

主成分に潜んだ不純物も検出！ LC-PDA 検出器を使った未分離ピークの解析手法のご紹介

株式会社島津製作所 分析計測事業部

Contents

1. はじめに
2. LC-PDA システムと計量化学（ケモメトリクス）の融合
3. 高精度フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M40
4. 計量化学（ケモメトリクス）技術を用いたピークの分離
5. LabSolutions の新しいデータ解析手法 i-PDeA II
6. 適用事例
 - 複数添加物の同時分析によるスループットの向上
 - ピークの裾野に溶出する目的成分の定量精度の向上
 - 主成分ピークに隠れた不純物の検出と定量
 - 3成分以上の混合ピークへの適用例
 - 分離スペクトルを用いたライブラリ検索
7. まとめ

SHIMADZU

1. はじめに HPLC メソッド開発／波形処理における課題

日々の分析業務において、このような経験はありませんか？

👤 メソッド開発時のピーク分離のトレードオフ

分析条件をどのように設定しても...

前半のピークを分離する分析条件にすると後半が分離されない

後半のピークを分離する分析条件にすると前半が分離されない

👤 主ピークの裾野に溶出する不純物ピークの定量

波形処理をどのように設定しても...

テーリング処理 ⇒ 過小評価

垂直分割 ⇒ 過大評価

3

SHIMADZU

2. LC-PDA システムと計量化学 (ケモメトリクス) の融合

計量化学 (ケモメトリクス) 技術により未分離ピークを分離します。

優れた直線性・再現性

LC-PDA システム
(フォトダイオードアレイ検出器)

👤 未分離ピーク

クロマトグラム

スペクトル

👤 ケモメトリクスで分離

クロマトグラム

スペクトル

計量化学
ケモメトリクス

4

SHIMADZU

3. 高精度フォトダイオードアレイ検出器 Nexera series with SPD-M40

従来、希釈率を変更して複数試料の分析を行っていた主成分と微量不純物の分析において
広いダイナミックレンジにより同時分析を実現

直線性 吸光度の直線を決める要素 上限…迷光が支配的 下限…検出器レスポンスのノイズ
⇒ SPD-M40 ではこれらが改善

ノイズの改善

$R^2=0.9998$

迷光の影響

再現性 Nexera series の優れたパフォーマンスにより、良好な再現性を実現

含有率が、0.1% 程度の不純物成分ピークの面積値において良好な再現性が得られた例
変動係数(%RSD)が1%以下

ケトプロフェン分析のクロマトグラム

各成分の分析結果

No.	Compounds	Retention time (min)	Area (%)	Area (%RSD)
1	Ketoprofen	2.583	99.704	0.001
2	Impurity 1	1.998	0.126	0.598
3	Impurity 2	3.072	0.075	0.543
4	Impurity 3	3.186	0.046	1.115

C190-0487A Technical Report フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M40による直線性と定量性の向上 5

SHIMADZU

4. 計量化学（ケモメトリクス）技術を用いた ピーク分離

MCR-ALS 法をフォトダイオードアレイ（PDA）検出器データに適用
(MCR-ALS : Multivariate Curve Resolution Alternating Least Squares)

測定データ **クロマトグラム** **スペクトル**

測定データ = クロマトグラム × スペクトル

未分離のピークから目的ピークを抽出

$c_1(t)s_1(\lambda)$

$c_2(t)s_2(\lambda)$

$c_3(t)s_3(\lambda)$

6

SHIMADZU

5. LabSolutions の新しいデータ解析手法 i-PDeA II (デコンボリューション)

- 時間・波長の範囲を設定するだけで未分離ピークを分離
- 微量成分補正により微量成分の定量精度を向上

測定

装置トラブル?
それとも不純物?

ピーク
形状確認

未分離の成分が
無いか確認

ピュリティー
解析
ピュリティー曲線
ピュリティー曲線
不純物の存在を示唆

デコンボリュ
ーション

隠れていたピーク
目的ピーク1
デコンボリューション後の
クロマトグラム
隠れていたスペクトルの抽出
デコンボリューション後のスペクトル

高精度分離
モード適用

デコンボリューション後の
クロマトグラム
— 純品
— 微量成分
デコンボリューション後のスペクトル

微量成分補正モード適用で
微量成分の定量精度向上

7

SHIMADZU

6. 適用事例

① 複数添加物の同時分析によるスループットの向上

ケース GPC 分析 (RID 検出器 / PDA 検出器)
ポリスチレン試料および試料中の複数の添加剤の同時分析

課題 排除限界の小さなカラムを使っても、低分子の添加剤相互の完全分離は難しく、Polystyrene 以外の添加剤のうち 2 つが分離できない

Tinuvin 144 Irganox 1010 Tinuvin 120

i-PDeA II で添加剤 3 つ全てについてピークを分離・定量

RID 検出器のクロマトグラム

PDA 検出器のクロマトグラム

2つのピーク

デコンボリューション

3つのピークに分離

デコンボリューション後のクロマトグラム

検量線を用いた定量計算

検量線の直線性 (n = 6)

Additive	Irganox 1010	Tinuvin 144	Tinuvin 120
Linearity of calibration curve (r ²)	0.999	0.995	0.998
Determined content (mg/g)	49.2	23.1	27.4
%RSD	1.28	1.93	1.47

