

CONTRIBUȚII LA OPTIMIZAREA ALGORITMILOR DE PRELUCRARE A INFORMAȚIEI CROMATOGRAFICE

(comunicarea 2)

Igor Casian, Ana Casian, Vladimir Valica
Institutul Național de Farmacie MS RM

Rezumat. *Lucrarea este dedicată studiului metodelor matematice pentru separarea picurilor cromatografice parțial suprapuse: scăderea sectorului cromatogramei de fond, modelarea cromatogramelor cu utilizarea funcțiilor algebrice și de aparat. S-au discutat avantajele și dezavantajele fiecărei metode, propunându-se propriile recomandări la optimizarea algoritmilor de calcul corespunzători. S-au selectat două modele algebrice – Gauss exponențial modificat și Asimetric bisigmoidal, care descriu mai adecvat picurile reale, aparente în HPLC. Experimental, s-au evaluat erorile analizei cantitative a cromatogramelor în funcție de gradul de suprapunere a picurilor și nivelului de zgomot la utilizarea modelelor algebrice și de aparat.*

Cuvinte cheie: *HPLC, prelucrarea datelor, modelarea cromatogramelor, deconvoluția picurilor cromatografice.*

Summary. *The contributions in optimisation of the chromatographic information handling algorithms.*

This paper is dedicated to research of mathematical methods for separation of particular overlapped chromatographic peaks: subtraction of sectors of background chromatogram, modelling of chromatograms using apparatus and algebraic functions. Surveyed of advantage and disadvantages of each method, the own recommendations on optimisation of the corresponding computing algorithms are given. Two algebraic models – Exponentially Modified Gaussian and Asymmetric Double Sigmoid – most adequately describing real peaks apparent in HPLC have been selected. The experimental estimation of chromatograms quantification errors depending of various peaks overlapping and noise level is carried out at usage of apparatus and algebraic models.

Key words: *HPLC, data handling, chromatograms modelling, chromatographic peaks deconvolution.*

Materiale și metode

Lucrarea a fost efectuată pe cromatograful de lichide “Jasco”, seria LC-1500, cu detector UV-VIS, coloane cu faza inversă C-8, C-18 și Phenyl, pe faza amină (NH₂) în regim cu fază normală și schimb de ioni, pe faza cian (CN) cu mecanism combinat de interacțiune. Pentru alegerea modelului matematic adecvat au fost studiate funcțiile algebrice, propuse pentru descrierea picurilor în pachetul de programe matematice “Origin”, versiunea 7.0 (OriginLab Corp.), și aplicabile în varianta HPLC cu fază inversă. La ajustarea parametrilor modelului matematic s-a folosit algoritmul de ajustare, menționat în literatura de specialitate sub denumirea “Two Step”. Algoritmii studiați au fost realizați în Borland Delphi 3.0.

Rezultate obținute și discuții

Separarea matematică a picurilor cromatografice suprapuse

De la începutul dezvoltării istoriei cromatografice și până în prezent, problema separării picurilor suprapuse răvășește mințile cromatografiștilor. Chiar dacă zi de zi se întâmplă îmbunătățirea proprietăților sorbenților produși și creșterea eficienței coloanelor cromatografice, permanent se vor găsi sarcini pentru care eficiența dată este insuficientă. Cu alte cuvinte, talere teoretice, precum și bani, niciodată nu sunt de ajuns și întotdeauna persistă dorința de-a “stoarce” ceva mai mult din utilaj, decât este posibil conform definiției.

1. Scăderea picurilor empirice și sectoarelor de cromatograme de fond

Deja s-a menționat, că scăderea matematică a cromatogramei de fond sau a unui sector al ei, reprezintă o modalitate utilă de înlăturare a derivei liniei de bază, precum și a picurilor de impurități din faza mobilă la eluarea prin gradient [0]. Aici este nevoie de-a se face o concretizare substanțială. O simplă scădere a masivelor, cum se procedează în spectroscopie, nu e rezonabilă pentru sarcina pusă din cauza ireproductibilității timpilor de retenție a componentilor de fond (cum și a celor analitici), care duc de obicei la apariția picurilor bipolare pe cromatograma diferențială. Este necesară posibilitatea deplasării sectorului scăzut de cromatogramă pe axa de timp cu interpolarea valorilor dintre punctele de noduri. Noi am aplicat interpolarea liniară:

$$Y'_{i+\text{round}(dt-0.5)-1} = Y_{i+\text{round}(dt-0.5)-1} \cdot (Y_{0i} \cdot (\text{round}(dt-0.5) - dt + 1) + Y_{0i-1} \cdot (dt - \text{round}(dt-0.5))) \cdot M_{Y0},$$

unde Y și Y_0 reprezintă masivul datelor de lucru și celui scăzut (de fond), corespunzător.

Selectând valorile de deplasare pe axa de timp dt și ale coeficientului de dimensiune M_{Y0} se pot înlătura complet picurile străine, cu condiția reproductibilității formei lor. Însă trebuie de ținut cont, că amplitudinea zgomotului în acest caz crește de $\sqrt{M_{Y0}^2 + 1}$ ori.

Cu toată simplitatea și eficacitatea metodei, ea are și un dezavantaj legat de alegerea manuală a valorilor coeficienților dt și M_{Y0} și aprecierea vizual subiectivă a rezultatelor. De aceea ea trebuie utilizată cu precauție și, în dependență de posibilități, să fie înlocuită cu metode mai sigure, cu excepția cazului de scădere a derivei liniei de bază.

