

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA S VYUŽITÍM HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

MICHAEL VOLNÝ

*Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i, Vídeňská 1083,
142 20 Praha 4
mvolny@gmail.com*

Tento text původně vznikl na AV ČR, současné zaměstnání autora je ve firmě Thermo Fisher Scientific.

Došlo 14.11.19, přijato 4.12.19.

Klíčová slova: mez detekce, citlivost, odstup od šumu, instrumentální mez detekce, mez kvantifikace, interní standard, kalibrační křivka

Obsah

1. Úvod
2. Citlivost
3. Mez detekce
4. Odstup od šumu
5. Mez detekce metody a instrumentální mez detekce
6. Mez kvantifikace
7. Iontové chromatogramy
8. Interní standard
9. Výběr a použití interního standardu
10. Kalibrační křivka
11. QC standardy a referenční materiály

1. Úvod

Chemie byla ve svých počátcích zaměřena spíše na přípravu látek a kvalitativní poznávání a nevyužívala ani zdaleka exaktní výpočty v takové míře, jako ve stejné době například fyzika či astronomie. Je pravda, že již práce pionýrů chemie nesly v určité míře prvky kvantitativní analytické chemie, ale za skutečného průkopníka oboru bývá obvykle považován švédský chemik Torbern Bergman, který sestavil první systematická schémata pro kvalitativní i kvantitativní analýzu a popsal všechna v té době známá a dostupná činidla^{1,2}. Dějinnou ironií je, že zakladatel analytické chemie Bergman přitom zůstal celoživotním přívržencem tzv. flogistonové teorie v chemii, která byla falzifikována právě především díky kvantitativním experimentům, které ukázaly, že látky spálením nabývají na hmotnosti, přestože hořením měly ztratit „flogiston“^{1,2}.

V roce 1850 publikoval Ludwig Wilhelmy práci³ o tom, že rychlost inverze roztoku cukrové třtiny závisí na koncentraci cukru i kyseliny dusičné. Práce byla rozvedena Wilhelmem Ostwaldem⁴ a tvoří nejen stavební kámen

chemické kinetiky a potažmo tedy jeden z pilířů fyzikální chemie, ale také v plné míře poukázala na důležitost velmi přesné kvantitativní chemické analýzy v širším kontextu chemické vědy, aplikované i základní. Obecně lze argumentovat, že pokrok v chemii i biochemii od druhé poloviny 19. století až po dnešní dobu by se nebyl býval obešel bez kvantitativních metod analytické chemie, a ta si tak zaslouženě vydobyla zásadní místo v celé chemii a příbuzných vědeckých oborech.

Hmotnostní spektrometrie je jednou z metod, která sehrála významnou roli jak v samotné kvantitativní analytické chemii, tak i v obecnějším kvantitativním popisu chemických problémů⁵. Hmotnostní spektrometr je nejen přístroj pro chemickou analýzu, ale také v podstatě fyzikálně-chemickou laboratoří pro experimenty v plynné fázi a hmotnostní spektrometrie umožnila kvantifikaci celé řady důležitých fyzikálně chemických vlastností pro širokou škálu specií. Druhou, v dnešní době nesrovnatelně důležitější oblastí, ve které hmotnostní spektrometrie poskytuje bohaté kvantitativní informace, je samozřejmě samotná analytická chemie. Význam hmotnostní spektrometrie v této oblasti dokonce i nadále roste a hmotnostní spektrometrie je dnes základní kvantifikační metodou v analytické chemii, kde postupně přebírá pozice celé řady jiných dříve používaných analytických technik. Lze dokonce říci, že v dnešní analytické praxi se mnohem větší počet hmotnostně spektrometrických měření týká kvantifikace vzorku než řešením problémů molekulární struktury. Všechny hmotnostní spektrometry sice umožňují za vhodných podmínek experimentu kvantifikaci vzorku, ale standardem pro kvantifikaci malých molekul (jakož i tryptických peptidů) jsou trojitě kvadrupóly. Hlavní výhody trojitých kvadrupólů oproti ostatním hmotnostním spektrometrům v LC-MS konfiguraci jsou: nejnižší mez detekce a stanovitelnosti (při použití SRM/MRM), největší lineární dynamický rozsah a obvykle nejnižší cena. Určitou nevýhodou je, že použití SRM/MRM je možné pouze pro cíleovou analýzu již identifikovaného analytu, což je ovšem podmínka při kvantitativní analýze splněná. A právě kvůli významu kvantitativní analýzy jsou trojitě kvadrupóly celosvětově nejprodávanějšími hmotnostními spektrometry v konfiguraci LC-MS.

Tento text se zabývá základními pojmy a koncepty důležitými pro kvantitativní hmotnostně spektrometrická stanovení. Řada z nich není specifická pro hmotnostní spektrometrii a má stejný nebo obdobný význam v dalších analytických metodách, ale v tomto textu je zohledněno pouze hmotnostně-spektrometrické hledisko.

Při použití určitého zjednodušení lze rozlišit tři oblasti kvantifikace hmotnostní spektrometrií. Jednou je anorganická prvková analýza, dnes téměř výhradně pomocí ICP-MS, druhou analýza malých organických molekul (ať již pomocí LC-MS nebo GC-MS) a třetí analýza velkých

biomolekul. Jak již bylo uvedeno, v tomto textu popsané termíny jako mez detekce nebo citlivost mají obecnou platnost, ale příklady jsou vždy uváděny primárně s ohledem na organickou analýzu malých molekul.

