

УДК 543.632.95(045)

Е.Т. Володарский¹, Л.А. Кошечая²

¹Национальный технический университет Украины «КПИ», Киев,
кафедра автоматизации экспериментальных исследований
E-mail: vet_1@voliacable.com

² Национальный авиационный университет, Киев,
кафедра биокибернетики и аэрокосмической медицины,
E-mail: kmice@ukrtel.net

СТРУКТУРНЫЕ МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ ТОЧНОСТИ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

Abstract

Volodarsky E.T., Koshevaya L.A. Structural methods for increasing the accuracy chromatomass-spectrometric measurement system. Features of the application of structural-algorithmic methods of increasing the accuracy of the results of quantitative chemical analysis with the use of chromatomass – spectrometric measuring system designed to exclude the influence of the uncertainty of sample preparation stage, which allows you to directly calibrated mass spectrometer to assess the frequency dispersion and to determine the overall uncertainty analysis.

Keywords: exactness, mass-spectrometer, calibrating, structural-algorithmic methods.

Анотація

Володарський Є.Т., Кошечая Л.А. Структурні методи підвищення точності хроматомас-спектрометричних вимірювальних систем. Розглянуто особливості застосування структурно-алгоритмічних методів підвищення точності результатів кількісного хімічного аналізу із застосуванням хроматомас-спектрометричної вимірювальної системи, що дозволяє безпосередньо будувати градувальну характеристику мас-спектрометра, оцінити дисперсію повторюваності та визначити сумарну невизначеність результату аналізу.

Ключові слова: точність, мас-спектрометр, градування, структурно-алгоритмічні методи.

Аннотация

Володарский Е.Т., Кошечая Л.А. Структурные методы повышения точности хроматомасс-спектрометрических измерительных систем. Рассмотрены особенности применения структурно-алгоритмических методов повышения точности результатов количественного химического анализа с применением хроматомасс-спектрометрической измерительной системы, направленных на исключение неопределенности, вносимой этапом пробоподготовки, что позволяет непосредственно строить градуировочную характеристику масс-спектрометра, оценить дисперсию повторяемости и определить суммарную неопределенность результата анализа.

Ключевые слова: точность, масс-спектрометр, градуировка, структурно-алгоритмические методы.

Постановка задачи

При контроле качества пищевых продуктов и лекарств, при экологическом мониторинге, при криминалистических и медицинских лабораторных исследованиях

возникает необходимость количественного анализа многокомпонентных жидкостей и газов с целью идентификации компонентов и определения их концентрации. Для этого применяется хроматографический количественный анализ, первичная информация которого содержится в хроматограмме, представляющей собой сумму хроматографических пиков, положение которых идентифицирует компонент, а площадь под пиком пропорциональна его относительному содержанию. Такая многопиковая хроматограмма получается при пропускании известного количества пробы анализируемого вещества через сорбент или длинную капиллярную трубку, в которых различные компоненты задерживаются в разное время в силу их различной сорбционной способности. На последующем этапе, когда хроматограмма зарегистрирована, происходит обработка с целью определения площади хроматографических пиков. Однако при наличии в анализируемой матрице, так называемых, загрязняющих веществ, близких по составу к исследуемому компоненту требуется повышенная разрешающая способность анализа, и здесь никакие вычислительные методы [1] не решают этой проблемы.

Анализ состояния исследований и публикаций

В последнее время масс-спектрометр становится все более доступным детектором для большого числа аналитических лабораторий. Сочетание хроматографа с масс-спектрометром позволяет достичь более высокой специфичности анализа и низких пределов обнаружения и количественного определения аналита. Такая система является полезным инструментом при анализе, который позволяет использовать упрощенную и укороченную процедуру очистки экстрактов, выделяемых из исходной матрицы, что в конечном итоге повышает процент определения анализируемых веществ. Масс-спектрометрия в сочетании с хроматографией позволяет обойтись практически без стадии очистки экстрактов и тем самым революционно увеличивает экспрессность и точность анализа [2]. Однако остаются не до конца решенными задача уменьшения влияния пробоподготовки на результат анализа, а также вопросы, связанные с построением градуировочной характеристики системы.

Цель статьи

В связи с поставленной задачей целью статьи является рассмотреть и обосновать возможность применения структурных методов повышения точности при проведении количественного химического анализа с использованием хроматомасс-спектрометрических измерительных систем.

