生体関連物質の動態分析のための電気化学検出 HPLC の高感度化・高精度化とその応用

小 谷 明

Development of HPLC with High-sensitive and Precise Electrochemical Detection Enabling Dynamic Analysis of Compounds of Biological Importance

Akira Kotani

Department of Analytical Chemistry, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences; 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan.

(Received May 16, 2012)

HPLC with electrochemical detection (HPLC-ECD) is an attractive method with sensitivity and selectivity for the determination of redox compounds. However, an improper system makeup or operation is apt not to show such the intrinsic characteristics of the analytical results by HPLC-ECD in regards to biological sample assays. In this review, HPLC-ECD enabling high-sensitive and precise analysis of compounds of biological importance was developed using the following chemometric strategies: spectrum analysis of chromatographic baseline noise, standard deviation (S.D.) of area measurements in baseline noise from stochastic aspects, and optimization of HPLC conditions and method validations in HPLC-ECD using the prediction of precision based on the FUMI (Function of Mutual Information) theory. When HPLC-ECD was established using a capillary column (0.2 mm i.d.), catechins were determined at attomole levels and the present HPLC-ECD was applied to the determination of concentration profiles of catechins in human plasma after green tea ingestion. Moreover, two HPLC-ECD systems for determining acids and bases were developed by the means of the voltammetric reduction of quinone and the oxidation of trolox, respectively. Thus, the application of HPLC-ECD methods has been remarkably expanded through the development of novel ECD for the determination of acids and bases which are less active electrochemically. The present methods for determining acids and bases were applied to the pharmacokinetic studies of free fatty acids and theophylline, respectively. In conclusion, it was shown the present HPLC-ECD methods have been successfully applied to biomedical and pharmaceutical analyses.

Key words—electrochemical detection; HPLC; noise analysis; function of mutual information (FUMI) theory; biomedical analysis

1. はじめに

薬学分野の基礎から臨床の広範な領域の創薬研究、代謝機能研究、血中薬物濃度モニタリング (TDM) 等の実践において、生体関連物質あるいは薬物の動態分析は、信頼できる測定データを提供しなければならない。それには、使用する分析法が信頼性に優れ、さらに一個体について十分な測定時点数を確保できることが大切である。特に臨床での適用を考慮すると、分析法は実用性と汎用性に優れることが望まれる。

電気化学検出 HPLC (HPLC-ECD) は、酸化還

元物質を特異的に検出できる長所があり、¹⁾ 電流シグナルの増幅が容易であるため本来非常に優れた感度を有する。その結果、前処理が比較的簡便、微量試料で分析可能、といった動態分析を行う上で多くの利点を有する。しかし、実際は検出部である電解セルや作用電極界面の制御及び安定化が不十分あるいは不適切な場合、又は生体試料由来のマトリックスにより電極表面が汚染された場合には、感度や精度が顕著に低下する。そのために HPLC-ECD が精度に劣ると評される場合もあった。HPLC-ECD の本来の特性を活かし、生体試料分析に有用な分析法とするためには、電極界面の安定化を維持・評価できる手法の開発が不可欠である。本研究では、電極界面の安定性を的確に把握するためのケモメトリクス的手法を開発し、この手法を活用して HPLC-ECD の高感度化・高精度化を図った。

The author declares no conflict of interest.

東京薬科大学薬学部分析化学教室 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

e-mail: kotani@toyaku.ac.jp

本総説は、平成 23 年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

さらに、生体関連物質には電極酸化還元反応に不活性な物質も多くあり、従来は電極活性物質による誘導体化などが行われてきた例が多い。²⁾そこで、酸化還元能を有さない酸物質と塩基物質を特異的に定量するための新たな電気化学検出法を開発し、HPLC-ECD の広範囲な測定対象物質の拡張を図った。本稿では、ケモメトリクス的手法と新規電気化学検出法の開発、これらに基づく高性能な HPLC-ECD 開発の成果を紹介する。

