吸光光度法による多成分同時定量におけるデータ解析及び検量法

——8-キノリノールによるアルミニウム、鉄、及びチタンの同時定量——

飯田 康夫[®]， 後藤 一男， 古川 正道， 柴田 正三*

(1983 年 1 月 28 日受理)

吸光光度法により多成分同時定量を行う場合のデータ処理において、Lambert-Beer の法則を行列の形で表す方法 (AKC 法) と、逆に、濃度を吸光度の関数として表す方法 (CPA 法) を定量精度などの面から比較し、更に検量 (キャリブレーション) 法についても検討した。その結果、定量精度の点では CPA 法が優れていると考えられるが、AKC 法においてはスペクトルとしての観察ができることなどの利点があり、両者を組み合わせて用いることがよいと結論される。又、キャリブレーションにおいては、各成分の混合溶液を用いること、あるいは解析式に切片項を導入することにより、定量精度の向上が認められた。更に、これらの方法を用いて、8-キノリノール (オキシシン) によるアルミニウム、鉄、及びチタンの 3 成分同時定量を行い、ほぼ満足のゆく結果を得ることができた。

1 緒 言

紫外・可視分光光度計とマイクロコンピュータを接続することにより、測定操作が容易になるばかりでなく、多量のスペクトルデータをオン・ラインで収集し、解析することが可能となる^{1)~3)}。

それに伴い、これまでの単一波長、あるいは二波長の吸光度を用いた場合とは異なった、種々のデータ解析法が検討され⁴⁾⁵⁾、多成分同時定量法はそのなかでも、最も利用が期待されるものであり、これまでに多くの研究者により実試料分析に応用され、又、定量精度などについての考察がなされてきた^{6)~13)}。

通常の多成分同時定量法においては、Lambert-Beer の法則をもとにして、吸光度を a 、濃度を c 、及び吸光係数を k として $a=kc$ の関係式により解析を行うが、最近、Brown らは¹²⁾、これとは逆に濃度を吸光度の関数、すなわち、 $c=pa$ として解析を行う方法 (p は比例定数) を報告した。又、多波長における吸光度を測定することにより、試料に含まれる複数の成分を同時に定量するためには、各成分のスペクトルを測定するなどのキャリブレーションが必要であるが、どのような方法でキャリブレーションを行うかにより、定量精度が大きく影

響されることが考えられる。

そこで本研究では、これまであまり議論されていない多成分同時定量法における検量 (キャリブレーション) 法による定量精度への影響を検討するとともに、解析法について、Brown らの方法と通常の方法とを比較し、その優劣を議論した。

なお、実際の測定系としては 8-キノリノール (オキシシン) によるアルミニウム、鉄、及びチタンの同時定量を行った。これは、ケイ素を主成分とする窯業原料などの主な不純物としてこれらの成分が考えられること、又単一成分に対するオキシシンによる分析法がよく確立されていることなどを考慮して選定した。

2 理 論

本報で使用する記号を Table 1 に示す。

Lambert-Beer の法則が成り立ち、又測定に使用するセル長を一定とするならば、吸光度 a と濃度 c は次のような比例式で表される。

$$a=kc \dots\dots\dots (1)$$

ここで k は吸光係数である。又、多成分系において、各成分の吸光度について加成性が成り立つとすれば、次のような行列として表すことができる。

$$A=KC \dots\dots\dots (2)$$

* 工業技術院名古屋工業技術試験所：愛知県名古屋市中区平手町 1-1

Table 1 Definition of terms

l	Number of analytical positions
m	Number of mixtures (samples)
n	Number of components
g	1, 2, ..., l : Sequence of the analytical position
i	1, 2, ..., m : Sequence of the mixture (sample)
j	1, 2, ..., n : Sequence of the component
$\tilde{A}$	Absorbance matrix of the calibration mixtures ($l \times m$ matrix)
A	Absorbance matrix of the samples ($l \times m$ matrix)
$\tilde{C}$	Matrix of the component concentrations in the calibration mixtures ($n \times m$ matrix)
C	Matrix of the component concentrations in the samples ($n \times m$ matrix)
K	Absorptivity matrix ($l \times n$ matrix)
P	Proportionality matrix between C and A ($n \times l$ matrix)
Q	Matrix for the calculation of the concentrations ($n \times l$ matrix)
M^t	Means the transpose of the matrix M
M^{-1}	Means the inverse of the matrix M

