

ノ ー ト

改重回帰分析法による混合色素試料中の
低混合比成分の定量と未知成分の判定松 下 晃¹, 奥 山 修 司², 三 井 利 幸^{®3}, 尾 崎 幸 洋⁴

1 緒 言

改重回帰分析法 (DCR) は, 混合している各化合物そのものあるいは混合比が明らかな既知試料の測定値を説明変数, 混合比が不明な未知試料の測定値を目的変数として計算する. DCR で比較的混合割合の大きな未知試料の混合比を計算する方法については, すでにガスクロマトグラフィー (GC), 近赤外分光光度法 (NIR) あるいは吸光光度法で得られた測定値に適用した結果を報告してきた^{1)~3)}. 2 種類の化合物が混合している未知試料の混合比を求めるには, 従来からの検量線法では分離操作が必要であり, 主成分回帰分析法 (PCR) 及び partial least squares regression (PLS)^{4)~6)} では非分離で混合比の計算が可能であるが, いずれの方法も検量線作成のために 4~5 個の混合比の明らかな既知試料が必要となる. 更に, PCR や PLS では多数の既知試料を用いても非分離で 3 種類以上の化合物の混合比を満足できるような精度で求めることはできない. それに対して, DCR は混合している可能性のある化合物のみを既知試料として用いるだけで, 非分離で混合比の少ない化合物の混合比を短時間で精度よく求めることが期待されるので今回の研究を行った. 更に, 従来の分析方法では不可能な未知試料中の未認識化合物の混合の有無と, 混合していた場合の化合物名を, 測定値から計算値を差引いた結果を図示して判定する方法についても検討した.

食品に添加された色素の分析は, 定性分析には薄層クロマトグラフィー (TLC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC)⁷⁾ が, 定量分析には HPLC⁸⁾ やキャピラリー電気泳動⁹⁾ を用いた方法がすでに報告されている. 今回, DCR を食品色素の混合物を吸光光度法で測定した結果に適用し, 1% 程度の食品色素の混合比を非分離で精度良く求め

られることを明らかにした. 更に, 吸光光度法で測定した結果からでは認識できなかった 1% 程度混合している食品色素を, 測定値から計算値を差引いた結果を図示することで確認することができた.

2 実 験

2.1 試 料

食品色素は三栄源エフ・エフ・アイ製の赤色色素の 102 号 (R102), 紫色色素の 106 号 (R106) 及び青色色素の 1 号 (B1) をそのまま使用した.

試料溶液は R102, R106, B1 及びこれらを混合した試料 (試験試料) を蒸留水に溶解し, いずれも吸収スペクトルの最大吸光度値が 0.800~0.950 の範囲 (濃度として約 20 µg/mL) になるように更に蒸留水で調整した. 混合比はすべて重量パーセント (w/w) である.

2.2 吸光光度分析測定条件

光路長 1 cm のガラス製セルを用いて, 測定波長範囲 380~720 nm, データ取込間隔 1 nm, 走査速度 40 nm/min, 繰返し回数 1 回の条件で 341 個の測定波長に対する吸光度を測定した. 測定機器は日本分光製の V-530 型分光光度計を使用した.

3 結果と考察

3.1 測定値の補正

試料溶液は吸収スペクトルの最大吸光度値が 0.800~0.950 の範囲になるように蒸留水を加え調整しているので, 正確な濃度は得られない. そのために, DCR では測定値の最大吸光度値が 1.000, 最小吸光度値が 0.000 となるように補正した補正值を使用した.

参考として, Fig. 1 に R102, R106, B1 及び R102:R106:B1 の混合比が 1.24:37.10:61.66 の混合物を試験試料として測定した 341 個の補正值の吸収スペクトルを示した. なお, 試料溶液の濃度を正確に調製し, 測定結果の分散が小さければ測定値を補正しないで試験試料の各混合物の含有量を求めることができる.

