

高性能先端分析法 (High-performance Frontal Analysis) の 簡便なExcelシミュレーション

Simple Excel simulation of High-performance Frontal Analysis

杉本 幹治¹⁾・稲垣 万里菜¹⁾・大高 泰靖²⁾・澁川 明正¹⁾

Kanji SUGIMOTO, Marina INAGAKI, Hiroyasu OHTAKA
and Akimasa SHIBUKAWA

高性能先端分析 (High-performance Frontal Analysis, HPFA) 法はHPLCシステムを利用する薬物-血漿タンパク結合分析法であり、オンラインで簡便、高感度な結合分析が可能となる。しかし、移動相条件に制限があるため、保持時間はHPFA用カラムサイズや移動相流速を変化させることで調整する必要がある。そこで、HPFA 分析の効率的な条件検索を目的として、段理論を基にHPFA分析における薬物の溶出曲線を簡便にシミュレーションできるプログラムを開発した。本プログラムは表計算ソフトExcel (Microsoft Co., Ltd.) 上で作動するプログラムであり、薬物の固定相へのクロマトグラフィックな分配平衡と、薬物-タンパク質の結合平衡を同時に考慮した理論式から薬物溶出曲線を計算して表示することができる。本プログラムによるシミュレーション結果を実際の溶出曲線と比較するために、モデル試料として、ヒト血清アルブミン (HSA) と phenylbutazone (PB) の混合試料 (pH7.4) を採用した。サイズの異なる2種類のHPFA用カラム Develosil 100Diol-5 (8.0 i.d.×100mm, 8.0 i.d.×300mm, Nomura Chemical Co., Ltd.) を使用し、移動相にリン酸緩衝液 (pH7.4, I=0.17)、流速条件0.3~0.9mL/min、カラム温度37°Cにて測定を行った。検出にはフォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M20A, Shimadzu Co., Ltd.) を用いた。HSA、NaNO₂、PBの単独試料測定から、カラム内移動相容積、充填剤細孔容積、 t_0 、capacity factorを算出し、Excel上のプログラムに入力した。その後、HSA-PB混合試料を測定し、HPFA溶出パターンについて、シミュレーション結果との比較を行った。結果、HPFAの溶出曲線をラップトップPC上でも迅速、簡便に行えることが示された。本プログラムを利用することにより、HPFA法を行う上での条件検索の効率化、最適化が期待できる。

1. 序論

一般に薬物は、血液中ではアルブミンや α_1 -酸性糖タンパク質 (AGP) などの血漿タンパク質と、可逆的な結合平衡を保った状態で存在している。結合型薬物は血管壁を通過しにくいのに対して、非結合型薬物は自由に血

管壁を透過し組織に移行できるため、薬物のタンパク結合は薬理効果や副作用の発現に大きな影響を与える。一方で、結合型薬物は肝臓での代謝や腎臓での糸球体濾過を受けにくく、血管外に移行した薬物を補充する貯蔵型薬物としての役割がある等、薬物の体内動態にも影響を与える。以上のように、非結合型薬物濃度の定量は、薬物の薬理効果や体内動態などの研究において重要である¹⁾²⁾。

この非結合型薬物の定量には、限外濾過法や平行透析法などが従来から用いられている。しかしながら従来法では、濾過膜への薬物の吸着や膜の破損による結合型薬物の漏れの発生からくる測定誤差が起こりうる問題があり、新しい分析法が求められている。また、様々な薬物を網羅的に測定するには手間がかかるという難点もあった。これらの問題点を解決する方法として、試料の注入から

連絡先：澁川明正 ashibukawa@cis.ac.jp

1) 千葉科学大学薬学部生命薬科学科

Department of Pharmaceutical and Life Science, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

2) 千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2015年9月30日受付, 2015年12月3日受理)

分離、測定までがオンラインで行える高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography、HPLC)にサイズ排除と逆相保持の2つの性質を持つ特殊なカラムを適用した高性能先端分析法(High-performance Frontal Analysis、HPFA法)がある。HPFA法では、このカラムに試料を連続注入することで、薬物-血漿タンパク結合の平衡状態をカラムの中で再現し、更に血漿タンパク質と非結合型薬物がカラム中で希釈されずに平衡を保ったまま分離が可能であり、加えて分離した非結合型薬物ピークを濃縮するステップを組み込むことが可能なため、高感度な測定を行うことが出来る薬物-血漿タンパク結合分析法である³⁻⁸⁾。

一方、その分析においては、生体高分子を対象とするため、移動相条件に制約を受けることになり、保持時間はHPFA用カラムサイズや移動相流速を変化させることで調整する必要がある。そこで、本検討では、表計算ソフトを用いてHPFA法の段理論に基づいたプログラムを作成し、薬物の溶出曲線を簡便にシミュレーションすることによるHPFA分析条件検索の効率化を行った。

