



QUALITY ASSURANCE ASPECTS OF IDENTIFICATION WITH CHROMATOGRAPHIC – MASS SPECTROMETRIC METHODS

Maciej J. BOGUSZ

Consulting Toxicologist, GTFCh, Sinsheim, Germany

Abstract

The factors affecting identification of compounds with chromatography – mass spectrometry were discussed from the quality assurance point of view. The criteria of identification of compounds, as formulated by several international or national organisations, were discussed. Various recommendations or guidelines defining minimal attributes necessary for identification have been published. These documents concern both chromatographic and mass spectrometric aspects of analysis. There is general agreement concerning the kind of parameters to be controlled, e.g. retention time, number of ions, or ion intensity ratios. However, the exact numerical criteria, formulated by different bodies or organisations, show distinct variations. The strictest requirements are set in those areas where the results of identification may lead to legal sanctions, such as in forensic toxicology, doping analysis, or food control. Requirements concerning quality assurance in the field of identification with GC-MS or LC-MS vary according to the particular discipline and final task of the analysis and are continuously changing in relation to actual knowledge.

Key words

Identification; Quality assurance; Mass spectrometry; GC-MS; LC-MS.

Received 3 December 2008; accepted 20 January 2009

1. Introduction

Identification of a particular compound is a key issue in analytical toxicology. It precedes other steps, such as quantification, and, above all, interpretation.

According to de Zeeuw and Franke [10], the process of identification starts with the comparison of an unknown substance with a database containing reference substances with exactly defined properties. The process of identification must continue, using several criteria, until only one substance remains on the list. These authors have formulated the following questions, relevant for chromatographic – mass spectrometric procedures:

- How can analytical properties be compared (e.g. how to compare mass spectra)?
- What should be considered an “adequate” match?

- Is there a difference between confirmation and identification?
- What are the requirements for suitable databases?
- What are the criteria for rejecting substances?
- What is the probability of correctness of identification?

De Zeeuw and Franke distinguished three types of identification: Structure elucidation through identification of a pure compound by powerful spectrometric methods, confirmation as a result of successful comparison of the properties of the expected substance with a reference substance, and recognition as a result of positive matching of the properties of the unknown substance with a reference database. In recommendations formulated by the Food and Drug Administration (FDA) [23], confirmation is similarly defined as “unambiguous identification of a compound’s presence by

comparison to a reference standard (mass spectrometric)". However, the term "confirmation" may be used in a different way. In forensic toxicology and doping control, the usual analytical strategy consists of two steps; screening procedure, usually performed with highly sensitive but less specific methods (mainly immunoassays, or tandem-MS using only one transition), and confirmation of the positive result of the screening procedure, which is done with methods of the highest possible specificity, such as full-scan GC-MS [46], or LC-MS-MS in MRM mode using three transitions or product spectra [26, 48]. A similar definition was given by the U.S. Department of Agriculture [58] for pesticide identification: "Confirmation: Verification of a previous analyte identification that is performed by another analytical system". De Zeeuw [9] warned against using confirmation procedures as the only proof of identification and postulated the use of various identification procedures, not only mass spectrometry. Nevertheless, procedures based on hyphenation of chromatographic separation with mass spectrometric detection are regarded as a sufficient tool for unequivocal identification, if particular requirements are met. These requirements, such as establishing the analytical threshold, appropriately high for the particular task, are formulated by responsible organisations or bodies on a national or international level.

2. Screening procedures applied to identification

Mass spectrometric screening procedures, often used as a first step of identification, may be divided into two main groups: general non-target screening, and target substance-oriented screening.

2.1. General screening

In the case of non-target screening, which is often referred to in clinical and forensic toxicology as "general unknown" analysis, a capillary GC coupled with electron impact ionisation mass spectrometer (GC-EI-MS) is a logical choice. Full-scan mass spectra, obtained with EI-MS, are not very dependent on the instrument and chromatographic conditions applied. Comprehensive libraries of reference EI mass spectra, comprising thousands of substances, are available nowadays [35, 36, 59]. This makes tentative identification possible through a library search – even without a reference compound. In cases where a reference compound for comparative analysis is not available, a decision concerning the spectrum identity should be

taken with utmost care, particularly in the case of some "exotic" compounds proposed by the instrument software as candidates for identification. However, in most identification procedures used in legally sensitive fields, such as doping analysis, forensic toxicology, or food quality monitoring, tentative identification through the GC-EI-MS library must be followed by a confirmation step, using a reference compound analysed in identical conditions to the studied specimen. In full-scan GC-MS-EI, at least four selective ions, including – if possible – the molecular ion, should be present in proper abundance ratios. If possible, mass spectra belonging to matrix compounds and affecting identification should be filtered out. This may greatly enhance the identification power of GC-MS screening [52].

However, it must be stressed that the decision concerning preliminary selection-identification based on statistical analysis of a mass spectrum match with reference library spectra should be always done by the expert toxicologist. It is s/he who decides, depending on the case, when the identification level has been achieved [9, 42, 43].

Liquid chromatography-mass spectrometry is potentially better suited to screening than GC-MS since it covers a much broader spectrum of compounds of different polarities. However, this technique has several important limitations, both on the chromatographic and mass spectrometric side. LC, despite its universality, is a far less selective separation technique than capillary GC. On the other hand, mass spectra of compounds obtained with various LC-MS instruments may vary greatly in regard to relative abundance of fragment ions, even if exactly identical nominal conditions are applied [3]. This makes direct use of mass spectral data acquired in another laboratory very difficult. For these reasons, LC-MS is an excellent technique for targeted screening or confirmation, but it is not easily applicable to a broad-spectrum search, e.g. "general unknown" analysis. Nevertheless, in recent years, several spectral libraries, comprising hundreds of compounds, have been developed using LC-MS [45, 65], LC-MS-MS [31, 64], and LC-MS-TOF [11, 21, 38]. Reviews of this topic have been carried out recently by Gergov [20] and by Marquet [30].

2.2. Targeted screening

Targeted screening and subsequent confirmation is employed if a particular compound or defined set of compounds is to be identified. This is the case in the search for scheduled, controlled substances, e.g. drugs of abuse [61], doping substances [19, 54], or food contaminants [60]. In this situation, very specific meth-

ods, such as GC-MS-MS and LC-MS-MS, both in MRM mode and also GC-TOF-MS or GC-MS-SIM, are applicable. Identification is achieved through comparison of the chromatographic mobility and the presence of particular fragment ions in intensities corresponding to preset values, observed in reference standards. Limited, task-oriented reference libraries have been built for particular groups of compounds. Comprehensive reference data libraries, e.g. for pesticides, based on LC-MS, may comprise several hundred substances.

The definition of positive identification or confirmation after LC-MS screening may vary. Some authors have mentioned high coincidence of at least two of three spectra generated at three fragmentation energies [28], others a match of at least 60% in a reverse-fit library search [62] or similarity of at least five of the most abundant ions [4].

For some halogen-containing compounds, such as chloramphenicol, alternative identification strategies have been used. Bogusz et al. [2] applied LC-MS-MS (negative ionisation ESI, MRM mode). Three transitions of deprotonated molecule (m/z 321) were monitored. The following criteria of positive identification of chloramphenicol were formulated: R_t of target within $\pm 1\%$ of internal standard (deuterated analogue of target), the presence of three product ions originating from the precursor, and intensity ratios of product ions in the range of $\pm 2SD$ of the mean control values, i.e. $\pm 25\%$. Mottier et al. [37] took advantage of the presence of two chlorine atoms in the chloramphenicol molecule and used two precursor ions: m/z 321 and m/z 323. The transitions of each isotopic form to product ions m/z 152 and 257 were monitored. The identification criteria were as follows: R_t of target within $\pm 1\%$ of internal standard (deuterated analogue of target), the variability of the intensity ratios of product ions in the range of 15–25% of the mean control values.

Since the intensity and sometimes pattern of fragmentation in LC-MS is related to the particular technique and conditions used, it has generally been postulated that the reference standard should be analysed in exactly the same conditions as the examined sample, ideally in the same analytical run.

Requirements concerning quality of mass spectrometric screening procedures have been reviewed and discussed by various authors, such as Drummer [15], Stimpfl et al. [50, 51], and Maurer [32] in relation to clinical and forensic toxicology, and by Thevis and Schänzer [54] in relation to doping analysis.

3. Methodical considerations relevant for identification

There are numerous possible factors which may affect identification by mass spectrometry, at various stages of the identification procedure; the influence of coextracted matrix compounds, incomplete chromatographic separation of compounds, general condition of instrument or detector saturation and peak distortion through excess of the substance. All these factors may change the abundances of ions in a particular mass spectrum and cause mismatching with consequent false-positive or false-negative identification [33, 34]. There are several approaches to optimising the identification process with mass spectrometry. These approaches may be divided into optimisation of sample pretreatment, optimisation of chromatographic separation, and optimisation of mass spectrometric detection itself.

3.1. Optimisation of sample pretreatment for mass spectrometric analysis

Optimal, matrix-oriented sample pretreatment is of critical importance in the GC-EI-MS identification procedure. It may involve cleavage of conjugates, derivatisation, or several clean-up steps. Among isolation procedures used in GC-MS screening and identification, liquid-liquid extraction [35] and solid-phase extraction (SPE) [16], have mainly been used. In recent years, solid-phase microextraction (SPME) has been increasingly frequently applied; it is a solvent-free method and is particularly useful for screening of volatile compounds of natural or synthetic origin [e.g. 5, 6, 24, 41].

For some compounds, particularly large molecules with haptogenic properties, immunoaffinity extraction procedures have been developed. Ho et al. [26] isolated insulins originating from various sources (human, bovine, and porcine) from horse plasma by immunoaffinity precipitation with antibody-coated magnetic beads followed by molecular weight centrifugal extraction. The obtained extracts were analysed by LC-MS-MS, using a QTrap mass spectrometer. For screening purposes, single transition to one common tyrosine immonium ion was monitored. Confirmation was performed with at least three transitions characteristic for the particular insulin, also taking retention time into account. This method was applied in doping control analysis, as a tool of differentiation of equine insulin from exogenous insulin.

3.2. Optimisation of chromatographic separation

Capillary GC is a mature technique in relation to the efficiency of chromatographic separation. Nevertheless, there are recent examples showing that this field of chromatography may still be refined, in order to facilitate identification in complex mixtures or matrices. Van der Lee et al. [60] presented targeted screening for 106 scheduled pesticides and contaminants in animal feed matrix. The procedure was based on solvent extraction, gel permeation chromatography clean-up, and two-dimensional GC with full-scan TOF-MS. All compounds were automatically detected at a level exceeding 50 ng/ml. Two-dimensional GC followed by TOF-MS was also applied by Banerjee et al. [1] for multiresidue analysis of pesticides in grapes. A combination of a non-polar and a polar capillary column connected in series was used. The method resolved co-elution problems as observed in full scan one-dimensional GC-MS analysis and allowed chromatographic separation of 51 pesticides within 24 min run time with library-searchable mass spectrometric confirmation. An automated direct sample introduction technique coupled to comprehensive two-dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry was applied to the development of a screening method for polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in fish oil [27]. Kolbrich et al. [29] applied two-dimensional GC-EI-MS (SIM) with cryofocusing for determination of methylenedioxyethylamphetamine (MDEA), MDMA, and its metabolites, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine (HMMA), and 4-hydroxy-3-methoxyamphetamine (HMA) in human plasma. This assay provided low limits of quantification and the chromatographic system should be suitable for application to other analytes and to other complex matrices.

In the case of HPLC, recent years have brought distinct progress through introduction of fine-particle columns (particle size below 2 μ m). This technique, known as ultra-performance liquid chromatography (UPLC), enables much better separation in a shorter time and was immediately introduced in combination with mass spectrometry for identification purposes. In the field of doping analysis, UPLC has enabled high-throughput analysis, particularly of diuretic compounds. Ventura et al. [63] detected 34 scheduled diuretics and other doping agents in urine extracts, using UPLC-MS-MS in negative and positive ionisation mode. Total analysis time was 5 min, and the method fulfilled the requirements established by the World Anti-Doping Agency. Thörngren et al. [56] developed

a UPLC-MS-MS-based screening method of 130 substances (diuretics, central nervous system stimulants and opiates) for direct injections of urine samples. Samples were injected on a reversed phase column connected to a fast polarity switching and rapid scanning tandem mass spectrometer with an electrospray interface. The software used to evaluate the results produced reports, showing adverse analytical findings in the sample. One 96-well plate could be analysed within 16 h.

