

- anie dwuoksymetylenowe // Dissert. pharmac. pharmacol. PAN.– 1968.–Vol. 20– N1.– P.111-117.
6. Tămaș M., Chindriș E., Roman L., Tuia M. Cercetări asupra alcaloizilor din *Chelidonium majus* L. // Clujul medical. –1987. – Vol. LX, N3. –P. 256-260.
7. Арзамасцев А. П., Никуличев Д. Б., Попов Д. М., Соколов А. В. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе лекарственных препаратов (Обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 1989. – Т. 23, N4. – С. 486-491.
8. Бабилов Ф.В. Применение люминесценции в фармацевтическом анализе. – Кишинев: Штиинца, 1977. – 120 с.
9. Государственная фармакопея СССР. 11 изд. — М.: Медицина, 1987.— Т. 1.— 334 с.
10. Дементьева Н. Н. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармацевтическом анализе // Фармация. – 1979. – Т. XXVIII, N 2. – С. 60-68.
11. Зенкевич И. Г., Багирова В. Л., Сокольская Т. А., Нечаева Е. Б. Обзор физико-химических методов стандартизации настоек, экстрактов и эликсиров в ведущих странах Европы и Америки // Фармация.— 2002.— № 3.— С. 44-46.
12. Сапечиня Л. П., Брутко Л. И., Российская А. И. Флуориметрический анализ лекарственных препаратов // Фармация. – 1982. – Т. XXXI, N 5. – С. 59-61.

CONTRIBUȚII LA OPTIMIZAREA ALGORITMILOR DE PRELUCRARE A INFORMAȚIEI CROMATOGRAFICE

Ana Casian, Igor Casian, Vladimir Valica

Institutul Național de Farmacie MS RM

Rezumat. *Lucrarea este dedicată evaluării influenței unor parametri de digitalizare și diverșilor algoritmi de prelucrare a semnalelor cromatografice la precizia și siguranța marcării cromatogramelor, determinării parametrilor picurilor și fidelității rezultatelor cantitative. Autorii propun propria apreciere a frecvenței optime de achiziționare a semnalului analog de intrare, adecvării algoritmilor de filtrare a zgomotului și exceselor, depistarea capetelor și determinarea coordonatelor vârfului picurilor cromatografice, pe exemplu cromatogramelor, obținute la analiza materialului biologic. S-a făcut un șir de recomandări pentru optimizarea algoritmilor de prelucrare a cromatogramelor în cazuri dificile.*

Cuvinte cheie: *HPLC, achiziționarea datelor, prelucrarea datelor, filtrarea zgomotului, cromatografie derivată.*

Summary. *The work is dedicated to estimation of the influence of digitization parameters and various algorithms of chromatographic signals handling on accuracy and reliability of chromatograms marking, determination of peaks parameters and on fidelity of quantitative results. The authors have yielded an own estimation of necessary frequency of the input analogue signal acquisition, adequacy of some algorithms of noise and excesses filtration, detection of limits and determination of top coordinates of chromatographic peaks on an example of chromatograms, characteristic for cases of biomaterial analysis. Some recommendations on optimization of chromatogram handling algorithms in difficult cases have been made.*

Key Words: *HPLC, data acquisition, data handling, noise filtration, derivative chromatography.*

În literatura dedicată metodelor de analiză cromatografică se acordă o mare atenție problemelor de optimizare a condițiilor de separare, mai puțin – preparării probelor, pe când sarcina de colectare și prelucrare a informației cromatografice primare de obicei rămâne ”la discreția” developerilor de aparat și soft-uri. Cu toate acestea posibilitățile programelor comerciale de prelucrare a datelor cromatografice nu asigură soluționarea tuturor sarcinilor apărute, sau realizarea lor este nereușită la utilizarea practică în analiza de rutină, parametrii de prelucrare a da-

telor, optimizați la soluționarea sarcinilor destul de simple (analiza formelor medicamentoase, controlul proceselor tehnologice) adesea dau rezultate nesatisfăcătoare la analiza obiectelor compuse de natură biologică. De asemenea se acordă o atenție insuficientă evaluării erorii, introduse în rezultatul final a analizei cromatografice la etapa de colectare și prelucrare a datelor.

Scopul lucrării

Pe baza propriilor experiențe de aplicare a metodei cromatografice de lichide de înaltă performanță (HPLC) să se aprecieze adecvarea algoritmilor de prelucrare a informației primare cel mai des utilizați în condițiile analizei materialului biologic, efectuată în studiul farmacocinetic și de propus recomandări concrete pentru selectarea și optimizarea acestor algoritmi.

Materiale și metode

Partea experimentală a lucrării a fost efectuată cu cromatograful de lichide "Jasco", seria LC-1500, cu detector UV-VIS, echipat cu program Borwin v. 1.5. S-au studiat și alte programe de prelucrare a datelor (Z-Lab, Хромос 2.3, МультиХром 1.6). Algoritmii ce nu sunt incluși în soft-urile disponibile s-au realizat în Borland Delphi 3.0. Programa de construire a cromatogramelor model pentru testarea unor algoritmi s-a realizat în Turbo Pascal 7.0.

Rezultate obținute și discuții

Având în vedere caracterul voluminos și multilateral al temei examinate, această lucrare nici într-un caz nu pretinde la plenitudinea expunerii materialului, reflectând doar propriile viziuni ale autorilor asupra problemei. Sugestiile trebuie acceptate, în principiu, nu ca soluții finale, ci ca direcții de cercetări ulterioare. Aceasta este prima din seria de lucrări dedicate problemelor generale de optimizare a prelucrării informației cromatografice și aplicarea ulterioară a algoritmilor de prelucrare pentru optimizarea selectivității sistemului cromatografic. La abordarea diferitor etape de prelucrare a datelor autorii s-au străduit să țină cont de cronologia, în care se execută operațiile corespunzătoare.

