

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-DReC (Intelligent Dynamic Range Extension Calculator)の原理と概要

A new data processing method for photo diode array detector
Principle and summary of i-DReC (Intelligent Dynamic Range Extension Calculator)

柳沢 年伸¹

Abstract:

高濃度な試料の分析でも、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ダイナミックレンジ拡張計算機能i-DReC (Intelligent Dynamic Range Extension Calculator)を用いれば、検出器の信号が飽和する濃度領域でも、スペクトルの相似性を利用して、ピークの面積や高さを自動的に求めることができます。

i-DReCは、PDA検出器データのピーク強度が既定のしきい値を超えた場合、吸収の少ない波長に自動的にシフトして得られたクロマトグラムでピーク面積や高さを求め、スペクトルデータから波長間の感度比を補正して、目的波長のピーク面積や高さを計算します。

i-DReCは、ダイナミックレンジを飛躍的に拡張する新たな解析手法です。従来は希釈をしなければならなかったような高濃度試料についても、希釈をすることなく分析を行い、正しい定量値を得ることができます。

Keywords: PDAデータ処理、ダイナミックレンジ拡張、Nexera X2、UHPLC

1. ダイナミックレンジ拡張計算機能 (i-DReC) の基本原理

高濃度な試料の分析を行った場合、クロマトグラムのピークが検出器の測定上限値を超えてしまい、ピークの正しい面積値が得られないことがあります。

i-DReCでは、吸収の少ない波長でクロマトグラムを切り出して求めたピーク面積(高さ)に、ピークの裾野で切り出したスペクトルから計算した感度係数をかけることにより、対象ピーク的面積(高さ)を求めます。

■計算アルゴリズム

1. 対象ピークの保持時間の強度値を取得し、強度値が「しきい値」を超えるかどうか判定します。
2. 「しきい値」を超える場合に、i-DReCを適用します。i-DReCで補正する波長の探索は、補正波長を自動設定する方法とスペクトル形状の特長を利用してシフト先の波長λbを手動設定する方法があります。自動設定処理では、次の方法で補正波長λbを求めます。
 - ・補正対象ピークの保持時間でのスペクトルを取得します。
 - ・このスペクトルについて、対象波長であるλaの+側(長波長側)または-側(短波長側)で、強度値が「補正波長(自動)強度」となる波長λbを探索します。
3. 補正波長λbでクロマトグラムを切り出し、波形処理を実行します。シフト先のクロマトグラムのピークから、補正対象ピークに対応したピークを探索します。このピークの「ピーク面積・ピーク高さ」を補正用データとします。
4. 対象ピークの保持時間の後の時間で、強度値が「感度補正スペクトル抽出強度」となる時間のスペクトルを抽出します。
5. このスペクトルの波長λaの強度Iaと補正波長λbの強度Ibの比(感度係数)kを求めます。

$$k = I_a / I_b$$

6. 補正波長λbで切り出したクロマトグラムのピーク面積(高さ)に感度係数を乗じて、対象ピーク的面積(高さ)を算定します。
 ピーク面積 = (補正波長のピーク面積) × k
 ピーク高さ = (補正波長のピーク高さ) × k