2. Modelarea cromatogramelor din picuri empirice

Dezvoltarea și îmbunătățirea metodei descrise mai sus prezintă sinteza unui sector de cromatogramă inițială, format din picuri de compuși individuali, descriși cu așa-numita funcție de aparat [0]. Ultima se prezintă în mod tabelar, sub formă de masive unidimensionale, conținând picuri de componenți individuali, "tăiate" din cromatogramele experimentale ale substanțelor pure, obținute în aceleași condiții. Funcțiile de aparat ai componenților individuali se sumează, fiecare cu deplasarea ei dt și coeficientul de dimensiuni M_Y ; totodată, ajustarea acestor parametri se poate de efectuat în regim automat, minimizând suma pătratelor de devieri tuturor punctelor a cromatogramei model de datele experimentale. Ajustarea cu viteză înaltă, soluționarea stabilă precum și posibilitatea definerii funcției aparat pentru picuri de orice formă evidențiază cu adevărat capacitățile pozitive ale metodei de prelucrare a cromatogramelor. Un dezavantaj al metodei îl prezintă necesitatea înregistrării cromatogramelor tuturor componenților individuali ai amestecului supus analizei pentru a obține acea funcție de aparat, care este uneori imposibilă de obținut la analiza probelor de material biologic, deoarece conțin mulți componenți neidentificați. Un alt neajuns este sensibilitatea înaltă a metodei la schimbarea formei picului, adică a funcției de aparat, deoarece modul de definire a funcției date nu permite schimbarea formei ei la ajustare. În tabelul 1 este prezentată evaluarea comparativă a erorii determinării ariei picului la ajustarea funcției aparat și algebrice, fiind influențată de factorii ce alterează forma picurilor.

Tabelul 1

Influența compoziției solventului și volumului probei injectate la forma picului și eroarea determinării ariei lui.

Substanța	Para- metrii	Solventul și volumul probei injectat								
		apă			faza mobilă			acetonitril – apă (40:60)		
		5 μ l	20 μ l	50 μ l	5 μ l	20 μ l	50 μ l	5 μ l	20 μ l	50 μ l
Feno- barbital	Rt	1,97	1,98	2,13	1,97	2,0	2,0	1,97	1,97	1,95
	N	1780	1985	2183	1506	1369	1013	1370	807	255
	A	1,15	1,22	1,22	1,20	1,18	1,25	1,14	1,23	1,28
	w_{1/2}	0,111	0,109	0,108	0,120	0,129	0,151	0,126	0,164	0,288
	CV_{EMG}	0,5	-1,95	-0,64	-0,72	0,95	1,83	2,71	3,49	-0,88
	CV_{Ap.}	2,77	1,07	3,34	-0,60	-4,26	-11,4	0,177	-14,1	-43,2
Carbama- zepină	Rt	3,54	3,65	3,8	3,55	3,61	3,62	3,56	3,56	3,53
	N	3276	3453	3704	2946	2774	2234	2748	1693	524
	A	1,15	1,07	1,03	1,03	1,09	1,22	1,03	1,17	1,19
	w_{1/2}	0,146	0,147	0,146	0,154	0,162	0,181	0,160	0,204	0,364
	CV_{EMG}	-1,7	-3,25	-1,03	-1,15	-0,95	-0,26	0,42	-0,97	2,06
	CV_{Ap.}	2.16	0.08	2,64	0.01	-2.9	-8,8	0.42	-14,4	-40,1

Nota: Rt – timp de retenție, min; N – eficacitatea, talere teoretice; A – factor de asimetrie; w_{1/2} – lărgimea picului la 1/2 din înălțimea sa, min; CV_{EMG} – eroarea relativă (coeficient de variație) a ariei calculată utilizând funcția Gauss exponențial modificată, %; CV_{Ap.} – eroarea relativă (coeficient de variație) a ariei calculată utilizând funcția aparat, %.

Condițiile cromatografice: coloana Zorbax RX C18, 5 mkm 2,1x150mm; viteza de eluție 0,5 ml/min; lungimea de undă 220 nm; faza mobilă : acetonitril – 0,01M H₃PO₄ (30:70).

3. Modelarea cromatogramelor din funcții algebrice

Posibilitatea utilizării modelelor matematice la îmbunătățirea rezoluției în cromatografie a fost evidentă din momentul punerii bazei teoretice a metodei și mai este actuală. Există metode de separare bazate pe aproximarea sectorului de cromatogramă cu suma de Gaussiene [0, 0], care nu iau în considerație asimetria picurilor reale; alți autori [0] au utilizat funcția Gauss cu alterarea exponențială a frontului descendent, dar din anumite motive aceste idei nu sunt realizate în soft-urile comerciale nici până în prezent. Una din aceste cauze, observate în special în cromatografia de lichide, o reprezintă corespunderea incompletă a teoriei destul de simplificate cu procesele fizice reale, dificultatea aplicării aparatului matematic în practică, evaluarea neunivocă a siguranței metodelor matematice model de însuși cromatografiști. În cromatografie, un rol important l-a avut îmbunătățirea considerabilă a parametrilor și lărgirea sortimentului de sorbenți produși, îmbunătățirea sensibilității și selectivității detectoarelor, când se părea că orice problemă se poate soluționa alegând corect realizarea aparat a metodei și condițiile experimentului. Însă orice parametru al utilajului și sorbenților, ce determină sensibilitatea și selectivitatea metodei, are o limită fizică de care producătorii deja s-au apropiat, iar optimizarea selectivității prin alegerea experimentală, dintr-un număr enorm de sorbenți și moduri de detecție, e o “plăcere” nu doar îndelungată, dar și destul de costisitoare. Bineînțeles, posibilitățile modelelor matematice au și ele o limită, dar costul lor de realizare la etapa curentă este cu mult mai redus, fapt de care trebuie profitat.

