ダイオキシン類の GC/HRMS 測定における 検出下限の推定法の比較

岩木 和夫¹⁾, 大羽 宏¹⁾, 勝峰 万里²⁾, 小澤さやか¹⁾, 松田りえ子³⁾, 林 譲³⁾

¹⁾株式会社荏原総合研究所 (〒251-8502 神奈川県藤沢市本藤沢4-2-1)

²⁾株式会社荏原製作所 (〒251-8502 神奈川県藤沢市本藤沢4-2-1)

³⁾国立医薬品食品衛生研究所 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1)

[平成13年 1月15日受理]

Comparison of Methods for Estimating Limit of Detection in GC/HRMS for Dioxins

Kazuo IWAKI¹⁾, Hiroshi OHBA¹⁾, Mari KATSUMINE²⁾, Sayaka OZAWA¹⁾,
Rieko MATSUDA³⁾ and Yuzuru HAYASHI³⁾

¹⁾EBARA Research Co., Ltd.

(4-2-1 Honfujisawa, Fujisawa, Kanagawa 251-8502)

²⁾EBARA Corporation

(4-2-1 Honfujisawa, Fujisawa, Kanagawa 251-8502)

³⁾National Institute of Health Sciences

(1-18-1 Kami-Yoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501)

[Received January 15, 2001]

Summary

Five methods for estimating the limit of detection are compared with regard to the estimates of LOD and reproducibility of the LOD estimates in GC/HRMS for dioxins. The following methods are taken:

1. LOD based on repetition:

Three times SD of area measurements (area SD, $n=5$);

Three times SD of height measurements (height SD, $n=5$);

2. LOD based on S/N:

Six times SD of baseline noise (baseline SD);

Six fifths of envelope of baseline (baseline range);

3. LOD based on probability theory of signal and noise (FUMI theory).

The LOD estimates obtained from the above methods, except the height SD, are comparable to each other. The reproducibility of the LOD estimates is ca. 30 % RSD for the area SD, height SD and baseline range, ca. 20 % RSD for baseline SD and ca. 15 % RSD for the FUMI theory. The FUMI theory is concluded to be the best choice from the viewpoints of statistical reliability and practicality.

Key words: dioxins, limit of detection, detection limit, GC/MS

1. はじめに

ダイオキシン類はたいへん毒性が強い上、環境に広く存在するため、社会的な問題になっている。そのため、環境中のダイオキシン類の測定は非常に低濃度まで行なう必要がある。測定が可能な最低濃度は検出下限 (LOD) であり、ダイオキシン類では LOD まで問題になることも多い。LOD はある物質が検出できたか否かの判定基準であるが、分析システムの性能を示すパラメータでもある。分析法の信頼性を科学的に評価するバリデーションには、評価基準の1つとして LOD が採用されている¹⁾。

LOD は、実験誤差を考慮して、次のように確率論的に定義されることが多い²⁾：ある測定値が LOD と同じであれば、この測定により物質が検出された確率は99.9%であり、検出されなかった確率は0.1%である。測定値が LOD 以下であれば、物質が検出された確率は99.9%より低くなる。

ある物質の存在を分析から証明するためには、正しい LOD を実験から求めることが第1条件である。LOD の誤差が大きいと、存在の判定自体が曖昧になるからである。一般に、LOD の値はそれぞれの分析システム（分析法、人、機器を含める）に特有であり、回数を多くして分析をくり返せば、かなり精確に求められる。しかし、試験・研究室の仕事の能率を考えると、多くの時間（例えば、半日）を費やして LOD を求めることはできないので、LOD の信頼性はある程度犠牲にしなければならないのが実状である。

そこで、本研究では、幾つかの実践的な方法で求めた LOD の誤差の程度を調べ、それぞれの LOD 推定法の特徴を議論する。判定基準のバラツキの程度を知っていれば、判定自体の曖昧さを推測できるからである。ここで検討する LOD 推定法は、どれも明確に定められた手順に従って LOD を算出する³⁻¹⁰⁾。これらの方法に従えば、必ず LOD を求めることができるが、全く同じ条件（サンプル、測定など）で、もう1度 LOD を求めても、実験誤差のため同じ LOD 値が得られることはありえない。すると、同じ条件から得られた LOD のバラツキが小さい方法が、良い LOD 推定法となる。

