

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Kémia Doktori Iskola

**KÉT-DIMENZIÓS KORRELÁCIÓS ANALÍZIS
ALKALMAZÁSA A KROMATOGRÁFIÁBAN ÉS AZ
ALTERÁCIÓS ANALÍZIS BEMUTATÁSA**

PhD értekezés tézisei

Simon József

Analitikai és környezeti kémia
Tanszék

Témavezető:
Dr. Felinger Attila
egyetemi tanár



PÉCS, 2018

Bevezetés

A számítógépes adatfeldolgozás és így a kemometria az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb jelentőségre tesz szert az analitikai kémia területén. A rohamosan fejlődő műszereknek köszönhetően a feldolgozandó adathalmazok egyre nagyobb méretűek és egyre komplexebbek lesznek. Szerencsére a számítástechnika is legalább ilyen ütemben fejlődik, így lehetőség nyílik egyre komplexebb adatfeldolgozó programok kidolgozására és ezek mindennapi használatára.

A kemometriai módszerek felé alapvetően két elvárás van, amik bizonyos szempontból egymásnak ellent is mondanak. Egyrészt a folyamatosan növekvő és egyre bonyolultabb adathalmazokat kell kezelniük, másrészt a kapott eredményeket minél egyszerűbb, könnyen érthető, lehetőleg vizuális módon kell prezentálniuk. Van azonban egy szakterület a kemometrián belül, ami ezeket a feltételeket tökéletesen teljesíti, ez pedig a két-dimenziós korrelációs analízis (2DCOR). Ez a módszert eredetileg az infravörös spektroszkópia (IR) kiterjesztésére fejlesztették ki úgy, hogy az mágneses magrezonancia spektroszkópia (NMR)-ben már régóta használt módszereket ültették át. A módszer nagy sikereket ért el és idővel kiterjesztették más analitikai módszerekre is. Ennek ellenére továbbra is túlnyomó többségben IR és látható spektroszkópia (VIS)-ben használják. Azonban alapvető tulajdonságai a kromatográfiában is hasznosak lehetnek.

A dolgozatban kifejtjük a 2DCOR fejlődését az egyszerű IR módszertől kezdve a széleskörűen használt, szerteágazó szakterületig. Kifejtjük az eredeti- és az általunk kifejlesztett módszer matematikai hátterét. Részletes összehasonlítást adunk a két módszert tulajdonságairól számítógép által generált adatokon, megmutatjuk a saját módszerünk hogyan működik magasabb dimenziójú rendszereken, végül mért adatokon mutatjuk be ezek gyakorlati jelentőségét.

Célok

A munkánk fő céljai a következők:

- a 2DCOR tulajdonságainak feltérképezése a kromatográfiában;
- a 2DCOR kiterjesztése három-dimenziós adathalmazokra, ami két-dimenziós kromatogramokból áll;
- egy új módszer felállítása, ami képes három-dimenziós adathalmazok kezelésére és amiben különös figyelmet kap a kromatográfiás felhasználás;
- a 2DCOR és az általunk felállított módszer összehasonlítása két-dimenziós adathalmazokon;
- a 2DCOR hatékonyságának bizonyítása a kromatográfiában mért adatokon egyéb kemometriai módszerrel való összehasonlítással;
- módszerünk gyakorlati előnyeinek bemutatása mért kromatogramokon komplex problémák megoldásával.

Módszerek

Munkánk nagy részét képezte a szükséges számítástechnikai háttér kiépítése. A dolgozat nem foglalkozik részletesen a munka programozási aspektusával, de szeretnénk kiemelni, hogy nem használtunk kereskedelemben beszerezhető szoftvereket, minden számításához a programot az R [1] nyelvben írtuk az Rstudio [2] segítségével.

A kromatográfias csúcsokat exponenciálisan módosított gauss függvény (EMG)-vel modelleztük. A perturbáció kiváltotta változásokat úgy állítottuk elő, hogy az EMG paramétereit változtattuk a kromatogramok között.

Az ismételhetségi kísérlethez a főkomponens elemzés (PCA)-t Felinger és tsi. [3] végezték Kele és tsi. mérései alapján [4, 5].

