Информация

Инструментальный предел обнаружения систем ГХ/МС

Практика применения при оценке чувствительности хромато-масс-спектрометров производства СКБ "Хроматэк"

Васильев В.Ю., Мальцев А.В., Винокуров А.А., СКБ "Хроматэк"
v.vasilyev@chromatec.ru

1 Аннотация

Вопросы определения инструментального предела обнаружения хромато-масс–спектрометров (Instrument Detection Limit – IDL) и сравнения его с отношением амплитуды сигнала к шуму (Signal-to-Noise Ratio, S/N или SNR) уже достаточно хорошо освещены в литературе. В данной статье рассмотрены практические аспекты применения оценки чувствительности IDL при выпуске из производства хромато-масс-спектрометров в СКБ "Хроматэк", г. Йошкар-Ола. Ключевые слова: хромато-масс-спектрометр, определение чувствительности, инструментальный предел обнаружения, отношение сигнал/шум.

The problem of Instrument Detection Limit (IDL) evaluation for mass-spectrometers and its comparison with Signal to Noise Ratio (S/N or SNR) was well discussed in different sources. In this article we consider practical aspects of use IDL as sensitivity metric during producing GC/MS systems in "Chromatec" company, Yoshkar-Ola. Key words: mass-spectrometer, sensitivity evaluation, Instrument Detection Limit (IDL), Signal to Noise Ratio (SNR).

Рисунок 1 – Масс-спектрометрический детектор "Хроматэк" с газовым хроматографом "Хроматэк-Кристалл 5000" и жидкостным дозатором

2 Обоснование перехода на IDL

За последние десятилетия методы оценки чувствительности хромато-масс-спектрометров претерпели значительные изменения. Четверть века назад для регистрации сигнала использовались самописцы, а для измерения его амплитуды – линейка. Величина шума определялась как разница между максимальным и минимальным значением сигнала базовой линии в течение 60 секунд непосредственно перед анализируемым пи– ком.

По мере совершенствования техники и замены самописцев на компьютеры, менял– ся и сам подход к определению отношения Сигнал/Шум. Появилась возможность автоматического поиска участка масс-хроматограммы с минимальным шумом, а в качестве величины шума при вычислении отношения сигнала к шуму стало использоваться стандартное отклонение (standard deviation, SD) амплитуды шума. Отношение Сигнал/Шум (SNR) стали рассчитывать по формуле:

$$\frac{\text{Сигнал}}{\text{Шум}} = \frac{(\text{Амплитуда пика} - \text{Среднее значение базовой линии})}{\text{Стандартное отклонение шума}}$$

В качестве примера на рисунке 1 приведена масс-хроматограмма для m/z от 271.5 до 272.5, полученная при вводе 1 мкл раствора октафторнафталина (ОФН) с концентрацией 1 пг/мкл, в режиме полного сканирования в диапазоне масс от 50 до 300 а.е.м. на масс-спектрометрическом детекторе (МСД) "Хроматэк" с хроматографом "Хроматэк-Кристалл 5000". В зависимости от выбранного участка шума (1, 2 или 3), отношение Сигнал/Шум различается почти в 2 раза: так для участка 1 SNR=135, для участка 2 SNR=95, для участка 3 SNR=76.

