

Kétdimenziós korreláció alkalmazása a kromatográfiában

Készítette:

Simon József

Vegyész Msc. szakos hallgató, 2. évfolyam



Pécsi Tudományegyetem,
Analitikai és Környezeti Kémiai Tanszék

Témavezető:

Dr. Felinger Attila

egyetemi tanár,

Analitikai és Környezeti Kémiai Tanszék

2012

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS.....	4
2. CÉLKITŰZÉS	6
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1. Perturbáció alapú kétdimenziós korrelációs spektroszkópia.....	7
3.2. Általános kétdimenziós korreláció	8
3.2.1. Diszkrét Hilbert transzformáció	9
3.2.2. Keresztkorrelációs analízis és a kétdimenziós korrelációs spektroszkópia kapcsolata 10	
3.2.3. Milyen információt adnak a kétdimenziós korrelációs spektrumok?	11
3.3. Adat előkezelési eljárások	13
3.3.1. Alapvonalkorrekción	13
3.3.2. Zajsűrés.....	14
3.4. Arányosítási eljárások [12]	14
3.4.1. Egység-variancia arányosítás	15
3.4.2. Pareto arányosítás	15
3.4.3. Általános arányosítás.....	15
3.5. Kétdimenziós korrelációs analízis a kromatográfiában.....	16
3.5.1. Kétdimenziós korrelációs gélpermeációs kromatográfia (GPC)	16
3.5.2. Minta-minta korrelációs spektroszkópia	17
4. Anyagok, eszközök és módszerek.....	19
4.1. A kétdimenziós spektrum tulajdonságainak megismerése	19
4.1.1. Kromatogramok generálása	19
4.1.2. Számítás	20
4.1.2.1. R.....	20
4.1.2.2. Parancssor	20
4.1.3. Átfedő csúcsok vizsgálata	21
4.2. Valós rendszeren mért kromatogramok vizsgálata.....	21
4.2.1. Kromatogramok	21
4.2.2. Számolás.....	23
4.3. Több kromatogram összehasonlítása	24
4.4. Gyakorlati alkalmazás	24
5. EREDMÉNYEK.....	26
5.1. A spektrumok tulajdonságai	26

5.1.1.	Azonos kromatogramok.....	26
5.1.2.	Csúcsmagasság változás.....	27
5.1.3.	Retenció idő változása.....	27
5.1.4.	Csúcsszélesedés	28
5.1.5.	Csúcsszélesedés magasság megtartásával.....	28
5.1.6.	Aszimmetrikus csúcsok	29
5.1.7.	Új csúcs megjelenése	29
5.1.8.	Átfedő csúcsok vizsgálata	30
5.2.	Valós rendszeren mért adatok.....	31
5.2.1.	Alapvonal korrekció és Savitzky-Golay simítás	31
5.2.2.	Arányosítás	32
5.3.	Több kromatogram összehasonlítása.....	34
5.4.	Gyakorlati alkalmazás.....	36
5.4.1.	Vizsgálat	36
5.4.2.	Összehasonlítás.....	40
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	42
7.	IRODALOMJEGYZÉK	43
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	45

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt pár évtizedben a számítástechnika korszerűsödése látványos hatást gyakorolt az alkalmazott tudományokra, így a kémiára is, azon belül az analitikára. Az egyre összetettebb és egyre növekvő mennyiségű adathalmaz műszeres feldolgozást követelt, amit a digitális forradalom hamar ki is elégített, majd ezt meghaladva eddig ismeretlen lehetőségekre mutatott rá. A lineáris fejlődésen túl a számítógépek ugrásszerűen növekvő kapacitása új dimenziók megnyitását tette lehetővé az analitikusok számára.

A minőségi és mennyiségi meghatározások ma már szinte elképzelhetetlenek műszeres analitika nélkül. E műszerek is folyamatos fejlődésen mentek keresztül, ezen felül új módszerek jelentek meg, amik a mintákban lévő információk magasabb szintű kinyerését valósították meg. Ilyen például a ma már széles körben ismert kétdimenziós kromatográfia vagy a kétdimenziós NMR spektroszkópia.

1976-ban az NMR spektroszkópiában úgy kezdték el vizsgálni az adatokat, hogy az egydimenziós spektrumokat számítások útján kétdimenzióssá terjesztették ki [1]. Az így kapott spektrumokkal az összetett, átfedő csúcsokat is tartalmazó minták könnyen értelmezhetővé váltak, eddig rejtett információk kinyerésére is lehetőség nyílt. Ezekből a kísérletekből indult ki, és nőtt ki magát az a szakterület, amit ma kétdimenziós korrelációs spektroszkópiának hívunk.

Tíz évre rá ez a módszer az NMR határait is átlépte: 1986-ban Isao Noda infravörös spektroszkópiában alkalmazta a koncepciót [2], ezzel megalkotva a perturbáció alapú kétdimenziós korrelációs spektroszkópiát. Ebben az eljárásban az adott mintát egy spektroszkópiai módszerrel (ami lehetett infravörös-, közeli infravörös-, ultrabolya-, látható- és Raman spektroszkópia) adott időközönként mérték, miközben valamilyen fizikai vagy kémiai behatásnak tették ki. Ennek a módszernek még egyértelmű határai voltak, mivel a tökéletes kivitelezésnek az volt a feltétele, hogy a számítások során előállt dinamikus spektrum intenzitásai szinuszos változást mutassanak. Ezt kiküszöbölendő szintén Noda 1993-ban alkotta meg az általános kétdimenziós korrelációs spektroszkópiát [3]. Ezzel egy olyan eszköz került az analitikusok kezébe, aminek elméleti határait a mai napig nem sikerült felderíteni.

Az elmúlt negyven évben egyre szélesebb körben fedezték fel a kétdimenziós korrelációs spektroszkópia hatékonyságát, a szakirodalomban rengetek cikk jelent meg a témával kapcsolatban. Ezeket összefoglalva könyv is került publikálásra Isao Noda által 2004-ben [4], valamint a területen azóta elért eredményeket is a szerző rendszeresen közli [5,6]. Azon túl, hogy a mérésekből kapott adatokból könnyen olyan információt nyerhetünk ki, ami eddig nehézkesen vagy egyáltalán nem volt elérhető, a módszer hatékonyságát és így az elterjedését az is nagyban elősegítette, hogy adat előkezelési eljárások, mint például alapvonal korrekció vagy zajszűrés, egyszerűen beiktathatók. Napjainkig ezzel a módszerrel anyagok széles skáláját vizsgálták az egyszerű molekuláktól elkezdve polimereken, folyadékkristályokon át egészen bonyolult biomolekulákig. Az alkalmazott behatások is nagyfokú változatosságot mutatnak. Ezek lehetnek mechanikai, hő, kémiai, optikai és elektromos perturbációk is. Habár a publikációk legnagyobb hányada az NMR-, IR-, NIR-, FT-IR- és Raman spektroszkópiával kapcsolva foglalkozik az eljárással, számos egyéb mérési módszerre is sikeresen alkalmazták. Ilyen például a látható-, röntgen-, fluoreszcencia- vagy tömeg spektroszkópia, mikroszkópia vagy akár a termogravimetria [7].

A kétdimenziós korrelációs spektroszkópia a széles érdeklődés ellenére a kromatográfiában csak nagyon kisszámú eredményt tud felmutatni. Ez a kb. tucat cikk is főleg gélkromatográfiára korlátozódik. Például a gázkromatográfiában is csak a kétdimenziós spektroszkópia egy speciális alkalmazását az úgy nevezett minta-minta korrelációs spektroszkópiát használták [8].

2. CÉLKITŰZÉS

A kétdimenziós korrelációs spektroszkópia egy bizonyítottan működő módszer információ egyszerű és hatékony kinyerésére a spektroszkópia számos területén. Ez a módszer azonban a kromatográfiában még nem nyert teret. Céлом, hogy megvizsgáljam, a spektrumokra már sikeres számítás alkalmazható-e kromatogramok vizsgálatára.

Célul tűztem ki egy olyan számítási eljárás szisztematikus kiépítését, ami egyszerű, alkalmazható lehetőleg minden kromatográfiás adathalmazra, kapcsolható adat-előkezelési eljárásokkal, és beállításai könnyen az adott analitikai problémára hangolhatók.

Munkám során igyekszem megismerni az előállított kétdimenziós spektrumok válaszát a kromatogramokban előforduló összes változásra, ezzel megteremtve az összehasonlítás alapját.

Végül szeretném bizonyítani, hogy az elméletben felállított módszer a gyakorlatban is megállja a helyét. Be szeretném mutatni HPLC oszlopok összehasonlításán keresztül, hogy a kromatográfiában már használt eljárásnál mennyivel ad több információt az általam bevezetett analízis.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Perturbáció alapú kétdimenziós korrelációs spektroszkópia

Isao Noda 1986-ban sikeresen alkalmazta az NMR spektroszkópiában már bizonyított koncepciót az optikai spektroszkópiákra, ezzel megteremtve a módszer szerteágazó fejlődésének alapját. A kétdimenziós korrelációs spektroszkópiának ebben a formájában, bizonyos mérőműszer segítségével vizsgáljuk, egy adott anyag hogyan viselkedik egy fizikai-kémiai perturbáció hatására. Ezek a behatások változást idéznek elő a rendszerben vagy magában az anyagban, ami kihatással van az adott módszerrel mért spektrumokra. Attól függően, hogy milyen spektrumot veszünk föl, információt kaphatunk vegyületek vagy kémiai csoportok széleskörű viselkedéséről, egymásra hatásáról.

A kísérlet alatt általában meghatározott időközönként felveszünk egy spektrumot, de a mérési pontoknak lehet az alapja az adott fizikai paraméter változása (pl. hőmérséklet, nyomás) is. Ebből az egydimenziós spektrumok sorozatából állítjuk elő megfelelő számításokkal a kétdimenziós spektrumokat. A mérésekhez egyes esetekben a műszerhez csatlakoztatni kell egyéb tartozékokat, amik a kísérlet körülményeit hivatottak biztosítani, de legtöbbször a laborokban általánosan használt spektroszkópok is elegendőek a kivitelezéshez.

Mint tudjuk egy adott anyagról egy adott műszerrel felvett egyetlen spektrum is rengeteg információt tartalmazhat. Azonban ezeknek kinyerése hagyományos módszerekkel korlátokba ütközik pl. a spektrum összetettsége miatt. A kétdimenziós korrelációs spektroszkópia olyan eszköz a kezünkben, ami a mindeddig rejtett összefüggéseket hivatott feltárni. Hiszen az újabb dimenzió bevezetésével ezek nagyon gyakran már felfedezhetők a spektrumokban. És az, hogy a rendszer paramétereinek változtatásával előállt adatokat össze tudjuk hasonlítani, a perturbációk sokszínűsége miatt számtalan vizsgálat elvégzésére ad lehetőséget.

Attól függően, hogy egy vegyület vagy kémiai mátrix milyen tulajdonságait szeretnénk vizsgálni, rengeteg perturbáció közül választhatunk. Az eddig publikált közleményekben találkozhatunk mechanikai, elektromos, termikus, mágneses, kémiai, sőt hanghatással is [9]. Ezek milyensége szintén lehet egyenletesen-, szinuszosan változó vagy adhatjuk impulzusok formájában, de ennél összetettebb zavarás is előfordulhat, mint pl. háttérzaj. Megfelelően megválasztott kísérleti körülmények között a spektrumokban megjelelő változásokból következtethetünk a minta tulajdonságaira. Így akár az anyagszerkezetet vagy kémiai reakciókat is vizsgálhatunk. A spektrumbeli változásnak nem feltétlen kell lineáris sémát követnie. Nemlineáris mintázatok gyakran értékesebb felfedezésekkel járhatnak együtt.

3.2. Általános kétdimenziós korreláció

A mérések során a perturbáció hatására előállt spektrumokból kinyerjük az adott hullámhosszakhoz tartozó intenzitásokat, jelöljük ezeket az értékeket $y(v,t)$ -vel, ahol v a megfelelő spektroszkópai index (pl. hullámhossz, hullámszám,...), t pedig általában az idő, ami $T_{\min}$ és $T_{\max}$ között változik, de lehet egyéb fizikai paraméter is (pl. koncentráció, hőmérséklet, nyomás,...). Ebből az úgy nevezett dinamikus spektrumot ($y'(v,t)$) úgy kapjuk, hogy kivonunk egy referencia spektrumot ($\bar{y}(v)$):

$$y'(v,t) = \begin{cases} y(v,t) - \bar{y}(v), & \text{ha } T_{\min} \leq t \leq T_{\max} \\ 0, & \text{egyébként} \end{cases} \quad (1)$$

A referenciaspektrum meghatározására nincs általános szabály. Lehet pl. a méréshez tartozó vak vagy egy adott állapotban vett érték (mérés elején, végén,...) vagy 0, de legtöbbször a spektrumok átlagát szokták venni:

$$\bar{y}(v) = \frac{1}{T_{\max} - T_{\min}} \int_{T_{\min}}^{T_{\max}} y(v,t) dt \quad (2)$$

Alapvető esetben a kétdimenziós korrelációs spektroszkópia valamilyen külső koordináta (t) szerint két spektrális változó (v_1, v_2) mentén felvett intenzitások összehasonlítása.

$$X(v_1, v_2) = \langle y'(v_1, t) y'(v_2, t) \rangle \quad (3)$$

Az $X(v_1, v_2)$ jelenti a korrelációs spektrumot, aminek intenzitásai megadják a két spektrumban található azonosságokat és különbségeket. A $\langle \rangle$ szimbólum adja meg a szükséges számítást. Hogy egyszerűsítsük a matematikai kifejezést $X(v_1, v_2)$ -t intenzitásait komplex számként kezeljük, és a számítás így:

$$X(v_1, v_2) = \Phi(v_1, v_2) + i\Psi(v_1, v_2) \quad (4)$$

A valós komponens az úgy nevezett szinkron, a képzetes komponens az aszinkron intenzitásokat adja meg. Ezekből kaphatjuk a szinkron- és aszinkron spektrumokat. A szinkron rész mutatja meg az adathalmazok közti hasonlóságokat, az aszinkron rész a különbségeket.

A szinkron és aszinkron kifejezések alapvetően történeti megfontolásokból használandók. Onnan eredeztethetőek, hogy a kezdeti koncepciókban minden esetben a spektrumokat idő szerinti, kronológiai sorrendben vették fel. Mivel a módszer fejlődésével már más fizikai értékek is képezhetik a külső változó paramétert, ezért ezek a megnevezések gyakran pontatlanok. Ennek ellenére a szakirodalom máig napig ezeket a kifejezéseket használja, mivel a pontos meghatározások, mint szinterm vagy aszinbár legtöbbször feleslegesen bonyolítanak a szaknyelvet, és nem utolsósorban gyakran ügyetlennek hatnak.

Az előbb meghatározott kétdimenziós spektrum értékeit a következő számításokkal kaphatjuk meg:

$$X(v_1, v_2) = \Phi(v_1, v_2) + i\Psi(v_1, v_2) = \frac{1}{\pi(T_{\max} - T_{\min})} \int_0^\infty Y_1(\omega) Y_2'(\omega) d\omega \quad (5)$$

Y_1 a spektrális intenzitások ($y'(v_1, t)$) Fourier-transzformáltját adják meg:

$$Y_1(\omega) = \int_{-\infty}^\infty y'(v_1, t) e^{-i\omega t} dt = Y_1^{Re}(\omega) + iY_1^{Im}(\omega) \quad (6)$$

Y'_2 pedig a Fourier-transzformáció konjugáltját a másik spektrális változón ($y'(v_2, t)$):

$$Y'_2(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} y'(v_2, t) e^{+i\omega t} dt = Y_2^{Re}(\omega) - iY_2^{Im}(\omega) \quad (7)$$

Ahol az Re és Im indexek a valós és képzetes részre utalnak.

Egy nagyon érdekes területe a korrelációs spektroszkópiának, hogy a két spektrális változónak nem szükségszerűen kell egy azon mérési módszerből származnia. Ezt hívják hetero-spektrális korrelációs analízisnek. Ez esetben megegyező mérési körülmények között, tehát azonos perturbáció mellett veszik fel a spektrumokat, csak ellentétben az eddig tárgyaltakkal pl. IR spektrumokat hasonlítanak Raman készülék méréseivel. Érthetően ilyen kísérleti körülményekkel még összetettebb képet kaphatunk az adott minta fizikai-kémiai tulajdonságairól.