2. 機器・試薬

【機器】

紫外可視分光光度計 SPD-M20A

・・・島津製作所社製

HPLCコントローラー SCL-10A VP

・・・島津製作所社製

ポンプ LC-20AD

・・・島津製作所社製

カラムオープン CTO-20AC

・・・島津製作所社製

分析カラム 5C18-MS-II (2.0 i.d.×150mm)

・・・ナカライテクス社製

HPFAカラム Develosil 100Diol-5 (8.0 i.d.×300mm)

・・・野村化学株式会社製

HPFAカラム Develosil 100Diol-5 (8.0 i.d.×100mm)

・・・野村化学株式会社製

ラップトップPC ThinkPad Edge 11 (032826J)

Windows 7 Professional

Intel®Core™i3 CPU U380 1.33GHz ・・・lenovo社製

表計算ソフトExcel 2010 ver.14 ・・・Microsoft社製

【試薬】

超純水 ・・・millipore社製 Gradient A10で作製

リン酸水素ナトリウム ・・・和光純薬工業株式会社製

リン酸二水素ナトリウム二水和物

・・・和光純薬工業株式会社製

Albumin human, ~99%, fatty acid free (~0.005%),

essentially globulin free ・・・SIGMA-ALDRICH社製

亜硝酸ナトリウム(特級) ・・・関東化学株式会社製

Phenylbutazone 99% ・・・Alfa Aesar社製

【測定試料の調製】

・HPFAカラム分離系統用の移動相: 67mM リン酸緩衝液(pH7.4、I=0.17) 1Lの作製

・・・リン酸水素ナトリウム2.1516g、リン酸二水素ナトリウム7.3915gを天秤で秤量し超純水に溶かし、1Lに調製した後、メンブレンフィルター(孔径0.2μm)を用いて減圧濾過し作製した。

・100μMヒト血清アルブミン(HSA) 20mLの作製

・・・HSA 0.1342gをリン酸緩衝液で溶かし、20mLに調製した後、メンブレンフィルター(孔径0.45μm)で濾過して作製した。

・Phenylbutazone (PB) 溶液の作製

・・・PBはMeOHを溶媒として作製し、使用時は窒素ガスを用いて溶媒を乾燥させ、新たにリン酸緩衝液やHSA溶液を加えたものを母液として希釈を行うことで様々な濃度(1μM~500μM)になるように調製した。

3. HPFA法の測定原理

HPFA法では、サイズ排除と逆相保持の2つの性質を持つ特殊なカラムを使用している。具体的には、血漿タンパク質のような巨大分子はサイズ排除するが、薬物のようにサイズの小さい分子は充填剤の細孔内で分配保持される特殊なカラムを用いている。血漿試料直接注入分析用HPLCカラムは通常、薬物-タンパク質混合試料を注入すると試料が希釈され結合平衡がずれるため(図3-1, (1))、結合型薬物がすべてのタンパク質から解離し非結合型薬物と一緒に溶出する。その結果、サイズ排除されたタンパク質のピークが出現した後、すべての薬物が1本のピークとして出現し、そのピーク面積から薬物総濃度を求めることができる。しかし、タンパク結合を乱さないようなマイルドな移動相(pH7.4のリン酸緩衝液(PBS))を使用し、試料を連続的に注入すると、タンパク質からの結合型薬物の解離が抑えられ、その結果、カラムの先端付近では薬物-タンパク結合平衡とクロマトグラフィックな分配平衡が同時に成立したゾーン(図3-1, (3) *印)が生じる。つまり、充填剤細孔内部では非結合型薬物の固定相-移動相間の分配平衡が達成しており、細孔外部(充填剤粒子間)の移動相中では注入前の試料溶液と同じ薬物-タンパク質結合平衡が再現されている。注入終了後、このゾーンの非結合型薬物が帯状となって溶出し台形状のプラトーピークとして観測される。このプラトー部分の薬物濃度は*ゾーンの細孔内部の移動相中の薬物濃度と細孔外部の移動相中の非結合型薬物濃度と等しくなる。従って、試料溶液中の非結合型薬物濃度と等しい。つまり、プラトーゾーンの薬物濃度を測定する事により、非結合型薬物濃度の測定が可能となる。これが測定原理である。

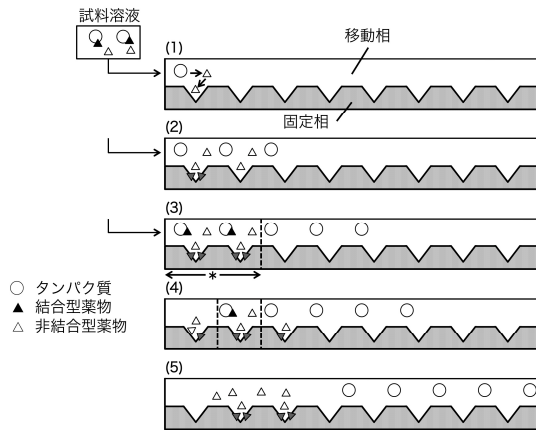


図3-1 HPFA 法の原理

図 3-2 に HPFA 法と、代表的な従来法である限外濾過法を比較するための模式図を示した。限外濾過法では、試料溶液中の結合平衡を乱さないように全溶液量 20% 程度しか透析できず (図 3-2, ①)、低濃度領域における非結合型薬物の測定に誤差が生じやすくなってしまっていた。しかし、HPFA 法では、結合型薬物と非結合型薬物を分離するのではなく、結合型薬物を非結合型薬物に変換して溶出させるため、非結合型薬物濃度に相当するピークを試料注入時間に応じて連続的に得ることが可能となる。そこで、このプラトー状の非結合型薬物の部分 (図 3-2, ②) を切り出して濃縮することで、分析感度を飛躍的に向上できるという利点がある。

