

Информационные технологии на службе хроматографии

Каламбет Юрий Анатольевич,

Генеральный директор ЗАО «Амперсенд»

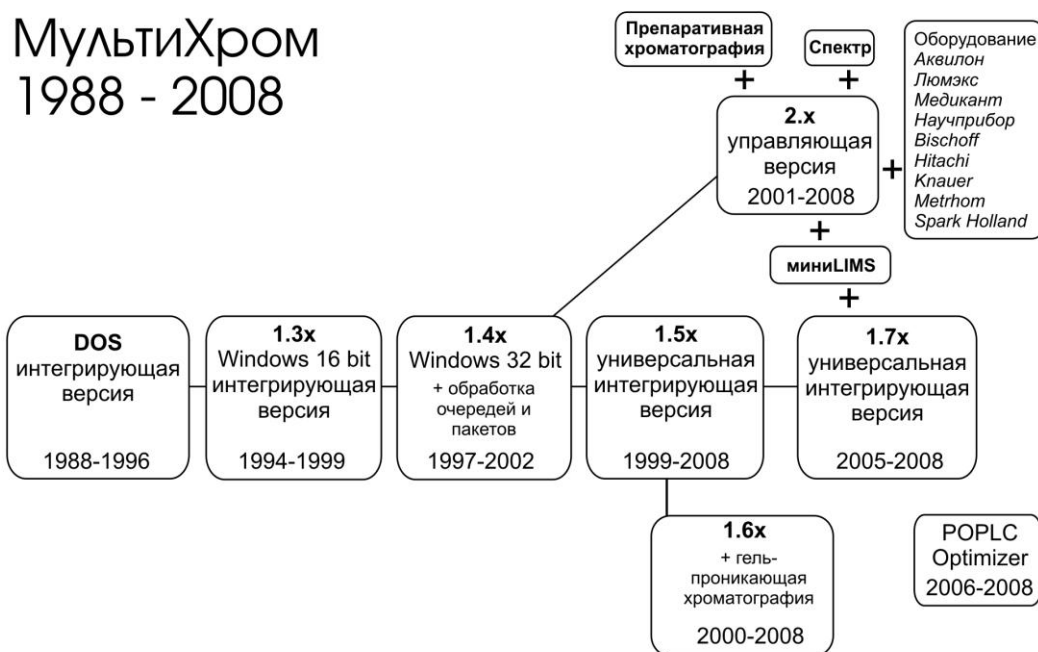
Москва, kalambet@ampersand.ru

Есть известное высказывание: математика – одновременно царица и служанка всех наук. С не меньшим основанием сегодня можно сказать, что компьютер стал господином и слугой всей современной техники. 20 лет назад, когда в НТК «Амперсенд» писалась первая DOS-овская программа «МультиХром», такая перспектива если и вырисовывалась, то только в самых общих чертах. Однако развитие вычислительной техники диктовало и логику развития программного обеспечения для хроматографии. Открывались все более широкие возможности не только освобождения человека от рутинных вычислительных операций, но и создания все более сложных алгоритмов извлечения содержательной информации, обработки и хранения объемов данных, которые были совершенно недоступны в докомпьютерную эпоху, а также моделирования различных процессов. Кроме того, на новых принципах развивались технологии управления оборудованием, обеспечившие и новые подходы в организации всей работы хроматографических комплексов.

Нам во многом удалось реализовать открывшиеся возможности: за 20 лет существования фирмы (НТК-АОЗТ-ЗАО) «Амперсенд» в России было поставлено более трех с половиной тысяч комплексов «МультиХром» разных версий. Это позволило подключить к компьютеру около семи тысяч хроматографов, используемых для решения самого широкого круга задач – от исследований в лабораториях академических институтов до контроля технологических процессов на предприятиях нефтепереработки, от анализа микроколичеств вещества при проведении криминалогической экспертизы до получения макроколичеств чистых веществ методом препаративной хроматогра-

фии. «МультиХром» используют химики и нефтехимики, биологи, энергетики, экологи, фармацевты, гигиенисты, криминалисты, специалисты пищевой и парфюмерной промышленности.

В рамках развития комплекса нам удалось разработать ряд собственных программных технологий, позволяющих решать разнообразные прикладные задачи в области хроматографии. Эти технологии касаются принципов взаимодействия с оборудованием, входящим в состав хроматографической системы, обработки аналитического сигнала для разных типов хроматографии, централизованного хранения и представления данных. История развития версий наших программ схематически представлена на рисунке 1.