Several applications of UPLC-MS concerned pesticide residue analysis. UPLC-TOF-MS was applied to the rapid qualitative and quantitative analysis of 100 pesticides targeted in strawberries [53]. Accurate mass measurement of positive and negative ions allowed their extraction following "full mass range data acquisition" with negligible interference from background or co-eluting species observed during UPLC gradient separation (in a cycle time of 6.5 min per run). In another study [44], 90 pesticides were screened in fruit juices by UPLC-MS-MS (MRM) after simple acetonitrile extraction. The separation was achieved in an 11 min run.

3.3. Optimisation of mass spectrometric detection

Accurate mass determination emerged as one of the most promising identification tools in contemporary mass spectrometry. The measured elemental mass allows calculation of the elemental formula of the ion, and therefore confirmation of its identity in the case of a match with a known compound in a library search [21] or identification of an unknown ion. The mass accuracy may be expressed in absolute values, usually in millidaltons (mDa), or in relative values, e.g. in parts per million (ppm). These values are calculated as follows:

$$\text{mDa: } [(m/z)_{\text{measured}} - (m/z)_{\text{calculated}}] \cdot 1000, \quad \{1\}$$

$$\text{ppm: } 10^6 \cdot [(m/z)_{\text{measured}} - (m/z)_{\text{calculated}}] / (m/z). \quad \{2\}$$

Mass accuracy depends on the instrument used; for a standard quadrupole or ion-trap instrument, a mass accuracy of 50–100 mDa is possible, for TOF or QTOF below 10 mDa, for FTICR-MS and orbitrap – 1 mDa or less. Some new triple-quadrupole instruments show accurate mass capabilities below 1 mDa [40].

Besides forensic toxicological screening [20, 22] high-resolution mass spectrometry has been applied in other screening and identification procedures. Hernandez et al. [24] developed a procedure based on gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF-MS) for identifi-

cation of 60 organic pollutants in water after solid-phase microextraction. The identification was based on evaluating the presence of up to five representative m/z ions per analyte, measured at high mass accuracy, and determination of their Q/q (Q , quantitative ion; q , confirmative ion) intensity ratio. This strategy led to the detection of target compounds in several water samples at low ppb levels.

Several hundred crop protection products were recently banned from use by European and US environmental agencies and this became an issue for environment monitoring laboratories. Since it was difficult to monitor all these compounds with GC-MS, LC-MS, or LC-MS-MS, Thurman and Ferrer [57] developed a non-targeted screening procedure based on a combination of LC-TOF-MS, LC-IT-MS, and LC-QTOF-MS. The Merck Index and ChemIndex, both commercially available, were applied as reference databases. The identification strategy consisted of four steps: full-scan LC-TOF-MS analysis; library search for empirical formulas and any $A+2$ isotopes (for halogens or S); LC-IT-MS or LC-Q-TOF-MS-MS for structure elucidation; and final comparative standard analysis. Accurate mass determination may be very useful in the analysis of such compounds, which cannot yield characteristic fragment ions in tandem mass spectrometric analysis, particularly in MRM mode. Nielen et al. [39] compared the performance of various high resolution LC-MS techniques for hormone residue analysis in food samples. The authors used three types of instruments: LC-QTOF-MS, LC-FTIR-MS, and LC-FT-Orbitrap-MSⁿ. The authors stressed the need for optimal sample pretreatment and cleanup when using instruments with lower accuracy (around 20 ppm) since the LC resolution and MS resolution are strongly interrelated and have a major impact on mass accuracy. Instruments with higher mass resolution may accommodate a less completely resolved chromatographic separation. This may be illustrated by the analysis of stanozolol; an inexplicable fragment observed in QTOF-MS (m/z 161.1223 at mass resolution 5000 FWHM) analysis appeared in LC-FTIR-MS as a doublet of ions having minor mass differences (m/z 161.1073 and m/z 161.1324, mass resolution 250,000).

Besides high-resolution accurate mass MS, other instrumental solutions have recently been applied for identification purposes. The most promising was the application of information dependent acquisition (IDA) in combination with an enhanced product ion (EPI) spectrum. This technique was used by Stanley et al. [48] for screening of 32 acidic drugs in equine plasma and 11 neutral drugs in equine urine. For plasma, acetonitrile/internal standard precipitation fol-

lowed by centrifugation was used; urine specimens were only spiked with internal standard and centrifuged. The chromatographic method consisted of on-line extraction with an Oasis HLB column and isocratic separation on a Chromolith RP-18e column. The drugs were detected with QTRAP hybrid tandem MS in positive and negative ionisation. One transition was monitored for each drug. IDA was applied; if the signal was greater than the preselected value, the EPI spectrum was recorded. Unequivocal identification was achieved for most of the drugs. In the case of anabolic steroids, highly similar EPI spectra were observed, and the authors found the method unsuitable for this group of compounds. Drees et al. [14] compared the identification ability of MRM ratios and MRM-IDA, using QTrap hybrid triple quadrupole/linear ion trap MS. 14 selected drugs of abuse were examined at various concentrations. Both methods performed well at low concentrations; at very high concentrations, the MRM-IDA method gave a better chance of confirmation.

A combination of LC-MS-MS and/or GC-MS-NPD was used by Thevis et al. [55] to identify compounds present in confiscated black market drug preparations, containing mainly anabolic steroids or sexual stimulants. The drugs were dissolved in methanol, and subjected to LC-ESI-MS-MS examination on a QTrap instrument. For each drug, three transitions were monitored. For the GC-MS-NPD examination, an inlet splitter was applied, and the injected sample was separated on two identical columns; one was connected with an EI-MS detector, the other with a nitrogen-phosphorous detector (NPD).

Relative ion intensities (ion ratios) are usually applied as one of the identification features [2, 37]. Feng et al. [18] developed an LC-MS-MS procedure for simultaneous determination of 30 different drugs of abuse in urine. Three transitions were monitored for each drug. The intensity ratios of the two fragment ions to most abundant fragment ion were calculated and used to confirm the identity. These ratios should be in the range of $\pm 3SD$ as determined in the validation procedure. Concheiro et al. [8] published an LC-MS-MS study on the simultaneous determination of various drugs of abuse in urine. Two transitions were monitored for each drug. Relative ion intensities were tested, in within-day and between-day mode at two concentration levels. The variability of results was much higher in between-day experiments than in within-day experiments. The authors concluded that relative ion intensity should be treated with caution as an identification criterion, and strongly recommended analysis of standard samples on the same day as real samples in order to fulfil the established criteria.

Stein and Heller [49] published a very important study on the factors responsible for false positive identification with mass spectrometry. The following experiments were done: From the reduced NIST/EPA/NIH mass spectral library [59], comprising 96,464 entries, every tenth spectrum (roughly 9600 spectra) was chosen as a search spectrum. These search spectra were eliminated from the library before performing the search, so all library spectra that matched the search spectrum for a given set of constraints were false positives. Search experiments were performed using different a number of peaks for matching, the number ranging from 1 to 8 peaks. The abundance window was set at 0.25, i.e. the search and library spectrum at given m/z was considered a match if the difference in abundance was less than 25%. It was shown that the number of peaks as well as peak abundance clearly reduced the false positive probability. The authors concluded that more than three fragment ions (in full scan or SIM mode) should be used for identification and their m/z values should be carefully selected. Highly probable peak correlations such as 14 amu difference (methyl group loss) or 18 amu (water loss) should be avoided.

4. Legal and regulatory aspects of identification

Several professional organisations as well as national and international agencies have formulated recommendations and guidelines concerning criteria for identification with mass spectrometric methods. These documents may be divided into two main groups. The first group constitutes legal regulations at a national and international level, such as those issued by US Human Health Services for clinical laboratories [12] and for workplace drug testing [13] and by the European Union [17]. The second group comprises recommendations and guidelines of professional organisations at a national and international level, such as the World Anti-Doping Agency – WADA, College of American Pathologists – CAP, Food and Drug Administration – FDA, US Department of Agriculture, Society of Forensic Toxicologists – SOFT [47], German Society of Toxicological and Forensic Chemistry – GTFCh [22].

The FDA has published final guidance for the development, evaluation, and application of mass spectrometric methods for confirming the identity of animal drug residues [23]. According to the guidance, the confirmatory mass spectrometric procedures should address each of the following points:

- a validation package from the originating laboratory containing replicate samples, original and spi-

- method description, also containing structure and full spectrum of target compound, spectral data on at least three structurally-specific ions that completely define the parent molecule or more if non-specific ions are included, proposed fragment ions structures, consistent with fragmentation patterns, justification for specificity of selected ions or scan range, confirmation and operational criteria, as well as quality control section;
- confirmation criteria. In the confirmation procedure, the comparison standard(s) should be analysed contemporaneously, in the presence of extracted matrix if appropriate. Any of the following MS chromatograms may be used: TIC, RIC, SIM, or SRM. Flow injection analysis is discouraged. The chromatographic peak should exceed a signal-to-noise threshold of 3:1, and the retention time should not differ from the retention time of the standard by more than 2% for GC-MS or 5% for LC-MS. Mass spectral matching criteria vary depending on the MS acquisition mode: in the full-scan and partial-scan MS^1 , the spectrum should contain at least three structurally-specific ions, and the spectrum should visually match the spectrum of the standard. An acceptability range of $\pm 20\%$ for relative abundance of major ions is recommended. Library search algorithms should not be used to confirm identity. All structurally-specific ions mentioned in the method description should be present and their relative abundances should correspond to those of the standard. The presence of other unrelated prominent ions should be explained (e.g. from matrix compounds). If background subtraction has been used, it should be specified and indicated. In the MS^1 SIM, relative abundances of three structurally-specific ions should match the standard within $\pm 10\%$ (absolute). In the case of four or more structurally-specific ions, the match level is $\pm 15\%$ (absolute). Relative abundances for more than three ions, which include less specific ions such as isotopes or due to loss of water, should match the comparison standard within $\pm 10\%$. In the full-scan and partial-scan MS^n , the spectrum should visually match the spectrum of the standard, and there should be general correspondence between relative abundances obtained in sample and standard. All structurally-specific ions mentioned in the method description should be present. If a structurally-specific precursor ion completely dis-

sociates to product ions, the appearance of at least two structurally-specific product ions should be sufficient in MS^{n+1} . The presence of other unrelated prominent ions should be explained (e.g. from matrix compounds). If background subtraction has been used, it should be specified and indicated. In MS^n SRM, if a precursor ion is completely dissociated, the relative abundance of structurally-specific product ions should match the comparison standard within $\pm 10\%$ in cases where two ions have been monitored, and within $\pm 20\%$ in cases where three or more ions have been monitored;

- quality control should include the following points: establishing of system suitability, running of at least one control and one fortified control sample, control of possible carryover.

The European Commission [17] has published requirements concerning performance of analytical methods and interpretation of results. In this document, performance criteria for mass spectrometric detection were formulated. It was stated that on-line or off-line chromatographic separation is a prerequisite for mass spectrometric confirmation.

For both GC-MS and LC-MS, the minimum acceptable retention time for the target compound should be at least twice the retention time corresponding to the void volume of the column (i.e., the dead time, or Rt_0). The relative retention time of the analyte (ratio target : internal standard) should not differ from that of the reference standard more than $\pm 0.5\%$ for GC and $\pm 2.5\%$ for LC.

Mass spectrometric detection should be carried out in full-scan mode, SIM, as well as $MS-MS^n$ techniques such as SRM or other techniques in combination with appropriate ionisation modes.

For full scan MS, the presence of a minimum of four diagnostic ions with relative intensity of more than 10% in the reference spectrum is obligatory. The molecular ion should be included if its intensity is above 10%.

For SIM, the molecular ion should preferably be included. The signal-to-noise ratio for each diagnostic ion should be $\geq 3:1$.

