

**A RAMAN ÉS IR SPEKTROSKÓPIA
VÁLOGATOTT ALKALMAZÁSAI
A KROMATOGRÁFIÁBAN**

Ph.D. ÉRTEKEZÉS

Szerző: István Krisztina
(MTA Kémiai Kutatóközpont, Szerkezeti Kémiai Intézet)

Témavezetők: Dr. Keresztury Gábor
(MTA Kémiai Kutatóközpont, Szerkezeti Kémiai Intézet)

Dr. Halász János
(Szegedi Tudományegyetem,
Alkalmazott és Környezeti Kémia Tanszék)

Budapest

2004

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	4
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1. BETEKINTÉS A REZGÉSI SPEKTROSKÓPIA ÉS A KROMATOGRÁFIA EGYES TERÜLETEINEK KAPCSOLATÁBA .	5
2.1.1. Az IR spektroszkópia és a kromatográfia egyes területeinek kapcsolata	7
2.1.2. A Raman spektroszkópia és a kromatográfia egyes területeinek kapcsolata	13
2.2. A KONVENCIONÁLIS RAMAN SPEKTROSKÓPIA ÉS A FELÜLETERŐSÍTETT RAMAN SPEKTROSKÓPIA ALKALMAZÁSA KROMATOGRÁFIÁS VÉKONYRÉTEGEN (TLC-RAMAN ÉS TLC-SERS).....	16
2.3. A HPLC-IR CSATOLT TECHNIKA	18
3. CÉLKITŰZÉS	23
4. TLC-RAMAN ÉS TLC-SERS VIZSGÁLATOK	26
4.1. TLC-RAMAN ÉS TLC-SERS MÉRÉSEK KÍSÉRLETI MÓDSZEREI	26
4.1.1. Felhasznált anyagok és mintakészítés	26
4.1.2. Műszerek és mérési paraméterek	27
4.2. TLC-RAMAN ÉS TLC-SERS VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEINEK TÁRGYALÁSA	28
4.2.1. TLC lapok Raman szórásának vizsgálata különböző gerjesztőlézők alkalmazása mellett	28
4.2.2. A szilika TLC lapon lévő aminosav foltok Raman szórásának vizsgálata	32
4.2.3. SERS vizsgálatok a TLC foltokkal: száraz minták.....	38
4.2.4. SERS vizsgálatok a TLC foltokkal: nedves minták	39
4.2.5. A detektálási hatékonyság összehasonlítása	46
4.3. A TLC-RAMAN ÉS TLC-SERS VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGZÉSE	47
5. .HPLC-IR MÉRÉSEKKEL KAPCSOLATOS ELMÉLETI MEGFONTOLÁSOK, HPLC-IR ADATOK KEMOMETRIAI KIÉRTÉKELÉSE.....	48
5.1. ELMÉLETI MEGFONTOLÁSOK	48
5.2. A FELHASZNÁLT KEMOMETRIAI MÓDSZEREK, PROGRAMOK	51
5.3. A KEMOMETRIAI KIÉRTÉKELÉSHEZ FELHASZNÁLT SZIMULÁLT HPLC-IR ADATOK JELLEMZŐI.....	52
5.4. A KEMOMETRIAI KIÉRTÉKELÉSHEZ FELHASZNÁLT MÉRT HPLC-IR ADATOK MÉRÉSI PARAMÉTEREI; FELHASZNÁLT ANYAGOK ÉS MŰSZEREK	54
5.5. A SZIMULÁLT ÉS MÉRT HPLC-IR ADATOK KEMOMETRIAI KIÉRTÉKELÉSE.....	55
5.5.1. A szimulált HPLC-IR adatok kiértékelése: PARAFAC és PARAFAC2 módszerek tesztelése	55
5.5.2. A mért HPLC-IR adatok kiértékelése a PARAFAC2 és OSSS-IU-PARAFAC2 módszerekkel	61
5.6. A SZIMULÁLT ÉS MÉRT HPLC-IR ADATOK KEMOMETRIAI KIÉRTÉKELÉSEL KAPOTT EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGZÉSE	66

6.	A β-CIPERMETRIN IZOMEREK HPLC-IR VIZSGÁLATA.....	67
6.1.	A β -CIPERMETRIN IZOMEREK HPLC-IR MÉRÉSEINEK KÍSÉRLETI KÖRÜLMÉNYEI	67
6.1.1.	<i>Felhasznált anyagok és mintakészítés</i>	67
6.1.2.	<i>Műszerek és mérési paraméterek</i>	67
6.2.	A β -CIPERMETRIN IZOMEREK HPLC-IR VIZSGÁLATI EREDMÉNYEINEK TÁRGYALÁSA	69
6.2.1.	<i>Az IR detektálási tartományok összehasonlítása.....</i>	69
6.2.2.	<i>Mintaazonosítási és detektálási határok</i>	74
6.2.3.	<i>Koncentrációfüggés</i>	77
6.3.	A β -CIPERMETRIN IZOMEREK HPLC-IR VIZSGÁLATI EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGZÉSE	79
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	81
8.	SUMMARY	84
9.	IRODALOMJEGYZÉK	87
10.	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ ÉS EGYÉB PUBLIKÁCIÓK	93
10.1.	AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK	93
10.2.	AZ ÉRTEKEZÉSSSEL KAPCSOLATOS KÖZLEMÉNYEK	95
10.3.	TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK, ELŐADÁSOK.....	95
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	97

1. Bevezetés

A kromatográfia analitikai célú gyakorlatában számos detektálási módra nyílik lehetőség, ugyanakkor ezen módszerek egyike sem biztosítja az elválasztott anyagok közvetlen és megbízható azonosítását. Számos példa igazolja, hogy a retenciós paraméterek alapján történő “azonosítás” félrevezető lehet, ugyanis az elválasztás során alkalmazott kromatográfiás paraméterek eredményezhetnek teljesen együtt (azonos retenciós idővel) eluálódó csúcsokat is, amennyiben két (vagy esetleg több) vegyületnek a mérési körülmények között közel azonos az adszorpciós-deszorpciós sajátsága. A szerkezetvizsgálatra alkalmas detektálási módszerek egyik alkalmazási területe tehát az előbbieknél megfelelően a kromatográfiás csúcstisztaság vizsgálata lehet.

Belátható, hogy a retenciós paraméterek alapján történő “azonosítás”-ra is csak akkor van mód, ha rendelkezésünkre állnak a megfelelő referenciaanyagok. Ismeretlen összetételű, vagy ismeretlen vegyületeket is tartalmazó minták esetén azonban ismét szerkezetmeghatározásra is alkalmas detektálási módszerre/módszerekre van szükség.

Noha a valódi (közvetlen) azonosítás megoldható úgy is, hogy az elválasztott komponensek összegyűjtött frakcióit külön-külön (egyesével) megvizsgáljuk egy vagy több szerkezetvizsgálatra alkalmas módszerrel, korunk igényévé váltak az úgynevezett “on-line” és egyben “real-time” mérést biztosító csatolt technikák alkalmazása. Az “on-line” a kromatográfiás és szerkezetvizsgálati műszer(ek) olyan integrált egységét jelenti, amely biztosítani tudja a “real-time” jelleget: az elválasztással egyidőben történő, szerkezetazonosítási célokat ellátó detektálást.

A csatolt (úgynevezett “hyphenated”) technikák előnye, hogy nem kell frakciókat gyűjteni és referencia anyagokkal ismételt kromatográfiás méréseket végezni (időmegtakarítás), kizárható a frakciók gyűjtése/tárolása során bekövetkező elszennyeződés lehetősége, valamint megbízható kvalitatív/azonosítási információt is nyerünk.

A szerkezetazonosítást biztosító detektálás céljára elsősorban olyan mérési módszerekkel való csatolás jöhet szóba, amelyek az anyagok molekuláris szintű, egyedi (ujjlenyomat-szerű) azonosítására képesek. Ilyen lehetőséget kínál (a tömegspektroszkópia és a mágneses magrezonancia spektroszkópia mellett) pl. a rezgési spektroszkópia is, amelyre az a laboratórium specializálódott, ahol munkámat végeztem. Az itt bemutatásra kerülő munka ezért az infravörös (IR) és Raman spektroszkópia elválasztástechnikával kombinált

alkalmazásaival foglalkozik. Jelen dolgozat a lehetséges csatolási kombinációk irodalmi forrásokra alapozott rövid áttekintése után egyrészt a kovencionális és felületerősített Raman spektroszkópia kromatográfiás vékonyrétegen történő egyik alkalmazását, másrészt a HPLC-IR csatolt technika problematikáját, a felmerülő problémák több lehetséges megoldását, valamint magának a technikának egy konkrét alkalmazását mutatja be. A dolgozat arra is rámutat, hogy melyek azok a kromatográfiás alkalmazási területek, ahol az általunk kialakított/használt HPLC-IR műszeregyüttes alkalmazható.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Betekintés a rezgési spektroszkópia és a kromatográfia egyes területeinek kapcsolatába

Mind a rezgési spektroszkópia, mind a kromatográfia számos lehetőséget és módszert foglal magában mérés technikai kivitelezés szempontjából. Mivel a kromatográfiás mérések kivitelezési módja határozza meg elsődlegesen, hogy milyen fajta rezgési spektroszkópiai detektálást alkalmazhatunk (ha alkalmazhatunk), célszerűnek látszik a kromatográfiás módszerek csoportosításán keresztül megvizsgálni e két tudományterület lehetséges kapcsolódási pontjait.

A kromatográfiás módszerek szinte *majdnem* mindegyikét magába foglaló csoportosítását akkor végezhetjük el, ha figyelembe vesszük az elválasztandó komponensek vándorlását létrehozó erőt, az állófázis valamint a mozgófázis minőségét. Az 1/a. táblázat azokat a kromatográfiás módszereket és azok osztályba sorolását mutatja be, melyek esetében a vándorlást létrehozó erő a nyomáskülönbség, míg az 1/b. táblázat az elektromos erőter által létrehozott migrációt felhasználó módszereket csoportosítja. (A zárójelekben az adott módszer angol rövidítése található.)

Megjegyzendő, hogy léteznek olyan módszerek is, melyeknél a folyadék halmazállapotú mozgófázis áramlását nem annak pumpálása, hanem “természetes erők”, mint pl. a gravitáció vagy a kapilláris hatás tartja mozgásban. A korai, nem nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (LSC) módszerek használták ki a gravitációs folyadék áramlást, míg a kapilláris hatás elvén halad a mozgófázis a manapság is használatos vékonyréteggkromatográfiás (TLC) alkalmazások esetén. A TLC-ről - csakúgy mint a

túlnyomásos vékonyrétegekromatográfiáról (OPTLC-ről) - külön érdemes megemlíteni, hogy klasszikusan a folyadék-szilárd kromatográfiai módszerek közé szokás sorolni, noha a szilárd állófázison adszorbeálódott folyadékréteg is lehet állófázis, s így a TLC-s (és OPTLC-s) alkalmazások a folyadék-folyadék kromatográfiai módszerek közé is beilleszthetők lennének. A továbbiakban a TLC rövidítést használom, függetlenül attól, hogy túlnyomás alkalmazásával, vagy anélkül kivitelezett vékonyrétegekromatografálásról van szó.

A haladóbb elektrokromatográfiai módszerek az elektromos térerő mellett nyomást is alkalmaznak mint migrációs kényszererőt [1], így ezeket szintén az 1/a. táblázatban lehetne feltüntetni.

1/a. táblázat. Nyomáskülönbség hatására létrejött vándorlást alkalmazó kromatográfiai módszerek

Mozgó fázis anyagi minősége	Állófázis anyagi minősége	Módszer elnevezése	Módszer osztályba sorolása
Gáz	Szilárd	Gáz-szilárd kromatográfia (GSC)	Gáz- kromato- gráfia (GC)
	Folyadék	Gáz-folyadék kromatográfia (GLC)	
Folyadék	Szilárd	Folyadék-szilárd kromatográfia (LSC): •HPLC ^a •IPC ^b , IEC ^c •OPTLC ^d •GPC ^e •AC ^f	Folyadék kromatográfia (LC)
	Folyadék	Folyadék-folyadék kromatográfia (LLC)	
Szuperkritikus folyadék	Szilárd	Szuperkritikus kromatográfia (SFC)	Szuperkritikus kromatográfia (SFC)
	Folyadék		

^aHigh Performance Liquid Chromatography, ^bIon Pair Chromatography, ^cIon Exchange Chromatography,
^dOver Pressure Thin Layer Chromatography, ^eGel Permeation Chromatography, ^fAffinity Chromatography

1/b. táblázat. Elektromos térerő hatására létrejött vándorlást alkalmazó kromatográfiás módszerek

Mozgó fázis anyagi minősége	Állófázis anyagi minősége	Módszer elnevezése	Módszer osztályba sorolása
Folyadék	Szilárd	Kapilláris elektroforézis (CE): • CZE^a • MEKC^b • CGE^c • CIEF^d • CITP^e	Elektrokromatográfia (EC), vagy más néven: Kapilláris elektrokromatográfia (CEC)

^aCapillary Zone Electrophoresis, ^bMicellar Electrokinetic Chromatography, ^cCapillary Gel Electrophoresis, ^dCapillary Isoelectric Focusing, ^eCapillary Isotachopheresis

A továbbiakban a kromatográfiás módszerek *osztályai* szerint haladva, a GC, LC, SFC, valamint EC és az IR spektroszkópia kapcsolatát mutatja be a 2.1.1. fejezet, míg a 2.1.2. fejezet a Raman spektroszkópia és az említett kromatográfiás osztályok kapcsolatáról nyújt tájékoztatást.

2.1.1. Az IR spektroszkópia és a kromatográfia egyes területeinek kapcsolata

GC-IR

Minthogy a gázkromatográfiában leggyakrabban alkalmazott vivőgázoknak (N₂, H₂, He) semmiféle jele nincs az eluátum mért IR spektrumában, a kapcsolt technikák közül – nem véletlenül - a GC-IR mérés technika bemutatására került sor legelőször [2]. Ehhez azonban az is hozzájárult, hogy az 1960-as évek végén, 70-es évek elején már megjelentek a gyors Fourier transzformációs IR spektrométerek (FTIR spektrométerek), s így technikailag is lehetővé váltak a valós idejű on-line mérések.

A két műszer összekapcsolására három módszer alakult ki [3]: „light-pipe”, mátrixizoláció, vagy közvetlen depozítumképzés alkalmazása. A fűtött „light-pipe” (mely egy IR áteresztő végablakokkal és tükröző belső bevonattal ellátott „fényvezető” üvegapilláris) a gázkromatográfiás oszlop után helyezkedik el, s gyakorlatilag az FTIR spektrometriai mérés átfolyós gázcellájaként és egyben mérőcellájaként funkcionál. Az interferométer által modulált fény ezen a cellán halad keresztül, s jut tovább az IR detektor felé.

A mátrixizolációs módszer alkalmazása során a vivőgáz egy kis része argon, melyet az elválasztott mintakomponensekkel együtt a kromatográfiás oszlop után elhelyezett (10-20

K-re) hűtött szubsztrátra kondenzáltatnak. A szubsztráton, annak folyamatos mozgatása mellett egy keskeny sáv alakul ki a mintakomponensekből, melynek különböző pontjairól (vagyis az egyes elválasztott komponensekről) off-line módon, tehát nem a kromatografálással egyidőben vesznek fel IR spektrumot. A közvetlen depozítumképzés a mátrixizolációs módszertől annyiban tér el, hogy a vivőgáz nem tartalmaz argont (vagy más olyan komponenst, mely az adott hőmérsékleten lekondenzálna), így közvetlenül csak a mérendő anyagok kondenzációja történik meg a hűtött felületre. Bár ez utóbbi két módszer off-line mérést jelent, használatukkal csökkenthető a legkisebb azonosítható mennyiség a „light pipe”-os alkalmazásokhoz képest.

A „light pipe”-ot alkalmazó csatlakozás esetében transzmissziós IR detektálásra kerül sor, míg a kondenzált anyagok detektálási módszerét a szubsztrát anyaga határozza meg. Ha a szubsztrát fém, akkor reflexiós-abszorpciós, ha pedig IR transzparens, akkor transzmissziós IR detektálást alkalmaznak. A laboratóriumunkban működő, on-line rendszerű, 15 cm-es „light-pipe”-ot alkalmazó GC-FTIR berendezéssel erős IR elnyelő anyagok esetén 1-10 ng körüli detektálhatósági szintet lehet elérni; a keskeny (csupán 100 μm széles) sávban kondenzált anyagok IR mikroszkóppal való detektálásakor pedig kb. 100 pg –ra csökkenthető a legkisebb azonosítható mennyiség [3].

LC-IR

A folyadékkromatográfiás módszerek többségénél a gázkromatográfiával ellentétben nemcsak az állófázis, hanem a mozgófázis (vivőfázis) anyagi minőségének is van szerepe az elválasztásban, így azt nem választhatjuk meg csupán az IR detektálás szempontjából való megfelelés alapján. Ez alól kivételt képez a gélpermeációs kromatográfia (GPC) - más néven méretkizárásos kromatográfia (SEC) -, ahol a különböző vegyületek molekulái alapvetően méretük alapján választódnak szét. Bár e módszer peptidek, fehérjék és polimerek elválasztására is alkalmas, a GPC-IR csatolt módszert – figyelembe véve, hogy a peptidek, fehérjék esetében a funkciós csoportokon túl legfeljebb a másodlagos szerkezetről kaphatunk az IR spektrumok alapján információkat, az azonosítás pedig nem lehetséges - manapság polimerek méretfrakcióinak jellemzésére használják. A legelső GPC-FTIR mérésekről az 1970-es évek végén számoltak be [4], majd az első kereskedelemben kapható készülék [5] az 1990-es évek közepén került forgalomba.

Noha az affinitáskromatográfiában szintén nem a vivőfázis játsza a fő szerepet, hanem az “antigén-antitest” reakció, az állófázisra kötött antitest egyetlen molekulára (fehérjére) való specifikussága miatt nem alakult ki e kromatográfiás módszernek a rezgési spektroszkópiával kapcsolata.

Nagyon nehézkesen lehet IR spektrometriai detektálást alkalmazni az ionpárokromatografálási folyamatoknál. Egyrészt a mozgófázis (mely nem csupán vivő funkciót tölt be) többnyire nagyon összetett, tartalmaz általában puffert, idegen só, szerves módosítót és ionpároképző anyagokat, másrészt az ilyen típusú elválasztásokat úgy valósítják meg, hogy az elválasztandó vegyületek mindvégig ionos formában legyenek, tehát ionos vegyületek detektálását és azonosítását kellene végrehajtani. A standard IR spektrometriai adatbázisok azonban *többnyire* csak nem ionos vegyületek, vagy az ionizálható vegyületek semleges formáinak spektrumát tartalmazzák. Valószínűsíthető, hogy ezen nehezítő tényezők miatt nem jelent meg egyetlen publikáció sem az irodalomban eddig (1975-től napjainkig) e témában.

Az ioncserekromatográfiai méréseknél megvalósított IR detektálásról mindeddig csak két publikáció jelent meg. Az egyikben Vonach és munkatársai az UV spektroszkópiai detektálási módszerrel nem detektálható cukrok IEC-IR méréseit végezték el [6], míg a másik cikk értékét az a tény képviseli, hogy egy adott borminta különböző cukor, szerves sav és alkoholos összetevőinek mennyiségét egyetlenegy többkomponenses analízissel rövidebb idő alatt határozták meg, mint amennyi idő alatt a szokásos enzimátikus eljárással lehetne [7].

Az eddig említett folyadékkromatográfiás módszerek (IR detektálással vagy anélkül) a vegyületek egy-egy jól meghatározott körének vizsgálatát teszik lehetővé. A vegyületek más körének vizsgálatára adnak módot mind a TLC-s, mind a HPLC-s módszerek.

