

IX 定量の基礎

IX-1 分析誤差

測定値から真の値を引いたものを**誤差 Error**

正（負）誤差 **Positive (Negative) Error** : 真の値より大きい（小さい）とき

相対誤差 **Relative Error** : 誤差を真の値で割ったもの、誤差率ともいう

許容誤差 **Tolerance** : 経験的に許容し得る範囲の誤差

Ex. 通常の容量分析（滴定）の誤差率は、**±0.1%**

IX-1-1 系統誤差 Systematic Error

繰り返し測定によって**一定の方向にほぼ同程度**に生ずる誤差（カタヨリ）。

原因をつきとめ、補正することができる。

- ・器 差- 量器の不良 *cf.* 許容範囲の誤差：公差
- ・試薬誤差- 不純な試薬等
- ・個人誤差- 未熟、不器用、注意力散漫、性格、感受性（鈍感・敏感）
- ・操作誤差- 誤った操作、失敗
- ・方法誤差- 方法自身に誤り（指示薬選択の誤り、反応や分離が不十分等）

IX-1-2 偶然誤差 Random (or Accidental) Error

同一条件で繰り返し測定によって**不特定の方向に同程度**に生ずる誤差（バラツキ）。真の値（平均値）の囲りに正規分布する。原因をつきとめることは不可能。従って、補正はできない。

IX-1-3 系統誤差補正法

1) 空試験 Blank Test

試料を加えず、他は同一条件で測定する。本試験との差が真の値。

* 目的成分以外の成分（不純物等）による影響を調べる

2) 対照試験 Control Test

試料成分と同じ物質（標準物質）、または性質の似ている既知物質を同一方法で測定する。

* 目的物質の量に比例する系統誤差に対して有効

*この操作を**較正 calibration** という

3) 添加回収試験 Addition Recovery Test

試料に既知量の目的成分を加えて測定し、回収率を調べる。

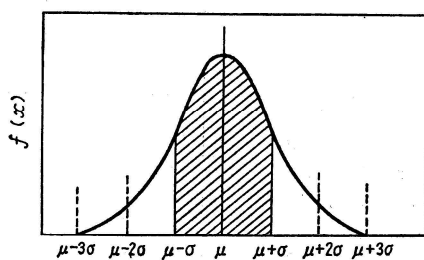
*試料が複雑な系 (**Ex.**血清、海水等) で、共存成分が目的成分と相互作用をするような場合の補正

Ex. A : 未知試料測定値 S : 添加量 (既知) B : 添加試料測定値 R : 回収率 (%)

とすると
$$R = \frac{B-A}{S} \times 100$$

IX-1-4 偶然誤差の取り扱い

補正はできないので、データの推計学的処理により真の値の範囲を推定したり、分析法の精度を評価する。ここで扱うデータの集団は通常、左右対称の分布 (正規分布 normal distribution) に従うものとする。このような曲線を正規分布曲線 (ガウスの誤差曲線) という。



正規分布

この分布の平均値を μ 、標準偏差を σ とし、図において横軸を x 、縦軸を $f(x)$ とすると、この曲線は次式のように表わされる。これを分布関数という。

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-(-\mu)^2/2\sigma^2}$$

a. 代表値

1) 平均値 Mean : \bar{x}

偶然誤差が正規分布に従えば、母平均は真の値に一致する。ただし、測定値には系統誤差がないこと。最もよく使われる。

2) 中央値 Median

データを大きさの順に並べたときの中央番目のデータ。データが偶数のときは中央の 2

個の平均値とする。

3) 中点値 Midrange

データの最大値と最小値の平均値。

4) 最頻値 Mode

データの中で度数が最大のもの。

b. バラツキの表示法

1) 標準偏差 Standard Deviation(SD) : σ

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

x_i : 個々のデータ \bar{x} : 平均値 n : 試料数

$\bar{x} \pm \sigma$: 68.3% $\bar{x} \pm 2\sigma$: 95.5% $\bar{x} \pm 3\sigma$: 99.7%

* 平均値の周りのバラツキの度合いを示す。平均値と同次元 (単位)。

* 平均値の絶対値が大きくなれば、標準偏差の絶対値も大きくなるため、標準偏差の値だけでデータを直接比較することができない。

* $s_x = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ を標準誤差 **standard error** という。

* 誤差の範囲を $\bar{x} \pm \sigma$ または $\bar{x} \pm s_x$ で表す。

2) 相対標準偏差 Relative Standard Deviation (RSD)

変動係数 **Coefficient of Variation (CV)** ともいう。

$$\text{RSD} = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100 (\%)$$

* **RSD** により、異なる分析方法によるバラツキ度合いの比較が可能となる。

3) 測定値の棄却 (異常値の棄却)

推計学的処理により異常データを捨てる : **棄却検定**

【例 1】 Goodwin 法 (4 d 法)

