

HPLC 分析における内標準法の有効性について

大高 怜子,^a 前田 昌子,^a 岩上 猛,^b 植田 泰輔,^b 木村 良夫,^b
今井 一洋,^c 四方田 千佳子,^d 松田 りえ子,^d 林 譲*,^d

Precision of Internal Standard Method in HPLC Analysis

Reiko OHTAKA,^a Masako MAEDA,^a Takeshi IWAGAMI,^b Taisuke UEDA,^b Yoshio KIMURA,^b
Kazuhiro IMAI,^c Chikako YOMOTA,^d Rieko MATSUDA,^d and Yuzuru HAYASHI*,^d
*School of Pharmaceutical Sciences, Showa University,^a Hayashi Pure Chemicals,^b Graduate School
of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,^c and National Institute of Health Sciences^d*

(Received December 26, 2002; Accepted February 7, 2003)

The internal standard methods are known to compensate for the errors from sample preparation and injection into an analytical instrument. However, recent HPLC apparatuses have injectors of excellent repeatability and it is dubious whether the cancellation of injection error can lead to substantial improvement in the precision of analysis. This paper answers the above question experimentally and theoretically. The HPLC analysis of butylscopolamine bromide is taken as an example. The relative standard deviations (RSD) of measurements in the internal standard method and absolute calibration curve method are compared and the advantages of these methods are discussed. The measurement RSD is shown to be well estimated by the (function of mutual information) (FUMI) theory without repeating measurements. This report also demonstrates simple equations for calculating the measurement RSD at an arbitrary concentration of analyte and for selecting the better method between the internal standard method and absolute calibration curve method under specific experimental conditions.

Key words—precision; repeatability; internal standard; HPLC; FUMI theory

緒 言

内標準法では、分析対象物質の測定値と内標準物質の測定値の比をとることにより、試料溶液の調製誤差と分析機器への注入誤差を大幅に低減できることはよく知られている。内標準法が調製誤差を相殺するための有効な手段であることは、実験的・理論的に証明されている。¹⁾しかし、最近の HPLC の注入精度は非常に優れているため、注入誤差を相殺することが内標準法の分析精度の向上につながるかどうかは疑問である。

本研究では、分析精度を基準にして、注入誤差に対する内標準法の有効性を検討する。実験計画により調製誤差を除き、注入誤差だけに焦点を当てる。有効性の判断基準としては、分析値の RSD (相対標準偏差) を用いる。分析法の設計では多くの場

合、調製誤差、注入誤差、測定誤差を見積もり、絶対検量線法又は内標準法を選択するであろう。本論文は、繰り返し実験なしに、それぞれの方法の定量精度を見積もる簡便な方法を提供する。

副交感神経遮断薬である臭化ブチルスコポラミン (ブスコパン) の HPLC 分析を例として取り上げる。内標準物質を添加した臭化ブチルスコポラミン溶液に対して繰り返し HPLC 測定 ($n=8$ 又は 7) を行い、測定値の比の RSD を求める。いくつかの濃度で対応する絶対検量線法の RSD と比べ、上の疑問に答える。

分析対象の濃度に対する繰り返し実験結果 (RSD) のプロットを精度プロットと言う。精度プロットを描くことにより、広い濃度範囲での内標準法と絶対検量線法の精度の比較が可能となる。しかし、精度プロットを繰り返し実験によって描くことには、次の 2 つの重大な問題がある：1) 繰り返し実験から精度プロットを作成するには、各濃度で十分な数の繰り返し実験が必要であり、多くの時間、

^{a)}昭和大学薬学部, ^{b)}林純薬工業株式会社, ^{c)}東京大学大学院薬学系研究所, ^{d)}国立医薬品食品衛生研究所
e-mail: funi@nihs.go.jp

エネルギー、試薬などを費やす；2) 少数の繰り返し実験から求めた RSD の信頼性は低いため、精度プロット上で RSD の変化を確実に示すには、多数の実験が必要である。

