

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ТРЕНАЖЕР "ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ": ТЕХНОЛОГИИ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ

Ю.Каламбет, к.ф.-м.н., ЗАО "Амперсанд"
kalambet@ampersand.ru

В статье представлены оригинальные технологии ЗАО "Амперсанд", которые помогли превращению хроматографа в хроматографический анализатор и стали частью электронного учебника. Некоторые из них не имеют мировых аналогов.

В октябре 2012 года произошло знаменательное событие: программно-аппаратный комплекс "Компьютерный тренажер "Жидкостный хроматограф" получил статус учебного пособия. Программная часть комплекса включает в себя программу-эмулятор жидкостного хроматографа "Альфахром" производства ЗАО "Институт хроматографии "ЭкоНова" и программу "МультиХром-Спектр", разработанную ЗАО "Амперсанд". Тренажер предназначен для освоения функционирования "Альфахрома" в режиме хроматографического анализатора, а не хроматографа.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗАТОР "АЛЬФАХРОМ"

"Альфахром" [1, 2] построен на технологической платформе хроматографа "Милихром А-02", характеристики анализатора приведены ниже.

Характеристики анализатора "Альфахром"

Детектор:

двухлучевой спектрофотометр
спектральный диапазон 190–360 нм
одновременная детекция на 1–8 длинах волн
объем ячейки 1,2 мкл
флуктуация нулевого сигнала <0,0002 е.о.п.
дрейф нулевого сигнала <0,0001 е.о.п./ч

Насос:

двухшприцевой, градиентный
скорость подачи от 2 до 999 мкл/мин
максимальное давление 70 атм
градиент формируется из 1–20 линейных участков

Колонка:

Ø2×75 мм из нержавеющей стали
эффективность колонки ... до 6000 теоретических тарелок

Автодозатор:

автоматический, программируемый
число пробирок 46
число анализов в серии от 1 до 200
дозированный объем от 1 до 99 мкл
пробирки из стекла объемом 200 мкл
пробки для пробирок из полиэтилена

Термостат:

твердотельный, электрический
устанавливаемая температура от 35 до 90°C
дискретность установки температуры 1°C
погрешность термостатирования 0,1°

Программное обеспечение:

Windows 2000/XP/7
"Милихром А-02", "МультиХром"

Обратим особое внимание на детектор прибора, позволяющий снимать до восьми длин волн и измеряющий фрагмент ультрафиолетового спектра вещества. В этом отношении он подобен детекторам на основе линейки диодов и обеспечивает те же возможности обработки данных: число длин волн меньше, зато точность измерения на каждой длине волны выше, чем у диодноматричного детектора.

Специалисты ЗАО "ЭкоНова" под руководством Г.Барама создали прибор, позволяющий производить положительную идентификацию многих веществ. Он потребляет мизерные количества растворителей и при этом не требует наличия в лаборатории стандартов определяемых веществ.

ПОЧЕМУ АНАЛИЗАТОР?

Вначале несколько слов о том, почему "Альфахром" называется хроматографическим анализатором, а не хроматографом и в чем различие между этими типами приборов.

Схема работы на хроматографе включает в себя серию градуировочных анализов проб с известной концентрацией вещества, на основании которых расшифровываются хроматограммы неизвестной пробы, предположительно содержащей то же вещество.

Анализатор работает без стандартов, определяя концентрацию вещества на основе заранее собранной информации. В отношении "Альфахрома" это означает, что градуировка проводится один раз, и в дальнейшем используется та градуировка, которая была сделана в самом начале. Для того чтобы такой режим работы стал возможен, требуется тщательнейшим образом стандартизировать и подтвердить характеристики прибора и хроматографической системы. Колонки и условия разделения при работе в режиме анализатора строго фиксируются.

Характеристики прибора подтверждаются (валидируются) с помощью специально разработанной тестовой смеси, оценивающей настройки и состояние прибора. К контролируемым параметрам относятся точность и воспроизводимость установки длин волн, линейность детектора, точность и воспроизводимость скорости подачи элюента, качество смешения элюентов, воспроизводимость градиента, точность дозирования; проверяется и хроматографическая система – концентрация буфера и рН элюента, качество колонки.

