

食品衛生基準科学研究費補助金(食品安全科学研究事業)
既存添加物の品質確保に資する分析法開発のための研究
(23KA1012)

令和7年度 研究分担報告書

分析法及び試験法の開発に関する研究

相対モル感度(RMS)を利用した定量法の検討

—検出器としてフォトダイオードアレイ(PDA)を用いた際の測定値ばらつきの原因—

研究分担者 増本直子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 第二室長

研究要旨

UV-Vis や PDA 検出器を用いた RMS 法では、基準物質と分析対象物質の測定波長が異なる場合、装置間差が大きくなるという課題がある。本研究では、PDA 検出器のスペクトル検出特性を調査するため、複数の装置を用いて、同一試料における吸光度を4つの検出波長にて測定し比較した。その結果、装置間の吸光度のズレは最大で15%ほどあり、そのズレ方は波長や装置によって異なっており一定ではないことなどが明らかとなった。また、光源ランプ種の切り替わりも装置間差への寄与が大きいことが示唆された。装置間差を小さくするための補正方法を検討し、装置間差に PDA 検出器における波長ごとの感度差が大きく寄与していることを示した。

研究協力者

中島 馨 国立医薬品食品衛生研究所
西崎 雄三 東洋大学食環境科学部 准教授

A. 研究目的

近年、標準物質の入手が困難な物質の定量において、代わりに他の物質を基準として設定(基準物質)し、それに対する分析対象物質の相対モル感度(relative molar sensitivity, RMS)を利用する定量法(以下、RMS法)が注目されている。我々はこれまでに食品添加物をはじめ、天然物由来製品に含まれる有効成分や機能性成分のRMS法を報告している。

RMS法での定量には、基準物質に対する分析対象のRMS値が必要である。通常、RMS値は定量NMR(^1H -qNMR)とHPLCなどのクロマトグラフィーを用い、分析対象物質と基準物質の正確な純度や応答値を求めたうえで算出する。

RMS法が採用可能な検出器としては、分析種の量とその応答量とに直線性があることが大前提として挙げられる。現在、最もRMS法

の報告が多いクロマトグラフィー及び検出器は、汎用性が高く、広いダイナミックレンジを有し良好な定量性を示すフォトダイオードアレイ(PDA)検出器及び紫外可視分光計(UV-Vis)の2種である。両検出器はともに Lambert-Beer の法則を基本原理としているが、検出器の光学系が異なっている。PDA 検出器は連続した UV スペクトルを測定可能であるという利点があるが、RMS法を両検出器に適用した際には、UV-Vis 検出器の方がわずかに装置間差が小さいというデータが報告されている(統計学的な有意差はない)¹⁾。

UV-Vis や PDA 検出器を RMS 法に適用する場合、RMS の算出には基準物質及び分析対象物質それぞれの吸収極大波長(λ_{max})における応答量を用いる。これは、とくに PDA 検出器ではスペクトル検出特性の装置間差の影響が無視できないと考えられるためである²⁾。さらに、可能であれば分析対象物質と同一の吸収極大波長(λ_{max})をもつ物質を基準物質とし、その波長における応答量を用いる方が装置間差が小さくなる。しかし、分析対象物質と同一

の $\lambda_{\max}$ をもつ基準物質を探すのは困難である。

本研究では、 $\lambda_{\max}$ が異なる基準物質を用いた精度の高い定量法を確立するため、装置間での RMS 値のばらつき、すなわち応答比のばらつきが大きくなる原因を探索することを目的とし、PDA 検出器の特性を調査した。

B. 研究方法

B-1) 試料及び試薬

「黄色 4 号 (国立衛研食品添加物部内管理番号：Y-4)」, 「赤色 2 号 (国立衛研食品添加物部内管理番号：R-2)」及び「青色 1 号 (国立衛研食品添加物部内管理番号：B-1)」は、日本食品添加物協会から入手した。カフェイン (国立衛研食品添加物部内管理番号：02-53a) は、Alfa Aesar 社のものを用いた。

試薬の溶解溶媒として、超純水を用いた。

B-2) 測定装置

表 1 に示す検出器 (HPLC 用) 及び分光光度計を本研究に用いた。なお、用いた測定装置のメーカーは表の通りだが、項 C で示す PDA 検出器についての結果は、メーカーを伏せて示す。なお、分光光度計に用いた測定用セルの光路長は 10 mm, HPLC 装置用 PDA 検出器のフローセルの光路長は 1 台を除いて 10 mm であった。残りの 1 台は光路長が 7 mm であり、検出器間で比較する際には、10 mm であると仮定した補正を行ったうえで比較した (表 1)。

B-3) 試験液調製

以下 2 種の試験液を調製した。

カフェイン溶液：12.2 mg/L になるよう試薬をとり、超純水に溶解させた。この溶液を相対濃度 1.0 とし、これに加えて、相対濃度 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 2.0, 及び 3.0 となるよう超純水にて希釈または調製した。なお、本研究で用いたカフェイン溶液の吸収極大は 273 nm であった。

3 色素混合液：黄色 4 号、赤色 2 号及び青色 1 号をひとつの容器にはかりとり、超純水にて溶解させ混合液とした。混合液においては、それぞれの化合物濃度が、10.0 mg/L, 15.0 mg/L,

