



## 46. MAGYAR SPEKTROKÉMIAI VÁNDORGYŰLÉS

Szeged

2003. június 30. – július 2.

**Előadások összefoglalói**

## A HPLC/FT-IR csatolt rendszer működési elvei, problémák és a potenciális megoldás(ok)

István Krisztina<sup>1</sup>, Rajkó Róbert<sup>2</sup>, Keresztury Gábor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kémiai Kutatóközpont, Kémiai Intézet; 1525 Budapest, Pf. 17.

E-mail: krisztina.istvan@chemres.hu

<sup>2</sup>Szegedi Tudományegyetem, Élelmiszeripari Főiskolai Kar; 6725 Szeged, Mars tér 7.

**Működési elvek.** Keverékek folyadékkromatográfias (LC) elválasztása során az infravörös (IR) spektrométerek detektorként való alkalmazását először 1975-ben mutatták be [1], mely munka az átfolyós folyadékcella használatára irányította a figyelmet. Ez a működési elv (módszer) az UV detektálás technikai megvalósításához annyiban hasonlít, hogy lényegében mindkét esetben a kromatográfias oszlop után elhelyezett, megfelelően kialakított cella van bekötve a folyadékáramlás útjába. Technikai szempontból csak a cellák anyaga, illetve az alkalmazott rétegvastagság/cellatérfogó különbözik, attól függően, hogy a fény melyik intervallumát használjuk fel a transzmissziós detektálás során.

Az IR detektálás másik módszerének, az úgynevezett oldószereliminációs technikának a bevezetése Kuehl és Griffiths nevéhez fűződik [2]. E módszer (és a későbbiekben továbbfejlesztett technikai változatok) alkalmazása esetén a kromatográfias elválasztás után az oldószer, azaz az eluens fizikai eltávolítása történik meg, miközben az így koncentrált elválasztott komponensek egy megfelelő IR médium felületére kerülnek porlasztással. Ezután történik az IR detektálás, melynek módja lehet: reflexiós-abszorpciós, DRIFT, illetve transzmissziós, az alkalmazott IR médium anyagától függően.

Mind az átfolyós folyadékcellás, mind az oldószereliminációs módszerekre igaz ma már, hogy ezek "on-line" és "real-time" módszerek, azaz a kromatográfias elválasztással integráltan és azzal egyidőben elvégezhető az IR detektálás. Ennek eredményeképpen a klasszikus kromatográfias detektálási módszerekkel (UV, fluoreszcens, refraktív index, stb.) szemben a komponensekről kémiai szerkezeti információk is nyerhetők.

Az a tény, hogy az átfolyós folyadékcellás mérési mód hátrányai az eluensek detektáláskori jelenlétéhez köthetők (az eluens és az elválasztott komponens között fellépő kölcsönhatások sávtorzulásokat okozhatnak, az eluens intenzív sávjainak helyén teljes spektrális információvesztés léphet fel), azt eredményezte, hogy napjainkig az oldószereliminációs módszer fejlődött erőteljesen. Ez utóbbi módszer különböző technikai változataival kapcsolatos problémákat és előnyöket Somsen és munkatársainak összefoglaló munkája [3] részletesen tárgyalja.

Általánosan igaz azonban mindenféle oldószereliminálási technikára, hogy alapvetően egy technikailag bonyolultabb rendszer kiépítését követeli meg, miközben az általános használhatóság kapcsán korlátozó tényezők lépnek fel (pl.: az eluens eliminálása csak részleges, és csak az eluensnél kevésbé illékony vegyületek vizsgálhatóak), ezért célszerűnek

láttuk az egyszerűbb kivitelezhetőségű átfolyós folyadékcellás módszer problémáira megoldás(oka)t keresni.

**Potenciális megoldás(ok).** Mivel az IR spektroszkópia tipikus oldószerei a kromatográfiás elválasztási feladatoknak csak egy szűk körét teszi lehetővé, s a normál fázisú ill. fordított fázisú elválasztások során alkalmazott szokásos oldószerek (eluensek) pedig a spektrális információk kinyerését részlegesen gátolják ha átfolyós folyadékküvetével dolgozunk, kézenfekvő megoldást jelenthet, ha olyan új, eddig sem az IR spektroszkópiában, sem a kromatográfiában nem használt oldószereket keresünk, amelyek keresésekor elsődlegesen az IR spektroszkópiai alkalmazhatósági kritérium szerint válogatunk. Az ilyen kritériumokkal kiválogatott oldószerek közül kell majd azokat kiválasztani, amelyek normál körülmények között folyadékok és stabilak, az elválasztandó szerves kémiai vegyületekkel (az elválasztási körülmények között) nem lépnek reakcióba, ill. az elválasztási funkciót is biztosítani tudják.

