FUMI 理論による機器分析の測定精度の予測*

松田 りえ子*

国立医薬品食品衛生研究所

(平成 13 年 8 月 27 日受理)

Prediction of Precision of Measurement Performed by Analytical Instruments Based on FUMI Theory

Rieko MATSUDA

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

Key words: instrumental analysis, precision, FUMI theory.

1. 分析精度を求める時の問題点

分析値には必ず誤差が伴う。精度は誤差の変動の程度である。最近、分析値について、その信頼性を保証するために精度を明らかにすることが求められている。精度を求めるためには、同一の試料についてくり返し分析を行い、得られた結果の標準偏差 (SD) または相対標準偏差 (RSD) を計算するのが、一般的方法である。

しかし、くり返しで求めた精度の信頼性については大きな問題点がある。多くの分析化学の論文では、分析法の精度を示すために、3~6 回のくり返し分析の結果とその標準偏差が、分析法の正当性を示す根拠となっている。また、日本薬局方の分析法バリデーションでも、6 回のくり返しから併行精度を評価する方法が示されている。しかしながら、くり返し測定によって信頼性のある標準偏差を求めるためには、3 回あるいは 6 回の測定では不十分である。

3 回のくり返しから求めた標準偏差の推定値の 95%信頼区間は、母標準偏差の上下に 90%の範囲にわたっている。5 回のくり返しでも、上下に 60%程度の幅がある。±20%程度の信頼性を持つ標準偏差推定値を求めるために必要なくくり返し数は、30 回以上である。農薬分析に多く使用されている HPLC あるいは GC のように、1 回の測定に時間のかかる測定方法では、このような多数のくり返しを行うのは実際的ではない。さらに、くり返し測定では移動相等の薬品を大量に消費するために、コストも増大する。つまり、く

り返し測定では、回数が増えるに従って推定された統計量の信頼性は向上する一方、コスト・時間が増大する。くり返しの結果から不確かさを求めている限り、この関係は変わらない。くり返し測定に変わる迅速かつ簡便な、精度推定方法が必要である。

2. FUMI 理論による精度予測

2.1 FUMI 理論とは

FUMI 理論は、機器測定に由来する分析値のばらつき、あるいは精度を予測するために開発された理論である。FUMI 理論は多くの分析機器による測定に応用可能であるが、クロマトグラフィーに関する研究が最も進んでいるので、これを例にして簡単に解説する。

クロマトグラフィーでは、低濃度の小さいピークの高さ、面積値が変動しやすく、高濃度のピークでは変動は小さい。小さいピークの面積を変動させているのは、ベースラインに現れているノイズである。ランダムに現れるノイズの影響を評価するために、ノイズの幅や標準偏差を使った、S/N 比が検出限界の指標とされることが多い。しかし、このように定義された N (ノイズ) はピーク高さの次元を持っており、ピーク面積測定には原理的に適用できない。

FUMI 理論では、一定の形 (面積、高さ) をもつピークに、ベースラインのゆらぎに由来するノイズが重なることにより、ピーク形状が変動すると考え、ベースラインが、ピーク測定範囲で、どの程度の面積変動を起こすかを推定し、この値からある濃度のピークの高さ (面積) の精度、検出限界を求める。

*第 26 回大会シンポジウムの講演者による解説。

*〒 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

2.2 ベースラインノイズのモデル

FUMI 理論により精度を予測するためには、クロマトグラフィーのベースラインの性質を知らなくてはならない。数学的によく分かっている確率過程として、ホワイトノイズとマルコフ過程がある。Figure 1 にこれら 2 つの過程を示す。ホワイトノイズでは、各ポイントの値は、前のポイントの値と独立であるが、マルコフ過程では、あるポイントの値は、その前のポイントに依存している。このため、マルコフ過程では全体が緩やかな変化を示す。図の 2 つの過程の標準偏差は等しいが、マルコフ過程の方がなめらかでノイズが少ないように見える。しかし、実際には、マルコフ過程のような緩やかな変動の方が、ピーク面積を大きく変動させる上に、スムージングにより除去することも困難である。

ホワイトノイズは標準偏差 w のみで記述でき、マルコフ過程は標準偏差 m と自己相関係数 r で表される。HPLC のベースラインを 2 つの過程の和とすれば、3 つのパラメータでノイズの性質が記述できる。Figure 2 は、実際のベースラインをフーリエ変換して得たパワースペクトルであ

A. white noise

B. Markov process

Fig. 1 Well understood stochastic processes.

Fig. 2 Observed (grey line) and theoretical (black line) power spectra of HPLC baselines.

Fig. 3 Statistical and stochastic approaches.

る。図中のなめらかな線は、ホワイトノイズとマルコフ過程の和のパワースペクトル理論式を、実際のパワースペクトルにフィッティングした結果である。2 つの例ともに、フィッティングは良好であり、ベースラインノイズがこのモデルで近似できることが分かる。

2.3 精度の予測

ベースラインによる面積変動は、ピークの幅によって異なるため、実際のピーク的面積（高さ）精度を予測するためには、ピークの形（ピークの始まりから終わりまでのポイント数）が必要である。これは、目的とするピークを実際に測定して求める。また、ある濃度のピークの精度を求めるためには、そのピーク的面積（高さ）が必要である。これも、実測しなくては得られない。従って、FUMI 理論での精度予測においても、1 回の測定は必要である。実際の精度予測は下に示すように行われる。

2.4 統計的方法との相違点

くり返し測定は、抽出した少数のサンプルから母分散を推定するという、統計学の方法である。一方、FUMI 理論の方法は元の事象（ベースラインの変動）の確率過程から分散を推定する方法であり、確率論的方法である。Figure 3 に示すように、両者は同じ問題を別の方法で解いている。

Fig. 4 LOD of ethyl *p*-hydroxybenzoate observed in different laboratories.