A vékonyrétegkromatográfiás frakciók IR méréséhez a korai, még a Fourier transzformációs spektrométerek előtti időszakban, a frakciókat minden esetben fizikailag (manuálisan) eltávolították, koncentrálták, s általában KBr porban való diszpergálás után pasztillává préselték. A teljes eltávolításhoz és mintakoncentrációhoz igen nagy gyakorlatra és ügyességre volt szükség, a rutinszerű alkalmazhatóság csak az úgynevezett Wick-StickTM [8] kereskedelmi megjelenése után következett be. A Wick-StickTM alkalmazásakor a kromatográfiás adszorbenssel együtt lekapart mintafoltot egy üvegfíolába helyezték, melyre magát a Wick-StickTM-et helyezték, s oldószert öntöttek mellé, a fíolába. A Wick-StickTM nem

volt más mint egy 25 mm magasságú pórusos, de tömör KBr tömb, melynek az alapjától a magassága irányában fokozatosan szűkült a szélessége (míg a vastagsága állandó volt). Az illékony oldószer, mely magába oldotta az adott frakciót, felkúszott a tömb csúcsáig, ahol a oldószer folyamatosan elillant, míg a nem illékony kromatográfiásan elválasztott komponens a csúcsban koncentrálódott. A KBr tömb 1-2 mm-es letört csúcsából mikro-pasztillát készítettek, melyet aztán fókuszált IR fénnel vizsgáltak. Valójában a Wick-StickTM –es, illetve az ezzel ekvivalens (ugyanúgy a második elúció elvét kihasználó) módszerek, melyek a frakciókat szintén alkáli-halogenidekbe viszik át, ma is használatosak [9, 10].

Az egyes frakciók eltávolítása nélkül, a foltok közvetlen TLC lapon történő transzmissziós [11, 12] és diffúz reflexiós méréseit [13, 14] először Griffiths és munkatársai, fotoakusztikus méréseit pedig Lloyd [15], valamint White [16] mutatta be. Griffiths és munkatársai [11, 12] kezdetben nem kereskedelmi vékonyrétegeken lévő komponenseket vizsgáltak: a kromatográfiás adszorbenseket AgCl lapokra vitték fel, s így érték el, hogy transzmissziós módon is mérhessenek. Mivel azonban megnőtt az igény a kereskedelembe kapható (nem AgCl, hanem Al vagy üveg hátlappal rendelkező) kromatográfiás lapok használatára, ez értelemszerűen más típusú mérés technikák (diffúz reflexiós és fotoakusztikus mérés technikák) alkalmazásával kapcsolatos megfigyeléseknek adott teret.

A megfigyelések szerint a TLC lapokon lévő minták diffúz reflexiós spektrumainak értékelését általában az alábbi problémák befolyásolják: A kromatográfiás réteg (adszorbens) kémiai jellege a kromatográfiás foltban nem csak az elválasztott komponens, hanem az azon átvándorolt eluens miatt is megváltozik. A szokásosan használt (szilika, alumina, poliamid és cellulóz) vékonyrétegeknek jelentős IR abszorciójuk van. A mintakomponens felületi adszorbcója nem teszi lehetővé a spektrum adatbankokban található referenciaspektrumokkal való közvetlen összehasonlítást. Tovább nehezíti a helyzetet, hogy az adszorbensek a TLC lap hátlapjához különböző kötőanyagok segítségével vannak hozzákötve, melyek eltérő módon módosítják a mért spektrumokat [17]. Mindezek miatt számos kutató [18- 20] azon a véleményen van, hogy bár létrehozható egy TLC-IR adatbank, ez csak a vizsgált vegyületek általános osztályozására, nem pedig azok specifikus azonosítására lenne alkalmas.

Összehasonlítva a fotoakusztikus (PA) méréseket a diffúz reflexiós mérésekkel White megállapította, hogy a detektálási határ 70-szer rosszabb, mint a megfelelő diffúz reflexiós mérésé, még megnövelt akkumulációs idő esetén is [16]. A legfőbb forrása a spektrális

interferenciának a PA cellában lévő vízgőz, mely a TLC lapról történő deszorpció következtében kerül a cellába [15]. Ezt vagy azzal lehetett kiküszöbölni, hogy mérés előtt néhány napig szárítószekrényben tárolták a vizsgálandó mintát, vagy azzal, hogy mérés előtt He-mal öblítették át a mintateret. Ez utóbbi a CO₂ jelenlétéből eredő interferenciát is kiküszöbölte.

A fennálló problémák miatt újabb, - a Wick-Stick-es és az azzal analóg elvet használó megoldásokon túlmutató -, a frakciókat nem egyesével, hanem együtt eltávolító eszközök jelentek meg [21, 22]. Ezen eszközök szintén egy második elúcióval juttatták a TLC lapról az IR transzparens anyagba az elválasztott komponenseket, melyek aztán akár már diffúz reflexióval is mérhetőek. Minthogy az IR transzparens anyag az így mért spektrumban semmiféle interferenciát, többletháttérrel nem okoz, a kapott spektrum referenciaspektrumokkal is összehasonlíthatóvá válik.

Tekintve, hogy jelen dolgozat fő témáját TLC-Raman és HPLC-IR mérések adják, ezen módszerek kapcsolatát részletesen a 2.2 és 2.3 fejezetek külön tárgyalják.

SFC-IR

A szuperkritikus folyadékkromatográfia különleges helyet foglal el a kromatográfián belül. A módszert az elválasztástechnikában való megjelenésekor forradalminak tartották, majd jó hírneve lassan csökkent az évek folyamán [23]. Mivel az SFC technikai kivitelezése magában foglalja az egyszerűbb HPLC mérések és a szuperkritikus folyadékokkal történő mérések lehetőségét is, kezdetben azt gondolták, hogy fel fogja váltani a folyadékkromatográfiát (HPLC-t), ami viszont nem történt meg. Noha az SFC a 1960-as években már ismert volt, az első SFC kromatográfok kereskedelemben való megjelenése az 1980-as évekre tehető. Erre az időszakra tehető az SFC-FTIR kapcsolat alkalmazásának első bemutatása is [24].

Az SFC-FTIR műszeretgyűttes használata során idővel kiderült, hogy a gyakorlati szempontból igazán hasznos cseppfolyós CO₂ mobilfázis IR abszorpciója (metanol vagy acetonitril módosítókkal), illetve a mobilfázis spektrumának változása az alkalmazott nyomás változásával nehezen korrigálható [25], így a módszer alkalmazási területeit nagymértékben a cseppfolyós xenonnak, mint eluensnek a használata javította fel [26, 27].

Különösen intenzív kutatómunka folyt a kapcsolt technika alkalmazása és optimalizálása érdekében az 1985-1995-ös évek folyamán. Morin és munkatársai szerves vegyületek szuperkritikus vagy folyadék CO₂-ban felvett spektrumait hasonlították össze a vizsgált vegyületek gőz illetve kondenzált fázisú spektrumaival [28]; Raymer nevéhez pedig az első (GC-IR mérés technikából átvett) mátrixizolációs technikát alkalmazó SFC-IR mérések fűződnek [29]. A HPLC-IR mérés technikában már korábban bemutatott folyadékcélás és oldószereliminációs technikai megvalósítások (ld. a 2.3 fejezetet) természetszerűleg szintén megjelentek az SFC-IR technikában is. Míg Taylor és munkatársai az átfolyós folyadékcél használata mellett főleg különböző alkalmazásokon keresztül mutatták be eredményeiket (zsírsavak [30], üzemanyagokból kiextrahált robbanóanyagok [31], mezőgazdaságban használt vegyületek [32], és szőjaolajok elválasztása [33]), addig Griffiths nevéhez (többek között) az SFC-IR oldószerelimináción alapuló mérési módszerének technikai fejlesztései fűződnek [34-36].

EC-IR

Míg az 1/a. táblázatban felsorolt kromatográfiás módszerek nagy múltra tekintenek vissza, addig az elektrokromatográfiás módszerek fiatalnak tekinthetők. Bár az elektroforézisen alapuló elválasztást (a gélelektroforézist) már 1937-ben felfedezték (Tiselius), Pretorius munkája pedig 1974 óta ismertté tette az elektrokromatográfiát, mint módszert [37], a nagy elválasztási hatékonysággal bíró EC módszerek csak az igen kis belső átmérőjű kvarc kapillárisok 1980-as évekbeli megjelenésével váltak gyakrabban alkalmazott módszerekké. A kapilláris elektroforézissel (CE) elválasztott anyagok bármiféle műszerrel történő detektálása kimondottan alapproblémája volt a módszernek, ugyanis a kicsiny (25-75 µm) belső átmérőjű kapillárisokban átfolyó komponensek nagy érzékenységgű detektorokat igényelnek. Végül az UV detektorok váltak a leggyakrabban használt detektorrá a CE eljárások során, ahol a detektálás helyén a kapilláris átmérőjének megnövelésével jutottak egymással kompatibilis elválasztó-detektáló rendszerhez.

A CE-IR rendszerről és az összekapcsolás módszeréről eddig egyedül deHaseth és munkatársai számoltak be [38, 39]. Munkájuk praktikusán a korábban már HPLC-IR mérés technikában is alkalmazott módszeren, az alkalmazott vivőfolyadék (itt: elektrolit) detektálás előtti eltávolításán alapszik (ld. 2.3 fejezet).

2.1.2. A Raman spektroszkópia és a kromatográfia egyes területeinek kapcsolata

A kromatográfiai módszerek Raman spektroszkópiai módszerekkel történő együttes alkalmazása, ill. kutatása az IR spektroszkópiai detektálást alkalmazó csatolt technikákhoz viszonyítottnan korántsem olyan széleskörű. Mivel a Raman szórás rendkívül gyenge jelenség, az IR spektroszkópiai detektáláshoz viszonyítottnan hosszabb akkumulálási időkre lenne szükség ugyanazon kromatográfiai folyamat időfüggő koncentrációváltozásainak követésére, ami viszont a kromatogram időfelbontásának romlásával is együttjárna.

Leginkább a TLC-Raman, illetve a TLC lapokon megvalósított felületerősített Raman spektroszkópiai detektálási (TLC-SERS) módszerek tanulmányozása gyakori. Ezt egyrészt az indokolhatja, hogy a szilárd halmazállapotú mintákban az egységnyi térfogatra eső molekulák száma nagyobb, mint a folyadék vagy gáz halmazállapotban, s így a várható Raman szórás intenzitása is nagyobb, másrészt a SERS kimondottan a detektált jel intenzitásának nagyságrendekkel való növelésére szolgáló módszer. Emellett a vékonyrétegekromatográfiai elválasztások nem kívánják meg az elválasztással egyidőben történő detektálást, vagyis a statikus (időben nem változó) minta mérésére hosszabb idő áll rendelkezésre.

GC-Raman

A gázkromatográfiai eluátumok konvencionális Raman spektroszkópiai detektálására eddig az irodalomban nem volt példa, ami a gázhalmazállapotú minták kicsiny Raman szórási keresztmetszetével és a jel akkumulálásra rendelkezésre álló idők rövidségével magyarázható. Roth és Kiefer két megközelítésben tanulmányozta a SERS detektálás lehetőségét [40]. Az egyik során a GC-s eluátumokat Ag-szolba vezették, s így a felületerősített mérések tekintetében hagyományosnak tekinthető, folyadékban történő SERS detektálást hajtottak végre. A másik megközelítésben TLC lapra gyűjtötték az eluátumokat, azaz a "GC-Raman" mérést visszavezették TLC-SERS mérésre. Carron és Kennedy szintén SERS detektálást próbáltak alkalmazni, de a kapott jelintenzitások (a kismértékű intenzitásingadozásoktól eltekintve) a vizsgált anyagok konvencionális Raman spektrumával ekvivalensek voltak [41]. Napjainkban teljesen új megközelítésben, egy nemlineáris Raman spektroszkópiai módszerrel, a koherens anti-Stokes Raman spektroszkópia (CARS) multiplex változatának segítségével

kivitelezett GC-Raman mérés kezdeti eredményeinek publikálására került sor [42]. A CARS szintén a mérhető Raman intenzitások növelését teszi lehetővé, bár a módszer hátrányai között tartják számon, hogy technikailag nagyon bonyolult (és drága). A CARS alkalmazásakor 2-3 lézert alkalmaznak, melyek közül egy vagy több hangolható, de a limitált hangolhatóság többnyire nem teszi lehetővé a teljes rezgési spektrum felvételét. Ennek kiküszöbölésére olyan CARS spektrométereket alkalmaznak, melyekben egy beépített optikai oszcillátor (“nemlineáris kristály”) biztosítja a széles tartományú hangolhatóságot. A hangolás (vagyis a kívánt tartománybeli spektrum hullámszámonkénti szimplex felvétele) azonban akár 5 percet is igénybe vehet, ami viszont teljesen alkalmatlan a kromatográfiás folyamat on-line követésére.

Chen és munkatársai az említett cikkben [42] *multiplex* CARS módszerrel (vagyis többcsatornás detektorral, valamint széles és keskeny tartományban hangolható lézerek együttes alkalmazásával) küszöbölték ki a hosszú hangolási időt, és teljes spektrumtartomány mérést is bemutatottak. A csatolt GC-Raman mérések számára azonban csak akkor válhat vonzóvá e mérési elrendezés, ha a detektálási határt a jelenlegi μg tartomány alá tudják szorítani.

LC-Raman, SFC-Raman és CE-Raman

Az SFC-Raman csatolásról és alkalmazásokról egyáltalán nem jelentek meg közlemények napjainkig. Ugyanez mondható el a folyadékkromatográfia bizonyos almodszereinek (affinitáskromatográfia (AC), ionpárokromatográfia (IPC), ioncserekromatográfia (IEC)) és a Raman spektroszkópia on-line összekapcsolásáról is. Az AC-Raman valamint IPC-Raman csatolt technika hiányát mindkét esetben a már 2.1.1. fejezetben tárgyalt, és ide is vonatkozó kromatográfiai tényezők magyarázzák.

A gélpermeációs kromatográfiai mérések Raman spektrométerrel történő detektálását elsőként Edwards és munkatársai mutatták be 1993-ban [43], majd Barth 1995-ben megjelent (csatolt polimerelválasztási technikákról szóló) könyvfejezete egy “jelenleg tanulmányozás alatt álló” technikaként aposztrofálja e módszert [44]. Az azóta eltelt majdnem 10 év óta azonban nem jelentek meg újabb publikációk.

A HPLC-Raman csatolt technikánál csakúgy mint a GC-Raman esetében a kutatások egy része a mért Raman intenzitások megnövelésére irányulnak, noha itt már erősítés nélküli

konvencionális Raman spektrometriai detektálást bemutató közleményekre is van példa [45-47]. A jelerősítést ugyanakkor nem csak TLC-SERS mérésre visszavezetett mérési módszerrel [48, 49], hanem valódi, áramlás közben kivitelezett HPLC-SERS mérésekkel is bemutatták [50-52]. Ez utóbbi mérések mindegyikénél a HPLC oszlopot elhagyó folyadékáramba folyamatosan Ag-szolt áramoltattak, majd az így kapott keverék Raman szórását mérték.

Külön érdemes megemlíteni azokat munkákat, melyek nem a felület általi erősítés elvét igyekeznek kihasználni a Raman szórás intenzitásának növelésére, hanem a szóró térfogat növelésével jutnak intenzívebb Raman jelekhez. Ehhez úgynevezett "Liquid Core Waveguide" (LCW) eszközt használnak, mely a HPLC és Raman spektrométer közötti összekötő elemként és egyben mérőcellaként is funkcionál. Ha az LCW anyagának kisebb a törésmutatója, mint az alkalmazott HPLC-s eluensé, akkor teljes belső reflektálódás érhető el [53], és a folyadékkal töltött fényvezető kapilláris vezetni fogja a fényt. Ily módon akár egy 50 μm átmérőjű és 1 m hosszú kapilláris teljes hosszában is végigvezethető a gerjesztőlézer fénye [54]. Ha a Raman szórást tekintjük, akkor az ilyen fényvezető kapillárisok alkalmazása során csakis azok a szórt komponensek fognak továbbítódni a kapillárisban, melyek egy kritikus vagy annál nagyobb szögben érik el a folyadék-LCW anyag határfelületet. Ez egyben azt is jelenti, hogy az LCW-k alkalmazása során a gerjesztőlézer haladási irányával megegyező irányban haladó (LCW által továbbított) Raman szórást detektálnak.

A víz gyenge Raman szórása alapvetően a fordított fázisú HPLC-s mérések megvalósításának kedvez, de csak a víznél kisebb törésmutatójú, úgynevezett AF2400-as Teflon fényvezetők bevezetésével váltak lehetővé a fényvezetővel ellátott mérőcellájú HPLC-Raman mérések [53-55]. Előtanulmányukban Dijkstra és munkatársai a detektálhatósági határ 35-szörös növekedéséről [53], Marquardt munkacsoportja pedig 1000-szeres növekedésről számolt be [54].

A kapilláris elektroforézis (CE) módszerei annak köszönhetően, hogy többnyire vizes vivőfolyadékokat alkalmaznak az elválasztandó kémiai komponensek vivőfolyadékaként, eleve kompatibilisak a Raman spektrometriai detektálással. Ugyanakkor, mivel igen kis mintatérfogat (1-50 nl), s ezzel igen kis mintamennyiség kapillárisba való bevitelére van lehetőség, a konvencionális Raman detektálás néhány esetétől eltekintve [56-58], többnyire CE-SERS alkalmazások bemutatására került sor napjainkig.

2.2. A konvencionális Raman spektroszkópia és a felületerősített Raman spektroszkópia alkalmazása kromatográfiás vékonyrétegen (TLC-Raman és TLC-SERS)

A TLC lapokon történő IR mérésekkel szemben a Raman spektrometriai mérések előnye, hogy így általában szélesebb hullámszámtartomány tanulmányozható, mivel a Raman spektrumban a közép-IR tartomány általában 650 vagy 400 cm^{-1} -ig terjedő tartományán túl, az ez alatti hullámszámtartományról is kapunk információt. Ugyanakkor a mintatérbeli nedvesség sem zavarja a Raman méréseket, hiszen a víz (vízgőz) gyenge Raman szóró anyag.

A TLC-Raman mérések sikerességét a minta foltbeli koncentrációja, a folt lokalizáltsága, a mintakomponens lézertérrel szemben tanúsított stabilitása, a vizsgálandó anyag Raman szórásának erőssége, valamint a TLC lap szórási tulajdonsága, annak esetleges fluoreszcenciája szabja meg. A tipikus, kromatográfiás futtatás utáni foltméretek általában meghaladják a gerjesztőlézerek fókuszpontjának méreteit, de van rá példa, hogy a kromatográfiás folt méretét sikeresen csökkentették (elérve ezzel a lézertérben mért koncentráció növekedését) [59].

Az első Raman spektrometriai méréseket kromatográfiás vékonyrétegeken Adams és munkatársai végezték Ar-ion lézer használata mellett, és a legkedvezőbb esetben 50 μg -os detektálási határt állapítottak meg [60]. A későbbi TLC-Raman mérések hasonló eredményt mutattak [61, 62, 59], majd az FT-Raman spektrométerek bevezetése után számos kutatócsoport újra felbecsülte a kromatográfiás lapokon történő Raman detektálás teljesítőképességét [63-66]. Fredericks és munkatársai fluoreszcens indikátorral kezelt és kezeletlen szilika lapon lévő aromás vegyületeket vizsgáltak, és 10 μg -os detektálási határt állapítottak meg. A polimer hátlappal rendelkező TLC lapokról ugyanakkor munkájuk során kiderült, hogy nem használhatóak Raman detektálás esetén, mivel a Raman spektrumban az adott polimerhez rendelhető sávok egyértelműen megjelennek [63]. Everall és munkatársai aromás és kettőskötést tartalmazó polimer adalékanyagokat [64], Rau paracetamolt és szalicilamidot [65], míg Caudin és munkatársai a kumulált kettőskötést tartalmazó kroketint vizsgálták [66] InGaAs detektorral ellátott FT-Raman spektrométerrel, és rendre 100-200, 40,

illetve 16.5 μg -nak megfelelő volt az a TLC lapon lévő anyagmennyiség, amelyről az azonosítás szempontjából értékelhető spektrumot kaptak.

A mért Raman intenzitás növelését (s így a detektálási határ csökkenését) a már említett foltméret-redukálás mellett az úgynevezett felületerősített Raman spektroszkópiái (SERS) mérések alkalmazásával is el lehet érni. A felületerősített Raman spektroszkópia (SERS = Surface Enhanced Raman Spectroscopy), ami fémfelület által megnövelt Raman szórás intenzitást mér, az 1970-es évek közepén született meg, amikor Fleischmann és munkatársai először észlelték, hogy fémfelülettel (elektróddal) érintkező molekulákról érkező Raman szórás intenzitása megnövekszik [67]. Később nem csak különböző anyagi minőségű *fém*elektrodok felületén, hanem *fém*szólok oldatában, valamint hordozóanyag nélküli, vagy különböző hordozóanyagokra (változatos technikai megoldásokkal) felvitt *fém* *film*rétegek illetve “szigetek” is alkalmazásra kerültek [68].

