

## Review

## ISO 11843 Part 7 : ビジネス戦略としての検出限界推定法

小谷 明<sup>\*1</sup>、楠 文代<sup>\*1</sup>、林 譲<sup>\*2</sup>

## ISO 11843 Part 7: Method for Estimating Detection Limit as Business Strategy

Akira Kotani<sup>1</sup>, Fumiyo Kusu<sup>1</sup>, Yuzuru Hayashi<sup>2</sup><sup>1</sup>Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392<sup>2</sup>Teikyo Heisei University, 4-1 Uruidominami, Ichihara, Chiba 290-0193**Abstract**

ISO International Standards are strategic tools for business that reduce costs by minimizing waste and errors and increasing productivity. This paper takes ISO 11843 Part 7: Methodology based on stochastic properties of instrumental noise. This standard provides a method to estimate the detection limit from the noise and signal data involved in a chromatogram with no recourse to repeated measurements of real samples. Determination of epichatechin in HPLC with electrochemical detection is taken as an example. ISO 11843 Part 7 will help to improve global environments by saving time, energy, material and human efforts that would be required by repetition.

**Keywords:** Detection limit, FUMI theory, ISO11843-7, Precision

**1. 緒言**

分析法の信頼性を保証する方法論である分析法バリデーションの分析能パラメータは検出限界を含んでいる。定義により[1,2]、検出限界は測定値の標準偏差 (SD) から算出される。しかし、SDを求めるためにくり返し測定を採用すれば、その作業は煩わしいものとなる。一定な測定環境の維持、物質、エネルギー、時間、労力などが要求されるからである。幸いなことに、2012年6月に発行された国際標準化機構 (ISO) の国際規格 ISO 11843 Part 7 には、くり返し測定なしに検出限界を求める方法が採用されている[1]。対象はクロマトグラフィーなどの機器分析に限定されるが、この規格を用いれば、物質、エネルギーなどが節約できるため、地球環境の保全にも貢献できると考えられる。

ISO の英語表記は International Organization for Standardization であり、この頭字語は IOS であり、ISO ではない。ISO は isotope, isocratic などの接頭辞であるギリシャ語の isos

(均等) に由来する表記である。ISO は異なった言語に翻訳されると、異なった記述、略号となる。しかし、ISO はどのような言語、地域においても、常に ISO と表記される。

ISO から出版される国際規格は、物質、製品、工程、サービスが目的に適うように、必要事項、ガイドライン、仕様、特徴などを提供する文書であり、製品およびサービスの安全性、信頼性、品質を保証する[3]。ビジネスにおいては、ISO の国際規格は無駄と間違いを最小にし、生産力を向上させることにより、コストを削減する戦略となりえる[3]。

ISO 11843は検出限界を求めるための理論、方法論を収載したシリーズであり、7つのパートから成る (2012年8月現在)。Part 7 には、分析機器のベースラインノイズの確率論的性質から検出限界 (測定値の SD) を求める方法論として FUMI 理論 (Function of Mutual Information) が採用されている。検出限界に近い低濃度サンプルの測定値の誤差の主要な要因がベースラインノイズである分析機器には、FUMI 理論が

\*1東京薬科大学 〒192-0392 東京都八王子市堀之内1432-1

\*2帝京平成大学 〒290-0193 千葉県市原市うるいど南4-1

適用できる。このような機器には、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、原子吸光分析法などがある。

ISO の規格である限り、科学技術的、経済的、社会的な利益をもたらすことが必要条件である。たとえば、FUMI 理論の最も重要な利点は、1 回の測定データ（クロマトグラムなど）に含まれるノイズとシグナルに関する情報から測定値の SD を推定できることにある。貴重なまたは高価なサンプルにおいてはくり返し測定は現実的ではないし、短寿命のラジオアイソトープでは、原理的に不可能である。FUMI 理論はくり返し測定を回避することにより、エネルギーなどの節約、最終的には地球環境の保全に資することが期待できる。

本稿は、FUMI 理論の原理と応用例を記述する。原理は、ホワイトノイズ、マルコフ過程などを含む確率過程論とフーリエ変換であり、応用例は、電気化学検出 HPLC によるカテキン類の分析である。

## 2. ISO 11843 シリーズ

ISO 11843 は検出限界の理論と実践に関するシリーズ規格であり、日本語翻訳規格もあるので合わせて紹介する。ISO 11843 シリーズは 7 つのパートから成っている（2012 年 8 月現在）：

Part 1: Terms and definitions

Part 2: Methodology in the linear calibration case

Part 3: Methodology for determination of the critical value for the response variable when no calibration data are used

Part 4: Methodology for comparing the minimum detectable value with a given value

Part 5: Methodology in the linear and non-linear calibration cases

Part 6: Methodology for the determination of the critical value and the minimum detectable value in Poisson distributed measurements by normal approximations

Part 7: Methodology based on stochastic properties of instrumental noise

2012 年 8 月現在、Part 6 は ISO で検討中であるが、他の

パートは全て出版されている。Part 1 は、検出限界に係る用語の定義が記載されている。Part 5 は、検量線が非線形の場合（競合法 ELISA など）の検出限界の定義と算出法を収載している。これは、検量線が線形の場合（Part 2）の概念を含むより一般的な方法論を記述している。Part 7（下線）は、本稿で取り上げる国際規格である。

ISO 11843 の日本語翻訳規格は日本規格協会から発行されている日本工業規格 JIS Z 8462（測定方法の検出能力）であり、次の 5 部から成る（2012 年 8 月現在）：

第 1 部：用語及び定義

第 2 部：検量線が直線である場合の方法

第 3 部：検量線がない場合に応答変数の限界値を求める方法

第 4 部：与えられた値が検出可能か否かの判定方法

第 5 部：検量線が線形及び非線形である場合の方法

JIS 規格の部は ISO 規格の Part に対応している。第 7 部の翻訳作業は現在進行中である（2012 年 8 月現在）。

ISO の用語（英語）とその JIS 翻訳規格の用語（日本語）は、分析化学で通常使われる用語と大きな違いがある。表 1 は、分析化学、ISO、JIS の対応する用語を示している。ISO が科学、技術、経済など広い分野における普遍性を重視し、化学だけに限定した用語を使わないことが相違の理由である。

分析化学で使われる「検出限界」は、JIS では「検出可能な最小正味状態変数値」であり、正味状態変数とは検量線の X-軸（たとえば、濃度、重さ）に対応する。検量線の Y-軸は測定値であるが、ISO の用語は応答変数またはレスポンス変数である。分析機器の出力をレスポンスということがあるが、応答変数はクロマトグラムまたはチャートの信号強度ではない。事実、JIS Z 8462 第 1 部の記述は、「検出に分光光度法を用いるクロマトグラフィが適用されるときには、応答変数はピーク高さ、又はピーク面積となる」である。「クロマトグラフィ」は原文のまま記載しているが、本稿では、「クロマトグラフィー」を用いている。

