

Systemtest in einem Schuss

Single-Shot-Konzept zum Leistungs-Check von Chromatographiesystemen

Dr. Joachim Emmert,
Universitätsmedizin Mannheim, Institut für Klinische Chemie

Bei Forderungen zur Qualitätskontrolle analytischer Verfahren und Geräte geht oftmals die Relation zwischen Kontrollen und Messergebnissen verloren. Dabei kann eine Hierarchie von Tests so angewendet werden, dass die zeitaufwändige OQ/PV- (OQ/PV = Operational Qualification/ Performance Validation) Prozedur nur ein- bis zweimal im Jahr und methodennahe Kontrollen innerhalb des jeweiligen Verfahrens durch QC- (Quality Control) Proben mit bekannter Konzentration des Analyten durchgeführt werden (1). Wenn auf einem Analysengerät verschiedene Verfahren laufen, kann ein Systemeignungstest (SST = System Suitability Test) Auskunft darüber geben, ob das Gerät noch die gewohnte Performance zeigt. Überprüft wird dabei dann z. B. die Stickstoffspezifität des NPFID-Detektors, die Halogenspezifität des ECD (beides GC), oder die Massenkalkulation eines mit der HPLC oder GC gekoppelten Massenspektrometers.

Systemtests im zertifizierten Umfeld

Arbeiten im zertifizierten oder akkreditierten Umfeld erfordern eine Leistungsüberprüfung des verwendeten Gerätes. Dies kann arbeitstäglich, bei Verfahrenswechsel sowie nach Kalibration oder Umbau sein. Allerdings ist speziell bei einem LC/MS die Definition eines Umbaus schwierig, weil dieses sehr viele Einstellparameter besitzt. Für einen SST eignet sich am besten eine Substanz mit bestimmten Eigenschaften und in bestimmter Konzentration, welche die gewünschten spezifischen Messeigenschaften und ggf. deren Abweichung schnell aufdeckt. Das ist z. B. in der GC ein Gemisch aus je einer Stickstoff (N) und Phosphor (P) enthaltenden Substanz sowie einem Alkan (C) in unterschiedlichen Konzentrationen zur Messung der Spezifität des NPFID-Detektors, der im Umweltbereich eingesetzt wird.

Bei der GC/MS müssen neben der chromatographischen Trennung und der generellen Detektion der Substanz Parameter wie Massengenauigkeit und Empfindlichkeit betrachtet werden. Hier hat sich Pentachlorphenol (PCP) als geeignet herausgestellt. Die 5 Chloratome im Molekül erzeugen im MS ein typisches Isotopenmuster (Abb. 1 unten). In höherer Verdünnung kann im SIM- (Selected Ion Monitoring) Modus eine quantitative Auswertung sowie eine Betrachtung der Peaksymmetrie vorgenommen werden (Abb. 1 oben). Erlaubte Abweichungen und Korrekturen ergeben sich aus einer Regelkarte (s. u. und Abb. 5) und der zugehörigen Verfahrensanweisung (SOP = Standard Operating Procedure).

HPLC-Anlagen werden meist turnusgemäß einer Leistungsfähigkeitsüberprüfung (OQ/PV) unterzogen. Dazu beginnt man zunächst mit einem Übersichtschromatogramm, es gibt Hinweise auf eventuelle Abweichungen. Dieses „Single Shot Chromatogramm“ eignet sich auch für routinemäßige System checks. Das dazu verwendete Gemisch enthält vier Ketone (Aceton, Acetophenon, Propiophenon und Butyrophenon) unterschiedlicher Konzentration und wird isokratisch chromatographiert. Wenn der erste Peak bei 254 nm kleiner ist als der zweite (Abb. 2), ist wahrscheinlich die Wellenlängenkalibrierung des UV-Detektors falsch. Im vorliegenden Beispiel wurde so eine falsche Parameterzuordnung im Diodenarray-Detektor entdeckt. Nach Korrektur mit Erbiumperchloratlösung oder Holmiumoxidfilter stimmt die Wellenlängenkalibrierung wieder und das Chromatogramm entspricht der vorgesehenen Form (Abb. 2 unten).

