

К. ВАЙНЕР, Г. ПРЕСТ

## ФИКСАЦИЯ ВРЕМЁН УДЕРЖИВАНИЯ: СОЗДАНИЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛЬСКИХ RTL-БИБЛИОТЕК ДЛЯ СКРИНИНГА АНАЛИЗИРУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ

### Введение

Программа фиксации времён удерживания (Retention Time Locking – RTL) является мощным средством обеспечения воспроизводимости времён удерживания при использовании разных газовых хроматографов (ГХ) модели «6890» фирмы *Agilent Technologies* (в дальнейшем – *Agilent*), независимо от метода детектирования [1–3]. На отдельно взятом ГХ модели «6890» программа RTL может служить для воспроизведения исходного значения времени удерживания конкретного соединения после технического обслуживания прибора – замены или укорачивания колонки. Особенно удобно использовать программу RTL для анализа методом ГХ-МС, поскольку, благодаря применению пакета программ «MSD Productivity Chemstation» (версия B.01.00), достигается высокая степень автоматизации RTL [4] и устраняется необходимость всякий раз обновлять методику сбора данных и соответствующие базы данных для получения количественных результатов при использовании в ГХ-МС режима мониторинга отдельных ионов (SIM).

Программа фиксации времён удерживания позволила создать оригинальную методику ГХ-МС и соответствующую библиотеку (номер по каталогу – G1049A), позволяющие осуществлять «скрининг» (быстрое, без больших трудозатрат выявление наличия соединений в пробах) на содержание 567 пестицидов и других химических соединений, представляющих экологический интерес [6]. После накопления данных ГХ-МС по упомянутой методике (RTLPEST.M), программа скрининга с RTL сравнивает имеющиеся в базе данных хроматографические пики в узком диапазоне времени в районах ожидаемых времён удерживания соединений со значениями из файла данных, полученных при проведении опытов. Соотношения концентраций ионов и времен удерживания используются в качестве критериев «соответствия» и «возможного соответствия». В одном из окон программа скрининга («Screener») отображает хроматограмму, извлеченную из хромато-

граммы по полному ионному току, для выбранного иона из спектра, характерного для данного соединения, в другом – фактически полученные и ожидаемые значения соотношений концентраций ионов для этого соединения (рис. 1). При этом пользователь получает весьма полные данные, содержащие значения времени удерживания и масс-спектрометрическую информацию, по результатам идентификации и подтверждения наличия конкретного соединения. Высокая эффективность такого подхода к задаче расширения спектра пестицидов, обнаруживаемых в пищевых продуктах, была подтверждена на практике.

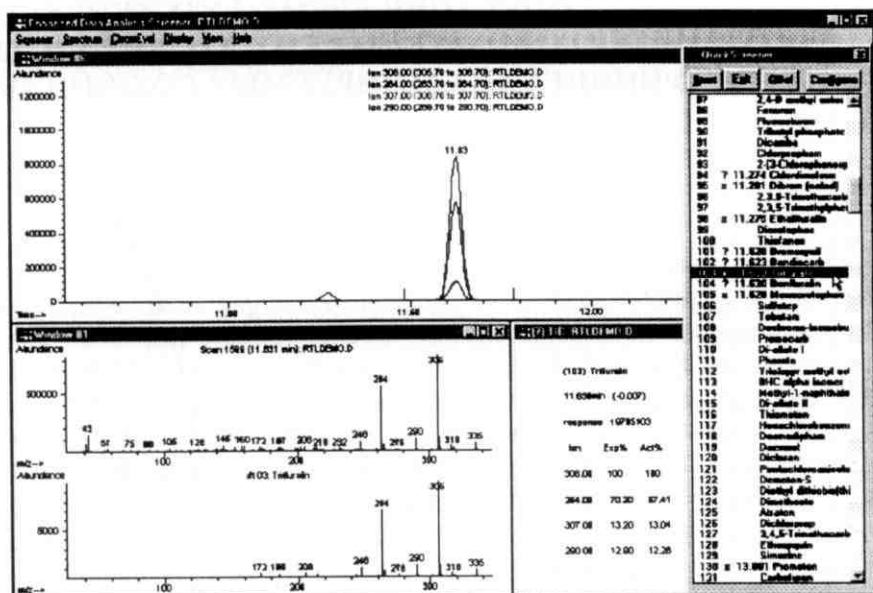


Рис. 1. Окна с результатами работы программы «Screener».

