

Vorbereitung von Geräteneuanschaffung („Design Qualification“)

Empfehlung der Arbeitsgruppe Pestizide

Stand: April 2016

Zielstellung

Aufgrund der Komplexität der Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmittelrückständen in Lebens- und Futtermitteln ist die Erarbeitung eines Kriterienkatalogs für Gerätedemonstrationen bei der Entscheidungsfindung von entscheidender Bedeutung. Im Wesentlichen betrifft dies gegenwärtig die Kopplungstechniken GC-MS(/MS) und LC-MS/MS (inkl. HRMS). Dieser Kriterienkatalog hängt vorwiegend von der Fachspezifikation (Pflichtenheft) ab, welche für die geplante Investition erstellt wurde.

Unter Gerätedemonstration wird folgend die Durchführung von Messungen an bekannter Zusammensetzung von Pestizidwirkstoffen (Messlösungen) in Demonstrationslaboren von Geräteherstellern verstanden. Alternativ sind auch Messungen von Probenextrakten zu empfehlen, welche dem Gerätehersteller vom eigenen Laboratorium bereitgestellt werden.

Das Ziel beim Erwerb neuer Messsysteme ist die Wahl von Geräten mit optimaler Performance und Konfiguration. Die Gerätedemonstration soll sicherstellen, dass das anzuschaffende Gerätesystem in der Fachspezifikation festgelegte Anforderungen erfüllt. Dies kann mit unterschiedlicher Gewichtung Kriterien wie z. B. gute Robustheit, Reproduzierbarkeit, Selektivität, Empfindlichkeit, Richtigkeit, einfache Bedienung oder leistungsfähige Software beinhalten. Werbeversprechen der Hersteller sollten stets kritisch hinterfragt und ggf. durch die Gerätedemonstration verifiziert werden.

Kriterien für Gerätedemonstrationen

Es wird empfohlen, eigene Anforderungen an relevante Geräteeinheiten und Software zu formulieren. Folgend sind einige Beispiele aufgeführt:

- Art der Probenaufgabe,
- chromatographische Auflösung (GG und LC),
- Möglichkeiten der Automatisierung (z. B. bei Säulen- und Eluentenwechsel bei der LC),
- Einsatz spezieller Hardwarekomponenten: z. B. PTV, automatischer Linerwechsel (GC), Backflush (GC, LC),
- Empfindlichkeit der Detektoreinheit (z. B. S/N-Verhältnis für ausgewählte Analyten unter Berücksichtigung der Anzahl der zu untersuchenden Analyten),
- dynamischer Bereich des Detektors (Konzentrationsbandbreite über mehrere Zehnerpotenzen),
- Selektivität,
- Leistungsfähigkeit der Datenbank für Akquisition und Reporting (MRM),
- Leistungsfähigkeit und Einfachheit beim Erstellen von Reporting-Templates und Reporting-„Geschwindigkeit“,
- Leistungsfähigkeit der Datenakquisition (dwell time, Anzahl MRM etc.),
- Speicherkapazitäten bei hohen Datenvolumina (z. B. externe Speichermedien).

Bei der Definition von Geräte Kriterien sollte das im eigenen Labor zugrunde liegende Untersuchungsspektrum (Anzahl und Struktur der Analyten) berücksichtigt werden. Bei der

Prüfung frei verfügbarer oder käuflich zu erwerbender Applikationen sollte eine Objektivierung beim Vergleich von Geräten verschiedener Lieferanten (Hersteller) angestrebt werden. Dies kann z. B. durch die geeignete Auswahl einer repräsentativen Anzahl „schwieriger“ und „einfacher“ Analyten sowie die Berücksichtigung der Probenmatrix erfolgen.

Es sollten Anforderungen an Probenaufgabe (Einlass HPLC, GC), Automatisierung, Einfluss der Probenmatrix, benötigte Detektor-Performance (MS; MS/MS; HRMS) in Abhängigkeit von der Analytik (Target- oder Non-Target) sowie ggf. an Zusatzdetektoren (DAD), Service, applikative Unterstützung etc. definiert werden.

Als Grundvoraussetzungen für die **Planung von Gerätedemonstrationen sollten folgende Punkte berücksichtigt werden:**

- Durchführung von Messungen (auch) unter Matrixeinfluss,
- Einbeziehung einfacher und komplexer Matrices (SANTE-Matrixgruppen),
- Überprüfung der Kombination aus Detektorperformance (z. B. Massenbereich) und Leistungsfähigkeit des chromatographischen Systems,
- Übertragbarkeit von Ergebnissen des Demonstrationslabors des Geräteherstellers auf den Routinebetrieb im eigenen Labor (falls Testphase im eigenen Labor möglich),
- Erfüllung methodischer Anforderungen des eigenen Laboratoriums,
- Wartungsfrequenz und Wartungsintensität (Wartungsvertrag, Service-Reaktionszeit),
- Erfüllung arbeitssicherheitsrelevanter Aspekte (z. B. Lärmschutz),
- Berücksichtigung bereits vorhandener Referenzen (Austausch mit Fachexperten),
- Gerätedemonstration vor Ort (eigene Anwesenheit im Demolabor des Geräteherstellers).