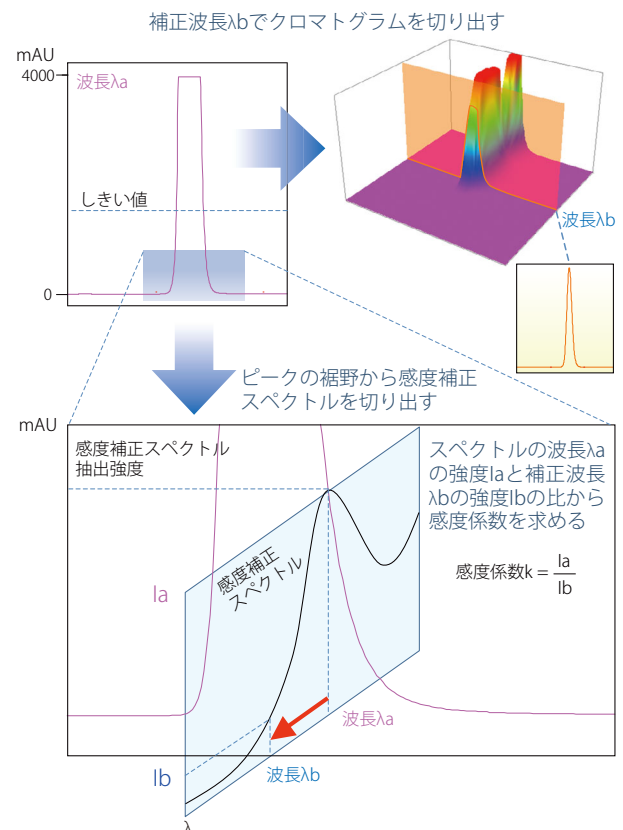


Fig. 1 i-DReCの基本原理

2. i-DReC機能の適用例

2-1. ダイナミックレンジの拡張

高濃度の試料を用いて検量線を作成した事例をご紹介します。
0.01 g/Lから10 g/Lの濃度のローダミン標準試料を準備し、次の条件でデータを採取しました。

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-20Alite
 オートサンブラ : 島津製作所製 SIL-30AC
 移動相 : 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液 45 % / ACN 55 %
 カラムの種類 : 島津製作所製 Shim-pack VP-ODS
 (4.6 mm L. × 150 mm i.d., 5.0 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 : 80 msec
 採取波長範囲 : 190 nm~700 nm
 セル光路長 : 10 mm
 試料注入量 : 2 μL

Fig. 2に、ローダミンのスペクトルを示します。

最大吸収波長554 nmで切り出したクロマトグラムを用いて作成した検量線をFig. 3(a)に示します。この図から濃度1 g/L付近(約3AU)で、既に検量点が直線からずれていることが判ります。

Fig. 3(b)は、i-DReCによる自動補正機能を用いて、ダイナミックレンジを拡張した後の検量線です。ここでは、補正波長として極大波長347 nmを手動設定し、強度値700 mAUで感度補正スペクトルを抽出して感度係数を求め、ダイナミックレンジを拡張しています。Table 1の結果から0.01 g/Lから10 g/Lの濃度範囲で、重み付けなしの相関係数Rは0.9999078、1/濃度²の重み付けをした場合には、0.9995750の直線性が得られます。

Fig. 3(c)は、1/濃度²の重み付け検量線を用いて逆推定した濃度の誤差%を示しています。すべての濃度範囲で、5%未満の結果が得られています。

このようにローダミンでは、高濃度で検量点が直線から大きくずれてしまった場合でも、i-DReCによってダイナミックレンジを約10倍まで拡張することができます。

Table 1 ローダミンの検量線情報

#	濃度 [g/L]	平均面積 [μAUsec] (n=2)	
		補正前	補正後
1	0.01	267,847	267,847
2	0.02	544,266	544,266
3	0.08	2,089,341	2,089,341
4	0.1	2,622,781	2,622,781
5	0.2	5,255,999	5,255,999
6	0.5	12,072,748	12,282,271
7	0.8	18,539,104	19,887,814
8	1	21,823,608	24,644,792
9	2	33,708,885	49,250,552
10	5	53,883,445	126,813,723
11	8	65,182,276	198,990,013
12	10	71,500,307	245,336,353

