České vysoké učení technické v Praze
Fakulta elektrotechnická
Katedra řídicí techniky

MATEMATICKÉ A ELEKTRONICKÉ ZPRACOVÁNÍ SIGNÁLU KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU

Disertační práce

Pavel Píša

Praha, Srpen, 2010

Doktorský studijní program: *Elektrotechnika a informatika*
Studijní obor: *Řídicí technika a robotika*

Školitel: *Doc. Ing. Ondřej Vysoký, CSc.*
Katedra řídicí techniky
České vysoké učení technické v Praze

© Copyright by Pavel Píša
CC BY-SA - Creative Commons Attribution Share Alike
Srpen 2010

Výše uvedené právo šíření se vztahuje na veškeré infomace obsažené přímo v této práci, nikoliv však automaticky na informace s prací pouze související

Autor zároveň prohlašuje, že má plné právo publikovat a nakládat (a to i komerčně) s informacemi a výsledky v práci uvedených projektů, které spoluzakládal ve firmě PiKRON s.r.o. a které byly téměř výhradně touto firmou financované.

Co se týče informací souvisejících s publikovanými projekty, tak v případě oblastí související s vývojem software pro vyhodnocení chromatografických analýz (CHROMuLAN) se jedná o software publikovaný pod licencí GPL (GNU General Public Licence), který je pod touto licencí již téměř deset let šířen a je i zájem autorů maximálně zpřístupnit veškeré (i interní) údaje a spolupracovat s případnými zájemci podle pravidel této licence.

Projekt komunikačního protokolu vhodného pro sběr dat a řízení chromatografických analýz (μLAN) byl po dohodě o spolupráci s firmou Agrosoft Tábor s.r.o. v roce 2002 uvolněn kromě dřívější publikace ovladačů pod licencí GPL i pod volnější licencí MPL umožňující jeho volné použití ve firmware komerčních vestavných zařízení. Opět v této oblasti firma PiKRON s.r.o. deklaruje zájem o maximální sdílení a publikaci svých znalostí i obecnou výměnu zkušeností a znalostí.

Ukázka postupu návrhu elektroniky a především analogově digitálního převodníku spektrofotometrického detektoru je pak dokumentací a rozborem návrhu, který vznikal ve firmě a případní zájemci o tuto technologii buď mohou zcela bez omezení použít zde dostatečně podrobně popsaný a v rámci práce namodelovaný princip nebo se mohou obrátit na autora nebo firmu PiKRON s.r.o. Bezplatný přístup k veškerým informacím není však touto prací deklarovaný. Při nabídce zajímavé spolupráce může dojít k dohodě třeba o novém společném VHDL návrhu pod otevřenou licencí.

Autorovi toho textu ani nikomu dalšímu z vývojového týmu PiKRON není známo, že by některé ze zde uváděných inovací byly zatížené a jejich použití a rozvoj poškozovaný patenty. Přitom informace o projektech byly uvedené v rozmezí mnoha let na více konferencích a nemělo by tedy případným zájemcům hrozit nebezpečí patentových trojských koní.

Abstrakt

Práce se zabývá rozborem a návrhem elektronického řešení detekce signálu a matematických metod vyhodnocení záznamů vysoce účinné kapalinové chromatografie (dále jen **HPLC**). Rozbor v současné době používaných řešení je doplněn popisem chromatografického systému, který byl vyvinut týmem, ve kterém autor disertační práce vedl návrh elektronického hardware, je výhradním autorem veškerého firmware přístrojů a výraznou měrou se podílel i na koncepci a vyhodnocovacích algoritmech nadřazeného řídicího a vyhodnocovacího softwarového systému. Jako prezentace zajímavého řešení je pak podrobněji rozebraný dílčí úkol projektu, kterým byl návrh převodníku s vysokým rozlišením vhodného pro **HPLC** aplikace. Dalším cílem práce je seznámení s možnostmi a současnými stavem vyhodnocení chromatografického záznamu. Na tomto základě je pak proveden výběr a návrh nových metod a algoritmů založených na metodách matematické optimalizace. Pro vybrané a navržené metody a algoritmy je pak předložen rozbor jejich možné integrace do budoucích verzí chromatografického řídicího a vyhodnocovacího systému **CHROMuLAN**, který je šířen pod otevřenou licencí **GPL**. Práce také stručně popisuje komunikační protokol μLAN, který byl právě pro řízení a sběr dat z chromatografických přístrojů navržen.

Klíčová slova: chromatografie, spektrofotometr, analogově-digitální převodník

Abstract

The thesis focuses on research and development of high performance liquid chromatography (abbreviated HPLC) assays evaluation algorithms, spectrophotometer electronic design, signal processing and instruments setups control. Analysis of the currently used solutions is accompanied with description of the chromatographic system that was developed by a team in which the author of the thesis leads electronic hardware design, is the sole author of all instruments firmware and significantly contributed to the design and evaluation of algorithms superior control and assay record evaluation. The detailed description of innovative method and further design of high resolution analog to digital converter for HPLC applications is highlighted as one of the interesting and reusable achievements. The thesis provides introduction into chromatography analytical method as well. The use of modern methods and algorithms for chromatography assays evaluation is proposed on that theoretical basis. The possibilities for integration of researched methods into CHROMuLAN open-source chromatography system are discussed as well as invention and implementation of communication protocol (μLAN) used for chromatographic apparatus setups control.

Keywords: chromatography, spectrophotometer, analog to digital converter

Hlavní v práci analyzované a řešené úkoly

Práce se zabývá především podrobným rozborem a řešením následujících úkolů

1. návrh koncepce a implementace analogově digitálního převodníku, který bude splňovat specifické požadavky v aplikaci spektrofotometrického detektoru pro kapalinovou chromatografii. Jedná se především o vysoké rozlišení, stabilitu, možnost přímého použití pro poměrové měření a schopnost zachovat hodnotu plochy pod křivkou (integrál) měřeného signálu ve výstupních digitálních datech.

2. výběr a poté návrh vlastního distribuovaného deterministického algoritmu řízení přístupu k přenosovému médiu a kompletní vývoj komunikačního protokolu od struktury datových rámců až po introspekci objektových datových slovníků vhodný pro řízení a monitorování (nejen) sestav chromatografických přístrojů.

3. návrh a implementace softwarového prostředí – chromatografického systému – pro řízení sestav chromatografických přístrojů a sběr a zpracování chromatografických záznamů. K tomuto tématu se váže i požadavek na analýzu, výběr a otestování metod kvantitativního vyhodnocení chromatografických analýz metodou matematické optimalizace a modelování průběhu s využitím analytických popisů odezev jednotlivých složek analyzovaných látek.

Obsah

1 Úvod **1**
1.1 Cíle, zaměření a publikum práce 2
1.2 Vztah k souvisejícím pracem 4

2 Kapalinová chromatografie **7**
2.1 Chromatografická metoda 7
2.1.1 Základ chromatografické metody 8
2.1.2 Kolonová chromatografie 9
2.1.3 Klasifikace detektorů 12
2.1.4 Odezva detektoru 12
2.1.5 Kapalinová chromatografie 13
2.2 Spektrofotometrická detekce 14
2.2.1 Zákon Beer-Lambertův 15
2.3 Komponenty kapalinového chromatografu 16

3 Vlastnosti chromatografického záznamu **21**
3.1 Separace analytů a její model 21
3.2 Matematické modely píků 25
3.2.1 Volba parametrizace modelů píků 26
3.2.2 Gaussovský pík 27
3.2.3 Lorenzovský pík 28
3.2.4 Logaritmicky gaussovský pík 29
3.2.5 Voightova funkce píku 31
3.2.6 Smíšený lorenzovsko-gaussovský pík 31
3.2.7 Pearsonův pík typu VII 32

4 Konvenční metody vyhodnocení chromatografického záznamu **35**
4.1 Kvantitativní vyhodnocení analýzy 35
4.2 Využití analytických standardů 38
4.2.1 Vyhodnocení bez standardu 38

4.2.2 Vnější standard 38
4.2.3 Vnitřní standard 39
4.2.4 Vnější i vnitřní standard 40

5 Moderní matematické metody pro vyhodnocení analýz 41
5.1 Rozbor problému 41
5.1.1 Šum signálu a rozvaha nad potlačením jeho vlivu 44
5.1.2 Vliv průběhu chemického pozadí 45
5.1.3 Vyhledání umístění odezev analytů 47
5.1.4 Určení parametrů modelů a kvantitativního složení analytů . 47
5.2 Analytické modely průběhů píků a jejich derivací 49
5.2.1 Analytický popis gaussovského píku 50
5.2.2 Alternativní popis gaussovského píku 50
5.2.3 Třetí parametrizace gaussovského píku 51
5.2.4 Analytický popis logaritmicky gaussovského píku 51
5.2.5 Alternativní popis logaritmicky gaussovského píku 52
5.3 Testovací nástroj pro vyhledání a určení parametrů píků 53

6 Návrh spektrofotometrického detektoru pro HPLC 59
6.1 Optická koncepce spektrofotometru LCD 5000 59
6.2 Stručný popis konstrukce LCD 5000 62
6.2.1 Mechanická konstrukce 62
6.2.2 Elektronika detektoru 62
6.2.3 Zástavba přístroje 63
6.3 Analogově digitální převodník 65
6.3.1 Požadavky na AD převodník 65
6.3.2 Přehled možných řešení AD převodu 68
6.3.3 Návrh vlastního AD převodníku na míru 69
6.3.4 Princip navrženého Σ-Integračního AD převodníku 71
6.3.5 Číslicové zpracování výstupu Σ-$\int$ modulátoru 78
6.3.6 Realizace Σ-$\int$ AD převodníku 79
6.3.7 Dosažené výsledky 82

7 Chromatografický vyhodnocovací a řídicí systém 85
7.1 Komunikační protokol 86
7.1.1 Požadavky na komunikaci 86
7.1.2 Přehled dostupných řešení 90
7.1.3 Návrh protokolu nad fyzickou vrstvou RS-485 93
7.1.4 Formát zpráv protokolu μLAN 94
7.1.5 Řízení arbitrace přístupu ke sběrnici 96

7.1.6 Analýza vlivu protokolu μLAN na propustnost sběrnice RS-485 98
7.1.7 Vyšší komunikační vrstvy protokolu μLAN 100
7.1.8 Přístup k datovým položkám zařízení – uLOI 100
7.1.9 Aplikace komunikačního protokolu μLAN 103
7.2 Chromatografický systém CHROMuLAN 103
7.2.1 Možnosti systému CHROMuLAN 104
7.2.2 Propojení přístrojů se systémem CHROMuLAN 105
7.2.3 Architektura datových souborů a subsystémů 107
7.2.4 Možnosti integrace testovaných metod vyhledávání píků . . 109

8 Závěr 111
8.1 Členové týmu a spolupracovníci 112

Literatura 115

Seznam obrázků

2.1 Průchod směsi kolonou 10
2.2 Vliv termodynamiky a kinetiky na rozdělení píků 11
2.3 Schematický diagram kapalinového chromatografu se spektrofotometrickým detektorem 18
2.4 Kapalinový chromatograf LC 5000 19

3.1 Základní parametry gaussovského píku 23
3.2 Průběh gaussovského píku 28
3.3 Průběh lorenzovského píku 29
3.4 Průběh logaritmicky gaussovského píku 30
3.5 Smíšený lorenzovsko-gaussovský pík 32
3.6 Paersonův průběh typu VII 33

4.1 Rozdělení plochy sousedních píků 37

5.1 Nástroj **pfit_ui** pro vyhledávání parametrů píků 54
5.2 Nezpracovaná data záznamu analýzy aminokyselin 55
5.3 Data a aproximace po vyhledání a odečtení nulové linie a vyhledání píků 56
5.4 Detail nástrojem **pfit_ui** vyhledaných píků 57

6.1 Optické schéma spektrofotometrického detektoru LCD 5000 61
6.2 Optická cela detektoru LCD 5000 61
6.3 Zástavba celého přístroje LCD 5000 64
6.4 Závislost požadavku na přesnost poměru R_{mr} na absorbanci 67
6.5 Blokové schéma Σ-$\int$ AD převodníku 72
6.6 Analogová část Σ-$\int$ AD převodníku 73
6.7 Průběh napětí integrátoru Σ-$\int$ AD převodníku 74
6.8 Průběh signálů modulátoru při simulaci Σ-$\int$ AD převodníku 78
6.9 První digitální stupeň Σ-$\int$ AD převodníku 80
6.10 Výpočet poměru sestupné hrany ku periodě trojúhelníkového signálu 80

6.11 Digitální filtr a decimátor 81
6.12 Zjednodušené elektronické schéma realizace Σ-$\int$ AD převodníku . . 81
6.13 Distribuce výstupních kódů AD převodníku pro konstantní vstupní signál 84
6.14 Příklad reálné HPLC analýzy směsi Oligo-Nucleotidů 84

7.1 9-bitový formát znaků 94
7.2 Formát datového rámce μLAN 95
7.3 Arbitrační sekvence μLAN 96
7.4 Sada přístrojů řady LC 5000 a AAA 400 103
7.5 Architektura komunikace s připojenými přístroji 106
7.6 Hierarchická struktura datových souborů 108
7.7 Vazby mezi objekty a daty v systému **CHROMuLAN** 108
7.8 CHROMuLAN User Interface 109

Seznam tabulek

5.1 Modely průběhů píků poskytované ze skriptu **„pfit_fncs.m“** nástroji **pfit_ui** 50
5.2 Parametry nalezených píků 58

6.1 Nutný počet bitů AD převodníku pro rozlišení $1 \cdot 10^{-5}$ AU 68

7.1 Chromatografické přístroje řady LC 5000 104

Kapitola 1

Úvod

Práce se zabývá rozborem a návrhem elektronického řešení detekce signálu a matematických metod vyhodnocení záznamů vysoce účinné kapalinové chromatografie[1] (dále jen **HPLC**). Rozbor v současné době používaných řešení je doplněn popisem chromatografického systému, který byl vyvinut týmem autora. Dalším cílem práce je seznámení se s možnostmi a současným stavem vyhodnocení chromatografického záznamu a následný výběr a návrh metod a algoritmů založených na metodách matematické optimalizace. Pro vybrané nově navržené metody a algoritmy se počítá s jejich integrací do chromatografického řídicího a vyhodnocovacího systému **CHROMuLAN**, který je šířen pod otevřenou licencí **GPL**.

V kapitole 2 je stručně popsán chemický základ chromatografické metody. Dále jsou stručně popsány jednotlivé funkční celky kapalinového chromatografu. Text práce si neklade za cíl předložit hluboce propracovaný podrobný popis chromatografické metody. Autor není odborníkem v oboru analytické chemie a pro konstrukci detektoru a vyhodnocení záznamu jsou více než chemické zákonitosti důležité fyzikální optické vlastnosti detekovaných látek a znalosti v oborech elektroniky, řízení a procesorové techniky. Matematický model chromatografického záznamu je podrobněji popsán v kapitole 3.

Kapitola 3 předkládá podrobnější popis zákonitostí ovlivňujících průběh chromatografického záznamu. Především se jedná o popis matematických modelů odezvy jednotlivých složek analyzovaného vzorku. Dále jsou specifikovány problémy, které je potřeba řešit při kvantitativním vyhodnocení chromatografické analýzy.

Kapitola 4 se zabývá běžnými metodami kvalitativního a kvantitativního vyhodnocení chromatografického záznamu. Tyto metody jsou založeny na lokálním výpočtu plochy odezvy jednotlivých detekovaných složek a v množství případů jsou

[1] Metody kapalinové chromatografie patří do širší skupiny analytických a separačních metod využívajících časového nebo prostorového rozdělení látek před optickým, elektrochemickým nebo jiným detektorem, který není schopen samostatně od sebe odezvy jednotlivých složek rozlišit.

vypočítané hodnoty silně závislé na volbách uživatele a charakteru záznamu.

Možnosti vyhodnocení záznamu s využitím moderních optimalizačních metod jsou rozebrány v kapitole 5. Tyto metody umožňují v mnoha případech zcela eliminovat vliv vzájemného překrytí odezvy více složek a potlačují vliv šumu na kvantitativní vyhodnocení analýz. Kapitola přináší také návrh a otestování vlastního řešení problému.

Kapitola 6 obsahuje rozbor požadovaných vlastností a návrh obvodového řešení vysoce citlivého spektrofotometrického detektoru pro kapalinovou chromatografii. Popisuje mechanické, optické a elektronické prvky přístroje, jehož vývoje se autor zúčastnil a který je v současné době vyráběn a provozován na analytických i předních vědeckých pracovištích pracovištích v několika zemích světa. Kapitola se poté zaměřuje na hledání a návrh originálního řešení digitalizace signálů, které vyhovuje požadavkům kladeným na přístroj.

Kapitola 7 obsahuje přehled požadavků na chromatografický software a jeho komunikaci s přístroji. Dále seznamuje čtenáře s vyvinutým komunikačním a softwarovým řešením pro řízení chromatografických systémů a vyhodnocení chromatografických záznamů. V oblasti vývoje software se především jedná o projekt **CHROMuLAN**. Dále je popsán návrh integrace metod popsaných v předchozích kapitolách do tohoto systému. Kapitola zahrnuje i popis komunikačního protokolu μLAN, který byl pro tuto aplikační oblast navržen.

V závěru je uvedeno zhodnocení v současné době dosažených výsledků a uveden návrh možností pro další rozšíření systému a s ním souvisejících projektů. Závěr též přináší seznam členů vývojového týmu, kteří se podílejí na vývoji již několika generací chromatografických přístrojů a systémů.

1.1 Cíle, zaměření a publikum práce

Text této práce sice podléhá požadavkům na strukturu disertační práce, ale případnému čtenáři může posloužit i jako náhled do popisované problematiky z pohledu člena týmu, ve kterém se již 20 let zabýval vývojem laboratorních a medicínských přístrojů, řízením a komunikacemi. Řešení technických problémů a dosažení výborných parametrů při zachování přiměřené ceny je často výzvou, která vyžaduje analýzu, výzkum a návrh nových principů a metod. Několik takových řešení a problémů, které autorovi textu práce připadaly zajímavé, je v práci podrobněji zpracovaných a analyzovaných a i díky předložení návrhu na zadání disertační práce se dočkaly dalšího rozvoje a především byly lépe zdokumentované. Přitom většina výsledků popisovaných řešení je i případným zájemcům plně přístupná v příslušných souvisejících otevřených projektech, a některé již našly i uplatnění v projektech cizích. Seznam témat řazený podle hodnocení inovativnosti autorem textu

- návrh originálního řešení převodu analogového signálu na digitální, který

kombinuje poznatky z několika známých metod a přímo svými vlastnostmi odpovídá požadavkům daného použití. Nápad vznikl během diskuze ve firmě **PiKRON** mezi autorem textu a Ing. Petrem Porazilem. Autor poté provedl analýzu a původní návrh digitální části zpracování. Analogová část je společným dílem. V rámci disertační práce pak byla autorem provedena další podrobná analýza a modelování. Podrobná analýza problému i návrhu je náplní kapitoly 6.

- návrh vlastního distribuovaného deterministického algoritmu řízení přístupu k přenosovému médiu a kompletní vývoj komunikačního protokolu od struktury datových rámců až po introspekci objektových datových slovníků. Jedná se o původní vývoj autora pro firmu **PiKRON**. Projekt byl zveřejněn a v současné době na jeho dalším rozvoji spolupracují s autorem i uživatelé a vývojáři z jiných projektů a firem. V rámci disertační práce byl nově proveden rozbor časového chování protokolu a rozšířena dokumentace na stránkách projektu. Současně autor pracoval na podpoře dalších vestavných architektur. Implementace protokolu byla dále rozšířena o možnost tvorby kombinovaných zařízení. Také byl navržen a implementován systém pro přímé propojování konfigurovatelných kanálů procesních dat mezi připojenými zařízeními. Postup návrhu a rozbor vlastností protokolu jsou součástí kapitoly 7.

- otevřený chromatografického systém **CHROMuLAN**. Projekt byl založen Doc. Jindřichem Jindřichem ve spolupráci s autorem této práce. Autor textu disertační práce se podílel na návrhu struktury dat, implementoval základní algoritmy pro vyhodnocení analýz a podílel se na návrhu koncepce aplikace a realizaci propojení se zařízeními. V rámci disertační práce autor textu nastudoval teoretický základ chromatografické analýzy látek a na základě získaných znalostí a informací navrhl řešení, které umožní přesnější zpracování záznamů. Dále připravil rozvahu k integraci řešení do systému **CHROMuLAN**. Teoretický základ je zpracovaný v kapitole 5 a možnosti integrace v kapitole 7.

Tyto podrobněji rozebrané a zpracovávané oblasti jsou svázané společným tématem (oblastí kapalinová chromatografie a vlastním vývojem kompletní sady přístrojů pro tuto analytickou oblast) i vzájemnými souvislostmi (záznamy analýz jsou měřené popisovaným spektrofotometrickým detektorem, data měřeného signálu jsou do digitální podoby převáděna zmíněným převodníkem, řízení celých sestav přístrojů včetně tohoto detektoru a sběr měřených dat je možný díky projektu **CHROMuLAN** a k vlastní komunikaci a propojení přístrojů se používá vyvinutý komunikační protokol μ**LAN**).

1.2 Vztah k souvisejícím pracem

Oblast převodu analogového signálu na digitální je doménou mnoha vědeckých kapacit a týmů. Při návrhu a volbě použitých principů se vždy jedná (když odhlédneme od ceny řešení) o určitý kompromis mezi třemi požadavky: vysoké rozlišení (přesnost), vzorkovací frekvence (případně šířka pásma) a energetická spotřeba zapojení. Přehled a analýzu různých principů převodu lze nalézt v Walden (1999). Realizace převodníků s vysokým rozlišením (zajímavých pro oblast digitalizace chromatografických signálů) byla dříve založena většinou na principu dvojí nebo vícenásobné integrace. Díky pokroku v teorii signálů a řízení se v dnešní době zájem přesměroval především na řešení založená na principu sigma-delta modulátorů a následného matematického zpracování. Nevýhodou sigma-delta modulace prvního řádu je relativně nepříznivý poměr mezi šířkou pásma a rozlišením, který však může být rapidně (mnoha řádově) zlepšen použitím modulátorů vyšších řádů. Návrhy takových převodníků s požadovanými vlastnostmi jsou již velmi dobře propracované Tortosa et al. (2008). Příkladem postupu návrhu může být například disertační práce Qifeng (2007), která popisuje návrh rychlého audio převodníků se sigma-delta modulátorem třetího řádu. Rešení předložené autorem je založené na alternativní metodě a jeho návrh začal v době, kdy ještě sigma-delta převodníky vyšších řádů nebyly běžné. Při jeho srovnání s přehledem a rozborem technologicky dosažitelných řešení světové špičky v Le et al. (2005) by jeho přímé zařazení sice bylo hluboko pod křivkou spojující maximální dosahované hodnoty kombinací vzorkovacích frekvencí a rozlišení, ale autor práce je přesvědčený, že pro dané použití má stále návrh zásadní výhody. Sigma-delta převodníky prvního řádu vykazují buď výrazně delší časové konstanty nebo jsou spínací frekvence uvnitř modulátoru příliš vysoké a chvění hodin přispívá k vzniku šumu. Obecně vysoký poměr počtu přepnutí na čas, za který je dodán jeden nekorelovaný vzorek, je řádově vyšší než u navržené metody a při uvažování reálných technologií polovodičových součástek je takový převodník v nevýhodě. Zrychlení dosažení odezvy zvýšením řádu modulátoru je zásadní. S řádem systému pak sice roste rychlost přiblížení se k plnému určení vstupní hodnoty a snižuje se počet přepínání na nekorelovaný vzorek, avšak obdobnou měrou roste vliv reálných vlastností součástek v integračním řetězci a nepřesností v časech přepínání. Tým autora má zkušenosti s nasazením standardně dostupných špičkových sigma-delta převodníků v jiných aplikacích bez specifických požadavků v této práci probíraného případu a i po porovnání s novějšími technologiemi je stále přesvědčen, že pro daný typ úloh je navržené originální řešení i přes náročnost vedení vlastního návrhu a současnou nedostupnost jeho na čip integrované varianty výhodnější a počítá s ním i pro budoucí generace přístrojů.

V době hledání vhodného řídicího a vyhodnocovacího software pro vyvíjenou sadu chromatografických přístrojů již existovalo množství komerčních uzavřených systémů – **ChemStation** (Agilent), **Chromeleon** (Dionex), **Clarity** (DataApex).

Ovšem popis v nich použitých metod zpracování dat byl autorovi práce zcela nedostupný a pravděpodobně ani v té době tyto systémy podporu pro matematické dekonvoluční Halket et al. (1999); Kong et al. (2005) zpracování analýz neobsahovaly. Přitom možnost přesvědčit velké korporace s vlastními přístroji, aby podporovali českého výrobce nebyla reálná. Ani český vývojový tým **DataApex** se neměl zájem kompletním řízením plně digitálních sestav nově navržených přístrojů zabývat. Komerční program **PeakFit** (Systat Software) již zpracování na úrovni dekonvoluce nabízel, ale ani ten nebyl autorovi dostupný. Týmem autora založený projekt **CHROMuLAN** byl pravděpodobně první plně se zdrojovými kódy publikovaný chromatografický systém. Podobnou snahu postavit takový řídicí a vyhodnocovací systém na kombinaci otevřených nástrojů a programů reprezentuje práce Carr et al. (2006). V ní navržený přístup ale není příliš uživatelsky přívětivý. Pro samotnou oblast zpracování dat analýz již v posledních letech vznikly zajímavé projekty, např. Sturm et al. (2008) (především pro hmotnostní spektrografii) a disertační práce Wenig – Odermatt (2010). Vlastních algoritmů na hledání a prokládání křivek existuje velké množství Björck (1996) a i jejich implementací, např. **Matlab** nebo Galassi et al. (2002). Práce přináší návrh kombinací metod, postupů a výsledky vlastního testování, které nabízí cestu dalšího rozvoje projektu. Ten již i v současné podobě po roky slouží v sestavách s vyvinutými přístroji na mnoha vědeckých a analytických pracovištích.

Komunikačních protokolů pro řídící aplikace existuje velké množství (CAN, Profibus, BACnet, Ethernet Powerlink) s různými přístupovými protokoly. Z otevřených řešení se jedná například o Karg (2010); SYS TEC electronic GmbH (2010); Tran (2009–2010). Rozbory jejich chování v reálném čase jsou opět častým tématem různých prací, např. Hanzálek – Capek (2003). Do reálného návrhu všech vrstev včetně implementací a ovladačů pro většinu operačních systémů se však již pouští minimum z autorů vědeckých prací. V práci je obsažen rozbor možností volby některého ze standardizovaných řešení a poté je předvedené, že volba vlastního řešení minimálně v době vzniku byla nejvýhodnější možností. Přitom některé vlastnosti navrženého řešení jsou unikátní i dnes.

Kapitola 2

Kapalinová chromatografie

V této kapitole je stručně popsán chemický základ chromatografické metody. Práce je poté dále zaměřena na specifický druh chromatografie a to na chromatografii kapalinovou s optickou detekcí, proto jsou do této kapitoly začleněny i základní informace týkající se spektrofotometrické detekce látek. Dále jsou stručně popsány jednotlivé funkční celky kapalinového chromatografu. Účelem této kapitoly však není předložit hluboce propracovaný podrobný popis chromatografické metody. Autor není odborníkem v oboru analytické chemie a pro konstrukci přístrojů jsou více než chemické zákonitosti důležité fyzikální a optické vlastnosti detekovaných látek. Rozsáhlejší teoretický popis chemických a fyzikálních aspektů kolonové chromatografie lze nalézt například v Novák (1981); Purnell (1962). Matematický model chromatografického záznamu pro potřeby vyhodnocení vzorků je podrobněji popsán v kapitole 3.

2.1 Chromatografická metoda

Chromatografie patří do široké skupiny separačních (dělících) metod. Tyto metody slouží k získávání čistých látek (separaci látek) nebo umožňují zvýšit selektivitu a specifičnost při analýze jednotlivých složek látky. Základní rozdělení a příklady některých separačních metod:

1. dělení srážením, elektrolýza, destilace, krystalizace, dialýza, extrakce
2. elektromigrační separační metody
   (a) planární gelová elektroforéza
   (b) kapilární zónová elektroforéza (CE)
3. chromatografie

(a) plynová (GC – Gas Chromatography) (adsorpční a rozdělovací)
(b) superkritická fluidní (SFC)
(c) kapalinová (LC – Liquid Chromatography)
    - sloupcová gravitační
    - kolonová (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)
      adsorpční, rozdělovací, gelová a iontově výměnná
    - planární (plošná)
      papírová (PC) a tenkovrstvá (TLC)

Tato publikace je zaměřena především na vyhodnocování a řízení analytické HPLC. Přesto lze metody pro popis a vyhodnocení chromatografických záznamů popisované a navrhované v dalších kapitolách použít i pro podobné analytické metody uvedené v předchozím seznamu. Jedná se především o plynovou chromatografii (GC) a kapilární zónovou elektroforézu (CE). Podobné techniky výpočtů lze použít i pro vyhodnocení klasické gelové elektroforézy.

Protože jsou chromatografické metody používány v mnoha oborech, vyskytuje se množství pojmů, které jsou typické pro určitou oblast využití. Obecný popis na počátku této kapitoly je těmito vícenásobnými termíny poněkud zatížen. Další části jsou již zaměřeny na analytickou větev chromatografie, zabývající se kvantitativním a kvalitativním měřením složení směsí látek, proto jsou postupně k obecnějším pojmům uváděny i termíny typické pro analytickou chromatografii.

2.1.1 Základ chromatografické metody

Chromatografie je označení skupiny analytických a separačních (dělících) metod založená na rozdílech v distribuci a tím i pohyblivosti dělených (analyzovaných) látek mezi dvě fáze, pohyblivou mobilní fázi a nepohyblivou stacionární fázi. První popsané pokusy provedl počátkem dvacátého století ruský vědec Cvět, který rozdělil jednotlivé složky rostlinných barviv tak, že nechal procházet jejich roztoky kolonami naplněnými tuhými adsorbenty. Jednotlivé barevné složky opouštěly kolonu při průchodu čisté kapaliny v čase postupně. Proto byla metoda pojmenována chromatografie (z řeckých slov *chroma* barva a *grafein* psát). Toto označení je sice pro mnoho metod patřících do popisované skupiny zavádějící, přesto již nebylo později změněno. Po delší přestávce byla metoda znovu objevena v třicátých letech a uplatnila se v mnoha modifikacích pro stanovování a dělení složek látek, získávání velmi čistých látek, monitorování a řízení technologických procesů. V současné době lze chromatografické metody dělit podle různých kritérií:

1. povaha mobilní fáze: plynová (GC), kapalinová (LC)

2. způsob provedení: kolonová (sloupcová), plošná (planární)

3. princip separace: rozdělovací, adsorpční, iontově výměnná, gelová
4. pracovního postupu: eluční (analytická), frontální, vyměšovací
5. účel: analytická, preparativní

Chromatografická metoda je vhodná pro analytické účely především v těch případech, kdy je velmi obtížné sestrojit specifický detektor (senzor) nebo chemický postup pro přímé stanovení koncentrace jedné složky směsi. Po rozdělení směsi na jednotlivé složky je možné použít detektor (senzor), který detekuje pouze součet koncentrací analyzovaných složek v mobilní fázi, protože jednotlivé složky opouštějí kolonu postupně. Doba, po kterou je určitá složka zdržena v koloně, se nazývá retenční čas. Odezva detektoru na přítomnost detekovaných složek směsi je od počátku analýzy (nadávkování směsi) zaznamenávána. Tento záznam závislosti odezvy na retenčním čase se nazývá chromatogram. Odezva jedné oddělené složky směsi odpovídá v chromatogramu většinou impulzu s průběhem blížícím se průběhu hustoty pravděpodobnosti normálního rozdělení. Tato odezva jedné složky je v chromatografii označována termínem pík (z anglického peak)[1]. Závislost tvaru a velikosti píku na koncentraci složky se liší pro různé třídy detektorů a je podrobněji popsána v odstavci 2.1.4. V oborech kapalinové a plynové chromatografie je často plocha odezvy určité složky přímo úměrná koncentraci této složky.

Dalším podstatným kladem metody je to, že po provedení jedné analýzy směsi (vzorku) je možné vypočítat koncentrace více složek analyzované směsi (analytů). Metoda dosahuje nejen vysoké specifičnosti stanovení koncentrací, ale v mnoha případech i velmi vysoké relativní i absolutní přesnosti a rozlišitelnosti. Jako příklad množství stanovených analytů z jedné analýzy lze uvést například stanovení koncentrací aminokyselin v biologických preparátech kapalinovou chromatografií, které je schopné rozlišit okolo 40 analytů. Některé analýzy s využitím plynové chromatografie stanovují i několik set analytů (například asi 200 analytů v cigaretovém kouři).

2.1.2 Kolonová chromatografie

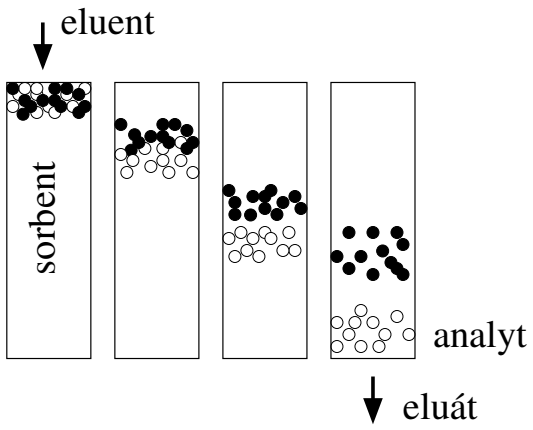
Kolonová chromatografie se vyznačuje uzavřením stacionární fáze (sorbentu) do mechanicky vymezeného prostoru (kolony). Procházející mobilní fáze (eluent) způsobuje průchod složek (analytů) nadávkované směsi (vzorku) kolonou. Při tomto postupu se jednotlivé složky směsi dělí a složkám příslušné zóny se rozšiřují. Z prostoru kolony jsou postupně složky vynášeny mobilní fází do detektoru nebo jímek. Tento proces se zazývá eluce a z kolony vystupující mobilní fáze vynášející složky

[1] V českém překladu Purnell (1962) je zavedený termín zóna a „peak area“ je překládáno jako plocha pod zónou nebo vlnou. V novějších česky psaných materiálech Štulík et al. (2005); Zýka (1980) je již od této snahy upuštěno a je používaný počeštělý tvar pík.

se pak nazývá eluát. Stěny kolony představuje většinou u LC skleněná nebo nerezová válcová nádoba nebo trubice s uzávěry, které udržují sorbent ve vnitřním prostoru a propouštějí kapalný eluát. V případě GC je použita tenká kapilára, nejčastěji skleněná nebo křemenná s vnitřním povrchem potaženým sorbentem a eluát je v plynné fázi. Určité množství dělené látky (směsi) je nejdříve dopraveno s mobilní fází na čelo (přívod) kolony. Při průchodu směsi kolonou dochází k postupné separaci (dělení) jednotlivých složek směsi v důsledku různé rychlosti jejich postupu kolonou. Rychlost postupu složek směsi (analytů) je závislá na mnoha faktorech. Hlavními z nich jsou

1. rozdílná **afinita** analytů ke stacionární fázi
2. různá **distribuce** (rozdělení) jednotlivých analytů mezi stacionární a mobilní fázi
3. analyty jsou rozdílně **zdržovány** (retence) a **zpožďovány** (retardace)

Všechny tyto děje jsou dále závislé na rychlosti pohybu mobilní fáze kolonou a na množství dalších fyzikálních podmínek procesu eluce. Jedná se o teplotu, tlak, tlakový spád na koloně, homogennost sorbentu a jiné vlivy. Na obrázku 2.1 graficky je znázorněn průchod dvousložkové směsi kolonou. Vlivy způsobující rozdílnost



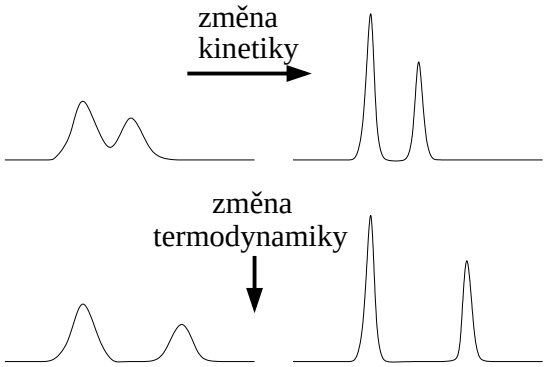
Obrázek 2.1: Průchod směsi kolonou

rychlosti postupu složek lze rozdělit do dvou oborů. Jedná se o termodynamiku separace a kinetiku separace.

Termodynamika separace se zabývá vlivy, které ovlivňují velikost interakce mezi sorbentem a analytem, zdržování (retenci) a zpožďování (retardaci) analytů, rychlost migrace analytů kolonou, rozdíly v retenčních časech (čas, po který je analyt zdržován v koloně) analytů a dělení analytů od sebe navzájem.

Kinetika separace se zaměřuje na vlivy, které způsobují rozšiřování (rozmývání) zón analytů během postupu kolonou, a vlivy působícími na šířku píků v chromatogramu.

Termodynamika a kinetika separace spolu úzce souvisejí a obě dvě určují, jak moc se sousední píky v chromatogramu překrývají. Při zkoumání průchodu analytů to odpovídá dokonalosti nebo nedokonalosti vzájemného rozdělení zón sousedních analytů. Termodynamika i kinetika separace ovlivňují **rozlišení** sousedních píků v chromatogramu. Úkolem sestavení analytického předpisu pro stanovení určitých složek je nalezení co nejvhodnějších chemických a fyzikálních podmínek, které zaručují co nejlepší rozdělení sousedních píků. Vliv termodynamiky i kinetiky je graficky znázorněn na obrázku 2.2. Obrázek znázorňuje ve vodorovném směru zúžení píků vhodnější volbou parametrů kinetiky separace a ve svislém směru možnost oddálení retenčních časů při zachování šířky píků způsobeného úpravou samotné termodynamiky separace. Většinou jsou při návrhu a zvyšování účinnosti separace upravované oba parametry k dosažení co nejlepšího výsledku separace a tuto kombinaci úprav demonstruje pravá spodní ukázka záznamu píků.



Obrázek 2.2: Vliv termodynamiky a kinetiky na rozdělení píků

Termodynamiku a kinetiku procesu eluce lze ovlivňovat fyzikálními a chemickými podmínkami v koloně. Jedná se především o

- volbou mobilní fáze
- volbou stacionární fáze
- volbou teploty procesu

Vhodně zvolené podmínky se buď udržují po celou dobu procesu neměnné nebo se během procesu eluce mění a pak se takové separační metody nazývají gradientní.

Hlavním cílem volby podmínek je dosažení co nejúčinnější separace analytů na výstupu kolony. Žádaný je tedy takový průběh separace, kdy jednotlivé analyty postupně opouštějí kolonu zcela oddělené. Pak je možné čisté látky jímat nebo detekovat s jistotou, že nejsou vzájemně znečištěné nebo výsledky určení koncentrací vzájemně ovlivněné. Vzhledem k tomu, že se však na nejnižší úrovni jedná o procesy, které je možné popsat pouze statistickými vlastnostmi těchto náhodných dějů a jejich pravděpodobnostní rozložení jsou spojitá a minimálně z jedné strany neohraničená (viz kapitola 3), je možné se ke stavu dokonalé separace jen do určité míry přiblížit.

2.1.3 Klasifikace detektorů

Pro kvantitativní vyhodnocení naměřených dat je výhodné rozdělit jednotlivé druhy detektorů následovně

1. detektory reagující na přítomnost detekované látky v čidle
   (a) detektory reagující na absolutní koncentraci detekované látky v přiváděném fluidu
   (b) detektory reagující na relativní koncentraci látky v přiváděném fluidu vzhledem k mobilní fázi
   (c) detektory reagující na množství detekované látky v efektivním objemu čidla
2. detektory reagující na rychlost přívodu detekované látky do čidla

2.1.4 Odezva detektoru

Z dříve uvedeného popisu chromatografické metody vyplývá, že nejvhodnější detektor pro chromatografickou analýzu by měl vykazovat pokud možno shodnou specifickou odezvu na všechny složky měřeného vzorku, protože jednotlivé složky jsou již od sebe separovány a kolonu opouštějí v rozdílném čase.

