

# ОБРАБОТКА ДАННЫХ ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ПРОГРАММОЙ "МУЛЬТИХРОМ"

К.Михайлова\*, к.ф.-м.н., В.Красиков\*\*, д.х.н., И.Малахова\*, к.х.н., Ю.Козьмин\*\*\*, Ю.Каламбет\*, к.ф.-м.н.  
kalambet@ampersand.ru

**Т**онкослойная хроматография на пластинах (ТСХ) – один из наиболее часто используемых вариантов хроматографии. Во многих случаях результат анализа получается визуальным исследованием пластины. В работе предлагается решение задачи количественной оценки результатов ТСХ в виде программы, преобразующей изображение пластины, полученное в денситометре или на сканере, в цифровую форму, с дальнейшей обработкой программой "МультиХром". Решение пригодно также для обработки изображений гель-электрофореза ДНК или белков.

## ПРОГРАММА PLANAR

Тонкослойная хроматография (ТСХ) [1] используется чрезвычайно широко в лабораториях самого разного профиля. Модуль Planar, входящий в состав специальной версии ПО "МультиХром-Planar" [2], предназначен для преобразования графических данных, представленных в виде изображений хроматографических пластин ТСХ или гелей планарного электрофореза, в хроматограммы формата \*.chw, в котором программа "МультиХром" записывает сигналы детекторов жидкостных и газовых хроматографов. Это позволяет производить последующую обработку данных планарных хроматограмм, именуемых денситограммами, с помощью процедур, разработанных для обработки данных, поступающих от детекторов.

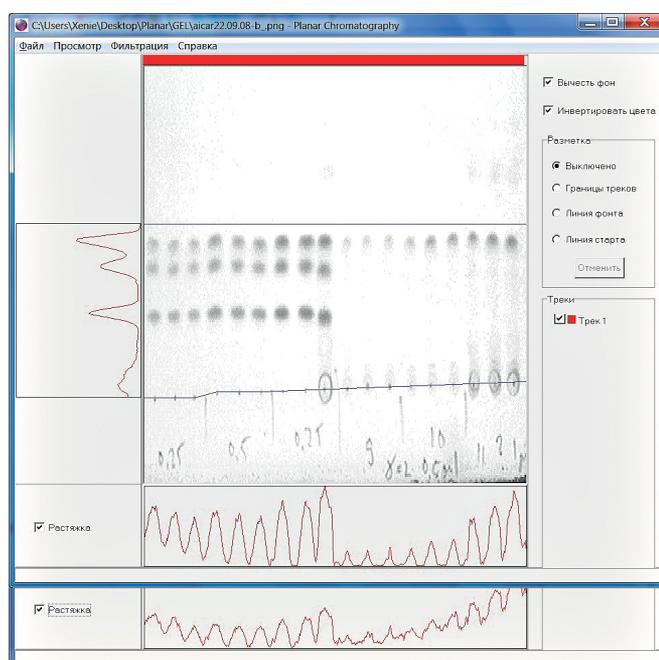


Рис.1. Окно программы Planar. Изображение пластины с нанесенными линиями старта и фронта

\* ЗАО "Амперсенд".

\*\* ЗАО НТЦ "Ленхром".

\*\*\* Институт биоорганической химии РАН.