LOD は実際にはどの程度ばらつくのであろうか？このバラツキが小さければ、分析化学の方法として問題はない。しかし、LOD のバラツキが無視できないくらい大きいことは次の例から分かる。5回のくり返し実験から求めた測定値（ピーク面積など）の標準偏差 (SD) の3倍を LOD としよう²⁾。数少ないくり返し実験から求めた SD はばらつくため、この LOD も同様にばらつく。このようにして求めた LOD のバラツキの程度 (95%信頼区間) は、真の LOD 値の約±60%であることが統計

学的に分かっている。つまり、5回のくり返しという操作を100回行ない、100個の LOD を求めると、95個は真の値の40%から160%の間に入るが、残りの5個はこの区間外にある。

95%信頼区間が±60%の場合、区間の上限と下限の比は4 ($=1.6/0.4$) となり、同じ条件で求めた LOD 値が2倍または3倍異なることは当然のように起こるだろう。LOD は判定の基準となる量であるから、さらに高い信頼性が必要であろう。もし、95%信頼区間が±20%ならば、LOD の異なり方は大きくとも1.5倍 ($=1.2/0.8$) となるので、この LOD の信頼性は十分と考えてよいだろう。

LOD の95%信頼区間は LOD 推定法によって異なる。くり返し実験による LOD の誤差の程度は上記のように理論的に分かるが、これ以外の LOD 推定法については実験から知ることができる。本研究では、異なった LOD の定義に基づいた方法から得られる LOD の信頼区間を明らかにする：

方法1：くり返し測定値の標準偏差 (SD) に基づく定義³⁻⁸⁾；

方法2：シグナルとノイズの比 (S/N) に基づく定義^{9,10)}；

方法3：ベースラインの確率論的性質による定義 (FUMI 理論)¹¹⁾。

これらの方法の思想は全く異なり、LOD を推定する手順も異なるので、それぞれの方法の特徴を踏まえ、これらを比較検討する。17のダイオキシン異性体の GC/HRMS 測定に起因する誤差に限定し、LOD 推定法自体の統計的信頼性を調べるために、サンプリング、調製による誤差は考慮しない。LOD はどのくらいの統計的信頼性を必要とするかという問題は、社会、科学の発展段階などに依存するので、ここでは扱わない。

ダイオキシン分析の LOD を調べた文献は多い。しかし、異なった LOD の定義を扱った論文を文献検索で見つけることはできなかった。

2. 実験方法

2. 1 ダイオキシン測定法

ダイオキシン測定は、ガスクロマトグラフ部分が Hewlett Packard 社製 HP5890 series II, 質量分析計部分が Micromass 社製 AutoSpec からなる高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計で行った。イオン化エネルギーは36eV, イオン化電流は500 μ A, イオン源温度は230または290℃, 加速電圧は8 kV, 分解能は12,000 (10% Valley), データ取り込みは840ms である。検液は Wellington 社製 “EPA method 1613 Standard Solutions CS1” nonane 溶液を用いた。

用いたカラムは、Supelco SP2331 60m $\times$ 0.25mm(id)

×0.20 μm (TeCDD, TeCDF), Supelco SP2331 30m × 0.25mm (id) × 0.20 μm (PeCDD, PeCDFs, HxCDDs, HxCDFs), SGE BPX-5 25m × 0.22mm (id) × 0.25 μm (HpCDDs, HpCDFs, OCDD, OCDF) である。いずれの場合もキャリアガスはヘリウムで、流量は2 mL/min である。また温度条件はSP2331の場合、注入口温度250℃、オープン温度は100℃で2分保持後10℃/minで昇温し230℃で保持する設定であり、BPX-5の場合は注入口温度300℃、オープン温度は100℃で2分保持後20℃/minで昇温し200℃に達した後、3℃/minで昇温し300℃で保持する設定である。

モニターイオンは、TeCDD は321.8935, TeCDF は305.8987, PeCDD は355.8546, PeCDF は339.8597, HxCDD は389.8157, HxCDF は373.8208, HpCDD は423.7767, HpCDF は407.7818, OCDD は459.7348, OCDF は443.7398である。

