

電気化学検出LCの高感度化と 技術評価

東京薬科大学薬学部 楠 文代

1. はじめに

機器分析における不確かさの表現には、標準偏差(SD)や相対標準偏差(RSD)が用いられる。Function of Mutual Information (FUMI)理論に基づくRSDの予測は、不確かさ推定のイノベーションとして注目される。本稿では、FUMI理論の活用による、電気化学検出液体クロマトグラフィー(LC)における高感度化と技術評価について紹介する。

2. 電気化学検出 LC では

電気化学検出(ここではアンペロメトリック検出に限る)LCは、電極活性物質を選択的に捕えるので酸化還元物質の分析に有利であり、図3に示す比較的単純な装置により高感度に定量できる特色がある。しかしながら測定精度が劣ることがある。これは装置の最適化が不十分なためと思われる。

電気化学検出では、バイカレインのような物質をどのように捕らえているのであろうか? 反応の場である作用電極表面に任意の電位(設定電位)をかけるとき、カラムを通過してきた溶出液中に含まれるバイカレインが電極に接して電子を与え、この酸化電流が検出信号として捉えられる(図3)。

作用電極上を電解液が流れる薄層型の電解セルにおける電流の大きさは、電極反応の種類、電解セルの構造、流速、測定対象物質の濃度などにより左右される。高感度化には、これらに関与するパラメータを考慮に入れ、さらにノイズを低減することが肝要である。(図4)もし測定対象が濃度ゼロであっても実質的

な電流ゼロにはならず、ブランク電流が流れる。これには、2つの要因がある。1つは溶出液中の不純物による電解電流であり、他は作用電極と溶液の界面で生じる電気二重層への充電電流である。前者は高純度試薬の使用により回避できるが、後者は必ず生じる。電気二重層の性質は、電極の種類、形状、設定電位の大きさ、溶液中の支持電解質の種類や溶媒などに依存する。さらに、電気二重層の厚さは溶液の流速にも影響される。したがって、電気化学検出器では、ブランク電流に対して負のバイアス電流をかけて見かけ上の電流ゼロをブランクとして扱っている。(図5)

電気化学検出でS/N比を上げるには、試薬の純度、電極反応速度、電解効率の向上のほかに、ブランク電流の安定化が大切である(図6)。

3. 装置の最適化

電気化学検出LC装置の最適化は、図7に示す①送液ポンプの選定、②電解セルの構造の検討、③カラムの選定、④設定電位の検討、⑤流速の検討、及び⑥移動相組成比の検討に関して、以後紹介する。パワースペクトルを活用するとノイズの低減を観測しやすいので、これにより①及び②の最適化を行った。パワースペクトルは、連続した1024ポイントのデジタルデータから得、0.2 s/ポイントでデータを取り込んだので、約3分間のクロマトグラムのベースラインをもとに得ることができる。

なお③～⑥は、後述のようにFUMI理論を利用したRSD算出を活用して、最適化を行っ

た。

送液ポンプの選択: HPLC の送液ポンプとして一般的なプランジャー式ポンプは、連続運転が可能で、移動相の補充も容易といった利点をもつが、ピストン運動に由来する脈流が問題となる場合がある。このような場合にクロマトグラムのベースラインのパワースペクトルを観測すると、ノイズの周波数依存性が如実に現れる。

ポンプ PU-880 (ストローク量 0.08 mL、日本分光製) を流速、0.36 mL/min、0.45 mL/min、0.54 mL/min で使用したときに得られるベースラインを図8に示した。このベースラインをフーリエ変換して得たパワースペクトルには、矢印で示す周波数にピークが現れた。

脈流ノイズを抑制するには、ポンプと試料注入部の間にダンパーを組み込むことがある。ダンパーにより、改善前に観察された大きなピークは消失した。また、ストローク量の小さいポンプ DP-8020 (ストローク量 0.006 mL x 2、東ソ一製) を用いた場合、ノイズは著しく低減した。(図 9)

電解セルの構造: 図 10 に示すように、EDP-1 型電解セルは作用電極表面にカラムからの溶出液が垂直にあたる Wall-jet 型で、EC-840 型電解セルは、斜めにあたる構造である。EC-840 型のノイズに対して EDP-1 型のノイズはかなり小さいことが分かった。(図 10)

4. FUMI 理論を利用した RSD 算出を活用した測定条件の最適化

予測 RSD の算出: FUMI 理論を活用した電気化学検出 HPLC の測定精度予測のスキームを図 11 に示す。A は、クロマトグラムである。ベースライン中の連続した 1024 ポイントのデジタルデータをフーリエ変換するとパワースペクトルを得ることができる。これに FUMI の理論曲線をシンプレックス最小二乗法でフィッティン

