

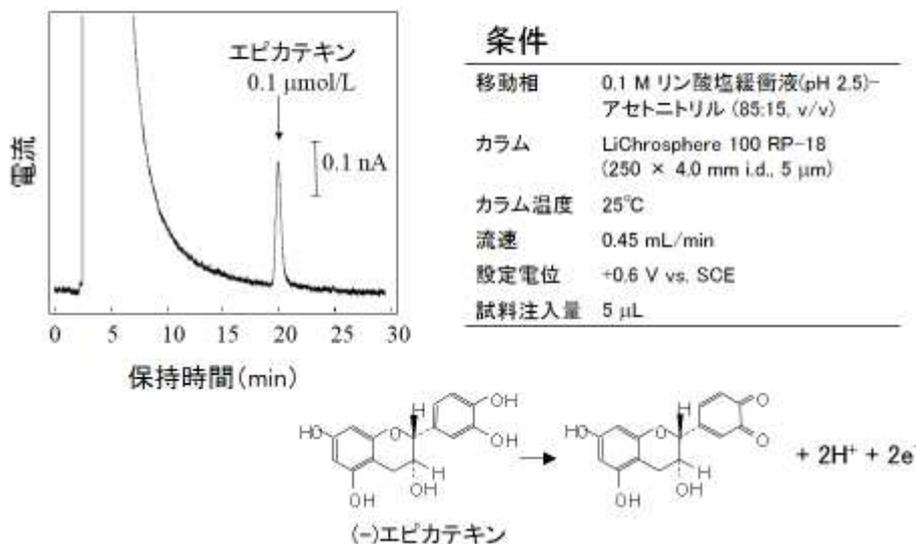
4 FUMI 理論による HPLC の測定精度推定の実践 -電気化学検出 HPLC を例として-

電気化学検出 HPLC のベースラインは、FUMI の理論曲線で表現でき、ノイズパラメーター (\tilde{w} 、 \tilde{m} 、 ρ) を算出することができることはわかった。しかし、実際に電気化学検出 HPLC の測定精度推定に FUMI 理論が適応できるか否かを確認するために一度は、精度の濃度プロファイルを作成し、くり返し測定から求めた RSD と FUMI 理論より算出した RSD が同程度であること調べておく必要がある。本節では、電気化学検出 HPLC の測定精度推定に FUMI 理論が利用可能であることを確かめるために、5 種類の濃度の物質についてそれぞれ 5 回のくり返し測定によって RSD を実測し、その分析 RSD と FUMI 理論によって推定された測定 RSD を比較することとした。例として、エピカテキンの酸化反応を用いた電気化学検出 HPLC を行った。エピカテキンに正の電位を印加することによって図 18 の反応式に示すように、B 環のフェノール性水酸基が酸化される。この反応に関与する酸化電流を計測することで、エピカテキンを電気化学検出器によって定量できる。