Pokud jsou specifické odezvy různých složek řádově rozdílné, lze v některých případech nežádoucí vliv rozdílů eliminovat různým nastavením detektoru pro časové úseky, kdy lze předpokládat příchod různých složek do detektoru. V případě kapalinové chromatografie se jedná například o změnu vlnové délky detekčního paprsku po dobu průchodu látky, která vykazuje absorbanci světelného toku při rozdílné vlnové délce. Při přípravě fyzikálních podmínek dělení a při stanovení velmi složitých směsí s výkyvy v retenčních časech jednotlivých složek je výhodné u metod s optickou detekcí provést měření pro dvě nebo i více vlnových délek, často pak i celý spektrální rozsah. Z takto získaných dat je poté možné vybrat nejvhodnější

vlnovou délku pro kvantitativní stanovení jednotlivých složek měřeného vzorku. Informace o průběhu absorbance v závislosti na vlnové délce v určitém čase také umožňuje snadněji přiřadit odezvě složku, která ji způsobila. Podrobněji je optické detekce rozebrána v odstavci 2.2.

2.1.5 Kapalinová chromatografie

Na základě uvedeného stručného vysvětlení chromatografické metody se lze již zaměřit na oblast kapalinové chromatografie a především na požadavky kladené na přístrojové vybavení a software pro zpracování příslušných chromatografických záznamů.

Přesto, že dělení na kolonách protékaných kapalnou mobilní fází ze zásobníku za působení gravitační síly bylo známo dříve než využití chromatografické techniky v plynech, tak se v praxi uplatnilo později než plynová chromatografie. Stručné shrnutí příčin a dalšího vývoje lze najít například v Wikipedia (2010). Velkou nevýhodou byl především pomalý proces dělení poháněného pouze gravitační silou a nedostatečná účinnost prvotních sorbentů. Zásadní překážku pak představovala neexistující technika detekce přítomnosti analytů v malých objemech. V podstatě jedinou možností zůstávalo jímání eluentu postupně do více zásobníků v průběhu analýzy a poté provedení analýzy látek v těchto zásobnících. Získaná měření pak byla vynesena jako body elučních křivek.

Původně nedostatečná kvalita procesu dělení (viz pojem teoretické patro kolony v odstavci 3.1) byla vyřešena nalezením a přípravou nových sorbentů s velikostí zrna 3 a 10 µm. Jedná se především o polárně působící silikagel, krystalický oxid hlinitý i různé nepolární stacionární fáze. Tyto materiály jsou obecně porézní, mají velkou aktivní povrchovou plochu a lze vybrat i materiály takových chemických vlastností, které vyvolají rozdílnou retenci i u strukturální izomerů[2]. Nové sorbenty umožnily i zvýšení používaných průtoků mobilní fáze a zrychlení celého procesu. Stanovení odezvy analytů v malých objemech eluentu bylo umožněno především pokrokem elektroniky a elektrooptiky v oblasti konstrukce detektorů a zesílení signálů. Nejběžnější jsou dnes optické detektory, které používají průtokové cely s vnitřními objemy v rozmezí 1 až 10 µl a které sledují buď útlum světelného toku na jedné nebo více vlnových délkách (spektrofotometrická detekce) nebo změnu indexu lomu. Postupně však byly vyvinuty i další techniky detekce, například detekce měřící vodivost kapaliny. Asi nejúčinnější, ale výrazně dražší je pak použití hmotnostního spektrometru na výstupu kolony kapalinového chromatografu, který rozkládá molekuly eluentu na ionty a dokáže rozdělit látky podle atomových hmotností. Zpracování signálů z většiny těchto detektorů je podobné. Jedná se buď o jednoduchý (skalární) sig-

[2]Látky, které mají ve své molekule shodné počty atomů jednotlivých prvků. Tyto látky se jeví shodně například i při analýze hmotnostní spektrometrii, kterou je pro to výhodné kombinovat s chromatografickým dělením.

nál v čase nebo o spektrální záznam (vektor dat o stovkách až tisícovkách položek) v čase.

Změna konstrukce kolony vyžadovala také změnu dopravy mobilní fáze a potřebu překonat větší průtokový odpor kolony. V současné době se používají vysokotlaká „bezpulzní“ čerpadla. Například varianta vysokotlakého čerpadla pro analytickou chromatografii z projektu autora je charakterizovaná parametry běžného průtoku od 0.1 do 20 ml/min při tlaku 0 až 40 MPa. Typické tlaky se pro běžnou analytickou chromatografii pohybují okolo 12 MPa.

Kapalinová chromatografie tedy dospěla v šedesátých letech minulého století do stavu vysoké použitelnosti a v této vysokotlaké obměně je označovaná jako HPLC, tedy vysokotlaká (high pressure), případně vysoce rozlišující (high performance) kapalinová chromatografie (liquid chromatography)

V současné době se jedná o jednu z nejpoužívanějších technik pro analýzu látek jak v oblasti přípravy nových, tak i k studiu a vyhledávání již existujících biologicky aktivních látek sloužících za základ léčiv ale i dalších chemických, technologických a diagnostických procesů a postupů. Například na chromatografické bázi založená analýza aminokyselin v krvi umožňuje vyhledání novorozenců s poruchami metabolizmu, kterým je možné poté substitucí chybějících látek zajistit normální zdravý vývoj.

2.2 Spektrofotometrická detekce

Nutným předpokladem pro kvantitativní analýzu je vzájemná závislost naměřených dat a množství (koncentrací) jednotlivých složek měřeného vzorku. Pro kvantitativní měření vzorku s neznámým složením je třeba nejdříve provést kalibraci (model odezev jednotlivých složek). Pokud je tento model na základě kalibrační sady vzorků se známým složením nalezen, je možné později využít modelu k přesnému vyhodnocení složení neznámého měřeného vzorku.

K výpočtu matematického modelu odezvy složek je nutné připravit sérii vzorků (standardů) se známým složením, která je navržena tak, aby co nejlépe pokrývala očekávaný rozsah koncentrací a složení vyhodnocovaného vzorku. Tato série vzorků je poté měřena přístrojem. Získaná data spolu se známými koncentracemi standardů slouží dále jako trénovací množina (kalibrační data). Na základně těchto dat je možné určit matematický model odezvy pro každou složku. Tento model se většinou sestává ze soustavy kalibračních rovnic, proto se zkráceně nazývá kalibrace.

Poté, co je kalibrační model stanoven, je možné vypočítat kvantity složek a vlastnosti vyhodnocovaného vzorku pokryté sérií standardů. Aby byly vzorky vyhodnoceny přesně, je nutné provádět všechna měření (vyhodnocovaných vzorků i standardů) na shodném přístroji a za přesně shodných podmínek.

Výhodou spektrofotometrických a chromatografických měření je, že zaznamе-

naná data z jednoho měření neobsahují pouze jednu skalární hodnotu, ale skládají se ze souboru mnoha naměřených hodnot (dat, analytického záznamu). Tato vlastnost umožňuje použití menšího množství standardů než pro skalární měření. Zároveň nadbytek měřených dat může posloužit v některých případech k potlačení vlivu šumu měřících přístrojů. Nevýhodou množství měřených dat je vyšší výpočetní náročnost těchto metod. určitou nevýhodou chromatografických metod je delší doba nutná k provedení jednoho vyhodnocení.

Další velkou výhodou spektrofotometrického měření koncentrace jednotlivých složek látek je lineární závislost mezi koncentrací a vyhodnocenou optickou odezvou každé složky. Tato vlastnost je pro spektrofotometrické měření potvrzena v následujícím odstavci.

2.2.1 Zákon Beer-Lambertův

Pokud je vzorek kapaliny umístěn do světelného paprsku spektrofotometru o vlnové délce λ, dochází v každé vrstvě kapaliny s určitou pravděpodobností ke střetu fotonu s molekulou látky a pohlcení části energie původního vstupujícího světelného toku o intenzitě I_0. Pro každou vrstvu i o tloušťce dl lze intenzitu vystupujícího světelného toku I_i zapsat jako

$$I_i = \left(1-\varepsilon'_\lambda\right)\cdot I_{i-1} \tag{2.1}$$

kde ε'_λ reprezentuje úbytek intenzity na jedné vrstvě při jednotkové koncentraci látky. Pro celkovou délku l reprezentovanou $n = l/\mathrm{d}l$ vrstvami se pak intenzita prošlého toku $I = I_n$ rovná

$$I_n = I_0\left(1-\varepsilon'_\lambda\right)^n \tag{2.2}$$

$$I = I_0\cdot 10^{log_{10}\left(1-\varepsilon'_\lambda\right)\cdot\frac{l}{\mathrm{d}l}} \tag{2.3}$$

Výraz $log_{10}\left(1-\varepsilon'_\lambda\right)/\mathrm{d}l$ pro zjednodušení nahradíme $-\varepsilon_\lambda$. Pokud naroste koncentrace látky na hodnotu c tak pravděpodobnost pohlcení (absorbce) fotonu na vrstvě tloušťky dl vzroste. Stejné množství příležitostí ke srážce jako dříve bude odpovídat vrstvě o tloušťce $\mathrm{d}l_c = \mathrm{d}l/c$. Po vyčíslení 2.3 pro látku o koncentraci c a úvaze navržené substituce

$$I = I_0\cdot 10^{-\varepsilon_\lambda\cdot l\cdot c} \tag{2.4}$$

Při sledování koncentrace látky je podstatný pouze poměr světelných toků (intenzit), označovaný jako transmitance T

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon_\lambda\cdot l\cdot c} \tag{2.5}$$

Pro stanovení koncentrací látek je vhodné definovat fyzikální veličinu, která je s koncentrací látek v lineární závislosti. Proto je zaveden logaritmus transmitance

$$A_\lambda = -\log_{10}(T) \tag{2.6}$$

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c \tag{2.7}$$

Kde A_λ představuje koeficient absorbce optického toku vzorkem (zkráceně absorbanci) pro vlnovou délku λ, ε_λ je absorbční koeficient látky (složky) při dané vlnové délce λ, l je délka chodu paprsku vzorkem a c je koncentrace vzorku. Absorbční koeficient je rozdílný pro různé materiály, ale pro vybranou složku při dané vlnové délce je konstantní. Přitom přidání určité koncentrace jiné látky si lze představit jako vložení dalších samostatných vrstev do světelného toku, což se projeví součinem obou transmitancí, to je součtem logaritmů – absorbancí.

Bylo tedy ověřeno, že měřená absorbance vzorku umístěného do světelného paprsku spektrofotometru je přímo úměrné koncentracím jednotlivých složek násobeným jejich absorbčními koeficienty.

2.3 Komponenty kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí Wikipedia (2010):

- zařízení pro uchovávání a transport mobilní fáze (vysokotlaké čerpadlo)
- zařízení pro dávkování vzorku
- zařízení pro separaci látek (chromatografická kolona, termostat kolony)
- zařízení pro detekci látek popř. sběrač frakcí

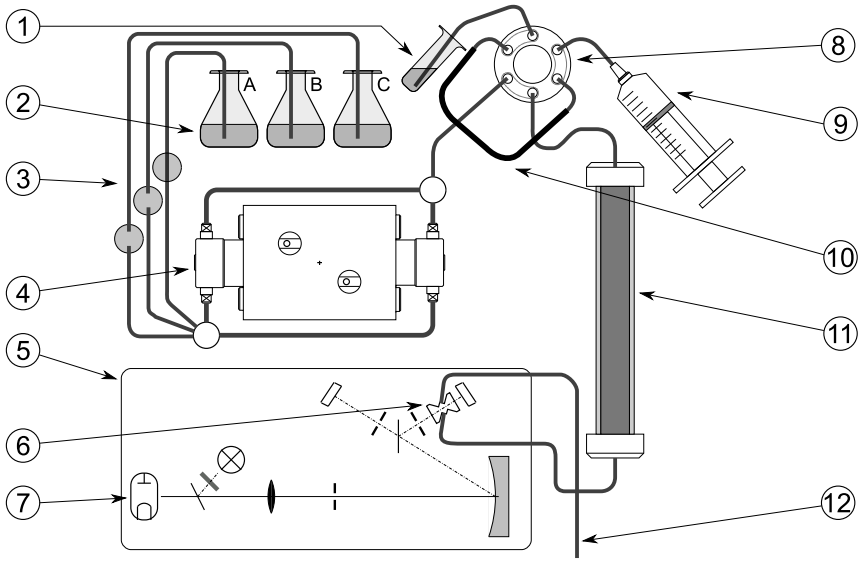
Kapalinový chromatograf může mít samozřejmě řadu obměn, některé komponenty lze vyřadit nebo naopak přidat. Při isokratické eluci je mobilní fáze vedena ze zásobníku mobilní fáze do vysokotlakého čerpadla nebo při gradientové eluci se přiváděné proudy ze dvou nebo více zásobníků mísí podle programu ve směšovači, který je zařazený před nebo za vysokotlakým čerpadlem. Odplynění mobilní fáze se provádí v odplyňovači (degasser). Dále je mobilní fáze vedena přes zařízení pro dávkování vzorku do chromatografické kolony, která je přímo spojena s detektorem, za nějž může být na výstupu zařazen ještě sběrač jednotlivých frakcí. Z detektoru může být signál veden buď do integrátoru a zapisovače nebo dnes častěji do datové stanice s tiskárnou. Tolik tedy říká definice z české Wikipedie.

Typická chromatografická sestava určená pro analytické použití vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) se pak sestává z funkčních jednotek vyobrazených

na schematickém obrázku 2.3. Mobilní fáze je nasávaná z jednoho nebo více zásobníků (2)[3]. Více zásobníků se používá tehdy, když je požadované řízení eluce změnami složení mobilní fáze. Změn je pak možné docílit buď jednoduchým přepínáním v čase, nebo je možné přepínání ventilů (3) synchronizovat s cykly nasávání čerpadla a docílit tak libovolného procentuálního zastoupení složek mobilní fáze v závislosti na čase od začátku analýzy. Takovému postupu se říká gradientní eluce a při použití míchání složek před sáním čerpadla (4) (na straně nízkého tlaku) se ventily nazývají gradientní. Alternativně je možné použít dvě (někdy i více čerpadel) a směšovat složky na straně vysokého tlaku. Koncentrace se pak řídí změnou poměru průtoků mezi čerpadly. Vysokotlaké čerpadlo je vybaveno dvěma čerpacími hlavami v paralelním nebo sériovém zapojení a souběhem pohybů pístů je zaručeno, že mobilní fáze bude dodávaná nepřerušovaně (s minimálními tlakovými pulzacemi). Do toku mobilní fáze je potřeba vložit přesně odměřený objem analyzovaného vzorku. Toho se nejčastěji dosahuje tak, že je analyzovaný vzorek (1) zaveden do dávkovací smyčky (10) o definovaném objemu. K přesunu vzorku do smyčky může být použito například nasátí přes smyčku stříkačkou (9) nebo vytlačení vzorku ze stříkačky přímo do injekčního vstupu dávkovacího ventilu (8). V mnoha případech je manuální dávkování nahrazeno dávkovačem automatickým, který postupně zpracovává sekvenci ve vialkách připravených vzorků a stará se o jejich postupné zavádění do dávkovací smyčky. Přepnutím dávkovací ventilu (8) je pak objem dávkovací smyčky vložen do toku mobilní fáze a vstupuje s ní do kolony (11). Zde dochází za kontrolovaných podmínek k procesu eluce. Kolona je pak obvykle udržovaná na určité teplotě termostatem kolony. Eluent s rozdělenými analyty pak vychází z kolony do detektoru. V případě vztahujícím se k této práci se jedná o spektrofotometr umožňující volbu použité vlnové délky v oblasti viditelného a ultrafialového světla (UV-VIS spectrophotometer). Světelný svazek o vlnové délce vybrané monochromátorem pak v optické cele (6) (také označované kyveta) prochází prostorem vyplněným protékajícím eluentem, který absorbuje určitou část světelného toku. Tato změna se převádí fotodetektorem na elektrický signál, který se dále logaritmuje, zaznamenává a zpracovává. Výstup z celé sestavy (12) je pak veden buď do odpadní nádoby nebo sběrače frakcí, který může určité vybrané složky/analyty oddělovat a uchovávat pro další analýzy nebo jiné využití.

Na obrázku 2.4 je pak možné pozorovat výše popsané komponenty na obdobně sestavené variantě chromatografické sestavy **LC 5000**, na jejímž vývoji se autor textu ve firmě **PiKRON s.r.o** podstatnou měrou podílel. Ve stojánku nahoře jsou umístěny zásobní nádoby s mobilní fází, pod nimi je umístěn automatický dávkovač se zásobníkem na 40 vzorků (**LCS 5040**), dále následuje vysokotlaké čerpadlo s gra-

[3]Zásobníky jsou většinou umístěny nad sací úrovní čerpadla, aby se zamezilo vzniku bublinek, které mohou vznikat z plynů rozpuštěných v kapalině působením podtlaku sajícího sloupec kapaliny vzhůru.



Obrázek 2.3: Schematický diagram kapalinového chromatografu se spektrofotometrickým detektorem

dientovým programem (**LCP 5020**), termostat kolon (**LCT 5100**). Vespod sestavy se pak nachází spektrofotometrický detektor **LCD 5000**. Inovativní řešení digitalizace signálu v tomto přístroji je nastíněno v kapitole 6. Na nosiči vpravo je možné umístit další netermostatované kolony a manuální dávkovací ventil, případně další přepínací ventily pro výběr zařazené kolony. Na monitoru vpravo je patrné zpracování chromatografické analýzy v systému **CHROMuLAN**, jehož stručný popis a architektura jsou rozebrány v kapitole 7.

Obrázek 2.4: Kapalinový chromatograf LC 5000

Kapitola 3

Vlastnosti chromatografického záznamu

Tato kapitola předkládá podrobnější popis zákonitostí ovlivňujících průběh chromatografického záznamu. Především se jedná o popis matematických modelů odezvy jednotlivých složek analyzovaného vzorku. Dále jsou specifikovány problémy, které je potřeba řešit při kvantitativním vyhodnocení chromatografické analýzy.

3.1 Separace analytů a její model

Pro účely této práce je především podstatné jaké průběhy signálů – elučních křivek – bude potřeba zpracovávat a jakými matemetickými průběhy je lze popsat. Vlastní chemická podstata dějů a možnosti jejich ovlivňování pro dosažení požadovaných parametrů separace analytů jsou úkoly, kterými se zabývá obor analytické chemie. Tato práce se již omezuje jen na vlastní detekční řetěžec a zpracování reálných výsledků analýz, ve kterých se často ani dostatečné míry separace nepodaří dosáhnout a pro vyhodnocení je potřaba použít náročnějších matematických postupů. Nejdůležitějším přepokladem je tedy znalost předpokládaného matematického modelu průběhu odezvy jednoho analytu. Náslefující odstavce přináší jen základní ozřejmení již obecně používaného modelu a jejich obsah je pouze populárně informativní přehled, který vychází z materiálů k přednáškám Katedry analytické chemie Univesity Karlovy Štulík et al. (2005) a dalších dostupných publikací Zýka (1980); Purnell (1962).

Jak bylo obecně vysvětleno v odstavci 2.1.2, základními ději probíhajícími na koloně jsou retardace a retence analytů. Přesun analytů do stacionární (adsorpce) a zpět do mobilní fáze (desorpce) je děj závislý na mnoha okolnostech prostředí v koloně. Rychlost pohybu v mobilní fázi pak závisí na rychlosti u dané vrstvy. Protože se však dějů při průchodu látek kolonou týkají velkých množstvích molekul,

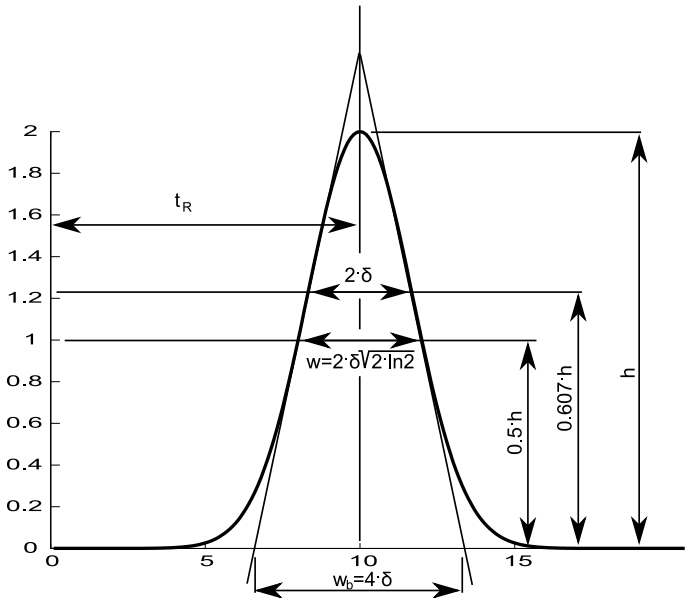
lze jejich průběh a výsledeky popsat jedině statisticky. Pro účel popisu je zaveden retardační faktor R_i, který představuje poměr doby, kterou potřebuje pro průchod kolonou délky L molekula mobilní fáze, ku době, kterou k průchodu potřebuje molekula analytu i.

$$R_i = \frac{t_m}{t_i} = \frac{t_m}{t_m + t_{s,i}} \tag{3.1}$$

kde t_i je celková doba průchodu molekuly analytu i kolonou, t_m je doba, kterou potřebuje molekula mobilní fáze na průchod kolonou a odpovídá i době strávené molekulou analytu v mobilní fázi. Rozdíl časů pak molekula analytu stráví jednotlivými zachyceními ve fázi stacionární $t_{s,i}$. Pravděpodobnosti přesunů analytů mezi stacionární a mobilní fází jsou dané ustavením chemické rovnováhy v každém objemovém elementu kolony. Distribuce pravděpodobnosti přechodů je nejlépe popsaná Poissonovým rozdělením.

Do nalezení dostatečně přesného modelu průběhu eluce s uvažováním postupného přesunu jednotlivých složek nadávkovaného vzorku prostorem kolony bylo v minulosti nainvestováno velké úsilí. K přiblížení je možné dojít například diskontinuálním modelem, který rozdělí kolonu na určité úseky (patra kolony) a zvášť vyšetřuje kroky ustavení rovnováhy a posun mezi patry. Dalším je kontinuální průtokový model, který uvažuje spojité rozložení koncentací i proudění mobilní fáze v elementárních průtokových vrstvách v pórech stacionární fáze atd. Současné metody po započítání proudění, látkového transportu v proudu i přesunů mezi stacionární a mobilní fází pak dokáží s dostatečnou přesností popsat postup a rozklad původně pravoúhlé zóny analytu vnesené do proudu nosné kapaliny – mobilní fáze. Zóna se tedy kontinuálně rozšiřuje a zaobluje, proto relativní vliv difúze postupně narůstá ve srovnání s konvekcí, která poměrně brzy dospěje do stacionárního stavu. Jak je popsáno i v Štulík – Barek (2007), koncentrační profil analytu postupně přechází od pravoúhlého rozdělení přes binomické a Poissonovo rozdělení až k normálnímu, **gaussovskému rozdělení**. Pro další úvahy je podsatný právě tento mnohonásobně potvrzený výsledek, ke ketrému se blíží jak empirická pozorování tak i pro dostatečnou délku kolony teoretické modely. Přitom délky kolony, pro které nedochází k přechodu Poissonova rozdělení na gaussovské v praxi nemají velký význam, protože účinnost dělení je u nich zcela nedostatečná.

Z výše uvedených důvodů tedy bude uvažovaná základní odezva jedné složky analytu ve tvaru gaussovského píku a pro popis odezvy analytu i lze pak popsat časem výskytu maxima odezvy. Pro gaussovský pík je zároveň čas maxima odezvy rovný střední hodnotě rozdělení odezvy v čase. Druhým parametrem je směrodatná odchylkou rozložení odezvy okolo tohoto středu. Obvyklá parametrizace jednoho píku je pak bez uvádění indexu analytu vyobrazena na obrázku 3.1, kde $t_{R,i}$ je retenční čas odpovídající maximu a zároveň středu odezvy. Maximální hodnota odezvy (výška píku od základny) je značena h. Šířku píku pak určuje směrodatná



Obrázek 3.1: Základní parametry gaussovského píku

odchylka průběhu odezvy σ_i. Ta je však často z důvodů možnosti jednoduššího přímého odměření nahrazena šířkou w v polovině výšky píku h, pro kterou platí

$$w_i = 2\sigma_i\sqrt{2ln2} \tag{3.2}$$

případně je někdy uvažovaná šířka v základně píku $w_{b,i} = 4\sigma_i$. Při srovnání s rovnicí 3.1 a úvahami vztahujícími se k jedné molekule je možné tyto úvahy nahradit vztahy pro šíření středu zóny analytu a $t_{R,i}$ odpovídá střednímu t_i pro molekulu. Pro mobilní fázi pak čas průchodu t_M odpovídá t_m z výše uvedeného vztahu. Pro některé účely je vhodné definovat i redukovaný retenční (eluční) čas $t'_{R,i} = t_{R,i} - t_M$, který odpovídá $t_{s,i}$.

Vzhledem k podstatě dějů založených na ustavování rovnováhy na jednotlivých patrech kolony dochází shodně všechny teorie k závěru, že i pro rozdílné látky s různými retenčními časy $t_{R,i}$ je poměr šířky píků ku retenčnímu času při neměných vějších podmínkách (přibližně) konstantní. Tento poznatek pak vedl k zavedení definice teoretického patra kolony H a rozdělení délky kolony L na n takovýchto pater.

$$n = \frac{L}{H} \tag{3.3}$$

Způsobů teoretického odvození a podložení této skutečnosti je více. Pro další výpočty je však plně postačující definice teoretického patra podle Purnell (1962) jako rozptylu analytu na jednotkovou délku kolony. Počet teoretických pater kolony

pak odpovídá poměru délky kolony ku délce jednoho patra a zároveň může být počet pater snadno určen z poměru rozptylu σ_i^2 a druhé mocniny retenčního času $t_{R,i}$ zanamenané odezvy analytu

$$n = \frac{t_{R,i}^2}{\sigma_i^2} = 16\frac{t_{R,i}^2}{w_{b,i}^2} \tag{3.4}$$

Tato nejčastěji používaná forma dobře vyhovuje běžným případům, kdy jsou retenční časy analytů výrazně delší než doba průchodu mobilní fáze kolonou. Pro malá zpoždění analytů především v oblasti plynové chromatografie se častěji používá efektivního počtu teoretických pater vycházejícího z redukovaného elučního (retenčního) času

$$n_{ef} = \frac{{t'_{R,i}}^2}{\sigma_i^2} = 16\frac{{t'_{R,i}}^2}{{w_{b,i}}^2} \tag{3.5}$$

$$H_{ef} = \frac{L}{n_{ef}} = H\left(\frac{1+k_i}{k_i}\right)^2 \tag{3.6}$$

kde k_i značí kapacitní poměr, který je definovaný jako poměr množství analytu i ve stacionární a mobilní fázi.

$$t_{R,i} = (1+k_i)t_M \tag{3.7}$$

Na základě těchto vztahů je pak již možné definovat a porovnávat dosaženou účinnost dělení dvou analytů, předpovídat změny účinnosti dělení pro změny délky kolony a porovnávat vliv různých dalších zásahů do průběhu dělení. Pro účely hodnocení kvality chemických separací obecně (ne jen na koloně) je zaveden separační faktor $\alpha_{i,j}$, který hodnotí míru zvýšení koncentace složky (analytu) i a potlačení znečištění složkou j po provedení jednoho cyklu separacev určitém objemu. V případě kolon je možné ho určit jako poměr kapacitních poměrů dvou složek (analytů)

$$\alpha = \frac{k_j}{k_i} \tag{3.8}$$

V Zýka (1980) jsou pak pro gaussovské tvary píků odvozeny vztahy potřebné pro dosažení určité míry rozlišení dvou látek s různými retenčními časy. Míra rozlišení analytů $R_{i,j}$ je definovaná vztahem

$$R_{i,j} = \frac{t_{R,j} - t_{R,i}}{(w_{b,i} + w_{b,j})/2} \tag{3.9}$$

a za předpokladu $t_{R,j}/w_{b,j} \approx t_{R,i}/w_{b,i}$ to je stálosti výšky efektivního patra H_{ef} lze rozlišení spočítat jako

$$R_{i,j} = \frac{\alpha - 1}{4\alpha}\sqrt{n_{ef,j}} \tag{3.10}$$

Pro dosažení určité míry separace pak vychází potřebná délka kolony počítaná počtem efektivních teoretických pater jako

$$n_{ef} = 16\left(\frac{R_{i,j}\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \tag{3.11}$$

Z těchto výpočtů je pak možné při znalosti vlastností látek a tabulkových parametrů různých sorbentů (stacionárních fází) a rozpouštědel (mobilních fází) navrhnout potřebné parametry kolony (průměr, délku) a další tak, aby bylo možné určitá stanovení provést.

Přesto není nikdy možné dosáhnout 100% rozdělení analytů, někdy by i pořízení nejlépe vyhovující kolony bylo velmi nákladné a pro některé kombinace více než dvou analytů není ani možné provést analýzu s dostatečnou účinností separace ve vyhovujícím čase. Proto se analýzy a průběh eluce urychluje a řídí i změnami koncentrace složek mobilní fáze, změnami teploty kolony atd. Všechny tyto vlivy pak mají vliv i na tvar měřených píků a v mnoha případech je potřeba stanovit koncentrace složek, které nejsou rozděleny dokonale. Základními, v praxi nejčastěji používanými postupy se dále zabývá kapitola 4. Přehledem a návrhem metod založených na matematických modelech se zabývá kapitola 5.

3.2 Matematické modely píků

V následujících odstavcích jsou podrobně popsány různé průběhy píků a matematický popis funkcí, které těmto průběhům odpovídají. Součástí popisu je i stručné teoretické vysvětlení jevů, které definují konkrétní průběhy píků. Přesto, že v mnoha případech je stupeň shody vhodně vybraného modelu píku s reálnými daty velmi vysoký, je nutné nezapomenout na to, že se jedná pouze o aproximace velmi složitých dějů. Tyto děje se řídí mechanickými, chemickými a kvantovými zákony, jejichž působení se vzájemně ovlivňuje.

Dále popsané průběhy píků vyskytující se v běžných chromatografických záznamech jsou rozšířeny i o další známé průběhy píků z oblasti spektrofotometrie a atomové hmotnostní spektrografie. Toto rozšíření je výhodné z několika důvodů:

- množství z dále popisovaných matematických metod je použitelné i pro tyto obory
- v některých případech mohou další zatím neuvažované vlivy vést k modifikaci průběhů chromatografických píků a může být výhodné aproximovat pík některou ze složitějších funkcí
- v oboru kapalinové chromatografie je ve většině případech použita spektrofotometrická detekce, která může umožňovat proměření optického spektra pro

jeden retenční čas nebo při použití Diode Array detektorů je možné zaznamenat průběhy spektra po celou dobu analýzy

- detekční techniky se někdy i kombinují, například se v kapalinové chromatografii používá kombinace spektrofotometrického detektoru pro určení kvantity složek a atomové hmotnostní spektrografie pro nalezení vzorce chemické látky odpovídající dané složce

- nesymetrické/negaussovské tvary píků se skutečně běžně v záznamech měřených kapalinové i plynové chromatografii vyskytují a často jsou způsobeny použitím nelineárních průběhů teplotních nebo koncentračních gradientů případně přepínáním mobilní fáze

- i při vyhodnocování analýz z námi navržených chromatografických přístrojů a především analyzátoru aminokyselin se potřeba hledat lépe odpovídající průběhy pro naměřená data vyskytla

3.2.1 Volba parametrizace modelů píků

Z popisu vzniku tvaru píků v odstavci 3.1 se jako přirozená volba jednoho parametru jeví použití střední hodnoty (dále označované jako x_T), která v případě chromatografického záznamu odpovídá retenčnímu času analytu $t_{R,i}$. Volba druhého a dalších parametrů pro negaussovská rozdělení je již náročnější. Pro gaussovský pík je pak potřeba zvolit další dva parametry. V úvahu přichází výška píku h, plocha odezvy S, směrodatná odchylka σ_i nebo pološíře píku w.

Pro použití plochy odezvy S hovoří skutečnost, že tato plocha je vlastně požadovaným výstupem zpracování. Plocha se rovná integrálu jednotlivých příspěvků procházejícího analytu, jehož okamžitá koncentrace je lineárně svázaná s měřeným signálem jak je třeba pro absorbanční měřené ukázáno v odstavci 2.2. Přitom celkové množství výstupního analytu je pro daný vzorek neměnné i při změnách podmínek na koloně, změně rozptylu a deformaci tvaru píku. Ovšem tento parametr má několik zásadních nevýhod. Pro některé uvažované průběhy píků je jeho výpočet relativně náročný a tím více jsou pak komplikované tvary jejich parciálních derivací. To pak komplikuje jejich využití v optimalizačních algoritmech. Při iteračních postupech je plocha silně závislá na změnách dalších parametrů a konvergence výpočtů se i přes počáteční snahu o jeho využití ukázala jako problematická.

Výška maxima odezvy h je zřetelně viditelný parametr. Vzhledem k tomu, že případné vzájemné překryvy píků jsou největší v okrajových oblastech, tak je to parametr, který je dostatečně nezávislý na malých změnách parametrů okolních píků. Zároveň v mnoha klasických metodách se často po kalibraci používá i k výpočtu koncentrace využívá pouze výška maxima. Důvodem volby tohoto parametru je

jeho malé ovlivnění okolními píky. Jedná se o řešení jednoduché a suboptimální, ale pro analýzy se stabilními retenčními časy obvykle dosahuje dobrých výsledků.

Směrodatná odchylka σ je pak dalším ze základních a relativně nezávislých parametrů gaussovského píku. Potíž s tímto parametrem nastává při přechodu k jiným, nesymetrickým průběhům píků, u kterých je často výpočet rozptylu (směrodatné odchylky) z analytického vyjádření komplikovaný. Přitom nejčastější předpokládaný postup vyhodnocení je v první fázi nahrazení průběhu skupinami gaussovských píků a až v závěrečné fázi, kdy se zvýrazní oblasti, které gaussovské píky nepokrývají s dostatečnou přesností, je potřeba hledat lepší reprezentaci konkrétních problematických píků. Přitom je vhodné nalézt takovou parametrizaci, která i při změně matematického modelu přibližně zachová předchozí tvar, jehož získání již stálo množství iterací a případné vzdálení se výsledku povede i k zbytečným změnám v dalších parametrech.

Na základě výše provedených úvah a po odzkoušení několika různých parametrizací byla nakonec zvolena parametrizace výškou maxima h a šířkou píku v polovině jeho výšky w. Tento parametr je i pro komplikované tvary píků snadno určitelný a pro žádný z uvažovaných modelů nepředstavovalo jeho použití výraznější komplikace. Nevýhodou je, že nemá přímý fyzikální/analytický význam srovnatelný třeba se σ, jenž je jednoznačně svázaná s teoretickými patry kolony. Na druhou stranu přepočet na σ je pro gaussovský pík jen záležitostí násobení konstantou a pro jiné průběhy je platnost jeho fyzikálního významu sporná.

3.2.2 Gaussovský pík

Jedná se o nejčastěji uvažovaný průběh pro jevy způsobené stochastickými procesy. Tomuto průběhu se velmi často blíží jak chromatografické píky tak píky ze spektrofotometrických měření.

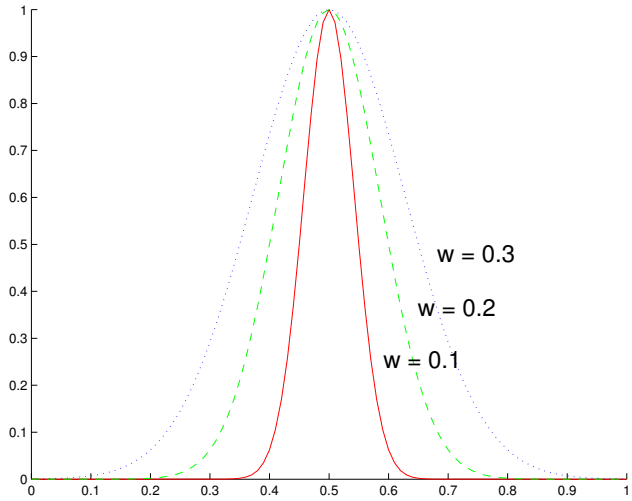
Tento průběh je častý pro spektrofotometrická měření, kdy jednotlivé píky odpovídají spektrálním čarám prvků a molekul obsažených v směsi. Molekuly jsou v neustálém neuspořádaném pohybu. Při vzájemných srážkách dochází k narušení a drobným odchylkám v hodnotách energie odpovídající elektronům ve vnějších vrstvách atomů. Tyto změny a pohyby jsou náhodné a mají za následek rozšíření průběhu spektrálních čar. Dalším z jevů, který také rozšiřuje spektrální čáry je Dopplerův efekt. Především u plynných látek převládají tyto příčiny rozšíření čar a v těchto případech odpovídá výsledný průběh píku průběhu Gausiánu.

Matematický popis gaussovského průběhu ve směru osy x může být zapsán následující rovnicí

$$f(x) = h e^{-4\ln(2)\left(\frac{x-x_T}{w}\right)^2} \tag{3.12}$$

kde x_T je souřadnice x vrcholu píku, h je výška vrcholu píku nad základnou a w je

pološíře píku (šířka píku v polovině výšky). Tento mírně modifikovaný zápis průběhu gausiánu má tu výhodu, že jednotlivé parametry funkce lze snadno odměřit z grafu průběhu. Vliv parametru w na gaussovský průběh píku lze vidět na obrázku 3.2.



Obrázek 3.2: Průběh gaussovského píku

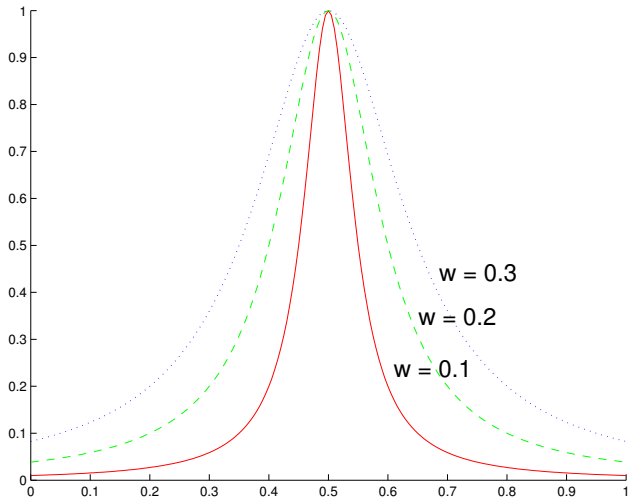
Při porovnání gaussovského píku s dále popsaným lorenzovským průběhem, který je také častý u spektrofotometrických měření, je patrné, že gaussovský pík má menší intenzitu v okrajových oblastech a větší intenzitu v centrální části než lorenzovský pík.

3.2.3 Lorenzovský pík

Tento průběh píku nejlépe odpovídá průběhu intenzity spektrálních čar při spektrofotometrických měřeních za té podmínky, že vliv neuspořádaného pohybu molekul je zanedbatelný. Po počáteční excitaci fotonem není energetická hladina excitovaného stavu určena přesně, určitá nejistota zůstává v excitační odezvě. V závislosti na době, po kterou molekula zůstává v excitovaném stavu, je ovlivněna šířka píku. Pokud doba setrvání v excitovaném stavu dosáhne frekvence přechodů, je rozšíření výrazně větší, ale jeho průběh zůstává stále lorenzovský. Pro parametry zvolené shodně s rovnicí gaussovského průběhu lze lorenzovský průběh zapsat v následujícím tvaru.

$$f(x) = \frac{h}{4\left(\frac{x-x_T}{w}\right)^2 + 1} \tag{3.13}$$

kde x_T je opět souřadnice x vrcholu píku, h je výška vrcholu píku nad základnou a w je pološíře píku.



