

既然信噪比已无意义为何还用作质谱性能的衡量指标？

技术概览

作者

Greg Wells, Harry Prest, and
Charles William Russ IV,
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809-1610
美国

摘要

单次测量所得到的色谱峰的信噪比已成为方便地比较两个不同质谱系统性能的数据指标。随着质谱仪设计的发展，仪器的噪声已经越来越低，从而使基于信噪比进行性能比较变得越来越困难，甚至在某些情况下根本无法比较。当使用超低噪声仪器如高分辨率质谱仪或串联质谱仪时尤其如此，此时背景中通常不含离子，噪声基本为零。此问题发生在为了确定仪器性能指标而对纯净标样进行分析的情况下。统计学方法通常用于确定分析复杂基质中痕量样品时的方法检测限，是鉴定仪器性能的一种手段，该方法对于高背景噪声和低背景噪声条件对严格有效。仪器制造商应当开始为客户提供另一种性能数据，即根据重复进样的相对标准偏差计算得到的仪器检测限，以便为分析人员提供一种切实可行的评估质谱系统性能的手段。



Agilent Technologies

引言

信噪比 (SNR) 是比较色谱系统 (包括气相色谱系统和液质联用系统) 性能的主要标准。SNR 的特定计算方法已被编入美国、欧洲和日本药典 [1-3], 可使用统一的方法来估算仪器检测限 (IDL) 和方法检测限 (MDL)。使用 SNR 作为 IDL 和 MDL 的衡量指标对于液相色谱的光学基检测器和气相色谱的火焰基检测器很有用。随着质谱仪的设计不断发展, 基于 SNR 来准确比较质谱仪的性能已变得越来越困难。使用超低噪声质谱仪如高分辨率质谱仪 (HRMS) 或串联质谱仪 (MS/MS) 进行痕量分析时尤其如此。SNR 仍然是一个有用的参数, 尤其适用于全扫描 (EI) MS; 但对于高性能质谱仪的比较应当基于一种适用于所有类型质谱仪和所有操作模式的衡量指标。统计学方法长期用于确定 IDL 和 MDL [4-7], 其适用于质谱仪的所有操作模式。

仪器的发展

质谱仪设计的改变已经减少了许多噪声源, 例如使用低噪声电子元件、可较长时间采集离子的快速电子元件 (信号平均)、经过改进可减少亚稳氦气 (中性噪声) 的离子通路, 以及进行信号处理 (数字过滤)。HRMS 和 MS/MS 还能有效降低化学背景噪声, 尤其适用于复杂样品基质。就信号而言, 信号源、分析仪和检测器组件的大量改进使单位样品量可以获得更多离子。并且, SNR 的改善和灵敏度的提高已使得 IDL 和 MDL 显著降低。

SNR 测量缺少指导准则

信号的测量一般是以基线上方最强色谱信号的高度作为标准 (图 1)。但是, GC/MS SNR 性能指标的某些改变是人为造成的。GC/(EI)MS 的行业标准样品已经由硬脂酸甲酯 (其大量碎裂为许多强度较低的离子) 改为能够产生更少、强度更高的离子的化合物, 例如六氯苯 (HCB) 和八氟萘 (OFN)。改用 OFN 的间接优势是噪声得以降低: m/z 272 处的分子离子不易受到色谱柱流出离子所造成的基线噪声的干扰 (m/z 281 处的聚硅氧烷的单一同位素峰增加了对 m/z 282 处 HCB 的基线干扰)。

除了仪器设计的改进与测试化合物的改换, 测量噪声也有多种不同方法。在条图记录仪和标尺的时代, 测量噪声的标准方法是在远离峰拖尾处测量基线噪声的峰到峰 (峰谷到峰顶) 的值, 测量峰前的 60 秒 (图 1) 或峰前后各 30 秒。随着积分仪与数据处理系统取代了标尺, 可以自动选择用于计算噪声的基线区域, 并在选定的时间窗口内根据标准偏差 (STD) 或均方根 (RMS) 计算噪声。