Înregistrarea cromatogramelor. Eroarea digitalizării semnalului analog, selectarea frecvenței și nivelului de discretizare.

La colectarea și prelucrarea informației primare în sistemele cromatografice moderne sunt

utilizate, de regulă, calculatoarele. Pentru o astfel de prelucrare, semnalul de ieșire al detectorului se transformă în formă digitală și este important ca informația utilă să nu se piardă sau să nu fie în exces. Se știe că cuanta semnalului conform nivelului nu trebuie să depășească valoarea medie a propriilor zgomote ale detectorului, în caz contrar limita de detecție va fi determinată incorect. Pentru aprecierea nivelului de zgomot propriu mărimea cuantei trebuie să fie de 2-3 ori mai mică. În studiul efectuat de noi prin utilizarea detectorului Jasco UV-1575, valoarea medie a zgomotului la ieșire pentru conectarea integratorului constituia 10-20 μV (în dependență de lungimea de undă selectată), iar valoarea maximă a semnalului – 1 μV . Aceasta înseamnă că mărimea cuantei conform nivelului nu trebuie să depășească 3-5 μV , iar numărul de poziții binare ale convertorului analogo-numeric (CAN), inclusiv și cel de semn, trebuie să fie de cel puțin 19.

În ce privește frecvența necesară de discretizare a semnalului de intrare, se cere asigurarea a cel puțin 5-10 măsurări la un pic cromatografic, iar valoarea optimă trebuie să se afle în intervalul 20-30 măsurări la pic [1]. Probabil, aceasta se justifică în cazul convertorului analogo-numeric, ce înfăptuiește achiziția valorii instantanee a semnalului. În cazul utilizării CAN de tip integrant (recomandabil în cromatografie) frecvența numită achiziției este excedentară. În mod teoretic pe sectorul cromatogramei ce conține un singur pic este de ajuns efectuarea doar a unei măsurări pentru a se obține informația exactă despre aria picului. În același timp înălțimea și forma acestuia nu vor fi stabilite. La prezența câtorva picuri separate complet pe cromatogramă, pentru determinarea corectă a ariei fiecărui pic prin metoda integrării directe este necesară efectuarea a cel puțin a unei măsurări la nivelul liniei de bază dintre picurile vecine. La separarea picurilor parțial suprapuse prin metode matematice de model minimum, în mod teoretic, se evaluează numărul de măsurări la pic egal cu numărul parametrilor în funcția de model matematic.

Pentru confirmarea experimentală a acestor postulate este necesar un convertor analogo-numeric de tip integrant, ce asigură intervale mari

de măsurare (până la 10 s și mai mult). Având în vedere că setul de resurse tehnice și softul "Borwin"¹, furnizat împreună cu cromatograful de lichide "Jasco", nu permit de a se stabili intervalul de măsurare mai mult de 1 s, noi am construit o instalație de înregistrare ale cromatogramelor, constituită din convertor tensiune – frecvență, divizor de frecvență (pentru a realiza convertorul cu 2 diapazoane) și calculator, înzestrat cu placa de sunet. Calcularea frecvenței semnalului și selectarea automată a diapazonului s-a efectuat în mod programat.

Pentru exemplificare, studiul s-a efectuat pe amestec model, în condiții ce asigură o separare completă, suprapunere slabă, moderată și puternică a picurilor (fig. 1). Picurile bine separate s-au prelucrat prin metoda de integrare directă, cele suprapuse (trei variante) – prin metoda model aplicând funcția Gauss exponențial modificată (EMG) [1]. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

Determinarea veridică a ariei picurilor separate complet prin metoda integrării directe s-a obținut în urmă a 7-9 măsurări la pic, cea

ce corespunde recomandărilor întâlnite în sursele bibliografice. De fapt, pe sectoarele dintre picuri cad neapărat câte 1-2 măsurări. Luând în considerație excesele și fluctuațiile de zgomot posibile se poate recomanda majorarea frecvenței de achiziție până la 10-12 măsurări la pic (se determină pentru cel mai îngust dintre picurile analitice).

La separarea prin model a picurilor suprapuse, precum s-a și presupus, numărul minim necesar de măsurări la pic este egal cu patru, corespunzător numărului de parametri ajustați ai funcției EMG. Practic valoarea medie a mărimii date pentru o grupă de picuri s-a depistat drept puțin majorată din cauza gradului de suprapunere diferit a picurilor vecine. Pe lângă aceasta, la efectuarea unui număr mic de măsurări apar dificultăți la detecția automată a picurilor după derivate și găsirea soluționării inițiale a modelului matematic. Prin urmare, ca valoare optimă a frecvenței de achiziție considerăm 8-12 măsurări la pic. Așadar, în practică, intervalul optim de măsurare se calculează ușor conform formulelor:

$$\tau = \frac{w_1}{10} \quad \text{– pentru cromatograme cu picuri separate complet;}$$

$$\tau = \frac{w_2}{10 \cdot n} \quad \text{– pentru cromatograme cu picuri suprapuse,}$$

unde, w_1 – lățimea la baza celui mai îngust din picurile analitice; w_2 – lățimea sectorului cromatogramei ce conține o grupă de picuri cel mai mult suprapuse; n – numărul de picuri în grupă.