3.1. Alegerea modelului matematic adecvat

Alegerea modelului matematic, care să descrie adecvat forma reală a picurilor cromatografice, este un factor decisiv în obținerea unor rezultate autentice și sigure. Necorespunderea modelului teoretic Gaussian, ce ia în considerație doar surparea prin difuzie a zonei, cu procesele fizice reale pentru mulți cromatografiști a și fost la timpul respectiv, una din cauzele de bază de-a renunța, în general, la separarea matematică a picurilor. Pe de altă parte, aplicarea modelului matematic, ce ia în considerație toate procesele fizice posibile și mecanismele de interacțiune în sistemul cromatografic, par ireale, fie doar și din cauza unor mecanisme ce încă nu sunt studiate deplin. Dar nici nu este cazul. Practic este suficient un set de funcții empirice ce descriu forma reală a picului cu eroare admisibilă în diverse variante ale metodei cromatografice. Cu cât mai complicat va fi modelul empiric și cu cât mai mulți parametri de reglare va conține el, cu atât mai precis vor fi descrise datele experimentale, iar rezultatul îl va constitui creșterea timpului de ajustare și micșorarea reproductibilității de soluționare. Iată de ce, alegerea unui compromis rezonabil dintr-un număr mare de modele empirice existente [0] prezintă o sarcină importantă și de mare răspundere.

Fiind studiate 19 modele matematice, propuse pentru descrierea picurilor în pachetul de programe matematice "Origin" v. 7.0 (OriginLab Corp.), și aplicându-le în varianta HPLC cu fază inversă, noi am selectat două funcții cu cea mai mică eroare de ajustare a datelor experimentale:

Funcția Gauss exponențial modificată (EMG):

$$f(x) = y_0 + \frac{A}{t_0} e^{\frac{1}{2} \left(\frac{w}{t_0} \right)^2 - \frac{x-x_c}{t_0}} \int_{-\infty}^z \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{y^2}{2}} dy, \quad (1)$$

$$z = \frac{x - x_c}{w} - \frac{w}{t_0}$$

unde y_0 – ordonata liniei de bază, A , x_c și w – aria, abscisa maximului și lățimea componentului Gauss, t_0 – constanta de timp al componentului exponențial. Raportul ultimelor două mărimi (w și t_0) determină gradul de asimetrie a picului.

Funcția este teoretică pentru forma picului obținut în rezultatul surpării exponențiale a zonei în injector și capilarele de legătură și al surpării de tip Gaussian în coloană. Experimental s-a depistat că modelul EMG descrie bine forma picurilor reale obținute pe fazele inverse C-18 și Phenyl; pe faza amină (NH_2) în regim de fază normală și schimb de anioni; pe faza cian (CN).

Pentru picuri reale valorile w și t_0 sunt legate reciproc și ajustarea lor independentă este urmată de mărirea considerabilă a timpului de ajustare, de aceea, am înlocuit parametru t_0 cu coeficientul $k = t_0/w$. Apar unele dificultăți la calculul analitic a integralului în expresia (1). Aplicând proprietatea, că valoarea lui tinde spre zero, când $z < -6$ și spre unu, când $z > 6$, noi am înlocuit integralul indefinit cu cel definit în intervalul de la -6 până la z când $-6 < z < 6$ și l-am calculat prin metoda numerică, iar pentru accelerarea calculelor am folosit prezentarea tabelară a acestei integrale cu interpolarea liniară dintre noduri.

Funcția Asimetrică bisigmoidală:

$$y = y_0 + A \cdot \frac{1}{1 + e^{-\frac{x-x_c+w_1/2}{w_2}}} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + e^{-\frac{x-x_c-w_1/2}{w_3}}} \right), \quad (2)$$

unde y_0 – ordonata liniei de bază, A – amplitudinea, x_c – abscisa maximului picului, w_1 – distanța dintre punctele centrale a două sigmoide, ce determină lățimea vârfului picului, w_2 și w_3 – lățimea frontului ascendent și descendent.

Modelul se potrivește aproape ideal pentru faza inversă C-8 și descrie satisfăcător picurile obținute pe fazele C-6 și Phenyl. El este mai simplu în calcul, dar conține un parametru mai mult, ce mărește inevitabil timpul ajustării.

Probabil aceste două funcții pot fi valabile și la modelarea cromatogramelor, obținute pe alte faze staționare, dar n-am avut posibilitatea verificării experimentale. Este important de menționat că forma picurilor obținute pe coloanele uzate poate varia esențial de cele luate ca model, manifestându-se prin alterarea fronturilor (mai des descendent), apariția “picurilor călăreți”, lărgirea și bifurcarea vârfului picului. În acest caz, independent de tipul fazei staționare, modelul Asimetric bisigmoidal se ajustează mai adecvat. Metodele model de prelucrare a cromatogramelor pot da rezultate nesigure la utilizarea coloanelor foarte uzate.