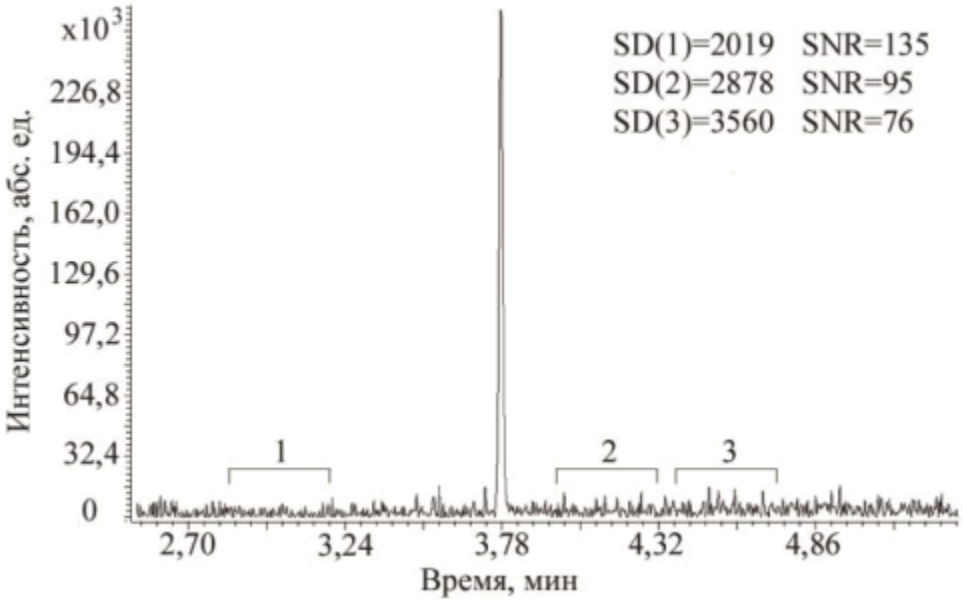

Рисунок 2 – Масс-хроматограмма (271.5-272.5) 1 мкл раствора ОФН с концентрацией 1 пг/мкл

Безусловно, программными методами, участок 1 с наименьшим уровнем шума все– гда будет найден и, соответственно, наибольшее значение SNR=135 будет вычислено.

В условиях все возрастающей конкуренции на рынке хромато-масс-спектрометров в 2008-2009 гг. ведущими зарубежными производителями оборудования был предложен модифицированный метод вышеописанного вычисления отношения Сигнал/Шум, который давал значительное увеличение отношения Сигнал/Шум без каких-либо существенных технических усовершенствований самой ГХ-МС системы. По этому методу для построения масс-хроматограммы вместо диапазона m/z шириной 1 а.е.м. стал использоваться диапазон шириной 0.1 а.е.м. При этом, из большого количества таких диапазонов вблизи массы анализируемого иона, программными методами опять определялся диапазон, в котором значение SNR было бы максимальным. Таким образом, значительная часть шумов оставалась за "кадром", и отношение сигнал/шум резко повышалось. Для наглядности на рисунке 2 приведена та же масс-хроматограмма, что и на рисунке 1, но построенная для диапазона m/z шириной 0.1 а.е.м. от 271.85 до 271.95 а.е.м. с наименьшим уровнем шума. Как видно из рисунка, амплитуда пика ОФН та же самая, а уровень шума резко упал. Поэтому отношение Сигнал/Шум для участка 1 SNR=1756, а для участка 2 SNR=126.