K が既知であれば、次のような演算を行うことにより試料中の各成分の濃度を求めることができる。

$$C = (K^t K)^{-1} K^t A = QA \quad (3)$$

そこで、 K 行列の要素を求めるには、次の二つの方法が考えられる。1) 各成分について濃度既知の溶液のスペクトルを測定し、これを標準スペクトルとして K 行列に使用する。この方法は簡便ではあるがあまり精度は望めないと考えられる。2) 各成分について濃度既知の混合試料を測定することにより、次式から K 行列を求める方法。

$$K = \tilde{A} \tilde{C}^t (\tilde{C} \tilde{C}^t)^{-1} \quad (4)$$

さて、実際には、吸光度と濃度の関係は、空試験値あるいは妨害の寄与などから次のような切片を持つ線形式で表されることも多い。

$$a = \sum_{j=1}^n k_j c_j + k_0 \quad (5)$$

このような場合、式(2)は

$$A = KC$$

$$= \begin{pmatrix} k_{11} & k_{12} & \cdots & k_{1n} & k_{10} \\ \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots \\ k_{l1} & k_{l2} & \cdots & k_{ln} & k_{l0} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} c_{11} & c_{12} & \cdots & c_{1m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ c_{n1} & c_{n2} & \cdots & c_{nm} \\ 1 & 1 & \cdots & 1 \end{pmatrix} \quad (6)$$

となり、これを式(4)により解くことにより K を求めることができる。そして A の各要素について

$$a'_{gi} = a_{gi} - k_{g0} = \sum_{j=1}^n k_{gj} c_{jg} \quad (7)$$

と補正した行列 A' について

$$C = QA' \quad (3)'$$

として C 行列、すなわち各成分の濃度を求めることができる{以後、式(1)を基にした上記の方法をAKC法と呼ぶことにする}。

一方、BrownらはLambert-Beerの法則を変形し

$$c = pa \quad (8)$$

とする解析法について報告している¹²⁾。 p は比例定数である。これを行列として表せば

$$C = PA \quad (9)$$

となり、キャリブレーション溶液を測定することにより

$$P = \tilde{C} \tilde{A}^t (\tilde{A} \tilde{A}^t)^{-1} \quad (10)$$

と P を求め、式(9)により各成分の濃度を得ることができる。この方法についても、式(8)に切片を導入することが可能であり、

$$c_{ji} = \sum_{g=1}^l p_{jg} a_{gi} + p_{j0} \quad (11)$$

となる。行列の形で

$$C = PA$$

$$= \begin{pmatrix} p_{11} & p_{12} & \cdots & p_{1l} & p_{10} \\ \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots \\ p_{n1} & p_{n2} & \cdots & p_{nl} & p_{n0} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & \cdots & a_{1m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ a_{l1} & a_{l2} & \cdots & a_{lm} \\ 1 & 1 & \cdots & 1 \end{pmatrix} \quad (12)$$

と表され、この式を用いて式(10)を解くことにより、 P 行列を得ることができ、更に式(12)により未知試料の A 行列と演算を行うことにより、各成分の濃度を知ることができる{以後、式(8)を基にした上記の解析法をCPA法と呼ぶことにする}。

3 実 験

3.1 装 置

島津 UV-360 型分光光度計を沖電気工業製パーソナル・コンピューター、IF-800 model 20 型に接続して使用した³⁾。スペクトル・データはフロッピーディスク上に保存し、データ解析などもこのコンピューターで行った。プログラム言語には BASIC を使用し、行列の演算など計算精度の必要なところは倍精度として処理した。