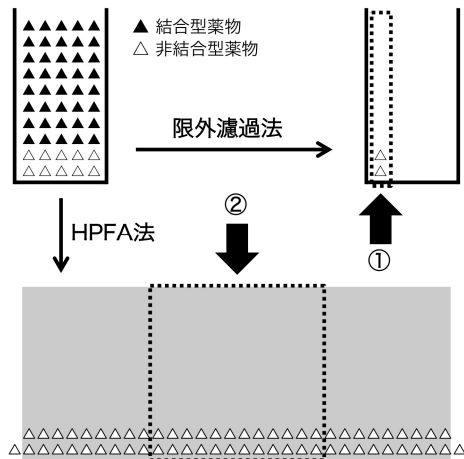


図3-2 HPFA 法と限外濾過法の比較

また、従来法では濾過膜への薬物の吸着や、膜の破損による結合型薬物の漏れの発生による測定誤差が起こりうる問題があるが、HPFA 法では膜を使用しないため、これらの問題点を原理的に回避できることも利点の一つである。

4. HPFA シミュレーションプログラムの開発

4. 1 段理論の計算

シミュレーションプログラムを作成するにあたり、HPFA 法で使用するカラムに関して段理論モデルを構築し、薬物-血漿タンパク結合に関する関数と、疎水性相互作用による分配平衡に関する関数から、カラム内の非結合型薬物濃度を求めた。カラム模式図と段理論モデルを図 4-1-1 に示す。

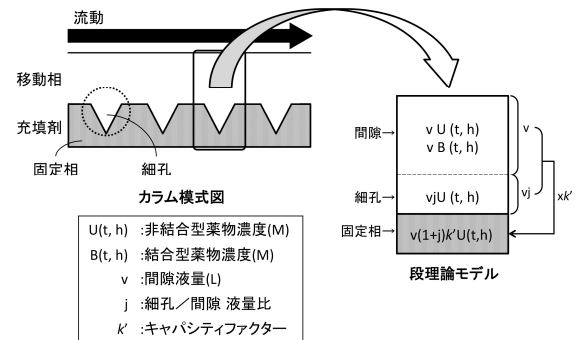


図4-1-1 模式図と段理論モデル

キャパシティファクターとは固定相中の成分量を移動相中の成分量で除したものであり、

$$k' = \frac{\text{固定相中の成分量}}{\text{移動相中の成分量}} \cdots (1)$$

の式で表される。

まず、タンパク質存在下の HPFA 法におけるカラム内の試料動態の規則として、

1. タンパク質及び結合型薬物は細孔に入れない
2. 細孔と移動相間の溶液は抵抗なく行き来できる

としてモデル解析を行った。規則 2 より、固定相から見た細孔を含む全液量は $v + v_j = (1 + j)v$ で表される。従って、(1) 式より、固定相中の成分量は、

$$\begin{aligned} (\text{固定相中の成分量}) &= (\text{移動相中の成分量}) \times k' \\ &= \{vU(t, h) + v_jU(t, h)\} \times k' = v(1 + j)k'U(t, h) \cdots (2) \end{aligned}$$