自动化计算为工作繁重的实验室带来了方便, 但对噪声测量的标准却缺乏控制。在某些情况下, 供应商根据非常窄的窗口 (仅 5 秒) 计算噪声; 且用于计算噪声的位置可能距离计算信号的位置相差许多峰宽。这些手动选择的噪声窗口使供应商可以特意选择

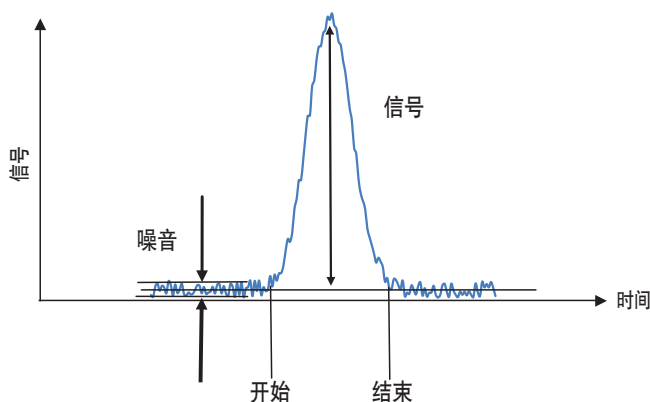


图 1. 色谱峰的分析信号作为时间的函数, 表明时间与分析物含量相关

噪声最低的基线区域来计算噪声, 却宣称他们的仪器具有更高的 SNR。现在通常情况下, 自动选择的用于计算噪声的基线位置是噪声最低的区域。图 2 显示了根据不同基线区域计算得到的三个不同的 RMS 噪声值。根据位置 a、b 和 c 计算得到的噪声值分别为 54、6 和 120; 由于测量噪声所选的基线位置不同, 可导致 SNR 值相差 20 倍。但是, 这些 SNR 与实验室自动分析过程的实际 IDL 并不相关。因此, 当离子噪声较低且变化较大以及选择测量的位置主观性很强的时候, 以信噪比估算检测限显然无法获得有用的数据。

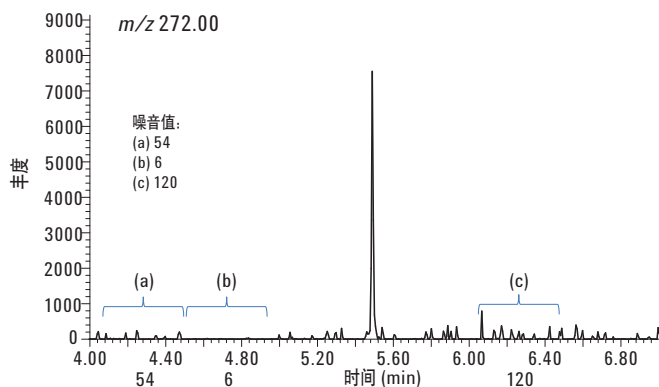


图 2. 1 pg OFN 在 $m/z = 272$ 处获得的 EI 全扫描离子色谱图

这种情况在背景噪声为零（如图 3 所示的 MS/MS 色谱图）时变得更加不确定。此时，噪声为零，信噪比将变成无穷大。图 3 中存在的唯一噪声是电子噪声，该噪声比背景中存在离子时所带来的噪声要低多个数量级。当提高离子检测阈值时尤其如此。在此类情况下，可以通过提高离子检测器增益来增加信号强度，而不会导致背景噪声提高。分析物的信号得到增强，而噪声值并未增大。此时由于信号增强，显然会对检测限的估算产生误导；但由于检测到的离子数量并未增加，因此，仪器的实际检测限并没有改变。这就要求对 SNR 进行调整，换用不改变实际检测限的其他衡量标准。