Kele és tsi. munkáját [4–9] Gritti és tsi. folytatták nemlineáris körülmények között [10, 11]. Ezekre az adatokra szintén Felinger és tsi. végezték a PCA-t [12].

A dolgozat továbbá tartalmaz két kísérletsorozatot, ahol mért adatokon alkalmazuk az alterációs analízis (ALA)-t. Az első esetben egy hét komponensből álló elegyet mértünk, ahol a komponensek koncentrációját külön változtattuk. Ezt a mérést hasonlítottuk össze számítógép által generált adatokkal. A második esetben az oldószer metanol koncentrációját változtattuk 0%-ról 100%-ig.

Eredmények

A 2DCOR egy régóta sikeresen használt módszer a spektroszkópiában, azonban széles körben a kromatográfiában még nem terjedt el. Az eredeti koncepció megengedi, hogy bármilyen adatot felhasználjunk a számolásokban, így elméletileg a kromatogramokra való áttérés spektrumok helyett nem okozhat problémát. A gyakorlatban azonban természetesen vannak különbségek, amik részletes leírása eddig váratott magára. Számítógép által generált adatok segítségével az EMG csúcsok paramétereit egyesével, szisztematikusan tudjuk változtatni. A dolgozat bemutat egy sor rendszerezett kísérletet, amiben ezek a változtatások által generált korrelációs térképek mintái könnyen érthetővé válnak.

A kromatográfiában a két-dimenziós mérések egyre elterjedtebbé válnak. Ebből adódóan felmerül a kérdés, hogy a 2DCOR képes-e ilyen adatokkal dolgozni. Ennek megoldására fejlesztettük ki az ALA-t, ami megtartja az eredeti módszer alapvető tulajdonságait, de a számítást és a térképek ábrázolását leegyszerűsíti, így lehetővé válik olyan három-dimenziós adathalmazok kezelése, amik két-dimenziós kromatogramokra alkalmazott egy perturbációból állnak. A dolgozatban ennek a 3D ALA-nek a tulajdonságait is a 2DCOR-ra alkalmazott rendszer szerint mutatjuk be.

Megmutattuk, hogy az ALA képes kiterjeszteni a 2DCOR alapvetéseit 3D adathalmazokra, azonban ez a módszer sokkal többre is képes. Mivel 2D adathalmazokra –amiket a 2DCOR használ– is ugyan úgy alkalmazható. Ráadásul ebben az esetben a módszer egyszerűsítése miatt az ábrák már nem pseudo-3D-k lesznek, hanem egyszerű vonalas ábrák, ezzel lényegesen leegyszerűsítve a kiértékelést. Ez lehetőséget ad arra, hogy lépésről-lépésre összehasonlítsuk a két módszert. A 2DCOR-ra alkalmazott szisztematikus kísérletsorozatot elvégeztük a 2D ALA-n is és bebizonyosodott, hogy az általunk fejlesztett módszer nem csak kiegészítése lehet a 2DCOR-nak, hanem annak alternatívája is.

Az in silico kísérletek mellett mért adatokon is bizonyítottuk a módszerek hatékonyságát. A 2DCOR két ismételhető nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia (HPLC) mérésben vett részt. Az eredményeit PCA adataival hasonlítottuk össze.

Az első esetben egy nyolc komponensű mintát vizsgáltunk 5 különböző oszlopon. Az oszlopokat magukban és a többihez viszonyítva is összehasonlítottuk. A nehézséget az okozta, hogy nagyon apró eltérések voltak, amiket ki kellett mutatni. Ennek ellenére a 2DCOR megmutatta, hogy az oszlopok reprodukálhatósága igen kedvező, csupán elhanyagolható eltérések figyelhetők meg az egyes komponensek retenciós időiben. Az eredeti munka PCA-ja ugyan erre a következtetésre jutott, így a két módszer összehasonlítása kimutatta, hogy a 2DCOR tökéletesen alkalmazható a kromatográfiában.

A második esetben nemlineáris kondíciók között vizsgáltuk az oszlopokat. A PCA itt az izoterma paramétereket vizsgálta. A 2DCOR ebben az esetben is ugyan arra a konklúzióra jutott, azonban itt tovább is tudtunk menni. Az eredeti kísérlet külön vizsgálta az egyes komponenseket, de 2DCOR-val létre lehetett hozni egy egyesített kromatogramot, így minden komponenst egyben lehetett vizsgálni az oszlopokon.

