

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PROCESAMIENTO DE DATOS CROMATOGRÁFICOS

E. TOZZI, H. KOFMAN, P. LUCERO[†]
y A. GONZÁLEZ[‡]

[†] Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral,
Santiago del Estero 2829 (3000) Santa Fe, R. Argentina
emitozzi@yahoo.com.ar, hkofman@fiquis.unl.edu.ar

[‡] Universidad Tecnológica Nacional, Regional Paraná

Resumen – Se desarrolló un sistema de adquisición y procesamiento de datos cromatográficos.

El software filtra la señal mediante splines cuadráticas. Los picos se detectan y clasifican a través de una máquina de estados para fijar las líneas de base según una serie de criterios usuales en cromatografía. Se agregaron prestaciones de manejo de archivos, manipulación gráfica de los datos y compatibilidad con aplicaciones de uso común.

Se desarrolló hardware para la amplificación de señal y conversión análogo-digital de 24 bits. El diseño es simple gracias al uso de componentes comerciales altamente integrados.

El sistema se transfirió a laboratorios de investigación química de dos universidades nacionales siendo utilizado en forma rutinaria.

Palabras clave - cromatografía, cromatograma, detección, integración, picos.

I. INTRODUCCIÓN

Muchos laboratorios de investigación, de análisis de rutina, o de control de calidad, cuentan con equipos de cromatografía de diversos tipos (gaseosos, HPLC, de electroforesis capilar, etc.) adquiridos hace ya algunos años. Algunos de ellos son de excelente calidad pero se tornan obsoletos por carecer de sistemas de adquisición y procesamiento de datos computarizados. En otros casos cuentan con sistemas poco amigables, que no permiten la comunicación con otras aplicaciones de uso corriente.

Los altos costos de reemplazar totalmente los equipos o informatizarlos a través de los sistemas ofrecidos por el comercio, hicieron que resultara atractiva la alternativa de desarrollar un sistema propio. La actividad asimismo resultó altamente instructiva para los participantes entre los cuales se contaba un técnico y alumnos pasantes de carreras de Ingeniería Química e Ingeniería Electrónica.

En una primera etapa se elaboraron los algoritmos de procesamiento de datos y las mediciones se efectuaron mediante placas de adquisición de datos comerciales. Posteriormente se diseñó y desarrolló el hardware de adquisición de datos de alta resolución.

En la programación se utilizó Visual Basic 6.0, en función de su versatilidad y facilidad para generar aplicaciones en entorno Windows.

Acondicionamiento de señal

Los cromatógrafos utilizados proveen una señal analógica del orden de los milivolt, destinada originalmente a integradores con salida de papel térmico o registradores. Dado que las placas A/D requieren señales del orden del voltio, se hizo necesario amplificar la señal. Para ello se usó un amplificador de instrumentación integrado, con entrada diferencial y ganancia variable, al cual se le adicionaron circuitos protectores contra sobrevoltaje y filtros pasabajos a la entrada y salida. Se obtuvo así una amplificación con alto grado de linealidad y bajo ruido agregado al sistema.

En la figura 1 se observa el amplificador de instrumentación sin la cobertura ni blindaje.

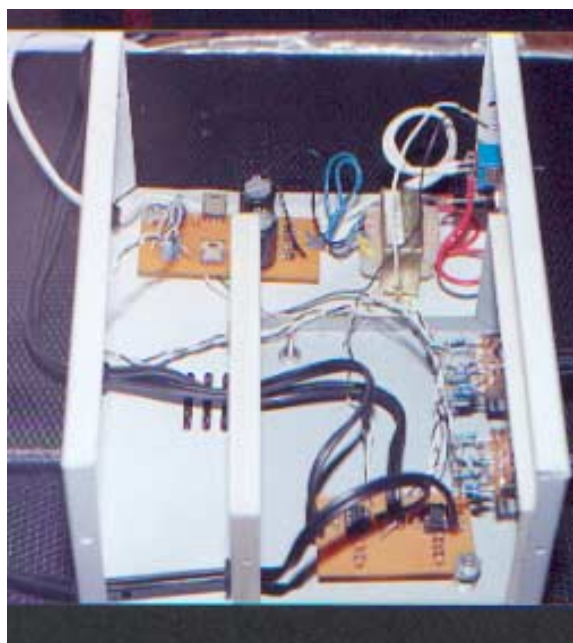


Fig. 1 : Amplificador de instrumentación dual.

II. CONVERSIÓN A/D CON PLACAS COMERCIALES

En la primera etapa se utilizaron placas comerciales para la captura de la la señal del cromatógrafo y su registro en un archivo.

