

固定化酵素リアクターと酵素電極を利用  
したアセチルコリンとコリンの同時定量  
フローインジェクション分析システム

八尾俊男，松本義宏，和佐保

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 Analytical System for Simultaneous Determination of  
Acetylcholine and Choline by Use of Immobilized Enzyme Reactors and  
Enzyme Electrode

Toshio Yao, Yoshihiro Matsumoto, and Tamotsu Wasa

Department of Applied Chemistry, College of Engineering, University of  
Osaka Prefecture, Mozu-Umemachi, Sakai-shi, Osaka 591

---

Acetylcholinesterase and choline oxidase were immobilized by reaction with glutaraldehyde onto alkylamino-bonded silica. They were incorporated in parallel as the enzyme reactor in a flow-injection system which was based on the splitting of the flow after the sample injection and subsequent confluence before reaching the peroxidase immobilized electrode. Because each channel has a different residence time, two peaks were obtained for choline and total of choline and acetylcholine. The first and second peak-current were linearly related to choline in the range  $5 \times 10^{-6}$  -  $5 \times 10^{-4}$  M and to total of choline and acetylcholine in the range  $5 \times 10^{-6}$  -  $1 \times 10^{-3}$  M, respectively. The detection limits were  $4 \times 10^{-7}$  M for choline and  $2 \times 10^{-6}$  M for acetylcholine when a 10- $\mu$ l sample was injected. The assay speed was about 15 samples/h.

---

## 1. 緒言

アセチルコリンは重要な神経伝達物質として知られ、神経細胞におけるイオン透過性や最近では老人性痴呆症にも深く関与していることが徐々に明らかにされつつあり、アセチルコリンとその代謝物質であるコリンの迅速、高感度、高選択的な分析方法の開発が要望されてきている。

そこで、著者らはアセチルコリンとコリンを高選択的に検出する方法として、それぞれに高選択的に作用するアセチルコリンエステラーゼ（以下 AChE と略記する）とコリンオキシダーゼ（以下 ChO と略記する）を固定化したバイオリアクター<sup>1,2)</sup>や酵素電極<sup>3)</sup>を組み込んだ液体クロマトグラフ-FIA計測システムについて検討し、既に報告した、本研究では、分岐点と合流点を持つ2成分同時定量FIA流路を用い、分離カラムを必要としないより迅速かつ簡便な流れ系について検討し、良好な結果を得たので報告する。

## 2. 実験

### 2.1 試薬

AChE (EC 3. 1. 1. 7) はSigma社製 (1400 IU mg<sup>-1</sup>, Type V-S, from Electric Eel) を、ChO (EC 1. 1. 3. 17) は東洋紡製 (14. 3 IU mg<sup>-1</sup>, from *Alcaligenes* sp.) を、ペルオキシダーゼ (EC 1. 11. 1. 7, POD と略記する) はベーリンガー・マンハイム山之内社製 (Grade II, 100 IU mg<sup>-1</sup>, from Horse-Radish) のものを用いた。アセチルコリン塩化物とコリン塩化物は、和光純薬製のものを五酸化リン上で減圧乾燥してもちいた。

### 2.2 固定化酵素リアクターとPOD電極の作製

固定化酵素リアクター: LiChrosorb-NH<sub>2</sub> (Merck社製アミノ基結合シリカ、粒子径 10 μm) をステンレス製カラム (内径 4 mm, 長さ 5 mm) に充填し、5 vol. % 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. 0 ml min<sup>-1</sup> の流量で 1. 5 時間循環することにより、スパーサー部末端にホルミル基を導入した。これを 0. 1 M リン酸緩衝液 (pH 8. 0) で洗浄し、AChE 280 IU と ChO 43 IU の混合酵素溶液 (pH 8. 0, 0. 1 M リン酸緩衝液) を 2 時間循環することにより、ACh

E-ChO固定化リアクターを作製した。同様の方法により、グルタルアルデヒドで活性化したカラムにChO 431Uを通液、循環することでChO固定化リアクターを作製した。

