報 文

高速液体クロマトグラフィーにおける検出下限の推定法の比較

石川 雅章*, 松田りえ子^{®**}, 林 譲**, 佐々木久美子**,
豊田 正武**

Comparison of the limit of detection in HPLC

Masaaki ISHIKAWA*, Rieko MATSUDA, Yuzuru HAYASHI, Kumiko SASAKI and Masatake TOYODA**

*Numazu Health Center, 1-3, Takashima-honmachi, Numazu-shi, Shizuoka 410-0055

**National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

(Received 14 January 1998, Accepted 11 March 1998)

Five methods to estimate the detection limit were compared. Sorbic acid was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC), and the detection limit was obtained by the following methods: (1) based on the $1/f$ fluctuation of the HPLC baseline, (2) based on the standard deviation of the measurement, (3) relative standard deviation of the measurements, (4) residual variance of the calibration line, and (5) baseline noise. These methods gave similar estimates of the detection limit. The standard deviation of the blank measurement was estimated by methods (1) to (4). Methods (2)~(4) were used to estimate the standard deviation based on repetitive measurements. Method (1), however, was used to estimate the standard deviation without repetition, and gave a precise limit of detection (LOD) in the shortest measurement time.

Keywords : limit of detection (LOD); precision; HPLC.

1 緒 言

分析値の信頼性保証の一部として、使用する分析機器を適切に管理することは重要である。食品検査の信頼性確保を目的として厚生省から通知された業務管理基準¹⁾においては、機器の定期点検及び使用時の点検法を確立し、文書化することが求められている。又、ISO/IEC guide 25²⁾においても、分析に使用する機器の校正と正

しい測定値を与える能力の検証を要求事項としている。しかし、分析機器の適切な検証法あるいは点検の指標はいまだ確立されていない。分析機器の性能指標として、測定精度、及び精度から導かれる検出下限 (LOD)・定量下限 (LOQ) が有用と考えられる。しかし、これらの値は、従来の方法では多数の繰り返し測定を行って求められるものであり、実際に毎日行う日常点検に用いることは困難である。著者らは、ベースラインの揺らぎと既知量の分析対象物から得られる信号から、測定精度及び LOD を短時間で推定する方法を確立しており³⁾⁴⁾、この理論を FUMI (Function of Mutual Information) 理論と名付けた。そこで、この理論の高速液体クロマトグラ

* 静岡県沼津保健所: 410-0055 静岡県沼津市高島本町 1-3

** 国立医薬品食品衛生研究所: 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

フィー (HPLC) を対象とした日常点検法への応用を検討する目的で、実際の試験系で FUMI 理論及びその他の確立された方法で LOD を測定し、比較を行った。

2 実験方法

2・1 試験系

試験系として、食品添加物のソルビン酸の HPLC 分析を用いた。

2・2 試薬

アセトニトリル (液体クロマトグラフ用)、メタノール (特級)、クエン酸一水和物 (特級)、クエン酸三ナトリウム二水和物 (特級) は関東化学製、ソルビン酸 (特級) は和光純薬製を使用した。

ソルビン酸は 70% メタノールに溶かし、0.005, 0.01, 0.02, 0.05 ppm の溶液とした。

2・3 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフは島津製作所製 LC10A を用い、以下の条件で測定を行った。カラム: Waters Symmetry C18 4.6×250 mm, 移動相: メタノール-アセトニトリル-pH 4.0 の 5 mM クエン酸緩衝液 (15:30:55), 流量: 1 ml/min, 検出器: 島津製作所製 SPD-10A 230 nm

2・4 HPLC 測定

各濃度のソルビン酸溶液 20 µl をそれぞれ 5 回ずつ HPLC に注入した。1 か月間隔で 2 回測定を行った。

2・5 信号の取り込み

検出器からの信号は増幅器 (横河電機, L1201) で増幅し、A/D 変換器 (キーエンス, NR-150) でデジタル変換して、パーソナルコンピュータに取り込んだ。サンプリング間隔は毎秒 5 point とした。

このデータから、ピーク高さ、ノイズレベル、FUMI 理論によるベースライン揺らぎ解析の計算を行った。方法 1 の計算には TOCO (自作)、方法 2~4 の計算は Excel (Microsoft) で行った。

2・6 LOD の計算

2・6・1 ベースラインの揺らぎに基づく方法 (方法 1) これは、ベースラインの $1/f$ 揺らぎを解析し LOD を推定する方法である。この理論ではベースラインの揺らぎが作る見掛けの高さ (又は面積) の変動の標準偏差 (SD) を空試験の SD と見なす。この見掛けの高さの SD を求