Maximum permitted tolerances for relative ion intensities are presented in Table I. For identification, the EC has defined an identification points system. In this system, at least four points are required for confirmation of identity. The number of points earned by particular techniques are shown in Table II. According to these criteria, e.g. four characteristic ions are needed if GC-MS or LC-MS is applied, or one precursor and two products for GC-MS-MS or LC-MS-MS. Nielen et al. [39] proposed additional identification criteria to the four-point classification, based on high-resolution mass spectrometry (Table III).

The College of American Pathologists (CAP) in their "Chemistry and Toxicology Checklist" of the Laboratory Accreditation Program formulated requirements, relevant for identification with chromatographic-mass spectrometric methods [7].

In the case of single-stage GC-MS or LC-MS, the identification should be done on the basis of ion ratios, using at least two ion ratios whenever possible. The suggested tolerance limit for GC-MS is $\pm 20\%$ of those of calibrators, for LC-MS the limit is $\pm 30\%$. If only one ratio of two characteristic ions is available, it may be acceptable if there are other identifying characteristics, e.g. retention time. The internal standard should be identified with at least one ion ratio. If full scan MS is used, the laboratory should set and validate its own

TABLE I. MAXIMAL PERMITTED TOLERANCES IN ABUNDANCE RATIOS IN COMPARISON WITH THE STANDARD

Relative intensity (% of base peak)	EC [17]	EC [17]	CAP [7]	WADA [66]	WADA [66]
	GC-EI-MS	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ , LC-MS, LC-MS ⁿ	LC-MS ⁿ	GC-EI-MS	GC-CI-MS, GC-MS ⁿ , LC-MS, LC-MS ⁿ
> 50%	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$	$\pm 20\%$	$\pm 10\%$ absolute	$\pm 10\%$ absolute
> 20–50%	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$	$\pm 25\%$	$\pm 20\%$ relative	$\pm 25\%$ relative
> 10–20%	$\pm 10\%$	$\pm 30\%$	$\pm 30\%$	$\pm 5\%$ absolute	$\pm 10\%$ absolute
10%	$\pm 50\%$	$\pm 50\%$	$\pm 50\%$		

FDA [23] used flat rate of permitted tolerances: within $\pm 20\%$ of relative abundance for MS scan and MS^n SRM (three transitions, and $\pm 10\%$ for MS-SIM and MS^n SRM (three transitions). PDP [58] used flat rate of $\pm 20\%$ of relative abundance (absolute difference) for all MS techniques.

threshold of “spectral match” or fit for identification purposes.

TABLE II. IDENTIFICATION POINTS EARNED BY VARIOUS MS TECHNIQUES ACCORDING TO EC [17]

MS technique	Identification points earned per ion
LR-MS	1.0
LR-MS ⁿ precursor ion	1.0
LR-MS ⁿ product ion	1.5
HR-MS	2.0
HR-MS ⁿ precursor ion	2.0
LR-MS ⁿ product ion	2.5

LR-MS – low resolution mass spectrometry; HR-MS – high resolution mass spectrometry.

For tandem MS (GC-MS-MS or LC-MS-MS) in SRM mode, at least one transition and one ion ratio should be monitored, together with retention time. However, if enough ions of sufficient abundance exist, two or more ion ratios should be monitored. Ion ratios determined from full scan analysis are an acceptable identification method and should fulfil the same criteria as for SRM mode. Tolerance limits should be adequate to the method employed and should be supported by references or own data. In another approach, two-fold acceptance criteria of data are applied for at least three ion ratios and a scoring system according to EC requirements [17]. The tolerances of ion ratios differ according to the abundance of ions (see Table I).

The US Pesticide Agency has published a standard operating procedure (SOP) for identification, confir-

mation, and quantitation of pesticide residues using GC and LC with mass spectrometric detection [58]. This SOP was written in order to combine the requirements of all MS and MS-MS procedures used in pesticide residue analysis into a single document.

In the case of full-scan GC-MS, the spectra should be recorded in the range of 20 to 500 amu. A minimum of three structurally-specific ions, preferably including molecular ion, meeting the signal-to-noise 3:1 ratio are required. Isotopic cluster ions may be used as one of three significant ions. The relative intensity ratios of each ion should be within $\pm 20\%$ of the ratios observed in the reference standard. The use of library search software for EI analysis is mandatory. The use of library searches in “soft” ionisation techniques, such as GC-CI-MS is discouraged. Chromatographic criteria (retention time accuracy) for GC-MS were not formulated in this document.

In GC-MS-MS analysis, the retention time of the target compound should not differ more than ± 0.05 min from the reference standard or ± 0.01 *Rrt*. Two transitions from one precursor ion or from two precursors should be monitored. The relative intensity ratios of each ion should be within $\pm 20\%$ of the ratios observed in the reference standard, and the abundance of each ion should exceed signal-to noise 3:1.

For LC-MS analysis, the apparatus should be capable of scanning 50 to 1200 amu in full scan mode. The retention time of the target compound should not differ more than ± 0.5 min from the reference standard or ± 0.01 *Rrt*. A minimum of three structurally-specific ions, preferably including a protonated or deprotonated molecule, meeting the signal-to-noise 3:1 ratio are required. Isotopic cluster ions may be used as one of three significant ions. The relative intensity ratios of each ion should be within $\pm 20\%$ of the ratios observed in the reference standard. In LC-MS-MS analysis, chro-

TABLE III. PROPOSAL FOR ADDITIONAL LC-MS CRITERIA TO BE IMPLEMENTED IN EC RECOMMENDATIONS [17] MADE BY NIELEN ET AL. [39]

Goal	Mass resolution (FWHM)	Mass accuracy (mDa)	Remarks
Screening	10,000	± 50 (window)	Relative retention time 2.5%
Confirmation	10,000	5	1.5 identification points/ion or product ion; at least one ion ratio; relative retention time 2.5% N.B. – LC/biogram: 1 additional identification point
HR confirmation	20,000	5	2 identification points/ion or product ion; at least one ion ratio; relative retention time 2.5%
MS-MS identification of unknowns	10,000	5	Confirm postulated structure by NMR and/or confirm accurate masses at mass resolution 70,000 (FWHM)

matographic requirements (Rt or RRt) are the same as for LC-MS, whereas mass spectrometric requirements are identical to GC-MS-MS.

The World Anti-Doping Agency (WADA) [66] has formulated criteria which must be fulfilled in order to identify a prohibited, scheduled substance in the urine or blood of an examined athlete using chromatographic-mass spectrometric procedures. These criteria are divided into separation and detection requirements and are as follows:

Chromatographic separation requirements. For capillary GC, the retention time (Rt) of the analyte shall not differ by more than 1% or ± 0.2 min (whichever is smaller) from that of the same substance in a spiked urine sample. For HPLC, the Rt of the analyte shall not differ by more than 2% or ± 0.4 min (whichever is smaller) from that of the same substance in a spiked urine sample. These criteria may be relaxed, if the shift in Rt may be explained (e.g. by sample overload).

Mass spectrometric requirements. Full scan mode: full scan or partial scan mode is the preferred approach to identification. A partial scan may begin at an m/z value greater than any abundant ion due to the derivatising agent or chemical ionisation reagent. All diagnostic ions with a relative abundance greater than 10% in the reference spectrum obtained from a reference material must be present in the spectrum of the unknown peak. The relative abundance of three diagnostic ions shall not differ by more than the defined amount (see Table I) from the relative intensities of the same ions observed in the reference spectrum (obtained from spiked urine, reference collection sample, or reference material). It is not permissible to collect additional ions and select those ratios that are within defined tolerance.

If computer-based mass spectral library searching or matching is used, the results should be reviewed by a qualified scientist.

If three diagnostic ions with a relative abundance greater than 5% are not available, a second derivative, yielding different diagnostic ions shall be prepared, or a second ionisation or fragmentation technique, based on a different physical principle shall be used. In any case, a minimum of two diagnostic ions is mandatory for each mass spectrum.

In SIM mode, at least three diagnostic ions must be acquired, with a signal-to-noise ratio > 3 for the least intense ion. The relative intensities of ions shall not differ by more than the defined amount (see Table I) from the relative intensities of the same ions observed in the reference spectrum (obtained from spiked urine, reference collection sample, or reference material). For diagnostic ions with a relative abundance of less

than 5% in the reference spectrum, the ion must be present in the unknown. The concentrations of detected compounds should be comparable with those in the reference sample.

If three diagnostic ions are not available, a second derivative shall be prepared, or a second ionisation or fragmentation technique, based on different physical principles shall be used. In any case a minimum of two diagnostic ions is mandatory for each mass spectrum.

In MS-MS, the data can be acquired either in full scan or selected reaction monitoring (SRM) mode. The precursor ion should be present in both modes. When monitoring more than one product ion, the relative intensities of any of the ions shall not differ by more than the amount given in the table from the relative intensities acquired from a spiked reference sample. The signal-to-noise for the least intense ion should be greater than 3. For a diagnostic ion with a relative abundance of less than 5% observed in the reference spectrum, the ion must be present in the studied sample. Table IV shows a summary of requirements as formulated by various organisations.

5. Conclusions

The criteria of identification of compounds with chromatography-mass spectrometry are certainly not carved in stone, like the Ten Commandments. They are rather a moving target, changing their position in relation to actual knowledge, with new requirements continuously being set, which vary according to the particular discipline and final task of analysis. It is understandable that the strictest requirements are set in those areas, where the results of identification may carry with them legal sanctions. For these reasons, several organisations have issued more or less detailed conditions, recommendations, or guidelines, defining minimal attributes necessary for identification. These documents concern both chromatographic and mass spectrometric aspects of analysis.

There is general agreement concerning the kind of parameters to be controlled, such as retention time, number of ions, or ion intensity ratios. However, the exact numerical criteria, formulated by different bodies or organisations, show distinct variations.

These recommendations, which are products of common knowledge in a given discipline, should be treated as a momentary, frozen picture of the present situation in the field of analytical identification. As Hill wrote: "regulatory guidances are not a substitute for good science, they do however provide a framework that should initiate the questions why and

TABLE IV. SUMMARY OF IDENTIFICATION REQUIREMENTS AS FORMULATED BY VARIOUS ORGANISATIONS

Method/parameter	FDA [23]	EC [17]	WADA [66]	PDP [58]	CAP [7]
GC-MS/ <i>Rt</i> tolerance	2%		1% or 0.2	0.05	
GC-MS/ <i>RRt</i> tolerance		0.5%		0.01	
LC-MS/ <i>Rt</i> tolerance	5%		2% or 0.4	0.5	
LC-MS/ <i>RRt</i> tolerance		2.5%		0.1	
MS scan minimal number of ions	3	4	3	3	3
MS SIM/minimal number of ions	3	4	3	3	3
MS ⁿ scan minimal number of ions	3	4	3	3	
MS ⁿ SRM number of transitions	2	2	2	2	2
HRMS minimal number of ions		2			
Signal-to-noise threshold	3	3	3	3	3

how” [25]. It will be always be incumbent upon the expert involved in identification to answer the question: “Did I identify this compound according to the best available knowledge?” in addition to the question: “Did I fulfil all formal conditions, necessary for identification?” At this point, professional ethics meets professional competence.