Az ilyen vegyületek kiválogatásához IR spektroszkópiai szempontból 2 kritériumot állítottunk fel:

1. A kiválasztásra kerülő potenciális eluens-beli molekulák maximum 3 (esetleg 4) féle atomból épüljenek fel úgy, hogy ezen atomok szimmetrikus molekulát hozzanak létre.
2. Kevés IR sáv jelentkezék a 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  tartományban, ill. a megjelenőek a kevés információt hordozó részekre essenek /pl. 2000-1850  $\text{cm}^{-1}$ , 650-400  $\text{cm}^{-1}$ /.

A 2. pontnak való megfelelést vagy az irodalomban található spektrum alapján, vagy a spektrum elméleti szimulálásával döntöttük el. Az elméleti számítások a HyperChem programmal, a szemiempirikus PM3 módszerrel történtek. Gyakran azonban, ha egy vegyület az 1. kritériumnak megfelelt, akkor előbb a halmazállapotára vonatkozó információt gyűjtöttük be.

A tipikusan szerves vegyületek köréből származó anyagok közül 64 felelt meg az 1. kritériumnak, ebből 29 bizonyult folyadéknak irodalmi adatok alapján. A 2. kritérium, de főleg a vegyület stabilitásának igénye azonban azt eredményezte, hogy az eddig vizsgált vegyületekről megállapítottuk, hogy azok egyike sem felel meg új potenciális eluensnek.

Új eluensek híján, a kromatográfiában klasszikusan használt, tetszőleges eluens IR detektálásakor jelenlétéhez köthető problémák matematikai megoldására kerestük a választ. Ígéretes megoldásnak egy kemometriai módszer, a PARAFAC (ill. a PARAFAC2) alkalmazása tűnik. A PARAFAC (PARalell FACtor analysis) felhasználásának egyik kritériuma, hogy a kiindulási adathalmaz 3-utas (vagy többutas) legyen, a másik, hogy a paralell/azonos adatstruktúrájú mátrixokban egy adott kémiai komponensre vonatkozóan a reprezentált/mért koncentrációk egymástól lineárisan függetlenek legyenek.

A módszer tesztelésére szimulált, átfolyós folyadékcellában történő mérést reprezentáló HPLC/IR adatokat használtunk fel, azaz mindegyik "kromatográfiás" csúcshoz az eluens és az elválasztott komponens keverékspektrumainak sorozata tartozik, míg a "kromatográfiás" alapvonalszakaszokhoz csak a tiszta eluens spektrumok sorozatai. A szimulált IR spektrumsorozatok készítésekor az ALDRICH elektronikus adatbázisában található n-hexán,

1-klórhexán, 1,3-dioxolán és 2-metoxi-1,3-dioxolán spektrumok (referenciaspektrumok) felhasználására került sor. A spektrumsorozatok az időtengely mentén nem tartalmaztak zajkomponenst, és a „kromatogramokban” a kromatográfiai csúcsokat 1-1 háromszög reprezentálta, egymástól jól elkülönülten. A szimulálásban a n-hexán szerepelt eluensként, míg a többi vegyület az elválasztott komponensek szerepét töltötték be. Mivel egyetlen szimulált (vagy valódi) HPLC/IR mérésnek megfelelő adatsor csak 2-utas adathalmaznak számít, a 3-utasságot jelen esetben 5 darab HPLC/IR méréshez tartozó spektrum és „kromatogram” adatok szimulálásával biztosítottuk. Ez annyit jelent, hogy 5 darab, ugyanazon komponenseket tartalmazó elegy elválasztásához tartozó mérési adatokat (5 mintát) szimuláltunk úgy, hogy az elegyekben a komponensek önmagukhoz (és egymáshoz) viszonyítottan különböző koncentrációkban voltak jelen.

A PARAFAC módszerek alkalmazásával végeredményként a tiszta komponensekhez tartozó spektrumokat (a hullámszám profilt), egyetlen egy normált kromatogramot (az elúciós vagy idő profilt) és a minta sorszámának függvényében a komponensek relatív koncentrációját (koncentráció profilt) kaphatjuk meg.

