

В статье предложен метод вычисления спектра хроматографического пика по «наилучшей локальной чистоте»

АВТОРЫ

Ю.А. Каламбет —
генеральный директор
ЗАО «Амперсенд»,
канд. физ.-мат. наук

Ю.П. Козьмин —
ЗАО «Амперсенд»

С.А. Мальцев —
ЗАО «Амперсенд»

КАК ПОЛУЧИТЬ ПРАВИЛЬНЫЙ СПЕКТР ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПИКА

Введение

В последние годы в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) все более широкое применение находят многоволновые спектрометрические детекторы [1]. Чаще всего это детекторы с фотодиодной матрицей. Эти детекторы позволяют, кроме обычных хроматографических данных, определять спектры поглощения веществ.

Такая информация представляет значительный интерес, в частности, для идентификации компонентов путем сравнения с эталонными спектрами веществ. Однако ряд факторов: шумы, ошибки вычисления базовой линии, выход за пределы линейного диапазона детектора и прочие — могут существенно исказить спектральную информацию. Применение специальных математических методов обработки [2] позволяет в значительной мере устранить влияние этих негативных факторов. Но при этом к методам вычисления спектров предъявляются весьма жесткие требования, так как они должны быть устойчивы к перечисленным выше искажениям и обладать хорошей воспроизводимостью от анализа к анализу — только в этом случае получаемые результаты будут достаточно надежны и однозначны для применения их на практике.

В настоящей работе рассматривается метод вычисления спектра по «наилучшей локальной чистоте» (далее — НЛЧ), реализованный в программе «МультиХром», и про-

водится сравнительный анализ с другими известными методами.

Теория

На сегодняшний день наиболее употребительными являются следующие методы вычисления спектров: спектр в вершине пика, средний спектр пика, спектры на переднем и заднем склонах пика.

Чтобы пояснить способ вычисления спектров по НЛЧ введем необходимые определения.

Для сравнения спектров друг с другом в [3] было предложено использовать понятия угла в N -мерном пространстве, где N — число значений длины волны, на которых производятся измерения. Каждый спектр в этом случае представляется как N -мерный вектор, компонентами которого являются отклики детектора на N длинах волн.

Если имеются два спектра с компонентами P_i и Q_i , то косинус угла φ между ними вычисляется следующим образом:

$$\cos(\varphi) = \frac{\sum (P_i \cdot Q_i)}{\sqrt{\sum P_i^2} \cdot \sqrt{\sum Q_i^2}},$$

где суммирование производится по всем длинам волн.

Если сравниваются спектры, полученные в результате разных анализов, то применяется специальная процедура нормировки, позволяющая минимизировать влияние погрешностей измерения [3].

Поясним данное определение на простом примере, когда измерения производятся всего на двух длинах волн, т.е. рассмотрим два спектра с компонентами P_1, P_2 и Q_1, Q_2 .

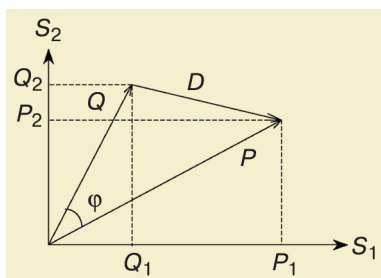


Рис. 1. Графическое изображение двух спектров с компонентами P_1, P_2 и Q_1, Q_2 .

Представим эти спектры графически в системе координат (рис. 1), где по горизонтальной оси откладываются величины отклика на одной длине волны, а по вертикальной оси — на другой. В этом случае спектры будут представлены в виде векторов \vec{P} и \vec{Q} , угол между которыми, по определению, и есть угол между спектрами.

Далее введем меру «локальной чистоты» пика. «Локальная чистота» в точке пика определяется наибольшим из двух углов между спектром в данной точке и спектрами в двух ближайших (по времени) соседних точках.

Для однородного пика должен выполняться закон Ламберта-Бера. То есть спектры, измеренные в разных точках должны быть пропорциональны друг другу и, соответственно, угол между спектрами должен быть равен нулю. В реальных условиях угол несколько больше нуля, поскольку всегда есть погрешности измерений, возможны нелинейные эффекты и наличие примесей. Однако чем ближе угол к нулю, тем лучше выполняется закон Ламберта-Бера. Поэтому мы говорим, что «локальная чистота» в точке пика тем выше, чем меньше угол между спектром в данной точке и спектрами, измеренными в ближайших по времени точках.