特に、2)は重要である。F-検定 (0.1%の危険率)によれば、7回の繰り返し実験から求めた RSD (厳密には SD) は、3倍以上異なっている場合限り、有意に差があると言える。一方、30回の繰り返し実験では、1.5倍以上が有意差の条件である。7回の実験から求めた RSD に3倍の違いがあったとしても、確実に言えることは2つの RSD が同じではないことであり、必ずしも3倍違うことでない。一方、1つの RSD を知るために、同じことを30回も繰り返すのは効率のよい実験とは言えない。

上記の欠点を補うために、本研究では、FUMI 理論 (Function of Mutual Information)¹⁾を用いる。FUMI 理論では、繰り返し測定なしに、1つのクロマトグラムのシグナルとノイズから、測定値の RSD が得られる。この RSD の信頼性は、30—50回の繰り返し測定からの RSD の信頼性に匹敵するが、FUMI 理論には誤差の確率論的モデルが必要である。精度プロットは、濃度の関数として曲線で表示できる。

本文中で、FUMI 理論に基づき、任意のサンプル濃度で内標準法の RSD を計算する方法、絶対検量線法と内標準法の中で精度の高い方を選ぶ簡便な方法、貴重な内標準物質 (例えば、同位体置換体) の必要最低量を計算する方法などを示す。機器分析一般の精度を理論的に扱った本^{1,2)}はあるが、HPLC の精度に関する論文³⁻⁹⁾は多くはない。特に、HPLC における内標準法の精度を扱った論文¹⁰⁻¹²⁾は少ない。本研究の理論は文献 12 に基づいている。

実 験

臭化ブチルスコポラミン及び *p*-ヒドロキシ安息香酸ブチル (内標準物質) は和光純薬工業株式会社製を用いた。その他の試薬は市販特級品を使用した。

HPLC は以下の条件とした。装置：Agilent 社製 SERIES1100, 検出器：紫外吸光光度計 (測定波長：220 nm), カラム：資生堂 CAPCELL PAK UG (4.6 mmI.D.×250 mm), カラム温度：40°C, 移動相：ラウリル硫酸ナトリウム 1.0 g に水 350 ml 及びメタノール 650 ml を加えて溶かし、リン酸で

pH 3 に調節する、流速：0.8 ml/min.

臭化ブチルスコポラミン溶液の濃度は、3.68 mg/l, 1.84 mg/l, 0.92 mg/l, 0.552 mg/l, 0.184 mg/l とした。内標準溶液の濃度は、5.33 mg/l, 0.267 mg/l, 0.107 mg/l とした。この臭化ブチルスコポラミン溶液 5 ml と内標準溶液 3 ml を混合し、計 15 種類の溶液を作った。オートインジェクターによりこの混合溶液 10 μl を HPLC に注入して、それぞれの溶液につき 8 又は 7 個のクロマトグラムを得た。上記の溶液の濃度は、FUMI 理論に基づいて求めた検出限界¹⁾を参考にして設定した。内標準法の RSD 推定と検出限界の算出には、FUMI 理論の市販ソフト MAY2000 (ヤザワ) を用いた。

理 論

内標準物質を既に加えてある試料を HPLC で繰り返し測定すると、調製誤差は存在しないと考えられる。この場合の絶対検量線法では、分析対象になっている物質の測定値 (面積など) の RSD は次式のように与えられる。

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\text{分析対象}}{\text{測定値の RSD}} \right)^2 \\ &= \left(\frac{\text{ノイズによる}}{\text{分析対象測定値の RSD}} \right)^2 \\ &+ (\text{注入量の RSD})^2 \end{aligned} \quad (\text{Eq.1})$$

一方、内標準法では、分析対象となる物質と内標準物質の注入誤差が相殺されるため、これらの測定値の比の RSD は Eq. 2 で表せる：

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\text{分析対象測定値}}{\text{内標の測定値}} \text{の RSD} \right)^2 \\ &= \left(\frac{\text{ノイズによる}}{\text{分析対象測定値の RSD}} \right)^2 \\ &+ \left(\frac{\text{ノイズによる}}{\text{内標測定値の RSD}} \right)^2 \end{aligned} \quad (\text{Eq.2})$$