2. Citlivost

Citlivost je obecný termín v kvantitativní analytické chemii, který vyjadřuje odpověď analytického signálu na zavedení analytu za definovaných podmínek. Matematicky se tedy jedná o směrnici závislosti množství analytu na intenzitě signálu – tedy o směrnici kalibrační křivky. Z praktického hlediska se citlivost projevuje jako schopnost odlišit signál ze dvou vzorků o různé koncentraci. Čím je citlivost větší (směrnice strmější), tím bližší hodnoty analytického signálu je možné ještě rozlišit na základě určení jejich rozdílu⁶.

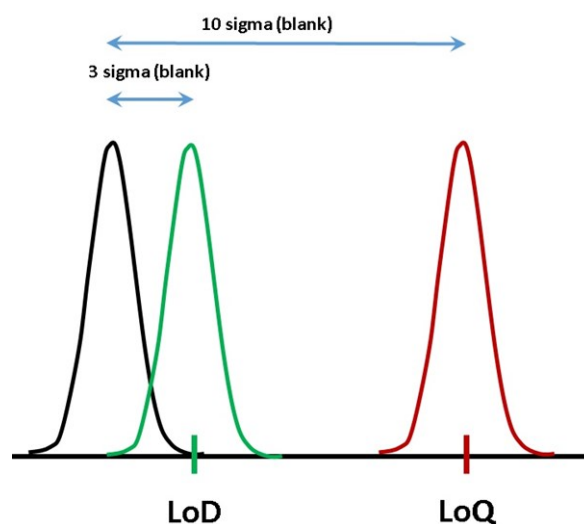
Konkrétně v hmotnostní spektrometrii je citlivost fundamentálně vyjádřena jako poměr náboje, který pro příslušný ion změřil detektor po dopadu zvoleného iontu a hmotnosti dávkovaného analytu. Jednotky jsou tedy C/kg (praktičtěji C/ng), při zavádění kapalného vzorku se místo hmotnosti dávkovaného vzorku mohou použít libovolné koncentrační jednotky. Pokud se citlivost vyjadřuje za definovanou dobu měření detektoru, pak je možné použít k vyjádření odezvy přímo iontový proud (například A/kg). V hmotnostních spektrometrech s definovaným plynným zavedením vzorku je možné vyjádřit citlivost také jako poměr iontového proudu a parciálního tlaku analytu (A/Pa). Při, v dnešní době obvyklém, použití násobičových detektorů (nebo při měření indukovaného proudu v FT-MS) je místo iontového proudu použita arbitrárně vyjádřená intenzita signálu, která je na ose y vynášena proti množství nebo koncentraci dávkovaného analytu. Tato intenzita není obvykle přímo přepočitatelná na iontový proud (vybitý náboj). V běžné analýze ovšem uživatel pochopitelně nezjišťuje hodnoty na detektoru, ale odečítá je v softwaru, který na ose y ve spektru ukazuje formální intenzitu výskytu iontů o daném m/z nebo poměr signálu analytu a interního standardu.

3. Mez detekce

Mez detekce je termín, který určuje nejmenší množství analytu potřebného k získání signálu, který může být odlišen od náhodného signálu (šumu)^{7–12}. Z této definice mimo jiné vyplývá, že mez detekce závisí na volbě deskriptoru náhodného signálu a je tedy termínem, jehož konkrétní pojetí je víceméně závislé na dohodě a může se v různých situacích lišit. Mez detekce je obvykle odhadnuta za použití průměru hodnoty signálu slepého vzorku (blanku), směrodatné odchylky slepého vzorku a předem určené hladiny významnosti. Asi nejčastější definice meze detekce ji zavádí jako trojnásobek směrodatné odchylky slepého vzorku, zatímco desetinasobek je potom nazýván mezi kvantifikace. Vztah mezi slepým vzorkem, mezi detekce a mezi kvantifikace je graficky vyjádřen na obr. 1.

Tato často přijímaná definice meze detekce pro analytickou instrumentaci pochází od Kaisera^{13–15} a hodnota 3 pro násobek směrodatné odchylky byla Kaiserem zvolena na základě Čebyševovy nerovnosti, která určuje, že tvar rozdělení nemůže mít pravděpodobnost větší než $1/9$ nad úrovní tří odchylek průměru⁷ (neboli, že alespoň $1-(1/k^2)$ hodnot rozdělení leží v rámci k standardních odchylek průměru; pro $k = 3$ je to tedy 89 %)⁷. To je hodnota, kterou autor definice považoval za bezpečnou z praktického hlediska. Jiný způsob definice meze detekce může být založen na alfa testu, kdy se testuje, zda je přítomen pouze slepý vzorek nebo i analyt. Pokud distribuce sleduje normální rozdělení, tak používaná hladina alfa = 0,05 odpovídá 2,927 standardních odchylek. Tedy z praktického laboratorního hlediska číslo stejně korespondující Kaiserově definici.

V každém případě je konkrétní hodnota meze detekce vždy platná pouze pro daný analyt a konkrétní analytický protokol. Velmi důležitým faktorem, který ovlivňuje analytickou metodu, je matrice vzorku. To platí obzvláště silně v hmotnostní spektrometrii, kde chemické látky v matici (například soli) mohou velmi negativně ovlivňovat ionizaci analytu, a tedy citlivost (potlačení signálu v hmotnostní spektrometrii), nebo navyšovat šum měření, pokud samy produkují signál stejně jako analyt. Je známo, že hmotnostní spektrometrie je nazývána spektrometrií spíše z důvodů historických a díky podobnosti záznamu dat s ostatními spektrometrickými metodami. Ve skutečnosti se však hmotnostní spektrometrie liší od spektrometrie v celé řadě zásadních aspektů. Tyto rozdíly se pochopitelně dotýkají i významu matričních efektů při stanovení reálných vzorků. Zatímco skutečné spektrometrické metody jsou založené na interakci vzorku s určitou formou elektromagnetického záření, a tedy poměrně dobře fyzikálně definovány, procesy, ke kterým dochází při ionizaci