Спектр НЛЧ пика есть спектр, измеренный в точке, где угол между соседними спектрами в пределах пика оказывается наименьшим. Такой спектр обладает рядом полезных свойств.

Во-первых, он достаточно устойчив к влиянию нелинейности от-

клика детектора, которая может появляться в области больших значений поглощения света. Нелинейность приводит к нарушению закона Ламберта-Бера, поэтому процедура вычисления спектра НЛЧ «проигнорирует» область, где сигнал вышел за пределы линейного диапазона, и вычислит спектр не в вершине, а в некоторой точке на склоне пика.

Во-вторых, этот метод оказывается устойчив и к наличию примесей, поскольку примесь тоже нарушает закон Ламберта-Бера и процедура вычисления найдет место в пике, где примеси еще нет или она минимальна.

Исследуем, что такой метод может дать на практике, и проведем сравнение с другими методами.

Эксперимент

Для сравнения мы взяли набор хроматограмм, полученных с помощью детектора на фотодиодной матрице. Измерения проводились по 87 каналам ультрафиолетового диапазона от 220 до 392 нм (с шагом 2 нм). В качестве исследуемого вещества был взят этомидат. Было проведено 11 анализов с разной концентрацией. Для приготовления пробы вещество в количествах от 0,01 до 50 мкг разводилось в одинаковых объемах растворителя. Типичная хроматограмма представлена на рис. 2. На рис. 3 изображен график изменения угла между соседними спектрами, соответствующий этой хроматограмме.

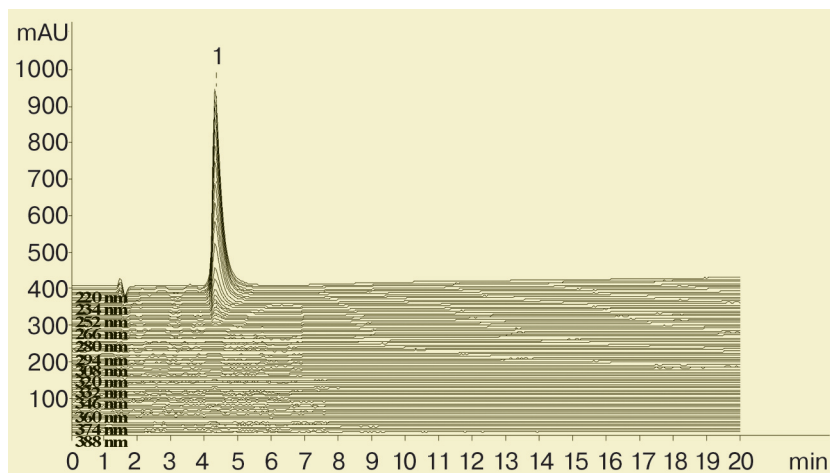


Рис. 2. Типичная хроматограмма раствора этомидата, полученная с помощью детектора на фотодиодной матрице.

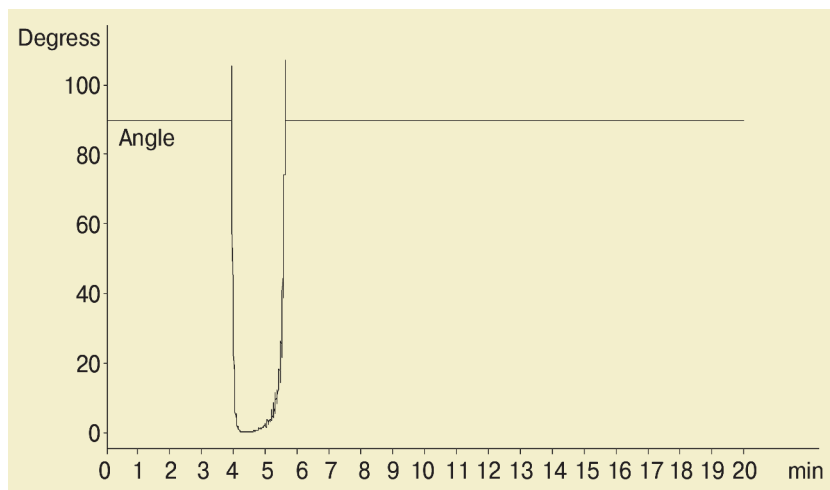


Рис. 3. Изменение угла между соседними спектрами хроматограммы, представленной на рис. 2.