Folgende relevante Kenngrößen und Faktoren sollten ebenfalls überprüft werden:

- Bestimmungsgrenze für die in Frage kommenden Verbindungen, Reproduzierbarkeit,
- Sensitivität, Selektivität,
- möglichst konstante Robustheit (auch unter Matrixeinfluss, z. B. Hopfen), ggf. vertragliche Vereinbarung,
- Notwendigkeit der Matrixentfernung, Matrixkompensation,
- Einsatz allgemeiner Markeranalyten mit unterschiedlichem Response,
- Prüfung von Thermolabilität etc. bei der Gaschromatographie (z. B. anhand von Captan und Folpet) mit Hilfe spezifischer Markeranalyten.

Bei der Bestimmung von Verbindungen mittels **Gaschromatographie** ist die Geometrie des Injektionssystems von wichtiger Bedeutung für eine optimale Probenaufgabe (möglichst zerstörungsfreie Verdampfung und gute Fokussierung der Analyten). Im Fall der Analytik von Pflanzenschutzmittelwirkstoffen im Rahmen von Multimethoden sollten die **Vorteile temperaturprogrammierter Injektion (PTV)** bei der Zusammenstellung von Bewertungskriterien beachtet werden. Zusätzlich können die Injektionsbedingungen in Abhängigkeit der Substanzeigenschaften variiert werden, um die Eignung von Injektorsystemen für die eigene Fragestellung prüfen zu können. Hinsichtlich der Reduktion von Qualitätsproblemen infolge verschmutzter Liner und aus Aspekten der Wirtschaftlichkeit kann außerdem ein **automatischer Linerwechsel** in Betracht gezogen werden. Als Zusatzkriterium können ebenfalls Optionen der Rückspülung der Säule (Backflush/Drucksteuerung) oder Kühlung des Autosamplers dienen.

Bei der **Kopplungstechnik LC-MS/MS (/HRMS)** sollten ferner Kriterien für die Überprüfung der Eigenschaften des **Probeneinlasses der HPLC-Geräte** herangezogen werden, da dies einen signifikanten Einfluss auf Trennung und Peakform haben kann. Hier kann es sich um

unterschiedliche Injektionstechniken handeln, z. B. online, in Fluss oder klassisch, durch Injektionskapillare etc. Bei der Bewertung der Performance des Probeneinlasses sollte auf reproduzierbare Startbedingungen (Äquilibrierung des chromatographischen Systems, Totvolumen der Pumpe, Vorausberechnen von Totvolumina in der Software etc.) Rücksicht genommen werden. Die **Aufbaugeometrie des „Interface“** HPLC/MS (z. B. Kapillarenlänge, -durchmesser etc.) kann ebenfalls von Relevanz sein.

Im Zusammenhang mit der **Stabilität der Analyten** bei der gaschromatographischen Bestimmung kann zugleich die Option einer **Autosampler-Kühlung** geprüft werden. Da Matrixeinflüsse durch eine unzureichend gespülte HPLC-Säule zu einer zusätzlichen Koelution auf der Säule verbliebener Probenmatrix zu **unreproduzierbarer Signalveränderung bei der LC-ESI-MS/MS** und damit zu Problemen bei der Quantifizierung führen können, wird an dieser Stelle die Prüfung des Einsatzes von **Backflush** empfohlen.

Nach Festlegung der Konfiguration von Probenaufgabe und Chromatographie sollten Kriterien für die **Performance der massenspektrometrischen Detektoreinheit** erstellt werden. So können Gerätesysteme als Ganzes mit einer höheren Objektivität miteinander verglichen werden. Folgend wird auf einige Besonderheiten beim Vergleich verschiedener Gerätehersteller im Fall von der gegenwärtig in der Routine angewendeten MS-Triple-Quad-Technik hingewiesen. Um die Routinetauglichkeit verifizieren zu können, sollte beispielsweise die Robustheit von Q0/Q1 gegenüber Verschmutzungen bei Gerätedemonstrationen möglichst realitätsnah (unter Routinebedingungen) simuliert oder nach Geräteerwerb im eigenen Labor im Rahmen von Vereinbarungen mit dem Gerätelieferanten verifiziert werden.