グさせ、ノイズパラメーターであるホワイトノイズの SD (\tilde{w})、マルコフ過程の SD (\tilde{m})、自己相関係数 (ρ) を算出する。次に、クロマトグラムのピーク面積 (A)、ピークを積分するポイント数 (k_p) を用いて、FUMI の基本式から RSD を求める (図 11)。FUMI 理論によって予測される RSD を以後、予測 RSD と呼ぶ。

キャピラリーカラムを用いた電気化学検出 LC: クロマトグラフィーでは、サンプルインジェクターに注入された物質は、カラム内や移動相中で拡散されて検出部に到達する。注入から検出に至る間の測定対象物質の濃度の低減を抑制できれば、電気化学検出の高感度化が可能である (図 12)。そこで、キャピラリーカラムを用いるシステムを構築した (図 13)。

情報量 ϕ と効率 θ : 測定条件の選定では、ばらつきの少ない条件が望ましい。と同時に、分離を確保しつつもできるだけ短時間に分離を達成することが、分析上は望まれる。そこで、測定条件の良否の判定を行い易くするために、次の情報量 ϕ と効率 θ のパラメータにより、予測 RSD と保持時間 t_R を表現することとした。

$$\text{情報量: } \phi = \log(1/\text{RSD})$$

$$\text{効率: } \theta = \phi / t_R$$

図 14 に模式的に示すように、 ϕ と θ はともに大きい値が良質を意味するので、判定では右上の条件を優れた条件として選択すればよい。

設定電位の検討: 電気化学検出器の作用電極の電位は、分析対象物質の選択性と感度を左右する。通常その設定は、ハイドロダイナミックボルタモグラム (電位と電解電流ピークの高さの関係を表す図) を求めて、高い電流値を与える電位を選んでいる。バイカレインとバイカリンにつき、+400 ~ +900 mV vs. Ag/AgCl の間の 7 点の電位で測定したハイドロダイナミックボルタモグラムを、図 15 左側に示した。最も高い電流値が +900 mV であった

が、この電位では多少ノイズが大きかった。

一方、予測 RSD から求めた ϕ と θ の電位依存性は、図 15 右側に示した。RSD はノイズの寄与も含んでいるので、バイカレインは +900 mV とバイカリン +650 mV が、S/N 比の点で優れていた。これらより、設定電位として +650 mV vs. Ag/AgCl を選んだ。

流速の検討: バイカレイン (B) とバイカリン (BG) につき、0.6 μ L/min ~ 2.0 μ L/min において保持時間を測定したところ、図 16 右上の結果を得た。それぞれのクロマトグラムから得た予測 RSD から求めた ϕ と θ の流速依存性は、図 16 右下に示した。バイカレインとバイカリンの ϕ - θ プロットから、流速は 1.8 μ L/min に定めた。

移動相組成比とカラム: バイカレインとバイカリンの電気化学検出キャピラリー LC を、ODS カラムと移動相 (リン酸:水:メタノール) を用いて行った。図 17 に示すように移動相の組成を検討した。リン酸:水:メタノール (0.5 : x : 100 - x, v:v:v) のメタノール含量を変えて得た ϕ - θ プロットから、メタノール含量は 65%、すなわち、移動相の組成比として、リン酸:水:メタノール (0.5 : 35 : 65, v:v:v) を定めた。

また、図 18 表に示す市販 5 種類のキャピラリーカラムを用いて、バイカレインとバイカリンのクロマトグラムを測定した。両者のピークの分離検出が適切で、かつバイカレインの ϕ - θ プロットを考慮に入れて、Inertsil ODS-3 (150 x 0.2 mm i.d., 3 mm) をカラムに選定した。

5. 検出限界と定量限界

RSD の濃度プロフィール: 図 19 にはバイカレインのクロマトグラムについて得た予測 RSD の濃度プロフィールを実線で示す。また 5 回の繰り返し測定の統計計算で得た RSD を白丸でプロットした。実線と白丸は、同等であるとみな

すことができ、これより、FUMI 理論を利用して求めた予測 RSD も繰り返し測定の推計学的計算と同程度に信頼できると考えられる。

バイカレインの検出限界と定量限界: 検出限界は、ブランクの測定値の SD の 3 倍のシグナルが得られるときの測定値として表される (SD/検出限界 = 1/3)。FUMI 理論によって求めた予測 RSD を用いると、検出限界 3 SD は、33% の RSD が得られるときの測定値として求めることができる (図 19)。また、定量限界は、ブランクの測定値の SD の 10 倍のシグナルが得られるときの測定値として表されるので、定量限界は、10% の RSD が得られるときの測定値として求めることができる。

バイカレインの検出限界は、26 amol であり、コンベンショナル HPLC-ECD やセミマイクロ HPC-ECD より、それぞれ 15,000 倍、80 倍、高感度な装置が構築できた。(図 20、図 21)

6. おわりに

以上述べたように、ベースラインのパワースペクトルの解析、ならびに FUMI 理論に基づく予測 RSD の算出は、装置や技術の評価を容易ならしめた。予測 RSD の算出は、装置の高感度化ばかりでなく、装置の日常点検にも生かすことができ、電気化学検出 LC の精度向上にも寄与できる。

