

## 技術論文

コリンオキシダーゼ固定化酵素反応カラムを用いる  
サプリメント中のコリンのフローインジェクション分析中野 正史<sup>1</sup>, 吉原 将明<sup>1</sup>, 櫻川 昭雄<sup>®1</sup>

コリンオキシダーゼ (ChO) とベルオキシダーゼ (POD) を担体であるキトサンに固定化し、固定化酵素反応カラムとしてシステムに組み込んだ簡易で高感度なコリン分析用フローインジェクション分析 (FIA) システムを開発した。酵素の固定化は Schiff 塩基生成反応を利用したグルタルアルデヒド架橋法で行い、検出器は蛍光光度検出器を用いた。調製した固定化酵素反応カラムを FIA システムに組み込み、分析の諸条件としてキャリアー組成、ポンプの流量、試料注入量などを検討し、システムの最適化を試みた。本システムでの 1 回の分析時間は 3 分間程度であった。また、検量線は  $0.2 \sim 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$  まで相関係数 0.999 以上の直線関係が得られ、検出下限は  $0.1 \mu\text{mol dm}^{-3}$  であった。実試料中の共存物質の影響を添加回収実験で行った後、実試料としてサプリメント中のコリンの定量を試みたところ、同一試料 5 回繰り返し測定による相対標準偏差は 0.3% 以内と、共存物質の影響を受けずに定量できることを確認した。

## 1 緒 言

近年、グルコース、アルコール、尿酸といった特定の酵素によって酸化され、過酸化水素を発生する多様な生体内微量物質を定量することを目的とする迅速で高感度な過酸化水素検出法の開発が行われている。そのような過酸化水素検出方法を開発することは、それら生体内微量物質の迅速な定量化にもつながり、また、その観点から迅速な定量が可能なフローインジェクション分析 (FIA) 法は有用な方法であると言える<sup>1)~3)</sup>。

一方、本研究の定量目的物質であるコリンは肝臓、腎臓、肺などの様々な臓器内で見られ、神経、筋肉間における脳からのインパルスの伝達にかかわる重要な神経伝達物質であるアセチルコリンや、脂質代謝にかかわるホスファチジルコリンの前駆体として知られている。そのためコリンの欠乏は肝臓中の脂肪量を増大させ、記憶力の低下や、脳から筋肉への情報伝達の遅れをもたらすので、それらの機能障害を予防するためにもコリンの迅速な定量法が必要とされている<sup>4)~7)</sup>。コリンは通常、ガスクロマトグラフィー (GC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) をはじめとする分離分析法<sup>5)~7)</sup> 又は酵素反応を利用した分析法<sup>4)</sup> のどちらかによって定量されている。しかし、一般的に特異的な反応を示す酵素を用いる分析法は、クロマトグラフィーに比べてより選択性の高い分析が可能であり、FIA と酵素法を組み合わせた自動定量では、単位時間当たりの試料

処理能力が GC 法などの数倍から数十倍であり、高価な装置も必要なく高感度で高選択的な定量が期待できる。酵素法には酵素を溶液として用いる方法と固定化酵素として用いる方法の二通りの方法があるが、前者は高価な試薬である酵素の大量消費や、FIA システムの流路の複雑化につながることも、また、酵素の安定性の問題、更には酵素溶液自身が検出のバックグラウンドに影響を与えるといった欠点がある。一方、後者は不安定な酵素を担体に固定化させることで酵素を安定させ、かつコストを低減させるための優れた方法であると言える<sup>7)</sup>。すでに、化学発光検出を用いる方法が報告されており<sup>4)</sup>、検出限界も  $15 \text{ pmol}$  と非常に高感度な分析が可能であるが、相対標準偏差が 3.5% と比較的大きい。また、アンペロメトリーで検出する方法も報告されているが<sup>8)~11)</sup>、感度は良好なものの検出器自体の安定性に問題がある。そこで、本研究ではコリンオキシダーゼ (ChO) 及びベルオキシダーゼ (POD) を固定化能力ならびに固定化後の酵素の反応性にも優れたキトサンビーズに固定化した固定化酵素を調製し、これを FIA システムに反応カラムとして組み込み、蛍光光度を測定する方法によりコリンの分析に適用した結果、検出限界は  $0.1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ 、同一試料 5 回の繰り返し測定による相対標準偏差は 0.3% 以内であった。固定化担体であるキトサンは天然高分子であるキチンの脱アセチル化物であり、構造中にアミノ基を有しており、そのアミノ基を固定化に利用するため固定化した酵素はきわめて安定であり、長期間使用できる特徴をもつ。キトサンの構造はセルロースと酷似しており、正式には D-グルコサミンの  $\beta$ -1,4 結合体と称され、

