— 論 文 —

(日本化学会誌, 1993, (4), p. 349~354)

© 1993 The Chemical Society of Japan

多変量解析法による複数のフラグメントイオン強度からの ニトラゼパムとジアゼパムの定量分析

(1992年9月30日受理)

佐藤 元泰・三井 利幸*

ニトラゼパムおよびジアゼパムをガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で測定後, 得られた複数のフラグメントイオンのイオン強度を用いて, 多変量解析法によりそれぞれの定量を行った。定量計算に使用するニトラゼパム, ジアゼパムおよび内部標準物質として用いたドトリアコンタン ($n\text{-C}_{32}\text{H}_{66}$) の複数のフラグメントイオンは, 数量化理論第IV類を用いて抽出した。次に, 抽出された複数のフラグメントイオンのイオン強度を基にして, クラスター分析, 偏差値からのクラスター分析および主成分分析を行い, 未知試料がどの既知試料に最も類似しているかを明らかにした。さらに, 主成分分析から得られる主成分得点と固有値を用いて, 正確に未知試料の濃度を決定した。計算されたニトラゼパムおよびジアゼパムの濃度は, 理論値とほぼ一致し, 精度の高い定量が可能となった。

1 緒 言

GC/MS は, 未知成分, 特に多成分系の試料の同定および定量に用いられている。したがって, 裁判化学の分野においても, 医薬品, 農薬などの定量分析に欠かすことのできない方法である。

定量分析には, 質量クロマトグラフィー (MC) あるいは選択イオン検出 (SIM) などの分析手法が用いられ, 一般に定量分析操作では, まず複数の濃度既知の試料 (既知試料) を測定し, それらの測定値と濃度から最小二乗法で検量線を作成後, この検量線に濃度未知の試料 (未知試料) の測定値を代入し定量を行っている。しかしこの方法では, 未知試料の測定値と既知試料 (検量線) の測定値間の相関関係はまったく考慮されていない。そのため, 未知試料の測定値のばらつきがそのまま定量結果に影響を与えることがある。

そこで, 目的物質および内部標準物質から得られるそれぞれの複数のフラグメントイオンのイオン強度から多変量解析法¹⁻³⁾を用いて既知試料と未知試料の測定値間の相関関係を考慮しながら定量する方法を検討した。このように複数のフラグメントイオンを用い, 既知試料と未知試料の測定値間の相関関係を考慮することにより, それらのイオン強度間のばらつきが互いに相殺され, より信頼性の高い定量が可能となる。既に著者らは, 多変量解析法を再現性の悪いX線回折法の定量分析^{4), 5)}に応用し, 満足

く定量結果を得ている。さらに, 多変量解析法による定量は, 測定により得られたフラグメントイオンから分析者の主観によって1から数個のフラグメントイオンを抽出することをせず, 客観的に抽出したすべてのフラグメントイオンの強度を同一の重みにして結論を導きだしている。

多変量解析法による定量は, まず数量化理論第IV類を用いて, 未知試料を含めた定量計算に使用し得る互いに相関性の高い複数のフラグメントイオンを抽出し, 相関性の低いものは計算から除外する。したがって, 一定の規則に従わないフラグメントイオンは, ここで除外される。次に, クラスター分析, 偏差値からのクラスター分析を行い, 既知試料と未知試料のデータ間の類似性を求め, 未知試料がどの既知試料に最も近似しているかを明らかにする。さらに, 主成分分析から得られる主成分得点および, その主成分得点が既知試料と未知試料を含む試料全体の内容をどの程度説明しているかを示す固有値を用いる方法で, 目的物質の定量を行った。

今回は, 複数の催眠薬を誤使用した結果得られる試料から, 迅速に精度よく分析することを目的として, GC/MS による複数の催眠薬の同時定量について検討した。検討した複数の催眠薬としては, 比較的良好に誤使用されているニトラゼパムとジアゼパムの混合物を用いた。

2 実 験

2.1 試 薬

ニトラゼパムおよびジアゼパムは, 三共製薬からの供与品を, ドトリアコンタン ($n\text{-C}_{32}\text{H}_{66}$) は, 東京化成製特級試薬をそのまま使用した。

愛知県警察本部科学捜査研究所, 460 名古屋市中区三の丸 2-1-1

- 1) 奥野忠一, 久米 均, 芳賀敏郎, 吉沢 正, “多変量解析法”, 日科技連 (1971), pp. 163~175, pp. 362~370.
- 2) 奥野忠一, 芳賀敏郎, 矢島敬二, 奥野千恵子, 橋本茂司, 古河陽子, “純多変量解析法”, 日科技連 (1976), pp. 116~131, pp. 183~195, pp. 215~216.
- 3) 田中 豊, 脇本和昌, “多変量解析法”, 現代数学社 (1983), pp. 171~176.
- 4) 三井利幸, 奥山修司, 藤村義和, 日化, 1991, 979.