2. 2 検出下限推定法

上記の3つの定義から、次の5種類のLODを求める：

方法1：くり返し面積測定値のSDの3倍（面積SD）^{3,9)}；
くり返し高さ測定値のSDの3倍（高さSD）^{3,9)}；

方法2：ベースラインノイズのSDの6倍（ベースラインSD）⁹⁾；

ベースライン最大値と最小値の差の6/5倍（ベースラインレンジ）¹⁰⁾；

方法3：FUMI理論による面積測定値のSDの6倍（FUMI理論）¹¹⁾。

参考資料³⁻⁹⁾によると、「測定値のSDは同一試料を5回以上くり返して分析して求める」と記してあるので、ここでは5回のくり返し測定からSDを求めた。ベースラインSDとベースラインレンジは、200データポイント上で求めた。FUMI理論では、ベースラインの解析に256または512データポイントを用いた。FUMI理論から求めたSDはベースラインSDに近かったため、後者のLODの定義に従って、FUMI理論のSDの6倍をLODとした。

精度（測定値のSD）、特に機器分析の精度、を理論的に扱う研究は多い¹¹⁻²⁰⁾。本論文では、その中から、FUMI理論をとりあげる。FUMIは相互情報量（Function of Mutual Information）の略であり、機器分析の精度を、ベースライン（ノイズ）とピーク（シグナル）の確率論的性質から推定する。1回の測定から測定精度を計算できるので、くり返し測定が時間的または経済的に困難な場合でも、精度・LODを推定できることが最大の利点である。一方、ベースラインノイズがFUMI理論のモデルノイズとは異なっている場合（たとえば、スパイクノイズ）は、精度の推定が正しく行えないという欠点

もある。

一方、方法1のくり返し測定では、どのような場合でも、必ず測定値のSDを求めることができる。FUMI理論のような予備的知識（ノイズの性質など）は必要としない。しかし、正しいSDを求めるためには、多くのくり返し数を必要とすることが、この方法の欠点である。5回のくり返し測定から得られるSD値のパラッキ（95%信頼区間）が約±60%であることは、既に最初の項でLODの信頼性として述べてある。また、SD推定値が±20%の信頼区間を得るためには、30回以上のくり返し数が必要である。そのため、1測定に多くの時間を要する測定法（クロマトグラフィなど）から信頼できるSD値を得ることは、現実にはほとんど不可能である。

S/Nを用いる方法2は、簡単にLODを算出できることが利点である。くり返し測定も予備的知識も必要としない。しかし、方法1と3では、LODに相当するピークが物質由来でない確率は0.1%である等と確率的に定義できることに対して、S/Nはこのような理論的な根拠を持たないという欠点がある。また、S/Nと面積測定値はディメンジョンが異なる上（S/Nは無次元、面積は時間×電圧など）、面積測定値のSDはピーク積分領域が広がると大きくなるので、S/Nから面積測定値のSDを推定することは原理的に不可能である。

方法1のくり返し測定から求めたSDの信頼区間は、統計学のカイ2乗分布から知ることができる。一方、方法2と3の信頼区間は理論的に求められないので、本論文では実験から求める（以下参照）。

3. 結果と考察

Fig. 1は、17のダイオキシン異性体のGC/HRMSにおけるLODである。全体を見渡すと、高さSDから求めたLODを除いて、他の4つのLODはだまかには一致していることが分かる。

Fig. 2には、LODシグナルをベースライン上に乗せて表示してある。異性体2,3,4,7,8-PeCDFを例とした。LODシグナルは、元の滑らかなピークをLOD測定値まで縮小して作成した。Fig. 1からも分かるように、ピーク高さSDのLODシグナルは他に比べてかなり大きい。

一般に、高さ測定と面積測定は精度が異なるため、くり返し測定値のSDの3倍と定義したLODが、これらの測定で異なることは当然である。しかし、高さSDのLODは、他に比べて、非常に大きい。この原因がノイズの特徴にあることを示したのがFig. 3である。図より、用いた測定装置では、ベースライン上に現れるノイズよりピーク上に現れるノイズの方が大きいことが分かる。高さ測定はピークの一番高いところを測定するため、ノイズの影響を受けやすいことが、高さSDが大きくなった原因と考えられる。一方、FUMI理論、ベース

Fig. 1 LOD estimates for dioxins by different methods

A group of three bars corresponds to the results from different estimation methods for an isomer.