3.2 試 薬

アルミニウム、鉄、及びチタンの標準溶液(1 mg/ml): それぞれの高純度金属を酸で溶解することにより作製し¹⁴⁾、これを適宜希釈して用いた。

1% オキシシ溶液: 試薬特級のオキシシ 2.5 g を氷酢酸 10 ml に加温溶解し, 250 ml に蒸留水で希釈して用いた。

クロロホルム: 試薬特級のクロロホルムを使用時に蒸留し, 用いた。

標準試料: BCS 314 (silica brick), NBS 81a (glass sand) は, それぞれ乾燥器で 110 °C にて 8 時間加熱した後, デシケーター内で保存したものを使用した。

その他の試薬類はいずれも特級あるいは特級相当品を使用した。

3.3 標準試料の分解法

JIS 法¹⁵⁾に従い分解した。

3.4 定量操作

本島の方法¹⁶⁾により, オキシシ錯体をクロロホルムに抽出した。この試料を同様の処理をした空試験液を対照として, (380~520) nm にわたり 5 nm 間隔でスペクトルを測定した。

4 結果と考察

4.1 キャリブレーション及びデータ解析法の検討

アルミニウム, 鉄, 及びチタンをそれぞれ (2~50) µg 含み, 各成分の含有量を変化させた 18 個の合成試料についてスペクトルを測定し, キャリブレーションを行った。式 (4) より求めた各成分のスペクトルを Fig. 1 に示す。これらのスペクトルは, 単一成分において測定されたものとほぼ一致しており, 解析が良好に行われたことを示している。鉄-オキシシ錯体は, 470 nm にピークをもつブロードなスペクトルとなり, 他の 2 成分とは異なっているが, アルミニウム及びチタンはそれぞれ 390

Fig. 1 Calculated spectra of each component

nm 付近にピークを持ち, チタンがややその広いスペクトルとなるが, かなり類似したプロファイルを示している。

式 (6) を基にしてキャリブレーションを行うと, 3 成分のスペクトルは, Fig. 1 とほとんど同じものとなり, 又切片成分としての k_{go} は $-0.043 \sim -0.002$ (吸光度単位) の値となった。

又, 式 (10), あるいは式 (12) を基にしたキャリブレーションでは, P 行列の各要素はパラメーターとして求められるので, K 行列の要素のような物理的意味を持った値とはならない。

Fig. 1 におけるスペクトルの重なりを明確にするために, 3 成分系のそれぞれの対において吸光係数の差の 2 乗を計算し, 波長に対してプロットした。これを Fig. 2 に示す。

Fig. 2 Calculated $(\Delta k)^2$ spectra between the components

さて, これらのキャリブレーション法における定量精度を検討するために, 先にキャリブレーションで使用したものと同一の組成の合成試料 18 個を濃度未知の試料として測定し, 式 (3), 式 (3)', 式 (9) あるいは式 (12) を基にして各成分を定量した。定量における誤差は次式より求めた。

$$\text{Error} = \left[\left\{ \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (c_{ji, \text{found}} - c_{ji, \text{added}})^2 \right\} / (n \times m) \right]^{1/2} \quad (13)$$

380 nm を起点として 520 nm までの間で, 70 nm から 5 nm まで, 5 nm おきにサンプリング間隔を変化さ

Fig. 3 Effect of sampling interval and nonzero intercept term in the calibration on the results of analysis

Methods: ○ AKC, ● AKC+C, △ CPA, ▲ CPA+C
 {+C: the calibration formulae include a nonzero intercept term as in eq. (6) or (12)}; Wavelength range: (380~520)nm; Errors are calculated from eq. (13).

せ、それぞれの解析法における定量結果を式 (13) を基に誤差を計算した。まとめたものを Fig. 3 に示す。

Fig. 3 において、サンプリング間隔 70 nm から 50 nm では測定波長数はすべて 3 であり、定量誤差の変化は、測定波長位置に依存していることが分かる。これらの結果を Fig. 2 の波長位置と比較すると、一般に Δk^2 値の大きな波長をサンプリング点とすることにより精度のよい定量結果が得られていることが分かる。しかし、逆に Δk^2 値を基にして測定波長、あるいはサンプリング数を決めることは困難であった。すなわち、 Δk^2 値を成分についてあるいは波長位置において和あるいは積をとるといった評価式を決めてプロットしても、Fig. 3 と一致するような式を見出すことはできなかった。これは、例えばサンプリング間隔 45 nm 及び 40 nm を比較した場合、どちらも測定波長数が 4 となるにもかかわらず、式 (3) あるいは式 (3)' では 45 nm 間隔としたほうが精度が良くなる一方、式 (9) あるいは式 (12) の解析法では逆に 40 nm 間隔としたほうが良い結果となるように、解析法にも依存するものである。