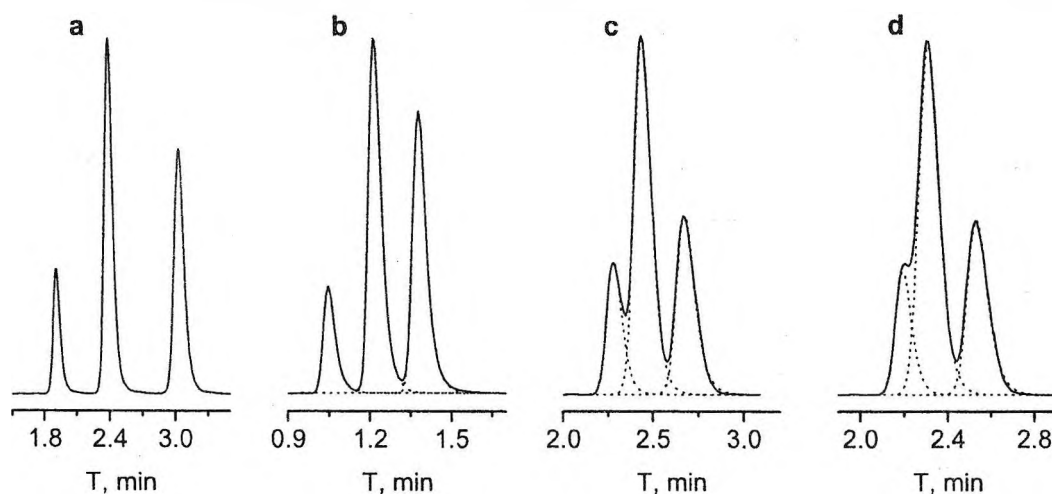


Fig. 1. Cromatogramele amestecurilor model cu diverse grade de suprapunere ale picurilor: *a, b* – izomeri de nitroanilină; *c, d* – carbamazepină, fenitoină și *p*-dimetilaminobenzaldehidă.

¹- Setul "Borwin" constă din placă specializată CAN și softul pentru colectarea și prelucrarea informației cromatografice.

În cercetările experimentale am depistat că până și în cazul analizelor de scurtă durată, realizate pe coloane "Ultrafast" (coloane cu lungimea 50-150 mm, sorbent cu diametrul particulelor 3 μm) intervalul optim de măsurare se află între 0,5-1 s, iar pentru analize îndelungate valoarea dată va fi și mai mare. În același timp, pentru

exemplificare, intervalul de măsurări instalat implicit în programul "Borwin" este de 0,1 s și nu poate fi mai mare de 1 s. Cea ce înseamnă, că cromatogramele obținute posedă informație excesivă ce duce atât la "cheltuielile" nejustificate a memoriei calculatorului, cât și la micșorarea raportului semnal / zgomot.

Tabelul 1.

Eroarea relativă a ariei picurilor cromatografice în funcție de intervalul măsurării semnalului de intrare

Intervalul de măsurare, s	Numărul de măsurări la pic		Eroarea relativă a determinării ariei picului, %	
	Minim	Mediu	Maximală	Medie
Picuri separate complet (Fig. 1a)				
0,5	27	37	0,61	0,26
1	17	22	0,44	0,22
2	10	14	0,82	0,68
4	6	8	0,99	0,58
8	3	4	2,38	0,64
Picuri slab suprapuse (Fig. 1b)				
0,5	19	23	1,62	0,80
1	10	12	1,65	0,92
2	5	6	3,89	0,81
3	3	4	4,84	1,46
4	3	3	38,4	15,7
Picuri moderat suprapuse (Fig. 1c)				
0,5	21	28	1,35	0,74
1	11	14	2,67	1,24
2	6	7	10,5	4,02
4	3	4	22,7	6,55
Picuri puternic suprapuse (Fig. 1d)				
0,5	18	27	4,02	2,59
1	9	13	1,64	1,21
1,5	5	9	4,85	1,76
2	4	6	16,8	5,18

Filtrarea zgomotului și exceselor

Filtrarea informației cromatografice primară se utilizează în scopul îmbunătățirii raportului semnal / zgomot și înlăturarea exceselor. În majoritatea programelor comerciale de prelucrare a

datelor cromatografice sunt incluși diverși algoritmi de filtrare, tratați pe larg în literatura tehnică corespunzătoare și analiza lor fundamentală iese din cadrul lucrării date, astfel că ne vom limita în principiu la aplicarea lor practică.

Prima întrebare, referitor la aplicarea tehnicii de calcul la prelucrarea cromatogramelor cere de a se da referințele necesare filtrării semnalului analog sau deja digital, rezolvându-se univoc în favoarea variantei a doua din următoarele considerente: În primul rând, în caz de selectare nereușită a parametrilor de filtrare cercetătorul poate reveni la datele inițiale, neprelucrate; în al doilea rând, filtrarea programatică a datelor, din punct de vedere tehnic, este realizabilă mai simplu decât construirea filtrelor complicate cu parametri fini reglabili. Cu atât mai mult, convertorul analogo-numeric de tip integrant atenuază efectiv zgomotul de înaltă frecvență, utilizarea lui excluzând necesitatea filtrării preventive a semnalului venit de la detector.

A doua întrebare se referă la algoritmul de filtrare și la parametrii ce trebuie aplicați în fiecare caz aparte, echivalând cu o altă problemă dacă filtrarea datelor nu e în genere discutabilă. Pe de o parte, filtrarea zgomotului îmbunătățește recepționarea subiectivă a cromatogramelor și permite micșorarea limitei fizice de detecție (determinată din raportul înălțimii picului la nivelul mediu al zgomotului), pe de altă parte – orice filtrare, într-o oarecare măsură, alterează semnalul util (fig. 2), ce poate duce la o mărire suficientă a erorii rezultatului final, în deosebi dacă rezultatul cantitativ se calculează după înălțimea picurilor. Evident valorile ariei picurilor sunt mai puțin sensibile la alterarea formei acestora, dar ele sunt și mai puțin influențate de zgomot, deoarece integrala procesului aleatoriu de zgomot la majorarea timpului de integrare tinde spre zero. Reiese că, în majoritatea cazurilor la calcularea după aria picurilor nu-i nevoie de filtrarea zgomotului; zgomotul poate deveni obstacol serios la depistarea capetelor picurilor cromatografice, despre care vom reveni ceva mai târziu. Utilizarea filtrării în analiza farmacocinetică pentru micșorarea limitei de detecție este de asemenea suspectă, deoarece cromatogramele probelor de natură biologică conțin, de regulă, o mulțime de picuri neanalitice, intensitatea cărora depășește cu mult nivelul zgomotului utilajului, și anume ele (aceste picuri) determină limita reală de detecție a semnalului util.