及び 4.1 mg/mL となるように調製し、このものを相対濃度 1.0 とした。この濃度を基準とし、相対濃度 1.0 のほか、相対濃度 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.5, 2.0, 及び 3.0 となるような混合液を、超純水にて希釈または調製した。なお、本研究で用いた 3 色素混合液の吸収極大は 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm であった。

B-4) 測定方法及び条件

本研究は PDA 検出器の装置間差を調査するためのものであるため、HPLC カラムは排除し、HPLC のポンプから直接 PDA 検出器を接続する構成とし、試料注入のためマニュアルインジェクタ (レオダイン) をポンプと検出器の間に設置したものをを用いた (図 1)。レオダインには 2 mL のサンプルループを接続した。

測定条件は以下のとおり

HPLC-PDA

測定波長：190～700nm または 190～510 nm

(装置のスペックによる)

移動相：超純水

流速：1.0 mL/min

セル音調：なし (実験室温度)

分光光度計

測定波長：190～900 nm

波長記録間隔：0.5 nm

B-5) 測定手順

B-3) に示す試料液は測定当日調製し、表 1 に示す装置での測定はすべて同一日に実施した。分光光度計は、測定の 1 時間前に起動させ、安定化させた。各試験液は超純水を対照として用い、各濃度について 2 回ずつ測定しデータを得た。

HPLC-PDA は、最低でも測定の 1 時間前に PDA 検出器のランプを起動させ、超純水を 1.0 mL/min 送液させた。試験液をマニュアルインジェクション用のシリンジに 6～7 mL とり、サンプルループ内を試験液でしっかり満たした。HPLC-PDA の測定は手動により開始し、開始 1 分後に試験液を流路に注入した。これを、1 試験液につき濃度ごとに 2 回ずつ実施した。HPLC-PDA で得られたデータはすべて

CSV 形式に変換し解析した。

C. 結果及び考察

C-1) PDA 検出器における吸収スペクトルの取得と装置間比較の考え方

本研究における試験液の測定は、すべて表 1 に示す分光光度計及び HPLC-PDA にて実施した。なお、分光光度計は表 1 に示す 1 台を、HPLC-PDA は表 1 に示す 6 台（メーカーは 5 社、装置 A～F、ただし装置 D 及び E は、同一メーカーで装置構成もほぼ同一）を用いた。

本研究では、分光光度計測定により得られる吸収スペクトルが真、すなわち「標準スペクトル」と仮定して、各 PDA 装置における吸収スペクトルと比較した。装置間比較に用いる試験液の吸収スペクトルの測定波長は、カフェイン溶液及び 3 色素混合液の吸収極大から選択した。各試験液における「相対濃度 1.0」は、分光光度計で得られた吸収極大波長（273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm）における分光光度計での吸光度が 0.6AU となる濃度と定義した。

HPLC-PDA での測定において、試験液を分析したときに得られるクロマトグラムを図 2 に示す。図 2 に示すように、PDA 検出器のフローセルが完全に試験液で満たされると、クロマトグラム上では飽和したピークが観察される。飽和したピークの中央付近では、移動相の流れはあるものの常に同一濃度の溶液が満ちていると考えられるため、分光光度計のセルによる測定と同等の状態であると見なすことが可能である。各試験液の代表的な吸収スペクトルを図 3 に示す。

C-2) 各検出器の直線性

まず、検出器によって直線性に特徴があるかを確認するため、各試験液の吸収スペクトルから各測定波長（273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm）における吸光度を得た。試験液の相対濃度を横軸に、分光光度計または PDA 検出器の吸光度を縦軸にとった検量線を図 4 に示す。

図 4 に示すように、分光光度計では、273 nm,

418 nm, 522 nm, 及び 629 nm のすべての波長において、濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性を示した。PDA 検出器は、装置 A, B 及び C は、分光光度計同様 4 波長すべてにおいて濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性を示した。装置 D 及び E では、273 nm で測定した場合は濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性を示した。しかし、418 nm, 522 nm, 及び 629 nm の 3 波長における吸光度は、濃度 0.10～2.0 の範囲では直線性が見られたものの、濃度 3.0 で極端に大きな値を示し、濃度 0.10～3.0 の範囲での直線性は不良であった。また、装置 F では、522 nm および 629 nm における濃度 0.10～3.0 の範囲で良好な直線性が確認されたが、273 nm および 418 nm の吸光度は、装置 D 及び E と同様に低濃度域では直線性が認められたものの、濃度が高くなるにつれて低濃度域で作成した直線の外挿から逸脱し、濃度 0.10～3.0 の範囲における直線性は不良であった。

そこで、想定より極端に大きな吸光度を示した装置 D における濃度 3.0 の 3 色素混合液の吸収スペクトルを、分光光度計のものと重ねた（図 5）。その結果、直線性の確認に用いた測定波長（図 5 における赤矢印）において、装置 D では分光光度計と比較して信号強度（吸光度）が増強されていることが明らかとなった。一方で、信号強度がある一定以下である波長域では、装置 D と分光光度計の吸収スペクトルに大きな違いはなかった。直線性が不良であった装置 E 及び D でも同様の現象が確認された。

吸光度は、Lambert-Beer の理論上、溶液中の物質濃度に比例するため、入射光強度が一定である場合、高濃度溶液になるほど光の吸収が大きくなり、透過光強度は低下する。検出器は、透過光強度を検出することで吸光度を算出しているため、あまりに高濃度の溶液の吸光度は透過光強度が弱くなりすぎ、正確に算出できない。したがって、装置 D～F でみられた高濃度域における吸光度の増強は、微弱な透過光を検出するための何らかの機能が検出器に搭載されていることを示唆している。また、直線性が不良であった領域が、装置 D, E

(同メーカー)では高波長側, 装置 F では低波長側と異なっていた. どの装置も光源に重水素ランプとタングステンランプのふたつを搭載しており, 装置 D, E はタングステンランプ, 装置 F は重水素ランプの影響がある領域でそれぞれ直線性が不良であったと思われる.