Проверка прибора с помощью тестовой смеси подтверждает право этого прибора пользоваться данными градуировки, полученными на любом аналогичном приборе, прошедшем валидацию. Соответственно, возникла и была реализована возможность создания библиотеки спектров веществ, содержащей на настоящий момент около 600 записей. Особенность библиотеки "Альфахрома" в том, что в ней сохраняются как время удерживания вещества в стандартных условиях, так и спектры, причем спектры пригодны не только для идентификации веществ, но и для количественного определения, т.е. совмещают в себе идентификационную и градуировочную информацию.

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ТРЕНАЖЕР

Тренажер эмулирует работу хроматографа "Милихром А-02" и позволяет проводить хро-

мографический анализ пробы растворов, состав которых определяет сам пользователь из 30 веществ. Тренажер дает возможность менять состав подвижной фазы, осуществлять изократический и градиентный режимы элюирования, менять скорость потока, температуру, объем пробы и параметры детектора во всем диапазоне значений, реализуемых в хроматографе "Милихром А-02". "Виртуальная хроматография" может производиться в ускоренном режиме: студент видит результаты достаточно быстро, чтобы успеть сделать несколько "разделений" за занятие и понять принципы хроматографии и работы прибора.

Эмулятор разработан специалистами "ЭкоНовы", хорошо знакомыми со спецификой работы оборудования.

В состав тренажера входит полнофункциональный модуль обработки данных "МультиХром-Спектр" [3], разработанный ЗАО "Амперсенд", освоение и использование которого входят в учебные задачи.

ОБРАБОТКА ДАННЫХ ПРОГРАММОЙ "МультиХром-СПЕКТР"

Технологии обработки данных для хроматографии, реализованные в ПО "МультиХром-Спектр", можно условно разделить на две части. Первая часть – технологии общего назначения, пригодные для использования в случае традиционной схемы хроматографа с одним измерительным каналом. Вторая – технологии многоканальной обработки данных, использующие дополнительную информацию, обусловленную тем, что за одним процессом разделения "наблюдают" несколько детекторов. В случае "Альфахрома" – один детектор, измеряющий отклик на нескольких длинах волн.

ОДНОКАНАЛЬНЫЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Технологии, относящиеся к одноканальной хроматографии, с большим успехом применяются к каждому каналу многоканальной хроматограммы, поэтому в полной мере относятся к работе с "Альфахромом". Перечислим только наши оригинальные разработки, оказавшиеся особенно полезными для "Альфахрома":

- фильтрация шума по всей хроматограмме [4] с использованием минимальных начальных предположений, обеспечивающая оптимальную фильтрацию шумов в каждой точке хро-

матодогаммы. Алгоритм не портит форму пика и улучшает отношение сигнал/шум в 2-15 раз. Эта технология позволяет существенно под- нять отношение сигнал/шум для узких пиков, когда применение альтернативных методов фильтрации шумов затруднено из-за возмож- ного искажения формы пика;

- оценка величины шума базовой линии [5] не- сколькоими альтернативными методами. Ис- пользуется при поиске пиков, оценке качества аппроксимации формы пика и при обработ- ке многоканальных хроматограмм. Для "Аль- фахрома" существенно то, что оценка шума по каждому каналу используется при сравнении каналов и спектров. Чем выше шум по каналу, тем менее значима соответствующая длина волны при сравнении спектров;
- разработка алгоритмов вычисления параме- тров пиков [5] для пиков с малым числом точек на полуширину пика. Основные приемы – ап- проксимация положения точек базовой линии полиномом и аппроксимация склонов и вер-шины пика полиномом, причем число учиты- ваемых точек измерений зависит от крутизны конкретного аппроксимируемого склона пика. Из-за затрат времени на сканирование по дли- нам волн у "Альфахрома" на полуширину пика приходится немного точек, и соответствующие алгоритмы становятся весьма актуальны;
- вычисляемые столбцы таблицы пиков позво- ляют создать столбец отчета по пикам, вве- сти формулу для его вычисления и рассчитать практически любой параметр пика, который может потребоваться исследователю. Такие столбцы особенно полезны для отчетов по ва- лидации прибора.