<sup>1</sup> 日本大学理工学部物質応用化学科: 101-8308 東京都千代田区神田駿河台 1-8-14

再結晶により精製と造粒が容易に行える物質である。キチンは海老や蟹の甲羅に含まれるバイオマスであり、このキチンより製造されたキトサンビーズを固定化酵素の担体を用いて分析化学に利用した例は、著者らの報文<sup>12)~16)</sup>以外には他に見当たらない。また、近年のダイエットブームから、脂質代謝を促す作用を持つホスファチジルコリンの母体であるコリンを、サプリメントで摂取する傾向もみられるため、本システムを用いたサプリメント試料中のコリンの定量に適用したところ、良好な結果を得ることができたので報告する。

## 2 実 験

### 2.1 装 置

蛍光光度検出には島津製 RF-535 型を用い、Unicorder U-228 記録計 (Pantos 製) に記録した。pH 測定には東亜 DKK 製 HM-30 pH メーターを使用した。固定化酵素の活性測定は反応温度 37°C で行い、温度はヤマト科学製 Coolnics circulator (model CTE-42W) を用いて調整した。固定化酵素の調製はマグネチックスターラー F-616 (Fine 製) を用いて、適度な速度でかき混ぜて行った。FIA システムに用いたポンプは、アクア・ラボ製の定流量ポンプ (PE-230) であり、キャリアーとして 0.15 mol dm<sup>-3</sup> 塩化ナトリウム及び蛍光試薬である 2.3 mmol dm<sup>-3</sup> 3-(*p*-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸 (HPPA)/0.3 mol dm<sup>-3</sup> 2-アミノ-2-ヒドロキシフェニル-1,3-プロパンジオール (Tris)-HCl 緩衝液 (pH: 8.0) は、それぞれ流量 0.6 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> で送液した。また、試料の注入量は 0.3 cm<sup>3</sup> とした。固定化酵素反応カラムは ChO 及び POD をキトサンに固定化した固定化酵素を 2.1 mm i.d. × 100 mm のプラスチック製のカラムにそれぞれ約 0.2 g 充填して作製した。また、ミリポア製の Milli-Q Reagent System による精製水を純水として使用した。

### 2.2 試 薬

標準溶液の調製に用いた塩化コリン (試薬 1 級) と過酸化水素 (試薬特級) は和光純薬工業製の試薬を精製せずにそのまま使用した。50 mmol dm<sup>-3</sup> 塩化コリン標準溶液は 0.698 g の塩化コリンをはかりとり、0.15 mol dm<sup>-3</sup> 塩化ナトリウム溶液で溶解し、同液で 100 cm<sup>3</sup> とした。

使用した塩化ナトリウム、HPPA 及び Tris は和光純薬工業製で、0.15 mol dm<sup>-3</sup> 塩化ナトリウム溶液は常法により水溶液を調製した。この塩化ナトリウム溶液はキャリアーや固定化酵素の保存液としても使用した。2.3 mmol dm<sup>-3</sup> HPPA/0.3 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl 緩衝液 (pH: 8.0) は HPPA 0.1911 g をとり、0.3 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl 緩衝液で溶解し 500 cm<sup>3</sup> とした。

固定化酵素の調製時に使用したグルタルアルデヒド溶液

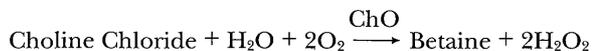
0.5 (v/v)% は、1 mol dm<sup>-3</sup> 塩酸 (和光純薬工業) で pH を調整した Tris-HCl 緩衝液を用いて調製した。固定化酵素の調製に用いた ChO (アルカリゲネス属由来、14 units mg<sup>-1</sup>) 及び POD (西洋わさび由来、100 units mg<sup>-1</sup>) は和光純薬工業製で、これらの溶液は酵素活性の低下を防ぐため、固定化酵素調製時に新たに調製した。