Ambele funcții algebrice descrise pot fi aplicate la modelarea sectorului de cromatogramă, ce conține câteva picuri suprapuse. În acest caz modelul rezultat prezintă suma termenului liber y_0 și a termenilor secunzi din părțile din dreapta ale ecuației (1) sau (2) pentru toate picurile.

3.2. Căutarea aproximării inițiale a parametrilor modelului matematic

Orice algoritm iterațional de ajustare a modelului matematic cere, după cum se știe, să i se dea soluționare inițială, care să nu difere prea mult de cea adevărată. Selectarea nereușită a coordonatelor inițiale în spațiu parametric poate duce la identificarea optimului local sau la trecerea în domeniul valorilor inadmisibile a oricărui parametru. De regulă pachetele de programe matematice de destinație generală cer introducerea manuală a valorilor inițiale ale parametrilor, devenind pentru utilizator o “piatră de încercare”, îndeosebi în cazul modelelor complicate, precum ar fi cele aplicate în cromatografie la separarea picurilor suprapuse. Astfel, în exemplu prezentat în fig. 1, modelul matematic conține 37 de parametri ajustați. Astfel este evidentă necesitatea elaborării algoritmilor de căutare automată a picurilor parțial suprapuse pe un sector al cromatogramei și determinarea valorilor inițiale pentru parametrii modelului, fără de care această metoda nu se poate implementa în practică pentru analiza cromatografică de rutină.

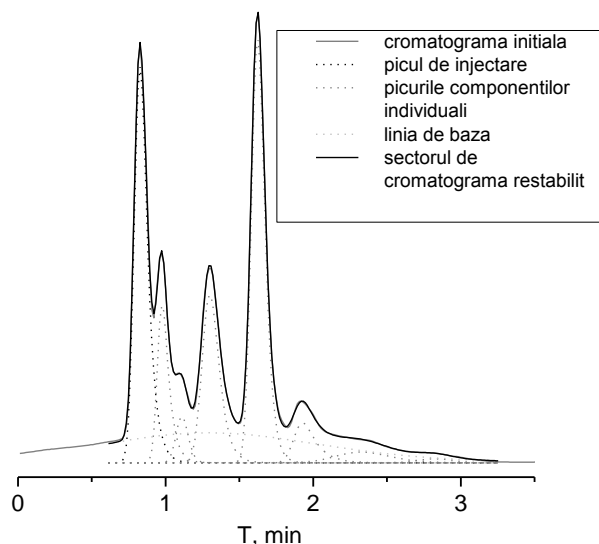


Fig. 1. Sectorul inițial al cromatogramei extractului de plasmă sanguină. Aproximarea picurilor cu funcția EMG.

Noi propunem varianta proprie de soluționare a problemei date, bazată pe analiza derivatei de ordinul 1 și 2 al semnalului cromatografic:

Inițial, sectorul cromatogramei cercetat se examinează în direcția creșterii timpului pentru căutarea punctului, în care se constată maximul primei derivate, iar înclinarea negativă a derivatei a doua este mai mare decât limita de sensibilitate stabilită (verificarea condiției a doua elimină “execuțiile false” la prezența zgomotului). Punctul găsit (“ T_L ” în fig. 2) corespunde cu punctul de inflexiune al frontului ascendent al picului. Apoi, examinarea continuă în căutarea maximului picului care corespunde punctului “ T_C ” cu minimul derivatei a doua și înclinarea negativă a primei derivate, depășind limita

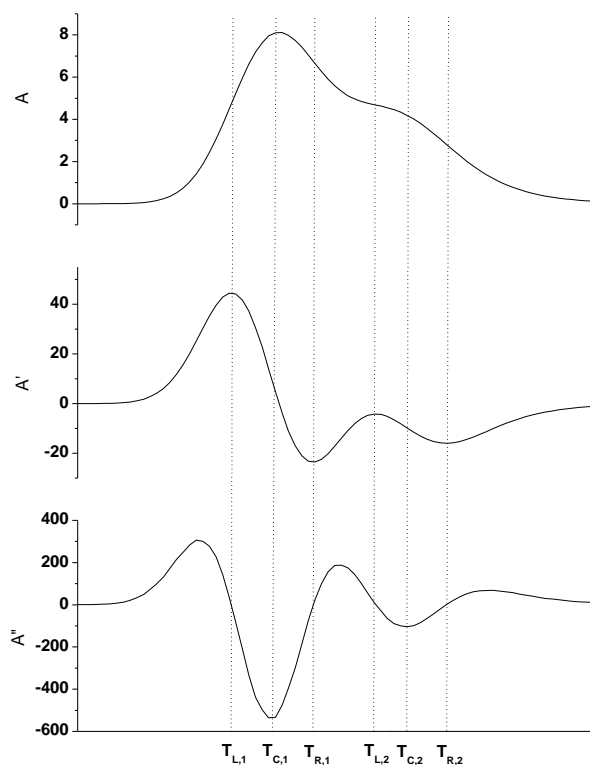


Fig. 2. Depistarea picurilor parțial suprapuse după derivate.

chromatogramă cercetat în căutarea picului următor.