References

- Banerjee K., Patil S. H., Dasgupta S. [et al.], Optimization of separation and detection conditions for the multiresidue analysis of pesticides in grapes by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 2008, 1190, 350–357.
- Bogusz M. J., Hassan H., Al-Enazi E. [et al.], Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography-electrospray negative ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 2004, 807, 343–356.
- Bogusz M. J., Maier R. D., Kruger K. D. [et al.], Poor reproducibility of in-source collisional atmospheric pressure ionization mass spectra of toxicologically relevant drugs, *Journal of Chromatography A* 1999, 844, 409–418.
- Bristow A. W., Nichols W. F., Webb K. S. [et al.], Evaluation of protocols for reproducible electrospray in-source collisionally induced dissociation on various liquid chromatography/mass spectrometry instruments and the development of spectral libraries, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002, 16, 2374–2386.
- Brown S. D., Rhodes D. J., Pritchard B. J., A validated SPME-GC-MS method for simultaneous quantification of club drugs in human urine, *Forensic Science International* 2007, 171, 142–150.
- Buszewski B., Ulanowska A., Ligor T. [et al.], Identification of volatile organic compounds secreted from cancer tissues and bacterial cultures, *Journal of Chromatography B* 2008, 868, 88–94.
- College of American Pathologists, Commission on Laboratory Accreditation, Laboratory Accreditation Program, *Chemistry and Toxicology Checklist* 2006, 57–59.
- Concheiro M., De Castro A., Quintela O. [et al.], Determination of illicit drugs and their metabolites in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry including relative ion intensity criterion, *Journal of Analytical Toxicology* 2007, 31, 573–580.
- De Zeeuw R. A., Substance identification: The weak link in analytical toxicology, *Journal of Chromatography B* 2004, 811, 3–12.
- De Zeeuw R. A., Franke J. P., General unknown analysis [in:] *Forensic Science*, Bogusz M. J. [ed.], Handbook of analytical separations, vol. 2, Elsevier Science, Amsterdam 2000.
- Decaestecker T. N., Vande Castele S. R., Wallemaecq P. E. [et al.], Information-dependent acquisition-mediated LC-MS/MS screening procedure with semi-quantitative potential, *Analytical Chemistry* 2004, 76, 6365–6373.
- Department of Health and Human Services, Health Care Financing Administration, Public Health Service, Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988; Final rule, Federal Register 1992, 57, 967–1087 [http://www.cms.hhs.gov/CLIA].
- Department of Health and Human Services, Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Mandatory guidelines and proposed revisions to mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs, Federal Register 2004, 71, 19644–19732 [http://workplace.samsha.gov].
- Drees J. C., Sasaki T. A., Stone J. A. [et al.], The advantages and limitations of MRM vs. full scan MS/MS for

- drug confirmation using LC/MS/MS, Poster K35 on the 55th Conference of American Society of Mass Spectrometry, Indianapolis 2007.
15. Drummer O. H., Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 188, 1495–1503.
 16. Drummer O. H., Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis, *Journal of Chromatography B* 1999, 733, 27–45.
 17. EU Commission, Commission decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities* 2002, L 221, 8–34.
 18. Feng J., Wang L., Dai I. [et al.], Simultaneous determination of multiple drugs of abuse and relevant metabolites in urine by LC-MS-MS, *Journal of Analytical Toxicology* 2007, 31, 359–368.
 19. Georgakopoulos C. G., Vonaparti A., Stamou M. [et al.], Preventive doping control analysis: liquid and gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for detection of designer steroids, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007, 21, 2439–2446.
 20. Gergov M. Forensic screening with liquid chromatography-mass spectrometry [in:] *Forensic science. Handbook on analytical separations*, vol. 6, Bogusz M. J. [ed.], Elsevier Science, Amsterdam, Boston 2008.
 21. Gergov M., Boucher G. B., Ojanpera I. [et al.], Toxicological screening of urine for drugs by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with automated library search based on elemental formulas, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001, 15, 521–526.
 22. German Society of Toxicological and Forensic Chemistry, Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, *Toxichem + Krimtech* 1998, 65, 18–24, [http://www.gtfch.org/tk/tk67_1/akqual.pdf GTFCh].
 23. Guidance for industry, Mass spectrometry for confirmation of the identity of animal drug residue, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, May 1, 2003.
 24. Hernandez F., Portolés T., Pitarch E. [et al.], Target and nontarget screening of organic micropollutants in water by solid-phase microextraction combined with gas chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 2007, 79, 9494–9504.
 25. Hill H. M., Chromatography in a regulated environment, [in:] *Bioanalytical separations. Handbook of analytical separations*, vol. 4, Wilson I. D. [ed.], Elsevier Science, Amsterdam 2003.
 26. Ho E. N. M., Wan T. S. M., Wong A. S. Y. [et al.], Doping control analysis of insulin and its analogues in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 2008, 1201, 183–190.
 27. Hoh E., Lehotay S. J., Mastovska K. [et al.], Evaluation of automated direct sample introduction with comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the screening analysis of dioxins in fish oil, *Journal of Chromatography A* 2008, 1201, 69–77.
 28. Hough J. M., Haney C. A., Voyksner R. D., Evaluation of electrospray transport CID for the generation of searchable libraries, *Analytical Chemistry* 2000, 72, 2265–2270.
 29. Kolbrich E. A., Lowe R. H., Huestis M. A., Two-dimensional gas chromatography/electron-impact mass spectrometry with cryofocusing for simultaneous quantification of MDMA, MDA, HMMA, HMA, and MDEA in human plasma, *Clinical Chemistry* 2008, 54, 379–387.
 30. Marquet P., Identification and confirmation criteria for LC-MS, [in:] *Applications of LC-MS in toxicology*, Poletti A. [ed.], Pharmaceutical Press, London 2006.
 31. Marquet P., Saint-Marcoux F., Gamble T. N. [et al.], Comparison of a preliminary procedure for the general unknown screening of drugs and toxic compounds using a quadrupole-linear ion-trap mass spectrometer with a liquid chromatography-mass spectrometry reference technique, *Journal of Chromatography B* 2003, 789, 9–18.
 32. Maurer H. H., Hyphenated mass spectrometric techniques – indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control, *Journal of Mass Spectrometry* 2006, 41, 1399–1413.
 33. Maurer H. H., Forensic screening with GC-MS, [in:] *Forensic science. Handbook on analytical separations*, vol. 6, Bogusz M. J. [ed.], Elsevier, Amsterdam, Boston 2008.
 34. Maurer H. H., Peters F. T., Analyte identification using library searching in GC-MS and LC-MS, [in:] *The encyclopedia of mass spectrometry*, vol. 8, Niessen W. M. A. [ed.], Elsevier, Amsterdam, Oxford 2006.
 35. Maurer H. H., Pflieger K., Weber A., Mass spectral library of drugs, poisons, pesticides, pollutants, and their metabolites, Wiley-VCH, Weinheim 2007.
 36. McLafferty F. W., Registry of mass spectral data, Wiley, New York 2001.
 37. Mottier P., Parisod V., Gremaud E. [et al.], Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 2003, 994, 75–84.
 38. Nielen M. W., Bovee T. F., van Engelen M. C. [et al.], Urine testing for designer steroids by liquid chromatography with androgen bioassay detection and electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry identification, *Analytical Chemistry* 2006, 7, 424–431.
 39. Nielen M. W. F., van Engelen M. C., Zuiderent R. [et al.], Screening and confirmation criteria for hormone residue analysis using liquid chromatography accurate mass time-of-flight, Fourier transform ion cyclotron resonance and orbitrap mass spectrometry techniques, *Analytica Chimica Acta* 2007, 586, 122–129.
 40. Niessen W. M. A., High-resolution mass spectrometry and accurate mass determination, [in:] *The encyclopedia*

- of mass spectrometry, vol. 8, Niessen W. M. A. [ed.], Elsevier, Amsterdam, Oxford 2006.
41. Pontes M., Marques J. C., Câmara J. S., Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry, *Talanta* 2007, 74, 91–103.
 42. Rivier L., Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple mass spectrometry in forensic and doping analysis, *Analytica Chimica Acta* 2003, 492, 69–82.
 43. Rivier L., Identification and confirmation criteria for LC-MS, [in:] Applications of LC-MS in Toxicology, Poletti A. [ed.], Pharmaceutical Press, London 2006.
 44. Romero-González R., Garrido Frenich A., Martínez Vidal J. L., Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Talanta* 2008, 76, 211–225.
 45. Saint-Marcoux F., Lachatre G., Marquet P., Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and high performance liquid chromatography-diode array detection, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2003, 14, 14–22.
 46. Segura J., Ventura R., Marcos J. [et al.], Doping substances in human and animal sport, [in:] Forensic science. Handbook of analytical separations, vol. 6, Bogusz M. J., [ed.], Elsevier Science, Amsterdam 2008.
 47. Society of Forensic Toxicologists, SOFT/AAFS forensic toxicology laboratory guidelines 2006, 1–24, [http://www.soft-tox.org/].
 48. Stanley S. M. R., Wee W. K., Lim B. H. [et al.], Direct-injection screening for acidic drugs in plasma and neutral drugs in equine urine by differential-gradient LC-LC coupled MS/MS, *Journal of Chromatography B* 2007, 848, 292–302.
 49. Stein S. E., Heller D. N., On the risk of false positive identification using multiple ion monitoring in qualitative mass spectrometry: Large-scale intercomparisons with a comprehensive mass spectral library, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2006, 17, 823–835.
 50. Stimpfl T., General unknown screening using GC-MS, [in:] The encyclopedia of mass spectrometry, Hyphenated methods, vol. 8, Niessen W. M. A. [ed.], Elsevier, Amsterdam, Oxford 2006.
 51. Stimpfl T., Vycudilik W., Automatic screening in post-mortem toxicology, *Forensic Science International* 2004, 142, 115–127.
 52. Stimpfl T., Demuth W., Varmuza K. [et al.], Systematic toxicological analysis: Computer-assisted identification of poisons in biological materials, *Journal of Chromatography B* 2003, 789, 3–7.
 53. Taylor M. J., Keenan G. A., Reid K. B. [et al.], The utility of ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for multi-residue determination of pesticides in strawberry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2008, 22, 2731–2746.
 54. Thevis M., Schänzer W., Examples of doping control analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: ephedrine, beta-receptor blocking agents, diuretics, sympathomimetics, and cross-linked hemoglobins, *Journal of Chromatographic Science* 2005, 43, 22–31.
 55. Thevis M., Schrader Y., Thomas A. [et al.], Analysis of confiscated black market drugs using chromatographic and mass spectrometric approaches, *Journal of Analytical Toxicology* 2008, 32, 232–240.
 56. Thörngren J. O., Ostervall F., Garle M., A high-throughput multicomponent screening method for diuretics, masking agents, central nervous system (CNS) stimulants and opiates in human urine by UPLC-MS/MS, *Journal of Mass Spectrometry* 2008, 43, 980–992.
 57. Thurman E. M., Ferrer I., Identification of Unknown Environmental Contaminants Using Multidimensional LC-MS Strategies Involving TOF-MS, Ion-Trap MSn, and Q-TOF-MS-MS, [in:] The encyclopedia of mass spectrometry, Hyphenated methods, vol. 8, Niessen W. M. A. [ed.], Elsevier, Amsterdam, Oxford 2006.
 58. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Marketing Service, Science & Technology, Pesticide data program, January 1, 2007 [http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC506150].
 59. U.S. Department of Commerce, NIST/EPA/NIH mass spectral library, Wiley, New York 2005.
 60. Van der Lee M. K., van der Weg G., Trang W. A. [et al.], Qualitative screening and quantitative determination of pesticides and contaminants in animal feed using comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 2008, 1186, 325–339.
 61. Van Thuyne W., Van Eenoo P., Delbeke F. T., Comprehensive screening method for the qualitative detection of narcotics and stimulants using single step derivatization, *Journal of Chromatography B* 2007, 857, 259–265.
 62. Venisse N., Marquet P., Duchoslav E. [et al.], A general unknown screening procedure for drugs and toxic compounds in serum using liquid chromatography-electrospray-single quadrupole mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2003, 27, 7–14.
 63. Ventura R., Roig M., Montfort N. [et al.], High-throughput and sensitive screening by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry of diuretics and other doping agents, *European Journal of Mass Spectrometry* 2008, 14, 191–200.
 64. Weinmann W., Gergov M., Goerner M., MS/MS libraries with triple-quadrupole tandem mass spectrometers for

- drug identification and drug screening, *Analysis* 2000, 28, 934–941.
65. Weinmann W., Wiedemann A., Eppinger B. [et al.], Screening for drugs in serum by electrospray ionization/collision-induced dissociation and library searching, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1999, 10, 1028–1037.
66. World Anti-Doping Agency (WADA), Identification criteria for qualitative assays incorporating chromatography and mass spectrometry, WADA Technical Document TD2003IDCR 2004, 1–5.

Corresponding author

Maciej Bogusz
Forensicher Toxikologe, GTFCh
Burghaldeweg 51
D 74889 Sinsheim
e-mail: mbogusz@web.de

ZAPEWNIANIE JAKOŚCI W IDENTYFIKACJI METODAMI CHROMATOGRAFICZNYMI SPRZĘŻONYMI ZE SPEKTROMETRIĄ MAS

1. Wprowadzenie

Problematyka identyfikacji poszczególnych składników jest kluczowym zagadnieniem analityki toksykologicznej. Poprzedza ona kolejne etapy, takie jak analiza ilościowa, a przede wszystkim interpretacja uzyskanych wyników.