次の項で紹介する検出限界の定義は、ISO 11843 シリーズ「測定方法の検出能力」の Part 5 と Part 7 に記載されてい

表 1. 分析化学と ISO における検出限界に係る用語の定義

分析化学用語	ISO 用語（日本語は JIS 用語）
検出限界 Limit of detection	検出可能な最小正味状態変数値 Minimum detectable value of the net state variable
判定限界 Limit of decision	正味状態変数の限界値 Critical value of the net state variable
測定値—検量線の Y-軸 Measurement	応答変数、レスポンス変数 Response variable
濃度、重さ—検量線の X-軸 Concentration, Weight	正味状態変数 Net state variable

JIS Z 8462-1 と文献[2]により作成。

る。この規格を作成した ISO の組織は Technical Committee TC 69 (統計的方法の適用) のサブグループ Subcommittee SC 6 (測定方法と測定結果) であり、統計学と分析化学の専門家集団である。本稿の検出限界の定義は日本薬局方の分析法バリデーション、分析化学の専門書[2]の定義と同等である。

本稿では、化学の用語を主に使う。「濃度」と書かれていても、厳密には、「正味状態変数」を表す。つまり、濃度は検量線の X-軸であり、重さの場合もある。このような場合、一般的な量を表す ISO の正味状態変数は便利な表現である。

### 3. ISO 11843における検出限界の定義

定量分析の最終目的の量は濃度推定値であることから、検出限界は濃度の単位で定義されている。そこで、濃度推定値の分布から話を始める。

液体クロマトグラフィーの場合、注入誤差、検出器のノイズ、光源のゆらぎ、流路の温度のゆらぎなどが測定値に影響する。同一条件でくり返し測定を行うと、測定値は測定ごとに異なった値を取り、測定値全体はある分布を示す。この測定値を検量線で濃度に変換すると、濃度推定値の分布が得られる。Figure 1 には、濃度推定値の分布が模式的に描かれている。

ブランクサンプルと検出限界の分析対象物質を含むサンプル (検出限界サンプル) の測定値はどちらも正規分布に従うと仮定する。実際に、HPLC とキャピラリー電気泳動では測定値の正規性が観測されている[4]。検量線が直線であると、検量線によって測定値を変換した濃度推定値の分布も正規となる。本稿は検量線が直線である機器分析に焦点を絞ることから、濃度推定値の分布も正規であることを前提とする。し

かし、競合法 ELISA のように検量線が非線形であると、濃度推定値の分布は正規とはならない[5,6]。この場合の検出限界の推定法は ISO 11843 Part 5 に記述されている。

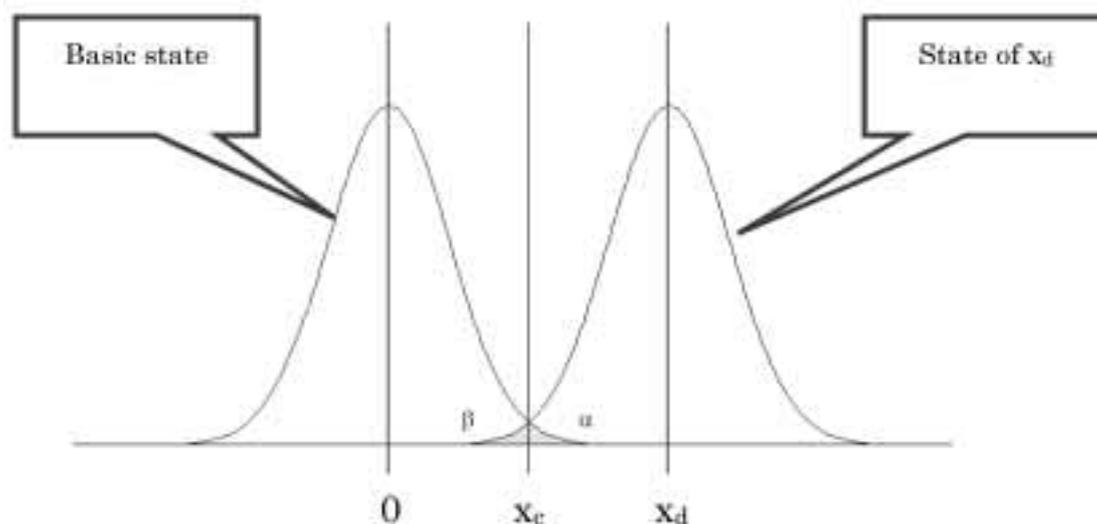
ブランクサンプルの濃度推定値の平均は 0 であり、検出限界サンプルの濃度推定値の平均は検出限界  $x_d$  である (Figure 1 の左と右)。分析系がブランク濃度推定値の分布を示す場合、分析系は基底状態 (basic state) にあるという。検出限界濃度推定値の分布を示す場合は、分析系は検出限界の状態 (state of  $x_d$ ) にあるという。

濃度 0 と検出限界の間には、判定限界  $x_c$  が定義されている[1,2]。判定限界は、2つの確率  $\alpha$  と  $\beta$  を規定する。 $\alpha$  は第 1 種の誤りの確率であり、ブランクサンプルを測定したとき、濃度推定値が判定限界より大きくなる確率である。翻訳規格 JIS Z 8462-1 では、次のように記述されている。 $x_c$  は、「その値を超えると、あらかじめ定めた誤りの確率  $\alpha$  で、観測した測定対象系が基底状態ではないと判定される正味状態変数 X の値」である。

$\beta$  は第 2 種の誤りの確率であり、検出限界サンプルを測定したとき、濃度推定値が判定限界より大きくなる確率が  $1 - \beta$  である。JIS Z 8462-1 では、検出限界  $x_d$  は、「確率  $(1 - \beta)$  で測定対象系が基底状態にないと判定される、実際の状態における正味状態変数 X の真の値」と定義されている。研究室においては、検出限界  $x_d$  は実験的に求めるので、 $x_d$  は推定値であり真の値を知ることはできない。そこで、JIS の記述は「X の値」ではなく、「X の真の値」となっている。

判定限界  $x_c$  と検出限界  $x_d$  を次のように記述する[1]：

$$x_c = k_c \sigma_x \quad (\text{式 1})$$



**Figure 1.** Probability distribution of estimated concentration in the basic state (left) and in the state of detection limit (right).