Magát a felület általi erősítés jelenségét számos fém felhasználása során vizsgálták (többek között: Cu, Ag, Au, Li, Na, K, In, Pt, Rh) [69], s az effektus létrejöttéhez minden esetben megfelelően “durva” (megfelelően kicsiny görbületi sugarú) felületre, vagy aggregálódott részecskékre, és az egyedi részecskék/felületi képződmények méretének megfelelő nagyságrendbe esésére (10-100 nm) volt szükség.

A felületerősítés létrejöttét alapvetően két főbb mechanizmussal is magyarázzák, de pontos matematikai modell a mért eredmények leírására még nem született. Az elektromágneses mechanizmuson alapuló elmélet szerint a gerjesztő fény hatására egy fémfelületi *többl*et elektromágneses tér indukálódik, mely az eredeti gerjesztő fénnel együtt lép kölcsönhatásba az adszorbeálódott molekulákkal. Ezen elmélet szerint a *többl*et elektromágneses tér jelenléte miatt növekszik meg a szórt Raman fény intenzitása. A kémiai mechanizmuson alapuló elmélet szerint a fémfelület és a molekulák között létrejövő kemisorpció új gerjesztett elektronállapotot hoz létre a molekulákban, mely rezonanciában lesz a gerjesztő fénnel, azaz rezonancia Raman szórás fog bekövetkezni. Az új gerjesztett állapot létrejöttét többféle módon is magyarázzák; úgy mint “adatom”-ok létezése a felületen, töltésátmenet a fémfelület és a molekulák között, illetve lyuk-elektron pár kialakulása [70]. Egyetértés van azonban abban, hogy a Raman szórás intenzitásának megnövekedéséhez mindkét effektus, az elektromágneses és a kémiai is hozzájárul.

A mért, felületerősítésből származtatható Raman intenzitás jó esetben maximum 10^4 - 10^6 -szorosa [71], speciális esetekben 10^{14} - 10^{15} -szöröse is lehet a konvencionális módon mért Raman intenzitásoknak [72], ezért az erősítési jelenség kihasználásával igen kis mennyiségek, sőt egyedi molekulák detektálására is lehetőség nyílik [72]. Az 1980-as évek végétől sorra születtek meg azok a közlemények, melyek a felületerősített Raman spektroszkópiai detektálást alkalmazták kromatográfiás vékonyrétegen lévő vegyületek vizsgálatára, vagy magának a TLC-SERS technika lehetőségeinek tanulmányozására. Mivel felületerősített Raman spektroszkópiai tanulmányokból már kiderült, hogy a fémek közül az ezüst és arany használata eredményezi a legnagyobb erősítési effektust, a TLC-SERS-szel foglalkzó cikkekben is ezek - de többnyire az ezüst - alkalmazására került sor. Az ezüst kromatográfiás vékonyrétegre történő felvitelére jellemzően szol formában került sor [65, 66, 73-79]; néhányan magán az adott ezüstvegyülettel átitatott TLC lapon végezték el az ezüstionok elemi ezüssté való redukcióját [80, 81]. Az ezüst szolt alkalmazó közleményekben vagy a Lee és Meisel [82], vagy a Creighton és munkatársai [83] által leírt szol készítési procedúrát, vagy ezek kissé módosított változatát alkalmazták; a SERS méréseket pedig néhány esetben a látható tartományban sugárzó Ar^+ lézerrel ([73], [74], [81]), többnyire azonban közeli-IR gerjesztősugárzást adó Nd:YAG lézerrel felszerelt spektrométerekkel végezték. A közlemények minden esetben olyan vegyületek vizsgálatával foglalkoztak, melyek UV spektroszkópiai módszerrel is detektálhatóak, illetve az aromás vagy több konjugált kettőskötés jelenléte miatt várhatóan jó Raman szóró tulajdonsággal rendelkeznek.

2.3. A HPLC-IR csatolt technika

Folyadékkromatográfiásan elválasztott komponensek IR spektroszkópiai detektálását először Kizer és munkatársai mutatták be 1975-ben [84]. Munkájuk során a legegyszerűbb összekötő elemet használták a folyadékkromatográf és a FTIR spektrométer on-line működtetéséhez: a kromatográfból érkező folyadékarám egy átfolyós IR cellán keresztül haladt át, mely cella a spektrométer mintaterében, a fényútban helyezkedett el.

Kezdetben a legtöbb átfolyós cellás LC-IR mérés során széntetrakloridot (CCl_4) vagy tetrahidrofuránt ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$) használtak eluensként, kihasználva, hogy a mért spektrumokban így

adódott a legkevesebb, eluens jelenlétéhez köthető abszorpciós sáv [84, 4, 85, 86]. Annak a ténynek köszönhetően, hogy ezen eluensek csak a méretkizárásos (SEC) vagy más néven a gélpermeációs (GPC) kromatográfiai eljárásokkal kombinálhatóak kompromisszummentesen - hiszen mint már említettük: az ilyen kromatográfias eljárásoknál nem az eluens anyagi minősége, hanem a kromatográfias oszlop tulajdonságai szabják meg az elválasztás hatásosságát -, a GPC-IR csatolt technika viszonylag hamar kommercializálódott [5].

Azokat a vegyületeket, melyek hő hatására bomlanak, vagy nem képezhető belőlük hőstabil száramzék - s ezért nem alkalmasak gázkromatografálásra -, valamint nem felelnek meg a gélpermeációs kromatografálás nagy molekulatömeget igénylő feltételének, tipikusan valamely folyadékkromatográfias eljárással szokás elválasztani. A HPLC-s eljárások a megvalósítás módja szerint lehetnek normál fázisúak (normal phase HPLC, röviden: NP-HPLC) vagy fordított fázisúak (reversed phase HPLC, röviden: RP-HPLC), ahol az NP ill. RP előtagok az alkalmazott állófázis és mozgófázis egymáshoz viszonyított polaritásának viszonyára utalnak (polárisabb állófázis = NP, polárisabb mozgófázis = RP). A hatékony és szelektív elválasztások gyakran fordított fázisú HPLC-s elválasztást igényelnek, ahol a leggyakrabban alkalmazott poláris mozgófázis-összetevő a víz, így az átfolyós folyadékcslát alkalmazó IR detektálás - a víz igen erős abszorpciós képessége és széles sávjai miatt - különösen nagy kihívásnak bizonyult. Kezdetben nem is vállalkoztak közvetlenül a vizes eluátummal együtt a cellába érkező elválasztott komponensek IR detektálására. Az 1980-as évek végén Hellgeth és Taylor [87, 88] olyan tanulmányokat mutattak be, amelyekben a kromatográfias oszlopról lejöő vizes eluátumot egy az oszlop után elhelyezett T-elemben CCl₄-dal szembe áramoltatták, majd a T-elem harmadik ágán, az ekkor már az eluátumból a CCl₄-ba extrahálódott anyagokat is tartalmazó CCl₄-ot a T-elem után kötött membrán fázisszeperatorban választották szét a vizes fázistól (eluátumtól). Az elszeparált CCl₄ (a kromatográfiasan elválasztott minták sorával) aztán a folyadékcslán haladt keresztül. Ugyanakkor Taylor és munkatársainak nevéhez fűződnek sorra azok a munkák is, melyben átfolyós folyadékcsl használata mellett, kizárólag halogénezett szénhidrogéneket (CHCl₃; CDCl₃; CCl₄; 1,1,2-triklór-1,2,2-trifluor-etánt) használva eluensként, NP-HPLC-s elválasztásokat hajtottak végre. Az említett körülmények között aromás, ciklikus szekunder aminokat [89, 90], fenolokat [89, 91], aromás és alifás szénhidrogéneket [92], valamint heterociklusos nitrogén tartalmú vegyületeket választottak el [93]. A halogénezett

szénhidrogének kizárólagos használata (eluensként) azonban a választható kromatográfiás paraméterek (s így az elválasztandó vegyületek körének) nagymértékű szűkítését jelenti, és kromatográfiás szempontból kompromisszumos megoldást jelent. A legutóbbi évekig - valószínűleg annak köszönhetően, hogy spektroszkópiai szemszögből optimált körülményeket igyekeztek fenntartani - egyetlen tanulmány sem született, mely átfolyós folyadékcellát használva az NP-HPLC-s elválasztás során, a szokványos normál fázisú HPLC-s mozgófázisokat tesztelte vagy alkalmazta volna.

A kromatográfiás eluensek szabad választásának lehetőségét kívánták az irodalomban többnyire oldószereliminációs eljárásoknak nevezett módszerek megoldani, noha kromatográfiás szemszögből ezek gyakran így is kompromisszumokat követelnek. Az oldószerelimináció valójában a kromatográfiás egység utáni, de még az IR detektálás előtti eluenseltávolítást jelent. Az eluens fizikai eltávolításának alapját a HPLC készülék és az IR spektrométer közötti összekötő elemek (interface-ek) többségénél az elpárologtatás adja, s az elpárologtatás hatékonyságának növelése érdekében jöttek létre különböző elveken működő interface-ek.

Griffiths és munkatársainak nevéhez fűződik az első oldószereliminációs elven működő interface létrehozása [94]. Az interface nem volt más, mint egy fűtőszállal fűtött vertikálisan elhelyezett cső, melybe a kromatográfából érkező folyadék és mellette N_2 áram érkezett porlasztás céljából. A cső alján egy forgatható egységen KCl port rácsozaton tartó csészék helyezkedtek el, melyekre már az oldószer 90%-ának eltávolítása utáni folyadékcseppek érkeztek (1. pozíció). A további eluenseltávolítást a csészék aljának irányából N_2 átfúvatással igyekeztek elérni a forgatható egység második fix pozícióba történő állításával, majd DRIFTS méréstechnikát alkalmaztak további elforgatás után egy harmadik fix pozíciónál. A kisebb átmérőjű, nem analitikai kromatográfiás oszlopok esetében, - a kisebb áramlási sebesség miatt -, elhagyható volt az interface cső egysége, s az eluátum közvetlenül (a kisebb átmérőjű) csészékbe volt gyűjthető [95]. Az ilyen típusú összekötő elemek azonban nem voltak képesek hatékonyan eltávolítani a víztartalmú eluenseket. Kalasinsky ezért hasonló elrendezésben, de még a fűtött cső előtt 2,2'-dimetoxipropánnal reagáltatta a vizes eluents, s az így acetonná és metanollá átalakult termékek már sikeresen elpárologtathatóak voltak a csőben [96]. Mivel azonban egyrészt a csészék újratöltését időigényesnek találták, másrészt a detektálás hatékonyságát erősen befolyásolni tudta a porított KCl (vagy KBr) felületének

egyenletlensége, ezért hamarosan síkfeületű KCl (vagy KBr) lapokra kezdték el gyűjteni az elválasztott komponenseket, amelyekkel már transzmissziós méréseket végeztek. Jinno és munkatársai ezen túlmenően, azért, hogy kiküszöböljék a (relatív) nagy mennyiségű eluens elpárologtatásának problémáját, az analitikai oszlopok helyett kisebb belső átmérőjű kromatográfiás oszlopokat kezdtek el használni [97], majd ugyanő, Fujimotoval együtt a vizes eluensek használatát is lehetővé téve, rozsdamentes acélhálóra gyűjtötték a mintákat [98]. Ez utóbbi azonban az eluátum összetételétől függően spektrális anomáliákat okozott a transzmissziós IR spektrumban, míg a kisebb átmérőjű oszlopok használata mellett, a jó minőségű IR spektrum nyeréséhez gyakran az oszlop kapacitásához viszonyítottan valószínűtlenül nagy mintakonzentrációk injektálására volt szükség.

Az igazán hatékony eluenseliminálás megvalósítására azonban olyan interface kialakítására volt és van igény, mely egyrészt a *kromatografálás által megkövetelt* áramlási sebesség mellett képes mind a normál fázisú, mind a fordított fázisú, többnyire vizet is tartalmazó eluensek eltávolítását megvalósítani, másrészt a minták adott felületen történő depozíciójakor képes biztosítani, hogy azok szétterülése megelőzően kicsiny (az IR sugár felületi keresztmetszeténél kisebb vagy egyenlő) legyen a megfelelő IR detektálás és spektrumnyerés érdekében.

Összességében, a fentiekben már részletezett korai módszerek megjelenése után, 5-féle eluenseliminációs technika bemutatására került sor napjainkig. Az úgynevezett ThermoSpray, pneumatikus és ultrahangos összekötő elemeken kívül - melyek mindegyike az eluens eltávolítását *részben* azok elpárologtatásával oldja meg - az ElectroSpray, valamint az LC-MS technikából átvett részecskesugár elven működőket mutatták be. Somsen és munkatársai áttekintő tanulmányukban [99] részletesen írnak a működési elvekről, valamint az alkalmazásokról. Munkájukból (valamint az 1998-2004. július közötti irodalmi adatokból) az is kiderül, hogy napjainkig csak egyetlen egy cikk jelent meg [100], mely HPLC-IR interface-ként ElectroSpray-t alkalmazott. Bár a részecskesugár elven működő interface mind a szerves, mind a vizes (sőt a pusztán vizet tartalmazó) eluensek eltávolításában a legjobb hatékonyságúnak mutatkozott, eddig még nem oldották meg a mintakomponensek folyamatos gyűjtését, vagyis csak off-line módon üzemeltethető. A többi (hőhatást is felhasználó) interface általános használatának korlátozó tényezője, hogy az alkalmazni kívánt eluensnél csak kevésbé illékony vegyületek elválasztását lehet kivitelezni, az elválasztandó (valós

életből származó, ismeretlen) vegyületek termikus degradációt szenvedhetnek, valamint az eluens hatékony eliminálása csak meghatározott (a kromatográfiailag optimálisnál kisebb) áramlási sebesség mellett lehetséges. Mindezek által a kromatográfiásan megvalósítható elválasztási feladatok köre szűkül.

Míg az ún. ThermoSpray interface az eluens eltávolítása érdekében az oszlopról érkező folyadékot egyszerűen egy fűtőszállal felfűtött további csövön keresztül engedi át, (mely csőből elvileg csak az elválasztott mintakomponensek kerülnek porlasztással egy adott IR médiumra), a pneumatikus elven működő összekötő elem a porlasztási funkciót He vagy N₂ gáz nagy sebességgel történő bevezetésével oldja meg. Gagel és Biemann fűtött N₂ gáz alkalmazásával növelte a pneumatikus interface hatékonyságát [101], s az ő interface-ük elve alapján készült el a kereskedelemben is kapható ún. LC-Transform készülék [102]. E készülék csupán annyiban tér el a Gagel és Biemann féle megoldástól, hogy a pneumatikus elven túl a ThermoSpray-típusú összekötő elemeknél használt fűtőszál beépítésére is sor került, valamint az elválasztott komponensek nem a reflexiós méréseket lehetővé tevő tükröző felületre kerülnek, hanem egy alulról alumíniummal fedett Ge lapra. (Mivel az ilyen szubsztrát alkalmazásakor a fény transzmissziója és reflexiója is megtörténik, ezt a mérési módot transzflexióknak nevezték el.)

A termikus degradáció esélyét csökkenti az a másik kereskedelmi készülék, melyet "Infrared Chromatograph" vagy IRC néven neveznek [103]. Az IRC-ben nincs fűtőszál, viszont van helyette egy vákuumkamra. E készülék további jellemzője, hogy a pneumatikus egységen túlmenően egy ultrahangozó egység is segíti a porlasztást és az eluens eliminálását; a mozgó ZnSe lapra gyűjtött komponensekről pedig fókuszált IR sugár segítségével, vagyis IR mikorszóppal veszik fel a spektrumokat. E két készüléket azonban még nem használják a kutatásban elég elterjedten, s így igen kevés cikk jelenhetett meg [LC-Transform: 104-107; IRC: 108-111], melyek alapján érdemeik/teljesítőképességük egyértelműen megállapítható lenne. Kiterjedt irodalma inkább a házi készítésű és fejlesztésű összekötő elemeknek van. Somsen és munkatársainak összefoglaló cikke [99] ezzel kapcsolatosan megjegyzi: a legtöbb (eluenseliminációs) HPLC-IR interface-t eddig sajnos csak a készítőik használták, s nagyon kevés olyan publikáció jelent meg, mely a valós életből származó problémára alkalmazta volna a HPLC-IR műszert.

Az irodalmi adatok áttekintése világosan megmutatja, hogy - bár a HPLC-IR műszeregyüttes kétféle működtetési elve azonos évtizedben került bemutatásra - az oldószereliminációs technikák jelentős fejlődésen mentek keresztül mindeddig. Ennek nyilvánvaló oka - ahogyan az várható is volt - az, hogy a mozgó fázis erős abszorpciója az átfolyós folyadékcélával megvalósított mérések lehetőségeinek fő korlátozó tényezőjének bizonyult, mind az azonosítási, mind a detektálási határt tekintve. S bár több áttekintő tanulmány is megjelent mostanában, melyek mind a két megközelítést részletesen tárgyalják [99, 112-114], ezek egyike sem idéz olyan cikkeket, melyek alapján világosan kiderülne: mekkora is az a jellemző detektálási (ill. azonosítási) határ, amely a folyadékcélával elérhető (analitikai oszlopot használva az elválasztás során).

Végül megjegyzendő, hogy a folyadékcélás mérések esetében a mobilfázisként oly sokáig elkerült víz, vagy vizes eluensek közvetlen használata ma már szintén nem lehetetlen; az utóbbi években erre mutatnak rá Lendl és munkatársainak munkái különböző kromatográfiai rendszerekben [115-118]. Vagyis a módszer bemutatása után több évtizeddel, a NP-HPLC-s feladatokon kívül eső problémák folyadékcélás IR detektálási lehetőségeinek feltérképezése és fejlesztése is elkezdődött.

3. Célkritizálás

A rezgési spektroszkópiai és kromatográfiai módszerek kapcsolatának két területén kívántunk kutatásokat végezni, mégpedig a vékonyrétegekromatográfia (TLC) és Raman spektroszkópia kapcsolata területén, valamint az átfolyós folyadékcélával összekötött HPLC-FTIR módszer területén.

A TLC-Raman, illetve TLC-SERS méréseink vizsgálandó vegyületeiként L- α -aminosavakat választottunk. Ezek keverékének elválasztása és azonosítása gyakori feladat a biokémiában, és figyelembe véve, hogy ezen vegyületek nem illékonyak, a vékonyrétegekromatográfia, mint gyors és egyszerű módszer alkalmazása szóba jöhet. Ugyanakkor mivel ezek a vegyületek (származékképzés nélkül) nem UV-aktívak, a standard UV detektálás helyett valamilyen rezgési spektroszkópiai (vagy más azonosításra alkalmas) detektálási módszerre van szükség. S minthogy az irodalmi adatokból már kiderült: a

mintakomponensek közvetlen TLC lapon történő IR spektroszkópiai (DRIFTS vagy fotoakusztikus) mérése több problémától is szenved (s emiatt érdemes az ilyen méréseket inkább *nem* a TLC lapon elvégezni), a közvetlen TLC lapon történő Raman spektroszkópiai detektálási lehetőségek feltérképezését időszerűnek véltük. Annál is inkább, mivel az irodalomban pl. némi vita, illetve zavar van a tekintetben, hogy milyen hullámhosszú gerjesztőlézerrel célszerű a TLC-Raman méréseket végezni. Kowalik és munkatársai ismétlődően a “nagy energiájú Nd:YAG lézer” használata ellen hívják fel a figyelmet [119, 120] (az általuk vizsgált TLC lapok szerves ligandumainak részleges bomlása miatt), miközben többek között Everall és munkatársai is arra figyelmeztetnek, hogy a TLC foltok esetében a lézer által indukált mintadegradáció és fluoreszcencia elkerülése a legfőbb előnye a NIR lézeres gerjesztéssel végzett FT-Raman spektroszkópiai méréseknek [64].