2. HPLC-ECD の高感度化のためのノイズ解析法

HPLC-ECD の検出部である作用電極から得られる電流には、電子授受反応に関与するファラデー電流と電気二重層の充電電流がある。もしも測定対象の酸化還元物質の濃度がゼロであっても電流はゼロにはならず、ブランク電流が流れている。ブランク電流の要因は、溶離液中の不純物の電解電流と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が、後者を取り除くことは不可能である。^{3,4)}電気二重層の性質は、電極の種類、形状、印加電位、支持塩の種類、溶媒によって影響されるが、一定の加電位条件下で HPLC-ECD による測定を行う際には、電気二重層の構造の安定化を図って充電電流の変動を抑え、高感度な電解電流の検出につなげている。すなわち、HPLC-ECD の高感度化には、ブランク電流の安定化が必須であり、ブランク電流の低減とノイズの性質を知る方法の開発が必要不可欠である。

ベースラインノイズ [Fig. 1(A)] から、ノイズの大小はおおまかに比較できるが、ノイズの規則性を見つけることは困難である。そこで、ノイズの性質を把握する手段として、ノイズの周波数依存性と確率的性質に着目したスペクトル解析法を開発した。すなわち、ベースラインノイズのパワースペクトルを用い、ノイズの周波数を手がかりに主なノイズ源を明らかにしたり、パワースペクトルを確率過程（ホワイトノイズとマルコフ過程）で近似して得たノイズの標準偏差 (S.D.) を基にベースラインノイズの変動の大きさを客観的に比較できる手法を開発した。Figure 1(A) のベースラインには、パワースペクトルより 0.09 Hz と 0.18 Hz の周期的なノイズが含まれることがわかった [Fig. 1(B)-(1)]。このノイズは、送液ポンプのストローク量

Fig. 1. (A) Chromatographic Baseline Noise in HPLC-ECD and (B) Their Power Spectrum

Power spectra of chromatographic baselines were obtained from the HPLC-ECD system using the pump (0.08 mL stroke) at 0.45 mL/min (1) without and (2) with damper. The arrows indicate the noises originating from the pulsation of the pump.

(0.08 mL) と流速 (0.45 mL/min) から計算した脈流ノイズの周波数 (0.09 Hz) と一致した。これよりノイズ源は、脈流ノイズであると判明した。このように、パワースペクトル上のノイズの周波数と可能性のあるノイズ源について計算で予測した周波数を対比することで、ノイズ源を特定できることがわかった。そこで、ノイズ低減のために脈流除去装置であるダンパーを流路に組み込んだところ、この脈流ノイズは著しく軽減した [Fig. 1(B)-(2)]。ほかにストローク量の小さいポンプや Wall-jet 型の電解セルの利用がノイズ低減に有効であることを示した。

本法は、ノイズの少ない分析装置構成の検討、外

小谷 明

東京薬科大学薬学部講師、博士(薬学)。千葉市生まれ。1997年東京薬科大学薬学部卒業。1999年千葉大学大学院薬学研究科博士前期課程修了。1999年東京薬科大学薬学部助手。2007年より現職。2008-2009年米国ルイジアナ州立大学博士研究員(S.A. Soper 教授)。専門：分析化学、センサー。

部ノイズの効果的な遮断, 表面が均一な電極の作製や処理法の検討, 高純度な試薬の選定に適用できた.⁵⁻⁷⁾ 本法は, 3 分程度のベースライン測定で解析可能であり, 日常点検, 新規分析法あるいは分析装置の開発, その性能評価を効率的に行うために有益である.

3. 測定精度予測を活用した HPLC-ECD の高精度化

精度は, 一般に統計学的観点から, 繰り返し測定により算出される相対標準偏差 (R.S.D.) によって評価される. これに対し, 確率論的観点からクロマトグラフィーの測定精度予測を行う手法として FUMI (Function of Mutual Information) 理論がある.^{8,9)} FUMI 理論によれば, 1 本のクロマトグラムに含まれる 1000 ポイント以上のデジタルデータを用いて R.S.D. を推定することが可能である.