注入誤差が相殺される代わりに、分析対象物質と内標準物質の測定誤差が内標準法の最も重要な誤差となる。

内標準法が絶対検量線法より精度が高いことを、RSD を用いて表現すると

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\text{分析対象}}{\text{測定値の RSD}} \right)^2 \\ &\geq \left(\frac{\text{分析対象測定値}}{\text{内標の測定値}} \text{の RSD} \right)^2 \end{aligned} \quad (\text{Eq.3})$$

となる。Eqs. 1 と 2 を Eq. 3 に代入すれば、内標準法の精度が高い条件は、

$$(\text{注入量の RSD})^2 \geq \left(\frac{\text{ノイズによる}}{\text{内標測定値の RSD}} \right)^2 \quad (\text{Eq.4})$$

となる。調製を含む一般的な分析における条件は Eq. 8 で示す。

絶対検量線法の精度プロットでは、分析対象の濃度を変化させるため、Eq. 1 を Eq. 5 のように少し変形して用いる：

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\text{分析対象}}{\text{測定値の RSD}} \right)^2 \\ &= \left(\frac{\text{ノイズによる分析対象測定値の SD}}{\text{分析対象測定値}} \right)^2 \\ &+ (\text{注入量の RSD})^2 \quad (\text{Eq.5}) \end{aligned}$$

内標準物質の精度プロットでは、内標準物質の量は一定とするが、分析対象の濃度を変化させるため、Eq. 2 を Eq. 6 のように少し変形して用いる：

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\text{分析対象測定値}}{\text{内標の測定値}} \text{の RSD} \right)^2 \\ &= \left(\frac{\text{ノイズによる分析対象測定値の SD}}{\text{分析対象測定値}} \right)^2 \\ &+ \left(\frac{\text{ノイズによる}}{\text{内標測定値の RSD}} \right)^2 \quad (\text{Eq.6}) \end{aligned}$$

検量線を使って、測定値を濃度に変換すれば、Eqs. 5 と 6 の左辺を濃度の関数として計算できる。

一般的には、絶対検量線法は調製誤差を含むので、分析対象の測定値の RSD は Eq. 7 となる：

$$\begin{aligned} & \left(\frac{\text{分析対象}}{\text{測定値の RSD}} \right)^2 = \left(\frac{\text{ノイズによる}}{\text{分析対象測定値の RSD}} \right)^2 \\ &+ (\text{注入量の RSD})^2 + \left(\frac{\text{分析対象の}}{\text{調製誤差の RSD}} \right)^2 \quad (\text{Eq.7}) \end{aligned}$$

上と同じ考察により、内標準法の RSD が絶対検量線法の RSD より小さくなる条件は Eq. 8 となる：

$$\begin{aligned} & (\text{注入量の RSD})^2 + \left(\frac{\text{分析対象の}}{\text{調製誤差の RSD}} \right)^2 \\ & \geq \left(\frac{\text{ノイズによる}}{\text{内標測定値の RSD}} \right)^2 \quad (\text{Eq.8}) \end{aligned}$$

内標準法と絶対検量線法の精度の差は、調製・注入時の誤差とノイズに起因する測定誤差の相対的大きさで決まる。

結果と考察

Figure 1A は内標準物質（保持時間約 9.5 分）の濃度が濃いとき（5.33 mg/l）のクロマトグラムであり、Fig. 1B はこの濃度が薄いとき（0.107 mg/l）のクロマトグラムである。臭化ブチルスコポラミン（保持時間約 13 分）の濃度はどちらでも同じである。Figure 1B の内標準のピークは小さく、ノイズの影響を受けやすいため、測定値の誤差（RSD）は大きいと考えられる。分析の基準となるピークの測定誤差が大きければ、内標準法の測定値の RSD も大きくなると容易に想像できる。以下で、このような精度に関する事実を検証する。

内標準法の RSD は Eqs. 2 又は 6、絶対検量線法の RSD は Eqs. 1 又は 5 で記述できる。まず、これらの理論式が現実に合うことは、Fig. 2 の内標準法と絶対検量線法の精度プロットから分かる。左側（A, B, C）はピーク高さ測定であり、右側（A', B', C'）は全面積測定である。A, B, C の順に内標準物質の濃度が低くなっている。どの条件においても、内標準法の RSD（○：実験，---：理論（Eq. 6））も絶対検量線法の RSD（●：実験，—：理論（Eq. 5））も理論と実験がよく一致している。B' と C' は理論と実践が異なっているように見えるかもしれないが、 $n=8$ の場合、RSD 推定値（○又は●）の 95% 信頼区間は約 ±50% であるので、誤差範囲内で理論と実践は一致していると言える。Figure 2 の理論曲線は実験結果に対するフィッティングではない。1 つのクロマトグラムから FUMI 理論に基づいて計算した結果である。