Vizsgálataink során néhány TLC lap alkalmazhatóságát is megvizsgáltunk. E lapok kiválasztásánál egyrészt igyekeztünk olyan vékonyrétegeket választani, melyek várhatóan kis háttérszórással járulnak majd hozzá az aminosavminták TLC foltjainak spektrumaihoz, másrészt egy (a forgalmazó által) kimondottan TLC-Raman mérésre szánt TLC lap is kiválasztásra került. Ezeket a vékonyrétegeket NIR gerjesztésű FT-Raman és 3 különböző látható hullámhosszon történő gerjesztés mellett Raman mikroszkópiai mérések alá vetettük. Célunk ezzel az volt, hogy megállapíthassuk, melyik az a gerjesztőlézer, ill. melyik az a TLC lap és gerjesztőlézer párosítás, melynek alkalmazása a TLC-Raman mérési céloknak leginkább megfelel (legkisebb háttérszórás és fluoreszcenciamentesség szempontjából). Ezek után került sor az aminosavaknak a megfelelő TLC lapra történő felvitélére, és a különböző gerjesztőlézerek alkalmazása melletti TLC-Raman mérésekre.

Céljaink között szerepelt az is, hogy kiválasszuk azokat a körülményeket, melyek lehetővé teszik a TLC foltok felületerősített Raman spektroszkópiai (SERS) mérését, és megvizsgáljuk a felületi erősítés (vagyis a kapott Raman sávok intenzitásnövekedésének) gerjesztő hullámhossztól való függését.

Bár az átfolyós folyadékcélás HPLC-FTIR mérési technikát ugyanabban az évtizedben mutatták be, mint az eluenseliminációs technikát, csak az utóbbi fejlesztésére és optimalizálására fordítottak nagy figyelmet. A folyadékcélás technika esetében a mozgó fázis erős (vagyis az elválasztott komponens abszorpciójához viszonyítottan erős) abszorpció

sávjaihoz köthető problémának a megoldásával gyakorlatilag nem foglalkoztak. Az eltelt évtizedek alatt azonban az FTIR mérés technika jelentősen fejlődött, épp ezért célunk részben a jelenlegi lehetőségek kiértékelése volt a rendelkezésünkre álló nagy sebességű, nagy érzékenységű FTIR készülékkel kialakított HPLC-FTIR műszeregyüttes kapcsán. Mindemellett az eddig megjelent cikkek - melyek folyadékcellával megvalósított normál fázisú HPLC-FTIR módszert alkalmaztak - csakis olyan próbálkozásokat mutattak be, melyek során IR-kompatibilis oldószereket (mozgó fázisokat) használtak. Másik célunk ezért olyan NP-HPLC-FTIR mérések kivitelezése volt, amelyeknél a NP-HPLC-s elválasztásokkor megszokott, konvencionálisan használt kromatográfiás mobilfáziskeverékeket használunk. Másrészt, bár számos összefoglaló tanulmány létezik, mely mindkét HPLC-IR mérési mód irodalmát tárgyalja [99, 112-114], ezek egyike sem idéz olyan cikket, melyek alapján világosan kiderülne: mekkora is az a jellemző detektálási illetve azonosítási határ, amely *analitikai* kromatográfiás oszlop használata mellett folyadékcellával (eluenseliminálás nélkül) elérhető. Vagyis egy gyakorlati szempontból fontos elválasztandó vegyületkeverék elválasztása során, a tipikus kromatográfiás mozgófázis-keverékek használata mellett, az elérhető detektálási és azonosítási határokat is meg kívántuk állapítani.

A fent részletezett mérési móddal gyakorlatilag felvállaljuk a mozgó fázis abszorpciós sávjaiból eredő problémákat. Munkánk egy másik szakaszában igyekeztünk olyan potenciális megoldásokat találni, felvázolni, melyek részletes kidolgozása valóban megoldhatja ezt a problémát (ld. az 5. fejezetet). Ezek közül az a kemometria módszer, mely a HPLC-FTIR mérésekből származó sorozatspektrumokat használja fel kiindulási adathalmaznak, és végeredményül (többek között) az elválasztott egyedi komponensek (eluensmentes) spektrumát adja meg, jelenleg fejlesztés alatt áll.

4. TLC-Raman és TLC-SERS vizsgálatok

4.1. TLC-Raman és TLC-SERS mérések kísérleti módszerei

4.1.1. Felhasznált anyagok és mintakészítés

Három különböző típusú, alumínium hátlappal ellátott kromatográfiás vékonyréteg tesztelésére került sor a konvencionális Raman mérések során történő használat céljából:

- a) *Kieselgel 60* szilika lap (Merck, cikkszám: 1.05553, 0.2 mm rétegvastagság);
- b) *Si 60 F₂₅₄ Raman* szilika lap (Merck, cikkszám: 1.05543, 0.1 mm rétegvastagság);
- c) *Aluminium Oxide 60 F₂₅₄, neutrális, E típusú* (Merck, cikkszám: 5550, 0.1 mm rétegvastagság).

A két utóbbi TLC lap a vékonyrétegekromatográfiásan elválasztott anyagok vizualizálására *F₂₅₄* jelű, fluoreszcens adalékot is tartalmaz.

A vizsgálatra kiválasztott hét esszenciális aminosav, a glicin, valamint az alanin, valin, szerin, prolin, hidroxiprolin és fenilalanin L- α formái “a.lt.” minőségű kereskedelmi termékek voltak (Reanal Rt., Budapest), és további tisztítás nélkül kerültek felhasználásra. A minták 150 μ g-nyi mennyiségben, vizes oldatukból felcseppentéssel kerültek a TLC lapokra, majd az így kialakult kb. 4 mm átmérőjű foltokat a Raman mérések előtt UV-lámpa alatt szárítottuk meg. A TLC lapokból a mintafoltot tartalmazó, kb. 10×10 mm-es darabokat vágunk ki, majd ezeket a lézernyaláb fókuszába helyezve, a Raman méréseket 180°-os szórási geometria mellett végeztük el.

Összehasonlítási célból, az említett aminosavak spektrumát szilárd (por) és vizes oldat formában is megmértük, ahol a vizes oldatok koncentrációi az egyes aminosavak oldhatóságának feleltek meg.

A SERS mérések során Lee és Meisel módszerének [82] egy módosított változata szerint előállított Ag-szolt használtunk [76]. A szolt használat előtt 20 másodpercig ultrahangoztuk, majd 5 μ l-nyi mennyiséget csöppentettünk a mintafoltokra. Az így elkészített minták SERS

mérését nedvesen (a nedvesen tarás érdekében a hosszabb idejű mérések esetén üveg fedőlappal letakarva), és száradás után is elvégeztük.

Az Ag-szol aktivitásának (a felületerősítési effektus jelenlétének) teszteléséhez p-dimetilamino-benzilidén-rodanint (Rodanin-t) használtunk, melyből 5 μg -nyi mennyiség felvitele körülbelül 28 mm^2 -es mintafoltot eredményezett a TLC lapon.

4.1.2. Műszerek és mérési paraméterek

Mind a Raman, mind a SERS méréseket két különböző típusú Raman spektrométerrel végeztük.

Az 1064 nm-en emittáló Nd:YAG lézerrel (Spectra Physics FC-106VN) és cseppfolyós nitrogénnel hűtött Ge-detektorral felszerelt *Nicolet Raman 950 FT* spektrométerrel történő mérések során az alábbi mérési paramétereket alkalmaztuk:

Az összes spektrum 4 cm^{-1} -es felbontással készült; a digitálisan regisztrált nyers spektrumokat pedig utólag a műszer válaszfüggvényével korrigáltuk, hogy azok más készülékeken felvett spektrumokkal is összehasonlíthatóak legyenek. A szilárd halmazállapotú aminosavak Raman mérésekor 512 scan akkumulálására és 320 mW lézerteljesítmény alkalmazására került sor, míg a vizes oldatok mérését 1024 scan és 500 mW lézerteljesítmény mellett végeztük el. A TLC lapokon lévő mintafoltok mérése során 1024 scan és 420 mW lézerteljesítményt alkalmaztunk. A SERS méréseknél 240 mW-ot és 256 scan-t alkalmaztunk a Rodanin, valamint a száraz aminosav mintafoltok esetében, míg az Ag-szollal impregnált nedves mintáknál (az elszénesedés veszélye miatt) 45 mW-ra csökkentettük a lézerteljesítményt.

A többcsatornás CCD detektorral, kétféle diffrakciós ráccsal (1800 és 950 gr. mm^{-1}) és 3 különböző gerjesztőlézerrel felszerelt *Jobin Yvon LabRAM 300*-as diszperzív mikro-Raman spektrométerrel az alábbi paraméterek mellett végeztük méréseinket:

A külön megemlített eseteket kivéve, általában 100-szoros nagyítású mikroszkópjobjektívet használtunk arra, hogy a minára fókuszáljuk az éppen alkalmazott lézersugarat. A használt gerjesztőlézerek: frekvencia kettőzött Nd:YAG lézer (532 nm, 11 mW kimeneti teljesítmény), He-Ne lézer (633 nm, 8 mW), és dióda lézer (785 nm, 6.5 mW). A lézersugár mintára eső teljesítményét D0.3, D1 vagy D2 jelű neutrális szűrőkkel kontrolláltuk. Az integrálási idők a detektorelemek által lefedett minden egyes spektrális tartományban 2×5 -től 2×300 másodpercig

változtak. A spektrális felbontás a hullámhossz függvényében változott, de tipikusan 3 cm^{-1} -nél kisebb volt az 1800 gr. mm^{-1} -es rács és az 532 nm -es lézersugár együttes használata mellett.

4.2. TLC-Raman és TLC-SERS vizsgálatok eredményeinek tárgyalása

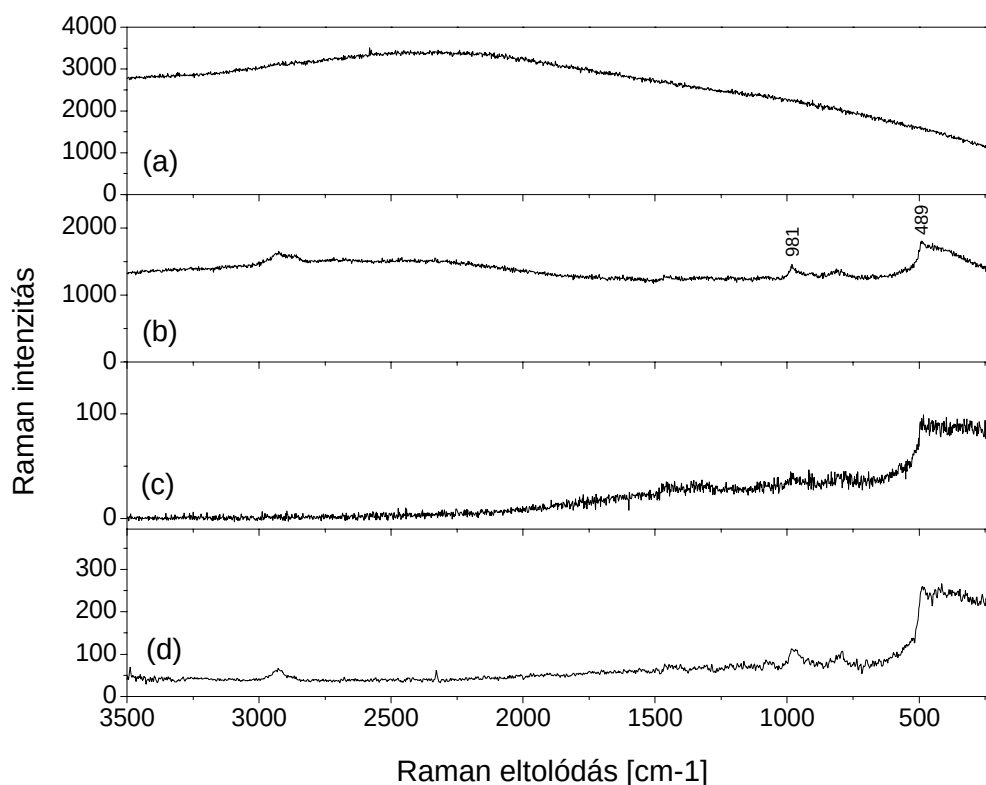
4.2.1. TLC lapok Raman szórásának vizsgálata különböző gerjesztőlézerek alkalmazása mellett

Azok a TLC lapok, melyek szerves összetételűek vagy kémiaileg kötött szerves ligandumot tartalmaznak, várhatóan kevésbé alkalmasak a közvetlenül TLC lapon történő minták mérésére. Mivel Everall és munkatársai már bemutatták, hogy a cellulóz és poliamid-alapú vékonyrétegeknek erős Raman spektrumuk van [64], ennek figyelembevételével választottuk ki az egyszerű szilíciumoxid (későbbiekben: szilika) és alumíniumoxid alapú TLC lapokat, míg a HPTLC-Raman lap vizsgálatra történő kiválasztását az indokolta, hogy azt kereskedelmileg kimondottan FT-Raman vizsgálatokhoz ajánlották.

Mielőtt a mintafoltjaink mérésére sort kerítettünk volna, megvizsgáltuk a kiválasztott üres TLC lapok Raman szórását (háttérszórást). A szilika lap (*Kieselgel 60*), a HPTLC-Raman lap (*Si 60 F_{254s} Raman*) és az alumíniumoxid lap (*Aluminium Oxide 60 F₂₅₄*) különböző gerjesztőlézerek alkalmazása mellett kapott Raman spektrumait az 1-3. ábrák tartalmazzák. Az 532 , 633 és 785 nm -es gerjesztőlézerrel mért spektrumok ugyanakkora integrálási idő ($2 \times 30\text{ s}$) mellett készültek, míg a FT-Raman spektrumok mérése olyan mérési paraméterek (scan-ek száma, lézerteljesítmény, stb.) mellett történt, hogy az előző spektrumokkal összemérhető jel/zaj arányt kapjunk.

Az első fontos megfigyelés, hogy a TLC lapok háttérszórása rendkívül erősen függ a gerjesztő lézersugár hullámhosszától. A *Kieselgel 60* az 532 nm -es zöld lézerrel történő gerjesztése (1/a. ábra) egy nagyon erős, folyamatos és a teljes spektrumra kiterjedő fluoreszcenciát ad, mely várhatóan elnyomná mintáink tiszta rezgési átmeneteiből származó Raman jeleit. A 633 nm -es vörös lézerrel (1/b. ábra) a fluoreszcencia még mindig erős, de a szilika és a kötőanyag Raman jellegzetességei (melyek nagyon hasonlítanak az Everall és munkatársai által közöltekhez [64]), 500 , 800 , 980 , és 2900 cm^{-1} környékén szintén

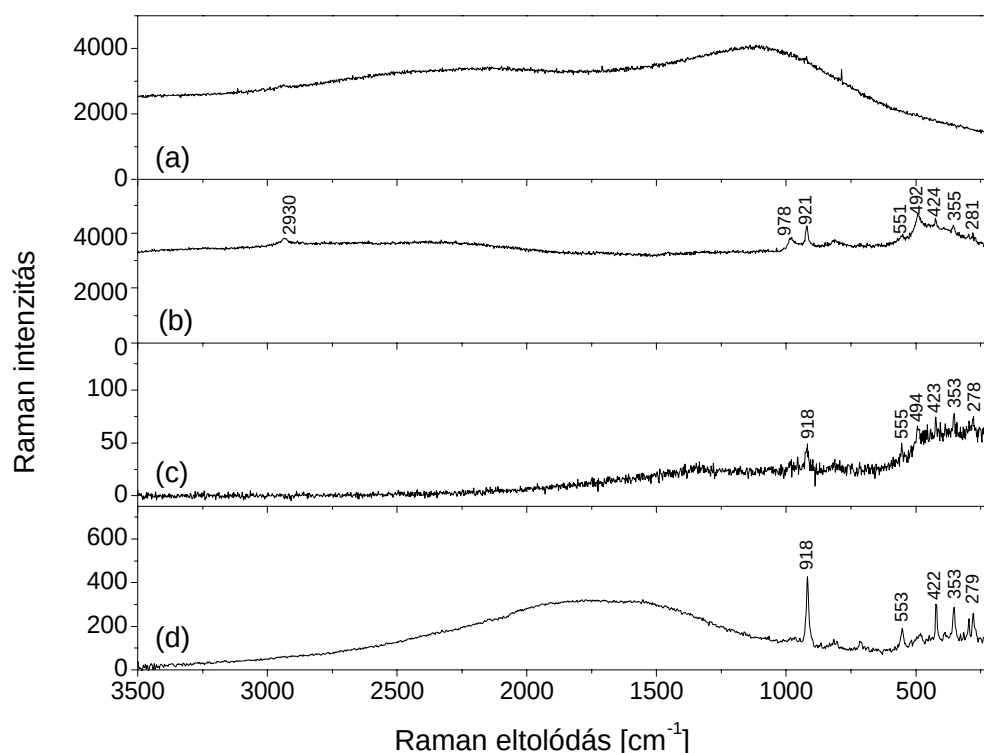
megfigyelhetőek. Ez az erős háttérszórás bármely vizsgálandó minta átfedő gyenge Raman vonalainak vizsgálata számára kedvezőtlen feltételeket teremt. Az 1/c. és 1/d. ábrák azt mutatják meg, hogy e háttérfluoreszcencia a két NIR lézerrel történő mérésakor (785 nm és 1064 nm) szinte teljesen hiányzik; ezek a lézerek emiatt sokkal megfelelőbbek a vékonyrétegen adszorbeálódott mintavegyületek (és általában az anyagok) Raman spektrumainak detektálására.



1. ábra. Háttérszórás a Raman spektrumban a *Kieselgel 60* TLC lapról: (a) 532 nm (D1 szűrő), (b) 633 nm, (c) 785 nm, (d) 1064 nm hullámhosszú gerjesztőlézerrel

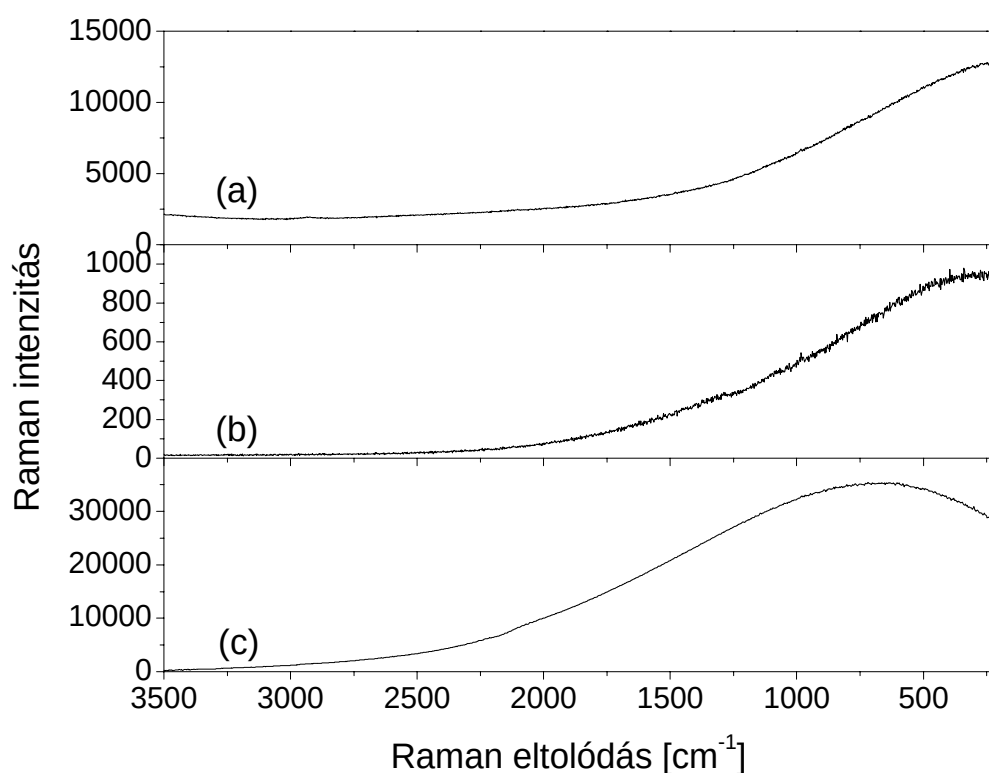
A háttérfluoreszcenciára vonatkozóan hasonló trend figyelhető meg a HPTLC-Raman lap esetén (2. ábra), néhány figyelemre méltó különbséggel. Az 532 nm-es gerjesztőlézer kivételével minden más esetben számos keskeny Raman vonal jelenik meg 280, 354, 423, 492, 552, és 920 cm^{-1} közelében, melyek feltételezhetően az ezt a lapot alkotó, sokkal szabályosabb gömbszerű szilika részecskék összetartása végett nagyobb mennyiségben jelenlévő kötőanyaghoz rendelhetőek. Míg e jellegzetes sávok nem bukkannak fel az

532 nm-es gerjesztéssel készített spektrumban, addig azok meglepően erősek (különösen 492, 978 és 2930 cm^{-1} -nél) a 633 nm-es vörös gerjesztővonal alkalmazása mellett (szemben az 1064 nm-rel és 785 nm-rel kapott spektrumbeliekhez). Ez a szelektív intenzitásváltozás felveti a kérdést, hogy vajon e sávok esetleg nem valamiféle rezonancia típusú erősítés következményei-e. A jellegzetes sávok az 1064 nm-es besugárzás által kapott spektrum (2/d. ábra) 1200 cm^{-1} alatti tartományában (ahol a legkisebb a háttérszórás) láthatóak a leghatározottabban. Ebben a spektrumban 1200 cm^{-1} felett, egészen kb 3200 cm^{-1} -ig ismét egy intenzív, ismeretlen eredetű fluoreszcencia-szerű háttér jelenik meg. Mindent egybevetve, a fent tárgyalt megfigyelések az ún. HPTLC-Raman réteget kevésbé teszik vonzóvá a Raman spektrometriai vizsgálatok számára, összevetve az előző szilika réteggel.



