

AKTUALISIERUNG VON PESTIZID-RETENTIONSZEITBIBLIOTHEKEN FÜR DEN AGILENT INTUVO 9000 GC



Vorgehensweise zur Aktualisierung von Retentionszeitbibliotheken auf Intuvo



Einführung

Bei der Anwendung von Methoden auf einem neuen Gaschromatographie (GC)-System empfiehlt sich vor Beginn der Erstellung eines typischen Arbeitsablaufs die Verifizierung der Retentionszeiten kritischer Analyten. Es kommt häufig vor, dass sich aufgrund einer unterschiedlichen Systemkonfiguration oder Säulenvariabilität Retentionszeiten zwischen zwei ähnlichen GC-Systemen unterscheiden. Mithilfe von Retention Time Locking (RT-Lock) lassen sich jedoch reproduzierbare Retentionszeiten zwischen mehreren Systemen sicherstellen.

Wenn eine Retentionszeit-Datenbank verwendet wird, in diesem Fall Pestizidanalysen mit Retentionszeiten aus einer MRM-Datenbank für Pestizide und Umweltschadstoffe, können zusätzliche Schritte unternommen werden, um sicherzustellen, dass die Retentionszeiten denen in der vorhandenen Datenbank entsprechen. Alternativ muss die analytische Methode mit den Retentionszeiten des neuen Systems aktualisiert werden.

Diese Technical Note enthält Anleitungen zum Retention Time Locking einer Methode zur Pestizidanalyse mit Multiple Reaction Monitoring (MRM) auf einem Agilent Intuvo 9000 GC-System und zur anschließenden Aktualisierung der Retentionszeiten zur Verwendung der MRM-Datenbank für Pestizide und Umweltschadstoffe.

Der allgemeine Arbeitsablauf für Extraktor- oder inerte Ionenquellen umfasst die folgenden Schritte:

1. Erstellung eines Chromatogramms mit Retention Time Locking.
2. Erfassung der Daten mit der dynamischen MRM-Methode und verbreiterten RT-Delta-Fenstern links/rechts.
3. Aktualisierung der Retentionszeiten mithilfe der Quantitative Analysis-Software.
4. Import neuer Retentionszeiten in die dynamische MRM-Methode.
5. Validierung der Methode.

Weitere Informationen finden Sie unter:

www.agilent.com



Agilent Technologies

Retention Time Locking

Bei der Konfiguration eines neuen Systems zur Duplizierung einer Pestizidanalyse sorgt RTL für eine Übereinstimmung der Retentionszeiten zwischen den beiden Systemen. Bei der Aufzeichnung der RTL-Kalibrierung erfasst das System fünf Datendateien mit verschiedenen Flussraten oder Drücken (Abb. 1).

Vor der Aufzeichnung der RTL-Kalibrierungsdaten wurden die Masse(n) der RTL-Verbindung und die Probenflaschennummer des Standards mit der Locking-Verbindung eingegeben. Bei Pestizidanalysen wird oftmals Chlorpyrifosmethyl als Locking-Verbindung verwendet. Aus dem Massenspektrum wurden gescannte Massen für das Locking für Chlorpyrifosmethyl ausgewählt, dessen Retentionszeit bei einer 20-minütigen Methode in der Regel bei 9,143 fixiert wird. Dieser Vorgang dauert bei einer typischen 20-minütigen Pestizidanalyse ungefähr 3 Stunden, einschließlich des anfänglichen Clean Out-Durchlaufs, um sicherstellen, dass keine Analytrückstände aus vorhergehenden Läufen verschleppt werden, die unter Umständen die Massen der RTL-Verbindung stören könnten.

Nach der Erfassung der RTL-Kalibrierungsdaten wurden die Retentionszeiten der Locking-Verbindung eingegeben und die Flussraten wurden angepasst (aus den Kalibrierungsdaten), um die gewünschte Retentionszeit zu erhalten (Abb. 2).

Erfassung der Daten mit dynamischem MRM

Nach dem Retention Time Locking des neuen Systems wurden die Retentionszeiten kritischer Verbindungen im gesamten Chromatogramm hinsichtlich der Genauigkeit des MRM-Fensters überprüft. Die MRM-Methode wurde in eine dynamische MRM-Methode umgewandelt (Abb. 3).