Obrázek 3.3: Průběh lorenzovského píku

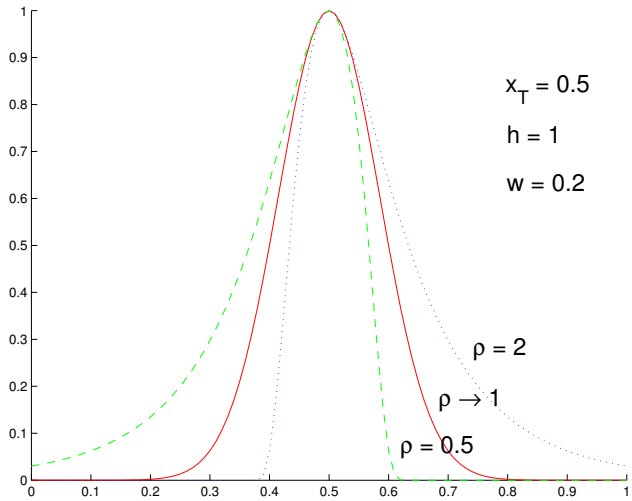
3.2.4 Logaritmicky gaussovský pík

Tento průběh může být použit k modelování sešikmených (nesymetrických) spektrálních čar a píků. Přesto, že se gaussovský průběh píku často shoduje se zjednodušeným modelem píků chromatografických metod, jsou průběhy píků reálných chromatogramů mnohem komplikovanější, protože závisí na mnoha dějích jako je difuze a podobné chemické procesy. Průběhy může dále ovlivnit volba kolony a detektoru. Tyto vlivy mohou způsobit, že jsou píky asymetrické, na jednu stranu protažené. Stav, kdy je odezva píku rozmyta za oblast předpokládaného gaussovského průběhu, je nazýván „chvostování“. Protažení však někdy může i předbíhat maximum píku. Sklon strmé větve píku může být velmi vysoký a to jak pro případ zpožďování tak pro případ předbíhání těžiště oproti maximu píků. Tyto průběhy píků mohou být často s úspěchem modelovány logaritmicky gaussovským průběhem. Nevýhodou této volby je ovšem, že parametry nalezeného modelu průběhu nelze použít pro zjištění parametrů difuzního procesu. Pak je nutné zvolit jiný model průběhu.

Při uvažování shodné parametrizace jako pro gaussovský pík lze rovnici logaritmicky gaussovského průběhu zapsat následovně

$$f(x) = h e^{\frac{-\ln(2)}{(\ln\rho)^2}\left(\ln\left(\frac{(x-x_T)\left(\rho^2-1\right)}{w\rho}+1\right)\right)^2} \tag{3.14}$$

kde ρ je poměr pološířek.



Obrázek 3.4: Průběh logaritmicky gaussovského píku

Funkci podle rovnice 3.14 nelze pro $\rho = 1$ vyhodnotit. Průběh funkce se však pro $\rho \to 1$ blíží gaussovskému průběhu definovanému rovnicí 3.12. Toto tvrzení lze potvrdit výpočtem limity funkce v bodě $\rho = 1$. Pro tento výpočet je potřeba nejdříve vyjádřit limitu výrazu

$$\frac{\ln\left(\frac{(x-x_T)(\rho^2-1)}{w\rho}+1\right)}{\ln\rho}$$

v $\rho \to 1$. Výraz lze přepsat do tvaru

$$\frac{\ln\left(\frac{(x-x_T)}{w}\left(\rho-\frac{1}{\rho}\right)+1\right)}{\ln\rho}$$

Výraz $\left(\rho-\frac{1}{\rho}\right)$ nabývá pro $\rho = 1$ hodnoty 0. Z toho je zřejmé, že se argument přirozeného logaritmu v čitateli i jmenovateli výrazu blíží hodnotě 1 a oba logaritmy lze nahradit prvními členy Taylorovy řady, $log(x) \to x-1$. Výraz se zjednoduší na

$$\frac{\frac{(x-x_T)}{w}\left(\rho-\frac{1}{\rho}\right)+1-1}{\rho-1}$$

První člen Taylorova rozvoje výrazu $\left(\rho-\frac{1}{\rho}\right)$ v bodě 1 je $(2\rho-2)$ a celý výraz tedy nabývá pro $\rho = 1$ hodnoty $2\frac{(x-x_T)}{w}$. Po dosazení této hodnoty do funkce logaritmicky

gaussovského průběhu 3.14 přechází funkce pro $\rho = 1$ do tvaru shodného s 3.12, což dokazuje původní tvrzení.

$$he^{-4\ln(2)\left(\frac{x-x_T}{w}\right)^2}$$

3.2.5 Voightova funkce píku

Vlastní průběh intenzity spektrální čáry je lorenzovský (viz 3.2.3), ale působením dalších vlivů dochází k ještě většímu rozšiřování průběhu. Mezi tyto vlivy patří například Dopplerův efekt a srážky molekul. Na rozšíření zaznamenaného průběhu má také vliv konstrukce spektrofotometru, světelného zdroje a monochromátoru. Podstatný vliv může mít i vzduch a ozón nacházející se v optické cestě spektrofotometru. Tento složitý průběh píku je označován pojmem Voightův průběh. Průběh je konvolucí Gausiánu a Lorenziánu (viz 3.2.2,3.2.3) a odpovídá skutečnému průběhu spektrálních čar převážné většiny interakcí. Lorenzovský průběh by měl odpovídat interakcím kapalin, ale většina systémů obsahuje více světlo absorbujících látek a izotopů, což má za následek složitější průběhy, které lze většinou také dobře aproximovat Voightovým průběhem. Matematický zápis průběhu je definován podílem dvou integrálů

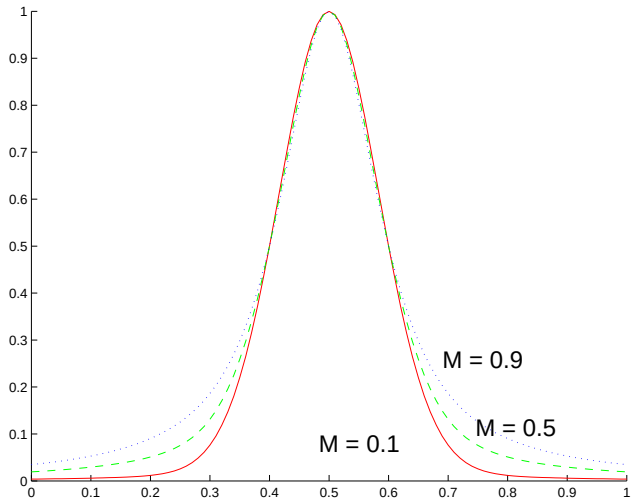
$$f(x) = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{he^{-z^2}dz}{w_l^2+\left(\frac{x-x_T}{w_g}-z\right)^2}}{\int_{-\infty}^{+\infty} \frac{e^{-z^2}dy}{w_l+z^2}}$$

kde h je výška, x_T je poloha píku, w_g je gaussovská šířka a w_l je lorenzovská šířka.

Tento průběh je natolik složitý, že nemůže být analyticky vyjádřen a je nutné ho aproximovat. Voightův průběh má umístěno více plochy v okrajových částech než gaussovský průběh, ale ne zase tolik, kolik má lorenzovský průběh.

3.2.6 Smíšený lorenzovsko-gaussovský pík

Protože numerické výpočty obsahující Voightův průběh jsou velmi náročné a analyticky nejsou výpočty s tímto průběhem řešitelné, používají se aproximace tohoto průběhu. Nejčastější dva používané průběhy jsou lorenzovsko-gaussovský a Pearsonův průběh. Ačkoliv tyto průběhy neodpovídají aproximovanému průběhu přesně, umožňují řádově snížit výpočetní náročnost hledání analytické aproximace změřeného spektra. Výhodou lorenzovsko-gaussovského průběhu je to, že získané parametry odpovídají příspěvkům gaussovského a lorenzovského rozšíření spektrálních čar. Jsou-li známy modely zdrojů rozšíření čar, lze z těchto parametrů vypočítat průběh vlastních spektrálních čar měřené látky. Matematicky je průběh definován váženým průměrem gaussovského a lorenzovského průběhu. Parametr M udává váhu lorenzovského průběhu, hodnota $1-M$ určuje váhu gaussovského průběhu. Vliv parametru M je demonstrován na obrázku 3.5.



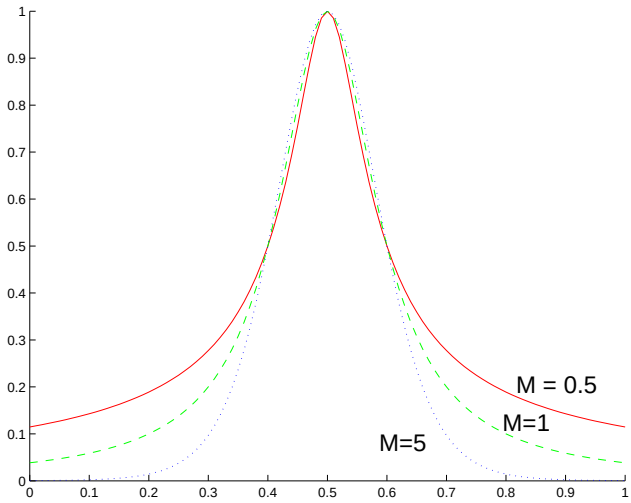
Obrázek 3.5: Smíšený lorenzovsko-gaussovský pík

3.2.7 Pearsonův pík typu VII

Tento průběh je aproximací Voightova průběhu spektrální čáry. Nevýhodou je, že parametry průběhu nemají žádný vztah k fyzikálnímu modelu rozšíření spektrální čáry. To znamená, že tento průběh může být použit k modelování průběhu píku, ale získané parametry nejsou v žádném vztahu k procesu rozšíření spektrální čáry. Na druhé straně tento průběh aproximuje velmi dobře Voightův průběh pro průměrné hodnoty parametrů. Pro parametr M blížící se k 1 se Pearsonův průběh blíží k Lorenzově průběhu a pro nekonečnou hodnotu parametru se průběh blíží Gausiánu. Průběh lze zapsat následující funkcí

$$f(x) = \frac{h}{\left[1 + \left(\frac{2(x-x_T)\sqrt{2^{(1/M)}-1}}{w}\right)^2\right]^M}$$

kde mimo běžné parametry x_T (poloha vrcholu píku), h (výška vrcholu píku) a w (pološířka píku), přibyl parametr M vyjadřující pearsonovu šířku. Vliv parametru M je zobrazen na obrázku 3.6.



Obrázek 3.6: Paersonův průběh typu VII

Kapitola 4

Konvenční metody vyhodnocení chromatografického záznamu

Tato kapitola předkládá velmi stručný úvod a přehled běžně užívaných metod kvalitativního a kvantitativního vyhodnocení chromatografického záznamu. Tyto metody jsou založeny na přímém určení ploch odezev jednotlivých detekovaných složek (píků). Je ukázáno, že pro dobře rozdělené analyty dává tento postup velmi přesné výsledky. Ale v případech, kdy se odezvy (píky) překrývají nebo jsou superponované na časově závislý průběh chemického pozadí (drift, gradientní změna mobilní fáze), závisí vypočítané hodnoty silně na volbách uživatele.

4.1 Kvantitativní vyhodnocení analýzy

V odstavci 2.2.1 je odvozeno pro případ spektrofotometrické detekce, jak zvolit veličinu (v tomto případě absorbanci), která je lineárně závislá na koncentraci protékajícího analytu. Pro takto zvolenou veličinu je pak možné určit celkové množství (hmotnost atd.) sledované látky (analytu) i v analyzovaném vzorku sledováním její okamžité koncentrace v eluátu $c_i(t)$.

$$V_i = \int_t c_i(t) \cdot Q \, \mathrm{d}t \tag{4.1}$$

kde Q bude uvažované jako objemový průtok eluátu detektorem a je shodný s průtokem mobilní fáze čerpadlem.

Pro případ spektrofotometrického měření lze podle rovnice 2.7 odezvu přepsat při znalosti optické délky průtočné cely a známou hodnotu absorbčního koeficientu

dané látky ($\varepsilon_{\lambda,i}$) jako

$$V_i = \int_t \frac{A_\lambda(t)}{l \cdot \varepsilon_{\lambda,i}} \cdot Q \, \mathrm{d}t \tag{4.2}$$

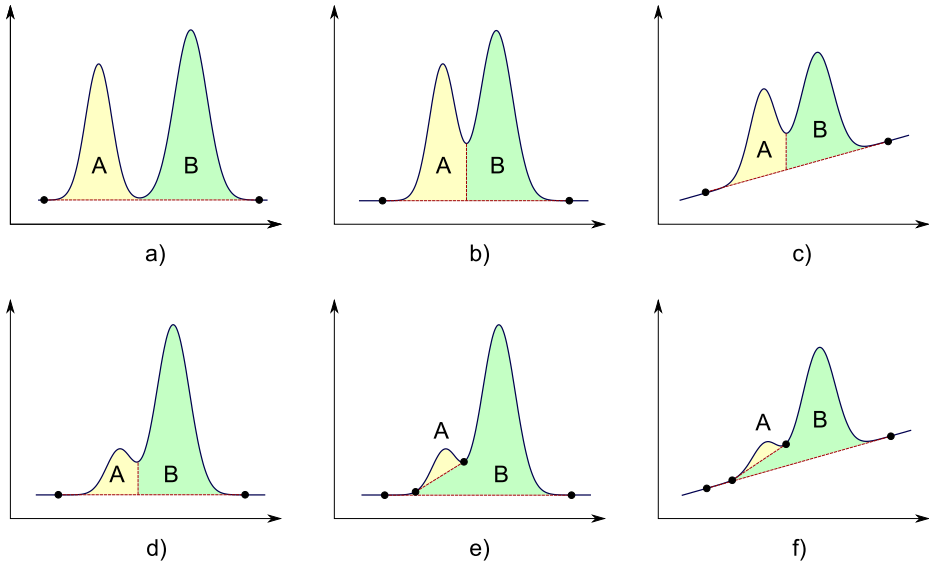
$$V_i = \frac{Q}{l \cdot \varepsilon_{\lambda,i}} \cdot \int_t A_\lambda(t) \, \mathrm{d}t \tag{4.3}$$

Protože obecně mobilní fáze také představuje určité pozadí, měl by být absorbční koeficient nahrazen rozdílem koeficientů látky a pozadí. Protože však přesné určení všech parametrů rovnice pro dosažení absolutního charakteru měření není většinou možné, používají se měření poměrová, kdy se nejdříve známým vzorkem (analytický standard, zkráceně standard) určí velikost odezvy na známou koncentraci. Proto jsou veškeré konstanty ve výrazu 4.3 nahrazeny jedním parametrem k_i. Zároveň i dávkování vzorku a standardu na kolonu je shodné, používá se stejná dávkovací smyčka, je možné vynechat i přepočty mezi objemem vzorku a koncentrací analytu ve vzorku a psát pro koncentraci dané látky (analytu) v původním analyzovaném vzorku jednoduše

$$C_i = k_i \cdot \int_t A_\lambda(t) \, \mathrm{d}t \tag{4.4}$$

Pokud jsou tedy hodnoty konstant k_i pro jednotlivé analyty (složky) určeny (obvykle s využitím standardů) a jsou známé nebo podle odezev standardů určené retenční časy jednotlivých analytů ($T_{R,i}$ viz 3.1), stačí správě přiřadit analyty k jednotlivým kvalitně rozděleným píkům a provést numerickou integraci plochy pod každým píkem. Jedná se o případ, který je pro dva píky **A** a **B** ilustrovaný na obrázku 4.1 jako možnost **(a)**. Na obrázku nejsou záměrně uvedeny veličiny ani jednotky. Tato úloha není totiž specifická pouze pro případ kapalinové chromatografie (LC). Svislá osa představuje odezvu (pro LC absorbance), vodorovná představuje rozdělení analytů. Pro LC se jedná o čas, při optických spektrálních stanovení o vlnové délky u hmotnostní spektrografie o atomární hmotnost.

Jak však bylo již dříve vysvětleno, v moha případech není možné (nebo je velmi nákladné) takto účinného dělení analytů dosáhnout. Zároveň se v analýzách uplatňuje i přídavek průběhu chemického pozadí (označované též nulová linie). Vyhodnocení analýz v programech nabízí modelování odezvy pozadí pod píky přímými úseky nulové linie. Vždy je možnost úsek zakotvit na body záznamu okolo skupiny píků, někdy je možné i protahovat nulovou linii vodorovně od zvoleného bodu před nebo za skupinou píků. Píky často nejsou rozděleny bez překryvu. Běžné řešení této situace je znázorněné na obrázku 4.1 jako možnost **(b)**. Píky se rozdělí v oblasti minima signálu. Pokud se píky překrývají jen málo a jejich vzájemné poměry se mezi různými analyzovanými vzorky mění relativně málo, je i při zanedbání vzájemného ovlivnění ploch mezi analyty celková přesnost stanovení vyhovující. Případ **(c)** znázorňuje situaci, kdy hodnota chemického pozadí v čase lineárně roste (drift). Řešení



Obrázek 4.1: Rozdělení plochy sousedních píků

využívající numerické integrace signálu a rozdělení píků svislicí v minimu však zásadním způsobem selhává v případě velkého překryvu a rozdílu ve výškách (plochách) píků. Problém je dobře patrný na ilustračním případu **(d)**. Programy obvykle nabízejí volbu pro vyhodnocení píku na chvostě. Počítá se s tím, že v dané oblasti většího píku již jeho rameno v ubíhá po přímce a menší pík (na ilustraci **A**) narůstá z tohoto ramena. Pokud se mění plocha píku **B** mezi analýzami pouze v malé míře a i rozsah změn plochy **A** je v určitých mezích, tak lze řešení ilustrované případem **(e)** považovat za schůdné a to i v případě působení driftu, případ **(f)**.

Obecně však předchozí rozebíraná řešení nejsou systémová a nelze od nich očekávat zaručené výsledky při větších změnách poměrů koncentrací analytů a překrývání píků. Proto je třeba hledat jiná řešení založená na moderním matematickém modelování průběhu záznamu, která jsou analyzovaná a navržená v kapitole 5. Určitě stojí za porovnání výsledky určení ploch a rozdělení překrývajících se píků podle takto navrženého postupu předvedené na reálné analýze (obrázky 5.3, 5.4) s postupy ilustrovanými v předchozím odstavci na průbězích složených z ideálních tvarů píků (obrázek 4.1). Na první pohled je jasné, že správnost přiřazení ploch k jednotlivým analytům je podle postupu v kapitole 5 řádově přesnější a přitom závislost na rozhodování uživatele mezi použitím případu d) a e) je zcela eliminovaná.

4.2 Využití analytických standardů

Jak bylo ukázáno v předchozím odstavci, možnost přímého absolutního měření koncentrací jednotlivých látek je vlivem problematického tabulkového určení konstant k_i používaná sporadicky. Je tedy potřeba chromatografickou sestavu pro následné měření požadovaných vzorků nakalibrovat, to znamená použít analytických standardů, vzorků obsahujících známá množství čistých analyzovaných látek. Existují však i další podobné kalibrační postupy, které mohou proces stanovení zpřesnit. V několika dalších odstavcích jsou tyto možnosti vyjmenované spolu se vztahy, které byly autorem textu a Doc. Jindřichem implementovány v programu **CHROMuLAN**. Vztahy jsou předloženy ve tvaru a symbolice, která přímo odpovídá uživatelskému rozhraní programu a pojmenování proměnných a metod v kódu. Podrobnější popis lze nalézt v uživatelském manuálu PiKRON (2002) k vyhodnocování analýz programem **CHROMuLAN**, který pro uživatele přístrojů **AAA 400** a **LC 5000** připravil Ing. Petr Porazil.

4.2.1 Vyhodnocení bez standardu

Jedná se o nejjednodušší způsob vyhodnocení, kdy je po integraci odezvy analytu určena plocha píku *Area*. Ta je poté vydělena uživatelem zjištěnou/zadanou mírou odezvy detektoru na konkrétní látku. Při porovnání se vztahem 4.4 tedy *Area* odpovídá integrálu $A_\lambda(t)$ a *Response* odpovídá $k_i \sim 1/\varepsilon_{\lambda,i}$. Ve vztazích v programu záměrně jednotky rozměrů nevystupují, protože stejný postup lze použít v zcela odlišných fyzikálních případech. Výsledkem vztahu je tedy jen hodnota bezrozměrného množství *Amount*. Uživatel může ještě volit koeficient pro násobení každého píku $UsrPeakCoef$ a dále konstanty $Factor$, $MutiplyFactor$ a $DivideFactor$ definované v metodě společně pro všechny píky dané analýzy. Typicky $DivideFactor$ představuje například množství původního vzorku, ze kterého byly analyzované látky přípravou vyluhovány do určitého množství ($MutiplyFactor$) rozpouštědla, ze kterého byl již konstantní objem dávkován na kolonu. Pokud nejsou tyto další koeficienty používané, jsou všechny nastaveny na hodnotu 1.

Výpočet pak pro každý pík (analyt) probíhá podle vzorce

$$Amount = \frac{Area}{Response} \cdot UsrPeakCoef \cdot Factor \cdot \frac{MutiplyFactor}{DivideFactor} \tag{4.5}$$

4.2.2 Vnější standard

Vyhodnocení s vnějším standardem se používá, pokud máme standardní vzorek se známým obsahem jednotlivých složek. Nejdříve je analyzován vzorek standardu,

pro který jsou známé koncentrace jednotlivých analytů[1]. Uživatel do metody standardu nebo přímo k jednotlivým nalezeným píkům dopíše známé hodnoty koncentrací/množství látek ve standardu $Amount_{std}$. Z těchto informací lze určit koeficient závislosti odezvy *Response*

$$Response = \frac{Area_{std}}{Amount_{std}} \cdot UsrPeakCoef_{std} \cdot Factor_{std} \cdot \frac{MutiplyFactor_{std}}{DivideFactor_{std}} \tag{4.6}$$

Poté jsou již měřeny vlastní vzorky k analýze. Při jejich vyhodnocení je v metodě povolena volba *Cal.Standard* a přiřazený soubor s jeho analýzou. Hodnoty *Response* jsou pak ze souboru standardu pro jednotlivé píky překopírované do vyhodnocované analýzy. Další výpočet již vypadá shodně s předchozím případem. Hodnota *Response* již však nepatří mezi uživatelské konstanty.

$$Amount = \frac{Area}{Response} \cdot UsrPeakCoef \cdot Factor \cdot \frac{MutiplyFactor}{DivideFactor} \tag{4.7}$$

4.2.3 Vnitřní standard

V některých případech je se vzorkem před dávkováním manipulováno takovým způsobem (ředění, destilace, louhování atd.), že je velmi problematické určit, jaké množství původního vzorku odpovídá dávkovanému objemu. Řešením je přidat předem známé množství určité (ve vzorku neobsažené) látky přímo k počátečnímu známému celkovému množství vzorku. Pokud další ředící a jiné procesy mají stejný vliv na koncentraci přidané látky jako na koncentrace ostatních analytů, je možné vliv tohoto ředění na konečné výsledky vyloučit tak, že je změřený vliv ředění na složku se známým původním množstvím $Amount_{is}$. V programu je pak vybraný pík označen volbou *Internalstandard*. Potom při zpracování analýzy dojde k výpočtu hodnoty *Factor*.

$$Factor = \frac{Amount_{is} \cdot Response_{is}}{Area_{is} \cdot UsrPeakCoef_{is}} \cdot \frac{DivideFactor}{MutiplyFactor}$$

Tato hodnota je pak použita ve výpočtu množství všech ostatních analytů, který se již dále provádí podle shodného vzorce, jako v případě bez standardu

$$Amount = \frac{Area}{Response} \cdot UsrPeakCoef \cdot Factor \cdot \frac{MutiplyFactor}{DivideFactor}$$

[1] Takový vzorek se připraví třeba navážkou jednotlivých látek z čistých chemikálií a jejich rozpuštěním v odměřeném množství rozpouštědla

4.2.4 Vnější i vnitřní standard

Výpočet s vnějším i vnitřním standardem je kombinací dvou předchozích způsobů vyhodnocení, probíhá podle následujících vzorců:

$$Amount = \frac{Area}{Response} \cdot UsrPeakCoef \cdot Factor \cdot \frac{MutiplyFactor}{DivideFactor}$$

kde se $Factor$ vypočte jako

$$Factor = \frac{Amount_{is} \cdot Response_{is}}{Area_{is} \cdot UsrPeakCoef_{is}} \cdot \frac{DivideFactor}{MutiplyFactor}$$

a $Response$ se vypočte ze standardu

$$Response = \frac{Area_{std}}{Amount_{std}} \cdot UsrPeakCoef_{std} \cdot Factor_{std} \cdot \frac{MutiplyFactor_{std}}{DivideFactor_{std}}$$

Kapitola 5

Moderní matematické metody pro vyhodnocení analýz

Tato kapitola se ze zaměřuje na možnosti vyhodnocení chromatografického záznamu s využitím moderních optimalizačních metod. Tyto metody umožňují v mnoha případech zcela eliminovat vliv vzájemného překrytí odezvy více složek a potlačují vliv šumu a chemického pozadí na kvantitativní vyhodnocení analýz. Nejdříve jsou analyzovány požadované funkce a kroky takového vyhodnocení. Ty jsou postupně doplňované o algoritmy, které je pro řešení úlohy používají. Nalezení matematického modelu a jeho parametrů, který by se shodoval s naměřenými daty, je ideální řešení, kterému se však lze jen do určité míry přiblížit. Pro hledání tohoto přiblížení je potřeba využívat nelineární optimalizační metody matematického modelu celého měřeného signálu. Pro urychlení jejich konvergence je vhodné doplnit modely píků (popsané v 3.2) i o jejich analytické derivace. Tyto výpočty byly provedeny a výsledky jsou prezentované v odstavci 5.2. Různé metody byly otestovány jednak s využitím dostupných nástrojů a knihoven a také byl navržen relativně jednoduchý, ale základním požadavkům vyhovující soubor skriptů v prostředí **Matlab** s grafickým rozhraním **pfit_ui**. Skripty především slouží k otestování algoritmů, u kterých se uvažuje o jejich možné integraci do chromatografického systému **CHROMuLAN**. Možnosti integrace jsou rozebrany v odstavci 7.2.4. Na konci kapitoly je pak demonstrované řešení s využitím navrženého postupu na reálné analýze aminokyselin.

5.1 Rozbor problému

Úkolem zpracování záznamu pro účely určení kvalitativního i kvantitativního zastoupení analytů v původním nadávkovaném vzorku je vlastně transformace výstupní informace z procesu eluce na vstupní podmínky tohoto procesu. Hledáme řešení inverzního problému k popisu procesu eluce (popsaný v 3.1), který má za

následek vznik detekovaného signálu obsahujícího superponované odezvy jednotlivých složek analytů (viz 3). Protože i analýza dopředného procesu vlastní eluce je často důležitá a nastavení jejích parametrů tak, aby byla separace co nejúčinnější, je důležité a v mnoha případech je potřeba vybrat vhodné parametry bez dlouhého testování a spotřeby někdy i extrémně nákladných látek a rozpouštědel, proto existuje i množství softwarových nástrojů, které umožňují modelovat proces eluce a získat pro dané parametry předpokládanou odezvu (eluční křivku). Jedním z takových nástrojů je třeba rozšíření LC-MSsim Schulz-Trieglaff et al. (2008) projektu OpenMS Sturm et al. (2008) sloužícího k zpracování chromatografických záznamů a spekter hmotnostního spektrofotometru. Projekt LC-MSsim tedy může posloužit jako zdroj cenných informací a také i pro přípravu modelových dat pro řešení inverzního problému.

Vzhledem k nedeterministické/statistické podstatě dějů se však problém určení analytů a jejich koncentrací komplikuje. Dále na proces působí množství faktorů a vlivů, které není možné jednoduše popsat. Výsledný signál je tedy zatížen šumem a dalšími odchylkami, které se v modelech nevyskytují nebo se do nich přidávají opět pouze jako šum. Hlavní příčiny a odchylky měřeného signálu od modelu tedy jsou

- chemický šum daný charakterem procesu eluce
- šum způsobený prouděním kapaliny v měrné optické cele (možná i dopplerovský efekt, mikrobublinky atd)
- šum daný vlastnostmi a technologií fotodetektoru (zvaný též temný proud)
- nelinearita daná vlastnostmi fotodetektoru nebo nedodržením přesných podmínek (např. požadavek na stabilizaci napětí na jeho výstupu)
- šum daný vedením velmi slabého signálu do zesilovače v detektoru
- šum ve vlastním zesilovacím stupni (zásadní je například šum vysokoohmových odporů ve zpětné vazbě operačního zesilovače)
- šumy, nelinearita a ofsety příslušející k technologii převodu signálu do digitálního tvaru
- šum a drift způsobený dosažením limitu možné stabilizace zdrojů světla, výskytem ozónu v optické cestě, tepelnou roztažností monochromátoru a dalších mechanických dílů, která se projeví vlivem zahřívání přístroje po zapnutí i díky častému použití přístrojů v prostorech bez přesné stabilizace teploty
- šum často s periodickým charakterem způsobený nerovnoměrností čerpání mobilní fáze. I u sebekvalitnějšího kontinuální vysokotlakého čerpadla dochází k určitým tlakovým pulzacím při předávání výtlaku z jednoho pístu na

druhý, stejně tak zpětné ventily projevují určité nedokonalosti (mechanický a softwarový návrh našich čerpadel a částečného potlačení těchto projevů je zdaleka mimo rozsah této práce).

- drifty a někdy i zlomy v průběhu základové linie (chemického pozadí), na které se se odezvy analytů superponují. Často jsou způsobené nepřesnostmi v míchání složek mobilní fáze, změnami koncentrací mobilní fáze v průběhu analýzy, záměrnými změnami teploty kolony nebo omezenou mírou její stabilizace.

- při vyšších koncentracích některých analytů může docházet i k vzájemnému ovlivnění během procesu eluce, kdy se například jedna látka váže na náplň kolony a vytěsňuje látku jinou

- pravděpodobně i mnoho dalších vlivů, které nejsou autorovi této práce známé

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že řešení inverzního problému nebude nikdy čistě analytické a bude vždy vyžadovat určité kompromisy.

Z teorie popisující teoretická patra kolony a tvrzení, že jejich počet zůstává přibližně konstantní i pro analyty vystupující ve velmi rozdílných časech vyplývá, že čas analýzy běží spíše v logaritmických souřadnicích. Zároveň se v mnoha případech projeví i vliv změn mobilní fáze a vzájemného ovlivnění elučních procesů jednotlivých analytů. Z těchto příčin nelze v mnoha případech počítat s čistě gaussovským průběhem píků, proto je potřeba umožnit i přiblížení realitě minimálně použitím modelů logaritmicko-gaussovských píků.

Předpokládejme tedy, že záznam odpovídá superponovaným základním odezvám píků na určitém průběhu základní linie. Je tedy možné buď řešit úlohy hledání průběhu základní linie a kombinace píků společně a nebo zpracování rozdělit do dvou samostatných kroků. Vzhledem k tomu, že při chromatografické analýze (na rozdíl od hmotnostních spekter) se většinou i během analýzy vyskytuje množství oblastí, kde je příspěvek dostatečně vzdálených okolních píků malý, používá se většinou rozdělení zpracování na krok hledání parametrů modelu nulové linie a teprve po odečtení jejího příspěvku se vyšetřují oblasti píků. V odstavci 5.1.2budou nastíněny i možnosti kombinovaného přístupu.

Protože je zpracovávaný signál zatížen velkým množstvím různých šumů a minimálně některé další matematické postupy jsou jeho přítomností ovlivněny, je potřeba zvážit možnosti potlačení jeho vlivu. Protože je to většinou první krok ve zpracování, bude popsán v následujícím odstavci této kapitoly. Dále bude následovat již zmíněné hledání modelu pozadí (5.1.2), poté vyhledání pozic nesoucích známky přítomnosti jednotlivých píků (5.1.3) a nakonec určení parametrů jednotlivých píků (5.1.4).

Předem je potřeba upozornit, že tento relativně náročný přístup není nutné aplikovat, pokud se jedná typicky o dělení jen několika analytů s velmi dobrým rozdělením, není nutné aplikovat. Avšak v okamžiku, kdy se odezvy analytů překrývají[1], tak pokud lze předpokládat výraznější změny poměru jejich výšek (ploch) mezi různými stanoveními, tak žádný z postupů popsaných v kapitole 4 nepřináší přesnější (uspokojivé) výsledky. Pokud je tedy potřeba takové analýzy zpracovávat, tak je potřeba zde popsaným náročnějším postupům věnovat.

5.1.1 Šum signálu a rozvaha nad potlačením jeho vlivu

Vliv šumu lze potlačit mnoha metodami. Klasické metody jsou postaveny na rozboru frekvencí odpovídajícím šumu a užitečném signálu. Mnoho zdrojů v předchozím odstavci uvažovaných šumů přispívá k signálu především na vyšších frekvencích než je měřený signál. Nejjednodušší technika na odstranění šumu je tedy použití běžného filtru typu dolní propust. Výsledný signál tedy potom bude dán konvolucí odezvy filtru s naměřeným signálem. Aplikace filtru tedy bude mít vliv na průběhy (funkce modelů) píků, které budou dále vyhledávané. Pokud bude tato změna výraznější, bude analytické vyjádření výsledného průběhu komplikovanější. Přitom již samotná směs gausiánů a i uvažovaných složitějších funkcí činí úlohu dostatečně obtížnou. Přímé použití filtru bez další rozvahy je tedy možné pouze v případě velkého odstupu frekvencí měřených průběhů od šumu.

Pokud uvážíme, že signál vniká aplikací množství procesů, jejichž odezva odpovídá normálnímu rozdělení (gausiánu) tak přichází v úvahu využití filtrace konvolucí s gausiánem s pološíří volenou uvnitř intervalu mezi frekvencí šumu a předpokládanou pološíří hledaných píků. Výhodou tohoto řešení je, že se charakter průběhů píků gaussovského tvaru nezmění. Pouze dojde k změně parametrů – snížení výšky a sečtení pološíří (směrodatných odchylek). To sice povede k zvětšení míry překryvu píků, ale vzhledem k tomu, že již při použití těchto složitějších metod s řešením této komplikace v dalších krocích musíme počítat, tak tato volba nepřináší kvalitativní změnu problému. Na takto filtrovaném signálu pak lze provést dále popsané kroky a případně na konci vyhodnocení přepočítat parametry nalezených odezev analytů (píků) tak, že je umělé zvětšení pološíře nakonec odečtené a výška příslušně upravená. Avšak vzhledem k tomu, že koncentrace analytů jsou podle uvažovaného přímo úměrné plochám pod jednotlivými píky a k změnám ploch při konvoluci s gausiánem o jednotkové ploše nedochází, tak není pro hlavní použití výsledků výpočtů potřeba provádět žádné úpravy. Často je jako další pomocný výsledek žádaný výpočet velikostí teoretických pater kolony a pokud nemá být tento výsledek ovlivněn uvažovanou filtrací tak je potřeba před jeho výpočtem velikosti přepočítat na parametry před provedením filtrace. Použití této metody není striktně analyticky

[1] Většinou je překryv uvažovaný, pokud je rozdíl retenčních časů menší než 4 až 6σ, to je přibližně 1.5 až 2.5 pološíře okolních píků.

správné pro jiné než gaussovské modely píků, ale vzniklá chyba je malá, protože i průběhy těchto modelů se ve velké většině případů gausiánu v případě kapalinové chromatografie blíží.

Další celkem zajímavou úvahou je, že vlastní výpočet plochy pod křivkou integruje relativně velké množství vzorků, takže i při použití klasických metod vyhodnocení i nad nefiltrovaným signálem dochází ke klasickému potlačení relativní chyby součtem více vzorků měření, u kterých vlastní signálový šum považujeme za šum s normálním rozdělením. Z toho plyne že je možné použít i výrazně filtrovaný záznam analýzy pro vyhledávání počátků a konců oblastí jednotlivých odezev píků a pro odečtení vlivu pozadí (nulové linie), ale vlastní numerickou integraci pak provádět nad původním záznamem s ještě výrazněji (v původní míře) oddělenými píky. Tento postup používá i program **CHROMuLAN** při klasickém vyhodnocení záznamu numerickou integrací pro automatické hledání nulové linie a integračních značek.

Při použití optimalizačních technik pro hledání parametrů píků popsané v dalších odstavcích je také možno pracovat se signálem původním (včetně šumu) a nechat vyhledání průběhu na použitém optimalizačním algoritmu. Výše popisovaná filtrace má tedy hlavně význam pro předpřípravu signálu pro vyhledání průběhu chemického pozadí a nalezení oblastí nebo předpokládaných vrcholů hledaných píků.

Větší problémy představuje periodický (korelovaný) šum způsobený třeba nerovnoměrností čerpání mobilní fáze vlivem přebírání a nástupu výtlaku mezi písty čerpadla. Tento problém by bylo možné řešit například hledáním modelu/aproximace těchto průběhů v oblasti nulové linie (bez píků) a následujícím protažením a odečtením aproximovaných průběhů i v oblastech pod píky. Ale vzhledem k tomu, že není jistý aditivní charakter tohoto signálu (nemusí působit jen chemickou cestou, ale i změnami průtoku optickou celou nebo její určitou deformací), tak by si ověření použitelnosti této myšlenky vyžadovalo samostatný výzkum a testování, které jsou nad rámcem této práce a snad i potřeb většiny nasazení uvažovaného chromatografického systému.

5.1.2 Vliv průběhu chemického pozadí

Obecně do této kategorie jsou zahrnuty všechny pomalé změny v signálu, které nelze přiřadit odezvám analytů, to je hledaným píkům. V této fázi vyhodnocení není známo, které části záznamu jsou (měřitelně/výrazněji) ovlivněny odezvami analyty, a které odpovídají samotnému pozadí. Proto je třeba alespoň v počáteční fázi zpracování provést klasifikaci zaznamenaných vzorků dat analýzy na body odpovídající oblastem výskytu píků a oblasti odpovídající pozadí (obecně označovanému jako nulová linie, anglicky baseline).

Zcela nejjednodušším řešením je hledat oblasti s malým sklonem nebo změnou signálu. Toto řešení však nepřináší kvalitní výsledky. Pokud nejsou během analýzy

prováděny skokové změny parametrů (mobilní fáze, teploty, průtoku atd.), lze předpokládat, že modelem pozadí bude hladká křivka. Podle zvolené míry požadované shody modelu s průběhem signálu mimo píky lze volit aproximaci polynomem určitého řádu. Buď jedním, nebo několika třeba ve formě spline funkcí. Stále zde ale zůstává problém nalezení těch bodů, ze kterých se jejich parametry budou počítat.

Za předpokladu, že vlastní odezvy analytů jsou výrazně kratší než změny sklonu křivky reprezentující pozadí, lze vyloučit z množiny vzorků odpovídajících převážně nulové linii všechny úseky, kde druhá derivace (diference) křivky (záznamu) překračuje určitou hodnotu. Pokud jsou poté úseky reprezentující nulovou linii ještě o určitou rezervu z obou stran zkráceny, je již většinou množina vzorků záznamu pro určení nulové linie dostatečně přesně určena a je možné provést aproximaci těchto vzorků polynomem s využitím metody nejmenších čtverců. Při tomto řešení je pak možné pokračovat určením pozic píků a nalezením jejich parametrů. Pokud není shoda mezi modelem a záznamem již dostatečná, lze se buď vrátit ke kroku hledání základové linie s tím, že jsou již od začátku přímo vyloučeny oblasti odpovídající do té doby nalezeným píkům, nebo je možné přidat parametrický model nulové linie do celkového optimalizovaného problému a pokračovat společným hledáním všech parametrů.

Další možností, která v některých případech dává lepší výsledky, než uvedená metoda druhé derivace, je metoda která postupně vylučuje vzorky s největší odchylkou od modelu nulové linie. Tato metoda vede k dobrým výsledkům především tehdy, když je předem známé, že se v záznamu objevují jen „pozitivní“ píky, to je píky nad nulovou linií a odebírají se tedy jen vzorky, které se nacházejí dále, než je daná určitá vzdálenost nad již odhadnutým průběhem nulové linie. Pokud lze očekávat i záporné píky[2] je potřeba odebírat i více vzdálené vzorky pod předpokládanou křivkou nulové linie a obecně spolehlivost algoritmu je nižší. V obou případech se kroky algoritmu opakují buď s postupným zmenšováním vzdáleností pro odebírání vzorků nebo s využitím setřídění vzorků podle vzdálenosti a odebíráním určitého počtu. Pro zbývající vzorky se vždy znovu určí aproximace průběhu nulové linie. Při zvolené míře shody průběhu se zbývajícími vzorky se postup zastaví. Tento algoritmus lze s výhodou použít po prvním odebrání vzorků metodou sledování druhé derivace.