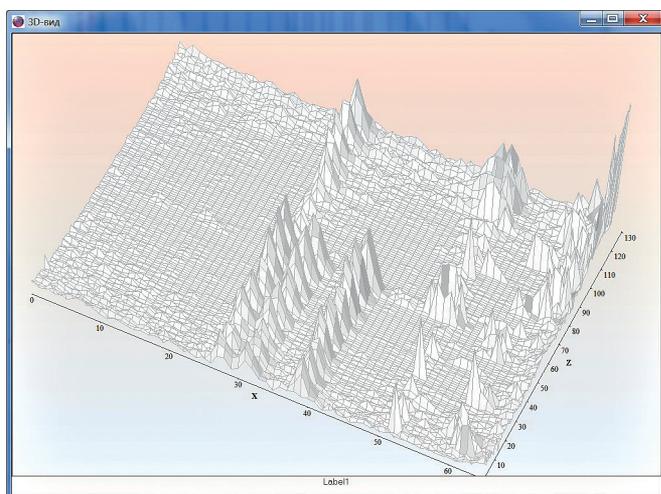


Рис.2. Представление денситограммы пластины ТСХ в формате 3D

По умолчанию гель или пластина изображаются в виде двумерной карты (рис.1), где цветом отмечена интенсивность сигнала. При необходимости можно посмотреть на изображение как на проекцию трехмерного объекта (рис.2). Хроматографическая пластина или гель планарного электрофореза содержит, как правило, несколько дорожек, которые должны быть преобразованы в отдельные денситограммы, поэтому на первом этапе надо провести разметку. Для этого изображение, записанное в каком-либо графическом формате (bmp, tiff, jpg,...), размещается в специальном окне с необходимыми инструментами (рис.1). Предпочтительно использование форматов, сохраняющих данные без потери точности (bmp, tiff). Слева от изображения представлена суммарная денситограмма пластины или геля по горизонтали, внизу – суммарная денситограмма по вертикали. Пики на левой денситограмме соответствуют разделенным веществам, на нижней – зонам или трекам. Полученное изображение необходимо разметить. Две горизонтальные линии обозначают область пластины (геля), в которой происходит разделение. Их положение зависит от направления процесса разделения. В тонкослойной хроматографии используются термины: "линия старта", "линия фронта", причем линия старта располагается снизу и поток растворителя идет снизу вверх, в этом же направлении движутся зоны разделяемых веществ. В гель-электрофорезе есть линия старта, линия финиша, соответствующие границам геля, а разделение идет сверху вниз. Горизонтальные линии могут быть кусочно-линейными, если какая-то из

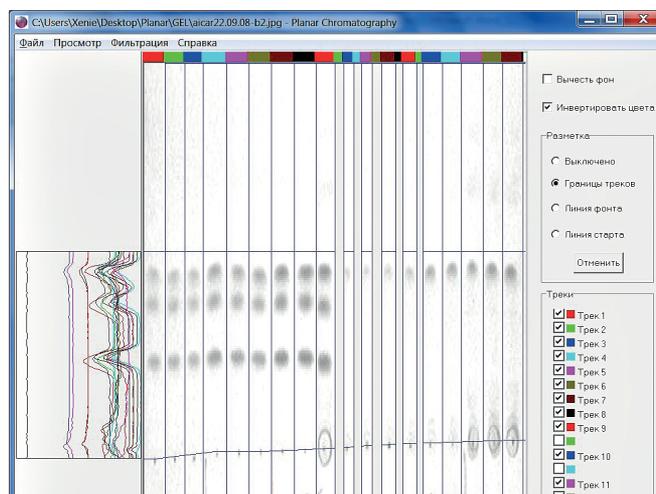


Рис.3. Изображение пластины после разметки

линий не прямая. При выборе начальной и конечной линии через отмеченную точку автоматически проводится горизонтальная линия, независимо от положения выбранной точки по другой координате. Пользователь при необходимости может сделать эту линию ломаной, отмечая нужные точки.

Анализируемая смесь движется по траектории – дорожке, которая в ТСХ называется треком, а в гель-электрофорезе – зоной. Пользователь должен обозначить начало, конец и границы между дорожками. В качестве границы используется вертикальная прямая, наклонные дорожки не допускаются. Для поиска границ между дорожками удобно пользоваться нижней гистограммой – граница дорожки соответствует минимуму этой гистограммы. Для выделения дорожек кликом по левой кнопке мыши отмечаются точки в минимумах графика нижней гистограммы. Образующиеся при этом зоны или треки получают цветную метку, цвет гистограммы в левом окне соответствует цветовой метке дорожки. Одновременно справа формируется список созданных элементов.

Для уменьшения шума на получаемых денситограммах область между дорожками можно удалить, выделяя ее в отдельную дорожку. Затем следует снять отметку в списке, после чего дорожка лишается имени, а содержащиеся в этой области данные не включаются в расчет (рис.3). С этой же целью можно вычистить общий фон, поставив соответствующий флажок. По мере разметки на дорожки слева от изображения появляются соответствующие денситограммы. Разметка должна быть полностью завершена до экспорта данных