次に、測定波長数についてみると、サンプリング点の増加により精度の向上がみられるのは、式 (9) を用いて解析した場合だけであり、他の方法では、かえって定量結果は誤差の大きなものになってしまう。この点については、先に述べたように波長位置の影響があると考えられるが、波長間隔 60 nm と 30 nm を比較すると、30

nm 間隔とした場合には 60 nm 間隔で使用した波長位置がすべて含まれ、更に 2 箇所の波長のデータを使用しているにもかかわらず、AKC 法においては定量結果は悪くなり、波長数の増加が、直接、精度の向上とは結びつかないことを示している。

又、更に波長間隔を短くし、サンプリング数を増加させると AKC 法ではほぼ一定の値となるのに対して、CPA 法では誤差が大きく増加している。これは式 (10) において、 $\tilde{A}\tilde{A}^t$ 行列が $l \times l$ 行列であり、 l すなわち測定波長数の増加に伴って、その逆行列を求める演算が計算誤差の大きなものとなることが原因と考えられる。これは、AKC 法において K を求めるための $\tilde{C}\tilde{C}^t$ あるいは C を求めるための K^tK がともに $n \times n$ 行列、すなわち成分数を次数とする行列となることと対照的である。これらは、CPA 法により解析する場合、あまり波長数を多く使用することが不都合であることを意味する。

次に、キャリブレーションにおいて式 (5) あるいは式 (11) に基づいて切片項を導入する効果についてみると、AKC 法あるいは CPA 法のどちらにおいても、定量誤差は減少している。しかし CPA 法においては、波長数の増加に伴いこの効果は少なくなり、ただ単にパラメーター数の増加という意味を持つだけとなると考えられる。

更に、AKC 法と CPA 法を比較すると、定量精度としては、Fig. 3 に示すように、CPA 法において成分数あるいはそれよりも若干多い波長数のデータを使用するものが優れていると考えられる。又、多くの波長のデータを使用する場合には、次のような利点を AKC 法に見いだすことができる。すなわち式 (4) より得られる K 行列において各成分ごとのスペクトルを観察することができる点、あるいは式 (3) を用いて C 行列を求めた後再び式 (2) により A 行列を計算することにより、もとのスペクトルデータと解析によるスペクトルとの差スペクトルを見ることができる点である。

Table 2 は特定の波長を選び解析した結果である。I は Fig. 2 における Δk^2 値のピークとなる波長位置を選んだもので、かなり良い結果を得ることができた。II は各成分のスペクトルのピーク位置付近の波長を選んだもので、この場合にはかなり誤差の大きな結果となった。一方、III はこれまでのキャリブレーション法とは異なり、各成分それぞれについて測定したスペクトルを利用して K 行列を作成するという簡便法によるもので、すべての測定波長のデータを用いて解析した。Fig. 3 の結果と比較して、このような簡便法は、やはり他のキ

Table 2 Errors on analysis at selected analytical positions by several methods of data reduction

Analytical position (nm)	Errors† (μg)			
	AKC	AKC+C††	CPA	CPA+C††
I 390, 400, 445, 470, 480	0.630	0.566	0.510	0.486
II 380, 400, 470	4.174	3.732	3.902	3.575
III 380~520†††	2.100	—	—	—

† Errors are calculated from equation (13). †† “+C” means that the calibration formulae include a non-zero intercept term as in equation (6) or (12). ††† The calibration is carried out by measuring the spectra of individual standard solutions of each component.

