

# Spolehlivé a korektní srovnání citlivosti přístrojů: Instrument Detection Limit (IDL)

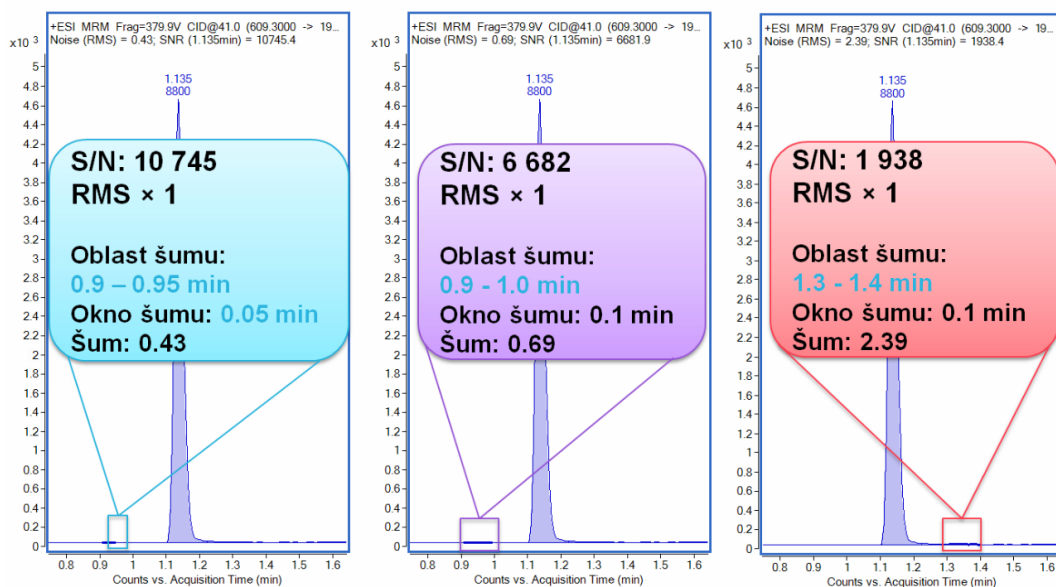
Při výběru hmotnostního spektrometru ve spojení s chromatografií je citlivost jeden z důležitých parametrů. Nejčastěji je vyjadřována jako poměr signálu k šumu (signal-to-noise, S/N) při nástřiku definovaného množství vybraného analytu a přístroj, který dosáhne vyšší hodnoty, je považován za citlivější. Nicméně hodnota S/N závisí na mnoha proměnných a lze ji tedy jednoduše ovlivnit buď umělým zvýšením signálu, nebo snížením šumu. Signál lze například zvýšit napětím detektoru, pro získání nižšího šumu lze záznam vyhladit, odečíst šum tam, kde je

nejnižší (nezávisle na elučním čase analytu), a v neposlední řadě záleží na způsobu výpočtu výšky šumu (peak-to-peak, RMS apod.).

Uvedené postupy v praxi vedou k navýšení hodnoty S/N, které však není postaveno na reálném základě, a extrapolovaná mez detekce neodpovídá skutečně stanovitelnému množství analytu. Obrázky 1 a 2 ilustrují, jak lze pro identický chromatogram ovlivnit hodnotu S/N až o dva řády. V tomto světle je porovnání přístrojů na základě S/N minimálně diskutabilní.