Spre deosebire de zgomotul aleatoriu, excesele provocate de trecerea impulsurilor de in-

terferențe ori de abateri la funcționarea utilajului nu se elimină la integrarea ariilor picurilor și complică marcarea cromatogramei în picuri, chiar și după filtrarea zgomotului. De aceea în programele de prelucrare a cromatogramelor trebuie să asiste neapărat algoritmi speciali de filtrare a exceselor ce pot fi conectați implicit, dacă ei (algoritmii) sunt selecți și nu alterează semnalul util. La problema dată am vrea să ne oprim mai detaliat, deoarece, după părerea noastră, algoritmii de filtrare a exceselor recomandați în sursele bibliografice nu sunt optimali sau în descrierea lor au fost omise unele imprecizii. De exemplu, în descrierea programului pentru calculator "Z-Lab" algoritmul de filtrare ale exceselor este definit astfel: "Punctul se consideră ca exces, dacă el rămâne de cel mai apropiat punct (din dreapta sau stânga) la o distanță de trei ori mai mare de valoarea zgomotului liniei de bază. În acest caz punctul dat se coboară (sau ridică) la nivelul celui mai apropiat punct vecin". Dat fiind faptul că zgomotul liniei de bază se determină pe sectorul cromatogramei lipsit de picuri, evident că punctele de pe panta abruptă a picurilor vor fi admise greșit ca excese. Este mai corect de a compara devierea punctului verificat cu devierea standard a celui mai apropiat mediu al său, iar în caz că-i acceptat ca exces – de a-l coborî (sau ridica) până la nivelul mediu al celor două puncte vecine.

Propunem următorul algoritm de filtrare a exceselor: Pentru verificarea punctului curent al cromatogramei (cu ordinata Y_i) se iau câte două puncte mai apropiate din stânga și dreapta (punctul curent nu se include în grupul dat). Pentru grupul obținut se calculează media aritmetică (Y_{mean}) și devierea standard (SD). Dacă $|Y_i - Y_{mean}| > 3 \cdot SD$, atunci punctul curent se consideră exces și se înlocuiește cu valoarea $(Y_{(i-1)} + Y_{(i+1)})/2$.

Filtrarea poate fi efectuată mai rigid, verificând condiția $|Y_i - Y_{mean}| > 1,5 \cdot SD$. În cazul dat se elimină și cele mai neînsemnate excese, totodată se atenuază zgomotul aleatoriu, practic fără alterarea formei picurilor; doar în cazuri aparte poate fi "retezat" punctul din vârful picului. Formal, un astfel de filtru nu mai poate fi numit filtru de excese, dar utilizarea lui în practică dă rezultate bune.

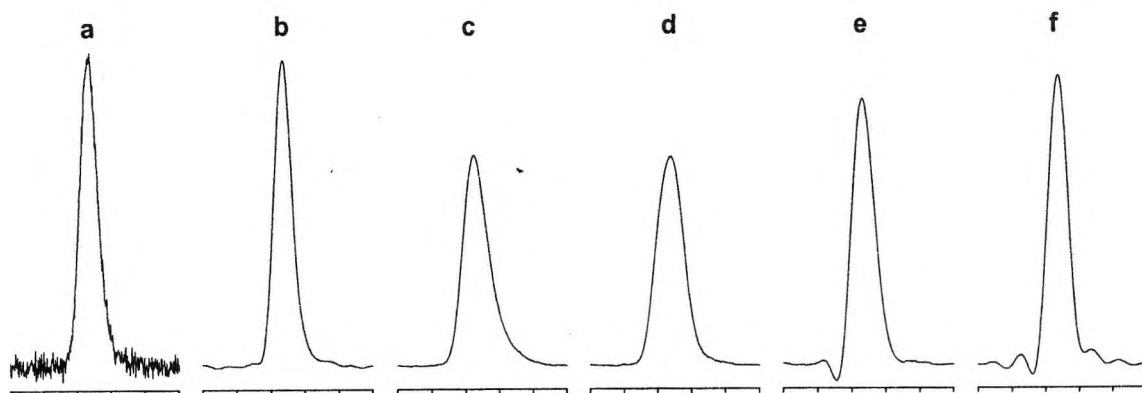


Fig.2. Influența filtrării zgomotului la forma picului cromatografic: **a** – cromatograma inițială; **b** – după atenuarea aproape optimă.

Alterarea caracteristică a formei picului la atenuarea excesivă cu diverși algoritmi: **c** – medie glisantă; **d** – atenuare liniară; **e** – atenuare cu polinom de gradul 3; **f** – filtrarea Fourier.

Corecția derivei liniei de bază. Interpolarea liniară și neliniară a liniei de bază, utilizarea filtrelor de frecvență înaltă și derivatelor.

Deriva liniei de bază prezintă un fenomen neprielnic întâlnit permanent în practica fiecărui cromatografist. Ea influențează în deosebi corectitudinea depistării capetelor picului, la calcularea înălțimii și ariei lui, iar uneori face imposibilă marcarea cromatogramei.

Principalele cauze de apariție a derivei sunt:

- Instabilitatea temporară a parametrilor detectorului și convertorului analogo-numeric. Mărimile date sunt strict reglate de specificația aparatului și, din punct de vedere practic, în utilajul modern se realizează valori destul de mici.
- Variația în timp a condițiilor de efectuare a analizei (temperatura coloanei, compoziția și viteza eluentului). Cel puțin unul dintre acești parametri se schimbă intenționat în timpul eluării prin gradient. Prin urmare, pe cromatogramele obținute în regimul dat, de regulă se observă semnificativ deriva liniei de bază, dar destul de reproductibilă.
- Eluarea din coloana cromatografică a componentelor puternic reținuți ai probelor analizate anterior. Aceasta este pricina principală a derivei liniei de bază la eluarea izocratică.