Application News No.L537 Nexera™ GPC システムによるスループット向上～オーバーラップインジェクションと複数添加剤の同時分析～

8

SHIMADZU

6. 適用事例

② ピークの裾野に溶出する目的成分の定量精度の向上

ケース 主ピーク (VP) の裾野に溶出する目的成分 (OXAZEPAM) の分析
 課題 ピークの裾野に溶出する目的成分の定量を行いたいが、通常の波形処理では、Over estimate もしくは、Under estimate になる

濃度比 VP:OXAZEPAM 100:0.05
 分離度 1.2
 スペクトル類似度 (215 - 300 nm) 0.82

純品の目的成分OXAZEPAMの面積値との誤差

波形処理	誤差 (%)
テーリング処理	- 80 %
垂直分割	+ 35 %
デコンボリューション	- 4 %

i-PDeA II で分離したピークを用いることで定量精度が向上

テリング処理 ⇒ 過小評価
 垂直分割 ⇒ 過大評価

分離後のクロマトグラム

分離後スペクトルと純品の比較

VP: スペクトル類似度 = 1.00
 OXAZEPAM: スペクトル類似度 = 0.98

9

SHIMADZU

6. 適用事例

③ 主成分ピークに隠れた不純物の検出と定量

ケース 主成分ピーク (DFBP) に隠れた 微小な不純物ピーク (VP) の分析
 課題 主成分ピークに隠れており、不純物の検出・定量ができない

濃度比 DFBP:VP 100:0.05
 分離度 0.6
 スペクトル類似度 (215 - 300 nm) 0.74

純品の目的成分VPの面積値との誤差 (n = 6)

分離度	誤差平均 (%)	%RSD
0.6	3.1	13.0
0.8	-2.2	10.6
1.0	-9.9	9.5

i-PDeA II で隠れた不純物ピークを分離・定量

混合試料のクロマトグラム
 不純物 (VP) 純品のクロマトグラム

デコンボリューション

分離後のクロマトグラム
 分離後スペクトルと純品の比較

DFBP: シフルオロベンゾフェノン
 VP: ハレロフェノン

DFBP: スペクトル類似度 = 1.00
 VP: スペクトル類似度 = 0.99

主成分との濃度比100:0.05、
 分離度0.6のピーク面積を
 誤差10%以内で推定

10

SHIMADZU

6. 適用事例

④ 3成分以上の混合ピークへの適用例

ケース 3成分以上の混合ピーク (o-MAP, p-MAP, m-MAP)

課題 主成分ピークに隠れており、不純物の検出・定量ができない

i-PDeA II で隠れた不純物ピークを分離・定量

混合試料のクロマトグラム

↓ デコンボリューション

分離後のクロマトグラム

分離後スペクトルと純品の比較

o-methylacetophenone (o-MAP) p-methylacetophenone (p-MAP) m-methylacetophenone (m-MAP)

濃度比	o:p:m 100:1:100		
スペクトル類似度 (210 - 320 nm)	o:p	p:m	o:m
分離度	0.83	0.84	—

純品の各成分の面積値との誤差、
スペクトル類似度 (n = 3)

成分	誤差平均 (%)	類似度
o-MAP	-0.50	1.00
p-MAP	-3.71	1.00
m-MAP	-0.08	1.00

Arase, Shuntaro, et al. "Intelligent peak deconvolution through in-depth study of the data matrix from liquid chromatography coupled with a photo-diode array detector applied to pharmaceutical analysis." *Journal of Chromatography A* 1469 (2016): 35-47.

SHIMADZU

6. 適用事例

⑤ 分離スペクトルを用いたライブラリ検索

ケース p-methyl acetophenone (p-MAP) 標準品の純度測定

課題 不純物が含まれている結果が得られたが、不純物を推定したい

i-PDeA II で隠れた不純物ピークを分離し、分離スペクトルを用いてライブラリ検索

隠れたピークを分離

p-methylacetophenone (p-MAP) m-methylacetophenone (m-MAP)

↓ デコンボリューション

分離後スペクトルで [ライブラリ検索] を実施する → m-MAP と推定

Technical Report C191-0078 フォトダイオードアレイ検出器の新しいデータ解析手法 i-PDeA II の原理と概要
Arase, Shuntaro, et al. "Intelligent peak deconvolution through in-depth study of the data matrix from liquid chromatography coupled with a photo-diode array detector applied to pharmaceutical analysis." *Journal of Chromatography A* 1469 (2016): 35-47.

7. まとめ



ANALYTICAL INTELLIGENCE

計量化学（ケモメトリクス）のMCR-ALS法をPDA検出器データに適用し、未分離ピークから目的ピークを抽出するデータ解析手法（i-PDeA II）を開発。

- LC-PDAシステムと計量化学（ケモメトリクス）を融合
- カラムで完全分離しなくても、ピーク分離が可能
- 微量成分補正により微量成分の定量精度を向上
- 同じ分子量を有する異性体の分析にも適用可能
- 分離後のデータに対するスペクトル解析も可能

LabSolutionsで分析業務の効率化とデータの信頼性を向上