C-3) 分光光度計における吸光度を基準としたときの各 PDA 検出器の実測値比較

前項 C-2) にて, 濃度範囲 0.10~1.0 ではいずれの装置 A~F (PDA 検出器) においても良好な直線性があることが示された. そこで, この濃度範囲内の 4 波長 (273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm) における各装置の吸光度が, 分光光度計にて得られた吸光度と比較してどのように異なっているかを調査した. 分光光度計における吸光度を 1 としたときの各装置の吸光度比を算出し, 横軸に相対濃度 (範囲 0.10~1.0) を, 縦軸に各装置の吸光度比をとったグラフを作成した (図 6). グラフでは, 分光光度計を基準としたときの吸光度比 1 を赤線で示しており, この線に近い装置の吸光度ほど分光光度計の吸光度と近いということとなる. PDA 検出器の吸光度を分光光度計と比較したとき, 大きい装置では 15%程度の差がみられた (吸光度比 1.15 付近).

分光光度計や PDA 検出器などの吸光度測定において, 装置の光学系構成にもよるが, 概ね吸光度が 0.3~0.7AU (0.5AU 前後) となる範囲で測定することが, 慣用的に望ましいとされている. 本研究でも, 吸光度 0.3~0.7AU 付近では, 他の吸光度範囲と比較していずれの装置も分光光度計での吸光度に近かった. しかし, 装置によっては 0.5AU 付近でも分光光度計との測定値に 10%程度の差が見られるものもあった (図 6).

また, 図 6 から, 同一装置であっても, 分光光度計との吸光度比の大小パターンは波長ごとに異なっており, 一見して法則性を見いだすことが困難であった. そこで, 同じく濃度範囲 0.10~1.0 を対象とし, 分光光度計における吸光度を 1 としたときの各装置の吸光度を, 同一装置内において検出波長ごとに比較しど

のように異なるか調査した (図 7). その結果, 装置 A~F のすべてにおいて, 分光光度計に対する吸光度比の濃度による遷移パターンが, 273 nm で測定したときと, 418 nm, 522 nm, または 629 nm で測定したときの 2 つのパターンに大別された. 先述の通り, どの装置も光源に重水素ランプとタングステンランプのふたつを搭載しており, 380~400nm 付近でこのふたつのランプを切り替えている. 切り替え手法は, メーカーごとにそれぞれ多少の違いはあると思われるが, 装置 D 及び E は同一メーカーの異なる個体であるため光学系はほぼ同一と見なせるが, 分光光度計に対する吸光度比は装置 D・E 間で大きく異なっている. このため, 分光光度計との吸光度比の差には, 光源ランプの違い (消耗度等を含む) が大きく寄与すると考えられた. しかし, 同一の光源ランプ種である場合でも, 測定波長によって分光光度計に対する吸光度比は一定ではなかった. さらに, 分光光度計に対する吸光度比を装置 B と C とで比較すると, 装置 B では 418 nm > 522 nm > 629 nm の順に吸光度比が小さくなるが, 装置 C では 522 nm > 418 nm > 629 nm の順に小さくなっており, 同一の光源ランプ種内でも装置間で必ずしも同様の強度比とはならなかった. これは, 濃度に対する検出器の応答値をとった検量線の傾きが装置間で逆転することを示しており, 検量線の傾きの比で求められる RMS 値への影響が大きいことが示唆された.

C-4) 異なるふたつの $\lambda_{\max}$ を測定波長として求めた RMS 値の装置間差の補正

RMS 法の定量値における装置間差を小さくするには, 測定波長は基準物質及び分析対象物質の $\lambda_{\max}$ とすることが重要である. このとき, 可能な限り分析対象物質と同一の $\lambda_{\max}$ をもつ物質を基準物質とし, その波長における応答量を用いる方が良いことが報告されている²⁾. この理由としては, 本研究結果からも明らかのように, 同一試料を同様に測定した場合においても, 測定装置及び波長によって, 吸光度が大きく異なることが挙げられる. 基準

物質と分析対象物質を同一波長で測定すれば、このようなズレは相殺されるが、 $\lambda_{\max}$ が異なるとき、とくに紫外領域と可視領域のように使用するランプが異なる場合や波長差が大きい場合には、装置間でのズレの影響が大きくなると考えられる。

このような現象が、ふたつの測定波長により RMS 値を決定する場合にその装置間差に大きく影響していると仮定すると、RMS 値の装置間差をある程度補正可能であると考えられた。そこで、既報の結果²⁾を用いて上記の仮定と補正方法を検証した。既報では、基準物質としてカフェイン (CAF) を設定し、これに対する分析対象物質 4-アミノカルミン酸 (4-ACA) の RMS 値を決定した。このときの検出器は PDA 検出器であり、図 8 に両物質の吸収スペクトルを示す。