¹ 大阪府警察本部科学捜査研究所: 541-0053 大阪府大阪市中央区本町 1-3-18

² 愛知県警察本部科学捜査研究所: 460-8502 愛知県名古屋市中区三の丸 2-1-1

³ 数値解析研究所: 475-0833 愛知県半田市花園町 1-18-28

⁴ 関西学院大学理工学部化学科: 669-1337 兵庫県三田市学園 2-1

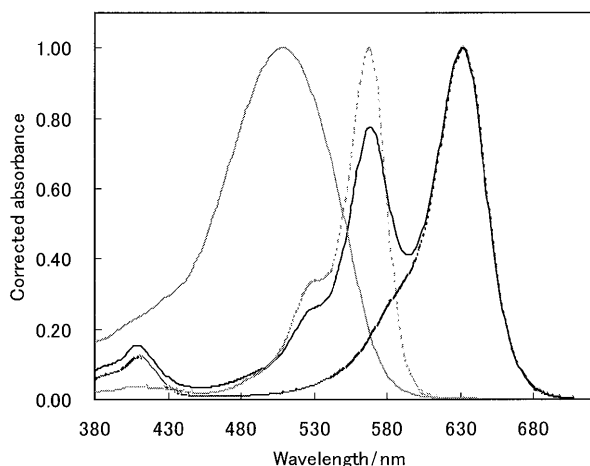


Fig. 1 Corrected absorption spectra of R102, R106, B1, and mixed test sample of three compounds

— : R102 : R106 : B1 = 1.24 : 37.10 : 61.66 ;
 - - - : R102; : R106; - · - · : B1

Table 1 Multiple regression equation for food dye mixture

No.	b_1	b_2	b_3	d	R
1	0.99849	0.01004	0.00042	-0.00057	1.00000
2	0.99098	0.05199	0.00089	-0.00065	1.00000
3	0.00000	0.01022	0.99997	0.00139	1.00000
4	0.00002	0.05213	0.99988	0.00141	1.00000
5	0.01196	0.99730	-0.00097	0.00162	0.99999
6	0.05485	0.98891	-0.00064	0.00165	0.99999
7	0.00942	0.00034	1.00034	0.00167	0.99999
8	0.05203	0.00011	0.99968	0.00192	0.99999
9	0.99909	0.00080	0.00951	0.00087	1.00000
10	0.99824	0.00068	0.05304	0.00070	1.00000
11	0.00209	0.99799	0.00924	0.00194	0.99998
12	0.00147	0.99079	0.05298	0.00148	0.99999
13	0.81092	0.78718	0.01839	0.00123	0.99997
14	0.88940	0.51582	0.01888	0.00161	0.99998
15	0.01754	0.84320	0.85704	0.00320	0.99998
16	0.01939	0.59215	0.99789	0.00318	0.99998
17	0.59497	0.01946	0.99689	0.00243	0.99998
18	0.97249	0.02051	0.98391	0.00203	0.99999

b: coefficient (b_1 : R102; b_2 : R106; b_3 : B1); d: intercept;
 R: multiple correlation coefficient

3.2 強度値による補正

DCR では測定値を補正しているの、R102, R106, B1 の同一濃度における最大吸光度値の差異が考慮されていない。したがって、DCR で最初に計算した混合比（仮の混合比）は求める混合比ではない。求める混合比は、仮の混合比を混合している各化合物の最大吸光度値の比（強度値）で補正する必要がある。今回は R102, R106, B1 が 1:1:1 の混合比の強度値補正用試料を 5 回測定し DCR で最初に計算した R102 : R106 : B1 の混合比の平均値が 1.0250 : 1.0000 : 1.0350 であったので、R102, R106, B1 の強度値は 1.025, 1.000, 1.035 となる。なお、説明変数に使用する既知試料に混合比が明らかで、その比が大きく異なる混合物を使用すれば、測定値を補正したときに化合物間の最大吸光度値の差異は自動的に補正されるので、強度値で仮の混合比を補正する必要がなく、計算で得られた数値がそのまま求める混合比となる。