エピカテキンを測定例とした精度の濃度プロファイルを Fig. 2 に示した. 従来の繰り返し測定による方法, FUMI 理論による方法, 両者の精度の濃度プロファイルはよく重なっており, HPLC-ECD の精度の評価に FUMI 理論が適用できることを示した.⁹⁾ 繰り返し測定による方法では, R.S.D. ($n=5$) を 5 濃度について求めるには 25 本のクロマトグラムの測定が必要である. これに対し, FUMI 理論では 1 本のクロマトグラムから測定していない濃度についての R.S.D. も算出できる. したがって, 30% R.S.D. から検出限界 (3.3σ), 10% R.S.D. から定量限界 (10σ) を求めることができる.¹⁰⁾ したがって, HPLC-ECD の開発及び性能評価において FUMI 理論の活用は, 分析法バリデーションの効率的な実施に寄与でき, 実験時間の短縮, 試薬及び廃液量を軽減でき, グリーンケミストリーの観点からも多くの利点がある.

さらに, 測定精度予測を活用した HPLC 条件の最適化手法を開発した.^{11,12)} 条件の最適化の例のうち, セル容量を検討した結果を示す. セル容量は, 電気化学検出器内のフロー型電解セルのガasketの厚さで調節される. セル容量が小さく, 電極界面が薄層であるほど電解効率が優れ, 感度が向上する. しかし, 薄すぎると作用電極と参照電極間の抵抗が上がり, その結果ノイズの増大を引き起こす. セル容量が $3.53\ \mu\text{L}$, $0.71\ \mu\text{L}$, $0.33\ \mu\text{L}$ におけるエピカテキンの検出限界を測定精度予測に基づき算出し

Fig. 2. Precision Profiles for the Determination of Epicatechin by HPLC-ECD

The observed R.S.D. ($n=5$) of epicatechin at each concentration is indicated by open circle. The predicted R.S.D. of epicatechin based on the FUMI theory is indicated by a solid line.

た結果, それぞれ $1.2\ \text{fmol}$, $0.69\ \text{fmol}$, $0.59\ \text{fmol}$ であり, セル容量が $0.33\ \mu\text{L}$ の場合が感度と精度に優れると判断できた.¹²⁾ HPLC の場合, S/N 比を基に感度が優れる条件を選定しても, その条件が精度に優れる保障はない. これに対し, 本法によれば, 精度に優れた HPLC 条件の選定を客観的かつ能率的に実施することが可能であった.

以上のように, HPLC-ECD の高精度化において FUMI 理論に基づく測定精度予測の活用は, 従来, 多大な労力と時間を費やして実施してきた分析法バリデーションあるいは装置開発時における分析条件の最適化において実験の省力化を可能とした.

4. キャピラリーカラムの活用による HPLC-ECD の高感度化

HPLC-ECD に組み込まれているフロー型電解セルにおいて計測される電解電流 (i) には, Eq. (1) のような関係が成り立つ.¹³⁾

$$i = 1.47nFU^{1/3}(DA/h)^{2/3}C \quad (1)$$

ここで, n は酸化還元反応の関与電子数, F はファラデー定数, U は流速, D は測定対象物質の拡散定数, A は作用電極の面積, h はフローセル層の厚さ, C は測定対象物質の濃度である. Equation (1) における C は検液中ではなく, 電極界面における測定対象物質の濃度である. したがって, 電極表面に測定対象物質を高濃度のままで到達させることができれば, 電解効率の増大により高いシグナルが得られ, 感度の向上が期待できる. そこで, 内径の小さいカラムを利用したダウンサイジングによっ