Lab. A LOD = 0.16 μg/L

Lab. E LOD = 3.0 μg/L

Fig. 5 Peaks around LOD.

3. FUMI 理論の応用例

3.1 HPLC 分析における検出限界

Figure 4 は、同一の試料溶液を 9 カ所の機関で測定し、FUMI 理論を用いて、検出限界を求めた結果である。装置によって検出限界が大きく異なり、最も高い検出限界 F は最低の値 A の 20 倍以上であった。Figure 5 は、実験室 A と E において測定したクロマトグラムを示している。

実験室 A の検出限界は 0.16 μg/l である。図に示したピークは、左からそれぞれ、1, 5, 10 μg/l である。これらの濃度は、いずれも検出限界よりも大きいため、ピークが明瞭に現れている。実験室 E の検出限界は 3.0 μg/l である。1 μg/l のピークは検出限界以下であるので検出されないが、他の濃度は検出されると予測される。実際のピークをみると、確かに、5 及び 10 μg/l ではピークが見られるが、1 μg/l ではピークは検出できない。以上の結果から、FUMI

理論に基づいた方法により予測した検出限界は、合理的であることが分かる。

3.2 ダイオキシン類の検出限界

ダイオキシン分析のように分析対象が非常に低濃度の場合には、検出限界が特に重要である。ピークが検出されなかった場合の報告値は nd となるが、検出限界濃度の値によって nd の意味、重要性が変わる。このため、ダイオキシン分析の多くのガイドライン等では、検出限界を明らかにすることを要求しているが、その求め方はそれぞれ異なっている。

代表的な検出限界の定義を以下に示す。

* ピーク面積及び高さの標準偏差 (SD) 実測値の 3 倍に相当する量 (環境庁, JIS)

* S/N=3 に相当する量 (厚生省)

N: ベースライン標準偏差(SD)の 2 倍 またはベースラインのレンジ (最大値-最小値) の 2/5 倍

ダイオキシン各異性体について FUMI 理論による方法と上記の方法で求めた検出限界を比較すると、S/N による値と FUMI 理論による結果とはよく一致しているが、ピーク面積 (高さ) の標準偏差から求めた値はかなり異なっている。実際には、ピーク面積 (高さ) の標準偏差から求めた検出限界付近のピークは、かなり大きいことが多い。また、最初に述べたように、数回の測定から求めているために、検出限界を求める毎に、異なった値が得られる。

3.3 調製誤差と測定誤差

ここまでの議論では、機器による測定に由来する測定値の変動のみを考えた。分析全体の不確かさを考える場合には、試料の HPLC への注入、及び試料の前処理等に由来する不確かさを含めて考える必要がある。インジェクターのくり返し注入の再現性は RSD として約 0.3% 程度である。高濃度の試料の場合には、ノイズによる面積変動は非常に小さいために、機器による測定精度の主な原因はこの注入の誤差となる。

分析全体の精度を、機器分析の測定精度と試料調製に伴う精度 (調製精度) に分けて考えると、

$$(\text{調製の RSD})^2 + (\text{測定の RSD})^2 = (\text{分析の RSD})^2$$

となる。調製の RSD を 10% 程度として、色々な測定の RSD について分析全体の RSD を計算して Table 1 に示した。残留分析のように、低濃度で測定の RSD が 20~30% になる場合には、分析全体の RSD と測定 RSD がほぼ等しくなる。検出限界付近では測定誤差が 30% 程度であり、検出限界

Table 1 調製誤差と測定誤差

調製の RSD	測定の RSD	分析の RSD	誤差の主原因
10%	1%	10.05%	調製
10%	10%	14.14%	調製, 測定
10%	25%	26.93%	測定

を推定する場合には、調製による変動を考慮せずに測定の変動のみを考えても、近似的に等しい値が得られる。

3.4 調製の精度の推定

前節で示したように、分析全体の RSD を調製の RSD と測定 of RSD に分けて考えることができる。しかし、実際には測定をしないと測定値が得られないために、調製の RSD を予測するためには、上記の式を置き換えて

$$(\text{調製の RSD})^2 = (\text{分析の RSD})^2 - (\text{測定の RSD})^2$$

として計算しなくてはならない。例えば、分析全体を 10 回くり返して RSD を求め、別に一定の濃度の試料溶液の測定を 10 回くり返して測定の RSD を求め、差し引くといった方法が考えられる。しかしながら、この方法ではくり返し数が少なくなるために、推定した RSD の信頼性が低く、2 つの差である調製の RSD の信頼性は非常に低くなってしまふ。

測定の RSD を FUMI 理論から求めれば、くり返し 30～40 回に相当する信頼性を持った RSD が求められるため、ある程度信頼性の高い調製 RSD が推定可能である。

4. FUMI 理論の利点と問題点

これまでに述べたように、FUMI 理論の利点としては

- 1) ベースラインとシグナルをそれぞれ 1 回測定すれば、広い濃度範囲で測定値の SD と RSD が予測できる

- 2) この様に予測された SD の信頼性は、約 40 回の繰り返し測定から得られた SD の信頼性に等しい
- 3) 多くの機器分析の精度を統一的に予測することが出来る

等が挙げられる。

一方、問題点としては

- 1) テキストファイルに変換された機器出力（クロマトグラムなど）が必要である
- 2) ノイズのパワースペクトルに対する理論曲線のフィッティングが悪い場合がある
- 3) 計算が複雑

等が考えられる。このうち、3 についてはソフトウェアが開発され入手できるので、それほど問題とはならないが、1 については機種によってはテキストファイルの作製が困難な場合がある。