FUMI 理論を利用した方法は、信頼性に富む RSD が求められるので、定量における不確かさの評価に役立つと思われる。

電気化学検出 LC

図3

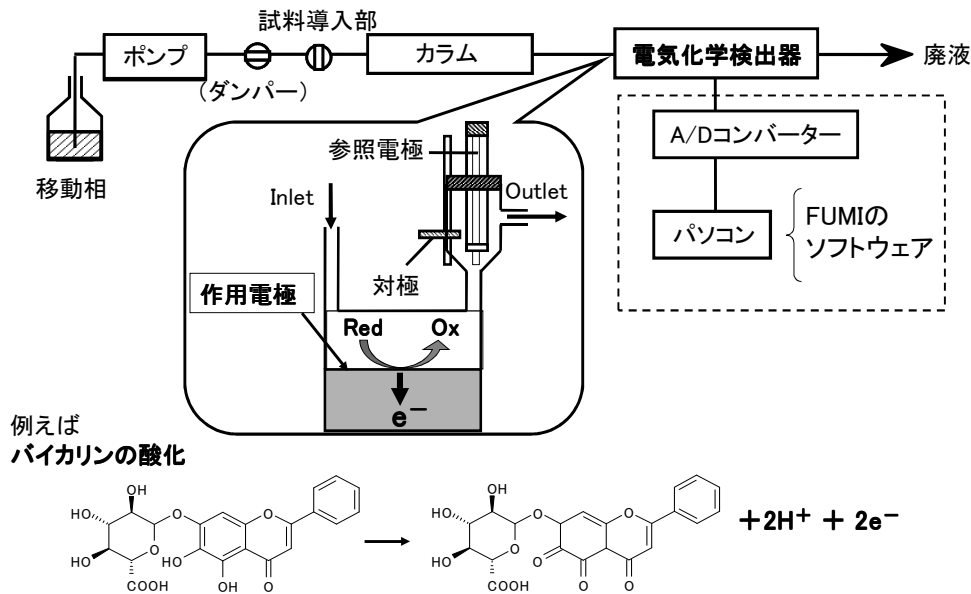


図4

高感度化には...

シグナルを上げる ⇒ 電流値を大きくする

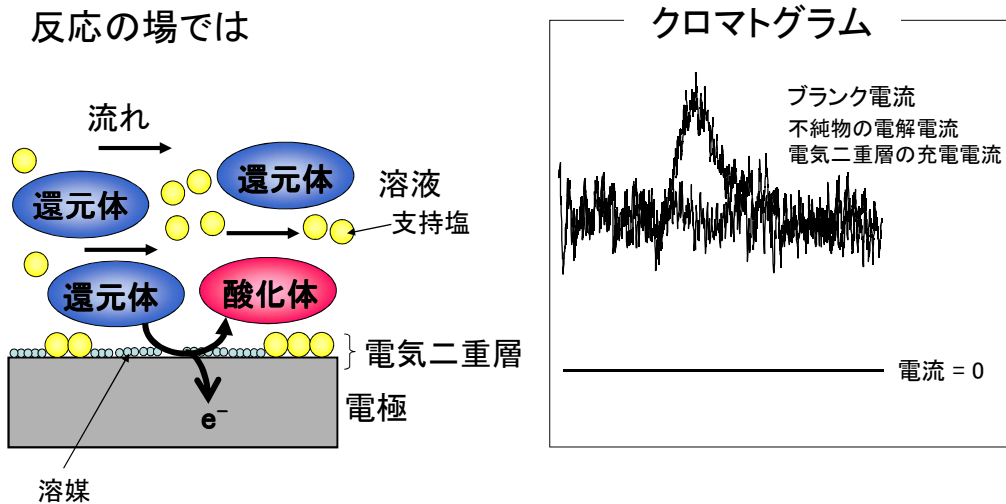
$$i = 1.47 n F U^{1/3} (DA / h)^{2/3} C$$

- | | |
|------------------|----------------|
| n 電解反応に関与する電子数 | F ファラデー定数 |
| U 流速 | D 測定対象物の拡散定数 |
| A 電極表面の面積 | h ガasketの厚さ |
| C 測定対象物の濃度 | |

S/N比を良くする ⇒ ノイズを抑える

図5

電気化学検出(アンペロメトリック検出)