HPLC の精度推定の実践

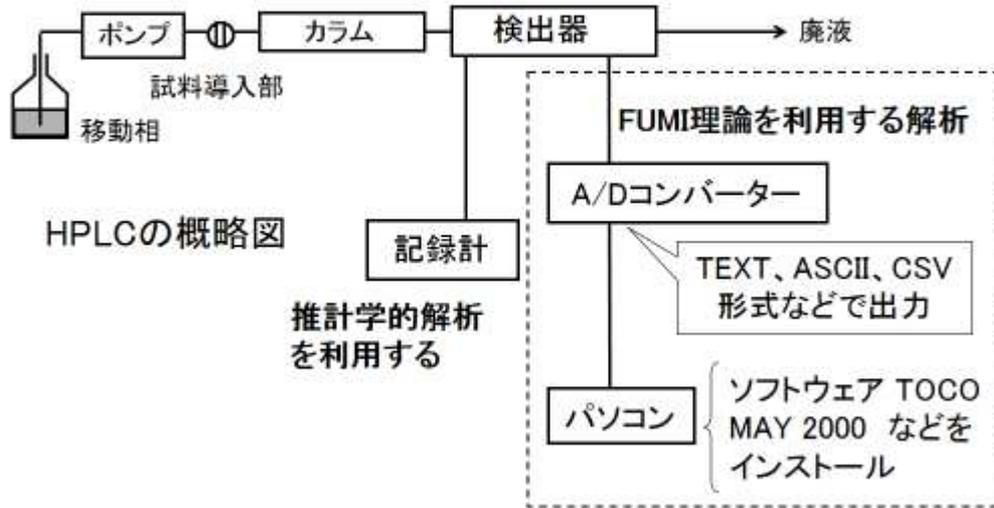
図 18

エピカテキンの電気化学検出 HPLC を例として



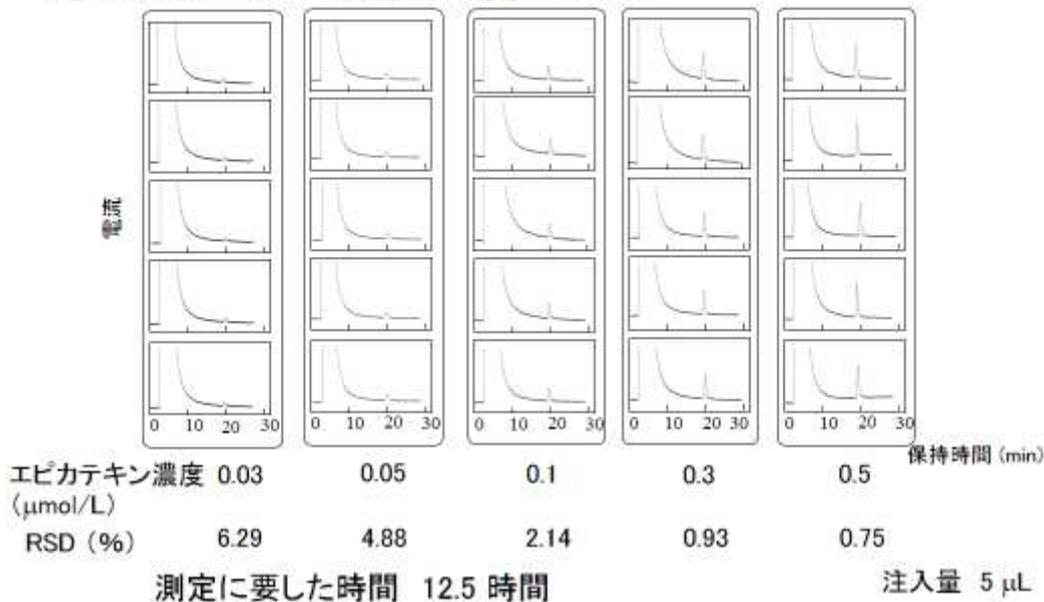
使用した電気化学検出 HPLC システムの概略図を図 19 に、測定条件を図 18 中の表に示した。TOCO や MAY2000 で計算するには、検出器の出力をデジタルデータにする必要がある。そのため、ペンレコーダーに出力させている場合は、A/D コンバーターを用いて、テキスト形式、CSV 形式、もしくはアスキー形式のファイルを得る必要がある。我々の場合は、電気化学検出器から出力された信号をアンプ (L1201、横河電機製) で増幅し、A/D コンバーター (NR-110、キーエンス製) でデジタル信号に変換後、パーソナルコンピュータに取り込んだ。デジタルデータの取り込み間隔は 0.2 s/ポイント、ベースラインのパワースペクトルは 1024 ポイントのデジタルデータをフーリエ変換して得た。パワースペクトルを得るためのフーリエ変換、FUMI の理論曲線の作成、精度推定には、ソフトウェア (TOCO) を使用した。

FUMI理論による解析には、デジタルデータが必要 図 19



従来の方法により、すなわち FUMI 理論を用いない場合、エピカテキンの RSD を求めるには同一試料についてくり返し測定が必要である。例えばエピカテキン (> 98%、栗田工業製) を用いて実験をした場合のクロマトグラムを図 5 に示す。0.3 $\mu\text{mol/L}$ のエピカテキンについて RSD ($n=5$) を求める場合、5 回のくり返し測定を行い図 5 に示すクロマトグラムを得なければならない。図 5 から求められた RSD は、0.93% であり、測定時間は、約 2.5 時間であった。このようにして得た分析 RSD を以後、実測分析 RSD と呼ぶ。

