

新しいケモトリクス法「仮想添加多変量微分スペクトル解析」による複雑系のラマンスペクトルの定量解析

(早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構*, 台湾国立交通大学分子科学研究所**)

○安藤正浩*, 濱口宏夫**,*

Quantitative Raman spectrometry of complex mixture systems by hypothetical addition multivariate analysis with numerical differentiation

(Waseda University*, National Chiao Tung University**) ○Masahiro Ando*, Hiro-o Hamaguchi**,*

【序】 物質の濃度を正確に測ることは分析化学の基礎であり、これまで様々な分光法に基づく定量分析法が開発されてきた。混合物試料中に、特定の分析目的物質(以下目的物質)がどれだけ含まれているかを測る方法の一つとして、標準添加法が広く用いられている。この手法では、目的物質をその濃度を段階的に変えながら試料に添加し、得られた複数の標準添加試料について分光測定を行う。観測されるスペクトル中の目的物質由来のバンドに着目し、そのバンド強度を添加濃度に対してプロットし検量線を作成する。この検量線に基づいて試料中の目的物質の濃度を決定する。しかし複雑な混合物試料では、バンドの重畳などから、正確な定量解析が困難となる場合が多い。それを克服する方法として、多変量解析によるケモトリクス法、主成分回帰(PCR)や Partial Least Squares (PLS) 回帰等、が知られている。

我々は、混合物試料のスペクトルと、目的物質のスペクトルの2つのみから(実際に試料を標準添加することなく)目的物質の定量解析を行う新しい多変量解析手法、「仮想添加多変量微分スペクトル解析」を開発した[1]。本手法では、試料のスペクトルに、係数を乗じた目的物質の標準スペクトルを数値的に添加することにより、多数の仮想添加スペクトルを作成し、それらに多変量スペクトル分解を適用することで、目的物質のスペクトルを目的物質以外のスペクトルから数値的に分離、定量することができる。

【方法】 混合物試料のモデル溶液として、グルコース、スクロース、フルクトースの混合水溶液を用意した。各糖質の濃度は、重量百分率で、グルコース 1.05 %、スクロース 3.16 %、フルクトース 1.71 %であった。これを試料としラマン分光測定を行い、目的物質としてグルコースの定量を仮想添加多変量微分スペクトル解析により試みた。

まず、10.0% グルコース水溶液を調整してラマン分光測定し、水のラマンスペクトルを差し引くことでグルコースの標準ラマンスペクトルを得た。つぎに、試料のラマンスペクトルに

$$S_j = S_{unkn} + c_j \times S_{std} \quad (1)$$

に従って仮想添加スペクトル S_j を作成した。混合物試料のスペクトルを S_{unkn} 、目的物質の標準スペクトルを S_{std} としてある。ここでは、 $c_j = -5.0$ から $c_j = 5.0$ まで0.01 間隔で、1001 個の仮想添加モデルスペクトルを作成した。さらに仮想添加モデルスペクトルの2次微分を計算し、

$$A = \begin{pmatrix} \frac{d^2 S_1}{dx^2} & \frac{d^2 S_2}{dx^2} & \dots & \frac{d^2 S_N}{dx^2} \end{pmatrix} \quad (2)$$

に従って行列**A**を作成した。この2次微分の操作は、分光器の迷光や蛍光などの連続したスペクトル背景の除去や、複数のバンドが重畳したスペクトルから目的物質の寄与のみを分離する上で有用である。次に、多変量スペクトル分解により、 $\mathbf{A} \cong \mathbf{WH}$ となる行列**W**と**H**を求めた。これらの行列のランクは2であり、行列**W**は目的物質以外の微分スペクトル(第1成分純スペクトル)及び目的物質由来の微分スペクトル(第2成分純スペクトル)を列ベクトルに含み、また行列**H**はそれら2成分に対応する強度プロファイルを行ベクトルに含む。行列分解は、 L_1 ノルム拘束を加えた最小二乗近似により行った。 L_1 ノルムはベクトル (x_1, \dots, x_n) の絶対値の和 $\sum_{i=1}^n |x_n|$ として表される量であり、これを正規化項に加えることで、より疎な解が得られるようになる。本手法により、第1成分純スペクトルにおける目的物質スペクトルの寄与がゼロとなるような、互いに疎なスペクトル分解結果を得ることが期待される。最終的に、得られた行列**H**から、第2成分強度プロファイル \mathbf{h}_2 が0となる点の係数値 c_{opt} を算出し、混合試料における目的物質の寄与を求めた。