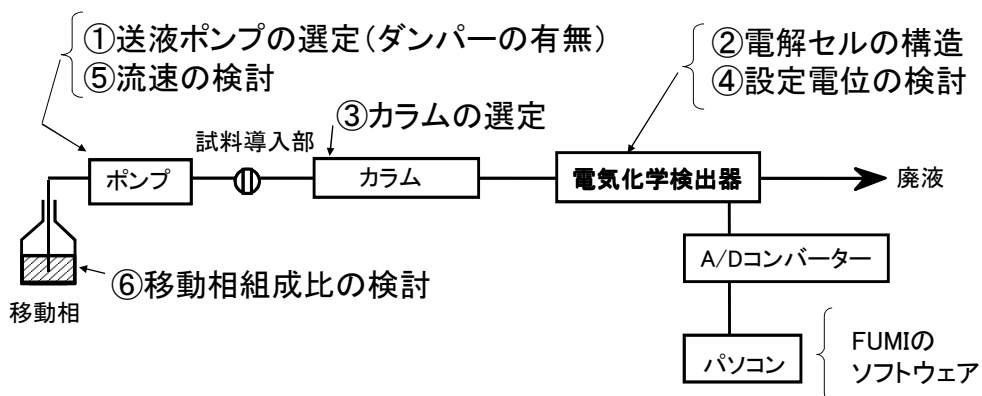
高感度化のためにS/N比を上げる

図6

- 高純度の試薬を使う → ブランク電流 ↓
- 電極界面を安定にして充電電流の変動を少なくする → ブランク電流安定化
 - ・セルの構造
 - ・流速
 - ・電極と電解液の選定
- 電子授受反応速度を上げる → シグナル ↑
 - ・設定電位の選定
 - ・電極材料の選定
 - ・支持電解質溶液の選定
- 電解の効率を上げる → シグナル ↑
 - ・セル容量を小さくする
 - ・流速を適切に