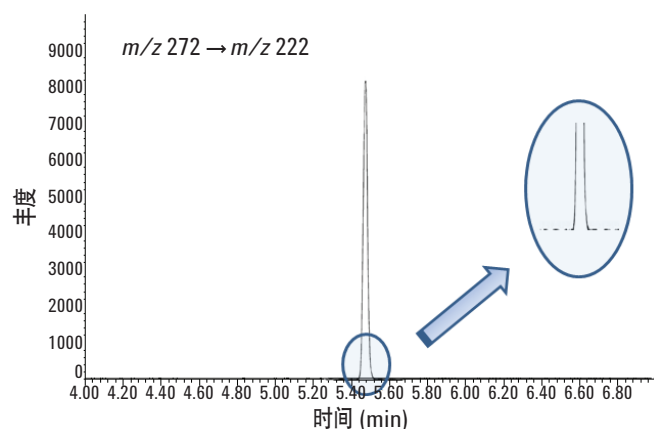


图 3. 由 1 pg OFN 在 $m/z 222.00$ 处获得的 EI MS/MS 提取离子色谱图，表明不存在化学离子噪声。

二十年前，仪器性能指标中通常会说明影响信号或噪声值的具体分析条件，例如色谱峰宽、数据采集速率和时间常数。如今，那些参数已不再给出或很难找到；尽管初学色谱工作者也能认识到窄峰比宽峰的峰高更高。在许多情况下，通过选择气相色谱条件使色谱峰达到最窄、最高，但结果是谱峰所含的数据点极少（整个色谱峰仅含一个或两个数据点）。这或许能够提高计算得到的 SNR，但采样点不足会导致精确度下降，将是大多数定量方法所不容许的。从而再次导致对仪器性能产生了错误认识。根据公开的性能指标对实际分析应用中的仪器性能进行准确、有意义的比较即便不是不可能，但也是变得越来越困难。须采用替代方法来确定仪器性能和检测限，并且方法须普遍适用于所有的质谱操作模式。

什么可以作为 SNR 的替代指标？

SNR 仍然有用，其代表了较好的初次评估结果，可指导其他基于统计学的性能评估指标。每个分析实验室都应当理解并在日常工作中采用统计学方法对其结果进行评估和验证。分析文献中已有大量文章利用统计学色彩更浓的方法来估算 IDL 或 MDL。US EPA 已经规定了计算 MDL 的统计学方法；具体方法可参阅推荐的《EPA 建立污染物分析程序指南》[6]。欧盟也支持这一做法。欧洲最常用的标准可参见《欧盟官方刊物》；2012 年 8 月 12 日的《欧盟委员会决议》；关于分析方法的性能和结果解析的《欧盟指令 96/23/EC》。[8]

美国和欧盟的这些方法大致相似，都要求对标准品进行多次重复进样分析以评价测量系统的不确定性。须测量少数几种浓度接近预计检测限的相同样品（5-10 种以内），以及数量相当的空白样品。由于质谱检测的特异性，空白样品的贡献可以忽略，通常在确认其贡献程度后将它排除。然后确定测得的一组分析物信号的平均值 \bar{x} 和标准偏差 (STD) 以及 X_n （即扣除基线后的色谱峰的积分面积）。即使对于灵敏度检测样品，采样过程也包括一系列复杂步骤，包括由注射器中吸取等量分析物溶液，注入气相色谱仪并由质谱仪进行检测。每个步骤都可能给色谱峰面积的最终测量值带来不确定性，从而导致样品到样品的差异或采样噪声的产生。这些差异通常会限制实际可得的 IDL 和 MDL。

所测峰面积的差异包括分析物信号变化、背景噪声和进样与进样之间的差异。区别于组合系统和采样噪声的所测分析物信号组的平均值的统计学意义可在已知的置信水平下建立。IDL 是指仪器能检测到分析物的最低信号或最低含量，该信号或含量在指定正确率下统计高于零。IDL (或 MDL) [9, 10] 与重复进样所测得的峰面积响应的标准偏差 STD 以及置信因子 t_{α} 有关：

$IDL = (t_{\alpha})(STD)$ ，其中 STD 和 IDL 以面积数表示。

此外，许多数据处理系统报告了相对标准偏差 ($RSD=STD/\text{平均值}$)。在这种情况下，IDL 可以用进样的标样量的单位 (ng、pg 或 fg) 表示：

