

報 文 (若手初論文)

部分的最小二乗法によるフローインジェクション分析の迅速化 —フェナントロリン吸光光度法を用いる鉄の定量による検証—

高橋 利¹, 渡邊 真由², 大塚 裕太³, 田中 秀治^{1,4}, 竹内 政樹^{*1,4}

フローインジェクション分析法 (FIA) では, 試料の導入間隔を短くするとスループットは向上するが, 試料の分散によるピークの重なりが起り, 分析の精確さが低下する. 本研究では, 重なりピークに部分的最小二乗法 (PLS) を適用することで, 目的成分を精確かつ迅速に定量可能な FIA, すなわち RFP (Rapid FIA by PLS regression) 法の確立を目指した. フェナントロリン吸光光度法による Fe^{2+} の FIA を RFP 法の評価モデルとした. 二つの Fe^{2+} 試料 (S_1, S_2) を一定間隔で導入し, それぞれのピークが重なっている吸光度シグナルを得た. 得られたシグナルに PLS を適用して PLS 予測検量線を作成したところ, S_1 と S_2 の検量線の傾きはいずれもほぼ 1 であり, 直線性も良好であった. 環境水に含まれる Fe^{2+} を RFP 法と絶対検量線法 (完全分離したピークの高さから濃度を算出) でそれぞれ定量した結果, 両者の分析値の間に有意な差はなく ($p > 0.05$), RFP 法の導入によりスループットを絶対検量線法の約 1.7 倍に高めることができた. 以上の結果から, PLS を導入した FIA, すなわち REP 法は重なった吸光度ピークでも精確な定量が可能であり, 試料導入間隔の短縮による分析の迅速化に有効であると結論した.

1 緒 言

フローインジェクション分析法 (FIA) では, 細いチューブを流れるキャリアー溶液の中に試料溶液を導入し, キャリヤー中あるいは別流路から導入された試薬との間で化学反応を行わせ, 生成物を物理的あるいは化学的な計測法で検出する. 1975 年に Ružička と Hansen¹⁾ が本手法を提案して以来, FIA は理工・環境・農・医薬などの分野においても広く利用され²⁾³⁾, 我が国では日本産業規格「JIS K0126: 2019 流れ分析通則」として規格化されている⁴⁾.

FIA は, 測定を自動化できるうえ, 試料・試薬の少量化, 精確さの向上, 分析時間の短縮といった長所が期待できる. そのスループットは, 当初から 1 時間あたり 200 試料も可能とされているが, 精確さとの兼ね合いもあり 30 から 60 試料が一般的である. FIA による定量では, 検出シグナルのピーク高さあるいは面積のみを利用した最小二乗法により検量線を作成する方法, すなわち絶対検量線 (ACC) 法が一般的に用いられる. ACC 法において, 分析の迅速化のために試料導入間隔を短くすると, ピーク分離

度が減少し精確さが低下する. また, 反応速度の小さい系に長い流路を用いた場合には, 試料の分散が大きくなり, 検出されるピーク幅の増大やピークの重なりが起る.

これまでに, 重なったピークを分離し定量する方法について, 数々の研究が行われてきた. 一例として, Stephen らによる反復畳み込みカーブフィッティング法⁵⁾ や James らによるフーリエ変換逆畳み込み法⁶⁾ が挙げられる. また, Bogdan らは, FIA で得られる検出シグナルにフーリエ変換を適用する手法について評価した⁷⁾. 他方, 1960 年代から発展した分野として, 数学的・統計的手法を化学に適用する計量化学 (ケモメトリックス) がある^{8)~11)}. そのなかでも, 多変量解析の一つである部分的最小二乗法 (PLS) については, クロマトグラフィーにおける重なりピークの分離¹²⁾ や FIA においては複数成分の同時定量が報告されている^{13)~17)}. しかし, PLS を FIA に適用し, 分析の迅速化を達成したという報告はない.

そこで本研究では, PLS を用いることで FIA のさらなる迅速化と精確さの実現を目指した (以降, 本手法を RFP 法 (Rapid FIA by PLS) と呼ぶ). RFP 法の評価モデルとして, 高感度で選択性が高く, 操作が容易なフェナントロリン吸光光度法による Fe^{2+} の FIA を用いた. 重なりピーク生成システムから得られた重なりピークに PLS を適用し, 回帰モデルを構築した. Fe^{2+} 標準試料の定量予測及び環境水試料を用いた ACC 法との比較を行い, RFP 法の性能を評価した.