Obr. 1. Vztah mezi směrodatnou odchylkou, mezi detekce a mezi stanovitelností

v hmotnostní spektrometrii, by šlo spíše označit jako chemické. Zejména při použití moderních metod měkké ionizace jsou ionty z neutrální molekuly analytu vytvořeny přidáním či odebráním protonu, kationtu nebo aniontu. Ionizace tedy závisí jak na rovnováze, tak i na kinetice těchto procesů a je zřejmé, že chemické prostředí, ve kterém se tyto děje odehrávají, má vliv na množství vytvořených iontů za jinak stejných instrumentálních podmínek. Proto platí, že mez detekce nebo stanovitelnosti v hmotnostní spektrometrii je vždy vztahena ke konkrétní matici vzorku, například vodě, moči, plazmě nebo konkrétnímu biologickému nebo environmentálnímu extraktu. Někdy je mez detekce nazývána „citlivostí“, to je však zcela špatně (viz předchozí definice). Kaiserova definice je pravděpodobně nejčastější nejen v hmotnostní spektrometrii, ale i ve všech spektrometrických metodách. Není ale zdaleka jediná, například technická norma DIN 32 645 (cit.¹⁶) zavádí mez detekce pouze jako spíše kvalitativní pojem, a to sice jako koncentraci, při které je analyt v matici detegován v polovině případů. Kromě toho tato norma definuje další termín – mez identifikace, a to jako koncentraci, při které jsou jak falešně pozitivní, tak i falešně negativní měření na úrovni výskytu 1 %.

Tak jako v každé analytické metodě, mez detekce v hmotnostní spektrometrii je ovlivněna každým krokem analytického stanovení a předúprava vzorku nebo separační technika často hrají větší roli než samotný hmotnostní spektrometr. Z hlediska instrumentace je největším faktorem, který ovlivňuje mez detekce i citlivost v dnešních hmotnostních spektrometrech, efektivita ionizace a transportu analytu do hmotnostního spektrometru.

4. Odstup od šumu

Odstup od šumu^{7–10} je parametr, který udává, kolikrát lze signál v plném rozsahu snížit, než se dostane na úroveň šumu. Šum je při měření přítomen po celou dobu, takže ovlivňuje každé měření a intenzita analytického signálu je tedy ovlivněna i intenzitou šumu. V hmotnostní spektrometrii se lze setkat jak s šumem elektronickým, tak i s šumem v důsledku chemického pozadí, např. v důsledku signálu matrice v desorpčních ionizačních metodách, nebo signálu nečistot iontového zdroje, kolony či mobilní fáze. Takovému šumu, který nemá původ v samotné elektronice, ale náleží analytickému signálu molekul přítomných v pozadí systému, se někdy říká „chemický šum“ a je principiálně odlišného původu od šumu elektronického. Pokud je možné rozlišit původ šumu v systému, pak je správnější používat pro poměr signálu a chemického šumu spíše termín „odstup od pozadí signálu“ (signal-to-background ratio). Elektronický šum je statistického původu, a proto je možné odlišit signál od šumu nastavením delších dob sběru analytického signálu a jeho následným sčítáním. Redukce šumu v čase je v tomto případě úměrná druhé odmocnině doby akvizice nebo počtu sbíraných spekter. To znamená, že pokud je místo jednoho spektra uloženo spekter deset, zvýší se odstup od šumu faktorem přibližně 3,2.

5. Mez detekce metody a instrumentální mez detekce

Moderní LC-MSMS systémy, nejčastěji trojitě kvadrupóly v režimu SRM/MRM, vykazují velmi nízký šum, takže firemní specifikace mohou obsahovat obrovské hodnoty S/N. Často je to pro standardizovaný 1 pg organické látky (např. reserpin či chloramfenikol) 1:100 000, někdy dokonce 1:1 000 000. To by při použití definice meze detekce a kvantifikace jako S/N 3, resp. 10, vedlo extrapolaci k nesmyslně nízkým hodnotám v řádu jednotek či desítek attogramů (10^{-18} g). Pokud jsou však takto malá množství na LC-MS systém skutečně dávkována, přístroj buď nedokáže žádný analytický signál vyprodukovat, nebo jen s velmi špatnou reprodukovatelností. Proto se v některých případech začala používat tzv. Mez detekce metody, MDL (Method Detection Limit)^{17,18}, která je definována jako minimální koncentrace analytu, která může být měřením určena jako nenulová na hladině významnosti 99 % při stanovení z příslušné matrice vzorku.

Společnost Agilent Technologies začala pro hmotnostní spektrometrii používat mírně pozměněný koncept MDL, takzvanou Instrumentální mez (limit) detekce^{19,20}, (IDL – Instrument Detection Limit). Podle této metodologie, používané firmou Agilent pro GC-MS a LC-MS s trojitými kvadrupóly, je proveden opakovaný počet nástřiků vzorku (minimálně sedmi) o koncentraci zhruba 2 až 5× nad očekávanou mezí detekce. V praxi se většinou provede nástřik několika koncentrací, aby se zjistila koncentrační hladina vhodná k popisu IDL. Po integraci ploch píků jednotlivých nástřiků se spočítá procentuální směrodatná odchylka a IDL se určí dle následujícího vzorce, obdobného jako pro MDL:

$$IDL = t(n-1; 0,01) \cdot (\%RSD/100) \cdot x \text{ (dávkové množství)}$$

kde t je kritická hodnota Studentova rozdělení pro hodnotu spolehlivosti 0,99 s $n-1$ stupni volnosti; n je počet opakování měření (nástřiků na kolonu), %RSD je relativní směrodatná odchylka v procentech, dávkované množství x je množství analytu nastříknuté na kolonu v jednotkách, ve kterých bude vypočten IDL^{19,21}.