Według De Zeeuw i Frankego [10] proces identyfikacji rozpoczyna się od porównania nieznanego związku z bazami danych zawierającymi substancje wzorcowe o dokładnie zdefiniowanych właściwościach. Proces identyfikacji musi być kontynuowany przy użyciu różnych kryteriów, aż do momentu, kiedy na liście pozostanie tylko jeden związek. Autorzy ci sformułowali istotne dla procedur chromatografii sprzężonej ze spektrometrią mas pytania:

- W jaki sposób mogą być porównane właściwości analityczne (np. jak porównać widma masowe)?
- Co powinno być uważane za „właściwe” dopasowanie?
- Czy istnieje różnica między potwierdzeniem i identyfikacją?
- Jakie są wymagania dotyczące odpowiednich baz danych?
- Jakie są kryteria odrzucenia związku?
- Jakie jest prawdopodobieństwo poprawnej identyfikacji?

De Zeeuw i Franke wyróżnili trzy następujące rodzaje identyfikacji: określenie struktury poprzez identyfikację czystego związku przy zastosowaniu nowoczesnych metod spektrometrycznych, potwierdzenie będące wynikiem udanego porównania właściwości nieznanego związku ze związkiem odniesienia oraz rozpoznanie, jako rezultat odpowiedniego dopasowania, właściwości nieznanego związku z bazą danych. W zaleceniach sformułowanych przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) [23] potwierdzenie zdefiniowano podobnie, jako „jednoznaczną identyfikację obecności związku poprzez porównanie do substancji wzorcowej (spektrometria mas)”. Jednakże termin „potwierdzenie” może być stosowany w innym znaczeniu. W toksykologii sądowej i kontroli antydopingowej strategia analityczna zazwyczaj składa się z dwóch etapów. Pierwszym etapem jest procedura przesiewowa wykonywana najczęściej bardzo czułymi, ale mniej specyficznymi metodami (głównie testami immunochemicznymi lub tandemową spektrometrią mas przy użyciu tylko jednego przejścia). Kolejnym jest potwierdzenie pozytywnego wyniku metody przesiewowej, które jest wykonywane metodami o największej możliwej specyficzności, takimi jak technika GC-MS w trybie przemia-

tania zakresu mas [46] lub LC-MS-MS w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM) przy użyciu trzech przejść lub widma fragmentacyjnego [26, 48]. Podobna definicja została podana przez Ministerstwo Rolnictwa Stanów Zjednoczonych [58] w odniesieniu do identyfikacji pestycydów: „potwierdzenie: weryfikacja wcześniejszej identyfikacji analitu wykonywana innym systemem analitycznym”. De Zeeuw [9] ostrzegł przed stosowaniem procedur potwierdzających jako jedyne dowodu identyfikacji i postulował stosowanie różnych procedur identyfikacji, a nie tylko spektrometrii mas. Niemniej jednak, jeżeli spełnione są odpowiednie wymagania, procedury oparte na połączeniu rozdziału chromatograficznego i detekcji przy użyciu spektrometrii mas są uznawane za wystarczające narzędzie do jednoznacznej identyfikacji. Wymagania te, takie jak np. ustalenie progu analitycznego, odpowiednio wysokiego do konkretnego zadania, zostały sformułowane przez właściwe organizacje lub instytucje na szczeblu krajowym lub międzynarodowym.

2. Procedury przesiewowe stosowane w identyfikacji

Procedury przesiewowe wykorzystujące spektrometrię mas są często stosowane jako pierwszy etap identyfikacji. Można je podzielić na dwie główne grupy: ogólne nieukierunkowane metody przesiewowe oraz metody ukierunkowane na konkretne związki.

2.1. Ogólne analizy przesiewowe

W przypadku analiz nieukierunkowanych, które są często określane w toksykologii klinicznej i sądowej jako analiza „ogólnie nieznaną substancji”, logicznym wyborem jest zastosowanie metody kapilarnej GC połączonej ze spektrometrią mas z jonizacją elektronową (GC-EI-MS). Widma masowe uzyskane techniką EI-MS nie są zależne od tego, jaki aparat i warunki chromatograficzne zostały zastosowane. Dostępne są obecnie kompleksowe biblioteki widm masowych uzyskanych techniką EI obejmujące tysiące związków [35, 36, 59]. Biblioteki te umożliwiają wstępną identyfikację związku poprzez ich przeszukiwanie, nawet bez związku odniesienia. W przypadku, kiedy nie można uzyskać związku odniesienia do analizy porównawczej, decyzja dotycząca identyczności widma masowego powinna być podejmowana z ogromną rozwagą. Szczególnie ważne jest to w przypadku niektórych „egzotycznych” związków proponowanych przez oprogramowanie urządzenia jako pretendentów do iden-

tyfikacji. Jednak w większości procedur identyfikacji stosowanych w dziedzinach związanych z prawem, jak np. analiza środków dopingowych, toksykologia sądowa lub kontrola jakości żywności, wstępna identyfikacja dzięki bibliotece GC-EI-MS musi być potwierdzona w następnym etapie przy użyciu substancji odniesienia analizowanej w identycznych warunkach jak badana próbka. W pełnym widmie masowym otrzymanym techniką GC-MS-EI powinny być obecne co najmniej cztery wybrane jony we właściwych proporcjach intensywności, w tym – jeżeli to możliwe – jon molekularny. Widma masowe pochodzące od tła oraz przeszkadzające w identyfikacji powinny zostać odjęte. Może to znacznie zwiększyć możliwości techniki GC-MS [52].

Należy podkreślić, że decyzja dotycząca wstępnej identyfikacji w oparciu o analizę statystyczną widma masowego dopasowanego z biblioteki widm powinna być zawsze wykonywana przez biegłego toksykologa. To on, w zależności od przypadku, decyduje, czy został osiągnięty odpowiedni stopień identyfikacji [9, 42, 43].

Chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas jest techniką potencjalnie bardziej odpowiednią do celów przesiewowych niż GC-MS, gdyż obejmuje znacznie szersze spektrum związków o różnej polarności. Jednak technika ta ma kilka istotnych ograniczeń dotyczących zarówno chromatografii, jak i związanych ze spektrometrią mas. LC, pomimo swojej uniwersalności, jest w porównaniu do kapilarnej GC znacznie mniej selektywną techniką rozdzielania. Z drugiej strony widma masowe związków zarejestrowane za pomocą różnych aparatów LC-MS mogą się znacznie różnić względną intensywnością jonów fragmentacyjnych, nawet jeżeli stosowane są identyczne parametry analizy [3]. Sprawia to, że bardzo trudno jest bezpośrednio wykorzystywać widma masowe uzyskane w innym laboratorium. Dlatego też LC-MS jest doskonałą techniką analizy ukierunkowanej lub potwierdzającej, ale niełatwo ją zastosować w analizie szerokiego spektrum związków, np. w analizie „ogólnie nieznaną substancji”. Pomimo tego, w ostatnich latach za pomocą technik LC-MS [45, 65], LC-MS-MS [31, 64] i LC-MS-TOF [11, 21, 38] opracowano kilka bibliotek widm obejmujących setki związków chemicznych. Prace przeglądowe dotyczące tej tematyki zostały niedawno opublikowane przez Gergova [20] oraz Marqueta [30].

2.2. Analizy ukierunkowane

Analizy ukierunkowane i ich dalsze potwierdzenie są stosowane, jeżeli ma być zidentyfikowany konkretny związek lub określona grupa związków. Ma to miejsce w przypadku analiz w kierunku substancji kontrolowanych, jak np. środków uzależniających [61], substancji dopingowych [19, 54] lub zanieczyszczeń żywności [60]. Stosowane są wtedy bardzo specyficzne metody, takie

jak GC-MS-MS i LC-MS-MS, obie w trybie MRM, a także GC-MS-TOF lub GC-MS-SIM. Identyfikacja odbywa się poprzez porównanie właściwości chromatograficznych i obecności specyficznych jonów fragmentacyjnych o intensywnościach odpowiadającym zaprogramowanym wartościom zarejestrowanym dla substancji wzorcowych. Dla poszczególnych grup związków stworzono biblioteki odniesienia zorientowane na konkretne zadania. Biblioteki kompleksowe, np. biblioteka pestycydów opracowana w oparciu o metodę LC-MS, mogą obejmować kilka set substancji.

Definicje pozytywnej identyfikacji lub potwierdzenia w wyniku analizy przesiewowej techniką LC-MS mogą się różnić. Niektórzy autorzy wymieniają wysokie podobieństwo co najmniej dwóch z trzech widm otrzymanych przy trzech energiach fragmentacji [28], inni natomiast dopasowanie co najmniej 60% odwrotnego dopasowania uzyskane podczas przeszukiwania biblioteki [62] lub podobieństwo przynajmniej pięciu najbardziej intensywnych jonów [4].

Dla niektórych związków zawierających chlorowce, takich jak np. chloramfenikol, zastosowano alternatywne strategie identyfikacji. Bogusz i in. [2] wykorzystali technikę LC-MS-MS z ujemną elektronową jonizacją (ESI, tryb MRM). Monitorowali oni trzy przejścia pozbawionej protonu cząsteczki (m/z 321). Sformułowali następujące kryteria pozytywnej identyfikacji chloramfenikolu: R_t badanego związku w zakresie $\pm 1\%$ wzorca wewnętrznego (deuterowana pochodna badanego związku), obecność trzech jonów potomnych pochodzących od jonu macierzystego oraz stosunki intensywności jonów potomnych w zakresie $\pm 2SD$ średniej wartości kontrolnej, czyli $\pm 25\%$. Mottier i in. [37] wykorzystali zalety wynikające z obecności dwóch atomów chloru w cząsteczce chloramfenikolu i monitorowali dwa jony macierzyste: m/z 321 oraz m/z 323. Monitorowali oni przejścia każdego izotopu do jonów potomnych o m/z 152 i 257. Kryteria identyfikacji były następujące: R_t badanego związku w zakresie $\pm 1\%$ wzorca wewnętrznego (deuterowana pochodna badanego związku) oraz zmienność stosunków intensywności jonów potomnych w zakresie 15–25% średniej kontrolnej wartości.

Ponieważ intensywność i niekiedy sposób fragmentacji w technice LC-MS są zależne od zastosowanych warunków i urządzenia, powszechnie zakłada się, że wzorec odniesienia powinien być analizowany równolegle w dokładnie takich samych warunkach, jak badana próbka, a najlepiej w tym samym nastrzyku.

Wymagania dotyczące jakości procedur przesiewowych wykorzystujących technikę spektrometrii mas zostały omówione przez różnych autorów, takich jak Drummer [15], Stimpfl i in. [50, 51] oraz Maurer [32] w odniesieniu do toksykologii klinicznej i sądowej, a także przez Thevisa i Schänzera [54] w odniesieniu do analizy środków dopingowych.

3. Rozważania metodyczne istotne dla identyfikacji

Istnieje wiele czynników, które mogą mieć wpływ na identyfikację techniką spektrometrii mas. Na różnych etapach procedury identyfikacji należą do nich: wpływ równolegle ekstrahowanych składników matrycy, niepełny rozdział chromatograficzny związków, ogólny stan aparatu, a także nasycenie detektora i zniekształcenie piku poprzez nadmiar substancji. Wszystkie te czynniki mogą wpływać na zmianę intensywności jonów w konkretnym widmie masowym i powodować niedopasowanie, a w konsekwencji błędnie pozytywną lub błędnie negatywną identyfikację [33, 34]. Istnieje kilka elementów optymalizacji procesu identyfikacji techniką spektrometrii mas. Można je podzielić na optymalizację przygotowania próbki, optymalizację rozdziału chromatograficznego oraz optymalizację parametrów pracy spektrometru mas.