$IDL = (t_{\alpha})(RSD) (\text{标样量})/100\%$

当测量次数 n 较小时 ($n < 30$)，可使用一侧的学生 t -分布 [11] 确定置信因子 t_{α} 。置信因子 t_{α} 值可使用 $n-1$ (测量次数减 1) 作为自由度从学生 t -分布表中获得； 1_{α} 为测量值高于零的机率。测量次数 n 越大， t_{α} 值将越小，估算得到的 IDL 或 MDL 的不确定性也将越小。与确定 IDL 和 MDL 所用的统计学方法不同，使用单次样品测量所得信噪比无法反映采样噪声，而采样噪声可造成相同分析物的多次测量结果略有不同。

作为示例，根据图 4 中的八次重复进样 (自由度 $n = 7$) 并在置信水平 99% ($1_{\alpha} = 0.99$) 下，从 t -表查得的检验统计量为 $t_{\alpha} = 2.998$ 。对于 8 个 200 fg 样品，峰面积的平均值为 810 counts，标准偏差为 41.31 counts，且 IDL 值为： $IDL = (2.998)(41.31) = 123.85$ counts。由于校准标样为 200 fg 且所测平均值为 810 counts，因此以 fg 为单位的 IDL 为： $(123.85 \text{ counts}) (200 \text{ fg}) / (810 \text{ counts}) = 30.6 \text{ fg}$ 。此外，就 RSD 而言， $IDL = (2.998)(5.1\%)(200 \text{ fg}) / 100 = 30.6 \text{ fg}$ 。因此，分析物含量高于或等于 30.6 fg 时有 99% 的机率检出并区别于背景。