МНОГОКАНАЛЬНЫЕ ХРОМАТОГРАММЫ

Многоканальные хроматограммы возникают, если измеряемая величина представляет собой спектр (детекторы на основе линейки диодов или быстрые сканирующие детекторы, такие как "Альфахром") или при использовании нескольких детекторов, соединенных последовательно. Это направление является для "Амперсенда" тради- ционным: наша деятельность в 1988 году нача- лась с автоматизации прибора "Милихром-1", и программа "МультиХром" с самого начала была приспособлена для работы с многоканальными хроматограммами [6].

Наиболее полно возможности работы со спек- трами реализованы в версии программы,

поставляющейся в составе хроматографа "Милихром А-02"/"Альфахром". Комплект реализо- ванных в нем технологий на момент написания статьи не имеет мировых аналогов. Это:

- угол как мера отличия спектров. Спектр рас- сматривается как вектор в n -мерном про- странстве, где n – число каналов или длин волн, на которых он измерен;
- концепция вычисляемых каналов;
- идентификация пика по спектру с выбором неискаженного спектра пика;
- проверка гомогенности хроматографического пика;
- разложение не полностью разделенных хро- матографических пиков по спектрам;
- количественный расчет с использованием спектра.

ВЫЧИСЛЯЕМЫЕ КАНАЛЫ

Первый вычисляемый канал – сумма отноше- ний сигнала к шуму по всем измеряемым кана- лам – присутствовал уже в первой версии про- граммы "МультиХром", выпущенной в 1989 году. В нынешней спектральной версии подобных кана- лов может быть много, только типов вычисляемых каналов около десятка. Наиболее актуальные для "Альфахрома":

- суммарный – сумма отношений сигнала к шу- му по всем измеряемым каналам. Полезен при поиске пиков, поскольку на нем присутствуют все пики, тогда как на канале, соответствую- щем одной длине волны, некоторые пики мо- гут отсутствовать;
- средний – среднее поглощение по диапазону длин волн. Может использоваться для градуи- ровки и количественного расчета;
- разность – позволяет вычитать один канал из другого с коэффициентом;
- спектральное отношение – позволяет нарисо- вать график спектрального отношения откли- ков на двух длинах волн для пика;
- угловой – показывает угол между соседними по времени измерения спектрами и является мерой спектральной чистоты пика во времени.

УГОЛ КАК МЕРА ОТЛИЧИЯ СПЕКТРОВ

Правильное сравнение спектров – не столь про- стая задача. Мы предложили [6] в качестве меры различия спектров использовать угол между ними, построенный в многомерном простран- стве. Например, для спектра, измеренного на восьми длинах волн, пространство будет вось-

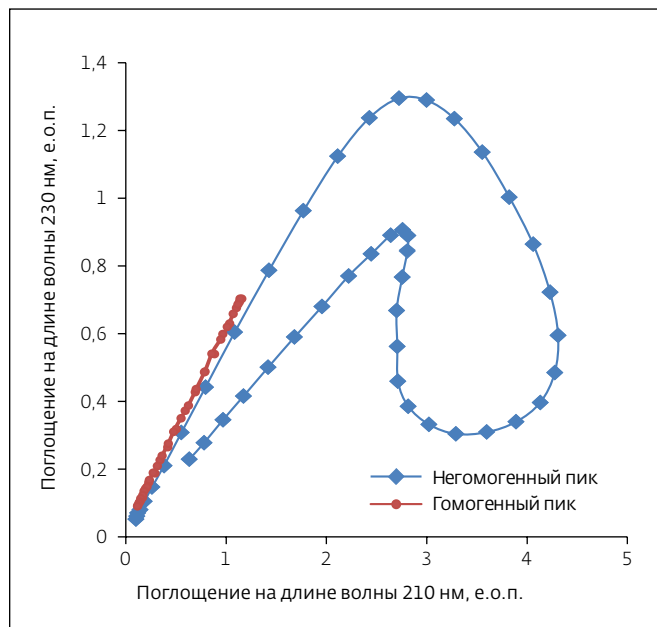


Рис.1. Проекция двух фрагментов многомерной хроматограммы на плоскость двух координат. Следующие друг за другом по времени точки соединены сплошной линией