ここで、時間 $t-1$ から t における、 $h-1$ 、 h 段の様子を表すと、図 4-1-2 のようになる。

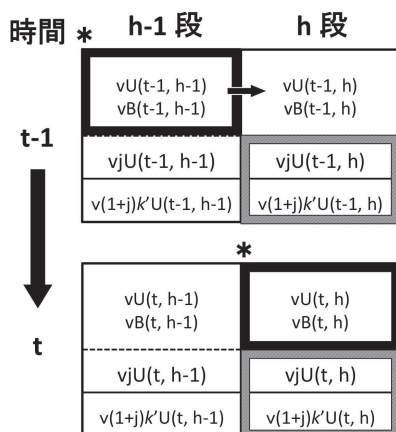


図4-1-2 タンパク質存在下における段理論

薬物のマスバランスを考慮すると、段1つ分の時間が進む間に移動相に含まれる成分(図4-1-2, *)が隣の段に移動するため、図4-1-3の関係が得られる。

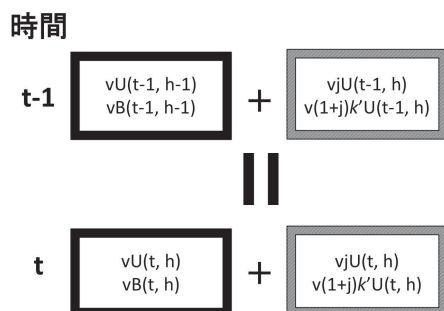


図4-1-3 タンパク質存在下における段理論

次に、タンパク結合平衡について、タンパク1分子あたりに結合するサイト数が n 個ある時、フリー結合サイト数 P は

$$P = nC_p - B \quad \dots (3)$$

C_p : タンパク濃度、 B : 結合型薬物数

と表せる。さらに、タンパク結合平衡から、

$$P + Cu \xrightleftharpoons{K} Cb \quad \dots (4)$$

Cu : 非結合型薬物濃度、 Cb : 結合型薬物濃度

K : 結合定数

となり、式(3)、(4)から、

$$K = \frac{Cb}{P \cdot Cu} = \frac{Cb}{(nC_p - B) \cdot Cu} \quad \dots (5)$$

と定義される。ここで式(5)に $Cu = U(t, h)$ 、 $Cb = B(t, h)$ を代入し、 $B(t, h)$ について解くと、

$$B(t, h) = \frac{nKC_p U(t, h)}{1 + KU(t, h)} \quad \dots (6)$$

が得られる。また、図4-1-3の質量バランスから、

$$vU(t-1, h-1) + vB(t-1, h-1) + vjU(t-1, h) + v(1+j)k'U(t-1, h) \\ = vU(t, h) + vB(t, h) + vjU(t, h) + v(1+j)k'U(t, h) \quad \dots (7)$$

が成り立つ。ここで、式(7)の両辺を v で除した左辺を c 、 $U(t, h)$ を x とおき、式(6)を式(7)に代入して x について整理すると、

$$K(1+j)(1+k')x^2 + \{(1+j)(1+k') + nKC_p - cK\}x - c = 0$$

の二次方程式が得られる。これを解くと、 x 即ち非結合型薬物濃度 $U(t, h)$ は、

$$U(t, h) = \frac{-b + \sqrt{b^2 + 4ac}}{2a} \quad \dots (8)$$

ただし、

$$a = K(1+j)(1+k')$$

$$b = (1+j)(1+k') + nKC_p - cK$$

$$c = U(t-1, h-1) + B(t-1, h-1) + jU(t-1, h) + (1+j)k'U(t-1, h)$$

と求められる。

一方、タンパク質成分がサイズ排除されて試料ゾーンに存在しない場合、図4-1-4に示すキャパシティファクターによる分配のみとなる。

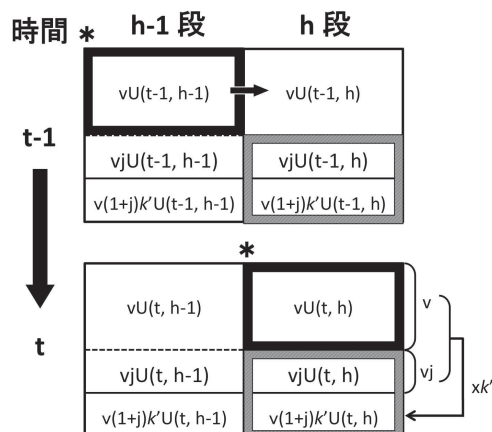


図4-1-4 タンパク質非存在下における段理論

これから、

$$\begin{aligned} vU(t, h) &= (\text{段内全薬物量}) \times \frac{1}{1+k'} \times \frac{1}{1+j} \\ &= \frac{vU(t-1, h-1) + vjU(t-1, h) + v(1+j)k'U(t-1, h)}{(1+k')(1+j)} \\ \therefore U(t, h) &= \frac{U(t-1, h-1) + \{j + (1+j)k'\}U(t-1, h)}{(1+k')(1+j)} \quad \dots (9) \end{aligned}$$

が成立する。

以上より、初期値 $U(t, h) = 0$ 、 $B(t, h) = 0$ として、

1. タンパク質が段 h に存在するとき
 $U(t, h) = (8)$ 式、 $B(t, h) = (6)$ 式
2. タンパク質が段 h に存在しないとき
 $U(t, h) = (9)$ 式、 $B(t, h) = 0$

となる。

これらの理論式を基に Excel に搭載される Visual Basic for Applications (VBA, Basic 言語) を用いてシミュレーションプログラムを作成した。

4. 2 結果及び考察

作成したプログラムの確認のため、1996年に澁川らが行ったシミュレーション結果 (Fortran 言語、Intel® 80486DX2CPU, 66 MHz)⁹⁾ との比較を行った。

C_p : 総タンパク濃度、 n : タンパク 1 分子あたりに結合するサイト数、 V_m : カラム内全液量、 j : 細孔/間隙液量比、 N : 理論段数、 $I.V.$: 注入液量、 $F.R.$: 流速、 k' : キャパシティブファクター、 C_t : 総薬物濃度、 K : 結合定数とし、条件設定は以下の通りとした。