Șirul de măsuri luate, cum ar fi echilibrarea îndelungată a coloanei cu fază mobilă până la începerea analizei și regenerarea coloanei după terminare, utilizarea solvenților și reagenților de puritate destul de înaltă la eluarea prin gradient

pot să micșoreze suficient mărimea derivei liniei de bază, dar n-o anulează complet. De aceea în deosebi la analiza cromatografică a probelor de material biologic apare periodic necesitatea corecției de program a liniei de bază, care poate fi realizată prin diferite căi:

- Scăderea cromatogramei de fond (unui sector sau în întregime). Procedura dată este destul de simplă, dar foarte efektivă în acele (și numai acele) cazuri, când forma liniei de bază se reproduce de la probă la probă, adică la eluarea prin gradient. În cazul dat poate fi anulată nu numai deriva, dar și picurile nedorite ale impurităților fazei mobile.

- Interpolarea liniară a liniei de bază cu funcția de tip $Y=A+B \cdot X$ (fig. 3a) se efectuează dintre două puncte, ce aparțin liniei de bază și sunt situate până la începutul și după sfârșitul sectorului de cromatogramă cu picul de analit sau grupa de picuri. Procedura este realizată în majoritatea programelor de prelucrare a datelor. Pentru a fi mult mai evident sectorul cromatogramei poate fi îndreptat după interpolarea liniei de bază, dar astfel se introduc schimbări în informația primară și, de regulă, astfel de procedee nu se aplică în programele comerciale. Avantajul metodei constă în realizarea simplă, iar neajunsurile țin de erorile introduse în caz de o relevantă neliniaritate a derivei liniei de bază și complicat de automatizat. Situația obținută aduce a cerc vicios: la interpolarea liniei de bază până la amplasarea nodurilor de reazem trebuie marcată cromato-

grama în picuri, care, la rândul său, se complică din cauza derivei liniei de bază. Consecința neajunsului secund este amplasarea manuală a nodurilor de reazem la interpolare, fapt care introduce, bineînțeles, o oarecare parte de subiectivism în procesul de prelucrare a datelor.

- Interpolarea neliniară (în particular exponențială) a liniei de bază (fig. 3b) prezintă evoluarea metodei precedente pentru cazurile, când picurile analitice sunt situate pe "coada" picului ce duce la o mai mare intensitate (picul solventului, surplusul de reagent și alte) și-i bazată pe faptul că sectorul final al picului cromatografic poate fi descris de ecuația monoexponențială: $Y=A+B \cdot \exp(C \cdot X)$. La interpolarea exponențială trebuie stabilite deja trei puncte de reper, situate la linia de bază, ce poate fi problematic la prelucrarea cromatogramelor complicate și mărește volumul lucrului de calculare și aportul factorului subiectiv în rezultatul final. Posibil că din această cauză n-am întâlnit realizarea metodei date în programele finite, totuși, în cazurile analogice prezentate în fig. 3 ea poate determina mai exact valorile ariei picurilor.

- Filtrele de frecvență înaltă pot fi utilizate atât pentru semnalul analog (filtrarea de aparat), cât și pentru echivalentul digital (filtrarea de program). Ideea constă în înlăturarea din semnalul cromatografic a componentelor de frecvență joasă, cărora le aparține și deriva liniei de bază. Este atrăgător faptul posibilității de prelucrare a tuturor cromatogramelor în regim automat, fără vreo marcă preventivă. Pentru o alterare minimală a formei picului, frecvența secantă a filtrului trebuie să fie destul de mică, ceea ce ar echivala cu o "piatră submarină" a metodei date. Metoda se realizează efectiv pe cromatograme "curate" (fig. 4 a1, a2), însă în prezența picurilor străine mai intensive apare un proces de relaxare care, din cauza constantei de timp mare a filtrului, se extinde adesea pe regiunea picului analitic, făcând panta și / sau curbura liniei de bază și mai mare, decât până la filtrare (Fig.4b1, b2).

- Soluționarea problemei date poate consta și în micșorarea constantei de timp al filtrului până la valori cu mult mai mici ca lățimea picului cromatografic, fapt ce va duce la diferențierea semnalului analitic, adică la obținerea derivatei (fig. 4a3, b3).

și aplicată în studiu de spectrofotometrie. Spectrofotometria derivată se aplică pe larg la creșterea selectivității atât în investigațiile calitative (depistarea benzilor de absorbție ascunse), cât și cantitative (determinarea mai multor componente cu spectre suprapuse) [3].

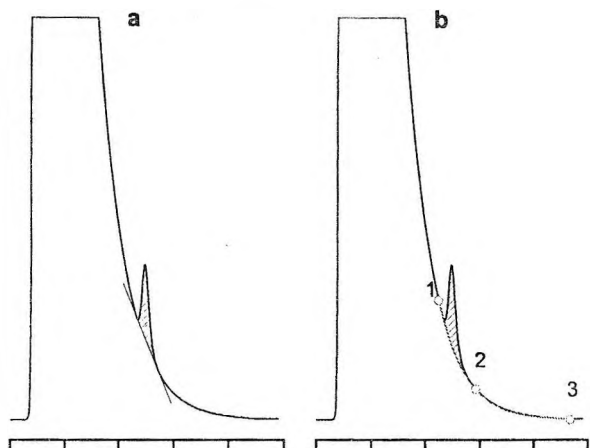


Fig. 3. Determinarea ariei picului, situat pe coada picului mai intensiv după interpolarea liniară (a) și exponențială (b) a liniei de bază.