мимерным. Координаты пространства – отношения сигнал/шум по соответствующим измерительным каналам, для "Альфахрома" – по длинам волн. Технология позволяет бороться с проблемой повышенного шума на коротких длинах волн и правильно оценивать значимость отличия спектра пика и спектра, записанного в базе данных.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПИКА ПО СПЕКТРУ

Задача идентификации пика состоит из двух частей: определение спектра данного пика и сравнение его с имеющимися в базе данных. Однако спектры могут быть искажены выходом детектора за пределы линейного диапазона, неправильным вычитанием базовой линии, примесью. В программе "МультиХром" реализована технология "Спектр наилучшей локальной чистоты" [7], позволяющая свести ошибки при определении спектра основного вещества пика к минимуму. Для иллюстрации этой технологии представим хроматографический пик в необычных координатах (рис.1), по одной оси отложив поглощение на канале 210 нм, по другой – на 230 нм.

Гомогенный пик в таких координатах выглядит как прямая, выходящая из начала координат и возвращающаяся обратно. В самом деле, отклик пропорционален концентрации по каждой длине волны, а это соответствует прямой.

Тангенс угла наклона этой прямой равен спектральному отношению для этих длин волн. Негомогенный пик выглядит совсем по-другому. Он начинается вдоль одной прямой, заканчивается вдоль другой, а поведение в промежутке зависит от числа перекрывающихся пиков. В приведенном на рис.1 примере таких пиков минимум три.

В качестве критерия локальной "чистоты" вещества в каждой точке пика мы используем угол между соседними по времени спектрами. Если этот угол близок к нулю, участок пика близок к гомогенности в этой точке, а большой угол соответствует негомогенным участкам пика. Самый маленький угол определяет "самый чистый" спектр, соответствующий основному веществу пика, – спектр наилучшей локальной чистоты. Угловой профиль дает представление о числе перекрывающихся пиков и характере их перекрывания (рис.2).

Если сравнивать спектры пика, полученные разными способами (средний по пику, в вершине пика и наилучшей локальной чистоты) при растущей величине пика, то получим зависимость,

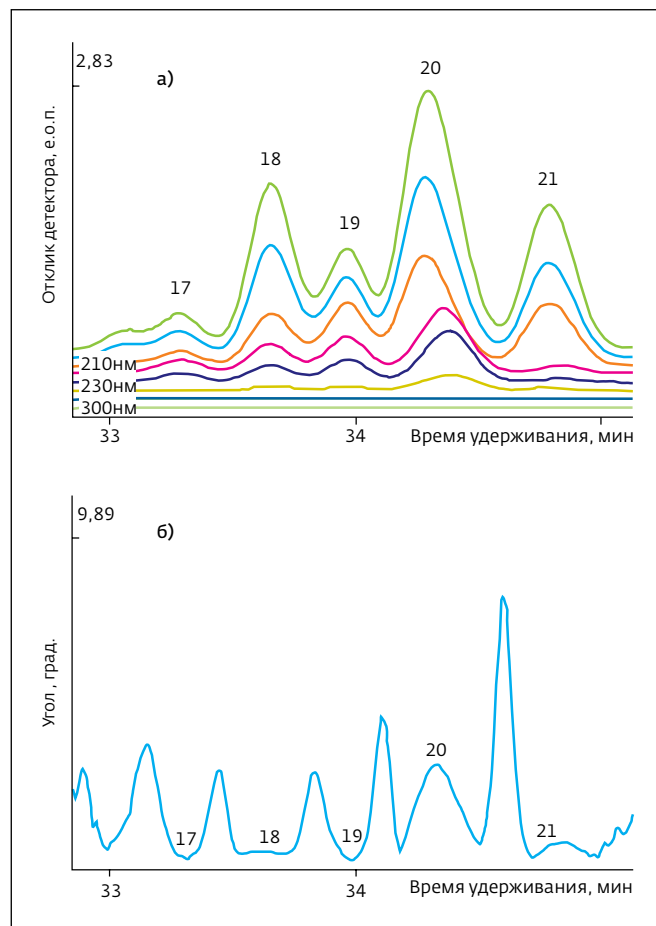


Рис.2. Многоволновая хроматограмма (а) и ее угловой профиль (б)