$\alpha$  denotes the probability of the basic state being above  $x_c$  and  $\beta$  the probability of the state of  $x_d$  being below  $x_c$ .

$$x_d = x_c + k_d \sigma_x \quad (\text{式 } 2)$$

ここで、 $k_c$  と  $k_d$  は定数であり、 $\sigma_x$  は濃度推定値の分布の標準偏差である。ISO 11843 Part 7 では、濃度推定値の標準偏差は濃度に関わらず一定であると仮定している。濃度 0 から検出限界の間の狭い範囲では、濃度推定値の SD は一定であると仮定しても実践的には問題はない。

濃度推定値の分布が正規であると、確率  $\alpha$  と  $\beta$  を把握しやすい。正規分布の性質から、 $k_c = k_d = 1.65$  とすれば、 $\alpha = \beta = 0.05$  (= 5%) である。式 1 と式 2 は、次のようになる：

$$x_c = 1.65 \sigma_x \quad (\text{式 } 3)$$

$$x_d = 3.3 \sigma_x \quad (\text{式 } 4)$$

となる。ここで、式 4 は

$$\sigma_x / x_d = 1/3.3 \quad (\text{式 } 5)$$

と変形できる。 $\sigma_x / x_d$  は濃度推定値の相対標準偏差 (RSD) を表すので、式 5 は検出限界サンプルの濃度推定値の RSD は 0.3 であることを示している[1]。つまり、検出限界を見つけるには、濃度推定値の RSD が 30% となる濃度を探せばよい (後述)。

ISO 国際規格の目的の一つは間違いを最小にすることである[3]。 $\alpha$  と  $\beta$  は判定の誤りの確率であるから、この確率を低くするためには、定数  $k_c$  と  $k_d$  を大きくすればよい。たとえば、 $k_c = k_d = 10$  とすれば、誤りの確率はほとんどゼロとなるが、微量な危険物質の混入を検出できる可能性は非常に低くなる。そこで、誤りの確率 5% は許容するとして、 $k_c = k_d = 1.65$  とすることが多い。もちろん、濃度推定値の分布が正規であると仮定した話である。

実験的な容易さから、濃度推定値の分布よりも、測定値の分布の方が取り上げられることが多い。しかし、ISO では、検出限界は濃度の単位で定義されている。測定値の単位 (吸光度、電流など) では定義されていないことに注意が必要である。一方、判定限界は測定値と濃度のどちらの単位でも定義されている。

検量線が原点を通る直線である限り、測定値の分布を濃度推定値の分布に変換すると、Figure 1 の  $\alpha$  (Basic state の分布で、 $x_c$  以上の確率) と  $\beta$  (State of  $x_d$  の分布で、 $x_c$  以下の確率) の値は、測定値の分布においても濃度推定値の分布においても同じである。しかし、非線形の検量線の場合、この変換は  $\alpha$  と  $\beta$  の値を変える可能性がある。そこで、定義の一般性を保持するために、ISO 11843 Part 5 と Part 7 では、検出限界の定義は、Figure 1 のように、濃度推定値 (検量線

の X-軸) に基づいている。濃度推定値の分布と測定値の分布が大きく異なる場合、たとえば、競合法 ELISA の分野では、ISO 11843 Part 7 発行以前から、検出限界の議論は濃度推定値の分布だけに基づいて行われていた[6]。

#### 4. ISO 11843 Part 7 の必要性

ISO の規格作成は、提案された題材の規格としての必要性を議論することから始まる。ISO 11843 Part 7 の科学技術的、経済的、社会的な利益については、緒言で簡単に述べた。本項では、科学技術的な側面について付け加える。検出限界は、それ自体が推定値であるため誤差を含む。少ない労力でこの誤差をできる限り小さくすることが、ISO 11843 Part 7 の目的の一つである[3]。

Figure 2 は、アセトアミノフェンの同一サンプルを同一の HPLC システムで 1 日に 6 回測定し、その測定値の SD (○) を 7 日間分プロットしたものである。分析法バリデーションにおける併行精度の日間変動、または試験日時だけを変えた室内再現精度である。Figure 2 の SD 推定値のバラツキの解釈としては、次の 2 つが考えられる[7]：

解釈 A：このバラツキは、使った HPLC 装置の調子の日間変動を表している；

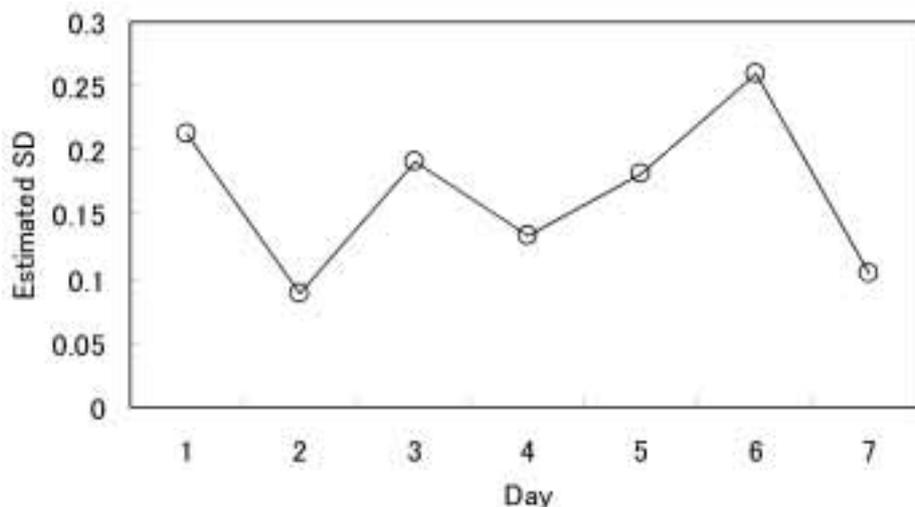
解釈 B：使った HPLC 装置の調子は 7 日間一定であり、このバラツキはくり返し測定によって求めた SD 推定値自体のバラツキを表している。

つまり、「HPLC 装置の調子を測定値の SD として表す場合、Figure 2 の HPLC 装置の調子は SD 推定値のバラツキのように日間変動するのか、あるいは、安定していて日毎に変化しないのか？」という問題である。

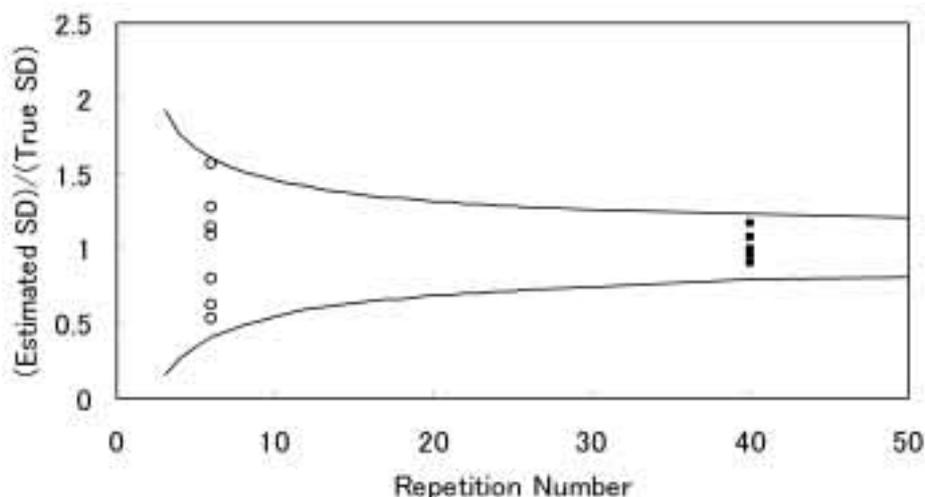
サイコロの目の SD は約 1.71 であるが、有限の数 (たとえば  $n = 6$ ) のくり返し実験から求めた SD 値は、求めるたびに異なり、1.71 の周りに分布する。同様に、同一の正規分布の母集団から独立な 6 回のサンプリングで得られた値 (6 個の正規乱数と考えてもよい) から計算した SD 値も、求めるたびに異なり、真の SD 値の周りに分布する。6 × 100 回の独立なサンプリングを行い、100 個の SD 推定値を求めたと仮定する。100 個の推定値は真の値の周りに分布するので、95 個の推定値を含み、残りの 5 個の推定値が外にある区間が存在する。この区間を 95% 信頼区間という。