既報¹⁾では、2 種の RMS 値を求めており、ひとつは 4-ACA の検出波長をその $\lambda_{\max}$ のひとつである 273 nm としたもの (以下、 $\text{RMS}^{273/273}$)、もうひとつは同じく $\lambda_{\max}$ のひとつである 525 nm としたもの (以下、 $\text{RMS}^{525/273}$) である。基準物質である CAF はどちらの場合もその $\lambda_{\max}$ である 273 nm で測定したため、 $\text{RMS}^{273/273}$ は検出波長がひとつの場合、 $\text{RMS}^{525/273}$ は検出波長がふたつの場合として単純に比較可能である。既報のうち、本研究と全く同一の PDA 検出器を用いて決定した RMS 値を抜粋し、表 2 に示す。表 2 から明らかなように、測定波長が 2 つある $\text{RMS}^{525/273}$ の装置間の RSD (%) は $\text{RMS}^{273/273}$ と比較して大きい。

RMS 法では、通常、どのようなメーカーの検出器でも適用可能な RMS 値を提示するが、その RMS 値は複数装置で算出した RMS の平均値であることが多い。このとき、RSD (%) が大きいほど、RMS 法によって得られる定量値がばらつく要因となる。そこで、RMS 値の装置間差の補正を、ある基準となるような検出器を想定することで試みた。基準となる検出器と分析者の検出器とで、どの程度の“差”が

あるか、すなわち補正係数を求めることができれば、基準となる検出器における提示された RMS 値から、分析者自身の装置で得られるであろう補正 RMS 値を予測することが可能となる。

HPLC/PDA を用いた RMS 法を確立しようとするとき、基準物質に対する分析対象物質の RMS 値を求める際に必要なのは、基準物質及び分析対象物質の検出波長における HPLC クロマトグラムのピーク面積である。同一試料を分析したときのピーク面積値は吸光度に比例するため、2 台の装置におけるピーク面積比は、同一の試料を分析したときに得られる吸光度比にほぼ等しい。例えば、カラムも装着した一般的な HPLC-PDA を用いて、ある検出波長 α における同一試料を分析したときのピークが、基準となる装置 S と装置 X とで、図 9 のようであったとする。

装置 S の吸光度が a である試料では、装置 X の吸光度は b であるとき、装置 S のピーク面積を $A_{S\alpha}$ とすると、装置 X のピーク面積 $A_{X\alpha}$ は以下のように近似される。

$$A_{X\alpha} = A_{S\alpha} \times \frac{b}{a} \quad (1)$$

同様に、ある検出波長 β において、装置 S の吸光度が c である試料では、装置 X の吸光度は d であるとき、装置 X のピーク面積 $A_{X\beta}$ は装置 S のピーク面積を $A_{S\beta}$ を用いて以下のように表される。

$$A_{X\beta} = A_{S\beta} \times \frac{d}{c} \quad (2)$$

ここで、検出波長 α で基準物質を、検出波長 β で分析対象物質を測定するような RMS の値を考える。このときの RMS 値は、検出波長 β で測定した分析対象物質のピーク面積を検出波長 α で測定した基準物質のピーク面積で除したものに比例する。すなわち、装置 S で測定した RMS_S は、

$$\text{RMS}_S = \frac{A_{S\beta}}{A_{S\alpha}} \times R_n \quad (3).$$

ただし、 R_n は基準物質に対する分析対象物質の物質質量比である。以上の式(1)~(3)から、感

度の違いを考慮して得られる装置 X の RMS_X は,

$$RMS_X = RMS_S \times \frac{d}{c} \times \frac{a}{b} \quad (4).$$

以上のように、基準となる検出器と実際に分析者が使用する検出器の吸光度比が、RMS 値の補正係数になる。本検討では、RMS 法にて提示される RMS が装置 A で求めた場合を想定し、装置 A に対する装置 B～D との補正係数を、273 nm と 522 nm のときの各装置の吸光度の実測値を用いて求めた (表 3)。図 7 に示すように、装置間の吸光度比は試料の相対濃度により異なるが、ここでは既報での吸光度にあわせ、相対濃度 0.25 のときの吸光度 (0.15AU 付近) を採用することとした。装置 A を基準の検出器とする場合、 $RMS^{525/273}$ は 0.492 として定量法に示される。仮に、 $RMS^{525/273}$ が 0.516 であった装置 D を用いて、RMS 法 (0.492 が RMS 値として提示されたもの) を実施した場合、得られる定量値に 4.9% の差が生じる可能性がある。各装置の実測値が真の $RMS^{525/273}$ の値であると仮定し、提示値 (装置 A の値) との差 (%) と、補正係数を用いて求めた補正值との差 (%) をそれぞれ比較した (表 3)。その結果、差が広がった装置も縮んだ装置もあったが、最も大きな差が 4.9 から 3.5 へと 1.4 ポイント小さくなった。これは、得られる定量値の装置間のばらつきが小さくなることを示している。

D. 結論

本研究では、UV-Vis や PDA 検出器を用いた RMS 法の課題のひとつである、基準物質と分析対象物質の測定波長が異なる場合における装置間差の原因探索を目的とした。PDA 検出器のスペクトル検出特性を調査するため、様々なメーカーの複数装置にて、同一試料の 273 nm, 418 nm, 522 nm, 629 nm における吸光度を測定し、分光光度計の値を基準として比較した。その結果、装置によって直線性の範囲が異なること、直線性が見られる範囲内であっても分光光度計の値からは最大で 15% ほどズレがある場合があること、分光光度計と