<条件>

$C_p = 550 \mu\text{M}$ 、 $n = 1$ 、 $V_m = 1 \text{ mL}$ 、 $j = 0.6$ 、 $N = 1000$

$I.V. = 150 \mu\text{L}$ 、 $F.R. = 1 \text{ mL/min}$ 、 $k' = 4$

i) $C_t = 379 \mu\text{M}$ 、 $K = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$

ii) $C_t = 10 \mu\text{M}$ 、 $K = 3.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

図4-2に結果を示す。図の通り、まったく同じ結果が数分の解析によって得られた。このように、クロマトグラム描画まで含めたシミュレーションが、CPU演算能力の進歩によりラップトップPC上で迅速、簡便に行えることが示された。

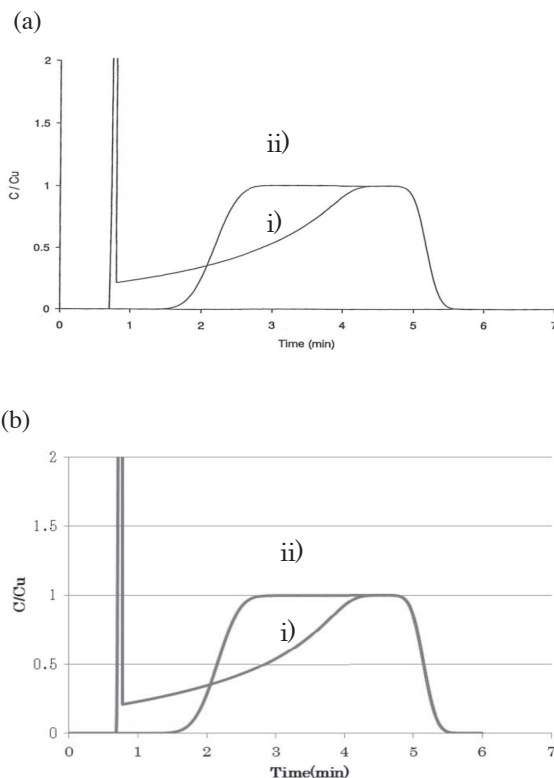


図4-2 シミュレーション結果の比較

(a) 以前のクロマトグラム (Fortran 言語)

(b) 今回得られたクロマトグラム (Excel VBA 言語)

5. HPFA 溶出曲線の比較

シミュレーションプログラムと実際の測定におけるクロマトグラムの比較を行い、シミュレーションが測定条件検索において有用であるか検討を行った。

5. 1 実験方法

試料

PB-HSA 混合試料 (HSA $100 \mu\text{M}$ + PB $50 \sim 200 \mu\text{M}$)

リン酸緩衝液 (pH7.4, $I = 0.17$)

測定条件及び手順

シミュレーションに入力する使用カラムの特性条件値を求めるため、移動相流速 $0.3 \sim 0.9 \text{ mL/min}$ 、カラム温度 37°C を条件に以下の実験を行った。カラム内の薬物の移動を模式的に示したものが図5-1-1である。HPFAカラムの特性を調べるため、HSA、 NaNO_2 、PBをそれぞれ単独で注入し測定した。

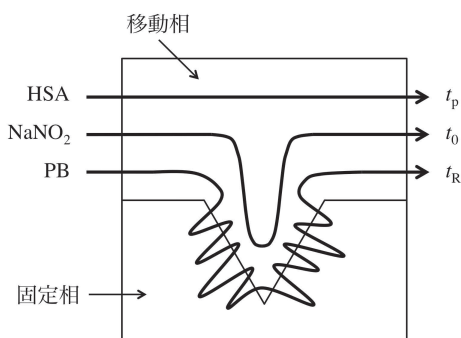


図5-1-1 HPFAカラム内の物質移動経路の模式図

HSAは大きな分子のため、HPFAカラム充填剤の細孔に入らずにカラムから溶出される（サイズ排除）。それに対して、NaNO₂は親水性小分子のため、細孔に入るが疎水保持されないため、HSAの後に検出される。また、PBは疎水性小分子のため、細孔に入り疎水性保持されるため、NaNO₂の後に検出される。それぞれのリテンションタイムをHSA = t_p 、NaNO₂ = t_0 、PB = t_R とし、カラム内全液量を V_m 、キャパシティブアクターを k' 、細孔/間隙液量比を j とすると、以下の式が成り立つ。

$$V_m = t_0 \times \text{流速} \quad \dots (10)$$

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \dots (11)$$

$$j = \frac{t_0 - t_p}{t_p} \quad \dots (12)$$

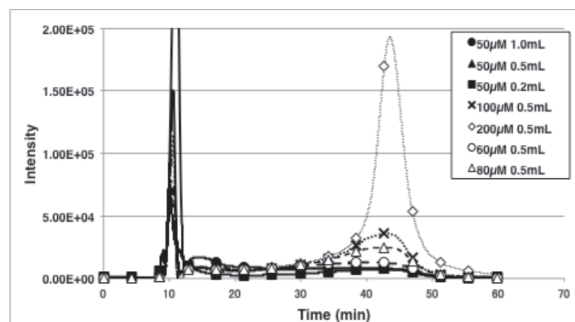
流速0.6mL/minにおいて、 $t_p = 9.7\text{min}$ 、 $t_0 = 16.3\text{min}$ 、 $t_R = 47.6\text{min}$ をそれぞれ、式(10)、(11)、(12)を用い算出したところ、 $V_m = 9.303\text{mL}$ 、 $j = 0.699$ 、 $k' = 2.075$ となった。

