— ノー ト —

(日本化学会誌, 1985, (7), p.1501~1503)

© 1985 The Chemical Society of Japan

酵素電極を検出器として用いた高速液体 クロマトグラフィーによるアセチル コリンとコリンの定量

(1985年1月23日受理)

八尾俊男*・佐藤 実・和佐 保

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ているが、脳組織などの実際試料中にはコリンと共存しているので、両者を分離測定する必要がある。従来、アセチルコリンはガスクロマトグラフ-質量分析法¹⁾や酵素標識-放射化分析法^{2)~4)}などにより測定されてきた。しかし、これらの方法は装置構成が高価格となり、前処理や誘導体処理が煩雑であるため、より簡便な測定方法の開発が要望されている。最近、イオン選択性電極による測定法⁵⁾が提案されたが、感度と選択性に問題があり、実用的センサーとはいえない。

一方、液体クロマトグラフィーによるこれら成分の測定は、実用的な検出感度を有する検出器がないため、ほとんど行なわれていないといえる。最近、この検出器の感度を克服する方法として、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)の反応特異性を利用した液体クロマトグラフ法⁶⁾が提案されたが、溶液酵素を反応溶液として用いるため、きわめてランニングコストが高くなる欠点があった。そこで、著者らは AChE と ChO を同時固定した固定化酵素リアクターによる測定システムを開発し、その結果をすでに報告した⁷⁾。本研究では、液体クロマトグラフの検出器に分子識別機能を付与する試みとして、酵素電極を用いたアセチルコリンとコリンの液体クロマトグラフ-電気化学計測システムについて検討した。

2 実 験

2.1 試 薬

AChE (EC 3.1.1.7) は Sigma 社製 (1400 IU mg⁻¹, Type V-S, *from Electric Eel*) を、ChO (EC 1.1.3.17) は東洋紡製 (14.3 IU mg⁻¹, *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・マンハイム山之内製 (Grade II, 100 IU mg⁻¹, *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、和光純薬製のを五酸化リン上で減圧乾燥して用いた。ウシ血清アルブミン、(3-アミノプロピル)トリエトキシシラン、グルタルアルデヒド (20% 溶液) はそれぞれ Sigma 社製、Aldrich 社製、和光純薬製のものを用いた。テトラエチルアンモニウムクロリド (以下 TMA と略記する) と 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (以下 SOS と略記する) は、それぞれ和光純薬、Aldrich 社製のものを用いた。エチルホモコリンは文献⁸⁾にしたがって合成し、内部標準物質として用いた。

アセチルコリン、コリン、エチルホモコリン標準溶液：アセチルコリン塩化物、コリン塩化物、エチルホモコリンのそれぞれを、0.1 mol·dm⁻³ の濃度になるよう 0.02 mol·dm⁻³ 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解して調製した。

2.2 酵素電極の作製

既報の化学修飾酵素膜電極⁹⁾の作製方法にしたがって、測定原理の異なる2種類の酵素電極をつぎのようにして作製した。

ChO-AChE 電極：10 wt% ウシ血清アルブミン溶液 50 μ l, 0.02 mol·dm⁻³ リン酸緩衝液 (pH 7.0) 50 μ l, ChO 3.0 mg, AChE 0.3 mg と 4 vol% グルタルアルデヒド溶液 11 μ l を均一に混合し、数分間放置したのち、この溶液 22 μ l を既報⁹⁾の方法でアミノシリル化した白金板 (20×20 mm) 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。

ChO-AChE-POD 電極：10 wt% ウシ血清アルブミン 30 μ l, 0.02 mol·dm⁻³ リン酸緩衝液 (pH 7.0) 60 μ l, ChO 2.0 mg, AChE 0.2 mg, POD 1.0 mg と 4 vol% グルタルアルデヒド 10 μ l を均一に混合し、この溶液 20 μ l をとり、同様の方法で橋かけ膜を形成させた。

作製した酵素膜修飾白金板を図1のフローセルに装着し、フロースルー型の酵素電極として用いた。なおセル容量は 1.6 μ l で

8) T. Yao, *Anal. Chim. Acta*, 148, 27(1983).