* E-mail: masaki.takeuchi@tokushima-u.ac.jp

¹ 徳島大学薬学部薬学科: 770-8505 徳島県徳島市庄町 1-78-1

² 徳島大学大学院薬科学教育部創薬科学専攻: 770-8505 徳島県徳島市庄町 1-78-1

³ 東京理科大学薬学部生命創薬科学科: 278-8510 千葉県野田市山崎 2641

⁴ 徳島大学大学院医歯薬学研究部薬学域: 770-8505 徳島県徳島市庄町 1-78-1

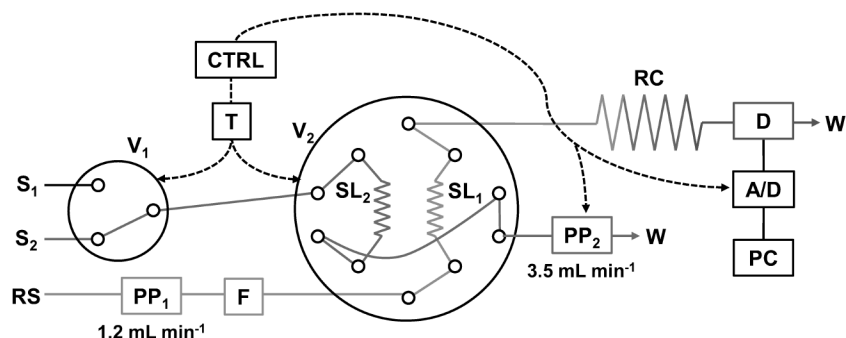


Fig. 1 Schematic of FIA system to generate overlapped peaks

RS, reagent solution (0.5 mol L^{-1} 1,10-phenanthroline + 94 mmol L^{-1} hydroxylammonium chloride in pH 4.7 acetate buffer); S_1 and S_2 , sample (Fe^{2+} in pH 4.7 acetate buffer); PP_1 and PP_2 , peristaltic pump; V_1 , 3-way valve; V_2 , 10-way valve; SL_1 and SL_2 , sample loop (volume: $100 \mu\text{L}$); F, filter; W, waste; T, digital timer; CTRL, timing controller; PC, computer; RC, reaction coil; A/D, A/D converter and data logger (range: $\pm 100 \text{ mV}$, sampling rate: 10 Hz); D, detector (UV/VIS range: 0.01 AUFS^* , scan rate: 1 Hz , $\lambda = 510 \text{ nm}$). * Absorbance units full scale.

2 実験

2.1 重なりピーク生成システム

フェナントロリン吸光光度法による Fe^{2+} の定量において、重なりピークを生成するための FIA システムを構築した。その模式図を Fig. 1 に示す。ペリスタポンプ 2 (PP_2 , Dynamax, Rainin) によって吸引された pH 4.7 の Fe^{2+} 標準液 (S_1 あるいは S_2) は、3 方バルブ (V_1 , FST-016M6Y, Flon Industry) を経て 10 方バルブ (V_2 , C2H-1340EH, Valco Instruments) に接続されているサンプルループ (SL_1 あるいは SL_2 , それぞれ $100 \mu\text{L}$ PEEK チューブ) に充てんされる。もう一つのペリスタポンプ (PP_1 , Rabbit, Rainin) により送出された反応試液 (RS, 0.5 mmol L^{-1} 1,10-フェナントロリン, 94 mmol L^{-1} 塩酸ヒドロキシルアミン in 0.5 mol L^{-1} 酢酸 (ナトリウム) 緩衝溶液, pH=4.7) は、ろ過フィルター (F, ミニザルト RC25 17765K, $0.45 \mu\text{m}$, Sartorius) を通過し、 V_2 で試料溶液と合流後、反応コイル (RC, 0.5 mm i.d. , 0.96 mm o.d. テフロンチューブ) を経て吸光光度検出器 (D, 875-UV, Jasco, $\lambda = 510 \text{ nm}$) に到達する。 SL_1 と SL_2 では、試料の充てんと検出流路への導入を交互に行う。 V_1 と V_2 の切替制御タイマー (T, H5CX-AD-N, Omron), PP_2 及び A/D コンバータ兼データロガー (A/D, midi Logger GL200A, Graphtec) の始動と停止は、Arduino UNO R3 互換マイクロコントローラ (CTRL, Elegoo) により制御し、取得データの保存に Windows OS 搭載コンピュータ (PC) を利用した。また、流路にはテフロンチューブ (0.5 mm i.d. , 0.96 mm o.d.) を用い、ペリスタポンプの送液チューブにはファームドチューブ (PP_1 : 0.8 mm i.d. , 4.0 mm o.d. , PP_2 : 2.0 mm i.d. , 4.0 mm o.d.) を利用した。

超純水は Sartorius 製の arium 611DI を用いて製造した。

標準液用の試薬は、99.0% 1,10-フェナントロリン一水和物 (特級, 関東化学), 98% 塩化ヒドロキシルアンモニウム (特級, 関東化学), 99% 硫酸アンモニウム鉄(II) 六水和物 (試薬特級, 富士フィルム和光純薬), 96% 硫酸 (特級, 関東化学), 99% 酢酸 (特級, ナカライテスク), 99% 酢酸ナトリウム三水和物 (特級, 関東化学) を、さらなる精製を行わずに用いた。