Cu regret, nu toate picurile pot fi depistate în regim automat. Astfel de cazuri pot apărea la coincidența timpilor de retenție a picurilor cu diferite lățimi, la apariția picurilor negative, precum și când un pic oarecare nu se află în întregime în sectorul cercetat al cromatogramei (de exemplu, la determinarea ariei picului-călăreț). De aceea, operatorul, trebuie să aibă permanent posibilitate de a adăuga sau extrage picuri în mod manual; de a regla parametrii lor controlând vizual rezultatele tuturor schimbărilor introduse.

3.3. Ajustarea parametrilor modelului

În programele aplicative se utilizează un șir de algoritmi de ajustare neliniară a funcțiilor, care se deosebesc semnificativ după viteza de lucru și reproductibilitatea soluționării; de regulă aceste două mărimi se află în dependență inversă. Siguranța funcționării algoritmilor scade odată cu creșterea numărului de parametri ai modelului și devine indice critic pentru acele modele complicate, ce sunt utilizate la separarea picurilor cromatografice. De aceea după părerea noastră la alegerea algoritmului de ajustare compromisul dintre viteza și stabilitatea de lucru trebuie rezolvat în favoarea indexului al doilea. Astăzi, având în vedere posibilitățile tehnicii moderne de calcul, majorarea inevitabilă a numărului necesar de operații aritmetice și, corespunzător, a timpului de calcul, deja nu mai este atât de critică.

Noi am folosit algoritmul de ajustare, menționat în literatura de specialitate sub denumirea “Two Step” [0] care, după observațiile noastre, funcționează destul de stabil pe modelele multiparametrice (nu doar în cromatografie, dar, de exemplu, și pe modelele farmacocinetice). Esența funcționării algoritmului constă în următoarele: în spațiul parametric n -dimensional (n – numărul de parametri ajustați ai modelului) de la coordonatele inițiale se execută câte doi pași în fiecare direcție – spre mărirea și micșorarea valorii parametrului corespunzător (Fig. 3).

Din $2 \cdot n + 1$ seturi de parametri obținuți se alege cel ce dă valoarea cea mai mică a sumei pătratelor de deviații ale curbei model de la cromatograma experimentală. Coordonatele noi

de sensibilitate. În sfârșit, găsim punctul “ T_R ” cu minimul primei derivate și înclinarea pozitivă a derivatei a doua, depășind o jumătate din limita de sensibilitate (se ia în considerație asimetria picurilor reale). El (“ T_R ”) corespunde punctului de inflexiune al frontului descendent al picului. În continuare, pentru picul găsit se calculează valorile inițiale ale parametrilor funcției de aproximare selectate:

Pentru funcția Gauss exponențial modificată:

$$w = T_R - T_L / 2,3; \quad x_c = T_C - w / 3;$$

$$A = (Y_{T_C} - y_0) \cdot w \cdot 2,5; \quad k = (T_R - T_C) / (T_C - T_L) / 1,1.$$

Pentru funcția Asimetrică bisigmoidală:

$$x_c = T_C; \quad A = (Y_{T_C} - y_0) \cdot 2,5; \quad w1 = T_R - T_L / 3;$$

$$w2 = (T_C - T_L) / 1,8; \quad w3 = (T_R - T_C) / 1,5.$$

Coeficienții numerici s-au selectat empiric, astfel ca în majoritatea cazurilor practice să se obțină rezultate satisfăcătoare.

După efectuarea acestor calcule se continuă examinarea sectorului de

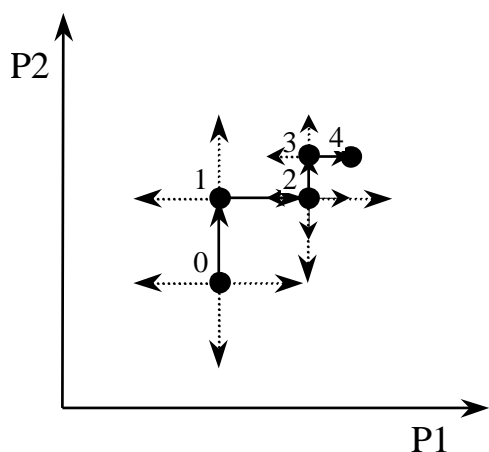


Fig. 3. Schema funcționării algoritmului "Two Step" pe exemplu spațiului parametric bidimensional.

program să fie prevăzută o astfel de posibilitate) și se cere ajustarea restului picurilor, ca apoi să se permită ajustarea tuturor parametrilor modelului, stabilind pasul de iterație inițial nu prea mare. De asemenea, este util să se asigure posibilitatea salvării rezultatelor ajustării pentru utilizarea lor ulterioară în calitate de aproximări inițiale ale modelului la prelucrare altor cromatograme din aceeași serie. În atare mod se reușește a micșora esențial timpul de prelucrare a datelor la efectuarea analizelor în serii.

3.4. Evaluarea preciziei determinării ariei picurilor prin metoda model în funcție de gradul suprapunerii lor și nivelului relativ de zgomot

În fond scopul constă în evaluarea siguranței metodei model de separare matematică a picurilor și intervalelor ei admisibile de implementare în practică.