キャリブレーション法には及ばなかった。

これらの結果から, 以後の実試料分析には I の波長による, 切片項を含めた CPA 法を用いた。

4.2 標準試料の分析

NBS 81a, glass sand 及び BCS 314, silica brick の 2 種類の標準試料に含まれるアルミニウム, 鉄, 及びチタンの 3 成分同時定量を行った。結果を Table 3 に示す。これらを, 各成分の標準溶液から作製した合成試料の場合と比較すると, 若干, 誤差の大きなものも認められる。この原因としては, 試料分解の操作におけるバックグラウンドとして各成分について (1~3)μg が観察され, このばらつきがやや大きい点などが考えられる。しかし, 3 成分系を定量操作における前処理なしで, 同時定量を行うという操作の簡便性を考えれば, ほぼ満足のゆく結果と考えることができる。

Table 3 Determination of aluminum, iron, and titanium in standard reference materials

Sample	Al (μg)		Fe (μg)		Ti (μg)	
	Taken†	Found	Taken†	Found	Taken†	Found
BCS 314	21.0	20.9	19.1	18.3	5.9	5.9
(silica brick)	20.6	22.6	18.7	19.1	5.8	5.8
NBS 81a	26.8	27.3	4.4	5.8	5.5	5.5
(glass sand)	26.3	28.7	4.3	4.1	5.4	5.6

† Calculated from the certified values of the standard reference materials

5 ま と め

キャリブレーションにおいて, 各成分について濃度既知の混合試料を用いること, あるいは切片項の導入により定量精度の向上が認められた。又解析においては, AKC 法及び CPA 法の特長を生かした方法を採用することが必要である。すなわち, まず AKC 法において多く

の波長におけるデータを用いて K 行列を求め, 各成分のスペクトルの観察を行い, Lambert-Beer の法則, あるいはスペクトルの加成性が成立していることを確かめること, 更に特定の波長を選び CPA 法により各成分を定量することにより, より精度のよい定量を行うことができる。この場合には, 得られた C 行列と, 先に求めた K 行列とから, 元の測定スペクトルとの差スペクトルの観察も可能となる。

(1982 年 11 月, 第 18 回応用スペクトロメトリー東京討論会において一部発表)

文 献

- 1) G. Hänish, T. A. Kaden, A. D. Zuberbühler : *Talanta*, **26**, 563 (1979).
- 2) A. D. Zuberbühler, T. A. Kaden : *Talanta*, **26**, 1111 (1979).
- 3) 飯田康夫, 古川正道, 柴田正三 : 分化, **31**, T65 (1982).
- 4) D. E. Metzler, C. M. Harris, R. L. Reeves, W. H. Lawton, M. S. Maggio : *Anal. Chem.*, **49**, 864A (1977).
- 5) M. Maeder, H. Gampp : *Anal. Chim. Acta*, **122**, 303 (1980).
- 6) J. C. Sternberg, H. S. Stillo, R. H. Schwendeman : *Anal. Chem.*, **32**, 84 (1960).
- 7) F. P. Zscheile, Jr., H. C. Murray, G. A. Baker, R. G. Peddicord : *Anal. Chem.*, **34**, 1776 (1962).
- 8) L. S. Herschberg : *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **205**, 180 (1964).
- 9) J. Šustek : *Anal. Chem.*, **46**, 1676 (1974).
- 10) J. B. Gayle, H. D. Bennett : *Anal. Chem.*, **50**, 2085 (1978).
- 11) K. L. Ratzlaff : *Anal. Chem.*, **52**, 1415 (1980).
- 12) C. W. Brown, P. E. Lynch, R. J. Obermski, D. S. Lavery : *Anal. Chem.*, **54**, 1472 (1982).
- 13) 飯田康夫, 古川正道, 柴田正三 : 分化, **32**, 104 (1983).
- 14) 無機応用比色分析編集委員会編 : “無機応用比色分析”, 1, p. 39 (1973), 2, p. 322 (1974), 5, p. 256 (1976), (共立出版).
- 15) JIS M 8852, けい石分析方法 (1976).
- 16) 本島健次 : 日化, **76**, 903 (1955).