2.2 構築モデル

PLS⁽¹⁸⁾ は、説明変数 X と目的変数 Y の関係をモデル化する線形回帰分析法の一つであり、重回帰分析 (MLR) や主成分回帰分析 (PCR) を発展させた手法である。MLR では、お互いに強い相関をもつ説明変数 X が存在する場合、モデルの予測精度が低下する (多重共線性) おそれがある。PLS 及び PCR では、データを互いに無相関かつ少数の主成分スコア (潜在変数) に変換してから回帰を行うことで、この問題を回避し、ノイズに強い回帰モデルを構築できる。PCR と PLS の相違点は、主成分スコアの計算方法である。PCR では、説明変数 X の分散を最大化するよう主成分スコアを決定する。一方、PLS では説明変数 X と目的変数 Y の共分散が最大になるよう主成分スコアを決定するので、目的変数 Y の影響を考慮したモデルが構築できる。

本研究では、多変量解析ソフトウェア (The Unscrambler X, CAMO software AS, Norway) を使用して PLS モデルを構築した。PLS のアルゴリズムとして、最も代表的な反復非線形部分最小二乗 (NIPALS)⁽¹⁸⁾ を選択した。NIPALS の解析手順⁽¹⁹⁾ は以下のとおりである。最初に、説明変数 X , 目的変数 Y を中心化及び標準化して X_0 , Y_0 とし、 $\hat{Y}_0 = 0$ とおく (Step 1)。次に、 X_0 と Y_0 の共分散として重み $\omega_1 = X_0^T Y_0$ を計算し、主成分スコア $t_1 = X_0 \omega_1$ を求める (Step 2)。続い

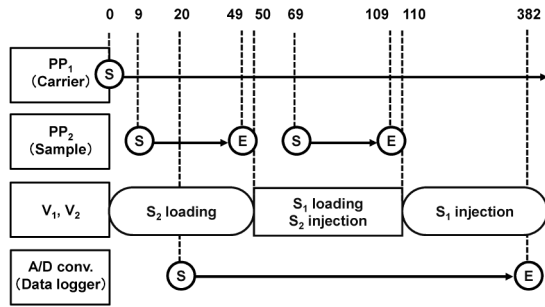


Fig. 2 Protocols of peristaltic pumps, valves, and A/D converter to generate the overlapped peaks

S_1 , first injection sample; S_2 , second injection sample; PP_1 and PP_2 , peristaltic pump; V_1 , 3-way valve; V_2 , 10-way valve S, start; E, end. The numerical values represent the time in sec.

て, Y_0 を t_1 上へ回帰し, 回帰モデルを $\hat{Y}_1 = \hat{Y}_0 + t_1(t_1^T t_1)^{-1} t_1^T Y_0$ へ更新する (Step 3). 最後に, 式(1)と式(2)で表させる主成分スコア上へ回帰したときの残差 X_1 と Y_1 を計算し (Step 4), 添え字を一つずつ増加させて十分な精度が得られるまで, Step 2から Step 4を繰り返す.

$$X_1 = (I - t_1(t_1^T t_1)^{-1} t_1^T) X_0 \quad (1)$$

$$Y_1 = (I - t_1(t_1^T t_1)^{-1} t_1^T) Y_0 \quad (2)$$

また, k 成分モデルにおける PLS 回帰係数 β_{PLS}^k は, 式(3)で求めることができる²⁰⁾.

$$\hat{Y} = X \hat{\beta}_{PLS}^k = X W_k (P_k^T W_k)^{-1} q_k \quad (3)$$

ここで, $W_k = (w_1, \dots, w_k)$ は, NIPALS アルゴリズムによって得られた重みベクトルを列にもつ行列である. $P_k = X^T T_k (T_k^T T_k)^{-1}$ と $q_k = (T_k^T T_k)^{-1} T_k^T Y$ は, それぞれ各々の主成分スコアを列にもつ行列 $T_k \times H, Y$ を射影したときの係数である.

PLS では, より予測性能の高い回帰モデルを構築するために, 適切な主成分数を決定する必要がある. 主成分数が少なすぎると, 元のデータを十分に説明することができない. 反対に主成分数が多すぎると, 過学習 (オーバーフィッティング) と呼ばれる現象により, 予測性能が低下するおそれがある. 本研究では, モデルを構築する前に主成分数を決定する方法として, 累積寄与率を用いた. ここで寄与率とは, ある主成分が元のデータの情報 (ばらつき具合) をどれだけ表現できているかを表す指標であり, 主成分スコアの分散を用いて算出される. 各主成分の寄与率は, 該当する主成分スコアの分散を, すべての主成分スコアの分散で除した値である. 累積寄与率は, 各主成分の寄

与率を加算していくことで求められる.

2.3 モデル構築用データ

5種の Fe^{2+} 標準試料 (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, いずれも 0.5 mol L^{-1} 酢酸緩衝液で pH 4.7 に調整) から, 15種のペアを作り, 重なりピークを生成する組合せとした. 15種の組合せを1回目に導入する試料液 (S_1) の Fe^{2+} 濃度 ($\mu\text{mol L}^{-1}$), 2回目に導入する試料液 (S_2) の Fe^{2+} 濃度 ($\mu\text{mol L}^{-1}$) の順で表すと, (0, 0), (0, 0.5), (0.5, 0), (0.5, 0.5), (0, 1), (1, 0), (1, 1), (0, 1.5), (1.5, 0), (1, 1.5), (1.5, 1), (1.5, 1.5), (0, 2), (2, 0), (2, 2) となる. 各ペアの Fe^{2+} 標準試料液を重なりピーク生成システムに導入し, それぞれ6回ずつ検出シグナルを取得した. また, S_1 と S_2 の試料導入間隔は 30 s と 60 s の2通りでデータを収集した.