Příkladem výpočtu může být nástřik 5 fg ($5 \cdot 10^{-15}$ g) analytu na kolonu v 15 opakováních. Pokud byla relativní směrodatná odchylka 15 měření 12 %, tak IDL se spočte následovně:

$$IDL = 2,624 \cdot (12/100) \cdot 5,0 = 1,6 \text{ fg}$$

(2,624 je hodnota Studentova rozdělení pro $n=15$ při $n-1$ stupních volnosti).

6. Mez kvantifikace

Vedle původního a v hmotnostní spektrometrii dnes již do značné míry opouštěného pojetí S/N a modernějšího MDL/IDL konceptu se v hmotnostní spektrometrii velmi často používá i definice založená na posuzování maximální přípustné relativní odchylky a chyby měření (přesnost a správnost). Tato metodologie^{22,23} je doporučena např.

americkou FDA. Doporučení FDA stanoví, že za mez kvantifikace (LoQ) lze považovat koncentraci nebo dávkovanou množství, při které je relativní odchylka a chyba od skutečné hodnoty v rozmezí $\pm 20\%$ (tedy, že přesnost a správnost jsou v rozmezí 80–120 %). To se zjišťuje opakovaným dávkováním vzorku o známé koncentraci (nejméně 3 \times , podle některých doporučení FDA 5–6 \times) a následnou zpětnou kvantifikací dle kalibrační křivky, jakož i výpočtem relativní odchylky. Nejnižší platný bod kalibrační křivky tedy musí být v rozmezí 20 % (pro chybu i směrodatnou odchylku) a definuje LoQ, což by se mělo ověřit dávkováním nezávislého QC standardu. Dle stejného doporučení FDA by ostatní platné body kalibrační křivky měly být v rozmezí 15 %. To znamená, že i pokud jsou splněna další kritéria pro mez kvantifikace, například, že S/N musí být větší než 10 a odezva 10 \times vyšší než směrodatná odchylka hodnoty slepého vzorku matrice, tak kritérium 20% rozmezí pro správnost a přesnost nemůže být pomínuto, a to ani v případě, že existuje dostatečný odstup od signálu slepého vzorku.

Principiálně je tato definice obdobná IDL/MDL konceptu, neb se orientuje na přípustný rozptyl měření při koncentracích na úrovni meze detekce, ale má tu výhodu, že se vztahuje ke konkrétní kalibrační křivce, a tedy kromě přesnosti obsahuje i správnost měření.

7. Iontové chromatogramy

Při kvantifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie je v dnešní době nejčastěji využito spojení s vhodnou separační nebo průtokovou metodou. Hmotnostní spektrometr tak figuruje jako detektor pro plynovou chromatografii, kapalinovou chromatografii, superkritickou chromatografii nebo kapilární elektroforézu. Z průtokových metod lze uvést průtokovou injekční analýzu a také přímé zavedení vzorku do zdroje pomocí vhodné laboratorní (většinou stříkačkové) pumpy. O použití zavedení vzorku do zdroje s atmosférickou ionizací (nejčastěji elektrosprejového) bez použití předřazené separační metody se také někdy hovoří jako o „přímém vstupu“, což je ale termín, který byl dříve používán pro přímé zavedení vzorku do elektronového ionizačního zdroje.

Při spojení se separačními nebo průtokovými metodami musí hmotnostní spektrometr poskytnout časový záznam (chromatogram, elektroforeogram) signálu, podobně jako jiné detektory (FID, UV atd.). Chromatogram v hmotnostní spektrometrii je soubor následně změřených hmotnostních spekter, přičemž každé reprezentuje spektrum odpovídající složení eluovanému v příslušném retenčním čase. Takový záznam, který reprezentuje výskyt a intenzitu iontu v daném retenčním čase, se označuje termínem iontový chromatogram. Terminologicky existuje několik druhů iontových chromatogramů:

Chromatogram celkového iontového proudu (total ion current chromatogram TICC nebo total ion chromatogram TIC) je chromatogram vytvořený jako závislost celkového iontového proudu v sérii hmotnostních spekter zaznamenaných jako funkce retenčního času. Celkový iontový proud

(tedy souhrn všech iontů v daném spektru) je v principu možné změřit přímo např. detektorem faradayovského typu, který monitoruje přímo iontový paprsek (v závislosti na místě měření a typu hmotnostního spektrometru se bude pohybovat v rozmezí od μA do desítek až stovek pA), ale v modernější podobě je TICC rekonstruován uměle až po samotné hmotnostní analýze. TICC tedy reprezentuje sumační signál všech iontových intenzit a je tedy jakousi obdobou nespecifického detektoru, např. UV.

Chromatogram extrahovaných iontů (extracted ion chromatogram, EIC) je chromatogram vytvořený jako závislost intenzity signálu pozorovaného při zvolené hodnotě m/z nebo série hodnot ve skupině hmotnostních spekter získaných jako funkce retenčního času. Jedná se tedy o časový záznam intenzity s užší šířkou extrakčního okna, často pouze jednoho vybraného iontu o určené hodnotě m/z . Takový časový záznam je velice užitečný, protože umožňuje zobrazit retenční čas jednoho konkrétního iontu a umožňuje tak rychlou lokalizaci analytu jakož i rychlé zobrazení přítomnosti nečistot nebo dalších látek, které mají signifikanci pro příslušnou analýzu. Signál extrahovaných iontů je obzvláště dobře využitelný pro kvantifikaci, protože omezení hodnoty m/z snižuje možnost příspěvku signálu od ostatních sloučenin přítomných ve vzorku.