Az ALA-t szintén teszteltük két mért adatsoron is. Elsőként felállítottunk egy kísérletet, ahol egy mintaoldat komponenseinek koncentrációját egyesével változtattuk a mérésorozat folyamán. Ugyan ezen körülményeket számítógéppel is szimuláltuk és a két eredményt összehasonlítottuk. Ez kimutatta, hogy az elméleti tulajdonságai az általunk fejlesztett módszernek a gyakorlatban is megállják a helyüket. Az egyetlen különbséget csak a retenciós idők mérések közötti csekély fluktuációja okozza.

Végül egy kísérletben a metanol hatását vizsgáltuk az ALA segítségével szuperkritikus fluidum kromatográfia (SFC) mérésekben. A térképekről le lehetett olvasni, a metanol a minta oldószerben való arányának növelésével a kromatogramban hogyan növekszik és vándorol annak csúcsa, illetve ez a változás melyik komponensre és hogyan van hatással.

Bibliográfia

- (1) R Core Team R: A Language and Environment for Statistical Computing.; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013.
- (2) RStudio Team RStudio: Integrated Development Environment for R.; RStudio, Inc., Boston, MA, 2016.
- (3) Felinger, A.; Kele, M.; Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **2001**, *913*, 23–48.
- (4) Kele, M.; Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **1999**, *830*, 41–54.
- (5) Kele, M.; Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **1999**, *830*, 55–79.
- (6) Kele, M.; Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **1999**, *855*, 423–453.
- (7) Kele, M.; Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **2000**, *869*, 181–209.
- (8) Kele, M.; Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **2001**, *913*, 89–112.
- (9) Kele, M.; Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **2002**, *960*, 19–49.
- (10) Gritti, F.; Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **2003**, *1003*, 43–72.
- (11) Gritti, F.; Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **2003**, *1021*, 25–53.
- (12) Felinger, A.; Gritti, F.; Guiochon, G. J. *Chromatogr. A* **2004**, *1024*, 21–38.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a témavezetőmnek, Dr. Felinger Attilának a munkám során nyújtott felbecsülhetetlen támogatását, útmutatását és hasznos tanácsait.

Szeretnék köszönetet mondani dr. Sepsey Annamáriának, aki dolgozatom megírásánál rengeteget segített és nap mint nap támogatott; Rédei Csanádnak, aki a méréseket végezte a munkámhoz; és az Analitikai és Környezeti Kémiai tanszék összes dolgozójának, akik az évek során segítettek elérni céljaimat.

Végül, de nem utolsó sorban feleségemnek, Simonné dr. Tenk Juditnak, aki a hosszú évek alatt minden jóban és rosszban kitartott mellettem. Édesanyámnak és édesapámnak, akik a kezdetektől egyengették utamat. Mikle Gábornak, mert szükségem volt egy barátira, aki tényleg ért a kémiához. És minden többi barátomnak és családtagomnak.

Köszönöm!

Tézispontok

1. Bevezettünk egy új módszert, az alterációs analízis (ALA)-t, ami kiterjeszti a két-dimenziós korrelációs analízis (2DCOR)-t két-dimenziós kromatogramokból álló három dimenziós adathalmazokra,.
2. Az ALA-t arra fejlesztettük, hogy a 2DCOR tulajdonságait megtartva felállítsunk egy módszert, ami három-dimenziós adathalmazokon is használható és kromatográfiás felhasználásra finomhangolt, mivel nagyobb hangsúly fektet a különálló változásokra ezek kapcsolata helyett. Felállítottunk egy kísérletsorozatot, ami bizonyította, hogy az ALA tökéletesen működik egy- és két-dimenziós mérésorozatokon egyaránt, azonban legfontosabb erénye, hogy megmutatta, a 2DCOR képes magasabb dimenziójú adathalmazok kezelésére.
3. Egy részletes összehasonlítással megmutattuk, hogy az ALA nem csak felveszi a versenyt a 2DCOR-al, de több szempontból felül is múlja azt. Mivel az előbbi képes megmutatni a változások abszolút irányát, nem csak a relatív irányokat és jóval egyszerűbb ábráinak köszönhetően könnyebben kiértékelhető.
4. Felmértük a 2DCOR potenciálját a kromatográfiában mért adatsorokon való összehasonlítással egy már bizonyított kemometriai módszerrel. Megmutattuk, hogy kétséget kizáróan ezen a területen is kiválóan alkalmazható, mivel képes volt minden a PCA által kapott információ kinyerésére.
5. Megmutattuk módszerünk, az ALA gyakorlati jelentőségét két kísérlettel. Az elsőben mért adatokat hasonlítottunk in silico kísérlethez. Míg a másodikban a metanol hatását vizsgáltuk alterációs térképek segítségével SFC mérésekben.