- 5) T. Mitsui, S. Okuyama, Y. Fujimura, *Anal. Sci.*, 7, 941 (1991).

Table 1 Operating conditions of instrument

Column	1.5% Silicone OV-17 (2.5 mm i.d.×0.5 m)
Column temp	240→265 °C (16 °C/min)
Injector temp	300 °C
Separator temp	300 °C
Inlet temp	300 °C
Chamber temp	200 °C
Electron accelerating voltage	70 V
Ionization current	300 μ A
Carrier gas	He (0.8 kg/cm ²)

2.2 装置

GC/MS は、日本電子製 DA 1000 のデータ処理装置付きの JMS-DX 300 を使用した。分析条件は、表 1 に示すとおりである。

多変量解析法による計算には、NECPC-9801 RX パーソナルコンピュータを使用した。言語は BASIC である。

3 結果と考察

3.1 データファイルの作成

ニトラゼパムおよびジアゼパムは、表 2 に示すようになるように、またドトリアコンタンは、50.5 μ g/ml になるようにクロロホルムに溶解し、その溶液 3 μ l を用いて GC/MS で分析を行った。試料 No. 1 から 5 を既知試料、No. 6 から 10 を未知試料とした。ニトラゼパム、ジアゼパムおよびドトリアコンタンの各全イオンクロマトグラム上の頂点に相当する走査番号と、さらにその前後の走査番号の質量スペクトルを求め、すべてのフラグメントイオンのイオン強度を測定した。次に、この三つの走査番号におけるイオン強度をフラグメントイオンごとに加算し、得られたイオン強度（合計イオン強度）を用いて、多変量解析法による定量分析の計算に使用可能なフラグメントイオンの組み合わせを数量化理論第 IV 類により抽出した。その結果、表 3 に示したように、ニトラゼパムから 11 個、ジアゼパムから 9 個、ドトリアコンタンから 13 個のフラグメントイオンの組み合わせ（イオンクロマトグラム上の頂点に相当するフラグメントイオン、カテゴリー）が得られた。次に、ドトリアコンタンの各フラグメントイオンの合計イオン強度に対する、ニトラゼパムおよびジアゼパムの個々のフラグメントイオンの合計イオン強度を、同一試料中のドトリアコンタンの個々の合計イオン強度で順次割り、ニトラゼパムの 11 個、ジアゼパムの 9 個の各フラグメントイオンごとに得られた値を合計した。すなわち、1 試料につき、ニトラゼパムから 11 個、ジアゼパムから 9 個のカテゴリーが得られる。ニトラゼパムの未知試料 No. 6 を例として、補遺に計算方法の詳細を示

Table 3 Combinations of fragment ions subtracted from nitrazepam, diazepam and dotriacontane

(1) Nitrazepam

Category No.	m/z	Category No.	m/z
1	77	7	253
2	205	8	254
3	206	9	264
4	207	10	280
5	234	11	281
6	252		

(2) Diazepam

Category No.	m/z	Category No.	m/z
1	221	6	283
2	255	7	284
3	256	8	285
4	257	9	286
5	258		

(3) Dotriacontane

Category No.	m/z	Category No.	m/z
1	85	8	183
2	99	9	197
3	113	10	211
4	127	11	225
5	141	12	239
6	155	13	450
7	169		

す。このようにして計算した結果、表 4 に示すような各カテゴリーに対する数値が得られた。多変量解析法の計算には、五つの既知試料（従来からの定量方法で検量線に相当するもの）に一つの未知試料を加えた六つの試料を使用した。すなわち、ニトラゼパムについては 6×11 行列、ジアゼパムについては 6×9 行列で計算を行った。