データ数 : 4 ~ 8 個、異常値 : 1 個 のとき適用可

\bar{x} : 異常値を除いた平均値 ($n-1$)個

x_i : 異常値以外の測定値

$$\bar{d} : \text{平均偏差} \left(= \frac{\sum |x_i - \bar{x}|}{n-1} \right)$$

x : 異常値

$|x - \bar{x}| > 4\bar{d}$ であれば棄却してよい。

【例 2】Dixon 法 (Dixon's Q)

データ数 : 3 個以上、異常値 : 1 個 のとき適用可

$$Q = \frac{\text{疑わしい値} - \text{最も近い値}}{\text{最大値} - \text{最小値}}$$

データ数により式はやや異なる

* Q 値が一定値を越えると“疑わしい値”を異常値として棄却してよい。

5) 有効数字 Significant Figures

位取りを示す 0 を除いた意味のある数字

IX-2 分析方法の評価 Validation of Analytical Procedures

医薬品の試験法に用いる分析方法が目的に合うかどうか (分析法の妥当性) を示すこと

IX-2-1 分析能パラメータ Validation Characteristics

分析法の妥当性を示すために評価することが必要なもの。→See 教科書表 4・2 (page 105)

1) 真度 (正確さ) Accuracy or Trueness

ある方法で繰り返し分析して得た測定値の平均値の真の値からの一定方向へのズレまたはカタヨリ (bias) の大きさ。測定値の総平均値と真の値との差。

2) 精度 (精密さ) Precision

均質な検体から採取した複数の試料を同じ方法で繰り返し分析して得た測定値のバラツキ (dispersion) の幅。測定値の分散、標準偏差または相対標準偏差で表される。

繰り返し条件の異なる三つのレベルで表される :

2-1) 併行精度 Repeatability or Intra-assay Precision

試験室、試験者、装置、器具、試薬のロットなどの分析条件を変えずに、均質な検体から採取した複数の試料を短時間内に繰り返し測定したとき (併行条件) の精度。

2-2) 室内再現精度 Intermediate Precision

同一試験室内で、試験者、試験日時、装置、器具、試薬のロットなどの一部またはすべての分析条件を変えて、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し測定したとき（室内再現条件）の精度。

2-3) 室間再現精度 **Reproducibility**

試験室を変えて、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し測定したとき（室間再現条件）の精度。

通例、室間（内）再現精度の値から分析法の採否を決定する。

3) 特異性 **Specificity**

共存成分の存在下で、目的成分を正しく測定（定性・定量分析）できること。分析法の識別能力を表す。

選択性 Selectivity とも呼ばれる

4) 検出限界 **Detection Limit (DL)**

試料に含まれる分析対象物の検出可能な最低の量または濃度のこと。検出限界では定量できるとは限らない。

測定値が正規分布し連続な場合、ブランク試料の測定値の標準偏差（ σ ）または機器のノイズレベルの 3.3 倍を検出限界付近の検量線の傾きで割った値で表される

$$DL = 3.3\sigma / slope$$

感度 Sensitivity と呼ぶこともある

Baseline noise を伴う分析法では、 $\frac{S}{N} = 2 \sim 3$ に相当する試料濃度を検出限界とするのが一般的である。ただし、S : signal、N : noise である。

5) 定量限界 **Quantitation Limit (QL)**

試料に含まれる分析対象物の定量が可能な最低の量または濃度のこと。定量限界の分析対象物を含む試料の測定値の精度は、通例、相対標準偏差で表して 10%である。

測定値が正規分布し連続な場合、ブランク試料の測定値の標準偏差（ σ ）または機器の

ノイズレベルの 10 倍を定量限界付近の検量線の傾きで割った値で表される

$$QL = 10\sigma / \text{slope} \quad \text{または} \quad \frac{S}{N} = 10 \quad \text{に相当する試料濃度}$$

注) DL、QL の定義式は日本薬局方の定義である (i.e. 他の定義もある!!)

6) 直線性 Linearity

物質の量 (濃度) と測定値 (滴定値、吸光度など) が正比例する分析法の能力のこと。量(濃度)の異なる数点の試料について繰り返し測定し、回帰式及び相関係数から評価する。

◇ 検量線 Calibration Curve

7) 範囲 Range

適切な精度及び真度を与える、分析対象物の下限及び上限の量または濃度に挟まれた領域のこと。通常、試験の規格値±20%程度でよい。

8) その他

頑健性 Robustness

分析条件 (pH、温度、時間、試薬量) を小さい範囲で故意に変化させても測定値が影響されにくい能力のこと。結果は数値の有効数字または留意事項として反映させる。

分析能パラメータには含まれないが、分析法を改善するのに有効。

IX-3 定量分析法の種類

IX-3-1 重量分析法 Gravimetric Analysis

目的物質を化学反応によって沈殿させ、沈殿の質量を測定することにより目的物質の量を知る。分離操作法によって 3 種類に分けられる。

揮発重量法 Volatilization Gravimetry

抽出重量法 Extraction Gravimetry

沈殿重量法 Precipitation Gravimetry

これらのうち、日本薬局方でよく用いられているのは、揮発重量法である乾燥減量試験法、強熱減量試験法、強熱残分試験法。

重量分析法の特徴

- ★質量測定（化学天秤）は体積測定（ビュレット）より精度が高い
- ★分離法の工夫により、容量分析より特異性を高くできる
- ★沈殿生成、乾燥などの前操作の精度は必ずしも高くない