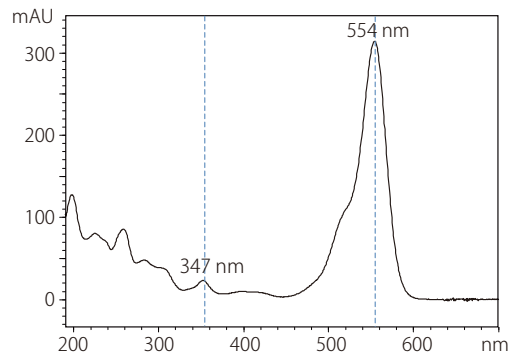
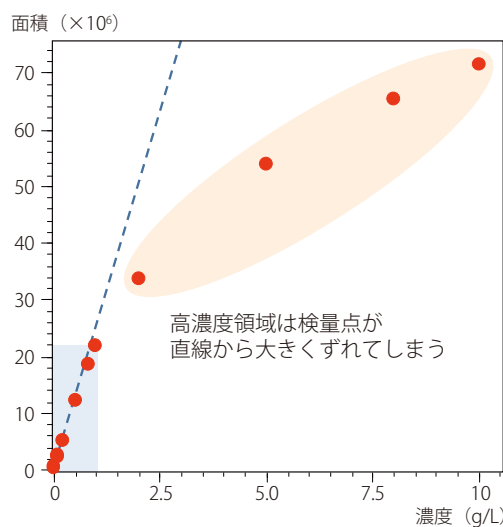
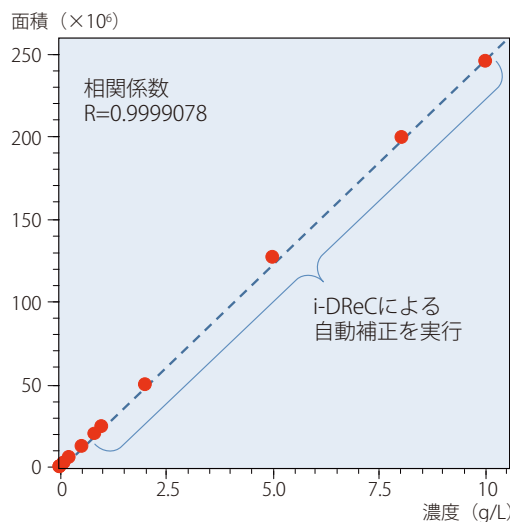


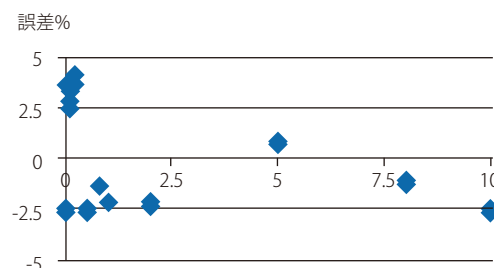
Fig. 2 ローダミンのスペクトル



(a) 554 nmのクロマトで検量線を作成



(b) i-DReCでダイナミックレンジを拡張



(c) 補正後の検量点の誤差%

Fig. 3 ローダミンの検量線

2-2. 混合成分の定量

医薬品に含まれる有効成分と不純物の同時定量を行った事例を示します。

医薬品をSPD-M30Aの高感度セルを用いて0.01 g/Lから1 g/Lの濃度範囲で測定し、波長250 nmで切り出したクロマトグラムから主成分の面積を求め検量線を作成したグラフをFig. 4に示します。

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-20Alite
オートサンプラ	: 島津製作所製 SIL-30AC
カラムの種類	: 島津製作所製 Shim-pack XR-ODS II (150 mm L. × 3.0 mm i.d., 2.2 μm)
移動相 A	: 5 % MeCN + 0.05 % TFA
移動相 B	: 95 % MeCN + 0.05 % TFA
タイムプログラム	: 2 % (0–1.2 min) → 2–98 % (1.2–8.9 min) → 98 % (8.9–10.8 min) → 98–2 % (10.8–11.1 min) → STOP (14 min)
移動相の流量	: 1 mL/min
オープン温度	: 40 °C
サンプリング	: 160 msec
スリット幅	: 8 nm
時定数	: 160 msec
採取波長範囲	: 190 nm~700 nm
セル光路長	: 85 mm
試料注入量	: 1 μL