3.2.1. Diszkrét Hilbert transzformáció

Az eddig ismertetett számítások hátránya, hogy a Fourier-transzformáció miatt viszonylag nagy a számítási igénye. Ennek kiküszöbölésére közölte Isao Noda 2000-ben a diszkrét Hilbert transzformációt [10], ami nagyban leegyszerűsíti a műveletet, mégis ugyan olyan hatásokkal használható.

Ebben a műveletben az eddig leírt módon a mért spektrumból kivonjuk a referencia-spektrumot. Az így kapott dinamikus spektrum:

$$y'_j(v) = y'(v, t_j) \quad j = 1, 2, \dots, m \quad (8)$$

Ezután a spektrum diszkrét értékeiből az alábbi egyenlettel kaphatjuk a kétdimenziós szinkron spektrum komponenseit:

$$\Phi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m y'_j(v_1) y'_j(v_2) \quad (9)$$

Az aszinkron spektrum számítása a következő:

$$\Psi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m y'_j(v_1) z'_j(v_2) \quad (10)$$

A z'_j ortogonális spektrumot a dinamikus spektrumból kaphatjuk meg egy egyszerű lineáris transzformációs operátor segítségével:

$$z'_j(v_2) = \sum_{k=1}^m N_{jk} y'_k(v_2) \quad (11)$$

$$N_{jk} = \begin{cases} 0, & \text{ha } j = k \\ \frac{1}{\pi(k-j)}, & \text{egyébként} \end{cases} \quad (12)$$

Azonban, ha a dinamikus spektrumot ($y'(v)$) egy vektorként kezeljük, az egyenletek tovább egyszerűsödnek:

$$y'(v) = \begin{bmatrix} y'(v, t_1) \\ y'(v, t_2) \\ \vdots \\ y'(v, t_m) \end{bmatrix} \quad (13)$$

$$\Phi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} y'(v_1)^T y'(v_2) \quad (14)$$

$$\Psi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} y'(v_1)^T N y'(v_2) \quad (15)$$

Ahol $\Phi(v_1, v_2)$ és $\Psi(v_1, v_2)$ rendre a szinkron és aszinkron spektrum, N pedig a Hilbert-Noda mátrix:

$$N = \frac{1}{\pi} \begin{bmatrix} 0 & 1 & 1/2 & 1/3 & \dots \\ -1 & 0 & 1 & 1/2 & \dots \\ -1/2 & -1 & 0 & 1 & \dots \\ -1/3 & -1/2 & -1 & 0 & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \end{bmatrix} \quad (16)$$

Ebből következik, hogy a teljes spektrumok kiszámításának legegyszerűbb módja, ha a dinamikus spektrumokat tartalmazó vektorokat egy mátrixba rendezzük:

$$Y = \begin{bmatrix} y'(v_1, t_1) & y'(v_2, t_1) & \dots & y'(v_n, t_1) \\ y'(v_1, t_2) & y'(v_2, t_2) & \dots & y'(v_n, t_2) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ y'(v_1, t_m) & y'(v_2, t_m) & \dots & y'(v_n, t_m) \end{bmatrix} \quad (17)$$

Így mátrixműveletekkel a szinkron (Φ_{vv}) és aszinkron (Ψ_{vv}) spektrum az alábbi módon áll elő:

$$\Phi_{vv} = \frac{1}{m-1} Y^T Y \quad (18)$$

$$\Psi_{vv} = \frac{1}{m-1} Y^T N Y \quad (19)$$

3.2.2. Keresztkorrelációs analízis és a kétdimenziós korrelációs spektroszkópia kapcsolata

A két módszer neve közötti hasonlóság nem véletlen. A klasszikus keresztkorrelációs analízis és a kétdimenziós korreláció kapcsolata numerikusan megadható:

A keresztkorrelációs analízis két meghatározott spektrális értéknél (v_1, v_2) adott időközönként vett intenzitások összehasonlítására szolgál, ahol az idő intervallum $T_{\min}$ és $T_{\max}$ között változhat:

$$C(\tau) = \frac{1}{T_{\max} - T_{\min}} \int_{T_{\min}}^{T_{\max}} y'(v_1, t) y'(v_2, t + \tau) dt \quad (20)$$

Ahol τ a korrelációs idő. Ebből számolhatjuk Fourier-transzformáció segítségével a keresztspektrumot ($S(\omega)$):

$$S(\omega) = \frac{Y_{v_1}(\omega) Y_{v_2}(\omega)}{T_{\max} - T_{\min}} = \phi_{\omega}(v_1, v_2) - i \psi_{\omega}(v_1, v_2) \quad (21)$$

A kereszt-spektrum valós ($\phi_\omega(v_1, v_2)$) és képzetes ($\psi_\omega(v_1, v_2)$) része adja rendre a kospektrumot és a quad-spektrumot, amiket az alábbi módon fejezhetünk ki:

$$\phi_\omega(v_1, v_2) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} [Y_1^{Re}(\omega) Y_2^{Re}(\omega) + Y_1^{Im}(\omega) Y_2^{Im}(\omega)] \quad (22)$$

$$\psi_\omega(v_1, v_2) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} [Y_1^{Im}(\omega) Y_2^{Re}(\omega) - Y_1^{Re}(\omega) Y_2^{Im}(\omega)] \quad (23)$$

Fontos megemlíteni, hogy ezekben az esetekben a spektrum szó az idő szerint változó jel Fourier-transzformált hullámhosszára utal, nem pedig az eredeti műszerrel felvett spektrális paraméterre.

Az előzőekben bevezetett kospektrum és quad-spektrum már szoros összefüggésbe hozható a kétdimenziós korrelációs szinkron és aszinkron spektrumokkal:

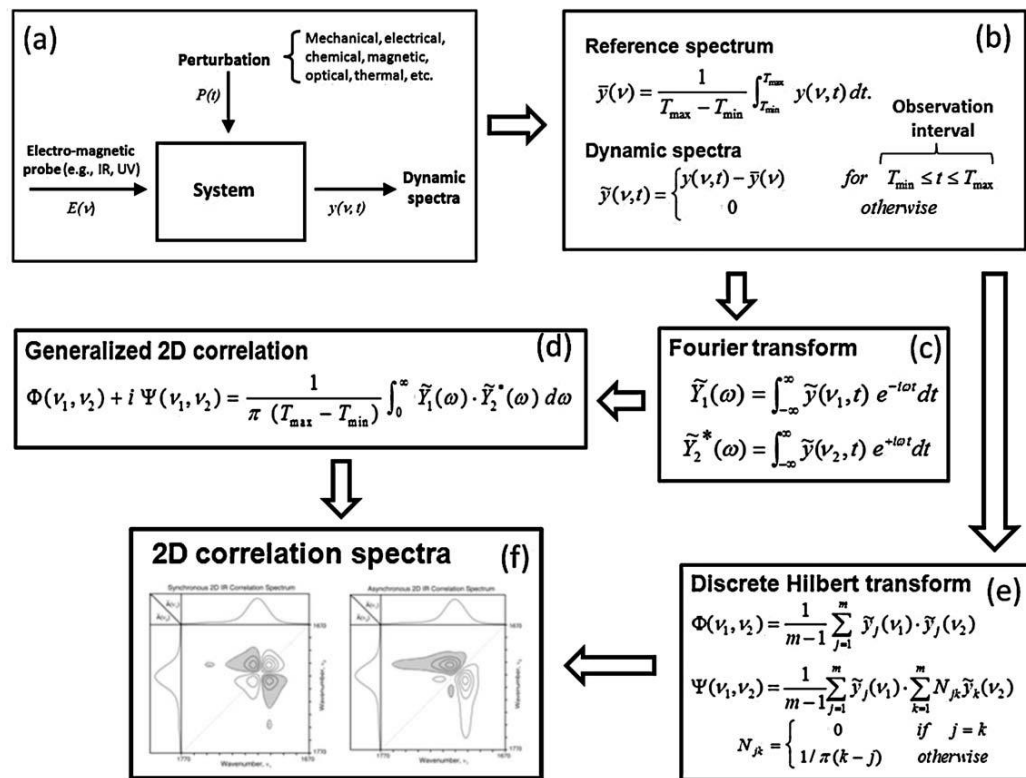
$$\Phi(v_1, v_2) = \frac{1}{\pi} \int_0^\infty \phi_\omega(v_1, v_2) d\omega \quad (24)$$

$$\Psi(v_1, v_2) = \frac{1}{\pi} \int_0^\infty \psi_\omega(v_1, v_2) d\omega \quad (25)$$

Tehát amint látjuk, a szinkron és aszinkron spektrum hozzárendelhető a ko- és quad-spektrum az egész Fourier-tartományon vett integráltjaihoz.

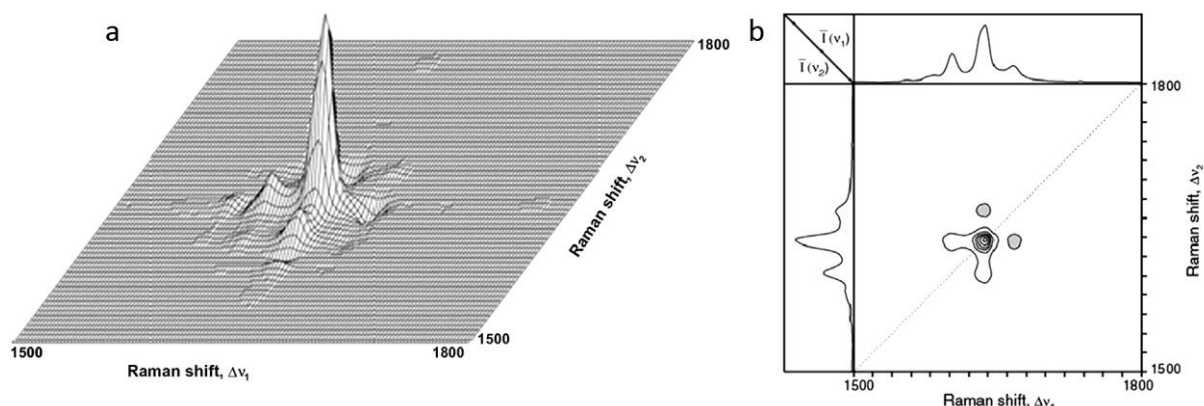
3.2.3. Milyen információt adnak a kétdimenziós korrelációs spektrumok?

Az alábbi összefoglaló ábrán láthatjuk hogyan is állnak elő a korrelációs spektroszkópiában használt spektrumok.



1. ábra Kétdimenziós korrelációs spektrumok előállításának összefoglalása [11]

Miután megkaptuk a spektrumokat (praktikusan egy mátrix formájában), ábrázolnunk kell azokat. Erre alapvetően két megoldás használtak az eddigi szakirodalomban: a 3D-s hálós és a 2D-s kontúrvonalas ábrázolás módot. Igaz a 3D-s kép jobban átlátható, de a csúcsok pontos helyének, nagyságának meghatározása nem megoldható, ezért a valódi kiértékelést 2D-s ábrán szokás elvégezni.



2. ábra A spektrumok ábrázolásának módjai: (a) 3D-s hálós, (b) 2D kontúrvonalas ábra [12]

A következőkben röviden bemutatom Noda nyomán, mit tudunk leolvasni ezekről az ábrákról [11]:

A szinkron spektrum, ami a korrelációs számítás valós értékeiből áll, a rendszer a perturbáció karakterével azonos változásokat mutatja. Áll egyrészt a főátlóban lévő *autocsúcsokból*, amik minden esetben pozitívak, nagyságuk a változás mértékét adja meg. Valamint a főátlón kívüli *keresztcsúcsokból*, amik értéke pozitív és negatív értéket is felvehet. Ezek képéből két spektrális paraméternél lévő csúcs változásának viszonyára kaphatunk felvilágosítást. Ha a keresztcsúcs pozitív, az azt jelenti, hogy a két csúcs egyszerre növekszik vagy csökken, ha negatív, az egyik csúcs növekszik, míg a másik csökken.

Az aszinkron spektrum, ami a megfelelő képzetes értékekből áll, ezzel ellentétben a spektrumban lévő csúcsok egyedi, avagy nem szabályszerű változásait mutatja. Ez a spektrum csak keresztcsúcsokból áll.

A két spektrum keresztcsúcsai további hasznos információval is elláthatnak. Ha a szinkron és aszinkron csúcsok azonos nagyságúak, a két spektrális paraméternél (ν_1, ν_2) lévő csúcsok azonos nagyságúak, akkor a mérés ideje alatt az első csúcs (ν_1) változik hamarabb. Ha csak a szinkron spektrumban jelentkeznek keresztcsúcsok, akkor a két csúcs egyszerre változik. Abban a ritka esetben, ha csak az aszinkron spektrumban látunk keresztcsúcsokat, nem tudjuk megítélni a sorrendet.

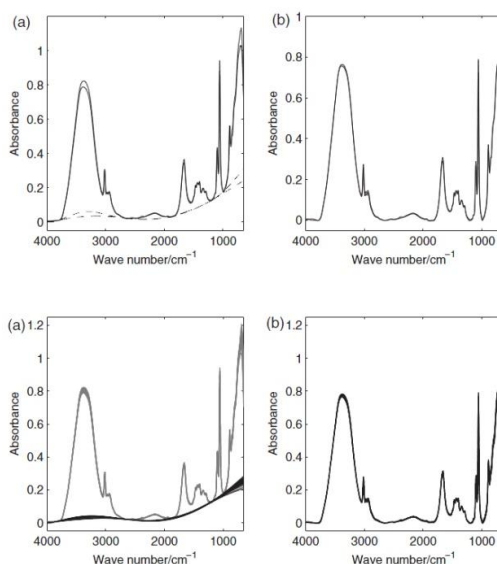
3.3. Adat előkezelési eljárások

Gyakran előfordul, hogy a vizsgálni kívánt spektrumok a mérőrendszer állandó és véletlen hibáiból kifolyólag „torzulnak”, ami megnehezíti, vagy akár ellehetetleníti a kiértékelésüket, legyen szó hagyományos módszerekről vagy kétdimenziós korrelációs spektroszkópiáról. Ilyen „torzulás” lehet az alapvonal változása és a különböző zajok. Ezeket a problémákat sokszor a rendszer beállításaival többé-kevésbé orvosolni lehet, azonban számos esetben manuálisan erre nem nyílik lehetőség. Szerencsére mára már rengeteg kipróbált, jól használható számítástechnikai megoldás létezik ezen problémák leküzdésére.

3.3.1. Alapvonalkorrekció

A spektroszkópiában és a kromatográfiában is rendszeresen előforduló probléma, hogy a mérőrendszer valamilyen hibájából kifolyólag az alapvonal nem állandó. Vagy a mérés során nő az értéke, vagy egyes mérések között is változhat. Ez spektrumok, kromatogramok kiértékelésénél, vagy mérések összehasonlításánál jelenthet gondot. A mi esetünkben is a kétdimenziós korrelációs spektrumokra kihatással van. Olyan mintázatok megjelenésével jár, amik elfedhetik a valódi információval bíró csúcsokat.

Kiküszöbölésének legegyszerűbb módja, ha az adatsor első és utolsó pár pontjára illesztünk egy egyenest, majd ezt kivonjuk a görbéből. Egyszerűsége ellenére gyakran jól használható módszer. Más eljárásokban egy meghatározott szélességű ablakot futtatnak végig az adatokon, amik rendre az egyes pontokat helyettesítik a hozzájuk tartozó ablakok megfelelő értékével, ami módszerenként változhat. Ez lehet a minimum, medián, átlag, stb.



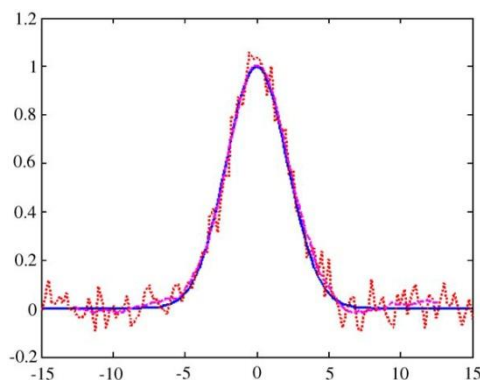
3. ábra Két példa alapvonalkorrekcióra (aszimmetrikus legkisebb négyzetek módszere): a) eredeti spektrum, b) alapvonal korrigált spektrum [13]

Az előbbieknél komolyabb matematikai apparátust igényel pl. az aszimmetrikus legkisebb négyzetek módszere. A számítás paramétereinek beállításával ezen belül is több megoldás létezik [13].

Az eddigieken kívül vannak Fourier-transzformáció alapulón módszerek, vagy pl. a BXR algoritmus [14].