IX-3-2 容量分析法 Volumetric Analysis

目的物質と反応する物質の一定量を含む溶液（＝標準液）を加え、反応が終了するまでに要した標準液の体積を測定することにより、目的物質の量を知る。この操作を**滴定 Titration**という。

直接滴定／逆滴定 Direct titration／Back titration

当量点 Equivalent point：反応が完結する点（理論値）

終点 End point：指示薬等によって反応の完結が認められる点

指示（薬）誤差：終点と当量点のズレによって生ずる系統誤差

a. 容量分析に用いられる反応の備えるべき条件

- 1) 反応が定量的で完全に進行する（逆反応が無視できる）こと（平衡定数が大きい）
- 2) 反応が単一（副反応がない）こと
- 3) 反応速度が大きいこと（速度定数が大きい）
- 4) 反応の完結を知る方法（指示薬、電気的方法）があること
- 5) 標準液が調製できること

b. 容量分析に用いられる主な反応

- 1) 中和反応：中和滴定 Neutralization titration
- 2) 沈殿反応：沈殿滴定 Precipitation titration
- 3) 酸化還元反応：酸化還元滴定 Redox titration
- 4) 錯体生成反応：錯滴定／キレート滴定 Compleximetry／Chelatometry
- 5) 電気化学反応：電気滴定 Elecrometric titration

c. 容量分析の誤差と精度

c-1 温度の影響

容器は 20℃で較正されている。測定は原則として 20±5℃で行う。

c-2 滴誤差 Drop error

ビュレット：0.05mL/drop or 1mL/20drops

i.e. 最後の一滴を加えたとき終点に達したとすれば、正誤差の可能性

c-3 指示（薬）誤差 Indicator error

空試験または当量点に達したときと同じ組成の液との比較で補正する。

c-4 精度と分析条件

試料、標準液の濃度や消費量、指示薬の感度などにより左右される。

d. 標準液 Standard Solution

目的物質と反応する物質の既知量を含む溶液

d-1 標準液の調製

目的濃度の±10%程度の溶液を調製し、標準物質を用いて真の濃度を測定し、濃度係数 Factor (f) を決める。Factor は、0.97～1.03 に入るものとする。

N ：真の濃度 N' ：表示濃度（目的濃度） f ：Factor とすると、

$$f = \frac{N}{N'}$$

d-2 標準液の標定

1) 一次標定

濃度の基準（一次標準 **Primary standard**）に対して調製した標準液で滴定し、標準液の濃度を正確に求める。一次標準物質の条件は次の通り：

- ①精製が容易か、純粋なもの（>99.95%）が得られる。
- ②加熱、乾燥で一定の重量になる。結晶水は望ましくない。
- ③物理化学的に安定である。吸湿性、潮解性がなく、酸素、日光などにも安定。
- ④水溶性が高い。
- ⑤反応が定量的で速やかに進行するもの。
- ⑥鋭敏な滴定終点検出の手段があるもの。

Exs. Na₂CO₃ (HCl, H₂SO₄) **HOSO₂NH₂** (NaOH) **NaCl** (AgNO₃)
Na₂(COO)₂ (KMnO₄) **KIO₃** (Na₂S₂O₃) **Zn** (EDTA)

2) 二次標定

一次標定で濃度係数を決めてある標準液を基準（二次標準）として標定する。精度は一次標定程高くない。

Exs. NaOH 液 (HCl, H₂SO₄) **HCl, H₂SO₄ 液** (NaOH) **AgNO₃ 液** (NH₄SCN)
Na₂S₂O₃ 液 (I₂) **I₂ 液** (Na₂S₂O₃)

IX-3-3 生物化学的定量法 Biochemical Analysis

血液・尿などの体液中の薬物や生体成分の分析（臨床化学分析）や河川水・空気中の環境試料の分析においては、複雑な夾雑成分中の超微量分析であることが多い。そこで、酵素 - 基質反応や抗原抗体反応のような生物学的親和性を利用した特異性の高い、高感度の分析法が開発されている。

Exs. 免疫測定法 Immunoassay

放射免疫測定法 Radioimmunoassay (RIA)

酵素免疫測定法 Enzyme immunoassay (EIA)

受容体結合法 Receptor assay

競合的タンパク結合測定法 Competitive protein binding assay

放射受容体結合法 Radioreceptor assay

特徴

* 超高感度分析が可能（ $\sim 10^{-18}$ mol）

* 再現性に問題がある（低い）

* 多数の試料の同時分析（臨床分析に適する）

IX-3-4 機器分析法 Instrumental Analysis

物理分析法ともいう。超微量分析が可能。