て、試料注入からカラムを経て検出器に至るまでの測定対象物質の拡散を低減させることで、電極界面における測定対象物質の濃度を高く維持する意図により高感度化を試みた。エピカテキンの検出限界は、内径 4.0 mm のカラムを用いた HPLC-ECD では 500 fmol、内径 1.0 mm のカラムを用いた HPLC-ECD では 5.0 fmol であった。^{14,15)} 内径 0.2 mm のキャピラリーカラムを用いた電気化学検出キャピラリー LC (CLC-ECD) によるカテキン類のクロマトグラムを Fig. 3 に示した。CLC-ECD によるカテキン類の定量範囲は 0.2–500 fmol、検出限界は 54 amol であった。¹⁶⁾ キャピラリーカラムの活用によりアトモレベル検出が可能な超高感度 CLC-ECD を開発できた。そこで、本法を缶緑茶 1 本飲用後の血中カテキン類の動態分析へ応用した。本法は、10 μ L の血漿と比較的簡単な前処理方法を用いて血中のカテキン類を定量でき、その濃度推移をモニタリングすることができた (Fig. 4)。さらに、バイカリン、バイカレイン、ケルセチンのようなポリフェノール類の動態分析にも適用できることを明らかにし、HPLC-ECD の実用性を示すことができた。^{17,18)} 以上の手法を駆使して、高感度化・高精度化を達成した HPLC-ECD は、健康人が日常的に摂取するレベルの極微量なポリフェノール類の血中動態分析へ

Fig. 3. Chromatogram of Catechins by CLC-ECD

Each catechin was injected into the CLC-ECD in amount of 25 fmol. Peaks: a, gallic catechin; b, epigallocatechin; c, catechin; d, epigallocatechin gallate; e, epicatechin; f, gallic catechin gallate; g, epicatechin gallate; h, catechin gallate; I.S., propyl gallate (internal standard).

応用でき、実用面での有用性に優れていることを示した。

5. 酸と塩基の新規電気化学検出法の開発と応用

HPLC-ECD の測定対象の多くは酸化還元物質であるが、生体関連物質には酸化還元能を有さない物質が多く存在する。例えば、糖脂質代謝調節に重要な役割を果たす遊離脂肪酸 (FFA)、短鎖脂肪酸、有機酸があるが、いずれも酸化還元能を有さない。これらを酸として電気化学的に検出する手法として、キノンの還元前置波測定に基づく HPLC-ECD を開発した。酸測定用の HPLC-ECD の検出原理には、酸が共存するキノンの非緩衝溶液における電解還元時のボルタモグラムにはキノンの還元波より正電位側に新たな還元波 (還元前置波) があらわれ、このピーク電流の高さが酸の濃度に比例することを利用した。¹⁹⁾ 還元前置波の出現電位は強い酸ほど正電位であり、測定対象の酸に応じた電位設定によって選択的な検出が可能であった。また、ビタミン K₃ や 3,5-ジ-*tert*-ブチル-1,2-ベンゾキノン をキノン試薬として用いることで電極界面が安定な電位領域で検出電位を設定することができた。酸測定用の

Fig. 4. Time Course of Catechin Concentrations of (A) Conjugated Form and (B) Free Form in Human Plasma after Ingestion of 340 mL Commercial Canned Green Tea

Plasma was incubated with glucuronidase and sulfatase at 37°C for 45 min to determine the conjugated forms of the catechins. Catechins: $\square$, gallic catechin gallate; $\blacksquare$, epicatechin; $\triangle$, epigallocatechin gallate; $\blacklozenge$, epicatechin gallate; $\diamond$, catechin gallate.

Fig. 5. Block Diagram of the HPLC-ECD System for Determining Acids or Bases

MP, mobile phase; RS, quinone solution for determining acid or trolox solution for determining bases; DG, degasser; P₁ and P₂, pump; S, sample injector; D, electrochemical detector, electrochemical cell and potentiostat; R, recorder; W, waste.

HPLC-ECD として、移動相とカラムからなる分離系にキノン試薬溶液を合流させるポストカラム方式の HPLC システムを構築し、FFA の分離には ODS カラム、短鎖脂肪酸と有機酸の分離にはイオン排除型カラムを用いた (Fig. 5).