A: FUMI theory (left); height SD (center); area SD (right).

B: FUMI theory (left); baseline SD (center); baseline range (right).

LOD estimates for other isomers are placed on the right side of the label.

Fig. 2 LOD signals from height SD, area SD and FUMI theory

The methods for LOD estimation are indicated in the figure.

ラインSD, ベースラインレンジは, ピーク上のノイズではなく, ベースライン上の一定区間のノイズからLODを計算するため, この3つのLODは特に良い一致を示した (Fig. 1)。

これまでのFUMI理論に関する研究では, HPLC, キャピラリー電気泳動における実測SDをかなり正確に予測できている¹⁹⁾。本論文で用いた装置のノイズは, FUMI理論では扱えないスパイクノイズを含んでいるので (Fig. 3), 高さ測定とFUMI理論による高さ測定とSDは一致しないことがむしろ当然と思える。しかし, ピーク面積測定値に関しては, スパイクノイズの影響はそれほど大きくないため, 実測と理論のSDが一致しても不思議ではない。残念ながら, LODの相関を17の異性体に対してプロットすると, 面積SDとFUMI理論のLODはあまり一致していない (Fig. 4A)。LODの定義はこれらの方法で異なるが (前項参照), 面積SDの方がかなり大きいことが分かる。参考のためにベースラインSDのLODとFUMI理論のLODの相関を調べると, これらは良く一致していることが分かる (Fig. 4B)。

くり返しピーク面積のSDとFUMI理論によるSDが一致していない理由として, ピークを表すデータポイント数が少ないことも考えられる。Fig. 5は, 1, 2, 3, 7, 8 PeCDFをくり返し測定した場合の, ピーク形状を示す。ピークの端から端までは約15データポイントで表されている。このピークは高いためノイズはあまり目立たないにも関わらず, ピークの形はクロマトグラム毎にかなり異なっている。ピーク上のノイズがベースライン上のピークより大きいという事実を考慮しても, 観測されたピークの形が歪んでいると結論できる。少なくとも30データポイントでピークを記述しないと, 正しいピークの形が得られないという研究結果²⁰⁾も, Fig. 5のピークの歪みを裏付けている。個々のピークがランダムに歪め

ば, くり返し面積測定値のSDが高くなるのは当然である。以上の議論により, 今回の実験でFUMI理論がくり返し測定精度を予測できない主な原因は, 少ないデータポイントのためのピークの歪みとシグナル上のスパイクノイズと考えられる。

ここで用いたGC/HRMS装置では, 設定してあるモニターイオン数を減らさない限り, 0.84s以上密にデータを取ることができない。もし, この装置のA/D変換器のサンプリング間隔を短くして (スキャン速度を早くして), ピークを30ポイント以上で表現することができても, ノイズの様子も変わるため, 面積SDとFUMI理論のSDが一致する保証はない。しかし, 他のGC/MSの実験では, 理論と実測は良く一致している²⁰⁾。

FUMI理論, ベースラインSD, ベースラインレンジは, 1つのクロマトグラムからLODを求めることができる。そこで, 4または5個のクロマトグラムからそれぞれLODを求め, その再現性をRSDとして比べた (Fig. 6)。一定領域中のノイズの最大と最小の差であるベースラインレンジの再現性が他より良くない (約30% RSD)。これは, 大きさの異なるスパイクノイズが, ベースラインレンジを求める領域中にランダムに発生するためと考えられる (Fig. 3)。ベースラインSDによるLODとFUMI理論からのLODを比べると, FUMI理論の再現性の方が良いことが分かる。Fig. 6から, 前者のRSDは約20%, 後者は約15%であることが分かる。

冒頭で述べたように, 5回のくり返し測定値のSDの95%信頼区間は約±60%である。この信頼区間をRSDに直すと, 約30%となる。くり返し測定 (面積と高さ) のSDの3倍がLODであるから, このLODの再現性も約30% RSDとなる。Fig. 6より, ベースラインレンジのLODの再現性は約30%であるから, 面積SDと高さSDによるLODの再現性とほぼ同じである。以上まとめる

Fig. 3 Noise on baseline and signal

The peak located around the center contains not only signal but also noise on signal.