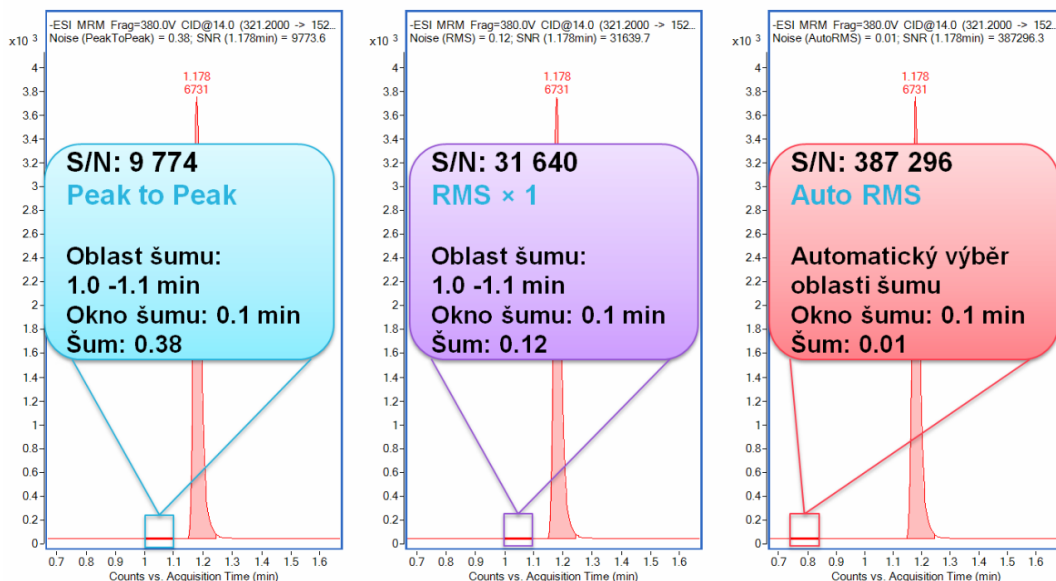
**Obrázek 1**

Závislost vypočteného poměru signál/šum na oblasti výběru šumu a šířce okna šumu. Všechny tři obrázky znázorňují identický chromatogram.



**Obrázek 2**

Závislost vypočteného poměru signál/šum na metodě výpočtu šumu (Peak-to-peak, RMS nebo auto RMS). Všechny tři obrázky znázorňují identický chromatogram.



Dalším z kritických bodů při stanovování meze detekce přístroje je již zmíněná extrapolace signálu k šumu. Jako příklad může posloužit nejnovější generace LC/MS trojitých kvadrupólů, kde se pro pozitivní polaritu elektrospreje ve specifikaci uvádí S/N pro 1 pg reserpinu v hodnotách přes 100 000:1. Pokud budeme za mez detekce (LOD) považovat koncentraci analytu, pro kterou se dosáhne S/N > 3:1, po extrapolaci by LOD těchto přístrojů mělo být nižší než 0,05 fg vnesených na kolonu. Přitom ve skutečnosti se dosahují meze detekce o 1 až 2 řády vyšší. Citlivost analytických přístrojů udávaná takovýmto způsobem ve specifikačních listech je tedy irelevantní a jedná se o nic neříkající „číslo“ na papíře.

Pro korektní porovnání citlivosti je vhodnější používat metody, které jsou v praxi často využívané pro stanovení meze detekce či kvantifikace. Tyto postupy jsou zakotveny i v oficiálních metodických pokynech pro laboratoře. Např. dle EPA - Analytical Detection Limit Guidance, [1] je limit detekce metody (Method Detection Limit - MDL) definován jako minimální koncentrace sloučeniny, která může být změřena a reportována s 99% mírou pravděpodobnosti, že koncentrace analytu je větší než nula. Pro stanovení MDL je nutné opakované měření koncentrace analytu (alespoň 7×) v příslušné matici o koncentraci 1-5 násobku očekávané mezi detekce.

Z naměřených dat je MDL vypočteno jako:

$$MDL = t_{(n-1, 1-\alpha=0,99)} \times s$$

kde:

$t_{(n-1, 1-\alpha=0,99)}$  je kritická hodnota Studentova rozdělení pro hodnotu spolehlivosti 0,99 s  $n-1$  stupňů volnosti (pro 7 opakování je hodnota Studentova rozdělení 3,143)

$n$  je počet opakování

$s$  je směrodatná odchylka odezvy z opakovaných měření.

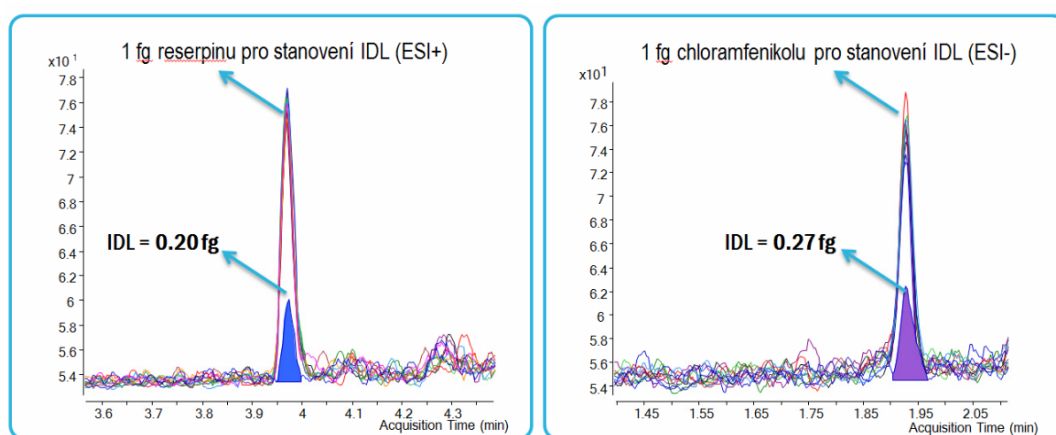
Podle této metodiky MDL závisí na opakovatelnosti měření koncentrací na limitu kvantifikace nebo nižších.