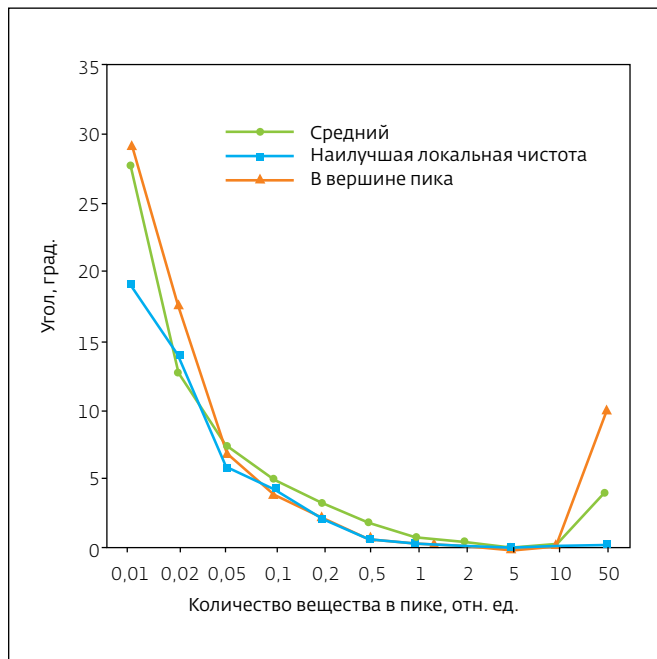


Рис.3. График зависимости угла между эталонным спектром и разными спектрами хроматографического пика от количества вещества в пике

изображенную на рис.3. Видно, что для спектра наилучшей локальной чистоты получается наименьший угол между измеряемым и эталонным спектрами во всем диапазоне как для низких концентраций, так и для высоких. На спектр наилучшей локальной чистоты не влияет даже нелинейность детектора (зашкаливание), искажающая два других спектра при высоких концентрациях.

МОДУЛЬ ФАКТОРНОГО АНАЛИЗА

В процессе разработки хроматографических методик часто встречается ситуация неполного разделения пиков. Тем не менее, крайне желательно иметь оценку времен удерживания, спектров и количества веществ, выходящих в группе. Наличие спектральной информации в сочетании с методами факторного анализа позволяет провести разделение пиков на основе спектральной информации, не делая никаких предварительных предположений о форме хроматографического пика. Пример разделения пиков приведен на рис.4. Технологии, используемые в этом модуле, позволяют также оценить спектральную гомогенность хроматографического пика.

ПЕРСПЕКТИВЫ

Примененные технологии обработки данных теоретически позволяют "Альфахрому" разли-

чать 10^5 - 10^6 спектров, тогда как число контролируемых в Российской Федерации веществ имеет порядок 10^4 . Прибор имеет прекрасные перспективы применения для задач скрининга в фармацевтике, судебной медицине, в наркоконтроле.

Обучение студентов работе с оборудованием – весьма трудоемкий и затратный процесс. Эмульсия оборудования имеет огромные перспективы, поскольку помогает понизить потенциальный барьер между студентом, изучаемым методом и оборудованием. Студент осваивает аналитический метод с помощью проб и ошибок, не отражающихся негативно на реальном оборудовании. Он может провести гораздо больше виртуальных анализов, чем мог бы сделать за то же время на реальном оборудовании, даже