次に、これらの値をシミュレーションプログラムに入力し、結合定数(K)を変更して実測データとの比較を行った。また、HPFA溶出パターンについてシミュレーション結果との比較を行った。実測データについては、HSAの濃度100 μM に対しPBの濃度を50～200 μM の間で変更した。また、試料注入量についても0.2～1mLの間で変更した。

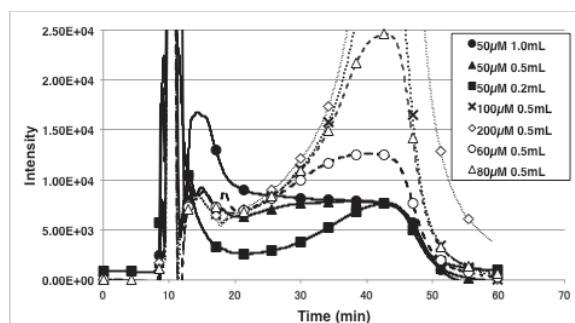
5. 2 結果及び考察

実測データとシミュレーションによるHPFAチャートの比較を行った結果を図5-2に示す。図は結合定数 $K = 1.15 \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$ の場合のシミュレーション結果である。薬物の溶出曲線について、シミュレーション結果は、実測データと比較しても遜色のない溶出曲線が得られ、ラップトップPC上でも迅速かつ簡便に溶出曲線を描けることが示された。

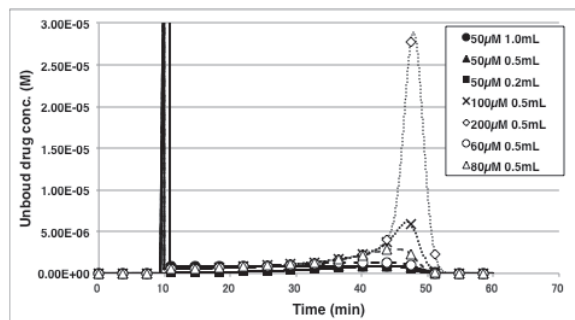
(a)



(b)



(c)



(d)

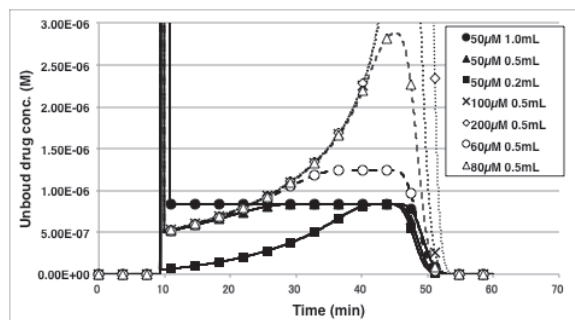


図5-2 溶出曲線の比較

(a) 実測データ

(b) 実測データ・拡大図

(c) シミュレーションデータ

(d) シミュレーションデータ・拡大図

6. HPFAシミュレーションプログラムの応用

本プログラムのシミュレーション結果が計算上正しく、また実際のクロマトグラムにもよく一致することが示されたため、応用事例として実験デザインを行うに当たり、カラム選定を含む種々の条件検討を予めPC上で行えるかについてシミュレーションを実施した。

6. 1 実験方法

測定試料について、使用するHPFAカラムに対するキャパシティブクター(k')を前節で述べた手法で予め求めておく。次に、測定試料とHSAの混合試料を作成し、HPFAカラムに注入して溶出曲線を描く(図6-1-1)。なお、本検討は応用事例のため、サンプルデータも架空の薬剤データ($C_p = 550\mu\text{M}$ 、 $C_t = 500\mu\text{M}$ 、 $n = 1$ 、 $j = 0.3$ 、 $k' = 4$ 、測定時間40分、 $N = 1000$ 、 $V_m = 4\text{mL}$ 、 $F.R. = 0.6\text{mL/min}$ 、 $I.V. = 1000\mu\text{L}$)を用いている。