Figure 2 のすべての精度プロットには共通する点がある。

- (A)：分析対象の濃度が高くなるに従って、分析値の RSD は小さくなる（--- と—）。
- (B)：絶対検量線法の精度（●又は—）を比べると、高さ測定の RSD の方が、全面積測定の RSD より小さい。
- (C)：内標準物質の濃度が最も高いとき（A と A'）は、内標準法と絶対検量線法の RSD はほとんど等しい（--- と—は重なっている）が、この濃度が低くなると（C と C'），内標準法の RSD の方が大きくなる。

共通点 A は、大部分の機器分析で成り立つこと

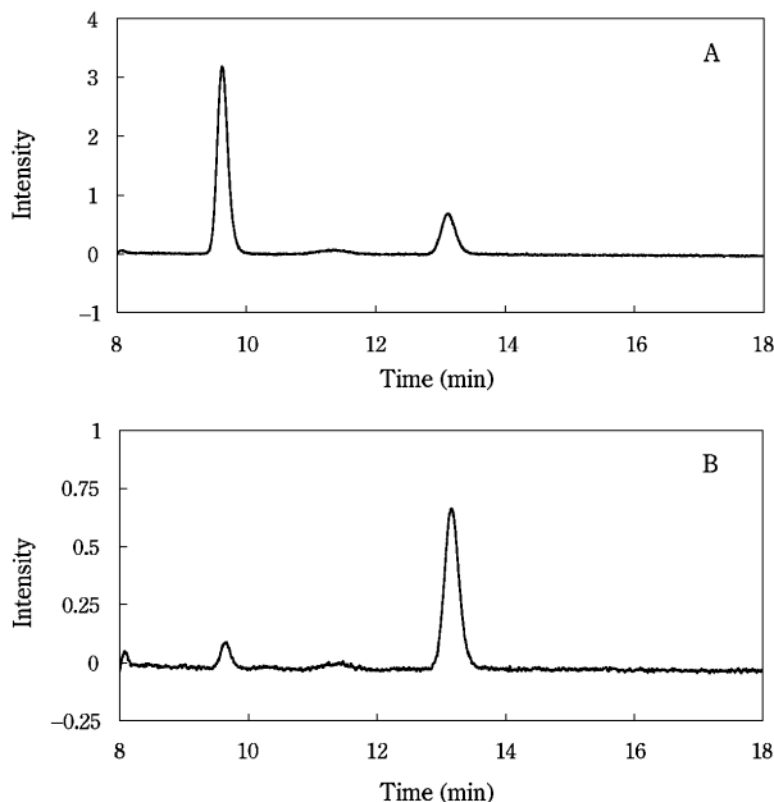


Fig. 1. Chromatograms of Butylscopolamine Bromide with Internal Standard of Different Concentrations

The concentration of butylscopolamine bromide is 0.552 mg/l for A and B. That of the internal standard is 5.33 mg/l for A and 0.107 mg/l for B.

が知られている。¹⁾ HPLC では、ノイズの性質により、高さ測定が優っている場合が多い。¹⁾ 共通点 C より、分析対象のピークの大きさとは無関係に、内標準物質のピークは高い方が測定精度が高いことが分かる。注入誤差を相殺する目的で、内標準法を使っても RSD は小さくならないと判断できる。理由は、最近の HPLC は注入精度が高いからである (約 0.3% RSD)。

HPLC 分析の RSD を、繰り返し測定なしに計算で予測することは不可能であると長く思われていた。しかし、Fig. 2 の理論曲線を得るのは簡単である。絶対検量線法の RSD (Eqs. 1 又は 5) は FUMI 理論 (実際にはソフト MAY2000) から直接計算できる。1つのクロマトグラム中の分析対象のピーク、内標準のピークをそれぞれマウスで囲み、面積と高さ測定値を得る。次に、ベースラインノイズを解析すると、ノイズによる分析対象測定値の SD と RSD が計算・表示される。すると、注入量の RSD が分かれば、Eqs. 1 と 5 の右辺が計算できる。