3.3 混合割合の少ない化合物の混合比の計算結果

DCR では、混合している可能性のあるすべての化合物を既知試料として、未知試料の補正值と最も類似した計算値を求めている。したがって、混合していない既知試料の補正值は未知試料の計算値を求めるための重回帰式に使用されることはなく、該当する係数はゼロとなるはずである。しかし、未知試料の測定値にノイズ等が発生していると、混合していない既知試料の補正值も使用して計算値を算出する場合がある。しかし、このような場合は混合していない既知試料に相当する重回帰式の係数の絶対値は極めて小さくなる。混合していない既知試料に相当する重回帰式の係数が正の場合は、混合比の計算に使用するが、値が

極めて小さいことから混合比はゼロかほとんどゼロになる。また、混合比がゼロ以下ということは有り得ないので、負の係数値は計算から除外する。

DCR で混合比を求める計算方法は、すでに報告¹³⁾してきたように未知試料の補正值と計算値の差の二乗和が最小となるように重回帰式を作成し、得られた重回帰式の係数から混合比を計算している。今回は各試料の測定値が 341 個なので、341 個の補正值と計算値の差の二乗和が最小となるように重回帰式を作成し混合比を求めた。なお、今回は DCR で計算した混合割合の少ない化合物の混合比の信頼性（分析精度）を検討することを目的としたので、すべて任意の混合比で調製した混合比の明らかな色素混合物を試験試料として使用した。

Table 1 に 18 個の試験試料について既知試料の補正值を説明変数、試験試料の補正值を目的変数として作成した重回帰式を示した。DCR では、重回帰式から計算した試験試料の 341 個の補正值と計算値との差が小さいほど分析精度が高くなり、相関係数も限りなく 1.000 に近づくことになる。また、既知試料と試験試料の同じ測定番号（今回は波長）にノイズが発生していても、ノイズレベルが同程度であればそれらの補正值は使用可能である。更に、仮に既知試料が試験試料のいずれかに 1~2 箇所ノイズが発生していても、計算に使用している補正值数が 341 個と多いので計算結果にはほとんど影響しない。Table 2 に Table 1 の重回帰式を用いて 18 個の試験試料の混合比を計算した結果を示した。

DCR では既知試料として用いた化合物の混合比を計算しているので、今回のように 3 種類の食品色素を既知試

Table 2 Analytical ratio of food dyes in mixture calculated by DCR and other methods

No.	DCR			PCR			PLS			Theoretical Value		
	R102	R106	B1	R102	R106	B1	R102	R106	B1	R102	R106	B1
1	98.94	1.02	0.04		2.95		2.61			99.01	0.99	—
2	94.82	5.10	0.08		4.43		4.16			94.80	5.20	—
3	0.00	1.05	98.95		3.94		2.62			—	1.00	99.00
4	0.00	5.13	94.87		6.01		4.91			—	5.00	95.00
5	1.16	98.84	0.00	4.60			2.16			1.00	99.00	—
6	5.13	94.87	0.00	7.55			5.50			5.00	95.00	—
7	0.94	0.03	99.02	5.39			2.73			1.00	—	99.00
8	5.00	0.01	94.99	7.87			4.20			5.00	—	95.00
9	98.99	0.08	0.93			3.92			2.62	99.00	—	1.00
10	94.95	0.07	4.99			5.46			5.38	95.00	—	5.00
11	0.20	98.91	0.88			3.61			1.96	—	99.00	1.00
12	0.14	94.96	4.90			5.99			4.65	—	95.00	5.00
13	49.57	49.32	1.11							49.45	49.55	1.00
14	61.90	36.80	1.30							61.66	37.10	1.24
15	1.01	49.98	49.00							1.00	49.55	49.45
16	1.20	37.63	61.17							1.24	37.10	61.66
17	37.17	1.25	61.58							37.11	1.25	61.64
18	49.46	1.07	49.47							49.50	1.00	49.50

Unit: weight per cent (w/w); Italic: mixing ratio of purposeless compound

料とすれば, 混合の有無にかかわらず 3 種類の食品色素の混合比が計算されてくる. Table 2 の DCR のカラムには計算で得られた 3 種類の食品色素の混合比を示した. なお, 混合割合の少ない化合物の混合比の信頼性 (分析精度) を検討している今回の目的とは関係ない化合物の混合比は斜字体で示した. すでに説明したように, PCR と PLS は 3 種類以上が混合した試料の場合, 精度の高い混合比を求めることは困難なので試験試料 13~18 については計算を行わなかった.