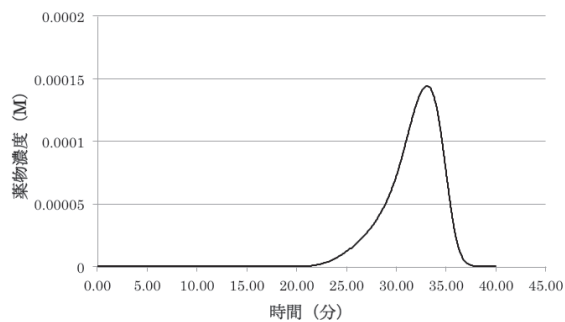


図6-1-1 サンプル薬剤の溶出曲線

次に、Excelシミュレーション上で結合定数(K)以外の値を実際のデータと揃えて入力し、 K を変化させて様々な溶出曲線をシミュレートする(図6-1-2)。

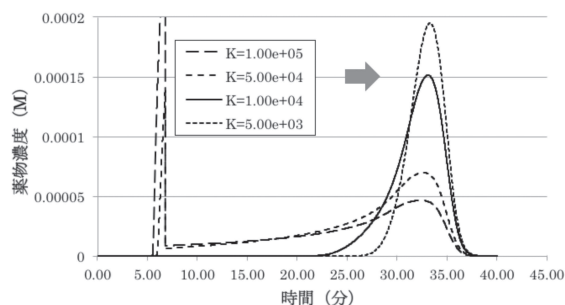


図6-1-2 結合定数の検索

この時、実際のクロマトグラムに最も良く一致する曲線を検索し、その時の K 値を測定条件検討時の仮の結合定数として用いる。

今回の場合、 $K = 1.00 \times 10^4 (\text{M}^{-1})$ が最も一致したので、これを以下の検討に用いた。

6. 2 結果及び考察

初期条件における溶出曲線を図6-2-1に示す。プラトーが得られておらず、溶出時間も32分辺りと遅いため、実験サイクルなどを考慮してもあまり良い条件ではない。

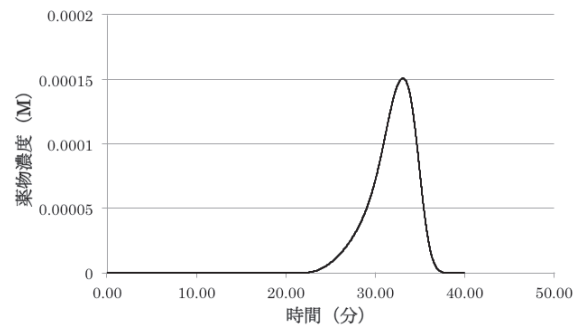


図6-2-1 初期条件における溶出曲線

注入量の検討

注入量を変更した結果のまとめを図6-2-2に示す。プラトーは得られるようになったが、溶出時間が遅いことに変わりはない。また、注入量 $1000\mu\text{L}$ では試料量が不足しており、最大ピーク高さが非結合型濃度であるプラトー部まで達していないことがわかる。

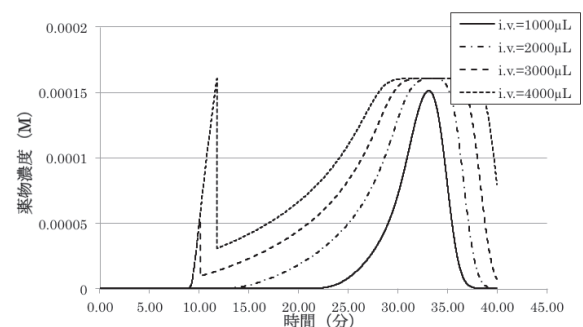
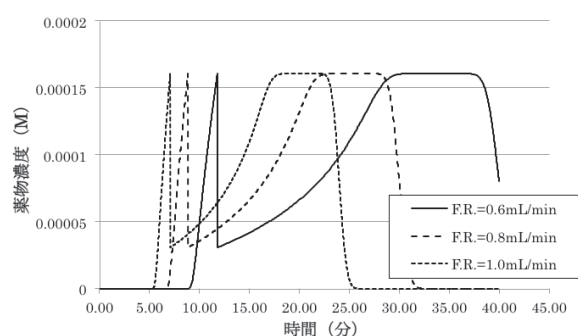


図6-2-2 注入量の影響

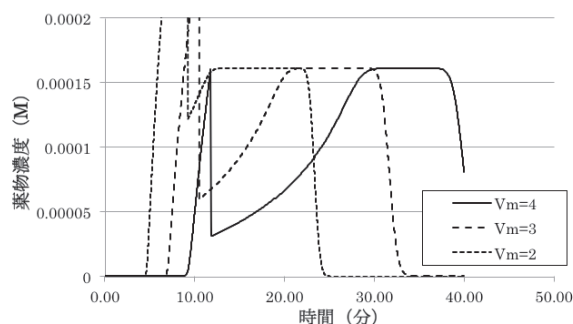
流速の検討

流速によっても溶出時間は変更可能であるため、流速を変更した結果のまとめを図6-2-3に示す。図に示される通り、溶出時間の短縮を図ることが可能なことがわかる。ただし、単純に時間方向に圧縮されるため、プラトー時間も流速に応じて短くなることが問題となる。