めるために、まずベースライン揺らぎをホワイトノイズと Markov 過程の和として近似し、ホワイトノイズの SD (w)、Markov 過程の SD (m) 及び自己相関係数 (η) の三つのパラメーターで表す。これらのパラメーターを求めるため、ベースラインをフーリエ変換して得られるパワースペクトルを理論式に対し最小二乗法を用いてフィッティングする。得られたパラメーターから空試験の SD が計算されるので、これに係数 (通常は 3) をかけて LOD に相当するピーク高さとし、濃度と高さの関係式から LOD を計算する。

2・6・2 低濃度試料の分析値の SD を空試験の SD と見なす方法 (方法 2-1, 2-2) 方法 2-1 は上水試験方法³⁾で使われている機器の LOD の測定法である。この方法では検出下限付近の濃度で繰り返し測定を行い、測定値の SD の 3 倍の測定値を与える濃度を検量線より求めて LOD とする。方法 2-2 は環境庁の水質試験法等の分析法で統一的に定められている LOD の求め方⁶⁾と同様の考え方である。原法は分析全体の LOD を求める方法であるが、機器の LOD にも応用可能である。LOD 付近の 3 濃度で繰り返し分析を行って測定値の SD (s) を求め検出力 D を計算する。

$$D = (t_{n-1, 0.05} / n^{1/2}) s / (dR/dC) \quad (1)$$

$t_{n-1, 0.05}$ は自由度 $n-1$ 、 α 5% に相当する t 分布の値、 dR は信号強度、 dC は濃度であり、 (dR/dC) は感度である。3 濃度で得た D の平均値の 3 倍を LOD とする。

2・6・3 測定の相対標準偏差 (RSD) から求める方法 (方法 3) 上水試験方法に定められた⁷⁾、定量下限 (LOQ) を RSD に基づいて求める方法を応用した。広い濃度範囲で測定値の RSD を求め、濃度 C に対してプロットする。これを理論式

$$RSD = aC^b \quad (2)$$

に当てはめ、濃度と RSD の関係式を計算する。RSD = 10% となる濃度を、関係式を用いて逆算で求め LOQ とする。上水試験方法ではこの方法で LOD を求めてはいないが、LOD の定義から RSD = 33% に対応する濃度を LOD とする。

2・6・4 検量線の残差分散を空試験の分散と見なす方法 (方法 4) 低濃度範囲では各濃度における測定値の分散を一定と仮定できるので、このような範囲で作成した検量線の残差分散を空試験の分散と見なす方法である。ISO ではこの方法を用いて LOD を求めている⁸⁾。

検量線は少なくとも 3 濃度, 各濃度で 4 回以上の測定を行って作成する。回帰式の計算から得られる残差分散の平方根を空試験の SD の推定値として使用する。この推定値の 3 倍に相当する濃度を LOD とする。なお ISO では, この SD の 2.5 倍を判定限界 (decision limit), 5 倍を LOD としている。この定義では第 1 種の過誤と第 2 種の過誤 (LOD 濃度の試料を空試験と誤る) の危険率を共に 5% として, LOD を定義している。

2.6.5 ベースラインノイズとの比 (S/N) による方法 (方法 5) ベースラインの範囲 (最大値と最小値の差, peak-to-peak noise) を求め, それに係数をかけて検出下限とする方法が広く使用されている。IUPAC のクロマトグラフィーの用語に従い⁹⁾, ベースラインの範囲の 2 倍を minimum detectability とする。

3 結 果

LOD は, 通常, 空試験信号の SD の 3 倍の強度の信号を与える量と定義されている。これは, 空試験信号を誤って分析対象の信号とする確率 (第 1 種の過誤の確率) を 0.1% とするという考え方である。しかし, HPLC 測定において空試験を繰り返し注入しても, ピーク高さはすべて 0 となり, その SD を求めることは不可能である。このために低濃度の測定値の SD を求め, これを空試験の代わりに使う方法が幾つかある。これらの方法を実際のデータを用いて比較するために, ソルビン酸を繰り返し分析してピーク高さを測定した。得られた

Table 1 Peak heights of sorbic acid and the statistical parameters

Concentration, ppm	0.005	0.01	0.02	0.05
Exp. 1				
1	0.0689	0.1432	0.2979	0.7790
2	0.0626	0.1346	0.2938	0.7874
3	0.0706	0.1372	0.2974	0.7817
4	0.0726	0.1464	0.3033	0.7835
5	0.0584	0.1469	0.2852	0.7698
Mean	0.0666	0.1417	0.2955	0.7803
Standard deviation	0.0059	0.0055	0.0067	0.0066
Relative standard deviation, %	8.8837	3.9060	2.2657	0.8435
Exp. 2				
1	0.0982	0.1749	0.3178	0.7668
2	0.0912	0.1642	0.3266	0.7797
3	0.0926	0.1562	0.3133	0.7467
4	0.1012	0.1833	0.3314	0.7580
5	0.0991	0.1847	0.3354	0.7668
Mean	0.0965	0.1726	0.3249	0.7636
Standard deviation	0.0044	0.0123	0.0092	0.0122
Relative standard deviation, %	4.5200	7.1296	2.8416	1.5993

