

博士論文要録

FUMI 理論による電気化学検出高速液体クロマトグラフィーの
最適化と遊離脂肪酸の高感度定量への応用

小 谷 明

学位授与：東京薬科大学（2004 年 3 月 23 日）

機器分析法の開発・改良において装置や実験条件の最適化は重要である。この最適化について、従前は経験や試行錯誤により行われ、多くの時間と労力を費やしてきたが、ケモメトリックス的取り扱いを活用した最適化方法が確立できれば、効率よく機器の高性能化が図れて、実験の省力化も可能と考えられる。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用の電気化学検出は選択性に優れた方法であるが、装置の構成などの最適化を行うことで、更なる高感度化が期待できる。本研究は、function of mutual information (FUMI) 理論を活用した電気化学検出 HPLC の最適化方法を確立した内容である。更に、この最適化方法を新規に開発した遊離脂肪酸（FFA）測定用電気化学検出 HPLC に適用して、生体試料中の FFA の高感度定量を行って、その有用性を明らかにした。

“序論”では、本研究の背景と目的について述べた。

第 1 章 “FUMI 理論の基本と電気化学検出 HPLC の測定精度予測”では、FUMI 理論の基本概念を明らかにした上で、電気化学検出 HPLC に FUMI 理論が適応可能であることを示した。装置の最適化を意図する場合、分析装置に由来する測定値の精度を指標とするのが妥当である。本論文ではこれを測定精度と呼び、測定相対標準偏差（測定 RSD）により表現した。FUMI 理論では、機器ノイズが示す $1/f$ 揺らぎ（ f は周波数）を確率過程で表現することで、繰り返し測定によらず測定 RSD を予測する。著者は、検出電流のベースラインノイズも $1/f$ 揺らぎであると予想でき、1 本のクロマトグラムであってもこれには約 10 分間程度の時間内に非常に多くの電流シグナルやノイズのデータが含まれていると考えられたので、測定精度を求めるケモメトリックス的手法の中から FUMI 理論の採用が妥当と判断した。

実際に電気化学検出 HPLC のベースラインノイズは、 $1/f$ 揺らぎを示し、FUMI 理論で表現できることが分かった。エピカテキンのピークにつき FUMI 理論により求めた測定 RSD（以後、予測 RSD という）と繰り返し測定により求めた RSD（以後、実測分析 RSD という）の比較を行ったところ、両者には、よい一致が見られた。実測分析 RSD は、測定した濃度についてしか求められないが、

FUMI 理論は、1 本のクロマトグラムのノイズとシグナルから広い濃度範囲における測定 RSD を予測することが可能であった。

第 2 章 “電気化学検出 HPLC システムと測定条件の最適化”では、ベースラインノイズのパワースペクトル及び FUMI 理論を活用した電気化学検出 HPLC の最適化方法を確立した。

ベースラインノイズのパワースペクトルを利用して、ノイズを評価することで、電気化学検出 HPLC に適した分析機器を選択できた。ポンプにはストローク量の小さい機種が、電解セルには Wall-jet 型の構造が、作用電極はプラスチックフォームドカーボン（PFC）電極が優れていることが分かった。これらの評価は約 3 分間のベースラインノイズの解析によって実施できることを明らかにした。この手法は、分析装置の評価や日常点検にも有用であり、経験の浅い分析者もトラブルに対処しやすい方法である。

更に測定条件の最適化のために、情報量 ϕ と分析効率 θ を用いた。ここで情報量 ϕ は $\phi = \log(1/\text{予測 RSD})$ とし、分析効率 θ は $\theta = \phi/t_R$ と定義した。両者が大きいほど優れた測定条件である。ここで、 t_R は測定対象物の保持時間とする。エピカテキンを電気化学検出 HPLC の測定条件最適化の例とし、4 種類の ODS カラム、流量、印加電位について検討した結果、エピカテキンを精度よく定量するには、ODS カラム（125 mm $\times$ 4.0 mm i.d., 5 μm ）、流量 0.9 ml/min、印加電位 +0.6 V vs. SCE を最適条件と選択することができた。従来は検討するすべての条件で 1 回の測定を行い、最も S/N 比が良かった条件を選択する。しかし、これで選択した条件は測定精度が良いという保証はなく、測定精度を求めるために繰り返し測定を行う必要がある。情報量 ϕ と効率 θ を活用することで、短時間に迷いのない最適測定条件が選択できることを明らかとした。

第 3 章 “遊離脂肪酸測定用電気化学検出 HPLC の開発と高感度定量への応用”では、FFA の新規な電気化学計測法として、キノンの電解還元を利用した電気化学検出 HPLC を開発した。FFA は、油脂の劣化、糖・脂質代謝異常の指標となることから、医学・薬学を中心に幅広い分野において簡易で高感度な測定法が期待されてきた。FFA 自体は電極不活性で、単なる定電位電解では検出が困難であったが、著者はキノンの電解還元を利用した FFA の電気化学検出 HPLC を開発した。この方法は、比較的簡単な