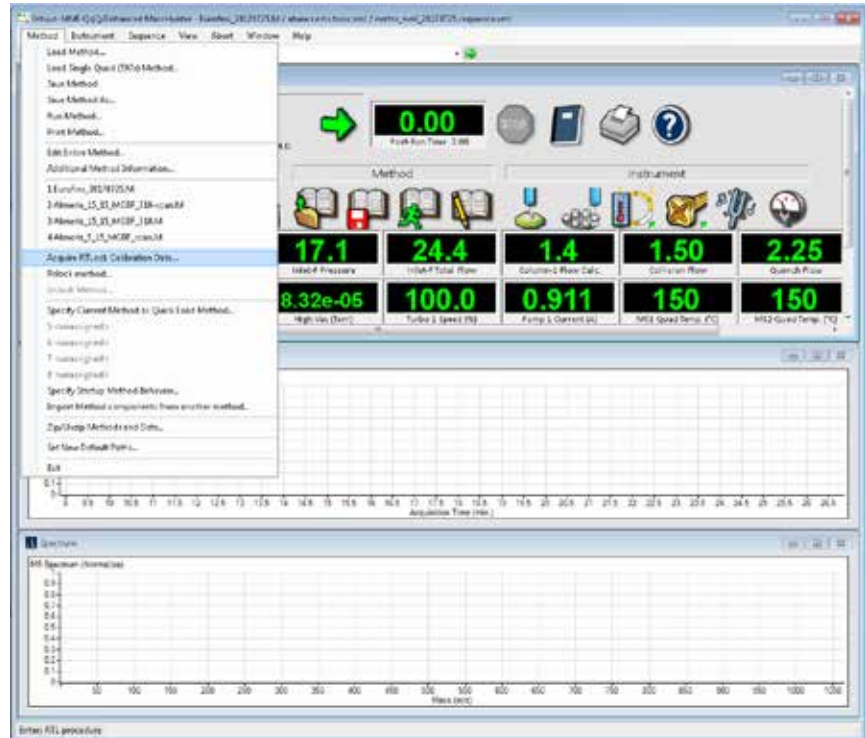


Abbildung 1. Der Befehl **RTL-Kalibrierungsdaten aufnehmen (Acquire RTL Calibration Data)** kann direkt aus der Methodenliste gewählt werden. Er dient der Aufnahme neuer RTL-Kalibrierungsdaten. Nach Abschluss der anfänglichen Kalibrierung kann der Befehl **Methode erneut sperren (Relock Method)** verwendet werden.

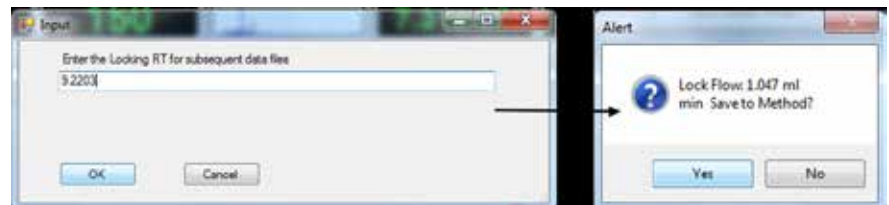


Abbildung 2. Es wird die gewünschte Retentionszeit der Locking-Verbindung eingegeben, und das System nimmt eine Anpassung der Flussrate vor, um die ausgewählte Retentionszeit zu erreichen.

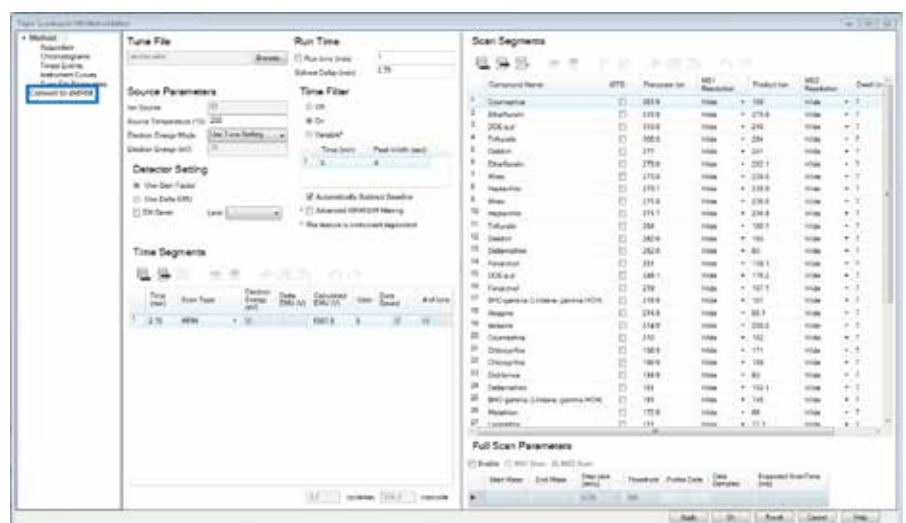


Abbildung 3. Eine Zeitsegment-basierte MRM-Methode wurde mithilfe der Agilent MassHunter-Datenaufnahmesoftware problemlos in eine dynamische MRM-Methode umgewandelt.

