

Application News

No. L453

高速液体クロマトグラフィー
High Performance Liquid Chromatography

高感度セルを用いたフォトダイオードアレイ検出器 SPD-M30A による不純物分析

Impurity Analysis Using the SPD-M30A Photodiode Array Detector with the High Sensitivity Cell

医薬品中の不純物分析においては、高濃度の主薬とともに微量不純物を検出する必要があります。このため検出器には広い直線性が求められます。

一方、微量不純物を精度良く定量するためには、高いS/N（シグナル・ノイズ比）での検出が必要となります。S/N向上の手段としては、試料濃度や注入量を増やすことが考えられます。しかし、試料濃度を増やす場合、主薬の溶解度を十分に確保できない、加温溶解操作により成分が分解する可能性があるといった問題が起こりえます。また、注入量を増やす場合、試料溶媒の影響によりピーク形状に歪みが生じることがあります。従って、無理のない試料濃度と注入量で微量不純物を検出するには、検出器の高感度化が必須であると言えます。

今回は新型フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M30A とオプションの高感度セル（光路長 85 mm）を用いた不純物分析を行い、その感度・直線性などを評価した例をご紹介します。

K. Tanaka*

* Shimadzu Scientific Instruments, Inc.

■ 感度

Sensitivity

今回はサンプルとして、非ステロイド系抗炎症薬のケトプロフェンを用いました。

新型フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M30A にはオプションとして光路長 85 mm の高感度セルがラインアップされており、従来は難しかった微量不純物の分析が可能となります。従来機 SPD-M20A（セミマイクロセル）との比較を行うため、同じ条件で、ケトプロフェン 0.02 mg/L 標準溶液を 2 μL 注入し、それぞれの S/N を確認しました。Fig. 1 に分析結果を、Table 1 に分析条件を示します。比較の結果、SPD-M20A では検出限界付近のピークが、高感度セルを用いた SPD-M30A では S/N が 10 倍以上向上し、定量が可能になりました。

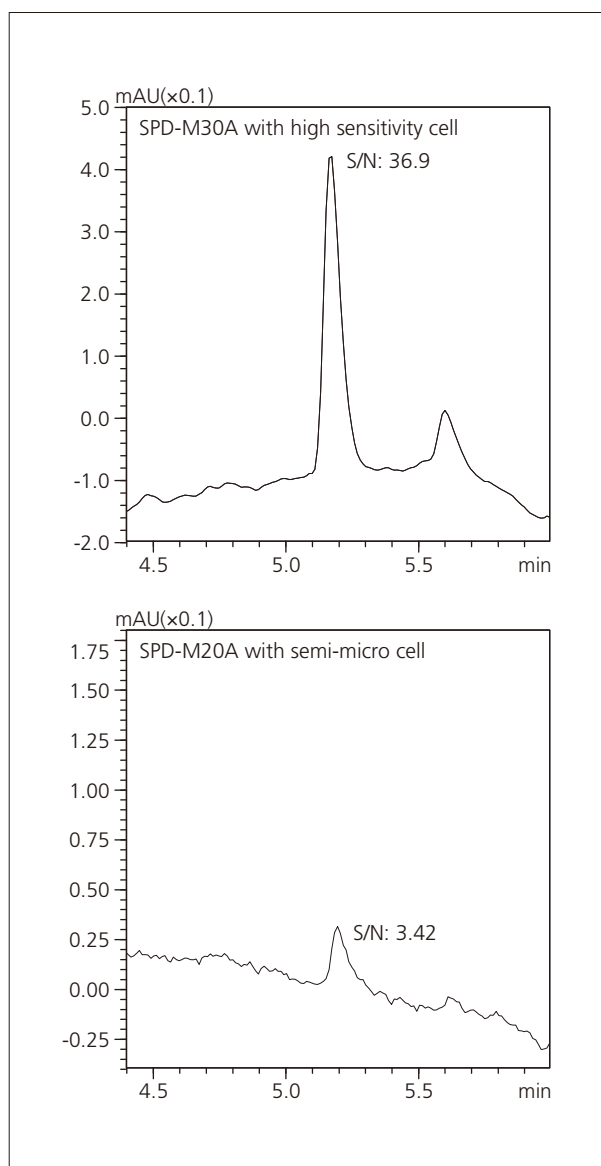


Fig. 1 ケトプロフェン 0.02 mg/L 標準溶液のクロマトグラム
Chromatogram of 0.02 mg/L Ketoprofen Standard Solution

