

# Technical Report

## フォトダイオードアレイ検出器の新しい分析手法i-PDeA (Intelligent Peak Deconvolution Analysis)の原理と概要

A new data processing method for photo diode array detector  
Principle and summary of i-PDeA (Intelligent Peak Deconvolution Analysis)

柳沢 年伸<sup>1</sup>

### Abstract:

未分離のピークであっても、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であるi-PDeA (Intelligent Peak Deconvolution Analysis) を用いれば、スペクトルの差異を利用して目的ピークを抽出することができます。i-PDeAは、測定される各時点でのUV-VIS吸収スペクトルに微分処理を施して得られた微分スペクトルの特定の波長の値を時間方向にプロットする微分スペクトルクロマトグラム法を利用することにより、共溶出ピークを分離します。

i-PDeA機能により、微分スペクトルクロマトグラム法の高選択性を利用して、予期しない不純物の混在を検知したり、同時に溶出する妨害成分の影響を除去し目的成分のみを定量する適用事例をご紹介します。

**Keywords:** PDAデータ処理、ピークデコンボリューション、微分スペクトルクロマトグラム法、Nexera X2、UHPLC

## 1. 微分スペクトルクロマトグラム法の基礎理論

### 1-1. 二成分の共溶出ピークの分離

Fig. 1は二成分(目的成分xとy)の吸収スペクトル、Fig. 2はこれらを波長方向に微分した微分スペクトルを表します。Fig. 2において成分xの微分スペクトルで微分値が0となる波長を $\lambda_x$ 、成分yの微分スペクトルで微分値が0となる波長を $\lambda_y$ とします。

目的成分xのスペクトルを $s_x(\lambda)$ 、ピークプロファイルを $p_x(t)$ 、同様に成分yのスペクトルを $s_y(\lambda)$ 、溶出プロファイルを $p_y(t)$ とすると、成分xとyが共に溶出している二成分系での3次元クロマトグラム $S(t, \lambda)$ は、

$$S(t, \lambda) = p_x(t)s_x(\lambda) + p_y(t)s_y(\lambda)$$

と表すことができます。これを波長 $\lambda$ で偏微分すると、波長 $\lambda_d$ での微分スペクトルクロマトグラムは

$$\left. \frac{\partial S}{\partial \lambda} \right|_{\lambda=\lambda_d}(t) = p_x(t)s_x'(\lambda_d) + p_y(t)s_y'(\lambda_d)$$

となります。成分xの微分値が0となる波長 $\lambda_x$ での微分スペクトルクロマトグラムは

$$s_x'(\lambda_x) = 0$$

より

$$\left. \frac{\partial S}{\partial \lambda} \right|_{\lambda=\lambda_x}(t) = p_y(t)s_y'(\lambda_x) \quad \text{式①}$$

となります。同様に、成分yの微分値が0となる波長 $\lambda_y$ での微分スペクトルクロマトグラムは、

$$s_y'(\lambda_y) = 0$$

より

$$\left. \frac{\partial S}{\partial \lambda} \right|_{\lambda=\lambda_y}(t) = p_x(t)s_x'(\lambda_y) \quad \text{式②}$$