Po vyhledání modelu nulové linie pak typicky následuje její odečtení od záznamu a do dalšího zpracování se předávají jen data, u kterých se předpokládá, že odpovídají kombinaci odezev píků.

[2]Záporné píky se vyskytují celkem běžně například při použití rozpouštědla s větším útlumem světelného toku než přísluší některým analytům.

5.1.3 Vyhledání umístění odezev analytů

Pokud je výsledek separace analytů uspokojivý, tak lze vyhledat vrcholy píků reprezentované maximy signálu. Pokud není signál dostatečně filtrovaný, je potřeba vybrat na určitém okolí jen jedno maximum. Tento postup však nevede k spolehlivým výsledkům v případě, že lze očekávat potřebu určení analytu, který se v některých měřených chemických vzorcích (dávkách) vyskytuje ve velmi malých koncentracích a přitom retenční čas jeho odezvy je blízký nějakému analytu s výraznější odezvou. Problémový analyt se například vyskytuje na chvostu většího píku na první pohled jen jako mírná změna jeho sklonu. Pak jednoduché určení podle vrcholů píků selhává.

Spolehlivějších výsledků je možné dosáhnout sledováním třetí derivace (diference) záznamu odezev. Umístění a odhady retenčních časů píků se pak umístí do průsečíků sestupných průchodů třetí derivace (diference) zpracovávaného signálu s osou x (nulovou hodnotou). Přitom se se uvažují jen ty průsečíky, kde sklon třetí derivace překročí určitou hodnotu. Tato metoda je dobře popsaná a demonstrovaná v O'Haver (2001).

Při postupném přidávání modelů píků do modelu celkové odezvy je potřeba kontrolovat, jestli stále ještě model umožňuje určení jednoznačného výsledku. Pokud některé funkce nejsou vzájemně lineárně nezávislé, pak běh algoritmu v kroku z následujícího odstavce může kolem řešení oscilovat nebo jinak degradovat. Při přidávání modelů píků lze jejich vzájemnou nezávislost kontrolovat výpočtem wronskiánu funkcí popisujících průběhy píků. Pokud nevychází tento determinant derivací funkcí nulový, tak je ověřena hypotéza nezávislosti. Pokud vyjde nula, není sice zcela jisté, že není potřeba další model píku přidat, ale riziko závislosti je vysoké a s přidáním modelu je vhodné počkat až do doby, kdy se v dalším kroku při určování/zpřesňování parametrů modelů dospěje k ustálenému stavu řešení. Pak je možné na rozdíl modelu a naměřeného signálu opět aplikovat postup popsaný v tomto odstavci, přidat do celkového modelu další položku a poté po ověření nezávislosti s využitím wronskiánu pokračovat opět v hledání parametrů modelu. Využití wronskiánu je popsané v Koinis et al. (1991).

5.1.4 Určení parametrů modelů a kvantitativního složení analytů

Pokud je alespoň předběžně nalezena směs funkcí tvořící odhad modelu průběhu signálu, tak je již možné použít matematicky i algoritmicky velmi dobře propracované optimalizační metody. Nejčastěji se používají metody založené na metodách minimalizace nejmenších čtverců odchylek modelu od signálu. Jedná se především o metody Levenberg–Marquardt, trust-region-reflective, Gauss-Newton.

Vyhledání různých postupů řešení problémů nelineárních případů nejmenších čtverců je možné například v Björck (1996) a v O'Neill (1971). Pro účely vlastního

využití těchto metod v testovacím prototypu **pfit_ui** byla využita funkce „**lsqcurvefit**“ z prostředí **Matlab**, která potřebné metody nabízí. Problém nalezení parametrů x funkce F takových, aby se tato funkce co nejvíce přiblížila naměřené odezvě $ydata$ v bodech (pro záznam analýzy časech) $xdata$, je přesně tím algoritmem, který je pro řešení úlohy potřeba[3].

$$\min_x \|F(x, xdata) - ydata\|_2^2 = \min_x \sum_i (F(x, xdata_i) - ydata_i)^2 \tag{5.1}$$

Využití této funkce při známých (v předchozím kroku předběžně estimovaných) funcích jednotlivých píků je vysloveně přímočaré. Řešený problém je však relativně velký (třeba i desetitisíce bodů) a rychlost konvergence k ustálenému výsledku nemusí být dostatečná. Protože se jedná o problém silně nelineární, není ani zcela vyloučeno uváznutí v některém lokálním minimu nebo oscilace. Avšak při dobře provedeném předchozím kroku vyhledání počátečních aproximací odezev píků a při občasném ohlídání lineární nezávislosti jednotlivých hledaných funkcí, se tyto problémy běžně nevyskytují.

Výpočetní náročnost jednotlivých iteračních kroků je však vysoká, protože optimalizovaná funkce F je závislá na parametrech všech hledaných píků. Vzhledem k tomu, že použité optimalizační metody jsou postavené na gradientních principech nebo je alespoň znalost gradientů urychluje, představuje numerické hledání gradientů funkce F zásadní část zátěže. Zároveň při optimalizaci i stovky parametrů (běžně se jedná například o 30 píků po minimálně 3 parametrech) tak je volba přesnosti pro numerický odhad derivací funkce F podle jednotlivých parametrů velmi komplikovaná. Vzhledem k vlastnostem sčítání číselných hodnot reprezentovaných v plovoucí řádové a obecně setkávání se velký a velmi malých hodnot v průběhu výpočtu může vlivem zaokrouhlování často dojít i k paradoxním výsledkům nebo výstupu nulové hodnoty ve všech bodech pro odhad parciální derivace (diference) podle některého parametru. Proto byly modely průběhů píků rozšířené o analyticky určené výrazy pro první a druhé parciální derivace podle jednotlivých parametrů. Tyto doplněné modely píků pak umožňují analytický výpočet hodnoty Jakobiánu a Hessiánu složeného modelu odezev pro aktuální stav napočítaných parametrů v daném optimalizačním kroku algoritmu. Znalost Hessiánu pak umožňuje využít modifikované rychlejší metody optimalizace než je základní Levenberg–Marquardtův algoritmus. Takové metody jsou například neimplementované v knihovně **AGLIB Bochkanov (2010)**. Zároveň byl otestován vliv volby parametrů na rychlost a úspěšnost optimalizačních algoritmů v případech, kdy byly uvažované různé možnosti parametrizace píků.

V prvním přiblížení v předchozím kroku 5.1.3 se většinou nepodaří nalézt kandidáty pro pro volbu jiných, než gaussovských průběhů. Opravu volby je možné

[3]Při minimalizaci lze použít i jiné normy než kvadratické, například normy $p = 1$, což vede na lineární programování.

provést v případě, že se řešení ustálí a výsledný nalezený průběh stále ještě dobře neodpovídá průběhu záznamu. Lze si představit množství algoritmů pro rozhodování mezi přidáním dalšího píku a změnou modelu některého z píků, ale v rámci svojí práce jsem tento problém uspokojivě nevyřešil a zatím ponechávám tuto volbu typu předpokládaných odezev na zvážení uživatele.

5.2 Analytické modely průběhů píků a jejich derivací

Jak bylo vysvětleno v odstavci 5.1.4, je výhodné doplnit modely průběhů píků analytickými vztahy pro výpočty derivací. Je velmi pravděpodobné, že určení vztahů pro parciální derivace uvažovaných křivek již provedlo mnoho matematiků, ale autor této práce na vztahy pro různé parametrizace průběhů v době analýzy problému nenarazil, proto se tímto problémem zabýval podroběji výsledky výpočtů jsou součástí navržené metody. Ve všech případech se vlastně jedná jen o mechanické provedení derivování podle jednotlivých parametrů funkce. Pro tyto účely existuje množství programů (**Derive**, **Maple**, **Matlab Symbolic Toolbox**, atd). Poslední zmíněný byl přizvaný na pomoc. Ukázalo se však, že pro většinu výpočtů derivací především složitějších průběhů píků (viz 3.2) byly výsledné výrazy často velmi komplikované a symbolický systém nebyl schopen jejich zjednodušení. Některé tvary ne jen, že nebyly minimální, ale i pro určité kombinace parametrů nedávaly konečné řešení. Nakonec bylo určení derivací prováděno kombinací a porovnáváním ručního a počítačového přístupu s ohlídáním problematických kombinací parametrů. Výsledky pak byly testované proti plně strojově nalezeným výrazům a v souladu s teorií vycházela (někdy i mírně překvapivě) zjednodušení těchto rozdílů jako nuly. Pro vybrané paramterizace všech uvažovaných průběhů píků pak byly nalezeny i derivace druhé. Nalezené výsledky pak byly integrované do skriptu „**pfit_fncs.m**“ poskytujícího seznam modelů průběhů píků pro testovací nástroj **pfit_ui**. V současné podobě skript poskytuje v tabulce 5.1 uvedené modely píků. Přitom symboly použité pro jednotlivé parametry jsou shodné se zavedením modelů píků v 3.2. V následujících odstavcích jsou pro některé z uvedených průběhů a parametrizací i výsledky uvedené v čitelné formě. Výsledky jiných výpočtů jsou však natolik nepřehledné, že je má smysl zpracovávat dále jen na strojové úrovni a nejsou v textu práce uvedeny. Autor rád poskytne případným zájemcům kompletní sadu všech nalezených vztahů včetně implementovaných nástrojů.

Pro zajištění možnosti záměny různých modelů píků bez velkého vlivu na výsledný průběh a vzdálení se od již dosažené shody modelu a měřených dat pak byl zvolen přepočet na společné (uživatelsky žádané a dobře sledovatelné) parametry S, μ, w.

Označení	Text (angl.)	Parametry	Max. der.
gaus	Gaussian Peak	h, μ, w	2
gaus1	Another Gaussian Peak	h, μ, σ	2
gaus2	Yet Another Gaussian Peak	S, μ, σ	1
loggaus	Log Gaussian Peak	h, μ, w, ρ	1
loggaus1	Another Log Gaussian Peak	h, μ, σ, ω	2
pearson7	Pearson's Peak	h, μ, w,M	2
lorentz	Lorentz's Peak	h, μ, w	2
mixlorgaus	Mixed Lorentz's Gaussian Peak	h, μ, w,M	2

Tabulka 5.1: Modely průběhů píků poskytované ze skriptu **„pfit_fncs.m“** nástroji **pfit_ui**

5.2.1 Analytický popis gaussovského píku

Výsledky výpočtů derivací pro gaussovský pík v parametrizaci výška h, střed μ, pološíře w zvolené jako vhodné pro zpracování v popisu 3.2.

$$y = h e^{-4\ln(2)\frac{(x-\mu)^2}{w^2}} \tag{5.2}$$

$$\frac{\partial y}{\partial h} = e^{-4\ln(2)\frac{(x-\mu)^2}{w^2}} \tag{5.3}$$

$$\frac{\partial y}{\partial \mu} = 8h\frac{1}{w^2}(x-\mu)\, e^{-4\ln(2)\frac{(x-\mu)^2}{w^2}} \tag{5.4}$$

$$\frac{\partial y}{\partial w} = 8h\frac{1}{w^3}(x-\mu)^2 e^{-4\ln(2)\frac{(x-\mu)^2}{w^2}} \tag{5.5}$$

Tato parametrizace nevykazovala vliv zhoršení běhu optimalizační úlohy.

5.2.2 Alternativní popis gaussovského píku

Parametrizace výška h, střed μ, směrodatná odchylka σ.

$$y = h e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \tag{5.6}$$

$$\frac{\partial y}{\partial h} = e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \tag{5.7}$$

$$\frac{\partial y}{\partial \mu} = h\frac{1}{\sigma^2}(x-\mu)\, e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \tag{5.8}$$

$$\frac{\partial y}{\partial \sigma} = h\frac{1}{\sigma^3}(x-\mu)^2 e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \tag{5.9}$$

Chováním ekvivalentní předchozí parametrizaci.

5.2.3 Třetí parametrizace gaussovského píku

Parametrizace plocha S, střed μ, směrodatná odchylka σ.

$$y = \frac{h\sqrt{2}}{2\sqrt{\pi}}\frac{1}{S}e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2S^2}} \tag{5.10}$$

$$\frac{\partial y}{\partial h} = \frac{\sqrt{2}}{2\sqrt{\pi}}\frac{1}{S}e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2S^2}} \tag{5.11}$$

$$\frac{\partial y}{\partial \mu} = \frac{h\sqrt{2}}{2\sqrt{\pi}}\frac{1}{S^3}(x-\mu)\,e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2S^2}} \tag{5.12}$$

$$\frac{\partial y}{\partial S} = \frac{h\sqrt{2}}{2\sqrt{\pi}}\frac{1}{S^2}\left(\frac{(x-\mu)^2}{S^2}-1\right)e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2S^2}} \tag{5.13}$$

Parametrizace je sice lákavá přímým určením žádané plochy odezvy, ale velké vzájemné ovlivnění derivací podle parametru S a h vede k horší rychlosti konvergence mnou testovaných optimalizačních algoritmů.

5.2.4 Analytický popis logaritmicky gaussovského píku

Logaritmicky gaussovský pík je v tomto případě parametrizovaný podle definice v 3.2.4, tedy výška h, střed μ, pološíře w a poměr pološířek ρ.

$$y = he^{-\frac{\ln(2)}{\ln^2(\rho)}\ln^2\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho w}+1\right)} \tag{5.14}$$

Jak je i v definici modelu ukázané, případ $\rho \to 1$ vede k přechodu na čistě gaussovský pík

$$y = he^{-4\ln(2)\frac{(x-\mu)^2}{w^2}} \tag{5.15}$$

Vztah pro výpočet parciální derivace podle výšky pak je

$$\frac{\partial y}{\partial h} = e^{-\frac{\ln(2)}{\ln^2(\rho)}\ln^2\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho w}+1\right)} \tag{5.16}$$

Derivace podle umístění středu

$$\begin{aligned}\frac{\partial y}{\partial \mu} &= \frac{h\ln(4)\left(\rho^2-1\right)}{w\rho\ln^2(\rho)}\ln\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho w}+1\right)\cdots \\ &\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho w}+1\right)^{-1} e^{-\frac{\ln(2)}{\ln(\rho)^2}\ln^2\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho w}+1\right)}\end{aligned} \tag{5.17}$$

Derivace podle pološíře

$$\frac{\partial y}{\partial w} = \frac{h\ln(4)\left(\rho^2-1\right)}{w^2\rho\ln^2(\rho)}(x-\mu)\ln\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho\, w}+1\right)\cdots \left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho\, w}+1\right)^{-1} e^{-\frac{\ln(2)}{\ln^2(\rho)}\ln^2\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho\, w}+1\right)} \tag{5.18}$$

Nakonec přichází ke slovu derivace podle poměru pološířek

$$\frac{\partial y}{\partial w} = \frac{2\ln(2)h}{\rho\ln^3(\rho)}e^{-\frac{\ln(2)}{\ln^2(\rho)}\ln^2\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho\, w}+1\right)}\cdots \left(\rho\ln^2\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho\, w}+1\right)-\rho\ln(\rho)\ln\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho\, w}+1\right)\cdots \left(2\frac{x-\mu}{w}-\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho^2 w}\right)\left(\frac{(x-\mu)\left(\rho^2-1\right)}{\rho\, w}+1\right)^{-1}\right) \tag{5.19}$$

Z délky výrazu je na první pohled vidět, že něco „není v pořádku“. Zároveň výraz vede pro hodnotu $\rho \to 1$výpočtu logaritmu z nulové hodnoty. Vyšetřením výpočtu limitní hodnoty v tomto bodě však bylo možné výraz zjednodušit na

$$\frac{\partial y}{\partial w} = 8\,h\ln(2)\frac{(x-\mu)^3}{w^3}e^{-4\frac{\ln(2)(x-\mu)^2}{w^2}} \tag{5.20}$$

Tento tvar je tedy v dále popsaných nástrojích používaný pro hodnoty parametru ρ pohybující se v okolí bodu 1. Přesto tato parametrizace při testech vykazovala potíže v konvergenci k ustáleným hodnotám. Z těchto důvodů byla autorem navržena parametrizace alternativní.

5.2.5 Alternativní popis logaritmicky gaussovského píku

Navržená parametrizace využívá výšku h, střed μ, směrodatnou odchylku σ a parametr ω, který určitým způsobem reprezentuje vzdálenost počátku počítání logaritmického času od středu píku

$$y = he^{-\frac{\ln^2((x-\mu)\omega+1)}{2\sigma^2\omega^2}} \tag{5.21}$$

Pro umístění počátku do středu píku $\omega \to 0$ pak pík přechází na gaussovský průběh

$$y = he^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \tag{5.22}$$

Pro parciální derivaci podle výšky pak platí

$$\frac{\partial y}{\partial h} = e^{-\frac{\ln^2((x-\mu)\omega+1)}{2\sigma^2\omega^2}} \tag{5.23}$$

derivace podle umístění středu

$$\frac{\partial y}{\partial \mu} = \frac{h}{\sigma^2\omega}\ln\left((x-\mu)\,\omega+1\right)e^{-\frac{\ln^2((x-\mu)\omega+1)}{2\sigma^2\omega^2}}\left((x-\mu)\,\omega+1\right)^{-1} \tag{5.24}$$

derivace podle směrodatné odchylky (šířky píku)

$$\frac{dy}{d\sigma} = \frac{h}{\sigma^3\omega^2}\ln^2\left((x-\mu)\,\omega+1\right)e^{-\frac{\ln^2((x-\mu)\omega+1))}{2\sigma^2\omega^2}} \tag{5.25}$$

Derivace podle parametru ω

$$\begin{aligned}\frac{\partial y}{\partial \omega} &= -\frac{h}{\sigma^2\omega^2}\ln\left((x-\mu)\,\omega+1\right)e^{-\frac{\ln^2((`x-\mu)\omega+1)}{2\sigma^2\omega^2}}\cdots \\ &\left(\frac{\ln\left((x-\mu)\,\omega+1\right)}{\omega}-\frac{x-\mu}{(x-\mu)\,\omega+1}\right)\end{aligned} \tag{5.26}$$

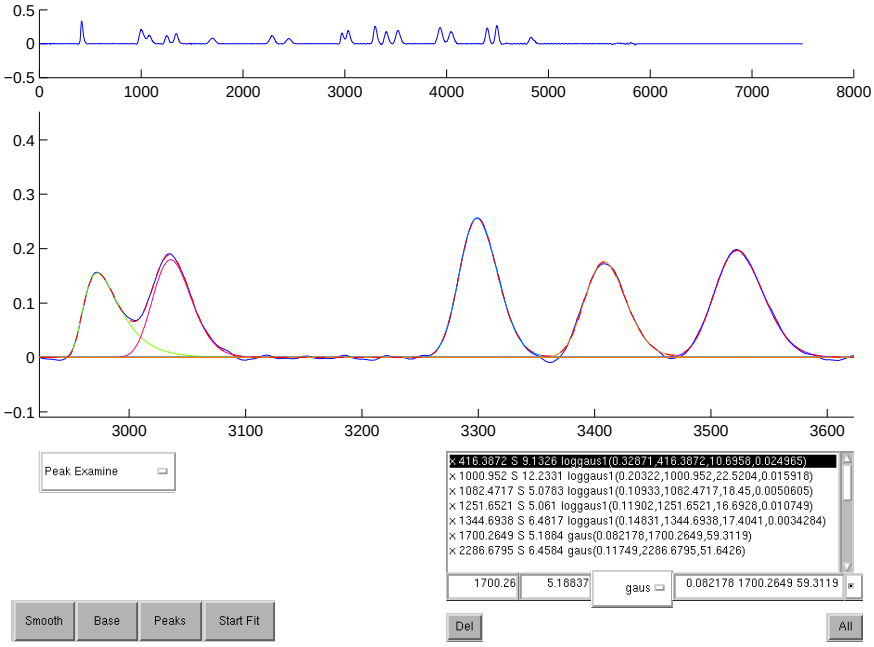
Tato derivace však opět v oblasti blízké gaussovskému proběhu ($\omega \to 0$) vykazuje problémy, ale je možné jí nahradit limitní hodnotou

$$\frac{\partial y}{\partial \omega} = \frac{h}{2\sigma^2}(x-\mu)^3 e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \tag{5.27}$$

5.3 Testovací nástroj pro vyhledání a určení parametrů píků

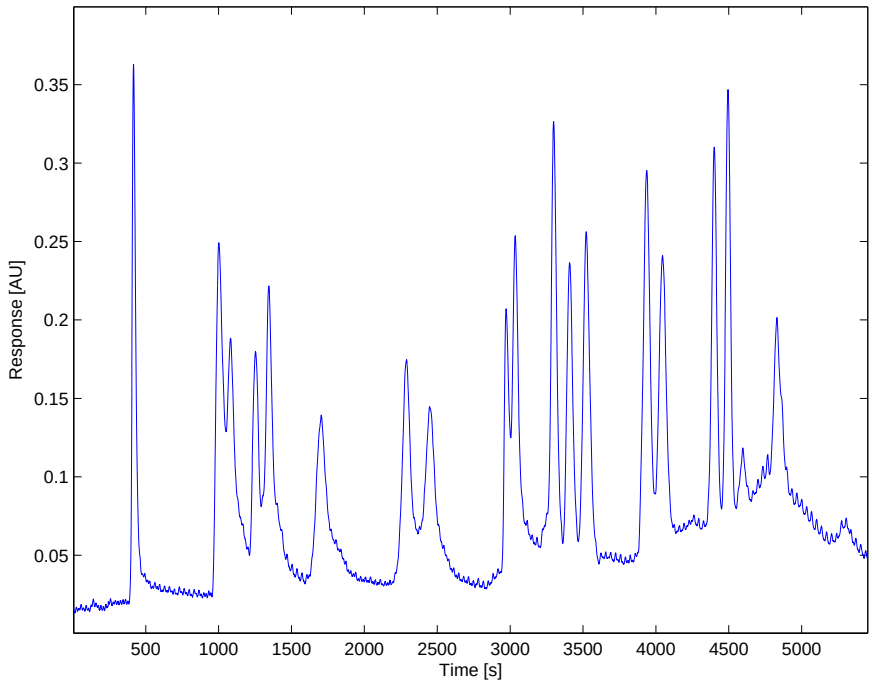
S využitím některých technik popsaných v předchozích odstavcích byla navržená sada skriptů v prostředí **Matlab**, která umožňuje testování některých postupů. Především se jedná o vlastní provádění optimalizační úlohy vyhledání hodnot parametrů píků. Nástroj **pfit_ui** (peak fitting user interface tool) dále obsahuje základní algoritmy pro vyhledání nulové linie s využitím předfiltrování signálu a pro automatické počáteční nalezení pravděpodobných umístění a výšek píků. Prostředí (viz obrázek 5.1) pak umožňuje odebírat i přidávat další modely píků, editovat jejich parametry a typ funkce. Následně je možné celý problém s využitím znalosti analytického výpočtu derivací/gradientu hledané funkce předat do standardní optimalizační funkce „**lsqcurvefit**“ nabízené prostředím **Matlab.** V prostředí **pfit_ui** je pak možné sledovat a porovnávat výsledky, ukládat a načítat data včetně určených parametrů a typů píků. Nástroj umožňuje i připravit průběh ze zadaných parametrů píků a poté sledovat, do jaké míry dokáží algoritmy z průběhu parametry určit.

Na sérii obrázků 5.2, 5.3 a 5.4 je demonstrované použití nástroje na reálné analýze aminokyselin provedené na přístroji **AAA 400** řízeném chromatografickým systémem **CHROMuLAN**. Pro demonstraci metody byl vybraný tento záznam z následujících důvodů



Obrázek 5.1: Nástroj **pfit_ui** pro vyhledávání parametrů píků

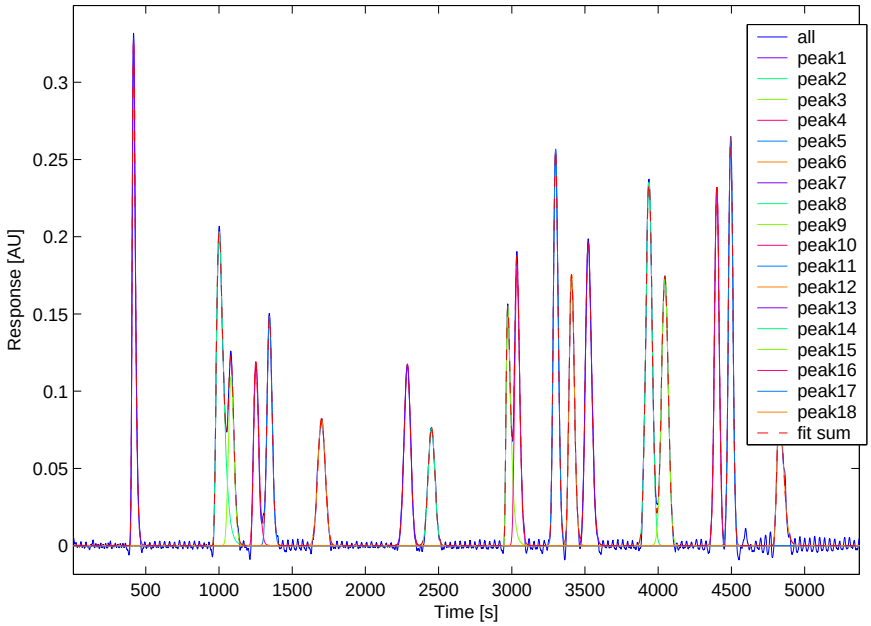
- chromatografická analýza aminokyselin ninhydrinovou metodou umožňuje rozlišit velké množství aminokyselin, je tedy potřeba zpracovávat velké množství píků.
- záznam obsahuje relativně velké množství dat. Například tento testovací záznam obsahuje přes 5000 vzorků (přibližně 2 hodiny záznamu)
- během analýzy se využívá změn složení mobilní fáze, což má za následek deformované tvary píků. Je tedy důležité modelovat některé části záznamu s využitím negaussovských průběhů píků.
- protože je analytů (aminokyselin) velké množství, je velmi problematické proces eluce nastavit tak, aby k žádným překryvům nedocházelo, proto má smysl uvažovat o využití relativně složité matematické metody pro zpřesnění výsledků analýzy.
- jedná se o aplikaci přístroje vyvinutého firmou **PiKRON** a řízeného systémem **CHROMuLAN**. Integrace navržené metody zpracování může tedy zkvalitnit a zpřesnit stanovení ve více jak 50 laboratořích v oblasti zdravotnictví a zemědělství v České republice i v zahraničí, které tyto sestavy vyráběné a dodávané firmou **INGOS** používají.



Obrázek 5.2: Nezpracovaná data záznamu analýzy aminokyselin

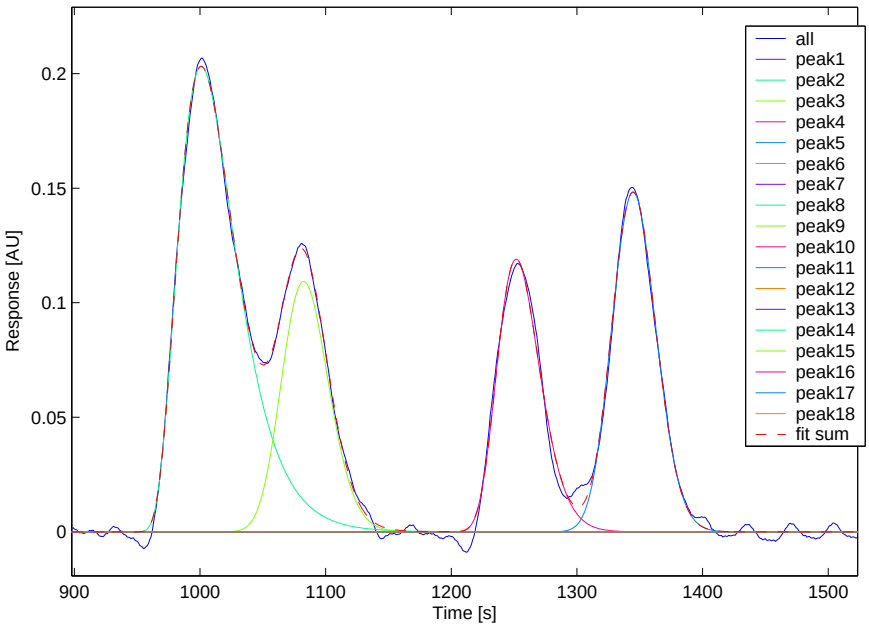
Na obrázcích je vidět, jak jsou surová data nejdříve předzpracovaná jedním z algoritmů pro nalezení a odečtení průběhu chemického pozadí (kapitola 5.1.2), poté jsou vyhledané odhady pozic a počáteční parametry jednotlivých píků (kapitola 5.1.3) a nakonec je provedena optimalizace. Vysoká míra shody nalezeného modelu (aproximace) s původním signálem je dobře patrná z detailního zobrazení výsledku na obrázku 5.4. Čárkovaně je zobrazen průběh modelu, který pro skupinu prvních dvou překrývajících se píků zcela splývá s původními daty. V oblasti druhé skupiny je již v oblasti mezi píky patrný rozdíl. Je ovšem natolik malý, že není možné rozhodnout, jestli se jedná o další neidentifikovanou odezvu nebo pouze vliv kolísání tlaku na koloně. Dále je patrné, že průběh samotného prvního píku v detailu (pík 2 s retenčním časem 1000.95 s) je natolik nesymetrický, že bylo potřeba použít modelu logaritmicky-gaussovského píku. V tabulce 5.2 jsou vypsané použité modely průběhů píků („gaus“ a „loggaus1“ z tabulky 5.1) a určené číselné hodnoty parametrů všech nalezených píků.

Vlastní určení chemických složek nebylo při tomto testování algoritmů s chemikem řešeno, protože pro posouzení algoritmů má především význam kvalita shody nalezeného modelu s původním záznamem. Zájemci z oblasti chemie, kteří by chtěli o použité chemické metodice tohoto stanovení vědět více, mohou nalézt a chemický popis s postupem vyhodnocení v systému **CHROMuLAN** v manuálech firmy **IN-**



Obrázek 5.3: Data a aproximace po vyhledání a odečtení nulové linie a vyhledání píků

GOS k přístroji **AAA 400**. V případě ještě hlubšího zájmu se lze obrátit přímo na autora postupu chemického stanovení ZMBD chemika Václava Havlíčka.



Obrázek 5.4: Detail nástrojem **pfit_ui** vyhledaných píků

Pík	Ret. čas	Plocha	Funkce	Parametry nalezených funkcí			
	$T_{R,i}$ [s]	S [AU·s]		Výška h	Střed μ	w nebo σ	ω
1	416.38	9.1326	loggaus1	0.3287	416.38	10.69	0.024965
2	1000.95	12.2332	loggaus1	0.2032	1000.95	22.52	0.015917
3	1082.47	5.0782	loggaus1	0.1093	1082.47	18.44	0.005065
4	1251.65	5.0610	loggaus1	0.1190	1251.65	16.69	0.010749
5	1344.69	6.4817	loggaus1	0.1483	1344.69	17.40	0.003428
6	1700.26	5.1884	gaus	0.0821	1700.26	59.31	
7	2286.67	6.4584	gaus	0.1174	2286.67	51.64	
8	2451.68	4.4071	gaus	0.0765	2451.68	54.07	
9	2972.77	6.3826	loggaus1	0.1550	2972.77	14.95	0.028898
10	3035.54	7.4708	loggaus1	0.1796	3035.54	16.42	0.008565
11	3299.28	10.4993	loggaus1	0.2568	3299.28	16.22	0.006301
12	3408.10	7.8122	loggaus1	0.1755	3408.10	17.63	0.006462
13	3522.55	10.3453	loggaus1	0.1966	3522.55	20.85	0.005302
14	3937.29	12.7619	gaus	0.2352	3937.29	50.96	
15	4045.69	10.0336	gaus	0.1741	4045.69	54.11	
16	4400.71	9.2933	gaus	0.2319	4400.71	37.64	
17	4495.29	9.9359	gaus	0.2650	4495.29	35.21	
18	4830.41	5.0927	loggaus1	0.0923	4830.41	21.25	0.012373

Tabulka 5.2: Parametry nalezených píků

Kapitola 6

Návrh spektrofotometrického detektoru pro HPLC

V této kapitole je předložen rozbor požadovaných vlastností a návrh obvodového řešení vysoce citlivého spektrofotometrického detektoru pro kapalinovou chromatografii. Popisované řešení přibližuje mechanické, optické a elektronické prvky přístroje LCD 5000 vyvinutého ve firmě PiKRON s.r.o.. Autor se na vývoji podílel v pozici hlavního návrháře software a koncepce elektronického hardware. Výroba přístroje byla licencovaná společnosti INGOS s.r.o, která také zajišťuje jeho prodej. Přístroj je v současné době již více let vyráběn a provozovaný na analytických a vědeckých pracovištích v několika zemích světa.

Spektrofotometrický detektor LCD 5000 navazuje na dlouhou tradici firmy PiKRON a jejích vývojářů s vývojem přístrojů pro kapalinovou chromatografii. Přesto, že byl návrh mechanické, optické i elektronické části proveden nově od začátku, tak byly při vývoji využity zkušenosti s předchozím úspěšně dokončeným spektrofotometrem LCD 4000, který tým začal vyvíjet ještě v době, kdy byl k vývoji povolán do podniku Laboratorní přístroje Praha a jehož vývoj byl po odkoupení projektu dokončen již v režii firmy PiKRON. Z předchozího návrhu software byly převzaty již dříve autorem této práce naprogramované rutiny pro vlastní výpočty logaritmu a osvědčená vrstva pro komunikaci mezi přístroji μLAN. Zvolený však byl modernější řídicí mikrokontrolér a i uživatelské rozhraní bylo včetně knihoven pro definici vstupních polí bylo naprogramováno nově. Stejně tak k dále popsané koncepci AD převodníku bylo potřeba navrhnou nové řešení filtrování a zpracování signálu.

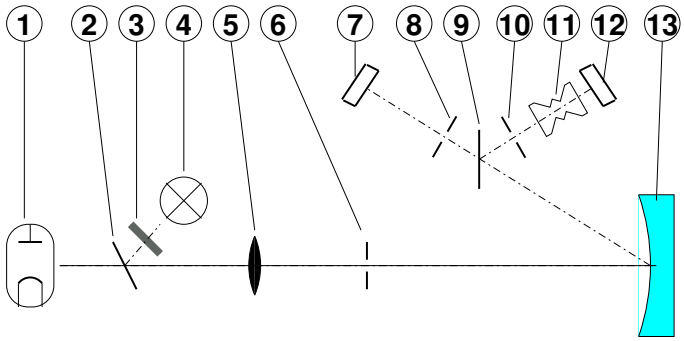
6.1 Optická koncepce spektrofotometru LCD 5000

Vlastní optická koncepce přístroje vychází ze standardního uspořádaní spektrofotometrického detektoru, které bylo popsané v odstavci 2.2. Přístroj je pro pokrytí

celého požadovaného rozsahu vlnových délek (190 až 700 nm) vybaven dvěma světelnými zdroji. Na schematickém obrázku optického uspořádání 6.1 je znázorněný běh světelných paprsků přístrojem. Při použití v oblasti 190 až 370 nm se využívá deuteriové výbojky (1), pro delší vlnové délky je k dispozici klasická halogenová žárovka (4). Pro potlačení rušivého vlivu zbytkového světla o kratších vlnových délkách při práci v oblasti vyšších vlnových délek může být světlo žárovky ošetřeno filtrem (3). Vzhledem k velmi strmému poklesu vyzařování žárovky v oblasti vlnových délek pod 400 nm je však vliv druhého řádu odrazu na holografické mřížce zanedbatelný a proto není filtr při výrobě osazovaný. Slučovací polopropustné zrcátko (2) zajišťuje směřování paprsků z obou zdrojů světla na vstupní čočku (5), která soustřeďuje světelný tok na vstupní štěrbinu monochromátoru (6). Holografická mřížka (13) pak rozkládá spojité spektrum světelného zdroje do jednotlivých směrů. V přístroji je použita korigovaná konkávní holografická mřížka od firmy Karl ZEISS. Mřížka byla vybraná tak, aby zaručovala malou pološíři spektra v okolí vybrané vlnové délky na výstupu monochromátoru. Speciálně nasvícená a poté leptaná mřížka (korigovaná mřížka) zajišťuje, že rozbíhající se svazek paprsků ze vstupní štěrbiny je pro libovolné natočení (v uvažovaném rozsahu) mřížky vždy zaostřen na vstupní clonu optické cely (kyvety), která je na obrázku označena (11). Podrobný nákres kyvety je pak vidět na obrázku 6.2. Intenzita světla na výstupu kyvety je měřena diodovým fotodetektorem umístěným v příložné desce kyvety (12). Protože zajištění stability intenzity světelných zdrojů nutné k měřením v oblasti 10^{-5} Au je nereálné, používá se poměrového měření. Část světelného toku před průchodem kyvetou je oddělena polopropustným zrcátkem (9), které na kyvetu směřuje jen část světelného toku. Neodkloněný světelný svazek prochází výstupní clonou reference (8), která je také ve vzdálenosti odpovídající projekci vstupní štěrbiny přes holografickou mřížku[1]. Intenzita referenčního svazku je poté měřena optickým detektorem (7) stejného typu jako je použit ve větvi měrné.

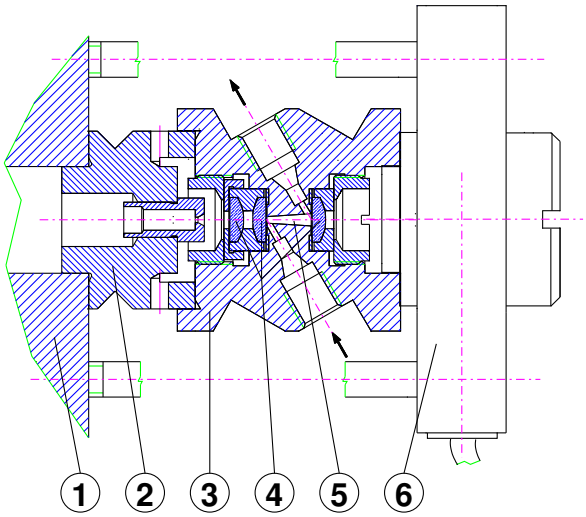
Aby bylo možné pracovat i s vlnovými délkami v oblasti ultrafialového záření, musí být veškeré čočky a průchozí zrcátka vyrobena z kvalitního křemenného skla, které zaručuje malé světelné ztráty i na krátkých vlnových délkách okolo 200nm. Optickou celou (kyvetou – obrázek 6.2) protéká směs mobilní fáze a postupně eluovaných měřených analytů. Protože index lomu procházejících látek se může měnit v relativně širokém rozsahu a případná kolize (odraz) části měrného světelného svazku se stěnou kyvety vede k degradaci přesnosti měření, byla snaha navrhnout optiku kyvety tak, aby se ve vnitřním měřícím prostoru kyvety (5) paprsky svazku pocházejícího z monochromátoru (1) přes clonu v podložce (2) mírně sbíhaly. Toho je docíleno kombinací vstupních čoček kyvety (4). Zároveň je pro zamezení možnosti kolize se stěnami vnitřní prostor kyvety navržen kuželového tvaru tak, aby od

[1] Požitá holografická mřížka je schopná projekce proto, že vlastní proužky odrazových plošek jsou vytvořeny na konkávním kulovém základu.



Obrázek 6.1: Optické schéma spektrofotometrického detektoru LCD 5000

svazku se vzdáleností od vstupní čočky ustupoval. Výstupní čočka pak prošlé světlo směruje na aktivní část optické diody (fotodetektoru).



Obrázek 6.2: Optická cela detektoru LCD 5000

Fotodiody představují jeden z kritických prvků celého měřícího řetězce. Musí splňovat požadavky na potřebnou velikost vstupní aktivní optické plochy, vysokou citlivost, malé hladiny šumů a velmi malý temný proud. Proto byly vybrány výrobky světové jedničky v oboru – firmy Hamamatsu Photonics – založené na technologii PIN. Pro zajištění linearity měření jsou diody zapojeny jako proudové zdroje, kdy následně připojený operační zesilovat udržuje hodnotu rozdílového napětí mezi výstupy diody na nule.