固定化担体として使用したキトサンビーズ (Chitopearl 3503, 30 μmφ, 富士紡績製) は、特別な処理をせず、そのまま使用した。

### 2.3 操 作

**2.3.1 固定化酵素の調製** ChO 固定化酵素の調製は担体であるキトサンビーズ及び ChO のアミノ基と、架橋剤であるグルタルアルデヒドのアルデヒド基との Schiff 塩基の生成を利用したグルタルアルデヒド架橋法<sup>9)~12)</sup>によって行った。2 g のキトサンビーズを 100 cm<sup>3</sup> ビーカーにとり、1 (v/v)% 以上では本法で用いた Tris-HCl 緩衝液では不溶になるので、0.1~0.5 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl 緩衝液に 0.1~0.6 (v/v)% になるようにグルタルアルデヒドを溶解したグルタルアルデヒド/Tris-HCl 緩衝液を 10 cm<sup>3</sup> 加え、スターラーで 15 から 120 分間かき混ぜて、かき混ぜ時間の影響を検討するとともに、このとき使用した Tris-HCl 緩衝液の pH を 7.0 から 9.0 の範囲で変化させ、その影響も検討した。その後、これに 20 から 500 ppm の ChO 溶液 10 cm<sup>3</sup> を加え、更に 15 から 120 分の間で酵素固定化時のかき混ぜ時間の影響を検討した。固定化酵素ビーズを水で洗浄後、この操作を 2 回繰り返し、得られたキトサンビーズを ChO-IE とし、0.1 mol dm<sup>-3</sup> Tris 溶液中で 4°C の冷蔵庫に保存した。

**2.3.2 ChO-IE の活性測定** ChO-IE の活性測定は次のような反応を利用して行った。



この方法での検出物質は過酸化水素であり、この過酸化水素の存在で HPPA は POD を介して HPPA のダイマーを生成し、その蛍光強度の増加から ChO の活性を測定した。

条件を変えて調製した ChO-IE の表面の水を沷紙で取り除き、その約 0.3 g を 100 cm<sup>3</sup> の三角フラスコにとり、これにあらかじめ 37°C に調整しておいた塩化コリンを 30 cm<sup>3</sup> 加え、POD カラムのみを組み込んだ過酸化水素分析用 FIA システムに 6 分間隔で 2.5 cm<sup>3</sup> ずつ計 4 回溶液を採取し、各溶液の 1.0 cm<sup>3</sup> を孔径 0.45 μm のクロマトディスク 25 A (バイオフィールド製) を通して注入し、過酸化水素の濃度 (ppm) を算出した。次に得られた濃度

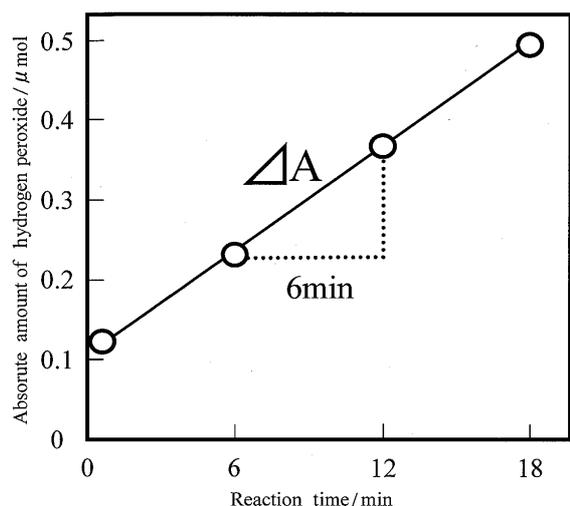


Fig. 1 Measurement of activity

$\cdot \text{H}_2\text{O}_2 (\mu\text{mol}) = \text{H}_2\text{O}_2 (\text{ppm}) \times \text{Total Solution } (\text{cm}^3) \div \text{H}_2\text{O}_2 \text{ Molecular Weight } (\text{g mol}^{-1})$   
 $\cdot \text{Activity (Unit/g)} = \Delta A \div \text{Dry Weight of Immobilized Enzyme}$