図7

ベースラインのパワースペクトルを活用して、装置の最適化



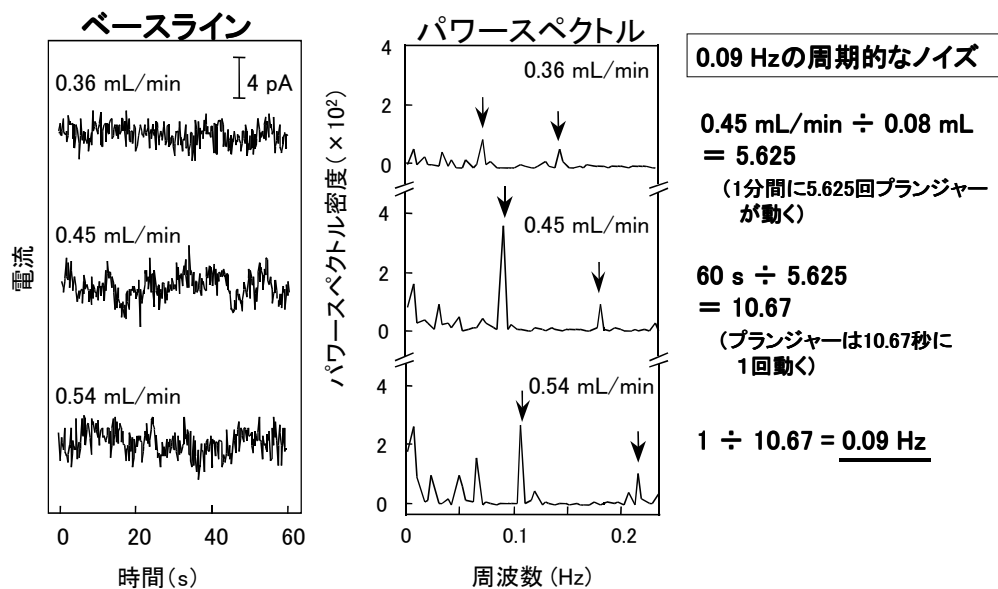
①②： ベースラインのパワースペクトルを活用

③④⑤⑥： FUMI理論を利用したRSD算出を活用

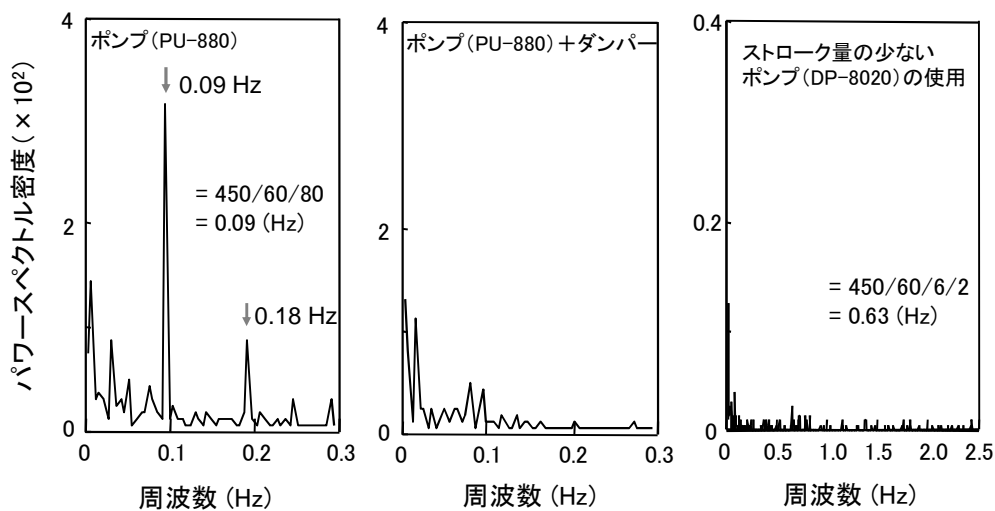
送液ポンプの選定

図8

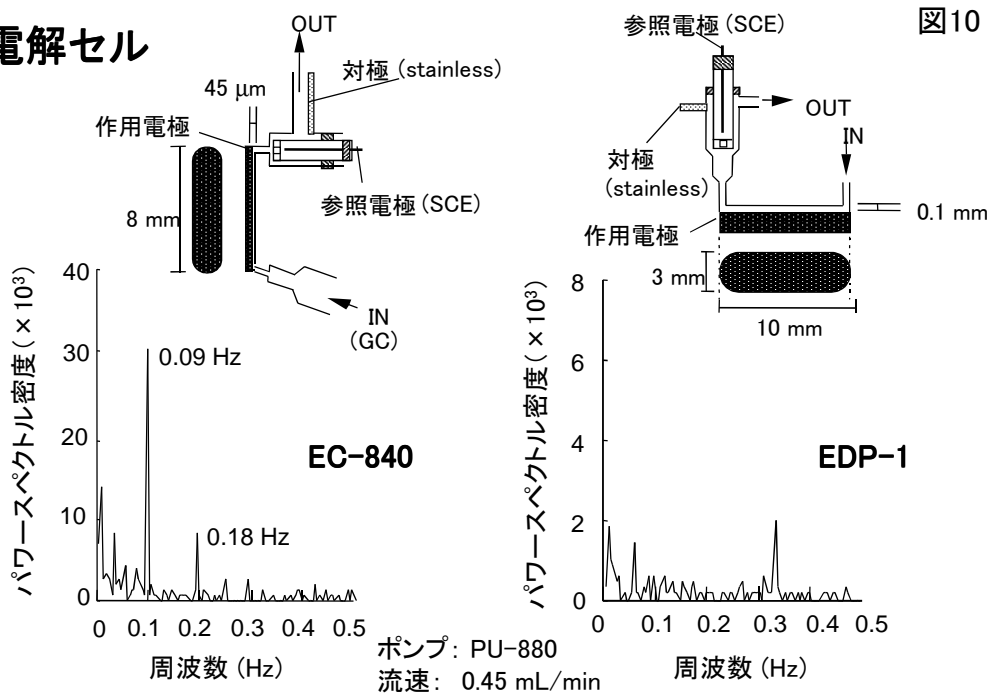
(1) 脈流のチェック



改善前 (2) 改善の手段 図9

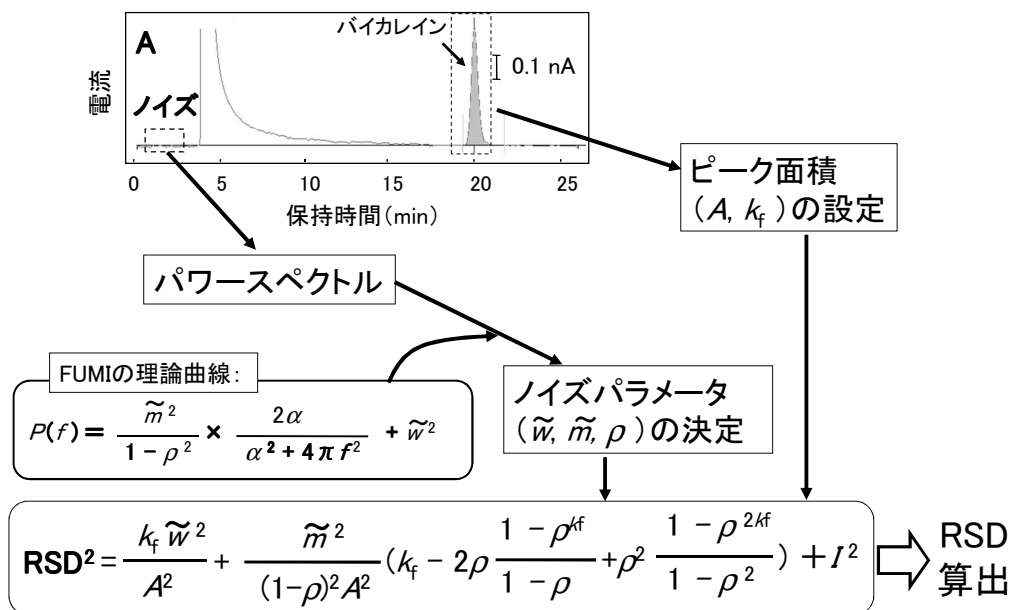


電解セル



FUMIによってRSDを算出

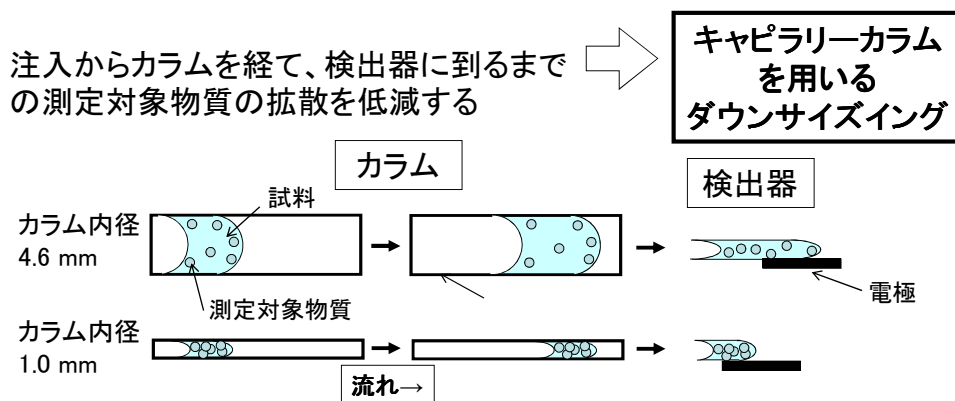
