希釈の不確かさ

林　譲

科学分析においては，サンプル溶液の希釈はピペットとメスフラスコを用いて行われます．たとえ同じサンプルを同じピペットとメスフラスコで希釈しても，最終的なサンプル濃度は実験ごとに異なります．同じ条件で実験を繰り返すと異なった結果が得られるのは，不確かさ(uncertainty of measurement)と呼ばれています．

測定結果の信頼性表現の国際的基準として GUM (Guide to the expression of uncertainty in measurement)があり，不確かさは，この国際ルールに沿った表現です．GUM の付属書 B には不確かさの定義があります．それによれば，不確かさとは，測定量に合理的に結びつけることができる値のばらつきを表し，測定の結果に付随するパラメータです．不確かさの定量的尺度は標準偏差(またはその定数倍)です．

ピペットとメスフラスコは，その表示量が真の値からどの程度外れているか議論されることもあります．これは，真度またはバイアスと呼ばれている概念です．しかし，本稿で取り上げるのは，くり返し実験結果のバラツキの程度を示す概念，つまり不確かさです．GUM では定量的表現として標準偏差と用いていますが，ここでは，分析化学でよく使われる相対標準偏差(RSD)で不確かさを記述します．不確かさは精度と言うこともあります．「精度が高い」は，「不確かさが小さい」に相当します．

次の問題を考えましょう．ピペットの採取容量の不確かさは 0.3%RSD，メスフラスコの不確かさは 0.07%RSD とします．

問題 1(10 倍希釈)：サンプル溶液をピペットで 1mL 取り 10 倍希釈する場合，10mL のメスフラスコを使いメスアップするのと，9mL のピペットで希釈液を加えるのでは，どちらの方が不確かさは少ないか？

問題 2(2 倍希釈)：サンプル溶液をピペットで 5mL 取り 2 倍希釈する場合，10mL のメスフラスコを使うのと，5mL のピペットを使うのでは，どちらの方が不確かさは少ないか？

答え：問題1の答えはメスフラスコであり，問題 2 の答えはピペットである．

本稿*は，ピペット-メスフラスコ希釈とピペット-ピペット希釈では，不確かさを表す数式が異なることを示します．つまり，ピペット-メスフラスコ希釈は，希釈倍率を変えても，希釈の不確かさは変わりませんが，ピペット-ピペット希釈の不確かさは希釈倍率に依存して変わることを説明します．

最も単純に考えてみましょう．ピペットの操作とメスフラスコの操作は独立(無関係)ですから，それらの誤差も確率的に独立であると考えられます．すると，ピペット-メスフラスコ希釈の不確かさは，

$(0.3)^2 + (0.07)^2 = 0.31$ %RSD

となり，ピペット-ピペット希釈の不確かさは

$(0.3)^2 + (0.3)^2 = 0.42$ %RSD

となります．メスフラスコよりピペットの方が不確かさが大きいので，ピペット-ピペット希釈の

*本稿は FUMI 理論研究会のホームページ(http://www8.plala.or.jp/fumitheory/)に掲載されています．

RSD はピペット-メスフラスコ希釈の RSD より大きいという当然の帰結です. しかし, この解釈は問題 1（10 倍希釈）の答えと一致しますが, 問題（2 倍希釈）2 の答えは説明できません. 以下で, これらの問題を解くための希釈理論の説明をします.

はじめに, 希釈の不確かさを定義しましょう. 濃度 C_0 のサンプル（原液）をピペットで容量 V_1 だけ採取し, これをピペットまたはメスフラスコで希釈します. その結果, 原液は濃度 C_1 の溶液になったとします. この操作をくり返すと, 実験誤差により, 希釈後の濃度 C_1 はばらつきます. 最終濃度 C_1 の相対標準偏差 RSD を希釈の不確かさと定義しましょう. まず希釈の不確かさを表す数式を導いてから, 上の問題をもう一度考えます.