POD電極： 既報の化学修飾酵素膜電極<sup>3)</sup>の作製方法にしたがって、次の様にして作製した。10wt.%ウシ血清アルブミン溶液8 $\mu$ l, 0.02Mリン酸緩衝液30 $\mu$ l, POD2mgと4vol.%グルタルアルデヒド溶液4 $\mu$ lを均一に混合し、数分間放置した後、この溶液10 $\mu$ lを既報<sup>3)</sup>の方法でアミノシリル化した金板(20x10mm)の片面に塗布し、数時間空气中に放置することで、橋かけ膜を形成させた。これお既報<sup>3)</sup>で示したフローセルに装着し、フローセル型の酵素電極として用いた。なおセル容量は1.6 $\mu$ lであった。

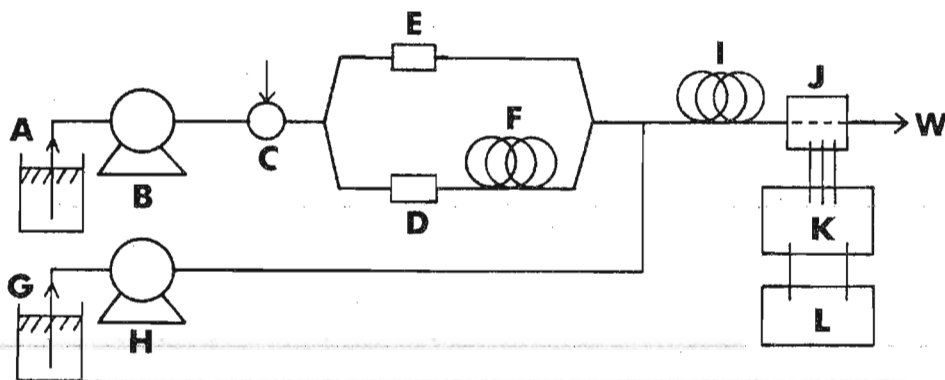
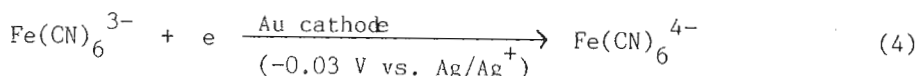
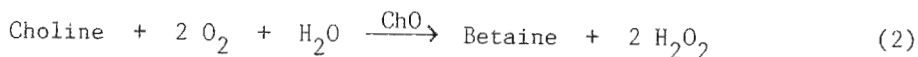
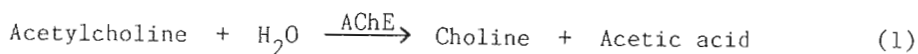


Fig. 1 FIA manifold for the simultaneous determination of acetylcholine and choline.

(A) carrier solution (0.1M phosphate buffer, pH 8.3);  
 (B) and (H) pump; (C) injector; (D) AChE-ChO coimmobilized reactor ( $\phi$  4mm, 5mm); (E) ChO immobilized reactor ( $\phi$  4mm, 5mm); (F) delay coil ( $\phi$  0.5mm, 6.0m); (G) reagent solution (0.3mM potassium hexacyanoferrate(II) solution);  
 (I) mixing coil ( $\phi$  4mm, 6.0m); (J) POD electrode; (K) potentiostat; (L) recorder; (W) waste.



Scheme 1

### 2. 3 測定システムと方法

アセチルコリンとコリンの同時定量 F I A システムの概略を Fig. 1 に示す。装置は高速液体クロマトグラフ（柳本製作所製 L-5000）、電気化学検出器（柳本製作所製 VMD-101）、送液ポンプ（柳本製作所製 RP-203）、記録計（柳本製作所製 YR-101A）とフロースルー型 POD 電極などから構成されている。

キャリアー溶液として 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.3) を、一定流量 (1.5 ml min<sup>-1</sup>) で送液する。インジェクターから注入された (10 μl) 試料ゾーンは、三方接手で 2 流路に分割される。リアクター (d) でアセチルコリンとコリンは式 (1) と (2) の酵素反応にしたがって、過酸化水素を生成する。一方、カラム (e) ではコリンのみが式 (2) にしたがって過酸化水素を生成するが、アセチルコリンには作用しない。遅延コイル (f) を図の様に入れることによって、リアクター (d) を通った試料ゾーンはリアクタ (e) を通った試料ゾーンに比べて、一定時間の遅れを伴って合流点に達する。分割された試料ゾーンの各々は合流点を経て、ポンプ (g) によって流量 0.5 ml min<sup>-1</sup> で送液されたヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム水溶液 (0.3 mM) とミキシングコイル内で混合される。POD 電極 (j) は酵素リアクターで生成した過酸化水素をさらに式 (3) の反応でヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンに変換し、最終生成物であるヘキサシアノ鉄 (III) 酸イオンを低電位 (-30 mV vs. Ag/AgCl) で電流測定する。