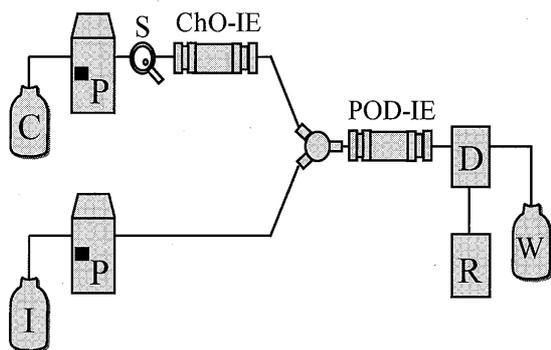


Fig. 2 Scheme of The Flow System for The Determination of Choline

C: carrier ( $0.15 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$ ); I: indicator ( $2.3 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ HPPA}$ ); P: pump (flow rate:  $0.6 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ); S: sample injector (injection volume:  $0.3 \text{ cm}^3$ ); D: fluorescence detector (EX = 305 nm, EM = 405 nm); R: recorder; W: waste; IE: immobilized enzyme reactor column

(ppm) を過酸化水素の物質質量 ( $\mu\text{mol}$ ) に変換し, 得られたグラフから 1 分間当たりの過酸化水素生成量を測定した (Fig. 1). 測定後, 使用した ChO-IE を回収し,  $55^\circ\text{C}$  で 18 時間以上乾燥し, 固定化酵素の乾燥重量から, 乾燥重量 1 g 当たりの活性を算出した.

**2.3.3 コリンの定量操作** コリンの分析には, Fig. 2 に示した FIA システムを使用した. 試料溶液  $0.3 \text{ cm}^3$  をインジェクター (Rheodyne7125) よりキャリアー溶液を流した流路に注入した. 注入された試料溶液は ChO-IE 反応カラムに送られ, ここでコリンから過酸化水素に誘導さ

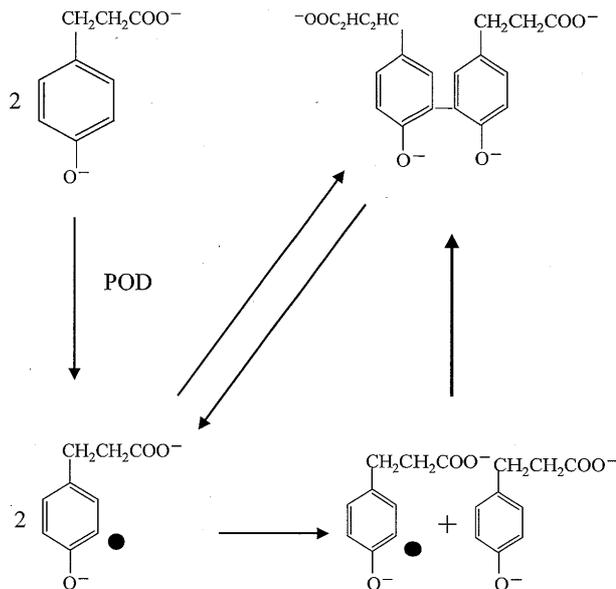


Fig. 3 Scheme of the chain reaction between HPPA and HPPA-radical

れる. 次に過酸化水素の蛍光指示薬の流路が合流し, 既報を参考<sup>12)~16)</sup>に調製した POD-IE 反応カラム内で過酸化水素と HPPA が, Fig. 3 に示されたように反応して生成した蛍光生成物の蛍光強度を測定し, 得られたピーク高さからコリンを定量した.

**2.3.4 FIA システム** 本法では ChO を用いてコリンから過酸化水素を誘導することでコリンの分析を行っている. 測定対象物質である過酸化水素の定量については, 従来の測定法をそのまま使用することができるので, ChO-IE のコリンから過酸化水素への変換部分の反応条件 (反応温度・キャリアーの流量・試料注入量・共存物質の影響) を中心に検討を行った. すなわち, 酵素反応の温度依存性について, 反応温度を制御した場合としない場合の, キャリアーの流量については装置全体にかかる圧力を考慮し,  $0.1 \sim 1.0 \text{ cm}^3/\text{min}$  の範囲内で検討を行った. また, 試料注入量については  $0.1 \sim 0.5 \text{ cm}^3$  まで  $0.1 \text{ cm}^3$  間隔で注入し, そのときのピーク高さを比較した. 更に共存物質の影響の検討では, 実試料中に含まれるコリンから過酸化水素への変換を妨害すると思われる無機イオン及び有機物をコリン標準溶液に加えて, その影響を添加回収実験で検討した.