大阪府立大学工学部応用化学教室, 591 堺市百舌鳥梅町

- 1) I. Hanin, R. F. Skinner, *Anal. Biochem.*, **66**, 568 (1975).
- 2) P. A. Shea, M. A. Aprison, *ibid.*, **56**, 165(1973).
- 3) R. E. McCaman, J. Stetzler, *J. Neurochem.*, **28**, 669 (1977).
- 4) D. R. Haubrich, N. Gerber, A. B. Pflueger, M. Zweig, *ibid.*, **36**, 1409(1981).
- 5) A. Jaramillo, S. Lopez, J. B. Justice, *Anal. Chim. Acta*, **146**, 149(1983).
- 6) P. E. Potter, J. L. Meek, N. H. Neff, *J. Neurochem.*, **41**, 188(1983).
- 7) T. Yao, M. Sato, *Anal. Chim. Acta*, in press.

Fig. 1 Schematic representation of flow-through enzyme electrode

- (1) : Solution inlet
- (2) : Solution outlet
- (3) : Reference electrode (Ag/Ag^+ electrode)
- (4) : Counter electrode (stainless steel pipe)
- (5) : Spacer (0.05 mm in thickness, channel : 2×16 mm)
- (6) : Enzyme-modified platinum sheet (20×20 mm, 0.1 mm in thickness)
- (7) : Silicone rubber
- (8) : Stainless steel screw
- (9) : Assembly screw

あった。

2.3 測定システムと操作法

アセチルコリンとコリンの測定システムを図2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-101 A), ミキシングコイル (テフロン管, 内径 0.25 mm, 長さ 20 m) と Yanapak ODS-120 T 逆相カラム (内径 4 mm, 長さ 250 mm) などから構成されている。

移動相として $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ TMA と $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ SOS を含む $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を, 一定流量 ($1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) で送液する。ODS カラム (4) からの溶出液は三方接手で, ポンプ (5) から pH 調整用試薬溶液 ($0.3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ リン酸緩衝液, pH 8.5) を $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ の流量で合流させ, ミキシングコイルで移動相と試薬溶液を混合させる。上記の流量で, ミキシングコイル出口での pH は 8.2 となり, カラムから分離, 溶出したアセチルコリンとコリンは酵素電極 (8) で検出される。なお, ChO-AChE 電極を検出器とする場合には, 上記の測定条件で酵素電極への加電圧を 0.5 V (vs. Ag/Ag^+) に設定する。一方, ChO-AChE-POD 電極の場合には, 前記の試薬溶液に $3 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ のヘキサシアノ鉄(II)酸カリウムを加え, 加電圧を 0.0 V (vs. Ag/Ag^+) に設定する。

Fig. 2 Flow diagram for the determination of acetylcholine and choline

- (1) : Mobile phase
- (2) : HPLC pump
- (3) : Injector
- (4) : Analytical column
- (5) : Pump for reagent solution
- (6) : Reagent solution
- (7) : Mixing coil
- (8) : Immobilized enzyme electrode
- (9) : Potentiostat
- (10) : Recorder

3 結果と考察

ChO-AChE 電極による測定原理は, 式(1)と(2)の酵素反応により基質 (アセチルコリンとコリン) を過酸化水素に変換し, 生成した過酸化水素の酸化電流 (式(4)) を測定することによる。一方, ChO-AChE-POD 電極は, 式(2)の反応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)酸イオンの還元電流 (式(5)) を測定する電極で, 低電位 (0.0 V vs. Ag/Ag^+) で測定できるので, 被酸化性物質による電気化学的な妨害が少ない⁹⁾。

酵素電極の応答は溶液の pH に依存するので, 図2の測定回路から分離カラムをはずしたフローインジェクションシステムにより, pH 調整用試薬溶液の pH を変化させて, コリンとアセチルコリンに対する応答について検討した。両電極ともに, 最大応答は 8.0~8.5 の pH 範囲で得られた。

9) T. Yao, M. Sato, Y. Kobayashi, T. Wasa, *Anal. Chim. Acta*, 165, 291(1984).