A PARAFAC szimulált adatokon való tesztelése során az alábbiakat állapítottuk meg:

- A kemometriában szokásos adatelőkezelési eljárások közül a skálázás nagyban befolyásolja a számított spektrumok minőségét, ennél fogva egyáltalán nem előnyös a használata.
- A skálázás nélküli, tehát eredeti adathalmazon elvégzett ALS (Alternating Least Squares) algoritlussal futtatott PARAFAC alkalmas arra, hogy ismeretlen komponensszám esetén is meghatározzuk a komponensek számát. Amint a számítás elején több komponens adunk meg, mint amennyit az adatok ténylegesen reprezentálnak, a többletkomponens(ek)hez tartozó spektrum(ok) spektrálisan értelmezhetetlenné, zajszerűvé válnak.
- Az ALS algoritmus mellett alkalmazható direkt és nem direkt (az az iteratív) mátrix-inicializációs módok önmagukban nem tudják garantálni, hogy a számított spektrumokban csak pozitív abszorbanációjú adatok legyenek, illetve a kromatogram csak pozitív irányultságú csúcsokat tartalmazzon, ezért ezen profilokra vonatkozóan a nem-negativitás kritériumát mindenképp alkalmazni kell a számítás során.

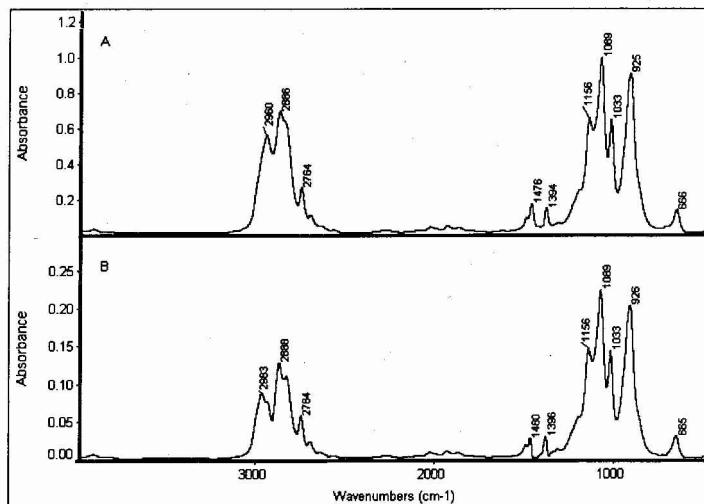
Mivel a skálázás nélküli adathalmazon, nem-negativitás feltételekkel a rendelkezésre álló algoritmusok nem szolgáltatnak kielégítő eredményt, sort kerítettünk a PARAFAC2 módszer kipróbálására. E módszer fontos tulajdonsága, hogy megengedi egyetlen profil változását. Esetünkben pedig ez a helyzet, hiszen belátható, hogy ott ahol „kromatográfiai” csúcs jelentkezik, ott az eluens koncentrációja az elválasztott komponens koncentráció változásának függvényében változik; s míg 1 mintán (1 HPLC/IR mérésen) belül az elválasztott komponensekhez 1-1 koncentráció tartozik, az eluenséhez annyi, ahány elválasztott komponens van. Más szóval az eluens koncentrációja változik egy mintán/mérésen belül.

Miután elvégeztük a számítást a PARAFAC2 ALS algoritmusát használva (szintén skálázatlan adathalmazon és nem-negatív kritériumot alkalmazva a hullámszám és idő profilokra), már kielégítő eredményt kaptunk. Az így kiszámított spektrumoknak a referencia spektrumokkal való korrelálásának mértéke ugyanis már lehetővé tette, hogy az ALDRICH

adatbázisban történő elektronikus keresés eredményeként a komponensek helyes azonosítása megtörténjen. Az 1. táblázat ezt mutatja meg, míg az 1. ábrán példaként a 2. komponenshez tartozó referenciaspektrum valamint a szakértői spektrumkiértékelés alapján történő komponens azonosítást is lehetővé tevő számított spektrum látható. Összességében tehát a számított spektrumok mind a referencia spektrumokkal való korreláltságának mértéke alapján, mind pedig a szakértői véleményezés alapján alkalmasak voltak az adott kémiai komponens azonosítására.

1.táblázat

	Korrelálás mértéke[%]	Azonosítás eredménye
1. komponens	94.96	1-klórhexán
2. komponens	97.68	1,3-dioxolán
3. komponens	98.40	2-metoxi-1,3-dioxolán



1.ábra. 1,3-dioxolán spektrumok; A: referencia, B: számított

Jelenleg a valós mérésekből származó, zajjal és az eluens-eluátum kölcsönhatásából származó (matematikai értelemben vett) többletkomponens jelenlétével is terhelt adathalmaz kiértékelése folyamatban van.

#### Felhasznált irodalom

- [1] K.L. Kizer, A.W. Mantz, L.C. Bonar, *Am. Lab.*, **7**, 85-90 (1975)
- [2] D. Kuehl, P.R. Griffiths, *J. Chrom. Sci.*, **17**, 471-476 (1979)
- [3] G.W. Somsen, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, *J. Chrom. A*, **811**, 1-34 (1998)