Pro seriózní porovnání citlivosti přístrojů začala společnost Agilent Technologies uvádět i hodnotu Instrumentální Meze Detekce (IDL), která je stanovena analogicky jako MDL, tedy na základě několika opakovaných měření standardního roztoku, jehož koncentrace nesmí být vyšší, než je pětinašobek odhadované meze detekce. V praxi je většinou nutné provést opakované měření pro několik různých koncentračních hladin a následně se vybere ta, která je ke stanovení IDL vhodná. Výpočet IDL probíhá dle výše uvedené rovnice. IDL se u firmy Agilent Technologies stala standardem pro specifikaci citlivosti GC/MS i LC/MS přístrojů typu trojitého kvadrupólu.

6495 QQQ IDL	Nastříkované množství	Počet opakování	Plocha % RSD	t (99 %)	IDL
Reserpine (+)	1 fg	n = 10	7.2	2.821	0.20 fg
Chloramphenicol (-)	1 fg	n = 10	9.7	2.821	0.27 fg

**Tabulka 1**

Výpočet Instrumentální Meze Detekce (IDL) pro reserpin a chloramfenikol na trojitém kvadrupólu Agilent 6495



**Obrázek 3**

Chromatogramy reserpinu (vlevo) a chloramfenikolu (vpravo) znázorňující opakované nástřiky množství 1 fg a množství odpovídající vypočtené mezi detekce

Příkladem výpočtu IDL v praxi je Tabulka 1 a Obrázek 3. IDL bylo stanoveno pro LC/MS trojitý kvadrupól Agilent 6495 (Obrázek 4), který je novinkou z roku 2014 a představuje současnou technologickou špičku. V Tabulce 1 jsou uvedeny výsledky opakovaného měření (n=10)

při nástřiku 1 fg absolutního množství reserpinu (ESI pozitivní), respektive chloramfenikolu (ESI negativní), kdy vypočtená opakovatelnost plochy píku při tomto analyzovaném množství byla 7,2% pro reserpin a 9,7% pro chloramfenikol.

Dle výše uvedené rovnice, v níž je směrodatná odchylka vypočtena jako  $RSD \times$  měřené množství, bylo vypočteno IDL 0,2 fg pro reserpin a 0,27 fg pro chloramfenikol. Na Obrázku 3 jsou vidět chromatogramy obou analytů z opakovaných nástřiků množství 1 fg, přeložené s chromatogramem při nástřiku množství odpovídajícímu vypočtenému IDL. Tento obrázek dokladuje nejen vynikající opakovatelnost na tak nízké hladině, jako je 1 fg, ale i fakt, že stanovené IDL je stále ještě pohodlně detekovatelným množstvím analytu a signál přibližně odpovídá trojnásobku šumu.

#### Závěr:

Specifikace citlivosti přístroje založená na poměru signálu k šumu může poskytovat zkreslující informace, neboť hodnota signálu k šumu je snadno ovlivnitelná řadou parametrů. Naopak parametr IDL přináší několik výhod: (i) s hodnotou IDL v podstatě nelze manipulovat: se šumem se nepracuje vůbec, a zvýšení

napětí detektoru zvýší pouze výšku signálu, nikoli množství iontů dopadajících na detektor, a tím i opakovatelnost; (ii) pro výpočet se používají koncentrační hladiny blízko detekčního limitu a není proto nutné výsledky extrapolovat.

Praktické příklady ukazují, že tento přístup poskytuje realistické hodnoty meze detekce přístroje, a lze jej tudíž využít jako objektivního parametru porovnání.

**Jitka Zrostlíková**

[jitka.zrostlikova@hpst.cz](mailto:jitka.zrostlikova@hpst.cz)

#### Literatura:

1. EPA - Analytical Detection Limit Guidance, 1996: Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits  
<http://dnr.wi.gov/regulations/labcert/documents/guidance/-lodguide.pdf>

**Obrázek 4**

Trojítý kvadrupól LC-MS Agilent 6495