となります。

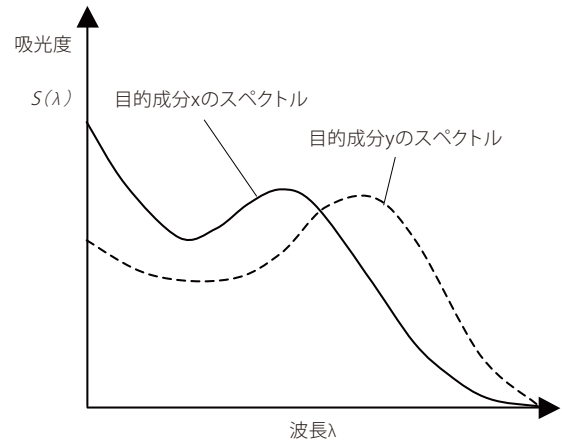


Fig. 1 二成分のスペクトル

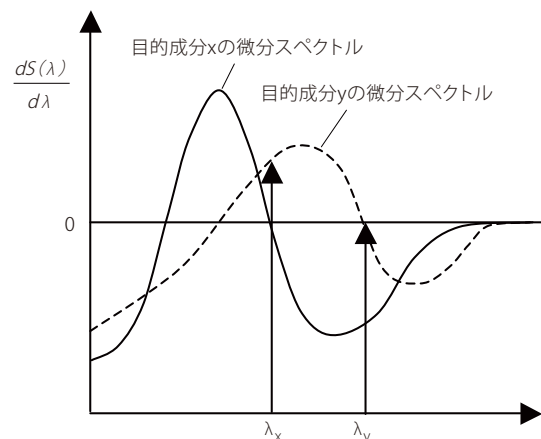


Fig. 2 二成分の微分スペクトル

式①、式②において、 $s_x'(\lambda_y)$ 、 $s_y'(\lambda_x)$ は0でない定数であるため、波長 $\lambda_x$ での微分スペクトルクロマトグラムは、成分 $y$ だけの溶出プロファイルを示し、波長 $\lambda_y$ での微分スペクトルクロマトグラムは、成分 $x$ だけの溶出プロファイルを示すことができます。

これにより、波長 $\lambda_x$ での微分スペクトルクロマトグラムから、 $y$ 成分だけを分離することができ、また波長 $\lambda_y$ での微分スペクトルクロマトグラムから、 $x$ 成分だけを分離することができます。

## 1-2. 不純物の検出

i-PDeAを用いることで、主成分以外の不純物が存在するかどうかを検知することができます。この手法は、主成分は一種類であり、他の成分が不純物として混在している試料を対象としています。このとき、主成分の溶出プロファイル $p_x(t)$ 、各不純物の溶出プロファイルを $p_y(t)$ 、 $p_z(t)$ …とし、主成分のスペクトルを $s_x(\lambda)$ 、各不純物のスペクトルを $s_y(\lambda)$ 、 $s_z(\lambda)$ …とすると、3次元クロマトグラム $S(t, \lambda)$ は、以下のように表すことができます。

$$S(t, \lambda) = p_x(t)s_x(\lambda) + p_y(t)s_y(\lambda) + p_z(t)s_z(\lambda) \dots$$

主成分の微分スペクトル $s_x'(\lambda)$ の値が0となる波長 $\lambda_x$ での微分スペクトルクロマトグラムは、

$$\left. \frac{\partial S}{\partial \lambda} \right|_{\lambda=\lambda_x}(t) = p_y(t)s_y'(\lambda_x) + p_z(t)s_z'(\lambda_x) + \dots$$

となります。波長 $\lambda_x$ での微分スペクトルクロマトグラムでは、主成分による溶出プロファイルは除去され、主成分以外の不純物の溶出プロファイルが現れます。

## 2. i-PDeA機能の解析例

### 2-1. 標準試料中の不純物の検出

メチルナフタレン（以降MNと表記）の標品に含まれている不純物を微分スペクトルクロマトグラム法により検出した事例を示します。

#### 分析条件

ポンプ	: 島津製作所製 LC-30AD×2
検出器	: 島津製作所製 SPD-M30A
カラムオープン	: 島津製作所製 CTO-20AC
コントローラ	: 島津製作所製 CBM-20A
オートサンプラ	: 島津製作所製 SIL-30ACMP
カラムの種類	: 島津製作所製 Shim-pack XR-ODS (30 mm L. × 3.0 mm i.d., 2.2 μm)
移動相の流量	: 1 mL/min
オープン温度	: 40 °C
サンプリング	: 80 msec
スリット幅	: 1 nm
時定数	: 240 msec
採取波長範囲	: 190 nm~700 nm
試料注入量	: 1 μL

Fig. 3は、複数の移動相条件で分析を行った、波長235 nmにおけるMNのピーク付近の吸収クロマトグラムとMNの一次微分ゼロ波長における微分スペクトルクロマトグラムをプロットしています。

(a)は、MNと不純物ピークが重なっていても、i-PDeAで不純物が検出されています。

(b)では、不純物がMNのピークよりやや分離された状態で出現しています。2つのピーク頂点のスペクトル形状の比較により、MNと不純物が異なる物質であることが確認できます。

(c)では、不純物がMNと完全に分離して出現しています。MNのピーク付近における微分スペクトルクロマトグラムでは、ノイズ以上の信号が検出されていないことから、このMNのピークには不純物が含まれていないことがわかります。このように、主成分と不純物のピークが完全に重なってしまい、通常のクロマトグラムでは不純物の存在が確かめにくいデータに対しても、i-PDeAによって不純物を検出することができます。