### 3 結果と考察

#### 3.1 固定化酵素の調製

固定化条件として, グルタルアルデヒドの濃度と溶媒である Tris-HCl 緩衝液の濃度及び pH, 固定化時の pH 及び反応時間, 使用する酵素の量などについて検討した結果, Table 1 に示した条件が最適であった. 調製時に最も大き

Table 1 Preparation conditions of ChO-IE

Glutaraldehyde	Concentration	0.5 (v/v)%
	Medium	0.2 M Tris Buffer (pH 8.0)
	Reaction Time	60 min
	Volume	10.0 mL
Choline Oxidase	Concentration	200 ppm
	Medium	0.1 M Tris Buffer (pH 8.0)
	Reaction Time	30 min
	Volume	10.0 mL
Number of Repetitions		2
Stock Solution		0.1 M Tris Buffer

な影響を及ぼす因子は、グルタルアルデヒドの濃度とその溶媒の pH であり、それぞれの条件について検討した結果、ChO-IE の活性はグルタルアルデヒドの濃度が 0.5 (v/v)% のとき最大となり、pH は 8.0 のとき最大となった。

なお、グルタルアルデヒドの希釈溶媒として、本研究では Tris-HCl 緩衝液を使用しているが、他にも代表的な緩衝液である 0.1 mol dm<sup>-3</sup> ホウ酸塩緩衝液、0.2 mol dm<sup>-3</sup> リン酸塩緩衝液、0.2 mol dm<sup>-3</sup> アンモニア緩衝液などの pH を 8 として用いたところ、アンモニア緩衝液は担体であるキトサンの変色を起し、活性が低下したこと以外は、他の緩衝液でもほぼ同様の活性を示したが、最も調製が容易な Tris-HCl 緩衝液をグルタルアルデヒドの希釈溶媒に用いることにした。

また、固定化時の pH が 8.5 よりも高くなると酵素の構造が破壊され、pH 7.5 以下では Schiff 塩基の生成反応が弱塩基下の反応であるために活性が低下したと考えられる。

この条件で数回固定化を行い固定化時の誤差を検討したが、コリンの定量に影響を及ぼすほどのピーク高さの変化は認められなかった。また、このように調製された ChO-IE は安定であり、一日あたり数十回の試料の分析に使用しても、使用后、保存溶液である 0.15 mol dm<sup>-3</sup> 塩化ナトリウム溶液に浸し冷蔵庫に保存すれば、二年以上安定であることを確認した。

### 3.2 FIA システムの改善

3.1 までの知見による最適条件を用いて調製した固定化酵素反応カラムを実際に FIA システムに組み込んで測定を行ったところ、1 回の分析に約 13 分間という長い測定時間と、試料注入量も 1.5 cm<sup>3</sup> と多量の試料を必要とした。この原因は、従来から使用してきた 5.0 mm i.d. × 50 mm の固定化酵素を充てんする反応カラムにあり、システム全体が内径 0.5 mm のテフロンチューブでつながれているのに対し、カラム部分は 5.0 mm i.d. であるため、ここで溶

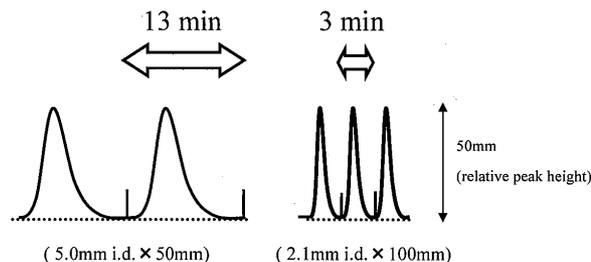


Fig. 4 FIA signals of choline

Carrier (0.15 mol dm<sup>-3</sup> NaCl); Indicator (2.3 mmol dm<sup>-3</sup> HPPA); Flow Rate: 0.6 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>; Injection Volume: 0.3 cm<sup>3</sup>; Sample concentration: 5 μmol dm<sup>-3</sup>

液の拡散が起こり、長い分析時間が必要となる。

この欠点を改善するために、2.1 mm i.d. × 100 mm と従来よりも内径が細く、また、触媒である酵素との接触時間を増加させるために長さの長いカラムを新たに作製し、分析時間の短縮と試料注入量の削減を試みた。従来、使用していたカラムに比べ、新しいカラムのピークはほぼ左右対称でかつ鋭い形状を示し、1 回当たりの分析時間はそれまで約 13 分であったのが約 3 分まで短縮された。しかしながら、Fig. 4 に示されているようにピーク高さはほとんど変化なく、感度の改善にはつながらなかった。この理由は内径の大きいカラムでは拡散により試料中のコリンと酵素の接触時間が長くなり過酸化水素への誘導、ならびに蛍光物質の生成反応が右に進行したためと考えられる。