- a* – хроматограмма, извлечённая из хроматограммы по полному ионному току, для выбранного иона;  
*b* – окно результатов совпадения; *в* – масс-спектр пика пробы;  
*г* – библиотечный масс-спектр анализируемого соединения

Поскольку пользователи решают свои аналитические задачи и разрабатывают собственные методики, возможности программы RTL позволяет создавать свои собственные библиотеки для скрининга большого количества веществ в пробах, поэтому в пакет программ «ChemStation» была включена функция создания собственных RTL-библиотек. В настоящей работе описан порядок разработки таких библиотек. Поскольку указанный порядок предполагает создание библиотеки масс-спектров, в предлагаемой публикации описано также, каким образом создаются пользовательские RTL-библиотеки на основе масс-спектров, полученных при проведении опытов.

Следует отметить, что библиотеки с RTL, предназначенные для целей скрининга, не рассчитаны на количественный анализ, а поэтому такое их

применение не предполагается. Если количественное определение представляет интерес, более целесообразным подходом является разработка базы данных количественного определения для методики ГХ-МС с RTL.

### **Требования к программному обеспечению**

Для создания RTL-библиотеки необходим пакет программ «MSD Productivity Chemstation» (редакция В.01.00 или более новая). В настоящей публикации использованы изображения с экранов версии С.00.00.

### **Порядок работы**

Предполагается, что оператор имеет опыт эксплуатации или, по меньшей мере, знание программы «Screener» пакета «MSD ChemStation» [6]), либо изучил справочную систему к программе, а также знаком с основными принципами пользования пакетом программ расширенного анализа данных «Enhanced Data Analysis».

Порядок работы весьма прост и состоит из трёх этапов: разработки методики ГХ-МС с RTL [3], создания библиотеки масс-спектров (по данным, полученным при помощи методики ГХ-МС с RTL на реальных пробах) и преобразования библиотеки в базу данных для скрининга. Прежде чем приступить к созданию библиотеки масс-спектров, необходимо располагать информацией о наименовании вещества, его химической формуле (не обязательно), молекулярной массе (не обязательно), номере вещества по каталогу «Chemical Abstracts Registry Service» (CAS) (не обязательно) и временах удерживания всех пиков в секундах. Эту информацию можно получить посредством интегрирования хроматограммы и библиотечного поиска по пикам (с преобразованием времени выхода пика из минут в секунды).

### **Разработка методики ГХ-МС с фиксацией времён удерживания**

Последовательность шагов по фиксации времён удерживания после разработки самой методики анализа описана в [4]. При этом важно, во-первых, иметь достаточный опыт работы с анализируемыми пробами. Методика должна обеспечивать разделение всех соединений в течение оптимального времени. Во-вторых, следует правильно выбрать именно то соединение, по которому осуществляется фиксация времён удерживания. В идеале фиксацию целесообразно осуществлять по внутреннему стандарту или другому веществу, о котором известно, что оно присутствует во всех пробах и элюируется в середине хроматографического опыта.