正規分布の SD 推定値 (厳密には分散の推定値) の 95% 信頼区間はカイ 2 乗分布として知られている。Figure 3 の曲線は、標準偏差の真の値を 1 としたときの 95% 信頼区間を表している[7]。くり返し数  $n$  が大きくなるに従って、95% 信頼区間は狭くなる。つまり、SD 推定値が真の値に近い確率が増す。たとえば、 $n = 6$  では、95% 信頼区間は約 0.4 ~ 1.6 であり、下限と上限の比は 4 倍である。しかし、 $n = 40$  では、95% 信頼区間は約 0.75 ~ 1.25 であり、下限と上限の比は約 1.6 倍である。

Figure 2 の SD 推定値をその平均で割り、Figure 3 の  $n = 6$



**Figure 2.** Daily change in SD estimates (○) of measurements in HPLC analysis of acetaminophen [7]. Samples for repetition are 10 ng/L acetaminophen. Six measurements are consecutively obtained a day for SD estimation and this series of measurements are repeated for seven days to give seven SD estimates (○). 日本薬学会 YAKUGAKU ZASSHI 第122巻第10号849頁より転載。



**Figure 3.** 95% Confidence intervals ( ) of SD estimates from Chi-square distribution and distributions in experimental SD estimates (○ and ■) [7].

○: data from Figure 2; ■: data from the FUMI theory. 日本薬学会 YAKUGAKU ZASSHI 第122巻第10号851頁より転載。

の位置でプロット (○) すると、すべての推定値 (○) が95%信頼区間に含まれていることが分かる。これより、上記の解釈はBが正しいと結論してよいだろう。厳密に言えば、この実験データからでは、解釈AとBのどちらか一方だけを選択することはできない。しかし、もし装置の安定性に観測可能なくらい大きなバラツキがあれば、Figure 3の95%信頼区間から大きくはみ出す推定値 (○) が見られる可能性が高いからである。

現実には、測定装置の環境をできる限り一定に保ち、同一サンプルを測定しても、SD推定値はFigure 2のようにばら

つく。

分析機器の調子が一定であれば、真の検出限界も一定であると考えるのが自然である。しかし、測定値のSD推定値はくり返し実験ごとにばらつく。検出限界はSD値の定数倍(式4の3.3)であるので、この3.3は固定するとしても、実験的に求めた検出限界は、 $n = 6$ では、4倍くらい異なる可能性がある (Figure 3の曲線を参照)。Figure 2とFigure 3における7個のSD推定値 (○) の最小と最大の比は3倍強、4倍弱であることから、この可能性は納得がいく。検出限界が4倍異なる可能性は、分析化学的に許容できるだろうか。

真の検出限界が1 mg/L、測定対象物質の濃度が10 mg/Lであると仮定する。簡単のために、測定値はばらつかないと仮定する。n = 6の場合、SD推定値の95%信頼区間は0.4~1.6であるため、検出限界推定値が0.4~1.6 mg/Lの間で変動しても、濃度10 mg/Lの物質はほとんどの場合で「検出された」と結論できるだろう。次に、測定対象物質の濃度が1.5 mg/Lである仮定する。この物質は検出限界以上であるが、実際の測定結果は検出と不検出が混在することになる。なぜならば、検出限界が上記のようにばらつくからである。

Figure 3の●は、ISO 11843 Part 7の方法から求めたSD値をプロットしたものである。これらのSD値のばらつきの程度(約0.75~1.25)から、その信頼区間を推定すると、95%信頼区間はn = 40の区間(0.75~1.25)に相当すると推定できる(Figure 3より)。すると、上記の問題の検出限界(1 mg/L)は95%信頼区間0.75~1.25 mg/Lの間で変動すると考えられる。この場合、濃度1.5 mg/Lの測定対象物質を測定すると、ほとんどの場合、検出と判定されるだろう。つまり、本来検出すべき物質を、確実に検出できるのである。

このISOの方法は、実サンプルのくり返し測定を省略できるが、クロマトグラムのデジタルデータを必要とする。これまでの実験データから、ノイズデータとして最低256ポイントが必要であることが分かっている。256ポイントのノイズデータをクロマトグラムから抽出することは容易であるが、くり返し測定で同等な信頼性を持つSD値を得ることは現実的にはほとんど不可能である。なぜならば、n = 40のくり返し数が必要だからである。

性能の良い測定装置を使用できれば、検出限界の推定値の曖昧さを考慮する必要はない。しかし、検出限界と測定対象物質の濃度が近い場合には、検出・不検出の判定が信頼できなくなるため、検出限界推定値の曖昧さを考慮する必要性が生じる。

## 5. FUMI理論の概観

FUMI理論は、分析機器の出力(時系列)はシグナルとバックグラウンドノイズの和であるというモデルを採用している[4]。くり返し測定においては、シグナルは測定毎に変化しないで常に同じ形(たとえば、決まった山型のピーク)を示すが、ノイズは毎回異なると仮定している。ただし、ノイズはランダムであるが、ある確率法則に従って出現するモデル(ホワイトノイズとマルコフ過程)を採用している。

測定毎に同じシグナルが出現するため、シグナルだけが分析機器から出力されれば、原理的には常に同じ測定値(面積値または高さ)が得られる。測定値の平均は真の値に等しく、測定値の標準偏差は0である。しかし、シグナルとノイズが同時に出力されると、測定は誤差を含む。シグナルが一定である限り、この誤差はノイズだけに起因し、面積測定値の誤差はノイズが作る面積(偽りの面積)に相当する。無限回の測定を仮定すれば、測定値の平均は、誤差が相殺される

ため、真の値と等しくなるが、測定値の標準偏差は、誤差の大きさを推定するため、ゼロではない有限の値となる。つまり、測定値の標準偏差は誤差の標準偏差と同じである。標準偏差の式には、個々の測定値から測定値の(真の)平均を引く項がある。これが、上記2つの標準偏差の同等性を表している。

以上を、簡潔にまとめる。FUMI理論では、ノイズが作る偽りの面積の標準偏差が測定値の標準偏差に等しい。

FUMI理論を実際に使うときのポイントを挙げる：

1. 実際のバックグラウンドノイズをモデルノイズ(ホワイトノイズ+マルコフ過程)で近似し、実際のノイズからモデルノイズのパラメータ(ノイズパラメータ)を抽出する；
2. 実際のシグナルから、シグナルの幅、頂点の位置などのパラメータ(シグナルパラメータ)を設定する；
3. FUMIの式にノイズパラメータとシグナルパラメータを代入し、測定値のSD(またはRSD)を計算する。