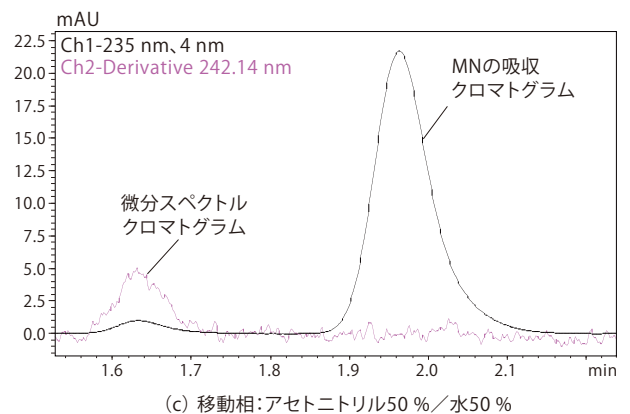
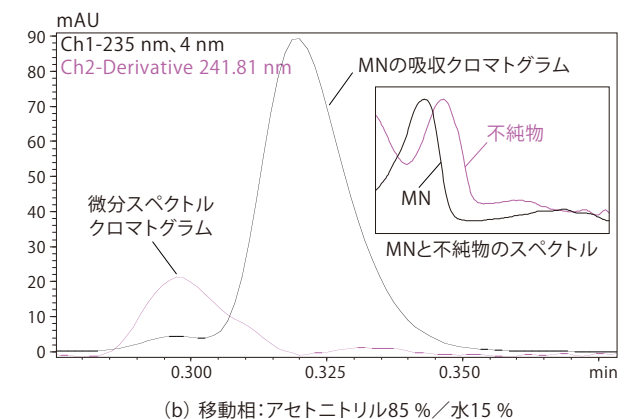
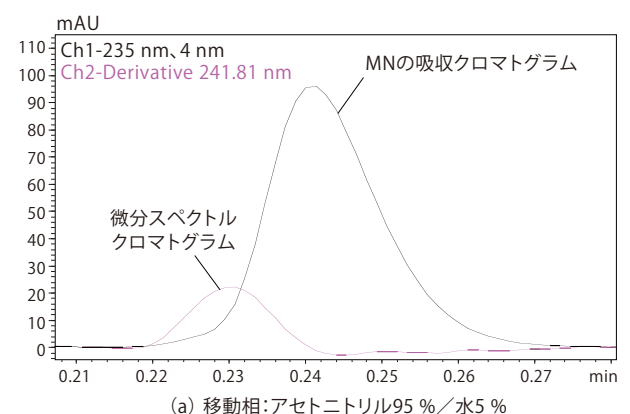


Fig. 3 吸収クロマトグラムとMNを除去した微分スペクトルクロマトグラム

## 2-2. 二成分の混合物の定量

二成分の混合試料を、ピークが未分離となる条件で取得したデータについて、微分スペクトルクロマトグラム法によりピークを分離して定量した事例を示します。

ジフルオロベンゾフェノン(以降DFBPと表記)の標品、バレロフェノン(以降VPと表記)の標品、およびDFBPとVPの相対濃度100/1、100/10、100/50、100/100、100/200の5種類の混合試料を用意して、DFBPとVPの微分スペクトルクロマトグラムを求め、標品による検量線を作成し(Table 1)、混合試料の定量(Table 2、Table 3)を行いました。

### 分析条件

ポンプ : 島津製作所製 LC-30AD×2  
 検出器 : 島津製作所製 SPD-M30A  
 カラムオープン : 島津製作所製 CTO-20AC  
 コントローラ : 島津製作所製 CBM-20A  
 オートサンプラ : 島津製作所製 SIL-30ACMP  
 移動相 : アセトニトリル45% / 水55%  
 カラムの種類 : 島津製作所製 Shim-pack XR-C8  
 (50 mm L. × 3.0 mm i.d., 2.2 μm)  
 移動相の流量 : 2 mL/min  
 オープン温度 : 40 °C  
 サンプリング : 80 msec  
 スリット幅 : 1 nm  
 時定数 : 240 msec  
 採取波長範囲 : 190 nm~700 nm  
 試料注入量 : 1 μL

Fig. 5は、混合試料(DFBP/VP=100/200)の波長210 nmにおける吸収クロマトグラムと、波長255.93 nm(DFBPの一次微分ゼロ波長)と波長216.93 nm(VPの一次微分ゼロ波長)における微分スペクトルクロマトグラムをプロットしたものです。