Спектр - модуль для работы с многоволновым спектрофотометрическим детектором (диодной матрицей)
 миниLIMS - модуль для обмена хроматографической информацией с базами данных и последующей ее обработки
 POPLC Optimizer - программа для моделирования оптимального состава неподвижной фазы

Рис.1. История развития версий программного обеспечения «МультиХром»

Усилия по разработке программного обеспечения были поддержаны выпуском оборудования. Самой успешной моделью аналого-цифрового преобразователя (АЦП) для хроматографии стал АЦП Е-24 – размером чуть более пачки сигарет и довольствующийся питанием от СОМ-порта компьютера. Тираж этого весьма надежного прибора приближается к тысяче.

В данной публикации мы попробуем обобщить свой опыт и представить те технологии, которые позволили нам добиться успеха.

Управление оборудованием

Управление оборудованием построено по модульному принципу. Для добавления нового прибора не нужно собирать заново и переустанавливать программу – просто добавляется модуль, реализующий функции управления новым прибором, и можно начинать им пользоваться.

Управляемое оборудование представляется на экране схематическим изображением, являющимся «воротами» к программе (драйверу) управления данным устройством. Несколько устройств, работающих совместно, собираются в комплекс, называемый *Системой*. Пример изображения хроматографической системы представлен на рисунке 2.



Рис.2. Схематическое изображение хроматографической системы

Устройства, входящие в состав системы, умеют синхронно стартовать, запускать специальные программы, откликаясь на событие ввода пробы, или выключаться по окончании серии анализов или в случае аварии. Системы могут начинать работу под управлением оператора или в составе очереди анализов; для выхода оборудования на режим можно запрограммировать запуск системы, например, по утрам рабочих дней.

Драйвер устройства поддерживает функции ручного управления, позволяет задать набор начальных настроек оборудования, которые будут установлены при запуске системы, составить последовательность действий, выполняемых в ходе хроматографического анализа (например, программу смены длин волн спектрофотометрического детектора или профиль градиента для блока формирователя градиента). Драйвер может выдавать информацию другим приборам по измерительным каналам (аналитическим и телеметриче-

ским) и может иметь каналы управления своим состоянием. Для отладки взаимодействия драйвера с прибором детальная информация по обмену командами может быть просмотрена или записана на диск.

Основные типы драйверов:

- детекторы;
- насосы;
- блоки управления градиентом;
- автосамплеры;
- краны – переключатель потоков или инжектор
- составные устройства, объединяющие, к примеру, детектор, насос и кран-инжектор;
- виртуальные устройства, речь о которых пойдет ниже.

Концепция виртуальных устройств оказалась особенно интересной. В этом случае драйвер объединяет совокупность функций, для реализации которых не используется никакое реальное устройство, стоящее на столе у хроматографиста. Примеры виртуальных устройств:

- сводная индикаторная панель, на которой отображается информация обо всех наиболее важных приборах, входящих в состав системы;
- самописец, в котором сосредоточены параметры обработки хроматограммы;
- экономайзер элюента, позволяющий следить за уровнем сигнала детектора и переключать кран или клапан на рециркуляцию элюента или слив;
- коллектор фракций, позволяющий собирать пики по определяемым пользователем условиям, включающим время, уровень сигнала и производную. Исполнительным механизмом может быть кран-переключатель или специализированный прибор коллектор фракций.

Индикаторная панель и самописец, как правило, включаются в состав любой системы – в частности, изображенной на рисунке 2.

Особые требования предъявляются к организации «разговора» программы с оборудованием (коммуникации) – этот разговор должен исключать возможность недопонимания. Применялись разнообразные схемы увеличения устойчивости коммуникаций, начиная от переспроса параметров и заканчивая организацией коммуникационного протокола, обеспечивающего гарантию доставки информации. Устойчивая работа нашей программы в составе промышленных анализаторов, не выключаемых месяцами, подтверждает, что цель увеличения надежности коммуникации была достигнута.

В дополнение к виртуальному коллектору фракций в рамках совместного с СП «БиоХимМак» проекта по препаративной хроматографии разработана технология визуализации состояния жидкостной схемы хроматографической системы (пример на рисунке 3), позволяющая оператору быстро и наглядно оценить текущее состояние системы и при необходимости моделировать различные (в том числе, аварийные) ситуации.