これら3つの段階を実行するための操作をFigure 4に示す。第1段階は、分析機器の実際のバックグラウンドノイズ(Noise (1/f noise))をフーリエ変換し、パワースペクトル(ギザギザの線)を作成することである。この実測パワースペクトルにモデルノイズ(White noise+マルコフ過程)の理論パワースペクトル(滑らかな線)を非線形最小2乗フィッティングすると、3つのノイズパラメータ( $\bar{w}$ ,  $\bar{m}$ ,  $\rho$ )が決定される。

第2段階は、シグナルに関するパラメータ(ピークの幅、面積、ゼロウィンドウ)を決定することである。ゼロウィンドウは、ピークの相対的なベースラインの位置(ゼロ点)を決定するための領域であり、この領域の出力強度の平均をゼロ点とする。シグナルパラメータはユーザが任意に指定できるが、ノイズパラメータは最小2乗法により自動的に決定される。

第3段階は、ノイズパラメータとシグナルパラメータをFUMIの式(Figure 4の式)に代入することである。この操作により、測定値のRSDが計算される。

パワースペクトルは、X軸が周波数、Y軸がパワー密度のグラフであり、ある周波数(Hz)を持つ波のエネルギーを示す。Figure 4またはFigure 5のパワースペクトル(ギザギザの線)を見ると、低周波の波のエネルギー(図の左側)は、高周波の波(図の右側)より大きいことがわかる。多くの自然現象のパワースペクトルは、このように右下がりである。特に、1/fゆらぎと呼ばれる現象は数多く知られていて、そのパワースペクトルは周波数fに反比例する[4]。1/fゆらぎをFigure 4またはFigure 5のように両対数で表示すると、そのパワースペクトルは傾き-1の直線になる。カラムクロマトグラフィーのベースラインノイズのパワースペクトルも1/fゆらぎに似ている場合がある。FUMI理論は、1/fゆらぎをホワイトノイズとマルコフ過程の混合確率過程で近似

する理論とも言える。

FUMI 理論においては、パワースペクトルはノイズパラメータを抽出するための手段である。自己相関関数を用いても目的は達せられるが、フーリエ変換して得られるパワース

ペクトルを使うことがほとんどである。分析機器のバックグラウンドノイズは、観測するごとに異なって見える (Figure 5 左)。これらのパワースペクトルのギザギザのパターン (Figure 5 右) も観測ごとに異なるが、これらにフィッティ

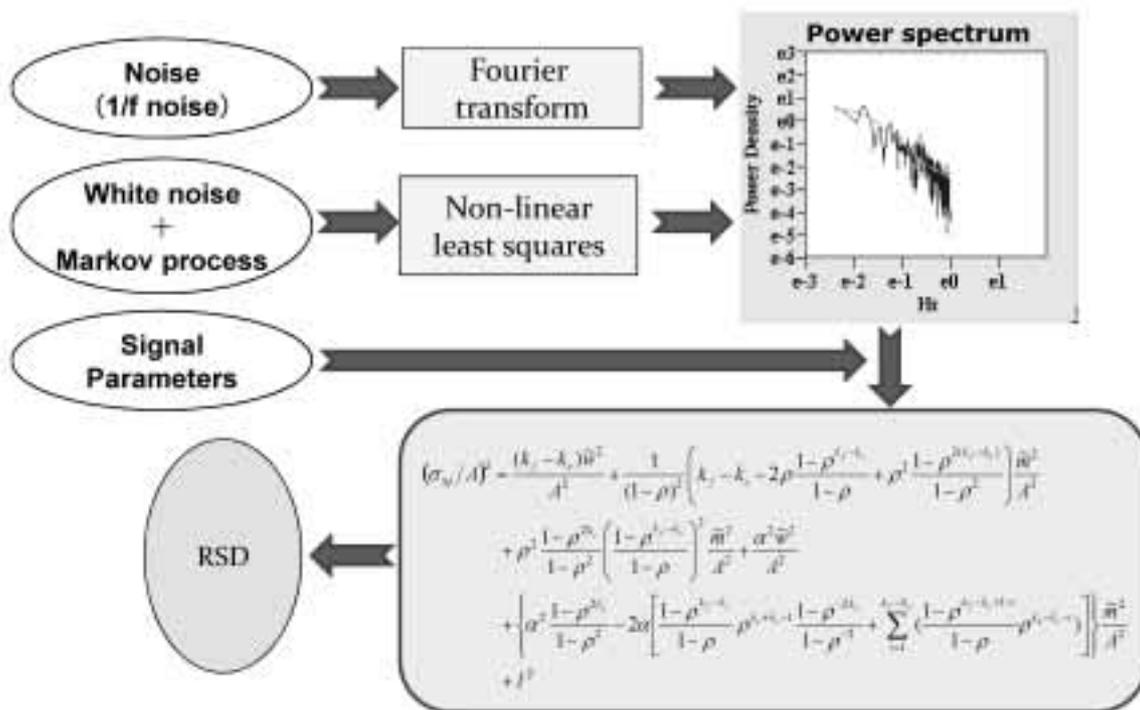


Figure 4. Principle of the FUMI theory.

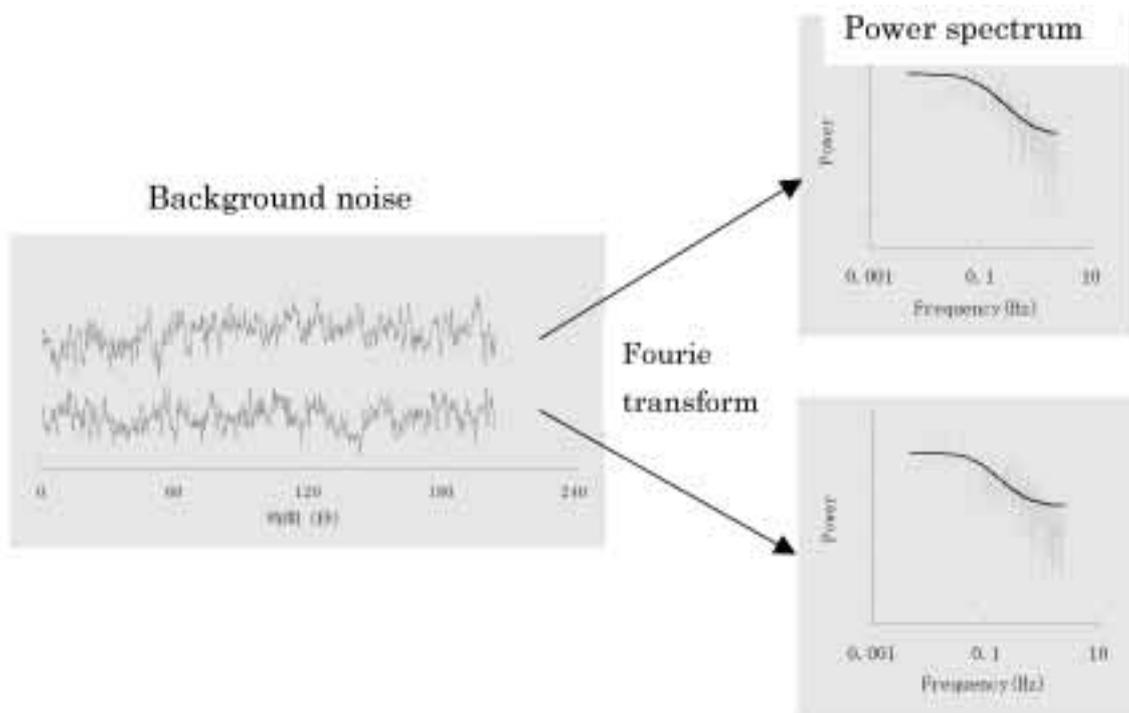


Figure 5. HPLC background noise (left) and its power spectrum (right).