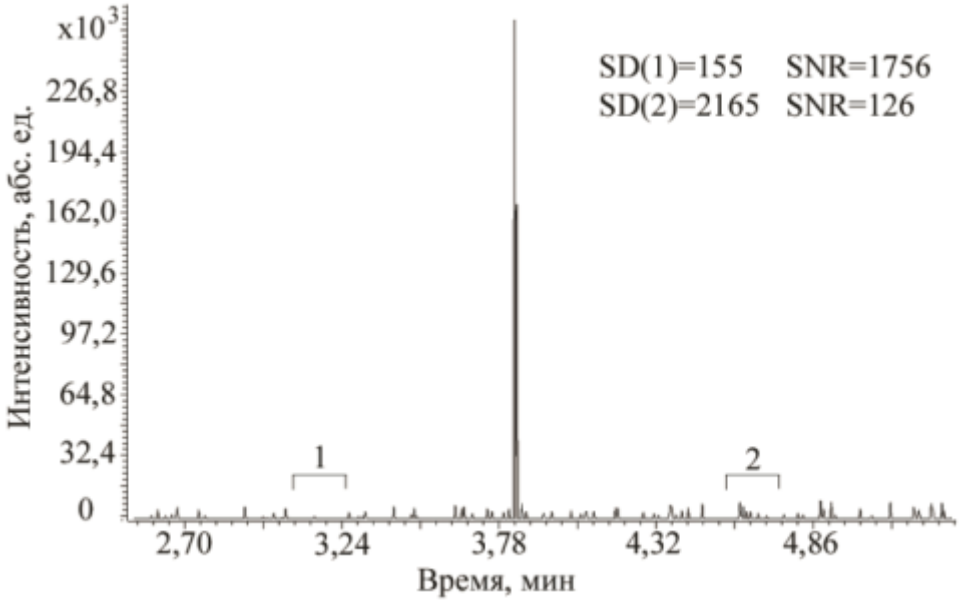

Рисунок 3 – Та же масс-хроматограмма, что и на рисунке 1, но построенная для диапазона m/z шириной 0.1 а.е.м.

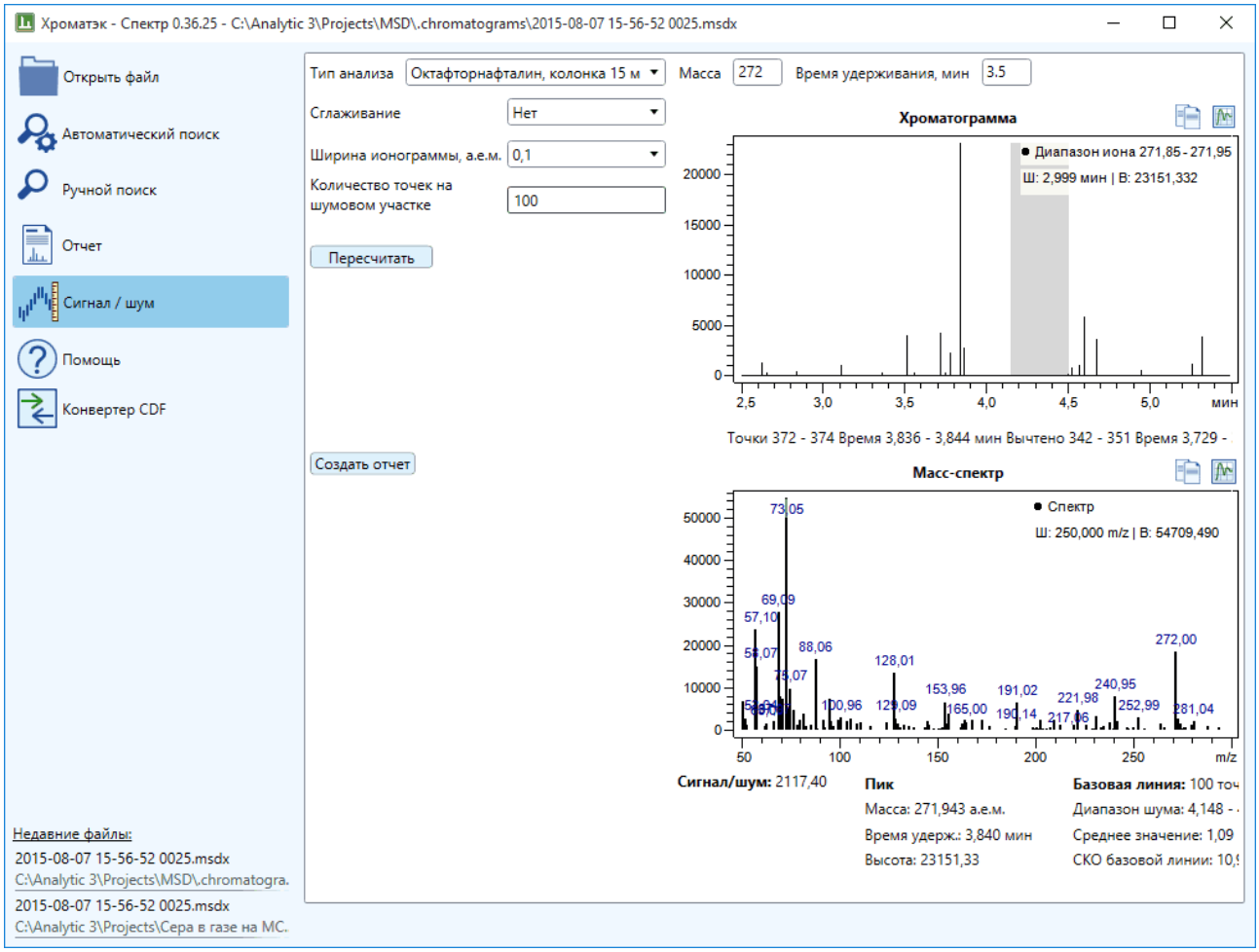

Рисунок 4 – Пример вычисления SNR в программе "Хроматэк-Спектр"