### **Создание библиотеки масс-спектров**

Для создания библиотеки масс-спектров необходимо выполнить следующие действия:

1) открыть раздел расширенного анализа данных, загрузить методику с RTL и файл полученных по этой методике данных;

2) в меню «SPECTRUM» (спектр) выбрать команду «EDIT LIBRARY» (редактировать библиотеку) (рис. 2);

3) открыть окно с заголовком «EDIT PBM LIBRARY» (редактирование библиотеки PBM), в котором имеется возможность выбора из нескольких режимов;

4) нажать кнопку «CREATE LIBRARY» (создать библиотеку) (рис. 3);

5) ввести новое имя библиотеки (не более восьми символов) в виде «filename.L» и сохранить в каталоге баз данных (рис. 4).

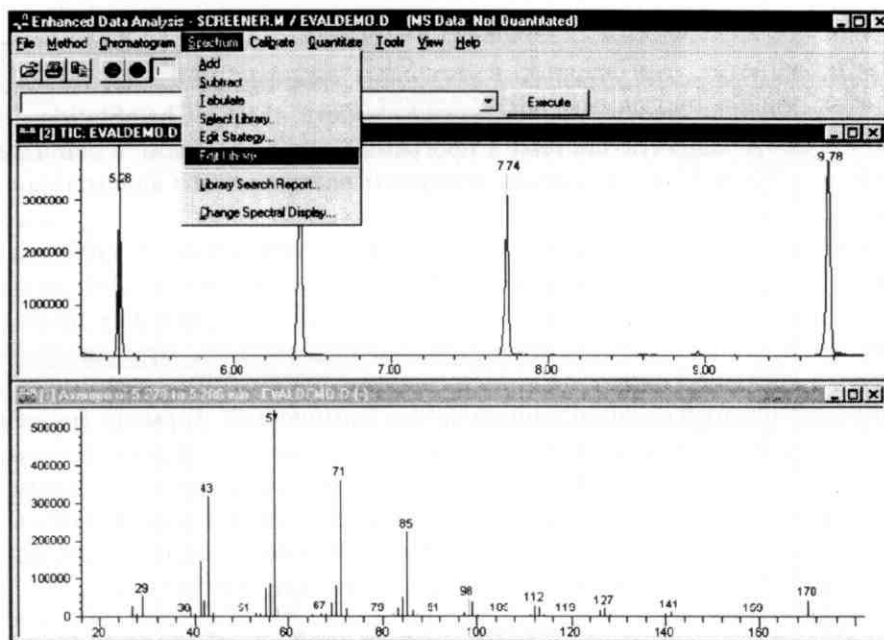


Рис. 2. Выбор команды меню «EDIT LIBRARY» (редактировать библиотеку)

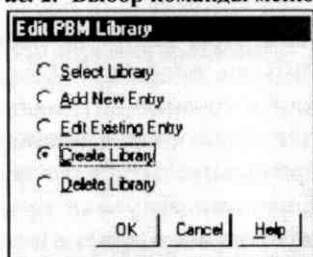


Рис. 3. Выбор команды меню «CREATE LIBRARY» (создать библиотеку)

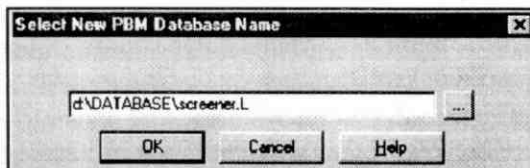


Рис. 4. Присвоение имени библиотеке скрининга PBM

Чтобы добавить запись в библиотеку, необходимо дважды щёлкнуть клавишей мыши на TIC (полный ионный ток) в окне 2. Масс-спектр отображается в окне 1 (спектр помещается в регистр стека X). Чтобы вывести на экран содержимое стека, в командной строке следует ввести «STACK» и на-

жать на клавишу «Enter». У оператора имеется возможность использовать масс-спектр на вершине пика, усреднённый по всему пику или с вычитанием фона. В меню «SPECTRUM» (спектр) необходимо выбрать команду «EDIT LIBRARY» (редактировать библиотеку) в результате чего открывается окно с заголовком «EDIT PBM LIBRARY» (редактирование библиотеки PBM), в котором имеется возможность выбора из нескольких режимов. Далее необходимо нажать кнопку «ADD NEW ENTRY» (добавить новую запись) (рис. 5).