図11



高感度化のためには

図12

注入したサンプルにつき、カラム通過後に到達する作用電極界面での濃度を考慮



キャピラリーカラムを用いた
電気化学検出LCシステム

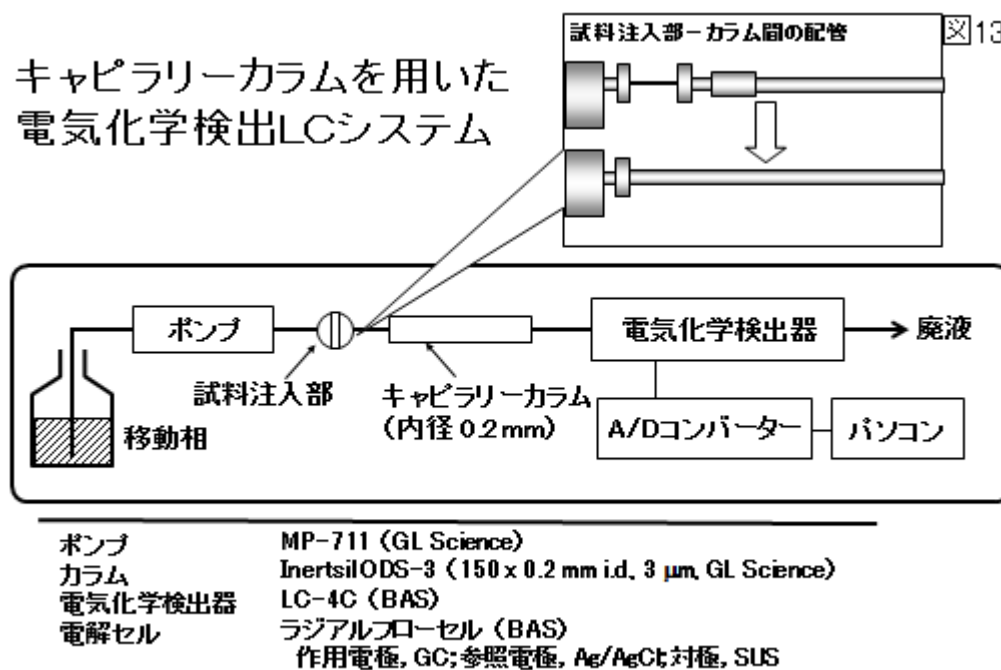


図13

測定条件の優劣判断に際して

図14

情報量 ϕ と分析効率 θ を用いて判断すると便利

$$\text{情報量 } \phi = \log \left(\frac{1}{\text{RSD}} \right)$$

$$\text{分析効率 } \theta = \frac{\phi}{t_R}$$

RSD: 測定対象物質の予測RSD

t_R : 測定対象物質の保持時間 (min)