Fig. 4 Correlation of LOD estimates between different methods
 A: correlation between FUMI theory and area SD.
 B: correlation between FUMI theory and baseline SD.

Fig. 5 Observed peak shape of 1, 2, 3, 7, 8-PeCDF
 The above peaks are obtained from repeated measurements. The abscissa denotes the data points around the peak.

Fig. 6 Reproducibility of LOD estimates

A group of three bars corresponds to the results from different estimation methods for an isomer. FUMI theory (left); baseline SD (center); baseline range (right).

LOD estimates for other isomers are placed on the right side of the label.

と、考察した5つのLOD推定法の中で、FUMI理論の再現性をもっとも高いと結論できる。

4. まとめ

異なったLODの定義に基づいた方法から得られるLODの値とそのバラツキを、17のダイオキシン異性体のGC/HRMS測定について調べた。次のよく知られている方法を検討した：

方法1：くり返し測定に基づく方法

くり返し面積測定値のSDの3倍（面積SD, $n = 5$ ）；

くり返し高さ測定値のSDの3倍（高さSD, $n = 5$ ）；

方法2：S/Nに基づく方法

ベースラインノイズのSDの6倍（ベースラインSD）；

ベースライン最大値と最小値の差の6/5倍（ベースラインレンジ）；

方法3：ベースラインノイズの確率論的性質に基づく方法

FUMI理論による面積測定値のSDの6倍（FUMI理論）。

LODの値自体は、高さSDによるLODを除いて、他の4種類の方法ではほぼ一致していた。LODのバラツキ（統計的信頼性）を調べると、面積SD、高さSD、ベースラインレンジが約30% RSDであり、ベースラインSDが約20% RSD、FUMI理論が約15% RSDであった。LODの値、そのバラツキ、必要な実験量を考慮すると、FUMI理論が最も実践的な方法と考えられる。

要 約

ダイオキシン類の測定に用いたGC/HRMSに対して、次の5つの検出下限推定法を比較検討した：

1. くり返し測定に基づいた検出下限（LOD）：

面積測定値のSDの3倍をLODとする（area SD, $n = 5$ ）；

高さ測定値のSDの3倍をLODとする（height SD, $n = 5$ ）；

2. S/Nに基づいたLOD：

ベースラインノイズのSDの6倍をLODとする（baseline SD）；

ベースラインの最大幅の6/5をLODとする（baseline range）；

3. シグナルとノイズの確率論的性質に基づいたLOD（FUMI theory）。

height SDを除けば、これらの方法のLOD推定値は互いにほぼ同じであった。LOD推定値の再現性は、area SD, height SD, baseline rangeでは約30% RSD, baseline SDでは約20% RSD, FUMI theoryでは約15% RSDであった。LODの再現性と推定の簡便さから、FUMI theoryが最も優れた方法であると結論できた。

文 献

- 1) ICH Topics Q2B, Validation of Analytical Procedure: Methodology (1996)
- 2) Long, G.L. and Winefordner, J.D.: Limit of Detection, A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.*, **55**, 712A-724A (1983)
- 3) 環境庁大気保全局大気規制課, 有害大気汚染物質測