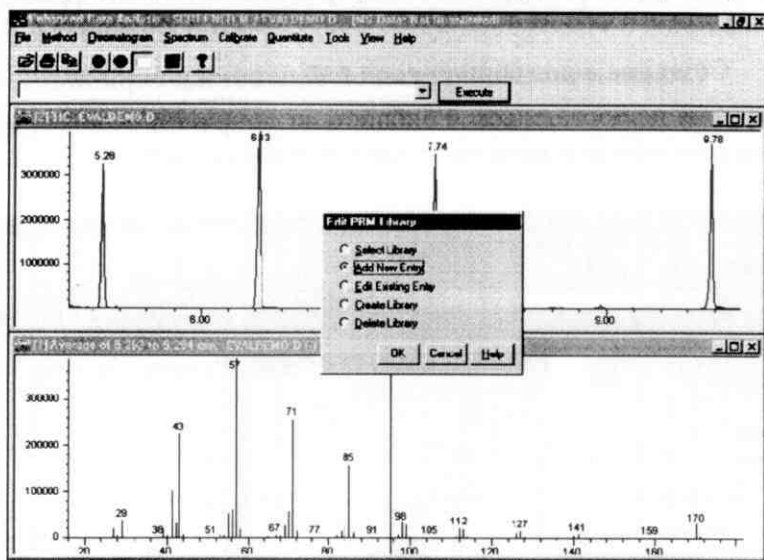


Рис. 5. Занесение записи в библиотеку

При этом открывается окно с заголовком «NEW ENTRY» (новая запись) и полями для масс-спектра «Name» (наименование), «Mol. Formula» (химическая формула) (заполнять не обязательно), «Mol. Weight» (молекулярная масса) и «Ret. Index» (время удерживания) (рис. 6).

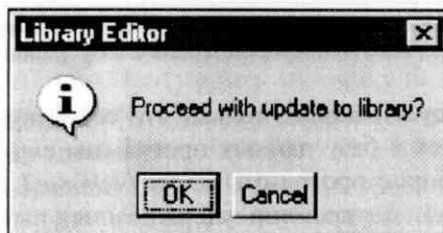


Рис. 6. Обновление библиотеки

**Обязательны** для заполнения следующие поля: «Name» (наименование), «Mol. Weight» (молекулярная масса) и «Ret. Index» (время удерживания). Если молекулярная масса неизвестна, следует ввести «9999». Значение времени удерживания пика (измеренное по вершине) необходимо ввести в се-

кундах. После ввода информации в соответствующие поля нажать «ОК», после чего программа обновит библиотеку (рис. 7). Прежде чем выбрать следующий спектр, необходимо выйти из режима записи в библиотеку. Затем перейти к следующему пику, выбрать спектр и повторить описанные действия по всему файлу данных, пока в базу данных не будут занесены все соединения (не обязательно в порядке времён удерживания). Если имеются другие файлы данных, содержащие информацию об анализируемых соединениях, загрузить эти файлы и добавить масс-спектры в библиотеку.

### Создание пользовательской библиотеки скрининга

Для создания пользовательской библиотеки скрининга необходимо в командной строке ввести и запустить команду *makescreendb* (рис. 7).