Основной материал

В последнее время для определения концентрации вещества в сложной матрице широко используются хроматографы, которые в комплексе с масс-спектрометром создают систему количественного анализа с высокой разрешающей способностью.

Отсутствие эталона единицы концентрации вещества — моля приводит к необходимости градуировки средств измерений перед проведением анализа. Для этого используются подаваемые на вход средства измерения стандартные растворы, которые иногда называют «стандартами», имеющие нормируемую концентрацию определенного аналита x_{0i} , и регистрируют показания y_i , соответствующие этим концентрациям. В большинстве случаев при построении градуировочной характеристики масс-спектрометра предполагается, что она имеет вид линейной функции $y = a + bx$, а оценки коэффициентов которой \hat{a} и \hat{b} вычисляются с использованием метода наименьших квадратов.

По полученной градуировочной характеристике, зная результат y_k , определяют концентрацию исследуемого аналита

$$x_k = (\hat{y} - \hat{a}) / \hat{b}.$$

При проведении медико-биологических исследований перед непосредственным измерением концентрации аналита осуществляется этап выделения определяемого компонента из матрицы, состав которой довольно сложный. Этот этап состоит из многих стадий, и процент извлечения компонента из матрицы, так называемый «возврат», зависит от чистоты реактивов, точности дозировки, тщательности выполнения в соответствии с методикой режимов очистки, экстракции и т.п., что вносит неопределенность в результат анализа.

При осуществлении градуировки системы в абсолютных значениях измеряемой концентрации, как это было описано выше, необходимо располагать не только набором стандартных растворов со значениями концентраций, перекрывающими рабочий диапазон измерения, но, исходя из предшествующего этапа пробоподготовки, и идентичными «холостыми» матрицами, в которые вносится определенное количество соответствующих стандартных растворов. Под «холостой» понимается матрица вещества, аналогичная исследуемой, но не содержащая аналит, который предполагается выделить из рабочей матрицы, и концентрацию которого требуется определить. При этом должна быть уверенность в том, что в «холостой» матрице он действительно не содержится. Это первая сложность, возникающая при количественном химическом анализе.

Вторая сложность состоит в необходимости обеспечения в заданных пределах одинаковой неопределенности многостадийного этапа пробоподготовки как при градуировке измерительной системы, так и при проведении анализа, т.е. необходимо выполнить условия воспроизводимости этапа пробоподготовки.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что при градуировке, так называемая, многоканальная структура реализации этапа пробоподготовки практически не позволяет исключить неопределенность этого этапа, а иногда даже и увеличить.

В соответствии с теорией инвариантности академика Б.Н. Петрова необходимо, как минимум, два канала восприятия влияющих величин. Эти каналы могут быть реализованы не только разнесением их в пространстве, но и разделением во времени. Это обеспечивается поочередной подачей на канал образцовой x_0 и измеряемой x_k величин. При малых изменениях влияющих величин за время переключения будут и одинаковые изменения характеристик канала, и поэтому соотношение между значениями выходных величин $y'_0 = kx_0$ и $y'_k = kx_k$ остается таким же, что и на входе этого канала. Тогда значение измеряемой величины определится исходя из отношения y'_0 и y'_k как

$$x_k = x_0 \cdot y'_k / y'_0$$

и несовершенство характеристики канала при этом не учитывается.

При проведении количественного химического анализа это свойство непосредственно использовать нельзя, т.к. этапы процедуры пробоподготовки протекают во времени последовательно, то есть нельзя без специальных приемов реализовать принцип одноканальности с разделением во времени. Однако использование в системе количественного химического анализа хроматографа, дает возможность разделить «стандарт» и измеряемый аналит, если их состав по какому-либо признаку отличается. Если эту задачу решать непосредственно путем выбора «стандарта» с другими свойствами, то принцип инвариантности нарушится. Этого можно избежать, если в исследуемую матрицу предварительно ввести в качестве добавки изотопно-меченый раствор, который, по определению, обладает теми же свойствами, что и аналит, концентрация которого определяется, но имеющий отличную от него массу. Это позволяет, исходя из времени появления пика на хроматограмме, отдельно оценивать концентрацию исследуемого аналита и изотопно-

меченой добавки, введенной в матрицу. При этом неопределенность, вносимая на стадиях пробоподготовки, таких как очистка, выпаривание, экстракция и т.п., исключается, так как и аналит, и «стандарт» будут одновременно проходить одни и те же стадии пробоподготовки.