RSD (%)	ϕ
0.1	3.0
1.0	2.0
10 (定量限界)	1.0
33 (検出限界)	0.48

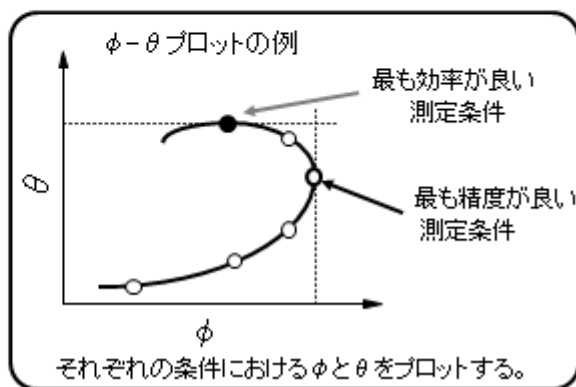
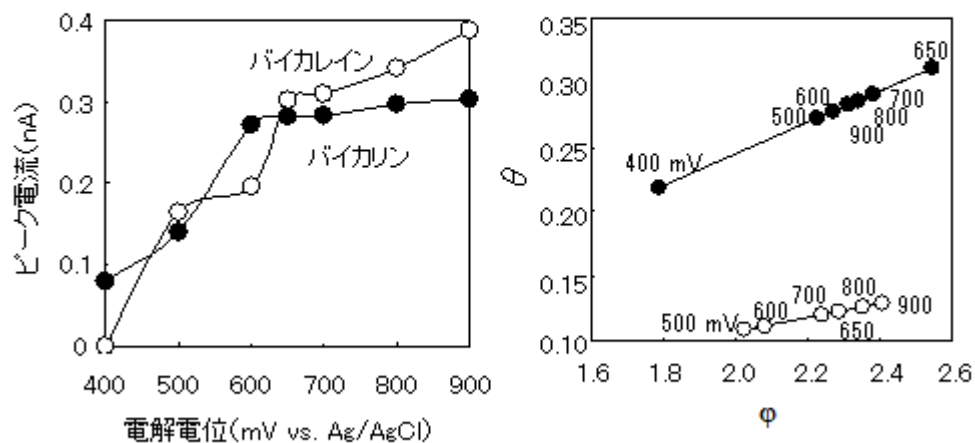


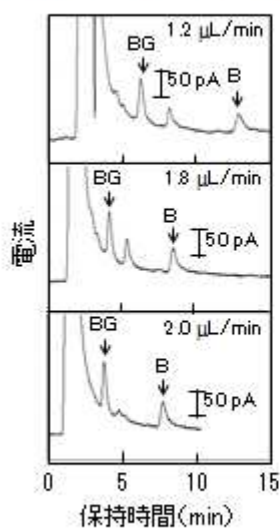
図15

設定電位の検討

ハイドロダイナミックボルタモグラム ϕ - θ プロット



流速の検討



サンプルループの容量: 0.2 μL

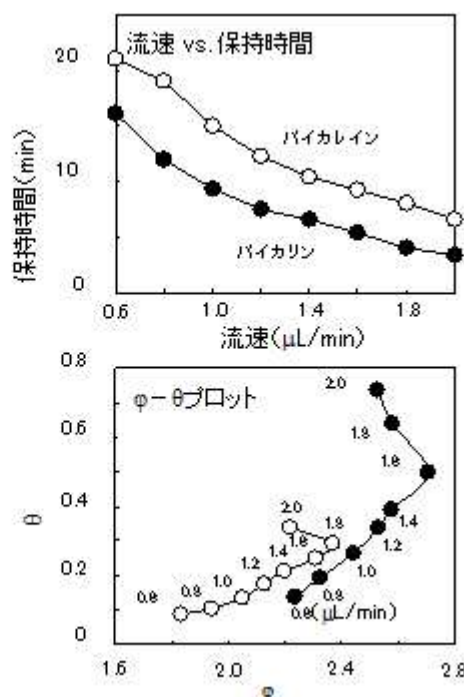
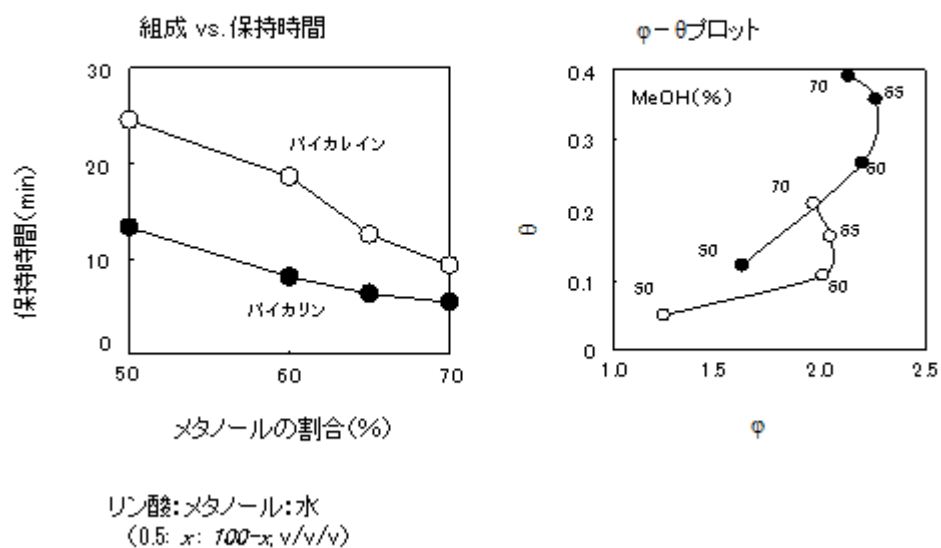