Până în prezent cromatografia derivată, n-a fost aplicată în analiza cantitativă, dar cercetările efectuate de noi au arătat importanța acestor abordări mai ales la prelucrarea cromatogramelor complicate ale obiectelor biologice. Cel mai mult s-a recomandat derivata de ordinul 2 inversă ($-dY^2/dX$). Această conversie simplă separă efectiv atât deriva liniară, cât și pe cea neliniară a liniei de bază, totodată permițând separarea picurilor suprapuse, dacă ele se deosebesc esențial după lățime. Un factor evident pozitiv îl prezintă posibilitatea aplicării procedurilor standard de prelucrare la cromatogramele convertite astfel. Luând în vedere creșterea bruscă a nivelului relativ de zgomot cu frecvență înaltă și creșterea ordinului derivatei, trebuie combinată calcularea ei (derivatei) cu atenuarea optimă, parametrii cărora e de dorit să fie selectați experimental pentru fiecare serie în parte. Sensibilitatea înaltă a derivatei de ordinul 2 la forma picului, ce asigură o înlăturare efectivă a derivei liniei de bază, și, concomitent limitează metoda dată, înaintându-i cerințe sporite la stabilitatea temporară a parametrilor sistemului cromatografic.

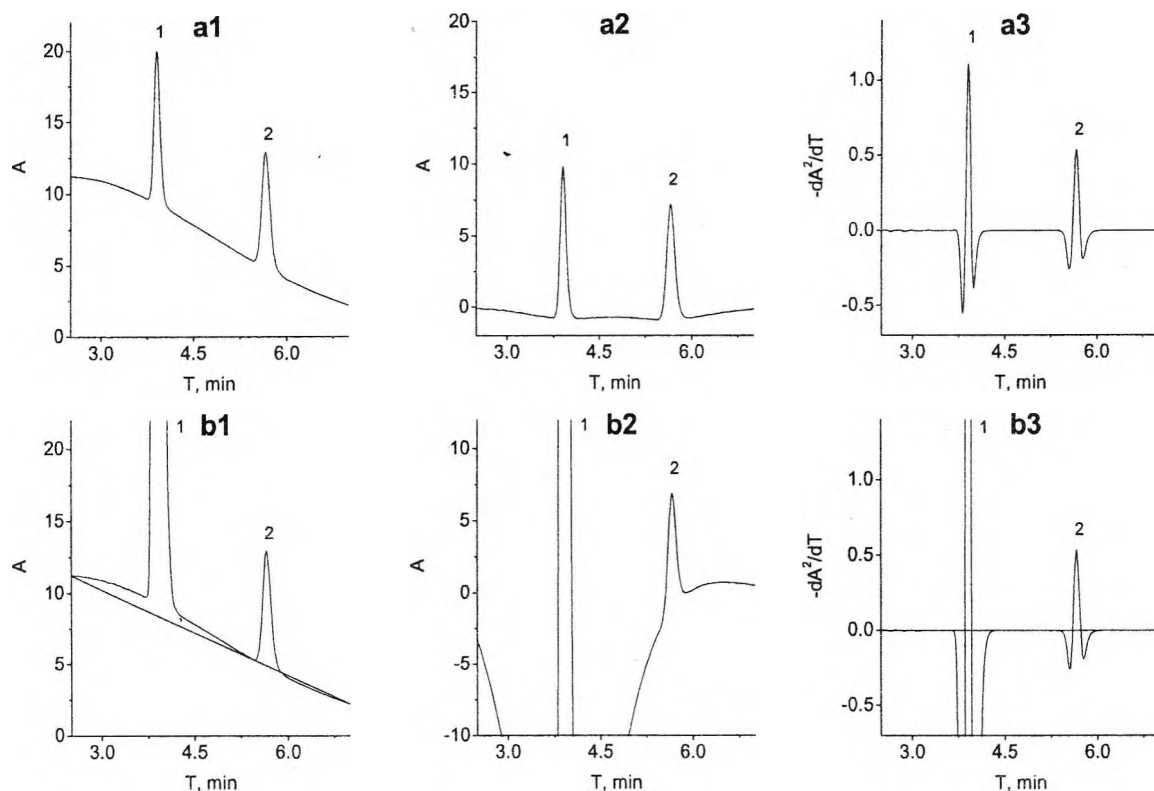


Fig.4. Filtrarea derivatei liniei de bază: a1 – sectorul cromatogramei inițiale (2 – componentul analitic); a2 – după prelucrarea cu filtru Fourier de frecvență înaltă cu frecvența secantă 0,01 Hz și atenuarea în afara benzii de trecere 24 dB/oct.; a3 – derivata a doua inversă, obținută la lățimea fisurii de atenuare 8 s; b1–b3 – concentrația 1 component mărită de 40 ori.

Pentru evaluarea domeniului de aplicabilitate a metodei de prelucrare propuse au fost modelate următoarele grupări a câte 100 cromatograme fiecare: 1 – pentru modelarea derivatei liniei de bază pe picul analitic cu parametrii constanți s-au suprapus două picuri mai intensive și mai late cu repartizarea normală a parametrilor; 2 – la picul analitic cu parametrii constanți s-a adăugat zgomot aleatoriu în raport semnal / zgomot, egal cu 10; 3 – cromatograme ce conțineau pic analitic cu aria constantă, lățimea căruia se schimba întâmplător după legea normală cu coeficientul de variație 5% (modelarea instabilității parametrilor de retenție). Toate grupările au fost prelucrate la marcarea automată a cromatogramelor prin metoda clasică și după conversia în derivata a doua inversă, valorile obținute ale ariei picului analitic fiind supuse prelucrării statistice cu utilizarea criteriilor t și F . Rezultatele obținute duc la următoarele concluzii:

- La prezența derivatei pronunțate a liniei de bază aplicarea derivatei a doua permite a se micșora semnificativ (mai mult de un nivel) eroarea

aleatoare a rezultatelor, precum și înlăturarea erorii sistematice;

- La selectarea reușită a lățimii fisurii de atenuare prezența zgomotului mare, în pofida așteptărilor, nu constituie un obstacol pentru utilizarea cromatografiei derivate, deoarece mărimile obținute ale erorilor aleatorii și sistematice nu s-au deosebit de mărimile corespunzătoare, obținute la prelucrarea cromatogramelor inițiale (neconvertate);

- Instabilitatea lățimii picului analitic duce la eroarea întâmplătoare a rezultatelor cantitative în cromatografia derivată, aproape de două ori depășind eroarea relativă a lățimii picului, însă eroarea sistematică în cazul dat lipsește.

