

SEIN ODER NICHTSEIN

Identifizierungskriterien in der LC-MS/MS

Wolfgang Brodacz

Absolute Retentionszeit-Fenster

Bei der Multikomponentenanalytik mittels Gradienten-(U)HPLC (bzw. temperaturprogrammierter GC) ist die Variation der Retentionszeit unabhängig von der Retentionszeit RT. Die Toleranz für die RT ist daher als absoluter Wert anzugeben, meist liegen die Abweichungen innerhalb von +/- 0,1 Minuten. Relative RT-Regelungen zeigen keinen wesentlichen Vorteil (Ausnahme: C13-markierte interne Standards).

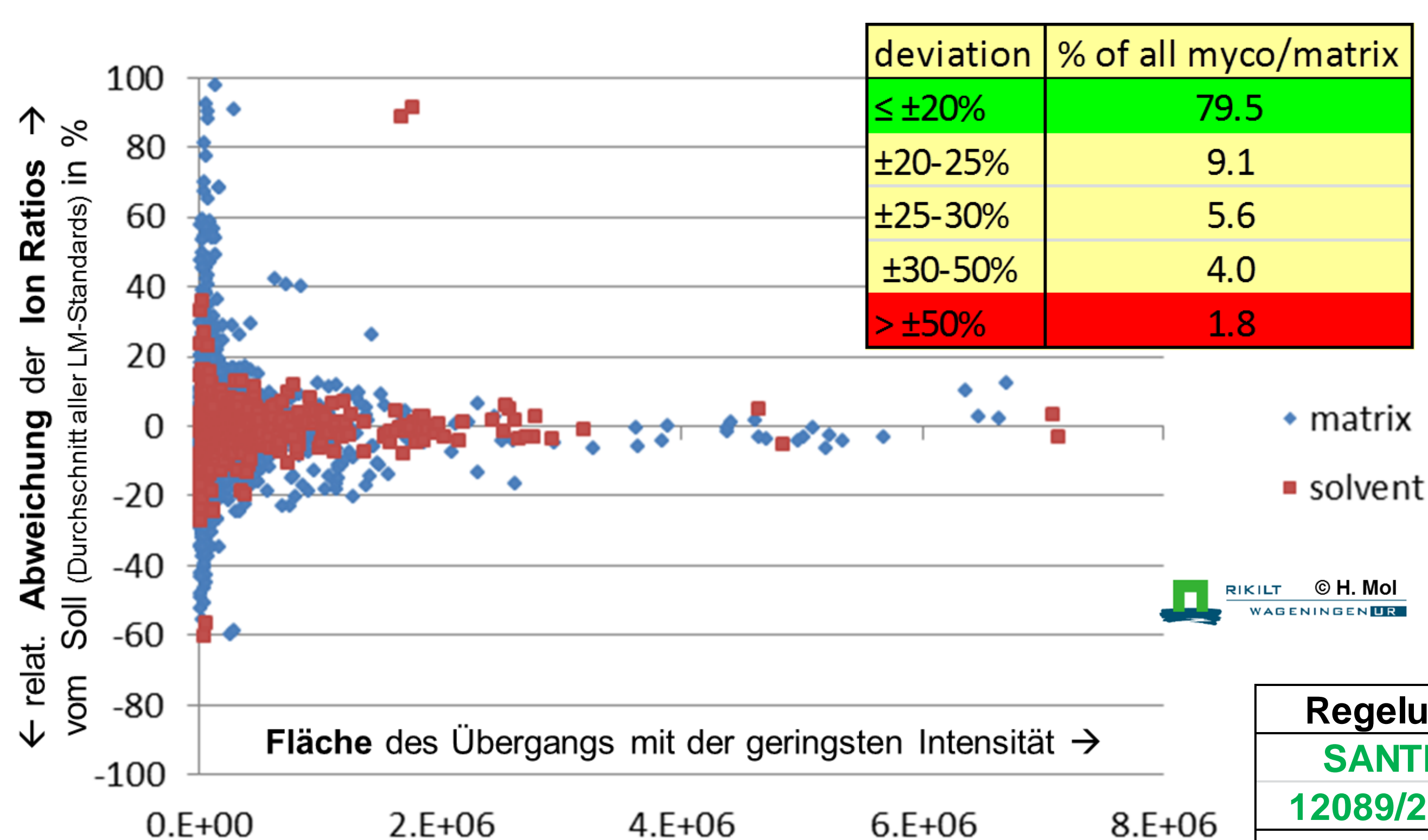
Empfehlung: Die Chromatographie ist so zu gestalten, dass die RT des ersteluirenden Zielanalyten zumindest die doppelte Totzeit überschreitet. Das chromatographische Erkennungsfenster sollte ein absoluter Wert im Bereich von +/- 0,1 bis maximal 0,2 Minuten sein. Als RT-Bezug dient der Mittelwert aller Standards derselben Sequenz. Bei individueller Korrektur mit C13-isotopenmarkierten internen Standards kann die RT-Toleranz auf +/- 0,05 Minuten (3 Sekunden) reduziert werden.