【結果と考察】 仮想添加多変量微分スペクトル解析で得られた行列**H**から、各成分の強度プロファイルを作成すると図1Aのようになる。目的物質以外に対応する第1成分強度プロファイル(赤線)は、仮想添加量によらず一定強度を示すのに対し、目的物質に対応する第2成分強度プロファイル(緑線)は、仮想添加係数に対して直線関係を示す。第2成分の強度が0となる点から、 $c_{opt} = -0.1081 \pm 0.0001$ と求められた。誤差は、最小二乗法における反復計算の収束誤差(標準偏差)である。仮想添加スペクトルの数が多いほど収束性が高く、仮想添加スペクトルを11本とした場合は $c_{opt} = -0.1112 \pm 0.0114$ 、101本とすると $c_{opt} = -0.1079 \pm 0.0019$ となった。また1001本以上としても収束値は今回の結果と変わらなかった。

$c_{opt} = -0.108$ から、試料のグルコース濃度は1.08%と算出される。実際の試料作製に用いた濃度は1.05%であり、今回の解析結果はこの濃度をよく再現している。

また、得られた係数値から、図2Bのように、混合試料スペクトル(黒線)を、グルコース以外のスペクトル(赤線)とグルコース寄与分のみのスペクトル(緑線)に分解することができる。本手法により、目的物質以外の成分についての情報を全く含めなくても、スペクトル全体の情報を使うことにより、明瞭に目的物質スペクトルの寄与分を抽出することが可能となった。

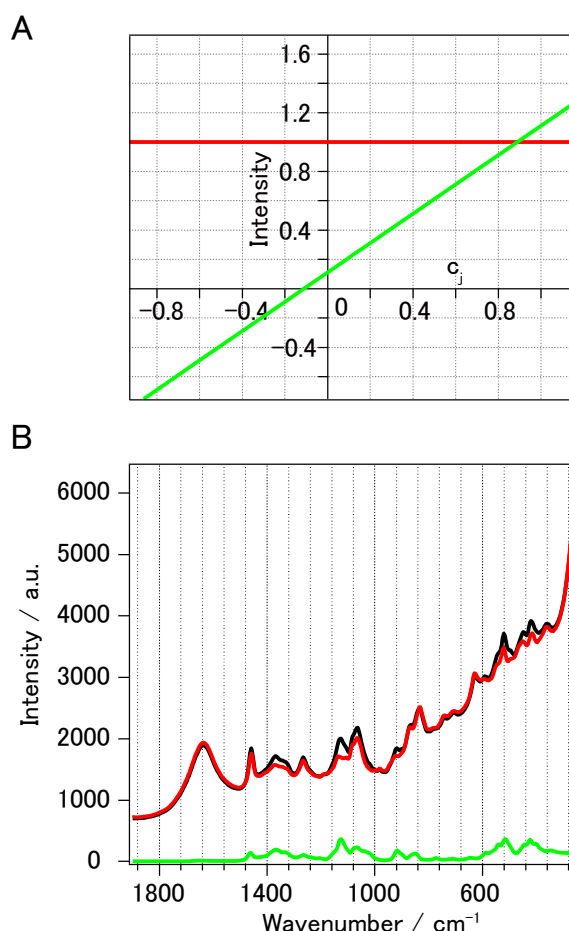


図1. 仮想添加多変量微分スペクトル解析で得られた強度プロファイル(A)、グルコースのラ