Fig. 1 Chromatogram of sorbic acid of 0.05 ppm (A), baseline (B), and power spectrum (C)

LOD 値の変動を比較するために, 同じ手順で 2 回の実験を行った。両実験の結果を Table 1 に示す。これらのデータを用いて LOD を計算した。以下, Table 1 のデータを用いて, 各方法の計算手順を示す。

方法 1 Fig. 1 に, 計算に用いたソルビン酸のピーク及びベースラインとそのパワースペクトルを示す。このベースラインから得られたパラメーターは $w =$

Fig. 2 Bilogarithmic plot of the RSD and the concentration of sorbic acid

0.0061, $m=0.0012$, $r=0.9999$ であった。これらの値と 0.05 ppm のピーク高さから、ソルビン酸の LOD は 0.0021 ppm と計算された。

方法 2-1 測定した 4 濃度中、最も LOD に近いと考えられる、0.005 ppm のデータの SD (0.0059) を空試験の標準偏差と見なす。この 3 倍のピーク高さに対応する濃度を計算すると、LOD=0.0013 ppm となった。

方法 2-2 3 種の濃度で計算を行う。5 回測定を行っているので、 $t_{n-1, 0.05}=2.776$ である。0.005 ppm のデータを用い、式(1)に値を代入すると、

$$D = 2.776 / \sqrt{5} \times 0.0059 / (0.0666 / 0.005) = 0.00055 \text{ ppm}$$

となる。同様に 0.01 ppm では $D=0.00048$, 0.02 ppm では $D=0.00056$ となる。これらの値より、LOD は $\{(0.00055 + 0.00048 + 0.00056) / 3\} \times 3 = 0.0016$ ppm であった。

方法 3 各濃度での RSD と濃度の関係式を求める。式(2)の形では、非線形最小二乗法で当てはめる必要があるが、両辺の対数をとると

$$\log(\text{RSD}) = \log a + b \log(C)$$

となる。これは線形関係であり、容易に回帰式が求められる。対数としたプロットを Fig. 2 に示す。直線

Table 2 LODs obtained with the five methods

Method	LOD, ppm	Number of measurement	Measurement time/min
Exp. 1			
1	0.0021	baseline	1
		sample	1
2-1	0.0013	5	75
2-2	0.0016	15	225
3	0.0013	20	300
4	0.0013	15	225
5	200s 0.0055 ± 0.0034		3.3
	40s 0.0024 ± 0.0008		0.7
Exp. 2			
1	0.0021	baseline	1
		sample	1
2-1	0.0009	5	75
2-2	0.0019	15	225
3	0.0002	20	300
4	0.0014	15	225

関係が認められるので、線形の最小二乗法により回帰式を計算し係数 $\log a$, b を求める。回帰式は

$$\log(\text{RSD}) = -3.3706 - 1.00057 \log(C)$$

となる。この式を用い、 $\text{RSD}=10\%$ ($\log(\text{RSD})=-1$) となる濃度 (LOQ) は 0.0043 ppm, $\text{RSD}=33\%$ ($\log(\text{RSD})=-0.4815$) となる濃度 (LOD) は 0.0013 ppm であった。

方法 4 Table 1 のデータから、回帰直線を求めその残差分散の平方根 (0.0059) を空試験の SD と見なす。この 3 倍の信号を与える濃度は 0.0013 ppm となった。又、ISO の定義による判定限界は 0.0011 ppm, 検出下限は 0.0022 ppm となった。

方法 5 ベースラインを 200 及び 40 秒測定し最大値と最小値の差を求める。得られた差の 2 倍の信号に相当するソルビン酸濃度を最小検出量とする。ベースラインの異なった場所を使用し、それぞれ 5 個の推定値を得た。200 秒から計算した LOD は 0.0055 ± 0.0034 ppm, 40 秒からでは 0.0024 ± 0.0008 ppm であった。