Fig. 6は、混合試料(DFBP/VP=100/1)の波長210 nmにおける吸収クロマトグラムをプロットしています。通常の吸収クロマトグラムでは、VPの濃度が低いため、DFBPのピークに埋没してしまい、VPピークを確認することができません。Fig. 6の楕円内にi-PDeA機能を用いて分離したDFBPとVPの微分スペクトルクロマトグラムを重ねた波形を表示しています。

混合試料(DFBP/VP=100/1)のVPの定量結果は、VP標品の微分スペクトルクロマトグラムで作成した検量線からVPの濃度1.023(誤差2.30%)が得られました。

同様に、DFBP標品の微分スペクトルクロマトグラムを用いて作成した検量線から求めた、各混合試料のDFBPの定量結果をTable 3に示します。この結果から試料注入量1 μLにおけるDFBPの面積再現性<1 %RSD、濃度誤差<3%が得られました。

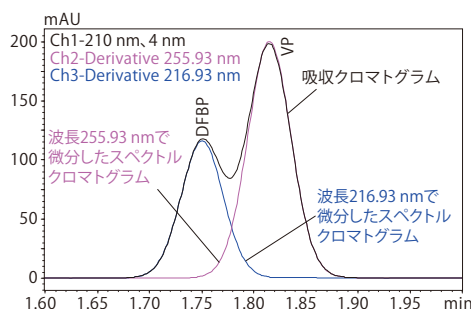


Fig. 5 混合試料(DFBP/VP=100/200)のデータでのピーク分離

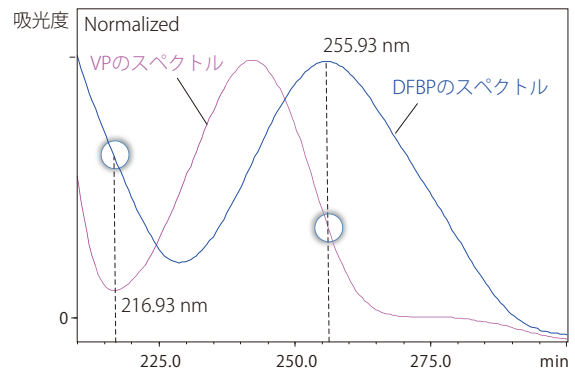


Fig. 4 DFBPとVPのスペクトルの比較

Table 1 VP標品試料の微分スペクトルクロマトグラムによる検量線の作成 ( $R^2=0.9999309$ )

サンプルの相対濃度 (VP)	保持時間 (min)	面積	濃度	誤差%
1	1.804	2,984	0.964	-3.62
10	1.801	30,368	9.876	-1.24
50	1.804	151,922	49.439	-1.12
100	1.802	310,801	101.149	1.15
200	1.802	613,207	199.572	-0.21

Table 2 DFBP/VP混合試料におけるVPの定量結果

サンプルの相対濃度 (DFBP/VP)	保持時間 (min)	面積	濃度	誤差%
100/1	1.808	3,167	1.023	2.30
100/10	1.807	30,372	9.878	-1.22
100/50	1.802	153,206	49.856	-0.29
100/100	1.806	309,596	100.757	0.76
100/200	1.815	620,556	201.964	0.98

Table 3 DFBP/VP混合試料におけるDFBPの定量結果

サンプルの相対濃度 (DFBP/VP)	保持時間 (min)	面積	濃度	誤差%
100/1	1.746	359,670	102.225	2.23
100/10	1.742	357,969	101.741	1.74
100/50	1.737	357,497	101.607	1.61
100/100	1.742	357,891	101.719	1.72
100/200	1.751	351,528	99.911	-0.09

面積 %RSD=0.87 (試料注入量1 μL)

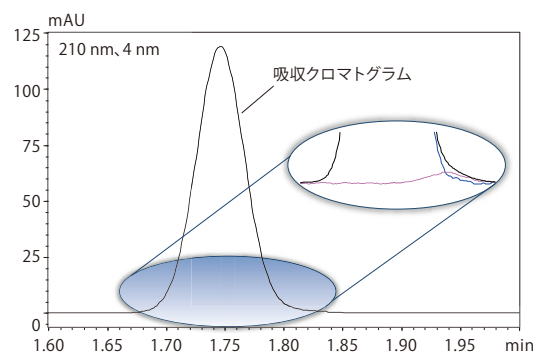


Fig. 6 混合試料(DFBP/VP=100/1)のデータの吸収クロマトグラム

### 3. i-PDeA機能適用の要点

i-PDeA機能は、フォトダイオードアレイ検出器のデータ解析メソッドに設定します。分析手法が確定すれば、ルーチン分析への適用が可能となります。i-PDeA機能適用の要点を以下に示します。