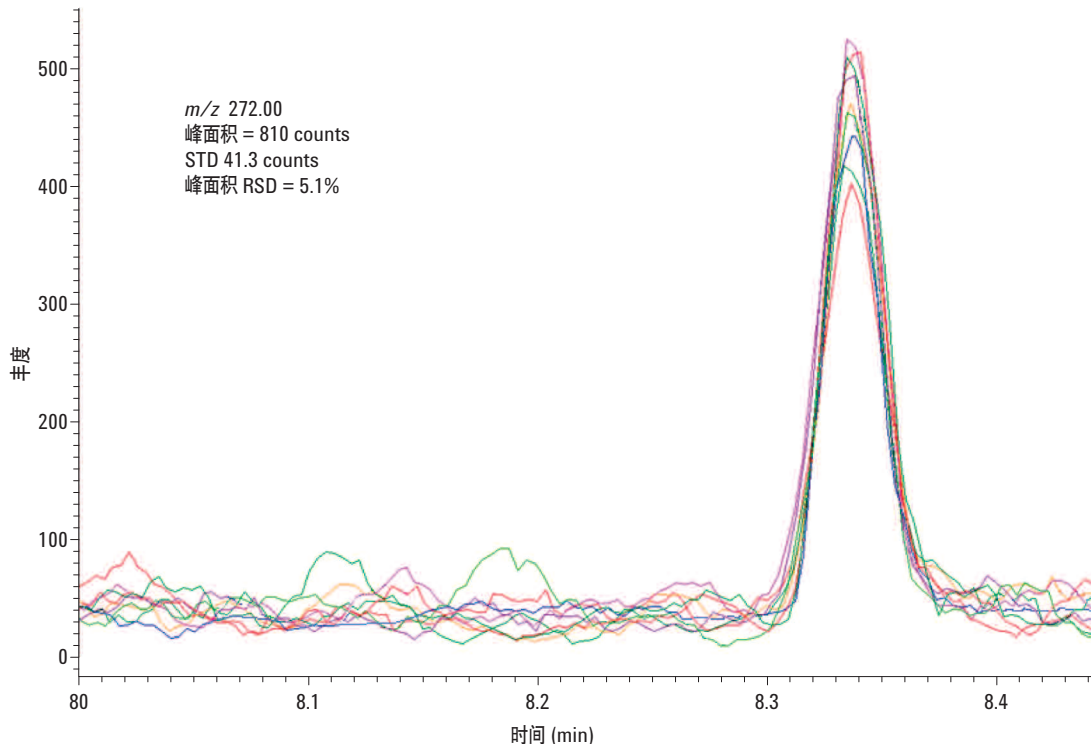


图 4. 200 fg OFN 在 $m/z = 272$ 处获得的 EI 全扫描提取离子色谱图；八次重复进样；数据采集速率为 3.3 Hz

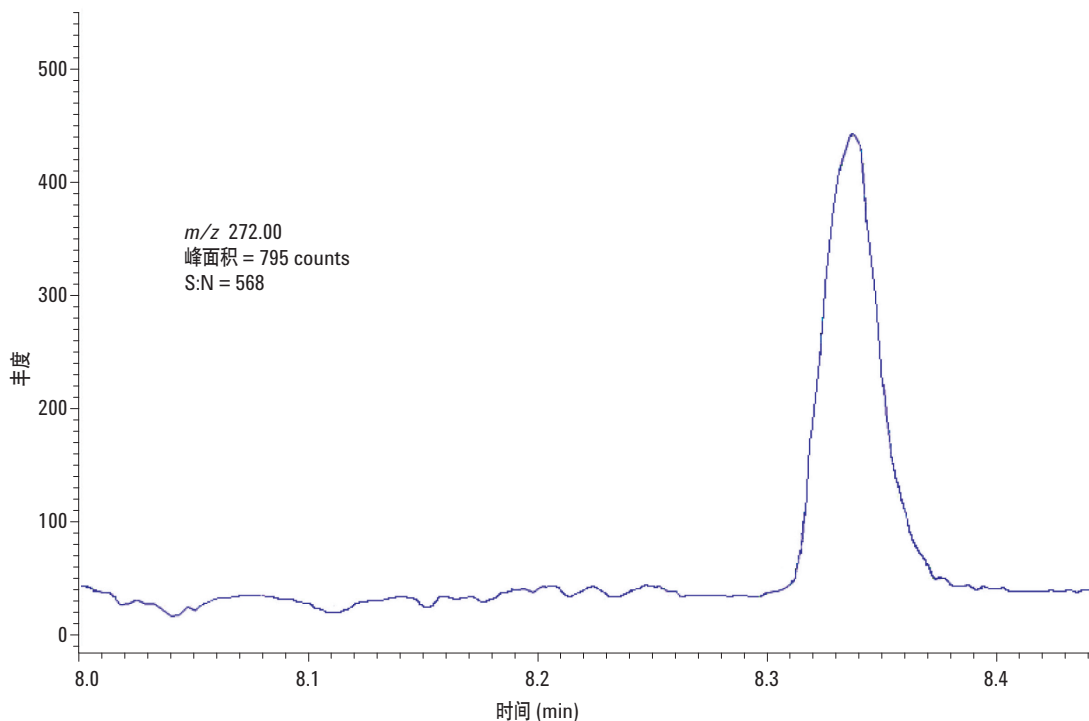


图 5. 200 fg OFN 在 $m/z = 272$ 处获得的 EI 全扫描提取离子色谱图；表 1 中的第一项；数据采集速率为 3.3 Hz

相比之下，根据单个色谱图测得的 SNR（图 5）所得到的 IDL 为 1.1 fg，假设 $IDL = 3 \times \text{rms 噪声}$ （表 1 中的第一项）。高 SNR 是根据计算噪声的常用算法得到，该方法使用噪声异常低处的色谱峰相邻的基线最低的噪声部分进行计算。图 4 中每次进样所测得的各个 SNR 和 IDL 列在表 1 中。IDL 值的范围从 1.1 fg 至 20.5 fg；即便最大值也明显小于由统计平均值所测得的 IDL；其更加真实可信。

表 1. 八次进样所得 S/N 的比较

进样次数	信号	RMS 噪声	S/N	$IDL=3 \times \text{RMS (fg)}$
1	795	1.4	568	1.1
2	821	2.5	328	1.8
3	835	10.9	77	7.8
4	854	2.8	305	2.0
5	818	2.9	282	2.1
6	776	26.6	29	20.6
7	853	2.6	328	1.8
8	735	2.7	272	2.2