MRM/SRM chromatogram. Nejčastějším fragmentačním módem sběru signálu při kvantitativní hmotnostní spektrometrii je monitorování vybrané reakce (selected reaction monitoring – SRM) a monitorování více reakcí (multiple reaction monitoring – MRM; jedná se o zaměnitelný termín, někdy používaný pokud metoda obsahuje více než jednu SRM). V těchto experimentech se monitoruje vybraná reakce (většinou kolizí indukovaná disociace) rodičovského iontu o známém m/z za vzniku produktového iontu rovněž o známém m/z . Intenzita vzniklého iontu o daném m/z v čase může být rovněž vynesena jako chromatogram a tento záznam je dnes pravděpodobně nejpoužívanější forma dat používaná při kvantifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie.

Chromatogram základního píku (base peak chromatogram, BPC) je chromatogram získaný vnesením iontového signálu představovaného základním píkem detegovaným v každém jednotlivém hmotnostním spektru.

Zatímco termíny chromatogram celkového iontového proudu a chromatogram extrahovaných iontů mají smysl a použití i při přímém zavedení vzorku pomocí pumpy, zavedení chromatogramu základního píku dává smysl pouze ve spojení se separačními metodami.

V hmotnostní spektrometrii se velmi často demonstruje schopnost dosáhnout požadovanou mez detekce graficky, jako ukázkový chromatogram extrahovaných iontů, často v MSMS režimu pro konkrétní zvolený MRM přechod, který odpovídá absolutnímu množství analytu dávkovaného na kolonu. Taková demonstrace meze detekce, prodejci obvykle nazývaná „citlivost“, má svoji praktickou užitečnost, ale je zásadním způsobem závislá na podmínkách měření. Pokud se jedná o demonstraci za účelem prodeje hmotnostně spektrometrického systému, tak potenciálnímu nakupujícímu lze vždy doporučit značnou obezřetnost. Dosažené specifikace také silně závisí na

zvoleném analytu. Není např. náhodou, že oblíbeným demonstračním analytem citlivosti v hmotnostní spektrometrii je verapamil, terciární amin a od roku 1982 úspěšný lék na vysoký tlak, který z běžně používaných standardních látek vykazuje největší ionizační efektivnosti jak v ESI, tak i APCI, a je proto považován za vhodný demonstrační analyt např. i v ambientních desorpčně-ionizačních metodách.

8. Interní standard

Protože účinnost převodu analytu ze vzorku skrze ionizační zdroj a hmotnostní analyzátor až do detektoru, který změří iontový signál, závisí na mnoha faktorech a nelze ji předpovědět s dostatečnou správností, je pro spolehlivou kvantitativní analýzu v hmotnostní spektrometrii vždy zapotřebí použít interní standard. Tedy látku, jejíž obsah ve vzorku je znám a jejíž signál se porovná se signálem neznámého analytu a provede se normalizace pomocí vydělení signálu analytu signálem interního standardu. To platí i v případě, kdy je pro kvantifikaci použit model externí kalibrační křivky, který je společný všem analytickým metodám. Pokud je na ose x vyneseno např. molární množství, hmotnost nebo koncentrace látky, potom se na ose y nevynáší přímo signál analytu, ale poměr signálu analytu k signálu interního standardu, bez ohledu na to, zda se k určení signálu používá výška nebo plocha píku.

Interní standard je tedy vhodně zvolená sloučenina, která se přidá do vzorku (do každého vzorku a kalibračního bodu vždy stejné množství), přičemž její množství je obvykle známo. Signál interního standardu kompenzuje nejen rozdílnost chování různých molekul v hmotnostním spektrometru, ale např. ztráty při zacházení se vzorkem (typicky extrakce). Z hlediska hmotnostní spektrometrie jsou potom pomocí interního standardu kompenzovány především různé ionizační účinnosti a ionizační suprese v důsledku přítomnosti matričních efektů.

Je v principu možné (a nikoliv neobvyklé) pracovat bez interního standardu, pouze dle externí kalibrační křivky, ale je nutné počítat s tím, že odchylky budou významně větší než při použití interních standardů, linearita kalibrace horší a blíže k mezi detekce pro metodu s interním standardem mohou být již dva různé kalibrační body získané bez interního standardu nerozlišitelné. Navíc se při absenci interních standardů velice riskuje, že náhodná ztráta při zpracování vzorků nebo nové matriční efekty nebudou vůbec zaznamenány. Pro plnohodnotnou validaci metody je tedy použití interních standardů reálně nevyhnutelné. Naopak je v některých případech možné pracovat pouze s poměrem analyt/interní standard bez kalibrační křivky. V takovém případě je možné dosáhnout např. relativní kvantifikace dvou analytů v jednom vzorku.