3・4 定量 (計算) 限界値

DCR は多数の波長における測定値を用いて混合比を求めているので, シグナルノイズ比等で定量 (計算) 限界値を検討することはできない. そのために, 定量 (計算) 限界値は相対標準偏差 (RSD) で示すこととした. DCR による定量 (計算) 限界値は, 試料間の異同識別が可能な分散の限界点から, 混合比の分散程度を示す RSD ($n = 5$) が 4.00% 未満であるか否かを基準とした.

R102 : R106 が 99.50 : 0.50 の混合物を 5 回測定し R106 の混合比を計算したところ, 0.60, 0.55, 0.40, 0.65, 0.70 の値が得られ, RSD は 8.88% であった. この結果から, 0.50 の混合比は定量 (計算) 限界値以下と判断した. 更に, R102 : R106 が 99.01 : 0.99 の混合物から R106 の混合比を計算したところ, RSD が 3.63% と定量 (計算) 限界値 4.00% に比較的近い数値を示したので, 混合比約 1.0 が定量 (計算) 限界値と判断した.

参考として, R102 : R106 が DCR の定量 (計算) 限界値である 99.01 : 0.99 の試験試料を 5 回測定し, PCR 及び

PLS で求めた混合比の再現性を検討した. PCR 及び PLS は検量線を作成する必要があるので, R102 : R106 の混合比が 0.00 : 100, 30.05 : 69.95, 49.96 : 50.04, 69.90 : 30.10, 100 : 0.00 の 5 個の既知試料で検量線を作成し R106 の混合比を計算した. その結果, PCR は平均混合比の値が 1.18, RSD が 26.36% であった. PLS は計算時に未知試料の推定混合比を使用しなければならないので, 推定混合比に理論値の 0.99 を代入して計算した場合は, 平均混合比の値が 1.05, RSD が 12.92% であった. なお, この試験試料の吸収スペクトルは Fig. 2 に示したように視覚的に R102 と合致しているので, R106 の推定混合比に 0.00 を代入して計算した場合は, 平均混合比の値が 1.21, RSD が 14.12% であった. DCR は平均混合比が 0.95, RSD がすでに述べたように 3.63% であったことから, DCR は PCR や PLS と比較して 1% 程度の混合比を極めて精度良く求めることができると考えられる. PCR 及び PLS はこの混合比での RSD の数値が 4.00% 以上で定量 (計算) 限界値以下と考えられるが, 参考として Table 2 には混合比約 1.0 の試験試料の計算結果も示した.

3・5 未認識化合物混合の有無の判定

DCR で混合比を求める場合, 混合している可能性のある化合物すべてを既知試料として混合比を計算するか, あるいは未知試料の定性的な測定結果から混合している化合物を推定した後, 推定化合物を既知試料として混合比を計算している. 通常は, 混合している可能性のあるすべての化合物を既知試料として使用すると膨大な数となる場合があるので, 定性分析で推定した化合物を既知試料として用

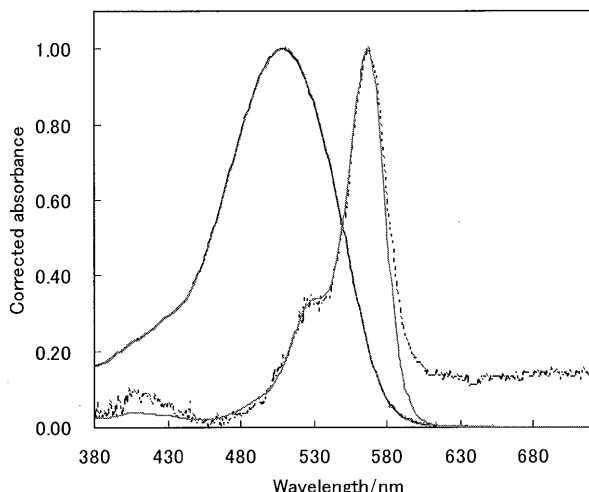


Fig. 2 Corrected absorption spectra of corrected value, calculated value, and corrected value of difference of corrected value and calculated value for test sample