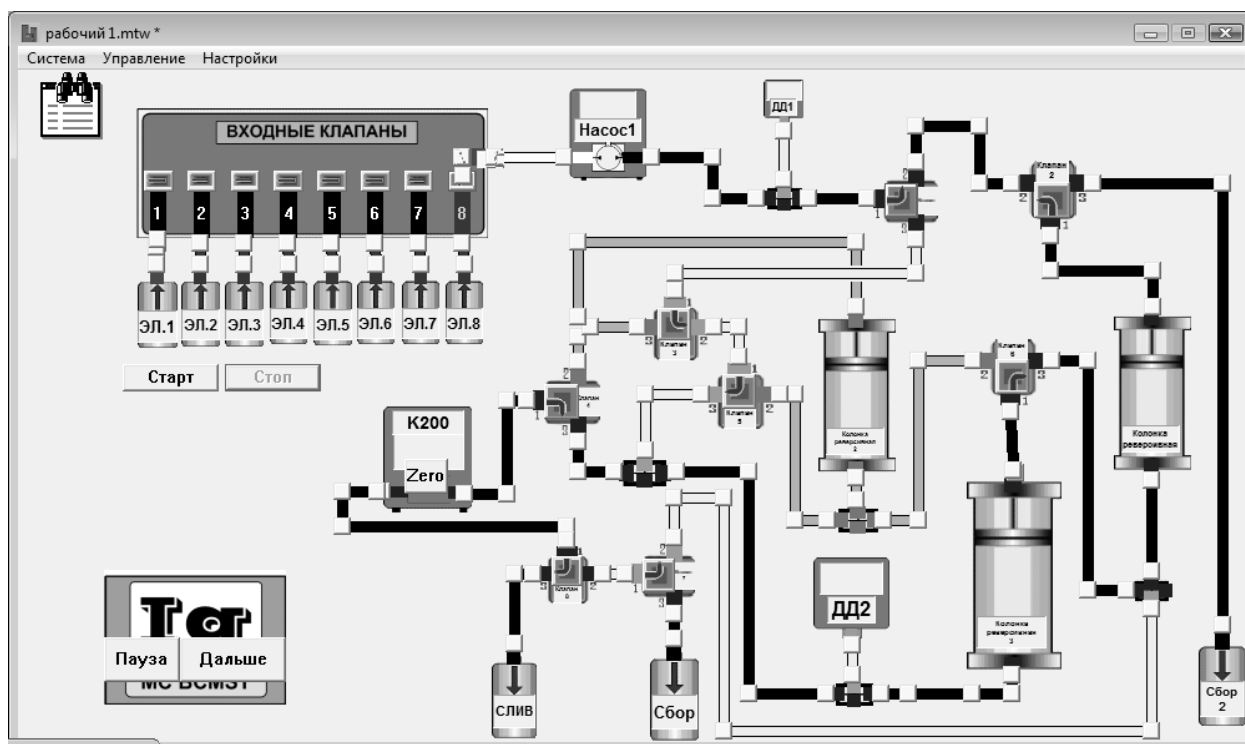


Рис.3. Представление жидкостной схемы хроматографической системы для контроля ее состояния в реальном времени.

Сбор и обработка данных

Одноканальные хроматографические системы

В области традиционной (одноканальной) хроматографии наши оригинальные разработки легли в основу ряда решений:

- Компрессия данных измерений (без потери информации) при записи на диск. Коэффициент компрессии зависит от источника данных, для данных от АЦП Е-24 составляет примерно тройку.
- Оценка шума базовой линии по всей хроматограмме, без предварительного выделения «шумового» участка. Эта оценка используется при поиске пиков, оценке качества аппроксимации пика полиномом и при обработке многоканальных хроматограмм.
- Разработка алгоритмов вычисления параметров пиков [1], устойчивых к процедуре сжатия хроматограммы (процедура сжатия состоит в замене нескольких соседних измерений на одно, равное среднему значению заменяемых). Основные приемы – аппроксимация положения точек базовой линии полиномом и аппроксимация склонов и вершины пика полиномом, причем число учитываемых измерений зависит от крутизны конкретного аппроксимируемого склона пика.
- Схема вычислений по методу Внутреннего стандарта [2], которую можно применять в случае нелинейных градуировочных зависимостей и переменной концентрации внутреннего стандарта.
- Разложение группы неразделенных пиков на отдельные пики путем их аппроксимации функцией Гаусса, экспоненциально-модифицированной функцией Гаусса (ЭМГ – пример на рисунке 4) или произвольной функцией заданной формы.
- Фурье-фильтрация периодических шумов.
- Вычисляемый канал, отображающий отношение отклика детектора ко времени получения этого отклика. Такой канал позволя-

ет компенсировать изменения площади пиков при изменении общей подвижности в капиллярном электрофорезе.