估算相对灵敏度

以统计学形式指定检测限的一个附带优势在于可以用 RSD 间接测量组成色谱峰的相对离子数。已知 [12] 如果恒定离子流会影响检测器，并且在特定时间间隔内通过多次重复测量所得到的平均离子数为 N ，则以这些离子数计算得到的 RSD 为 $1/\sqrt{N}$ 。因此，色谱峰中离子数的减少将提高峰面积的 RSD。通过比较图 6 与图 4 中的 RSD（其中分析物含量分别为 1 fg 和 200 fg），可以看到这一影响。较低的样品量可以获得较高的 RSD，这在很大程度上是由离子统计造成的。离子数减少 5 倍意味着 RSD 提高 $\sqrt{5} = 2.24$ 倍。于是，将样品量由 1 pg 增至 200 fg 后，根据离子统计结果得到的 RSD 将由 2.1% 增至 4.7%。较低的样品量还将造成色谱图产生一些其他变化，这点很容易理解。因此，在两台不同仪器上使用相同量的分析物来测量 RSD 可用于指示检测限附近的灵敏度相对差异；前提是假设其他因素对信号总波动的影响很小。在其他因素（即峰宽和数据采集速率）不变时，仪器越灵敏，则 RSD 越小。该方法避免了选择没有基线噪声的区域测量峰面积从而推断灵敏度所造成的不确定性。