При таком подходе можно осуществлять градуировку непосредственно масс-спектрометра, а не всей системы, так как неопределенность, вносимая на этапе пробоподготовки, практически будет исключена.

Как уже отмечалось, концентрация вещества на входе такой системы будет пропорциональна площади пика S , зафиксированного на хроматограмме. В соответствии с проведенным анализом концентрация C_k измеряемого компонента при введении изотопно-меченого стандартного раствора с концентрацией $C_{и}$ в исследуемую матрицу будет пропорциональна отношению соответствующих площадей пиков $S_k / S_{и}$ на хроматограмме. Тогда при линейной характеристике масс-спектрометра и отсутствии ее аддитивного смещения, будет

$$C_k = C_{и} \cdot S_k / S_{и}. \quad (1)$$

Таким образом, определив соотношение площадей пиков хроматограмм при известной концентрации «стандарта» можно найти искомую концентрацию C_k аналита. Это будет при идеальной ситуации, когда характеристика не смещена.

Аддитивное смещение характеристики преобразования масс-спектрометра вносит неопределенность в результат, и при различных значениях концентраций C_k и $C_{и}$ будет различный вклад смещения в неопределенность. К тому же, одно и то же отношение площадей пиков $S_k / S_{и}$ может быть получено при различных соотношениях C_k и $C_{и}$, что вносит дополнительную неопределенность в результат.

Чтобы достичь однозначности при градуировке, исключить зависимость результата от значения концентрации изотопно-меченого стандарта, градуировку необходимо проводить при фиксированном значении $C_{и}$, т.е. располагать набором стандартных растворов, в которых концентрация изотопно-меченого компонента остается постоянной, а концентрация исследуемого аналита представлена рядом значений C_{ki} , перекрывающих нормируемый (заданный) диапазон измеряемых значений в исследуемой матрице.

Тогда по изменению отношения

$$A = (S_k \cdot C_{и}) / (S_{и} \cdot C_{ki}), i = \overline{1, N},$$

которое в идеале должно быть равным единице, можно судить, исходя из уравнения регрессии, построенного по градуировочным данным, о реальной характеристике масс-спектрометра. Отклонение реального коэффициента A от единицы учитывается с помощью поправочного множителя к полученному текущему результату. При этом относительная градуировочная характеристика зависит только от текущего значения концентрации анализа C_{ki} .

Проведя эксперимент в i -ой точке диапазона измерения, вычисляем множество значений градуировочных коэффициентов

$$A_{\text{гpi}} = \frac{S_{и}}{S_{ki}} \cdot \frac{C_{ki}}{C_{и}}, \quad (2)$$

которые в общем случае будут отличаться от единицы.

Используя метод наименьших квадратов [3], находят коэффициенты уравнения регрессии

$$\hat{A}_{\text{гpi}} = \hat{a} + \hat{b} \cdot C_{ki}, \quad (3)$$

при которых минимизируется сумма квадратов отклонений градуировочных коэффициентов, рассчитанных на основании экспериментальных данных по выражению (2), и найденных из уравнения (3) для всех i -ых концентраций компонента (точек диапазона измерений, в которых проводился эксперимент).

Соответствие найденной зависимости экспериментальным данным оценивается на основании остаточной дисперсии адекватности [3]

$$s_{ад}^2 = \frac{1}{N-2} \sum_{i=1}^N (\hat{A}_{гpi} - A_{гpi})^2,$$

где $\sum_{i=1}^N (\hat{A}_{гpi})$ и $\sum_{i=1}^N (A_{гpi})$ — значения, соответственно рассчитанные на основании уравнения регрессии и найденные на основании экспериментальных данных значения в i -ой точке.

В соответствии с теорией математической статистики при однократном проведении эксперимента для каждого соотношения концентрации $\frac{C_{ki}}{C_{и}}$, что имеет место в

рассматриваемом случае, на основании $s_{ад}^2$ можно проверить гипотезу H_0 : горизонтальная прямая $\bar{A} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N A_{гpi}$ соответствует экспериментальным данным, разброс значений относительно которой зависит только от влияния случайных величин при альтернативной гипотезе H_1 : наклонная прямая соответствует экспериментальным данным.