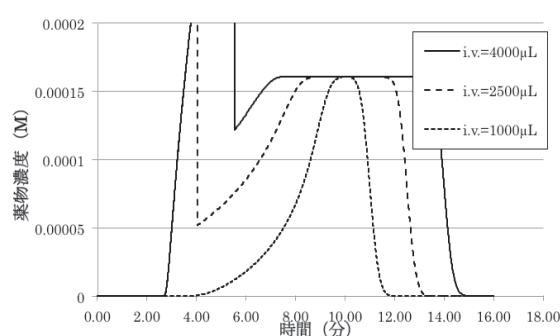
図6-2-3 流速の影響 (I.V. = 4000 μ Lの場合)

カラム長さの検討

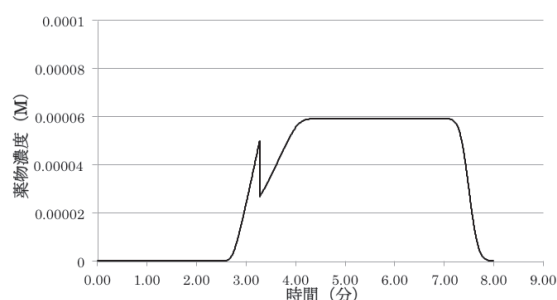
流速と同じく、カラム長さを変更した結果のまとめを図6-2-4に示す。充填材が同じであれば基本的にカラム内の移動相と固定相の比率は大きくは変わらないと考えられる。したがって、 V_m 値を変更することで、カラム長さの検討を行うことができる。充填率に相違がある場合は、 j 値を変更することで対応可能であり、前章で述べた手法で測定が可能である。カラム長さを短くすることで溶出時間を大きく改善することができる。また、流速の変更と異なり、プラトー時間が変化しないことが読み取れる。

図6-2-4 カラム長さの影響 (I.V. = 4000 μ Lの場合)

以上の検討から、最終的な測定条件を $V_m = 2$ mL、流速 = 1 mL/min として、再度、注入量を変更して得られた結果を図6-2-5に示す。初期条件の図6-2-1に比べ、短い時間で十分なプラトー部分が得られるようになっていたことが示された。

図6-2-5 注入量の影響
($V_m = 2$ mL、F.R. = 1 mL/min の場合)

さらに、実験スケールを縮小した場合のシミュレーション結果を図6-2-6に示す。 $C_p = 110 \mu\text{M}$ 、 $C_t = 100 \mu\text{M}$ の場合でも、 $V_m = 1$ mL となるような長さのカラムで、F.R. = 1 mL/min、注入量 2500 μ L で測定を行えば、上記と遜色のないプラトー部分が短時間で得られることがわかる。これは、実験サイクルの短縮や、試薬量の削減が可能であることを示している。

図6-2-6 実験スケールダウン
(HSA = 110 μ M の場合)

このように本プログラムは、HPFA分析に必要なプラトー形成に及ぼす試料注入量やカラム長さ、固定相の保持力等の影響を事前に検討可能にするものであることが示された。

7. 結語

本研究では、HPFA法によるタンパク結合分析システムに関する、簡便なシミュレーション法の開発を目的に、HSAとPBの混合試料を用いた検討を行い、段階理論を用いたシミュレーションにおいて、ラップトップPCでも迅速にシミュレーション結果を得ることができた。

今回開発したExcelシミュレーションプログラムは、身近なラップトップPCでもHPFA分析に必要な試料注入量やカラム長さ、固定相の保持力などの影響を事前に予測可能にするため、実験デザインを含めたHPFAシス

テムの定量工程の効率化ができることを示している。これらはHPFA分析に関して大きく貢献できるものである。

参考文献

- 1) Hardy J. and Hardy KG. Science 282,1075-1079 (1998) .
- 2) Price DL, Sisodia SS, and Borchelt DR. Science 282, 1079-1083 (1998) .
- 3) Nakagawa T, Shibukawa A. Bunseki Kagaku 40 (5) ,203-214 (1991) .
- 4) Rosas M.E.R.R, Shibukawa A, Yoshikawa Y, Kuroda Y, Nakagawa T. Anal.Biochem.274, 27-33 (1999) .
- 5) Shibukawa A, Yoshikawa Y, Kimura T, Nakagawa T, Wainer I.W. J.Chromatogr.B. 768,177-188 (2002) .
- 6) Shibukawa A, Yoshikawa Y, Kimura T, Nakagawa T, Wainer I.W. J.Chromatogr.B.768,189-197 (2002) .
- 7) Kimura T, Nakanishi K, Nakagawa T, Shibukawa A, Matsuzaki K. Pharmaceutical Research22 (4) ,667-675 (2005) .
- 8) Kimura T, Nakanishi K, Nakagawa T, Shibukawa A, Matsuzaki K. J.Pharm.Biomed.Anal.38 (2) ,204-209 (2005) .
- 9) A.Shibukawa and T.Nakagawa Analytical Chemistry 68, 447-454 (1996) .