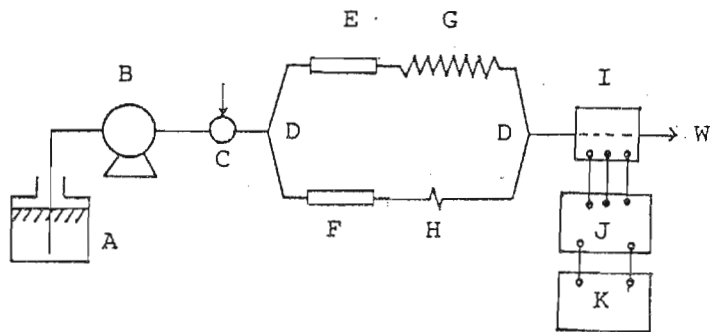


Fig. 9. The FIA manifold for simultaneous determination of L- and D-lactic acid

(A) Carrier solution (0.1 M pyrophosphate buffer, pH 9.6, 0.5 mM in NAD^+ and 1.0 mM in potassium hexacyanoferrate(III)), (B) pump, (C) injector, (D) T-connector, (E) immobilized D-lactate dehydrogenase reactor, (F) immobilized L-lactate dehydrogenase, (G) and (H) Teflon coil, (I) immobilized diaphorase electrode, (J) potentiostat, (K) recorder, (W) waste

を図のように入れることにより、bの流路を通った試料ゾーンは遅れて検出器に到達するので2つの分離したピークが得られる。

一方、酵素には基質特異性のほかに、光学特異性を有するものがある。例えば、L-乳酸脱水素酵素はL-乳酸を特異的にピルビン酸に酸化し、D-乳酸には作用しない。逆にD-乳酸脱水素酵素はD-乳酸に作用するが、L-乳酸には作用しない。このような酵素の光学特異性と基質特異性を利用して、D, L-乳酸のFIAによる同時定量システム(Fig. 9)が著者らによって考案された。⁷⁹⁾ この方法で、乳酸のD, L体に対応する2つの分離したピークが得られ、ピーク電流値からそれぞれを同時定量できる。

6-2 HPLCの分子認識型反応検出器として

固定化酵素/FIAシステムを高速液クロの分離カラムの出口に接続することで、HPLCの特異的なポストカラム反応検出器として利用できる。Fig. 10にアセチルコリンとコリンの測定システムを示す。コリンエステラーゼとコリンオキシダーゼを固定化したリアクターにより、分離カラムから溶出したアセチルコリンとコリンは、以下の酵素反応で過酸化水素に変換されるので、これを電流測定することで、pmolレベルのアセチルコリンとコリンを高感度検出できる。⁷⁶⁾

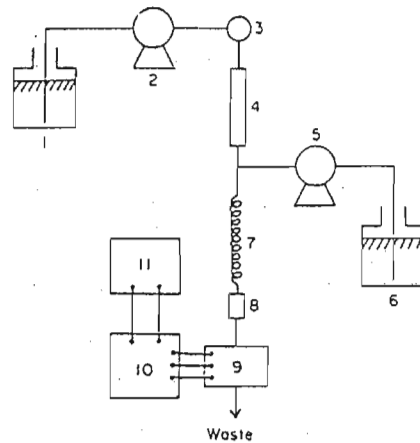


Fig 10. HPLC system for amperometric detection of acetylcholine and choline with the immobilized enzyme reactor

(1)mobile phase(0.01M sodium acetate buffer, pH 5.0, containing 10 mg/l sodium octyl sulfate and 1 mM tetramethylammonium chloride); (2)HPLC pump, 1.0 ml/min; (3) injector; (4)ODS-120T column; (5)pump, 0.5 ml/min; (6) 0.3M phosphate buffer, pH 8.5, containing 0.5 mM EDTA; (7) mixing coil; (8) immobilized enzyme column; (9) flow-through platinum electrode; (10) potentiostat; (11) recorder.

コリンエステラーゼ



コリンオキシダーゼ



このシステムはほかに、L-アミノ酸オキシダーゼを用いたL-アミノ酸の検出、⁸⁰⁾ β -グルクロニダーゼを用いたグルクロナイドの検出、⁸¹⁾ 複数の酵素(キサンチンオキシダーゼとグアナーゼ及びヌクレオシドホスホリラーゼ)を用いたプリン塩基とヌクレオシドの検出⁸²⁾などに利用されている。

このように、2成分あるいは3成分までの測定には、FIA独自のシステ

ムにより測定が可能であるが、それ以上の多成分同時定量には、現在のところHPLCのポストカラム反応検出器としての利用に限られている。

7. 結言

酵素には特定の基質に対する特異性を示すもののほかに、アミノ酸化酵素のようにアミノ酸という化合物群に選択性を示すものや、光学対掌体を認識できるものなど、多種多様な機能を持っている。また年々新しい酵素が発見され、入手できる酵素も今後ますます増えることが期待できるので、いろいろな酵素の機能をうまく利用することにより、多様な機能を持った高選択的なFIAシステムを設計することが可能になるであろう。また、ここでは酵素反応に限定して概説したが、他のいろいろな生物化学反応もFIAに取り入れられることができるので、今後のますますの発展が期待されているところである。