Table 1 分析条件
Analytical Conditions

System	: Nexera SR	[Autosampler rinse settings]
Column	: Shim-pack XR-ODS III (150 mm L. x 2.0 mm I.D., 2.2 μm)	Rinse Solution : R0 : Water/Methanol=50/50
Mobile Phase	: A : 0.1 % Formic acid in water	R1 : Acetonitrile
	: B : Acetonitrile	R2 : Acetonitrile
Time Program	: B.Conc. 30 % (0 min) → 70 % (10 min)	R3 : Acetonitrile
Column Temp.	: 40 °C	Rinse Mode : Before and after aspiration
Flow Rate	: 0.5 mL/min	Rinse Method : Rinse port → Rinse pump
Injection Vol.	: 2 μL	External Rinse : R0 0 sec, R3 2 sec
Detection	: SPD-M30A at 254 nm	Internal Rinse : R0 → R1, rinsing volume 300 μL each
Flow Cell	: High sensitivity cell (SPD-M30A)	Injection Port Rinse : R0, R1

■直線性

Linearity

高感度セルを用いた SPD-M30A でケトプロフェンの直線性を確認するため、0.01 ~ 500 mg/L の標準溶液を調製し、測定を行いました。Fig. 2 には濃度範囲 0.01 ~ 50 mg/L の検量線を示します。寄与率 (R^2) が 0.999 以上の良好な直線性が得られました。Fig. 3 には濃度範囲 0.01 ~ 500 mg/L での検量線を示します。50 mg/L を越えると直線性が保てませんでしたので、アプリケーションニュース No. L451 でご紹介しましたダイナミックレンジ拡張機能 *i*-DReC を用いることにより検量線範囲を拡張しました。この時、寄与率 (R^2) は 0.999 以上となり、各検量点における誤差も 5 % 未満でした。

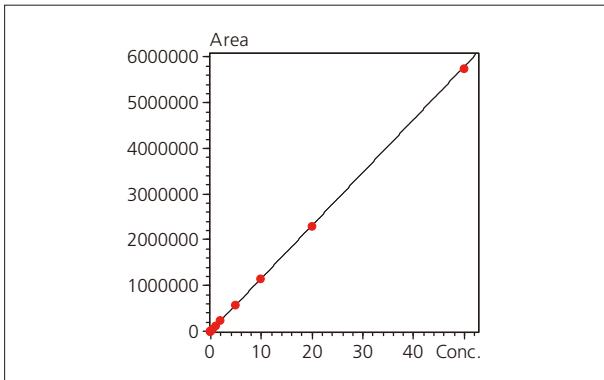


Fig. 2 ケトプロフェンの直線性 (0.01 ~ 50 mg/L)
Linearity of Ketoprofen (0.01-50 mg/L)

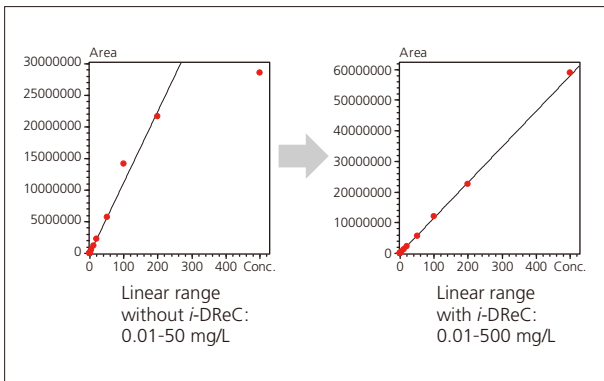


Fig. 3 *i*-DReC による検量線補正 (0.01 ~ 500 mg/L)
Linearity Correction by *i*-DReC (0.01-500 mg/L)