試料導入間隔 30 s における重なりピーク1回分の生成及び吸光度測定の手順を Fig. 2 に示す. 得られる重なりピークのデータは, 吸光度シグナルを電圧値に変換した値である. サンプリング周波数は 1 Hz で, 1 試行あたり 360 点のデータを収集した. 試行ごとのデータに, ベースライン補正処理 (ベースラインが 0 となるように取得データ値からオフセット値を差し引く) を行った. 15 種の組合せについて 6 回ずつ測定を行い, 計 90 回分のデータを収集した. このうち, 各種の 3 回分, 計 45 回分をモデル構築のためのキャリブレーションデータ (トレーニングデータ) とし, 残りの 45 回分をモデル検証のためのバリデーションデータ (テストデータ) とした. 多変量解析ソフトウェアを使用し, 吸光度シグナルを説明変数 X , 対応する Fe^{2+} 試料濃度を目的変数 Y とし, PLS (NIPALS アルゴリズム), 最大 7 主成分 (PC) までを仮定して, 回帰モデルを構築した. なお, モデルは, S_1 と S_2 とで別々に構築される.

2.4 環境水試料

環境水試料として, 2020 年 6 月 26 日に徳島県内で河川水 (松崎谷川) と湖沼水 (蛭田池) を各 1 試料ずつ採取した. 各試料 100 mL に対して 1 mL の 96 % 硫酸を加えてよく振とうし, 非溶存鉄を溶解させた. 得られた試料溶液をろ紙にて 1 回, シリンジフィルター (ミニザルト RC25 17765K, 0.45 μm , Sartorius) にて 2 回ろ過し, 環境水試料原液とした. 続いて, 同原液を最終濃度が 0.5 mol L^{-1} となる容量の 5 mol L^{-1} 酢酸緩衝液と超純水を用いて 4 倍に希釈し, 測定に供した. このような前処理を行うことで, 試料 pH は Fe^{2+} 標準試料液の pH と同程度になる.

3 結果と考察

3.1 重なりピーク生成システムの最適化

ピークの重なり具合を制御する因子として, S_1 と S_2 の導

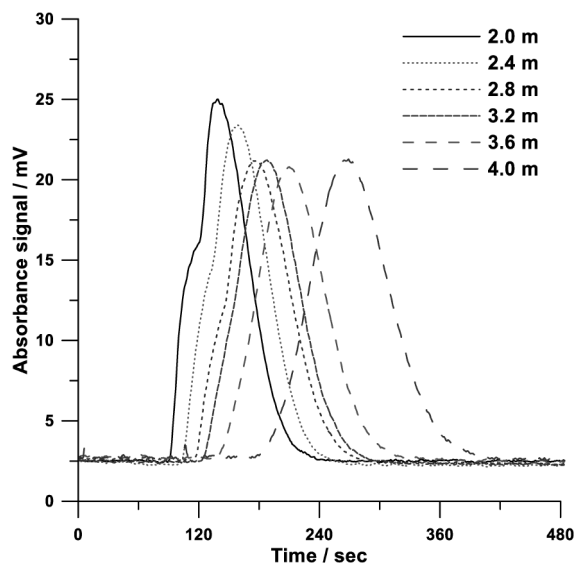


Fig. 3 Signal outputs using 2.0 to 4.0 m reaction coils

The injection interval between S_1 and S_2 was 30 sec. S_1 , first injection sample; S_2 , second injection sample.

入間隔及び反応コイルの長さが挙げられる。前者はピーク同士の距離を、後者は各ピークの広がりそれぞれを決定づける。最初に、試料の導入間隔を検討した。Fig. 1で示した重なりピーク生成システムはサンプルループを二つ備えており、一方に S_1 が導入されている間に、もう一方では S_2 の充てんが行われる。試料の充てん流量を一定 (3.5 mL min^{-1}) にして、充てん時間 3, 5, 10, 20, 30 及び 60 s における検出シグナルを確認した。 Fe^{2+} のピーク高さは充てん時間とともに増加し、30 s と 60 s でほぼ一定となったことから、試料の最短導入間隔は 30 s が適切であると判断した。充てん流量を増やすことで、導入間隔をさらに短縮することも可能と思われるが、試料消費量が増加するため採用しなかった。次に、反応コイル長を検討した。反応コイル長を 2.0 m から 4.0 m まで 0.4 m ずつ変化させ、 S_1 ($10 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$) と S_2 ($10 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$) を導入間隔 30 s で分析したときの重なりピークを得た。Fig. 3 に反応コイル長を変えたときの重なりピークの形状変化を示す。反応コイル長が 3.2 m 以上の場合、二つのピークが重なり、ほぼ一つに見えた。よって、反応コイル長を 3.2 m に決定した。先に示した 15 種の Fe^{2+} 濃度の組合せのうち、(0, 0), (0, 2), (2, 0), (2, 2) の試料について、導入間隔が 30 s と 60 s の場合に得られた重なりピークを Fig. 4 に示す。試料導入間隔が 30 s の場合 (Fig. 4a) は、二つのピークが重なり合い、各々のピーク高さやピーク面積を用いる ACC 法では、定量が困難であることが分かる。一方、試料導入間隔 60 s (Fig. 4b) においては、二つのピークの位置が判別できる程度に重なり合っている様子を確認できる。