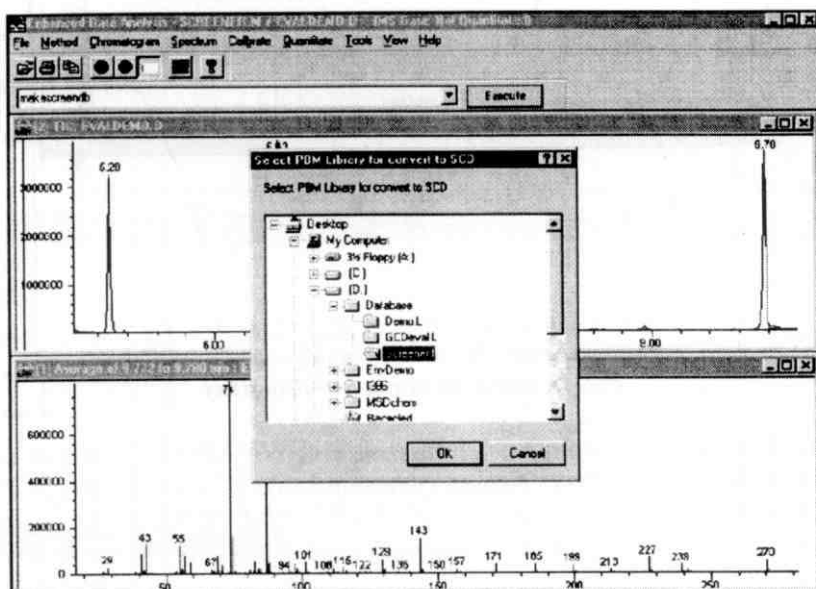


Рис. 7. Выбор вновь созданной библиотеки, подлежащей преобразованию в базу данных

Программа потребует выбрать только что созданную библиотеку PBM, чтобы преобразовать её в базу данных программы скрининга (SCD). Когда на экране появится запрос программы «Sort filename.L by Retention Time?» (сортировать filename.L по времени удерживания), выбрать кнопку «YES»

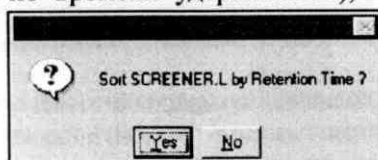


Рис. 8. Сортировка библиотеки

(да) (рис. 8), вследствие чего открывается окно с запросом на ввод имени файла SCD и каталога, в который его нужно записать (рис. 9).

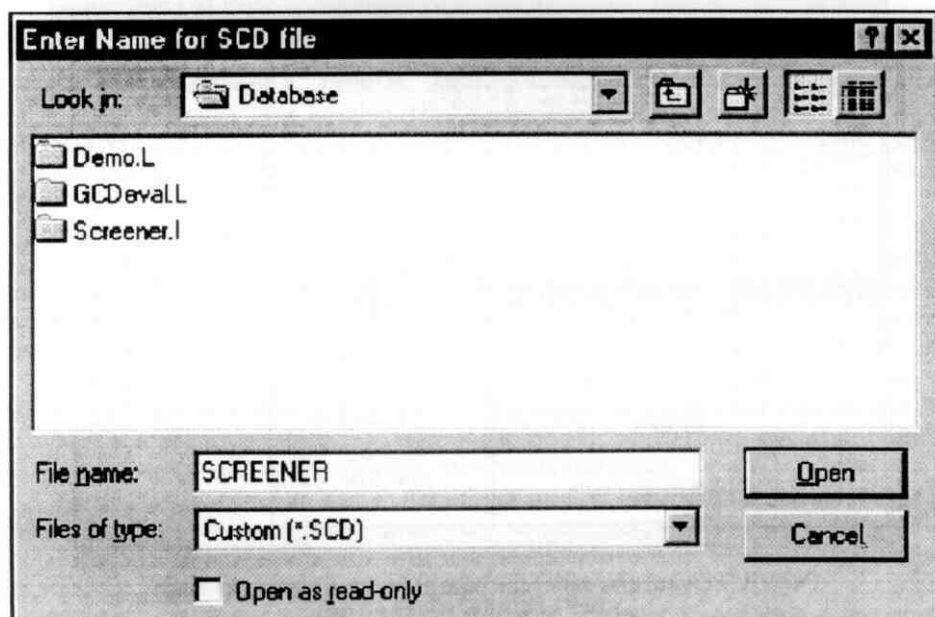


Рис. 9. Выбор названия библиотеки для программы скрининга

### Проверка пользовательской библиотеки скрининга

Для проверки пользовательской библиотеки скрининга необходимо выполнить следующие действия. Для проверки содержимого файла «filename.SCD» в меню «TOOLS» (инструменты) нужно выбрать команду «LIST SCREEN DATABASE» (вывести базу данных скрининга в виде списка). На экран выводится перечень соединений с характеристическими ионами в порядке значений времени удерживания (рис. 10).