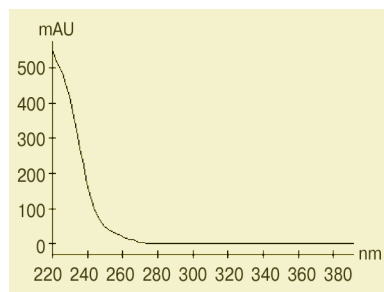


Рис. 4. Изображение эталонного спектра.

Спектр исследуемого вещества, полученный при разведении 5 мг вещества, когда еще не наблюдается никаких нелинейных эффектов, но сами спектры хорошо выражены и шумы вносят наименьшие искажения, был принят в качестве эталонного (рис. 4).

Эталонный спектр сравнивался со спектрами, полученными во всех прочих анализах. При этом для вычисления спектров использовалось 3 метода (сравнивались спектры, вычисленные одним и тем же методом):

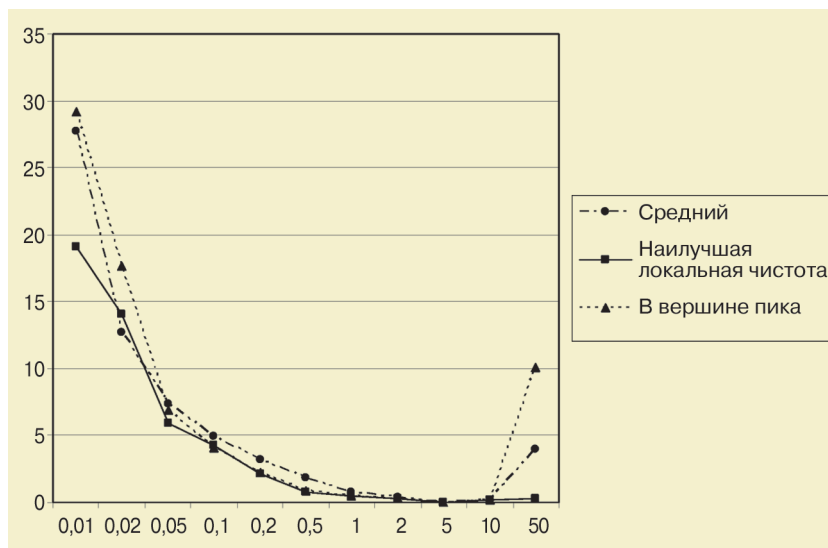


Рис. 5. График зависимости угла между эталонным и анализируемым спектрами от концентрации раствора этомидаата.

— средний спектр (интегральный отклик по всему пику для каждой длины волны);
— спектр в вершине пика;
— спектр в точке НЛЧ, полученный описанным выше методом.

На основе полученных данных был построен график зависимости угла между эталонным и анализируемым спектрами от концентрации (рис. 5).

Легко заметить, что при малых концентрациях наилучшей вос-

МультиХром® для Windows

Надежная система автоматизации хроматографии



123060 Москва, а/я 80
(095) 196 1857, 196 5290
support@ampersand.ru
www.ampersand.ru



ЗАО «Амперсэнд» – разработчик, производитель и поставщик систем компьютерной автоматизации хроматографии «МультиХром»

• Система «МультиХром» для приема, обработки и хранения хроматографических данных. 24-битный аналого-цифровой преобразователь и ПО версии 1.5х – 1.7х (в том числе с поддержкой эксклюзивной хроматографии). Допускает подключение до 8 хроматографов любого типа, имеющих аналоговый выход.

- **Управляющая версия ПО «МультиХром» 2.x.** Модификации для оборудования производства Bischoff Chromatography (в том числе с многоволновым спектрометрическим детектором), Metrohm AG, Merck/Hitachi, Knauer, НПФ «Аквилон», а также с хроматографом «Милюхром-5(4)».
- **«МультиХром-миниLIMS».** Система управления хроматографическими данными в масштабах предприятия, включающая централизованное хранение данных и доступ к информации по локальной сети.