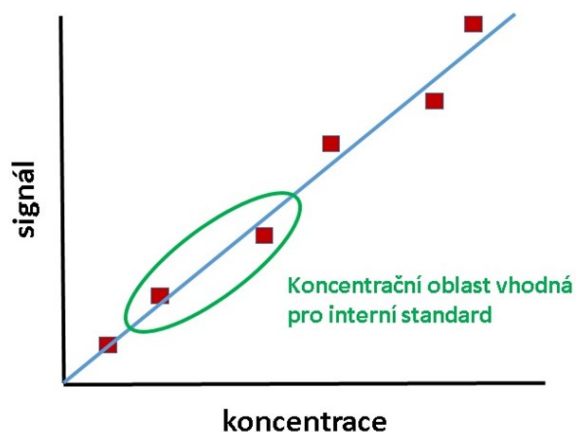
9. Výběr a použití interního standardu

Nejlepším interním standardem je vždy isotopicky značená verze molekuly, která má být kvantifikována. V hmotnostní spektrometrii jsou nejčastěji použity značící

isotopy ^{13}C , ^{14}N , ^2H , ale v případě výskytu dalších prvků je možné použít i jejich další stabilní isotopy. Při použití deuteria je třeba mít na paměti, že k označení jsou použitelné pouze ty pozice, na kterých nedochází k vodík-deuteriové výměně. Není zvykem používat radioaktivní isotopy, protože jejich aplikace nepřináší z hlediska hmotnostní spektrometrie žádnou výhodu oproti isotopům stabilním a použití radioaktivních materiálů na hmotnostních spektrometrech je dovoleno pouze na k tomu určených specializovaných pracovištích.

Isotopicky značené interní standardy mají podobné nebo dokonce identické vlastnosti jako analyt. To se týká především rozpustnosti a extrakčních výtěžků při různých procedurách předúpravy vzorku. Dále mají velmi podobné chování v chromatografii (retenční časy se obvykle liší velice málo) a téměř identické ionizační chování. Jejich jedinou nevýhodou je, že nemusí být vždy k dispozici nebo mohou být příliš drahé. Z tohoto důvodu se někdy musí vystačit s interním standardem, který je pouhým analogem analytu, tedy chemickou látkou s podobnou strukturou, která se liší např. přítomností nebo absencí funkční skupiny. Analog může být vybrán přímo z katalogu, z dostupné knihovny látek, nebo se může jednat o látku, která byla meziproduktem při syntéze analytu.

V metabolických studiích a obecně při práci s reálnými biologickými vzorky se nedoporučuje používat analogy založené na methylaci/demethylaci (± 14 Da) nebo hydroxylaci/dehydroxylaci (± 16 Da) analytu, protože stejné hmotnostní posuny jsou také obvyklé v přirozeném metabolismu látek a analyt mohl být tedy metabolicky přeměněn na látku s molární hmotností lišící se o 14 nebo 16 Da. Za výhodné interní standardy se považují chlorované analogy analytu, protože často eluují při blízkém retenčním čase a jsou tedy ionizovány za podobných podmínek složení mobilní fáze jako analyt. Při analýze lipidů se v některých případech jako interních standardů používá lipidových analogů, které obsahují mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků. Argumentem je, že tyto se v živočišných buňkách vyskytují naprosto minimálně, protože syntéza mastných kyselin se děje přidáváním acetyl-koenzymu A, tedy skládáním dvouuhlíkatých fragmentů (byť v posledních letech se o přítomnosti mastných kyselin s lichým počtem uhlíků vede nová diskuse). Při použití strukturních analogů jako interních standardů v tandemové hmotnostní spektrometrii (SRM kvantifikace) je třeba dbát, aby nedocházelo k překryvu SRM přechodu mezi analytem a interním standardem. To hrozí např. v případě, kdy by interní standard a analyt mohly přejít na stejný ion v důsledku fragmentace ve zdroji. Vždy je zapotřebí zkontrolovat pozadí SRM interního standardu ve vzorku bez přidaného interního standardu a stejně zkontrolovat, že interní standard nijak nepřispívá na intenzitě SRM přechodu analytu. Při použití isotopicky značeného standardu, který má ale stejný fragmentový produktový ion jako analyt, sice nemůže dojít k překryvu celého přechodu (protože prekurzory mají odlišné m/z), ale je třeba zkontrolovat, zda nedochází k časovému překryvu produktových iontů v kolizní cele („cross-talk“). Interní standard může mít stejný nebo velice blízký retenční čas jako ana-



Obr. 2. Příklad kalibrační křivky s vyznačenou oblastí vhodnou pro volbu koncentrace interního standardu

lyt, což je běžné u isotopově značených interních standardů. Pokud by však měl mít stejnou hodnotu m/z , tak je samozřejmě nutné pracovat s dostatečným chromatografickým rozlišením (mohou tak nastat čtyři kombinace shodného/odlišného retenčního času a shodného/odlišného m/z). V nejhorším případě není k dispozici ani isotopicky značená molekula, ani analog a je třeba použít generický interní standard. Pak je důležité vybrat alespoň látku s podobnou polaritou a rozpustností v používaných systémech. Pokud bude analýza prováděna z komplexní matrice vzorku, pak je vhodné předem otestovat, zda analyt i generický interní standard trpí zhruba podobným potlačením signálu v důsledku matričních efektů.

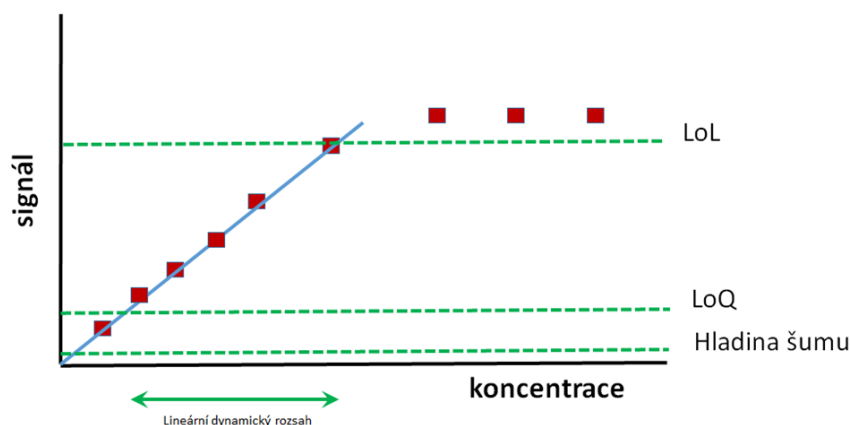
Interní standard se přidává na začátku práce se vzorkem, určitě před případnou extrakcí analytu z matrice vzorku nebo před srážením vzorku. Do každého vzorku se