Da ein optimales Verhältnis zwischen Selektivität und Sensitivität bei Multimethoden unabdingbar ist, sollte bei einem Gerätevergleich auf einheitliche Einstellung von Tune-Parametern geachtet werden. Beispielsweise liegt bei Triple-Quad-Systemen die Einstellung bei Q1 für die „Halbwertsbreite“ der Massenpeaks üblicherweise bei 0,5 - 0,7 D, oft beträgt diese jedoch $\geq 1D$. In diesem Fall würde es zu Gewinn an Sensitivität jedoch zu Verlust an Selektivität kommen. Nach erfolgter Auswahl repräsentativer Vertreter von Verbindungen mit unterschiedlicher Stabilität und Polarität sowie Definition von Tune-Parametern können zwecks des Vergleichs verschiedener Gerätesysteme ggf. „Signal/Rauschen (S/N)-Verhältnisse“ bei einer oder mehreren Substanzkonzentrationen (in Lösungsmittel und/oder Matrix) als Kenngröße genutzt werden. So sind Gerätesysteme mit unterschiedlicher Performance bezüglich konkreter Anforderungen an Nachweis- (LOD) oder Bestimmungsgrenze (LOQ) miteinander vergleichbar. Dadurch können repräsentative Standardmischungen so verdünnt werden (in Lösungsmittel und Matrix), dass sowohl „LOD-“ oder „LOQ-Standards“ abgeleitet als auch der dynamische Bereich des Detektors verifiziert werden können.

Die Software sollte eine hohe Datenaufnahmerate, leistungsfähige Auswertalgorithmen (z. B. Deconvolution) und eine adäquate Sicherheit bezüglich der Vermeidung falsch negativer Befunde etc. liefern. Zusätzlich sollte beachtet werden, dass Matrixeinflüsse trotz permanent steigender Detektorempfindlichkeit nicht immer durch „Dilute and shoot“-Techniken zu kompensieren sind. Die hohe Sicherheit der Quantifizierung mit Hilfe von Standardaddition sollte an dieser Stelle beachtet werden.

Nach Definition der Konfiguration des Gerätesystems könnte eine Überprüfung von Empfindlichkeit, Stabilität und Robustheit folgendermaßen erfolgen (Beispiel):

→ **Stufe 1: Versand von Lösungen bekannter zu untersuchender Verbindungen (externe Standards: als ESTD oder Target-Substanzen bezeichnet), von internen Standards (ISTD) und von Matrixextrakten mit Angabe von Konzentrationen**

Bezeichnungen:

M1: (Matrixextrakt 1): enthält Matrix und ISTD

M2: (Matrixextrakt 2): enthält Matrix, ISTD und Target-Substanzen bekannter Konzentration

Aufgabe A: Verifizierung der Konzentrationen von Target-Substanzen aus M2 durch Quantifizierung mit Hilfe einer Kalibriergeraden unter Einbeziehung des ISTD (interne Kalibrierung)

Aufgabe B: Prüfung auf Empfindlichkeit durch Herstellung und Messung einer Verdünnungsreihe aus M2 bis zu einer Verdünnungsstufe, bei welcher die Target-Substanzen noch eindeutig detektierbar und identifizierbar sind.

Dokumentation: Umfasst Angaben über Chromatographiebedingungen (inkl. Injektionsvolumina), Chromatogramme, statistische Daten zu den Kalibrierfunktionen, Auswertungsdaten zur Verdünnungsreihe, Angaben der Verhältnisse von Qualifikationen zu Quantifikationen

Quantifizierung der zudosierten Target-Substanzen aus M2 mittels Kalibriergerade aus ISTD und verschiedenen Konzentrationen der Targetsubstanzen

→ **Stufe 2: Identifizierung und Quantifizierung von Stoffen aus einer vorgelegten Stoffliste von Target-Substanzen in einem weiteren Matrixextrakt (M3)**

Aufgabe A: Prüfung der Nachweissicherheit: Identifizierung von Stoffen aus einer vorgelegten Stoffliste von Target-Substanzen in einem weiteren Matrixextrakt (M3)

Aufgabe B: Quantifizierung der detektierten Substanzen in M3

Aufgabe C: Prüfung der Reproduzierbarkeit: zehnfache Injektion von M3 und Berechnung des Variationskoeffizienten

Dokumentation: Chromatogramme mit Auswertungen, statistische Daten zu den Kalibrierfunktionen, Auswertungsdaten zur Verdünnungsreihe, Angaben der Verhältnisse von Qualifikationen zu Quantifikationen

Sonstige Vorgaben: Alle Extrakte und Standards werden in doppelter Ausführung zur Verfügung gestellt.

Nach Durchführung aller Messungen in den Demonstrationslaboren verschiedener Gerätehersteller und Auswertung der erzielten Ergebnisse sowie nachfolgender Gewichtung der zuvor selektierten Kriterien sollte eine Entscheidung über den Erwerb eines geeigneten Gerätesystems möglich werden. Im Idealfall werden in einer Gesamtdarstellung die verschiedenen Geräte, die Untersuchungsergebnisse sowie die Preise gegenübergestellt. Die vorliegende Empfehlung sollte zur Objektivierung der Entscheidungsfindung beitragen.

Verabschiedet als Ergebnis der 103. Sitzung der AG Pestizide, Münster, 28./29.04.2016