Indem vorhandene MRMs verwendet wurden, behielt die neue dynamische MRM-Methode die vorhandenen Übergänge bei. Die Software berechnete die Analyt-Retentionszeiten durch Mitteln der vorab angegebenen Start- und Endzeit jedes Segments (Abb. 4).

Bei der dynamischen MRM-Methode wurden mithilfe der Funktion zum Überschreiben von RT-Delta (**Overwrite RT Delta**) das linke und das rechte Delta-Fenster allgemein auf 2 Minuten verbreitert (Abb. 5).

Je nach der Anzahl der Verbindungen und Übergänge bei der dynamischen MRM-Methode werden die maximalen gleichzeitigen MRMs (200) mitunter überschritten (Abb. 6).

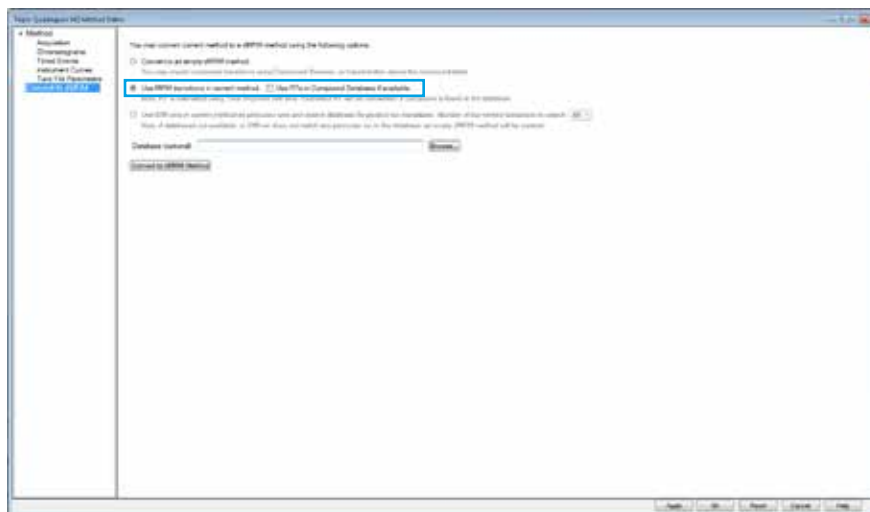


Abbildung 4. Bei der Umwandlung der Methode in eine dynamische MRM-Methode wurden die MRM-Übergänge aus der aktuellen Methode verwendet.

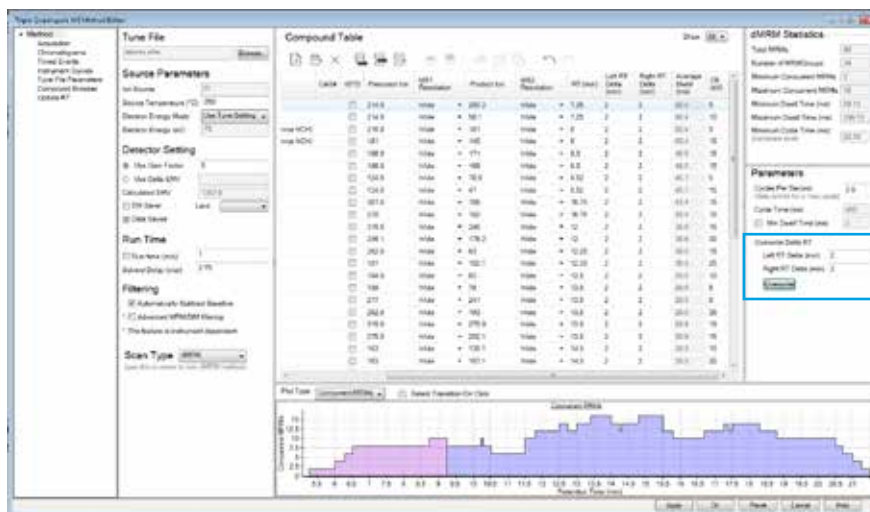


Abbildung 5. Ein allgemeines Überschreiben des linken und rechten Retentionszeit-Deltas verbreitert die Fenster mit den MRM-Übergängen, um sicherzustellen, dass alle Analyten detektiert werden, auch wenn sich ihre Retentionszeit leicht verschoben hat.



Abbildung 6. Eine dynamische MRM-Methode mit einer großen Anzahl an Analyten und Übergängen überschreitet die Anzahl an gleichzeitigen MRMs bei Festlegung des linken und des rechten Retentionszeit-Deltas auf 2 Minuten.

