

## 検量デザインと分析値精度の関係について

松田りえ子<sup>#</sup>・林 譲・佐々木久美子・豊田 正武

## Relationship between design of calibration and precision of measurement

Rieko Matsuda<sup>#</sup>, Yuzuru Hayashi, Kumiko Sasaki and Masatake Toyoda

The method to estimate the confidence interval of calibration line was established. The method used the variance of measurement that can be predicted based on the background fluctuation. The validity of the estimated confidence interval was verified experimentally. The relationship between the calibration design and the analytical precision can be predicted with this method. The ill-designed calibration line deteriorates the trueness of the measurement as well as the precision.

**Keywords :** calibration, measurement precision

(Received May 30, 1997)

精密度または精度は、真度と共に分析値の品質の指標として重要であり、分析法バリデーションにおいても、分析精度を保証することが求められている。このために分析法の操作条件の設定に多くの注意が払われており、また、分析機器においても精度に影響する条件をコントロールすることが求められている。一方、多くの分析法では既知濃度の標準品の信号と比較して濃度を求める、つまり検量線によって試料中の分析対象の濃度を推定することが一般的である。従って、最終的に求められた分析値には分析操作による誤差に加えて検量線から生じる誤差も含まれる。特に製剤の分析のように、前処理操作からの誤差の寄与が小さい分析においては、この影響は大きい、あまり考慮されていないように思われる。本報告では検量線のデザインの分析の精度に対する影響について述べる。

### 1. 検量線の信頼区間の推定

検量線による誤差は、検量線の95%信頼区間として表すことが可能である。95%信頼区間とは、100本の検量線を作成したときに95本が含まれる範囲である。信頼区間は各測定点の測定精度と関係しており、大きな測定誤差を持つ方法で作成した検量線はその信頼区間が大きい。通常、信頼区間は、検量線と個々の測定点との距離から測定分散を推定し、それに基づいて計算される。一般的には各測定点の分散は全て等しいと仮定している。測定値から推定した分散はカイ2乗分布に従った分布を示すが、一般的な検量線で用いられる程度の測定点の数(5~20)はそれほど多

くないので、推定した分散の分布範囲が大きく、信頼区間の推定精度はあまりよくない。測定値の真の分散が精密に推定できれば、検量線の信頼区間も精密に求められる。また、従来の信頼区間の推定においては、各測定点の分散は全て等しいつまり等分散性を仮定しているため、信頼区間は検量線の重心で最も狭くなる。従って、検量線による推定の精度は重心付近が最も高い。しかしながら、測定法によっては測定対象物濃度にもよって測定精度も変化する(非等分散性)ため、真の信頼区間は異なった形となる。検量線の信頼区間を正確に推定するためには、各検量点における測定値の分散の大きさを正確に知らなくてはならない。

### 2. 濃度と測定精度の関係

我々はすでに、分析機器の出力の揺らぎから測定値の分散を精密に推定する方法を確立した<sup>1)</sup>。この方法では、ベースライン部分をFourier変換し、揺らぎをパラメータ化する。このようにして得られたパラメータを用い、信号に含まれる誤差の影響を推定する。これを用いて、実際の測定値の誤差と測定値の関係はどのようなものであるかを検討した。

高速液体クロマトグラフィ(HPLC)では測定対象物の濃度が低い範囲では、ピーク面積値の標準偏差はほぼ一定である。濃度が非常に高くなると、バックグラウンド揺らぎによる誤差よりも、注入誤差の影響が顕著になり、標準偏差が増加し、RSDが一定の値に近づく。

一方、原子吸光ではHPLCと異なり、濃度の増加と共に標準偏差が増加する。原子吸光の各濃度でのノイズレベルは、信号強度と共に増加し、このノイズの増加が測定値の誤差の原因となる。

このような、測定値が等分散性と非等分散性を示す2つ

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed: Rieko Matsuda; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158 Japan; Tel: 03-3700-1141 ext 334; Fax: 03-3707-6950; E-mail: matsuda@nihs.go.jp  
本ステートメントは、日本薬学会第117回レギュラトリーサイエンス討論会(1997,4,東京)にて発表したものをまとめたものである。

の手法において、検量線の信頼区間を推定した。また、実際の測定を繰り返して、3000本の検量線を作成した。このように推定した信頼区間の中には実測した検量線がほぼ収まり、この信頼区間が正当であることが分かる。HPLCの検量線の信頼区間は、検量線の重心付近で最も狭く、原子吸光では重心よりも低濃度側に最も狭い点が現れ、高濃度側で信頼区間が広がった。

実際に測定した検量線から、従来法により信頼区間を推定すると、大きなバラツキを示した。以上から、バックグラウンド揺らぎから推定した検量線の信頼区間は、正確でありまた精密であることが確認された。

### 3. 検量線とデザインと分析精度の関係

検量線の信頼区間の精密な推定法の確立により、検量のデザインと精度の関係を明らかにすることが可能となった。まず、測定点の数を同じにして、濃度範囲を大きくしたときの信頼区間を考える。測定値の分散が一定と考えられるHPLCにおいては、最も信頼区間が狭くなる場所は、高濃度側に移動するが、信頼区間のはばにの最小値は変化しない。低濃度の部分では検量線の区間を広げたことにより、信頼区間が広がり精度が低下する。一方、測定値の分散が濃度と共に増加する原子吸光では、検量線の濃度範囲を大きくすると信頼区間のはばが広がり、低濃度では2倍程度大きくなる場合がある。このように、濃度範囲を過度に大きくすると、低濃度側でかえって誤差が非常に大きくなる場合がある。

標準添加法では、常に検量線を外挿した点で未知試料濃度を推定するために、通常の検量線の場合よりもデザイン

が与える影響は大きい。原子吸光分析の例では、添加量のデザインが不適切である場合には、非常に推定の精度が低下する。

検量線または標準添加法を用いて推定した濃度の分布をモンテカルロシミュレーションにより求めた。検量線の中心部で推定した濃度は、ほぼ対称で正規分布に近い分布を示し、その平均値も真の値と一致した。しかし、信頼区間が広い検量線の端あるいは標準添加法を用いて推定した値は、非対称分布を示し、さらにその平均値あるいは再頻値が、真の値からずれている。従って、このような分析では、精度と共に真度が保証されなくなる。

以上述べたように、検量線のデザインは分析値の真度、精度に影響する。バリデーション時には、分析を繰り返して真度、精度を推定するが、検量線の信頼区間の推定値はバラツキが大きく、また、検量線を繰り返し測定して、信頼区間を求め、さらにこのような推定値の真度を求めるためには、膨大な回数が必要となる。今回、紹介した機器のノイズからの分析誤差と検量線信頼区間の推定法を用いれば、分析の真度、精度が容易に求められ、また必要な真度、精度を得るための検量線の設計も可能となる。

分析対象の濃度がおおよそ推定できるならば、目的とする濃度での誤差がなるべく小さくなる様なデザインを考慮する。測定対象濃度範囲が広いときには、適切に分割した検量線を用いる必要がある。

### 文 献

- 1) Hayashi, Y. and Matsuda, R.: Anal. Chem., 66, 2874~2881 (1994)