3.2 クラスター分析

表 4 に示したデータファイルを用いてクラスター分析を行ったところ、表 5 に示すような結果が得られた。表 5 内の最小ユークリッド距離 (MIED) は、ある未知試料から最も近い既知試料までのユークリッド距離である。たとえば、ニトラゼパムの未知試料 No. 6 の MIED は 2133 であり、既知試料 No. 2 と最も類似性が高い。一方、最大ユークリッド距離 (MAED) は、未知試料を含む試料内で、最も遠く離れた試料間のユークリッド距離を示

Table 2 Concentrations of nitrazepam and diazepam in sample solutions

Sample No.	Concentration (μ g/ml)		No.	Concentration (μ g/ml)	
	Nitrazepam	Diazepam		Nitrazepam	Diazepam
1	40.3	160.3	6	80.6	144.3
2	120.9	128.3	7	161.2	112.2
3	201.5	96.2	8	241.8	80.2
4	282.1	64.1	9	282.1	64.1
5	362.7	32.1	10	322.4	48.1

Table 4 Filed data of nitrazepam and diazepam used for multivariate analysis

(1) Nitrazepam

Sample No.	Category No. ^{a)}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	6.238	5.964	9.593	4.265	8.947	8.102	13.940	6.995	4.730	13.214	12.481
2	22.112	22.493	39.383	15.876	38.628	32.494	59.196	28.471	18.858	57.134	52.289
3	46.272	44.367	77.320	33.245	74.859	65.279	115.500	55.508	39.448	117.699	103.875
4	65.133	66.440	116.455	48.487	113.224	97.940	179.246	84.059	58.865	182.174	160.958
5	109.918	100.796	175.180	72.391	167.344	147.181	256.610	124.971	87.870	266.153	234.539
6	14.497	14.226	24.982	10.676	22.947	19.993	37.245	17.772	12.078	37.465	33.834
7	35.969	34.133	58.394	24.875	56.740	48.888	88.174	42.824	30.579	88.293	78.934
8	59.251	56.157	99.581	42.133	94.999	82.610	149.574	71.729	49.783	152.084	134.862
9	66.996	65.816	118.226	49.444	115.229	96.927	181.837	83.791	59.595	180.499	158.547
10	93.678	86.304	149.664	61.041	141.141	121.437	225.246	106.609	72.738	224.105	195.914

(2) Diazepam

Sample No.	Category No. ^{b)}								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	69.423	122.216	341.213	132.381	121.278	286.777	276.877	140.274	92.568
2	52.377	80.652	254.389	97.634	89.681	212.924	206.947	102.938	67.665
3	36.761	63.943	178.325	68.324	61.639	148.032	142.026	71.227	45.810
4	25.101	29.995	117.227	45.537	34.967	98.038	94.513	47.739	30.921
5	12.503	23.592	60.773	24.550	21.842	51.635	48.882	24.618	16.022
6	61.478	107.185	301.744	117.768	107.781	256.610	244.350	123.938	83.148
7	44.187	76.797	217.114	84.257	77.468	182.515	174.272	87.767	57.608
8	29.284	53.715	145.980	56.315	51.048	122.096	114.623	58.181	38.498
9	23.089	42.272	113.968	43.993	40.094	94.924	90.966	45.642	30.104
10	16.064	30.141	77.312	32.274	29.195	65.270	62.410	32.123	20.260

^{a)} The category number corresponds to the fragment ions of nitrazepam in Table 3.

^{b)} The category number corresponds to the fragment ions of diazepam in Table 3.

Sample No. 1~5 : Known samples, Sample No. 6~10 : Unknown samples.

Table 5 Results of nitrazepam and diazepam from multivariate analysis

(1) Nitrazepam

Sample No.	Cluster analysis			Cluster analysis from deviation NKS ^{c)}	Principal component analysis NKS ^{c)}
	MIED ^{a)}	MAED ^{b)}	NKS ^{c)}		
6	2133	293692	2	2	2
7	3709	293692	3	3	3
8	3734	293692	4	4	4
9	29	293692	4	4	4
10	8058	293692	5	5	5

Minimum and maximum Euclidian distance calculated from only known samples are 9246 and 293692, respectively.