Testarea metodelor de prelucrare a datelor pe cromatograme reale este dificilă, deoarece în practică nu se pot obține cromatograme cu valori ale ariei picurilor, rezoluției și nivelului zgomotului, fixate precis. Pe de altă parte, aplicarea uneia și aceleiași funcții matematice la modelarea cromatogramelor de test și prelucrarea lor ulterioară este incorectă: În cazul dat, condițiile de funcționare a algoritmilor și rezultatele ajustării vor fi îmbunătățite artificial, deoarece întotdeauna forma picurilor reale diferă de cea teoretică. Pentru evitarea acestor factori negativi noi am modelat cromatogramele test cu parametrii necesari din picurile cromatografice reale, obținute la analiza soluțiilor de substanțe pure. Rezoluția picurilor a fost stabilită în intervalul de la 1,0 (încă acceptabilă de prelucrat cu metode clasice) până la 0,4 (convoluția a două picuri în unul singur). S-au folosit picuri forma cărora într-o oarecare măsură diferă de cea teoretică; perechile de picuri suprapuse au fost luate cu înălțimile egale care se deosebeau de 10 ori; de asemenea s-a adăugat zgomot aleatoriu, intensitatea medie a căruia constituie circa 10% din înălțimea picului.

Bineînțeles, evaluarea maximum obiectivă a siguranței metodelor model matematice de prelucrare a cromatogramelor și aplicarea lor efectivă poate fi obținută doar într-un proces îndelungat de utilizare a lor, la soluționarea celor mai diverse sarcini aplicative. Însă chiar și acum, pe baza testelor efectuate și succintei experiențe practice, putem expune unele concluzii preliminare:

- Separarea matematică de model a picurilor poate da rezultate satisfăcătoare la suprapunerea puternică a lor ($R_s = 0,4-0,5$ pentru picuri cu înălțimile aproape egale), pe când separarea lor prin metode clasice este imposibilă. De asemenea, s-au obținut rezultate mai bune la suprapunerea moderată ($R_s = 0,7-1,0$). Totodată, la rezoluția

serveșc drept date inițiale pentru următorul ciclu de iterație. Dacă într-un oarecare ciclu coordonatele inițiale dau cea mai mică sumă a pătratelor de deviații, înseamnă că optimul se află la o distanță mai mică decât lungimea pasului. În cazul dat se micșorează lungimea pasului și se continuă iterațiile. Ajustarea se termină când lungimea pasului devine mai mică decât mărimea definită, la care eroarea depistării optimului poate fi ignorată. Traiectoria mișcării în spațiu parametric de obicei prezintă o linie frântă, care se torsează în apropierea optimului în spirală convergentă.

De regulă, algoritmul descris demonstrează o repetabilitate bună, dar la diferențe mari (de un ordin și mai mare) ale înălțimilor picurilor suprapuse este posibil "expulzarea" parametrilor unor picuri minore. În aceste cazuri acești parametri trebuie fixați (în

- picurilor, ce e suficient de a fi prelucrată prin metode clasice, aplicarea metodelor model poate da rezultate mai rele, în deosebi când forma picurilor este puternic alterată.
- Metodele model dau rezultate mai bune pentru cromatogramele supraîncărcate de zgomot, chiar și în cazul separării complete a picurilor. Fenomenul se manifestă prin faptul, că modelul algebric mediatizează zgomotul pe întregul sector de cromatogramă examinat, nu alterează forma semnalului util și, în atare mod, fiind filtru ideal de zgomot.
 - Precizia ajustării se îmbunătățește suficient, dacă sunt cunoscute și fixate valorile parametrilor ce redau forma măcar la unul din picurile suprapuse; când se cunoaște forma tuturor picurilor, după esența și precizia de ajustare metoda se apropie de aproximarea cu funcția aparat. Parametrii formei picurilor, ca și funcția aparat, pot fi determinați din cromatogramele soluțiilor de substanțe pure.
 - În caz că înălțimile picurilor suprapuse diferă suficient, valoarea ariei picurilor minore se determină cu mare eroare care este imposibil de prognosticat, reieșind din valoarea rezoluției picurilor. Am depistat o corelație cu mult mai strânsă dintre precizia determinării ariei și valoarea criteriului de suprapunere parțială (FO), descris în literatura de specialitate [0]. În studiul farmacocinetic obținerea unei erori relative admisibile (sub 10-15%) a analizei cantitative poate conta pe valoarea FO a picurilor analitice cel puțin 0,80-0,85, iar când parametrii formei picurilor se cunosc – la valori ale FO cel puțin 0,70-0,75. În ultimul caz prelucrarea cromatogramelor fără aplicarea metodelor matematice de regulă este imposibilă.
 - Valorile devierii standard pentru datele experimentale, minimizezate la ajustarea modelului matematic, nu corelează cu eroarea determinării ariei, dar, fiind calculate pentru picuri individuale, ele oglindesc nivelul de adecvare al modelului algebric ales.
 - În plus, metoda model de separare a picurilor am testat-o în practică după repetabilitatea rezultatelor cantitative pe exemplu dozării helidoninei (tabelul 2, fig. 4).

Tabelul 2.

Evaluarea repetabilității rezultatelor dozării helidoninei în formele farmaceutice din iarba de rostopască cu utilizarea modelului Gauss exponențial modificat la separarea picurilor suprapuse.