内標準法では、Eq. 2 により、ノイズによる分析対象測定値の RSD とノイズによる内標測定値の RSD が分かれば、測定値の比の RSD は計算できる。Equation 2 の右辺の第 1 項と第 2 項は、上と同様に MAY2000 で計算できるので、この実験条件での測定値の RSD は分かる。

濃度による RSD の変化を知るときには、Eq. 6 を用いる。ここでも、1つのクロマトグラムだけで計算が可能である。MAY2000 により、分析対象物質のピークからノイズによる測定値の SD (右辺第 1 項の分子) が得られる。この SD 値は、分析対象の濃度を変えても一定である。なぜならば、ノイズはピークの大きさ (つまり濃度) とは無関係だからである。ノイズによる内標測定値の RSD は定数であり、これも MAY2000 から求まる。すると、Eq. 6 の右辺第 1 項の測定値を検量線で濃度に変換すれば、RSD を分析対象の濃度の関数として記述できる。

内標準法か絶対検量線法かを選ぶときの基準は、Eq. 4 又は 8 である。Equation 4 によれば、ノイ

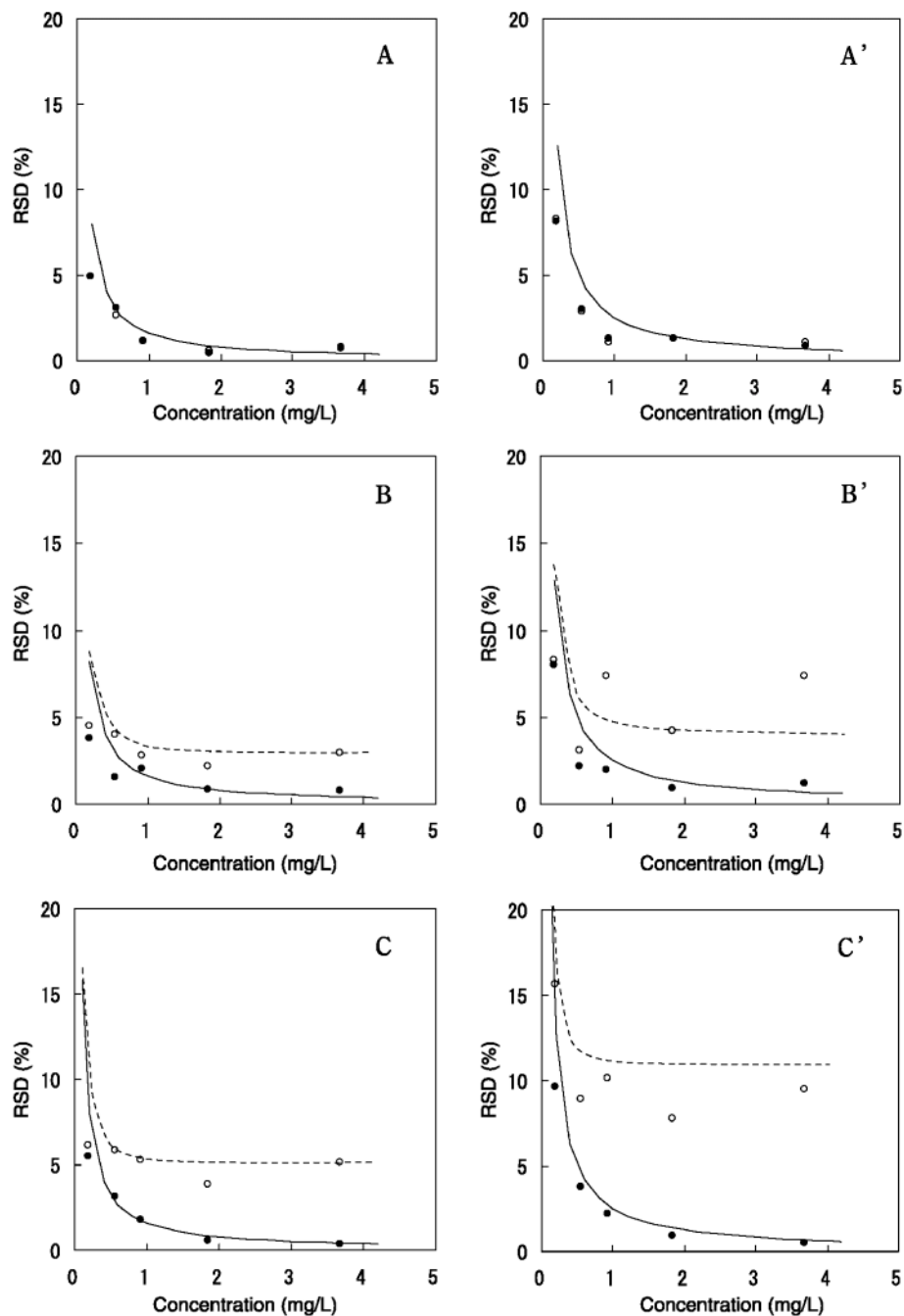


Fig. 2. Precision Plots for Internal Standard Method and Absolute Calibration Curve Method in HPLC Analysis of Butylscopolamine Bromide

o and --- : RSD estimates for internal standard method. ● and — : RSD estimates for absolute calibration curve method. o and ● : RSD estimates by repeated measurements ($n=8$ or 7). --- and — : theoretical RSD estimates by the FUMI theory. Left side (A, B and C): peak height measurement, right side (A', B' and C'): whole area measurement. A and A': internal standard of high concentration (5.33 mg/l), B and B': internal standard of middle concentration (0.267 mg/l), C and C': internal standard of low concentration (0.107 mg/l).

