

検量線の作成と評価用ソフト

使用説明

WREG inst
Ver 2.1
1996年10月 - 2010年12月

秋山 功

1 はじめに

HPLC、GCによる濃度測定の見量線では、重み付き回帰が一般的に使用されています。しかし、分析方法の立ち上げ時に見量線が直線か曲線か、重み付け変数をどのようにするか、などについて迷うことが多くあります。

採用した見量線により、精確さが左右されます。このため、見量線の回帰モデルを何らかの形で評価し選択する必要があります。

本ソフトは、見量線回帰モデルの選択と測定誤差の推定のために作製したものです。

本ソフトにより、何故見量線を直線回帰にしたのか、何故重み付けを行ったのか、その見量線でどの程度の精確さ（正確さ、精密度）が得られるのかなどの検討をすることが可能です。

日常の測定でも使用できるように、エクセルなどのデータから簡単に見量線から濃度を求める（逆推定）ことも可能です。

変更履歴

本ソフトは1996年に作成し3年間改良しませんでした。（Ver1.0）VB4

1999年 今回、log log回帰式を追加し、計算結果の表示桁数を合わせました。（Ver2.0）VB6

2010年12月20日 本ソフトが分析現場で今も使用され、今後も使用したいとの要望から、使用説明文の作成と一部プログラムの変更（不要な部分を削除）を行った。

2 使用例（データの作成）

データはエクセルで作成します。

（ワープロで作成する場合はデータをスペースかカンマで区切ります。）

濃度とレスポンスの入力データは0.00000001~1000000000の範囲になるようにして下さい。

下記のデータを例として計算してみます。

5濃度を4回測定した見量線データです。5濃度4回測定したデータを下記のように縦に並べて下さい。

xに繰り返す同じ数値が並ぶことにより、自動で4回の測定データであると判断します。

	X (濃度)	Y
1	0.406	0.2297
2	1.015	0.5873
3	2.03	1.1598
4	4.06	2.3446
5	20.3	11.6401
1	0.406	0.2266
2	1.015	0.5833
3	2.03	1.1673
4	4.06	2.3498
5	20.3	11.697
1	0.406	0.2283
2	1.015	0.5802
3	2.03	1.1566
4	4.06	2.3173
5	20.3	11.6124
1	0.406	0.2291
2	1.015	0.5802
3	2.03	1.1631
4	4.06	2.3541
5	20.3	11.7877

もしも繰り返しが無いときは下記の様にします。

	X (濃度)	Y
1	0.406	0.2297
2	1.015	0.5873
3	2.03	1.1598
4	4.06	2.3446
5	20.3	11.6401

(5濃度の検量線)

注意 (計算出来ないデータの作成形式の例)