(2) Diazepam

Sample No.	Cluster analysis			Cluster analysis from deviation NKS ^{c)}	Principal component analysis NKS ^{c)}
	MIED ^{a)}	MAED ^{b)}	NKS ^{c)}		
6	4569	239187	1	1	1
7	4296	239187	2	2	2
8	2941	239187	4	3	3
9	220	239187	4	4	4
10	858	239187	5	5	5

Minimum and maximum Euclidean distance calculated from only known samples are 8880 and 239187, respectively.

^{a)} Minimum Euclidean distance. ^{b)} Maximum Euclidean distance.

^{c)} Nearest known sample number.

している。もし、この MAED が、既知試料のみから計算された MAED と同一であるならば、その未知試料は、既知試料のクラスター（集合）内に存在する。すなわち未知試料の濃度は、既知試料の濃度範囲内に存在していることを示している。これは従来から行われている検量線による定量法でいえば、検量線の範囲内にあることになる。表 5 に示した各未知試料の MAED は、既知試料のみの MAED と一致することから、今回計算した各未知試料は、すべて既知試料の濃度範囲内に存在することが明らかとなった。

3.3 偏差値からのクラスター分析

表 4 に示したデータファイルのカテゴリー間の数値に大きな差異がある時、分析結果は、より大きな数値を示すカテゴリーに、より大きな影響を受けると考えられる。そこで、カテゴリー間の重みを均一にすることを目的として、表 4 に示したデータファイルの内、五つの既知試料に一つの未知試料を加えた 6×11 行列、6×9 行列の各行列をカテゴリーごとに偏差値に直し、カテゴリー間の重みを均一にしてクラスター分析を行った。その結果、表 5 に示したように、ジアゼパムの未知試料 No. 8 以外は、クラスター分析と同一の結果が得られ、今回は、各カテゴリー間の重みに大きな差はないものと判断された。

3.4 主成分分析

表 4 に示したデータファイルの内、五つの既知試料に一つの未知試料を加えた 6×11 行列、6×9 行列のカテゴリー間の相関関係を求め、ついでこの相関関係から主成分分析を行った。さらに、得られた主成分得点を用いてウォード法によりクラスター分析を行い、結果をデンドログラムで表示した。デンドログラムは、結ばれた試料間のユークリッド距離が小さいものほど、試料間の類似性の程度が高いことを示す。図 1 に、ニトラゼパムの未知試料 No. 6 の主成分分析結果のデンドログラムを示した。この結果では、未知試料 No. 6 は、既知試料 No. 2 と最も類似性が高いことがわかる。他の未知試料についても同様に検討したところ、表 5 に示すような結果が得られた。

3.5 主成分得点からの未知試料濃度の決定

上記の方法で、未知試料中のニトラゼパムおよびジアゼパムの濃度の推定が可能となった。次に、さらに正確な濃度の測定を行

うために、各試料から得られた主成分得点と固有値を用いて、未知試料中のニトラゼパムおよびジアゼパムの定量を行った。主成分分析で定量する目的は、従来の検量線を用いる方法とは異なり、情報として得られる 1 試料からの複数の測定値すべてを定量分析のための対象とすることと、定量時に、未知試料の測定値と既知試料の測定値間の相関関係を見ていることである。すなわち、本方法は、既知試料の測定値間のみの相関関係から検量線を作成した後、未知試料の測定値を、あらかじめ作成してある 1 本の検量線に代入して定量するという従来法とは基本的に異なる。

定量計算には、1.000 以上の固有値から得られる主成分得点のみを用い、第 1 主成分得点を除くものについては、固有値を用いて主成分得点の補正を行う。1.000 以上の固有値を持つ主成分得点のみで定量分析を行ったのは、固有値 1.000 以上で定量分析に用いた測定値全体の内容（主成分分析に用いた行列）の約 98% 以上が説明できることと、各試料に対する主成分得点の数が多くと計算に長時間を必要とするためである。