La frecuencia de muestreo depende del ancho de los picos que se deben detectar, para los casos estudiados se establecieron valores entre 5 y 50 Hz. Los tiempos totales se pueden establecer entre unos pocos minutos y algunas horas.

Las frecuencias se fijaron usando un oscilador a cristal y contadores de la placa. También se utilizó temporización por software cuando se contó con computadoras suficientemente rápidas.

Las lecturas se registraron en archivos de tipo binario, lo cual reduce su tamaño respecto a formatos como el ASCII. El archivo se inicia con una cabecera de datos que permite registrar información sobre el cromatograma: equipo, frecuencia, muestra, operador, fecha, hora, etc. Estos datos son propuestos por defecto en la experiencia siguiente, conformándose el nombre del nuevo archivo con el prefijo literal del anterior, con incremento de numeración en una unidad. Esto permite que se puedan identificar distintas series de experiencias, y que se pueda pasar de un ensayo de rutina al siguiente en forma casi automática.

A medida que transcurre la experiencia se visualiza el cromatograma en pantalla, lo cual permite monitorear el proceso, que puede ser finalizado o cancelado en cualquier momento.

III. PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

A. Entorno de procesamiento

Otro componente del software es la aplicación denominada "PROCESAR", que permite cargar los archivos de datos, visualizar el cromatograma, realizar la integración y generar el informe.

La pantalla de lectura de cromatogramas permite recorrer la lista de archivos y visualizar los datos de las cabeceras de los mismos, lo cual facilita la búsqueda de experiencias realizadas.

Se utilizan archivos de método, que contienen los parámetros de integración, los que se han optimizado de acuerdo al tipo de cromatograma.

La fijación correcta de las líneas de base depende fuertemente del juego de parámetros de integración. Si se modifica sustancialmente la técnica se hace necesario realizar pruebas con los parámetros hasta obtener una líneas de base satisfactorias.

B. Ajuste de datos

El software realiza en primer lugar un ajuste de datos, con la finalidad de eliminar el ruido y permitir el correcto funcionamiento del algoritmo de integración. Con tal finalidad, se probaron distintos métodos (filtrado digital, ajuste con splines de distinto orden, y

filtrado por media móvil.), optándose finalmente por splines de segundo orden con derivada primera continua. Este método permitió una mejor identificación del comienzo de pico y de los máximos, aún en condiciones de alto ruido. La cantidad de muestras que toma cada tramo de ajuste, es un parámetro que se puede fijar en el archivo de método, y resulta posible la elección de tramos de longitud variable, que aumenten gradualmente el número de puntos conforme avanza el tiempo.

En la figura 2 se muestra en detalle un trozo de cromatograma, en el que puede observarse la curva continua del ajuste y los datos con el ruido de la señal.

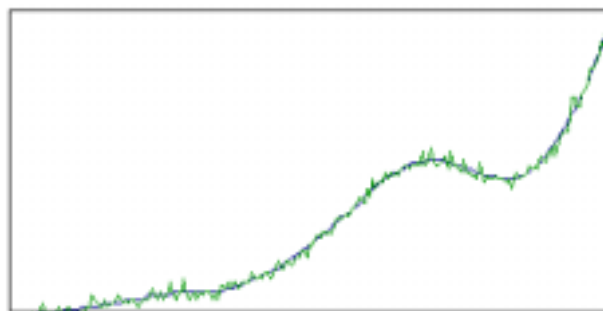


Fig. 2: Superposición de datos y curva de ajuste

C. Integración de picos

El algoritmo de integración del cromatograma es capaz de distinguir diferentes casos de picos cromatográficos en los cuales la línea de base se fija de distinta manera.

Para ello se tiene en cuenta el valor de la señal, su derivada ($D1$) y su derivada segunda ($D2$).

Picos simples: Se considera detectado el comienzo del pico cuando la derivada primera de la señal supera un valor prefijado ($D1 > Ls$) punto 2 de la figura 3.

Cuando la derivada pasa por cero siendo la derivada segunda negativa, se detecta el máximo ($D1=0, D2<0$) Punto 3 de la figura 3.

El final de pico se detecta cuando la derivada segunda es positiva y la derivada primera supera el valor prefijado ($D1>Li$) Punto 4 de la figura 3.