Чтобы соотнести библиотеку скрининга с конкретной методикой RTL, в меню «TOOLS» (инструменты) нужно выбрать команду «SPECIFY METHOD SCREEN DATABASE» (указать методику базы данных для скрининга) и выбрать нужный файл «filename.SCD». Загрузить файл данными, накопленными по методике с фиксацией, затем в меню «TOOLS» (инструменты) выбрать команду «CREATE SCREEN RESULTS FOR THE CURRENT FILE» (создать результаты скрининга для текущего файла).

Далее в меню «VIEW» (просмотр) выбрать «RESULT SCREENER» (программа скрининга результатов), после чего открывается окно программы скрининга «Screener» с обозначениями всех соединений в файле данных, если именно этот файл был использован для построения базы данных (рис. 11).

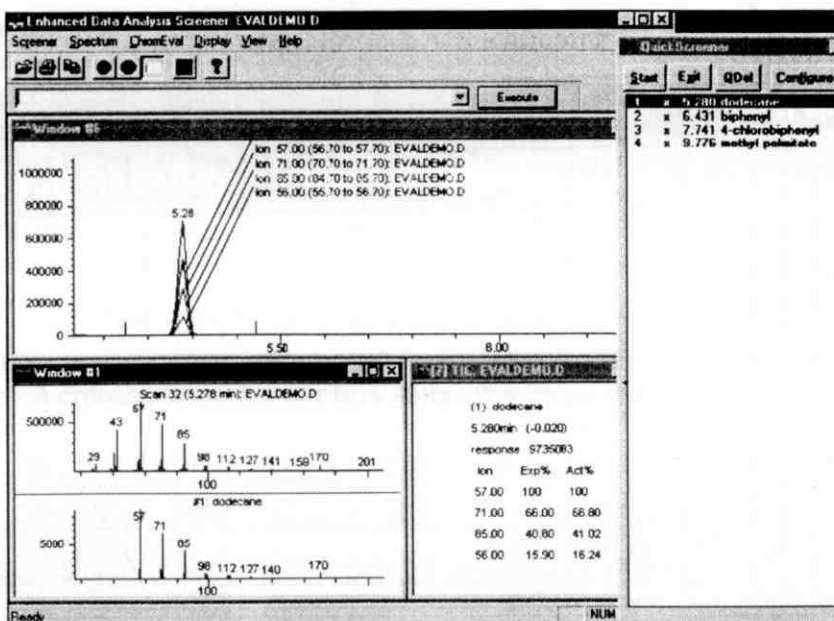


Рис. 10. Результаты действия программы по команде меню «LIST SCREEN DATABASE»

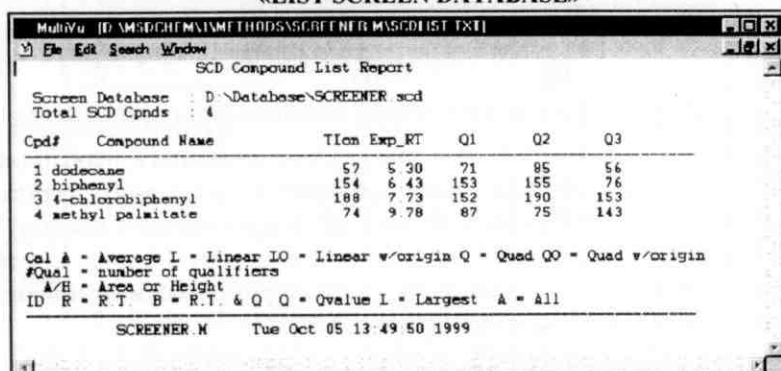


Рис. 11. Результаты для загруженного файла данных «EVALDEMO.D»