FFA の HPLC-ECD では、アラキドン酸、リノール酸、オレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸のピークを 12 分以内で観察できた。各 FFA の定量範囲は 2.5–800 $\mu\text{mol/L}$ であり、血中 FFA を定量する上で十分な感度を有することがわかった。本法を食後の血糖値の変化に伴う血中 FFA の動態分析へと応用し、その実用性を示した (Fig. 6).²⁰⁾ 本法は、誘導体化が必要ないため、前処理方法はエーテル抽出のみ、穿刺器具で得られる少量の血液 (20 μL 程度) で測定可能である。したがって、本法は血中 FFA の動態分析を簡易、迅速に実践できることから、糖脂質代謝機能研究、糖脂質代謝に影響を及ぼす薬物の評価、1 型あるいは 2 型糖尿病の病因の解明や病態把握のための分析法としても有用であると考えられる。また、酸の HPLC-ECD は血中乳酸の定量、ヒト皮表脂質中 FFA の分布分析、便中短鎖脂肪酸の組成分析のようなバイオメディカル領域における様々な分析へ応用できた。^{21–23)}

さらに、塩基の検出法の開発では、プロトン受容体である塩基がトコフェロールやトロロックスのような被酸化体に求核的に作用して電極酸化反応を促進すれば、塩基由来の酸化前置波が出現し、この酸化前置波測定が塩基の定量法へ展開できると考えた。塩基を電気化学的に検出する方法として、トロロックスの酸化前置波測定に基づく HPLC-ECD を開発した。塩基が共存するトロロックスの非緩衝溶

Fig. 6. Change in FFAs and Blood Glucose Levels versus Elapsed Time after Meal Ingestion

FFAs: $\square$, arachidonic acid; $\blacksquare$, linoleic and palmitoleic acids; $\circ$, oleic acid; $\bullet$, palmitic acid; $\diamond$, stearic acid. Blood specimens were obtained from a healthy human subject (female, 50 years old) after overnight fasting and subsequent to a 600-kcal meal ingestion. Blood glucose was determined from a 5- μL blood specimen using a pocket-size glucose meter (Glucocard, Model CT-1640).

液における電極酸化時のボルタモグラムにはトロロックス自体の酸化波より負電位側に酸化前置波があらわれ、このピーク電流の高さが塩基の濃度に比例することを利用した。²⁴⁾ 酸化前置波は、強い塩基ほど負電位側に出現する特徴もある。トロロックスの酸化前置波測定により、 pK_b の範囲が約 4–12 の弱塩基物質が定量可能であった。塩基測定用の HPLC-ECD として、移動相とカラムからなる分離系にトロロックス試薬溶液を合流させるポストカラム方式の HPLC システムを構築し (Fig. 5)、テオフィリン投与後のラット血中動態分析へ応用した。10 μL の血漿を試料とし、クロロホルムで抽出する比較的簡単な前処理方法を確認した。テオフィリンのピークは約 6 分にあらわれ (Fig. 7)、定量範囲は 2.0–100 $\mu\text{mol/L}$ であった。本法により得られた濃度–時間曲線から薬物動態パラメータが算出できた。²⁴⁾

弱塩基性物質は生物活性が強いものが多く、日本薬局方収載医薬品の約 30% は弱塩基性物質である。本法は、 pK_b 4–12 の弱塩基物質であれば、酸化還元能に乏しい薬物を電極界面が安定な電位領域において検出することが可能であり、今後さらに、

Fig. 7. Chromatograms of Theophylline by HPLC-ECD Based on Trolox Oxidation

(A) Standard solution (20 $\mu\text{mol/L}$) and (B) test solution obtained from rat plasma after 2 h oral administration of theophylline (dose of 10 mg/kg) was injected into the HPLC-ECD. Arrows indicate the peak of theophylline.

薬物動態分析あるいは薬物代謝研究への応用展開が期待される。

6. まとめ

HPLC-ECD は、酸化還元物質の定量において特異性と感度に優れる分析法である。しかし、従来は検出部である電極界面の安定化が感度と精度を左右するため、生体試料分析への適用が困難な場合があった。本研究では、電極界面の安定化を的確に把握できるノイズ解析法、ケモメトリクスを活用した分析法バリデーション及び HPLC 条件の最適化手法を開発し、これらの手法を駆使して HPLC-ECD の高感度化と高精度化を達成した。さらに、薬物や生体成分の動態分析への応用によって、実用面での有用性も示した。また、電極不活性な酸物質及び塩基物質の新規電気化学検出法の開発によって、生体試料分析における HPLC-ECD の測定対象を拡張できた。本研究で開発した分析手法は、バイオアナリシスの発展へ大きく貢献できると考えられる。