今回は、1.000 以上の固有値を示す主成分が一つであり、第 1 主成分以外の各主成分は、表 4 に示した測定値の行列に対する寄与率が極めて小さいことから、第 1 主成分に対する第 1 主成分得点のみで定量した。ニトラゼパムの未知試料 No. 6 を例として、補遺に計算方法を示す。未知試料 No. 6 から No. 10 についての定量結果（計算結果）は、表 6 に示すとおりであり、理論値との差は平均して、ニトラゼパムで 1.8%、ジアゼパムで 2.9% であった。またニトラゼパム 201.5 $\mu\text{g/ml}$ とジアゼパム 96.2 $\mu\text{g/ml}$ を用いて本方法と従来法との再現性を検討した。従来法は、分子イオンピークであるニトラゼパムの m/z 281、ジアゼパムの m/z 286 およびトリアコンタンの m/z 450 のイオン強度を用いて最小二乗法で行った。その結果、本方法による相対標準偏差は、ニトラゼパムで 0.9% ($n=10$)、ジアゼパムで 0.3% ($n=10$) であり、従来法では、ニトラゼパムで 3.8% ($n=10$)、ジアゼパムで 3.5% ($n=10$) であった。このことから、本方法は従来法に比較して精度良く定量できる有効な方法であると考えられた。

Fig. 1 Dendrogram of unknown sample No. 6 for nitrazepam

Table 6 Results of nitrazepam and diazepam from quantitative calculation

(1) Nitrazepam

Sample No.	Theoretical value $\mu\text{g/ml}$ (A)	Calculated value $\mu\text{g/ml}$ (B)	Ratio % (B/A $\times 100$)
6	80.6	83.0	103.0
7	161.2	164.8	102.2
8	241.8	247.7	102.4
9	282.1	283.0	100.3
10	322.4	326.8	101.4

(2) Diazepam

Sample No.	Theoretical value $\mu\text{g/ml}$ (A)	Calculated value $\mu\text{g/ml}$ (B)	Ratio % (B/A $\times 100$)
6	144.3	146.9	101.8
7	112.2	113.5	101.1
8	80.2	81.1	101.2
9	64.1	65.0	101.4
10	48.1	43.7	90.9

4 結 論

多変量解析法によるデータ処理は、測定から得られた複数の情報（イオン強度）を同一の重みにして、一つの数値に凝縮する。したがって、ひとつひとつの情報の再現性が悪い場合でも、それから生じる誤差を十分に吸収した結果が得られる。また、複数の主成分得点を補正して用いることにより、それらの情報の損失を最小限にすることが可能となる。このことから、多変量解析法が GC/MS の定量分析に有用な方法であると考えられた。この方法は、特定の情報のみを用いて定量を行う従来法に比べ、より定量精度の高い結果を導き出すことが明らかとなった。

補 遺

多変量解析法による定量分析法について、ニトラゼバムの未知試料 No. 6 を例にして説明する。

まず、測定値を表 4 に示したような、多変量解析法で取り扱う数値に変換する方法として、表 3 に示したフラグメントイオンおよび分子イオンのイオン強度と、それを中心として、その前後の走査番号のイオン強度を測定する。この三つのイオン強度を合計したものを求める。表 3 のカテゴリー No. 1, 2, 3, ..., 11 の走査番号のイオン強度は、

カテゴリー No. 1 が 1.841, 2.070, 1.905

カテゴリー No. 2 が 1.906, 2.004, 1.799

カテゴリー No. 3 が 3.242, 3.518, 3.265

...

...

カテゴリー No. 11 が 4.420, 4.793, 4.364

ただし、最初の数値が表 3 の m/z の 1 つ前の走査番号のイオン強度、2 番目の数値が表 3 の m/z に相当する走査番号のイオン強度、3 番目の数値が表 3 の m/z の一つ後の走査番号のイオン強度である。

それぞれのカテゴリーごとに合計したイオン強度、5.818, 5.709, 10.025, ..., 13.577 を求める。

次に、表 3 に示したドトリアコンタンの 13 のカテゴリーについても、同様の方法で各カテゴリーごとに合計したイオン強度を求める。すなわち、

カテゴリー No. 1 が 11.095, 14.432, 12.853

カテゴリー No. 2 が 5.909, 7.213, 6.544

カテゴリー No. 3 が 3.971, 4.788, 4.309

...

...