Test sample: R102 : R106 = 99.01 : 0.99. Only R102 was used as known sample for multiple regression equation. — : Corrected value of test sample (A); : Calculated value by multiple regression equation (B); - · - · : Corrected value of (A - B); — : Corrected value of R106

い混合比を計算している。その結果、混合比の小さい化合物は測定結果からでは判別できず見落とす可能性がある。このようなことを避ける目的で、未知試料の補正值と計算値との差を補正後図示して、他の化合物が混合しているか否かを判定する。例えば Fig. 2 に示したように、R102 と R106 が 99.01 : 0.99 に混合している試験試料 1 の補正值の吸収スペクトルは、R102 の補正值の吸収スペクトルと一致し、試験試料 1 は R102 のみで構成されていると判断してしまうことになる。しかしながら、Fig. 2 に示したように、試験試料 1 の補正值と定性分析の結果から R102 (x_1) のみを既知試料として作成した重回帰式 ($Y = 0.99983x_1 + 0.00050$, $R = 0.99998$) から得られた計算値との差を、最大値を 1.00, 最小値を 0.00 に補正した吸収スペクトルで図示すれば、R106 の吸収スペクトルが得られ、試験試料 1 には R106 が混合していることが分かる。この結果から明らかなように、未知試料の補正值と計算値との差を補正後図示したスペクトルの形状から、定性分析で見落とした混合比の小さい化合物の混合と化合物名が判定できる。見落とした化合物がない場合は、Fig. 3 に示したように補正值と計算値との差を補正した後のスペクトルが全体に鋸歯状の形状を示し、特定の化合物の混合を示すような吸収スペクトルにはならない。

このように、推定した化合物のみを用いて作成した重回帰式の重相関係数が極めて 1.000 に近く、他の化合物が共

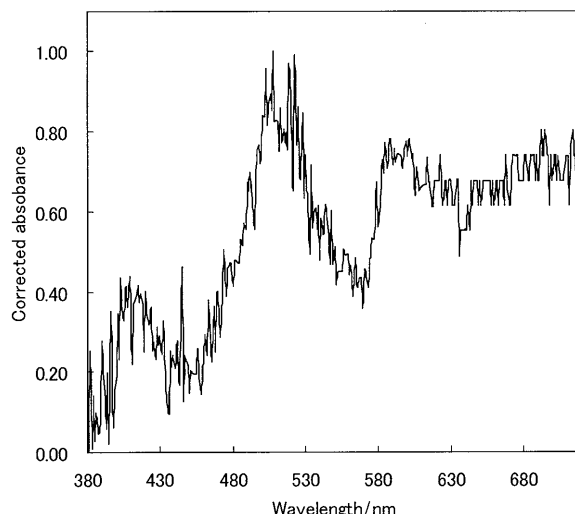


Fig. 3 Corrected absorption spectra of difference of corrected value and calculated value for test sample

Test sample: R102 : R106 = 99.01 : 0.99. R102 and R106 were used as known sample for multiple regression equation.

存しているようにみえない場合でも、常に未知試料の補正值と計算値との差を補正し図示することによって、推定した混合物以外の化合物が未知試料に混合しているか否かの判定が可能となる。このことは、特定の化合物だけの混合比を求めようとするとき、目的の化合物だけを既知試料として使用すれば、既知試料以外の化合物が混合していても、妨害することなく既知試料のみの混合比が求められることになる。DCR では共存している既知試料以外の化合物が既知試料と極めて類似したスペクトルを持つ場合を除いて、目的とする化合物の混合比の計算に対しては全く妨害しない。実際に食品自身が淡黄色に呈色している試料に食品色素を添加後、吸光光度法で測定し食品色素の混合比を計算したところ、計算値から淡黄色の吸収スペクトル部分は除外され、添加食品色素の混合比を極めて精度良く求めることができた。

今回は、比較的混合割合の低い化合物の混合比を精度良く求めることを目的としたので、Table 2 に示したように PCR 及び PLS の計算結果は DCR より信頼性が低い結果となった。しかしながら、混合比が 10% 以上の 2 種類の混合試料であれば Table 3 に示したように DCR, PCR, PLS のいずれを用いても非分離で同じ程度の精度で混合比を求めることができた。