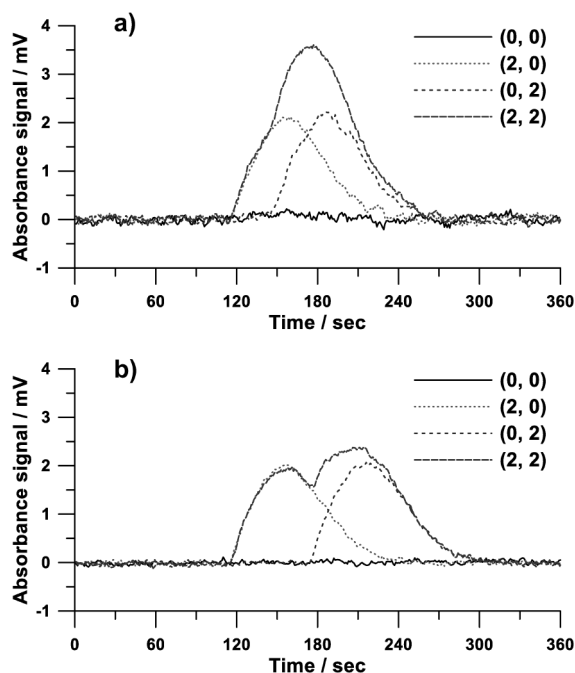


Fig. 4 Typical overlapped peaks with the sample injection intervals of 30 sec (a) and 60 sec (b)

The numerical values in parentheses represent the Fe^{2+} concentration for S_1 and S_2 in $\mu\text{mol L}^{-1}$. S_1 , first injection sample; S_2 , second injection sample.

3.2 PLS 回帰モデルによる Fe^{2+} 濃度の予測定量

試料導入間隔 30 s のキャリブレーションデータ及びバリデーションデータについて、目的変数 Y (Fe^{2+} 濃度) に対する累積寄与率は、それぞれ主成分数 1 (PC_1) で 50.4 % と 50.0 %, PC_2 で 99.4 % と 99.3 % となり、 PC_3 以降における累積寄与率は PC_7 まで大きな差は見られなかった。いずれのデータも PC_2 にて、ほぼ 100 % に近い値となり、重なりピークでは、 S_1 の Fe^{2+} 濃度 (C_{S1}) と S_2 の Fe^{2+} 濃度 (C_{S2}) によりピークの形状に変化が生じると考えられる。このことから、本モデルでは最大主成分数として 2 を採用した。

主成分の構成に各説明変数 X がどのくらい盛り込まれているかを表す X ローディングを Fig. 5a に示す。 PC_1 の X ローディングは 170 s 付近を中心とする正のピークを示した。 PC_2 の X ローディングは、145 s 付近の正のピークと 200 s 付近の負のピークを示し、120 s から 300 s の間に Fe(II)-1,10- フェナントロリン錯体の吸光度が大きく変動していることが示唆された。キャリブレーションモデルにおける PC_1 と PC_2 のスコアをそれぞれ横軸と縦軸にとった関係図を Fig. 5b に示す。 PC_1 のスコアは 8 つに大別でき、連続して導入した Fe^{2+} 試料濃度の合計値の写像を示していることが示唆された。また、 PC_2 のスコアの変動は、正方向の値によって C_{S1} 、負方向の値によって C_{S2} を示していることが示唆された。Fig. 5c に構築された PLS 回帰モデル