■不純物分析

Impurity Analysis

Fig. 4 にケトプロフェン 500 mg/L のクロマトグラムを示します。ケトプロフェンのピーク強度は 4AU を超えて信号が飽和していますが、*i*-DReC 機能を適用すれば直線性を保った補正面積値が自動算出されます。このため、その試料中に含まれる不純物の含有率が面積百分率法で直接的に算出できます。Fig. 4 のピーク頂上に、その数値を表示しました。0.001 % 付近の極微量の不純物も良好に検出できたことがわかります。

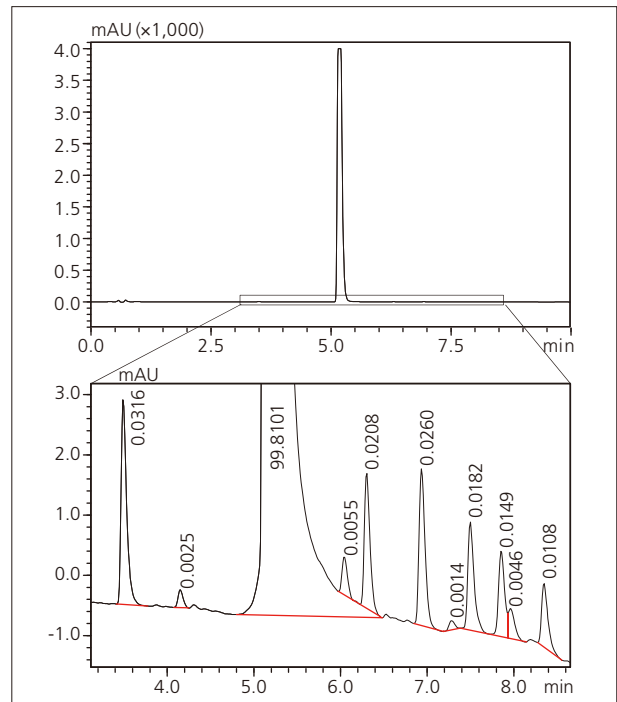


Fig. 4 ケトプロフェン 500 mg/L 標準溶液のクロマトグラム
Chromatogram of 500 mg/L Ketoprofen Standard Solution

■キャリーオーバーの確認

Carryover Test

広い直線性を保つためには、キャリーオーバーの抑制も重要です。キャリーオーバーが大きくなると低濃度領域の定量性が悪化するためです。Fig. 5 にケトプロフェンのキャリーオーバーの確認を行った結果を示します。検量線の最低濃度の標準溶液 (0.01 mg/L), 最高濃度の標準溶液 (500 mg/L), ブランクの順に注入了。Nexera X2 シリーズのオートサンブラ SIL-30AC に搭載された機能であるニードル内外洗浄を行うことにより、キャリーオーバーを完全に抑制することができました。

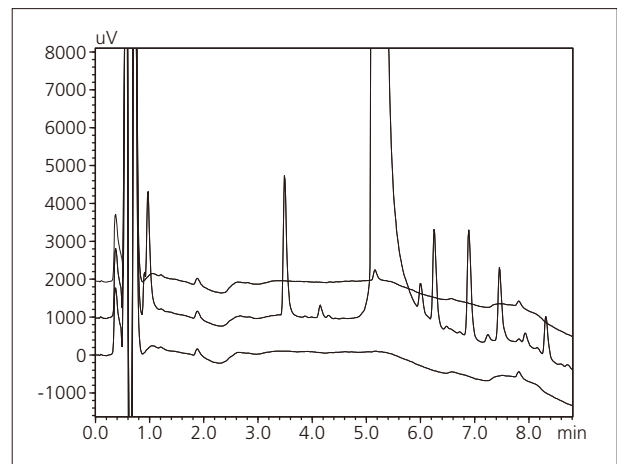


Fig. 5 ケトプロフェンのキャリーオーバー試験
(上段: 0.01 mg/L, 中段: 500 mg/L, 下段: ブランク)
Ketoprofen Carryover Test
(Upper: 0.01 mg/L, Middle: 500 mg/L, Lower: Blank)