přidává stejné množství interního standardu, přičemž je samozřejmě důležité, aby byl interní standard bezpečně detegovatelný. Není ale vhodné přidávat příliš velké množství interního standardu, které by mohlo způsobovat ionizační supresi analytu. Empirické pravidlo doporučuje přidat takové množství analytu, aby odpovídalo zhruba spodní třetině kalibrační křivky analytu (obr. 2).

10. Kalibrační křivka

Kalibrační křivka je graf, který ukazuje, jak se odpověď přístroje, tedy analytický signál, mění s koncentrací analytu. Jedná se o základní model v instrumentální analytické chemii, a tedy i v kvantitativní analýze hmotnostní spektrometrii, který je založen na principu porovnání signálu neznámého vzorku se souborem signálů vzorků o známých koncentracích nebo dávkovaných množstvích. Příklad kalibrační křivky s vyznačením důležitých parametrů je na obr. 3.

Body změřené kalibrační závislosti se většinou prokládají pomocí modelu lineární regrese. Vznikne tak model popsáný rovnicí $y = ax + b$, kde a vyjadřuje citlivost a b signál pozadí. Rovnice je následně použitelná pro výpočet koncentrace neznámého vzorku (x) ze změřené odezvy (y). Při práci s interním standardem v hmotnostní spektrometrii se pak na ose y vynáší poměr signálu analytu a interního standardu, což umožní příslušnou normalizaci. Výhodou kalibrační křivky je její univerzálnost – nezáleží na tom, jak dobře je analytická metoda popsána teoreticky a jak dobře lze odezvu detektoru předem spočítat. To je v hmotnostní spektrometrii obzvláště důležité, protože tvorba signálu je v této metodě závislá na velkém počtu faktorů. Zejména pak dnes nepoužívanější ionizační metody ESI a MALDI mají řadu empirických parametrů, které je nemožné zohlednit při teoretických předpovědích intenzity signálu.



Obr. 3. Modelová kalibrační křivka se schematicky ukázanou mezí stanovitelnosti (LoQ) a mezí linearity (LoL). Směrnice regresní křivky udává citlivost

Kalibrační křivka je obecně lineární v rozmezí několika řádů množství analytu (linearita se liší pro různé druhy hmotnostních analyzátorů a detektorů). Když se signál blíží saturaci detektoru nebo iontového zdroje, tak se kalibrační křivka postupně ohýbá, až se stane rovnoběžnou s osou x . Naopak v blízkosti meze detekce může dojít k odchylkám na obě strany. Vyšší hodnoty jsou většinou způsobeny kontaminací systému, ať už vstupního dávkování (včetně chromatografického systému) nebo iontového zdroje. Nižší hodnoty jsou způsobeny ztrátou analytu např. sorpcí na materiálu. V podstatě jediným omezením modelu kalibrační křivky je nutná dostupnost analytu pro přípravu kalibračních standardů, obvykle v dostatečné čistotě a především o známém množství. I v hmotnostní spektrometrii je použitelná metoda standardního přídatku tak, jak je známá z ostatních analytických metod.

Metoda standardního přídatku je variantou modelu kalibrační křivky. Do vzorku obsahujícího neznámou koncentraci analytu se přidává vhodné množství čistého analytu. Pomocí vícenásobného přídatku se získá graf závislosti intenzity na koncentraci, ve kterém úsek mezi počátkem a průsečíkem na záporném směru osy x udává koncentraci analytu ve vzorku. Metoda standardního přídatku se používá tehdy, pokud je konstrukce kalibrační křivky ovlivněna matricovými efekty. Její použití předpokládá lineární závislost mezi signálem a koncentrací nebo množstvím analytu.

Konstrukce kalibrační křivky a měření vzorků

Je vhodné dopředu odhadnout, například sadou příbližných měření, koncentrační rozsah, ve kterém má být metoda kalibrována (stanovované vzorky musí vždy ležet mezi nejnižším a nejvyšším bodem kalibrační křivky). Při přípravě kalibračních standardů je někdy doporučováno vyhnout se sériovému ředění roztoku, protože případná chyba na počátku se pak propaguje celou kalibrační křivkou. Je také doporučeno nepipetovat objemy menší než 10 μl a dohlédnout na to, že pipety jsou správně kalibrovány. Jednotlivé body kalibrační křivky jsou obvykle měřeny od nejmenší koncentrace k největší (což omezuje chybu z přenášení předchozího kalibračního roztoku do dalšího měření). Po změření kalibrační křivky by mělo být dávkováno několik slepých vzorků, aby se potvrdilo, že kalibrační standardy nekontaminovaly systém, případně aby se přenesené kontaminace odstranily.

11. QC standardy a referenční materiály

QC standardy

QC standardy (z angl. quality control) jsou souborem vzorků o známé koncentraci, které slouží ke kontrole kalibrační křivky, především jejího posunu (driftu), např. v důsledku změny citlivosti. V GC-MS a LC-MS může změna citlivosti nastat např. kontaminací iontového zdroje. Jejich koncentrační rozmezí by mělo být rovnoměrně rozprostřené podél celé kalibrační křivky (spodní okraj, prostředek, horní okraj). QC standardy by měly být připraveny nezávisle na kalibračních standardech z jiných zásob-

ních roztoků, případně z nezávislého vážení analytu nebo dokonce jinou osobou. Zpětná kvantifikace QC standardů podle kalibrační křivky musí být v rámci maximální povolené chyby metody.