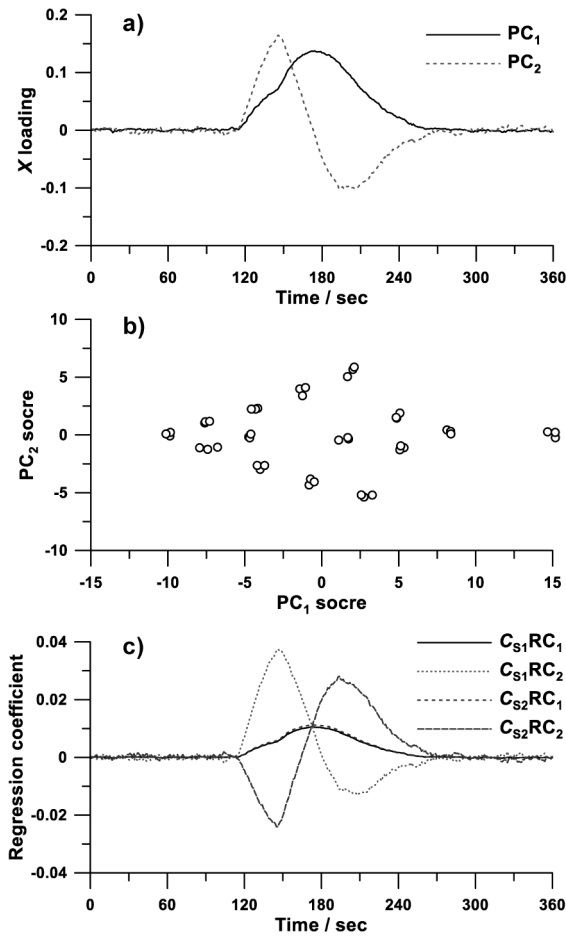


Fig. 5 X loading (a), score (b), and regression coefficient (c) of the PLS regression model constructed with a 30-sec sample injection interval

PC₁, first principal component; PC₂, second principal component; C_{S_x}RC_y, regression coefficient of the PLS model constructed for S_x' Fe²⁺ concentration prediction by PC_y (x, y = 1, 2). S₁, first injection sample; S₂, second injection sample.

の主成分ごとの回帰係数を示す。回帰係数は、説明変数 X と目的変数 Y の相関を示している²¹⁾。ここで、C_{S₁}を目的変数としたモデルの回帰係数を C_{S₁}RC_y (y は主成分の番号), C_{S₂}を目的変数としたモデルの回帰係数を C_{S₂}RC_yとした。C_{S₁}予測のために構築された PLS モデルの PC₁ による回帰係数 (S₁RC₁) は、174 s 付近を頂点とする正のピークを示し、C_{S₁}RC₂ は 148 s 付近及び 208 s 付近において、正と負のピークを示した。また、C_{S₂}RC₁ は 173 s 付近を頂点とする正のピークを示し、C_{S₂}RC₂ は 145 s 付近及び 193 s 付近において負と正のピークを示した。S₁ 及び S₂ の濃度予測モデルは、いずれも全体のピークの面積総和に各々の PC₂ の波形を合成することによって構築されていることが示唆された。

構築された PLS モデルを用いて、先の実験で得られたデータの半数にあたるバリデーションデータ (n = 45) を

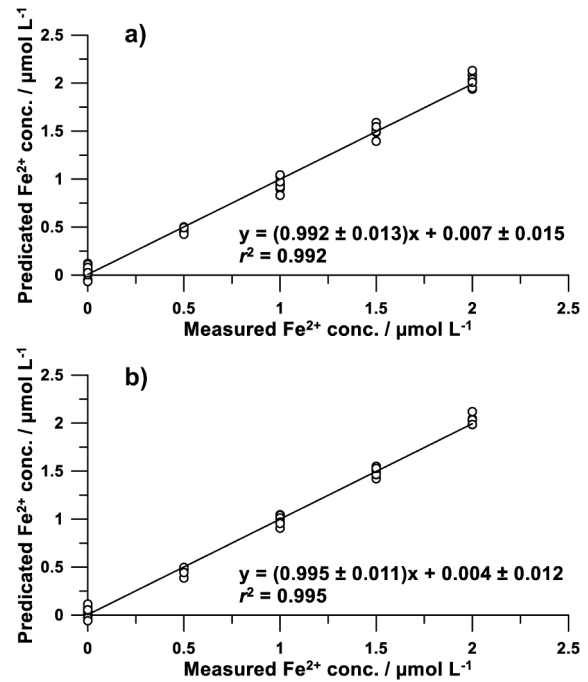


Fig. 6 Predicated Fe²⁺ concentration using RFP with a 30-sec sample injection interval for S₁ (a) and S₂ (b) S₁, first injection sample; S₂, second injection sample.

回帰し、予測値を得た。Fig. 6 に、試料導入間隔 30 s のデータにおいて、調製した Fe²⁺ 標準試料濃度を横軸、PLS モデルにより予測された Fe²⁺ 濃度を縦軸としたときの予測相関図を示す。S₁ と S₂ のいずれにおいても、回帰線の傾きと決定係数がほぼ 1 の直線が得られていることから、構築された PLS 回帰モデルは高い予測性能を有すると言える。また、試料導入間隔 60 s のデータにおいても、最大主成分数を 2 として PLS モデルを構築し、予測相関図を作成したところ、30 s の場合と同様に高い予測検量線が得られた (S₁: $y = (0.998 \pm 0.004)x + 0.000 \pm 0.004$, $r^2 = 0.999$; S₂: $y = (0.996 \pm 0.005)x + 0.004 \pm 0.006$, $r^2 = 0.999$)。

3.3 RFP 法による環境水中 Fe²⁺ の定量と ACC 法との比較

環境水試料 (河川水, 湖沼水) を通常の FIA で分析し、得られた単一ピークのピーク高さをを用いた ACC 法により Fe²⁺ を定量した。その翌日に、環境水試料を重なりピーク生成システムに試料導入間隔 30 s で導入し、S₁ と S₂ のピークが重なった検出シグナルを取得した。得られた重なりピークに構築した PLS 回帰モデルを適用し、RFP 法による Fe²⁺ の予測値を得た。Table 1 に、RFP 法と ACC 法により得られた定量値を示す。RFP 法の予測濃度は ACC 法で得られた値の 94.4 % から 103.3 % の範囲にあり、t 検定では、両定量法の結果に有意差は認められなかった (p > 0.05)。次に、RFP 法と ACC 法のスループットを比較した。