### 3.3 FIA システムの最適化

本法では ChO を用いてコリンから過酸化水素を誘導することでコリンの分析を行っている。測定対象物質である過酸化水素の定量については、従来の測定法<sup>12)~16)</sup>をそのまま使用することができるので、ChO-IE のコリンから過酸化水素への変換部分の反応条件を中心に検討を行った。

**3.3.1 反応温度** HPLC 用のカラム恒温槽などを用いて反応温度の影響を 15~50℃ にわたって検討した。ChO は温度が 40~45℃ で最大の活性を示したため、本システムはこの温度に保たれていることが理想的であると思われる。そのため、システム全体をこの温度に保つことは分析感度の向上につながる。しかし、本システムは常温のままでも十分な感度が得られていることや与えられた流路全体を最適温度に保つことは不可能であること、更に恒温槽を設置することはシステムの大型化につながるなどから、恒温槽を設置せずに常温のまま測定を行うことにした。

**3.3.2 キャリヤーの流量** キャリヤーの流量と装置全体のテフロンチューブの内径を変えることは、分析時間の長短につながる。本 FIA システムではテフロンチュー

ブの内径 (0.5 mm) を一定として検討を行った. その結果, 高流量側では1回の分析時間は3分以内と迅速な分析が可能であるが, 再現性がやや悪く, 逆に低流量側では1回の分析時間が長くなってしまいうため, キャリヤーの流量を  $0.6 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  を最適とした. キャリヤーの流量は, ピーク形状の再現性及び分析時間に影響を及ぼしたが, ピーク高さにはほとんど影響を与えないことが分かった.

**3.3.3 試料注入量** 分析シグナルのピーク高さを増大させる要因には, 試料注入量が大きな割合を占める. Fig. 5 に本法における試料注入量の影響を示した. 3.2 で述べたように  $5.0 \text{ mm i.d.} \times 50 \text{ mm}$  のカラムを使用した場合, 試料注入量が  $1.5 \text{ cm}^3$  程度必要であったことから, 溶液の拡散の少ない新しいカラムでは, それ以下の注入量で十分な感度が得られることが予想される. 2.3.4 に従い注入量を  $0.5 \text{ cm}^3$  として測定を行ったところ, ピーク高さが安定せず  $0.5 \text{ cm}^3$  でも注入量としては過剰であることが分

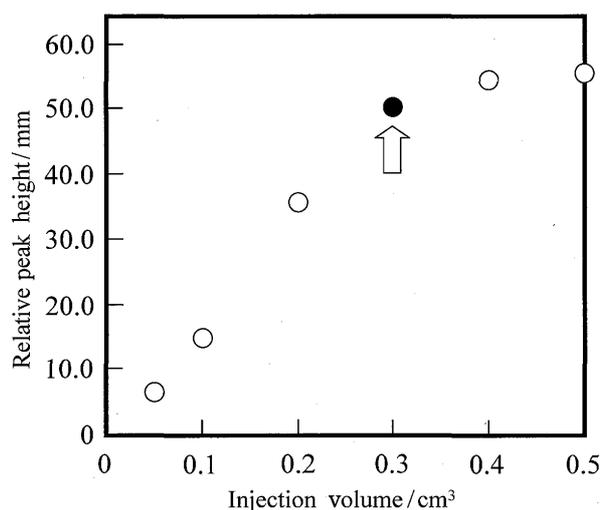


Fig. 5 Sample volume

Carrier ( $0.15 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl); Indicator ( $2.3 \text{ mmol dm}^{-3}$  HPPA); Flow Rate:  $0.6 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ; Sample concentration:  $5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$

かった. そこで, 試料注入量を  $0.5 \text{ cm}^3$  から  $0.1 \text{ cm}^3$  間隔で減少させ注入量を検討したところ,  $0.3 \text{ cm}^3$  で感度, 再現性ともに安定なシグナルを得た.

また, HPPA の濃度については, 既報<sup>12)~16)</sup>での濃度をそのまま使用した.