### Предлагаемый подход

Прежде чем перейти к использованию всего вышеописанного порядка действий, следует испытать работу программы с помощью файла «EVALDEMO.D» в каталоге «DATA». В файле содержатся результаты анализа четырёхкомпонентной смеси (додекан, дифенил, 4-хлордифенил и метилпальмитат), что позволяет оператору быстро выполнить все действия, необходимые для создания RTL-библиотеки (кроме разработки методики самого анализа с RTL для получения данных). Прежде чем испытывать программу скрининга, эта краткая библиотека должна быть приведена в соответствие с методикой RTL, поэтому необходимо загрузить в программу для анализа данных методику «RTLPESTF.M»



или «RTLPESTB.M», присоединить базу данных скрининга «TEST.SCD» и сохранить методику под именем «TEST.M».

### *Литература*

1. *Chang I. and Treese C. (Чан И., Триз К.)*. Enhanced Reliability of Forensic Drug Testing Using Retention Time Locking (Повышение надёжности определения наркотических веществ в судебно-медицинской экспертизе путём использования фиксации времён удерживания). Техническая информация 228–393, публикация (23) 5966–2494E, январь 1998 г.

2. *Quimby B. D., Blumberg L. M., Klee M. S., and Wylie, P. L. (Квимби Б., Бламберг Л., Клу М., Уайли П.)*. Precise Time-Scaling of Gas Chromatographic Methods Using Method Translation and Retention Time Locking (Точное масштабирование по времени хроматографических методик с помощью переноса методики и фиксации времён удерживания). Техническая информация 228–401, публикация (23) 5967–5820E, апрель 1998 г.

3. *Wylie P. L. and Quimby B. D. (Уайли П., Квимби Б.)*. A Method Used to Screen for 567 Pesticides and Suspected Endocrine Disrupters (Методика, использованная для скрининга на 567 пестицидов и веществ, подозреваемых во вредном воздействии на обмен веществ). Техническая информация 228–402, публикация (23) 5967–5860E, май 1998 г.

4. *Agnew D. et al. (Агню Д. и др.)*. Retention Time Locking with the HP G1701BA MSD Productivity ChemStation Software (Фиксация времён удерживания на приборе «HP G1701BA» с помощью пакета программ «MSD Productivity ChemStation»). Публикация (23) 5968–3433E, декабрь 1998 г.

5. *Prest H. and Cormia P. (Прест Г., Кормия П.)*. Retention Time Locking: Advantages in GC/MS SIM Analysis. (Фиксация времён удерживания: преимущества для анализа посредством ГХ-МС-SIM). Краткая техническая информация, (23) 5967–3797E, [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

6. *Prest H. et al. (Прест Г. и др.)*. RTL-MSD Pesticide Method and Database: Efficient Screening for Pesticides and Endocrine Disruptors Using the 6890/5973 GC/MSD System, Agilent Technologies (Методика и база данных для определения пестицидов с помощью МС-детектора и RTL. Эффективный скрининг на пестициды и вещества, оказывающие вредное воздействие на обмен веществ, с помощью прибора для ГХ-МС «6890/5973» фирмы Аджилент Текнолоджиз). Техническая информация, (23) 5968-4884E, [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

*Фирма "Agilent Technologies",*

*USA, 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808-1610*

*Фирма "АЛСИ" – официальный дистрибьютор фирмы "Agilent Technologies"*

*в Украине, тел./факс (044) 245 3224, 246 1017, e-mail: [instruments@alsi.ua](mailto:instruments@alsi.ua),*

*[www.alsi.ua](http://www.alsi.ua)*

Дополнительную информацию об изделиях и услугах фирмы можно найти в сети Internet по адресу: [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

*Надійшла до редакції 10.03.2005.*