Fig. 4 (a) から、通常の条件では0.5 g/L (約9AU相当)の濃度で検量点が直線から大きくずれていることが判ります。i-DReCを用いて、補正波長として280 nmを設定し、強度値200 mAUで感度補正スペクトルを抽出して感度係数を求め、ダイナミックレンジを拡張することにより、0.01 g/Lから1 g/Lの濃度範囲で1/濃度²の重み付けで相関係数R=0.9996726の直線性が得られます。

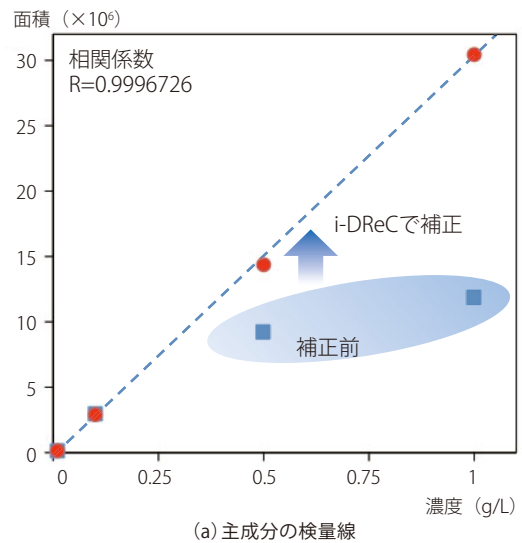
Fig. 4 (b) に示すように、1/濃度²の重み付け検量線を用いて逆推定した濃度の誤差率は4%以内となります。

この分析条件で、濃度1 g/Lの試料を6回分析し、主成分とその他のピーク的面積比%とn=6における面積再現性を測定した結果をTable 2に示します。Fig. 5は、この試料を測定したクロマトグラムの1例です。

主成分①のピークは、波長250 nmでは検出器で測定できる吸光度を超えてしまうため、i-DReCで面積値を補正しています。その他のピークは、検出器の直線性の範囲内(ピーク②で約600 mAU)にあるため、補正なしの条件で面積を求めます。

Table 2 医薬品混合成分の定量結果 (n=6)

ピーク	保持時間 [min]	平均面積 [μAUsec]	面積 %RSD	面積比 [%]
①Main	4.634	31,123,746	0.06	--
②	5.448	925,522	0.12	2.974
③	3.900	64,161	0.08	0.206
④	4.910	32,810	0.15	0.105
⑤	5.091	15,103	0.16	0.049
⑥	4.487	9,487	0.26	0.030
⑦	4.226	7,981	0.28	0.026
⑧	4.975	7,981	0.44	0.026
Imp1	4.056	2,001	0.27	0.006
Imp2	4.331	2,440	0.85	0.008
Imp3	4.376	1,663	0.65	0.005