Das linke und das rechte RT-Delta-Fenster wurden auf 1 Minute oder 0,5 Minuten verkleinert, um die Anzahl gleichzeitiger MRMs unter Beibehaltung einer ausreichenden Fensterbreite zur Identifizierung der Zielanalyten zu reduzieren. Die aktuellen Retentionszeiten wurden als CSV-Datei gespeichert (Abb. 7).

Aktualisierung von Retentionszeiten

Unter Verwendung der Agilent MassHunter Quantitative Analysis-Software wurde mit den verbreiterten Fenstern ein Standard analysiert, und die Retentionszeiten wurden in einer vorhandenen quantitativen Analysemethode aktualisiert. Bei geöffnetem und ausgewähltem Batch mit dem neuen Standard wurde eine bereits gespeicherte quantitative Methode geladen. In der Methoden-Editor-Ansicht wurde aus dem Aktualisierungsmenü **Retentionszeiten aktualisieren (Update Retention Times)** ausgewählt (Abb. 8). Mit **Alle auswählen (Select All)** wurden alle Retentionszeiten in der vorhandenen Methode aktualisiert. Anschließend wurde die Methode gespeichert, validiert und auf das Batch angewendet (Abb. 9).



Abbildung 7. Die Verbindungstabelle der dynamischen MRM-Methode wurde exportiert, indem auf das Symbol **Speichern (Save)** geklickt und die Tabelle lokal als CSV-Datei gespeichert wurde.

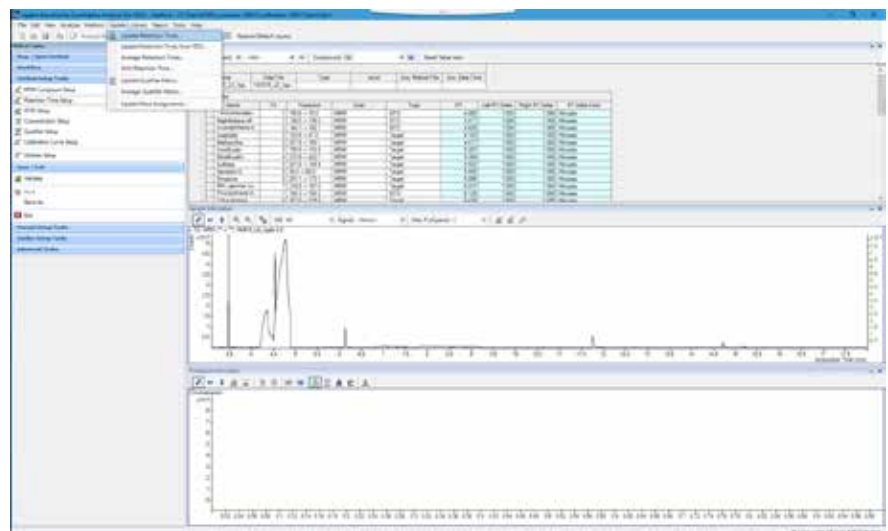


Abbildung 8. **Retentionszeiten aktualisieren (Update Retention Times)** wurde in der Methoden-Editor-Ansicht aus dem Menü **Aktualisieren (Update)** in Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis aufgerufen.

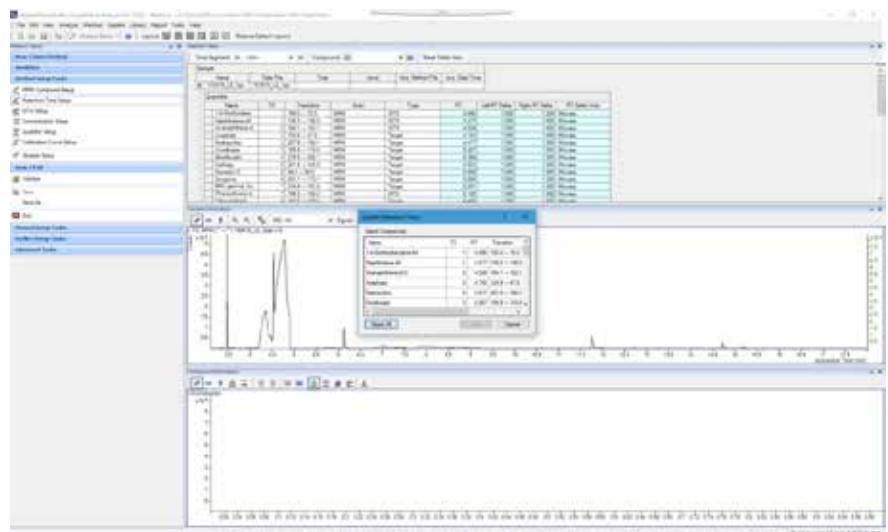


Abbildung 9. Alle Analyte in der angegebenen Methode wurden in einem Arbeitsschritt aus einem Standard-Durchlauf aktualisiert.