図16

図17

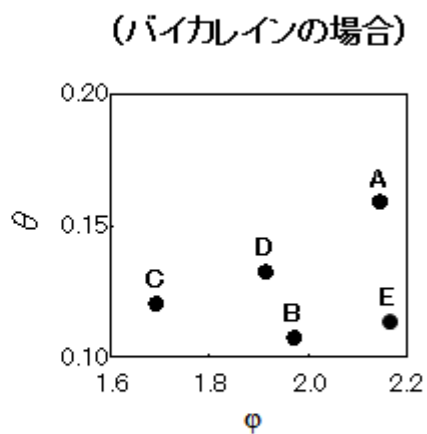
移動相の組成比の検討



キャピラリーカラムの選択

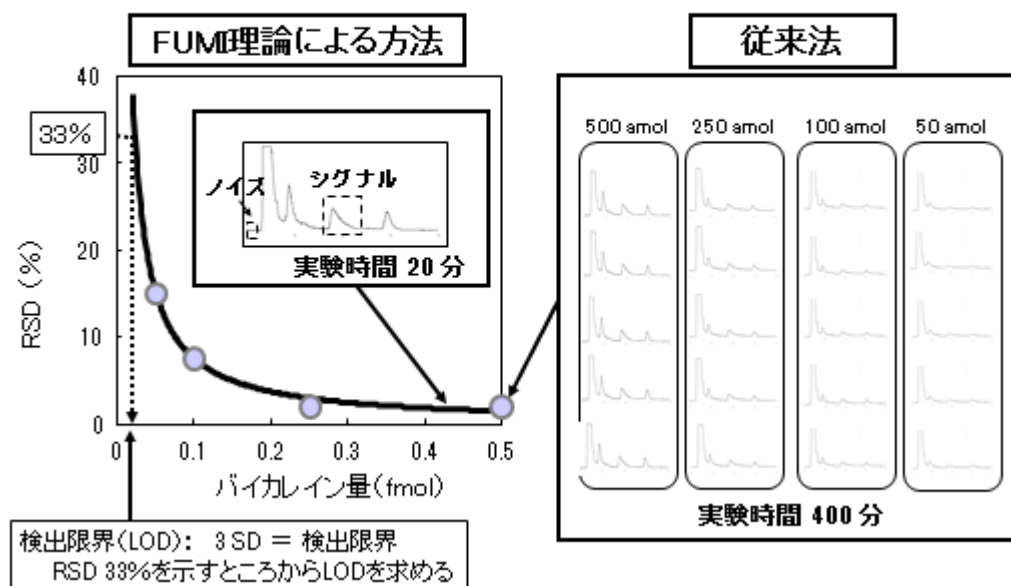
図18

カラム (長さ 150 mm 粒子径 3 μm)	内径 (mm)	分離度 (BGとB)
A. UG 120 (資生堂)	0.3	バイカリン 測定不可
B. MG 120 (資生堂)	0.3	9.83
C. Inertsil ODS-3 (LC-Packing)	0.3	7.63
D. Inertsil ODS-3 (GL Science)	0.3	6.54
E. Inertsil ODS-3 (GL Science)	0.2	6.75



バイカレインの濃度プロフィール

図19



最適化されたCLC-ECD条件

図20

移動相	リン酸:メタノール:水(0.5:65:35, v/v/v)
カラム	Inertsil ODS-3 (150 X 0.2 mm i.d., 3 μm)
流速	1.8 μL/min
電解電位	+0.65 V vs. Ag/AgCl
サンプルループ容量	0.2 μL

バイカレインの検出限界の比較

方法	カラム		注入量 (μL)	検出限界 (fmol)
	内径(mm)	長さ(mm)		
CLC-ECD	0.2	150	0.2	0.026
μHPLC-ECD	1.0	150	0.5	2
HPLC-UV	4.6	250	5	10000
HPLC-ECD	4.6	250	20	400
LC-MS	4.6	150	20	480

図21

定量限界 (10SD) = 76 amol

検出限界 (3SD) = 26 amol

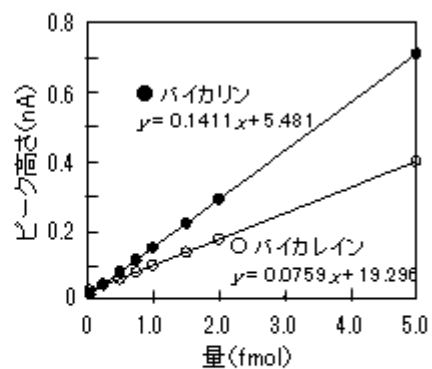
併行精度

バイカリン量 (amol)	RSD (%)
5000	0.17
1000	0.81
500	1.55
100	6.05



FUMI理論に基づき算出

直線性



直線範囲 76 amol ~ 5 fmol
($r > 0.998$)



従来法