下記の様に横に並べたデータは計算出来ません。

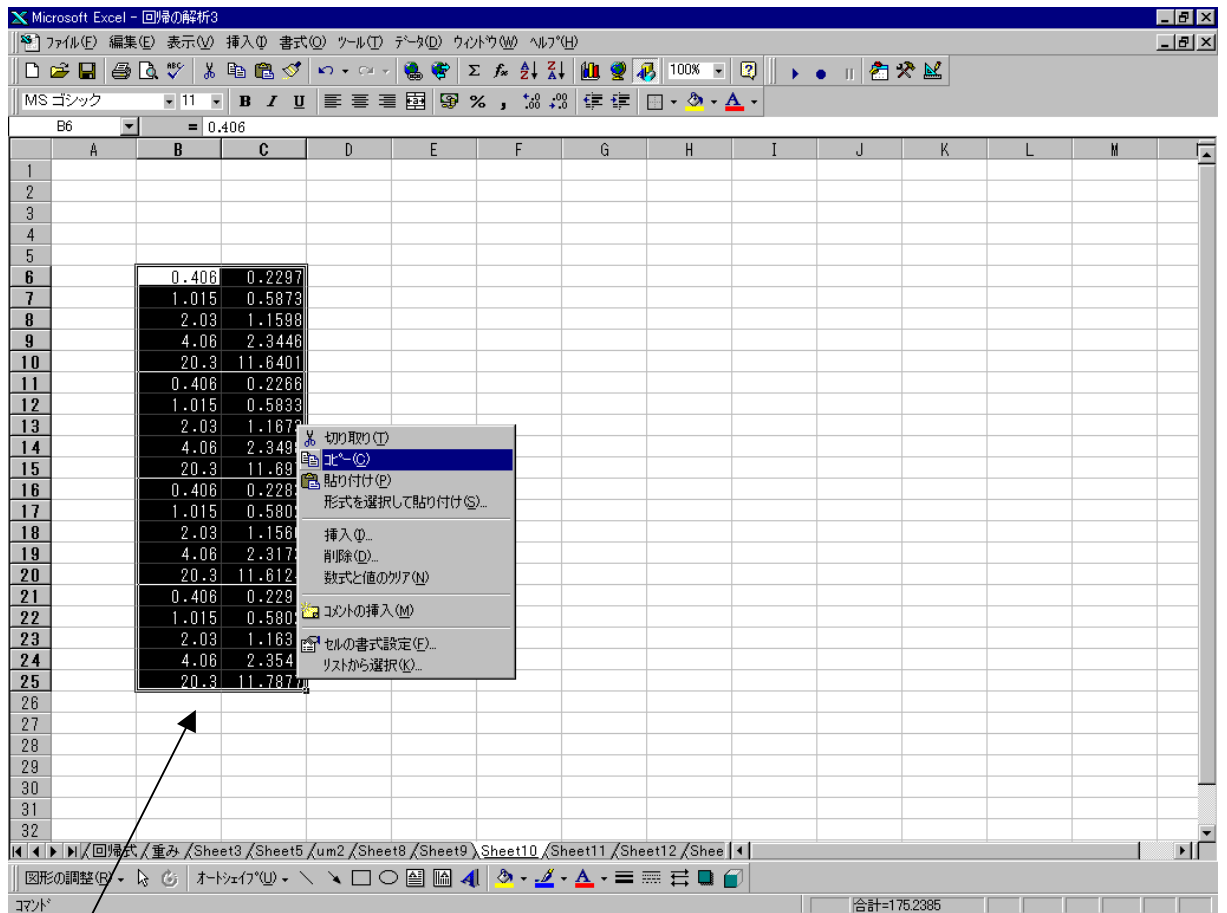
X		1	2	3	4
1	0.406	0.2297	0.2266	0.2283	0.2291
2	1.015	0.5873	0.5833	0.5802	0.5802
3	2.03	1.1598	1.1673	1.1566	1.1631
4	4.06	2.3446	2.3498	2.3173	2.3541
5	20.3	11.6401	11.697	11.6124	11.7877

また、次の様な場合も繰り返しデータとは判断しません。

X(濃度)

0.406	0.2297
	0.2266
	0.2283
	0.2291
1.015	0.5873
	0.5833
	0.5802
	0.5802
2.03	1.1598
	1.1673
	1.1566
	1.1631
4.06	2.3446
	2.3498
	2.3173
	2.3541
20.3	11.6401
	11.697
	11.6124
	11.7877