Import neuer Retentionszeiten in die dynamische MRM-Methode

Nach der Aktualisierung von Retentionszeiten in der quantitativen Methode wurde die Verbindungstabelle aus dem Batch in eine CSV-Datei exportiert (Abb. 10).

Die zuvor exportierte und gespeicherte CSV-Datei aus der dynamischen MRM-Methode wurde mit den neuen Retentionszeiten aus der Analyse des Standards und der neuen quantitativen Methode aktualisiert und unter einem neuen Namen gespeichert (Abb. 11). Die kritischen Datenelemente in der CSV-Datei sind die Spalte mit den Verbindungen und die Spalte mit den RT.

Die Retentionszeiten in der dynamischen MRM-Methode wurden im MassHunter Acquisition-Methoden-Editor aus der neuen CSV-Datei aktualisiert (Abb. 12).

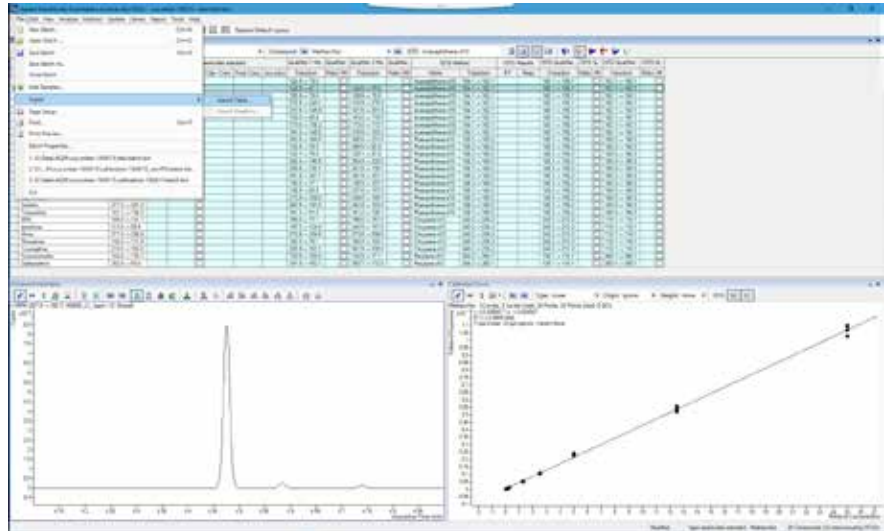


Abbildung 10. Die Verbindungstabelle wurde in eine lokal gespeicherte CSV-Datei exportiert.

Compound Name	Retention Time (min)
1. Standard	1.50
2. Standard	1.50
3. Standard	1.50
4. Standard	1.50
5. Standard	1.50
6. Standard	1.50
7. Standard	1.50
8. Standard	1.50
9. Standard	1.50
10. Standard	1.50
11. Standard	1.50
12. Standard	1.50
13. Standard	1.50
14. Standard	1.50
15. Standard	1.50
16. Standard	1.50
17. Standard	1.50
18. Standard	1.50
19. Standard	1.50
20. Standard	1.50
21. Standard	1.50
22. Standard	1.50
23. Standard	1.50
24. Standard	1.50
25. Standard	1.50
26. Standard	1.50
27. Standard	1.50
28. Standard	1.50
29. Standard	1.50
30. Standard	1.50
31. Standard	1.50
32. Standard	1.50
33. Standard	1.50
34. Standard	1.50
35. Standard	1.50
36. Standard	1.50
37. Standard	1.50
38. Standard	1.50
39. Standard	1.50
40. Standard	1.50
41. Standard	1.50
42. Standard	1.50
43. Standard	1.50
44. Standard	1.50
45. Standard	1.50
46. Standard	1.50
47. Standard	1.50
48. Standard	1.50
49. Standard	1.50
50. Standard	1.50
51. Standard	1.50
52. Standard	1.50
53. Standard	1.50
54. Standard	1.50
55. Standard	1.50
56. Standard	1.50
57. Standard	1.50
58. Standard	1.50
59. Standard	1.50
60. Standard	1.50
61. Standard	1.50
62. Standard	1.50
63. Standard	1.50
64. Standard	1.50
65. Standard	1.50
66. Standard	1.50
67. Standard	1.50
68. Standard	1.50
69. Standard	1.50
70. Standard	1.50
71. Standard	1.50
72. Standard	1.50
73. Standard	1.50
74. Standard	1.50
75. Standard	1.50
76. Standard	1.50
77. Standard	1.50
78. Standard	1.50
79. Standard	1.50
80. Standard	1.50
81. Standard	1.50
82. Standard	1.50
83. Standard	1.50
84. Standard	1.50
85. Standard	1.50
86. Standard	1.50
87. Standard	1.50
88. Standard	1.50
89. Standard	1.50
90. Standard	1.50
91. Standard	1.50
92. Standard	1.50
93. Standard	1.50
94. Standard	1.50
95. Standard	1.50
96. Standard	1.50
97. Standard	1.50
98. Standard	1.50
99. Standard	1.50
100. Standard	1.50