LC/MS – ein komplexes Analysengerät

Ein LC/MS kann für viele verschiedene Aufgaben eingesetzt werden, z. B. für Proteomics oder Plasmaspiegelbestimmungen von Medikamenten. Eine besondere Herausforderung ist es, wenn das Gerät für beide Aufgaben eingesetzt wird und zusätzlich von HPLC auf Nano-LC umgebaut wird. Wegen des hohen Zeitaufwands kann das Gerät nicht jedes Mal qualifiziert werden, sondern nur im Abstand von einigen Wochen. Dann wird zuerst geprüft, ob die Einlasskapillare verschmutzt ist. Wenn Messungen im Negativ-Modus durchgeführt werden, muss das Gerät auch in diesem kalibriert werden. Die richtige Kalibration in allen Modi nachzuweisen, ist Teil des nachfolgenden SSTs. Hierzu wird zunächst eine verdünnte Lösung Reserpin eingespritzt und in den verschiedenen Auflösungen im Positiv-Modus in Bezug auf Massengenauigkeit gegen eigene Vorgaben geprüft, wobei natürlich die Spezifikation des Gerätes beachtet wird. Dann werden in einer Sequenz ein Blank, Reserpin

und Digoxin mit einem Standard-Gradienten (Wasser-Acetonitril) chromatographiert. Ausgewertet werden EIC (= Extracted Ion Chromatogram) und Massenspektrum (Abb. 3 und 4). Die Bedingungen sind durch das Ansäuern mit 0,1% Ameisensäure für den Positiv-Modus optimiert. Man kann aber auch unter diesen Bedingungen Digoxin chromatographieren und im Negativ-Modus detektieren, da es besser geeignet ist als Reserpin. Dabei entsteht das $[M+CHO_2]^-$ – Ion, das ist bei der Auswertung und Festlegung des EIC-Signals zu beachten. Fläche oder Höhe des EIC-Signals können in eine Regelkarte eingetragen werden. Für die Massengenauigkeit gelten erlaubte Abweichungen nach eigenen Vorgaben bzw. der Spezifikation des Gerätes im entsprechenden Messmodus.

Forderungen nach wöchentlicher Kalibration oder Revalidierung nach jedem Umbau kommen vor, sind aber realitätsfern. Ein TOF- (Time of Flight) Massenspektrometer dagegen muss z. B. durch einen Lockmass-Kalibrator ständig (nach)kalibriert werden. Dieser Sonderfall soll aber in unseren Betrachtungen hier nicht weiter behandelt werden.

Die Regelkarte – ein Werkzeug zur Systemkontrolle

Messwerte gewinnen erst Aussagekraft durch Eintragen in eine Regelkarte, im vorliegenden Beispiel ist es eine Regelkarte zur Messung aromatischer Amine mittels GC/MS (Abb. 5). Bei Einführung des Prüfverfahrens und der ersten Überprüfung von Kalibrationen und Prüfgerät mittels externem Standard wurden verschiedene Trendregeln nach Western Electric verletzt (2, 3). Folgende Maßnahmen wurden ergriffen:

- ▶ Wert 04 Wiederholung der Prüfung
- ▶ Wert 12 Weitere Beobachtung der Datenentwicklung zur Gewinnung von Erkenntnissen
- ▶ Wert 53 Weitere Beobachtung der Datenentwicklung zur Gewinnung von Erkenntnissen
- ▶ Wert 64 Auswertung der bisherigen Daten und Erstellung einer neuen Regelkarte unter Einbeziehung aller Daten

Eine Regelkarte entfaltet erst nach einer gewissen Zeit ihre Wirkung, während man eine falsche Wellenlängen- oder Massenkalkulation in der Regel sofort erkennt. Für beides gibt es geeignete Standards, teilweise sind diese kommerziell erhältlich. Dies hat den Vorteil einer unab-