4 結 論

PCR や PLS では混合比を求めることが困難な食品色素混合物中の 1% 程度の混合比を、DCR では非分離で精度良く求めることができた。更に、補正值と計算値の差から、

Table 3 Ratio of food dyes in mixture

No.	Calculated value						Theoretical Value	
	DCR		PCR		PLS			
	R106	B1	R106	B1	R106	B1	R106	B1
1	84.86	15.14	86.59	13.41	85.13	14.87	85.00	15.00
2	51.25	48.75	53.61	46.39	50.42	49.59	50.00	50.00
3	8.23	91.77	10.73	89.27	9.71	90.30	10.00	90.00

Unit: weight percent (w/w)

未認識化合物が混合しているか否かの判定が可能であった。DCRは、未知試料に混合されている各化合物のみを既知試料として使用するだけなので、検量線法、PCR、又はPLSと比較して分析時間を短縮することができる。

文 献

- 1) 三井利幸, 奥山修司: *J. Computer Aided Chemistry*, **6**, 29 (2005).
- 2) 三井利幸, 肥田宗教: *J. Computer Aided Chemistry*, **7**, 31 (2006).
- 3) 松下 晃, 南 幸男, 三井利幸, 尾崎幸洋: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 561 (2006).
- 4) 宮下芳勝, 佐々木慎一: “ケモメトリックス, 化学パターン認識と多変量解析”, p. 54 (1995), (共立出版).
- 5) 相島鉄郎: “ケモメトリックス”, p. 114 (1992), (丸善).
- 6) 三井利幸: “ケモメトリックスの基礎と応用”, p. 37 (2003), (アイピーシー).
- 7) 宮武ノリエ, 永山敏廣: 東京健康安全研究センター年報, **56**, 145 (2005).
- 8) 平田恵子, 植松洋子, 鈴木公美, 飯田憲司, 安田和男, 齊藤和夫: 食品衛生学雑誌, **42**, 109 (2001).
- 9) 石川ふさ子, 大石充男, 木村圭介, 安井明子, 齊藤和夫: 食品衛生学雑誌, **45**, 150 (2004).

Analysis of Small Components and Unknown Species in Dye Mixture by Different Calculation Method of Regression Analysis

Akira MATSUSHITA¹, Shuji OKUYAMA², Toshiyuki MITSUI³ and Yukihiro OZAKI⁴

¹ Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police Headquarters, 1-3-18, Honmachi, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0053

² Criminal Investigation Laboratory, Aichi Prefecture Police Headquarters, 2-1-1, Sannomaru, Naka-ku, Nagoya-shi, Aichi 460-8502

³ Data Analysis Laboratory, 1-18-28, Hanazono-cho, Handa-shi, Aichi 475-0833

⁴ Kwansei Gakuin University, 2-1, Gakuen, Sanda-shi, Hyogo 669-1337

(Received 16 August 2006, Accepted 27 February 2007)

The quantitative analysis of different calculation method of regression analysis (DCR) is performed without a calibration curve and separation process. Also, the mixture ratio of an unknown sample is determined from the coefficient of the multiple regression equation using the measured values of two or more known samples and one unknown sample. In the present work, the mixture ratio of small component in food dye mixture was calculated from 431 absorbance data of known and unknown samples measured by a spectrophotometer. As a result of calculations, a small component in a food dye mixture in an unknown sample was determined very correctly by DCR. The detection limit of the small component in the food dye mixture by this method was about 1%. The reproducibility of the purple dye mixture ratio was examined using a test sample (red dye : purple dye = 99.01 : 0.99), and the relative standard deviation from the calculated result was 3.63%. Also, the relative standard deviations of PCR and PLS were 26.36% and 12.9%, respectively. Furthermore, the existence judgment of a non-recognized small component in an unknown sample of food dye was performed based on the difference in the corrected value and the calculated value.

Keywords : different calculation method of regression analysis (DCR); small component in food dye; existence judgment of a non-recognized small component; spectrophotometry.