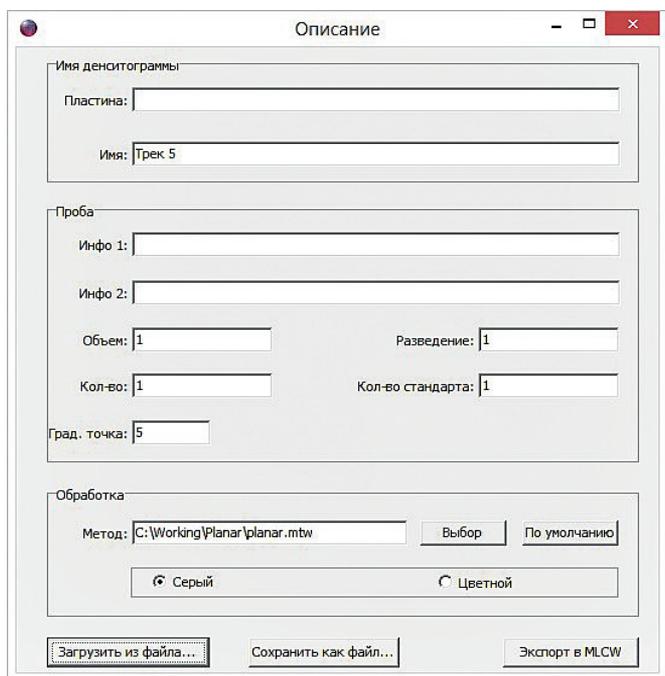


Рис.4. Окно экспорта денситограммы

в ПО "МультиХром". Для преобразования отдельной денситограммы в формат \*.chw, используемый в ПО "МультиХром", необходимо, щелкнув правой кнопкой мыши по нужной дорожке, открыть специальное окно для экспорта данных (рис.4). В этом окне вводится вся необходимая информация об анализе, которая будет перенесена в паспорт денситограммы, а также использована для расчетов. Параметр **Град.точка** автоматически ставится равным номеру трека или зоны. Треки, описанные в таблице концентраций как градуировочные точки, автоматически обсчитываются и заносятся в градуировку.

При выполнении экспорта данных после нажатия кнопки **Экспорт в MLCW** используется файл метода ПО "МультиХром". Предполагается, что для каждого набора анализируемых веществ используется свой метод. После экспорта первой денситограммы может потребоваться его настройка. При выполнении известного анализа, для которого уже создавался метод, следует до перехода в окно экспорта выбрать нужный файл метода. Первой денситограммой для нового метода, в котором нужно создать градуировку, должна быть градуировочная денситограмма первой точки (рис.5). После ее экспорта выполняются стандартные процедуры ПО "МультиХром", необходимые при первой градуировке: создается таблица компонентов и таблица концентраций, причем в последнюю обязательно сразу вносятся все градуировоч-

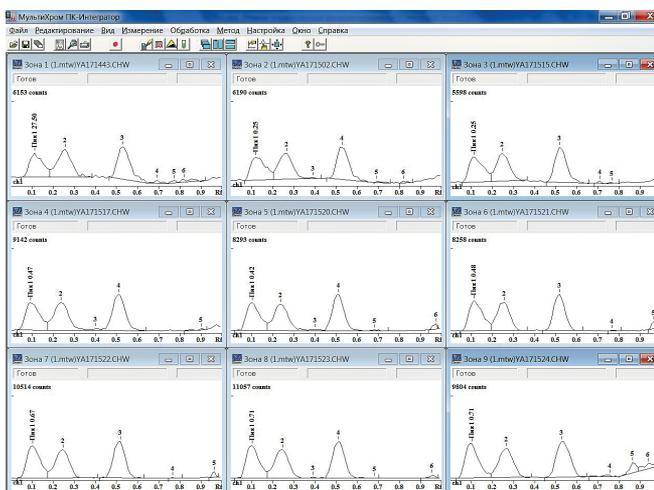


Рис.5. Денситограммы для девяти градуировочных точек (по три для трех значений концентрации), соответствующие трекам 1–9 на рис.3

ные точки (рис.6). Номер градуировочной точки в таблице концентраций должен соответствовать номеру трека, на котором проводится разделение градуировочной смеси. По мере экспорта остальных градуировочных хроматограмм данные из них автоматически включаются в построение обновляемой градуировочной зависимости. По окончании экспорта градуировочных треков и, соответственно, построения градуировочной зависимости, можно выполнить экспорт денситограмм для определения неизвестных концентраций. На рис.7 представлены денситограммы треков 10–18 (см. рис.3) с концентрациями, автоматически рассчитанными на основе получен-