- Вычисляемые столбцы таблицы пиков, позволяющие рассчитать практически любой параметр пика, который может потребоваться исследователю.
- Модуль расчета молекулярно-массовых распределений для эксклюзионной (гель-проникающей) хроматографии.

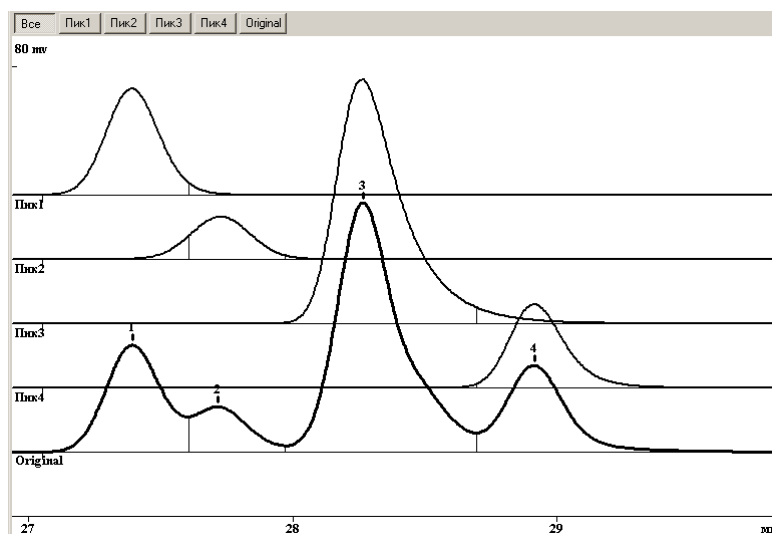


Рис.4. Разложение группы пиков на отдельные пики (ЭМГ)

Многоканальные хроматограммы

Многоканальные хроматограммы возникают, если измеряемая величина представляет собой спектр (детекторы на основе линейки диодов или быстрые сканирующие детекторы, например, «Милихром А02») или при использовании нескольких детекторов, соединенных последовательно. Это направление является для «Амперсенда» традиционным: наша деятельность в 1988г. началась с автоматизации прибора «Милихром-1», и программа «МультиХром» с самого начала была приспособлена для работы с многоканальными хроматограммами.

В области многоканальной хроматографии нами был накоплен большой опыт [3,4], позволивший предложить ряд решений, уникальных не только в России. Это концепция вычисляемых каналов, идентификация пика по спектру с выбором неискаженного спектра пика, проверка гомогенности

хроматографического пика, разложение неполностью разделенных хроматографических пиков по спектрам, количественный расчет с использованием спектра.

Пожалуй, наиболее полно возможности работы со спектрами реализованы в версии программы, поставляющейся в составе хроматографа «Милихром А02»/«АльфаХром». Комплект технологий, реализованных в нём, на момент написания данной статьи не имеет мировых аналогов. По сути специалисты ЗАО «Эконова» под руководством Г.И.Барама создали прибор, позволяющий производить положительную идентификацию большого круга веществ, потребляющий мизерные количества растворителей и при этом не требующий наличия в лаборатории стандартов определяемых веществ. Наши программные технологии, как мы надеемся, способствовали решению задач, стоящих перед этим прибором.

Вычисляемые каналы

Первый вычисляемый канал – сумма отношений сигнала к шуму по всем измеряемым каналам – присутствовал уже в первой версии программы, такой канал очень удобно использовать для поиска пиков. В нынешней спектральной версии подобных каналов может быть много, только типов каналов около десятка. Наиболее часто используемые – средний (среднее поглощение по диапазону длин волн); разностный (позволяет вычитать один канал из другого с коэффициентом); угловой (показывает угол между соседними спектрами, являющийся мерой спектральной чистоты пика во времени), можно задать также отношение сигнала ко времени.

Идентификация пика по спектру

Непростая задача идентификации пика состоит из двух частей – определить спектр данного пика и сравнить его с записанным в базе данных. Определение спектра пика оказывается не такой простой задачей, как может показаться на первый взгляд. Спектры могут быть искажены выходом детектора за пределы линейного диапазона, неправильным вычитанием базовой

линии, примесью. В программе «МультиХром» реализована технология «Спектр наилучшей локальной чистоты», позволяющая свести ошибки при определении спектра основного вещества пика к минимуму. Как видно из рисунка 5, для спектра наилучшей локальной чистоты получается наименьший угол между измеряемым и эталонным спектром как для малых концентраций, так и больших, где только на него не влияет нелинейность детектора.