ズによる内標準物質の測定値の RSD が、注入量の RSD より小さければ、内標準法は有効である。しかし、本研究 (Fig. 2) では、実行したすべての実験条件で内標準法が有効ではないという結果が得られた。そこで、調製誤差も考慮した判定基準 (Eq. 8) を以下で考察する。

Equation 8 の各項は次のように求まる。

(注入量の RSD) : 通常は約 0.3% RSD であるが、カタログ値。繰り返し測定などからも分かる、
 (分析対象の調製誤差の RSD) : 絶対検量線法での繰り返し実験から求まるが、経験的にも推定できる、
 (ノイズによる内標測定値の RSD) : FUMI 理論

(実際は MAY2000) で求まる。

10% RSD は IUPAC の定量下限の定義である。そこで、調製誤差が 10% RSD の場合を考察する。この条件で得たクロマトグラム中の内標準物質のピークを FUMI 理論で解析すれば、ノイズによる内標準測定値の RSD が得られる。例えば、この RSD を 1% とする。注入の RSD は小さいので無視すると、Eq. 8 の左辺は 100、右辺は 1 となり、内標準法の優位性は際だっている。

内標準物質と分析対象がほとんど同じ挙動を示すことが前提条件であるが、一般に調製誤差が 1% RSD 以上である実験では、内標準法を使う意味があると思える。もちろん、ノイズによる測定値の RSD (Eq. 8 の右辺) が、調製の RSD (Eq. 8 の左辺) よりかなり小さくなるように、FUMI 理論を参照して、内標準物質の濃度を定める必要がある。

ここまでは調製誤差を対象にしたが、次は測定誤差を論じる。HPLC の測定誤差が 10% RSD くらいの低濃度サンプルでは、内標準法は効果的ではない。Equation 8 から、内標準法が絶対検量線法より有利であったとしても、内標準法の RSD は Eq. 2 から推定する。ノイズによる内標準測定値の RSD を 10% とすると、Eq. 2 の右辺第 1 項は (分析対象物質のピークがいくら大きくても) 正であるので、左辺の RSD は 10% 以上になる。IUPAC の定量分析の基準は RSD が 10% 以下であるから、この内標準法は定量分析としては誤差が大きすぎると判断される。