のズレ方は波長や装置によって異なっており一定ではないことなどが明らかとなった。とくに、光源としている重水素ランプとタングステンランプが切り替わると、基準とのズレ方に大きな変化が見られる傾向があった。

そこで、装置間差を小さくするために、RMS 法にて提示された RMS を求めた装置と分析者との装置との間での感度補正の方法のひとつを提案した。具体的には、同一試料を両装置で分析した際の吸光度から補正係数を算出し、分析者の装置における補正 RMS を求めるものである。この補正方法の実装には複数波長での標準物質を用意し、その際の吸光度をあわせて提示する等のひと手間が必要となる。しかし、本補正の検討結果により、装置間差に PDA 検出器における波長ごとの感度差が大きく寄与していることが裏付けられたといえる。

一方で、RMS 法における測定波長が 2 波長であっても、光源ランプ種の変更がなく、数十 nm の違い程度であれば、それほど装置間差が大きくならないとも思われた。既報²⁾にて $RMS_{525/273}$ が $RMS_{273/273}$ より装置間差が大きかった要因のひとつとしては、検出に用いられる光源ランプ種の切り替わりが寄与していると考えられる。RMS 法における基準物質の選定においては、必ずしも分析対象物質の検出波長と同一にする必要はないが、光源ランプの切り替わり付近や離れすぎた波長は避ける方が、装置間差を考慮すると望ましいといえる。

E. 参考文献

- 1) Masumoto N. *et al*, Chem. Pharm. Bull. 73(7), 650–657 (2025). DOI: 10.1248/cpb.c25-00129
- 2) Nishizaki Y. *et al*, Food Additives & Contaminants: PART A, 35(5), 838–847 (2018).

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masumoto N., Yamazaki T., Miura T., Nakajima K., Yamamoto K., Kato T., Minamoto N., Suematsu T., Sato Y., Nomura A., Akagi M.,

Ohtsuki T., Koyama K., Mizumoto T., Miyashita T., Kawashima S., Saito T., Sugimoto N. Development of a Standard-Free Analytical Quantitative Method based on Liquid Chromatography Using Relative Molar Sensitivity for Chlorogenic Acid in Apple Juice. Chem. Pharm. Bull. 73(7), 650–657 (2025). DOI: 10.1248/cpb.c25-00129

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

表 1 本研究で用いた測定装置

	検出器の型番	メーカー	解析ソフト
分光光度計	V-650	日本分光	スペクトルマネージャー
HPLC-PDA	Series1200 G1315B	Agilent	OpenLab CDS
	Ultimate 3000 DAD ^{a)}	Thermo	Xcalibur
	2996	Waters	MassLynx
	SPD-M20A	島津製作所	LabSolution
	MD-4010	日本分光	ChromNAV

a) 光路長が 7 mm (そのほかはすべて光路長 10 mm)

表 2 CAF に対する 4-ACA の RMS 値²⁾

検出器	RMS ^{525/273}	RMS ^{273/273}
装置 A	0.492	1.29
装置 B	0.475	1.27
装置 C ^{a)}	0.498	1.31
装置 C ^{a)}	0.491	1.30
装置 D ^{a)}	0.499	1.25
装置 D ^{a)}	0.516	1.29
RSD (%)	2.7	1.5

a) カラム構成が異なる

表 3 装置 A の RMS 値を基準としたときの装置 B～C の補正 RMS 値

装置	吸光度 (相対濃度 0.25)		補正係数	RMS ^{525/273}		実測の RMS との差 (%)	
	522 nm	273 nm		実測値	補正值	提示値	補正值
A	0.144	0.149	1.00	0.492	0.492	-	-
B	0.144	0.149	1.00	0.475	0.492	-3.5	-3.5
C	0.147	0.151	1.01	0.498	0.496	1.2	0.5
				0.491	0.496	-0.2	-0.9
D	0.154	0.153	1.04	0.499	0.512	1.4	-2.6
				0.516	0.512	4.9	0.7

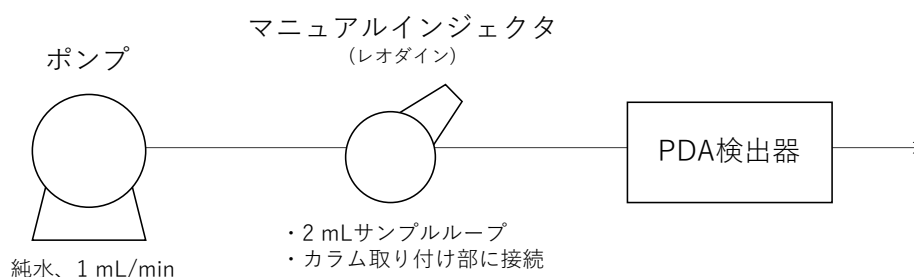


図1 PDA 検出器装置間差調査のための装置構成.