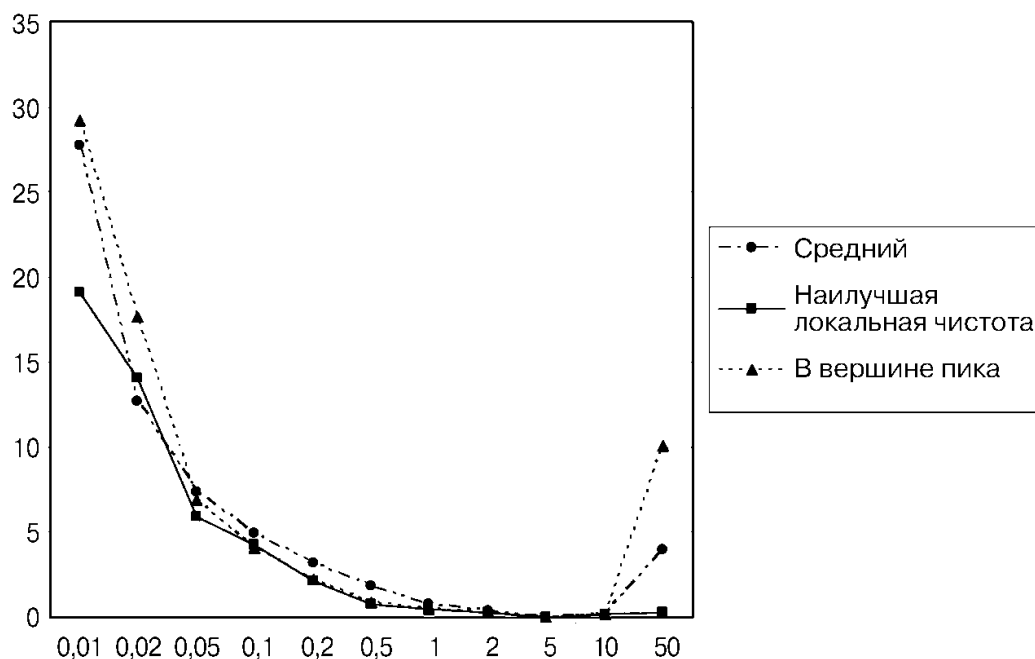


Рис. 5. График зависимости угла между эталонным спектром и разными спектрами хроматографического пика от количества вещества в пике.

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 на рисунке 6). Технологии, используемые в этом модуле, позволяют также оценить спектральную гомогенность хроматографического пика.

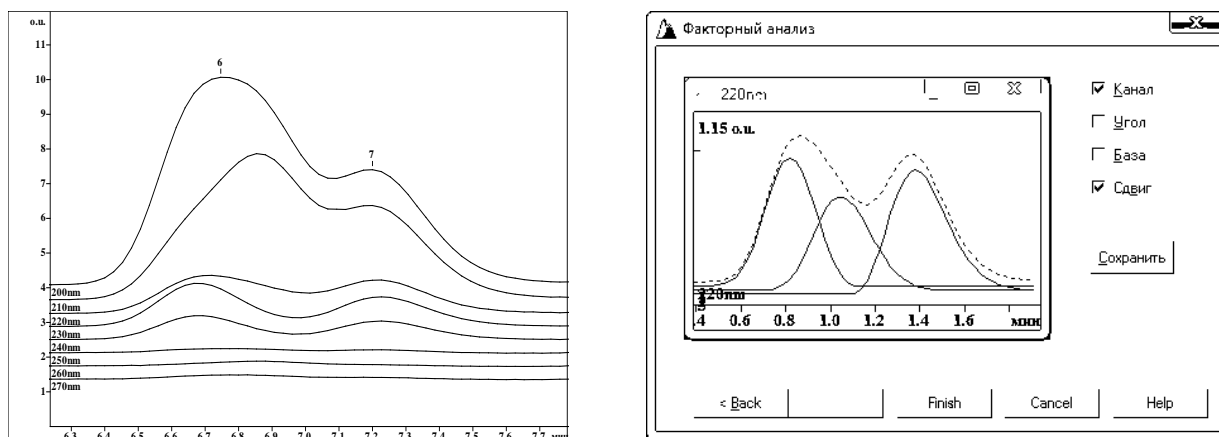


Рис.6. Профиль исходной хроматограммы и хроматограммы на канале 220нм, разложенной по спектрам