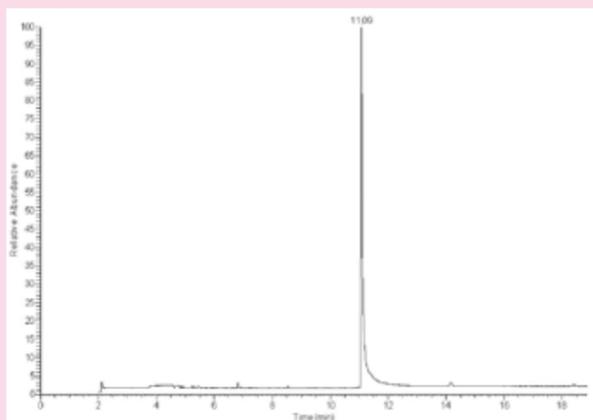


Abb. 1 PCP als GC/MS-Standard (10µg/ml); SIM-Chromatogramm (oben) und exaktes Massenspektrum (unten).

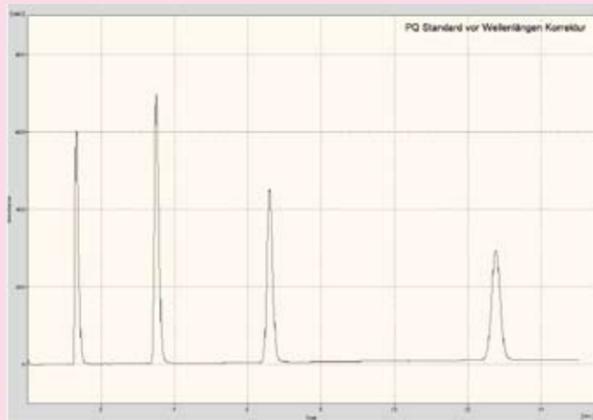


Abb. 2 Standard-Mix aus 4 Ketonen (siehe Text) als SST-Standard für die HPLC. Chromatogramm bei 254 nm vor (oben) und nach (unten) Korrektur der DAD-Wellenlängenkalibrierung.

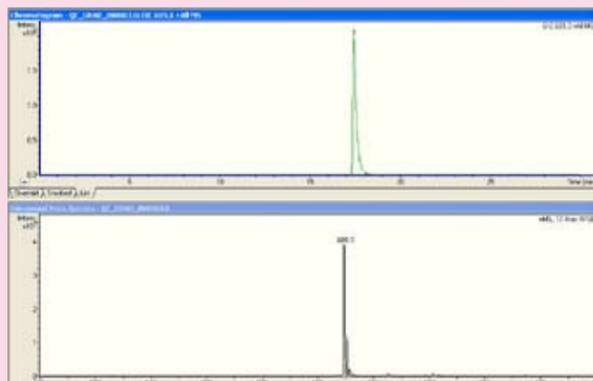


Abb. 3 Reserpin (5 µg/ml) als LC/MS-SST im Positiv-Modus. EIC (oben) und Massenspektrum (unten).

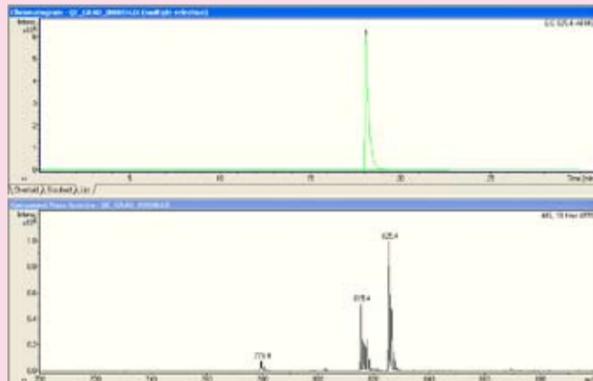


Abb. 4 Digoxin (10 µg/ml) als LC/MS-SST im Negativ-Modus. EIC (oben) und Massenspektrum (unten).