貴重な内標準物質の必要最低量を知ることが興味深い。上の結果から、内標準物質の濃度を低くすると、内標準法の RSD は大きくなる (共通点 C) ので、許容できる最大 RSD で、内標準物質の最低濃度を求めることが問題である。分析対象の予想最低濃度における測定値の RSD が 2%、内標準法の許容できる RSD が 3% の場合を想定する。Equation 2 より $3^2 - 2^2 = (\sqrt{5})^2$ となり、ノイズによる内標準測定値の RSD が $\sqrt{5}$ となるような濃度が最低濃度である。この濃度は次の式から求められる：

$$\begin{aligned} & \left(\begin{array}{l} \text{ノイズによる} \\ \text{内標準測定値の RSD} \end{array} \right) \\ &= \left(\frac{\text{ノイズによる内標準測定値の SD}}{\text{内標準測定値}} \right) \end{aligned} \quad (\text{Eq.9})$$

上で議論したように、右辺の分子 (ノイズによる

内標準測定値の SD) は、MAY2000 により、内標のピークから直接得られる。左辺を $\sqrt{5}$ とし、式を解けば、内標準測定値が求まる。検量線を使って、この測定値に対応する濃度を計算すれば、これが求めている内標準物質の最低濃度である。

絶対検量線法 (Eq. 7) と比べると、内標準法の RSD (Eq. 2) は調製と注入による誤差を含まない代わりに、内標準物質のノイズによる測定誤差を含む。そのため、ノイズによる内標準物質の RSD が小さい方がこの方法の RSD は小さい。これは、サンプルに加える内標準物質の濃度は高い方が有利であることを示している。実際には分析対象物質と同じくらいのピークになるように内標準物質の量を決定することが多い。これは、解析の容易さ、縦軸のスケールなどの理由が考えられる。これらの条件が満たされれば、精度の点からは内標準物質の濃度は高い方がよい。

1 μl の HPLC 注入で同様な実験も行った。ただし、10 倍濃い溶液を使用した。しかし、その結果は 10 μl の結果 (共通点 A-C) とほぼ同じであった。1 μl 注入の精度も十分に高いことが分かる。

結 論

本研究の結論として、

- 用いた HPLC の注入精度は高く、注入誤差を相殺する目的で内標準物質を使っても、分析精度は向上しない；
 - 内標準物質のピークが小さいと、内標準法の RSD が、対応する絶対検量線法の RSD より大きくなることもある；
- が得られた。最初の結論は、内標準物質を測定の前 (調製の最後) に加えるのは意味がないことを示している。

FUMI 理論を用いると、繰り返し測定なしに、HPLC における内標準法の RSD を推定できる。Equation 8 により、内標準法と絶対検量線法のうちで精度の高い方を選ぶことができる。また、実験計画の助けにもなると考えられる。

謝辞 本研究は、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業の一環として行われた。

REFERENCES

- 1) Hayashi Y., Matsuda R., "HPLC no Bunseki Seido (Precision of HPLC Analysis)," Hayashi Pure Chemical, Osaka, 1999.
- 2) Ingle J. D. Jr., Crouch S. R., "Spectrochemical Analysis," Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1988.
- 3) Grushka E., Zamir I., *Chemical Analysis*, **98**, 529–561 (1989).
- 4) Hayashi Y., Matsuda R., *Anal. Chem.*, **66**, 2874–2881 (1994).
- 5) Haefelfinger P., *Anal. Chim. Acta*, **218**, 73–81 (1981).
- 6) Smit H. C., Walg H. L., *Chromatographia*, **9**, 483–489 (1976).
- 7) Barth H., Dallmeier E., Courtois G., Keller H. E., Karger B. L., *J. Chromatogr.*, **83**, 289–311 (1973).
- 8) Huber J. F. K., Hulsman J. A. R. J., Meijers C. A. M., *J. Chromatogr.*, **62**, 79–91 (1971).
- 9) Snyder L. R., van der Wal S. J., *Anal. Chem.*, **53**, 877–884 (1981).
- 10) Altria K. D., Bestford J., *J. Capillary. Electrophor.*, **3**, 13–23 (1996).
- 11) Halász I., Vogtel P., *J. Chromatogr.*, **142**, 241–259 (1977).
- 12) Hayashi Y., Matsuda R., *Anal. Sci.*, **11**, 389–400 (1995).