1. 目的ピークのスペクトルの一次微分ゼロの波長を検出するスペクトルの微分はSavitzky-Golay法により行い、スプライン補間を用いて微分値が0となる波長を探します。

	波長	スペクトル#1 一次微分	スペクトル#2 一次微分
1	216.93	-5.394	0
2	228.92	0	14.771
3	242.18	4.656	0
4	255.93	0	-17.954

ピーク分離を行う場合には、一方の成分の一次微分ゼロの波長で他方の成分の一次微分値の絶対値が十分に大きい必要があります。成分間のスペクトル形状が互いに類似している場合には、i-PDeA機能は適用できません。

2. 微分スペクトルクロマトグラム(一次微分ゼロ波長の微分スペクトルの値を時間方向にプロットしたクロマトグラム)を抽出するため、マルチクロマトグラムの設定で「微分」を選択し、一次微分ゼロの波長を小数点第2位まで設定します。

波長の設定

クロマトグラムの種類

吸光度(A)  微分(D)

MaxPlot(M)

平均(V)

波長(W) 係数(F) ポラリティ(P)

216.93 nm 21.63 -

微分スペクトルクロマトグラムは、スペクトルの立ち上がりではプラスに、立下りではマイナスの値となるため、ポラリティと係数を設定してピークの方角と大きさを調整します。

3. 微分スペクトルクロマトグラムの波形処理と定量パラメータを設定します。

微分スペクトルクロマトグラムは、他のマルチクロマトグラムと同様に扱うことができたため、分離後のクロマトグラムデータに対して、通常の定量計算機能をそのまま適用することができます。シンプルなメソッド設定により、定量計算も可能です。

### 4. 結論

フォトダイオードアレイ検出器SPD-M30Aの基本性能の高さとNexera X2システムの優れた再現性により、カラム以外の手段でピークを分離する分析手法が、実用可能となりました。

i-PDeA機能は、分析の高速化とラボの生産性向上に役立てることが出来ます。キーポイントは以下の通りです。

- ・微分スペクトルクロマトグラム法を活用して、共溶出ピークを分離
- ・カラムで完全分離しなくても高速で正確な定量が可能
- ・目的成分ピーク中に潜む不純物ピークを検出
- ・未分離ピークあるいは分離不十分なピークをリアルタイムに処理して視覚的に表示
- ・シンプルなメソッド設定で定量計算も可能

i-PDeAは、従来手法にはないピーク分離や不純物検知に対する新しいソリューションを提供します。これらの特長を活用することにより、分析業務の更なる効率化とデータの信頼性の向上が期待されます。

#### 参考文献

- 1) A. Lober, *Anal. Chim. Acta*, 164, 293-297 (1984)
- 2) B. Kowalski *et al.*, *Anal. Chem.*, 58, 496-499 (1986)
- 3) T. Ryan *et al.*, *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (7), 1545-1560 (1993)
- 4) B. Vandeginse *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 173, 153-164 (1985)
- 5) M. Maeder *et al.*, *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, 3, 205-213 (1988)
- 6) I. Sakuma *et al.*, *J. Of Chromatog.*, 506, 223-243 (1990)
- 7) A. Yamamoto *et al.*, *Analyst*, 120, 377-380 (1995)
- 8) T. Hakuta *et al.*, *ANALYTICAL SCIENCE*, 25, 1149-1153 (2009)
- 9) K. Uchiyama *et al.*, *J. Sep. Sci.*, 34, 1525-1530 (2011)
- 10) 葛原茂彦、農林水産消費技術センター調査研究報告、23、77-86 (1999)
- 11) K. Uchiyama *et al.*, *BUNSEKI KAGAKU*, 60 (2), 171-174 (2011)
- 12) S. Kodama *et al.*, *BUNSEKI KAGAKU*, 45 (3), 259-263 (1996)

株式会社 島津製作所  
分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2013年2月  
© Shimadzu Corporation, 2013