3.3.2. Zajsztűrés

A zajsztűrés technikák közül kiemelném a Savitzky-Golay szűrőt, amit 1964-ben publikáltak [15]. Hatékonyságát és népszerűségét jól mutatja, hogy ez a mű mai napig az egyik legtöbbet hivatkozott, ami valaha megjelent az *Analytical Chemistry* folyóiratban. A számítás alapja egy helyi legkisebb négyzetes polinom illesztéssel való közelítés. Pontos számítása az eredeti cikkben, vagy egyéb szakirodalomban olvasható [16].



4. ábra Savitzky-Golay módszerrel simított csúcs. (-) ideális görbe, (...) zajos adatsor, (- -) simított görbe [16]

3.4. Arányosítási eljárások [12]

Az analízis során könnyen befuthatunk egy olyan problémába, hogy a spektrumban megjelenő domináns csúcsok miatt az apróbb részletek elvesznek. Ha a csúcsok mérete között nagyságrendi különbségek vannak, az ábrázolt spektrumok szerkezete látszólag egyszerűsödik, mivel egyes nagy értékek miatt a kisebb, de ugyan olyan fontos mintázatok a skála szerinti elhanyagolható tartományba esnek. Ezáltal a korrelációs spektroszkópia használhatósága csorbul, mivel a spektrumok információ értéke drasztikusan lecsökken. Erre válaszul jelentek meg az arányosítási technikák, amik különböző megoldásokkal teszik ismét láthatóvá a spektrum finom szerkezetét.

Bár több erre a célra kifejlesztett módszer van a legismertebb ezek közül az Egység-variancia arányosítás (Unit-variance scaling), és talán a leghatékonyabb a Pareto arányosítás (Pareto scaling). Mindegyik matematikai alapja, hogy először kiszámoljuk egy adott hullámhosszon (ν) vett intenzitások szórását (σ):

$$\sigma(\nu) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m [y_j(\nu) - \bar{y}(\nu)]^2}{m-1}} \quad (26)$$

A kezelni kívánt szinkron ($\Phi(\nu_1, \nu_2)$) és aszinkron ($\Psi(\nu_1, \nu_2)$) spektrumokat az eddig megismert módon számolhatjuk. A szórás a szinkron spektrum intenzitásaival szoros összefüggésben van:

$$\sigma(\nu_1) = \sqrt{\Phi(\nu_1, \nu_1)} \quad (27)$$

$$\sigma(\nu_2) = \sqrt{\Phi(\nu_2, \nu_2)} \quad (28)$$

3.4.1. Egység-variancia arányosítás

Ebben a módszerben az arányosítási tényező a $[\sigma(v_1) \sigma(v_2)]$ által kapott érték, amit teljes kapcsolt varianciának hívnak. Ennek segítségével az arányosított szinkron $(\rho(v_1, v_2))$ és aszinkron $(\zeta(v_1, v_2))$ spektrumokat az alábbi módon számíthatjuk:

$$\rho(v_1, v_2) = \Phi(v_1, v_2) / [\sigma(v_1) \sigma(v_2)] \quad (29)$$

$$\zeta(v_1, v_2) = \Psi(v_1, v_2) / [\sigma(v_1) \sigma(v_2)] \quad (30)$$

Ezeket az arányosított spektrumokat úgy is megkaphatjuk, hogy a dinamikus spektrumokat még a korreláció számítása előtt elosztjuk a szórásukkal. Az eljárásnak ezt a változatát hívják *auto-arányosításnak*.

Természetesen ennek az eljárásnak is megvannak a maga határai. Az egység-variancia arányosítás művelete felerősíti a zajokat. Ez főleg a kis intenzitású csúcsoknál zavaró. Ezen kívül az auto-spektrumban (korrelációs spektrumok főátlója) kapott információk elveszhetnek. Ezek miatt a kezelt spektrumokat általában a kezeletlen spektrumokkal együtt szokás elemezni.

3.4.2. Pareto arányosítás

A Pareto arányosítás abban tér el az előbb bevezetett módszertől, hogy itt a teljes kapcsolt variancia négyzetgyökét használjuk arányosítási faktorként:

$$\Phi(v_1, v_2)^{Pareto} = \Phi(v_1, v_2) / \sqrt{\sigma(v_1) \sigma(v_2)} \quad (31)$$

$$\Psi(v_1, v_2)^{Pareto} = \Psi(v_1, v_2) / \sqrt{\sigma(v_1) \sigma(v_2)} \quad (32)$$

Az egység-variancia arányosítással ellentétben itt a zaj felerősítése jóval kisebb mértékű, és a kisebb csúcsok sokkal kivehetőbbek. Továbbá az auto-spektrum is megtartja információ tartalmát.

Ezt a módszert először Svante Wold írta le 1993-ban, aki Vilfredo Pareto tiszteletére nevezte el [17]. Vilfredo Pareto (1848-1923) egy híres olasz közgazdász volt, aki többek között 80-20 szabályáról ismert. Ami annyit tesz, hogy jó közelítéssel szinte mindig az okozat 80%-a az okok 20%-ból adódik, pl. a munka 80%-át a munkások 20%-a végzi, vagy egy spektrumban az információ 80%-át a spektrum 20%-a tartalmazza.

3.4.3. Általános arányosítás

Az általános arányosítás az eddig ismert technikák kombinációja ként, azok jó tulajdonságainak egyesítése érdekében született meg. Számítása a következő:

$$\Phi(v_1, v_2)^A = \Phi(v_1, v_2) [\sigma(v_1) \sigma(v_2)]^{-\alpha} |\rho(v_1, v_2)|^\beta \quad (33)$$

$$\Psi(v_1, v_2)^A = \Psi(v_1, v_2) [\sigma(v_1) \sigma(v_2)]^{-\alpha} |\zeta(v_1, v_2)|^\beta \quad (34)$$

Az α és a β arányosítási állandók. Amennyiben $\alpha=0$ és $\beta=0$, nem végzünk arányosítást, a hagyományos kétdimenziós korrelációs spektrumokat kapjuk. Ha $\alpha=1$ és $\beta=0$, az egység-variancia arányosítás műveletét végezzük el. Ha $\alpha=0,5$ és $\beta=0$, a Pareto arányosítás eredményét kapjuk.

Láthatjuk, hogy az α állandó 0 és 1 közötti értéket vehet fel. Minél jobban megközelíti az 1-t, annál jobb lesz a skálázás hatásfoka, ellenben a zajok is ezzel együtt erősödnek. Így a két szélsőérték között kell megtalálnunk az adott probléma megoldására legmegfelelőbb értéket. Ennek kiválasztása, mialatt β -t 0-n tartjuk, gyakorlatilag a Pareto arányosítás kibővítése. Habár általános szabály nincs α megállapítására, a gyakorlat azt mutatja, hogy legtöbb esetben 0,8 az ideális érték. Más szavakkal az információ tartalom maximális növekedését (mondjuk kb. 80%) a szórás 20%-ba eső adatok megtartásával tudjuk elérni. Ez azért nagyon érdekes, mert így egybeesik a Pareto által felállított 80-20 szabállyal.

A β -val fémjelzett állandót korrelációjavító faktorként szokás emlegetni, és Noda vezette be az Kétdimenziós Korrelációs Spektroszkópia Első Nemzetközi Szimpóziumán (First International Symposium on Two-Dimensional Correlation Spectroscopy, 2DCOS-1) 1999-ben Japánban [18]. β értékét -1-nél nagyobbra érdemes választani, mivel ebben az esetben a korrelációs információk teljesen elvesznek. $\beta>0$ értéket választva (általában egész érték, de nem szükségszerű) a spektrumokban az autocsúcsok lesznek dominánsak, és a kevés megmaradt keresztcsúcs csak a teljesen párhuzamos változásokat fogják mutatni, így kiszűrhetők a véletlenszerű események.

3.5. Kétdimenziós korrelációs analízis a kromatográfiában

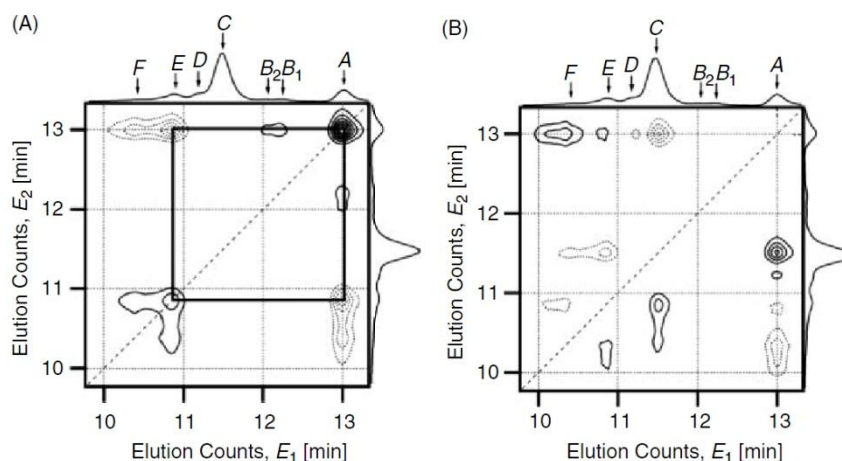
Napjainkra a kétdimenziós korrelációs spektroszkópia egy bizonyítottan jól működő módszeren alapuló kiterjedt tudományággá nőtte ki magát. Annak ellenére, hogy az általános számítási módszer majdnem két évtizede látott napvilágot ez a technika a spektroszkópia határait csak nehezen lépte át.

Bár a kromatográfia és a kétdimenziós spektroszkópia kapcsolata elsőre nehezen elképzelhető gondoljunk csak bele, hogy pl. egy UV detektorral egy hullámhosszon mért kromatogram megfeleltethető a korrelációs spektroszkópiában előállított dinamikus spektrumnak, hiszen egy spektroszkópiai paraméteren mért intenzitások változását ábrázolja az idő függvényében. Mégis, bár már nem idegen a kromatográfiában, a kétdimenziós korrelációs spektroszkópia vívmányainak alkalmazása, széleskörű elterjedésük még várat magára.

3.5.1. Kétdimenziós korrelációs gélpermeációs kromatográfia (GPC)

Az egyik felhasználása a korrelációs analízisnek a kromatográfiában a gélkromatográfiában történt. Egyik példája ennek, amiben 1H,1H,2H,2H-perfluorooctiltriethoxiszilán (PFOTES) szol-gél polimerizációját vizsgálták [19].

A kapott adatok a GPC intenzitások $I(E,t)$, ahol E a kromatográfiás elúciós idő, t pedig a reakció lejátszódása közbeni mintavétel ideje. A polimerizációs reakció 30 perces idejét 5 részletre osztották, ezeknek korrelációját külön-külön vizsgálták, így állították elő a szinkron és aszinkron spektrumokat.



5. ábra Az első fázis (60-180 másodperc) eredményeiből kapott szinkron (A) és aszinkron (B) térképek [19]

Ezek alapján a szerzők képet tudtak alkotni, hogy a polimerizációs reakció egyes fázisaiban milyen részreakciók játszódnak le, mikor melyik közbenső termék dominál és ezek milyen kölcsönhatásban vannak egymással.

3.5.2. Minta-minta korrelációs spektroszkópia

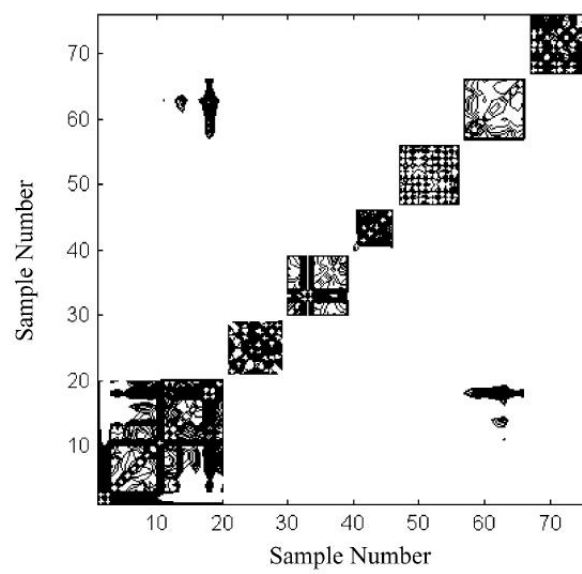
A minta-minta korrelációs spektroszkópia egy nagyon érdekes területe a kétdimenziós korrelációs spektroszkópiának. A módszer alapjait Zimba fektette le 1990-ben [20], majd Šašić és munkatársai fejlesztették tovább [21]. Ebben az eljárásban vették a korreláció számítás alapjait és egy egyszerű változtatással elérték, hogy a képlet ne a spektroszkópiai értékek, hanem a minták közötti korrelációt adja meg. Ez az egyszerű módosítás annyiból áll, hogy a számítás részben bevezetett $\mathbf{Y}$ mátrix (17) sorait és oszlopait felcseréljük, ill. a számításban az alábbi módon használjuk:

$$\Phi_{ss} = \frac{1}{m-1} \mathbf{Y} \mathbf{Y}^T \quad (35)$$

A minta-minta korrelációs spektrum (Φ_{ss}) tengelyein így a minták száma jelenik meg. A spektrum egyes értékei pedig két minta közötti korrelációs koefficiensek, amik számszerűleg adják meg az adatsorok hasonlóságát. Természetesen előállíthatjuk ennek a spektrumnak a párját is, az aszinkron minta-minta korrelációs spektrumot, de idáig nem találtak olyan esetet, amikor érdemi információval szolgált volna.

$$\Psi_{ss} = \frac{1}{m-1} \mathbf{Y} \mathbf{N} \mathbf{Y}^T \quad (36)$$

Egy gyakorlati példa ennek a módszernek a megvalósítására a gázkromatográfiában történt [8]. Ebben a munkában különböző típusú repülőgépek üzemanyagok kromatogramját hasonlították össze talajvízből vett mintákkal. A minta-minta korrelációs spektroszkópia segítségével meg tudták mondani melyik környezeti minta volt szennyezve üzemanyaggal, és abból is konkrétan melyik fajtából került a talajba.



6. ábra Minta-minta korrelációs térkép [8]

4. Anyagok, eszközök és módszerek

4.1. A kétdimenziós spektrum tulajdonságainak megismerése

A kétdimenziós korrelációs spektroszkópiában a kétdimenziós spektrumok x és y tengelyein az aktuális spektroszkópiai dimenziók jelennek meg. Ezzel szemben kromatogramokat vizsgálva az ábrák tengelyein a retenciós időket láthatjuk, ennek ellenére én mégis a spektrum kifejezést használok rájuk. Ez a döntésem két okra vezethető vissza: így megtartom a folytonosságot a szakterület nomenklatúrájában, valamint a kétdimenziós kromatogram kifejezés nem lenne szerencsés, hiszen félreértésekre adna lehetőséget, mivel könnyen összekeverhető a hagyományos kétdimenziós kromatográfia eredményeivel. Ezen felül a szakirodalomban is gyakran hivatkoznak spektrumokra olyan esetekben, amikor ez nem lenne helyénvaló [4,7].

Kromatogramok elemzése eddig nem elterjedt a kétdimenziós korrelációs analízisben. Éppen ezért a kétdimenziós spektrumok tulajdonságait ezen a területen még nem ismerjük. Kutatásom első lépése az volt, hogy szisztematikusan megvizsgáljam, a kromatogramok egyes változásait hogyan reflektálja a kétdimenziós spektrum.

4.1.1. Kromatogramok generálása

A kétdimenziós spektrum vizsgálatára szükségem volt olyan kromatogramokra, melyek tulajdonságait szelektíven tudom változtatni. Ehhez a *Microsoft Excel* program segítségével olyan adatsorokat állítottam elő, amikben 4-4 Gauss-görbét egyesítettem, amik paramétereinek értékeit egyesével meg tudtam adni.