Получение максимального SNR путем снижения шума стало целью производителей квадрупольных и других масс-спектрометров. Кроме того, за последнее десятилетие значительно выросло количество масс-спектрометров с тройным квадруполем и высокого разрешения, по принципу своей работы практически не дающих шума базовой линии.

Однако уменьшение шума почти до нулевого уровня привело к сложностям в оценке чувствительности прибора.

Из приведенных выше масс-хроматограмм видно, что с уменьшением шума базовой линии увеличивается разброс величины стандартного отклонения шума SD (зависящей от выбранного участка масс-хроматограммы) и, следовательно, разброс SNR. При практически нулевом шуме базовой линии значение SNR для одного и того же прибора, в одних и тех же условиях может отличаться в сотни раз. Это справедливо как для отдельно взятой масс-хроматограммы, так и для нескольких масс-хроматограмм, снятых на одном приборе: чем меньше шум, тем больше разброс значений SNR между анализами. Очевидно, что в этом случае аналитик не имеет практического представления о чувствительности прибора.

Таким образом, возникла необходимость в применении универсального критерия для оценки чувствительности всех типов и режимов работы ГХ/МС, в качестве которого компания Agilent предложила статистический параметр – инструментальный предел обнаружения (IDL), а остальные производители его поддержали. И теперь уже ни одна спецификация квадрупольного хромато-масс-спектрометра не обходится без указания этой характеристики.

Несколько слов о том, как СКБ "Хроматэк" прошел этот путь, и как он оценивает чувствительность масс-спектрометров собственного производства.

Вполне естественно, что мы, ориентируясь на достижения лучших зарубежных аналогов, при разработке и производстве своего масс-спектрометрического (или по терминологии компании Agilent – масс-селективного детектора – МСД), прошли все исторические шаги по определению отношения Сигнал / Шум, сделанные мировыми производителями. Поэтому каждая новая методика оценки чувствительности проверялась нами на МСД нашего производства.

В настоящий момент мы обязательно контролируем SNR как в диапазоне 1 а.е.м. (не менее 100:1), так и в диапазоне 0.1 а.е.м. (не менее 1000:1) без применения какой бы то ни было аппаратной и программной фильтрации. По нашему опыту соответствие последнему критерию не всегда давало гарантию хорошей чувствительности и отсутствия загрязнений МСД, а вот предыдущий, многократно проверенный критерий (диапазон 1 а.е.м., SNR не менее 100:1) практически всегда работал, т.к. по своей сути был интегральным критерием. Кроме того, мы постоянно сравнивали полученные результаты с результатами обсчета наших данных в программах Xcalibur и ChemStation.

После появления в начале 2013 г информации о применении статистического IDL в качестве универсального критерия оценки чувствительности квадрупольных хромато– масс-спектрометров, в СКБ "Хроматэк" была проведена серия испытаний своих ГХ-МС с целью определения IDL для них. В результате были получены значения IDL от 5.5 до 8.7 фг, что соответствует чувствительности лучших зарубежных хромато-масс– спектрометров. Далее остановимся немного подробнее на методике измерения и полученных результатах.

3 Методика измерения

За основу оценки IDL был взят метод, изложенный в [2] со следующими параметрами и уточнениями:

1. количество анализов в серии n=8;
2. способ ввода – с помощью автосамплера;
3. тестовое вещество – октафторнафталин (ОФН) с концентрацией 100 фг/мкл;
4. объем вводимой пробы тестового вещества – ровно 1 мкл (режим ввода – "сэндвич");
5. инструментальный предел обнаружения IDLS в единицах площади пика рассчитывается по формуле:

$$\mathrm{IDLS} = t_{\alpha,n-1} \cdot \sigma$$

где:

$t_{\alpha,n-1}$ – коэффициент Стьюдента для 99 % (1-α=0.99) доверительного интервала и n-1 = 7 степеней свободы, равный 2,998;

σ – стандартное отклонение значений площади пика ОФН для серии анализов.