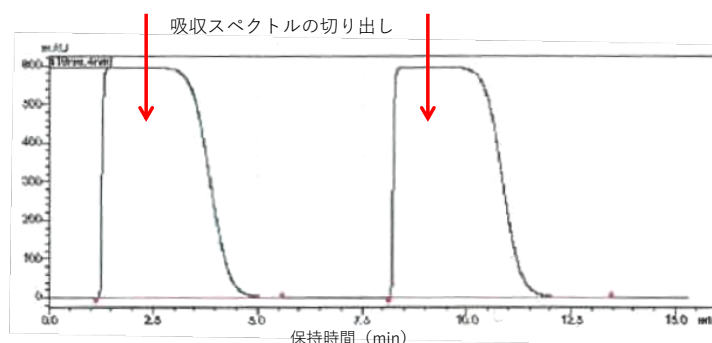


図2 HPLC-PDA クロマトグラム.

ピークが飽和しているあいだは、フローセルが試験液で満たされていると見なし、赤矢印で示す保持時間付近の吸収スペクトルを切り出し、PDA 検出器における各試験液の吸収スペクトルを得た.

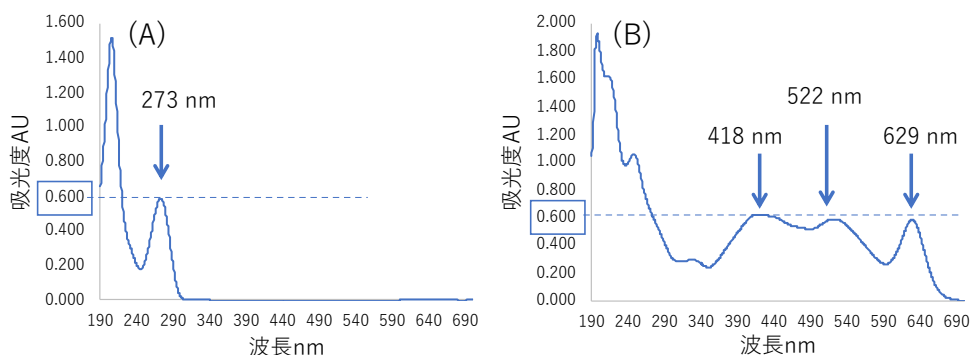


図3 相対濃度 1.0 における(A) カフェイン溶液及び(B) 3 色素混合液の代表的な吸収スペクトル. 吸収極大波長を矢印で、吸光度 0.6AU を点線で、それぞれ示している.