2. ábra. Háttérszórás a Raman spektrumban a Si 60 F_{254s} Raman TLC lapról: (a) 532 nm (D1 szűrő), (b) 633 nm, (c) 785 nm, (d) 1064 nm hullámhosszú gerjesztőlézerrel

Összehasonlítva az előző két TLC lappal, az alumíniumoxid lap (melynek a spektrumait a 3. ábrán tüntettük fel) adja a legerősebb, azaz legkevésbé elfogadható háttérszórást. A szórás rendkívül intenzív maradt a teljes hasznos Stokes-szórási spektrumtartományban, még az 1064 nm-es NIR gerjesztés esetén is (3/c. ábra), ami várható volt az alumináról publikált Raman tanulmányok alapján [121, 122], s ami eleve kizárja e vékonyréteget a Raman alkalmazások köréből.

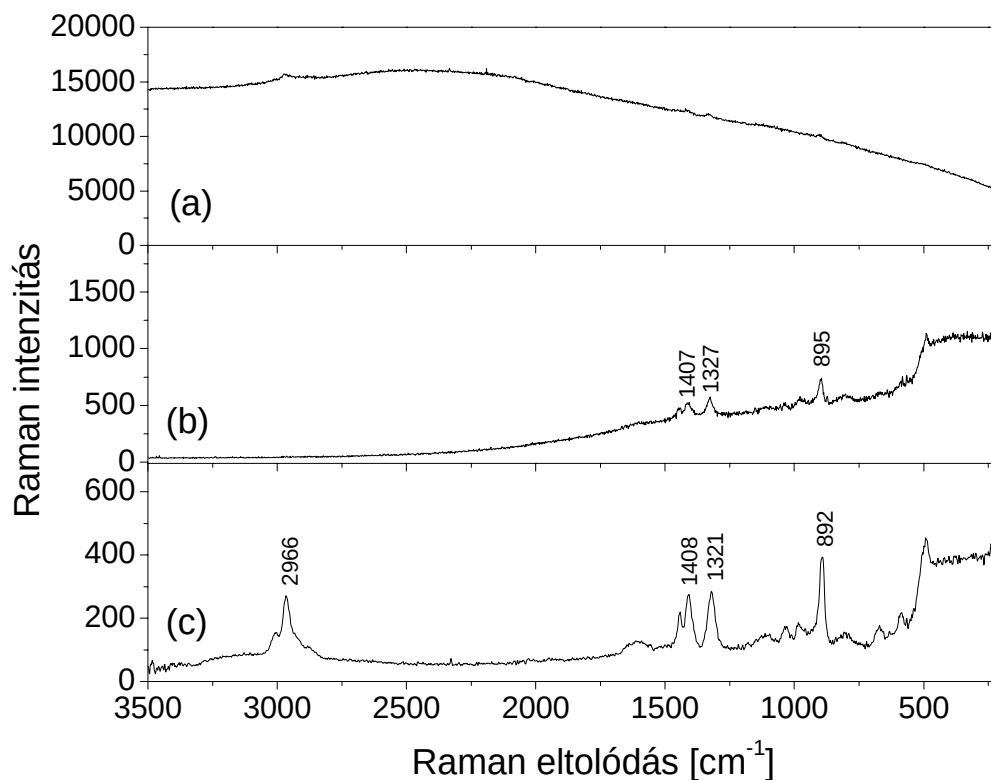


3. ábra. Háttérszórás a Raman spektrumban az *Aluminium Oxide 60 F₂₅₄* TLC lapról: (a) 532 nm (D1 szűrő), (b) 633 nm, (c) 785 nm, (d) 1064 nm hullámhosszú gerjesztő lézerrel

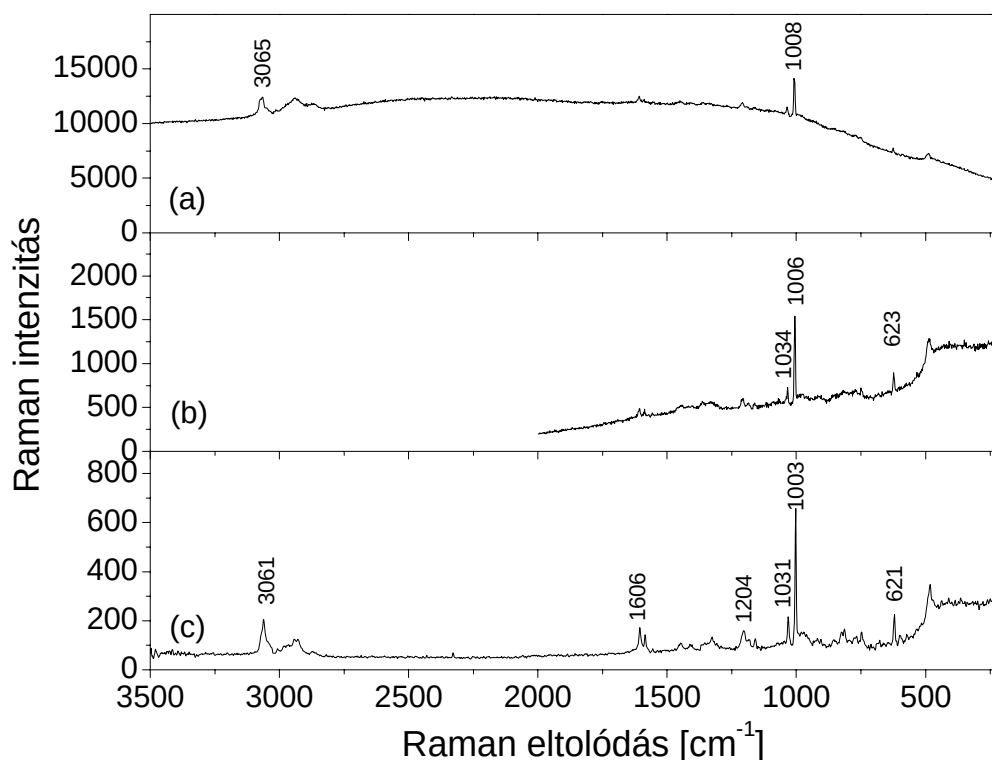
A fent leírt referenciamérések azt jelzik, hogy a háttérszórás az egyszerű *Kieselgel 60* lap esetében, az 1064 vagy 785 nm-es NIR gerjesztőlézerek használatával a legkisebb, mely így a TLC mintafoltok “in situ” azonosításra a legjobb választás.

4.2.2. A szilika TLC lapon lévő aminosav foltok Raman szórásának vizsgálata

A *Kieselgel 60*-on adszorbeálódott hét esszenciális aminosav (Gly, L-Ala, L-Val, L-Ser, L-Pro, L-HO-Pro, és L-Phe) konvencionális Raman spektrumát az 1064 nm-es gerjesztőlézerrel (a FT-Raman készülékkel) vettük fel, míg a Gly és L-Phe-t az 532 és 633 nm-es gerjesztőlézerekkel (a diszperzív Raman mikroszkóppal) is tanulmányoztuk. A különböző gerjesztőlézerek használata nagyon különböző minőségű és információtartalmú spektrumokat eredményezett, a háttérszórás szintjétől és az adott aminosav szórási tulajdonságától függően. A Gly és L-Phe esetében kapott spektrumokat a 4. és 5. ábra mutatja.



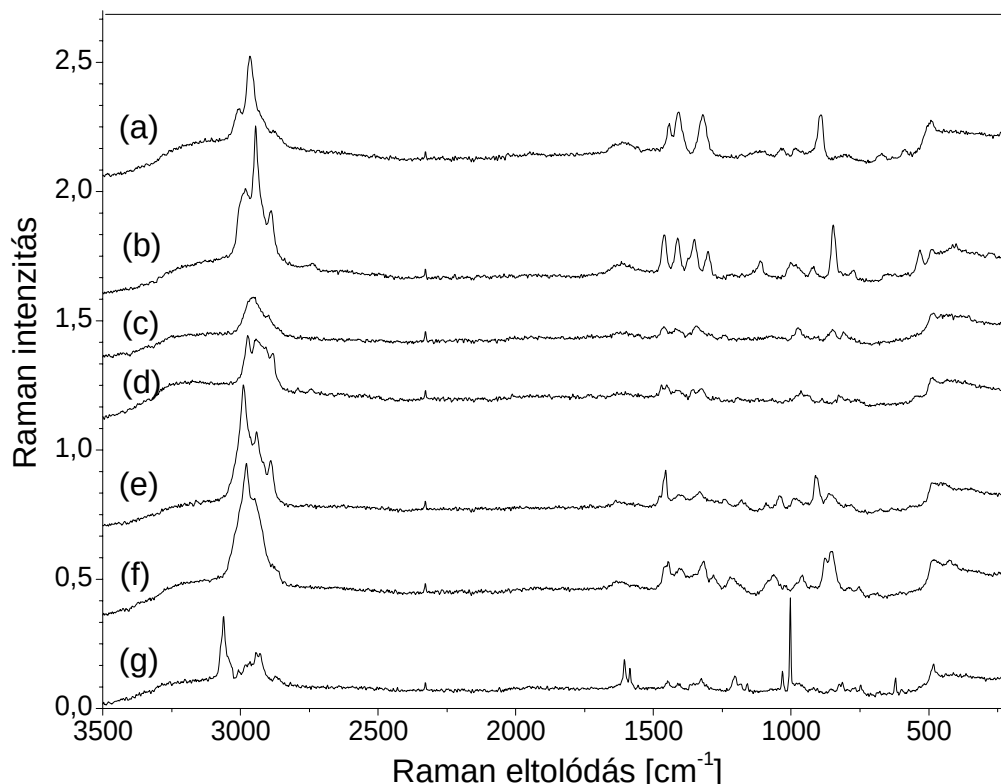
4. ábra. A *Kieselgel 60*-on lévő Gly (150 μg /folt, 4 mm foltátmérő) nyers Raman spektrumai: (a) 532 nm, (b) 633 nm, (c) 1064 nm hullámhosszú gerjesztőlézer esetén



5. ábra. A Kieselgel 60-on lévő L-Phe (150 $\mu\text{g}/\text{folt}$, 4 mm foltátmérő) nyers Raman spektrumai: (a) 532 nm, (b) 633 nm, (c) 1064 nm hullámhosszú gerjesztőlézer esetén

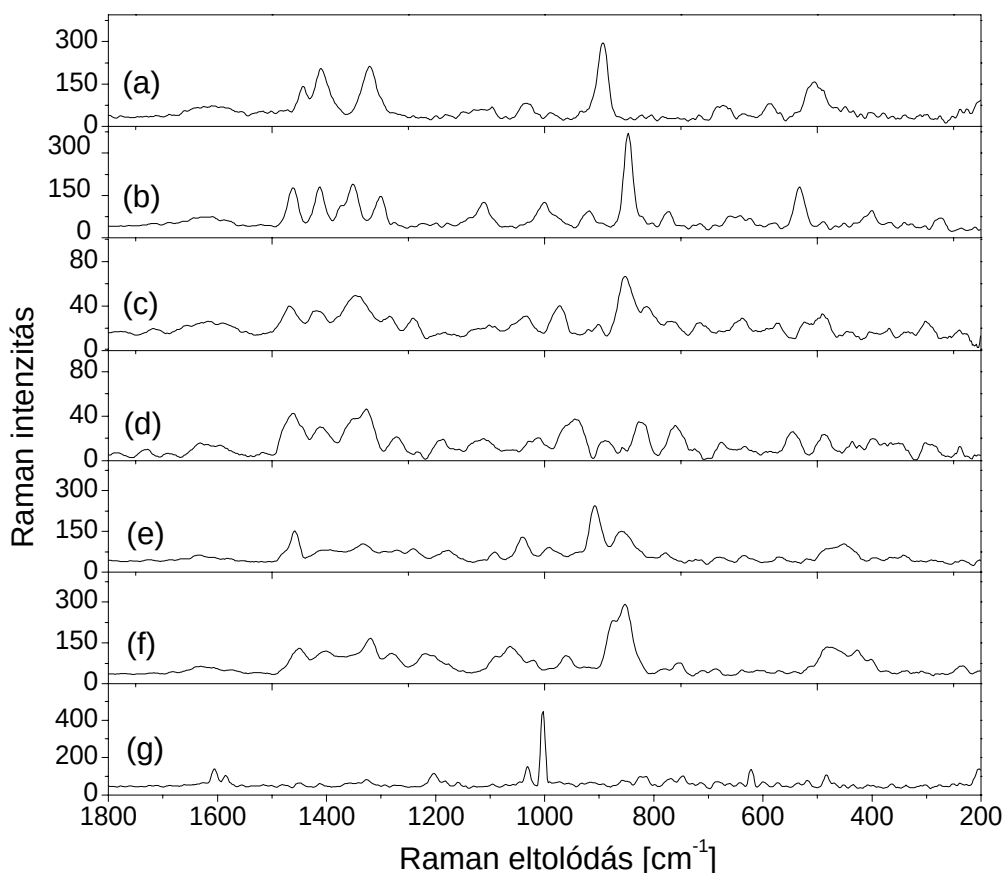
Az 532 nm-es gerjesztőlézerrel csak a legerősebb Gly sávok bukkantak fel az intenzív fluoreszcencia háttéren (892, 1320, 1410, és 2960 cm^{-1} -nél), alig meghaladva a zaj szintjét (ld. 4/a. ábrát), míg a helyzet az L-Phe esetében némileg jobb (ld. 5/a. ábrát), köszönhetően az L-Phe erősebb Raman szórási tulajdonságának. A 633 nm-es gerjesztés határozottan jobban működik (5-10 –szeres jel/zaj arány növekedést eredményezve, ld. a 4/b. és 5/b. ábrát), míg az 1064 nm-rel kapott FT-Raman spektrum mindkét esetben nyilvánvalóan kiváló. E spektrumok jelentősen nagyobb jel/zaj arányt, jobb spektrális kontrasztot és részletességet mutatnak.

A 6. ábra a hét vizsgált aminosav szilika TLC lapon lévő foltjairól felvett nyers (korrigálás nélküli) NIR FT-Raman spektrumokat mutat be. E spektrumok a Raman szórási keresztmetszet-beli különbségeket demonstrálják, ami annyit jelent, hogy az azonos mennyiségű aminosavak különböző szórási intenzitást és spektrális minőséget eredményeznek.



6. ábra. A *Kieselgel 60* TLC lapon adszorbeálódott aminosavak (150 µg/folt, 4 mm foltátmérő) nyers FT-Raman spektrumai: (a) Gly, (b) L-Ala, (c) L-Ser, (d) L-Val, (e) L-Pro, (f) L-HO-Pro, (g) L-Phe. (Mérési körülmények: 1064 nm-es gerjesztés, 420 mW lézerteljesítmény, 1024 akkumulált scan, 4 cm⁻¹ spektrális felbontás, műszerfüggvénnel való korrekció nélkül)

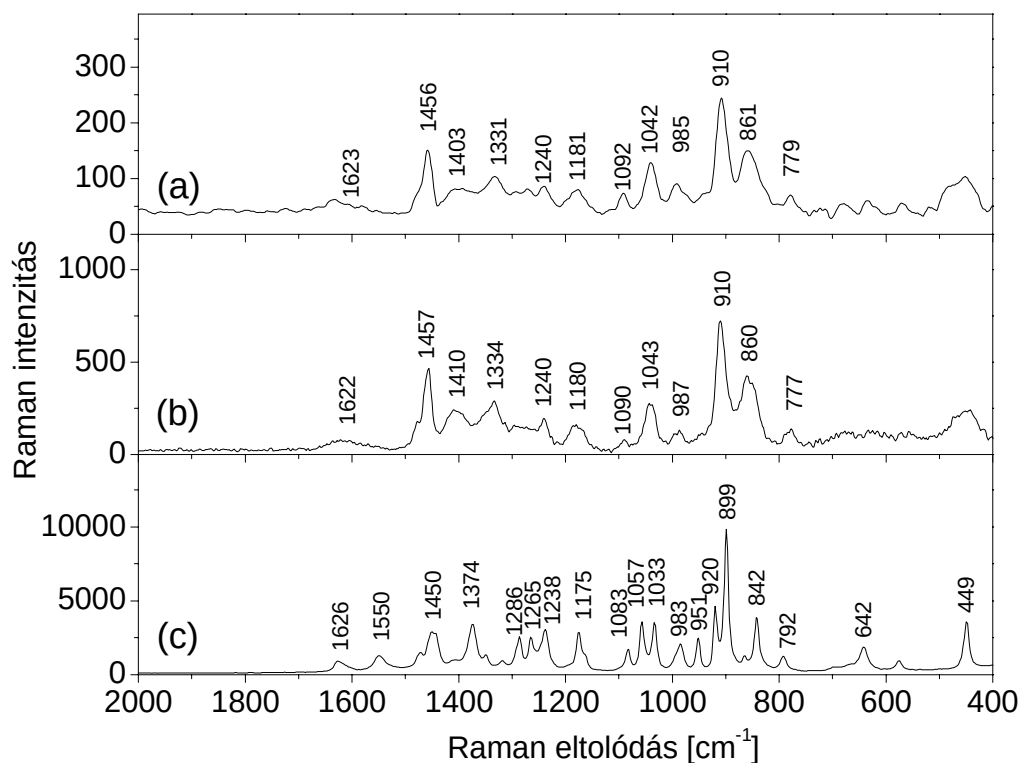
Míg a Gly, L-Ala, L-Pro, L-HO-Pro és L-Phe karakterisztikus spektrális sajátosságai jól megfigyelhetőek voltak, addig azt L-Val és L-Ser spektrumai (ld. a 6/c. és 6/d. spektrumokat) kevésbé voltak kifejezőek és sokkal nehezebben voltak azonosíthatóak. Ennek következtében az utóbbi két esetben, a TLC lap háttérszórásának interaktív spektrális kivonása után erős digitális simítást kellett alkalmaznunk ahhoz, hogy elfogadható Raman spektrumokat kapjunk. (Az L-Ser és L-Val spektruma 25-pontos simítást igényelt, míg a többi spektrumot 9-pontos simításnak vetettük alá.) Az adszorbeálódott aminosavak háttérkivonás, alapvonalkorrekció és digitális simítás után kapott spektrumait (az 1800 cm⁻¹ alatti tartományban) a 7. ábra mutatja be.