☆

Data reduction and calibration methods for multicomponent analysis in spectrophotometry; Simultaneous determination of aluminum, iron, and titanium with 8-quinolinol. Yasuo IIDA, Kazuo GOTO, Masamichi FURUKAWA, and Shozo SHIBATA (Government Industrial Research Institute, Nagoya, 1-1, Hirate-machi, Kita-ku, Nagoya-shi, Aichi)

Data reduction and calibration methods in an over-determined multicomponent analysis are discussed on the accuracy and precision of determination. In the data analysis, the matrix representation of the Lambert-Beer's law (AKC method) and their reversed form, expressing the concentration as the function of absorbance (CPA method) are compared. The CPA method

is superior to the AKC method in the accuracy and precision when the number of the analytical wavelengths is equal to, or a few more than the number of component. But there is a problem in the calculation of the inverse matrix in the highly over-determined case with regard to the analytical wavelengths. On the other hand, the AKC method has several advantages in the course of data analysis. In the AKC method, the data collected from many wavelengths can be dealt with; therefore, we can observe not only the individual spectrum of each component by calculating the absorptivity matrix after the calibration, but also the difference spectrum by subtracting the raw data spectrum from the calculated one after the analysis. From these spectra, validity of the Lambert-Beer's law, or the additivity of the spectrum of each component can be ascertained. In both methods, the accuracy

and precision of determination are improved by adding the nonzero intercept term to the calibration model, and by the calibration with standard mixtures instead of a standard solution of single component. The present methods could be successfully applied to the simultaneous determination of aluminium, iron, and titanium in the standard reference materials: NBS 81a (glass sand) and BCS 314 (silica brick).

(Received Jan. 28, 1983)

Keyword phrases

multicomponent analysis in spectrophotometry; data reduction; calibration method; simultaneous determination of aluminum, iron, and titanium; 8-quinolinol.

酸素分析法を用いたスクアレンの安定性評価

今枝 一男, 大沢 敬子, 横田 貴史[Ⓐ]*

(1983 年 1 月 28 日受理)

スクアレンの安定性の指標として、酸素直接定量法、酸素吸収法、過酸化物質及び赤外吸収スペクトル法を用い、その測定結果を比較した。これらの分析法によりスクアレンの温度による酸素含量の変化及びゼラチンカプセル化による安定性を測定した。又、スクアレンに各種油溶性ビタミン類、リノール酸、 β -カロチン、レスチンなどを添加しその安定性を検討した。ナフテン酸金属類あるいは鉄、銅板と接触させて金属による影響についても調べた。スクアレンの安定化は、ゼラチンカプセル封入による酸素遮断を行うことが著効を示した。スクアレンに対する抗酸化剤としては、ビタミン D_3 と DL- α -トコフェロールの作用が強く、ビタミン D_3 がより強い作用を示した。又、スクアレンの酸化を促進するものとしては、銅が鉄より強い作用を示した。

1 緒 言

スクアレンはビタミンAの含量が少ない魚類、殊に深海ぎめの肝油中に豊富に含まれる不けん化成分として存在し、又、性ホルモン、コレステロールなどステロイドの前駆物質としてよく知られた物質である。構造中に6個の二重結合を有する非常に酸化されやすい化合物で、そのためゼラチンカプセル封入の形態で食品としての販売が許可されている。

著者らは酸素吸収法などを用いて薬物、高分子、油脂などの安定性について報告した^{1)~4)}。今回は、スクアレンを試料として用い、安定性の指標として酸素直接定量

法、酸素吸収法、過酸化物質 (POV) 及び赤外吸収スペクトル (IR) 法を用いて測定を行った。これらの分析法によりスクアレンの温度による酸素含量の変化及び、ゼラチンカプセル化による安定性を測定した。又、スクアレンの安定化を図るため各種油溶性ビタミン類、リノール酸、 β -カロチン、レスチン、各種ナフテン酸金属類を添加し、あるいは鉄、銅板と接触させてその安定性について検討した。

2 試料、試薬及び装置

2.1 試料及び試薬

試料としてスクアレン及び、その製剤であるマリンゴールド (以上海洋牧場 K. K. 製) を用いた。マリンゴ

* 星薬科大学：東京都品川区荏原 2-4-41