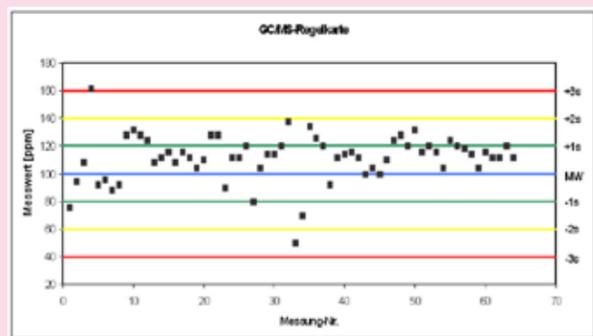


Abb. 5 Regelkarte: Die arbeitstäglichen Kontrollwerte des GC/MS-Standards schwanken um den Mittelwert (blau) innerhalb der zur Bewertung herangezogenen Vertrauensbereiche 1σ (grün), 2σ (gelb) und 3σ (rot). Weitere Auswertung siehe Text.



Dr. Joachim Emmert ist Analytischer Chemiker und seit mehr als 25 Jahren mit der Entwicklung und Anwendung analytischer Messverfahren befasst (u. a. bei Hewlett-Packard, Boehringer Mannheim und Sigma-Aldrich). Sein Spezialgebiet sind die chromatographischen Verfahren GC und HPLC sowie deren Kopplungen mit der MS. Aktuell ist er mit dem Aufbau neuer Methoden zum toxikologischen Screening und therapeutischen Drug-monitoring im Institut für Klinische Chemie des Uniklinikums Mannheim beschäftigt. Das Institut ist nach DIN EN ISO 15189 akkreditiert.

hängigen Herstellung, großer Chargenkontinuität und garantierter Haltbarkeit. Bei Eigenherstellung wird gerade die Haltbarkeit meist unterschätzt. Die Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel, starker Verdünnung und Verpackungsmaterial (Glas, Kunststoff etc.) kann ebenfalls für Überraschungen sorgen. Für eine einwandfreie Kontrolle des Gerätes muss aber das Prüfmittel selbst möglichst fehlerfrei und rückführbar sein.

→ joachim.emmert@ikc.ma.uni-heidelberg.de

Literatur

- [1] M.P. Balogh, V.L. Corbin, LC/GC Europe 18, 78 (2005).
- [2] ISO 8258, Sheubart Control Charts (1991).
- [3] H. Petersen, M. de Mebr, Grundlagen der Statistik und der statistischen Versuchsplanung Bd. 4, ecomed Verlagsgesellschaft mbH., Landsberg/Lech (1993).

In Zusammenarbeit mit



Dr. Gerald Degenhardt ist Physiker und Geschäftsführer der DURATEC Analysentechnik GmbH in Hockenheim.



Peter Laubner ist Leiter des Analytischen Labors bei DyStar Textilfarben GmbH & Co. Deutschland KG in Ludwigshafen.

strata™ X*

Polymersorbentien für die Festphasenextraktion



- Hohe Wiederfindung
- Saubere Extrakte
- Einfache Handhabung

- **Strata-X** Reversed Phase Sorbens für polare und unpolare Verbindungen
- **Strata-X-C** Mixed Mode Sorbens: **Starker Kationentauscher** + Reversed Phase für starke und schwache Basen
- **Strata-X-CW** Mixed Mode Sorbens: **Schwacher Kationentauscher** + Reversed Phase für starke Basen und quartäre Ammoniumverbindungen
- **Strata-X-AW** Mixed Mode Sorbens: **Schwacher Anionentauscher** + Reversed Phase für organische und starke Säuren + PFT

Für die PFT-Analyse halten wir ein **Angebotskit mit 1 Box Strata X-AW und einer Synergi® Fusion-RP zu einem Sonderpreis für Sie bereit - Nennen Sie uns einfach den Code PFT08**

Besuchen Sie auch www.strataSPE.com für die neuesten SPE Produktinformationen, Hilfen zur Methodenentwicklung und technische Tipps

phenomenex
...breaking with tradition™

Synergi ist ein eingetragenes Markenrecht von Phenomenex, Inc. Strata-X ist ein Markenrecht von Phenomenex, Inc. Strata-X ist patentiert von Phenomenex, Inc. ©2008 Phenomenex, Inc. Alle Rechte vorbehalten.