Excelで下記の様にデータを作成します。

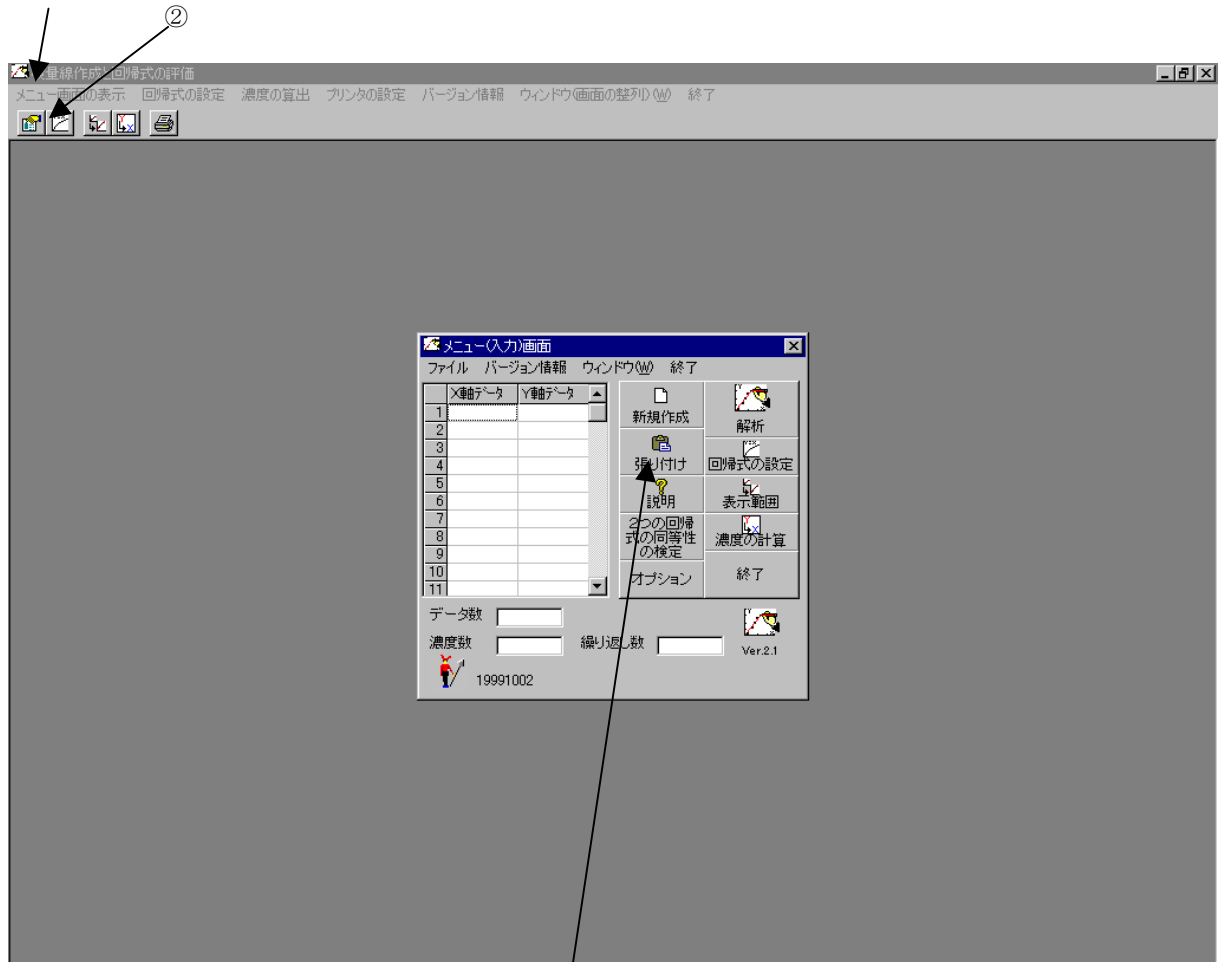


データの範囲を指定し、コピーします。(データはクリップボードに送られます。)

3 起動画面

- 1) 起動するとはじめに下記の画面が出力されます。
- 2) ①か②をクリックするとメニュー画面（入力画面）が出ます。

①（入力画面）



Excelで作成しコピーしたデータを本ソフトに「張り付け」ます。

4 メニュー（入力）画面

[張り付け] エクセルなどデータを作成して、コピーして貼り付けます。



データ張り付いたデータを消して [新規作成] するとき 사용합니다。（データを消します。）

[解析] で検量線の作成を行います。

[回帰式の設定] で回帰式の次数、重み付け関数などを設定します。

[表示範囲] で作成した回帰図の X 軸と Y 軸の表示範囲を設定します。

[濃度の計算] で作成した検量線を用いて、濃度（逆推定）の計算をします。

プログラムを終了します。

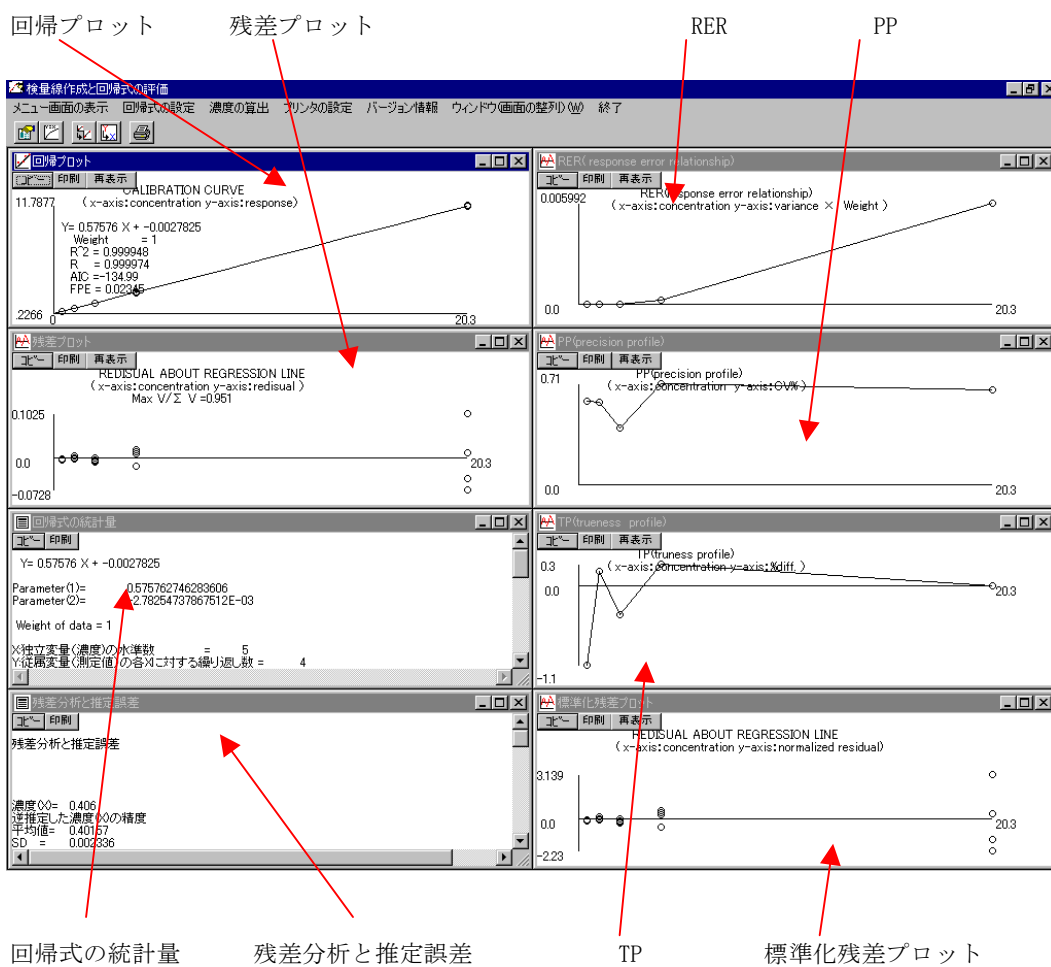
正しく取り込めたかを確認します。（同じ濃度が繰り返されていると、繰り返しと判断します。）