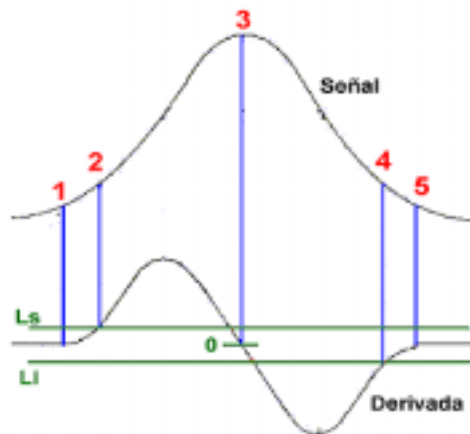


Fig. 3: Principio para la detección de los picos.

Los valores de L_s y L_i pueden ser variables a lo largo del cromatograma, lo cual permite compensar el efecto de ensanchamiento de los picos.

El tiempo de retención que identifica al componente es aquel en el cual ocurre el máximo, punto 3 de la figura 3.

La línea de base es una recta que une los puntos 2 y 4, figura 3.

Para calcular el área se resta el área bajo la línea de base del área bajo la curva de la señal.

Picos superpuestos: En el caso de dos o más picos fusionados o superpuestos se traza una línea de base entre el comienzo del primero y el fin del último. El criterio usual es trazar rectas verticales desde los valles hasta la línea de base común y en base a esta división se asignan las áreas.

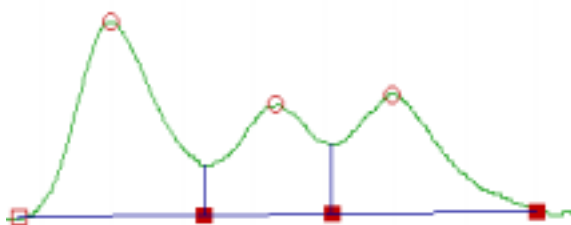


Fig. 4: Picos superpuestos

Para detectar si dos picos están superpuestos se traza una recta desde el comienzo del primer pico con una pendiente igual a la derivada en este punto. Si al llegar al final del pico o un mínimo de la señal, (valle) la recta antes mencionada pasa por encima del valor de la señal se considera que los picos están separados y se obtiene el fin de línea de base, de lo contrario se los considera fusionados y se trazará una línea de base común. En la figura 5 se observa que en los puntos 1 y 2 la recta pasa por debajo de la señal, y por lo tanto estos picos terminan fusionándose con el siguiente. En el punto 3 la recta pasa por encima del valor de la señal y allí termina la serie de picos fusionados.

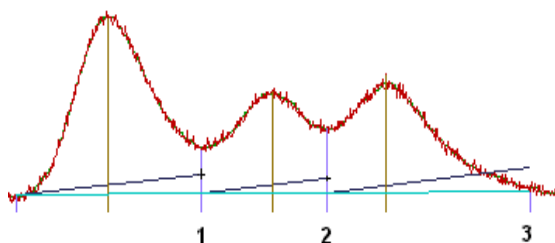


Fig. 5: Detección de picos superpuestos

Picos tangentes: Los picos pequeños montados sobre uno mucho mayor se denominan tangentes y su línea de base se traza de manera especial. Para detectarlo un criterio común es comparar alturas (diferencia de altura entre el máximo y el punto de comienzo del pico), con

la misma diferencia medida en el pico anterior, si este valor cae por debajo de un límite prefijado, el pico será considerado tangente.

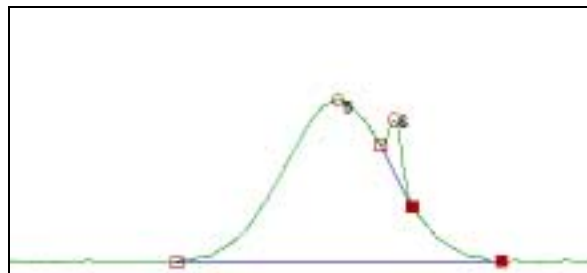


Fig. 6: Ejemplo de pico tangente

La línea de base en el pico tangente comienza en el mínimo local y finaliza en el punto donde se alcanza una relación prefijada entre la derivada de la señal y la pendiente de la recta que une el punto de inicio y el valor de la señal en ese punto.

Dado que en los cromatogramas pueden darse múltiples combinaciones de los casos antes mencionados, el algoritmo debe ser capaz de identificar estas posibilidades.

Una solución para lograrlo fue el uso de una máquina de estados como la graficada en la figura 7.