Publikációk

Publikációk a dolgozat témájában

1. **Simon, J.**, Felinger, A., Two-dimensional correlation analysis of the reproducibility of high-performance liquid chromatography columns, *J. Chromatogr. A*, 2015, 1384, 115–123
2. **Simon, J.**, Felinger, A., Correlation analysis on 3D data – Introducing the alteration analysis, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 2016, 158, 54–60
3. **Simon, J.**, Felinger, A., Exploring the changes in a series of measurements – The comparison of the two-dimensional correlation analysis and the alteration analysis, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 2017, 168, 28–37

Poszterek és előadások a dolgozat témájában

1. **Simon, J.**, Felinger, A., Two-dimensional correlation in chromatography, 9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2013. 09.04–09.06., Siófok
2. **Simon, J.**, Felinger, A., Kétdimenziós korreláció alkalmazása a kromatográfiában, XXXVI. Kémiai Előadói Napok, 2013. 10.28–10.30., Szeged
3. **Simon, J.**, Felinger, A., Two-dimensional correlation in chromatography, 10th János Szentágothai Transdisciplinary Conference and Student Competition, 2013. 11.04–11.05., Pécs

4. **Simon, J., Felinger, A.,** Correlation on 3D data – Alteration Analysis, The 8th International Symposium on Two-Dimensional Correlation Spectroscopy, 2015. 07.08–07.11., Vienna, Austria
5. **Simon, J., Felinger, A.,** Correlation on 3D data – Alteration Analysis, 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2015. 09.02–09.04., Siófok
6. **Simon, J., Felinger, A.,** Correlation on 3D data – Alteration Analysis, Conferentia Chemometrica, 2015. 09.13–09.16., Budapest
7. **Simon, J., Felinger, A.,** Alternation Analysis: An alternative to 2DCOR, The 9th International Symposium on Two-Dimensional Correlation Spectroscopy, 2017. 06.07–06.10., Victoria, Canada
8. **Simon, J., Felinger, A.,** An alternative to two-dimensional correlation analysis: Alteration Analysis, Conferentia Chemometrica, 2017. 09.03–09.06., Gyöngyös, Farkasmály
9. **Simon, J., Felinger, A.,** Correlation Analysis on a Series of 1D and 2D Chromatograms, 11th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, 2017. 09.06–09.08., Siófok

Poszterek és előadások a dolgozat témáján kívül

1. **Simon, J., Felinger, A.,** Modelling the 2D correlation in chromatography with exponentially modified Gaussian peak shape, III. Interdisciplinary Conference, 2014. 04.15–04.17., Pécs
2. **Simon, J., Felinger, A.,** Modelling the 2D correlation in chromatography with exponentially modified Gaussian peak shape, 30th International Symposium on Microscale Bioseparations, 2014. 04.27–05.01., Pécs
3. **Simon, J., Felinger, A.,** Enhancement of chromatographic peak determinations by two-dimensional correlation, 30th International Symposium on Chromatography, 2014. 09.14–09.18., Salzburg, Austria

4. **Simon, J.**, Felinger, A., A kromatográfiás kétdimenziós korrelációs térképek leírása módosított Gauss-görbékkel, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2014. 11.12–11.14., Egerszalók
5. **Simon, J.**, Lambert, N., Felinger, A., Kromatográfiás hatékonyság vizsgálata alterációs analízissel, Elválasztástudományi Vándorgyűlés, 2016. 11.09–11.11., Kecskemét