Abbildung 11. Die exportierte CSV-Datei mit der dynamischen MRM-Methode enthält in einer Spalte den Verbindungsnamen und in einer anderen Spalte die Retentionszeit. In diesem Beispiel ist jeder MRM-Übergang mit der Retentionszeit der jeweiligen Verbindung abgeglichen.

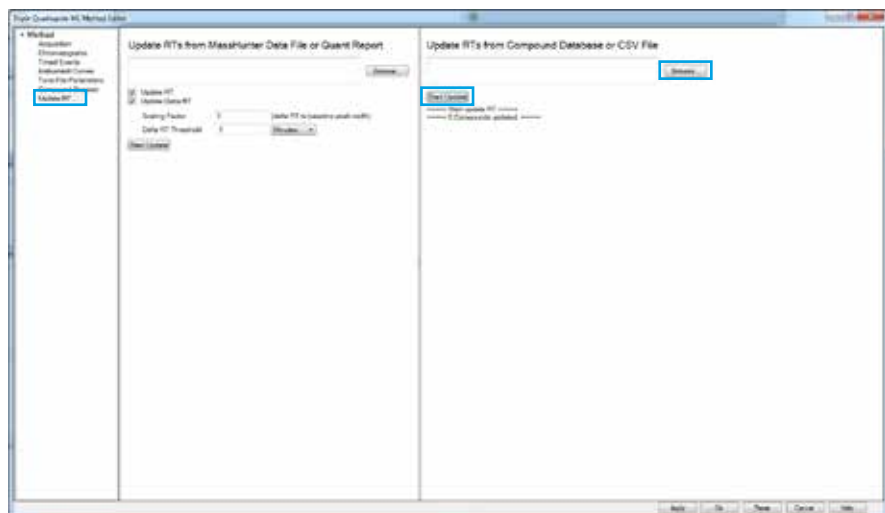


Abbildung 12. Als Datei zum Aktualisieren der RT wurde die gespeicherte CSV-Datei mit den aktualisierten Retentionszeiten verwendet.

Mit der Funktion **RT aktualisieren (Update RT)** wurde die gespeicherte CSV-Datei vor Beginn des Updates ausgewählt. Nach dem Aktualisieren der Retentionszeiten wurde die Verbindungsliste angezeigt und gab die geänderten Retentionszeiten wieder (Abb. 13). Die vorhergehenden Retentionszeiten der Methode sind in Klammern gelistet.

Alternativ können die Retentionszeiten mit einem ähnlichen Verfahren aus einem quantitativen Bericht aktualisiert werden. Mit der Quantitative Analysis-Software wurde ein Bericht erstellt (Abb. 14) und verwendet, um die Retentionszeiten im Datenaufnahmefunktion-Editor zu aktualisieren.

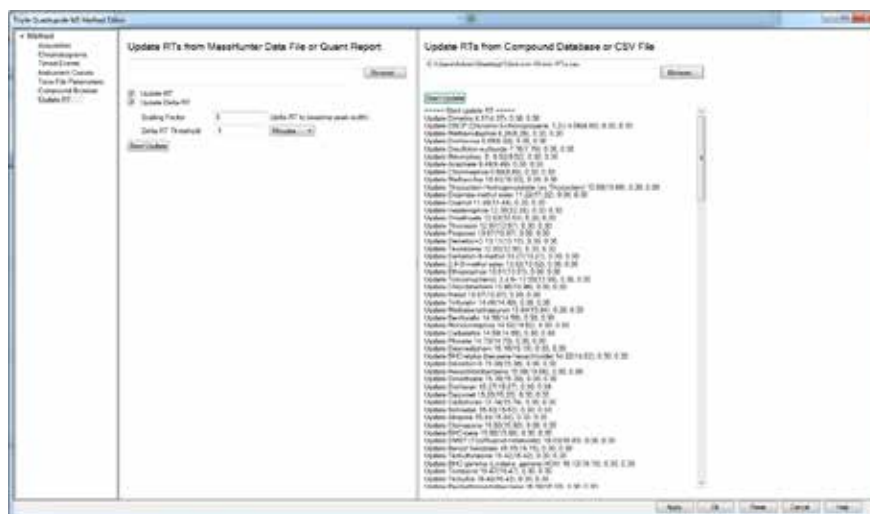


Abbildung 13. Nach dem Aktualisieren der Retentionszeiten wurde die Verbindungsliste unter Angabe der durchgeführten Änderungen angezeigt.