- 定方法マニュアル (1999)
- 4) 環境庁水質保全局土壤農業課, ダイオキシン類に係る土壌調査暫定マニュアル (1998)
 - 5) 環境庁水質保全局水質規制課, ダイオキシン類に係る水質調査マニュアル (1998)
 - 6) 環境庁水質保全局水質管理課, ダイオキシン類に係る底質調査暫定マニュアル (1998)
 - 7) JISK0311, 排ガス中のダイオキシン類及びコプラナー PCB の測定方法 (1999)
 - 8) JISK0312, 工業用水・工場排水中のダイオキシン類及びコプラナー PCB の測定方法 (1999)
 - 9) 厚生省生活衛生局水道環境部環境整備課, 廃棄物処理におけるダイオキシン類標準測定分析マニュアル (1997)
 - 10) 厚生省生活衛生局食品保健課, 食品中のダイオキシン類およびコプラナー PCB の測定方法暫定ガイドライン (1999)
 - 11) 林 譲, 松田りえ子: HPLC 分析の精度, 林純薬工業 (1999)
 - 12) Prudnikov, E.D., Elgersma, J.W. and Smit, H.C.: Theoretical calculation of the standard deviation and detection limit in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 619-622 (1994)
 - 13) Ingle Jr., J.D. and Crouch, S.R.: Spectrochemical analysis, Prentice-Hall, Inc., New Jersey (1988)
 - 14) Rothman, L.D., Crouch, S.R. and Ingle Jr., J.D.: Theoretical and experimental investigation of factors affecting precision in molecular absorption spectrophotometry. *Anal. Chem.*, **47**, 1226-1233 (1975)
 - 15) Bower, N.W. and Ingle, Jr., J.D.: Precision of flame atomic absorption measurements of copper. *Anal. Chem.*, **48**, 686-692 (1976)
 - 16) Bower, N.W. and Ingle, Jr., J.D.: Precision of flame atomic absorption measurements of arsenic, cadmium, calcium, copper, iron, magnesium, molybdenum, sodium, and zinc. *Anal. Chem.*, **49**, 574-579 (1977)
 - 17) Boumans, P.W.J.M.: Detection limits and spectral interferences in atomic emission spectrometry. *Anal. Chem.*, **66**, 459A-467A (1994)
 - 18) Boumans, P.W.J.M.: Atomic emission detection limits: more than incidental analytical figures of merit! — A tutorial discussion of the differences and links between two complementary approaches. *Spectrochim. Acta*, **46B**, 917-939 (1991)
 - 19) Alkemade, C.Th.J., Snelleman, W., Boutilier, G.D., Pollard, B.D., Winefordner, J.D., Chester, T.L. and Omenetto, N.: A review and tutorial discussion of noise and signal-to-noise ratios in analytical spectrometry-I. Fundamental principles of signal-to-noise ratios. *Spectrochim. Acta*, **33B**, 383-399 (1978)
 - 20) Boutilier, G.D., Pollard, B.D., Winefordner, J.D., Chester, T.L. and Omenetto, N.: A review and tutorial discussion of noise and signal-to-noise ratios in analytical spectrometry-II. Fundamental principles of signal-to-noise ratios. *Spectrochim. Acta*, **33B**, 401-415 (1978)
 - 21) Alkemade, C.Th.J., Snelleman, W., Boutilier, G.D. and Winefordner, J.D.: A review and tutorial discussion of noise and signal-to-noise ratios in analytical spectrometry-III. Multiplicative noises. *Spectrochim. Acta*, **35B**, 261-270 (1980)
 - 22) Pollard, B.D., Ullman, A.H. and Winefordner, J.D.: Noise sources in multielement atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Chem.*, **53**, 330-336 (1983)
 - 23) Hayashi, Y. and Matsuda, R.: Deductive prediction of measurement precision from signal and noise in liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **66**, 2874-2881 (1994)
 - 24) Matsuda, R., Hayashi, Y., Sasaki, S., Saito, K., Iwaki, K., Harakawa, H., Satoh, M., Ishizuki, Y. and Kato, T.: Deductive prediction of precision in measurement, calibration and standard addition method in atomic absorption spectrometry for cadmium. *Anal. Chem.*, **70**, 319-327 (1998)
 - 25) 四方田千佳子, 田頭洋子, 勝峰万里, 岩木和夫, 松田りえ子, 林 譲: クロマトグラフィー分析における適切なデータ取り込み間隔の推定, 分析化学, **49**, 225-231 (2000)
 - 26) Haishima, Y., Hayashi, Y., Yagami, T. and Nakamura, A.: Elution of bisphenol-A from hemodialyzers consisting of polycarbonate and polysulfone resins. *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biometer.*, **58**, 209-215 (2001)