ングした理論曲線 (Figure 5 右の滑らかな曲線) の傾き、位置はほとんど同じである。つまり、測定値の標準偏差はくり返し測定から得られることを考慮すると、パワースペクトルには、くり返し測定に関する情報が凝縮されていると考えられる。FUMI 理論は、この情報を最小 2 乗フィッティングで取り出し利用する。FUMI 理論はくり返し測定を回避できるが、代わりに、相当数 (たとえば、512ポイント) のデジタルのノイズデータを必要とする。

分析機器のバックグラウンドノイズのパワースペクトルは、その装置の状態が一定ならば、ほとんど同じパターン (傾き、位置) を示す (ノイズパラメータ ( $\tilde{w}$ ,  $\tilde{m}$ ,  $\rho$ ) はほとんど同じ)。逆に、装置の状態が変化すると、パワースペクトルのパターンも変化する。この性質を利用して、分析機器のルーチンチェックの指標としてパワースペクトルを用いることができる[4]。

測定値の RSD を計算するために必要な数学的方法は、フーリエ変換、パワースペクトル、非線形最小 2 乗法、FUMI の式である。これらを電卓で実施するのは不可能であるが、PC を使えば簡単である。フリーのソフト (TOCO) では、ノイズに関する領域とシグナルに関する領域をそれぞれマウスで囲めば、RSD と検出限界が自動計算される。西川計測の LC/GC Powered (Agilent Technologies の GC、LC、LC/MS (Single Quad) に搭載されている ChemStation 用のアドオンデータ解析・レポートソフトウェア) にも同様の自動計算が実施可能である。日本分光からは、クロマトグラフィーデータシステム (CDS) ChromNAV のオプションプログラムとして FUMI 理論精度計算プログラムが発売されている。

## 6. FUMI の式の導出

FUMI の式は、ノイズが作る偽りの面積の標準偏差を計算する式であることは前項で述べた。FUMI の式の導出は、次の手順で行う：

1. 時間  $i$  におけるノイズの強度を記述する；
2. ある時間区間におけるノイズの強度の和 (偽りの面積) を記述する；
3. 偽りの面積の分散 (標準偏差の 2 乗) を求める。  
ノイズの成分であるホワイトノイズの時間  $i$  での強度は

$$w_i \quad (式 6)$$

と表せる。ただし、時間は離散とする ( $i=0, 1, 2, \dots$ )。  $w_i$  は確率変数であり、通常関数のようにある値をとる。しかし、  $w_i$  は、観測するたびに異なった値を取ることが通常関数とは異なる。そのため、「ある時間  $i$  で  $w_i$  がある特定の値を取る」は意味を成さないが、  $w_i$  の分布、つまり、平均と標準偏差は定数として表せるので、「ある時間  $i$  で  $w_i$  がある特定の値以上の値を取る確率」は意味がある。

ノイズの測定は時間 0 から始まると仮定する。ノイズのく

り返し測定においても、どの測定も時間 0 から始まると仮定する。すると、時間  $i$  におけるノイズ強度  $w_i$  は、くり返し測定毎に異なるが、無限にくり返した測定における  $w_i$  をすべて集計すると、これらは平均 0、標準偏差  $\tilde{w}$  の正規分布を示す (ホワイトノイズの定義)。  $w_i$  の平均と標準偏差は、時間  $i$  について行うのではなく、  $i$  は固定して、くり返し測定について行うのである。これが、  $w_i$  の平均と標準偏差の意味である。  $w_i$  はアンサンブル平均と言われている。

一般的な確率過程としては、  $w_i$  の平均と標準偏差が、時間  $i$  に従って、変化しても問題はない。しかし、ホワイトノイズの定義では、  $w_i$  の平均と標準偏差は時間によらず一定である。

同様に、時間  $i$  でのマルコフ過程の強度は

$$M_i = \rho M_{i-1} + m_i \quad (式 7)$$

である。マルコフ過程は、1 ステップ前の時間  $i-1$  の強度  $M_{i-1}$  に定数  $\rho$  をかけた位置  $\rho M_{i-1}$  から出発し、  $m_i$  だけ移動する。  $m_i$  は平均 0 で標準偏差  $\tilde{m}$  のホワイトノイズであり、マルコフ過程の駆動力である。  $\rho$  は 1 未満 0 以上の値を取る。  $\rho = 0$  の場合は、ホワイトノイズである。ホワイトノイズは自己相関がなく、マルコフ過程は自己相関があると言われる。例えば、ホワイトノイズの軌跡は、サイコロの出た目をプロットしたものであり、マルコフ過程は、すごろくの位置をプロットしたものである。

FUMI 理論のノイズモデルでは、時間  $i$  におけるバックグラウンドノイズの強度は

$$Y_i = M_i + w_i \quad (式 8)$$

である。時間 1 から  $k$  までの区間でのノイズの強度の和は

$$F = \sum_{i=1}^k Y_i \quad (式 9)$$

であり、ノイズが作る偽りの面積を表す。

偽りの面積 (式 9) の平均は 0 である。なぜならば、  $F$  に含まれる  $Y_i$  は、ホワイトのノイズ  $w_i$  と  $m_i$  の和であり、ホワイトノイズの平均は 0 だからである。一方、偽りの面積の分散は 0 とはならない。偽りの面積の分散を

$$\text{Var}(F) = E[F^2] \quad (式 10)$$

と表す。ここで、  $E[Z]$  は、確率変数  $Z$  の平均を表す。

最後の問題 (上記手順 3) は、式 10 を  $w_i$  と  $m_i$  の関数として展開することである。マルコフ過程 (式 7) は時間 ( $i=0, 1, \dots, k$ ) ごとに次のように記述できる：

$$\begin{aligned}
 M_0 &= 0 \quad (\text{仮定}) \\
 M_1 &= m_1 \\
 M_2 &= \rho m_1 + m_2 \\
 M_3 &= \rho^2 m_1 + \rho m_2 + m_3 \\
 &\dots \\
 M_k &= \rho^{k-1} m_1 + \rho^{k-2} m_2 + \dots + \rho m_{k-1} + m_k
 \end{aligned}$$

式8から式10と、 $M_1$ から $M_k$ と $w_0$ から $w_k$ を利用すれば、ノイズが作る偽りの面積の標準偏差を、ノイズ ( $w_1, w_2, \dots, w_k, m_1, m_2, \dots, m_k, \rho$ ) とシグナルの幅  $k$  の関数として記述できる。この式は、確率変数としては、ホワイトノイズ  $w_i$  と  $m_i$  だけを含んでいるので、ホワイトノイズの基本的な性質を使うと解くことができる。