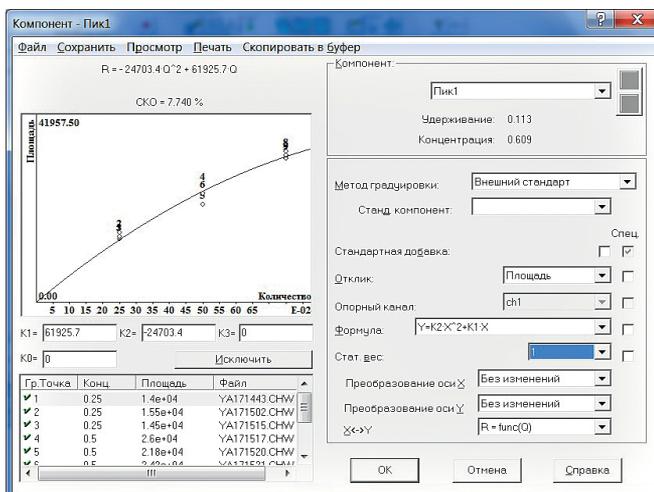


Рис.6. Градуировочная зависимость, построенная по данным денситограмм рис.5

**Фрагмент отчета по хроматограмме**

Дата:	22.10.2014 13:36:20					
Автор отчета:	Михайлова К.В.					
Хроматограмма:	Зона 18					
Дата импорта:	17.10.2014 15:42:37					
Файл:	C:\Users\Xenie\Desktop\Planar\DATA\YA171547.CHW					
РЕЗУЛЬТАТЫ	РАСЧЕТА					
No	Rf	Ширина	Высота	С/Ш	Конц.	Название
1	0,10	0,075	3049,03	16	0,609	Пик1

ной градуировки (см. рис.6). В представленном примере результат расчета виден на изображении денситограммы, однако несложно получить отчет по анализу в файле или на принтере (см. врезку).

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЦВЕТНЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ

Если изображение пластины или геля получено по визуализации флуоресценции, то следует использовать серый цвет. Цветные изображения возникают при разделении цветных компонентов и получении изображения с помощью сканера.

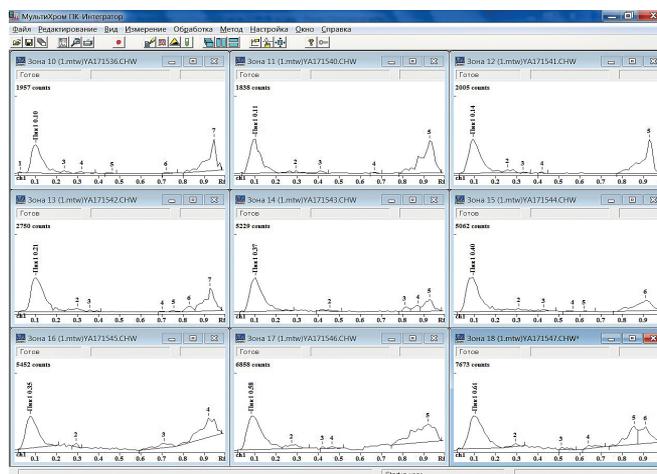


Рис.7. Денситограммы зон 10–18 с расчетом концентраций

В случае частично перекрывающихся разноцветных пятен обработка цветного изображения пластины может дать дополнительную информацию для более точного определения концентрации компонентов (рис.8). Для этого производится преобразование изображения в многоканальную денситограмму, к которой далее применяется процедура факторного анализа [6, 7].

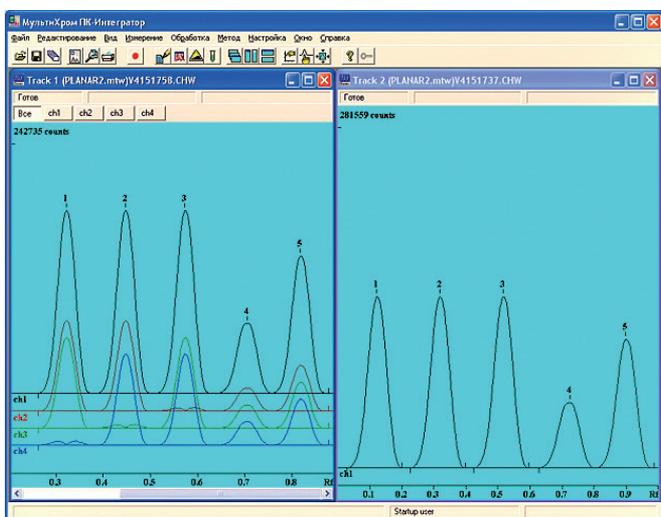


Рис.8. Цветная и черно-белая обработка тестового изображения, содержащего синее, зеленое, красное и два серых пятна разной интенсивности