Depistarea capetelor la picurile cromatografice, diminuarea influenței zgomotului la precizia marcării cromatogramei.

Din cele două metode uzuale de detecție a capetelor de picuri – după nivel și după derivata de ordinul 1 – a doua, după cum se știe, are un avantaj incontestabil datorită insensibilității ei la ordinata liniei de bază.

Pare ademenitoare utilizarea derivatelor de ordine mai mari. Însă derivata de ordinul 2 nu-i sensibilă la deriva liniară a liniei de bază, oricât de pronunțată ar fi. Totuși, prezența picurilor sateliți pe a doua derivată complică algoritmi de marcarea a cromatogramelor, iar la existența picurilor suprapuse (și aceasta are confirmare în practică) funcțiunea acestor algoritmi devine destul de nesigură, fiindcă programul nu-i în stare să depisteze corect picurile-sateliți în prezența picurilor interferente. Prin urmare, am ajuns la concluzia că detecția picurilor este optimă efectuată după prima derivată, corectând preventiv deriva liniei de bază în dependență de necesitate. Am dori să expunem și unele recomandări referitoare algoritmi de marcarea a cromatogramelor:

În primul rând, la calcularea derivatei, chiar și la nivelul de jos al zgomotului, necesită utilizarea fisurii de atenuare, lățimea căreia trebuie reglată în dependență de înclinările frontierelor picului la bază. În caz de o lățime insuficientă a fisurii este posibilă pierderea unei părți a ariei picului (fig. 5a). Desigur, problema poate fi soluționată și prin micșorarea limitei de detecție a capetelor picurilor, dar aceasta mărește sensibi-

litatea la zgomot și deriva liniei de bază.

În al doilea rând, la cromatogramele supraîncărcate de zgomot nu trebuie aplicate valorile curente din masivul de date, după cum se realizează în majoritatea programelor, dar e necesar să se calculeze valorile atenuate ale ordonatei capetelor de picuri (fig. 5b). Dar fiind faptul că valorile prelevate pentru efectuarea atenuării aparțin sectorului neliniar de cromatogramă, se preferă utilizarea algoritmilor neliniari de atenuare, de exemplu cu polinomul de gradul 2-3.

În al treilea rând, având în vedere că picurile reale pot fi destul de asimetrice, se recomandă selectarea independentă limitelor depistării începutului și sfârșitului picului. În așa mod vom obține o marcarea mai corectă a picurilor (fig. 5c).

În sfârșit, la elaborarea algoritmilor de marcarea poate fi recomandată atașarea limitei de detecție a picurilor la scara curentă de reprezentare grafică a informației. De obicei, pentru confort, utilizatorul aranjează scara cromatogramelor în așa mod, ca picurile analitice să încapă în fereastra de examinare. Astfel limita de detecție a picurilor se va ajusta automat aproape de optimală.

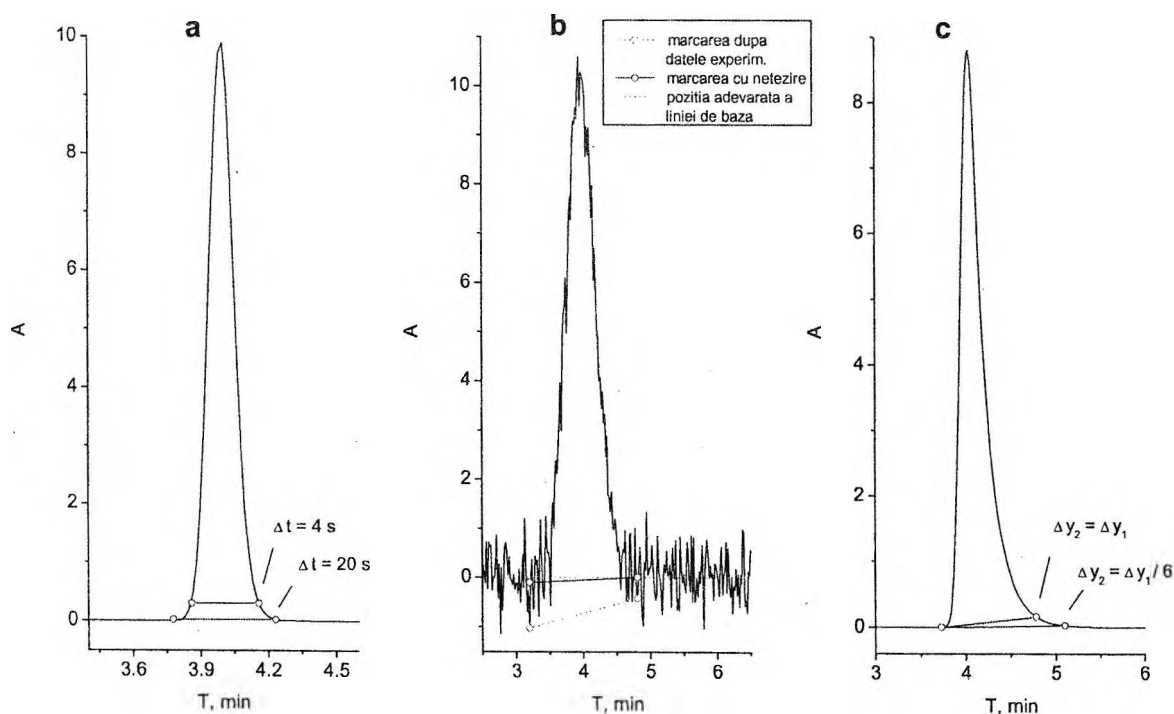


Fig. 5. Influența diverselor parametri la precizia marcării cromatogramelor: lățimea fisurii de atenuare la calcularea derivatei (a), metoda depistării ordonatei capetelor picurilor (b) și raportul limitelor de detecție ale capetelor picului (c).