7. ábra. A *Kieselgel 60* TLC lapon adszorbeálódott aminosavak FT-Raman spektrumai műszerfüggvénnnyel való korrekció, háttérkivonás, alapvonalkorrekció és digitális simítás után: (a) Gly, (b) L-Ala, (c) L-Ser, (d) L-Val, (e) L-Pro, (f) L-HO-Pro, (g) L-Phe

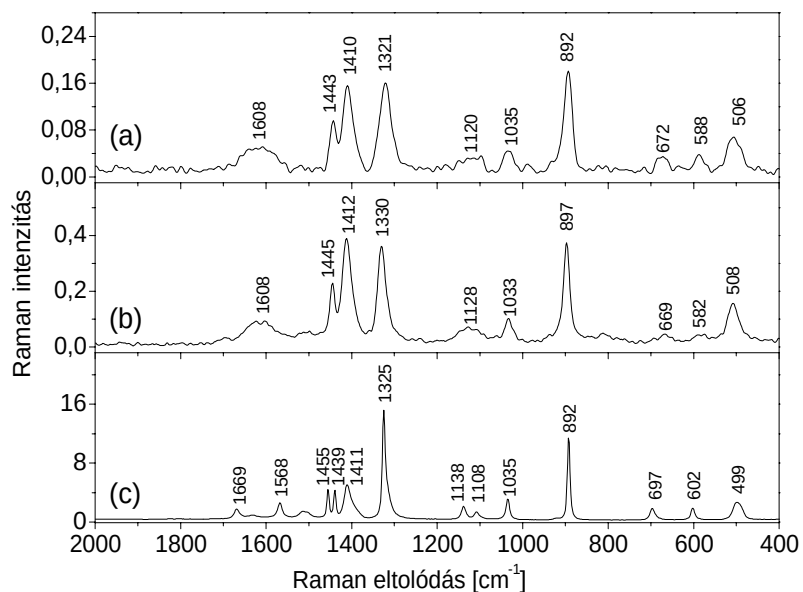
A vizsgált aminosavak többségénél hasonló jellegzetes spektrális módosulásokat figyeltünk meg. Ezeket az L-Pro példáján a 8. ábrán figyelhetjük meg, összehasonlítva a TLC lapon lévő minta FT-Raman spektrumát (8/a.) a tiszta kristályos minta porított formában megmért spektrumával (8/c.). Nyilvánvalóan látszik, hogy az adszorpció a Raman sávok hullámszámtolódását, kifejezett szélesedését (és esetleges összeolvadását), valamint azok relatív intenzitásainak megváltozását eredményezi. Nevezetesen, az $1390\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$ tartományban talált $\nu_s\text{CO}_2^-$ sávok erősödtek meg figyelemreméltóan (2-3-szorosan) a többi sávhoz képest. A változások azt jelezték, hogy bár minden terminális atom (a NH_x^+ , CO_2^- és még a CH_x csoportokéi is) kölcsönhatnak a felülettel így vagy úgy, a legerősebb kölcsönhatás

az ikerionos molekulák karboxilát-csoportja és feltehetően a kromatográfiás lap szilanol-csoportjai között lépnek fel.

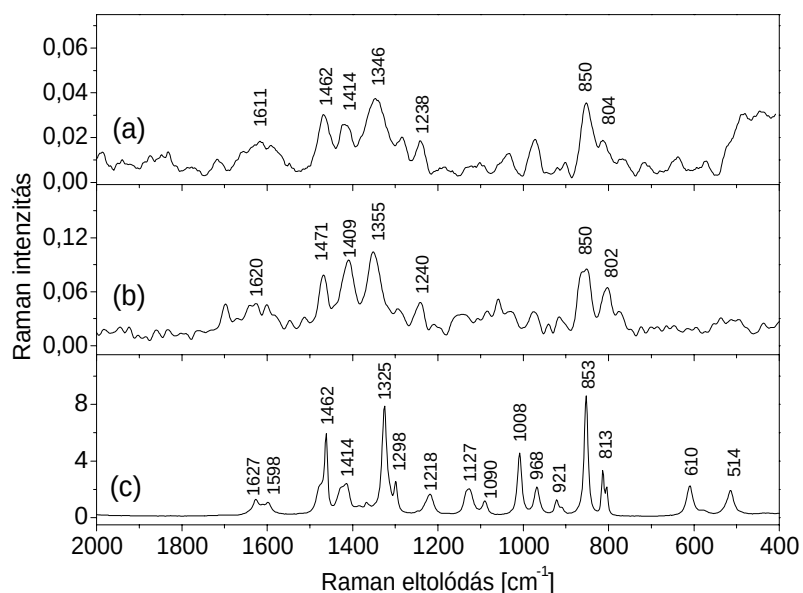


8. ábra. Az L-Pro FT-Raman spektrumai: (a) *Kieselgel 60*-on (ugyanazok a korrekciók, mint a 7. ábrán), (b) vízben (a víz háttérszórásának kivonása után), (c) kristályos porként

Az L-Pro és L-HO-Pro erősen átfedő és széles sávjainak tanulmányozása során ezek vizes oldatainak Raman spektrumaira [123] terelődött a figyelmünk, melyek figyelemre méltóan hasonlóknak tűntek azokhoz a spektrumokhoz, melyeket a TLC foltokról kaptunk. Ezek után felvettük a kérdéses komponensek vizes oldatainak FT-Raman spektrumait, és kiderült, hogy e hasonlóság minden esetben jelen van. (További két példát a 9. és 10. ábrák mutatnak be.) Mivel kölcsönhatás az oldott anyag és az oldószer között csak a víz OH-csoportjaival jöhet létre a vízben, hasonló kölcsönhatásnak kell jelen lennie a TLC lap felületén is, melyben valószínűleg szerepet játszanak a szilika felületén található szilanol OH-csoportok is.



9. ábra. A Gly FT-Raman spektrumai: (a) *Kieselgel 60*-on (háttérkivonás, alapvonalkorrekció és digitális simítás után), (b) vízben (a víz háttérszórásának kivonása után), (c) kristályos porként

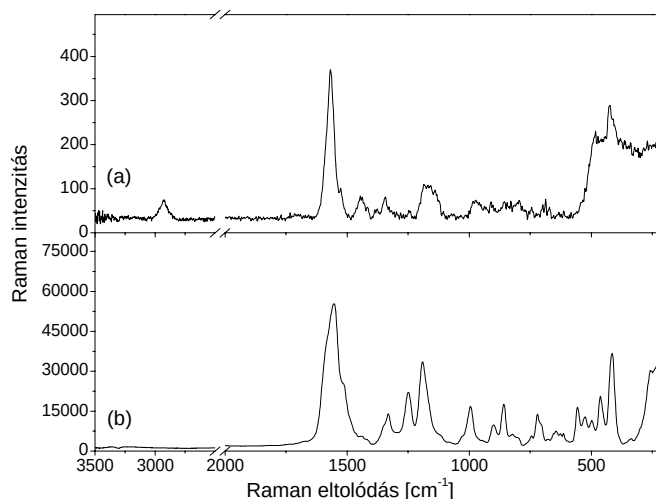


10. ábra. Az L-Ser FT-Raman spektrumai: (a) *Kieselgel 60*-on (háttérkivonás, alapvonalkorrekció és digitális simítás után), (b) vízben (a víz háttérszórásának kivonása után), (c) kristályos porként

A spektrális változások ellenére, számítógépes spektrumkereséssel - akkor is, amikor az elektronikus keresés adatbázisa csak tiszta porított anyagok spektrumait tartalmazta - a TLC foltokról nyert Raman spektrumok mindegyike pozitívan azonosítható volt, bár az egyezés mértékét kifejező mutatószámok a 35-43 %-os tartományban maradtak (kivéve az L-Phe esetén, ahol az egyezés mértéke 74.6 % volt). Ugyanakkor az egyezőségi mutatószámok jelentősen megnövekedtek (20-40 %-kal, egészen 86.4 % -ig), amikor a keresési adatbázist a vizes oldatok spektrumaival bővítettük. A vizes oldatok spektrumai és a szilika rétegen adszorbeálódott anyagok spektrumai közötti hasonlóság azt is jelzi, hogy a tiszta minták spektrumaihoz képest kialakult spektrális torzulások nem lézer-indukálta mintadegradációnak, hanem csakis a szilika hordozóanyaggal létrejött adszorpció típusú kölcsönhatásoknak a következménye.

4.2.3. SERS vizsgálatok a TLC foltokkal: száraz minták

A fémfelület általi erősítés indukálásának lehetőségét a vékonyrétegen lévő foltokra felvitt Ag-szol segítségével először száraz mintákon vizsgáltuk. Az Ag-szol aktivitását a TLC lapon Rhodanin mintával ellenőriztük, mely anyagról már kimutatták, hogy jó SERS médium [124].



11. ábra. Rhodanine folt (5 $\mu\text{g}/28 \text{ mm}^2$) *Kieselgel 60* –on: (a) konvencionális Raman spektrum, (b) Ag-szollal indukált SERS spektrum (szárított minta, 1064 nm gerjesztés, 240 mW lézerteljesítmény, 4 cm^{-1} felbontás, 256 scan)

Ahogy a 11. ábrán bemutatott spektrum jelzi (száraz minta, 1064 nm-es lézer, 240 mW), az alkalmazott szol rendkívül hatékonyak mutatkoztak: a legerősebb Raman sáv 1560 cm^{-1} közelében 360-szorosan erősödött meg, és ezzel egyidőben számos más gyenge sáv is kiemelkedett a zajszintből. Az erősítés függetlenül attól, hogy az Ag-szol a vékonyrétegre a minta után vagy előtt került fel, ugyanúgy létrejött. Nyilvánvalóan hasonló jelerősítésre lenne szükség az aminosavak esetén is, hogy csökkenthető legyen a detektálási limit és növekedjen a mintaazonosítás megbízhatósága.

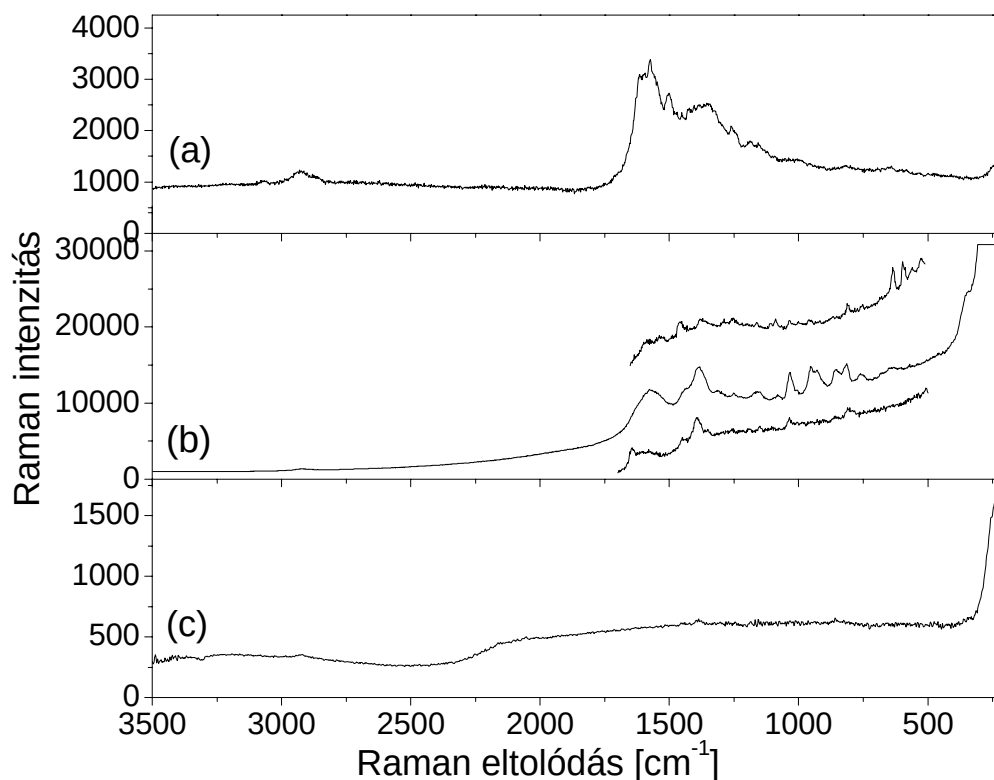
Az ugyanolyan mérési körülmény és ugyanolyan mintakezelési eljárás (aminosav foltok tetejére történő Ag-szol cseppentés, szárítás) nem eredményezett semmiféle erősítést a Gly, ill. a többi tanulmányozott aminosav esetén. Épp ellenkezőleg, a kezelt szilika hordozóból (vagy valamiféle szennyezőjéből) eredő háttérszórás néhányszor erősebbnek bizonyult, mint az a várt szórás, mely a mintából származik, olyannyira, hogy még a minta legerősebb sávja is csaknem teljesen eltűnt. Az L-HO-Pro és L-Phe esetében 1100 és 1700 cm^{-1} között megjelenő “katedrális” sávok valószínűleg degradációnak (a minta grafitizálódásának [125, 126] vagy amorf szén képződésének [127]) volt a következménye. A lézerteljesítmény csökkentése 240 mW-ról indulva 80 mW-ig eliminálta ugyan a grafitizációt, de ezzel nem járt együtt a minták sávjainak elfogadható erősödése; vagyis az aminosavak esetében száraz állapotban nem lehetett valódi SERS effektust indukálni.

4.2.4. SERS vizsgálatok a TLC foltokkal: nedves minták

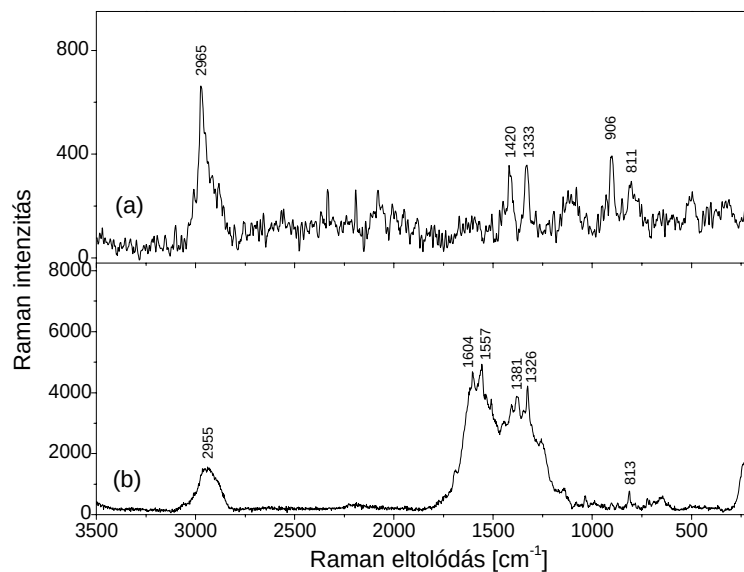
Nemrégiben Szabo és Winefordner [128] egy érdekes megfigyelést tettek közzé, melyet az “in situ” TLC-SERS mérések során végeztek. A szubsztrátfelületen egy vékony, vízből kialakuló réteg kialakításával és annak egy védő üveg fedőlap alatti nedvesen tartásával az erősítés javulását tapasztalták. Ezt a nedves (vagy üveg fedőlapos) módszert próbáltuk meg adaptálni a *Kieselgel 60*-on lévő aminosavak esetére, kiterjesztve a kísérleteket 3 különböző lézer alkalmazásával. A TLC lapon lévő mintán a nedves állapotot az Ag-szol felvitele után 10-15 perces mérési időig fenn lehetett tartani az üveg fedőlap által. Problémamentesen azonban csak a makroszkopikus FT-Raman mérések során sikerült a “nedves módszert” alkalmaznunk. A Raman mikroszkóp alkalmazása során optikai interferencia jelentkezett az üveg fedőlap jelenlétének köszönhetően, mind a 100-szoros, mind az 50-szeres nagyítású

objektíveknél. Emiatt az üveglapot el kellett távolítani, a mérési időt pedig rövidebbre, 10-40 másodpercesre fogtuk. A kb. fél perces intervallumokban ismétlődő mérések ugyanazzal a (gyorsan száradó) mintával, a megfigyelt Raman intenzitásoknak egy kezdeti növekedését, majd 1-2 perc után - a minta száradásával párhuzamosan -, azok fokozatos csökkenését mutatták. A Raman jel általában a legnagyobb “nedves intenzitás” 15-25% -ánál stabilizálódott a levegőn való száradás 2-3. perce után.

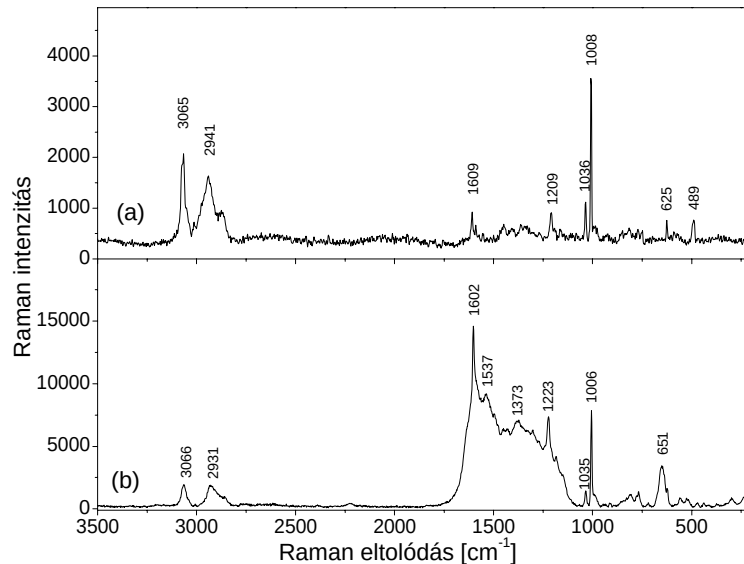
A szilika lap SERS háttérszórása az Ag-szollal való friss kezelés után, a három különböző gerjesztőlézer alkalmazása mellett a 12. ábrán található, míg a Gly és L-Phe nedves TLC lapon 532, 785 és 1064 nm-es gerjesztés mellett kivitelezett SERS kísérleteinek eredménye a 13-14., 15-16., és 17-18. ábrákon láthatóak.