A Gauss-görbe egyenlete:

$$f(x) = \frac{m}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (37)$$

Ahol:

m - terület

σ - szórási

μ - középpont

Az összehasonlítás alapjául egy azonos Gauss-görbékből álló kromatogramot választottam, aminek adatai:

$$m = 1$$

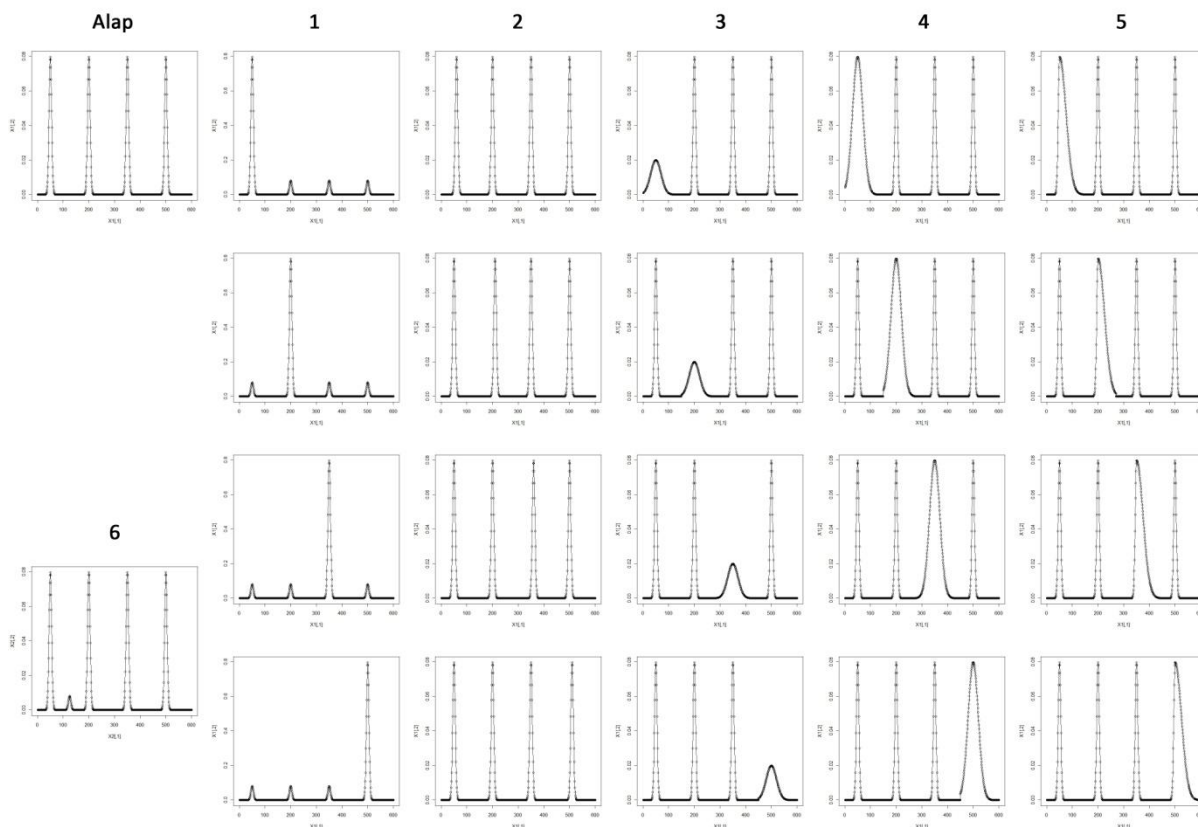
$$\sigma = 5$$

$$\mu_{1-4} = 50, 200, 350, 500$$

A továbbiakban minden kromatogramot ehhez a referencia-kromatogramhoz hasonlítottam.

A referencia-kromatogramhoz képest az alábbi módosításokat hajtottam végre rendre minden Gauss-görbén:

1. $m = 2$
2. $\mu = \text{alap} + 10$
3. $\sigma = 20$
4. $m = 4, \sigma = 20$
5. aszimmetrikus csúcs: Gauss-görbének csak a leszálló ágát változtattam, $m = 5, \sigma = 25$
6. Ezen kívül új csúcs megjelenését is vizsgáltam, $m = 0.1, \mu = 125, \sigma = 5$



7. ábra Az előállított kromatogramok

4.1.2. Számítás

4.1.2.1. R

Számításaimhoz az *R project* nevű ingyenesen letölthető szoftvert használtam, amit eredetileg Robert Gentleman és Ross Ihaka írt az Aucklandi egyetemen [22].

4.1.2.2. Parancssor

A generált kromatogramokat szövegfájlban (txt) mentettem el, mert az R ebben a formában tudja beolvasni az adatokat. Az R programnyelvét használva az alábbi parancsok segítségével számoltam ki és ábrázoltam a szinkron és aszinkron spektrumokat:

```

X1<- matrix(scan("g01.txt", 0), ncol=2, byrow=TRUE)
X2<- matrix(scan("g02.txt", 0), ncol=2, byrow=TRUE)
v1<-X1[,2]
v2<-X2[,2]
Y<-cbind(v1,v2)
sync<-Y%*%t(Y)
x=X1[,1]
y=X2[,1]
filled.contour(x,y,sync,col=rainbow(100),asp=1,nlevels=100)
N<-matrix(scan("N2.txt"),ncol=2,byrow=TRUE)
async<-Y%*%N%*%t(Y)
filled.contour(x,y,async,col=rainbow(100),asp=1,nlevels=100)

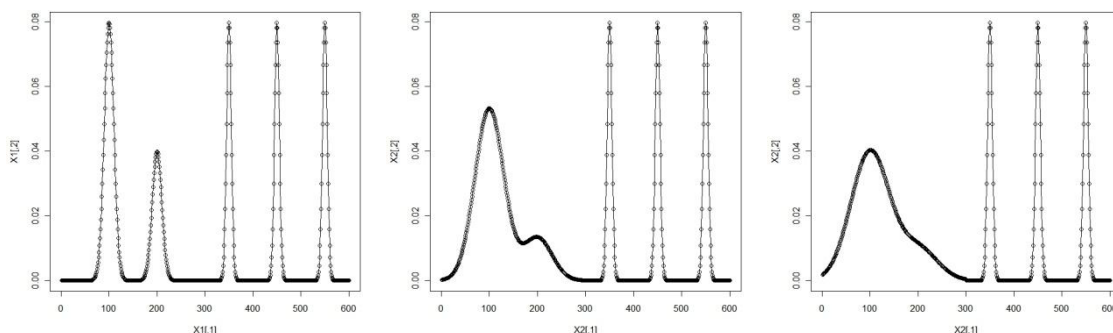
```

4.1.3. Átfedő csúcsok vizsgálata

A spektroszkópiában a kétdimenziós korreláció nagy előnye, hogy összetett spektrumokban az esetlegesen megbúvó csúcsok is láthatóvá válhatnak. Ezért egy fontos lépés megvizsgálni, a kromatogramokban is előjön-e a módszer ezen pozitív tulajdonsága.

Ehhez olyan kromatogramokat állítottam elő, amiben két csúcs közel esik egymáshoz, majd szélesedve ezek egybeolvadnak.

Azt is vizsgáltam, a kétdimenziós spektrumok képe mennyiben tér el egyszerű aszimmetrikus csúcsokétól, meg lehet-e különböztetni a két esetet.



8. ábra Átfedő csúcsokat tartalmazó kromatogramok vizsgálata

4.2. Valós rendszeren mért kromatogramok vizsgálata

4.2.1. Kromatogramok

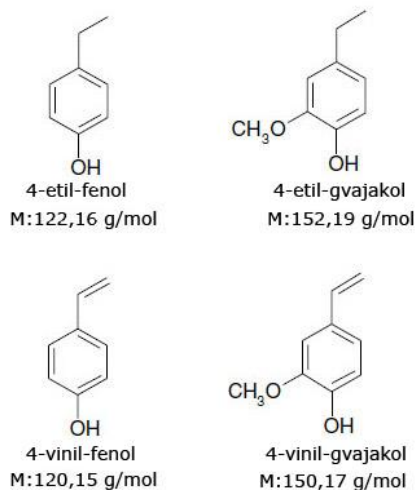
Ehhez a vizsgálathoz szükséges kromatogramokat a szakdolgozatomból vettem át [23]. Ebben a munkámban négy illékony fenolos vegyületet vizsgáltam bormintákban.

Kromatográfiás mérőrendszer:

- Gázkromatográf: GC-2010 (Shimadzu, Japán)
- Mintaadagoló: AOC-20i Auto Injektor (Shimadzu, Japán)
- Tömegspektrométer: GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Japán)
- Szoftver: GCMSsolution Version 2.53 SU3 (Shimadzu, Japán)
- Kolonna: Zebron ZB-5MS Capillary GC Column (Phenomenex, USA)

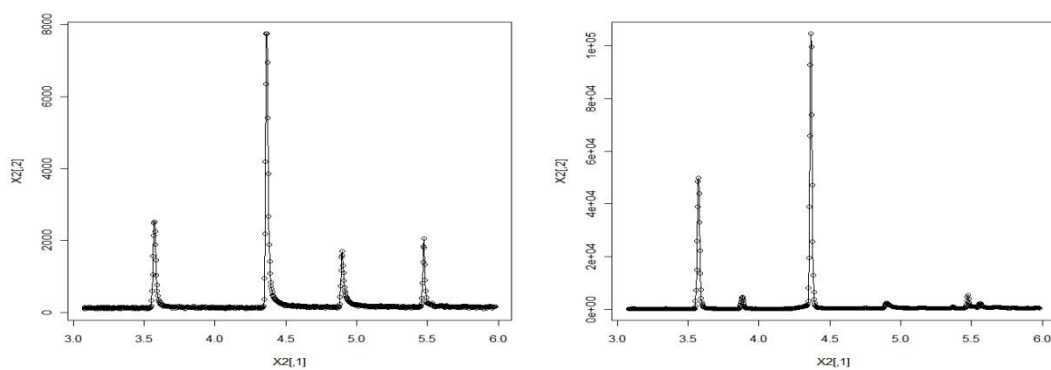
Hőmérséklet-program:

- 100 °C-ról indult az analízis,
- 100 °C-ot 3 percig tartottam, majd
- 25 °C/perc-es sebességgel 180 °C-ra felfűtöttem a kolonnát.
- Az analízis időtartama: 6,2 perc volt.



9. ábra Borokban vizsgált 4 illékony fenolos komponens

A számolások során felhasználtam a szakdolgozatom adataiból sztenderd oldatok és minták kromatogramját is.



10. ábra Egy sztenderd oldat (balra) és egy borminta (jobbra) kromatogramja

4.2.2. Számolás

A szükséges számításokat az alábbi parancssorral végeztem:

```
X1<- matrix(scan("r1.txt", 0), ncol=2, byrow=TRUE)
X2<- matrix(scan("b1.txt", 0), ncol=2, byrow=TRUE)
tX1<-t(X1)
tX2<-t(X2)
B1<- baseline(tX1[,2,, drop=FALSE])
B2<- baseline(tX2[,2,, drop=FALSE])
b1<-getCorrected(B1)
b2<-getCorrected(B2)
v1<-t(b1)
v2<-t(b2)
p=3
s1<-sgolayfilt(v1, p = 3, n = p + 3 - p%%2, m = 0, ts = 1)
s2<-sgolayfilt(v2, p = 3, n = p + 3 - p%%2, m = 0, ts = 1)
Y<-cbind(s1,s2)
sync<-Y%*%t(Y)
x=X1[,1]
y=X2[,1]
filled.contour(x,y,sync,col=rainbow(150),asp=1,nlevels=100)
N<-matrix(scan("N2.txt"),ncol=2,byrow=TRUE)
async<-Y%*%N%*%t(Y)
filled.contour(x,y,async,col=rainbow(150),asp=1,nlevels=100)
A<-sd(s1)
B<-sd(s2)
C<-A*B
a<-0.5
b<-0
S<-sync*(C^a)*(abs(sync/C))^b
AS<-async*(C^a)*(abs(async/C))^b
filled.contour(x,y,S,col=rainbow(150),asp=1,nlevels=100)
filled.contour(x,y,AS,col=rainbow(100),asp=1,nlevels=100)
```

A kékkel kiemelt rész az alapvonal korrekciós számításokat jelöli. Ehhez az R projecthez külön le kell tölteni a *baseline* csomagot. Szintén ingyen elérhető [22].

A pirossal jelzett parancsok a Savitzky-Golay simítás elemeit tartalmazzák. Ezek a funkciók a *signal* csomagban elérhetők.

A zöld parancsok az általános arányosításra vonatkoznak.

4.3. Több kromatogram összehasonlítása

Amikor több kromatogramot vizsgálunk, a számítások csak kis mértékben térnek el az eddigiektől. Pl. 10 adat esetén a parancssorban Y-ként jelölt mátrix 2 helyett 10 oszlopból áll:

```
X1<- matrix(scan("g01.txt", 0), ncol=2, byrow=TRUE)
X2<- matrix(scan("g02.txt", 0), ncol=2, byrow=TRUE)
X3<- matrix(scan("g03.txt", 0), ncol=2, byrow=TRUE)
...
v1<-X1[,2]
v2<-X2[,2]
v3<-X3[,2]
...
Y<-cbind(v1,v2,v3,v4,v5,v6,v7,v8,v9,v10)
sync<-Y%%t(Y)
x=X1[,1]
y=X2[,1]
filled.contour(x,y,sync,col=rainbow(100),asp=1,nlevels=100)
N<-matrix(scan("N10.txt"),ncol=10,byrow=TRUE)
async<-Y%%N%%t(Y)
filled.contour(x,y,async,col=rainbow(100),asp=1,nlevels=100)
z<-matrix(c(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10),10,1)
filled.contour(x,z,Y,col=rainbow(100),nlevels=100)
```

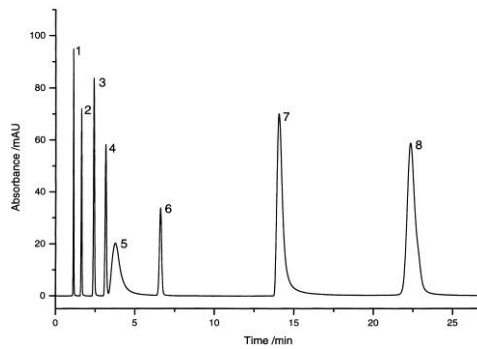
A késsel kiemelt rész egy harmadik ábra megjelenítését szolgálja, amivel a kromatogramok könnyen átláthatóak lesznek.

4.4. Gyakorlati alkalmazás

Az adatokat a gyakorlati példához Kele és Guiochon munkájából kölcsönöztem [24, 25]. Ezekben a kísérletben validálási méréseket és számításokat végeztek több Symmetry C₁₈ (Waters, Milford, MA, USA) kromatográfiás oszlop összehasonlítására. Minden oszlopra öt féle oldatot injektáltak különböző összetétellel. Számomra 24 db kromatogram állt rendelkezésre, ezek a 3-as számú oldat [24] öt oszlopra történő injektálásának 4, illetve 5-5 párhuzamos mérésére vonatkoznak.

A 3-as számú oldat összetétele:

1. tiokarbamid (12 mg/ l)
2. teobromin (18mg/ l)
3. teofillin (30 mg/ l)
4. koffein (32 mg/l)
5. piridin (98.3 mg/ l)
6. fenol (160 mg/ l)
7. 2,2-dipiridil (200 mg/ l)
8. 1,3-dihidroxinaftalén (200 mg/ l)
- Oldószer: metanol-víz (30:70, v/v)



11. ábra 3-as számú oldat kromatogramja [24]

A számítások során alapvonal-korrekciót, simítást és arányosítást sem kellett alkalmaznom, a kromatogramok kezeletlen állapotban is tökéletesek voltak a kísérlethez.