Инструментальный предел обнаружения IDLM в единицах массы вещества рассчитывается по формуле:

$$\mathrm{IDLM} = \mathrm{IDLS}\frac{m}{S} = t_{\alpha,n-1} \cdot \sigma \cdot \frac{m}{S}$$

Зная, что RSD=σ/S*100%, можно записать:

$$\mathrm{IDLM} = t_{\alpha,n-1}\mathrm{RSD}\frac{m}{100}$$

Серии анализов проводились в режиме сканирования отдельного иона (SIM) и при

условиях, аналогичных приведенным в спецификациях хромато-масс-спектрометров Agilent 5977A и Thermo ISQ.

Почему в SIM? Потому что при полном сканировании статистические колебания амплитуды малого сигнала квадрупольного масс-спектрометра настолько велики, что не дают возможности получить стабильный отклик при вводе 100 фг ОФН. Однако, работа в режиме SIM, хоть и является типичной для тройных квадрупольных МСД, не является таковой для МСД с одним квадруполем. Потребителя в этом случае в первую очередь интересует чувствительность в режиме полного сканирования. Следовательно, было бы нежелательно отказываться от оценки SNR в диапазоне m/z=1 а.е.м. в режиме полного сканирования. Поэтому данный метод оценки постоянно применяется в СКБ Хроматэк.

Конкретные значения параметров режима измерения следующие:

Колонка:	CR-5ms 15m × 0.25mm × 0.25µm.
Длительность анализа:	12 мин
Температура колонки:	40 °C (1 мин) – 30 °C/мин – 250 °C
Поток через колонку:	1 мл/мин
Деление потока в испарителе:	0 мл/мин (1 мин) – 30 мл/мин (2 мин) – 10 мл/мин
Температура испарителя:	250 °C
Температура переходной линии:	250 °C
Температура источника ионов:	200 °C
Ток эмиссии:	100 мкА (задержка включения 2.5 мин)
Коэффициент усиления детектора:	3e5
Диапазон сканирования:	272 (SIM)
Ширина окна SIM:	1 а.е.м.
Длительность скана:	0.2 с

4 Результаты

Оценки IDL были проведены на пяти экземплярах ГХ-МС производства СКБ "Хроматэк", в состав каждого из которых входил:

- хроматограф Хроматэк-Кристалл 5000;
- одноименный масс-спектрометрический детектор собственного производства;
- автоматический дозатор ДАЖ-2М.

Таблица 1 – Результаты измерений и вычислений для пяти экземпляров ГХ-МС

№	S	σ	RSD, %	IDLM, фг
1	7027	129.3	1.84	5.5
2	6661	158.5	2.38	7.1
3	5558	138.7	2.5	7.5
4	2454	72	2.93	8.8
5	3458	92.9	2.69	8.1

Для примера, в таблице 2 более подробно приведены результаты измерений и вычисления IDLM для МСД №5, а на рисунке 4 – хроматограммы данной серии анализов.

Таблица 2 – Результаты измерений и вычисления IDLM для МСД №5

Значение площади пика S для соответствующего измерения в серии								Среднее значение площади пика	Стандартное отклонение σ
1	2	3	4	5	6	7	8		
3348	3474	3491	3602	3311	3445	3469	3524	3458	92,9

Среднее значение площади пика ОФН составляет, как видно из таблицы 2, S=3458, а стандартное отклонение σ=92,9.