時間  $i$  のホワイトノイズと時間  $j$  のホワイトノイズは独立である。ホワイトノイズの平均は0であることを考慮すると、次の性質がある。

$$\begin{aligned}
 E[w_i] &= 0 \\
 E[m_i] &= 0 \\
 E[w_i w_j] &= 0, \text{ if } i \neq j \\
 &= \bar{w}^2, \text{ if } i = j \\
 E[m_i m_j] &= 0, \text{ if } i \neq j \\
 &= \bar{m}^2, \text{ if } i = j \\
 E[w_i m_j] &= 0
 \end{aligned}$$

これらの式を使えば、FUMIの式(文献[8]の式19)を導出できる。現在使われているFUMIの式は、ゼロウィンドウと水平でないベースラインを使って面積測定をした場合を考慮している[9,10]。

7. 電気化学検出 HPLC における検出限界推定の実践

カテキン類の電気化学検出 HPLC の検出限界推定をくり返し測定による方法と FUMI 理論による方法で実施した例を紹介する[11]。

7.1 くり返し測定による方法

カテキン類の電気化学検出 HPLC を用い、0.1  $\mu\text{mol/L}$  のエピカテキンについて5回のくり返し測定を行って得た5本のクロマトグラムを Figure 6 に示す。Figure 6 のクロマトグラムよりエピカテキンのピーク面積のRSDを算出したところ、2.14%であった。他に、0.5、0.3、0.05、0.03  $\mu\text{mol/L}$  のエピカテキンについても同様に5回のくり返し測定を行い、ピーク面積のRSDを算出したところ、それぞれ0.75%、0.93%、4.88%、6.92%であった。このように、くり返し測定により5濃度におけるRSD ( $n=5$ ) を求めるには、計12.5時間の測定時間を費やして25本のクロマトグラムを測定する必要がある。

くり返し測定により検出限界  $x_d$  を求める方法のひとつ

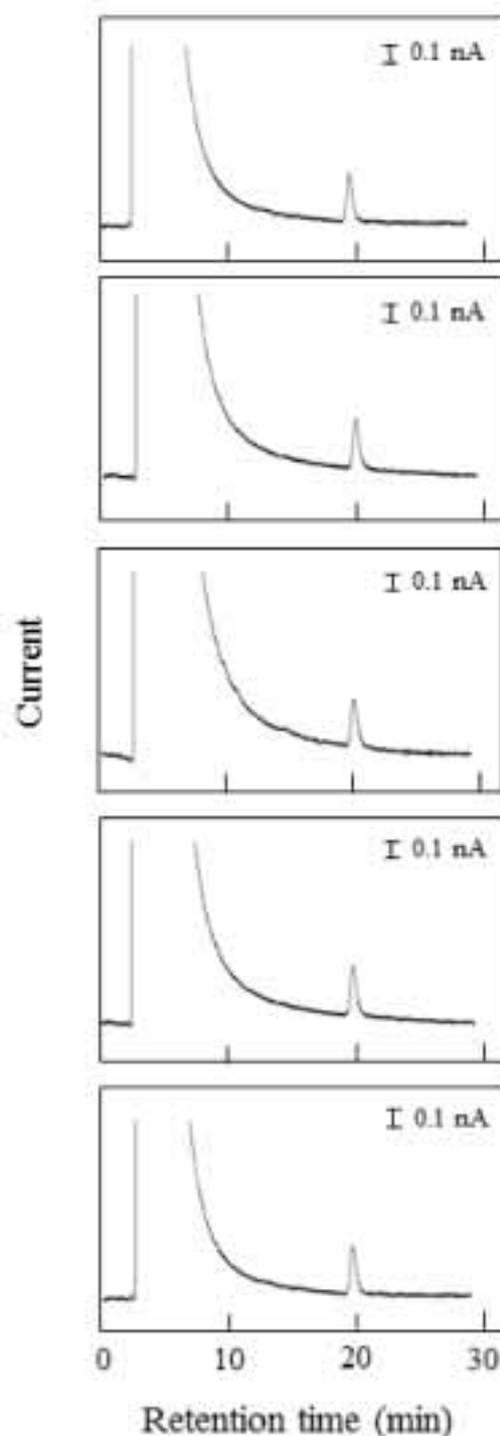


Figure 6. Chromatogram of each 0.1  $\mu\text{mol/L}$  epicatechin by HPLC with electrochemical detection.

HPLC conditions: mobile phase, acetonitrile - 0.1 mol/L phosphate buffer (pH2.5), (15:85, v/v); column, LiChrospher 100 RP-18 ODS column (250  $\times$  4.0 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ ); flow-rate, 0.45 mL/min; applied potential, +0.6 V vs. SCE (saturated calomel electrode).

して、『ブランク試料の測定値のSDと検量線の傾きから算出する方法』があり、以下の式で算出することができる。

$$x_d = 3.3\sigma / \text{slope} \quad (\text{式11})$$

ここで、 $\sigma$  はブランク試料の測定値のSD、*slope* は検出限界付近の検量線の傾きである。式11は式4と同じである。ただし、式11では測定値のSDを使っているが、検出限界の定義により濃度のSDを使う必要があるため、変換 ( $\sigma_x = \sigma / \text{slope}$ ) を行っている。これは、日本薬局方でも採用されている方法である。

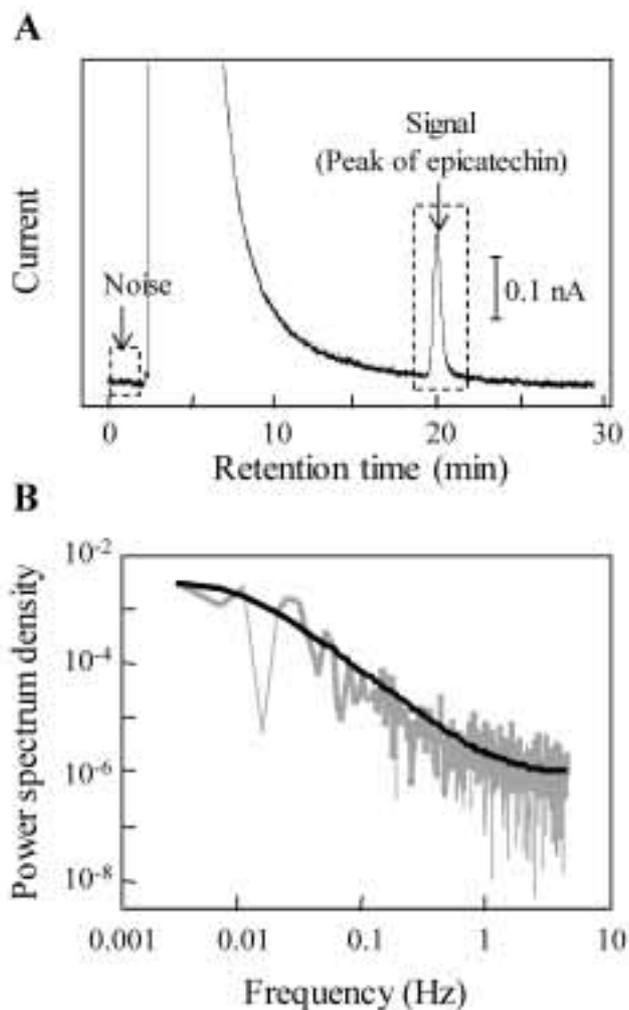
クロマトグラフィーの場合は、測定値のSDの代わりにノイズ・レベルを用いることができることも日本薬局方では規定されている。Figure 6のクロマトグラムのノイズ・レベルに基づき、エピカテキンの検出限界は、7.4 nmol/Lであると算出できる。この方法は簡便であるが、残念ながら、ISO 11843、JIS Z 8462、分析化学の本[2]などが基づいている統計的な定義(確率 $\alpha$ と $\beta$ )とは対応しないことが分かっている[12]。