Konstant relative Ion Ratio-Toleranz

Das Ion Ratio (IR, MRM-Verhältnis) bezeichnet das Signalverhältnis zw. Qualifier und Target und ist das wichtigste MS-Identifizierungskriterium. Die zwei diagnostischen MRM-Peaks müssen dabei zeitlich exakt deckungsgleich sein und über dem LOD liegen.

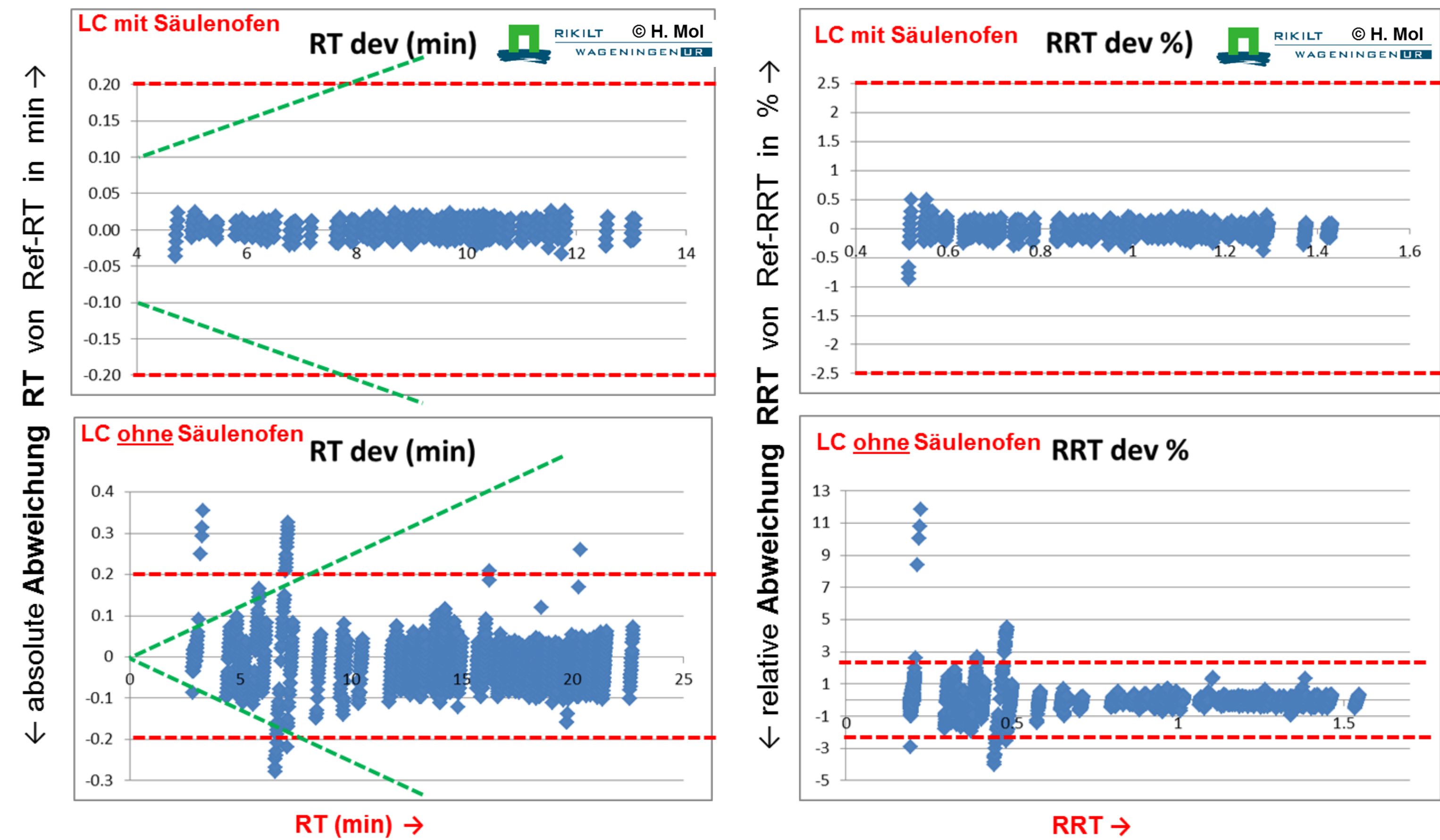
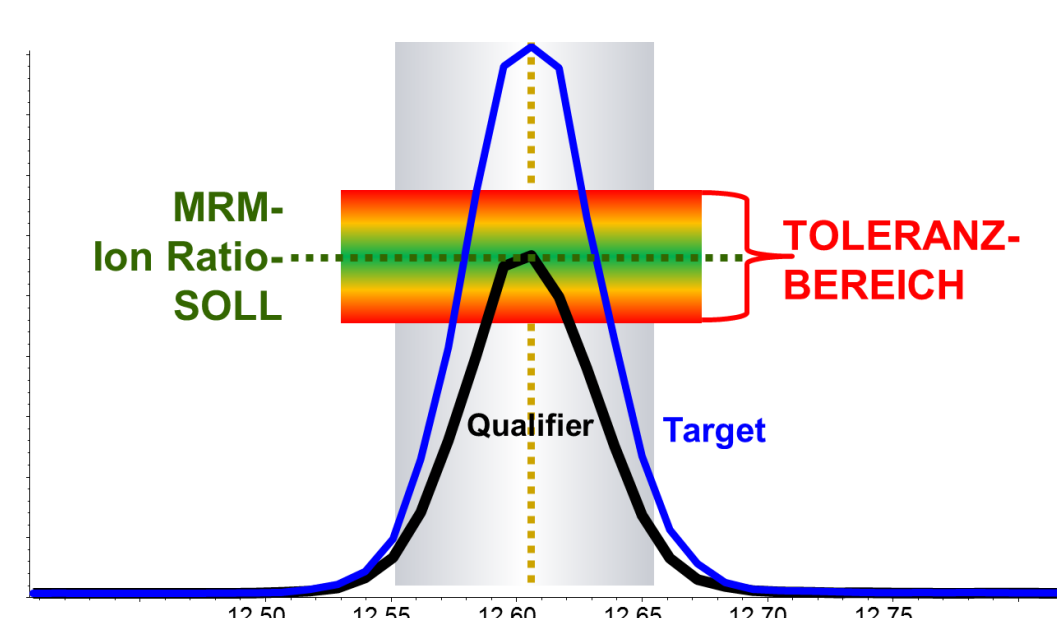
Die Variation des IR hängt hauptsächlich vom Signal/Noise-Verhältnis der Produkt-Ionen ab und nicht wie von einigen Regulatorien angenommen, vom relativen Verhältnis der beiden Signale. Daher ist eine konstante Abweichung in Prozenten des Referenz-IR (Mittelwert aller LM-Kalibrierstandards derselben Sequenz) zu definieren. Mit +/- 45 % Toleranz wird der Großteil der bei praktischen Proben auftretenden Variationen abgedeckt („Fit for Purpose“). Bei IR-Abweichungen >30% ist eine genauere Überprüfung auf eventuelle Interferenzen u. Artefakte notwendig.