8. 文献

- 1) P.J.Worsfold: *Anal.Chim.Acta*, 145, 117 (1983).
- 2) 鈴木周一編: “イオン電極と酵素電極”, (1981), (講談社サイエンティフィック).
- 3) H.A.Mottola: *Anal.Chim.Acta*, 145, 27 (1983).
- 4) 松野隆一, 中西一弘: *細胞工学*, 2, 346 (1983).
- 5) Y.M.Fraticelli, M.E.Meyerhoff: *Anal.Chem.*, 55, 359 (1983).
- 6) L.J.Kricka, G.K.Wienhausen, J.E.Hinkley, M.D.Luca: *Anal.Biochem.*, 129, 392 (1983).
- 7) G.Decristoforo, F.Knauseder: *Anal.Chim.Acta*, 163, 73 (1984).
- 8) 八尾俊男, 小林義昭: *分析化学*, 32, 253 (1983).
- 9) T.Yao: *ibid.*, 153, 169 (1983).
- 10) 八尾俊男, 和佐保: *分析化学*, 33, 342 (1984).
- 11) I.Karube, K.Hara, H.Matsuoka, S.Suzuki: *Anal.Chim.Acta*, 139, 127 (1982).
- 12) T.Kojima, Y.Hara, F.Morishita: *Bunseki Kagaku*, 32, E101 (1983).
- 13) W.Hinsch, A.Antonijević, P.V.Sundaram: *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.*, 19, 307 (1981).
- 14) N.L.Malavolti, D.Pilosof, T.A.Nieman: *Anal.Chim.Acta*, 170, 199 (1985).
- 15) T.Yao, M.Sato, Y.Kobayashi, T.Wasa: *Anal. Biochem.*, in press (1985).
- 16) M.Mascini, G.Palleschi: *Anal.Chim.Acta*, 136, 69 (1982).
- 17) I.Kubo, I.Karube, S.Suzuki: *ibid.*, 151, 371 (1983).
- 18) P.J.Worsfold, J.Růžička, E.H.Hansen: *Analyst*, 106, 1309 (1981).
- 19) H.Huck, A.Schelter-Graf, H.L.Schmidt: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 13, 199 (1984).
- 20) A.Schelter-Graf, H.L.Schmidt, H.Huck: *Anal.Chim.Acta*, 163, 299 (1984).
- 21) W.J.Blaedel, J.Wang: *Anal.Chem.*, 52, 1426 (1980).
- 22) T.Yao, Y.Kobayashi, S.Musha: *Anal.Chim.Acta*, 139, 363 (1982).
- 23) A.S.Attiyat, G.D.Christian: *Analyst*, 105, 154 (1980).
- 24) E.L.Gulberg, G.D.Christian: *Anal.Chim.Acta*, 123, 125 (1981).