Для обработки цветного изображения в окне **Описание** при заполнении полей в области **Обработка** устанавливается значение **Цветной**. После нажатия кнопки **Экспорт в МультиХром** в окне программы "МультиХром" откроется окно денситограммы, содержащее 4 графика: ch1 – суммарный сигнал; ch2 – сигнал красного; ch3 – сигнал зеленого; ch4 – сигнал синего. Разметка производится по ch1.

## ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБРАБОТКИ ДАННЫХ ТСХ

Обрабатываемая область изображения представляет собой двумерный прямоугольник, направление разделения – вертикальное, интенсивность в каждой точке задается тремя числами (т.е. исходное изображение цветное). Отдельные пиксели изображения  $p_{i,j}$  можно представить в виде одной матрицы  $P[m,n]$  в случае градаций серого и трех матриц  $R[m,n]$ ,  $G[m,n]$  и  $B[m,n]$ , где  $m$  – число пикселей по вертикали и  $n$  – по горизонтали. Преобразование в градации серого производится суммированием:

$$P_{i,j} = r_{i,j} + g_{i,j} + b_{i,j} .$$

Преобразование в денситограмму происходит в двух направлениях. Горизонтальная денситограмма  $H(j)$ , отражающая распределение материала по ширине дорожки, получается путем суммирования горизонтальных пикселей по индексу  $i$ :

$$h_j = \sum_{i=1}^m p_{i,j} .$$

Вертикальная денситограмма  $D(j)$ , отражающая разделение веществ и называемая после экспорта в программу "МультиХром" хроматограммой, получается путем суммирования горизонтальных пикселей по индексу  $j$ :

$$d_i = \sum_{j=1}^n p_{i,j} .$$

После импорта хроматограммы в "МультиХром" проводится адаптивная фильтрация шумов [3], по окончании которой вычисляется средний доверительный интервал аппроксимации  $\Delta$ . Полученное значение доверительного интервала используется в качестве оценки шума для вычисления отношения сигнал/шум (S/N) по пикам:

$$S/N = \frac{\text{height}(i)}{3 \cdot \Delta} ,$$

где  $\text{height}(i)$  – высота соответствующего пика.

Градуировка производится методом наименьших квадратов [4, 5], допускаются полиномиальные зависимости до третьей степени, в том числе форсированно проходящие через начало координат.

Таким образом, разработан пакет программ, позволяющий автоматизировать работу с изображениями пластин ТСХ и гелей планарного электрофореза. В рамках пакета применены уникальные технологии фильтрации шумов [3] и обработки многоканальных данных [6, 7], что заметно расширяет возможности его применения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Красиков В.Д. Основы планарной хроматографии. – СПб.: Химиздат, 2005.
2. Каламбет Ю.А., Мальцев С.А., Козьмин Ю.П. "МультиХром" и метрология: 25 лет вместе. – Аналитика, №2 (9), 2013, с.48–55.
3. Каламбет Ю.А., Мальцев С.А., Козьмин Ю.П. Фильтрация шумов: окончательное решение проблемы. – Аналитика, 2011, №1 (1), с.50–55.
4. ГОСТ Р ИСО 11095-2007. Линейная калибровка с использованием образцов сравнения.
5. Каламбет Ю.А., Мальцев С.А. Доверительные интервалы градуировки при взвешенном МНК. – Аналитика, 2013, №4 (11), с.42–47.
6. Kalambet Y., Kozmin Y., Perelroyson M. Computer spectrochromatography: Principles and practice of multi-channel chromatographic data processing. – Journal of Chromatography A, 1991, v.542, p.247–261.
7. Каламбет Ю.А. Компьютерный тренажер "Жидкостный Хроматограф": технологии обработки данных. – Аналитика, 2012, №6 (7), с.16–21.