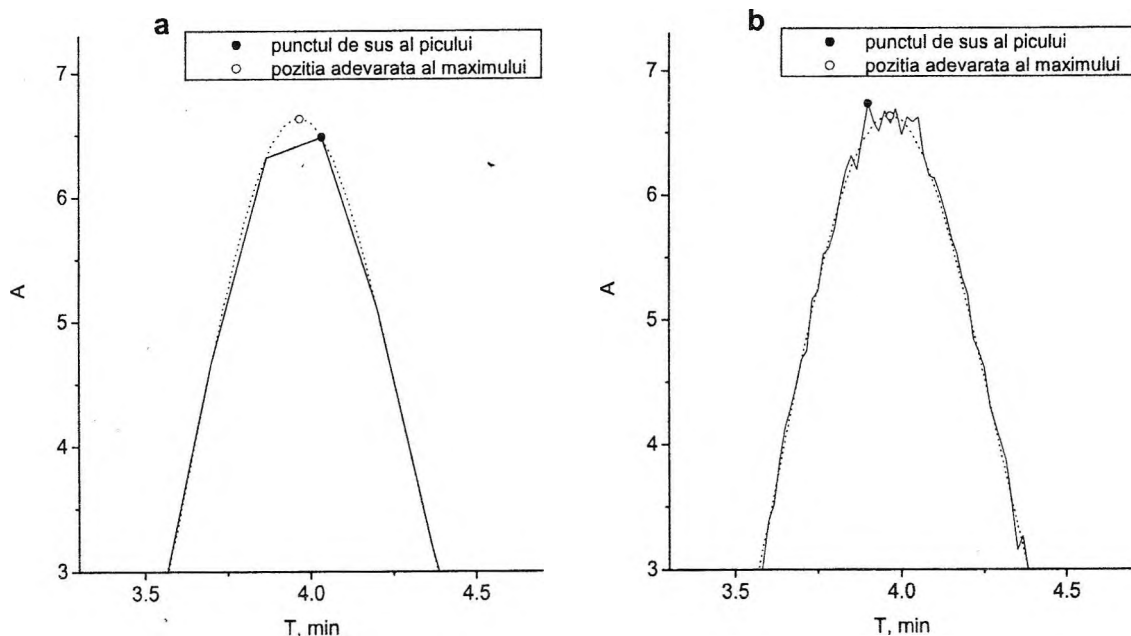


Fig 6. Eroarea depistării coordonatelor vârfului de pic la interval mare de măsurare (a) și în prezența componentelor de zgomot (b).

Depistarea coordonatelor vârfului de pic. Aproximarea funcțională a maximumului

De obicei, coordonatele celui mai înalt punct sunt acceptate drept vârf al picului și pot fi depistate în masivul inițial de date conform valorii maxime (după detecția începutului picului), precum și conform schimbării semnelui derivatei de ordinul 1. Varianta a doua convine mai mult, în cazul când detecția capetelor picurilor se efectuează la fel după valoarea primei derivate. Valorile coordonatelor de vârf obținute sunt agravate de eroarea aleatoare stipulată de doi factori: cuantificarea semnalului de intrare în timp (eroarea în limita unui interval de măsurare) și prezența componentelor de zgomot (fig. 6). Valoarea maximă a erorii, introdusă de al doilea factor rămâne incertă. Această eroare nu influențează precizia determinării ariilor picurilor, dar poate scădea siguranța identificării componentelor după timpul de retenție.

Se poate mări precizia depistării coordonatelor vârfului de pic după aproximarea câtorva puncte ale cromatogramei în apropierea vârfului cu o funcție matematică corespunzătoare. Noi am utilizat funcția parabolică: $Y=A+B \cdot X+C \cdot X^2$, care descrie satisfăcător vârful picului, dacă toate punctele luate pentru aproximare aparțin părții a treia de sus a picului. Valoarea timpului de retenție adevărată s-a calculat ca abscisa vârfului parabolic: $Rt=-B/2/C$, iar înălțimea picului

– ca valoarea funcției de aproximare la $X=Rt$ cu scăderea ordinatei liniei de bază interpolate.

Concluzii:

1. A fost studiată influența unor parametri ai sistemelor de achiziționare și prelucrare a datelor cromatografice la fidelitatea și siguranța rezultatelor calitative și cantitative.
2. A fost propusă metoda de calculare a frecvenței optime de achiziționare a datelor reieșind din parametrii picurilor analitice.
3. A fost efectuată aprecierea diversilor algoritmi de prelucrare a informației cromatografice, și anume – filtrarea zgomotului și exceselor, corecția derivatei liniei de bază, determinarea coordonatelor capetelor și vârfului picului.
4. A fost propusă utilizarea cromatografiei derivate, și anume – a derivatei inverse de ordinul 2 pentru prelucrarea cromatogramelor complicate de deriva liniei de bază.

Referințe:

1. Гуревич А. Л., Коломыцев Л. А., Русинов Л. А. Автоматизация обработки хроматографической информации. – М., 1973.
2. Papas A. N., Delaney M. F. Evaluation of chromatographic integrators and data systems. *Analytical Chemistry*. 1987, v. 59, no. 1, p. 55A-59A.
3. Muntean D. L., Bojița Marius. Controlul medicamentelor. Metode spectrale, cromatografice și electroforetice de analiză. Cluj Napoca, 2004. p. 42-48.