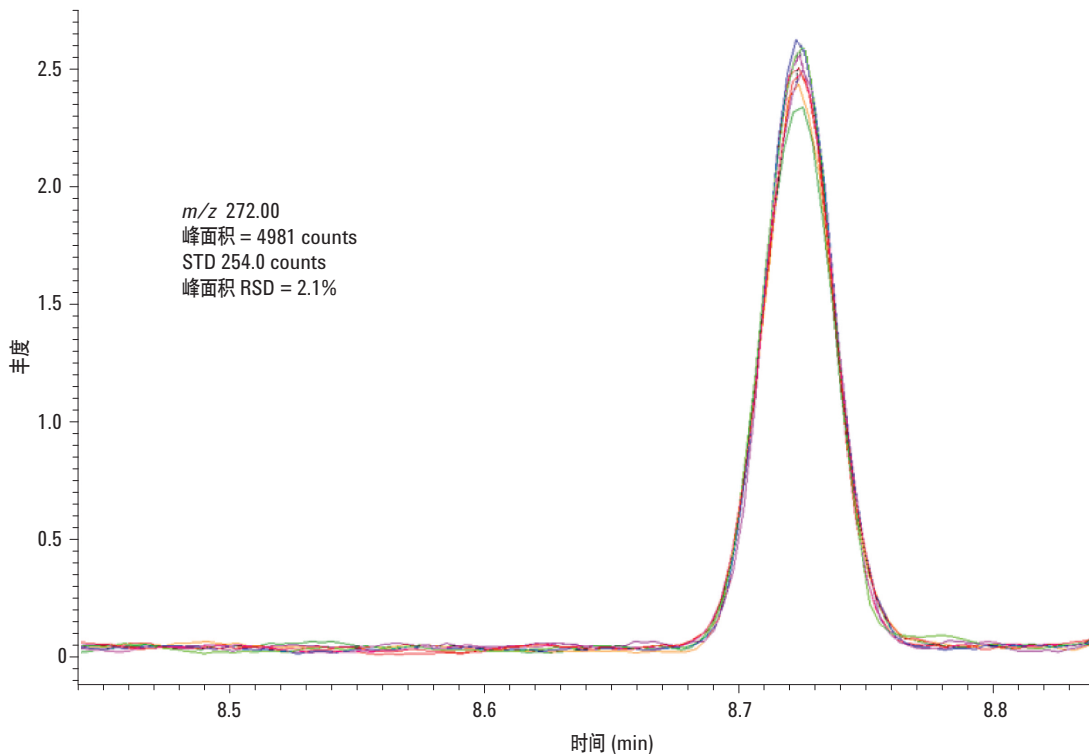


图 6. 1 fg OFN 在 $m/z = 272$ 处获得的 EI 全扫描提取离子色谱图；八次重复进样；数据采集速率为 3.3 Hz

由 S/N 换用 RSD 的影响

对于质谱仪供应商而言，要为客户提供这一重要信息比较困难且成本较高。如果气相色谱仪配有自动进样器和不分流进样口，增加 7 至 10 次重复进样相当容易。这可能造成安装时间略有增加，但使用自动进样器应当能够最大限度减少这一增加量。但对于没有配备自动进样器或适当进样口的系统该如何测试呢？手动进样会因操作者不同而增加峰面积测量的不精确性。为了降低采样噪声，有必要采用手动操作的进样器如 Merlin MicroShot 进样器 (Merlin Instrument Co.) 进行重复进样。如果方法使用顶空进样或进行气体分析，那么就需要在测试时以液体进样，然后将其重新配置为最终分析模式，该过程成本高昂。这些成本必须进行适当管理；但某些仪器配置的成本和复杂性等因素不应当妨碍大多数不存在此类进样口限制的系统换用效果更好、基于统计学意义的新标准，如 %RSD。

但从客户的角度来看，对仪器系统的性能水平进行测试并提供实际估算的 IDL 和接近检测限（最关键区域）的系统精度具有重要意义。购买质谱仪属于大型资本支出，客户做出这样的购买决定

通常是为了满足其特定的应用需求。仪器制造商不可能针对每个不同应用都证明其产品的性能。因此，以 IDL 和系统精度的形式提供简单却实际的方法评估特定质谱仪的性能就非常重要。这些值将构成特定应用的 MDL 和方法精度的下限。

总结

过去，根据单次测量所确定的色谱峰 SNR 长期作为方便地比较两个不同质谱系统性能的数据指标。但是，我们已经发现，该参数不再普遍适用，且通常无法提供有意义的 IDL 估算值。更切实可行的比较仪器性能的方法是采用多次进样统计学方法，该方法通常用于确定对复杂基质中痕量样品进行分析时的 MDL。根据重复进样获得的平均值和 RSD，可用于评估低含量分析物响应、分析物和背景测量的整体不确定性以及分析物采样过程不确定性的统计学显著性差异。这对于现代质谱仪尤其如此，因为其背景噪声往往接近零。采用 RSD 方法鉴定仪器性能对于高背景和低背景噪声条件均在统计学上严格有效。仪器制造商应当开始为客户提供另一种性能参数，即基于 RSD 的仪器检测限，作为客户根据其预期应用评估质谱系统性能的现实可行方法。

参考文献

1. European Pharmacopoeia vol. 1; 7th Edition
2. United States Pharmacopeia, XX Revision (USP Rockville, Maryland, 1988)
3. Japanese Pharmacopoeia, 14th Edition
4. ASTM: Section E 682 – 93, Annual Book of ASTM Standards, Vol.14.01
5. *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*, Vol. 1; Edited by: Lee, Philip W.; (2003) John Wiley & Sons; Chapter 4, “Best Practices in Establishing Detection and Quantification Limits for Pesticide Residues in Foods” by Johannes Corley
6. U.S. EPA - Title 40: Protection of Environment; Part 136 – Guidelines Establishing Test Procedures for the Analysis of Pollutants; Appendix B to Part 136 – Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit – Revision 1.11.
7. “Uncertainty Estimation and Figures of Merit for Multivariate Calibration”; IUPAC Technical Report, *Pure Appl. Chem.*; Vol. 78, No. 3, pp 633-661, 2006.
8. Official Journal of the European Communities; Commission Decision of 12 August 2002; Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
9. “Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry”; ACS COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT; *Anal. Chem.* 1980, 52, 2242-2249.
10. “Signal, Noise, and Detection Limits in Mass Spectrometry,” (质谱中的信号、噪声和检测限), 安捷伦科技公司技术报告, 出版号 5990-7651EN
11. “Statistics;” D. R. Anderson, D. J. Sweeney, T. A. Williams; West Publishing, New York, (1996)
12. “Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences;” Philip R. Bevington and D. Keith Robinson; WCB McGraw-Hill, Boston, 2nd Edition, (1992)

如需更多信息

有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的 Web 站点 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
中国印制

2011年6月7日
5990-8341CHCN



Agilent Technologies