6.2 Stručný popis konstrukce LCD 5000

Následující odstavce přináší přehledový popis navrženého přístroje, který je převzatý z informací použitých pro přípravu uživatelského manuálu k přístroji LCD 5000 INGOS (2006). Podrobná analýza požadavků a vlastní postup konstrukce AD převodníku je podrobně popsaný v 6.3. AD převodník byl pro popis vybraný proto, že se jedná o autorem práce a jeho kolegy navržené inovativní řešení a jeho parametry jsou jedním z kritických faktorů, který definuje citlivost a stabilitu celého měřícího řetězce.

6.2.1 Mechanická konstrukce

Mechanicky je detektor konstruován tak, aby poskytoval co největší možnosti při malém rozměru. Při konstrukci byl brán ohled též na co nejlepší servisovatelnost. Mechanika detektoru se skládá z těchto částí: skříň, čelní panel, monochromátor, mechanizmus nastavení vlnové délky.

Skříň je duralová a je konstruovaná tak, aby byla co nejlehčí při zachování maximální tuhosti.

Přední panel je tvořen standardním plastovým výliskem stejně, jako je tomu u dalších přístrojů PiKRON této generace (čerpadlo, dávkovač, atd.).

Monochromátor svou robustní konstrukcí zajišťuje vysokou stabilitu měřícího systému.

Mechanismus nastavování vlnové délky je poháněn krokovým motorem, který otáčí mikrometrickým šroubem. Matka mikrometrického šroubu posouvá páčku spojenou s mřížkou. Tento mechanizmus vytváří funkci arcsin. Tato funkce je potřeba, aby převod mezi kroky motoru a vlnovou délkou byl lineární. Spojení krokového motoru a mikrometrického šroubu zajišťuje přesné nastavení vlnové délky s přesností lepší než ± 1 nm a reprodukovatelnost nastavení ± 0.1 nm.

6.2.2 Elektronika detektoru

Elektronika detektoru je navržena s využitím moderních postupů. Návrh je optimalizován tak, aby byla zajištěna vysoká stabilita a spolehlivost celého přístroje. Elektroniku je možno rozdělit na tyto části: impulzní síťový zdroj, zdroje napájení pro výbojku a žárovku, řídicí jednotka, klávesnice a displej.

Vstupní napětí impulzního síťového zdroje může být v rozsahu 110 až 230 V, 50 až 60 Hz. Výstupní napětí je 24 V. Všechny ostatní elektronické bloky jsou navrženy pro napájení 24 V.

Zdroj napětí pro žárovku je impulzní měnič se vstupním napětím 24 V a výstupním 5.3 V 2 A. Zdroj pro výbojku se skládá z dvou částí, vlastního zdroje a pomocného zdroje pro žhavení. Vlastní zdroj je proudový 100 nebo 150 mA, maximální

napětí je 100 V. Zdroj pro žhavení je napěťový 6 nebo 10 V 2 A. Při zapalování se používá vyšší napětí, při provozu je výbojka přižhavovaná nižším napětím. Zdroje jsou řízeny řídící jednotkou.

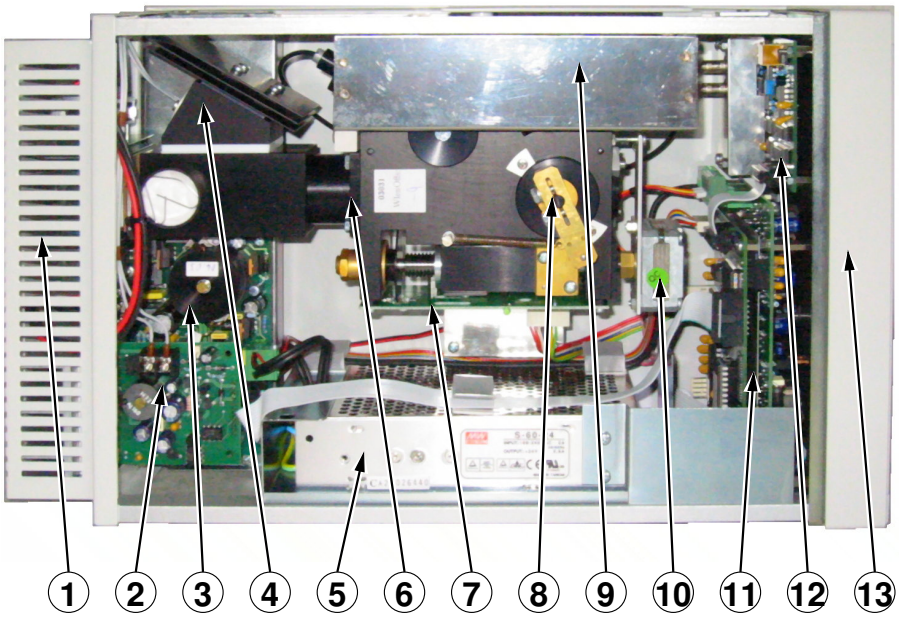
Řídící jednotka zajišťuje řízení celého přístroje, jejím základem je procesor Siemens 80C517. K procesoru je připojeno 32 kB paměti EPROM a 32 kB paměti RAM. A/D převodník je až 24 bitový, vlastní konstrukce. Převodník pracuje rychlostí 25 vzorků za sekundu.

Klávesnice zahrnuje 36 tlačítek, některé jsou doplněny indikační led diodou. Displej je znakový LCD displej s řadičem a podsvětlením, který zobrazuje dva řádky po 16 znacích.

6.2.3 Zástavba přístroje

Rozměry a zástavba složeného přístroje je dobře viditelná po odmontování horního krytu. Celý přístroj má rozměry 240 × 130 × 400 mm. Šířka 240 mm je daná dostupným plastovým čelem a i ostatní rozměry jsou omezené volbou zástavbových parametrů celé vyvíjené rodiny chromatografických přístrojů firmy PiKRON. Z obrázku 6.3 je patrné, že míra vyplnění prostoru, umístění, návrhu a vestavby jednotlivých komponent znamenala množství představivosti a plánování. I veškeré elektronické komponenty byly navrhovány tak, aby kritické délky vedení signálů byly co nejmenší.

Deuteriová výbojka (1) je umístěna v zadním sníženém (za prostor modulární sestavy přístrojů vytaženém) krytu tak, aby bylo teplo z chladiče výbojky dobře odváděné prouděním okolního vzduchu. I druhý světelný zdroj – halogenová žárovka v tělese (4) – je umístěn tak, že je chlazen především do prostoru za přístrojem. Zdroje světla jsou k bloku vstupního slučovače připevněny přes teflonové destičky tak, aby se co nejvíce zamezilo přestupu tepla a dilataci optiky. Patrný je i buničinovou ucpávkou chráněný průduch pro odvod ozónu, který vzniká ve vzduchu prosvíceném krátkými vlnovými délkami záření deuteriové výbojky. Vlastní napájecí zdroje pro halogenovou žárovku a výbojku (2 a 3) jsou také umístěné v zadní části. Přesto, že se jedná o zdroje pulzní s relativně dobrou účinností, tak jsou jejich výkonové prvky namontované na chladič vystupující opět do oblasti zadního krytu. Deska zdroje pro deuteriovou výbojku (3) nese i druhý stupeň lineární proudové stabilizace, který též potřebuje odvod tepla. Vlastní síťový pulzní zdroj (5) je namontovaný na boční výztuhu a dno tak, aby opět bylo teplo pokud možno odváděné do krytu přístroje. Světlo ze zdrojů světla vstupuje do monochromátoru přes vstupní štěrbinu, která se nachází na přechodu vstupního tubusu do těla monochromátoru přibližně v oblasti značky (6). Monochromátor nese ložiska mikrometrického šroubu. Deska snímačů polohy (7) pro určení referenčních poloh nastavení vlnové délky snímá značku otáčky šroubu v kombinaci s optickými závorami, které snímají kódované otvory na vrtané destičce připevněné k vozíku s matkou šroubu.



Obrázek 6.3: Zástavba celého přístroje LCD 5000

Vozík pak přes raménko nastavuje požadovaný úhel natočení holografické mřížky uvnitř monochromátoru. Na spojení raménka s osou otáčení mřížky ukazuje šipka (8). Krokový motor (10) pro volbu vlnové délky je nesený osou mikrometrického šroubu a pomocné raménko vymezuje pouze axiální rotační stupeň jeho volnosti vůči monochromátoru, čímž jsou vyřešené problémy se souosostí pohonu a ložisek mikromentrického šroubu. Vlastní optická cela (kyveta) a diodové fotodetektory se nacházejí v prostoru přístupném dvířky z boku přístroje. Tento prostor je od vnitřního prostoru přístroje oddělený krytem (9). Na jeho levé straně je patrný triboelektrický kabel, který vychází s fotodetektoru na referenčním výstupním svazku monochromátoru. K prostoru kyvety je co nejblíže umístěna deska s elektronikou analogové části zpracování signálů (12). Tato deska nese plechovým krytem odstíněnou vstupní sekci zesílení signálů, ve které jsou přímo na teflonové destičce umístěny zásuvky koaxiálních konektorů. Zapojené příchozí zástrčky na koncích kabelů jsou na obrázku patrné. Dále je na ní realizované obvodové zapojení zajišťující veškeré funkce AD převodníku pracující s analogovými signály. Do digitální části přistroje již vede pouze propojovací plochý kablík, kterým je již veškerá informace o vstupním poměrovém signálu měrné a referenční větve přenášená ve formě digitálního časového výstupu modulátoru. Digitální část zpracování signálu je soustředěná na levé z dvojice na sebe namontovaných desek hlavní elektroniky (11). Na této desce se nachází hlavní řídicí mikrokontrolér, obvod FPGA, paměti a další ob-

vody. Druhá deska je odstíněná plechovou oddělovací destičkou a nese galvanicky oddělený zdroj z napětí 24 V na 5 V pro digitální část přístroje, samostatný podřízený mikrokontrolér pro nastavování vlnových délek a další stabilizovaný zdroj pro přípravu napájení analogové části přístroje.

6.3 Analogově digitální převodník

Převodník analogového signálu na signál digitální je jedním z klíčových prvků, které určují výslednou přesnost a rozlišovací schopnost HPLC detektoru. Navržená koncepce detektoru předpokládá převod analogového signálu na digitální před jeho logaritmováním a to také zvyšuje požadavky na kvalitu převodníku. V následujících odstavcích jsou nejdříve tyto požadavky specifikovány. Dále jsou uvedeny různé uvažované možnosti řešení problému. Protože žádné z běžných řešení AD převodníků nebylo vyhodnoceno jako vyhovující požadavkům, byl autory navržen netradiční princip analogově-digitálního převodníku, který je popsán v odstavci 6.3.4. Dosažené výsledky jsou prezentovány v dalším odstavci.

6.3.1 Požadavky na AD převodník

Absorbanční měření má specifické požadavky na AD převodník. U většiny měřících aplikací AD převodníku je požadováno vysoké rozlišení především pro malé hodnoty vstupního signálu. Při hodnotách vstupního signálu blížícího se vstupnímu rozsahu převodníku je možné mírně slevit z požadavků na absolutní přesnost převodníku, protože relativní přesnost měřené hodnoty s rostoucí hodnotou digitálního výstupu automaticky roste. Proto je u běžných převodníků kladen při návrhu důraz na poměr signálu ku šumu a tím i na co nejmenší šum pro signály blízké nule. Zároveň je možné při požadavku na měření signálů menších než je základní rozsah AD převodníku uvažovat o přepínání zesílení vstupního zesilovače, případně vstupu modulátoru u sigma-delta AD převodníků. Pro přímý převod intenzity světla u absorbančních měření je situace výrazně komplikovanější.

Z chromatografickými analytiky požadovaných vlastností detektoru jsou pro návrh AD převodníku nejpodstatnější výstupní rozlišení, šum drift a rozsah v absorbančních jednotkách (AU) a dále schopnost přesně vyhodnotit plochu rychlých úzkých píků. Každý z těchto požadavků je nutné přesněji analyzovat.

Vysoké rozlišení je potřeba především pro detekci velmi nízkých koncentrací látek. V mnoha případech není možné koncentraci zvýšit zvětšením dávkovaného množství, protože analyzované látky je nedostatek, nebo by při zvýšení dávky došlo k zhoršení dělení na koloně. V mnoha případech se jedná o zpracování vzácného materiálu, jehož cena je vysoká (látka je syntetizována s nízkou výtěžností často z velmi drahých komponent), nebo je materiál ve větším množství těžko dostupný

(například biologický materiál). Požadované rozlišení je minimálně $1 \cdot 10^{-5}$ AU především pro malé hodnoty výstupního logaritmovaného signálu. S tímto údajem úzce souvisí požadavek na nízkou hodnotu šumu pod úrovní $1 \cdot 10^{-5}$ AU. Dále je požadován nízký drift celého měřícího systému pod úrovní $5 \cdot 10^{-4}$ AU/h. Opět je třeba upozornit, že se jedná o požadavek na celý systém včetně optické části, kyvety monochromátoru, zdroje světla i vlivu teploty, vnitřní atmosféry a UV zářením generovaného ozónu. Zároveň je potřeba upozornit, že se jedná o požadavky na signál za logaritmátorem a po odečtení referenční (nulové) hodnoty. Uvažované malé hodnoty tedy znamenají velikou přesnost a stabilitu především při velkých hodnotách původního signálu před logaritmem.

Měřící rozsah je požadován především v případech, kdy detektor slouží pro monitorování separací a syntézy, kdy již nemusí být kladeny tak vysoké požadavky na rozlišení. Přesto jsou možné případy, kdy je nutné kontrolovat nepatrná množství nečistot vedle velmi velké koncentrace jiných látek. Z tohoto pohledu vyplývá požadavek na vysokou dynamiku měření. Pro návrh převodu signálu byl uvažovaný požadovaný měřící rozsah minimálně -1 AU až $+2$ AU.

Rychlost převodu je parametr, který je uživateli definován velmi mlhavě. Pro běžnou analytickou HPLC chromatografii lze uvažovat píky s pološíří od desetiny minuty do několika minut. Mikrokolonová HPLC může pracovat s píky s pološíří od 1 sekundy. Pokud by byl detektor používán pro vyhodnocení kapilární zónové elektroforézy, jsou uvažované šířky píků ještě menší.

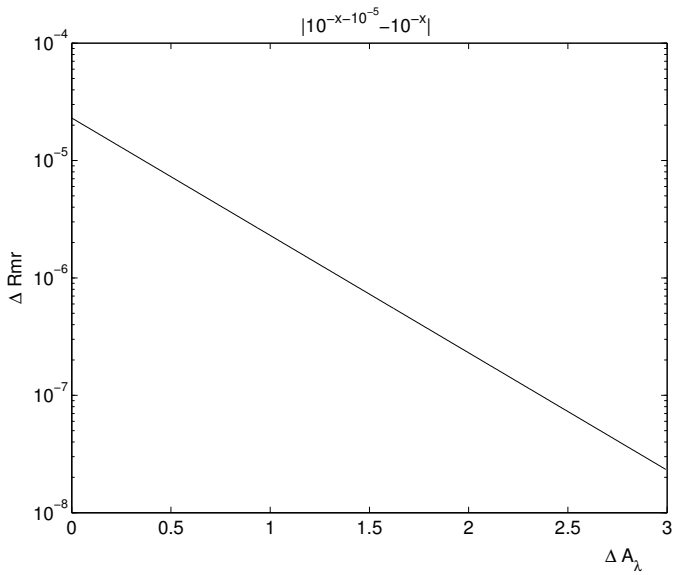
Nyní je nutné tyto praktické požadavky na celý detektor převést na požadavky na vlastnosti samotného AD převodníku. Praktické požadavky na rozsah a rozlišení se týkají výstupu v AU. Jedná se tedy o hodnotu za logaritmátorem a odečtením referenční nulové hodnoty. Protože sestrojení optického zdroje, monochromátoru a dalších prvků s požadovanou stabilitou a maximálním driftem by bylo extrémně náročné, je použit systém dvoupaprskový s referenční a měrnou větví. Z toho vyplývá, že je nutné před vlastním logaritmováním (jedná se o desítkový logaritmus) provést výpočet poměru signálu z čidla měrné a referenční větvě. Požadované rozlišení poměrového signálu je dáno následujícími vztahy

$$A_\lambda[\mathrm{AU}] = -\log_{10}\left(\frac{U_m}{U_r}\right) \tag{6.1}$$

kde U_m/U_r je poměr výstupního napětí vstupních zesilovačů měrné a referenční větve a dále bude označován R_{mr}.

$$\begin{aligned} R_{mr} &= 10^{-A_\lambda} && (6.2)\\ \Delta R_{mr} + R_{mr} &= 10^{-(A_\lambda + \Delta A_\lambda)} \\ \Delta R_{mr} &= 10^{-(A_\lambda + \Delta A_\lambda)} - R_{mr} \\ \Delta R_{mr} &= 10^{-(A_\lambda + \Delta A_\lambda)} - 10^{-A_\lambda} && (6.3) \end{aligned}$$

na obrázku 6.4 je graficky znázorněn průběh požadovaného absolutního rozlišení přes oblast od 0 do 3 AU pro uvažovanou minimální přesnost $1 \cdot 10^{-5}$ AU. Záporné hodnoty absorbance nejsou uvažovány, protože se vyskytují pouze jako důsledek provedení nulování absorbance v době, kdy je v kyvetě světlo více absorbující látka, než je látka přítomná v určitých okamžicích analýzy (jedná se o negativní píky). Reálné záporné hodnoty AU by mohly odpovídat jedině chemoluminiscenčním nebo radioluminiscenčním látkám, které se v praxi nevyskytují. Hodnoty až do 3 AU jsou uvažovány opět pro případy, kdy je detektor vynulován za přítomnosti světlo více absorbujících látek v kyvetě.



Obrázek 6.4: Závislost požadavku na přesnost poměru R_{mr} na absorbanci

Pokud bude uvažován poměr $R_{mr} = 1$ za odpovídající plnému rozsahu AD převodníku, lze po vyhodnocení převrácené hodnoty ΔR_{mr} přibližně určit potřebný počet rozlišitelných úrovní převodníku a tím i minimální počet bitů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.1. Z tabulky je patrné, že nároky na rozlišení AD převodníku jsou velmi vysoké. Dodržení požadavku na rozlišení $1 \cdot 10^{-5}$ při vynulování detektoru za přítomnosti látky s asorbancí 1 AU a dalšího relativního nárůstu absorbance během analýzy o 2 AU by bylo nutné použít převodník s rozlišením 26 bitů. Dosažení takového rozlišení je prakticky velmi těžko realizovatelné. Jak bylo uvedeno dříve, je vysoké rozlišení absorbance důležité především pro malé hodnoty výstupního signálu, proto je možné považovat uvedený případ $1 + 2$ AU za mezní. Zároveň při detekci velmi vysokého píku bude relativní přesnost určení jeho plochy velmi dobrá i při nižším rozlišení měření absorbance. Proto lze považovat 22 bitový pře-

Hodnota A_λ [AU]	Potřebný počet úrovní	Počet bitů ADC
0	$4.343 \cdot 10^4$	14.4
1	$4.343 \cdot 10^5$	18.7
2	$4.343 \cdot 10^6$	22.1
2.5	$1.373 \cdot 10^7$	23.7
3	$4.343 \cdot 10^7$	25.4

Tabulka 6.1: Nutný počet bitů AD převodníku pro rozlišení $1 \cdot 10^{-5}$ AU

vodník za dostačující. Zároveň je možné přistoupit k určitému kompromisu, kdy je podle podmínek konkrétní analýzy možné provést volbu mezi rychlostí odezvy převodníku a jeho rozlišením. Velmi úzké píky koncentrují větší množství látky do kratšího časového úseku, tím je koncentrace v kyvetě vyšší a je pro tyto případy možné připustit nižší rozlišení AD převodníku. Uživatel většinou provádí volbu mezi rozlišením a rychlostí odezvy na detektoru nastavením časové konstanty.

Rychlost převodu AD převodníku je nutné vyhodnotit z požadavku na minimální šířku analyzovaných píků a z požadované přesnosti výpočtu plochy píků. Pro konvenční metody výpočtu plochy píků se uvádí, že pík je dostatečně popsán, pokud jeho průběh obsahuje alespoň 30 vzorků. Pro šířku píků okolo 1 sekundy by se tedy jednalo o frekvenci vzorkování 30 Hz. Při použití moderních metod popsaných v kapitole 5 jsou teoreticky nároky na počet bodů průběhu píku menší. Podstatným problémem kladoucím specifické nároky na AD převodník, je požadavek přesného měření a výpočtu plochy z průběhu absorbance, tedy nikoliv hodnoty převáděného poměru signálů R_{mr}. Z tohoto požadavku vyplývá, že není pro měření plochy úzkých píků přípustné použít AD převodník, jehož doba odezvy na rychlou velkou změnu signálu je dlouhá. Důvodem je následující nerovnost

$$\frac{1}{n}\sum \log_{10}(R_{mr\,i}) \neq \log_{10}\left(\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} R_{mr\,i}\right)$$

Na druhé straně při měření velmi malých signálů přechází vztah 6.1 na výraz $A_\lambda = 1/\ln(10)\cdot(1-R_{mr})$, kdy může být výhodné použít částečnou integraci (filtraci) signálu již před logaritmátorem.

6.3.2 Přehled možných řešení AD převodu

Tradičně používaný vztah pro výpočet dosažitelného poměru efektivní hodnoty užitečného signálu k šumu, který je uváděn v množství pramenů (například v Oppenheim et al. (1999); Dattorro (1999))

$$\frac{S}{N} = 10\,log_{10}\left(\frac{A^2/2}{2^{-2B}/(12L_{ovr})}\right) \quad \text{[dB]} \tag{6.4}$$

kde poměr S/N značí poměr efektivní hodnoty užitečného signálu k šumu v dB, L_{ovr} je poměr převzorkování AD převodníku, B je bitové rozlišení AD převodníku a A je amplituda měřeného signálu braná relativně k rozsahu AD převodníku.

6.3.3 Návrh vlastního AD převodníku na míru

Žádný dostupný převodník se nezdál být při návrhu detektoru zcela vyhovující. Autoři zároveň již měli zkušenosti s návrhem vlatního převodníku s dvojí integrací, který byl používán v předchozí generaci HPLC detektorů, proto se rozhodli provést vlastní návrh, který v první řadě bere na zřetel požadavky HPLC detektoru a až v druhé řadě se zabývá obecnými požadavky na AD převodník.

Základní požadavky podle důležitosti jsou

1. primární převedený digitální signál musí být možné filtrovat přes více vzorků tak, aby s délkou filtru deterministicky narůstalo rozlišení převodníku
2. již primární převod musí mít integrační charakter pro veškerý spojitý vstupní signál a šum
3. převodník musí být maximálně lineární a výstup musí být striktně monotóní
4. převodník musí maximálně potlačit vliv nestability světelného zdroje na měřený signál, tím že již první stupěň bude převádět poměr měrné větve ke větvi referenční a bude dostatečně rychle akceptovat změny referenčního signálu (řádově se může jednat o změny s frekvení až stovek Hz)
5. převodník musí vykazovat velmi dobrou teplotní stabilitu a dlouhodobou stabilitu nulové hodnoty
6. převodník musí poskytovat v nejrychlejším režimu minimálně korelované vzorky na frekvenci 25 Hz
7. pro nekorelované vzorky s frekvencí 1 Hz musí být rozlišení alespoň 22 bitů
8. konstrukce převodníku musí co nejvíce oddělit rušivý vliv digitální části na část analogovou
9. převodník musí být realizovatelný z dostupných součástek

První požadavek odpovída vlastnostem modulátoru sigma-delta AD převodníků. Rozdíl mezi skutečnou hodnotou vstupního signálu a hodnotou převedenou kvantitizérem je v každé periodě modulátoru sumován a přidán k hodnotě přiváděné v další periodě. Druhý požadavek ovšem vylučuje použití obvodu sample-and-hold na vstupu převodníku. Tím odpadá možnost použít sériově vyráběné sigma-delta

AD převodníky, které s modulační frekvencí provádějí převod vstupního napětí na náboj a poté realizují jeho sečtení s minulou chybovou hodnotou, komparaci a odečtení nábojového kvanta. Je sice možné, že by tuto vlastnost bylo možné získat přidáním aktivního nebo pasivního filtru na vstup AD převodníku, ale to by mohlo být v rozporu s dalšími požadavky. Ideálním AD převodníkem pro splnění požadavku 2), by byl převodník napětí frekvence, kerý lze zkonstruovat tak, že provádí trvale integraci vstupního signálu. Jeho nevýhodou je proměnná vzorkovací frekvence a tím i neschopnost zaručit pravidelné periodické prokládání proměnného referenčního signálu. Z pohledu požadavku na co nejméně korelované vzorky by se jako vhodný ukazoval princip převodníku s dvojí nebo vícenásobnou integrací, ten ovšem nesplňuje požadavky 1) a 2). Do popředí se opět dostává možnost použití modifikovaného sigma-delta převodníku. Ten by bylo možné navrhnou tak, že by trvale integroval vstupní signál a šum jako náboj na kondenzátoru a modulátor by řídil periodické odečítání kvantovaného referenčního signálu. Problém této konstrukce je, že pro nekorelované vzorky s frekvencí 1 Hz a rozlišením 22 bitů by bylo nutné aby modulátor pracoval na frekvenci 2^{22}, to je minimálně 4.2 MHz. Běžné sigma-delta AD převodníky pracijí s frekvencí modulátoru 0.1 až 1 MHz. Zároveň velké množství period přepnutí analogového multiplexru v modulátoru pro přenos kvant referenčního signálu do integračního kondenzátoru by způsobilo vnesení dalšího šumu. Lze predpokládat, že při každém přepínání analogového multiplexru dojde k přenosu určitého náboje z logické části do analogové cesty. Pokud je tento přenos vždy shodný, bylo by ho možné vykompenzovat, ale lze předpokládat že velikost přeneseného rušivého náboje může být závislá na teplotě, hodnotě napětí na dalších analogových vstupech a hodnotě napájecího napětí multiplexru. Z těcho příčin je tedy nutné uvažovat o převodníku s nižší frekvení primárního modulátoru, který ovšem v takovém případě musí v každém kroku rozlišovat řádově více úrovní než dvě. Proto začali autoři uvažovat o možnosti kombinace více principů převodu signálu.

Z požadavku 2) vyplývá, že převodník musí trvale integrovat vstupní signál. Požadavky 4), 6) a 7) si vynucují konstantní frekvenci převodových cyklů modulátoru. To je možné zaručit tak, že vždy po uplynutí konstantního časového úseku začne být k integrovanému měřenému signálu přičítán signál referenční s opačným znaménkem. Logickým okamžikem, kdy přestane být referenční signál aplikován je okamžik dosažení nulové hodnoty na integrátoru. To by ovšem neumožnilo přesné spočítání počtu aplikovaných referenčních kvant, okamžik průchodu nulou se nemusí shodovat s celou periodou hodinového signálu. Zároveň by tím nebyl splněn požadavek 1). Proto je nutné reagovat na průchod napětí na integrátoru nulovou hodnotou až v příští celé periodě hodinového signálu. Zbytková záporná hodnota napětí na integračním kondenzátoru je poté automaticky přičtena k hodnotě měřeného signálu v dalším cyklu modulátoru. Tím je možné po zprůměrování hodnot

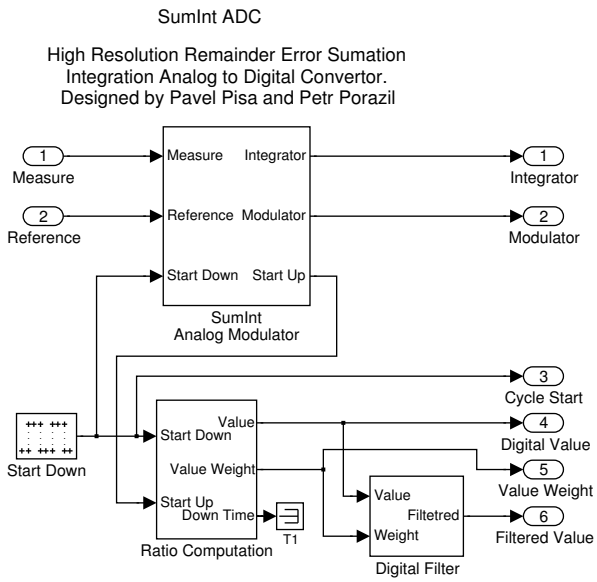
z více cyklů zvýšit rozlišení AD převodníku a je automaticky splněn požadavek 1). Protože cykly modulátoru mohou být mnohonásobně delší, než perioda hodinového signálu pro odměžování množství aplikovaných kvant referenčního signálu, může být frekvence oscilátoru pro odměřování kvant velmi vysoká (v provedeném návrhu se jedná o 32 MHz a frekvence byla omezená pouze rychlostí dosažitelných FPGA obvodů v době návrhu). Návrh je možné provést i tak, že potlačí vliv napěťových ofsetů a další limitující vlastností většiny součástek v analogové části AD převodníku. Navržený princip AD převodníku slučuje východy sigma-delta i integračních AD převodníků. Autoři proto tento princip převodu nazvali suma-integrační, zkráceně Σ-integrační nebo Σ-$\int$ ADC. Již na začátku je potřeba poznamenat, že převodník byl optimalizován pro splnění výše uvedených požadavků a ne jako ideální převodník pro všeobecné použití, proto má tento princip i množství záporných aspektů, na které bude upozorněno v dalším textu.

6.3.4 Princip navrženého Σ-Integračního AD převodníku

V předchozím odstavci byla popsána posloupnost úvah, která vedla ke vzniku Σ-integračního převodníku. V tomto odstavci je podrobně popsána jeho činnost a teoreticky dosažitelné vlastnosti. Jak je znázorněno na obrázku 6.5, funkce převodníku je realizována třemi hlavními bloky a zdrojem hodinového signálu ϕ_{clk} (perioda T_{clk}, frekvence f_{clk}) a signálu synchronizujícího periody modulátoru ϕ_{mod} (perioda T_{mod}, frekvence f_{mod}). Signál ϕ_{mod} je získán vydělením frekvence hodinového signálu, $T_{mod} = T_{clk} \cdot L_{mod}$. Protože celá digitální část i modulátor AD převodníku při zanedbání zpoždění pracuje synchronně s hodinovým signálem ϕ_{clk}, bude v následujícím výkladu používáno vyjádření časových úseků v celým násobcích period T_{clk} a pro takto definovaný rozměr času bude používáno značení l, případně pro průběhy s konstantní periodou L.

Prvním blokem je vlastní blok modulátoru (SumInt Analog Modulator). Ten převádí hodnotu poměru vstupních analogových signálů (měrného a referenčního) na logický signál, který délkou své jednotkové úrovně udává počet aplikovaných kvant referenčního signálu (signál Start Up). Počátek aplikování referenčního signálu je dán zdrojem hodinového signálu (signál Start-Down). Druhý blok (Ratio Computation) počítá z odměřených časů hran (s rozlišením T_{clk}) vstupních signálů poměr měřeného a referenčního signálu (výstup Value) a další pomocnou hodnotu vypovídající o váze vzorku (výstup Value Weight), jejíž význam bude popsán dále. Poslední funkční blok (Digital Filter) provádí digitální filtraci obou výstupních signálů druhého bloku a na výstupu počítá hodnotu s plným rozlišením, která již odpovídá poměru měřeného signálu k signálu referenčnímu. Popsané rozdělení bloků zpracování signálů odpovídá rozdělení funkčnímu, fyzické rozdělení mezi analogové obvody, FPGA obvod a zpracování řídícím procesorem je odlišné.

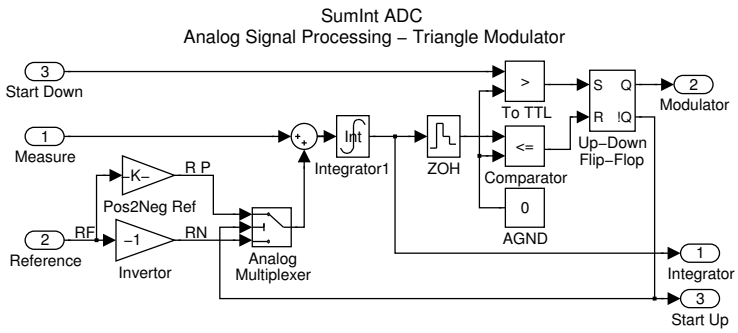
Podrobnější model bloku modulátoru je zobrazen na obrázku 6.6. Základem mo-



Obrázek 6.5: Blokové schéma Σ-∫ AD převodníku

dulátoru je integrátor, který kontinuálně integruje vstupní napěťový signál z měrné větve (u_m). Do vstupního signálu integrátoru je střídavě přičítána a odečítána hodnota referenčního signálu (signály RP – pozitivní referenční signál a RN – negativní referenční signál o napětích u_{rp} a u_{rn}) vynásobená příslušnými konstantami ($K_{pos2neg}$) určujícími vstupní rozsah AD převodníku. Přepínání přičítání a odečítání referenčního signálu zajišťuje analogový přepínač, který je řízen z klopného obvodu. Napěťový výstup integrátoru je porovnáván analogovým komparátorem s nulovou hodnotou (analogovou zemí obvodu), který po dosažení záporné hodnoty na výstupu integrátoru vynuluje klopný obvod a tím přepne analogový přepínač do polohy RP. K přepnutí nedojde okamžitě po průchodu výstupu nulou, ale až na začátku další periody hodinového signálu ϕ_{clk}. To má za následek, že na výstupu integrátoru je v okamžiku přepnutí již malé záporné napětí, které je dále značeno u_{Ai}. Zpět do polohy RN je klopný obvod a analogový přepínač nastavován na počátku periody modulátoru signálem ϕ_{mod}.

Výsledný časový průběh výstupu integrátoru má trojúhelníkový tvar, jak je znázorněno na obrázku 6.7. V i-tém cyklu modulátoru vzestupná část průběhu mezi body A_i B_i odpovídá přičítání signálu RP a trvá po dobu $t_{rpi} = l_{rpi} \cdot T_{clk}$. Sestupná část mezi body B_i C_i odpovídá aplikaci signálu RN a trvá po dobu $t_{rni} = l_{rni} \cdot T_{clk}$. Pro obě doby platí $l_{pni}, l_{rni} \in \langle 0, L_{mod} \rangle$. Celková doba trojúhelníkového průběhu t_{trii} je dána součtem obou částí $t_{trii} = t_{rpi} + t_{rni}$. Protože časování přepínače v bodech B_i je dáno periodou T_{mod} (l_{mod} v počtu cyklů hodin ϕ_{clk}), platí pro po sobě jdoucí úseky



Obrázek 6.6: Analogová část Σ-∫ AD převodníku

B_{i-1} C_{i-1} a A_i B_i

$$t_{rpi} = T_{mod} - t_{rni-1} \tag{6.5}$$

$$l_{rpi} = L_{mod} - l_{rni-1} \tag{6.6}$$

Pro napětí u na výstup integrátoru lze pak uvést následující vztahy

$$u_{Ai} = u_{Ci-1} \tag{6.7}$$

$$\Delta u_{ABi} = \int_{t_{Ai}}^{t_{Bi}} (u_m(t) + u_{rp})\, dt \tag{6.8}$$

$$\Delta u_{BCi} = \int_{t_{Bi}}^{t_{Ci}} (u_m(t) + u_{rn})\, dt \tag{6.9}$$

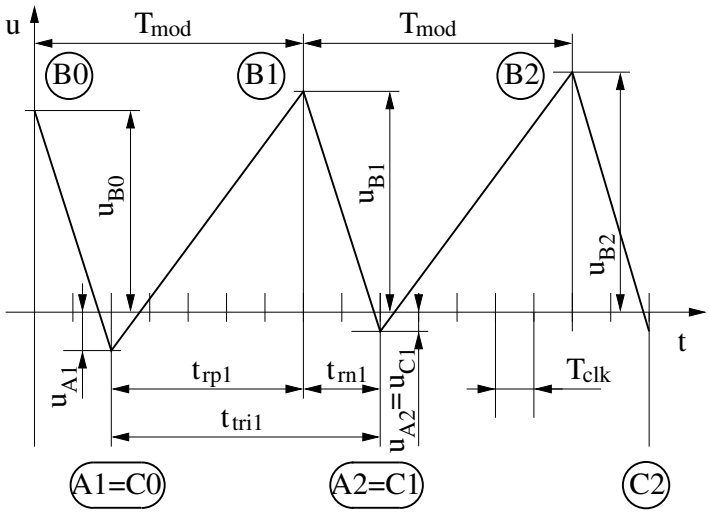
Tyto rovnice předpokládají kvazistatickou hodnotu referenčního napětí a časově libovolně proměnnou hodnotu měřeného napětí u_m. V systému s reálným integrátorem by měl být rozsah frekvencí vstupního signálu omezen tak, aby nedocházelo k nesymetrickému ovlivnění výstupu integrátoru. Pro obě části trojúhelníkového průběhu lze zapsat následující vztah

$$\Delta u_{ACi} = \Delta u_{ABi} + \Delta u_{BCi} \tag{6.10}$$

S využitím rovnic 6.8, 6.9 lze vztah dále upravit a integrál nahradit střední hodnotou měřeného signálu u_m v trojúhelníkovém průběhu i značenou $\overline{u_{mi}}$.

$$\begin{aligned}
\Delta u_{ACi} &= u_{rp} t_{rpi} + u_{rn} t_{rni} + \int_{t_{Bi}}^{t_{Ci}} u_m(t)\, dt \\
\Delta u_{ACi} &= u_{rp} t_{rpi} + u_{rn} t_{rni} + \overline{u_{mi}}\, t_{trii} \\
\Delta u_{ACi} &= T_{clk} \left(u_{rp} l_{rpi} + u_{rn} l_{rni} + \overline{u_{mi}} \left(l_{rpi} + l_{rni} \right) \right)
\end{aligned} \tag{6.11}$$

Za předpokladu $\Delta u_{ACi} = 0$, jsou vztahy popisující Σ-Integrační AD převodník podobné vztahům pro běžný převodník s dvojí integrací. Z jednoho trojúhelníkového



Obrázek 6.7: Průběh napětí integrátoru Σ-∫ AD převodníku

průběhu na výstupu integrátoru lze vypočítat střední hodnotu měřeného signálu podle následujícího vzorce.

$$\overline{u_{mi}} = -\frac{u_{rp}l_{rpi}+u_{rn}l_{rni}}{l_{rpi}+l_{rni}}+\frac{\Delta u_{ACi}}{T_{clk}\left(l_{rpi}+l_{rni}\right)} \tag{6.12}$$

Pro určení hypotetického rozlišení převodu sestávajícího se z jednoho trojúhelníkového cyklu je možné uvažovat s $l_{rpi}+l_{rni}=l_{trii}$ počtem rozlišitelných úrovní a dále je nutné započítat chybu převodu odpovídající nenulovému členu Δu_{ACi}. Možné jsou dvě nejnepříznivější situace:

- u_{Ai} nabývá největší možné záporné hodnoty a $u_{Ci}=u_{Ai+1}=0$
- druhá odpovídá opačnému pořadí událostí, $u_{Ai}=0$ a $u_{Ci}=u_{Ai+1}$ nabývá největší možné záporné hodnoty

Největší možná záporná hodnota u_{Ai} odpovídá situaci, kdy k průchodu výstupu integrátoru nulou dojde těsně po začátku periody T_{clk} a hodnota měřeného signálu u_m je po dobu celé periody T_{clk} minimální. Protože je převodník navrhovaný pro měření poměru světelných toků, to znamená pouze pro kladné hodnoty signálů, lze za krajní případ považovat $u_m=0$. Minimální hodnota napětí u_{Ai} je pak dána integrováním negativního záporného referenčního signálu RN po dobu periody T_{clk}. Pro rozsah hodnot u_{Ai} a odchylku tedy platí

$$\begin{aligned} u_{Ai} &\in \langle u_{rn}T_{clk},0\rangle \\ \left|\frac{\Delta u_{ACi}}{T_{clk}\left(l_{rpi}+l_{rni}\right)}\right| &\leq \frac{-u_{rn}}{l_{rpi}+l_{rni}} \end{aligned} \tag{6.13}$$

Ve skutečnosti však není možné rozlišení z jednoho průběhu určit, protože okamžitá hodnota $l_{trii} = l_{rpi} + l_{rni}$ není konstantní (závisí na předchozím průběhu). Pro střední hodnoty ovšem platí, že $\overline{l_{trii}} = L_{mod}$ ($\overline{t_{trii}} = T_{mod}$). Pro ustálený stav nejsou odchylky od středních hodnot také příliš velké. Převodník však není určen k poskytování měřené hodnoty za jednu periodu modulátoru. Naopak princip činnosti zaručuje možnost měřit střední hodnotu vstupního signálu přes neomezené množství period s lineárně rostoucím rozlišením omezeným pouze vlastnostmi použitých součástek.