3.1. Optymalizacja przygotowania próbki do analizy techniką spektrometrii mas

Decydujące znaczenie w procedurze identyfikacji techniką GC-EI-MS ma optymalne, dostosowane do rodzaju materiału, przygotowanie próbki. Przygotowanie takie może się składać z etapu hydrolizy sprzężonych związków, derywatywacji lub kilku etapów oczyszczania. W metodach przesiewowych i identyfikacyjnych techniką GC-MS wśród procedur izolacji stosowana była głównie ekstrakcja ciecz-ciecz [35] i ekstrakcja do fazy stałej (SPE) [16]. W ostatnich latach coraz częściej jest wykorzystywana mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) ze względu na fakt, że nie wymaga ona używania rozpuszczalników i jest szczególnie przydatna w analizie przesiewowej lotnych związków pochodzenia naturalnego lub syntetycznego [np. 5, 6, 24, 41].

Dla niektórych związków, a w szczególności dużych cząsteczek o haptenogennych właściwościach, zostały opracowane procedury ekstrakcji powinowactwa immunologicznego. Ho i in. [26] wyisobnili z końskiego osocza insuliny pochodzące z różnych źródeł (ludzi, bydła i świni) przy użyciu strącania powinowactwa immunologicznego z magnetycznymi kulkami powlekanymi przeciwciałami z następującym rozdziałem przez wirowanie frakcjonujące. Otrzymane ekstrakty były analizowane z użyciem aparatu LC-MS-MS wyposażonego w spektrometr mas typu QTrap. Dla celów przesiewowych monitorowano przejście do jednego wspólnego iminiowego jonu tyrozyny. Potwierdzenie zostało dokonane przez co najmniej trzy przejścia charakterystyczne dla danej insuliny, biorąc pod uwagę również czas retencji. Metoda ta była stosowana w kontroli antydopingowej w celu rozróżnienia końskiej insuliny od insuliny pochodzenia egzogennej.

3.2. Optymalizacja rozdziału chromatograficznego

W odniesieniu do sprawności rozdziału chromatograficznego, kapilarna GC jest dojrzałą techniką. Niemniej jednak pojawiły się ostatnio przykłady ukazujące, że ta dziedzina chromatografii może być nadal udoskonalana w celu ułatwienia identyfikacji w złożonych mieszaninach lub matrycach. Van der Lee i in. [60] przedstawili metodę przesiewową ukierunkowaną na oznaczanie 106 pestycydów i zanieczyszczeń w paszach dla zwierząt. Procedura ta była oparta na ekstrakcji rozpuszczalnikiem, oczyszczaniu techniką chromatografii żelowej i analizie dwuwymiarową GC z pełnym przemiataniem widma TOF-MS. Wszystkie związki były wykrywane automatycznie na poziomie powyżej 50 ng/ml. Dwuwymiarowa GC oraz TOF-MS były również stosowane przez Banerjee i in. [1] w analizie wieloskładnikowych pozostałości pestycydów w winogronach. Wykorzystano tutaj kombinację szeregowo połączonych kolumn kapilarnych – niepolarną i polarną. Metoda ta rozwiązywała problemy związane z koelucją, obserwowane w trybie pełnego skanowania w jednowymiarowej analizie GC-MS i umożliwiała rozdział chromatograficzny 51 pestycydów w czasie analizy wynoszącym 24 min wraz z potwierdzeniem poprzez przeszukiwanie biblioteki widm masowych. Zautomatyzowana technika bezpośredniego wprowadzenia próbki w połączeniu z obszerną dwuwymiarową chromatografią gazową sprzężoną ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu została zastosowana do opracowania przesiewowej metody oznaczania polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn (dibenzofuranów) i polichlorowanych bifenylu w oleju z ryb [27]. Kolbrich i in. [29] zastosowali dwuwymiarową technikę GC-EI-MS (SIM) z zateżaniem kriogenicznym w celu oznaczania w ludzkiej surowicy metylenodioksyetyloamfetaminy (MDEA), MDMA i jej metabolitu 3,4-metylenodioksyamfetaminy (MDA), 4-hydroksy-3-metoksymetamfetaminy (HMMA) oraz 4-hydroksy-3-metoksyamfetaminy (HMA). Metoda ta zapewniała niskie granice oznaczalności, a tego typu system chromatograficzny wydaje się odpowiedni do zastosowania w analizie innych związków i złożonych matryc.

W przypadku metody HPLC ostatnie lata przyniosły wyraźny postęp związany z wprowadzeniem drobnoziarnistych kolumn (wielkości cząstek poniżej 2 μ m). Technika ta, znana jako ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC), a umożliwiająca znacznie lepszy rozdział w krótszym czasie, została natychmiast zastosowana do celów identyfikacyjnych w połączeniu ze spektrometrią mas. UPLC umożliwia wysokowydajną analizę w dziedzinie badań środków dopingowych, a w szczególności środków moczopędnych. Ventura i in. [63], używając urządzenia UPLC-MS-MS pracującego w trybie ujemnej i dodatniej jonizacji, wykrywali w ekstraktach z moczu 34 wybrane diuretyki i inne środki dopingowe. Całkowity czas analizy wynosił 5 min, a metoda pod każdym

względem spełniła wymogi ustalone przez Światową Agencję Antydopingową. Thörngren i in. [56] opracowali przesiewową metodę oznaczania 130 substancji (diuretyków, środków pobudzających ośrodkowy układ nerwowy i opiatów) opartą na technice UPLC-MS-MS z bezpośrednim nastrzykiwaniem prób moczu. Próbki były wprowadzane na kolumnę z odwróconym układem faz podłączoną do szybkooskanującego tandemowego spektrometru masowego z jonizacją przez elektrorozpylanie, umożliwiającego szybką zmianę polaryzacji rejestracji jonów. Oprogramowanie wykorzystywane do opracowania wyników sporządzało raporty ukazujące nieprawidłowe wyniki analityczne w próbce. 96-dółkowa płytka mogła być przeanalizowana w ciągu 16 h.

Kilka aplikacji UPLC-MS dotyczyło analizy pozostałości pestycydów. Technika UPLC-TOF-MS została zastosowana do szybkiej ukierunkowanej analizy jakościowej i ilościowej 100 pestycydów w truskawkach [53]. Dokładny pomiar masy dodatnich i ujemnych jonów umożliwiał ich ekstrakcję z następującym po niej „zbieraniem danych z całego zakresu mas”. Na oznaczenia nie miały wpływu interferencje z tła i równocześnie koelutowane składniki obserwowane podczas rozdzielania gradientowego techniką UPLC (w cyklu wynoszącym 6,5 min na jedną analizę). W innych badaniach [44] analizowano techniką UPLC-MS-MS (MRM) 90 pestycydów wyosobnionych z soków owocowych prostą ekstrakcją acetonitrylem. Rozdział został osiągnięty w czasie analizy wynoszącym 11 min.

3.3. Optymalizacja parametrów spektrometru mas

Dokładne określenie masy wydaje się jednym z najbardziej obiecujących narzędzi identyfikacji we współczesnej spektrometrii mas. Zmierzenie masy cząsteczkowej pozwala zidentyfikować nieznaną jon lub określić jego wzór chemiczny, a tym samym potwierdzić podobieństwo do znanego składnika w przypadku przeszukiwania biblioteki [21]. Dokładność masy może być wyrażona w wartościach bezwzględnych, zazwyczaj w milidaltonach (mDa) lub w wartościach względnych, np. w częściach na milion (ppm). Wartości te oblicza się w następujący sposób:

$$\text{mDa: } [(m/z)_{\text{zmierzone}} - (m/z)_{\text{obliczone}}] \cdot 1000, \quad \{1\}$$

$$\text{ppm: } 10^6 \cdot [(m/z)_{\text{zmierzone}} - (m/z)_{\text{obliczone}}] / (m/z). \quad \{2\}$$

Dokładność masy zależy od rodzaju zastosowanego aparatu. Dla standardowego instrumentu z analizatorem w postaci kwadrupola lub pułapki jonowej możliwe jest uzyskanie dokładności mas 50–100 mDa, dla TOF lub QTOF poniżej 10 mDa, natomiast dla FTICR-MS i instrumentów z analizatorem typu orbitrap – 1 mDa lub mniej. Niektóre z niedawno skonstruowanych aparatów

z potrójnym kwadrupolem charakteryzują się możliwością określenia masy z dokładnością poniżej 1 mDa [40].

Poza zastosowaniem w toksykologicznych badaniach przesiewowych [20, 22] spektrometria mas o wysokiej rozdzielczości została wykorzystana w innych procedurach przesiewowych i identyfikacyjnych. Hernandez i in. [24] opracowali procedurę opartą na technice chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas o wysokiej rozdzielczości z analizatorem czasu przelotu (GC-TOF-MS) do identyfikacji w wodzie 60 zanieczyszczeń wyosobnionych za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej. Identyfikacja dla jednego analitu była oparta na ocenie obecności do pięciu reprezentatywnych jonów o m/z zmierzonych przy wysokiej dokładności masy i określeniu dla nich stosunków intensywności Q/q (Q jon ilościowy; q, jon potwierdzający). Strategia ta doprowadziła do wykrycia w kilku próbkach wody analizowanych związków w niskich stężeniach na poziomie ppb.

Problemem dla laboratoriów kontroli środowiska stało się kilkaset środków ochrony roślin, których stosowanie zostało niedawno zakazane przez europejskie i amerykańskie agencje ochrony środowiska. Ponieważ trudno byłoby kontrolować wszystkie te związki technikami GC-MS, LC-MS lub LC-MS-MS, Thurman i Ferrer [57] opracowali nieukierunkowane procedury przesiewowe w oparciu o techniki łączone LC-TOF-MS, LC-IT-MS i LC-QTOF-MS. Jako referencyjne bazy danych zastosowano komercyjnie dostępne bazy The Merck Index i ChemIndex. Strategia identyfikacji składała się z czterech etapów: analizy LC-TOF-MS z pełnym przemiataciem widma, przeszukiwania biblioteki pod kątem wzorów empirycznych i któregoś z izotopów A+2 (dla halogenów lub S), określenia struktury za pomocą technik LC-IT-MS lub LC-Q-TOF-MS-MS i końcowych analiz porównawczych. Dokładne określenie masy może być bardzo przydatne w analizie związków, które nie tworzą charakterystycznych jonów fragmentacyjnych w analizie tandemową spektrometrią mas, szczególnie w trybie MRM. Nielen i in. [39] porównali skuteczność różnych wysokorozdzielczych technik LC-MS w analizie pozostałości hormonów w próbkach żywności. Autorzy ci stosowali trzy rodzaje instrumentów: LC-QTOF-MS, LC-FTIR-MS i LC-FT-Orbitrap-MSⁿ. Podkreślali oni potrzebę optymalnej wstępnej obróbki i oczyszczenia próbki dla instrumentów o mniejszych dokładnościach (ok. 20 ppm), ponieważ rozdzielczość LC i rozdzielczość MS są silnie ze sobą powiązane i mają istotny wpływ na dokładność pomiaru masy. Instrumenty o wyższej rozdzielczości mas mogą złagodzić skutki niecałkowitego rozdzielania chromatograficznego. Może to być zilustrowane analizą stanazololu; nieokreślony fragment obserwowany dla QTOF-MS (m/z 161,1223 przy rozdzielczości mas 5000 FWHM) okazał się w analizie LC-FTIR-MS dubletem jonów o niewielkich różnicach mas (m/z 161,1073 oraz m/z 161,1324 przy rozdzielczości mas 250000).