(b) 補正後の検量点の誤差%

Fig. 4 直線性の確認

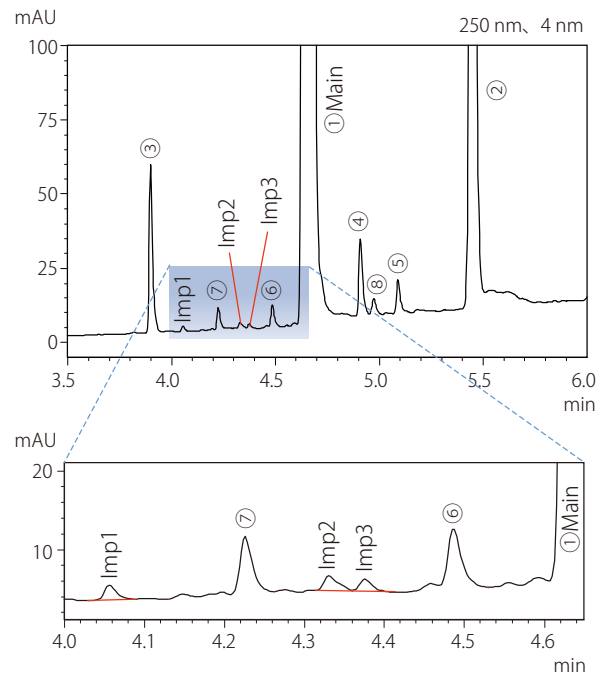


Fig. 5 医薬品混合成分のクロマトグラム

Tableの定量結果が示すように、i-DReCで補正した主成分の面積%RSDは0.06%の再現性となっています。

主成分との面積比が0.005%の不純物Imp3は、面積%RSD<1%の再現性が得られました。

3. i-DReC機能適用の要点

i-DReC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-DReC機能適用の要点を以下に示します。

1. PDAデータ解析メソッドのマルチクロマトグラムテーブルで、i-DReCの設定を行います。

パラメータ	内容
ダイナミックレンジの拡張	ダイナミックレンジ拡張機能のOn/Offを設定します。
しきい値	ダイナミックレンジ拡張機能を適用するピークとして判定する「しきい値」を設定します。ピークの保持時間の強度値がこの値を超えた場合に、補正処理を行います。
補正波長(手動/自動)	補正波長(補正処理のときに使用する波長)の設定方法を、選択します。
Ch#	補正波長を「手動」にしたとき、補正に使用するクロマトグラムとしてマルチクロマトグラムのCh#を設定します。
補正波長(自動)強度	補正波長を自動設定するとき使用する強度値を設定します。
移動方向(+/-)	補正波長を自動設定するとき、元の波長を基点として探索する方向(+:長波長側、-:短波長側)を指定します。
抽出する強度	感度補正スペクトルを対象ピークから抽出するときに使用する強度値を設定します。
バックグラウンド補正	感度補正スペクトルを抽出するときのバックグラウンド補正の有/無を設定します。

ダイナミックレンジを拡張できる濃度範囲は、スペクトルの形状によって異なります。補正波長は、強度指定により自動的に探索できますが、吸収極大波長付近などの変動が緩やかな波長を設定すると、より正確な補正を行うことができます。

2. i-DReCの適用と補正処理に用いた波長、感度補正スペクトルを抽出した時間、感度係数をピークテーブルや化合物テーブルに表示することができます。

項目	内容
マーク	ピークマークで、ダイナミックレンジ拡張処理に関する以下の情報を表示します。 C: ダイナミックレンジ拡張処理されたピーク E1~E4: ダイナミックレンジ拡張処理エラー
DRE波長	i-DReCを行ったピークの補正波長を表示します。
DRE係数	i-DReCを行ったピークの感度係数を表示します。
DRE時間	i-DReCを行ったピークの感度補正スペクトルを抽出した時間を表示します。

i-DReC機能は、スペクトル形状の相似性が維持されていることを前提としています。ピークの分離が不十分で隣り合うピークの影響が無視できない場合には、i-DReC機能を適用できないことがあります。

3. i-DReCで求めた面積や高さに対して、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、ルーチン分析にも使用可能です。

4. 結論

フォトダイオードアレイ検出器SPD-M30Aの基本性能とHPLC/UHPLCシステムの再現性の向上により、試料の再注入や再解析の手間にわずらわされることなく、高濃度な成分の面積や高さを求めることが可能となりました。

i-DReC機能は、試料の前処理工程の短縮化とラボの生産性向上に役立てることができ、

キーポイントは以下の通りです。

- スペクトル形状の相似性を利用してダイナミックレンジを拡張
- 1回の注入で低濃度から高濃度の成分を同時測定
- 1台のPDA検出器でダイナミックレンジを拡張
- 同一データ内でダイナミックレンジ拡張計算を行うため、標準試料を用いた校正は不要
- シンプルなメソッド設定でルーチン分析に適用

i-DReCは、1回の注入で低濃度から高濃度の成分の分析に適用することができるため、濃度差の大きい成分の同時定量が可能となります。

i-DReC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向上が期待されます。