謝辞 以上の研究を遂行するにあたり、御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部 楠 文代教授、帝京平成大学薬学部 林 譲教授、国立医薬品食品衛生研究所 松田りえ子博士、東京薬科大学薬学部 袴田秀樹准教授に深く感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Flanagan R. J., Perrett D., Whelpton R., "Electrochemical Detection in HPLC: Analysis of Drugs and Poisons," The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005.
- 2) Shimada K., Matsue T., Shimada K., "Modern Derivatization Methods for Separation Sciences, Reagents for electrochemical detection," ed. by Toyo'oka T., John Wiley & Sons, New York, 1999, pp. 191-211.
- 3) Xu K., Ding M. S., Jow T. R., *Electrochim. Acta*, **46**, 1823-1827 (2001).
- 4) "Progress in HPLC-HPCE, Vol. 6, Coulometric electrode array detectors for HPLC," eds. by Acworth I. N., Naoi M., Parvez H., Parvez S., VSP, Utrecht, 1997.
- 5) Kotani A., Hayashi Y., Matsuda R., Kusu F., *J. Chromatogr. A*, **986**, 239-246 (2003).
- 6) Kotani A., Hakamata H., Nakayama N., Kusu F., *Electroanalysis*, **23**, 2709-2715 (2011).
- 7) Kotani A., Yuan Y., Yang B., Hayashi Y., Matsuda R., Kusu F., *Anal. Sci.*, **25**, 925-929 (2009).
- 8) Hayashi Y., Matsuda R., *Anal. Chem.*, **66**, 2874-2881 (1994).
- 9) Matsuda R., Hayashi Y., Sasaki K., Saito Y., Iwaki K., Harakawa H., Satoh M., Ishizuki Y., Kato T., *Anal. Chem.*, **70**, 319-327 (1998).
- 10) Kotani A., Kojima S., Hayashi Y., Matsuda R., Kusu F., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, 780-787 (2008).
- 11) Kotani A., Hayashi Y., Matsuda R., Kusu F., *Anal. Sci.*, **19**, 865-869 (2003).
- 12) Kotani A., Iwagami T., Ueda T., Kimura Y., Hayashi Y., Matsuda R., Kusu F., *ITE Lett.*, **4**, 783-787 (2003).
- 13) Rocklin R. D., Tullsen T. R., Maruccoo M. G., *J. Chromatogr. A*, **671**, 109-114 (1994).
- 14) Yang B., Arai K., Kusu F., *Anal. Biochem.*, **283**, 77-82 (2000).
- 15) Kotani A., Miyashita N., Kusu F., *J. Chromatogr. B.*, **788**, 269-275 (2003).
- 16) Kotani A., Takahashi K., Hakamata H., Kojima S., Kusu F., *Anal. Sci.*, **23**, 157-163 (2007).

- 17) Kusu F., Kotani A., "Hyphenated and Alternative Methods of Detection in Chromatography, HPLC with electrochemical detection," ed. by Shalliker R. A., Taylor & Francis, Boca Raton, 2011, pp. 187–219.
- 18) Kotani A., Kojima S., Hakamata H., Kusu F., *Anal. Biochem.*, **350**, 99–104 (2006).
- 19) Kotani A., Kusu F., Takamura K., *Anal. Chim. Acta*, **465**, 199–206 (2002).
- 20) Kotani A., Fuse T., Kusu F., *Anal. Biochem.*, **284**, 65–69 (2000).
- 21) Miyaguchi Y., Kotani A., Kusu F., *Bunseki Kagaku*, **51**, 703–706 (2002).
- 22) Kotani A., Kusu F., *Arch. Dermatol. Res.*, **294**, 172–177 (2002).
- 23) Kotani A., Miyaguchi Y., Kohama M., Ohtsuka T., Shiratori T., Kusu F., *Anal. Sci.*, **25**, 1007–1011 (2009).
- 24) Kotani A., Hashimoto M., Kotani T., Kusu F., *J. Electroanal. Chem.*, **656**, 85–90 (2011).