Munkámban elkészítettem a mérések minta-minta korrelációs térképét is annak érdekében, hogy össze tudjam hasonlítani az általam felállított módszerrel. Így az alkalmazott parancssor mind a 24 adatra:

```
X2<-matrix(scan("W1T3_02.prn", 0),ncol=2,byrow=TRUE)
X3<-matrix(scan("W1T3_03.prn", 0),ncol=2,byrow=TRUE)
X4<-matrix(scan("W1T3_04.prn", 0),ncol=2,byrow=TRUE)
...
X<-
cbind(X2[,2],X3[,2],X4[,2],X5[,2],X6[,2],X7[,2],X8[,2],X9[,2],X10[,2],X11[,2],X12[,2],X13[,2],X14[,2],X15[,
2],X16[,2],X17[,2],X18[,2],X19[,2],X20[,2],X21[,2],X22[,2],X23[,2],X24[,2],X25[,2])
sync<-X%*%t(X)
x=X2[,1]
y=X2[,1]
filled.contour(x,y,sync,col=rainbow(100),asp=1,nlevels=100)
N<-matrix(scan("N24.txt"),ncol=24,byrow=TRUE)
async<-X%*%N%*%t(X)
filled.contour(x,y,async,col=rainbow(100),asp=1,nlevels=100)
z<-matrix(c(2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24),24,1)
filled.contour(x,z,X1,col=rainbow(120),nlevels=100)
Q<-t(X1)%*%X1
filled.contour(z,z,Q,col=rainbow(150),asp=1,nlevels=100)
```

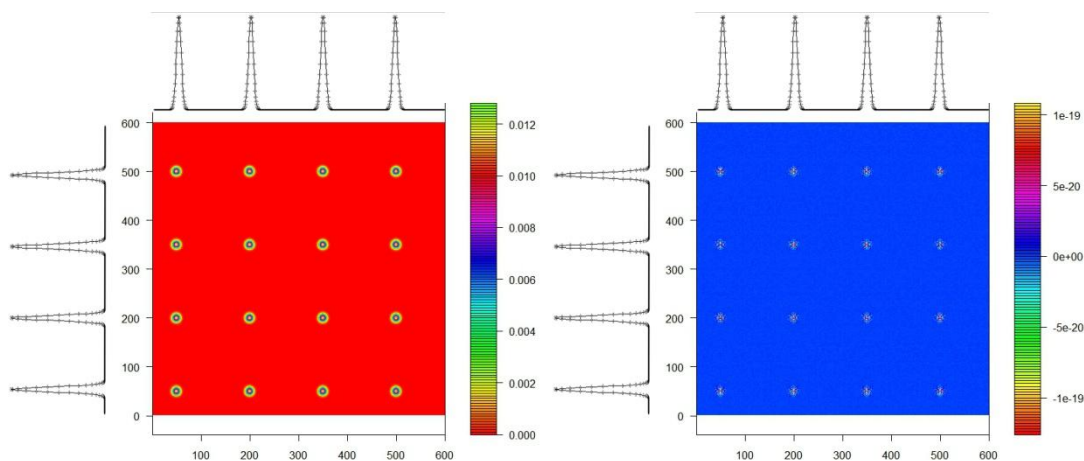
A késsel jelölt parancsok a kromatogramok egy helyen történő ábrázolására, a pirossal jelzettek a minta-minta korrelációra vonatkoznak. Ezen kívül a különböző oszlopokon mért eredményeket külön is vizsgáltam, az 5-5 kromatogram összehasonlításával.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A spektrumok tulajdonságai

Az összes generált kromatogram szinkron és aszinkron spektrumát előállítottam az alapkromatogramhoz viszonyítva. Ezekből néhányat kiemelve bemutatom, milyen mintázat jelenik meg a spektrumokban a kromatogramokban fellelhető jellemző változások hatására. Így a későbbiekben a spektrumokat elemezve visszakövetkeztethetünk a kromatogramok egymáshoz viszonyított tulajdonságaira.

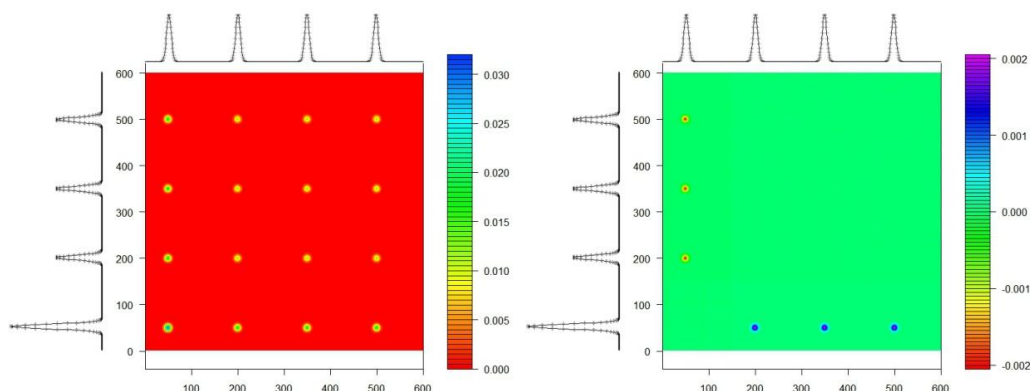
5.1.1. Azonos kromatogramok



12. ábra Azonos kromatogramok szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektruma

Amennyiben a két összehasonlított kromatogram megegyezik, mindegyik csúcshoz tartozó autocsúcs és keresztcsúcs megjelenik a szinkron spektrumban. Az aszinkron spektrumban is látjuk ezeket a csúcsokat, azonban ha megnézzük a nagyságukat, valójában elhanyagolhatóak (10^{-19}). Tehát azt az eredményt kapjuk, amit vártunk, az aszinkron spektrum ≈ 0 , nincs különbség a kromatogramok között.

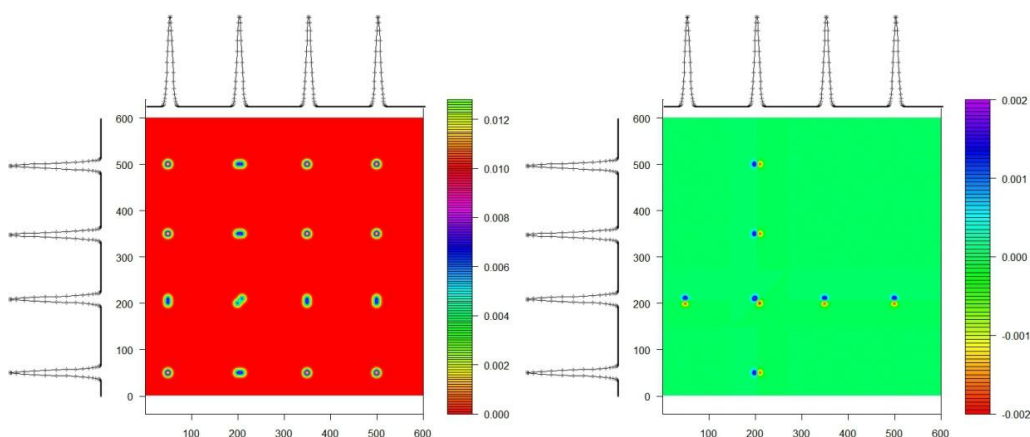
5.1.2. Csúcsmagasság változás



13. ábra Csúcsmagasság változásának képe szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektrumokon

A szinkron spektrumon azt láthatjuk, hogy míg az utolsó három csúcshoz tartozó összes auto- és keresztcsúcs azonos magasságú, az első csúcshoz tartozó auto- és keresztcsúcsok ezekhez képest nagyobbak. Összetettebb szinkron spektrumokban ezt nehezen lehetne észrevenni, azonban az aszinkron spektrummal együtt a változás egyértelműen észlelhető. Az aszinkron spektrumban a három utolsó csúcshoz nem kapunk jelet, hiszen ezek nem változtak, csak az első csúcshoz tartozó keresztcsúcsokat láthatjuk. A vízszintesen elhelyezkedő csúcsok pozitív, a függőlegesen elhelyezkedő csúcsok negatív értéket vesznek fel. Ebből lehet látni, hogy az első kromatogramban az adott helyen, ahol a csúcsok által meghatározott egyenes metszi a főátlót (a szinkron spektrumban itt jelenik meg az autocsúcs), hiány lép fel (negatív csúcsok), a második kromatogramban pedig többlet (pozitív csúcsok).

5.1.3. Retenciós idő változása

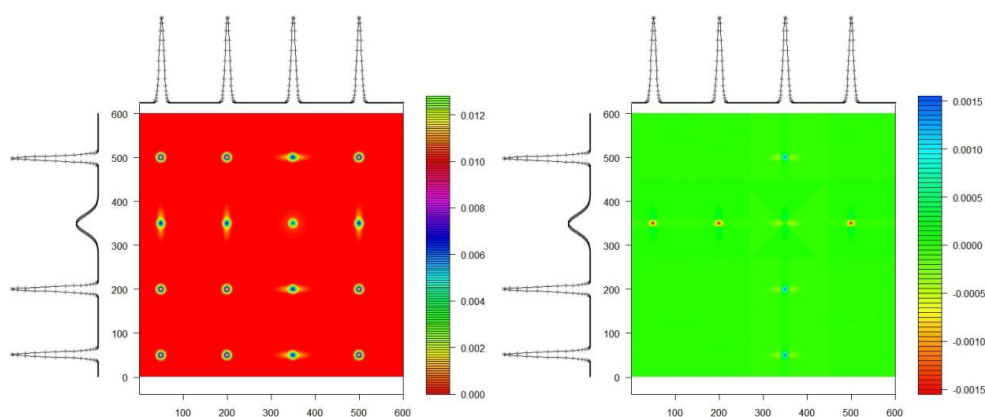


14. ábra Retenciós idő változásának képe szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektrumokon

A retenciós idő kismértékű eltolódását szabad szemmel nehéz észrevenni. A szinkron és aszinkron spektrumokból azonban rögtön levonható a következtetés, látva a második csúcshoz tartozó auto- és keresztcsúcsokat, hogy ez a csúcs a mérések között elvándorolt. A szinkron spektrumban ilyenkor a megváltozott csúcshoz tartozó auto- és keresztcsúcsok megnyúlnak, vagy akár ketté is válnak. Az

aszinkron spektrumban ebben az esetben látszólag megjelenik az autocsúcs, de az itt látható csúcsok valójában két összetevőből állnak, egy negatív és egy pozitív részből. A negatív csúcsok jelzik, hogy annál a retenciós időnél az egyik kromatogramban hiány jelentkezik, a pozitív csúcsok az adott retenciós időnél jelentkező többletet mutatják.

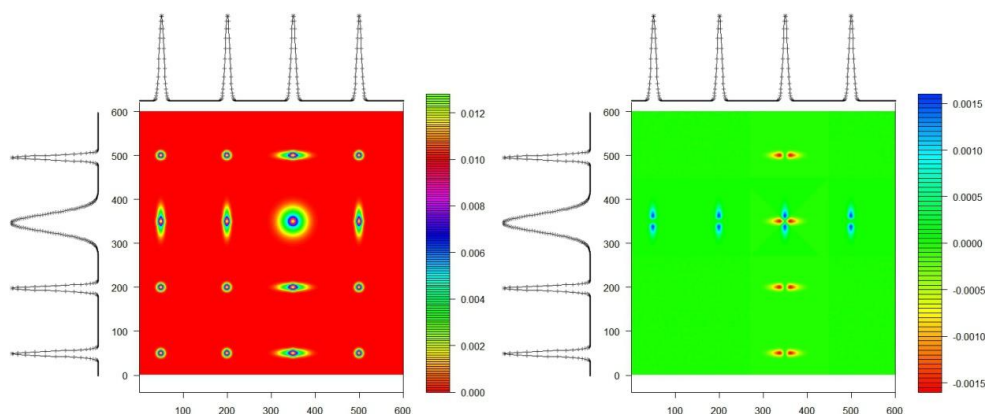
5.1.4. Csúcsszélesedés



15. ábra Csúcsszélesedés képe szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektrumokon

Amennyiben egy csúcs kiszélesedik, az autocsúcsa és a keresztcsúcsai kisebbek lesznek a többinél, hiszen csökkent a magassága, és a csúcsok karimát is kapnak. Ez a változás az aszinkron spektrumban is jól látható. Mind az eredeti szélességű csúcsok, mind a karimák pozitív és negatív rétékkal is megjelennek, ebben az esetben is jelezve, hogy magasságban és szélességben melyik kromatogramban lép fel hiány vagy többlet.

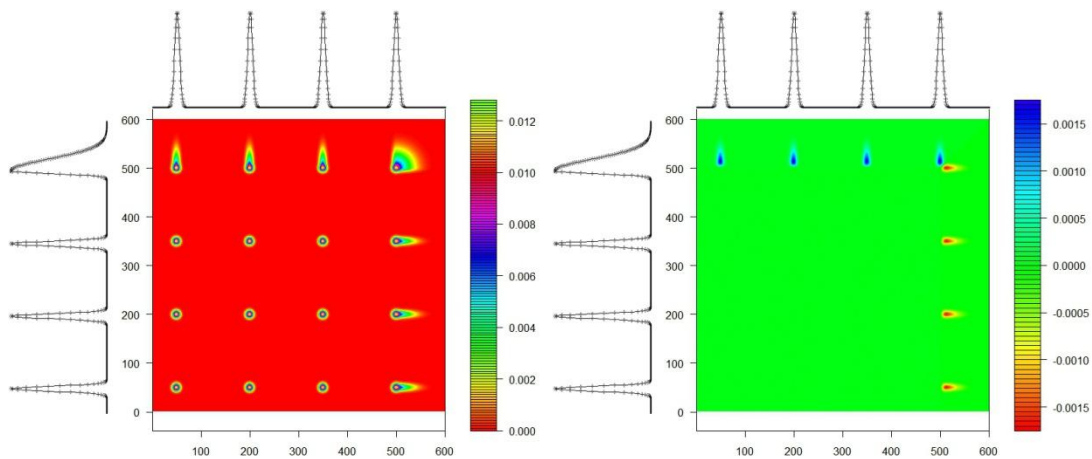
5.1.5. Csúcsszélesedés magasság megtartásával



16. ábra Csúcsszélesedés képe szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektrumokon a magasság megtartásával

Abban az esetben, ha a harmadik csúcs magassága számottevően nem változik, de valamilyen oknál fogva kiszélesedik, a szinkron és aszinkron spektrumban az előző esethez hasonló képet kapunk, azonban a magasságok megegyeznek a többi csúcséval, és a karimák is erősebben látszanak. Az aszinkron spektrumban mivel magasságváltozás nem történt, a 15. ábrától eltérő képet látunk. Csak a karimák jelennek meg.

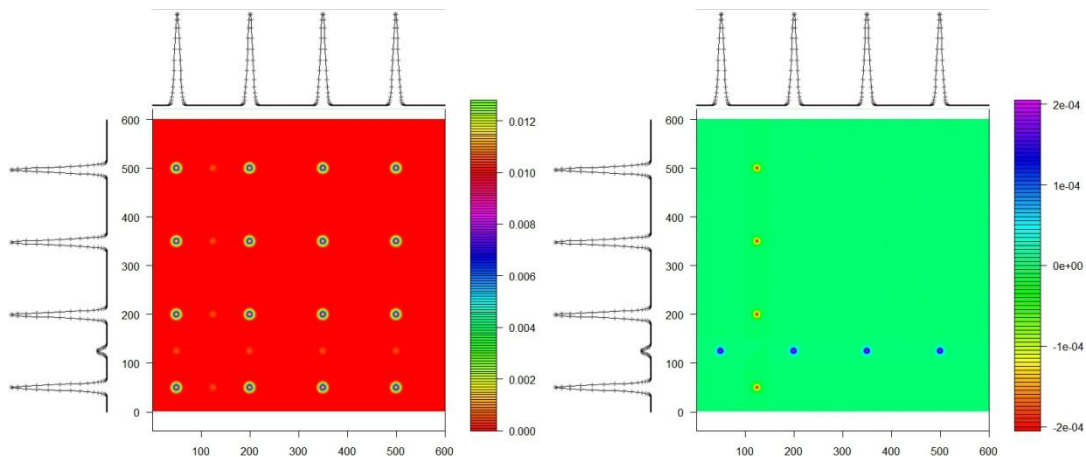
5.1.6. Aszimmetrikus csúcsok



17. ábra Aszimmetrikus csúcs képe szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektrumokon

Ebben az esetben a negyedik csúchoz tartozó auto- és keresztcsúcsokon látunk aszimmetrikus karimát. A mintázat könnyen értelmezhető a 15. 16. ábrán látottak segítségével, mert a változás analóg az előző esettel, de a szélesség változása csupán a csúcs lecsengő ágára terjed ki.

5.1.7. Új csúcs megjelenése

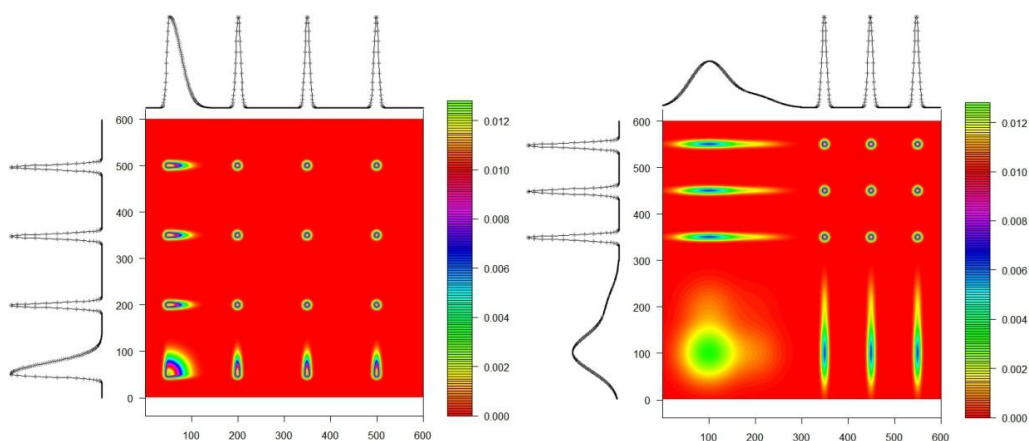


18. ábra Új csúcs megjelenésének képe szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektrumokon

Ha a mérések során új csúcs jelenik meg a kromatogramon, a szinkron és aszinkron spektrumban a méretével arányos keresztcsúcsok jelennek meg. Itt a szinkron spektrumban sincs autocsúcs, mivel önmagával nem tud korrelálni. Az aszinkron spektrumban a negatív értékek a csúcs hiányát mutatják az első kromatogramban, a második mérés során fellépő többlet csúcsot pozitív értékek ábrázolják.