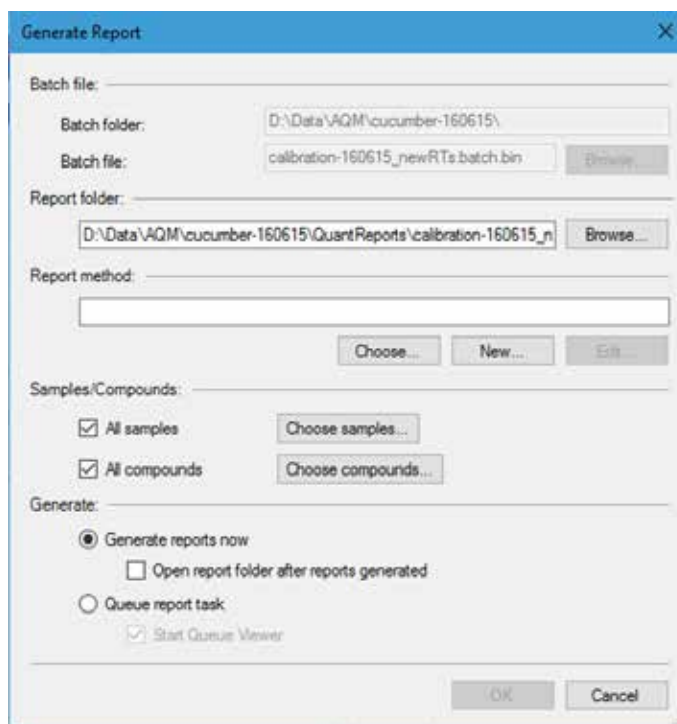


Abbildung 14. Die Erstellung eines Berichts in Quantitative Analysis ist eine andere Möglichkeit zur Aktualisierung der Retentionszeiten in der Datenaufnahmefunktion.

Wenn als endgültige aktualisierte Methode eine Zeitsegment-basierte MRM-Methode bevorzugt wird, kann ausgehend von der aktualisierten quantitativen Methode eine Datei mit den Übergängen erstellt werden (Abb. 15). Durch Spezifizierung eines Zeitsegment-Schemas (Abb. 16) kann die resultierende Datei in die Verbindungstabelle importiert werden (Abb. 17).

Validierung der Methode

Nach der Anwendung der Änderungen auf die Methode wurde der Standard verifiziert, bevor mit der Kalibrierung und der Probenanalyse fortgefahren wurde.

Schlussfolgerungen

Es wurde ein Schritt-für-Schritt-Verfahren für das Retention Time Locking und die Aktualisierung von Retentionszeiten in einer Bibliothek oder Datenbankmethode gezeigt. Der Vorgang war relativ einfach und zielgerichtet. Über die Retention Time Locking-Kalibrierung hinaus war ein zusätzlicher Analysedurchgang erforderlich. Zur Optimierung dieses Prozesses wird ein Standard oder eine Probe mit bekannten Zielanalyten benötigt.

Diese Ergebnisse können je nachdem, welche Ionenquelle in dem Massenspektrometer installiert ist, variieren. Wenn die Methode hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit optimiert wird, können die höheren Flussraten, die aller Voraussicht nach mit diesem Verfahren erzielt werden, zu einer suboptimalen Leistung führen.