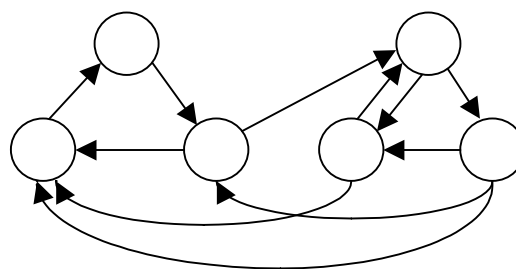


Fig. 7: Máquina de estados

Los estados son los siguientes:

- 1 “Sin pico”. Aún no se detecta el comienzo de un pico.
- 2 “Asciende”. Se detectó el comienzo de un pico y se continúa hasta encontrar el máximo local de la señal.
- 3 “Desciende”. Se encontró el máximo y se descende hasta encontrar el fin del pico o un valle (mínimo local de la señal).
- 4 “Asciende en un pico superpuesto”. Se detectó un valle y se continúa hasta buscar un máximo local. El pico puede ser “tangente”, lo cual se definirá al llegar al máximo.
- 5 “Desciende en un pico superpuesto”. Se detectó un pico superpuesto. Se busca un valle o el final del pico.
- 6 “Desciende en un pico tangente”. Se detectó un pico tangente. Se busca un valle, el final del pico tangente o el final del pico grande.

A medida que se incrementa la variable temporal se comparan los valores de señal, derivada primera y derivada segunda, y líneas auxiliares a fin de verificar si se cumplen los criterios previamente enumerados. En caso positivo la máquina pasa a otro estado y se almacenan entonces los valores de tiempo y magnitud de la señal correspondientes a puntos de interés, como comienzo y final de las líneas de base y tiempo de retención.

Posteriormente se procede a integrar numéricamente los picos, en base a la información de tiempo de inicio y fin del pico, altura de inicio y fin de la línea de base y la existencia o no de picos tangentes.

Para eliminar falsos picos debidos al ruido se descarta un pico si su área cae por debajo de un valor mínimo prefijado en el archivo de método.

D. Facilidades gráficas de edición

Se incluyeron rutinas tales como:

Ventana de ampliación (Zoom) para observar detalles del cromatograma.

Modificación manual de la línea de base.

Agregado y eliminación manual de picos.

Unificación de líneas de base para múltiples picos.

Ventana con vistas de la señal original, la señal filtrada y la derivada, con líneas de indicación de de comienzo y final de pico y los tiempos de retención.

Las rutinas permiten efectuar operaciones con el mouse que facilitan la puesta a punto de los métodos, permiten corregir errores en la asignación de las líneas de base, e integrar regiones que no son detectadas en forma automática.

E. Informe de resultados

En el archivo de método se puede establecer el tiempo de inicio de la integración, de modo que se elimine el solvente.

Es posible identificar los compuestos, lo cual se realiza a través de la programación del archivo de método, introduciendo los nombres en una tabla en la que figuran los tiempos de retención relativos al compuesto que se elija como referencia. Se establece también un margen de tolerancia para la operación de identificación.

El informe se puede ver en pantalla e imprimirse. Se puede fijar qué datos que deben figurar en el informe. La presentación del informe se hizo similar a la de los integradores electrónicos con los que los operadores, estaban familiarizados

El programa calcula una escala para la representación, la cual puede modificarse en función del aspecto que se desea.

En la figura 8 puede verse la primer página de un informe en pantalla. Se trata de una muestra de compuestos orgánicos, con 14 picos. El primero, correspondiente al solvente, se ha desechado.

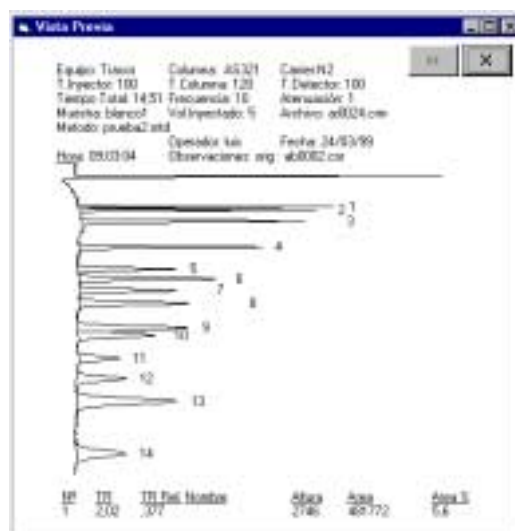


Fig. 8 : Vista previa de un informe

F. Comunicación con otros programas

Con la finalidad de facilitar la realización de informes y procesamiento alternativo de datos, el programa ha sido provisto con tres formas de comunicación: captura de imágenes que pueden ser transferidas al Word o a cualquier programa Windows a través del portapapeles, captura de la tabla de datos de picos que puede ser transferida a una planilla Excel, y exportación de archivos de datos cromatográficos directos en formato estándar de texto, que puede ser leído por casi cualquier programa.