Proba analizată	Valoarea FO picului de helidonină	S-a depistat:		Notă
		Valoarea medie conc., mg/ml	Repetabilitatea (CV, %)	
Tinctură de rostopască	0,76	0,063	10,6	
Suc de rostopască, proba 1	0,82	0,024	8,8	
Suc de rostopască, proba 2	0,86	0,021	6,6	
Suc de rostopască, proba 3	0,76	0,019	15,3	Valorile parametrilor ce determină forma picului helidoninei sunt fixate
	0,73	0,021	4,8	

3.5. Aplicațiile funcțiilor model în cromatografie

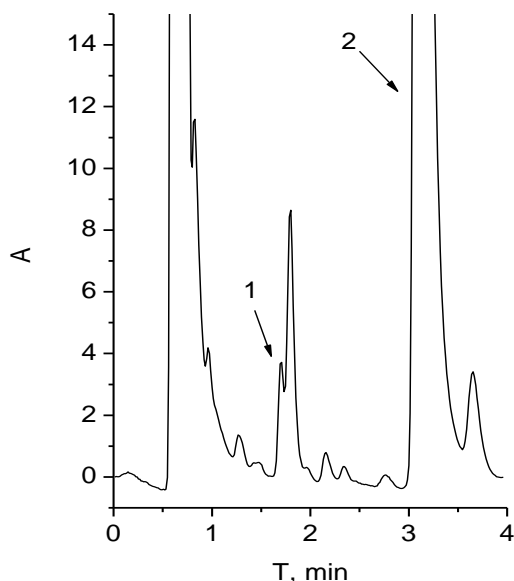


Fig. 4. Cromatograma sucului din iarba de rostopască:
1 –helidonină; 2 – coptizină.

Una din direcțiile aplicative de modelare matematică a picurilor cromatografice, pentru care în fond și s-au elaborat aceste metode, a fost deja amintită – separarea picurilor suprapuse ce permite majorarea suficientă a selectivității analizei cromatografice fără a mări timpul efectuării ei și cheltuielile suplimentare la optimizarea realizării de aparat. Acest mod de optimizare a selectivității pare destul de ademenitor, însă considerăm (și suntem de acord cu alți autori [0, 0]) că trebuie aplicat cu mare atenție și doar în cazurile, când separarea fizică a componentilor într-adevăr nu se reușește. Pe de altă parte, respectiva metodă trebuie să se afle în arsenalul cromatografistului ca una de rezervă la prelucrarea cromatogramelor complicate cu picuri adăugătoare, fenomen întâlnit periodic în practica analizei farmacocinetice. Probele de material biologic reprezintă obiecte cu componența calitativă ireproductibilă și, oricât de

înalță ar fi selectivitatea fizică al sistemului cromatografic, se vor găsi probe ce conțin suplimentar componenți interferenți cu cei analitici. De obicei în studiile de bioechivalență astfel de probe se rebutază, pe când la efectuarea monitoring-ului terapeutic medicamentos aceasta ar însemna imposibilitatea formulării unei concluzii referitoare la pacientul anumit.

Separarea picurilor este posibilă atât cu valori apropiate ale timpilor de retenție (Fig.5a), cât și cu aceeași timpi de retenție, dar cu lățimile diferite (Fig.5b); în ultimul caz este imposibilă corectitudinea marcării automate a cromatogramelor – în loc de două picuri interferente se detectează unul, dar la ajustarea modelului matematic se depistează clar neconcordanța lui după formă cu picurile experimentale. Ultima circumstanță permite ușor de a afla “artefactele” (componenți reținuți puternic din probele precedente), depistarea cărora cu alte metode fiind dificilă, dacă ele coincid întâmplător cu picurile analitice după timpii de retenție.

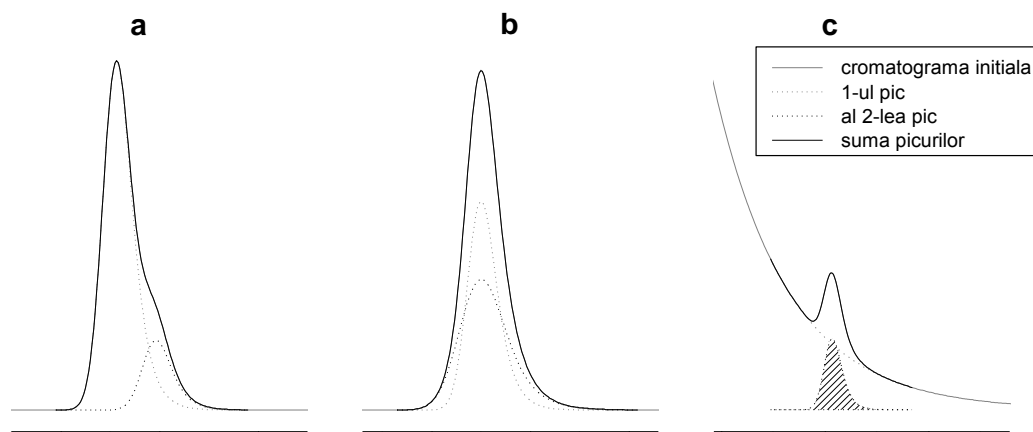


Fig. 5. Separarea matematică a două picuri suprapuse: **a** – lățimile egale, cu valori apropiate a timpului de retenție; **b** – cu timpul de retenție identic, având lățimile diferite; **c** – separarea “picului - călăreț”.

O altă aplicare a funcțiilor model poate fi la prelucrarea picurilor – călăreți (Fig.5c). Acest procedeu demonstrează rezultate sigure, dar se cheltuie mai mult timp decât la remarcarea picului analitic cu ajutorul derivatei a doua [0]. Așa-dar el trebuie recomandat doar în cazurile când așezarea picului analitic pe “coadă” se combină cu interferența lui cu alte picuri cu lățimi comensurabile.