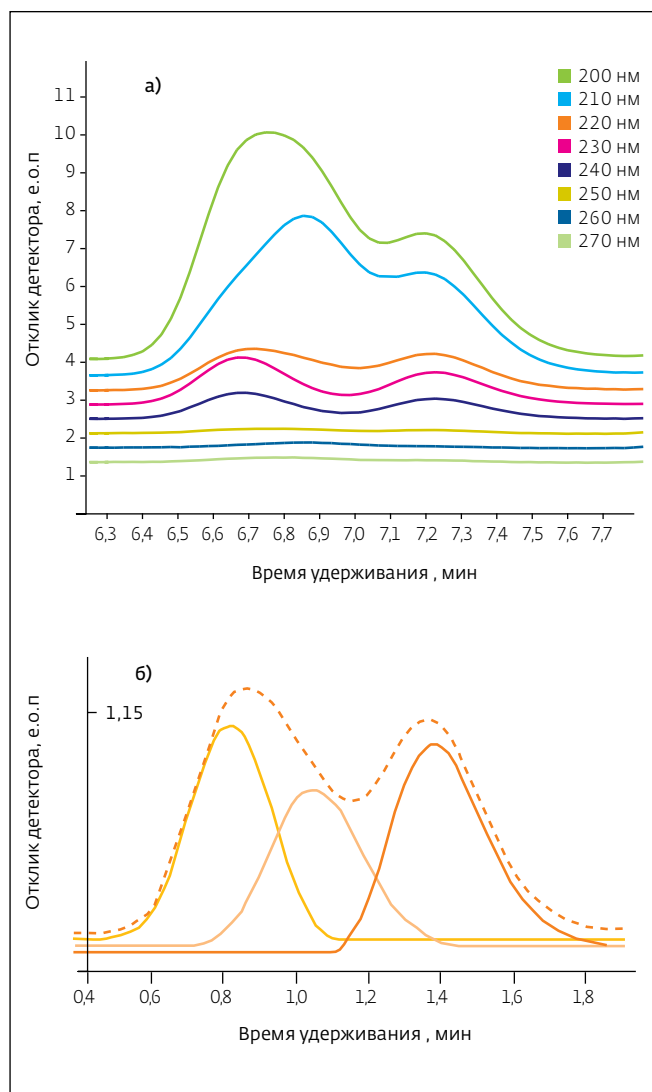


Рис.4. Профиль исходной хроматограммы (а) и хроматограммы на канале 220 нм, разложенной по спектрам (б)

находящемся в его полном распоряжении. После освоения тренажера студента можно допускать к реальному прибору, и таких приборов потребуются всего 1-2 на класс из 10 рабочих мест.

Тренажер активно используется в Новосибирском государственном университете, и, как уже говорилось, рекомендован в качестве учебного пособия для студентов-химиков. Тренажер помогает осваивать российское оборудование и программное обеспечение, по своей идеологии находящееся на переднем крае мировой науки.

Считаю весьма перспективным появление аналогичных тренажеров для других аналитических методов, что может способствовать подъему российского образования в области аналитической химии.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Барам Г., Азарова И., Кулябина Е., Рутенберг О.** Метрологическое обеспечение баз данных ВЭЖХ-УФ. Исследование и выбор веществ-маркеров для контроля свободного объема хроматографической колонки. – Заводская лаборатория. Диагностика материалов, 2010, т.76, № 2, с.66-70.
2. **Азарова И., Барсегян С., Барам Г.** Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии: базы данных "ВЭЖХ-УФ". В кн. "Хроматография на благо России" / Под ред. Курганов А.А. – М.: Граница, 2007, с.653-665.
3. **Каламбет Ю.** Информационные технологии на службе хроматографии. В кн. "Хроматография на благо России". / Под ред. Курганов А. – М.: Граница, 2007, с.459-469.
4. **Каламбет Ю., Мальцев С., Козьмин Ю.** Фильтрация шумов: окончательное решение проблемы. – Аналитика, 2011, №1 (1), с.50-55.
5. **Каламбет Ю., Михайлова К.** Оценка величины шума и ее использование при обработке хроматографического сигнала. – Лабораторный журнал, 2002, №1 (1), с.32-35.
6. **Kalambet Yu., Kozmin Yu. and Perelroyzen M.** Computer spectrochromatography. Principles and practice of multi-channel chromatographic data processing. – Journal of Chromatography, 1991, v.5421, p.247-261.
7. **Каламбет Ю., Козьмин Ю., Мальцев С.** Как получить правильный спектр хроматографического пика. – Партнеры и конкуренты, 2005, №4, с.27-30.