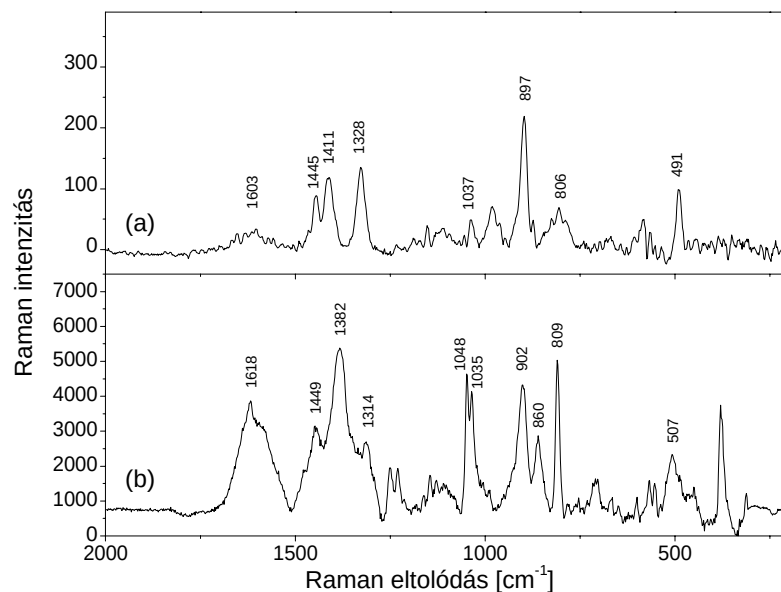
12. ábra. Az Ag-szollal frissen kezelt szilika lap (Kieselgel 60) tipikus SERS hátterei: (a) 532 nm, (b) 785 nm (mikroszkópos mérés a minta különböző helyein) és (c) 1064 nm-es gerjesztés esetén



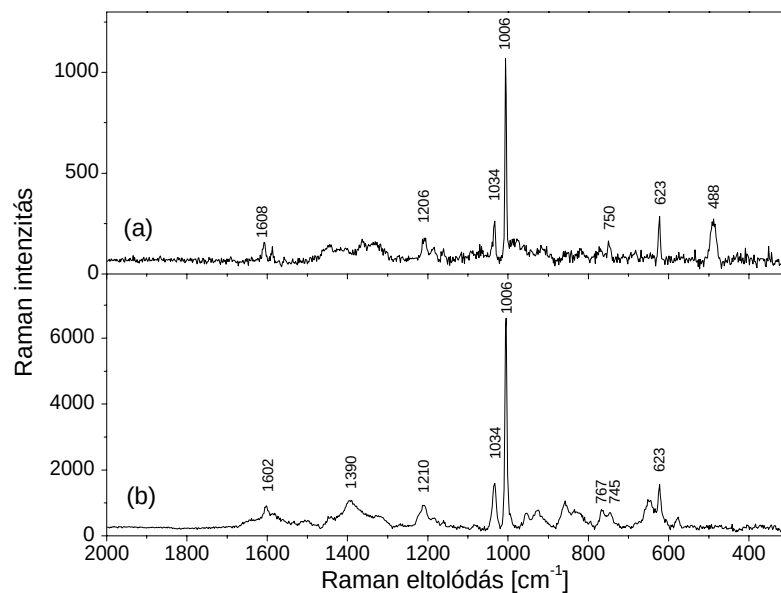
13. ábra. A *Kieselgel 60* –on lévő Gly folt alapvonalkorrigált, 532 nm-es gerjesztésű Raman és SERS spektruma 100x mikroszkópobjektív használata mellett: (a) konvencionális Raman spektrum (lézersugár 0.5-szörös gyengítése D0.3 szűrővel, 2×30 s integrálási idő), (b) SERS spektrum (lézersugár 0.01-szeres gyengítése D2 szűrővel, 2×5 s integrálási idő)



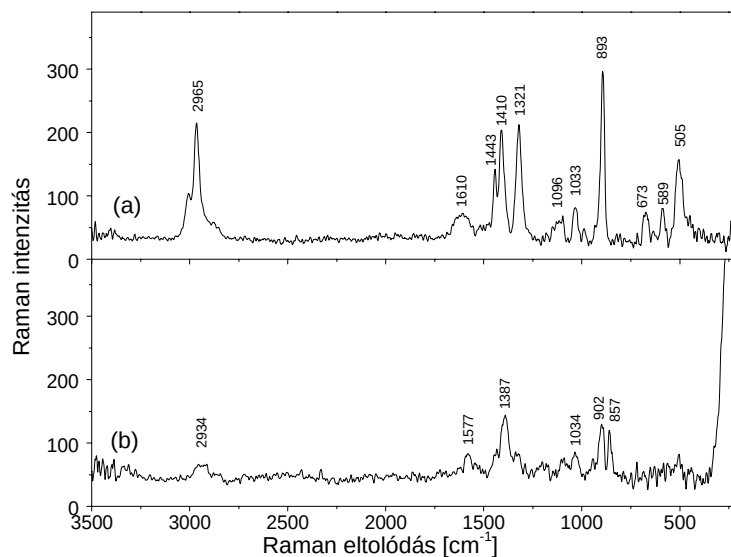
14. ábra. A *Kieselgel 60* –on lévő L-Phe folt alapvonalkorrigált, 532 nm-es gerjesztésű Raman és SERS spektruma 100x mikroszkópobjektív használata mellett: (a) konvencionális Raman spektrum (lézersugár 0.5-szörös gyengítése D0.3 szűrővel, 2×20 s integrálási idő), (b) SERS spektrum (lézersugár 0.01-szeres gyengítése D2 szűrővel, 2×10 s integrálási idő)



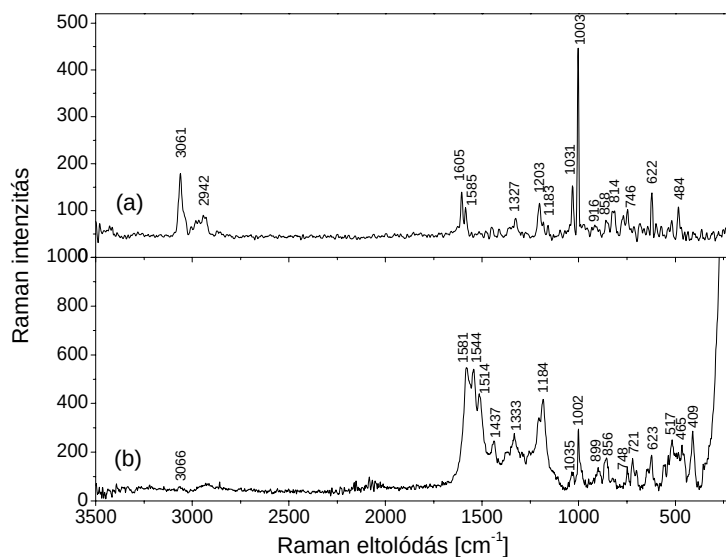
15. ábra. A *Kieselgel 60* –on lévő Gly folt alapvonalkorrigált, 785 nm-es gerjesztésű Raman és SERS spektruma 100x mikroszkópobjektív használata mellett: (a) konvencionális Raman spektrum (6.5 mW, 2 × 300 s integrálási idő), (b) SERS spektrum (6.5 mW, 2 × 20 s integrálási idő)



16. ábra. A *Kieselgel 60* –on lévő L-Phe folt alapvonalkorrigált, 785 nm-es gerjesztésű Raman és SERS spektruma 100x mikroszkópobjektív használata mellett: (a) konvencionális Raman spektrum (6.5 mW, 2 × 300 s integrálási idő), (b) SERS spektrum (6.5 mW, 2 × 18 s integrálási idő)



17. ábra. A *Kieselgel 60* –on lévő Gly folt alapvonalkorrigált, 1064 nm-es gerjesztésű Raman és SERS spektruma FT-Raman készülék használata mellett: (a) konvencionális Raman spektrum (420 mW, 1024 akkumulált scan), (b) SERS spektrum (45 mW, 1024 akkumulált scan)



18. ábra. A *Kieselgel 60* –on lévő L-Phe folt korrigálatlan, 1064 nm-es gerjesztésű Raman és SERS spektruma FT-Raman készülék használata mellett: (a) konvencionális Raman spektrum (420 mW, 1024 akkululált scan), (b) SERS spektrum (45 mW, 1024 akkumulált scan)

A kezeletlen szilika lap esetében korábban kapott háttérszóráshoz viszonyítva (ld. 1.ábrát), az Ag-szol jelenlétében 532 és 785 nm-es gerjesztéssel kapott spektrumok egy mérsékelten magas háttéren összetett spektrális mintázatot mutatnak. Ez lehet, hogy néhány meg nem határozott összetevő (mint pl. a TLC lap kötőanyagai) vagy a felületen jelen lévő esetleges szennyező miatt van. A 785 nm-es gerjesztéssel megismételt mérések azt mutatták, hogy a fókuszpozíció laterális változása befolyásolja a spektrális finomszerkezet megjelenését (összetételét és intenzitását), alátámasztva azt a feltételezést, hogy a 100-szoros nagyítású objektívvel (közel 1 μm -es lézerfoltátmérővel) kapott spektrumok a 10-12 μm -es részecskemérettel bíró szilika réteg mikroszkopikus inhomogenitását tükrözik vissza, nem pedig a réteg *átlagos* szórási tulajdonságát. Hasonló problémákat nem figyeltünk meg az 1064 nm-es lézernél (ahol a lézerfolt két nagyságrenddel nagyobb), habár egy észrevehető fluoreszcencia-szerű háttér kialakult, amikor a lapot Ag-szollal kezeltük.

Ahogy az várható volt, ezek a kedvezőtlen körülmények a szilika lapon elhelyezkedő aminosav foltok SERS spektrumainak tanulmányozását is gátolják. Példaként a háttérszórás kivonása utáni, 532 nm-es gerjesztésű spektrumok a Gly-re a 13., míg az L-fenilalaninra a 14. ábrán láthatók. Az Ag-szol jelenlétében a maximális szórási intenzitás annyira megnövekedett, hogy az integrálási idő 6-szoros csökkentése mellett a lézerteljesítményt 50-ed részére kellett csökkenteni (a D2 neutrális szűrőt használtuk a D0.3 helyett), mely így 300-szoros teljes csökkentést eredményezett a detektálási érzékenységben. Ugyanakkor a Gly esetében a háttér kivonása után kapott spektrum annyira különbözőnek tűnt a Gly folt normál Raman spektrumához viszonyítva, hogy a mintának csak alig néhány Raman sávját lehetett azonosítani. (Emékezzünk arra, hogy az utóbb említett spektrum a nagyon intenzív fluorszcenciaháttér miatt csaknem teljesen eltűnt.) Az sem zárható ki, hogy a 13/b. ábrán látható spektrum sávjai artifaktumok vagy szennyezők felerősített sávjaiból erednek, ami így a spektrumot analitikai célokra alkalmatlanná teszi. Az L-Phe esetében (14. ábra) a folt normál Raman és SERS spektruma között több közös vonás figyelhető meg, vagyis a jellegzetes, 1006 és 1035 cm^{-1} –nél lévő fenil-sávpár könnyen azonosítható mindkét spektrumban. Az is megfigyelhető, hogy az *erősítés szelektív*: néhány sávra vonatkozóan erősebb, másokra gyengébb erősítés adódik a kb. 150-től 1200-ig terjedő erősítési tartományban.

A 785 nm-es gerjesztőlézerrel mind a Gly (15. ábra), mind az L-Phe esetében (16. ábra) jóval informatívabb spektrumokat kaptunk, 1000 illetve 100 feletti erősítési faktorokkal.

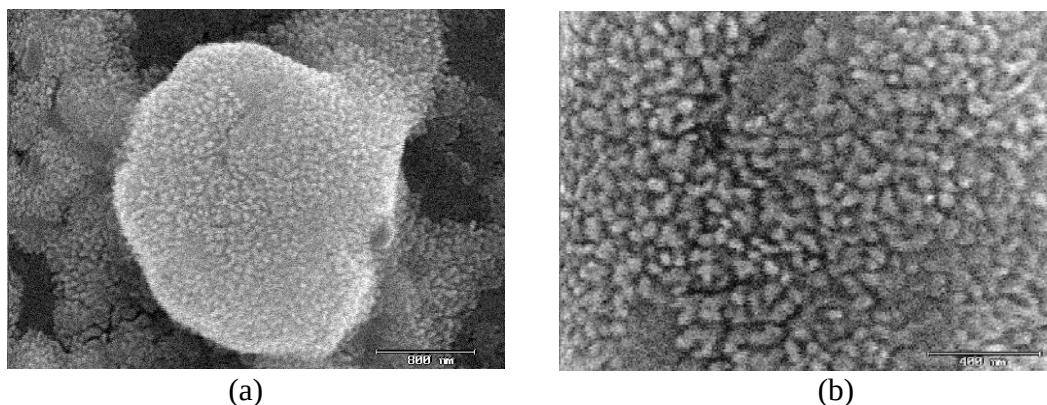
Ugyanakkor, különösen a Gly esetében, a különböző sávok szelektív erősítéséből adódó relatív intenzitásváltozások szintén jelentősek voltak.

A nedves (fedőlapos) módszert használva az 1064 nm-es gerjeszéssel, kisebb felületi erősítést és ezzel egyidejűleg háttérszórásnövekedést tapasztaltunk. A Gly és L-Phe esetében kapott SERS spektrumok 17. és 18. ábrái a különböző sávokra különböző erősítési faktorokat mutatnak, mind tipikusan 10 alatti értéken maradván. Megjegyezzük azonban, hogy míg száraz állapotban Ag-szol nélkül a mintafoltok egészen magas lézerteljesítmény értékig, 420 mW-ig is ellenálltak, addig Ag-szol jelenlétében nedves állapotban, a legmagasabb lézerteljesítmény melyet még biztonsággal lehetett alkalmazni, csak 45 mW volt. S bár a háttérszórás (vagy emisszió) növekedése megfigyelhető volt akkor is, amikor csak Ag-szol volt a TLC lapon (ld. 12/c. ábrát), e háttér eliminálása interaktív kivonással nem sikerült megfelelően, a különböző minták aktuális hátterének változatossága miatt.

A fenti megfigyelésekből következik, hogy a TLC foltokra történő Ag-szol adagolással és nedvesen tartással a Raman szórás felületi erősítése megvalósítható. A rendszer nedvessége - úgy tűnik - döntő szerepet játszik az erősítésben, bár a SERS-aktivitás említett időfüggő megjelenése miatt azt gyanítjuk, hogy a víz nem csupán hűtő közegként szolgál, hanem az Ag-részecskék számára nagyobb mobilitást is kölcsönöz, elősegítve ezáltal azok aggregálódását. Korábban már megfigyelték, hogy az ezüstrészecskék aggregációja néhány aminosav Ag-szolban való SERS aktiválódásához előfeltétel [129].

Mint már Nie és munkatársai meglehetősen meggyőzően demonstrálták: az erősítési faktor függ a gerjesztő sugárzás hullámhosszától, vagy még pontosabban az Ag-részecskék mérete és a hullámhossz közötti viszonytól [72, 130]. Ezt tekintetbe véve valószínűnek tűnik, hogy az 1064 nm-es gerjesztéssel is nagyobb SERS-aktivitást lehetne elérni, ha az Ag-szolban lévő részecskék ennek megfelelően lennének kialakítva.

Azért, hogy a SERS kísérleteink során használt Ag-szol részecskeméretéről és aggregációjának állapotáról információt nyerjünk, a szolt pásztázó elektronmikroszkópiai (SEM) vizsgálatnak vetettük alá. A 19. ábrán reprodukáltakhoz hasonló képekre alapozva megállapítottuk, hogy az 1-2 μm átmérőjű, másodlagos szerkezetet formáló aggregátumok 50-100 nm-es Ag-részecskékből épülnek fel. A kis gömbszerű formák további, láncszerű formákká történő aggregációját lehetett megfigyelni 5000-szeres nagyításnál.



19. ábra. Az Ag-szol SEM képei: (a) 1-2 μm -es gömbszerű képződmény és (b) annak finomszerkezete 50-100 nm-es elsődleges részecskékkel.

4.2.5. A detektálási hatékonyság összehasonlítása

Az összes fenti TLC-Raman mérés során 4 mm átmérőjű kör alakú foltban, vagyis 12.6 mm^2 területen terültek szét a $150 \mu\text{g}$ -os minták. Homogén eloszlást feltételezve ez $12 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ -es koncentrációnak felel meg. Besugárzott felületként (mely megegyezik a szórási területtel) a lézersugár mintafelületi (fókuszponti) területét véve, különböző besugárzási jellemzőket számíthatunk ki: a lézer fluxust, a besugárzott/szóró mintamennyiséget, és az egységnyi mintamennyiségre jutó lézerteljesítményt. A munkánk során használt négy különböző lézergyűjtésre ezek az adatok a 2. táblázatban találhatóak. Az adatok első három sora a 100-szoros nagyítású objektív használata mellett Raman mikroszkóppal végzett mérésekre, míg az utolsó sor az FT-Raman spektrométerrel végzett mérési körülményekre vonatkozik.

2. táblázat. A TLC foltok Raman mikroszkóppal és FT-Raman készülékkel történő mérései során használt különböző lézerek besugárzási jellemzői

Lézer hullámhossz λ_0 (nm)	Lézer teljesítmény ^a (mW)	Lézer folt felülete (μm^2)	Lézer fluxus (mW/ mm^2)	Besugárzott tömeg (pg)	Teljesítmény/ Tömeg (mW/pg)
532	10.0	0.40 ^b	25×10^6	4.8	2.0
633	8.0	0.55 ^b	14.5×10^6	6.5	1.2
785	6.5	0.86 ^b	7.6×10^6	10.2	0.6
1064	420	0.79×10^6	535	9.4×10^6	4.5×10^{-7}

^a A mintatérben, gyengítés nélkül;

^b A Raman mikroszkóp 100× objektívjének fókuszánál.

Mint ahogyan az adatok jelzik, a Raman mikroszkópban az erősen lecsökkentett lézerfókusz-átmérő miatt a mintafolt besugárzott részén a lézerfluxus legalább négy nagyságrenddel nagyobb, mint a nagyobb lézerteljesítményű, de sokkal szélesebb lézersugarú FT-Raman készülék esetén. Ennek megfelelően a Raman mikroszkóp esetében a szóró mintamennyiség a pikogramm tartományba, míg a NIR gerjesztéssel működő FT-Raman készüléknél a 6 nagyságrenddel nagyobb mikrogramm tartományba esik. Mindez lényegében annyit jelent, hogy Raman mikroszkóppal mérve a detektált anyagmennyiség-hányad a TLC foltban a redkívül kicsiny 10^{-8} tartományba esik, míg ez 6 % az FT-Raman készülékkel. A detektálási hatékonyságot tekintve, a TLC-Raman mérések során így nem előnyös Raman mikroszkópot használni, különösen olyan kicsi mintamennyiségek esetén, mint amit e munka során használtunk.

4.3. A TLC-Raman és TLC-SERS vizsgálatok eredményeinek összegzése

A TLC foltokbeli minták számos tesztmérése alapján megállapítottuk, hogy a Raman szórás gerjesztésének a Nd:YAG lézer 1064 nm-es sugárzásával hározott jel/zaj aránybeli és háttérszórásbeli előnye van a Raman mikroszkóp látható gerjesztésével szemben. Mindazonáltal a gyenge Raman szórási tulajdonsággal bíró anyagok (mint az alifás α -aminosavak) detektálása és biztonságos azonosítása NIR FT-Raman spektroszkópia és számítógéppel végzett spektrumadatbank-beli kereséssel 100 μ g nagyságrendű mintamennyiséget igényel. Az adszorbeálódott aminosavak Raman spektrumai a tiszta aminosav vegyületek Raman spektrumaitól különböznek, és meglehetősen nagy hasonlóságot mutatnak vizes oldataik Raman spektrumaihoz.

Az aminosavak TLC foltjainak felületerősített Raman spektrumai a mintafolt tetejére cseppentett Ag-szol hozzáadásával és a mérés ideje alatti nedvesen tartással előidézhetőek, az elérhető erősítés ugyanakkor mérsékelt (10-1000-szeres): legnagyobb az 532 nm-es lézerrel, legkisebb pedig az 1064 nm-es lézerrel. Az Ag-részecskékkel való kölcsönhatás hullámszámeltolódásokat és különböző sávok szelektív erősítését okozza, ami tovább nehezíti a minták azonosítását.

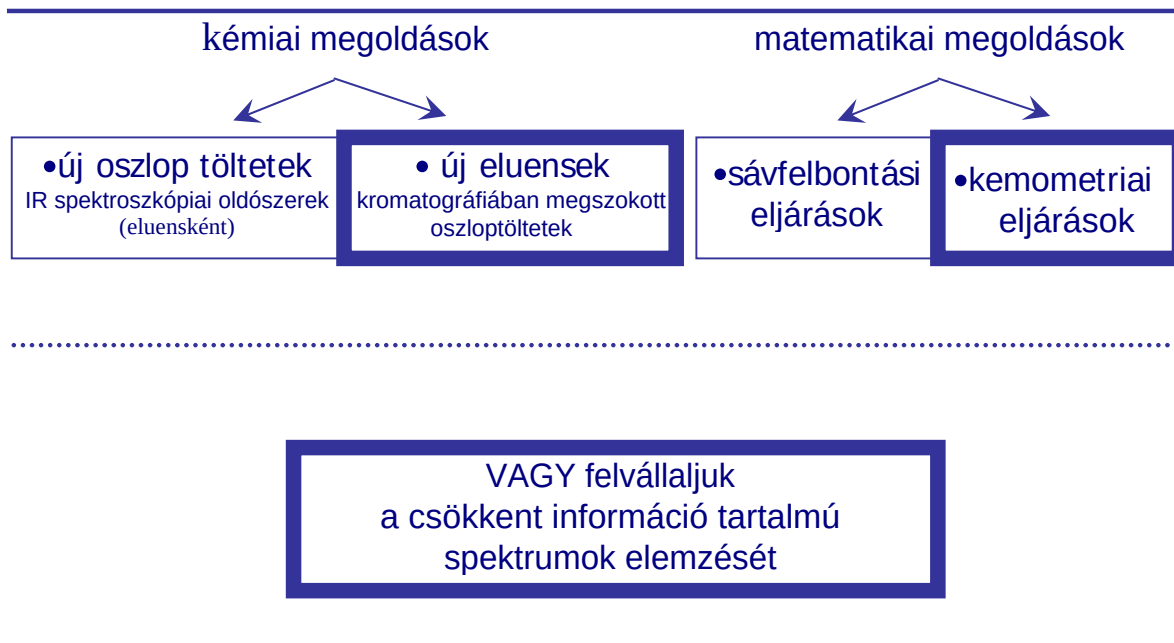
Összefoglalva elmondható, hogy bár bizonyos körülmények között az olyan gyenge Raman szóró anyagok TLC foltjainak SERS spektrumai is előidézhetőek, mint amilyenek az aminosavak, az így kapott spektrumok azonban kevésbé tűnnek megfelelőnek a minta azonosítása szempontjából (különösen a Raman mikroszkóp nagy laterális felbontása mellett), mint azok a konvencionális Raman spektrumok, melyeket NIR FT-Raman műszerrel kaptunk.