まず「解析」ボタンを押してみます。



1 次回帰で重み付け無しの計算が実行されます。

5 解析画面



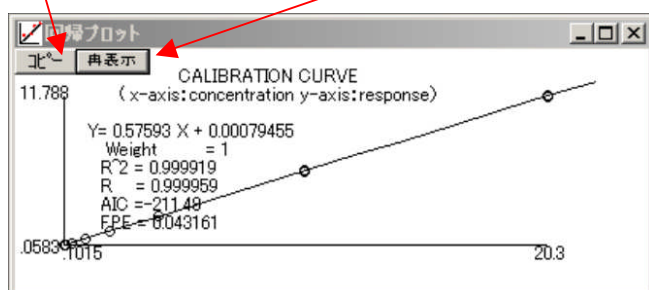
計算後、上記 8 つの画面（子ウィンドウ）が開きます。

[回帰プロット]

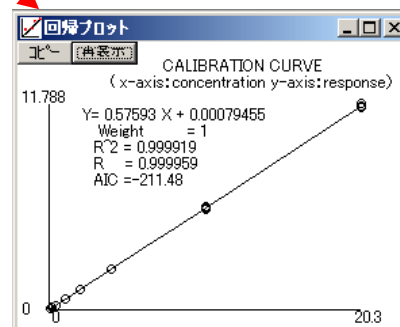
検量線を表示します。

[再表示] 大きさを変えて、再表示で枠内に表示する。

[コピー] でEXCEL等に張り付ける。



再表示



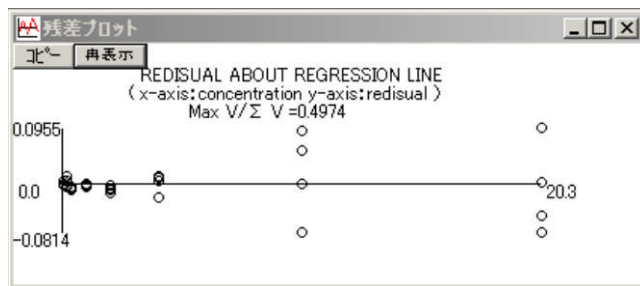
(注)

再計算 、 「再表示」などを使用すると、再計算、再表示し、図の大きさはそのままです。

[残差のプロット]

横軸 (X-軸) と残差のプロットです。

(注) Y-軸との残差ではない点に注意して下さい。



この例では、濃度に比例して誤差が大きくなっています。
重み付け回帰が必要であるといえます。

[回帰式の統計量]

各統計量を出力します。
必要なものをコピーしEXCEL等に張り付けます。



下記の統計量が出力されます。

(例)

Y = 0.575931 X + 0.000795
Parameter (1) = 0.575931153746492
Parameter (2) = 7.94554539200298E-04
Weight of data = 1
X:独立変量 (濃度)の水準数 = 8
Y:従属変量 (測定値)の各Xに対する繰り返し数 = 4
n = 32
決定係数(寄与率) R^2 = 0.9999189089
相関係数 R = 0.9999594536
Rの有意性
Fo 値 = 369924.25
母相関係数の推定範囲(95%)
0.9999160392 - 0.9999804196
最大対数尤度 MLL = 3.367
赤池の情報量規準 AIC = -211.479
Final Prediction Error FPE = 0.0432
Xの重心 = 4.7831875
Yの重心 = 2.75558125
Hartley の等分散性の検定
Max V/Min V = 3312.041
5% 点 = 83.5
等分散性の仮説は危険率5%で棄却された
Cochranの等分散性の検定
Max V/ Σ V = 0.4974
5% 点 = 0.4377
等分散性の仮説は危険率5%で棄却された