Ze vztahu 6.11 pro jeden průběh[2] a ze způsobu přepínání modulátoru vedoucího ke vztahům 6.6 a 6.7 je možné napsat rovnici pro měření přes n trojúhelníkových průběhů $(i, \ldots, i+n-1)$

$$\begin{aligned}
\Delta u_{AiAi+n} &= T_{clk} \sum_{j=0}^{n-1} \left(u_{rp} l_{rpi+j} + u_{rn} l_{rni+j} + \overline{u_{mi+j}} \left(l_{rpi+j} + l_{rni+j}\right)\right) \\
\Delta u_{AiAi+n} T_{clk}^{-1} &= u_{rp} \sum_{j=0}^{n-1} l_{rpi+j} + u_{rn} \sum_{j=0}^{n-1} l_{rni+j} + \overline{u_{mi,n}} \left(n L_{mod} + l_{rpi} - l_{rpi+n}\right)
\end{aligned}$$

Z rovnice lze snadno vyjádřit střední hodnotu měřeného signálu $\overline{u_{mi,n}}$ v intervalu $(i, \ldots, i+n-1)$ a maximální možné odchylky měření způsobené rozdílem napětí na počátku měření u_{Ai} a na konci u_{Ai+n}. Tato složka chyby odpovídající výrazu 6.13 v případu jednoho průběhu bude nadále označována $u_{aaerri,n}$.

$$\overline{u_{mi,n}} = - \frac{u_{rp} \sum_{j=0}^{n-1} l_{rpi+j} + u_{rn} \sum_{j=0}^{n-1} l_{rni+j}}{n L_{mod} + l_{rpi} - l_{rpi+n}} + u_{aaerri,n} \tag{6.14}$$

$$|u_{aaerri,n}| \leq \frac{-u_{rn}}{n L_{mod} + l_{rpi} - l_{rpi+n}} \tag{6.15}$$

Pro případ měření přes n průběhů je již možné určit minimální počet rozlišitelných úrovní, který je pro $l_{pni}, l_{rni} \in \langle 0, L_{mod} \rangle$ roven $(n-2) L_{mod}$. Tento údaj je však pouze teoretický, protože vstupní rozsah je nutné z důvodu dále rozebíraného zachování stability modulátoru omezit. Chyba daná výrazem $u_{aaerri,n}$ je vždy menší než jedna rozlišitelná úroveň. Pro další numerické výpočty je vhodné omezit množství přenášených digitálních hodnot a rovnici 6.14 vyjádřit co nejjednodušeji. Dále tedy budou uvažovány následující náhrady

$$\sum_{j=0}^{n-1} l_{rni+j} = l_{rni,n}$$

[2]Termín průběh je používán proto, aby bylo zdůrazněno, že se jedná o cyklický děj, který ovšem nemá pevně stanovenu periodu. Naopak posunutý cyklus modulátoru mezi okamžiky B_i a B_{i+1} je děj s pevnou délkou periody T_{mod}.

$$\sum_{j=0}^{n-1} l_{trii+j} = nL_{mod} + l_{rpi} - l_{rpi+n} = l_{trii,n}$$

$$\sum_{j=0}^{n-1} l_{rpi+j} = l_{trii,n} - l_{rni,n}$$

Rovnici 6.14 lze postupně zjednodušit do tvaru

$$\overline{u_{mi,n}} = -\frac{u_{rp}\left(l_{trii,n} - l_{rni,n}\right) + u_{rn} l_{rni,n}}{l_{trii,n}} + u_{aaerri,n}$$

$$\overline{u_{mi,n}} = -u_{rp} + \frac{l_{rni,n}}{l_{trii,n}}\left(-u_{rn} - u_{rp}\right) + u_{aaerri,n} \tag{6.16}$$

Dalším podstatným problémem je vyšetření oblasti, ve které se modulátor nachází bezpečně ve stabilní pracovní oblasti. Tento problém není na první pohled z výše uvedeného popisu patrný. Činnost modulátoru je považována za stabilní, pokud pro konstantní vstupní napětí u_m dojde postupně k takovému ustálení dob l_{rni} a l_{trii}, že se mění mezi jednotlivými průběhy pouze o jednotky. Tyto malé změny jsou dané principem činnosti převodníku a umožňují dříve popsané rozšiřování rozlišení měřením přes n průběhů. Modulátor se nachází v stabilní oblasti tehdy, pokud se rozdíly mezi hodnotami u_{Bi} postupně zmenšují. Pro výpočet závislostí mezi hodnotami u_{Bi} lze pro periodu modulátoru T_{mod} mnohonásobně větší než T_{clk} zanedbat synchronizaci výstupu komparátoru hodinovým signálem ϕ_{clk}. Za této podmínky budou hodnoty u_{Ai} nulové. Pro konstantní vstupní signál u_m lze z rovnic 6.8 a 6.9 určit vztah mezi hodnotami napětí u_{Bi}

$$u_{Bi+1} = \left(T_{mod} - t_{rni}\right)\left(u_m + u_{rp}\right) \tag{6.17}$$

kde se časový interval t_{rn} se shoduje s dobou sestupné části průběhu výstupu integrátoru a po zanedbání vlivu hodinového signálu ϕ_{clk} je zakončen při průchodu nulou. Pak platí

$$t_{rni} = -\frac{u_{Bi}}{u_m + u_{rn}}$$

po dosazení do rovnice 6.17

$$u_{Bi+1} = \left(T_{mod} + \frac{u_{Bi}}{u_m + u_{rn}}\right)\left(u_m + u_{rp}\right) \tag{6.18}$$

$$u_{Bi+1} = T_{mod}\left(u_m + u_{rp}\right) + u_{Bi}\frac{u_m + u_{rp}}{u_m + u_{rn}} \tag{6.19}$$

Pro vyjasnění je dobré upozornit, že hodnota u_{rn} je vždy záporná a druhý člen pravé strany rovnice 6.19 je pro předběžně odhadnuté podmínky na vstupní signál ($u_m < -u_{rn}$ a $u_m > -u_{rp}$) vždy záporný. Rovnici lze převést po náhradě hodnoty

u_{Bi} součtem konstantní hodnoty u_B a odchylky $\widetilde{u_{Bi}}$ na rovnici lineárního diskrétního systému

$$\begin{aligned}
\widetilde{u_{Bi+1}} + u_B &= T_{mod}\left(u_m + u_{rp}\right) + \left(\widetilde{u_{Bi}} + u_B\right)\frac{u_m + u_{rp}}{u_m + u_{rn}} \\
u_B &= T_{mod}\left(u_m + u_{rp}\right) + u_B\frac{u_m + u_{rp}}{u_m + u_{rn}} \\
u_B &= T_{mod}\left(u_m + u_{rp}\right)\frac{u_m + u_{rn}}{u_{rn} - u_{rp}} \\
\widetilde{u_{Bi+1}} &= \frac{u_m + u_{rp}}{u_m + u_{rn}}\widetilde{u_{Bi}}
\end{aligned} \tag{6.20}$$

Z uvedené rovnice je zřejmé, že pro podmínku stabilní činnosti modulátoru musí být absolutní hodnota zesílení odchylky $\widetilde{u_{Bi}}$ menší než 1.

$$\begin{aligned}
\left|\frac{u_m + u_{rp}}{u_m + u_{rn}}\right| &< 1 \\
\left|u_m + u_{rp}\right| &< \left|u_m + u_{rn}\right|
\end{aligned} \tag{6.21}$$

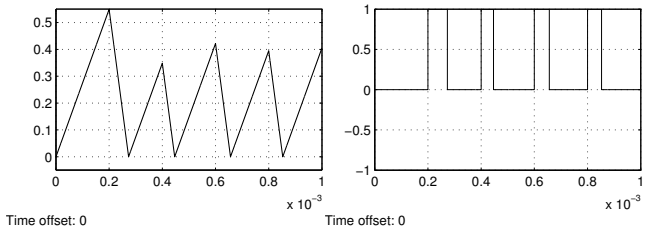
Za dříve uvažovaných podmínek $u_m < -u_{rn}$ a $u_m > -u_{rp}$ je čitatel zlomku ve vyšetřovaném výrazu vždy kladný a jmenovatel vždy záporný. Za těchto podmínek lze omezení kladené na vstupní signál přepsat na nerovnost

$$\begin{aligned}
u_m + u_{rp} &< -u_m - u_{rn} \\
u_m &< \frac{1}{2}\left(-u_{rn} - u_{rp}\right)
\end{aligned}$$

Po vyhodnocení všech omezujících podmínek lze určit využitelný rozsah převodníkem měřeného signálu u_m

$$u_m \in \left(-u_{rp}, \frac{1}{2}\left(-u_{rn} - u_{rp}\right)\right) \tag{6.22}$$

Z uvedeného rozboru vyplývá, že z původně uvažovaného vstupního rozsahu lze využít pouze jednu polovinu. Tato skutečnost není příliš omezující, protože referenční signál může být při úpravě na signály RN a RP libovolně zesílen a vstupní rozsah modulátoru převodníku může být nastaven libovolně. Omezení kladená na vstupní rozsah mají dále vliv na určení rozlišení AD převodníku. Z podmínek pro stabilitu modulátoru je nutné znovu zvážit závěry provedené na základě rovnic 6.13 a 6.15. Rozsah hodnoty l_{rni} je omezen na interval $\left\langle 0, \frac{1}{2}L_{mod}\right\rangle$ a rozsah hodnoty l_{pni} na $\left\langle \frac{1}{2}L_{mod}, L_{mod}\right\rangle$. Tím je počet primárně měřených úrovní snížen na $\frac{1}{2}L_{mod}$. Zároveň je dvakrát zmenšen rozsah rozdílu $l_{rpi} - l_{rpi+1}$. Za těchto podmínek je minimální



(a) (b)

Obrázek 6.8: Průběh signálů modulátoru při simulaci Σ-$\int$ AD převodníku

rozlišení Σ-Integračního AD převodníku pro měření přes n period modulátoru T_{mod} (L_{mod}) dáno výrazem

$$(n-1)\,\frac{1}{2}L_{mod} \tag{6.23}$$

Typický průběh výstupu integrátoru a výstup modulátoru Σ-Integračního AD převodníku je zaznamenán na grafech na obrázku 6.8. Tyto průběhy byly pořízeny na modelu převodníku v prostředí **Simulink**. Na záznamu je dobře patrný překmit a ustálení hodnoty u_{Bi} po spuštění simulace.

6.3.5 Číslicové zpracování výstupu Σ-$\int$ modulátoru

Digitální zpracování výstupu modulátoru je v určitém ohledu o něco složitější než v případě klasických sigma-delta AD převodníků, protože časové úseky odpovídající jednotlivým převodům mají doby trvání, které se pohybují v určitém rozsahu. Nejlepších výsledků je dosaženo, pokud jsou oba výstupy modulátoru (doby trvání trojúhelníkového průběhu $l_{tri\,i}$ a doby aplikace záporného referenčního signálu $l_{rn\,i}$) zpracované a filtrované nezávisle a výpočet vlastního poměru signálů určující hodnotu vstupního napětí je proveden až po těchto operacích.

Pro filtraci signálů může být použito množství metod stejně jako pro konvenční sigma-delta AD převodníky. V úvahu především přichází použití různých filtrů s konečnou odezvou (FIR), ze kterých nejpoužívanější bývá filtr odpovídající konvoluci signálu s průběhem funkce $sinc(x)$. Další vhodné řešení je filtrace gausiánem, která v případě pro chromatografii typických gaussovských píků povede k jejich menší tvarové deformaci. V navrženém detektoru bylo nakonec z důvodu malého výpočetního výkonu použité filtrování s dvouúrovňovým výpočtem plovoucího průměru. Tento výpočet způsobuje minimální zaokrouhlovací chyby. Zároveň vlastní průběh signálu slouží při chromatografickém stanovení pouze k nalezení základové linie a oblasti každého píku. Pro určení koncentrace je podstatný integrál (případně suma) jednotlivých vzorků a z tohoto důvodu je opět výhodné minimální zaokrouhlení a

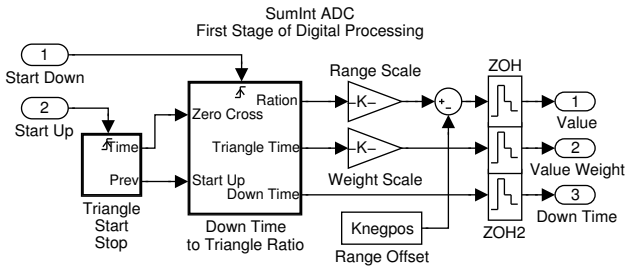
přílišná snaha o potlačení zdánlivého šumu v hodnotě signálu může být kontraproduktivní. Problém je sice komplikovaný aplikací logaritmu mezi výstupem převodníku a integrací, ale pro malé změny signálu (oblast, kde je rozlišení a zpracování nejkritičtější), lze považovat změnu směrnice funkce logaritmu během stále relativně krátkých dob převodů za blízkou konstantní.

Pro účely modelování činnosti převodníku a názornějšího sledování vlivu filtrace a použitého filtru jsou v matematickém modelu nahrazeny celočíselné veličiny nesoucí informaci o počtech časových kvant „spojitými“ hodnotami, které odpovídají okamžité měřené hodnotě vstupního signálu $a \cdot l_{rni}/l_{trii} + b$ a poměrové váze daného průběhu l_{trii}/L_{mod}. Konstanty a a b představují obecné parametry lineární závislosti pro kalibraci převodu vstupního analogového signálu na signál výstupní a lze je určit z hodnot použitých referenčních napětí $a = -u_{rn} - u_{rp}$ (odpovídá $K_{pos2neg} + 1$) a $b = -u_{rp}$ (odpovídá $-K_{pos2neg}$). Pro vlastní realizaci je však vždy nutné celý řetězec převodníku kalibrovat s reálnými osazenými elektronickými prvky. Zároveň pro absorbanční měření jsou podstatné pouze změny poměru signálů, takže jediným parametrem převodníku, který je ve skutečnosti potřeba v dané aplikaci kalibrovat, je konstanta b pro odečtení posunu nuly převodníku daného jak obvodovým návrhem, tak nepřesnostmi součástek.

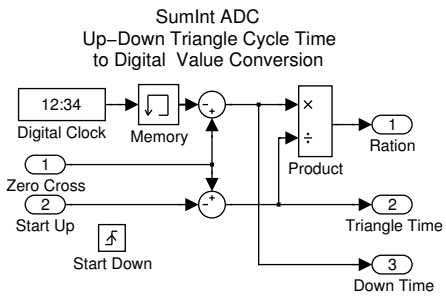
Názornější představu o realizaci a vlastnostech digitální části převodníku si lze udělat z obrázků použitých původně pro prezentaci navrženého principu AD převodníku na Světovém kongresu organizace IFACPíša – Porazil (2005). Propojení prvního stupně digitálního zpracování (blok Ratio Comoputation) s modulátorem obsaženým v analogové částí převodníku je patrné z obrázku 6.5. Model bloku na obrázku 6.9 určí délky časových úseků l_{trii} a l_{rni} a provede jejich převod na poměrový signál (Value) a váhu jeho vzorku (Value Weight). Vlastní měření diskrétních intervalů popisujících průběh trojúhelníkového cyklu je realizováno jako časově spouštěný subsystém (obrázek 6.10), který je označen popiskem Down Time to Triangle Ratio. Výstupy jsou pak normalizované do jednotkových rozsahů a předpokládaný způsob dvoukanálové filtrace je naznačen na obrázku 6.11. Vlastní obvodová a softwarová realizace se však od tohoto modelu vnitřní skladbou liší, veškeré zpracování až po výstupy hodnot z filtrů je navrženo v pevné řádové čárce a je optimalizované pro rozložení výpočtu mezi FPGA a nepříliš výkonný mikrokontrolér.

6.3.6 Realizace Σ-$\int$ AD převodníku

V návrhu spektrofotometrického detektoru LCD 5000 je vlastní realizace převodníku rozdělena mezi tři části. Vlastní analogová část modulátoru je umístěná na samostatnou desku dohromady se zesilovači signálu měrné a referenční větve. Analogová část obsahuje přípravu kladného a záporného referenčního signálu, analogové přepínače, integrátor a komparátor. Generování spouštěcího signálu a čítače pro určení dob l_{trii} a l_{rni} jsou realizované v obvodu FPGA. Vlastní digitální decimátor a



Obrázek 6.9: První digitální stupeň Σ-∫ AD převodníku

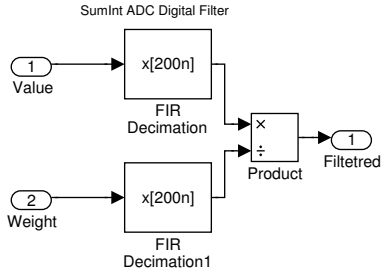


Obrázek 6.10: Výpočet poměru sestupné hrany ku periodě trojúhelníkového signálu

filtrace jsou rozloženy mezi obvodovou implementaci v FPGA obvodu a software hlavního řídicího mikrokontroléru přístroje.

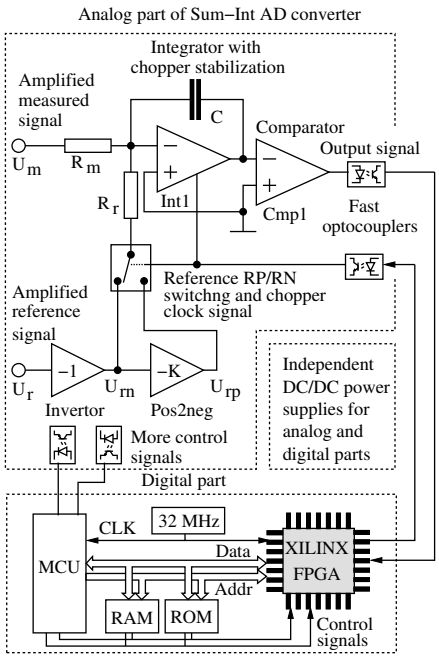
Pro implementaci digitální logické části modulátoru a první stupeň decimátoru bylo využit programovatelný obvod (FPGA) XILINX, jehož funkce je nakonfigurovaná vždy po zapnutí přístroje do jeho konfigurační paměti SRAM. O naprogramování se stará mikrokontrolér, který do obvodu přenese konfiguraci uloženou v paměti EPROM, ve které je uložen i firmware celého přístroje. Konfigurace se provádí v paralelním režimu a využívají se k ní piny FPGA připojené k vnější datové sběrnici mikrokontroléru. Po naprogramování pak stejné signály slouží v kombinaci s několika řídicími a adresními signály k přístupu k datovým registrům realizovaným v FPGA, které jsou přímo mapované do vnějšího adresního prostoru mikrokontroléru.

O další zpracování měřeného signálu, výpočet logaritmu se stará hlavní řídicí mikrokontrolér přístroje. Ten se stará i o povelování nastavení vybrané vlnové délky pro monochromátor, řízení zdrojů světla, komunikaci s řídicím softwarem nadřazeného počítače i o lokální uživatelský interface. Zjednodušené schéma elektronického zapojení elektronických komponent navržené implementace Σ-∫ AD převodníku je na obrázku 6.12. Schéma neobsahuje prvky týkající se funkcí elektroniky



Obrázek 6.11: Digitální filtr a decimátor

přímo nesouvisejících s převodem analogového signálu a i vlastní obvod převodníku je zjednodušen a neobsahuje funkce nutné pro servisní měření jednotlivých vstupních signálů proti pevně danému referenčnímu napětí a ani pomocný galvanicky oddělený analogový kanál pro průběžné monitorování velikosti referenčního signálu, které slouží k hlídání stavu zdroje světla a případnému vyhlášení chyby.



Obrázek 6.12: Zjednodušené elektronické schéma realizace Σ-∫ AD převodníku

Pro přesnost a stabilitu převodu však zůstává nejdůležitější částí vlastní analogová část modulátoru a zesilovače velmi slabých výstupních proudů diodových fotodetektorů. Vlastním srdcem modulátoru je integrátor realizovaný operačním ze-

silovačem. Hodnota a změna jeho vstupního napěťového ofsetu přispívá největší měrou k nepřesnosti převodu a případný posun nuly převodníku znamená i výrazný problém pro linearitu logaritmované hodnoty. Z těchto důvodů je v návrhu použitý přesný operační zesilovač s velkým vstupním odporem a aktivní kompenzací/nulováním vstupního napěťového ofsetu (chopper-stabilized amplifier). Vybraný byl obvod TLC2652 od firmy Texas Instruments. Nesynchronizované spouštění nulování vstupního ofsetu by vedlo k nedeterministickému souběhu s vlastními cykly převodu a tím i k případnému vzniku aliasingu, proto je spouštění nulování synchronizované s periodou modulátoru ϕ_{mod} a tím je možnost vzniku nežádoucích efektů potlačena. Parametry obvodu použitého analogového přepínače jsou také velmi podstatné. Analogový přepínač zajišťuje přepínání mezi kladnou a zápornou hodnotou referenčního signálu (u_{rp} a u_{rn}) a další jeho oddíl se stará o přepínání různých režimů pro servisní a kalibrační režimy převodníku. Požadavkem je volba obvodu s minimálními svodovými proudy, přeslechy mezi kanály a pro zajištění stability a zachování linearity poměrového řešení je důležitý i nízký odpor v sepnutém stavu. Použitý je obvod ADG444 od firmy Anlog Devices. Naopak časová i teplotní stabilita ani malé dokonce ani stabilní propagační prodlevy nejsou požadovány od použitého obvodu komparátoru, který porovnává hodnotu výstupu integrátoru a signalizuje okamžik průchodu nulou. Všechny jeho případné nepřesnosti se vzhledem k návrhu převodníku neuplatní vůbec nebo v zanedbatelné míře. Jako komparátor je tedy použitý relativně běžný obvod LM311. Důležité je však zajištění odstínění analogové části (nesoucí i obvody velmi citlivých zesilovačů vstupních signálů) od číslicové elektroniky a mikroprocesorového systému. Digitální logika je obecně zdrojem množství elektromagnetického rušení a i zde by znamenala degradaci návrhu. Proto není analogová část převodníku s digitální galvanicky propojená a o přenos informace do a z analogové části se starají rychlé digitální optočleny. Při rozboru návrhu se ukazuje, že vlastní dopravní zpoždění a i jeho pomalá změna v čase (např. při zahřívání přístroje) při přenosu signálů neovlivňují výslednou měřenou hodnotu. Pro přenos přepínacího signálu mezi u_{rp} a u_{rn} je ale podstatné, aby se dopravní zpoždění vzestupné a sestupné hrany shodovala a především, aby nevykazovala náhlé změny (jitter). V návrhu byly použity dva rychlé optočleny (20 MBd) HCPL7721.

6.3.7 Dosažené výsledky

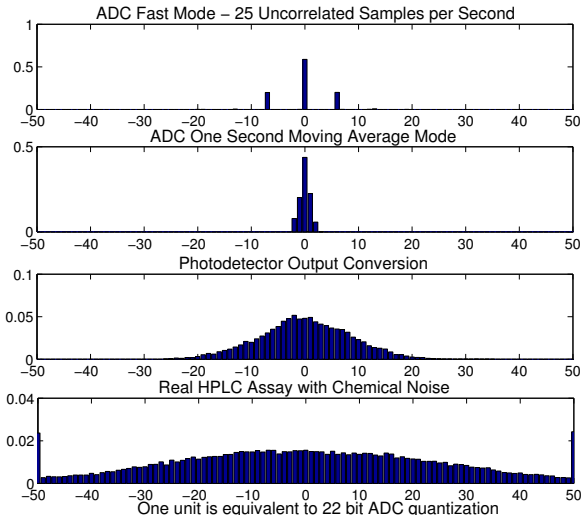
Tento odstavec dokumentuje vlastnosti návrhu AD převodníku změřené na jeho použití ve spektrofotometrickém detektoru **LCD5000**. Řídicí logika AD převodníku a celý synchronní návrh logiky v FPGA obvodu XILINX je řízen hodinovým signálem ϕ_{clk} o frekvenci 32 MHz. Periody modulátoru (trojúhelníkové cykly integrátoru) jsou synchronizované signálem ϕ_{mod} o frekvenci 5 kHz, který je odvozen ze hodinového signálu.

Histogramy distribuce výstupních kódů/úrovní analogově číslicového převodu

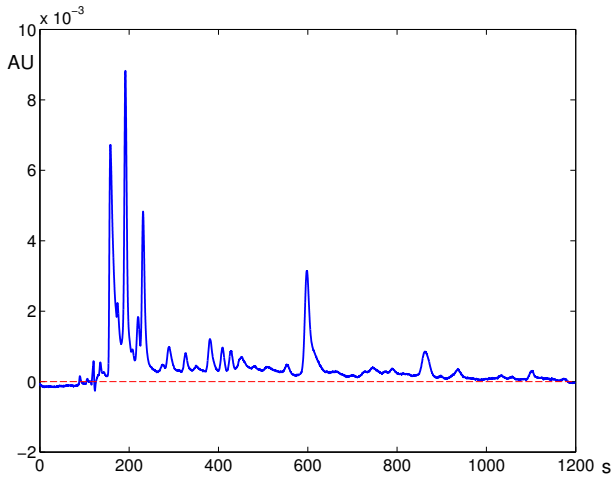
pro stejnosměrný konstantní signál jsou dokumentované na obrázku 6.13. Rychlý režim (ADC Fast Mode) zobrazuje výstupy nefiltrovaných převodů s frekvencí 25 Hz, které odpovídají vypočítanému rozlišení převodníku 19 bitů. Vlastní histogram je vynášený po dílcích odpovídajících 22 bitovému rozlišení, kterého převodník bez další filtrace nedosahuje. Proto se se měřené hodnoty rozdělují do několika diskrétních pozic okolo střední hodnoty. Když je aplikovaný filtr s dvojitým plovoucím průměrem, dochází k snížení rychlosti odezvy[3] a zároveň rozlišení převodníku roste. Při nastavení délky plovoucího průměru na jednu sekundu by podle teoretického výpočtu mělo rozlišení vzrůst na 24 bitů. To je sice více, než je rozlišení použité pro přípravu histogramu, ale vzhledem k elektronickému šumu i časovým nepřesnostem přenosů, přepínání a komparací (jitter) však této přesnosti již dosaženo není. Přesto mimo rozsah ± 2 úrovně pro rozlišení 22 bitů padne zanedbatelné vzorků a počet vzorků spadajících přímo do jedné úrovně je převažující. To znamená, že rozlišení převodníku přinejmenším překračuje 20 bitů a vlastní převod vykazuje dobrou stabilitu v čase. Další rozložení ukazuje distribuci vzorků kdy je již testovaný celý měřící řetězec od zdroje světla, monochromátor, optické dělení signálu na měrnou a referenční větev a diodové fotodetektory a vstupní vysoce citlivé zesilovače. Jak je vidět, ostatní zdroje šumu řádově převyšují šumy vznikající ve vlastním obvodu převodníku. Na druhou stranu stabilita měření a celé cesty je i tak velmi dobrá. Je nutné si uvědomit, že rozlišení jednoho zde uvažovaného dílku odpovídá na vlastním měřeném signálu desítkám femtoampér ($10 \cdot 10^{-15}$ A), což odpovídá necelému statisíci elektronů za sekundu. Jedná se tedy o proudy, při kterých je již jen výběr vhodných nízkošumových odporů do zesilovačů složitou záležitostí. Bylo také nutné použít triboelektrické kabely a vlastní aktivní body a propojení realizovat na teflonových destičkách. Poslední histogram pak ukazuje, jakým šumem přispívá zalití fotometrické cely kapalinou (mobilní fází) a její průtok. Přitom vlastní absolutní velikost signálů zůstává pro návrh optiky **LCD5000** na přibližně stejné úrovni jako při měření se suchou optickou celou. Je tedy vidět, že chemické šumové pozadí vlastní analýzy je v tomto případě o mnoho řádů větší než příspěvky na šum vznikající ve vlastní elektronice převodníku.

Pro ilustraci je pak na obrázku 6.14 prezentovaný záznam reálného chromatografického stanovení Oligo-Nucleotidů měřeného spektrofotometrickým detektorem **LCD5000**, který je vybaven diskutovaným Σ-$\int$ AD převodníkem.

[3] Vlastní výstupní vzorkovací frekvence 25 Hz je však zachovaná.



Obrázek 6.13: Distribuce výstupních kódů AD převodníku pro konstantní vstupní signál



Obrázek 6.14: Příklad reálné HPLC analýzy směsi Oligo-Nucleotidů

Kapitola 7

Chromatografický vyhodnocovací a řídicí systém

Tato kapitola pojednává o vyvinutém komunikačním a softwarovém řešení pro řízení chromatografických systémů a vyhodnocení chromatografických záznamů. Vlastní řešení lze rozdělit na několik dílčích projektů:

- nalezení vhodného řešení propojení přístrojů chromatografické sestavy mezi sebou a s nadřazeným počítačovým systémem
- integraci potřebného komunikačního hardware a software na straně přístrojů
- implementaci ovladačů pro vybraný způsob propojení (komunikaci) na straně řídicího počítače
- implementaci software pro řízení, sběr dat a vyhodnocení analýz

Zde uvedený popis se zaměřuje především na vznik a návrh vlastního vyhodnocovacího a řídicího software. K problému volby komunikačního protokolu je uveden jen stručný popis výběru a implementace navrženého komunikačního protokolu. Popis vlastního návrhu komunikačního a řídicího firmware přístrojů zde není rozebíraný. Určitou představu o rozsahu a použitých řešeních v této oblasti si lze udělat z popisu návrhu a implementace převodu snímaného signálu v modulu spektrofotometrického detektoru LCD 5000 uvedeného v kapitole 6. Podrobný popis jednotlivých vrstev vyvinutého protokolu lze nalézt na stránkách příslušného projektu μLANPíša – Smolík (2004–2010). Součástí projektu jsou i kompletní zdrojové kódy implementace komunikačního protokolu μLAN jak pro vestavná zařízení (např. jednotlivé moduly/přístroje chromatografického systému), tak i pro kompilaci ovladačů pro operační systémy používané na straně řídicích počítačů. Pro připojování přístrojů k řídicímu počítači byla jako alternativa k adaptéru na sériové rozhraní vyvinuta i

PC ISA karta. V současné době jsou však používané buď PCI komunikační karty dodávané společností Tedia s.r.o., nebo několik adaptací převodníku USB na μLAN vyvinutého ve spolupráci firem PiKRON s.r.o. a Agrosoft Tábor s.r.o. Kompletní zdrojové kódy tohoto převodníku jsou také součástí projektu μLAN umístěného na SourceForge.net.

Pro vlastní zpracování zaznamenaných dat byl původně používaný integrační software DataApex. Po přechodu ze systému DOS do prostředí Windows a požadavku na rozšíření systému i o možnost řízení ve firmě PiKRON vyvíjených složitějších chromatografických sestav[1] se však integrace do systému této firmy jevila neschůdnou. Zároveň již předtím začal vznikat na Katedře organické a jaderné chemie University Karlovy zpočátku jednoduchý program pro sběr dat ze staršího, firmou PiKRON dodaného spektrofotometrického detektoru LCD 4000. Na základě spolupráce s Doc. Jindřichem Jindřichem z této univerzity byl založen projekt **CHROMuLAN**, který byl dále rozvíjen a firmou PiKRON financovaný a na jehož vývoji se firma také podílela. Autor této práce implementoval především algoritmy základního vyhodnocení základové linie a vyhledávání píků.

Zde předkládaný text si neklade za cíl předložit podrobný popis uživatelského rozhraní programu ani popis jeho použití. Ty jsou k dispozici v tištěné i elektronické podobě na firemních a projektových stránkách programu PiKRON (2002). Zde uvedený popis se především zaměřuje na seznámení s navrženou koncepcí software a předkládá i rozbor možností začlenění metod popisovaných v kapitole 5. Vlastní zdrojové kódy chromatografického systému **CHROMuLAN** jsou součástí příslušného projektu na SourceForge.netJindřich – Píša (2004–2010).

7.1 Komunikační protokol

V této kapitole je nejdříve předložený zkrácený rozbor, který vedl k volbě do současné doby používaného komunikačního protokolu μLANPíša – Smolík (2004–2010). Jeho návrh a implementace jsou poté krátce popsané.

7.1.1 Požadavky na komunikaci

Vývojový tým, který později zakládal společnost PiKRON, hledal vhodné řešení pro komunikaci v sestavách vyvíjených laboratorních přístrojů již v letech 1990 až 1992. V té době přicházelo asi jako jediné technologicky dostupné řešení využití standardního sériového rozhraní RS-232, které v té době bylo běžně na počítačích

[1] Především se jednalo o vývoj automatizovaného analyzátoru aminokyselin se dvěma pumpami, spektrofotometrickou detekcí na dvou vlnových délkách, který ještě navíc k základnímu chromatografickému řízení požaduje průběžné řízení teploty na koloně a přepínání mobilních fází i použitého barviva pro předkolonovou derivatizaci.

třídy PC integrované. Přesto, že v současné době toto rozhraní na počítačích často nenajdeme, omezený koncept komunikace po jednom vyhrazeném sériovém dvoubodovém spojení s nadřazeným počítačem v podstatě převládá. Často je sice vlastní přenos dat realizovaný pomocí moderních multiplexovaných sběrnicových technologií, USB, IrDA, Bluetooth atd., ale často tyto sběrnice slouží pouze k vytváření virtuálních kanálů, které se poté chovají stejně, jako původní sériové rozhraní. Množství zařízení skutečně uvnitř i obsahuje samostatný čip převodu protokolu sběrnice na klasické signály RS-232, které jsou přivedeny na řídicí mikrokontrolér. Přitom i řešení schopná připojit k jednomu portu počítače více zařízení často neumožňují přímou komunikaci mezi zařízeními. Například i nejrozšířenější USB rozhraní je (kromě výjimky ve výměně rolí při použití OTG) čistě master-slave systém, kde bez vyslání požadavku nadřazeným počítačem není další komunikace možná. Přitom připravované projekty počítaly s tím, že bude potřeba koordinovat činnosti mezi zařízeními zapojenými do chromatografické sestavy a představa propojování množství kabelů pro dvoubodová spojení nebo používání samostatných vodičů přenášejících jednotlivé logické a analogové signály již v té době byla podle vývojářů nepřípustná. Stejně tak vybavení počítače větším množstvím rozhraní a zajištění synchronizace přístrojů pouze přes centrální počítačový systém se jevilo jako problematické. Minimálně některé aplikace vyžadují správně koordinované odstavení přístroje i v případě kdy řídicí počítač selže.

V chromatografických sestavách byly uvažované především následující datové a řídicí přenosy

- přenos dat reprezentujících měřený signál z detektoru do řídicího počítače obstarávajícího sběr dat. Pro uvažované detektory se jedná přibližně o desítky čísel v plovoucí řádové čárce za jednu sekundu. Případ použití detektorů snímajících celá spektra nebyl v té době uvažovaný a v dnešní volbě by bylo asi nejvýhodnější a nejlevnější takový detektor připojit přímo k USB rozhraní. Vlastní požadavky na případné latence přenosu jsou pro případ záznamu relativně volné, datové vzorky však nesmí být vynechány. Není tedy problém data posílat po určitých dávkách. Omezení na zpoždění a velikost dávek je dané jak velikostí vyhrazené paměti v detektoru tak požadavkem na dostatečně aktuální zobrazení průběhu signálu sledovaného uživatelem. Zpoždění okolo jedné sekundy tedy není problém. Situace se poněkud mění při využití kombinace detektoru, nadřazeného počítače a dalších přístrojů pro automatizované sbírání frakcí, ale i v tomto případě postup úseku příslušnému detekovanému analytu (čela píku) kapilárou ke sběrači nebo ventilům trvá typicky déle než jednu sekundu. Předpokládaný čistý datový tok je tedy pro dostatečně rychlé vzorkování 25 Hz a 4 byte na jeden vzorek přibližně 100 byte/s.

- průběžná kontrola stavu přístrojů, informace o aktuálních tlacích v kapalinové soustavě, teplotách kolony. Opět děje nejsou tak rychlé, aby zpoždění a

vzorkování okolo jedné sekundy bylo nedostatečné.

- průběžné řízení přístrojů z nadřazeného počítače, především se jedná o různé přepínání ventilů, případné přestavení vlnové délky za běhu analýzy a další funkce jako je sbírání frakcí.

- průběžné řízení koncentrací míchaných složek mobilní fáze při použití gradientu na straně nízkého nebo vysokého tlaku. Zde je požadovaná plynulá a dostatečně rychlá interpolace mezi jednotlivými body zlomu. Avšak většinou je požadované aby i samostatné vysokotlaké čerpadlo umožňovalo vytváření koncentračního nebo někdy i průtokového gradientu samostatně i bez použití nadřazeného počítače. Vzhledem k tomu, že musí být přístroj vybaven uživatelským vstupem pro zadání programu a požadavky na časování jsou relativně přísné, je výhodnější i v případě propojení s nadřazeným počítačem provést nahrání celého průběhu (jednotlivých bodů zlomů interpolovaných úseků) přímo do čerpadla před zahájením analýzy a poté pouze provést spuštění interpretace programu.

- nastavení parametrů všech přístrojů před analýzou, jedná se především o nastavení vlnové délky, parametrů filtrace signálu detektoru, průtoků a koncentrací čerpadel, teploty kolony a dalších. Vzhledem k předchozímu bodu lze předpokládat v tomto čase i přenos časového programu do čerpadla.

- řízení automatického dávkovače vzorku, pokud je použit. Především je potřeba nastavit požadovanou pozici a spustit naplnění dávkovací smyčky a její nadávkování do toku mobilní fáze.

- vlastní okamžik odstartování analýzy může být daný buď požadavkem na počítači, pak je potřeba poslat povel do čerpadla a dalších přístrojů, nebo je daný okamžikem, kdy dokončí přípravu vzorku automatický dávkovač a provede otočení dávkovacího ventilu. Je tedy vhodné posílat informaci do sestavy přímo z přístroje a i přímo odstartovat program v čerpadle a tím se vyhnout zpožděním způsobeným použitým operačním systémem na řídicím počítači. Při manuálním dávkování je pak většinou analýza spouštěna spínačem umístěným na dávkovacím ventilu. Tento signál je pak nejčastěji přiveden na čerpadlo a to se stará o přeposlání signálu dál.

- komunikace mezi dvěma čerpadly při jejich kombinaci pro tvorbu vysokotlakého gradientu. Mezi čerpadly je nutná synchronizace zapínání a především rychlého zastavení v případě detekce poruchy nebo vysokého tlaku. Čerpadla by měla umožňovat propojení do této konfigurace i bez nadřazeného počítače. Implementace řízení gradientu pak předpokládá, že jedno čerpadlo se stává nadřízeným a přeposílá průběžně požadavky na průtok počítaný pro druhé

čerpadlo podle svého časového programu průtoku a koncentrací. Zde je nutná dostatečně krátká latence pod alespoň jednu sekundu.

- další rozšířené plánované funkce. Například přenos informace o zjednodušené detekci píků přímo v detektoru do sběrače frakcí.

- případná možnost přidání dalších nadřízených systémů a operátorských panelů pro složitější sestavy. Této možnosti například využívá již zmíněné použití v automatickém analyzátoru aminokyselin, kde je přístroj vybaven jedním společným lokální operátorským panelem pro servisní úkony, čištění pump a sledování činnosti přístroje. Přístroj je sice realizovaný tak, že jeho provozní činnosti jsou centrálně řízené z nadřazeného počítače, ale v případě jeho havárie nebo uváznutí přebírá koordinaci řízeného vypnutí všech modulů právě lokální panel.