Neuere EU-Regelungen legen konstante +/- 30% als Identifizierungskriterien fest.



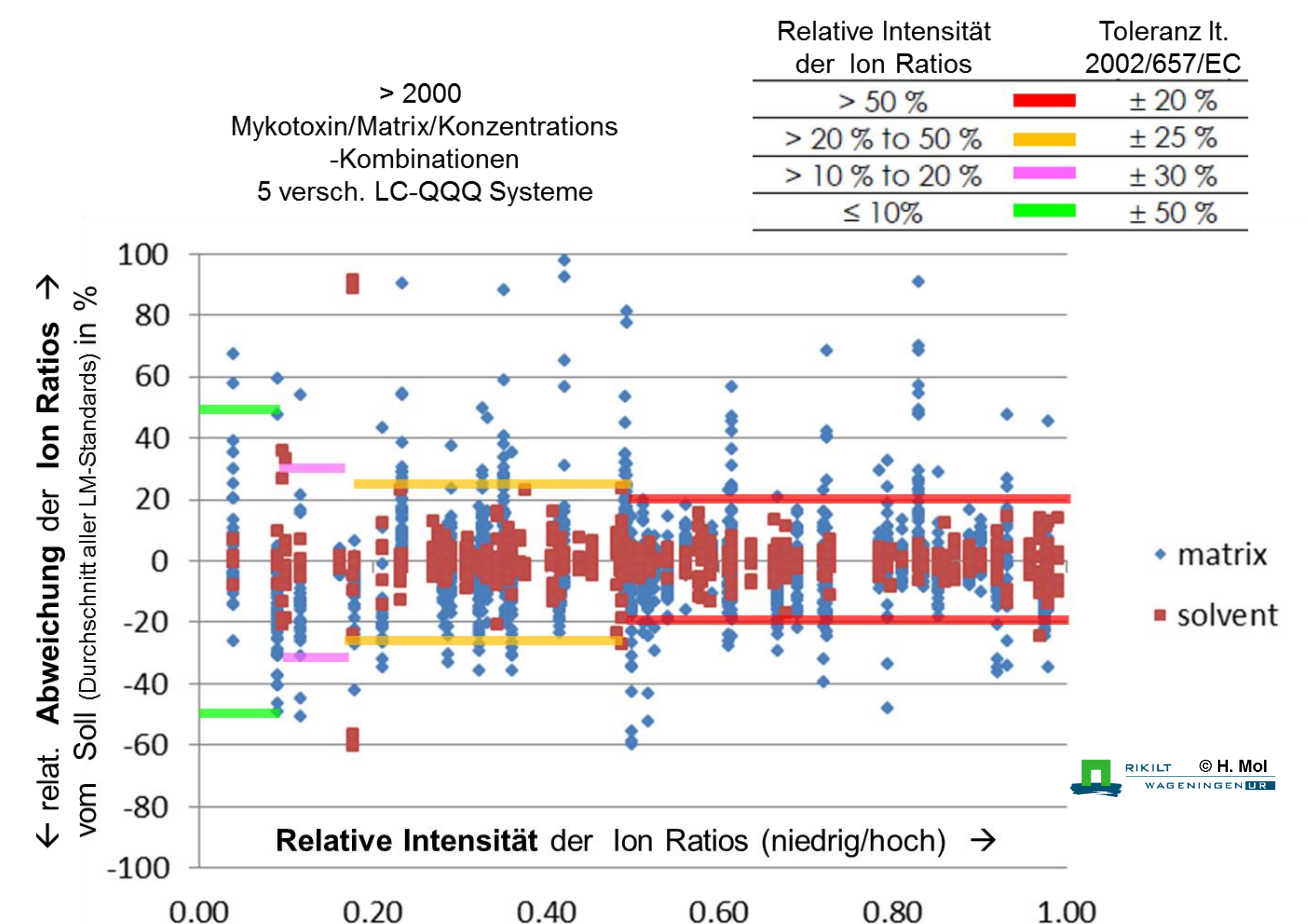
Plot der relativen Abweichungen der Signalverhältnisse gegen die absoluten Signalintensitäten zeigt eine deutliche Abhängigkeit der Ion Ratio-Differenzen von der Signalstärke