エピカテキンのクロマトグラムと 5 回の繰り返し測定で得た RSD 図 5

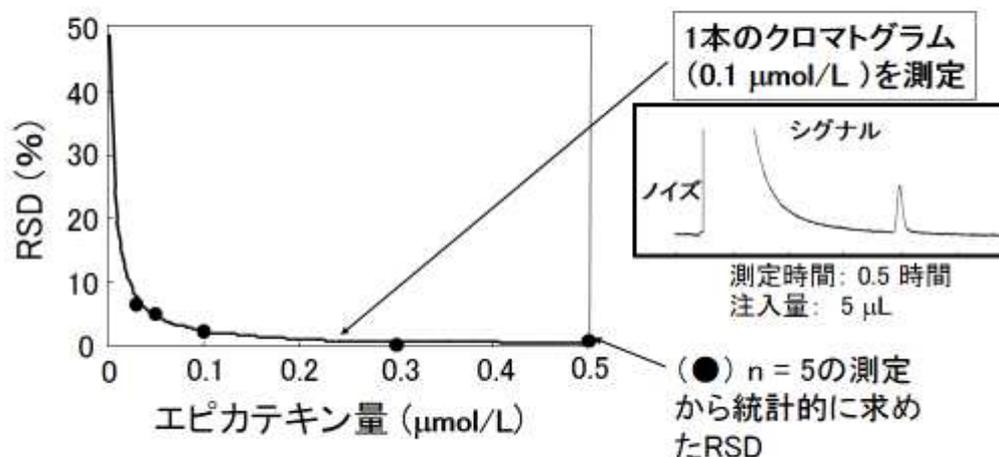


0.03、0.05、0.1、0.3、0.5 $\mu\text{mol/L}$ のエピカテキンについてそれぞれ 5 回のくり返し測定を行って、25

本のカロマトグラム(図 5)を用いて得た実測分析 RSD を図 24 に黒丸(●)でプロットした。図 24 にプロットした 5 種類の濃度について実測分析 RSD を求めるには、1 回の測定が約 0.5 時間であったので、12 時間以上の測定時間を要した。一方、1 回の測定で得たカロマトグラムから、FUMI 理論を用いることで得られる RSD を図 24 に実線で示す。FUMI 理論によって推定される測定 RSD を以後、予測 RSD と呼ぶ。

精度の濃度プロフィール

図 24



実測分析 RSD ではくり返し測定を行った濃度の RSD しか求められないが、FUMI 理論では 1 本のカロマトグラム上の連続したデジタルデータを用いて確率論によって広い濃度範囲における RSD を推定することができる。つまり、測定していない濃度の RSD についても精度を推定することが可能である。このデータポイント数を考慮すると 12 時間以上ものくり返し測定を行っても、その信頼性は $n = 5$ の RSD であるのに対し、FUMI 理論によって 1 回の測定 (0.5 時間) で得られる予測 RSD の信頼性は 30~50 回のくり返し測定によって求められた RSD に相当する [9]。予測 RSD と実際のくり返し測定によって求めた実測分析 RSD は図 24 に示すようによく一致していた。

実測分析 RSD は式(15)における注入誤差の項(I^2)を含む分析精度であるが、これと予測 RSD との一致が見られたのは、主に分析機器に由来する測定精度の影響が注入精度に比べてはるかに大きいためである。つまり、今回、実測分析 RSD を求めた濃度範囲では、式(1)の誤差の伝播法則において注入精度を含む調製 RSD の項は測定 RSD の項よりも著しく小さく、近似的な取り扱いとしては調製 RSD の項は無視することができる。以上のことから、電気化学検出 HPLC で検出されたシグナルピークはほぼ一定で、このピークのばらつきにはバックグラウンドである機器ノイズが大きく支配しているとの考えが現実的に妥当であることがわかった。