ACC法では、ピーク同士が重ならないようにするためには、180 sの導入間隔が必要であった。一方、RFP法では、導入間隔 30 sで試料を導入し、その 180 s後に再び導入間隔 30 sで次の試料を導入する手順とする。この場合、RFP法では 210 sで2回の分析が行われる。これらの分析手順を1時間あたりの分析回数に換算すると、RFP法が約34回、ACC法が20回となり、RFP法はACC法に比して分析時間を約1/1.7に短縮できることになる。

環境水試料の導入間隔を60 sとしたときのRFP法とACC法により得られた Fe^{2+} の定量値をTable 2に示す。Table 2には、RFP法で用いた重なりピークのピーク高さにACC法を適用して算出した Fe^{2+} 濃度も示している。ここで、単一ピークにACC法を適用して求めた河川水中の Fe^{2+} 濃度 ($1.09 \pm 0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$)は、Table 1における同試料の Fe^{2+} 濃度 ($1.22 \pm 0.07 \mu\text{mol L}^{-1}$)の9割程度となっている。これは、導入間隔 30 sの実験を行ってから60 sの実験を行うまでの約3週間で河川水試料中の Fe^{2+} 濃度が何らかの理由で変化したためと思われる。Table 2のRFP法による予測濃度は、単一ピークにACC法を適用して得られた値の100.9% (河川水)と102.2% (湖沼水)であった。一方、重なりピークにACC法を適用して算出した Fe^{2+} 濃度と単一ピークから算出した Fe^{2+} 濃度の比を見ると、 S_1 においては99.1% (河川水)と100.0% (湖沼水)であったが、 S_2 においては115.6% (河川水)と116.9% (湖沼水)となり、 S_2 では環境水中の Fe^{2+} を15%以上も過大評価し

ていた。これは、 S_1 のピークのテーリング部が S_2 のピークの頂点と重なっていたためと推察される。以上の結果より、二つのピークの位置が判別できる程度に重なり合っている重なりピークにおいても、RFP法はACC法よりも精確に定量可能と言える。

4 結 言

FIAで得られた重なりピークにPLSを適用し目的成分の定量を行うRFP法を考案し、その性能評価を行った。フェナントロリン吸光光度法による Fe^{2+} の定量を対象とし、重なりピークを生成するためのFIAシステムを構築した。本システムでは、タイマー機能をもつマイクロコントローラを組み込むことで、手操作を極力排除しながら自動化を行い、省力化を達成した。得られた重なりピークのデータを用いて、PLS回帰モデルを構築した。 Fe^{2+} の予測検量線において、傾きと決定係数がともに1に近い値となったことから、精確な定量が可能であることを確認した。続いて、環境水試料に含まれる Fe^{2+} の定量を行い、RFP法の実用性について検証した。単一ピークにACC法を適用して得られた定量値との比較では、有意水準5%で両者に差は認められなかった。また、RFP法はACC法に比べ1.7倍のスループットを達成できる。以上より、RFP法を用いることで、定量の精確さを損なうことなくFIAの迅速化に成功したと結論した。

謝 辞

本研究の一部は、徳島大学特別経費（多機能性人工エキソソーム (iTEX) 医薬品化実践を通じた操業人育成事業）の支援によりなされたことを付記し、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) J. Ružička, E. H. Hansen : *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145 (1975).
- 2) 本水昌二, 小熊幸一, 酒井忠雄 : “分析化学実技シリーズ機器分析編10 フローインジェクション分析”, 初版, 日本分析化学会編, p. 166 (2014), (共立出版).

Table 1 Comparison of Fe^{2+} concentration in surface water samples ($\mu\text{mol L}^{-1}$) estimated by RFP with 30-sec sample injection interval and ACC

Sample		Fe^{2+} by RFP, a	Fe^{2+} by ACC, b	a/b, %
River, n = 6	S_1	1.26 ± 0.02	1.22 ± 0.07	103.3
	S_2	1.20 ± 0.02		98.4
Pond, n = 6	S_1	0.89 ± 0.04	0.90 ± 0.04	98.9
	S_2	0.85 ± 0.02		94.4

RFP, rapid FIA by PLS; ACC, absolute calibration curve method using peak height; S_1 , first injection sample; S_2 , second injection sample.