Fig. 3 Chromatograms of standard solution containing 200 pmol each of choline (peak 1), acetylcholine (peak 2), ethylhomocholine (peak 3), ascorbic acid (peak 4), and dopamine (peak 5)

Enzyme electrode

(A): ChO-AChE electrode

(B): ChO-AChE-POD electrode

酵素電極で完全な酵素的変換が行なわれるとき、アセチルコリンとコリンのそれぞれ 1 mol から過酸化水素 2 mol 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、流量を変えて測定した。両電極ともに、

アセチルコリンのコリンへの変換率は、どの流量においても 91 ~ 93% とほぼ一定であった。一方、コリンの過酸化水素への変換率は、流量の増加でやや減少する傾向が認められたが、50% 以上の変換率が得られ、従来の酵素電極と比較して高い酵素変換率を有することがわかった。したがって、これらの酵素電極を液体クロマトグラフの検出器に用いることによって、アセチルコリンとコリンを高感度に検出できることが期待できる。

図 3 に得られたクロマトグラムを示す。ここでエチルホモコリンはコリンと同様の酵素反応を経て過酸化水素を生成すること、適当な保持時間を有することから、実際試料を分析する場合の内部標準物質として適当であった。また ChO-AChE 電極を検出器とした場合には、アスコルビン酸とドーパミンのような被酸化性物質も検出されるが、コリンとアセチルコリンのピークには妨害とならない。一方 ChO-AChE-POD 電極を用いた場合には、検出加電圧が低い (0.0 V vs. Ag/Ag⁺) ため、被酸化性物質によるピークは現われないので、コリンとアセチルコリンをほぼ特異的に検出できる。検量線はコリン、アセチルコリンとエチルホモコリンのそれぞれに対して、 $10 \sim 10^4$ pmol の範囲で良好な直線関係があった。また検出下限は $S/N=2$ のとき、両電極ともにコリンに対して 1.5 pmol、アセチルコリンに対して 2.9 pmol であった。

酵素電極をほぼ毎日数時間使用し、使用しないときにはリン酸緩衝液 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, pH 8.0) に浸して、冷蔵庫内に $4 \sim 5^\circ\text{C}$ で保存した場合の電極の安定性について検討した結果、両電極ともに 20 日後の酵素活性は初期活性の約 50% に低下した。したがって、長寿命の酵素電極とはいえないが、わずかの量の酵素で簡単に作製できるので、分析のランニングコストを大幅に軽減することができた。

最後に本研究を行なうにあたり、いろいろな便宜を計っていたいた株式会社柳本製作所、西野博人氏、倉橋辰雄氏に深謝します。

High-performance Liquid Chromatographic Determination of Acetylcholine and Choline by the Use of Immobilized Enzyme Electrode as the Detector

Toshio YAO*, Minoru SATO and Tamotsu WASA

Department of Applied Chemistry, College of Engineering, University of Osaka Prefecture ; Mozuumemachi, Sakai-shi 591 Japan

A simple and rapid method was presented for the determination of acetylcholine and choline, using the high-performance liquid chromatographic system with enzyme electrodes as the electrochemical detector. The enzyme electrode was made up of cross-linking acetylcholinesterase (AChE) and choline oxidase (ChO) with bovine serum albumin (BSA) or AChE, ChO and peroxidase (POD) with BSA using glutaraldehyde on a platinum electrode silanized with (3-aminopropyl)triethoxysilane. The AChE-ChO and AChE-ChO-POD electrodes were based on the amperometric detection of hydrogen peroxide and hexacyanoferrate(III) generated by the enzymic reactions, respectively. The method was high-sensitive and specific for the determination of acetylcholine and choline. The detection limit was 1.5 pmol for choline and 2.9 pmol for acetylcholine. The enzyme electrodes could be used continuously for at least 20 d.