Для проверки этой гипотезы используют критерий Фишера, расчетное значение которого определяют как

$$F_p = \frac{s^2(A)}{s_{ад}^2}.$$

Оценку дисперсии, характеризующую рассеяние значений A_i , определенных на основании проведенного эксперимента, по отношению к их среднему \bar{A} вычисляют как

$$s^2(A) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (A_{гpi} - \bar{A})^2.$$

Расчетное значение коэффициента Фишера F_p сравнивают с критическим значением $F_{кр}$ для выбранного уровня статистической значимости α и количества степеней свободы числителя ($N-1$) и знаменателя ($N-2$).

Если $F_p > F_{кр}$, то можно утверждать на основании имеющихся данных, что найденная линейная зависимость с вероятностью $1-\alpha$ соответствует экспериментальным данным, что свидетельствует об изменении характеристики масс-спектрометра в зависимости от измеряемой концентрации. Другого вывода при однократных измерениях сделать нельзя.

Вторым преимуществом использования фиксированного значения $C_{и}$ при относительной градуировке является возможность статистического оценивания повторяемости результатов.

Действительно, так как при градуировке характеристики масс-спектрометра концентрация стандартного изотопно-меченого раствора $C_{и}$ была постоянна, то и площади им соответствующих пиков $S_{иi}$ тоже должны быть постоянными. В действительности такое не наблюдается. Отличие площадей хроматографических пиков $S_{иi}$ для разных точек градуировочной зависимости при одной и той же концентрации стандарта обусловлено влиянием случайных величин (шумов) масс-спектрометра и могут быть оценены как

$$\hat{s}^2(S_{ii}) = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (S_{ii} - \bar{S}_{ii})^2,$$

где $\bar{S}_{ii} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N S_{ii}$ — среднее значение площадей пиков, зафиксированных на хроматограмме при проведении опытов в точках градуировки. Это дает возможность на основании вычисленного значения

$$F_{p1} = \frac{S_{ад}^2}{k\hat{s}^2(S_{ii})},$$

где k — коэффициент, учитывающий различный масштаб составляющих, проверить гипотезу H_0 : линейная зависимость адекватна экспериментальным данным. В этом случае F_{p1} сравнивают с критическим значением $F_{кр1}$, выбранным для уровня статистической значимости α и количества степеней свободы числителя ($N-2$) и знаменателя ($N-1$). Если $F_{p1} < F_{кр1}$, то гипотеза H_0 принимается. Это позволяет повысить статистическую надежность получаемых результатов.

Вычисленное значение оценки дисперсии $\hat{s}^2(S_{ii})$ результатов масс-спектрометра характеризует дисперсию повторяемости [4]. Полученное стандартное отклонение повторяемости вместе с неопределенностью подготовки рабочего стандартного изотопно-меченого раствора, отбора анализируемого объема исследуемой матрицы, определяемых по типу В из паспортных данных, позволяет найти оценку неопределенности результата единичного анализа, что при традиционном подходе сделать не представляется возможным.

Выводы

Введение в анализируемую матрицу изотопно-меченого стандартного раствора, имеющего те же физико-химические свойства, что и исследуемый компонент, исключает влияние неопределенности этапа пробоподготовки на точность получаемого результата. Это позволяет производить градуировку только масс-спектрометра. Проведение градуировки в относительных единицах при фиксированной концентрации «стандарта» дает возможность оценить повторяемость и расширенную неопределенность результата.

Литература

1. Фаткудинова Ш.Р., Солопченко Г.Н. Применение цифровых моделей реальных хроматограмм для оценки погрешности результатов химического анализа // Журнал аналитической химии, 1998, т.53, № 11. — С. 1158–1165.
2. Чмил В.Д. // Современные проблемы токсикологии. — 2002. — N2. — С. 56–62.
3. Володарський Є.Т., Кошева Л.О. Статистична обробка даних: Навч. посібник.— К.: НАУ, 2008. — 308 с.
4. ДСТУ-Н РМГ 43:2006. Метрологія. Застосування «Руководства по выражению неопределенности измерений».

Здано в редакцію:
11.03.2009р.

Рекомендовано до друку:
д.т.н, проф. Зорі А.А.