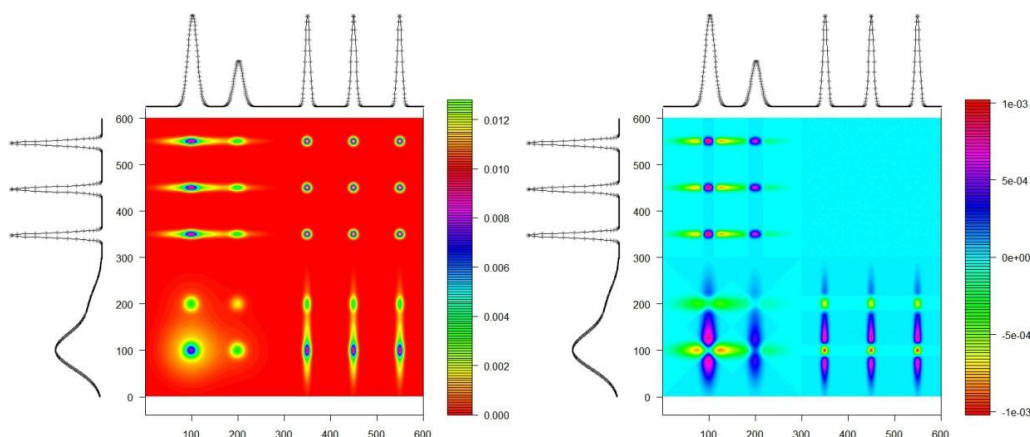
5.1.8. Átfedő csúcsok vizsgálata

Az eddig prezentált változásokat a kromatogramokban gyakran szabad szemmel is észre lehet venni. Azonban itt világosodik ki a kétdimenziós korrelációs analízis előnye, miszerint olyan információk is kinyerhetők a kromatogramokból, ami más módszerekkel nem. Jelen esetben azt mutatom be, hogyan nyílik lehetőség egymással átfedő csúcsok vizsgálatára.



19. ábra Szinkron spektrumok aszimmetrikus (balra) és átfedő csúcsok (jobbra) önmagukkal vett összehasonlításából

Ha a mérések során a csúcsok nem változnak, a szinkron spektrumok képéből akkor is következtetni tudunk arra, hogy egy olyan csúcs is jelen van, amit eddig nem vettünk észre. Hiszen ennek képe nem egyezik meg a csupán aszimmetrikus csúcsokéval. Mint láthatjuk, a karimák nem szimmetrikusak, a kisebb csúcs fele megnyúltak, az autocsúcson pedig nem adja ki a szabályos félkörívet. Itt nincs értelme az aszinkron spektrumokat vizsgálni, mivel értékük mindenhol 0.



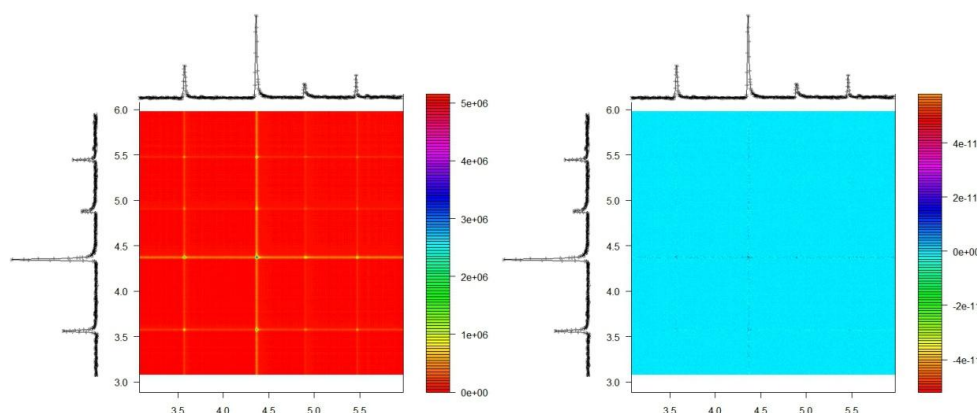
20. ábra Átfedő csúcsok képe szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektrumokon

Ha azonban van összehasonlítási alapunk, pl. kisebb koncentrációban a csúcsok elválnak, a szinkron és aszinkron spektrumokon egyedi minták jelennek meg. A szinkron spektrum a 19. ábra jobb oldali spektrumához hasonlít, de itt már a két csúcsához tartozó jelek az előzőhöz képest szignifikánsan elválnak. Az aszinkron spektrumon láthatók a magasságváltozáshoz és szélesedéshez rendelhető jelek is, és mivel két csúcsban egyszerre változik mind a két érték, ezért az egyedi jelek kombinációja adja a jellegzetes képet.

5.2. Valós rendszeren mért adatok

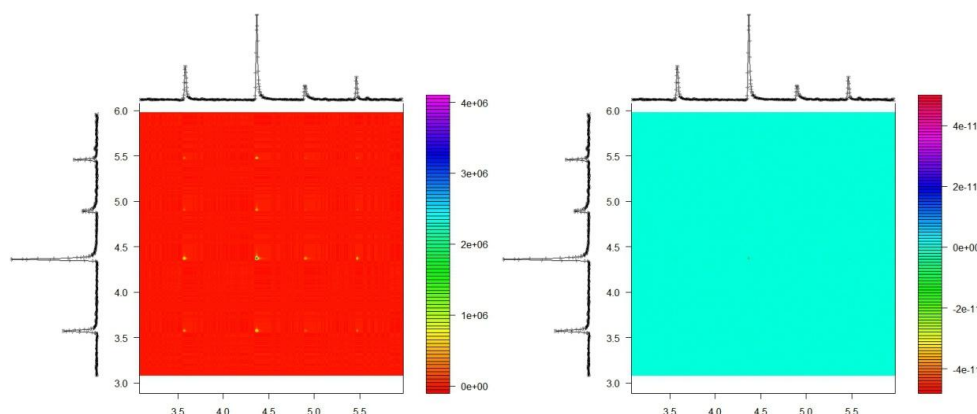
5.2.1. Alapvonal korrekció és Savitzky-Golay simítás

Miután megismertem, hogy a kromatogramokban megfigyelhető változások hogyan jelennek meg a spektrumokban, és láttam, hogy ideális rendszerekre működik a módszer, mért adatokkal végeztem a számításokat.



21. ábra Sztenderd oldat kromatogramjának önmagához hasonlításának szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektruma

Már az első spektrumoknál, amikor sztenderd oldatok összehasonlítását végeztem, kiderült, hogy a Gauss-görbékre használt számítások nem lesznek kielégítőek. Ahogy a 21. ábrán is látszik a spektrumokban megjelentek olyan vonalak, amik később zavarták volna a kiértékelést. Ezek kiküszöbölésére az alapvonal korrekció és a Savitzky-Golay simítás számításokba való integrálásával találtam megoldást.

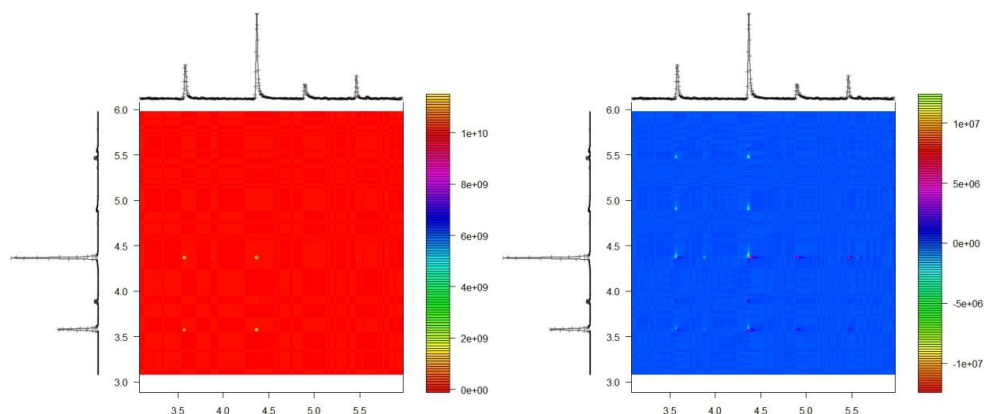


22. ábra Sztenderd oldat kromatogramjának önmagához hasonlításának szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektruma alapvonal korrekció és simítás után

A 22. ábrán a különbség szembeűnő. Mindkét spektrumból eltűntek a vonalak, és megkaptam a tiszta aszinkron spektrumot. Mint a kísérletek során kiderült, ezt az eredményt az alapvonal korrekció produkálta. Tehát a kezeletlen kromatogramok spektrumában az alapvonal változása okozza a megjelenő vonalakat. A simítások ebben az esetben minimális javulással jártak együtt. Ennek ellenére számításban való megtartása fontos, mert kisebb csúcsok vagy zajos jelek vizsgálata esetén jelenthet komoly segítséget.

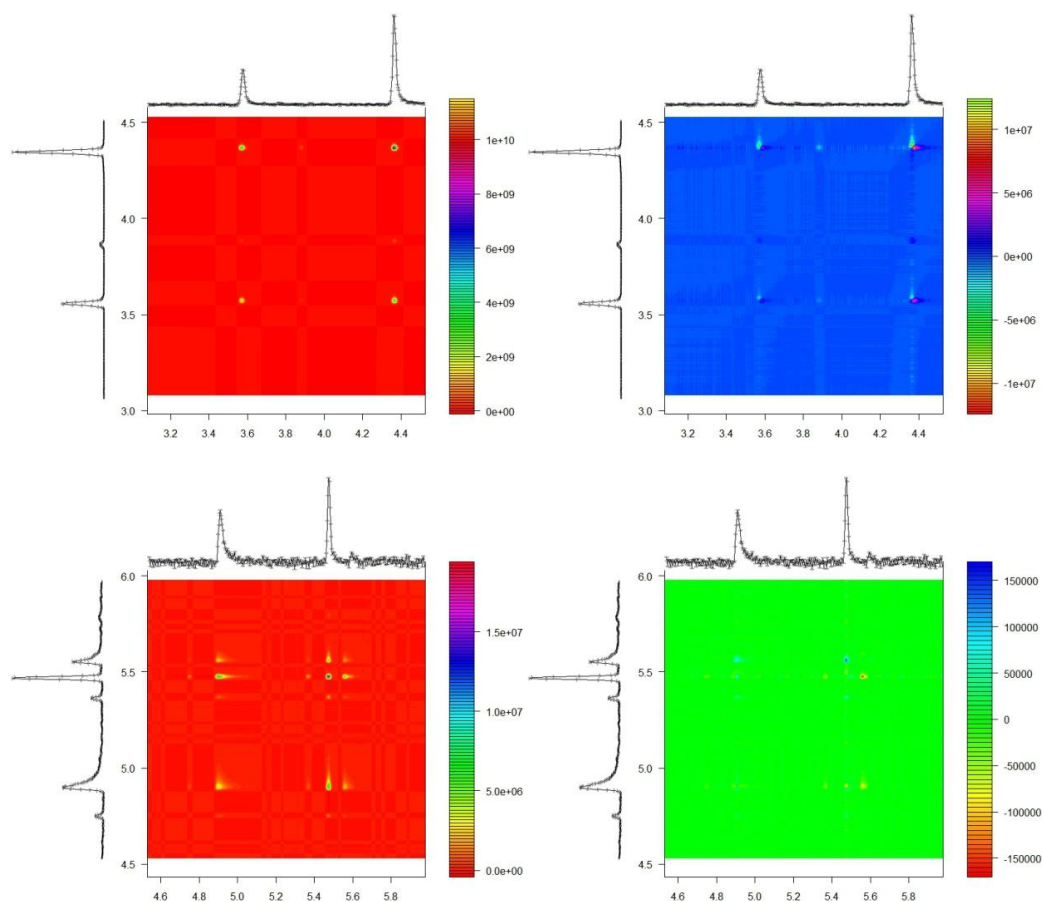
5.2.2. Arányosítás

Miután a mért jelekből adódó problémákat sikerült kiküszöbölnöm, borminták kromatogramjaival folytattam a kísérleteket. Ezeket a sztenderd oldatokhoz hasonlítottam.



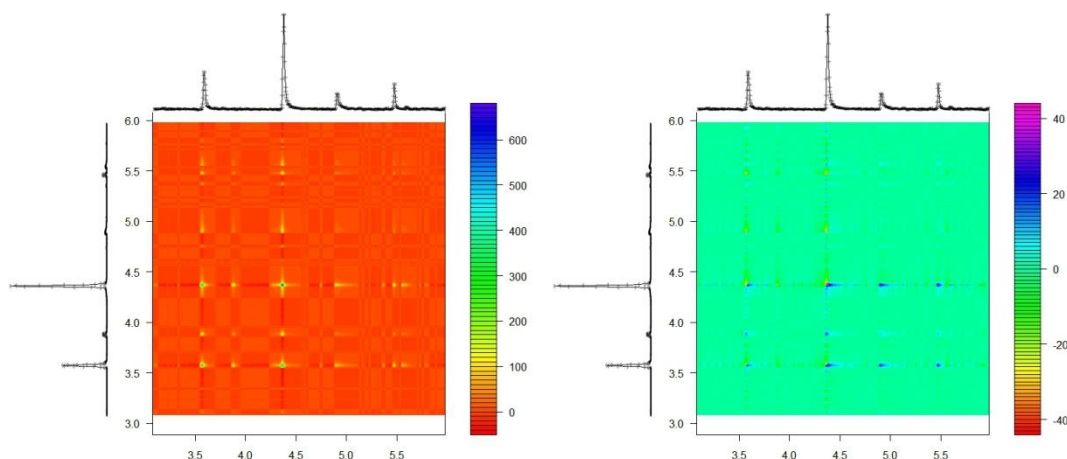
23. ábra Sztenderd oldat és borminta összehasonlításának szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektruma

Jelentkezett azonban egy újabb az előzőnél is súlyosabb probléma, ami csorbíthatta volna a módszer használhatóságát: Annak ellenére, hogy a kromatogramokból jól látszik, a spektrumokban 4,5 perc fölött is kéne látni csúcsokat, ezek mégsem jelennek meg (23. ábra). Mint kiderült, ha a spektrumban a csúcsok között nagyságrendi eltérések vannak, a nagy csúcsok elnyomják a kisebbeket. Erre először olyan megoldást választottam, mi szerint több részletben vizsgáltam a kromatogramokat. Jelen esetben két részre szedtem őket, ezek a 6 perces mérési időben, ahol a kromatogram 3,0-6,0-ig tart 3,0-4,5 perc és 4,51-6,0 perc között voltak.



24. ábra Kromatogramok vizsgálata két részletben, 3,0-4,5 percig (fent), 4,51-6,0 percig (lent), szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektrumok

Ebben az esetben már az összes csúcs jól látható, kiértékelésük könnyen elvégezhető (24. ábra). Jól láthatóak a 3,9; 4,8; 5,4 és 5,6 percnél megjelenő csúcsok képei, valamint az egyes csúcsok aszimmetrikus kiszélesedése. Ez az eljárás azonban korlátokba ütközik, hiszen nagy adatmennyiség esetén igen hosszadalmas minden egyes kromatogramot részére szedni. Szerencsére a szakirodalomban találtam egy másik megoldást [12]. Az arányítási technikák már bevett módszerek a kétdimenziós korrelációs spektroszkópiában, és amint eredményeimből látszik sikerrel alkalmazható kromatogramok esetén is. Kutatásom során az Isao Noda által bevezetett általános arányítást találtam a legcélravezetőbbnek.