Z výše uvedených hlavních směrů a požadavků na komunikaci mezi přístroji (případně moduly sestavy) je patrné, že by zvolené řešení mělo podporovat nejenom připojení více přístrojů k jednomu komunikačnímu rozhraní řídicího počítače, ale že by se mělo jednat o řešení, ve kterém jsou si všechny uzly sítě minimálně na spodních komunikačních vrstvách rovnocenné a mohou při dodržení zvoleného postupu iniciovat komunikaci samostatně. Přitom požadované řešení muselo být levné a samotné mikrokontroléry na navrhovaných přístrojích měly z komunikačních rozhraní implementovaný jen jeden sériový port (UART). V době výběru vhodné komunikace se sice nabízely i další možnosti (CAN, ETHERNET, atd.), ale integrace těchto technologií přímo do řídicích mikrokontrolérů nebyla k dispozici a samostatná obvodová řešení bylo relativně nákladné. Pro složitější komunikační protokoly, jako je například ETHERNET nebo nad ním postavené TCP/IP, byla jejich implementace v omezeném paměťovém prostoru navrhovaných řídicích systémů s procesory Intel 8051 a 32 kB paměti nezvládnutelná.

Přitom požadavek na levné a jednoduché propojení přístrojů a počítače minimálním počtem vodičů jednoznačně hovořil pro použití sběrnicové topologie s využitím jednoho sdíleného média. Ideální řešení by mělo umožňovat postupné propojování přístrojů jeden za druhý. Pro sdílení média je nejpřirozenější paketový přenos dat, který také umožňuje snadno data zabezpečit proti případným chybám a rušení. Protože se jedná o řídicí aplikaci pracující v reálném čase, je dobré zajistit detekci chyb a nápravu situace již na nižších komunikačních vrstvách. Proto je výhodné použít komunikaci, kdy může být vysílající strana rychle/okamžitě informovaná o úspěšnosti doručení dat po dokončení přenosu jedné zprávy a může již na této vrstvě zajistit po opětovném získání práva vysílat další pokus o předání dat. Kromě těchto provozních požadavků byly uvažované i další možnosti jako jsou ladění a nahrávání alespoň vývojových verzí firmware do jednotlivých zařízení. V původní úvaze se

uvažovalo o reálném propojení maximálně do deseti zařízení, ale protokol byl navržen obecněji a to se vyplatilo v jeho dalších aplikacích, kdy minimální požadavky narostly na možnost připojení až 50 zařízení.

Přenosy dat ve formě zpráv vyžadují definici komunikačního protokolu. Protokol by neměl vyžadovat nepřetržitý provoz všech přístrojů. Protože se jedná o přístroje s rozdílným množstvím vlastní inteligence, neměl by od nich vyžadovat znalost všech ostatních přístrojů připojených ke sběrnici. Měla by být alespoň částečně řešena situace, kdy dojde k přetížení sběrnice, tak, že se přístroje budou při obsazování sběrnice střídat. Protokol by neměl vyžadovat rekonfiguraci při výpadku nebo vypnutí některého přístroje. Protokol by měl umožňovat potvrzení doručení zprávy příjemcem odesílateli po úspěšném přenosu zprávy. Pro řízení jednoduchých slave přístrojů je nutné, aby bylo možné pro iniciátora spojení zpětně vyčíst informace ze slave. Komunikace s jedním přístrojem by neměla příliš zatěžovat ostatní přístroje, pro které není zpráva určena. Komunikace nemusí být příliš rychlá. Sběrnici by mělo jít snadno realizovat s bezpečným galvanickým oddělením (později pro aplikace v medicíně byl i minimální požadavek 4 kV) a s minimální možnou délkou 20 m. Přitom při nasazení v systémech průmyslové chromatografické separace by mohlo být potřeba využívat komunikaci i na delší vzdálenosti. V neposlední řadě je nutné, aby řešení bylo levné, nevyžadovalo speciální obvody a bylo použitelné i pro standardní počítače třídy PC.

7.1.2 Přehled dostupných řešení

Jako první byla uvažovaná komunikační sběrnice I^2C (Inter-Integrated Circuit-bus) NXP (2007). Tato sběrnice má velmi elegantně vyřešenou deterministickou arbitraci přístupu k médiu použitím sběrnicového součinu výstupů s otevřenými kolektory. Vyžaduje pouze dva vodiče (hodiny SCL a data SDA). Je relativně velmi rychlá (standard 100 kBd, dnes i přes 1 MBd). Výhodou je možnost zpomalit přenos ze strany přijímače libovolně dlouhým prodloužením stavu s vodičem SCL v nízké úrovni. Umožňuje kombinaci několika přenosů za sebou při opakované podmínce start. Umožňuje vyčtení informací z naadresovaného zařízení a kontrolu doručení zprávy. Zcela však neřeší rovnoměrné přidělování času mezi konkurující si iniciátory spojení (nejvyšší prioritu má minimální cílová adresa). Vyžaduje speciální hardware na straně připojení k PC a na straně přístrojů vyžaduje omezené množství procesorů vybavených tímto rozhraním nebo další obvody. Lze ji sice realizovat pouze softwarově, ale s velkými nároky na zatížení procesoru (při kombinaci s velmi jednoduchým hardwarem minimálně jedno přerušení na přenesený bit).

V době úvah o volbě protokolu již existovaly implementace v té době relativně nového protokolu ProfibusThomesse (2005); Bender – Katz (1993). V letech 1990 až 1992 byl pro běžné firmy nedisponující velkým kapitálem přístup k informacím

o této technologii[2] velmi problematický. Zkutečný stav a historie vývoje technologie Profibus jsou již dnes dobře dokumentované například v Felser – Sauter (2002). V době výběru se však idea obecně použitelné sběrnice Profibus FMS (Field bus Message Specification), u které probíhal proces její mezinárodní standardizace, jevila zajímavě a výhodou by bylo i její předpokládané rozšíření v oblasti průmyslových aplikací. Tuto sběrnici lze snadno realizovat při použití diferenciálního obousměrného dvoudrátového vedení s fyzickou vrstvou podle standardu RS-485. Přidělení oprávnění vysílat je vyřešeno předáváním tokenu. Je nutné znát adresu následujícího přístroje v logickém kruhu a zapojovat nové master přístroje do logického kruhu. Dále v případě výpadku nebo vypnutí přístroje musí dojít k rekonfiguraci kruhu a při ztrátě tokenu k vygenerování právě jednoho nového tokenu. Protokol umožňuje potvrzení a vyčtení informací z naadresovaného přístroje. Standardně se používá komunikace se start a stop bitem a osmi datovými bity. Řídící kódy jsou odlišeny od binárních dat pouze pozicí svého výskytu. K synchronizaci počátku zprávy se využívá časové prodlevy. Komunikace vyžaduje kontrolu všech znaků všemi přístroji a měření času mezi znaky. Přístroje schopné iniciování komunikace musejí znát své sousedy, minimálně svého následníka v logickém kruhu. Původní standard pro vzájemné předávání strukturovaných požadavků a dat mezi více účastníky komunikace později zdegradoval na obyčejné cyklické vyčítání bloků vstupně výstupních dat stylem master-slave a zachovaná zůstala jen možnost použití více master jednotek (přechod na Profibus DP). To se však autor tohoto textu dozvěděl až mnohem později. Hlavními důvody pro původní zavrhnutí této možnosti byla nedostupnost informací a bez použití specializovaných čipů relativně komplikovaná softwarová implementace, která by vyžadovala reagovat na všech přístrojích na všechny přenášené bajty a jim příslušná přerušení a to i pro zprávy určené jiným přístrojům. Udržování seznamů okolních master zařízení v omezených mikrokontrolérech by byla další komplikace. Na moderních výkonnějších mikrokontrolérech je již možné tento v podstatě nabízenými funkcemi primitivní, ale na dodržením obsáhlých norem a časování značně zkomplikovaný protokol, softwarově implementovat, jak ukazuje například prezentace projektu PBmasterTran (2009). Přesto je štěstím, že tento „otevřený“ standard nepronikl do navrhovaných přístrojů, protože je sice organizací Profibus International deklarovaný jako zcela otevřený Profibus International (2010), ale uvěření této zavádějící informaci má pro projekty opravdu míněné jako otevřené, nepříjemné důsledky ve více či méně skrytých hrozbách právních žalob, jak se stalo projektu PBmasterTran (2009–2010).

Z dalších protokolů dostupných v době návrhu komunikační technologie připadaly v úvahu HDLC, CAN a BITBUS. Ve všech případech se jedná o dobře propracované synchronní protokoly pro předávání zpráv, ale vyžadují použití specializo-

[2]Zainteresovanými v procesu standardizace a komercializace technologie Profibus deklarované jako optimální technologie pro průmyslové komunikace.

vaného hardware. V dnešní době je to již problém menší, množství mikrokontrolérů má již například integrovaný řadič CAN. Výhoda komunikačního protokolu CAN je, že dobře bezpečuje integritu zpráv, z pohledu obslužného software nabízí kompletní přenos celých zpráv v režii integrované periferie a tím snižuje zátěž procesorového jádra. Výhodou je i deterministický přístup k médiu prioritizovaný identifikátory zpráv. Naopak není v základních variantách vyřešeno rozdělování času mezi požadavky se shodnou prioritou, způsob arbitrace přístupu k médiu na časových intervalech jednotlivých bitů je důvodem k závislosti omezení celkové délky sběrnice podle použité přenosové rychlosti (asi 30 m při 1 MBd). Pro procesní data není maximální délka zprávy 8 bajtů podstatným omezením. Pro konfigurace a vyčítání popisů a stavu přístrojů je však nedostatečná. Vyšší vrstvy DeviceNET a CANopen sice přinášejí podporu přenosů delších zpráv, ale řešení se tím komplikuje a zároveň i v případě CANopen je přístup k datovým položkám slovníku (nikoliv procesním datům) jednoho zařízení z několika jiných zařízení velmi problematické. Nepříjemné je i to, že díky používání recesivních a dominantních úrovní na fyzické vrstvě ne jen během arbitrace, ale i během přenosu vlastních dat zprávy, je sběrnice celkem citlivá na způsob propojení a kromě dvou aktivních vodičů CANH a CANL je nutné vést i propojení zemnícího/referenčního vodiče. Přesto je komunikace na bázi sběrnice CAN v mnoha případech výhodná a v současné době ji mají i vývojáři ve firmě PiKRON zvládnutou a v některých zařízeních ji volili jako nejvhodnější. Pro vnější propojování chromatografických sestav se však stále nehodí jako nejvhodnější.

Celá další třída sběrnic vychází z technologie ETHERNET. Při původním návrhu byla pro danou třídu zařízení nedostupná. Dnes je již často na mikrokontroléry podpora integrovaná. Výhodou je řadič, který se stará o přenos celých zpráv (paketů) na nejnižší vrstvě. Nevýhodou je, že tato vrstva neposkytuje přímo mechanizmus pro potvrzování zpráv. Je tedy nutné použít vrstev vyšších. Z hlediska rozšíření je ideální volba použití TCP/IP. Jeho implementace při požadavcích na malou paměťovou náročnost je i v dnešních jednočipových mikrokontrolérech problematická, jak je ukázané třeba v Barák (2010). Zajímavou volbou by pravděpodobně bylo řešení na bázi ETHERNET PowerlinkSYS TEC electronic GmbH (2010). V právě probíhající rozvaze a návrhu již třetí budoucí generace elektroniky pro chromatografické přístroje se tedy s připraveností na použití některé z těchto technologií sice v návrhu hardware počítá, ale vzhledem k požadovaným koncovým cenám a paměťovým omezením se z cenových důvodů vybraných kontrolérů se spíš masivnější využití stále nepředpokládá. Zásadní nevýhodou dnešních technologií na bázi ETHERNET je i to, že se již nejedná o klasické sběrnicové řešení, ale je vyžadovaný centrální prvek – hub nebo switch.

Po zvážení výše uvedených možností se jako nejvýhodnější jevilo využít fyzickou vrstvu RS-485. V době návrhu však žádný vhodný a dostupný multi-master protokol nad touto vrstvou nalezen nebyl. Proto byl navržen a publikován protokol

nový. Od té doby k podobným závěrům došlo množství dalších zájemců o levnou a odolnou komunikační technologii. Většina z nich skončila u řešení na bázi master-slave. Z těchto řešení je dnes nejrozšířenější asi MODBUS. Z projektů, které si kladou za cíl vytvoření multi-master technologie zajímavý protokol BACnet MS/TP Karg (2010). Většina dalších, později vniklých protokolů, je i při dnešním srovnání s výsledkem dále popsaného návrhu nezajímavá.

7.1.3 Návrh protokolu nad fyzickou vrstvou RS-485

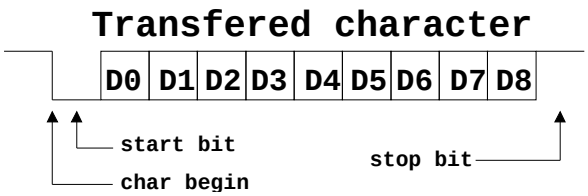
Návrh byl veden snahou minimalizovat požadavky na hardware, proto byl zvolen běžný způsob serializace a deserializace bytů/znaků tak, jak ho nabízelo sériové asynchronní rozhraní (UART) použitých mikrokontrolérů. Každý přenášený znak zprávy tedy začíná start bitem a končí stop bitem. Je to sice určité plýtvání šířkou přenosového kanálu, ale na druhou stranu jsou tím sníženy požadavky na přesnost použitých oscilátorů. Modernější řešení na bázi vkládání bitu opačné hodnoty při výskytu sekvence určité délky shodných bajtů by použití standardního UARTu vylučovalo. Mezi znaky jedné zprávy se vzhledem k nové synchronizaci na začátku každého znaku mohou vyskytovat určité prodlevy. Dává to určitou rezervu pro případy přetížení procesoru při vysílání. Na straně příjmu je správnou funkci v případě přetížení procesoru možné zaručit pouze pro případy, kdy je rozhraní UART vybaveno vyrovnávací pamětí FIFO. U použitého mikrokontroléru se na straně příjmu ovšem nalézá za deserializátorem jen registr pro uložení jediného znaku. Pro oddělení řídicích znaků využívá řešení možnosti velkého množství mikrokontrolérů přenášet znaky o délce 9 bitů a generovat přerušení pouze při příjmu znaku s nastaveným 8 bitem (při počítání bitů podle vah od 0, dále D8). Podporu této vlastnosti mají rodiny mikrokontrolérů na bázi I8051, I8096, I80196, MC68332, MSP430, MPC5200, AT91SAM a další. V mnoha případech lze tohoto typu přenosu docílit i na řadičích UART, které k devítibitovému přenosu nebyly původně určené. Často je totiž možné volit režim programového nastavení paritního bitu tak, jak toho bylo docíleno softwarovým řízením osmého bitu i na standardním sériovém rozhraní počítačů třídy PC. Při původním návrhu se jako velmi elegantní řešení jevilo navrhnout pro počítače rozšiřující kartu s obvodem INTEL i82510[3], který byl přímo pro devítibitovou komunikaci navržený. Díky tomuto rozlišení řídících znaků a adres od dat není nutná kontrola všech znaků všemi přístroji a dochází k menšímu výkonovému zatížení jednotek, pro které není zpráva daná určena. Pro protokol bylo nutné vymyslet způsob arbitrace přístupu ke sběrnici, zabezpečení dat proti chybám a formát

[3] Taková zásuvná karta pro sběrnici ISA byla skutečně později navržena a dodávaná. V současných počítačích třídy PC však již karta s ISA rozhraním využití nemá a PiKRON přešel na karty Tedia PCI-1602 pro sběrnici PCI s čipem OX16C954. Přesto jsou i PCI karty s ekvivalentem I82510 dostupné a zdá se, že se jedná o relativně současné návrhy. Například karty NBS-41 firmy Cimetrics pro sítě bacNET.

zpráv.

7.1.4 Formát zpráv protokolu μLAN

Datový rámec je základní jednotkou komunikace podle protokolu μLAN. Rámec obsahuje svojí cílovou adresu (adresu uzlu, všeobecnou adresu nebo neadresný začátek odpovědi), zdrojovou adresu, typ nebo také příkaz rámce, koncovou značku a kontrolní znak. Rámec se zakládá ze sekvence 9-bitových znaků. Znaky jsou přenášeny asynchronně, takže přenos každého znaku začíná start bitem, pokračuje devíti datovými bity a končí stop bitem. Celková doba přenosu tedy odpovídá 11 bitovým časům, viz obrázek 7.1. Celková délka přenosu znaku je tedy rovná 11 bitovým časům. Řídicí znaky jsou přenášené s nastavený bitem D8. Řídicí znaky se vyskytují jen na začátku a konci datového rámce.

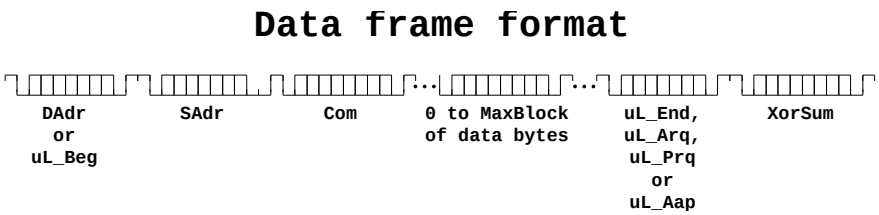


Obrázek 7.1: 9-bitový formát znaků

Datový rámec začíná řídicím znakem odpovídajícím adrese cílového uzlu sítě (DAdr) nebo indikujícím začátek neadresné odpovědi (uL_Beg). Příjem řídicího znaku aktivuje všechny uzly sítě, které po jeho zpracování rozhodnou, jestli jsou následující znaky rámce pro danou stanici určené. Druhý znak rámce (již s D8=0) nese adresu zdrojového uzlu (SAdr). Následuje pak typ příkazu neseného daty rámce (Com). Položka Com na straně příjemce určuje, pro kterou službu (např. přístup k datovým položkám) je určen nebo jaký příkaz (např. vyčtení paměti) se má vykonat. Dále pak následuje vlastní tělo s daty přenášenými rámcem. Tyto znaky jsou také přenášené s nulovým bitem D8. Vlastní délka přenášených dat není do přenášených informací zahrnuta. Zpráva může obsahovat prázdná data nebo počet znaků do pro danou aplikaci určeného maxima tak, aby při komunikaci po síti nedocházelo k překročení maximálního přípustného času blokování požadavku na přenos z některého uzlu. Softwarový návrh a velikost vyhrazené paměti pak u většiny zařízení umožňuje pracovat s rámci obsahujícími až 2 kB. Konec dat je ohraničen jedním ze řídicích znaků zakončení rámce, který je následovaný kontrolním znakem pro zajištění integrity dat (xor_sum). Z důvodů omezeného výpočetního výkonu použitých mikrokontrolérů byl volen relativně jednoduchý způsob jeho výpočtu. Jedná se o postupné kumulativní provádění operace XOR nad přicházejícími daty, přitom je za každou operaci XOR vloženo přičtení jedničky. Jednička se přičítá proto, aby se

zvýšila pravděpodobnost rozeznání úplného výpadku přenosu některého ze znaků zprávy. Operace se provádí nad všemi předcházejícími znaky rámce včetně znaku nesoucího cílovou adresu (DAdr).

Koncový znak rámce může nabývat jedné ze čtyř možných hodnot (uL_End, uL_Arq, uL_Prq, uL_Aap). Jeho volba pak určuje způsob potvrzování a zpracování rámce na nejnižší úrovni protokolu:



Obrázek 7.2: Formát datového rámce μLAN

uL_End běžný konec rámce. Rámec má být uložen do vstupní fronty.

uL_Arq zpracování dat rámce je v případě korektního příjmu shodné s předchozí možností, ale přijímací strana je žádaná o vyslání potvrzení po dokončení příjmu rámce. To se provádí vysláním znaku potvrzení (uL_ACK). V případě zjištění chyby v rámci je možné vyslat negativní potvrzení (uL_NAK). Potvrzení musí být příjemcem vyslané po minimální prodlevě délky jednoho znaku za příjmem kontrolního součtu, která zajišťuje čas na přepnutí směru budičů sběrnice. Prodleva začátku vysílání potvrzení nesmí překročit tři časové úseky přenosu znaku, protože pokud strana vysílající rámec nepřijme do čtyř znakových dob odpověď, předpokládá chybu přenosu nebo výpadek přijímacího uzlu a tuto situaci zpracovává stejně jako případ negativního potvrzení. Pro informaci vysílací strany o nepřijetí dat z důvodu přeplněné vstupní fronty je vyhrazený samostatný typ negativního potvrzení (uL_WAK) s významem „prosím o strpení“. Využití této možnosti pomáhá v situaci, kdy určitý uzel nemůže data přijmout a tím buď na vysílací straně musí být rozhodnuto o skartování (potenciálně kritické potvrzované) zprávy nebo postupné opakování snahy o přenosy zbytečně zatěžuje sběrnici a blokuje ve výstupní frontě vysílacího uzlu zprávy pro jiné, na příjem připravené uzly. Vysílací uzel může v případě přijetí této žádosti pozdržet na určitou dobu komunikace s takto odpovídajícím uzlem. Volba uL_Arq nemůže být specifikovaná pro rámce s všeobecnou cílovou adresou, protože snaha více uzlů o vyslání potvrzení ve shodném časovém okně by vedla ke kolizi budičů na sběrnici.

uL_Prq zakončení s požadavkem na okamžité zpracování rámce a případné zaslání okamžité odpovědi. Způsob zpracování rámce je daný hodnotou příkazu

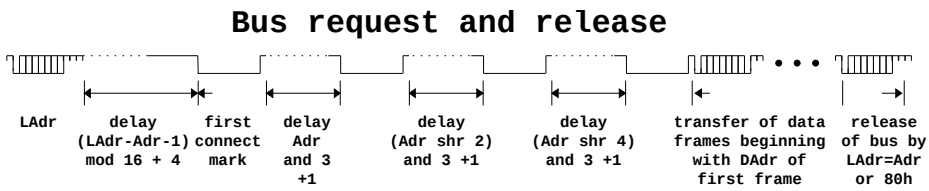
(Com). Numerické hodnoty příkazů pro tento typ rámce by měly být větší něž 80h. Zpracování rámce může vést k příjmu a zpracování následujícího rámce nebo k vyslání rámce s přímou odpovědí (například se jedná o ladicí příkazy a čtení a zápis do paměti).

uL_Aap zpracování je stejné jako v případě uL_Prq, ale před vlastním zpracováním se vyžaduje vyslání potvrzení příjmu rámce. V případě, že není možné rámec zpracovat je doporučené vyslat uL_NAK a tím uvědomit vysílací stranu, že příkaz nemůže být zpracován.

Obecný tvar datového rámce podle protokolu μLAN je znázorněný na obrázku 7.2. Kompletní popis je pak v aktuální, trvale udržované verzi k dispozici na stránkách projektu `http://ulan.sourceforge.net` – v seznamu literatury Píša – Smolík (2004–2010). Projekt byl prezentován i v rámci různých setkání odborníků v oblasti řízení Píša – Smolík (2005).

7.1.5 Řízení arbitrace přístupu ke sběrnici

Fyzická vrstva RS-485 neobsahuje žádný standardní mechanizmus pro rozpoznání kolize (současné snahy vysílat z více uzlů). Kolize může být pouze s určitou pravděpodobností rozpoznaná tehdy, pokud některý z přijímajících uzlů detekuje chybu v přijatých datech (v případě μLAN v xor_sum). Protože protokol μLAN nepředpokládá vysoké rychlosti a zároveň je navržený pro použití v řídicích aplikacích, není možné spoléhat na nejistou detekci kolizí a i nedeterministické chování a ještě další zvyšování zátěže sítě opakováním pokusů o vysílání v době, kdy již dochází ke kolizím, by situaci ještě zhoršovalo. Na druhé straně využití centrální arbitrace přístupu nebo předávání oprávnění vysílat vede k snížení odolnosti sítě na výpadek určitého uzlu a vyžaduje relativně komplikovaná řešení na nápravu takové situace. Přitom část přenosového pásma musí být věnovaná na dotazování, případně předávání oprávnění vysílat. Z těchto důvodů bylo rozhodnuto hledat distribuovaný deterministický algoritmus pro arbitraci přístupu ke sběrnici.



Obrázek 7.3: Arbitrační sekvence μLAN

Fyzická linka RS-485 může být za určitých okolností využita k realizaci funkce součinu na vedení (wired-and). K použití je potřeba aby zakončovací odpory v zaří-

zeních byly připojeny k předem definovaným napěťovým úrovním s určitým rozdílem, nebo aby měly diferenční přijímače sběrnice jednostranně posunuté rozhodovací úrovně. V navrženém případě je použito první řešení, přitom i většina používaných budičů a přijímačů má v určité míře implementovanou i druhou možnost. Na základě této vlastnosti sběrnice lze již celkem snadno navrhnout deterministickou přístupovou metodu, která využívá neaktivní a jedné vysílací/dominantní úrovně budiče k zajištění arbitrační sekvence vedoucí k výběru právě jednoho uzlu s oprávněním vysílat. Postupně totiž každý uzel, který rozpozná dominantní úroveň v době kdy vysílal úroveň neaktivní, odstoupí od požadavku v daném okamžiku vysílat. Vlastní arbitrační proces využívá 11-krát pomalejší časování změn úrovně něž je bitová rychlost přenosů znaků rámců, což představuje dostatek času na propagaci úrovní i dlouhým vedením a kompenzuje horší dynamické vlastnosti přenosů s jednou neaktivní úrovní, kdy jsou návraty do této úrovně negativně ovlivněny kapacitou vedení.

Deterministické arbitrace je dosaženo zavedením dále popsaných pravidel pro časování sekvence. Sekvence sestává ze správně načasovaného vysílání znaků přerušení (break), při kterých je vždy na dobu 11 bitových časů nastaven budič sběrnice do stavu vysílání dominantní úrovně logická nula. Poté je na určitý násobek této doby budič deaktivován a uzel sleduje, jestli dojde k návratu úrovně na sběrnici do neaktivního stavu. Veškeré časy jsou definované v násobcích doby přenosu jednoho datového znaku (11 intervalů bitového přenosu), takže k implementaci není potřeba další časovač, protože k časování lze využít informaci o ukončení vysílání znaků s vypnutým budičem (takzvaně do prázdna).

Vlastní sekvence začíná čekáním na interval klidu (T_{arbW}) na sběrnici odpovídající přenosu 4 až 20 znakových intervalů. Poté odstartuje vysílání arbitrační sekvence vysláním prvního break znaku. Požadovaná délka klidového intervalu je pro každý uzel spočítaná ze spodních bitů rozdílu numerické hodnoty vlastní adresy uzlu a adresy posledního uzlu, který měl právo vysílat a ukončil jeho držení vysláním řídicího znaku obsahujícího jeho adresu a nastavené bity D7 a D8.

$$T_{arbW} = ((LAdr - Adr - 1) \bmod 16 + 4) \cdot T_b \tag{7.1}$$

V předpisu $LAdr$ představuje adresu předchozího uzlu oprávněného vysílat, Adr v tomto případě představuje vlastní adresu uzlu, který oprávnění k vysílání chce získat a T_b je doba přenosu jednoho bitu. Protože v této fázi arbitrace vyhrává ten uzel, pro který vychází tento čas nejkratší, dochází při korektním ukončování komunikačních cyklů k určitému zvýhodnění uzlů, které s požadavkem na vysílání neuspěly po nejdelší dobu. Řešení optimálně zajišťuje postupné pořadí k získávání práva vysílat, pokud snaha vysílat vyhází z maximálně 16 uzlů, jejichž spodní 4 bity adresy se neshodují. Při shodě již jednoznačné právo vysílat získává uzel s nižší numerickou hodnotou vlastní adresy. Tato část návrhu omezuje maximální počet plnohodnotných uzlů na sběrnici na 64. Při vyšších počtech uzlů než 16 a teoretickém

případu trvalého generování požadavků na vysílání z uzlů s překrývajícími se adresami již cyklické přidělování není zaručeno. V praxi to však zatím k problémům nevedlo. Přitom i tak je zaručeno jednoznačné přidělení oprávnění jednomu z uzlů, takže kolize je vyloučená. Arbitrační procedura musí řešit i situaci, kdy není cyklus s oprávněním vysílat korektně ukončen (uzel je vypnut, dojde k chybě) a při prvním pokusu o vysílání. Protože je obecně definované, že žádná prodleva mezi znaky uvnitř rámce ani v jedné skupině rámců (sezení, cyklu komunikace) nesmí přesáhnout 4 znakové doby, je detekce takového stavu hodnocena jako neohlášené ukončení řízení/obsazení sběrnice a všechny uzly v takovém případě nastaví svoji čekací dobu T_{arbW} na hodnotu 20. Obecně platí, že uzel, který v průběhu své čekací doby zaznamená na sběrnici aktivní úroveň, ze soutěže odstupuje a čeká na korektní ukončení (LAdr) nebo klidový stav. Obecně toto schéma snižuje pravděpodobnost kolize v další fázi arbitrace a spravedlivě rozděluje přenosovou kapacitu mezi až 16 zařízení. Přitom při použití delších datových zpráv je i spotřebovaná přenosová kapacita malá.

Zajištění plně deterministické a spolehlivé arbitrace pro až pro 64 zařízení je dosaženo vysíláním dalšího pokračování arbitrační sekvence třemi dalšími znaky break v dominantní úrovni oddělenými postupně intervaly $T_{arb,0}$, $T_{arb,1}$ a $T_{arb,2}$, které jsou napočítané podle vzorce

$$T_{arb,i} = ((Adr\,\mathrm{shr}(2 \cdot i)) \bmod 4 + 1) \cdot T_b \tag{7.2}$$

První detekce přítomnosti dominantní úrovně v některé z těchto prodlev vede opět daný uzel k odstoupení ze soutěže. Výsledkem je tedy úplná, plně deterministická arbitrace přístupu v síti s až 64 uzly. Průběh arbitrační sekvence je znázorněn na obrázku 7.3. Po dokončení arbitrace již vítězný uzel vyšle jeden nebo někdy i více datových rámců nebo po výzvě vyslaným rámcem přijme rámec s okamžitou odpovědí. Potom tento jím řízený cyklus/sezení ukončí vysláním řídicího znaku se svojí adresou podle dříve uvedených pravidel (D7=1, D8=1). Protože ostatní řídicí znaky mají všechny bit D7=0, je sledování obsazení sběrnice velmi jednoduché.

7.1.6 Analýza vlivu protokolu μLAN na propustnost sběrnice RS-485

Vlastní arbitrace představuje relativně dlouhou dobu a tím i spotřebovaná určitou komunikační kapacitu kanálu. Relativní spotřeba je nepřímo úměrná délce datových zpráv. Sběrnice se tedy hodí spíše pro přenosy delších zpráv slučujících přenos více položek do datové reprezentace zařízení nebo představující celou skupinu procesních dat. Protokol se nehodí na časté přenosy velmi krátkých zpráv. Celková doba spotřebovaná na jednu arbitrační sekvenci T_{arbAll} se pohybuje v intervalu

$$T_{arbAll} \in \langle 4 + 3 \cdot 2, 20 + 3 \cdot 5 \rangle \cdot 11 \cdot T_b \tag{7.3}$$

$$T_{arbAll} \in \langle 10, 20 + 35 \rangle \cdot 11 \cdot T_b \tag{7.4}$$

Celková doba přenosu jedné zprávy s jedním potvrzovaným rámcem je pak maximálně $T_{arbAll} + (3 + l_d + 2 + 4 + 1) \cdot 11 \cdot T_b$, kde l_d značí délku zprávy. Vzhledem ke kratším časům druhé fáze arbitrace pro nižší adresy uzlů a využití maximální doby první fáze pouze v případě, kdy opětovně o přístup žádá uzel se shodnou adresou (viz rovnice 7.1) tak průměrná doba přenosu zprávy v konfiguraci s 10 uzly s adresami 1 až 11 při plné saturaci požadavky na vysílání v každém uzlu vychází výhodněji, než je výše vypočítané maximum. Prodlevy mezi stanicemi (první fáze arbitrace) budou pouze $9 \times 5 \cdot 11T_b$ a $1 \times 13 \cdot 11T_b$. Druhá fáze pak bude nabývat po vyhodnocení rovnice 7.2 hodnot $7, 8, 9, 7, 8, 9, 10, 8, 9, 10, 11$ počítaných v délce přenosu jednoho znaku. Průměrná hodnota T_{arb} pak bude $(9.6 + 5.8) \cdot 11 \cdot T_b$. To je na zprávu celkem čas $(l_d + 25.4) \cdot 11 \cdot T_b$. Pro uvažovanou délku zprávy 256 B a nejběžněji v aplikacích sběrnice μLANpoužívanou přenosovou rychlost 19200 Bd pak vychází čas na odvysílání celkem deseti zpráv (díky rotaci priorit jedné z každé stanice) na 1.6122sekundy a zátěž daná arbitrací a veškerými dalšími řídicími informacemi okolo 10 % při uvažování délky znaku jako základní jednotky. Po započítání bitů D8 a i do určité míry pro synchronizaci hodin nezbytných[4] start a stop bitů je výsledek navýšení počtu přenesených bitů ku vlastní informační hodnotě zprávami přenesených dat 50 %. Pro velmi krátké zprávy je však navýšení výrazné. V uvažované konfiguraci pro zprávy o délce 8 znaků vychází 300 % (550 % v bitových časech).

Celkově tedy proces arbitrace přináší určitou zátěž, ale obecně je řešení výrazně jednodušší a nepotřebuje složité zotavovací sekvence jako se vyskytují u protokolů s předáváním oprávnění k vysílání (Profibus). Při porovnání se sběrnicí CAN nevychází protokol μLAN dobře pro krátké datové zprávy. Pro delší požadavky na přenosy do délek okolo 1 kB však nevyžaduje komplikované segmentování dat a nabízí lepší využití komunikační kapacity. Celková propustnost je však menší díky používání relativně nízkých komunikačních rychlostí. Pokud by byl protokol realizován v hardwarovém řadiči, tak by pro stejnou maximální délku vedení umožnil volit 10×vyšší datovou přenosovou rychlost a propustnosti sběrnice CAN by se blížil a pro delší zprávy vysoce překonal. Na rozdíl od sběrnice CAN však nenabízí protokol μLAN prioritizaci zpráv podle jejich identifikátoru. Na druhou stranu se alespoň částečně stará o rozdělování přenosové kapacity mezi více uzlů a určitý systém prioritizace by šlo pro kritické chybové zprávy zavést tak, že by při arbitraci těchto zpráv byla použita minimální doba v první fázi arbitrace o délce $4 \cdot 11 \cdot T_b$. Nevýhody při přenosu krátkých zpráv se však typicky při použití vyšších vrstev komunikace μLAN neuplatní, protože objektová vrstva přístupu k datovým položkám (uLan Object Interface) podporuje a preferuje slučování požadavků do jedné delší

[4]Synchronizační bity lze z velké části eliminovat vysíláním výplňových (synchronizačních) bitů pouze v případě, že v datech není po určitou dobu změna. Například u sběrnice CAN se používá „bit-stuffing“ pro zaručení synchronizace hodin pouze při výskytu posloupnosti 6 shodných bitů.

zprávy. Stejně tak je navržena i vrstva pro vytváření propojených kanálů určených k předávání procesních dat (uLan Connection Network).

7.1.7 Vyšší komunikační vrstvy protokolu μLAN

Nad v předchozích odstavcích popsanou nejnižší vrstvou protokolu jsou postavené další služby. Jedná se především o

- jednoduchou službu pro rychlou identifikaci připojeného uzlu sítě/modulu/přístroje/zařízení[5] (UL_CMD_SID)
- skupinu služeb pro nastavování komunikačních parametrů připojených modulů (uLan NCS – Network Control Messages)
- dynamické přiřazování adres a sledování dostupnosti a provozního stavu modulů (uLAN Dynamic Address Assignment)
- služba pro přístup k datovým položkám komunikačních slovníků jednotlivých modulů (uLan Object Interface Layer)
- podpora vytváření přímých komunikačních kanálů mezi jednotlivými moduly pro přenos procesních dat mezi mapovaných na položky slovníků (uLan Connection Network)

Označení v kulatých závorkách slouží k vyhledání kompletního popisu příslušné služby nebo konceptu v dokumentaci publikované a udržovaní v rámci projektu μLANPíša – Smolík (2004–2010); Píša (2004–2010). V dalším textu je prezentovaný jen rozbor návrhu služby pro přístup k datovým položkám modulů. Kompletní popis kódování této služby a informace o dalších službách dostupný na stránkách projektu zde nemá smysl duplikovat.

7.1.8 Přístup k datovým položkám zařízení – uLOI

Protože se při návrhu protokolu uvažovalo s jeho použitím pro širokou škálu přístrojů a modulů používaných v chromatografických systémech, byla hned od počátku zohledněna možnost, aby řídící systém mohl komunikovat se zařízeními, která v době tvorby a kompilace dané verze řídicího software nebyla ještě známá. Proto byl systém adresace a přístupu k datovým položkám (module property) navržen tak,

[5] V dalším textu se budou tyto termíny do určité míry vzájemně zastupovat, podle toho, jestli se jedná o teoretický uzel sítě, samostatný laboratorní přístroj, zařízení z dalších aplikačních oblastí sběrnice nebo modul sestavy tvořící jeden celek, jako je například automatický analyzátor aminokyselin. V základní terminologii vlastní implementace převažuje (vzhledem k původnímu určení) označení modul/module

že si řídící systém může napřed ze zařízení vyčíst popis jeho datového modelu. Protože se uvažovalo i o použití jednorázových programů a utilit, bylo toto vyčítání modelu navrženo tak, aby jednoduché aplikace mohly zařízení požádat jen o popis některých datových položek.

Protože vlastní komunikační rychlost byla pro sběrnici zvolena relativně nízká, bylo jasné, že je potřeba minimalizovat počty a délky zpráv pro datové přenosy používané pro vlastní čtení a zápisy z a do datových položek. Proto vlastní datové přenosy nenesou žádnou informaci o datových typech přenášených informací. Zároveň bylo potřeba zohlednit v návrhu velkou cenu arbitrace při rozdělení přenosů do více zpráv. Proto bylo potřeba volit řešení, které umožní uložit více požadavků pro čtení i zápis položek z jednoho zařízení do minimálního počtu zpráv.

Přenos datových položek byl tedy navržen tak, aby bylo možné jednou zprávou poslat více požadavků na čtení a zápis. Pro minimalizaci délky byl dále zvolen přímý binární systém ukládání dat i jejich identifikátorů. S výhodou se využilo toho, že vlastní spodní vrstvy protokolu nekladou žádné požadavky na vyhrazení určitých znaků z běžného 8-bitového rozsahu (bajtu) pro účely ohraničení a řízení rámců. Pro dosažení kódování s malým počtem přenášených bajtů jsou data každé položky pouze uvozena 16-ti bitovým číselným identifikátorem (dva bajty) a pak přímo následuje takový počet bajtů, který je schopný pojmout datový typ položky. Přitom některé položky mohou spouštět v modulu/zařízení určitou činnost v reakci na zápis a tak mají význam i položky s nulovým počtem datových bajtů. Vícebajtové datové typy i identifikátory jsou přenášeny v pořadí little-endian.

Číselný identifikátor tedy jednoznačně definuje význam následujících dat, která jsou přímo tímto identifikátorem směrovaná do určité položky nebo jiné typicky volbu přístupu nebo čtení popisů řídicí funkci. Obecně je tento identifikátor dat označován jako numerický identifikátor objektu (object identification number – OID). Souhrn všech datových položek a dalších funkcí je označený jako objektový slovník daného modulu (přístroje/zařízení). V jedné zprávě se pak může po počáteční 3 bajty dlouhé hlavičce opakovat větší počet dvojic (identifikátor OID, příslušná datová informace), přičemž délka je omezena dodržením limitu maximální délky zprávy pro danou sestavu. Specifický význam má OID=0, který zakončuje sekvenci a ve složitějších případech vrací zpracování dat o úroveň výše, jak bude ukázané dále. Sekvenci (OID, data) nejvyšší úrovně není však potřeba takto zakončovat. Některé datové položky mohou obsahovat složené datové typy, například pole. V takovém případě přenášená datová informace před vlastními datovými bajty obsahuje metainformační bajty, které například pro pole určují, se kterým indexem nebo rozsahem indexů se bude pracovat.