- ✓ Познакомиться с нашей продукцией можно на выставке **«AnalyticaExpo-2005»** 19–22 апреля 2005 г. (Москва, КВЦ «Сокольники», павильон 11, стенд 3.4).
- ✓ В июне 2005 г. ЗАО «Амперсэнд» совместно с химическим факультетом МГУ проводит Девятую школу-семинар **«КомпьютерХром»**. Цель Школы – ознакомление с современным уровнем и тенденциями развития автоматизации в хроматографии, практическое освоение работы с системой «МультиХром».

производимостью обладает метод вычисления среднего спектра пика. Сильное влияние на него оказывают шумы и ошибки определения базовой линии. Это влияние наблюдается вплоть до оптимальной концентрации, при которой вычислялся эталонный спектр. При дальнейшем повышении концентрации начинает оказывать сильное влияние выход за пределы линейного диапазона и угол растет.

Результаты с использованием метода вычисления спектра в вершине пика значительно лучше в области малых концентраций. Однако спектр оказывается еще более искаженным, как только мы достигаем концентраций, которые выводят детектор за пределы линейного диапазона.

Что касается метода вычисления спектра по НЛЧ, то, как видно из графиков, даже при малых

концентрациях его результаты оказываются наилучшими, хотя метод вычисления спектра в вершине пика уступает незначительно. Однако в области нелинейности сигнала метод показал непревзойденные результаты — он просто «не чувствует», что такие искажения есть.

Заключение

Результаты вычисления спектра с помощью метода НЛЧ оказались самые надежные во всем диапазоне концентраций.

Основным недостатком данного метода является то, что теряется информация об абсолютной величине сигнала, поскольку спектр может быть взят фактически в любой точке пика. Соответственно, метод нельзя применять для количественного анализа, т.е. для расчета концентрации. Для проведения количественных рас-

четов необходимо использовать другие методы: средний спектр пика или спектр в вершине пика.

Эту проблему, по крайней мере частично, можно решить путем введения нормировочных коэффициентов. При вычислении спектра по НЛЧ одновременно можно вычислять средний спектр и спектр в вершине пика и проводить соответствующую градуировку полученного спектра.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Хубер Л. Применение диодного матричного детектирования в ВЭЖХ. — М.: «Мир», 1993.
2. Malinowsky E.R. Factor analysis in chemistry. — New York: Wiley, 1991.
3. Kalambet Yu.A., Kozmin Yu.P. and Perelroysen M.P. Computer spectrometry. Principles and practice of multi-channel chromatographic data processing // Chromatogr. — 1991. — 5421. — P. 247–261.

КНИЖНЫЙ
КИОСК

ЭТИ КНИГИ ВЫ МОЖЕТЕ ПРИОБРЕСТИ

в РИА «СТАНДАРТЫ И КАЧЕСТВО»
и в книжном магазине «Бизнес-Книга»

РИА
«СТАНДАРТЫ
И КАЧЕСТВО»

Адрес:

Москва, 115088
2-я ул. Машиностроения,
д. 17а, стр. 1

Адрес для переписки:
Москва, 115114, а/я 21

Тел.: (095) 506 8029,
177 8768, 771 6652

Факс: (095) 177 8467,
771 6653

E-mail: podpiska@mirq.ru

Интернет-магазин:
www.mirq.ru, www.stq.ru

УПОРЯДОЧЕНИЕ. ПУТЬ К СОЗДАНИЮ КАЧЕСТВЕННОГО РАБОЧЕГО МЕСТА

Растимешин В.Е., Куприянова Т.М. — М.:
РИА «Стандарты и качество», 2004. — 230 с., илл.

В книге дается описание практики и методологии внедрения метода повышения производительности и создания комплексной качественной производственной среды, который известен во всем мире под названием 5S.

Авторы подробно рассказывают о том, как простые приемы наведения порядка, чистоты и укрепления дисциплины, в реализацию которых вовлекаются все члены коллектива, создают мощный импульс для организационного развития и основу для внедрения более сложных методов повышения производительности, таких как TPM (производительное обслуживание оборудования с участием всего персонала), TQM (всеобщее управление на основе качества), JIT (точно вовремя).

Книга предназначена для руководителей, а также специалистов, занимающихся вопросами качества.



Индекс — 21213
Цена — 150 р. (без НДС)

Книжный магазин «Бизнес-Книга»
находится по адресу: Москва, ул. Тверская, д.12, стр. 2
(вход с Козицкого переулка)