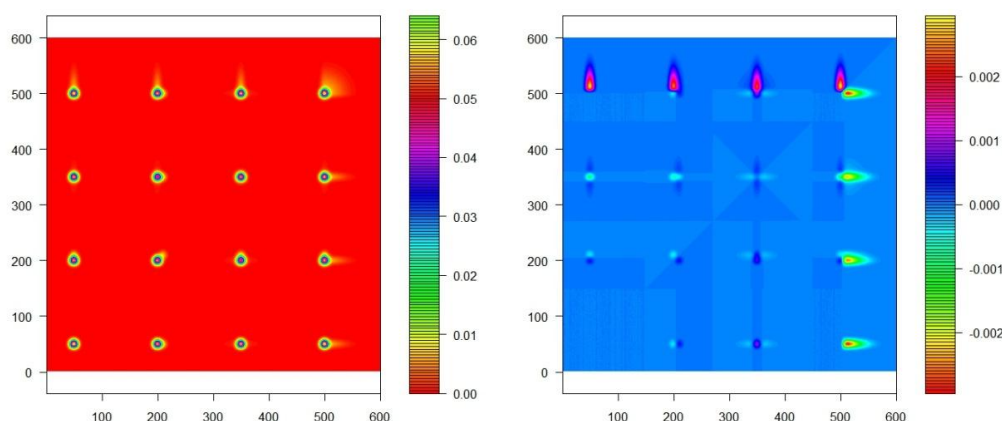
25. ábra Sztenderd oldat és borminta összehasonlításának szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektruma arányosítás után

A 25. ábrán lévő spektrumokon ha halványan is, de látszanak azok a csúcsok, amiket kerestünk. Több elvégzett számítás után, a (33, 34) képletekben megadott α és β kitevőket ebben az esetben $\alpha=0.8$ és $\beta=-0.6$ -os értékekre optimalizáltam. Egy hátránya azonban ezeknek az eljárásoknak is van. Felerősítik ugyan is a zajokat. Így azok a zavaró tényezők, amiket az előző lépésben kiküszöböltem, itt sajnos visszajönnek. Láthatjuk is a spektrumokban az alapvonal okozta vonalakat.

5.3. Több kromatogram összehasonlítása

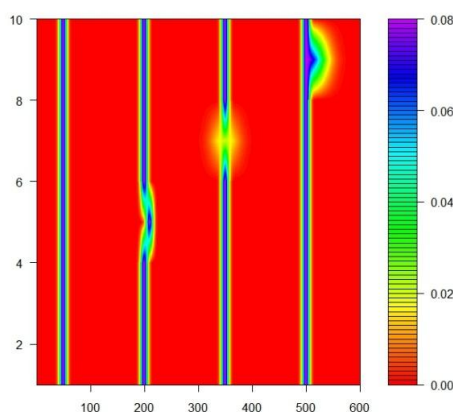
A kétdimenziós korrelációs analízis a kromatográfiában akkor mutathatja meg igazi értékét, ha az összehasonlítani kívánt adatok számát nem korlátozzuk le kettőre. A legtöbb ma használt kromatográfiás szoftver lehetőséget ad több mérés eredményének vizsgálatára azok egy ablakban való megjelenítésével. Azonban ily módon 2-3-nál több kromatogram már nehezen vizsgálható egyszerre. Ezzel szemben a kétdimenziós korrelációs spektrumokkal az összehasonlítani kívánt adatok számának elméleti határa nincs, ráadásul a kiterjesztett dimenzióknak hála az eddig felsorolt tulajdonságok is hozzájárulnak az előnyéhez. Az analitikai munka során pedig gyakran fordul elő, hogy nagymennyiségű adatot kell kiértékelni. A kétdimenziós korrelációs spektrumok számítási igénye a mai számítógépeken nem jelent gondot, a megfelelő program és parancssor meglétével időben sem tart pár percnél tovább. Ebből következik, hogy ez a módszer nagyban felgyorsíthatja az adatfeldolgozást.

Első lépésben szintén Gauss-görbékből álló általam generált kromatogramokkal kezdtem a kísérleteket. Az adatokat úgy állítottam össze, hogy egyszerre tíz kromatogramot vizsgáltam. A tíz kromatogram mindegyike négy csúcsból állt. Először a tíz adatsorból csak egyben változtattam egy csúcs valamilyen tulajdonságát, majd egyszerre több kromatogramban is eszközöltem a változásokat. Ezeket a vizsgálatokat most egy példán keresztül összegzem:



26. ábra 10 db kromatogram vizsgálatának szinkron (balra) és aszinkron (jobbra) spektruma

A 26. ábra szinkron spektrumán is látszik, hogy a kromatogramok között van eltérés, azonban az aszinkron spektrum, mint legtöbb esetben, jóval informatívabb. Megállapítható, hogy a második csúcs retenciós ideje, a harmadik csúcs szélessége változott, és a negyedik csúcs valamelyik mérésnél aszimmetrikus. Ezekről az ábrákról könnyen le lehet olvasni a változások milyenségét, azonban semmilyen információt nem kapunk arról, ezek melyik mérésnél jelentkeztek. Ennek orvoslására választottam egy ábrázolási módot, amelyen a számítás során mátrixba rendezett kromatogramokat ábrázoltam az eddig használt grafikai funkcióval (27. ábra), tehát a számítás mennyiségét gyakorlatilag elhanyagolható mértékben növeltem.



27. ábra 10 db kromatogram egymás mellett ábrázolása felülnézetből

Ezen az ábrán (27. ábra) az x-tengelyen a retenciós idő jelenik meg, az y-tengelyen pedig a minták sorszáma. A kromatogramokat egymás mellé rakva felülnézetből láthatjuk. Az ábra függőleges vonalai valójában a kromatogramokban lévő csúcsok lefutása a mintákon keresztül. Bármilyen változás történik a mérések alatt, a folytonos vonal abban a pontban megszakad. Ebből a perspektívából egyértelműen be tudjuk azonosítani, melyik változás melyik mérésnél következett be. A spektrumokból kapott információk, a második csúcs retenciós idő változása, a harmadik csúcs szélesedése, az szimmetrikus negyedik csúcs hozzárendelhetők rendre az ötös, hetes és kilences számú mintához. Így ebből a három ábrából már minden szükséges információt ki tudunk nyerni.

5.4. Gyakorlati alkalmazás

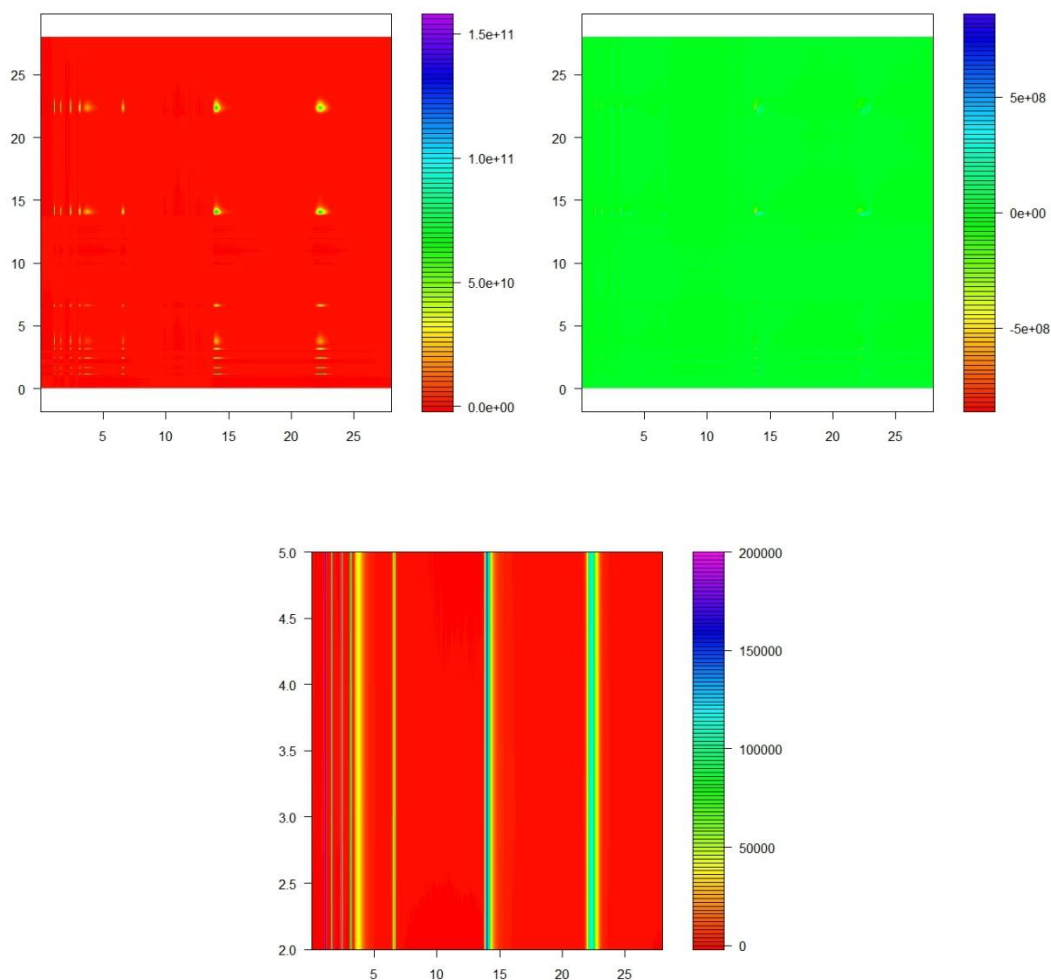
5.4.1. Vizsgálat

Az eddigi generált és mért kromatogramokból történő számításokkal megpróbáltam lefektetni a kétdimenziós korrelációs analízis kromatográfiában való használatának elméleti hátterét. Kísérleteimből kiderül, hogy ez a módszer a spektroszkópai alkalmazásokból kiindulva sikeresen átültethető az elválasztás technikába. A spektrumok változásait hűen tükröző kétdimenziós spektrumok a kromatogramok vizsgálatában is jó szolgálatot tesznek. A következőkben gyakorlati példán keresztül mutatom be, hogy eredményeim nem csak elméleti síkon lehetnek hasznosak.

Az eddig megismert tulajdonságai alapján a kétdimenziós korrelációs analízis a kromatográfia területén talán a validálási eljárásoknál lehet a legeredményesebb. Hiszen ilyen esetekben több, közel azonos értékből kell kiszűrni az esetleg előforduló eltérő méréseket, gyakran nagymennyiségű adathalmazból, amire a szinkron és aszinkron spektrumok ideális megoldást kínálnak. Ezért választottam a gyakorlati kísérlet alanyainak Kele és Guiochon munkájából származó adatokat [24,25].

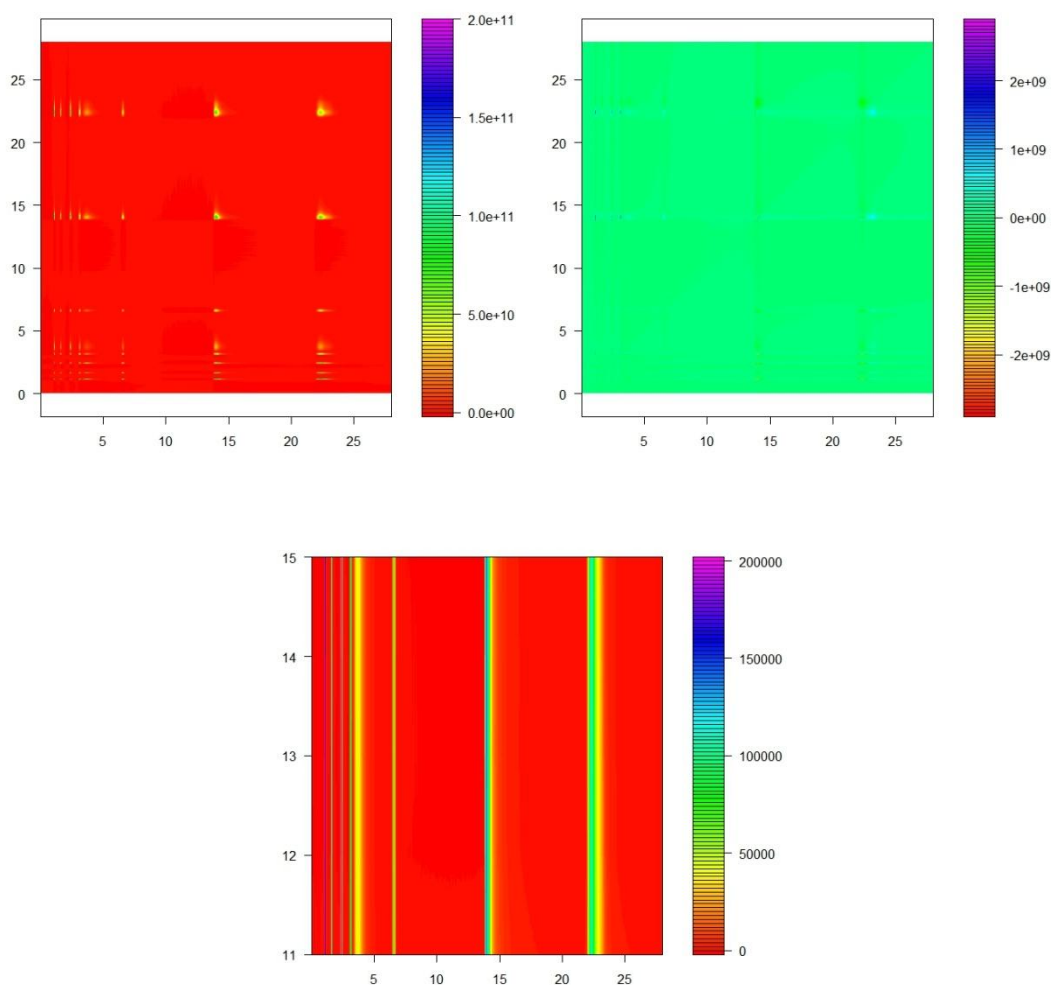
A validálások során az eredményeinket számszerűsíteni kell. Ebből a szempontból a minta-minta korrelációs analízis előnyösebbnek tűnik, hiszen itt minden minta-minta összefüggést egy számmal tudunk jellemezni, ami hasonló eredményt mutathat a klasszikus kiértékelés relatív szórásához. Ám azon felül, hogy talán egyszerűsítheti a procedúrát, semmi plusz információt nem ad. A két mérés közötti hasonlóságot/különbséget egy számban ki tudjuk fejezni, azonban a kapcsolat milyenségéről, részleteiről semmit nem tudunk meg. Ráadásul a kapott érték egyes esetekben akár félrevezető is lehet. Ezzel szemben a kétdimenziós spektrumok azonnal minőségi információt adnak, sőt egyszerre egy ábrán vizsgálhatjuk az összes eredményt. Természetesen az előbbiekből adódik, egy hátránya is, számszerűsítése eddig nem megoldott. Ez azonban nem zárja ki, hogy a jövőben se legyen rá megoldás.

A kísérlet során először az egyes oszlopokon mért (az első oszlopon csak 4) 5-5 kromatogramot hasonlítottam össze. Minden egyes esetben előállítottam a szinkron, aszinkron spektrumokat, a kromatogramok egymás mellett ábrázolt felülnézeti képét, és a minta-minta korrelációs térképeket. Két példán illusztrálom az eredményeket:



28. ábra Az első oszlopon mért négy kromatogram szinkron (balra), aszinkron (jobbra) spektruma és a kromatogramok felülnézeti képe (alul)

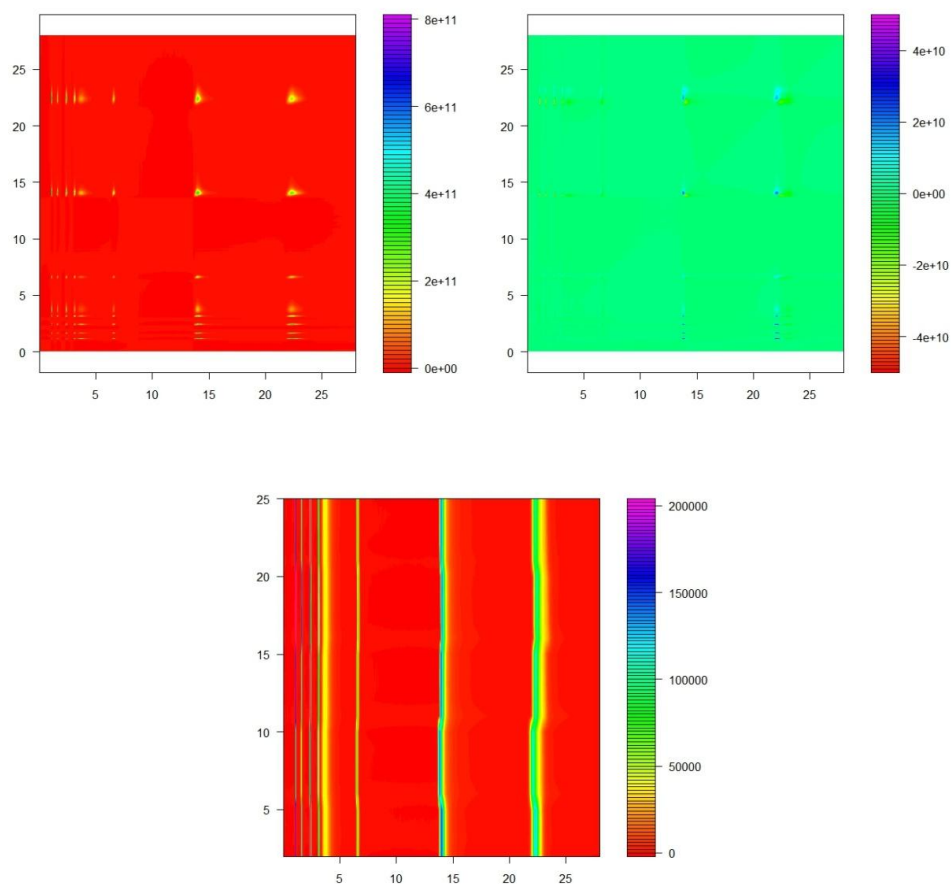
Az első oszlopon mért eredmények (28. ábra) igen kicsi eltérést mutatnak. A szinkron spektrumon láthatjuk a nyolc csúcs auto- és keresztcsúcsait, de ennél több információt nem tudunk meg. Az aszinkron spektrum már árulkodóbb annak ellenére vagy éppen azért, mert nagyon kevés értéket mutat. Jobban megnézve a 2,2-dipiridil (7.) és 1,3-dihidroxinaftalén (8.) csúcsaiban van némi eltérés, a retenciós idejük változik és aszimmetrikusak is lesznek, de ezek a változások minimálisak, legnagyobb esetben is a szinkron spektrum csúcsainál három nagyságrenddel kisebbek. A harmadik ábra is azt mutatja, hogy a csúcsok lefutása a mérésekkel szinte nem is változik.