[残差分析と誤差の推定]

各濃度の誤差の推定（逆推定した値の誤差）ができます。

全濃度域の誤差を推定でき、もっとも良く適合し、精確さの良い最適回帰式を選択し採用します。



(例)

濃度(X)=0.1015

逆推定した濃度(X)の精度

平均値= 0.104492

SD = 0.006646

CV% = 6.4

%diff. = 2.9

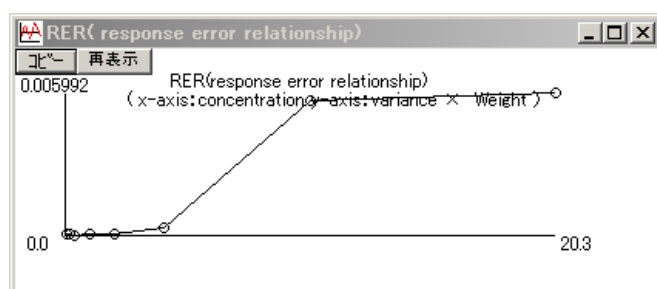
測定値 Y	期待値 Y	残差	逆推定した濃度(X)	濃度(X)の%diff.
0.0583	0.059252	-0.000952	0.099848	-1.63
0.0585	0.059252	-0.000752	0.100195	-1.29
0.0665	0.059252	0.007248	0.114086	12.4
0.0606	0.059252	0.001348	0.103841	2.31

[RER]

RIAで使用されているRER(Response Error Relationship)を、HPLC等の検量線の評価に取り入れたものです。

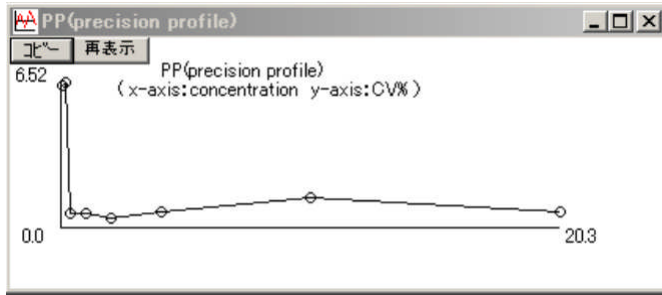
横軸が濃度で縦軸は測定値(Response)の誤差分散です。

(注) 重み付けた場合、重み付けた分散を示します。



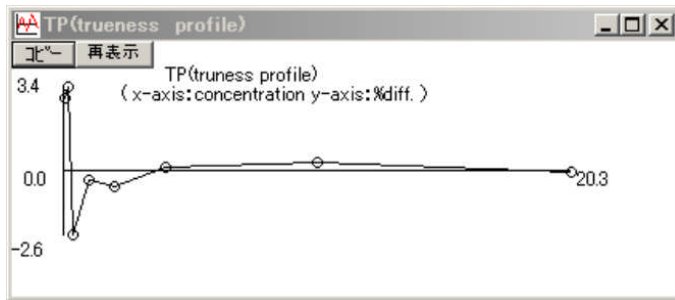
[PP]

RIAで使用されているPP(Precision Profile)を、HPLC等の検量線の評価に取り入れたものです。横軸が濃度で、縦軸は測定値から逆推定した濃度の精度(CV%)です。全濃度域での精度を調べることができます。



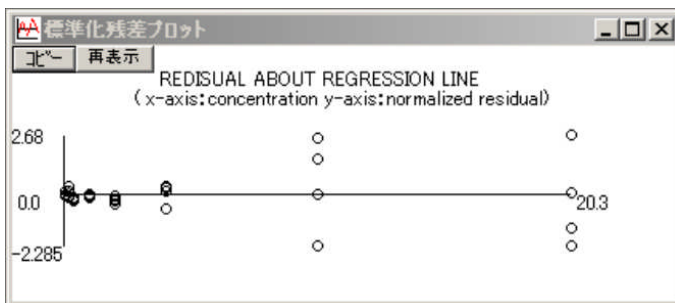
[TP]