Modelele matematice au capacitatea de a evidenția efectiv semnalul util din cromatogramele supraîncărcate de zgomot și permite aplicarea lor la detectarea concentrațiilor destul de joase ale analiților – la limita sensibilității fizice a utilajului, cu condiția că sensibilitatea dată se determină doar de nivelul relativ de zgomot și nu de semnalele interferente (Fig.6). La drept vorbind, astfel de situații se întâlnesc rar în studiul farmacocinetic.

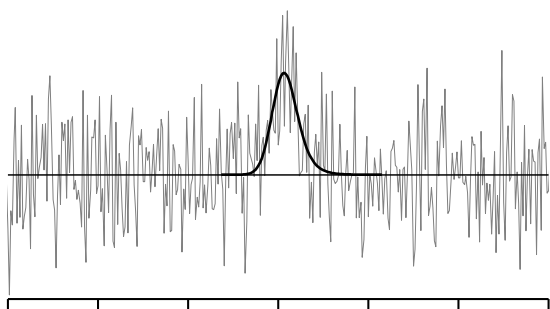


Fig. 6. Restabilirea picului din cromatograma supraîncărcată de zgomot (raportul semnal /zgomot = 2,0).

Determinarea erorii de aproximare a picurilor individuale cu funcții matematice permite studierea influenței diferitor factori ce alterează forma picurilor experimentale – de exemplu, aprecierea gradului de uzură a coloanelor cromatografice. De altfel, criteriul evaluării cantitative a gradului de uzură a coloanei va trebui elaborat pe viitor. Deocamdată putem constata, că uzura coloanei influențează diferit la forma picurilor compușilor din diverse grupe chimice. Practic, aceasta înseamnă că în timpul lucrului coloana poate deveni complet inutilă pentru unele metode analitice concrete, dar poate fi prelungită aplicarea ei cu succes la soluționarea

altor sarcini.

Mulți cromatografiști creează baze de date pentru păstrarea cromatogramelor proprii, având ca scop utilizarea lor ulterioară la elaborarea unor metode analitice noi. Implementarea metodelor model matematice va permite micșorarea suficientă a volumului bazei de date, fiind păstrate nu masivele inițiale, ci parametrii funcțiilor de aproximare. Totodată, cromatogramele amestecurilor multicomponente se modelează ușor din funcțiile picurilor individuale.

În fine, încă un punct – posibil, cel mai important - de aplicare a algoritmilor descriși mai sus trebuie să devină metodele model de optimizare a selectivității fizice a sistemului cromatografic la care ne vom referi mai detaliat în alte lucrări.

Concluzii

1. Au fost studiate unele metode matematice utilizate la separarea picurilor cromatografice parțial suprapuse.
2. S-au propus unele recomandări pentru optimizarea algoritmilor corespunzători de calcul.
3. Am selectat două modele algebrice – cele mai adecvate la descrierea picurilor cromatografice reale: Gauss exponențial modificat (EMG) și Asimetric bisigmoidal. Experimental s-a depistat că modelul EMG descrie adecvat forma picurilor reale obținute pe fazele inverse C-18 și Phenyl, pe faza amină în regim de fază normală și schimb de anioni și pe faza cian. Modelul Asimetric bisigmoidal se potrivește pentru faza inversă C-8 și descrie satisfăcător picurile obținute pe faza C-6 și Phenyl.
4. S-a efectuat evaluarea erorilor analizei cantitative a cromatogramelor la utilizarea modelelor algebrice și de aparat concomitent expunându-se direcțiile de aplicare a funcțiilor model în cromatografie.

Bibliografie

1. Casian A., Casian I., Valica V. Contribuții la optimizarea algoritmilor de prelucrare a informației cromatografice. Revista Farmaceutică a Moldovei. 2005, nr. 3, p. 29-38.
2. Косарев Е. Л., Муранов К. О. Хроматография сверхвысокого разрешения. Приборы и техника эксперимента. 2001, № 4, С. 74-79.
3. Аранович Г. Л., Аринштейн А. Э., Жуховицкий А. А., и др. Интерпретация перекрывающихся хроматографических пиков. Заводская лаборатория. 1983, т. 49, № 11, С. 29-31.
4. Серегина Н. И., Солопченко Г. Н. Коррекция искажений хроматограмм и разделение перекрывающихся хроматографических пиков. Журн. аналит. химии. 1995, т. 50, № 2, С. 187-189.
5. Фаткудинова Ш.Р., Солопченко Г.Н. Применение цифровых моделей реальных хроматограмм для оценки погрешности результатов химического анализа. Журн. аналит. химии. 1998, т. 53, № 11, С. 1158-1165.
6. Романенко С. В., Стромберг А. Г. Классификация математических моделей аналитических сигналов в форме пиков. Журн. аналит. химии. 2000, т. 55, № 11, С.1144-1148.
7. Очков В. Mathcad PLUS 6.0 для студентов и иженеров. М.: КомпьютерПресс, 1996, с. 134.
8. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. Пер. с англ.– М.: Мир, 1989, С. 154.
9. Papas A. N., Delaney M. F. Evaluation of chromatographic integrators and data systems. Analytical Chemistry. 1987, v. 59, no. 1, p. 55A-59A.