Oprócz spektrometrii mas o wysokiej rozdzielczości do celów identyfikacji zastosowano niedawno inne rozwiązania instrumentalne. Najbardziej obiecujące jest użycie warunkowo zależnej akwizycji (IDA) w połączeniu z wzmocnionym widmem jonu potomnego (EPI). Technika ta została wykorzystana przez Stanleya i in. [48] w celu wykrycia 32 związków o charakterze kwaśnym w osoczu końskim i 11 związków o charakterze obojętnym w moczu. W przypadku osocza przeprowadzono strącanie acetonitrylem zawierającym wzorec wewnętrzny, a następnie odwirowywanie; próby moczu, do których dodawano wzorec wewnętrzny, były tylko odwirowywane. Metoda chromatograficzna polegała na ekstrakcji przy użyciu kolumny Oasis HLB i izokratycznym rozdziale na kolumnie Chromolith RP-18e bezpośrednio ze sobą połączonych. Związki były wykrywane hybrydowym tandemowym spektrometrem mas typu QTRAP pracującym w trybie dodatniej i ujemnej jonizacji. Dla każdego związku monitorowano jedno przejście. Zastosowano technikę IDA, a jeżeli sygnał był większy niż wybrana wartość, rejestrowano widmo EPI. Dla większości związków osiągnięto jednoznaczny identyfikację. Autorzy stwierdzili, że metoda ta nie nadaje się do analizy sterydów anabolicznych, ponieważ dla tej grupy związków obserwowano bardzo podobne widma EPI. Drees i in. [14] porównali możliwości identyfikacyjne stosunków MRM i MRM-IDA przy zastosowaniu hybrydowego spektrometru mas QTrap w postaci potrójnego kwadrupola (liniowej pułapki jonowej). Analizowali oni 14 wybranych środków odurzających w różnych stężeniach. Obie metody dobrze sprawdzały się w niskich stężeniach, natomiast przy bardzo wysokich stężeniach metoda MRM-IDA charakteryzowała się lepszymi możliwościami potwierdzenia.

Połączenie technik LC-MS-MS i (lub) GC-MS-NPD było używane przez Thevisa i in. [55] w celu oznaczenia związków obecnych w narkotykach skonfiskowanych na nielegalnym rynku, zawierających głównie steroidy anaboliczne i środki o działaniu pobudzającym seksualnie. Narkotyki były rozpuszczane w metanolu i poddawane analizie techniką LC-ESI-MS-MS przy zastosowaniu aparatu QTrap. Dla każdego związku monitorowano trzy przejścia. W przypadku badania techniką GC-MS-NPD stosowano wielodrożny zawór dozujący, dzięki któremu dozowana próbka była rozdzielana na dwóch identycznych kolumnach; jedna kolumna była podłączona do detektora EI-MS, a druga do detektora azotowo-fosforowego (NPD).

Obliczanie względnych intensywności jonów (stosunków jonów) jest zwykle stosowane jako jedna z cech identyfikacyjnych [2, 37]. Feng i in. [18] opracowali procedurę jednoczesnego oznaczania 30 różnych środków odurzających w moczu techniką LC-MS-MS. Dla każdego związku monitorowali trzy przejścia. W celu identyfikacji obliczano i wykorzystywano stosunki inten-

sywności dwóch jonów fragmentacyjnych do jonu fragmentacyjnego o największej intensywności. Jak określono w procedurze walidacyjnej, wskaźniki te powinny mieścić się w zakresie $\pm 3SD$. Concheiro i in. [8] opublikowali badania dotyczące jednoczesnego oznaczania różnych środków odurzających w moczu techniką LC-MS-MS. Dla każdego związku monitorowali dwa przejścia. Zmienność wewnątrzgrupowa i międzygrupowa względnych intensywności jonów była badana przy dwóch poziomach stężeń. Zmienność międzygrupowa była znacznie większa niż wewnątrzgrupowa. Autorzy stwierdzili, że stosunek intensywności jonów jako kryterium identyfikacji należy traktować z dużą ostrożnością, a także zdecydowanie zalecili, aby w celu spełnienia określonych kryteriów wraz z rzeczywistymi próbkami analizować w tym samym dniu próbki wzorcowe.

Stein i Heller [49] opublikowali bardzo ważne badania dotyczące czynników odpowiedzialnych za błędnie dodatnie identyfikacje za pomocą spektrometrii mas. Przeprowadzono następujące eksperymenty: ze zredukowanej biblioteki widm masowych NIST/EPA/NIH [59] zawierającej 96464 zapisów co dziesiąte widmo (około 9600 widm) zostało wybrane jako widmo do identyfikacji. Widma te zostały wyeliminowane z biblioteki przed wykonaniem przeszukiwania, co spowodowało, że wszystkie widma dopasowane z biblioteki dla identyfikowanego widma z danego zestawu ograniczeń były błędnie pozytywne. Eksperymenty przeszukiwania zostały wykonane przy użyciu różnej liczby pików do dopasowywania w liczbie od 1 do 8. Intensywność okna została określona na 0,25, co oznacza, że widma poszukiwane oraz te z biblioteki uznawano za pasujące przy danym m/z , jeżeli różnice w intensywności były mniejsze niż 25%. Stwierdzono, że liczba pików, jak również intensywności pików, wyraźnie zmniejszają prawdopodobieństwo uzyskania wyników błędnie dodatnich. Autorzy stwierdzili, że do identyfikacji powinny być stosowane więcej niż trzy jony fragmentacyjne (w trybie przemiatania całego widma lub w trybie SIM), a ich wartości m/z powinny być starannie dobrane. Należy unikać korelacji z wysoce prawdopodobnymi pikami, takimi jak różnica 14 amu (utrata grupy metylowej) lub 18 amu (utrata wody).

4. Prawne i regulacyjne aspekty identyfikacji

Kilka branżowych organizacji, jak również agencje krajowe i międzynarodowe, sformułowały zalecenia i wytyczne dotyczące kryteriów identyfikacji z zastosowaniem metod spektrometrii mas. Dokumenty te można podzielić na dwie główne grupy. Pierwsza grupa wynika z regulacji prawnych na szczeblu krajowym i międzynarodowym, jak wydane przez służbę zdrowia Stanów Zjednoczonych dokumenty dotyczące laboratoriów klinicznych [12] oraz testowania środków odurzających

w miejscu pracy [13], a także opublikowane przez Unię Europejską [17]. Druga grupa obejmuje zalecenia i wytyczne zawodowych organizacji na szczeblu krajowym i międzynarodowym, takich jak Światowa Agencja Antydopingowa – WADA, Zrzeszenie Patologów Amerykańskich – CAP, Agencja ds. Żywności i Leków – FDA, Ministerstwo Rolnictwa Stanów Zjednoczonych, Stowarzyszenie Toksykologów Sądowych – SOFT [47] czy Niemieckie Towarzystwo Chemii Toksykologicznej i Sądowej – GTFCh [22].

FDA opublikowało końcowe wytyczne dotyczące rozwoju, oceny i stosowania metod spektrometrii mas do potwierdzania tożsamości pozostałości leków dla zwierząt [23]. Zgodnie z wytycznymi, procedury wykorzystujące spektrometrię mas powinny zawierać każdy z następujących punktów:

- pakiet walidacyjny z opracowującego metodę laboratorium zawierający powtórzenia próbek, oryginalnych i wzbogaconych, pokazujący zerowy odsetek błędnie dodatnich i 10% błędnie ujemnych wyników przy założonym poziomie tolerancji, ukazujący odporność metody i brak interferencji ze strony innych związków lub składników matrycy;
- opis metody zawierający także wzór i pełne widmo analizowanego związku, dane dotyczące widm dla co najmniej trzech strukturalnie specyficznych jonów, które całkowicie określają macierzystą cząsteczkę lub więcej jonów, jeżeli są uwzględnione niespecyficzne jony, proponowane wzory jonów fragmentacyjnych wraz z ścieżkami fragmentacji, uzasadnienie specyfiki wybranych jonów lub zakresu przemiatania widma, kryteria potwierdzenia i kryteria operacyjne, jak również część dotyczącą kontroli jakości;
- kryteria potwierdzenia. W procedurze potwierdzającej wzorzec (lub wzorce) porównywany powinien być analizowany równocześnie, w razie potrzeby w obecności ekstrahowanej matrycy. Może być zastosowany każdy z następujących chromatogramów otrzymanych techniką spektrometrii mas: TIC, RIC, SIM lub SRM. Odradza się wstrzykową analizę przepływową. Pik chromatograficzny powinien być większy niż próg stosunku sygnału do szumu 3:1, a czas retencji nie powinien się różnić od czasu retencji wzorca więcej niż o 2% dla GC-MS lub o 5% dla LC-MS;
- kryteria dopasowania widm masowych różnią się w zależności od trybu akwizycji spektrometru mas: w pełnym i częściowym przemiataniu MS^1 widmo powinno zawierać co najmniej trzy strukturalnie specyficzne jony i być dopasowane wizualnie do widma wzorca. Zalecany jest dopuszczalny zakres $\pm 20\%$ względnej intensywności głównych jonów. Algorytmy wyszukiwania biblioteki nie powinny być wykorzystywane w celu potwierdzenia tożsamości. Powinny być obecne wszystkie strukturalnie specyficzne jony, o których mowa w opisie metody, a ich względne intensywności powinny odpowiadać intensywnościom w standardach. Należy wyjaśnić obecność innych niepowiązanych widocznych jonów (np. z składników matrycy). Jeżeli zastosowano odejmowanie tła, należy to zaznaczyć i określić. W przypadku MS^1 SIM względne intensywności trzech strukturalnie specyficznych jonów powinny pasować do wzorca w zakresie $\pm 10\%$ (bezwzględna). W przypadku czterech lub większej ilości strukturalnie specyficznych jonów dopasowanie powinno być na poziomie $\pm 15\%$ (bezwzględna). Względne intensywności dla więcej niż trzech jonów, które zawierają mniej specyficznych jonów, takich jak izotopy lub pochodzące z utraty wody, powinny być dopasowane do wzorca w zakresie $\pm 10\%$. W pełnym i częściowym przemiataniu MS^n widmo powinno wizualnie odpowiadać widmu standardu i powinna istnieć ogólna zgodność między względnymi intensywnościami uzyskanymi dla próbki i standardu. Wszystkie strukturalnie specyficzne jony, o których mowa w opisie metody, powinny być obecne. Jeżeli strukturalnie specyficzny jon macierzysty całkowicie rozpada się do jonów potomnych, pojawienie się przynajmniej dwóch strukturalnie specyficznych jonów potomnych powinno być wystarczające w MS^{n+1} . Należy wyjaśnić obecność innych niepowiązanych widocznych jonów (np. z składników matrycy). Jeżeli zastosowano odejmowanie tła, należy to zaznaczyć i określić. W przypadku MS^n SRM, jeżeli jon macierzysty jest całkowicie fragmentowany, względna intensywność strukturalnie specyficznych jonów potomnych powinna odpowiadać wzorcowi w granicach $\pm 10\%$ w przypadku, gdy monitorowane były dwa jony lub $\pm 20\%$ w przypadku, gdy monitorowane były trzy lub więcej jonów;
- kontrola jakości powinna zawierać następujące punkty: ustalenie dopasowania systemu, analizę przynajmniej jednej próby kontrolnej i jednej wzbogaconej próby kontrolnej oraz kontrolę ewentualnego przeniesienia.

Komisja Europejska [17] opublikowała wymagania dotyczące skuteczności metod analitycznych i interpretacji wyników. W dokumencie tym zostały sformułowane niezbędne kryteria dla wykrywania techniką spektrometrii mas. Stwierdzono, że rozdział chromatograficzny w układzie bezpośrednim (*on-line*) lub pośrednim (*off-line*) jest wstępnym warunkiem dla potwierdzenia techniką spektrometrii mas.

W obu technikach – GC-MS i LC-MS – minimalny do zaakceptowania czas retencji dla badanego składnika powinien wynosić co najmniej dwukrotność czasu retencji odpowiadającego martwej objętości kolumny (tj. czasu martwego lub Rt_0). Względny czas retencji analitu (stosunek analit : wzorzec wewnętrzny) nie powinien się różnić od otrzymanego dla wzorca więcej niż $\pm 0,5\%$ dla techniki GC i $\pm 2,5\%$ dla LC.

Detekcja techniką spektrometrii mas powinna być przeprowadzana w trybie przemiatania całego zakresu mas, SIM oraz technikami MS-MSⁿ, takimi jak SRM lub innymi technikami w połączeniu z odpowiednimi sposobami jonizacji.

Dla pełnego przemiatania MS obowiązkowa jest obecność w widmie odniesienia minimum czterech jonów diagnostycznych z względną intensywnością powyżej 10%. Jon molekularny powinien zostać uwzględniony, jeżeli jego intensywność jest większa niż 10%.

W trybie SIM powinien zostać uwzględniony jon molekularny. Stosunek intensywności sygnał-szum dla każdego jonu diagnostycznego powinien wynosić 3:1.