Table 2 Comparison of the Fe^{2+} concentration in surface water samples ($\mu\text{mol L}^{-1}$), estimated by RFP with 60-sec sample injection interval and ACC

Sample		Duplicate peak by two consecutive sample injections		Non-duplicate peak	a_1/b , %	a_2/b , %
		Fe^{2+} by RFP, a_1	Fe^{2+} by ACC, a_2	Fe^{2+} by ACC, b		
River, n = 6	S_1	1.10 ± 0.01	1.08 ± 0.03	1.09 ± 0.05	100.9	99.1
	S_2	1.10 ± 0.02	1.26 ± 0.02		100.9	115.6
Lake, n = 6	S_1	0.91 ± 0.01	0.89 ± 0.03	0.89 ± 0.00	102.2	100.0
	S_2	0.91 ± 0.01	1.04 ± 0.08		102.2	116.9

RFP, rapid FIA by PLS; ACC, absolute calibration curve method using peak height; S_1 , first injection sample; S_2 , second injection sample.

- 3) 黒田六郎, 小熊幸一, 中村 洋 : “機器分析実技シリーズフローインジェクション分析法”, 初版, 日本分析化学会編, p. 118 (1990), (共立出版).
- 4) JIS K 0126:2019, 流れ分析通則 (2019).
- 5) S. N. Chesler, S. P. Cram : *Anal. Chem.*, **45**, 1354 (1973).
- 6) J. T. Dyke, Q. Fernando : *Talanta*, **32**, 807 (1985).
- 7) B. Szostek, M. Trojanowicz : *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **22**, 221 (1994).
- 8) 長谷川 健 : “スペクトル定量分析”, 初版, (2016), (講談社).
- 9) 三井利幸 : “初心者のためのケモメトリックス —分析化学と多変量解析—”, 初版, (2016), (一粒書房).
- 10) 尾崎幸洋, 宇田明史, 赤井俊雄 : “化学者のための多変量解析 —ケモメトリックス入門—”, 初版, (2009), (講談社).
- 11) 金子弘昌 : “化学のためのPythonによるデータ解析・機械学習入門”, 初版, (2019), (オーム社).
- 12) Y. Otsuka, H. Watanabe, H. Tanaka, M. Takeuchi : *J. Flow Injection Anal.*, **37**, 73 (2020).
- 13) B. Rezaei, T. Khayamian, A. Mokhtari : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **49**, 234 (2009).
- 14) Q. Sun, J. Tu, I. Yaroshenko, D. Kirsanov, A. Legin, P. Wang : *Sens. Actuators B Chem.*, **251**, 1050 (2017).
- 15) F. S. Oliveira, L. S. G. Teixeira, M. Korn : *Lab. Robot. Autom.*, **12**, 305 (2000).
- 16) B. Li, D. Wang, J. Lv, Z. Zhang : *Talanta*, **69**, 160 (2006).
- 17) O. Hernández, F. Jiménez, A. I. Jiménez, J. J. Arias, J. Havel : *Anal. Chim. Acta*, **320**, 177 (1996).
- 18) H. Wold : “Soft Modelling by Latent Variables: The Non-Linear Iterative Partial Least Squares (NIPALS) Approach”, Edited by M. S. Bartlett, p. 520, (1975), (Academic Press, London).
- 19) 橋本淳樹, 田中 豊 : アカデミア 情報理工学編, **10**, 39 (2010).
- 20) I. S. Helland : *Commun. Stat.-Simul. Comput.*, **17**, 581 (1988).
- 21) Y. Otsuka, M. Yamamoto, H. Tanaka, M. Otsuka : *Biomed. Mater. Eng.*, **25**, 223 (2015).

Rapid Flow Injection Analysis by Partial Least Squares Regression –Validation by a Spectrophotometric Determination of Iron with 1,10-Phenanthroline–

Toru TAKAHASHI¹, Mayu WATANABE², Yuta OTSUKA³, Hideji TANAKA^{1,4} and Masaki TAKEUCHI^{*1,4}

* E-mail : masaki.takeuchi@tokushima-u.ac.jp

¹ School of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University, 1-78-1, Shomachi, Tokushima-shi, Tokushima 770-8505

² Course of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University, 1-78-1, Shomachi, Tokushima-shi, Tokushima 770-8505

³ Department of Medicinal and Life Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641, Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278-8510

⁴ Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University, 1-78-1, Shomachi, Tokushima-shi, Tokushima 770-8505

(Received March 26, 2021; Accepted April 7, 2021)

We applied a partial least squares regression (PLS) to overlapped peaks to develop a rapid flow injection analysis by the PLS method (RFP method) that quantifies the analytes of interest both accurately and rapidly. Spectrophotometric determination of Fe²⁺ with 1,10-phenanthroline was used as an evaluation model of the RFP method. Two Fe²⁺ standard samples (S₁ and S₂) were sequentially injected at a 30-sec interval, and the overlapped peaks were obtained. A calibration curve was constructed by applying the PLS to the overlapped peaks. The slopes of the calibration curve for S₁ and S₂ were both almost unity with good linearity. The concentrations of Fe²⁺ in surface water samples were determined by the RFP method. The Fe²⁺ concentrations measured were in good agreement with the values calculated by applying an absolute calibration curve method to non-overlapped peaks (ACC method). The sample throughput of the RFP method was about 1.7-times faster than that of the ACC method. We concluded that the RFP method achieves both accurate and rapid quantification.

Keywords: FIA; overlapped peak; partial least squares regression; rapid analysis.