横軸が濃度で、縦軸は測定値から逆推定した濃度の真度(%diff.)です。全濃度域での真度の変化を調べることができます。



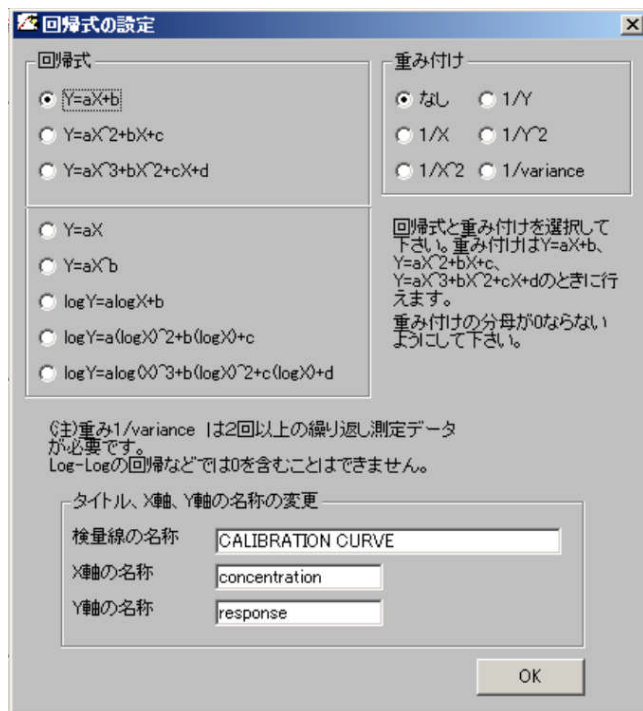
[標準化残差のプロット]

標準化した残差のプロットです。この残差は重み付けの影響を考慮しています。重み付けした標準化残差を表示します。このため、重み付けで変化しますので最適な重み付けを調べることができます。