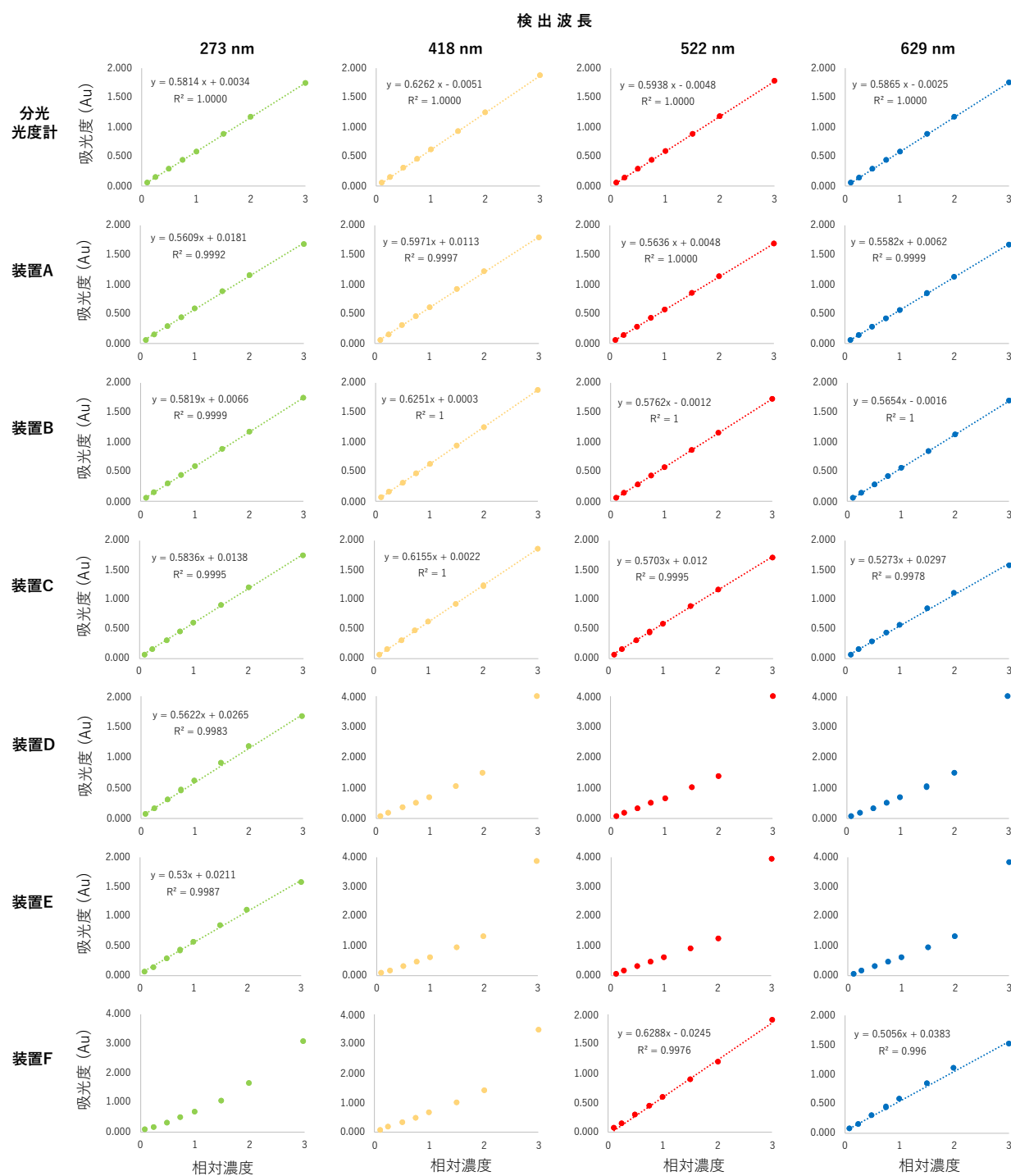


図4 試験液の 273 nm, 418 nm, 522 nm, 及び 629 nm における相対濃度に対する吸光度.

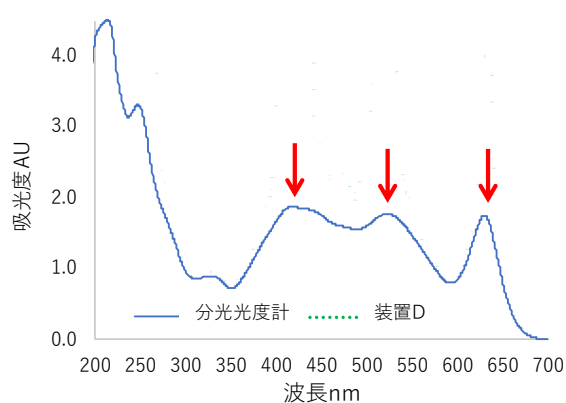


図5 3色素混合液（濃度3.0）の吸光スペクトル。
分光光度計（—）及び装置D（...）で測定したときのものを重ね書きした。赤矢印で示す波長における吸光度を、直線性の確認に用いた。

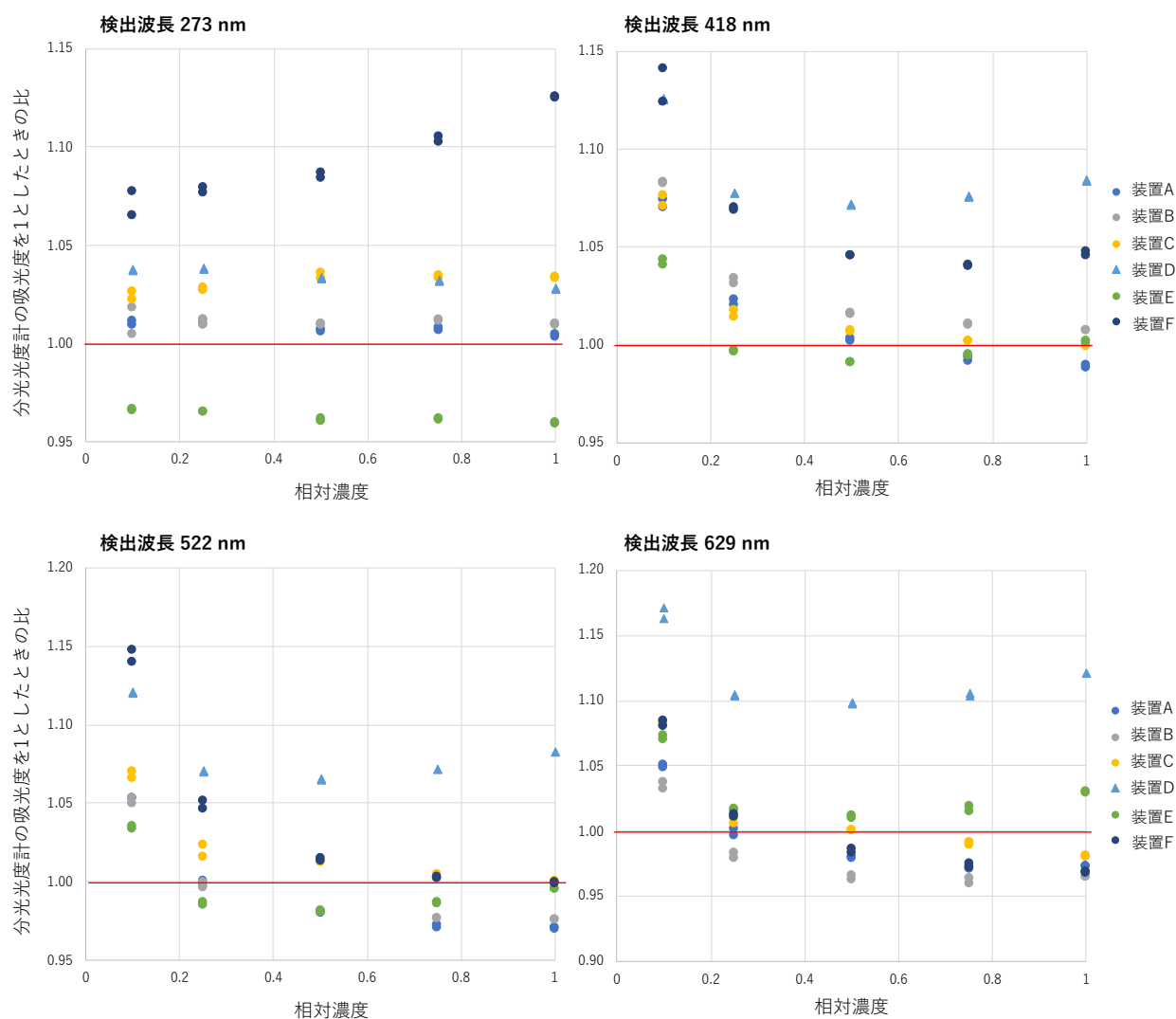


図6 分光光度計の吸光度を1としたときの、装置A～Fで得られた吸光度との比。
グラフ中の赤い線は吸光度比が1を示しており、この線に近いほどPDA検出器の吸光度が分光光度計と近いことを示唆している。