## 7.2 FUMI理論による方法

FUMI理論による方法では、Figure 4に示した概観に従い、Figure 6のエピカテキンのクロマトグラムのうち1本を用いて、精度プロファイルを作成する。まず、第一段階では、エピカテキンのクロマトグラム (Figure 7 A、Noise) のベースラインノイズをフーリエ変換して得たパワースペクトル (Figure 7 B、ジグザグ線) に、シンプレックス最小2乗法によってFUMIの理論曲線 (Figure 7 B、曲線) をフィッティングさせる。Figure 7 BからFUMIの理論曲線と実測のパワースペクトルは、良好にフィッティングしていることがわかる。従って、電気化学検出HPLCのベースラインノイズもFUMI理論のモデルで近似でき、3つのノイズパラメータを決定できる。

第二段階では、エピカテキンのクロマトグラムのピーク (Figure 7 A、Signal) からシグナルに関するパラメータ (ピークの幅、面積、ゼロウィンドウ) を決定する。今回、Figure 7 Aのエピカテキンのピーク形状からピークの幅は516ポイント (103.2 sec)、ゼロウィンドウは10ポイント (2 sec) に決定した。第三段階では、決定されたノイズパラメータとシグナルパラメータをFUMIの式に代入し、エピカテキンの精度プロファイルが取得できた (Figure 8、実線)。これに、くり返し測定により求めたエピカテキンのピーク面積のRSDをプロットした (Figure 8、○)。FUMI理論による方法とくり返し測定による方法、各々の方法より得られたRSDはよく重なっており、電気化学検出HPLCの精度推定にFUMI理論が適用できることがわかる。

FUMI理論は1本のクロマトグラムだけを使うが、測定していない濃度についてのRSDも推定可能であることが大き

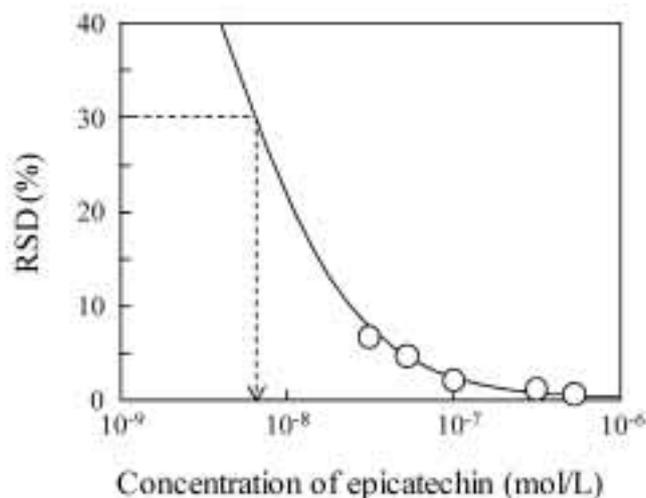


**Figure 7.** Chromatogram of epicatechin by HPLC with electrochemical detection (A) and its power spectrum of chromatographic baseline noise (B).

The smooth solid line in B indicates the best fit of the model power spectrum (white noise + Markov process) to the real power spectrum (zizag line).

な利点である。従って、精度プロファイルにおいて30%RSDから検出限界 ( $3.3\sigma$ ) を求めることができる。Figure 8のエピカテキンの精度プロファイルから、電気化学検出HPLCによるエピカテキンの検出限界は7.1 nmol/Lであると算出できる。

Figure 8の精度プロファイルを求めるために、くり返し測定 (○) では25個のサンプルと計12.5時間の測定時間が必要であるが、FUMI理論 (—) では1個のサンプルと0.5時間の測定時間が必要であった。両者が費やす物質、エネルギーの差は大きい。本項で示したカテキン類の電気化学検出HPLCは、ISO国際規格の意図がよく反映された例である。



**Figure 8.** Precision profiles for the determination of epicatechin by HPLC with electrochemical detection.

The observed RSD ( $n=5$ ) of epicatechin at each concentration is indicated by open circle. The predicted RSD of epicatechin based on the FUMI theory is indicated by a solid line. The arrow denotes the detection limit.

#### 8. おわりに

ISOのwebページにある文章を引用して、本稿を結びたい。“For business, ISO International Standards are strategic tools that reduce costs by minimizing waste and errors and increasing productivity.”ここで、ビジネスにおける戦略ツール、コストの削減、無駄、間違い、生産力がキーワードである。

#### 参考文献

- [1] ISO 11843 Part 7 Methodology based on stochastic properties of instrumental noise.
- [2] Miller, J. C.; Miller, J. N. 宗森信訳 データの取り方とまとめ方 共立出版 1993.
- [3] <http://www.iso.org/iso/home.html>
- [4] 林 譲;松田りえ子. HPLC分析の精度 林純薬工業 1999.
- [5] Hayashi, Y.; Matsuda, R.; Maitani, T.; Imai, K.; Nishimura, W.; Ito, K.; Maeda, M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1295–1301.
- [6] Dudley, R. A.; Edwards, P.; Ekins, R. P.; Finney, D. J.; McKenzie, I. G. M.; Raab, G. M.; Rodbard, D.; Rodgers, R. P. C. *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 1264–1271.
- [7] Iwagami, T.; Ueda, T.; Kimura, Y.; Morimoto, N.; Matsuda, R.; Hayashi, Y.; Imai, K. *YAKUGAKU ZASSHI* **2002**, *122*, 849–854.
- [8] Hayashi, Y.; Matsuda, R. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2874–1881.
- [9] Hayashi, Y.; Matsuda, R. *Chromatographia* **1995**, *41*, 75–83.
- [10] Poe, R. B.; Hayashi, Y.; Matsuda, R. *Anal. Sci.* **1997**, *13*, 951–962.
- [11] Kotani, A.; Hayashi, Y.; Matsuda, R.; Kusu, F. J. *Chromatogr. A.* **2003**, *986*, 239–246.
- [12] Matsuda, R.; Hayashi, Y.; Sasaki, K.; Saito, Y.; Iwaki, K.; Harakawa, H.; Satoh, M.; Ishizuki, Y.; Kato, T. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 319–327.