Bilder
Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Hans Mol (RIKILT)



Variabilität der absoluten RT-Abweichungen von den Referenzmittelwerten in zwei Labors, aufgetragen gegen die LC-Retentionszeit (RT). Absolutes Abweichungskriterium (SANTE/12089/2016 rot) im Vergleich zu der großzügigen Regelung (2002/657/EC) mit relativen Toleranzen (+/- 2,5% grün)

Variabilität der relativen RT-Abweichungen von den Referenzmittelwerten in zwei Labors, aufgetragen gegen die relative LC-Retentionszeit (RRT) (relative Toleranz lt. Reg. 2002/657/EC in rot)



Plot der relativen Abweichungen der Signalverhältnisse gegen deren relative Intensitäten. Die farbigen Toleranzbereiche der Reg. 2002/657/EC zeigen, dass die tatsächlichen Abweichungen nicht wie angenommen mit steigender relativer Intensität absinken

Regelung	Geltungsber.	Retentionszeit	Ionen-Verhältnisse			
SANTE/ 12089/2016	MYKOTOXINE	RT ≤ ± 0.2 min	alle Verhältnisse			
			± 30% (rel)			
2002/657/EC	Tierarzneimittel/ MYKOTOXINE	RRT ≤ ± 2.5%	RI >50% ±20% (rel)	RI >20-50% ±25% (rel)	RI >10-20% ±30% (rel)	RI ≤10% ±50% (rel)
SANCO/ 12571/2013	Pestizide	RT ≤ ± 0.2 min	alle Verhältnisse			
			± 30% (rel)			
FDA ORA-LAB.10	Pestizide	RT ≤ ± 5%	RI >40% ±20% (rel)	RI >10-40% ±25% (rel)	RI ≤10% ±50% (rel)	
			bei 2 diagn. Ionen: ± 10% (abs)		≥ 3 diagn. Ionen: ± 20% (abs)	
FDA 118	Tierarzneimittel	RT ≤ ± 5%	alle Verhältnisse			
USDA PDP	Pestizide	RT ≤ ± 0.5 min RRT ≤ ± 0.1 min	± 20% (abs)			
WADA TD2010IDCR	Doping	RT ≤ ± 2% od. 0.1 min	RI >50%	RI 25-50%	RI 5 to <25%	RI <5%
		RRT: ±1% (0.1% SI-IS)	±10% (abs)	±20% (rel)	±5% (abs)	±50% (rel)

Referenzen:

H.G.J. Mol, et al., „Identification in residue analysis based on liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Experimental evidence to update performance criteria“; Analytica Chimica Acta 2015; Volume 873, 11 May 2015, Pages 1–13

S. J. Lehotay, Y. Sapozhnikova, H.G.J. Mol, „Current issues involving screening and identification of chemical contaminants in foods by mass spectrometry“; TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 69, June 2015, Pages 62–75

H.G.J. Mol, et al., „Identification criteria for determination of mycotoxins in food and feed“; EURL-workshop mycotoxins, Geel, 15-16 October 2014