- 25) G.G.Guilbault, B.Danielsson, C.F.Mandenius, K.Mosbach: *Anal.Chem.*, 55, 1582 (1983).
- 26) 八尾俊男, 松本義宏, 和佐保: *分析化学*, 34, 513(1985).
- 27) B.Olsson, H.Lundbäck, G.Johansson: *Anal.Chim.Acta*, 167, 123 (1985).
- 28) M.Masoom, A.Townshend: *ibid.*, 166, 111 (1984).
- 29) N.Kiba, T.Tomiyasu, M.Furusawa: *Talanta*, 31, 131 (1984).
- 30) M.Mascini, M.Iannello, G.Palleschi: *Anal.Chim.Acta*, 146, 135 (1983).
- 31) M.Mascini, G.Palleschi: *ibid.*, 145, 213 (1983).
- 32) T.Yao: *ibid.*, 153, 175 (1983).
- 33) P.J.Worsfold, J.Farrelly, M.S.Matharu: *ibid.*, 164, 103 (1984).
- 34) D.Pilosof, T.A.Nieman: *Anal.Chem.*, 54, 1698 (1982).
- 35) P.Roehrig, C.M.Wolff, J.P.Schwing: *Anal.Chim.Acta*, 153, 181 (1983).
- 36) 八尾俊男, 中西邦之, 和佐保: *分析化学*, 33, 213(1984).
- 37) T.Yao, M.Sato, Y.Kobayashi, T.Wasa: *Anal.Chim.Acta*, 165, 291 (1984).
- 38) E.Watanabe, K.Ando, I.Karube, H.Matsuoka, S.Suzuki: *J.Food.Science*, 48, 496 (1983).
- 39) B.Olsson, L.Ögren: *Anal.Chim.Acta*, 145, 87 (1983).
- 40) B.Olsson, L.Ögren, G.Johansson: *ibid.*, 145, 101 (1983).
- 41) K.Tamaoku, Y.Murao, K.Akiura: *ibid.*, 136, 121 (1982).
- 42) M.Shiga, M.Saito, K.Kina: *ibid.*, 153, 191 (1983).
- 43) H.Lundbäck, G.Johansson, O.Holst: *ibid.*, 155, 47 (1983).
- 44) B.Olsson: *ibid.*, 136, 113 (1982).
- 45) M.Tabata, T.Murachi: *Biotechnol.Bioeng.*, 25, 3013 (1983).
- 46) R.Q.Thompson, S.R.Crouch: *Anal.Chim.Acta*, 159, 337 (1984).
- 47) T.Yao, Y.Kobayashi, S.Musha: *ibid.*, 138, 81 (1982).
- 48) M.Mascini, D.Moscone, G.Palleschi: *ibid.*, 157, 45 (1984).
- 49) S.Olsen, J.Růžička, E.H.Hansen: *ibid.*, 136, 101 (1982).
- 50) N.Minoura, S.Yamada, I.Karube, I.Kubo, S.Suzuki: *ibid.*, 135, 355 (1982).
- 51) K.Kurkijärvi, R.Raunio, T.Korpela: *Anal.Biochem.*, 125, 415 (1982).
- 52) R.Bais, N.Potezny, J.B.Edward, A.M.Rofe, R.A.J.Conyers: *Anal.Chem.*, 52, 508 (1980).
- 53) A.O.Lindberg: *Anal.Chim.Acta*, 152, 113 (1983).
- 54) A.O.Lindberg: *ibid.*, 152, 123 (1983).
- 55) T.Yao, Y.Kobayashi, M.Sato: *ibid.*, 153, 337 (1983).
- 56) G.Carrea, R.Bovara, P.Cremonesi: *Anal.Biochem.*, 136, 328 (1984).
- 57) J.Schoelmerich, J.E.Hinkley, I.A.Macdonald, A.F.Hofmann, M.Deluca: *ibid.*, 133, 244 (1983).
- 58) I.Satoh, B.Danielsson, K.Mosbach: *Anal.Chim.Acta*, 131, 255 (1981).
- 59) K.Nagashima, S.Suzuki: *ibid.*, 151, 13 (1983).
- 60) L.Gorton, L.Ögren: *ibid.*, 130, 45 (1981).
- 61) A.O.Lindberg: *ibid.*, 131, 133 (1981).
- 62) S.P.Fulton, C.L.Cooney, J.C.Weaver: *Anal.Chem.*, 52, 505 (1980).
- 63) K.Yasuda, H.Miyagi, Y.Hamada, Y.Takata: *Analyst*, 109, 61 (1984).
- 64) A.Iob, H.A.Mottola: *Anal.Chem.*, 52, 2332 (1980).
- 65) 八尾俊男, 佐藤実, 和佐保: *日本化学会誌*, 1985, 189.
- 66) P.Appelqvist, G.Marko-Varga, L.Gorton, A.Torstensson, G.Johansson: *Anal.Chim.Acta*, 169, 237 (1985).
- 67) 森下富士夫, 原義明, 小島次雄: *分析化学*, 33, 642(1984).
- 68) T.Yao: *Anal.Chim.Acta*, 148, 27 (1983).
- 69) 八尾俊男, 佐藤実, 和佐保: *日本化学会誌*, 1985, 1501.
- 70) J.Růžička, E.H.Hansen: *Anal.Chim.Acta*, 106, 207 (1979).
- 71) W.E.Hornby, L.Goldstein: *Methods Enzymol.*, 44, 118 (1976).
- 72) 八尾俊男, 武者宗一郎: *分析化学*, 30, 184(1981).
- 73) R.Chirillo, G.Caenaro, B.Pavan, A.Pin: *Clin. Chem.*, 25, 1744 (1979).

- 74) R.Ginman, J.S.Colliss, J.M.Knox: J.Appl.Biochem.Biotechnol., 8, 213 (1983).
- 75) R.Ginman, J.S.Colliss: *ibid.*, 8, 369 (1983).
- 76) T.Yao, M.Sato: Anal.Chim.Acta, 172, 371 (1985).
- 77) G.P.Hicks, S.J.Updike: Anal.Chem., 38, 726 (1966).
- 78) M.Masoom, A.Townshend: Anal.Chim.Acta, 171, 185 (1985).
- 79) T.Yao, T.Wasa: *ibid.*, in press (1985).
- 80) N.Kiba, M.Kaneko: J.Chromatogr., 303, 396 (1984).
- 81) L.L.Klopf, T.A.Nieman: Anal.Chem., 57, 46 (1985).
- 82) 八尾俊男, 松本義宏, 和佐保: 日本分析化学会第34年会講演要旨集, p. 331 (1985) .

Abstract

Enzymes offer two characteristics of paramount importance in analytical chemistry: generally high selectivity (occasional specificity), and capacity of self-regeneration via the catalytic cycle. The immobilization of enzymes provides preparations that combine high selectivity with increased stability. In addition, if the immobilized enzymes are used in a flow injection system, handling is minimized, reproducibility is enhanced and the enzyme can be re-used. In this review, research on the use of immobilized in flow injection system is discussed in detail.