前処理でかつ誘導体化を行わずに FFA を検出できる利点がある。

これによる電気化学検出 HPLC システムは、移動相を送液しカラムで分離する分離系と、キノン溶液を送液する送液系の 2 流路で構成した。この HPLC システムは、第 2 章で述べた 1 流路系の HPLC システムの最適化のほかに、移動相とキノン溶液が混合するミキシング部を検討することで、ピークの広がりを抑え、しかも試薬との混合に十分なポストカラム方式の条件を選択する必要がある。ベースラインノイズのパワースペクトルと FUMI 理論に基づき予測した検出限界を利用して、FFA 測定用電気化学検出 HPLC に最適なミキシング部を選択できた。

更に最適化された電気化学検出 HPLC を血しょう中及び皮脂中の FFA の高感度定量に利用した。血しょう 10 μ l を用いて健常人の食後の血糖値の変化に伴う血中 FFA の動態追跡、油取り紙 25 mm² に吸着した皮脂を用いて頭部 50 か所における FFA の分布分析を行うことができた。本法は、極微量の試料量で測定可能であることから被験者の負担も少なく、また簡易、迅速に FFA の測定ができることから、血液中や皮膚における FFA の役割及び動態を明らかにするための有力な手段であると考えられる。以上のように、FFA の高感度定量法として、電気化学検出 HPLC を最適化できたことを述べた。

“総括”では、各章で得られた結果の総括を述べた。

以上本論文では、新しい最適化方法を確立できた。この手法を活用すれば、日常点検及び日常分析において実験時間の短縮、試薬及び廃液量の軽減、分析者の人件費の削減のみならず新規分析法あるいは分析装置の開発、その性能評価の効率化において、多大に貢献できるものと考えられる。

公表論文

- 1) A. Kotani, T. Fuse, F. Kusu: *Anal. Biochem.*, **284**, 65 (2000).
- 2) A. Kotani, Y. Miyaguchi, F. Kusu: *Anal. Sci.*, **17**, a141 (2001).
- 3) A. Kotani, F. Kusu: *Arch. Dermatol. Res.*, **294**, 172 (2002).
- 4) A. Kotani, Y. Hayashi, R. Matsuda, F. Kusu: *J. Chromatogr. A.*, **986**, 239 (2003).
- 5) A. Kotani, Y. Hayashi, R. Matsuda, F. Kusu: *Anal. Sci.*, **19**, 865 (2003).
- 6) A. Kotani, Y. Miyaguchi, D. Harada, F. Kusu: *Anal. Sci.*, **19**, 1473 (2003).
- 7) A. Kotani, T. Iwagami, T. Ueda, Y. Kimura, Y. Hayashi, R. Matsuda, F. Kusu: *ITE Lett.*, **4**, 783 (2003).



Digest of Doctoral Dissertation

Optimization of high-performance liquid chromatography with electrochemical detection using a chemometric tool based on the FUMI theory and its application to the development of a highly-sensitive method for determining free fatty acids

Akira KOTANI

Department of Analytical Chemistry, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy & Life Science, 1432-1, Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo 192-0392

(Award by Tokyo University of Pharmacy & Life Science dated March 23, 2004)

A chemometric tool based on the Function of Mutual Information (FUMI) theory can provide a relative standard deviation (RSD) from a single measurement of noise and signal was used to optimize high-performance liquid chromatography with an electrochemical detection (HPLC-ECD) system and the conditions. That the predicted RSD by FUMI theory was parallel to the observed RSD shows that FUMI theory is useful for predicting the measurement precision in HPLC-ECD without repetitive measurements. The power spectra of chromatographic baseline were used to trace the source of instrumental noise, and to select a suitable apparatus in the HPLC-ECD system. To optimize the HPLC-ECD conditions, two parameters, information content (ϕ) and efficiency (θ = information content/time), which were calculated from predicted RSD based on the FUMI theory, were used. Moreover, optimization methods by the FUMI theory were applied to new HPLC-ECD that was developed with the objective of providing a sensitive, simple, and rapid means for determining free fatty acids (FFAs). This method requires small sample amounts, and the procedure is quite simple without the derivatization of fatty acids, permitting time-course measurements at the FFA level in human plasma and the distribution of FFA in skin surface lipids from 50 points on a human head. The presented method using FUMI theory saves considerable amounts of chemicals and experimental time, and was found to be useful to optimize the system and the conditions of HPLC-ECD.

(Received May 6, 2004)

Keywords : HPLC; electrochemical detection; measurement precision; optimization; FUMI theory; free fatty acid.