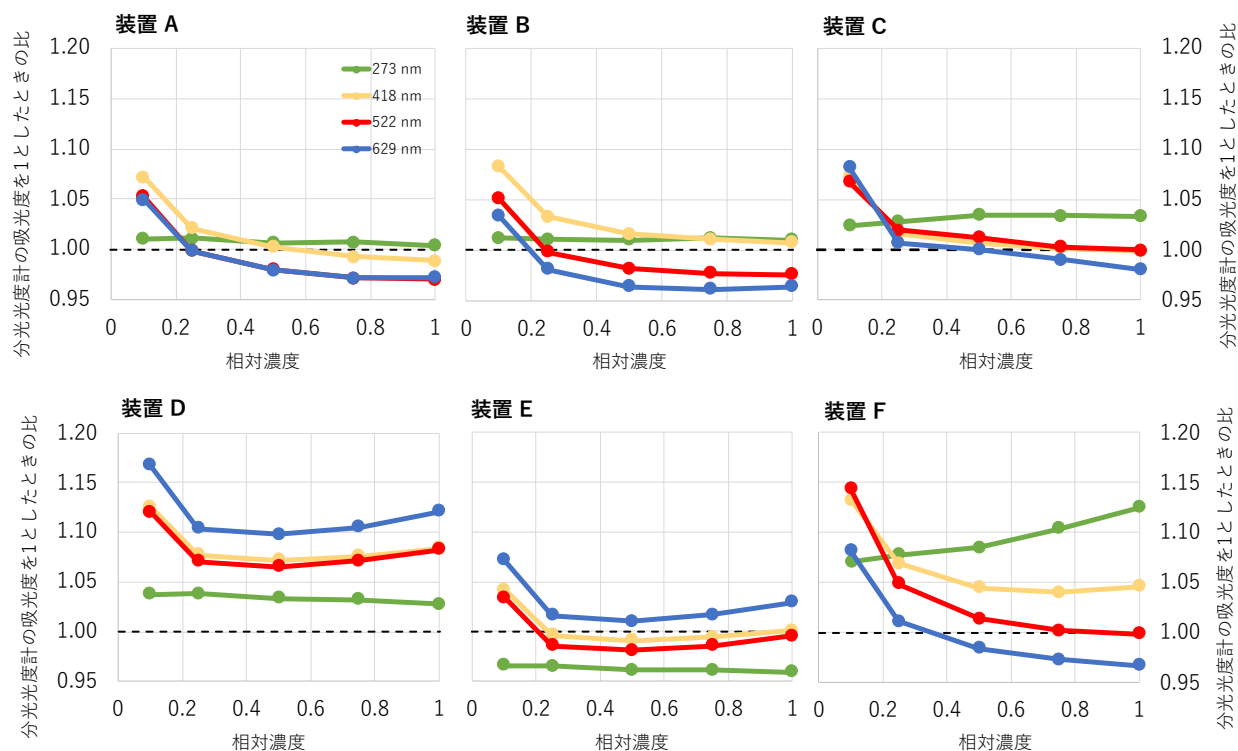


図7 分光光度計の吸光度を1としたときの装置A～Fで得られた吸光度との比を、同一装置内で検出波長をごとに比較した結果。

検出波長は、緑色：273 nm，黄色：418 nm，赤色：522 nm，青色：629 nm. 吸光度比が1（分光光度計と同一吸光度のライン）を黒色点線で示している。

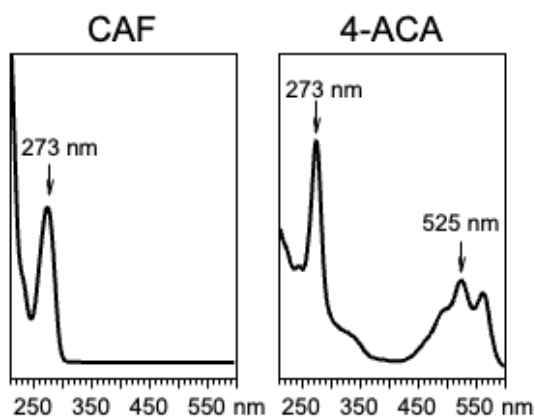


図8 カフェイン（CAF）及び4-アミノカルミン酸（4-ACA）の吸収スペクトル

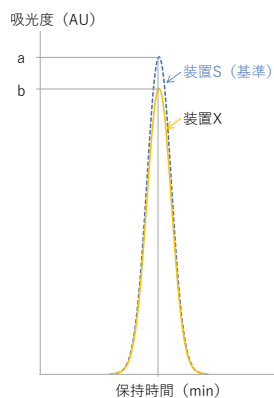


図9 同一試料を分析したときの装置Sと装置Xのクロマトグラムのピークイメージ。