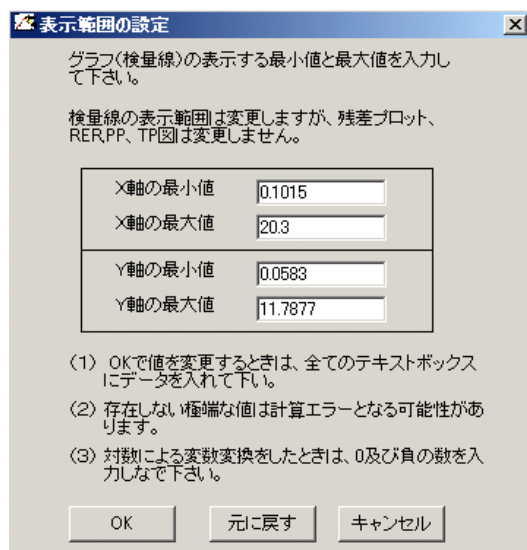
6 回帰式の設定

メニュー画面かツールバーの「回帰式の設定」で回帰式を選択します。



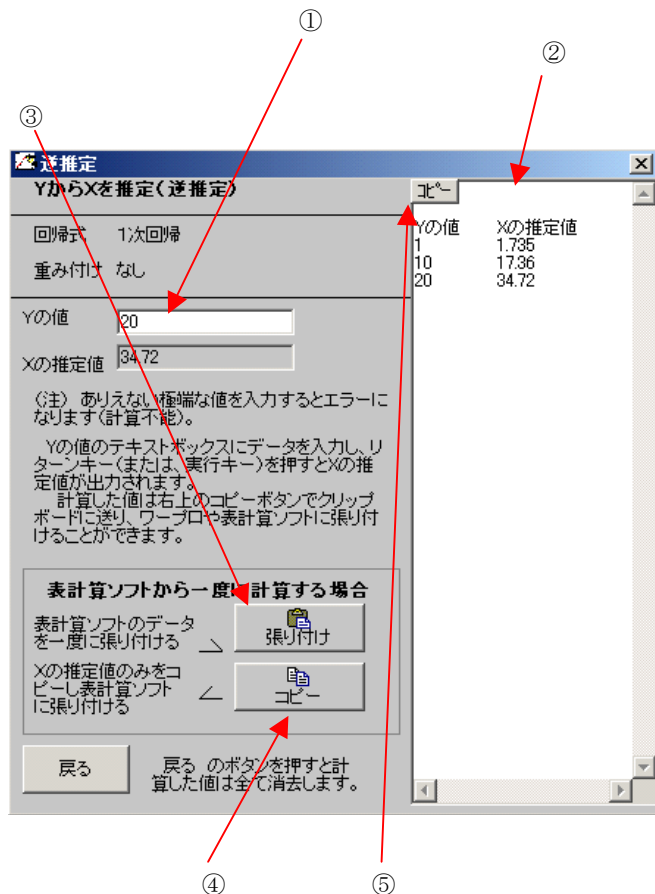
7 表示範囲の設定

メニュー画面かツールバーの「表示範囲の設定」で、検量線の表示する最小値と最大値を変更できます。



8 逆推定

メニュー画面かツールバーの「濃度の計算」で、選択した検量線での濃度の計算（逆推定）ができます。



1) テキストボックスでのデータ入力

①のテキストボックスにデータを入力すると②に計算値を出力します。

2) EXCELなどの表計算ソフトからのデータ入力

③の「張り付け」でEXCELなどの表計算ソフトのデータを一度に取り込みます。
取り込んだデータの計算値をエクセル④に出力します。

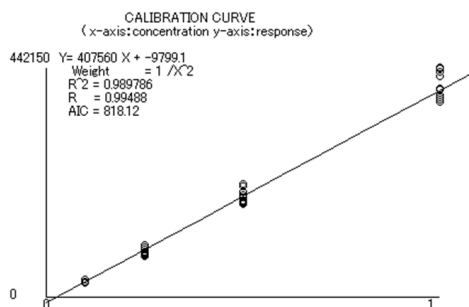
3) ⑤で②のテキストボックスの値を「コピー」し、EXCELなどの表計算ソフトに張り付けることもできます。

9 最適な重み付け

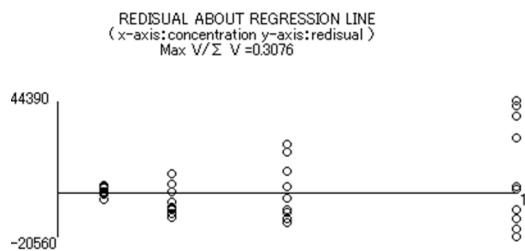
添付エクセルの下記のファイルのデータで解析してみます。

	A	B	C	D
1		GC/MS	SIM+スキャン測定	Agilent
2				
3		ダイアゾン		
4		測定回数	x(ppm)	y(面積)
5		1回目	0.10	30449
6			0.25	84911
7			0.50	186362
8			1.00	400984
9		2回目	0.10	31173
10			0.25	85804
11			0.50	191810
12			1.00	399847
13		3回目	0.10	30373
14			0.25	84082
15			0.50	191885
16			1.00	389802
17		4回目	0.10	33817
18			0.25	96466
19			0.50	217635
20			1.00	439615
21		5回目	0.10	34354
22			0.25	92840
23			0.50	213935
24			1.00	442153
25		6回目	0.10	34785
26			0.25	80814
27			0.50	184952
28			1.00	380838
29		7回目	0.10	30280
30			0.25	82304
31			0.50	181699
32			1.00	385393
33		8回目	0.10	28060
34			0.25	80564
35			0.50	180265
36			1.00	377203
37		9回目	0.10	30355
38			0.25	101585
39			0.50	204428
40			1.00	434438
41		10回目	0.10	31480
42			0.25	88107
43			0.50	197312
44			1.00	424506

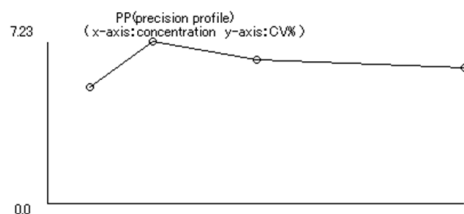
検量線は下記のようになり、1次回帰を選択します。



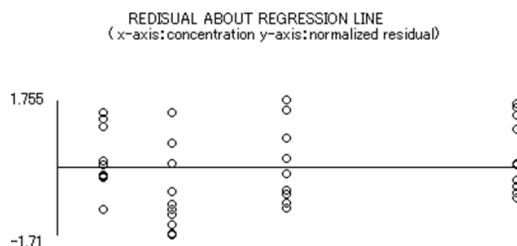
残差プロットから濃度でバラツキが異なることより重み付き回帰が必要です。



変動係数(CV%)は各濃度で一定なので $1/x^2$ を選択してみます。



$1/x^2$ での重み付け残差プロットを見ると、全濃度でバラツキが同じ程度になっていて、 $1/x^2$ を選択します。



この検量線での、逆推定した濃度の値、SD、CV%、各濃度の%diff (RE%)を確認して下さい。

検量線を変えて、望む「精確さ」が得られるかを検討します。

濃度 X = 0.1
 逆推定した濃度 X の精度
 平均値 = 0.10136
 SD = 0.005264
 CV% = 5.2

測定値 Y	期待値 Y	期待値 Y との差	逆推定した濃度 X	濃度 X の %diff.
30450	30960	-507.8	0.09876	-1.25
31170	30960	216.2	0.1005	0.53
30370	30960	-583.8	0.09857	-1.43
33820	30960	2860	0.107	7.02
34350	30960	3397	0.1083	8.34
34790	30960	3828	0.1094	9.39
30280	30960	-676.8	0.09834	-1.66
28060	30960	-2897	0.09289	-7.11
30360	30960	-601.8	0.09852	-1.48
31480	30960	523.2	0.1013	1.28