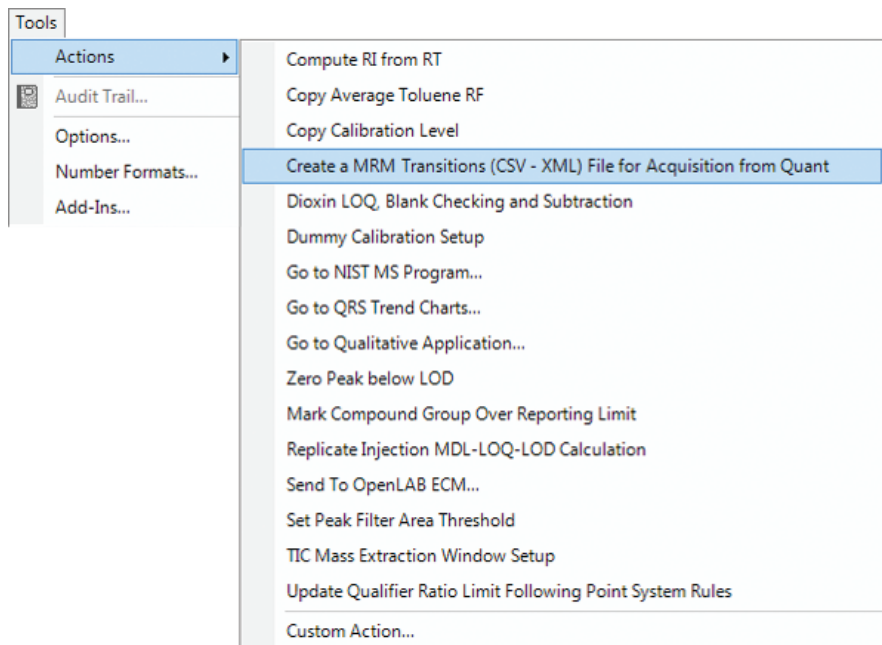


Abbildung 15. Eine CSV- oder XML-Datei mit aktualisierten Retentionszeiten und bestehenden MRM-Übergängen in der neuen quantitativen Methode.

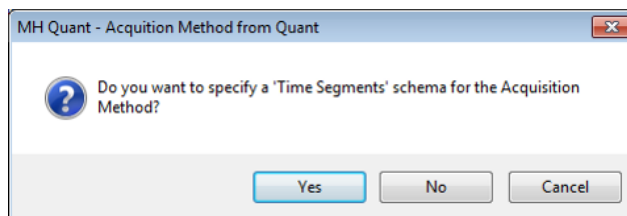


Abbildung 16. Durch die Auswahl von **Ja (Yes)** bei **'Zeitsegmente'-Schema angeben (specify a 'Time Segments' schema)** kann die CSV-Datei in die Verbindungstabelle einer Zeitsegment-basierten MRM-Methode importiert werden.

	Import Compound List	CAS#	ISTD	Precursor Ion	MS1 Resolution	Product Ion	MS2 Resolution	RT (min)
1	☒ Dimetox		☒	154	Unit	= 58	Unit	= 4.06
2	☒ Dimetox		☒	153	Unit	= 110	Unit	= 4.06
3	☒ Dimetox		☒	111	Unit	= 109.9	Unit	= 4.06
4	☒ DBCP (Dibromo-3-chloropropane, 1,2-)		☒	157	Unit	= 77	Unit	= 4.33
5	☒ DBCP (Dibromo-3-chloropropane, 1,2-)		☒	157	Unit	= 75	Unit	= 4.33
6	☒ DBCP (Dibromo-3-chloropropane, 1,2-)		☒	155	Unit	= 75	Unit	= 4.33
7	☒ Methamidophos		☒	141	Unit	= 95	Unit	= 4.95
8	☒ Methamidophos		☒	141	Unit	= 80	Unit	= 4.95
9	☒ Methamidophos		☒	141	Unit	= 64	Unit	= 4.95
10	☒ Dichlorvos		☒	184.9	Unit	= 93	Unit	= 5.06
11	☒ Dichlorvos		☒	144.9	Unit	= 109	Unit	= 5.06
12	☒ Dichlorvos		☒	109	Unit	= 79	Unit	= 5.06
13	☒ Disulfoton-sulfoxide		☒	125	Unit	= 96.9	Unit	= 5.5
14	☒ Disulfoton-sulfoxide		☒	96.9	Unit	= 64.9	Unit	= 5.5
15	☒ Disulfoton-sulfoxide		☒	96.9	Unit	= 47	Unit	= 5.5
16	☒ Mevinphos, E-		☒	127	Unit	= 109	Unit	= 6.05
17	☒ Mevinphos, E-		☒	127	Unit	= 94.9	Unit	= 6.05
18	☒ Mevinphos, E-		☒	109	Unit	= 78.9	Unit	= 6.05
19	☒ Acephate		☒	136	Unit	= 94	Unit	= 6.08
20	☒ Acephate		☒	94	Unit	= 64	Unit	= 6.08
21	☒ Acephate		☒	78.9	Unit	= 47	Unit	= 6.08
22	☒ Chlorfenvos		☒	153.9	Unit	= 121.1	Unit	= 6.18

Abbildung 17. Die CSV-Datei mit aktualisierten Retentionszeiten aus Quantitative Analysis kann in die Datenaufnahmemethode mit Zeitsegment-basierten MRMs importiert werden.

www.agilent.com
Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2017
Gedruckt in den USA, 29. September 2017
5991-8446DEE



Agilent Technologies