Referenční materiály

Zatímco QC standardy jsou připravovány v laboratoři, referenční materiály a certifikované referenční materiály používané k validaci metody jsou v drtivé většině případů pořizovány od specializovaných dodavatelů^{24,25}. Referenční materiál (RM) je materiál, jehož jedna nebo více hodnot vlastností je dostatečně homogenní a dobře stanovená, aby mohla být použita ke kalibraci přístroje nebo posouzení měřicí techniky. Certifikovaný referenční materiál (CRM) je referenční materiál vybavený certifikačním dokumentem vydaným k tomu určenou certifikační autoritou, který obsahuje hodnoty referenčních vlastností s přidruženými nejistotami a s uvedením platných postupů. V případě, že je možné zakoupit CRM od dvou výrobců, je doporučeno pro přípravu kalibrace a QC standardů použít rozdílné CRM standardy, a to z důvodu rozdílné návaznosti materiálů.

Seznam zkratek

BPC	Base Peak Chromatogram, chromatogram základního píku
CRM	Certified Reference Material, certifikovaný referenční materiál
EIC	Extracted Ion Chromatogram, chromatogram extrahovaných iontů
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
IDL	Instrument Detection Limit, instrumentální mez detekce
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LoQ	Limit of Quantification, mez kvantifikace
MDL	Method Detection Limit, mez detekce metody
MRM	Multiple Reaction Monitoring, monitorování více reakcí
MSMS	Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, tandemová hmotnostní spektrometrie
RM	Reference Material, referenční materiál
S/N	Signal-to-Noise ratio, poměr signálu k šumu (odstup od šumu)
SRM	Selected Reaction Monitoring, monitorování vybraných reakcí
TIC	Total Ion Current, celkový iontový proud
TICC	Total Ion Current Chromatogram, chromatogram celkového iontového proudu

LITERATURA

- Schufle J. A.: *Torbern Bergman: A Man Before his Time*, Coronado Press, Lawrence, KS 1985.
- Kauffman G. B.: *J. Chem. Educ.* 64, A58 (1987).

3. Wilhelmy L.: *Annalen der Physik und Chemie* 81, 413 (1850).
4. Stock J. T.: *Bull. Hist. Chem* 23, 42 (1999).
5. Urban P. L.: *Phil. Trans. R. Soc. A* 374, 1 (2016).
6. Saah A. J., Hoover D. R.: *Ann. Intern. Med.* 126, 91 (1997).
7. Long G. L., Winefordner J. D.: *Anal. Chem.* 55, 713A (1983).
8. Gauglitz G., Moore D. S.: *Pure Appl. Chem.* 71, 2189 (1999).
9. MacDougall D., Crummett W. B.: *Anal. Chem.* 52, 2242 (1980).
10. Cunningham W. C., Mindak W. R., Capar S. G.: *Elemental analysis Manual*, U.S. FDA, Silver Spring, MD 2014.
11. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*, East Publishing, Praha 1998.
12. Proctor C. H.: *J. Agr. Biol. Envir. St.* 13, 1 (2008).
13. Kaiser H.: *Anal. Chem.* 42, 24A (1970).
14. Kaiser H.: *Anal. Chem.* 42, 26A (1970).
15. Kaiser H.: *Spectrochim. Acta, Part B* 33, 551 (1978).
16. Norma DIN 32 645: *Chemische Analytik; Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze; Ermittlung unter Wiederholbedingungen; Begriffe, Verfahren, Auswertung* (2008).
17. Glaser J. A., Foerest D. L., McKee G. D., Quave S. A., Budde W. L.: *Environ. Sci. Technol.* 15, 1426 (1981).
18. U.S. Environmental Protection Agency: *Definition and Procedure the Determination of the Method Detection Limit*, EPA821-R-16-006, Revision 2, 2016.
19. Zrostlíková J.: *ChromAtoMol* 2, 9 (2015).
20. Sheehan T. L., Yost R. A.: *Curr. Trends Mass Spectrom.* 13, 2 (2015).
21. Parra N. P., Taylor L.: *Why Instrument Detection Limit (IDL) is a Better Metric for Determining The Sensitivity of Triple Quadrupole LC/MS systems*, Technical overview, Agilent Technologies, Santa Clara 2014.
22. U.S. FDA: *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* (2001).
23. U.S. FDA, *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry* (2018).
24. Zschunke A. (ed.): *Reference Materials in Analytical Chemistry A Guide for Selection and Use*. Springer Verlag, Berlin 2000.
25. Cali J. P.: *Anal. Bioanal. Chem.* 297, 1 (1979).

M. Volný (*Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Prague*): **Quantitative Analysis by Mass Spectrometry**

The present paper is an overview of basic concepts important for quantitative mass spectrometry, such as limit of detection, sensitivity, signal-to-noise ratio, method detection limit, instrument detection limit, limit of quantification, and calibration curve model. The topics are mainly covered from the perspective of small molecule LC-MS. The text includes detailed discussion of different approaches that can be used to define limit of quantification, from traditional signal-to-noise ratio and standard deviation definition to more recent definitions utilizing accuracy and precision. Usage of internal standards and certified materials is also briefly described.

Keywords: limit of detection, sensitivity, signal-to-noise ratio, method detection limit, instrument detection limit, lower limit of quantification, internal standard, calibration curve