濃度 X = 0.25
 逆推定した濃度 X の精度
 平均値 = 0.23934
 SD = 0.01731
 CV% = 7.23

測定値 Y	期待値 Y との差	逆推定した濃度 X	濃度 X の %diff.
84910	-7180	0.2324	-7.05
85800	-6287	0.2346	-6.17
84080	-9009	0.2303	-7.86
96470	4375	0.2607	4.29
84040	749.4	0.2518	0.74
80810	-11280	0.2223	-11.07
82300	-9787	0.226	-9.61
80560	-11530	0.2217	-11.31
101600	9494	0.2783	9.32
88110	-3984	0.2402	-3.51

一部をコピーすることも出来ます。

10 エクセルのデータを計算し、エクセルに貼り付ける方法

下記のようなレスポンス（面積、高さなど）が得られたら、エクセルのデータから次のように計算します。

コピー → 濃度の計算

濃度の計算を選択し → 張り付け

データを貼り付けます。

コピー

逆推定

YからXを推定(逆推定)

回帰式 1次回帰
 重み付け 1/X²

Yの値
 Xの推定値

(主) ありえない極端な値を入力するとエラーになります(計算不能)。
 Yの値のテキストボックスにデータを入力し、リターンキー(または、実行キー)を押すとXの推定値が出力されます。
 計算した値は右上のコピーボタンでクリップボードに送り、ワープロや表計算ソフトに貼り付けることができます。

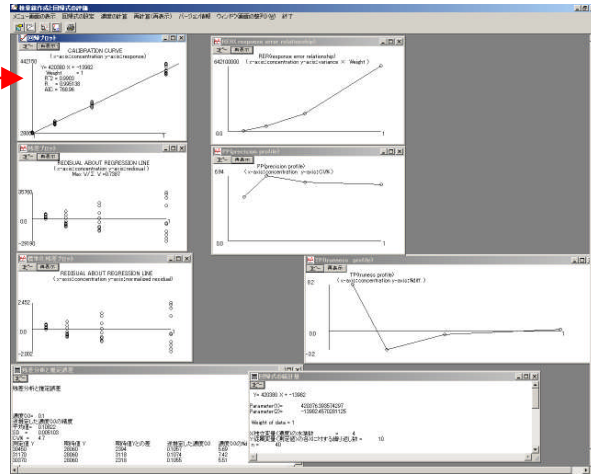
表計算ソフトから一度に計算する場合
 表計算ソフトのデータを一度に張り付ける [張り付け]
 Xの推定値のみをコピーし表計算ソフトに張り付ける [コピー]

戻る 戻るのボタンを押すと計算した値は全て消去します。

A	B
測定値	濃度
30071	0.09783
100224	0.27
213481	0.5478
299847	0.7598

1.1 同じ大きさの図で、データのみ変える方法

エクセルと同じ図の大きさの
検量線を貼り付けたい時など、
検量線の大きさを変えたくない
場合を説明します。

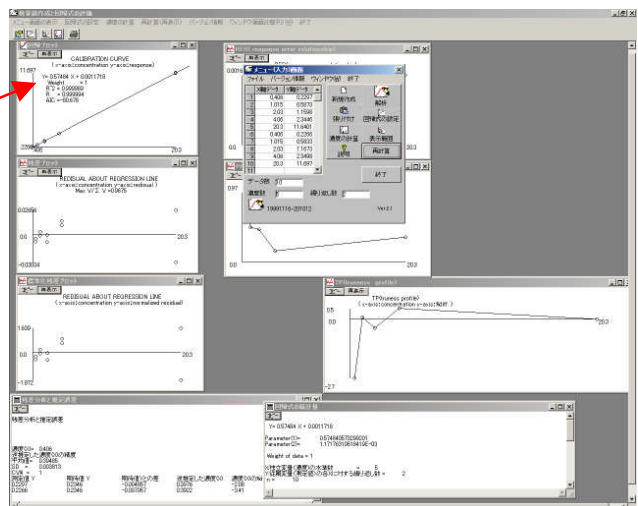


エクセルに検量線を貼り付ける場合、「新規作成」でデータを消して、新しいデータを「貼り付け」ます。



「解析」ではなく、**再計算** を選択して下さい。新しいデータで再計算しますが、各ウインドウの位置と大きさは変化しません。

データが変わりますが、各ウインドウの
位置は変化しませんので、そのまま
エクセルなどに貼り付ければ、同じ
大きさの検量線となります。



「回帰式の設定」**回帰式の設定** や「濃度の
計算」でも大きさは変化しませんので、回帰式の変更、重み付けの変更などを検討して、各検量線で濃度（逆
推定）を計算し、比較することができます。