Мини-LIMS

Обилие экспериментальных данных в активно работающей лаборатории может приводить к большим проблемам поиска нужных файлов, учета проб, статистического анализа по периодам времени. Решению подобных проблем способствует база данных хроматограмм и отчетов по ним Мини-LIMS. Ее основные функции - передача хроматограмм из программы МультиХром в базу данных; поиск хроматограмм в базе данных по набору признаков; построение диаграмм изменения параметров по данным выбранных хроматограмм; выполнение расчетов в соответствии с задачами заказчика и выдача специальных отчетов.

Технология POPLC

Кроме задач сбора и обработки данных весьма актуальна задача подбора оптимальных условий хроматографического разделения анализируемой смеси веществ. В последнее время фирмой Bischoff Chromatography развивается новый подход к этой задаче под названием POPLC (Phase-Optimized Liquid Chromatography) [5], в разработке которого приняло участие ЗАО «Амперсенд».

Одной из важнейших характеристик неподвижной фазы для ВЭЖХ анализа является ее селективность. Общее число коммерчески предлагаемых

ОФ сорбентов для хроматографии оценивается в 750, и каждый год появляются новые неподвижные фазы. Задача выбора оптимальной неподвижной фазы для конкретного хроматографического разделения оказывается весьма трудоемкой. Одним из шагов при подборе колонки может являться дорогая и длительная процедура подбора подвижной фазы.

Задача разделения компонентов анализируемой смеси может быть решена и кардинально иным образом – выбором оптимального состава неподвижной фазы по технологии POPLC®.

Методика

В состав набора POPLC входит от 3 до 5 наборов колонок, упакованных сорбентами с различными механизмами удерживания, например C18, C30, CN, C18-EPS, Phenyl. Каждый набор позволяет составить колонку любой длины от 1 до 25см с шагом в 1 см. Физически это делается путем комбинирования сегментов длиной 1, 2, 4, 6 и 8 см. Сегменты сочленяются с «нулевым» объемом соединения. Компоненты анализируемой смеси анализируются на тестовой колонке каждого типа и получаемые времена выхода каждого из компонентов вводятся в программу. Время выхода компонента считается пропорциональным длине колонки, эффективность (число теоретических тарелок системы) также пропорциональна длине.

Далее, поскольку система линейна (время выхода на комбинированной колонке $A+B$ = времени выхода на колонке A + время выхода на B), программа определяет такой набор длин колонок, при котором все заданные компоненты расходятся в соответствии с заданным разрешением. Возможны два особых ответа - лучшая колонка, длина и время разделения на которой не превышает заданные лимиты, и обеспечивающая лучшее возможное для этой длины и времени анализа разрешение; и самая быстрая колонка, на которой заданное разрешение достигается за кратчайшее время.

Самое быстрое решение может не существовать, если разрешение критической (худшей по разрешению) пары пиков на лучшей колонке меньше

заданного предела разрешения. Лучшее решение существует почти всегда, кроме случая совместного выхода пары компонентов на всех колонках.

Заключение

Представленные технологии далеко не охватывают всех направлений разработок, ведущихся в ЗАО «Амперсенд». Время и наши пользователи ставят все новые и новые задачи. Это и освоение смежных областей, и расширение списка поддерживаемого оборудования, и улучшение пользовательского интерфейса, и совершенствование алгоритмов обработки данных, и новые технологии оптимизации хроматографического анализа. Фронт работ на следующие двадцать лет обеспечен.

Литература

- [1] Ю.А. Каламбет, К.В. Михайлова. Оценка величины шума и ее использование при обработке хроматографического сигнала, «Лабораторный журнал», 2002, №1 (1), 32-35
- [2] Ю.А. Каламбет, Метод внутреннего стандарта - идея и воплощение. «Партнеры и конкуренты», 2004, № 4, 32-36
- [3] Ю.А. Каламбет, Ю.П. Козьмин, С.А. Мальцев. Как получить правильный спектр хроматографического пика; «Партнеры и конкуренты», 2005, № 4, 27-30
- [4] Kalambet Yu.A., Kozmin Yu.P. and Perelroysen M.P. Computer spectrochromatography. Principles and practice of multi-channel chromatographic data processing; Journal of Chromatography, 1991, 5421, 247-261.
- [5] <http://www.poplc.de>