4 考 察

Table 2 に、各方法で求めた LOD 及び必要な測定回数・所要時間を示す。又、2 回の実験結果を比較し再現性を評価した。

実験 1 では、得られた LOD の値は各方法間ではほぼ同

程度であった。所要時間は、方法 5 が最小であった。方法 5 については、ベースラインの異なる場所で 5 回測定した LOD の平均と SD を示した。これから分かれるとおり、peak-to-peak ノイズから求めた LOD のばらつきはかなり大きい。又、200 秒から求めた値は 40 秒の値よりも大きい。ベースラインノイズがホワイトノイズであれば、その SD は空試験のピーク高さの SD と考えられ、peak-to-peak も SD と関係づけられる。しかし、方法 1 の結果から、この HPLC のベースラインは単純なホワイトノイズではなく、0.9999 という大きな自己相関を持った Markov 過程を含んでいることが明らかであり、peak-to-peak から求めた LOD とピーク高さの精度とは結びつかない。他の 4 方法はすべて測定値の SD 又は RSD を基準としている。実験 1 では、すべての濃度でピーク高さの SD がほぼ等しくなったため、方法 2~4 で得られた値は同程度であった。しかし、少数回の繰り返しから得た SD の分布はかなり大きく、これに基づいて計算した LOD は同程度の誤差を伴う。実験 2 は実験 1 と全く同じ方法で実施しているが、得られた SD が実験 1 とは異なっている。このため、計算された LOD の値も変動している。

方法 2-1 は 0.005 ppm の SD から LOD を推定している。この方法 2-1 の LOD は 2 回目の実験で小さくなったが、3 レベルの濃度から計算した 2-2 の LOD 値は増加している。方法 3 では、実験 1 と 2 で得た回帰式の傾きは -1.001 と -0.542、切片は -3.371 と -2.447 でかなり異なっていた。相関係数は実験 1 では 0.998 で直線性が認められるが、実験 2 では 0.833 であった。この方法では、回帰直線の外挿で LOD を求めるために、二つの実験の結果は非常に異なる値となった。方法 4 で比較的安定した値が得られたのは、測定回数が 20 回と多いためと考えられる。方法 1 で得た LOD は、実験 1 と 2 でよく一致した。

このように繰り返し測定から得た SD が異なった値となるのは、標準偏差の統計的な性質による。正規分布から抽出した小標本から計算した標本標準偏差の信頼区間は χ^2 二乗分布から求められる。例えば 5 回測定で得た標本標準偏差の 95% 信頼区間は真の SD $\pm 60\%$ 程度、15 回でも $\pm 40\%$ である。一方、方法 1 で求めた LOD (2048 ポイントのデータから計算) の信頼区間はほぼ $\pm 20\%$ であり¹⁰⁾、40 回の繰り返し測定から得た標本標準偏差のばらつきと同程度である。これは、方法 1 がベースラインに含まれる情報を有効に抽出しているためである。又、所要時間は、方法 1 は 22 分であり、他の方法と比較して非常に短時間である。

このように FUMI 理論の方法による LOD の推定は、測定所要時間が少なく、又信頼性も繰り返しによって SD を推定する方法より勝っている。これらを考慮して、本方法は HPLC の日常点検の指標として有用と考えられる。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局食品保健課長通知, 衛食第 135 号 (1996).
- 2) ISO/IEC Guide 25.
- 3) Y. Hayashi, R. Matsuda: *Anal. Chem.*, **66**, 2874 (1994).
- 4) Y. Hayashi, R. Matsuda, R. B. Poe: *Chromatographia*, **41**, 66 (1995).
- 5) 日本水道協会: “上水試験方法解説編”, p. 8 (1993).
- 6) 鈴木 茂, 石黒智彦, 安原昭夫: *環境化学*, **2**, 71 (1992).
- 7) 日本水道協会: “上水試験方法解説編”, p. 7 (1993).
- 8) ISO/CD 11843-2 “Capability of detection Part 2: Methodology in the linear calibration” (1994).
- 9) L. S. Ettre: *Pure Appl. Chem.*, **65**, 819 (1993).
- 10) Y. Hayashi, R. Matsuda, R. B. Poe: *Analyst* (London), **121**, 591 (1996).

要 旨

高速液体クロマトグラフィーにおける検出下限を求めるための 5 種類の手法の比較を行った。(1) ベースライン揺らぎ解析に基づく方法, (2) 測定値の標準偏差に基づく方法, (3) 測定値の相対標準偏差と濃度の関係に基づく方法, (4) 検量線の残差分散に基づく方法, (5) ベースラインノイズの強度に基づく方法を用い、ソルビン酸の測定データからその検出下限を推定した。これらの方法はおおむね同等の検出下限を与えた。(5) の方法は空試験の標準偏差と理論上の関連性がなく適当ではない。(2)~(4) の方法は、すべて繰り返し分析により空試験の標準偏差の推定を行う方法で、精密な推定のために測定回数を多くする必要がある。全測定に長時間を要した。(1) の方法は同じく空試験の標準偏差を推定しているが、測定時間が短く、機器の日常的な精度検証に応用可能であった。