ピペット-メスフラスコ希釈

濃度 C_0 の原液をピペットで V_1 取り, メスフラスコで V_2 になるように希釈液を加えたときの最終濃度 C_1 は

$$C_1 = \frac{V_1}{V_2} C_0 \qquad \text{（式 1）}$$

です. ここで, 容量 V_1 と V_2 は, 実験ごとにランダムに変化します. このように変化する量（V_1 と V_2）を確率変数と言います. 確率変数には, 平均, 標準偏差, 相対標準偏差などの統計量が付随します. 一方, 同じ原液をくり返し使うので, 濃度 C_0 は一定であり, 確率変数ではありません. 解くべき問題は, 最終濃度 C_1 の不確かさ（RSD）を確率変数 V_1 と V_2 の RSD の関数として表すことです.

ピペット-メスフラスコ希釈の不確かさは次の式で表せます（付録参照）:

$$\rho^2 = (r_1)^2 + (r_2)^2 \qquad \text{（式 2）}$$

ここで,

ρ: 希釈後の濃度 C_1 の不確かさ（RSD）;

r_1: 原液を採取するピペットの採取容量の不確かさ（RSD）;

r_2: メスフラスコのメスアップ容量の不確かさ（RSD）;

です.

ピペット-ピペット希釈

濃度 C_0 の原液をピペット 1 で V_1 取り, ピペット 2 で希釈液 V_2 を加えると, 希釈後の濃度 C_1 は

$$C_1 = \frac{V_1}{V_1 + V_2} C_0 \qquad \text{（式 3）}$$

です.

この問題は, ピペット-メスフラスコ希釈の問題ほど簡単ではありません. その理由を説明します. 確率変数 V_1 と V_2 は, 互いに独立です. つまり, 操作が独立ですから, ピペット 1 の採取容量 V_1 とメスフラスコのメスアップ容量 V_2 は, 互いに無関係です. そのため, 希釈後の濃度 C_1 を表す式（式 1）の右辺の分母と分子は独立です. 一方, 式 3 では, 分母と分子に同じ確率変数 V_1 が入っているため, 分母と分子は独立ではありません. V_2 の変化が小さければ, 分母（$V_1 + V_2$）と分子 V_1 は同じような変化をするからです. この場合, 分母と分子は相関があると言います. 数学的見れば, 式 1 の右辺の分母と分子は相関がないため, 最終濃度 C_1 の RSD を求めることは簡単です. しかし, ピペット-ピペット希釈の問題を解くためには, この分母と分子の相関を考慮する必要がありま

す．

ピペット-ピペット希釈の不確かさは次の式で表せます（付録参照）：

$$\rho^2 = \left(\frac{V_2}{V_1+V_2}\right)^2 \left[(r_1)^2 + (r_2)^2\right] \qquad \text{（式 4）}$$

ここで，

ρ：　希釈後の原液の濃度の不確かさ（RSD）；

r_1：　原液を採取するピペット1の採取容量の不確かさ（RSD）；

r_2：　希釈液を採取するピペット 2 の採取容量の不確かさ（RSD）；

V_1：　ピペット1で採取するサンプルの容量（平均）；

V_2：　ピペット 2 で採取する希釈液の容量（平均）；

です．

<u>希釈理論の解釈</u>

式 2 と 4 は，係数 $V_2/(V_1+V_2)$が違うだけですから，ピペット-メスフラスコ希釈とピペット-ピペット希釈の違いは，最終濃度の不確かさが希釈倍率に依存するかどうかだけです．これらの式を精しく考察する前に，冒頭に挙げた問題をもう一度考えましょう．

問題 1 のピペット-メスフラスコ希釈の不確かさは，式 2 より

$$\rho = [(0.3)^2 + (0.07)^2]^{1/2} = 0.31\ \%$$

であり，ピペット-ピペット希釈の不確かさは，式 4 より

$$\rho = \frac{9}{1+9}[(0.3)^2 + (0.3)^2]^{1/2} = 0.38\ \%$$

と計算されます．ピペット-メスフラスコ希釈の方が優れていることが分かります．

問題 2 のピペット-メスフラスコ希釈の不確かさは，問題 1 と同じですが，ピペット-ピペット希釈の不確かさは，式 4 より

$$\rho = \frac{5}{5+5}[(0.3)^2 + (0.3)^2]^{1/2} = 0.21\ \%$$

となります．2 倍希釈では，ピペット-ピペット希釈の不確かさ（0.21％RSD）の方が，ピペット-メスフラスコ希釈の不確かさ（0.31％RSD）より，小さいことが分かります．