### 3.4 共存物質の影響

共存イオン又は共存物質の影響を検討した結果を Table 2 に示す. 使用した酵素は共存物質の影響を受けやすく, 無機イオンでは特に強い影響を受ける物質はみられなかったものの, 有機物に関してはアスコルビン酸で  $0.5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  レベルで負の影響をもたらした. これは, アスコルビン酸などの還元性を有する物質は POD による HPPA ラジカルの生成を抑制<sup>12)</sup>するため影響を与える. これよりアスコルビン酸オキシダーゼなどを用いて試料中のアスコルビン酸を分解してから定量に供することが考えられるが, 3.5 での試料中のその濃度は許容範囲内であったため, アスコルビン酸に対する処置は特に行わなかった. また, 尿酸も還元力を有するため  $5 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  で影響を与えたが, 尿酸の実試料中での存在割合はわずかなため, 希釈することで十分に処理が可能であると思われる. また, 実試料の中でも特に血清試料中に多く含まれるタンパク質の影響については, ヒト血清アルブミン (HSA) を用いたが,  $100 \text{ mg dm}^{-3}$  のタンパク質を添加しても影響は見られなかった.

### 3.5 実試料への適用

本法の共存物質に対する添加回収実験の結果から, 本システムをサプリメント試料中のコリンの定量に適用してみた. 使用したサプリメントは Choline & Inositol 500 mg (KAL company, U. S. A) を用いた. この試料一錠を  $100 \text{ cm}^3$  の  $0.15 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl に溶解し, その後, 孔径  $0.45 \text{ } \mu\text{m}$  のクロマトディスク 25 A で濾過した後, 10000 倍に希釈した ( $2.6 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ ). また,  $5.0 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$  のコリン

Table 2 Effect of the coexisting substances

Cation	Conc./mM	Recov., %	Anion	Conc./mM	Recov., %
Ca <sup>2+</sup>	0.5	95.8	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5	97.0
K <sup>+</sup>	0.5	98.2	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5	97.2
Mg <sup>2+</sup>	0.5	97.1	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.5	105
Al <sup>3+</sup>	0.5	100	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.05	98.4
Org.	Conc./mM	Recov., %	Org.	Conc./mM	Recov., %
Glucose	0.5	99.5	Creatinine	5	98.7
Ethanol	5	102	Tyrosine	0.05	100
Acetic Acid	5	97.4	Uric Acid	0.005	99.7
Ascorbic Acid	0.005	95.5	HSA <sup>a)</sup>	100 (ppm)	95.3

a) Human serum albumin addition to the  $10 \text{ } \mu\text{M}$  choline

Table 3 Analytical result in supplement

Sample	Found./ $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Recovery, %	R.S.D, % [n = 5]
$5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Standard sol.	—	—	0.21
1/10000 dil. Supplement sol.	2.6	—	0.28
$5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ Standard sol. + 1/10000 dil. Supplement sol.	7.2	95	0.23

R.S.D: relative standard deviation

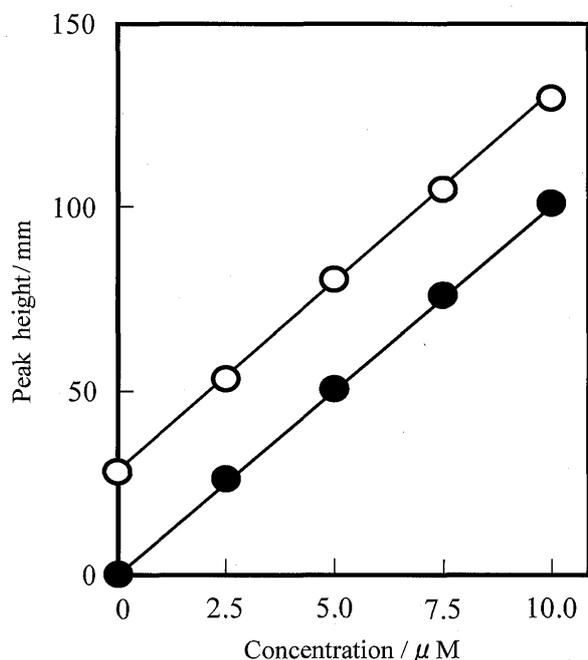


Fig. 6 Standard Addition Test of Choline in Supplement Sample

Carrier ( $0.15 \text{ mol dm}^{-3}$  NaCl); Indicator ( $2.3 \text{ mmol dm}^{-3}$  HPPA); Flow Rate:  $0.6 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ; Injection Volume:  $0.3 \text{ cm}^3$ ; ●: Calibration Curve; ○: Regression Analysis Curve