29. ábra A harmadik oszlopon mért 5 db kromatogram szinkron (balra), aszinkron (jobbra) spektruma és a kromatogramok felülnézeti képe (alul)

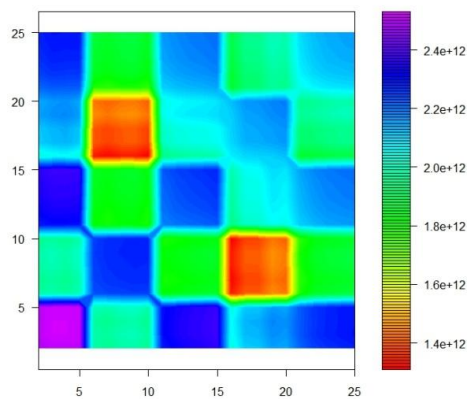
A harmadik oszlopon mért kromatogramokkal is hasonló a helyzet (29. ábra), bár itt az aszinkron spektrumban már hasonló eltérések nagyobb mértékben lépnek fel, de még ezek is a szinkron spektrum értékeinél két nagyságrenddel kisebbek, mondhatjuk, hogy elhanyagolhatók. A harmadik ábrából láthatjuk, hogy a 11-es (ezen az oszlopon első) mérés tér el a többitől. A kromatogramokon külön ellenőrizve ez igazolást is nyer.

Ezekkel a vizsgálatokkal még nem merítettem ki a kétdimenziós korrelációs analízis lehetőségeit. Az eddig bemutatott eredményeket egy számításán belül is megkaphatjuk:



30. ábra Mind az 5 oszlopon mért 24 db kromatogram szinkron (balra), aszinkron (jobbra) spektruma és a kromatogramok felülnézeti képe (alul)

Egyszerre vizsgálva az összes spektrumot érthető módon jelennek meg különbségek (30. ábra), főleg a retenciós időkben. Azonban amit a spektrumokból nem látunk, azt jól illusztrálja a harmadik ábra. Igaz, hogy a csúcsok helye változik, azonban egy oszlopon mért kromatogramok esetében nem. Az oszlopok közötti ilyen szintű különbség pedig még megengedhető.

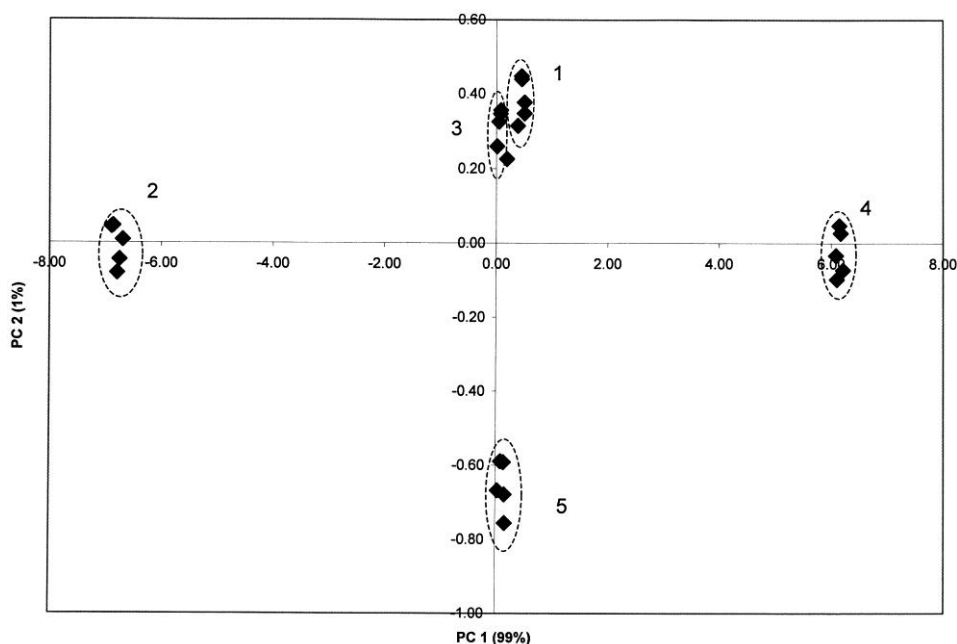


31. ábra A 24 mérés minta-minta korrelációs térképe

A minta-minta korrelációs térkép megmutatja, két-két minta mennyire hasonlít egymásra. Minél nagyobb a korreláció értéke, annál kisebb az eltérés. A 31. ábrán sakktábla szerű mintázat jelenik meg 5x5-ös négyzetekkel. Ez abból adódik, hogy az azonos oszlopokon mért kromatogramok alig térnek el egymástól, így azok közel síkfelületet adnak, és ötös csoportokban korrelálnak. Mindezt egybevetve a korábbiakkal megegyező eredményre jutottam. A kromatogramok között számottevő eltérés nincs. A legnagyobb érték is csupán kétszerese a legkisebbnek. A legalacsonyabb terület - azaz a legkisebb korreláció - a második és negyedik HPLC oszlop között van. A 30. ábra alapján ezt is könnyen értelmezni lehet. Ezen a két oszlopon a legnagyobb a retenciós idők eltérése.

5.4.2. Összehasonlítás

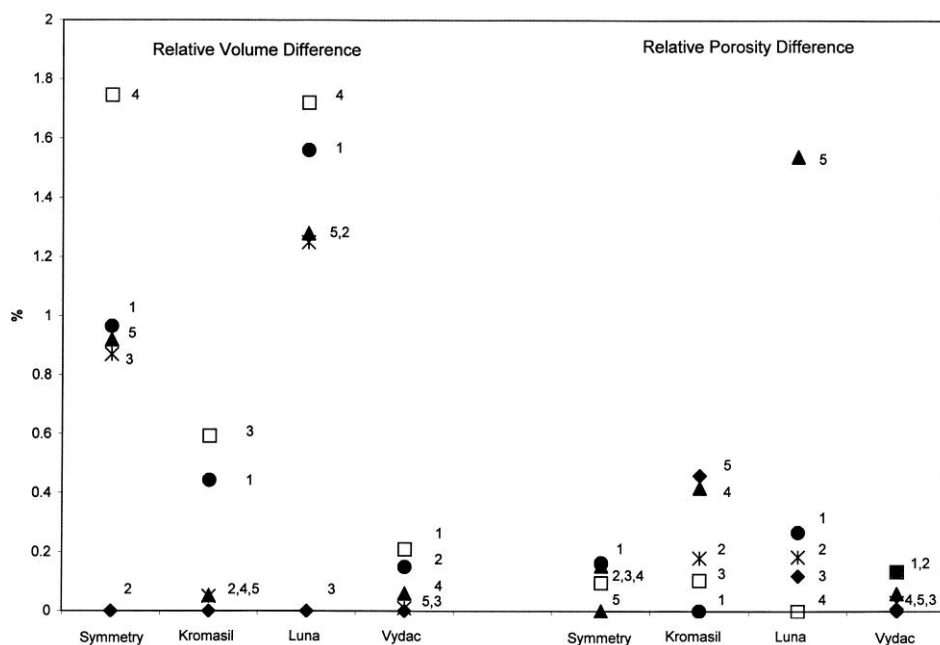
Felinger és munkatársai a Kele és Guiochon méréseiből kapott adatokat főkomponens elemzésnek vetették alá [26]. Ahogy a 32. ábrán láthatjuk, a második főkomponens a variancia 1%-t adja, így ezen a tengelyen a különbség elhanyagolható. Az első főkomponens adja meg a variancia 99%-át. Ezen a tengelyen, egymástól nagyon távol helyezkednek el a 2. és 4. oszlopon mért eredmények. Ebből kiderül, hogy ezek az oszlopok térnek el a legjobban egymástól.



32. ábra Symmetry C₁₈ oszlopokon mért retenciós időkön végzett főkomponens elemzés eredménye [26]

A kétdimenziós minta-minta korreláció (31. ábra) és a főkomponens elemzés eredményei (32. ábra) egyaránt azt mutatják, hogy az 1., 3. és 5. HPLC oszlopon nagyon hasonló a retenciós idők értéke. Az említett három HPLC oszlop a 2. és a 4. oszloptól eltérő eredményeket ad, és a legnagyobb különbség a 2. és a 4. HPLC oszlop között mutatkozik.

Felinger és munkatársai azt is vizsgálták, az oszlopok közötti eltérések miből adódnak. Az oszlopok ugyan abból a gyártási sarzsból származtak. Töltésüknél a két fontos tényező az acélcső (oszlop teste) hossza, és a töltet tömörsége. A 33. ábrából láthatjuk, az eredmények magyarázhatók az oszlopok valódi hosszával, tehát a 2. oszlop tartalmazza a legrövidebb, míg a 4. a leghosszabb töltetet.



33. ábra A vizsgált HPLC oszlopok relatív térfogatkülönbségének és porozitásbeli különbségének eredményei. Az általam vizsgált adatok a Symmetry megnevezésű oszlopra vonatkoznak

Láthatjuk, hogy Felinger és munkatársai főkomponens elemzéssel kapott eredményei megegyeznek a kétdimenziós korrelációs analízis által kapott eredményekkel. Ebből következik, hogy az általam felállított módszer a jövőben alternatívaként szolgálhat hasonló jellegű méréseknél az eredmények közötti különbség, illetve hasonlóság elemzésére.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során a kétdimenziós korrelációs analízist, ami a spektroszkópiában évtizedek óta bevált módszer, sikerrel ültettem át a kromatográfia területére. Megmutattam, hogy az eddig spektrumok összehasonlítására használt elvek kromatogramok vizsgálatára is alkalmasak.

Felállítottam egy parancssort az R project nevű ingyenes programon belül, ami lehetővé teszi a kétdimenziós korrelációs spektrumok kiszámítását. Ez az algoritmus tartalmaz testre szabható paraméterekkel alapvonal-korrekciót, Savitzky-Golay simítást és általános arányosítást, miáltal használatára adatok széles körén nyílik lehetőség.

Megismertem a kétdimenziós spektrumok tulajdonságait, azaz hogyan válaszolnak a kromatogramokban előforduló változásokra.

Egy példán keresztül bemutattam, hogy a kétdimenziós korreláció a kromatográfia területén is jó szolgálatot tehet. Eredménye megegyezik a főkomponens elemzéssel, és a kétdimenziós korrelációs analízisen belül a kromatográfiában eddig használt módszernél lényegesen több információval szolgál.

A jövőben szeretném további saját mérésekkel alátámasztani a dolgozatban foglaltakat. Valamint megvizsgálni, a kromatográfia területén még milyen lehetőségek rejlenek a kétdimenziós korrelációs analízisben.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] A. Bax, *Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids*, Reidel, Boston, 1982.
- [2] I. Noda, *Bull. Am. Phys. Soc.*, 31, 520 (1986).
- [3] I. Noda, *Appl. Spectrosc.*, 47, 1329 (1993).
- [4] Isao Noda, Yukihiro Ozaki, *Two-dimensional Correlation Spectroscopy – Applications in Vibrational and Optical Spectroscopy*, John Wiley & Sons Ltd., 2004
- [5] Isao Noda, Progress in two-dimensional (2D) correlation spectroscopy, *Journal of Molecular Structure* 799 (2006) 2–15
- [6] Isao Noda, Recent advancement in the field of two-dimensional correlation spectroscopy, *Journal of Molecular Structure* 883–884 (2008) 2–26
- [7] H.L. Sui, X.Y. Liu, F.C. Zhong, X.Y. Li, X. Jua, A study of radiation effects on polyester urethane using two-dimensional correlation analysis based on thermogravimetric data, *Polymer Degradation and Stability* (2012) 1-6
- [8] Gufeng Wang, John Karnes, Christopher E. Bunker, M. Lei Geng, Two-dimensional correlation coefficient mapping in gas chromatography: Jet fuel classification for environmental analysis, *Journal of Molecular Structure* 799 (2006) 247–252
- [9] Y. Ozaki and I. Noda (eds), *Two-Dimensional Correlation Spectroscopy*, *AIP Conf. Proc.* 503, AIP, Melville, 2000
- [10] I. Noda, *Appl. Spectrosc.* 54 (2000) 994–999
- [11] Isao Noda, Close-up view on the inner workings of two-dimensional correlation Spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy* 60 (2012) 146–153
- [12] Isao Noda, Scaling techniques to enhance two-dimensional correlation spectra, *Journal of Molecular Structure* 883–884 (2008) 216–227
- [13] Jiangtao Penga, Silong Penga, An Jianga, Jiping Weib, Changwen Li b, Jie Tana, Asymmetric least squares for multiple spectra baseline correction, *Analytica Chimica Acta* 683 (2010) 63–68
- [14] Donald A. Barkauskas, David M. Rocke, A general-purpose baseline estimation algorithm for spectroscopic data, *Analytica Chimica Acta* 657 (2010) 191–197
- [15] A. Savitzky and M. J. E. Golay, "Soothing and differentiation of data by simplified least squares procedures," *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627–1639
- [16] Jianwen Luo, Kui Ying, Jing Bai, Savitzky–Golay smoothing and differentiation filter for even number data, *Signal Processing* 85 (2005) 1429–1434
- [17] S. Wold, E. Johansson, M. Cocchi, in: H. Kubinyi (Ed.), *3D QSAR in Drug Design; Theory, Methods and Applications*, ESCOM Science Publishers, Leiden (1993) 523–550
- [18] I. Noda, in: Y. Ozaki, I. Noda (Eds.), *Two-Dimensional Correlation Spectroscopy*, AIP Press, Melville (2000) 201–204
- [19] R. K. Iler, *The Chemistry of Silica*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1979
- [20] C. Zimba, presented at the Second International Symposium on Advanced Infrared Spectroscopy (AIRS II), Durham, NC, June 17, 1996 and at the First International Symposium on Two-Dimensional Correlation Spectroscopy (2DCOS), August 30, 1999, Sanda, Japan
- [21] S. Šašić, A. Muszynski, and Y. Ozaki, *J. Phys. Chem. A* 104, 6380 (2000)
- [22] <http://www.r-project.org>
- [23] Simon József, Borok brettanomyces fertőzése során keletkező illékony fenolos vegyületek meghatározása GC-MS vizsgálati módszerrel, Szakdolgozat, PTE, 2011
- [24] Marianna Kele, Georges Guiochon, Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns I. Experimental protocol, *Journal of Chromatography A*, 830 (1999) 41–54

- [25] Marianna Kele, Georges Guiochon, Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatographic columns II. Results obtained with Symmetry C₁₈ columns, *Journal of Chromatography A*, 830 (1999) 55–79
- [26] Attila Felinger, Marianna Kele, Georges Guiochon, Identification of the factors that influence the reproducibility of chromatographic retention data, *Journal of Chromatography A*, 913 (2001) 23–48

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Felingér Attilának az útmutatását, és a dolgozat összeállításában nyújtott segítségét.