### 3. 結果と考察

#### 3. 1 FIAシステムの最適操作条件

##### a) キャリヤー溶液のpH

固定化酵素の活性及び安定性は一般に溶液のpHに大きく依存することが知られている。以前の研究で固定化されたAChEとChOの最適pHは共に8.0-8.5の間にあることを報告した。そこで本研究においても、pH8.3のリン酸緩衝液(0.1M)をキャリヤー溶液として使用することにした。

##### b) 遅延コイルの長さ

遅延コイルの長さは、第1ピークと第2ピークの分離に影響する。しかし、余りに長すぎると、分離は良くなるが、コイル内での試料ゾーンの分散のため第2ピークは広がり、ピーク高さが減少すると共に、定量時間が長くなる。そこで、分離度、感度、定量速度を考慮して、内径0.5mm長さ6mのテフロン管を遅延コイルとして用いた。

##### c) ヘキサシアノ鉄(II)酸塩の濃度

本FIAシステムでは、AChEとChOの作用によって生成した過酸化水素を、メディエーターとしてヘキサシアノ鉄(II)酸イオンを含む試薬溶液を連続的に流路系に加えることによって、ヘキサシアノ鉄(III)酸イオンとしてPOD電極で電流測定する原理に基づいている。本法では、低電位で検出できるので、被酸化性物質による電気化学的な妨害が少ないことと低いベースライン電流を容易に保つことができる利点がある。そこで、メディエーター濃度について検討した結果、0.3mMの濃度でFIAピークは飽和電流値を示したので、試薬溶液として0.3mMヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム水溶液を用いることにした。

##### d) 流量

固定化酵素リアクターで完全な酵素的変換が行われる時、アセチルコリンとコリンのそれぞれ1molから過酸化水素2molを生成する。そこで、式(1)の反応でアセチルコリンからコリンを生成する場合の酵素変換率と式(2)の反応でコリンから過酸化水素を生成する場合の酵素変換率を、キャリヤー溶液流量を変化させて測定した(但し、試薬溶液流量を一定(0.5ml min<sup>-1</sup>)に保った)。流量の増加に伴って、ピークは鋭くなり、ピーク電流は増加したが、2ml min<sup>-1</sup>以上の流量でほぼ一定となった。また両酵素変換率は2.0ml min<sup>-1</sup>以下の流量で100%であり、定量的にアセチルコリンをコリンに、コリンを過酸化水素に変換できる。そこで、キャリヤー溶液の流量を1.5ml

min<sup>-1</sup>に設定した。

以上の検討の結果、最適操作条件で得られた典型的なFIAシグナルの例をFig. 2に示す。測定の原理に基づいて、本FIAシステムでは、コリンに対して第1ピークと第2ピークが得られるが、アセチルコリンに対しては第2ピークのみが得られることになる。これは酵素の基質特異性によるものであり、FIAに酵素反応を利用する大きな利点の一つである。したがって、アセチルコリンとコリンの混合試料の場合、第1ピークはコリンの濃度に、第2ピークはコリンとアセチルコリンの総濃度に依存するので、コリンとアセチルコリンの2成分を同時定量することが可能である。また定量時間は試料あたり4分を必要とするので、サンプリング速度は毎時15である。

### 3. 2 検量線

コリンとアセチルコリンに対する検量線をFig. 3に示す。コリンの第1ピークは $5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-4} \text{M}$ の濃度範囲で相関係数0.9986の直線関係を示した。また、コリンの第2ピーク及びアセチルコリンに対するFIAピークは $5 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-3} \text{M}$ の濃度範囲で相関係数0.9998の良好な直線性を示した。さらにコリンの第2ピークとアセチルコリンピークに対する検量線は、全く同一の直線を示したので、実際試料の測定の際には、コリンの標準溶液を用いて、第1ピークと第2ピークに対する検量線を作製すればよいことになる。

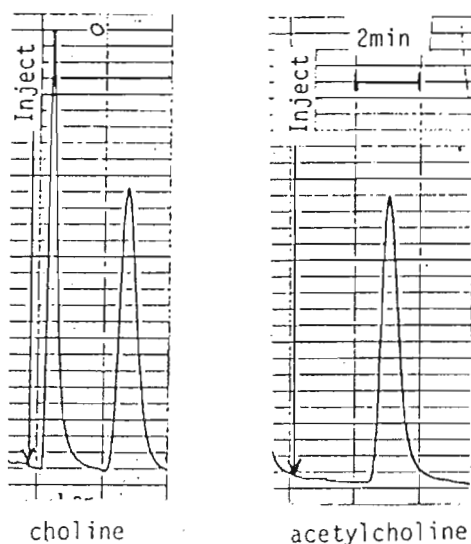


Fig. 2 Typical FIA signals for choline and acetylcholine.