以上で冒頭の問題を解くことができました．ピペット-メスフラスコ希釈の不確かさは，希釈倍率とは無関係に，一定です（式2）．一方．ピペット-ピペット希釈では，希釈倍率に依存して，最終濃度の RSD は 0 から$[(r_1)^2+(r_2)^2]^{1/2}$まで変わります（式 4）．希釈溶液の容量 V_2 が少なくなると，式 4 の係数 $V_2/(V_1+V_2)$が小さくなるため，最終濃度の RSD は小さくなります．希釈溶液の容量 V_2 がゼロならば原液は元のままですから，最終濃度の誤差はゼロであることも式 4 は表しています．つまり，ピペット-ピペット希釈では，希釈倍率が小さいときは不確かさが小さいことになります．

容量 V_2 が多くなると，係数 $V_2/(V_1+V_2)$は 1 に近づくので，ピペット-ピペット希釈の利点は無くなります．冒頭の計算（$(0.3)^2 + (0.3)^2 = 0.42$ %RSD）は，ピペット-ピペット希釈の不確かさとしては，厳密には正しくありません．しかし，希釈倍率が高いときの近似として成り立つことが分かります．

簡単な数値計算で，希釈理論の要点を推測できます．2 倍希釈を考えましょう．ピペットで 5mL の原液を採取するところが，5.05mL 採取されたとします．簡単のため，希釈溶液の誤

差は無いと仮定しますと，ピペット-メスフラスコ希釈の最終濃度は

$$0.505 = 5.05 \div 10 \times C_0$$

となり，ピペット-ピペット希釈の最終濃度は，

$$0.5025 = 5.05 \div (5.05 + 5) \times C_0$$

となります．$C_0 = 1$ とすれば，正確に分取・希釈された原液の最終濃度は 0.5 ですから，ピペット-メスフラスコ希釈の誤差は 1％(=0.505/0.5 − 1)となり，ピペット-ピペット希釈の誤差は 0.5％(=0.5025/0.5 − 1)となります．この例で示した計算から，最終濃度の式（式3）に現れる相関が希釈の不確かさにおいて重要な役目をしていることが理解できるでしょう．

以上，希釈の理論を展開しました．不確かさの式（式2と4）が実際の実験と合うかという疑問は誰しもが抱くでしょう．希釈理論の論文（Y. Hayashi and R. Matsuda, Anal. Sci., 1994, 10, 881）には，実験と理論の一致することが示されています．

ここで示した希釈理論を基に，前処理を含めたHPLC測定の不確かさ，HPLCの内部標準法の不確かさ，エンドトキシン試験法の不確かさなどが推定できます．

付録

微分によってRSDを求める一般的な方法はよく知られています．たとえば，H.G. Hecht, Mathematics in chemistry, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1990に詳述されています．以下では，この方法に基づいて，希釈の不確かさを求めます．

ピペット-メスフラスコ希釈

式1を全微分し，2乗する．交差項(dV_1dV_2)を除き，C_1で割れば，

$$\left(\frac{dC_1}{C_1}\right)^2 = \left(\frac{dV_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{dV_2}{V_2}\right)^2$$

が得られます．ここで，微分dXは標準偏差を表し，dX/Xは相対標準偏差を表します．

ピペット-ピペット希釈

式3の全微分は，

$$dC_1 = \frac{V_2}{(V_1+V_2)^2} C_0\, dV_1 - \frac{V_1}{(V_1+V_2)^2} C_0\, dV_2$$

となります．2乗して，交差項(dV_1dV_2)を除けば，

$$(dC_1)^2 = \frac{{V_2}^2}{(V_1+V_2)^4} {C_0}^2 (dV_1)^2 + \frac{{V_1}^2}{(V_1+V_2)^4} {C_0}^2 (dV_2)^2$$

が得られます．C_1の2乗で割れば，

$$\left(\frac{dC_1}{C_1}\right)^2 = \left(\frac{V_2}{V_1+V_2}\right)^2 \left[\left(\frac{dV_1}{V_1}\right)^2 + \left(\frac{dV_2}{V_2}\right)^2\right]$$

となります．