Podle tohoto konceptu jsou tedy data v nejvyšší úrovni přístupu do objektového slovníku podle svých identifikátorů předávaná/zapisovaná do datových položek. Pokud je zájem data číst, je možné do posloupnosti (OID, datová informace) vložit

identifikátor funkce zpracování požadavku pro čtení (ULOI_RDRQ). Tím jsou následující byte předané funkci pro zpracování operace čtení a zpracování se přepne do další úrovně. V té opět probíhá zpracování dvojic (OID, datová informace), ovšem vlastní datová informace v tomto případě obsahuje pouze metadata, pokud jsou pro přístup potřeba, vlastní data jsou prázdná. Zároveň je podle servisních informací v tříbajtové hlavičce přenosu otevřena zpráva pro zpětný přenos dat. Jak jsou jednotlivé dvojice (OID, prázdná data nebo pouze metadata) zpracovávané, jsou do zpětné zprávy ukládané hodnoty načtené z datových položek adresovaných OID. Protože se předpokládá i možnost asynchronního zpracování zpráv a využití vyrovnávacích pamětí na straně řídicího systému, jsou do zpětné zprávy ukládaná data tak, aby byl jejich zdroj plně identifikovaný. Ve zprávě se tedy za hlavičkou objeví informace, že se jedná o odpověď na požadavek čtení (ULOI_RDRQr) a pak následují položky kódované zcela stejně jako při přenosu dat do modulu, to je dvojice (OID, datová informace). Sekvence je jak na straně požadavku, tak v odchozí zprávě ukončena OID=0.

K vlastní interpretaci načtených dat i přípravě požadavků na zápis a čtení je tedy na straně řídicího systému potřeba plně znát informaci o přiřazení identifikátorů OID jednotlivým datovým položkám modulu a datové typy těchto položek. K tomu, aby mohl řídicí systém tyto informace získat, slouží standardizovaná skupina OID kódů ve vyhrazeném rozsahu 1 až 127, do kterého spadají i ULOI_RDRQ a ULOI_RDRQr. V tomto rozsahu jsou nabízené funkce, které umožňují vyčíst seznam všech použitých OID kódů rozpoznávaných na nejvyšší úrovni zpracování (obecně zápis do datových položek) i všech OID kódů známých funkci pro vyčítání datových položek. Pro jednotlivé OID kódy je možné se dotazovat na symbolická pojmenování příslušných datových položek, jejich datové typy a částečně i na interpretaci (např. počet desetinných míst). I tyto funkce jsou zpracovávané stejně, jako ostatní funkce přístupu do objektového slovníku, takže je lze slučovat a kombinovat v jedné zprávě a tím vyčítání popisu urychlit.

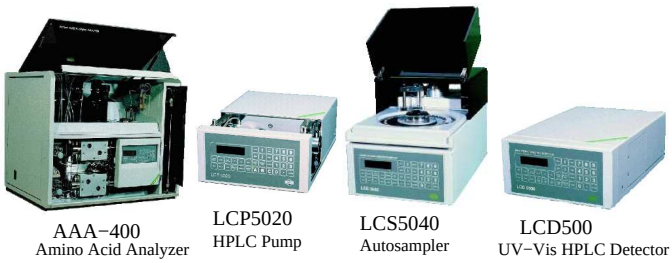
Aby bylo možné přistupovat i jen k jedné položce nebo jejímu popisu podle symbolického jména, je možné kód identifikátoru OID nahradit kombinací OID=ULOI_AOID následovanou textovým řetězcem nesoucím symbolické jméno položky. Zde je vhodné doplnit poznámku k zápisu a kódování textových řetězců. Protokol je ve všech vrstvách obecně binární a proto jsou řetězce přenášeny tak, aby mohly obsahovat veškeré možné binární hodnoty. Proto nejsou jak tyto, tak i ostatní datové řetězce ukončovány nulovým bajtem, jak je zvykem pro jazyk „C“, ale jsou přenášeny jako jeden byte určující délku 0 až 127 bajtů následovaným příslušným počtem bajtů. Na úrovni protokolu a datového modelu se pak přímo neřeší kódování národních abeced. Pro datový typ viditelného řetězce („vs“) se však počítá s tím, že sekvence bajtů reprezentuje řetězec kódovaný ve znakové sadě UTF-8. Výsledkem tedy je, že z hlediska vlastní komunikace nejsou s národními abecedami potíže. Při jejich použití je však

nutné počítat s tím, že délky datových položek pro ukládání řetězců udávají délky v bajtech, nikoliv ve znacích. Je tedy nutné při návrhu datových položek zohlednit možnost, že řetězec bude zabírat více bajtů, než bude zobrazovaných znaků.

Pro popis numerických datových typů je pak použita kombinace písmene a číslice reprezentující počet bajtů, do kterých je typ při přenosu zakódovaný. Písmeno „u“ je použito pro celá čísla bez znaménka, písmeno „s“ pro celá čísla se znaménkem a písmeno „f“ pro plovoucí řádovou čárku. Pro kódovaní hodnot v plovoucí řádové čárce se používá kódování podle standardu IEEE-754. Popis řeší i symboly pro kódování polí a struktur, viz podrobný popis Píša (2004–2010).

7.1.9 Aplikace komunikačního protokolu μLAN

Komunikace μLAN byla původně vyvíjena pro propojení přístrojů tvořících kapalinový chromatograf LC 4000. Našla však uplatnění i v sadě chromatografických přístrojů z další generace LC 5000. Popis spektrofotometrického detektoru LCD 5000 z této řady se nachází v kapitole 6 a alespoň přehled ostatních typů přístrojů se nachází v tabulce 7.1 a je ilustrován obrázkem 7.4. Komunikace byla též plánována pro nasazení v prostředí nemocnic pro monitorování činnosti infuzních pump IP 2050 a volumetrické pumpy VP 1000. Komunikace μLAN je i elektronickou páteří automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400. Protokol je používaný i ve výrobcích a aplikacích firmy Agrosoft Tábor s.r.o. od odečítání nádojů mléka až po dávkování krmení vepřům. Protokol byl využitý i minimálně v jednom projektu domovní automatizace řešeném jako hobby projekt a v dalším podobném projektu řešeném na komerční bázi. Obecně nasazení zahrnují přístroje a jednotky vybavené rozdílným množstvím paměti a s rozdílným stupněm autonomie.



Obrázek 7.4: Sada přístrojů řady LC 5000 a AAA 400

7.2 Chromatografický systém CHROMuLAN

Projekt CHROMuLAN nabízí otevřený software pro řízení chromatografických přístrojů, sběr dat a jejich následné vyhodnocení. Projekt byl založen Doc. Jindřichem

Označení	Funkce přístroje
LCD 5000	Spektrofotometrický UV-VIS detektor
LCP 5020	Vysokotlaké čerpadlo pro HPLC
LCP 5080	Vysokotlaké čerpadlo semipreparativní HPLC
LCS 5040	Automatický dávkovač
LCT 5100	Termostat kolon

Tabulka 7.1: Chromatografické přístroje řady LC 5000

Jindřichem z Katedry organické a jaderné chemie University Karlovy ve spolupráci s autorem textu. Vývoj byl financovaný firmou PiKRON s.r.o., která měla zájem nabídnout k sestavám svých plně digitálně řízených HPLC přístrojů[6] pro jejich uživatele finančně dostupný a funkce přístrojů dobře podporující chromatografický systém. Přitom většina chromatografických systémů byla v té době drahá a silně svázaná s velkými konkurenčními světovými výrobci. Protože projekt vznikl ve spolupráci s universitou a předpokládalo se i jeho používání a rozšiřování pro další účely i v dalších akademických institucích, byl projekt založený jako open-source s licencí GPL.

Pro začlenění detektorů nevybavených digitálním výstupem měřeného signálu byly postupně vyvinuté malé jednotky s konvenčními 20-bitovými AD převodníky. První byla jednotka ULAD 10, v současné době je k dispozici jednotka ULAD 31. Projekt je však otevřený, propojení s přístroji a zařízeními je umožněno vložením DLL knihovny s podporou daného rozhraní nebo digitalizační karty. I do základní distribuce je podpora některých takových zařízení zahrnuta.

Vývoj software byl spuštěn v prostředí Borland Delphi pro Windows. Tato volba byla poplatná době založení a v dnešní době ztěžuje přenos na jiné operační systémy. V současné době však začaly práce na přenosu vývoje projektu do prostředí FreePascal Lazarus, které již v posledních letech dosáhlo potřebné funkcionality.

7.2.1 Možnosti systému CHROMuLAN

- Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení chromatografických dat. Především se jedná o výpočty retenčních časů, ploch, výšek, pološířek píků a počtu teoretických pater kolon. Program pak umožňuje výstup tiskových sestav s výsledky.

- Manuální a automatické určení nulové linie, oblasti integrace jednotlivých

[6] V době jejich vzniku to nebylo zcela obvyklé a přenos dat byl také řešeném analogově na k tomu určenou zásuvnou kartu. Toto řešení včetně analogového řízení čerpadel v konfiguraci vysokotlakého gradientu je i dnes u mnoha levnějších systémů běžné a je to jediná možnost, jak často s různými chromatografickými systémy přístroje integrovat.

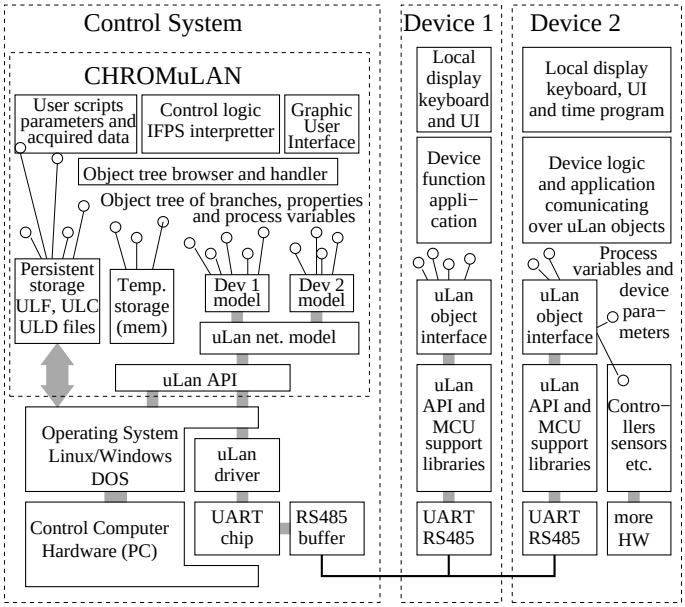
píků a přiřazení jmen analytů

- Pro výpočty koncentrací je možné použít měření s využitím vnitřního standardu, základní kalibrace po pících proti jednomu standardu nebo i víceúrovňovou kalibraci s využitím lineární, kvadratické a dalších aproximací napočítaných metodami nejmenších čtverců
- Systém v sobě přímo integruje podporu pro sběr dat, která mohou být získávána v digitální podobě několika metodami přes komunikaci μLAN nebo z rozšiřujících modulů zavedených ve formě DLL knihoven.
- Podporované je řízení přístrojů v čase, počáteční nastavení parametrů pro každou analýzu i příprava a přenos gradientních programů do čerpadel. Složitější přípravné a časové funkce mohou být na počítači řízeny interpretovanými skripty v jazyce Pascal
- Podpora přípravy a zpracování sekvencí vzorků a řízení automatického dávkovače.
- Počet paralelně zpracovávaných měřících kanálů je omezený pouze rychlostí a množstvím paměti počítače a propustností komunikačních rozhraní.
- Veškeré parametry pro počáteční nastavení přístrojů, časové a gradientní programy a další podmínky určující kontrolu chromatografické analýzy jsou stejně jako veškeré parametry kalibrací a vyhodnocení analýz ukládané spolu s naměřenými daty do objektově navržených souborů (*.ULF). Toto řešení umožňuje i úplnou zpětnou kontrolu všech podmínek týkajících se k daného vzorku. Zároveň nezávislost na databázovém systému umožňuje snadný přenos dat ve formě souborů i na jiný počítač. Zároveň každá analýza může sloužit jako zdroj/šablona pro provedení nové analýzy, což umožňuje jednoduché ladění parametrů a návrat k nejvýhodnějšímu stavu. Přitom jednotlivé skupiny nastavení – časové programy, metody vyhodnocení a nastavení řízení analýzy lze i exportovat a použít při přípravě nebo vyhodnocení dalšího vzorku samostatně.
- Díky otevřenému charakteru nepřináší program uživateli žádná umělá omezení. Je možné si ho i s daty přenést na libovolný počítač pro pozdější zpracování změřených vzorků mimo laboratoř.

7.2.2 Propojení přístrojů se systémem CHROMuLAN

Komunikace s přístroji je řešena přes nastavování a čtení položek datového modelu příslušnému každému přístroji. V případě komunikace μLAN se tyto modely vytvářejí automaticky při počáteční detekci přístrojů z popisu datových položek ve

slovnících jednotlivých zařízení. Položky publikují svoje jméno, datový typ, způsob zobrazení a lze určit, které jsou pouze pro čtení nebo pouze pro zápis. Z pohledu systému **CHROMuLAN** je možné při použití komunikace μLAN řídit i zcela nové zařízení s jehož datovým modelem nebyl systém dříve seznámen. K obrazům položek v datovém modelu lze přistupovat i z interpretovaných skriptů spouštěných například časovým programem a pro jednotlivé položky je možné i nastavit požadavek na jejich periodické obnovování z aktuálních hodnot přímo v zařízení. Koncept datového modelu a obrazů jednotlivých položek symbolizovaných jak na straně fyzických zařízení, tak v datovém modelu malými kroužky je vidět na obrázku 7.5. Vlastní obrazy datových položek jednotlivých zařízení jsou organizované v k tomu určené větvi[7] hierarchického úložiště dočasných, persistentních a dynamických dat v systému **CHROMuLAN**. Tato koncepce je stručně popsaná v dalším odstavci.



Obrázek 7.5: Architektura komunikace s připojenými přístroji

[7]Persistentní úložiště soubor „**ULD.ULD**“. Větev „Devices“(typ objektu ULD) / Jméno přístroje (ULDR) / Symbolické jméno datové položky v zařízení (ULDP). Vlastní informace o položce pak nese: jméno položky, komunikační datový typ, datový typ v systému **CHROMuLAN**, podpora čtení, zápisu, poslední hodnota vyčtená ze zařízení, poslední hodnota z pohledu počítače, stav přenosu a interval požadovaného občerstvování.

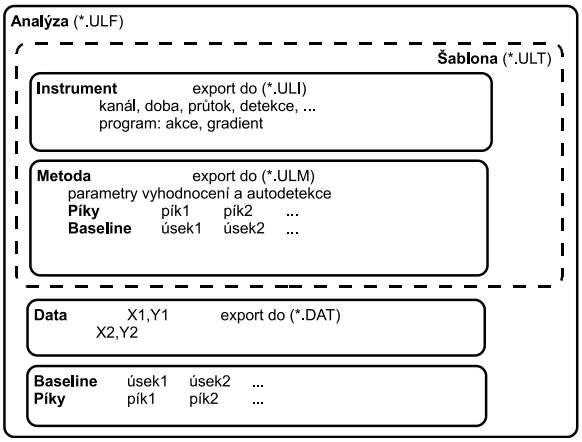
7.2.3 Architektura datových souborů a subsystémů

Veškeré informace, se kterými chromatografický systém **CHROMuLAN** pracuje jsou organizovaná do hierarchické podoby a umožňují jednotný přístup. Na každé úrovni tohoto stromu se nachází datové objekty, které reprezentují určitou informaci. Čtyřpísmenná značka určuje typ každého objektu. Pro každý typu jsou definované datové položky, které objekt obsahuje. Kromě tohoto pevně daného seznamu může objekt vytvářet svojí vlastní větev ve stromu, pod kterou mohou být uloženy další objekty (potomci/podobjekty objekty, child). Obecně by bylo možné do libovolné větve stromu přidávat objekty všech typů, ale pro dodržení logické struktury dat je pro každý objekt definované, které objekty se v jím nesené větvi/seznamu mohou vyskytovat. Chování a prezentace datových položek objektů pak může být v definici typů a struktury objektů přesněji specifikované. Jedná se především o informaci, jakým způsobem a jestli má být položka prezentovaná v tabulkách uživateli, jestli se jedná o hodnotu, která je pouze počítaná z jiných položek, jestli je položka perzistentní a má se její hodnota v určité podobě ukládat buď do konfiguračních nebo datových souborů atd.

Ukládání hierarchické struktury dat do souborů s sebou automaticky přináší požadavek na přenositelnost těchto souborů mezi různými verzemi chromatografického systému. Organizace serializovaných dat v souborech proto byla hned od začátku navržena tak, aby bylo možné zajistit ne jen dopřednou kompatibilitu při přechodu na vyšší verze programu, ale aby bylo i s minimální ztrátou informace možné načítat data vytvořená v novější verzi verzí starší.

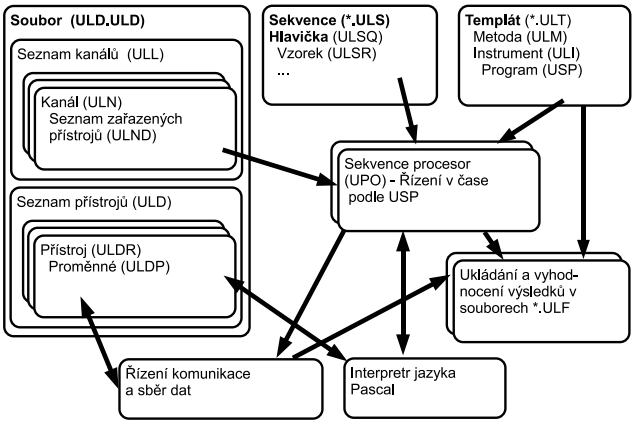
Nejcennějšími daty jsou vlastní záznamy a vyhodnocení analýz. Přitom z důvodu auditu a možnosti opakování je podstatné, aby bylo možné dohledat a nebo i znovu využít předchozí nastavení a naprogramování podmínek řízení analýzy a nastavení parametrů pro vyhodnocení. Vzhledem k tomu, že se počítá s tím, že by uživatel měl mít možnost bez větších potíží přenášet data i na jiný počítač bez nutnosti exportů a importů databází, byl zvolený koncept ukládat veškeré tyto informace dohromady s daty do jednoho souboru. Při otevření je pak datová struktura tohoto souboru zařazena do samostatné větve hierarchické reprezentace dat. Pro soubory se záznamy chromatografických analýz byla zvolena přípona **.ULF** a jejich struktura je patrná z obrázku 7.6. Kromě vlastních dat analýzy ve větvi Data (Cesta (ULA)/Raw Data) jsou v souboru uloženy parametry a charakteristiky nalezených píků, oblastí nulové linie, nastavení přístrojů a metoda, podle které byly píky a nulová linie vyhodnoceny.

Software může řídit více kanálů a zpracovávat množství analýz paralelně. Struktura funkčních objektů, která organizací z větší části kopíruje hierarchii datovou je pak patrná z obrázku 7.7. O vlastní řízení každé sestavy přístrojů se v případě zpracování sekvence vzorků stará vlastní procesor sekvence. Podle seznamu vzorků (Soubory ULS) k analýzám pak nastaví přístroje podle k vzorku přiřazeného šab-



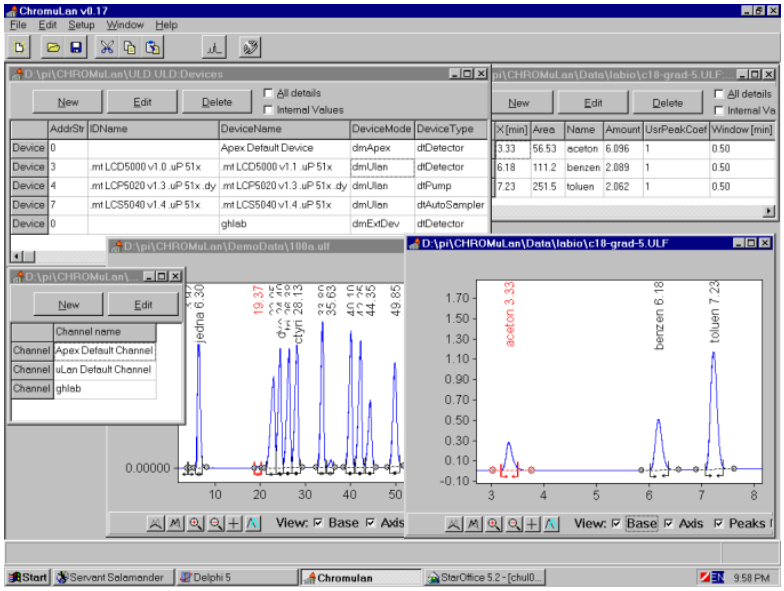
Obrázek 7.6: Hierarchická struktura datových souborů

lony/templátu analýzy (ULT) a po dokončení sběru dat tyto ukládá záznamy a výsledky do příslušných souborů (ULF). Přitom řízené přístroje a jejich organizace do sestav (kanálů) jsou reprezentované ve větvi ULD (viz odstavec 7.2.2).



Obrázek 7.7: Vazby mezi objekty a daty v systému **CHROMuLAN**

Vlastní uživatelské rozhraní programu s otevřenými několika analýzami a rozpracovaným jejich vyhodnocením je pak vidět na obrázku 7.8.



Obrázek 7.8: CHROMuLAN User Interface

7.2.4 Možnosti integrace testovaných metod vyhledávání píků

Z dříve uvedeného popisu programu **CHROMuLAN** je patrné, že se jedná o systém připravený pro další rozšiřování. Například rozšíření systému o možnost přípravy vícebodových kalibrací závislostí koncentrací na odezvách jednotlivých píků z několika analýz vzorků se známým složením sice vyžadovalo přidat nový typ souborů (ULC) s kalibračními údaji a další položky do metod zpracování analýz uložených v souborech ULF, ale obousměrná kompatibilita mezi verzemi byla zachovaná. Pouze načtením a úpravou ve starší verzi dojde ke ztrátě přiřazení vícebodového kalibračního souboru. Ostatní data však nejsou ovlivněna a standardní vyhodnocení je i ve starší verzi dále možné.

Integrace metod popsaných v kapitole 5 je tedy možná bez narušení kompatibility. Vlastní popisy jednotlivých píků (ULPR) je třeba rozšířit o příznak vyhodnocení s matematickým modelem a o položku s informací o zvoleném modelu píku. Vlastní parametry je pak asi vhodnější přidat do zatím prázdného seznamu možných potomků (pod objektů) jednotlivých píků. Toto řešení umožní nezatěžovat zbytečně data o pících ve standardním vyhodnocovacím procesu těmito daty a v případě potřeby jiné reprezentace a struktury parametrů je možné snadno typ tohoto záznamu vyměnit. Vlastní typ záznamu píku není možné zaměnit zcela jiným, protože je na něj vázané metody pro vykreslení značek a jmen v záznamu, tisk výsledků a dalších operací. Volby parametrů vyhledávání píků a nulové linie mohou být v parametrech analytické vyhodnocovací metody rozšířené. Ovšem pro většinu uživatelů je potřeba

udržet množství voleb na rozumné úrovni. Současná sada volitelných parametrů je pro uživatele srozumitelná a parametry matematických algoritmů (minimální sklon třetí derivace, šířka profilu gausiánu pro účely filtrace a další) je potřeba nalézt ze vztahů závislých na těchto uživatelských parametrech, jejichž stručný popis je uveden v kapitole 4 a plný popis v manuálu k programu PiKRON (2002).

Předzpracování signálu pro určení průběhu nulové linie již používá filtraci popsanou v odstavci 5.1.1. Tato metoda a následný postup nalezení úseků nulové linie na základě klasifikace úseků záznamu podle průběhu druhé derivace (jeden z postupů rozebíraných v 5.1.2) jsou již v programu využívané. Dalším možným rozšířením by bylo i přidání možnosti modelování průběhu nulové linie polynomem, ale ze zkušeností s naměřenými daty se zatím nejeví potřeba této metody jako prioritní. Odzkoušení možnosti nahrazení současného postupu automatického vyhledávání pozic pro umístění píků by naopak bylo výhodné doplnit možností volby algoritmu založeného na sledování třetí derivace signálu podle O'Haver (2001), které je součástí rozboru v odstavci 5.1.3.

Kapitola 8

Závěr

V práci zpracovávané projekty jsou základem bez kterého by nemohl projekt laboratorních přístrojů firmy **PiKRON** existovat. Přitom navržené technologie jsou v některých případech již užívané i pro zcela jiné aplikační oblasti nebo cizí zařízení. Komunikační protokol je v současné době používaný jak v domovní automatizaci tak v automatizovaných chovech zvířat v zemědělství. Projekt **CHROMuLAN** je využívaný i v kombinaci s přístroji a zařízeními jiných výrobců.

Vlastní návrh elektroniky a především podrobně rozebraného originálního řešení analogově číslicového převodníku se osvědčil jako velmi spolehlivý a vykazuje parametry, které zajisté pokrývají zpracování veškeré užitečné informace nesené měřeným elektronickým signálem. Jeho kvantizační i vlastnostmi reálných součástek daný šum je řádově menší než příspěvky na šum z jiných příčin (nejvíce se projevuje chemických a optický šum). V rámci vypracování této práce došlo k důkladné analýze a zdokumentování tohoto projektu.

V práci provedený rozbor zákonitostí a matematických možností zpracování chromatografického signálu přinesl minimálně autorovi tohoto textu výrazně širší rozhled v této oblasti a měl by být i dostatečným vstupním přehledem pro někoho dalšího, kdo by se chtěl problémem zabývat. V prostředí **Matlab** navržený soubor matematických algoritmů a nástrojů dosahoval dobrých výsledků. Původní představa při podání zadání byla, že se však podaří v této oblasti pokročit dále. K tomu autor práce předpokládal navázání spolupráce s někým s většími zkušenostmi v této oblasti. I přes množství snahy a vložení značných investic (včetně zapůjčení přístrojů, na základě kterého vznikly na jedné zahraniční univerzitě články o nové fyzikální metodě stanovení) se nakonec nepodařilo společný zájem s jiným odborníkem v oblasti matematického vyhodnocení nalézt. V poslední době odstartovalo několik **CHROMuLAN**u podobných otevřených projektů a autor předpokládá poskytnutí svých zkušeností a výpočtů do těchto projektů. Pokud se podaří zajistit financování nebo zájemce o spolupráci, tak předpokládá i dokončení integrace v práci publiko-

vaných řešení do spravovaného systému **CHROMuLAN**.

Od předložení zadání práce došlo i k výraznému rozvoji v implementaci a návrhu vyšších vrstev protokolu **μLAN**. Nad nově vytvořenými verzemi základního kódu byly implementované nové přístroje. V rámci práce došlo i k velkému pokroku v míře zdokumentování projektu.

Autor textu této práce by nikdy nebyl schopen popisované projekty realizovat sám a také by nikdy nevznikly, pokud by pro ně neexistovalo použití. Hlavní motivací, na základě které vznikal za účasti autora původní vývojový tým a poté byla založena firma **PiKRON**, byla snaha nabídnout moderní přístroje a zařízení vybavené otevřeným a značně konfigurovatelným prostředím řídicích a vyhodnocovacích systémů, které budou svým uživatelům spolehlivě sloužit po desetiletí. Po technické stránce se tohoto cíle podařilo dosáhnout a autor věří, že i další, ve stejném týmu již třetí navrhovaná generace elektroniky a řízení přístrojů opět tyto požadavky splní. Analýzy, rozbory a návrhy předložené v této práci pokrývají část z oblastí, které je pro budoucí vývoj projektů potřeba rozvíjet, a autor věří, že dosažené výsledky najdou v jeho i cizích projektech uplatnění.

8.1 Členové týmu a spolupracovníci

Ing. Ladislav Píša hlavní konstruktér všech mechanických přístrojů a zařízení firmy **PiKRON**, autor mechaniky a optické koncepce v práci popisovaného detektoru. Člověk nezlomný překážkami, politickými režimem i ekonomickými potížemi, který investoval do vývoje laboratorních přístrojů nejdříve v oblasti plynové chromatografie a poté chromatografie kapalinové již téměř padesát let svého života

Ing. Petr Porazil excelentní návrhář elektroniky, autor všech firemních návodů a obětavý spolupracovník ve všech oblastech od montování a testování elektroniky, přes ladění výrobních postupů mechaniky, optiky až po pomoc při prezentaci a podpoře zařízení

Doc. RNDr. Jindřich Jindřich, CSc zakladatel a po dlouho dobu hlavní správce projektu **CHROMuLAN**. Mimo v práci popisované projekty pak přední vědec Katedry organické a jaderné chemie University Karlovy, po dlouho dobu i správce stránek katedry a různých otevřených znalostních databází

Ing. Petr Smolík nezávislý dlouholetý uživatel a spolupracovník na projektu **μLAN**. Přispěl především odladěním ovladačů na systému Windows, spoluprací na jeho rozšíření o podporu převodníku **μLAN↔USB**, portaci na nové vestavné architektury i návrhu a odladění nových rozšíření protokolu

Ing. Pavel Píša autor textu této práce, spoluautor návrhu principu převodníku, zakladatel a hlavní vývojář projektu **μLAN**, přispěvatel, spolunávrhář architektury a autor většiny výpočetních postupů použitých v projektu **CHROMuLAN**. Autor návrhů a analýz týkajících se jak převodníku, tak oblasti vyhodnocení signálu. Mimo další také odborník a dlouholetý pedagog v oblasti vestavných a operačních systémů, elektroniky a procesorové techniky a Katedře řídicí techniky ČVUT FEL

Svým kolegům bych chtěl tímto poděkovat za pomoc, spolupráci a možnost být účastníkem svobodného tvůrčího díla. Za pomoc s korekturou a připomínky k textu práce náleží poděkování vedoucímu práce, kterým je Doc. Ing. Ondřej Vysoký, CSc. Cennou pomoc s korekturou a formátováním poskytli též moji kolegové z fakulty Ing. Ondřej Špinka, Ph.D. a Ing. Michal Sojka. Samostatného poděkování si pak zaslouží moje maminka

Ing. Jitka Píšová obětavá maminka a manželka, která v minulosti dlouhou dobu pracovala na návrhu a zavádění aplikačních metod plynové chromatografie. Poté se řadu let starala o zavádění a údržbu metod stanovení v oblasti biochemie.

bez její nezměrné pomoci, péče a podpory by nebylo možné firmu **PiKRON** založit, udržet a rozsáhlé projekty sloužící množství institucí, vědců, analytiků a pacientů realizovat.

Literatura

BARÁK, T. Zařízení pro vzdálený přístup ke sběrnici CAN po síti Ethernet. Bakalářská Práce, 2010.

BENDER, K. – KATZ, M. *The Fieldbus for Industrial Automation*. Prentice Hall, 1993. ISBN 978-0130126917.

BJÖRCK, Å. *Numerical Methods for Least Squares Problems*. Philadelphia : SIAM, 1996.

BOCHKANOV, S. *ALGLIB - cross-platform numerical analysis and data processing library* [online]. 2010. Dostupné z: `http://www.alglib.net/optimization/levenbergmarquardt.php`.

CARR, D. W. et al. An Extensible Object-Oriented Instrument Controller for Linux. In *In Proceedings of the Eighth Real-Time Linux Workshop (RTLWS8)*, 2006.

DATTORRO, J. Convex Optimization of a First-Order Sigma Delta Modulator. 1999.

FELSER, M. – SAUTER, T. The fieldbus war: History or short break between battles. In *Proc. IEEE Int. Workshop Factory Communication Systems (WFCS)*, s. 73–80, 2002.

GALASSI, M. et al. *GNU scientific library*. Citeseer, 2002.

HALKET, J. et al. Deconvolution gas chromatography mass spectrometry of urinary organic acids - Potential for pattern recognition and automated identification of metabolic disorders. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*. 1999, 13, 4, s. 279–284. doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19990228)13:4<279::AID-RCM478>3.0.CO;2-I.

HANZÁLEK, Z. – CAPEK, J. Channel backlog estimation in Lon-Works. *Fieldbus Technology-Industrial Network Standards for Real-Time Distributed Control. London; Berlin; Heidelberg: Springer*. 2003, s. 3–540.

INGOS. *Spectrophotometric Detector LCD5000 - User manual*. INGOS, Praha, April 2006. Dostupné z: `http://www.pikron.com/pages/products/support/manuals.html`.

JINDŘICH, J. – PÍŠA, P. *CHROMuLAN project* [online]. 2004–2010. Dostupné z: `http://sourceforge.net/projects/chromulan/`.

KARG, S. *bacNET SF.net project* [online]. 2010. [Online]. Dostupné z: `http://bacnet.sourceforge.net/`.

KOINIS, S. – TSATSAS, A. – KATAKIS, D. Use of the Wronskian determinant in the study of multicomponent systems. *Journal of Chemometrics*. 1991, 5, 1, s. 21–35.

KONG, H. et al. Deconvolution of overlapped peaks based on the exponentially modified Gaussian model in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal Of Chromatography A*. 2005, 1086, 1-2, s. 160–164. doi: 10.1016/j.chroma.2005.05.103.

LE, B. et al. Analog-to-digital converters. *IEEE Signal Processing Magazine*. 2005, 22, 6, s. 69–77.

NOVÁK, J. *Kvantitativní analýza kolonovou chromatografií*. Praha : ACADEMIA, 1981.

NXP. *UM10204 I2C-bus specification and user manual*. NXP - founded by Philips, 2007.

O'HAVER, T. An introduction to signal processing in chemical analysis. *Department of Chemistry and Biochemistry, University of Maryland, June*. 2001, 10.

O'NEILL, R. Algorithm AS 47: function minimization using a simplex procedure. *Applied Statistics*. 1971, 20, 3, s. 338–345.

OPPENHEIM, A. – SCHAFER, R. – BUCK, J. R. *Discrete-Time Signal Processing*. Englewood Cliffs : Prentice-Hall, 1999.

PIKRON. *CHROMuLAN - Basic instruction*. PiKRON, Praha, April 2002. Dostupné z: `http://www.pikron.com/pages/products/support/manuals.html`.

PÍŠA, P. *ulan Driver and Protocol Base Documentation* [online]. 2004–2010. Dostupné z: `http://ulan.sourceforge.net/index.php?page=3`.

PÍŠA, P. – PORAZIL, P. Suma-Integration Analog to Digital Converter, Idea, Implementation and Results. In HORÁČEK, P. – ŠIMANDL, M. – ZÍTEK, P. (Ed.) *Preprints of the 16th World Congress of the International Federation of Automatic Control*, s. 1–6, Prague, July 2005. IFAC.

PÍŠA, P. – SMOLÍK, P. uLan Communication Protocol for Laboratory Instruments, Home Automation and Field Applications. In *15th International Conference on Process Control 05*, Bratislava, 2005. Slovak University of Technology. ISBN ISBN 80-227-2235-9.

PÍŠA, P. – SMOLÍK, P. *uLan SF.net project* [online]. 2004–2010. [Online]. Dostupné z: `http://ulan.sourceforge.net/`.

Profibus International. *PROFIBUS is completely open. It was originally standardized* .. [online]. 2010.

PURNELL, H. *Gas Chromatography*. New York : John Wiley & Sons, Inc., 1962.

QIFENG, S. Design of CMOS Sigma-Delta modulators for audio applications. Masters Thesis, Technical University of Denmark, 2007.

SCHULZ-TRIEGLAFF, O. et al. LC-MSsim – a simulation software for liquid chromatography mass spectrometry data. *BMC bioinformatics*. 2008, 9, 1, s. 423.

ŠTULÍK, K. – BAREK, J. *Senzory*. Praha : VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-86238-20-3.

ŠTULÍK, K. et al. *Analytické separační metody*. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2005.

STURM, M. et al. OpenMS – An open-source software framework for mass spectrometry. *BMC bioinformatics*. 2008, 9, 1, s. 163.

SYS TEC electronic GmbH. *openPOWERLINK SF.net project* [online]. 2010. Dostupné z: `http://openpowerlink.sourceforge.net/`.

THOMESSE, J. Fieldbus technology in industrial automation. *Proceedings of the IEEE*. 2005, 93, 6, s. 1073–1101.

TORTOSA, R. et al. Systematic Design of High-Resolution High-Frequency Cascade Continuous-Time Sigma-Delta Modulators. August 2008, 30, 4, s. 535–545. ISSN 1225-6463. Dostupné z: `http://etrij.etri.re.kr/Cyber/servlet/GetFile?fileid=SPF-1218010445316`.

TRAN, D. K. *PBmaster SF.net project* [online]. 2009–2010. Dostupné z: `http://pbmaster.sourceforge.net/`.

TRAN, D. K. PBMaster - An Open Implementation of Profibus DP. In *In Proceedings of the 10th Real-Time Linux Workshop (RTLWS10)*, 2009.

WALDEN, R. H. Analog-to-digital converter survey and analysis. *IEEE Journal on selected areas in communications*. 1999, 17, 4, s. 539–550.

WENIG, P. – ODERMATT, J. OpenChrom: a cross-platform open source software for the mass spectrometric analysis of chromatographic data. *BMC Bioinformatics*. 2010, 11, 1, s. 405. ISSN 1471-2105. doi: 10.1186/1471-2105-11-405. Dostupné z: `http://www.biomedcentral.com/1471-2105/11/405`.

WIKIPEDIA. *Kapalinová chromatografie — Wikipedia, The Free Encyclopedia* [online]. 2010. Dostupné z: `http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=HPLC&oldid=5418270`.

ZÝKA, J. *Analytická příručka*. Praha : SNTL-ALFA, 1980.

Index

A_λ - absorbance, 16
λ - vlnová délka, 16
μLAN, 59
c - koncentrace, 16
h - výška vrcholu píku, 27, 29, 32
l - délka, 16
w - pološíře píku, 28, 29, 32
x_T - souřadnice x vrcholu píku, 27, 29, 32
účinnost separace, 12
ε_λ - absorbční koeficient, 15

absorbční koeficient, 16
absorbance, 16
adsorpce, 21
analyt, 9
analytický standard, 36
analytický vzorek, 36
AU - absorbanční jednotka, 65

break - znak přerušení vysílání, 97

chromatografie, 8
chromatogram, 9
CHROMuLAN, 1
Com - příkaz/typ/služba určení rámce, 94

dávkovací smyčka, 17
DAdr - adresa cílového uzlu, 94
datová položka (module property), 100
datový rámec, 93
desorpce, 21

eluát, 10
eluce, 9
eluent, 9

gradientní eluce, 17
gradientní separační metody, 11
gradientní ventily, 17

HPLC - High Performance Liquid Chromatography, 1, 8

identifikátor objektu (object identification number - OID), 101

kapacitní poměr, 24
kapalinová chromatografie (LC), 8
kapalinový chromatograf, 16
kinetika separace, 11
kolize, 96
kolona, 9
Kolonová chromatografie, 9

nulová linie, 36, 45

objektový slovník, 101
objemový průtok, 35
optický detektor, 13

pík, 9
pík gausovský, 27, 50
pík logaritmicky gausovský, 29, 51
pík lotencovský, 28
pík Pearsonův typu VII, 32
pík smíšený lorencovsko-gausovský, 31
pík s Voightovým průběhem, 31
patro kolony, 22

plynová chromatografie (GC), 8
průtoková optická cela, 13

redukovaný retenční čas, 23
retenční čas, 9, 10, 22
rozlišení analytů, 24

SAdr - adresa zdrojového uzlu, 94
separační faktor, 24
separace, 10
sorbent, 9
specifická odezva, 12
spektrofotometrická detekce, 13
standard, 14
start bit, 94
stop bit, 94

teoretické patro kolony, 23
termodynamika separace, 10

uL_Aap - konec rámce pro okamžití zpracování s potvrzením, 95
uL_ACK - potvrzení příjmu rámce, 95
uL_Arq - konec rámce s potvrzením, 95
uL_Beg - začátek neadresné odpovědi, 94
uL_End - konec rámce, 94
uL_NAK - negativní potvrzení rámce, 95
uL_Prq - konec rámce pro okamžité zpracování, 95
uL_WAK - požadavek na pozdržení a přeposlání rámce později, 95
uzel sítě, 94

vysokotlaká kapalinová chromatografie - HPLC, 14
vysokotlaké čerpadlo, 17

xor_sum - znak zajištění integrity dat, 94