IV. ADQUISICIÓN DE DATOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La resolución utilizada en la conversión analógico digital depende del tipo de análisis realizado, necesiándose mayor numero de bits si es grande la relación de alturas entre los picos de mayor y menor tamaño a medir en un mismo cromatograma. En los casos estudiados resultaba suficiente la resolución de 12 o 16 bits. Cuando se requieren de 20 a 24 bits, el costo de las placas es sensiblemente más alto.

A fin de posibilitar la medición a resoluciones altas sin elevar excesivamente los costos del hardware, se abordó la tarea de construir una interfase analógica digital. La misma se basó en el circuito integrado CS5534 de montaje superficial, fabricado por Crystal Semiconductor. Dicho componente tiene las siguientes características:

- 24 bits de resolución
- Amplificador de instrumentación de ganancia programable desde 1 a 64.
- Conversor analógico digital interno del tipo Delta-Sigma con error lineal menor a 0,0007%.
- Resolución libre de ruidos de 23 bits.
- Cuatro canales diferenciales multiplexados.
- Una interfaz simple de tres conductores mediante comunicación serie.

- Registro de calibración por canal que puede ser tanto escrito como leído, con posibilidad de autocalibración.
- Velocidades de conversión programables.
- Microcontrolador incorporado dentro del chip para la comunicación con la computadora.

Se diseñó un circuito con un buffer conectado al puerto paralelo de la computadora y se desarrolló el software correspondiente, en lenguaje Visual Basic. Tal desarrollo se realizó inicialmente para realizar pruebas del manejo del conversor, con la idea de incorporar a posteriori un microcontrolador que realizara la rutina de conversión, dejando para el lenguaje de alto nivel sólo la tarea de lectura de los valores.

Durante las pruebas se obtuvo una velocidad de conversión y cantidad de bits libres de ruidos suficientemente alta para su uso normal y se optó por utilizar esa misma configuración para la captura de cromatogramas, lo cual redujo el número de componentes necesarios y la complejidad del diseño. En la figura 9 puede verse el aspecto del dispositivo.



Fig. 9 : Conversor de alta resolución.

V. ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Actualmente se encuentran en funcionamiento las primeras implementaciones del sistema en dos laboratorios de la Facultad de Ingeniería Química de la UNL, Santa Fe, y en uno de la planta piloto de la Facultad de Ingeniería Química de la UNS, Bahía Blanca.

Las versiones instaladas hasta la fecha reciben señales de uno o dos cromatógrafos con una computadora personal a través de placas comerciales de adquisición de datos de 12 y de 16 bits.

El sistema con conversor de 24 bits se encuentra en las etapas finales de desarrollo previéndose su aplicación en breve en un laboratorio de la UNL, Santa Fe.

El presente trabajo apunta a generar un producto que puede ser transferido a distintos centros de investigación y enseñanza, así como a laboratorios industriales o de

control de calidad, lo cual puede redundar en beneficios económicos y técnicos tanto para los usuarios como para la Universidad en la que se realiza el desarrollo.

VI. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ulises Sedrán, Ing. Horacio Beldoménico y Dr. Javier Grau, quienes como responsables de distintos laboratorios de la Facultad de Ingeniería Química de la UNL, contribuyeron durante el desarrollo y pruebas del sistema, poniendo a disposición del grupo su equipamiento, conocimientos sobre cromatografía y aporte financiero.

Al programa CAI+D de la UNL por el aporte financiero.

A las autoridades de la Facultad de Ingeniería Química de la UNL por el respaldo y el estímulo a la labor desarrollada.

BIBLIOGRAFÍA

ASTM Standard D4626-90, Standard Practice for Calculation of Gas Chromatographic Response Factors

ASTM Standard E260-91, Standard Practice for packed Column Gas Chromatography

Bibbero R. J., Microprocessors in Instruments and control, Wiley, New York, (1977).

Dymond H.F., Kilburn K.D., Gas Chromatography proceedings, Ins. Pet, 1966.

Folleto "Peaksimple II Data System."

Folleto "PowerChrom Chromatography recording and analysis."

Folleto "WinChrom Chromatography Data Management System". GBC Scientific.

Galen W. E., Analytical Instrumentation Handbook, Drekker, New York, (1990).

Manual "Chromatopac C-R6A."

Manual "HP 3393/3396A File Server."

Manual "KONIKROM Chromatography Data System. Version 5".

Manual "Varian Vista 402, Chromatography Data System."

Valcarcel Cases M., Luque de Castro M., Automatic methods of analysis, Elsevier, Amsterdam, (1988).

Voress L., Instrumentation in Analytical Chemistry 1988-1991, Am. Chem. Society, xv, (1992).