Injected sample: 0.5mM (10  $\mu$ l)

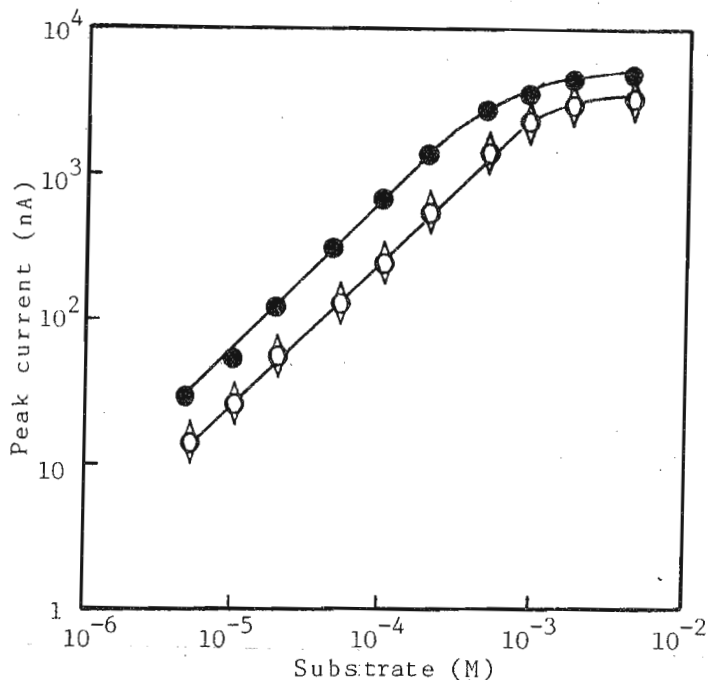


Fig. 3 Calibration curves for choline (●, 1st peak; ○, 2nd peak) and acetylcholine (◇).  
Sample size : 10  $\mu$ l

### 3. 3 測定の精度

アセチルコリンとコリンの標準溶液、及びその混合溶液を用いてFIAピークの測定の再現性について検討した。5  $\times$  10<sup>-5</sup>Mの基質濃度で、FIA第1ピークの測定の再現性は相対標準偏差 (n = 10) で0.97%であった。第2ピークに対しては3.5%であった。また、コリンとアセチルコリンに対する検出下限はS/N = 2の時、それぞれ4.1  $\times$  10<sup>-7</sup>M, 2  $\times$  10<sup>-6</sup>Mであった。

### 4. 結言

本法は酵素の基質特異性を利用し、さらに試料ゾーン分割-再合流FIA流路を用いることで、高選択的な2成分同時定量分析をFIAで可能にした例である。

しかし、以前に報告した固定化酵素カラムを組み合わせたHPLC法に比べて、検出下限はやや劣っているが、定量速度が早いことや分離カラムを必要としない簡単な流路で行える等、多くの利点を有している。また固定化酵素カラムとPOD酵素電極は、使用しない時にリン酸緩衝液(0.1M, pH 8.0)を満たして冷蔵庫に4-5°Cで保存しておけば、数か月の連続使用に耐えることができた。固定化することによる酵素の安定化と試料ゾーン中の基質を通常のキャリヤ-溶液流量で完全に酵素変換できる高活性酵素リアクターの特性は、分析の経済性及び高感度定量の点でDLAにとって重要である。

## 5. 文献

- 1) T. Yao and M. Sato, Anal. Chim. Acta., 172, 371 (1985).
- 2) K. Honda, K. Miyaguchi, H. Nishino, H. Tanaka, T. Yao and K. Imai, Anal. Biochem., 153, 50 (1986).
- 3) 八尾 俊男, 佐藤 実, 和佐 保, 日本化学会誌, 1985, 1501.
- 4) T. Yao, Anal. Chim. Acta., 148, 27 (1983).

(1987年10月5日受理)