カテゴリー No. 13 が 1.482, 1.632, 1.463

で、それぞれのカテゴリーごとに合計したイオン強度は 38.380, 19.676, 13.068, ..., 4.577 となる。表 4 に示した未知試料 No. 6 の数値は次のようにして求める。まず、(各カテゴリーの合計したイオン強度) $\times (1/A_1 + 1/A_2 + 1/A_3 + \dots + 1/A_{13})$ を計算する。ここで、 $A_1, A_2, A_3, \dots, A_{13}$ はドトリアコンタンの各カテゴリーのイオン強度の和である。この式から、表 4 に示した未知試料 No. 6 のニトラゼバムの各カテゴリーの数値は

カテゴリー No. 1 が

$$5.818 \times (1/38.380 + 1/19.676 + 1/13.068 + \dots + 1/4.577) = 14.497$$

カテゴリー No. 2 が

$$5.709 \times (1/38.380 + 1/19.676 + 1/13.068 + \dots + 1/4.577) = 14.226$$

カテゴリー No. 3 が

$$10.025 \times (1/38.380 + 1/19.676 + 1/13.068 + \dots + 1/4.577) = 24.982$$

カテゴリー No. 11 が

$$13.577 \times (1/38.380 + 1/19.676 + 1/13.068 + \dots + 1/4.577) = 33.834$$

となる。

ついで、未知試料 No. 6 の濃度決定（定量のために、表 4 の試料 No. 1 から 5（従来法での検量線に相当するもの）と、未知試料 No. 6 の計 6 行を取り出し（当然他の未知試料の定量の場合には、表 4 からそれに相当する行を取り出す）、 6×11 行列のデータでクラスター分析を行う。クラスター分析の結果から、未知試料が既知試料の濃度範囲内に存在するかどうかと、さらに未知試料の大まかな濃度の推定（定性分析）を行った後、主成分分析から、未知試料の定量を行う。

定量方法は、まず主成分分析から各主成分と、その主成分に対する固有値を計算し、計算に用いた全試料の主成分得点を求める。すでに説明したように、定量分析には固有値 1.000 以上に対する主成分得点のみを用いる。今回の計算例では、固有値が 1.000 以上を示しているのは 1 つだけであるから、第 1 主成分得点のみで定量することになる。通常、従来法でも相対標準偏差が大きいものの、何とか検量線が作成できるような場合には、本方法では固有値 1.000 以上を示すのは第 1 主成分得点のみとなる。表 4 の数値からの、未知試料 No. 6 の計算結果は、固有値が 10.992 と 0.007 となり、第 1 主成分得点のみで定量すれば良いことがわかった。第 1 主成分得点は

試料 1 が 39.38

試料 2 が 44.41

試料 3 が 51.17

試料 4 が 57.94

試料 5 が 68.13

試料 6 が 41.97

試料 6 が未知試料 No. 6

となる。未知試料 No. 6 の主成分得点が 41.97 だから、この主成分得点を挟んだ両端の主成分得点 39.38 と 44.41、さらにこの主成分得点を示す試料 2, 3 の濃度（表 2 参照）から次のようにして未知試料 No. 6 の濃度を求める。

$$\log 39.38 = 40.3 \times a + b \quad (1)$$

$$\log 44.41 = 120.9 \times a + b \quad (2)$$

(1), (2) から

$$a = 1.491 \times 10^{-3} \quad b = 3.613$$

が得られる。この a, b を用いて

$$\log 41.97 = 1.491 \times 10^{-3} \times C + 3.613$$

から未知試料 No. 6 の濃度 C を求めると、 $C = 83.0 \mu\text{g/ml}$ が得られる。

Determination of the Concentration of Nitrazepam and Diazepam with Many Fragment Ions by Multivariate Analysis

Motoyasu SATO and Toshiyuki MITSUI*

*Criminal Scientific Laboratory Aichi Pref. Police H.Q.; 2-1-1, Sannomaru,
Naka-ku, Nagoya-shi 460 Japan*

After nitrazepam and diazepam were measured by gas chromatograph mass spectrometer (GC/MS), their quantitative analyses were carried out with the ion intensities of many fragment ions by multivariate analysis. Dotriacontane ($n\text{-C}_{32}\text{H}_{66}$) was used as an internal standard. Their fragment ions of nitrazepam, diazepam and dotriacontane used for the quantitative calculation were subtracted with quantification IV. Cluster analysis, cluster analysis from deviation and principal component analysis were performed with the ion intensities of the subtracted fragment ions, and it was made certain which one of unknown samples among all was the closest to a given known sample. Furthermore, the concentrations of unknown samples were exactly determined with the principal component scores and eigen values obtained from principal component analysis. The calculated concentrations of nitrazepam and diazepam agreed well with the theoretical concentrations, and the quantitative analysis which has high preciseness was made possible.