Тогда:

$$\mathrm{RSD} = \frac{92{,}9}{3458} 100\% = 2{,}69\%$$

$$\mathrm{IDLM} \ = \ 2{,}998 \cdot 2{,}69\% \cdot \frac{100 \text{ фг}}{100}\% = 8{,}1 \text{ фг}$$

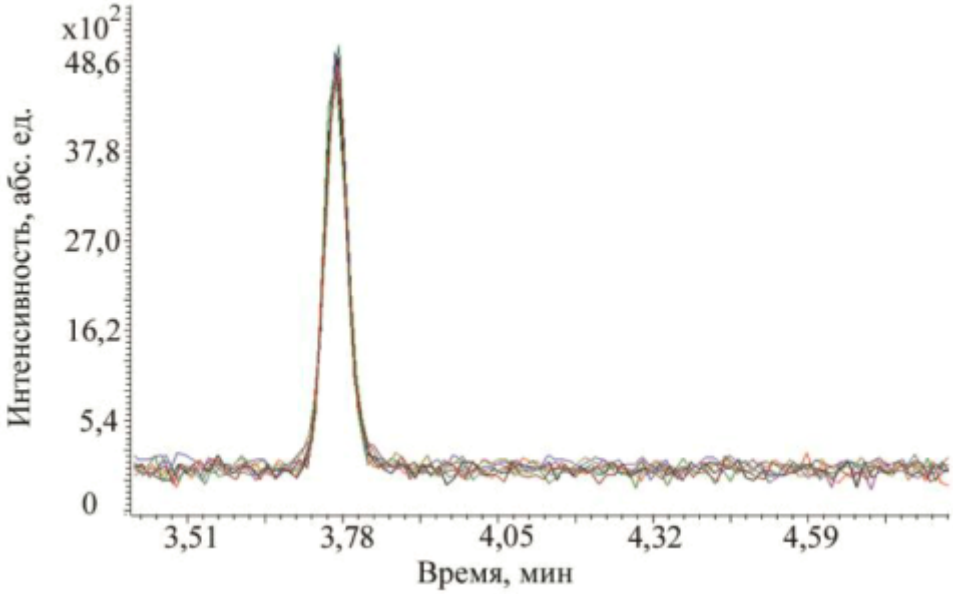

Рисунок 5 – Хроматограммы восьми инжекций для МСД №5 при определении IDL в режиме SIM. Низкий разброс площадей говорит о высокой чувствительности МСД "Хроматэк".

5 Заключение

Итак, на основе практического опыта определения чувствительности при производстве квадрупольных хромато-масс-спектрометров ЗАО СКБ Хроматэк можно сделать следующие выводы:

1. Оценку IDL в режиме SIM можно применять для оценки чувствительности квадрупольных ГХ/МС и с ее помощью можно получить представление о стабильности всей системы, включая автоматический дозатор, систему ввода и газового питания, колонку хроматографа, а также собственно масс-спектрометрический детектор.
2. Но оценка IDL в режиме SIM не позволяет "увидеть" и качественно оценить реальный уровень шумов ГХ/МС, а также определить загрязнения системы и их источники.
3. Для комплексной оценки чувствительности квадрупольных ГХ/МС необходимо ввести оценку IDL в режиме полного сканирования.
4. Оценка IDL в любом режиме (SIM и полного сканирования) не применима для ГХ/МС, поставляемых без автоматического дозатора, поскольку в этом случае в оценку вмешивается человеческий фактор. Поэтому данный метод требует обязательного наличия автоматического дозатора, что фактически является ограничением применения данного метода.

В связи с вышеизложенным мы предлагаем для проверки чувствительности систем ГХ/МС не отказываться от проверенного практикой метода оценки SNR в диапазоне m/z=1 а.е.м. и использовать новый метод оценки IDL наряду с хорошо себя зарекомендовавшим старым.

6 Литература

1. Герасимов Р. Инструментальный предел обнаружения вместо отношения сигнала к шуму: новый подход компании Agilent к оценке чувствительности метода ГХ/МС. – Аналитика, 2013, №2, с.56-58.
2. "Signal, Noise, and Detection Limits in Mass Spectrometry", Agilent Technologies Technical Note, publication 5990-7651EN.
3. "Why Use Signal-To-Noise as a Measure of MS Performance When it is Often Mean Ingless", Agilent Technologies Technical Note, publication 5990-8341EN.