標準溶液を添加して回収実験を行ったところ、 $7.2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  となり、ほぼ 100% の回収率を得ることができた (Table 3). 更に、同一試料を 5 回連続注入したときの相対標準偏差は 0.3% 以内であり、こちらも良好な値を得ることができた。更に本法の信頼性を確認するため、標準添加法により検量線を作成したところ、得られた直線は標準溶液の検量線とほぼ平行しており、サプリメント中の共存物質の影響はみられなかった (Fig. 6)。以上のことから本システムは還元性物質の含有量が少ない試料では、共存物質の影響を受けずに定量が行えることが確認できた。

## 文 献

- 1) S. Milardović, I. Kruhak, D. Iveković, V. Rumenjak, M. Tkalčec, B. S. Grabarić: *Anal. Chim. Acta*, **350**, 91 (1997).
- 2) A. M. Azevedo, J. M. S. Cabral, D. M. F. Prazeres, T. D. Gibson, L. P. Fonseca: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **27**, 37 (2004).
- 3) O. Elekes, D. Moscone, K. Venema, J. Korf: *Clin. Chim. Acta*, **239**, 153 (1995).
- 4) V. C. Tsafack, A. Marquette, F. Pizzolato, L. J. Blum: *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 125 (2000).
- 5) D. Budai, P. Szerdahelyi, P. Kása: *Anal. Biochem.*, **159**, 260 (1986).
- 6) R. Dunphy, D. J. Burinsky: *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **31**, 905 (2003).
- 7) O. Baticz, S. Tömösközi: *Nahrung/Food*, **46**, 46 (2002).
- 8) S. Pati, F. Palmisano, M. Quinto, P. G. Zambonin: *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6974 (2005).
- 9) O. N. Schuvailo, S. V. Dzyadevych, A. V. El'skaya, S. Gautier-Sauvigné, E. CsÖregi, R. Cespuglio, A. P. Soldatkin: *Biosensors Bioelectron.*, **21**, 87 (2005).
- 10) J. Wang, G. Lin, Y. Lin: *Analyst*, **131**, 477 (2006).
- 11) Z. Song, J. D. Huang, B. Y. Wu, H. B. Shi, J. I. Anzai, Q. Chen: *Sens. Actuators B*, **115**, 626 (2006).
- 12) A. Sakuragawa, T. Taniai, T. Okutani: *Anal. chim. Acta*, **374**, 191 (1998).
- 13) T. Taniai, A. Sakuragawa, T. Okutani: *Anal. Sci.*, **15**, 1077 (1999).
- 14) T. Taniai, A. Sakuragawa, T. Okutani: *Anal. Sci.*, **16**, 275 (2000).
- 15) T. Taniai, A. Sakuragawa, T. Okutani: *Anal. Sci.*, **16**, 517 (2000).
- 16) T. Taniai, A. Sakuragawa, T. Okutani: *J. AOAC Inter.*, **84**, 1475 (2001).

## Flow Injection Analysis of Choline in Supplements Using Choline Oxidase Immobilized Enzyme Reactor Column

Masahumi NAKANO<sup>1</sup>, Masaaki YOSHIWARA<sup>1</sup> and Akio SAKURAGAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of materials and applied Chemistry, College of Science and Technology, NihonUniversity, 1-8-14, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8308

(Received 13 March 2007, Accepted 23 July 2007)

A simple and sensitive flow injection analysis (FIA) system with immobilized choline oxidase (ChO) and peroxidase (POD) enzyme reactor columns for the determination of choline has been developed. ChO was immobilized onto chitosan as a support by cross-linking with glutaraldehyde by forming a Schiff base, and choline was determined with fluorescence detection. The FIA system with the immobilized enzyme reactor columns was tested for the parameters of the optimization procedure: carrier solution, flow rate and injected sample volume. After the optimization of the FIA parameters, the response time was about 3 (min), the linear calibration curve was obtained between  $0.2 \mu\text{mol dm}^{-3}$  and  $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$  of choline ( $r^2 = 0.999$ ) and the detection limit was  $0.1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . After researching of the effects of coexisting substances by an additional recovery test, the FIA system was applied for a supplement sample and the relative standard deviations by repeated measurements ( $n = 5$ ) were found to be within 0.3%. It was found that the FIA system can be applied to any samples without effecting of the coexisting substances.

**Keywords** : immobilized enzyme reactor column ; FIA ; choline ; fluorescence detection.