W tabeli I zamieszczono maksymalne dopuszczalne granice tolerancji dla względnych intensywności jonów. Do identyfikacji Komisja Europejska zdefiniowała system punktowy. W systemie tym w celu potwierdzenia tożsamości są wymagane co najmniej cztery punkty. W tabeli II jest ukazana liczba punktów uzyskanych specyficzną techniką. Zgodnie z tymi kryteriami, potrzebne są np. cztery charakterystyczne jony w przypadku, jeżeli stosowane są techniki GC-MS i LC-MS lub jeden jon macierzysty i dwa potomne w przypadku GC-MS-MS lub LC-MS-MS. Nielsen i in. [39] zaproponowali do czteropunktowej klasyfikacji dodatkowe kryteria identyfikacji w oparciu o spektrometrię mas wysokiej rozdzielczości (tabela III).

Zrzeszenie Amerykańskich Patologów (CAP) w „Spisie kontrolnym chemii i toksykologii” z Laboratoryjnego Programu Akredytacji sformułowało wymagania istotne dla identyfikacji metodami chromatograficznymi połączonymi ze spektrometrią mas [7]. W przypadku jedno-stopniowych technik GC-MS i LC-MS identyfikacja powinna odbywać się w oparciu o proporcje jonów z wykorzystaniem, o ile to możliwe, co najmniej stosunku dwóch jonów. Proponowany limit tolerancji dla GC-MS wynosi $\pm 20\%$ wartości uzyskanych dla wzorców, natomiast dla LC-MS limit ten wynosi $\pm 30\%$. Jeżeli dostępny jest tylko jeden stosunek dwóch charakterystycznych jonów, może on być wystarczający w przypadku, gdy istnieją inne właściwości identyfikujące, np. czas retencji. Wzorzec wewnętrzny powinien być identyfikowany na podstawie co najmniej jednego stosunku jonów. W przypadku, kiedy w technice MS stosowane jest przemiatanie całego zakresu mas, laboratorium powinno określić i zwalidować swoje własne progi „dopasowania widm” lub dostosować je do celów identyfikacji.

W tandemowej spektrometrii mas (GC-MS-MS lub LC-MS-MS) pracującej w trybie SRM powinno być monitorowane co najmniej jedno przejście jonów i jeden stosunek jonów wraz z czasem retencji. Jednakże jeżeli istnieje dużo jonów o wystarczającej intensywności, powinny być monitorowane dwa lub więcej stosunki jonów. Stosunki jonów ustalone podczas pełnego przemiatania widma są akceptowalną metodą identyfikacji i powinny

spełniać takie same kryteria, jak w trybie SRM. Limity tolerancji powinny być adekwatne do zastosowanej metody i wspierane przez bibliograficzne lub własne dane. W innym podejściu stosowane są dwuzależnościowe kryteria uznania danych dla co najmniej trzech stosunków jonów i systemu punktacji zgodnie z wymogami Komisji Europejskiej [17]. Tolerancje stosunków jonów różnią się w zależności od intensywności jonów (patrz tabela I).

Agencja ds. Pestycydów Stanów Zjednoczonych opublikowała standardowe procedury operacyjne (SOP) dotyczące identyfikacji, potwierdzenia i ilościowego oznaczenia pozostałości pestycydów za pomocą technik GC i LC z detekcją za pomocą spektrometrii mas [58]. Te standardowe procedury operacyjne zostały napisane w celu połączenia w jednym dokumencie wymagań wszystkich procedur dotyczących technik MS i MS-MS stosowanych w analizie pozostałości pestycydów.

W przypadku pełnego przemiatania GC-MS widma powinny być rejestrowane w zakresie od 20 do 500 amu. Wymagane są co najmniej trzy strukturalnie specyficzne jony, w tym najlepiej jony molekularne spełniające wymagania stosunku sygnału do szumu 3:1. Obwiednie izotopowe mogą być stosowane jako jeden z trzech istotnych jonów. Względne wskaźniki intensywności każdego jonu powinny mieścić się w zakresie $\pm 20\%$ stosunków obserwowanych dla wzorca. Dla analizy EI obowiązkowe jest korzystanie z oprogramowania służącego do przeszukiwania biblioteki. Odradza się przeszukiwanie biblioteki w technikach „miękkiej” jonizacji, np. GC-MS-CI. W dokumencie tym nie zostały sformułowane kryteria chromatograficzne (dokładność czasu retencji) dla GC-MS.

W analizie GC-MS-MS czas retencji badanego związku nie powinien różnić się o więcej niż $\pm 0,05$ min od wzorca lub $\pm 0,01$ *RRt*. Należy monitorować dwa przejścia z jednego lub dwóch jonów macierzystych. Względne stosunki intensywności każdego jonu powinny mieścić się w zakresie $\pm 20\%$ stosunków obserwowanych dla wzorca, a intensywność każdego jonu powinna przekraczać stosunek sygnału do szumu 3:1.

W analizie LC-MS aparat powinien mieć możliwość skanowania w zakresie od 50 do 1200 amu w trybie pełnego przemiatania widma. Czas retencji badanego związku nie może różnić się o więcej niż $\pm 0,5$ min od wzorca lub $\pm 0,01$ *RRt*. Wymagane są co najmniej trzy strukturalnie specyficzne jony, w tym najlepiej protonowane lub deprotonowane cząsteczki, spełniające warunek stosunku sygnału do szumu 3:1. Obwiednie izotopowe mogą być stosowane jako jeden z trzech istotnych jonów. Relatywna intensywność stosunku każdego jonu powinna mieścić się w zakresie $\pm 20\%$ stosunków obserwowanych dla wzorca. W analizie LC-MS-MS wymagania chromatograficzne (*Rt* lub *RRt*) są takie same jak w przypadku LC-MS, natomiast wymagania dotyczące spektrometrii mas są identyczne jak dla GC-MS-MS.

Światowa Agencja Antydopingowa (WADA) [66] sformułowała kryteria, które muszą być spełnione w celu identyfikacji substancji sklasyfikowanych jako niedozwolone w moczu lub krwi badanych sportowców za pomocą procedur chromatograficznych połączonych ze spektrometrią mas. Kryteria te są podzielone na wymagania dotyczące rozdzielania i wykrywania w opisany niżej sposób:

Wymagania rozdzielania chromatograficznego. W przypadku kapilarnej GC czas retencji (R_t) analitu nie powinien się różnić o więcej niż 1% lub $\pm 0,2$ min (w zależności, która wartość jest mniejsza) w odniesieniu do tej samej substancji we wzbożonej próbce moczu. Dla techniki HPLC, R_t analitu nie powinien różnić się o więcej niż 2% lub $\pm 0,4$ min (w zależności, która wartość jest mniejsza) w odniesieniu do tej samej substancji we wzbożonej próbce moczu. Kryteria te mogą zostać złagodzone, jeżeli można wyjaśnić zmiany R_t (np. przez przeładowanie próbki).

Wymagania spektrometrii mas. Tryb pełnego przemiatania widma: preferowanym sposobem identyfikacji jest tryb pełnego lub częściowego przemiatania widma. Częściowe przemiatanie może rozpocząć się przy wartości m/z większej niż jakiegokolwiek intensywne jony pochodzące z odczynnika derywatyżującego lub reagenta wywołującego jonizację chemiczną. Wszystkie jony diagnostyczne o względnej intensywności większej niż 10% obserwowane w widmie odniesienia uzyskanym z materiału referencyjnego muszą być obecne w widmie nieznanego piksu. Względna intensywność trzech jonów diagnostycznych nie powinna różnić się o więcej niż określona wartość (patrz tabela I) relatywnych intensywności tych samych jonów obserwowanych w widmie referencyjnym (otrzymywanym z wzbożonego moczu, pobranej próbki odniesienia lub materiału referencyjnego). Nie jest dopuszczalne zbieranie dodatkowych jonów i używanie ich stosunków pomimo, że mieszczą się w zakresie zdefiniowanych tolerancji.

Jeżeli stosowane jest komputerowe wyszukiwanie lub dopasowanie przez biblioteki widm masowych, uzyskane wyniki powinny być sprawdzane przez wykwalifikowanego specjalistę.

Jeżeli nie są dostępne trzy jony diagnostyczne o względnej intensywności większej niż 5%, należy przygotować kolejną pochodną dostarczającą inne jony diagnostyczne lub zastosować drugą technikę jonizacji lub fragmentacji opartą na innych zasadach fizycznych. W każdym przypadku obowiązkowe dla każdego widma masowego są minimum dwa jony diagnostyczne.

W trybie SIM muszą być zarejestrowane co najmniej trzy jony diagnostyczne o stosunku sygnału do szumu > 3 dla najmniej intensywnego jonu. Względne intensywności jonów nie powinny różnić się o więcej niż określone wartości (patrz tabela I) relatywnych intensywności tych samych jonów obserwowanych w widmie referencyjnym

(otrzymywanym z wzbożonego moczu, pobranej próbki odniesienia lub materiału referencyjnego). Dla jonów diagnostycznych o względnej intensywności mniejszej niż 5% obserwowanej w widmie referencyjnym, jony te muszą być obecne w badanej próbce. Stężenia wykrytych związków powinny być porównywalne z tymi w próbce wzorcowej.

Jeżeli nie są dostępne trzy jony diagnostyczne, należy przygotować inną pochodną lub zastosować drugą technikę jonizacji lub fragmentacji opartą na innych zasadach fizycznych. W każdym przypadku obowiązkowe dla każdego widma masowego są minimum dwa jony diagnostyczne.

W technice MS-MS dane mogą być zbierane w trybie przemiatania całego widma lub monitorowania wybranych reakcji (SRM). Jon macierzysty powinien być obecny w obu trybach. Podczas monitorowania więcej niż jednego jonu potomnego względne intensywności którejkolwiek z jonów nie powinny się różnić o więcej niż wartość podana w tabeli I w stosunku do względnych intensywności zarejestrowanych dla wzbożonej próbki odniesienia. Stosunek sygnału do szumu dla najmniej intensywnego jonu powinien być większy niż 3. Dla jonów diagnostycznych o relatywnej intensywności mniejszej niż 5% obserwowanej w widmie referencyjnym, jony te muszą być obecne w badanej próbce. Tabela IV przedstawia podsumowane wymogi sformułowane przez różne organizacje.

5. Wnioski

Kryteria identyfikacji związków przy zastosowaniu chromatografii połączonej ze spektrometrią mas z pewnością nie są wryte w kamieniu jak dziesięć przykazań. Są raczej jak ruchomy cel zmieniający swoją pozycję w zależności od aktualnej wiedzy i ciągłego ustalania nowych wymogów, które różnią się w zależności od specyficznej dyscypliny i końcowego zadania analizy. Jest zrozumiałe, że najsurowsze wymogi określone są w tych dziedzinach, w których wyniki identyfikacji prowadzą do sankcji prawnych. Z tych powodów kilka organizacji wydało mniej lub bardziej szczegółowe warunki, zalecenia lub wytyczne, określające minimalne parametry konieczne do identyfikacji związku. Dokumenty te odnoszą się do aspektów analizy dotyczących zarówno chromatografii, jak i spektrometrii mas.

Istnieje powszechna zgoda w sprawie rodzaju parametrów, które mają być kontrolowane, jak np. czas retencji, liczba jonów lub stosunki intensywności jonów. Jednakże dokładne liczbowe kryteria sformułowane przez różne instytucje lub organizacje charakteryzują się pewnymi różnicami.

Zalecenia te, będące wynikiem wspólnej wiedzy w danej dyscyplinie, należy traktować jako chwilowy,

zamrożony obraz obecnej sytuacji w dziedzinie identyfikacji analitycznej. Jak napisał Hill: „informacje regulacyjne nie są substytutem dla dobrej nauki, stanowią one jednak ramy, które powinny zainicjować pytania: dlaczego i w jaki sposób?” [25]. Ekspert zaangażowany w badania identyfikacyjne musi przede wszystkim odpowiedzieć na pytanie: „czy zidentyfikowałem ten związek zgodnie z najlepszą wiedzą?” oprócz odpowiedzi na pytanie: „czy spełniłem wszystkie formalne warunki niezbędne dla identyfikacji?”. W tym miejscu zawodowa etyka styka się z zawodowymi kompetencjami.