5. HPLC-IR mérésekkel kapcsolatos elméleti megfontolások, HPLC-IR adatok kemometriai kiértékelése

5.1. Elméleti megfontolások

Ahogy már a 2.3. fejezetben is utaltunk rá, az átfolyós folyadékcélás mérési mód hátrányai az eluens detektáláskori jelenlétéhez köthetőek (a mozgó fázis intenzív sávjainak helyén teljes spektrális információvesztés léphet fel, a mozgó fázis és az elválasztott komponens között fellépő kölcsönhatások sávtorzulásokat okozhatnak), ami azt eredményezte, hogy napjainkig az eluenseliminációs módszer fejlődött erőteljesen. Általánosan igaz azonban mindenféle eluenseliminálási technikára, hogy alapvetően egy technikailag bonyolultabb rendszer kiépítését követeli meg, miközben az átlános használhatóság vonatkozásában szintén korlátozó tényezők lépnek fel (ld. 2.3. fejezetet). Ezért célszerűnek láttuk, hogy az egyszerűbb kivitelezhetőségű átfolyós folyadékcélás módszer problémáira megoldás(oka)t keressünk. Az általunk végiggondolt potenciális lehetőségek körét a 3. táblázat mutatja be.

3. táblázat. Potenciális megoldások az átfolyós folyadékcélával kivitelezett HPLC-IR mérésekhez.



Amennyiben olyan oldószereket kívánunk használni HPLC-IR mérések során, melyek mind az IR spektroszkópiai, mind a kromatografálási (HPLC) feladatok megoldása során is szóba jöhetnek (pl. tetrahidrofurán, dimetilszulfoxid, MeCl_x , EtCl_x), akkor nemcsak a mozgó fázisok köre, hanem ezáltal a kromatográfiában megvalósítható feladatok köre is leszűkül, hiszen ebben az esetben az alkalmazható mozgófázisok polaritása (vagyis az eluenserősség) egy szűkebb skálán határolható be. Tehát valamilyen módon a kromatográfiában tipikusan használt állófázisok és tipikusan használt mozgó fázisok között fennálló lehetséges polaritáskülönbségek “elvesztését” kell pótolni. Ennek egyik módja lehet, ha a közös (de tipikusan inkább IR spektroszkópiai) oldószerek eluensként való használata mellett új oszloptöltetek kifejlesztését hajtjuk végre. Az új oszloptölteteknek a megfelelő skálájú állófázis-mozgófázis polaritáskülönbségek pótlásán túl, természetesen eleget kell tennie az alapkövetelményeknek: nyomástűrőnek (300-400 Bar) kell lennie; az oszloptöltetet alkotó részecskének pedig jól behatárolható pórusátmérővel, lehetőleg monodiszperz fajlagos felülettel (szabályos alakkal) és kis fémionttartalommal kell bírnia. Az ilyen oszloptöltetek szabályos alakú részecskéinek létrehozásához egyrészt igen komoly szintetikus-eljárási ismeretekre, a szóba jöhető (feltételezéseink szerint többnyire fémoxid alapú) anyagok

tulajdonságainak ismeretére, a kísérleti munkákhoz az oszlopok töltésére szolgáló töltő berendezésre, a kromatográfiás tesztmérések megtervezéséhez pedig kromatográfiai szakismeretekre (főleg tapasztaltokra) van szükség. Az utóbbi két feltétel megléte külső támogatás híján esetünkben nem teljesült, s így ennek a lehetőségnek a mélyebb körüljárása és kidolgozása elmaradt. (A kísérletek és tesztek híján alaposabban körül nem járt potenciális lehetőségeket a 3. táblázat vékony keretes részei tartalmazzák.)

Egy másik lehetőségnek tűnik a szerves vegyületek HPLC-IR-es elválasztási és IR folyadékcéllás detektálási problémájának megoldásában az, ha olyan új - eddig sem az IR spektroszkópiában, sem a kromatográfiában nem használt – (lehetőleg szervesetlen) eluenseket keresünk a szokásosan használt oszloptöltetek melletti használat céljára, melyek kiválogatásában elsődlegesen IR spektroszkópiai kritériumokat veszünk figyelembe (majd kromatográfiás tesztmérésekkel ellenőrizzük bizonyos kromatográfiai területeken való alkalmazhatóságukat). Az ilyen vegyületek kiválogatásához IR spektroszkópiai szempontból két 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 jelentkezzen a $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ tartományban, ill. a megjelenőek a kevés információt hordozó részekre essenek /pl. $2000\text{-}1850\text{ cm}^{-1}$, $650\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ /.

Az így kiválogatott vegyületeknek továbbá normál körülmények között stabilnak és folyadékhalmazállapotúnak kell lenniük, valamint az elválasztandó vegyületekkel szemben (az elválasztási körülmények között) nem mutathatnak reaktivitást.

A 2. pontnak való megfelelést vagy az irodalomban található spektrum alapján, vagy pedig a spektrum elméleti szimulálásával (Hyperchem program, szemiempirikus PM3 módszer) dönthettük el, de gyakran, ha egy vegyület az 1. kritériumnak megfelelt, akkor előbb a halmazállapotára majd a stabilitására vonatkozó információkat gyűjtöttük be. Többféle „adatbázis” [131-134] molekuláiból válogatva kereséseink azt eredményezték, hogy 64 db molekula felelt meg az 1. IR kritériumnak, majd ebből 29 db bizonyult folyadéknak. Sajnos ezek közül - a megfelelő irodalmi adatok alapján - egyik sem stabil normál körülmények között; legtöbbjük a levegő nedvesség vagy oxigéntartalmával való reakció következtében legfeljebb órákig létező vegyület.

Új eluensek (és oszloptöltetek) híján a lehetséges matematikai megoldások közül a kemometriai módszerekhez fordultunk segítségül (ld. 5.2.-5.6. fejezeteket), valamint egy konkrét alkalmazási feladaton keresztül (ld. 6. fejezetet) megvizsgáltuk a klasszikus kromatográfiás eluensek használata mellett nyerhető spektrális információk használhatóságát.

5.2. A felhasznált kemometriai módszerek, programok

A kemometria a kémiai információk mérési adatokból történő optimális kinyeréséhez szükséges matematikai statisztikai, lineáris algebrai, számítástechnikai és formál logikai módszerek együttesét jelenti. A sokféle lineáris algebrai kemometriai módszer közül a PARAFAC (PARalell FACtor analysis) és PARAFAC2 módszereket teszteltük, illetve ezen eljárásokra alapozva fejlesztettük és alakítottuk ki az OSSS-IU-PARAFAC2 (Objective Subtraction of Solvent Spectrum with Iterativ Use of PARAFAC2) iterációs eljárást. A PARAFAC alapú módszerek használatát más faktor analízisen alapuló módszerekkel szemben az indokolta, hogy a PARAFAC módszerek biztosítani tudják, hogy csakis egy, azaz 1 darab fizikailag-kémiaiilag értelmezhető megoldást szolgáltatassanak, vagyis más görbeillesztés nélküli profilkereső eljárások közül a PARAFAC módszerek *nem megoldástartományt*, hanem egyértelmű megoldást szolgáltatnak. S bár más görbeillesztés nélküli profilkereső eljárások is léteznek, további előnye a PARAFAC módszereknek, hogy az analizálandó adathalmaznak nem kell túl sok vagy szigorú feltételeknek megfelelnie.

A PARAFAC és PARAFAC2 felhasználásának egyik kritériuma, hogy a kiindulási adathalmaz 3-utas (vagy többutas) legyen, a másik, hogy a paralell/azonos adatstruktúrájú mátrixokban a kémiai komponensekre vonatkozóan a reprezentált/mért koncentrációk egymástól lineárisan függetlenek legyenek. Minthogy egyetlen HPLC-IR mérésből származó spektrumsorozat csak kétutas adathalmazt szolgáltat (vagyis a mért abszorbancia adatokat csak 2 paraméter, a hullámszám és az idő határozza meg), a harmadik utat esetünkben az ugyanazon mintakomponenseket, de azokat eltérő koncentrációban tartalmazó minták HPLC-IR mérésével lehet biztosítani.

Az említett módszerekkel történt számításokat a MATLABTM 6.1 verziójával [135] együtt használható PLS_Toolbox 3.0 -val végeztük [136], az OSSS-IU-PARAFAC2 iterációs eljárás programfejlesztésére pedig a MATLABTM 6.1 fejlesztői környezetében került sor.

A módszereket kezdetben szimulált HPLC-IR adatokon teszteltük, majd valós mérési adathalmalmazra is alkalmaztuk; a számítások pedig végeredményül a komponensek spektrumait, a komponensek normált (és 1 komponensre vonatkozó!) “kromatogramjait”, valamint a (szimulált vagy ijektált) minta sorszámának függvényében a komponensek relatív mennyiségeit/koncentrációit adták meg.

(A dolgozat további részeiben a *hullámszámprofil* vagy *spektrumprofil* elnevezést a komponensek számított spektrumainak együttesére, az *elúciósprofil* vagy *időprofil* elnevezést a komponensek normált és 1 komponensre(!) vonatkozó “kromatogramjainak” együttesére, míg a *koncentrációprofil* elnevezést az egyes komponensek mintánkénti mennyiségeit/koncentrációit megadó (nem folytonos és pontokkal ábrázolható) függvényeinek együttesére használjuk. Az elúciógörbe vagy időgörbe kifejezés általában az elúciósprofil vagy időprofil *egyetlen* komponensére vonatkozik. Fontos hangsúlyozni, hogy bár az elúciósprofil is kifejezi az egyes komponensek koncentrációinak/mennyiségeinek a változását, ez nem keverendő össze az itt használt koncentrációprofil fogalmával. Míg az elúciósprofil a kromatografálás karakterisztikájából adódóan az idő függvényében jellemzi az egyes komponensek (folyadékcella-beli) koncentrációit, addig a koncentrációprofil a minták függvényében adja meg a komponensek koncentrációit. Ez utóbbi koncentráció pedig — az elválasztott komponensek tekintében — a mintakomponensek ijektált koncentrációjával/mennyiségével kapcsolatos fogalom.)

5.3. A kemometriai kiértékeléshez felhasznált *szimulált* HPLC-IR adatok jellemzői

A folyadékcellával megvalósított HPLC-IR mérés szimulálásakor, az időben egymás után következő spektrumok sorozatait úgy készítettük el, hogy mindegyik “kromatográfiás” csúcscszakaszhoz az eluens és az adott elválasztott komponens keverékspektrumainak sorozatát rendeltük, míg a “kromatográfiás” alapvonalszakaszokhoz csak a tiszta eluens spektrumának sorozatait. Az elkülönülő kromatográfiás csúcsok a legegyszerűbb formájúak, vagyis háromszög-alakúak voltak, s a spektrumokat az időtengely mentén nem terhelte zajkomponens. A felhasznált spektrumok (n-hexán, 1-klórhexán, 1,3-dioxolán és 2-metoxi-1,3-dioxolán) az Aldrich elektronikus adatbázisából származtak; az n-hexán eluensként, míg a többi vegyület az elválasztott komponensként szerepelt. A 3-utasságot jelen

esetben 5 darab minta HPLC-IR méréséhez tartozó spektrumsorozatának (és a megfelelő „kromatogram” adatok) szimulálásával biztosítottuk. Minden egyes szimulált „kromatogram” 1.020 perctől 9.045 percig tartó és 108 adatpontból felépülő szakasza 4.46 másodperces időfelbontást eredményezett.

A felhasználandó spektrumok kiválogatásakor szempont volt a kémiai/spektrális hasonlóság (a n-hexán eluens és az 1-kórhexán elválasztott komponens, valamint a két másik elválasztott komponens közötti hasonlóság), a komponensek koncentrációjának kialakításakor pedig igyekeztünk kis koncentrációkat is reprezentálni. Az elválasztott komponensek relatív koncentrációját bemutató 4. táblázatból kitűnik, hogy az 1. komponens (1-klórhexán) és a 3. komponens (2-metoxi-1,3-dioxolán) koncentrációi ugyanabban a nagyságrendben vannak, míg a 2. komponens (1,3-dioxolán) koncentrációja az előzőeknél egy nagyságrenddel kisebb.

4. táblázat. A szimulált HPLC-IR adatokban az elválasztott komponensekhez tartozó relatív koncentrációk.

Minták sorszáma	Komponensek relatív koncentrációja		
	1. komp.	2. komp.	3. komp.
I.	0.25410	0.00588	0.30375
II.	0.21780	0.00735	0.24300
III.	0.18150	0.00882	0.18225
IV.	0.14525	0.01029	0.12150
V.	0.10890	0.01176	0.06075

1. komp.: 1-klórhexán

2. komp.: 1,3-dioxolán

3. komp.: 2-metoxi-1,3-dioxolán

Ezek a koncentrációviszonyok a spektrumok szempontjából annyit jelentettek, hogy az 1. és a 3. komponenseknek a kromatográfiás csúcshoz tartozó és n-hexánnal alkotott keverékspektrumai a különböző mintákban vizuálisan is megkülönböztethetőek voltak a n-hexán spektrumától, a 2. komponens esetében pedig már a maximális relatív koncentrációhoz tartozó spektrumot sem lehetett ilyen módon megkülönböztetni a n-hexán spektrumától.

5.4. A kemometriai kiértékeléshez felhasznált *mért* HPLC-IR adatok mérési paramétereit; felhasznált anyagok és műszerek

Minden felhasznált anyag a Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., USA) terméke volt. A HPLC-IR mérésekkor 3 minta elválasztását és folyamatos IR detektálását végeztük el, mely mintákban (X1, X2, X3) az egymástól elválasztott 1-klórhexán és toluol komponensek *injektált* koncentrációi az alábbiak voltak:

X1: $c(1\text{-klórhexán}) = 17,54 \text{ mg/ml}$, $c(\text{toluol}) = 8,65 \text{ mg/ml}$;

X2: $c(1\text{-klórhexán}) = 35,16 \text{ mg/ml}$, $c(\text{toluol}) = 8,65 \text{ mg/ml}$;

X3: $c(1\text{-klórhexán}) = 43,85 \text{ mg/ml}$, $c(\text{toluol}) = 8,65 \text{ mg/ml}$.

A méréskor a 6.1.2. fejezetben leírt HPLC berendezést (pumpa, injektor) és IR készüléket használtuk. A kromatográfiás körülmények egy része (oszlop, injektált térfogat) szintén az ott leírtakkal egyezett, viszont itt, a kemometriai értékelésre szánt HPLC-IR adatok mérésekor 1 ml/perc-es áramlási sebességet és egykomponensű mobilfázist (n-hexánt) használtunk.

A spektrumokat 4 cm^{-1} spektrális felbontás mellett, spektrumonként 8 interferogram scan akkumulálásával vettük fel (standard apertura méretet használva). Az ún. “valós idejű” (real-time) adatgyűjtési rendszer használata mellett (5.0632 cm/s tükrömozgatási sebességnél, a mozgó tükör 2.5 mm-es maximum elmozdulásánál), ez 1.86 másodperces időfelbontást eredményezett az “IR kromatogram” funkciót betöltő Gram-Schmidt rekonstrukciókban [140], melynek a 0.031 perctől 8.013 percig tartó szakaszai így 260 darab adatpontot tartalmaztak. Mivel háttér-spektrumnak a teljesen üres mintaterről 64 scan akkumulálásával nyert spektrumot használtuk, a Gram-Schmidt rekonstrukció (GSR)-beli “kromatográfiás” csúcs minden egyes pontjában az elválasztott komponens és az eluens krverékspektrumát, míg a GSR alapvonalához tartozó pontokban az eluens tiszta spektrumait kaptuk.

A használt átfolyós folyadékcellára és szoftverre vonatkozó információk a 6.1.2. fejezetben szintén megtalálhatók.

A kemometriai kiértékeléssel kapott spektrumok ellenőrzéséhez a 4 cm^{-1} felbontású 128 scan akkumulálása (és 5.0632 cm/s tükrömozgatási sebesség, valamint standard apertura érték) mellett nyert referenciaspektrumokat NaCl lapok közötti folyadékfilmekről nyertük, mind a toluol, mind az 1-klórhexán esetében. A detektor a Nicolet Magna 750-es FTIR

spektrométer HPLC-IR mérések során is használt cseppfolyós N₂-vel hűtött MCT-A detektora volt, melynek mérési tartománya: 4000- 650 cm⁻¹.

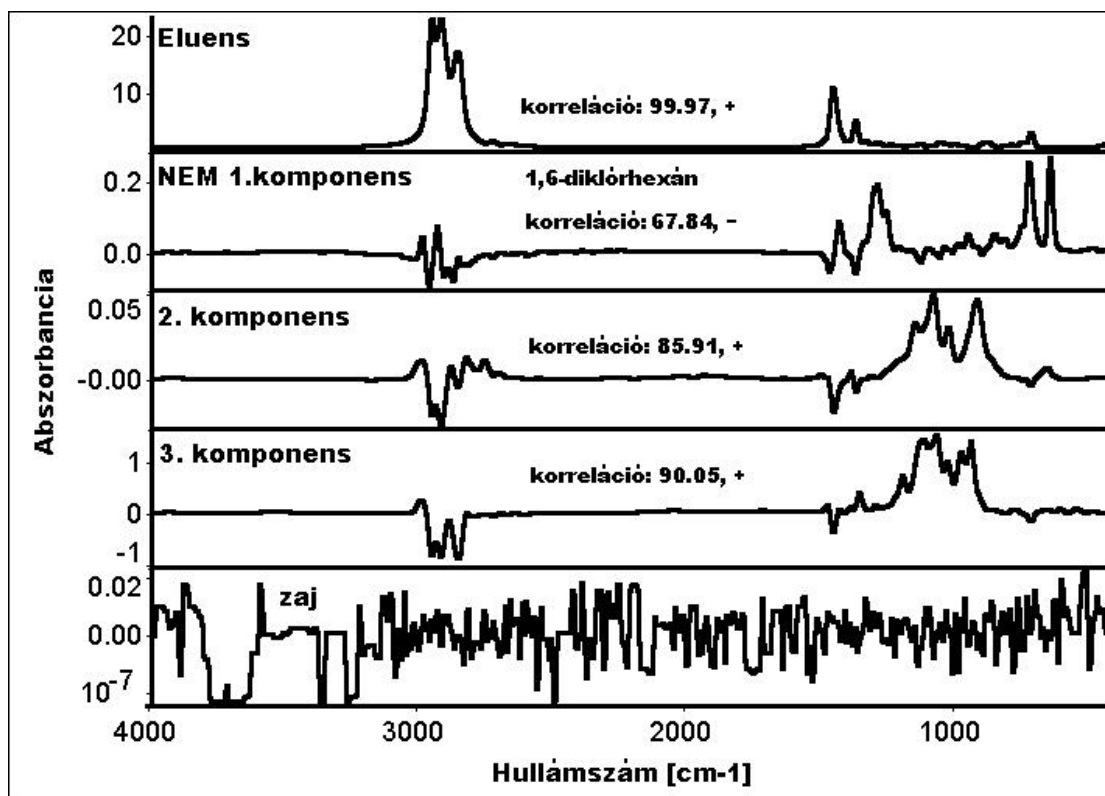
5.5. A szimulált és mért HPLC-IR adatok kemometriai kiértékelése

5.5.1. A szimulált HPLC-IR adatok kiértékelése: PARAFAC és PARAFAC2 módszerek tesztelése

A HPLC-IR adatok kemometriai kiértékelési módszereit először az 5.3. fejezetben részletezett jellemzőkkel bíró szimulált adathalmazon teszteltük.

A kemometriai kiértékelések indokolt esetben a nyers kiindulási adathalmazon végzett skálázással kezdődnek. A skálázásoknak több válfaja létezik [137]; mi a PLS_Toolbox programba beépített és a kemometriában legáltalánosabban elterjedt, illetve rutinszerűen használt adatelőkezelési eljárást, a 0 várható értékre és 1 szórásra skálázás hatását vizsgáltuk meg. A PARAFAC módszer tesztelésekor a skálázatlan, vagyis eredeti adathalmazon elvégzett PARAFAC analízis eredményeit összevetve a skálázott adathalmazon végzett PARAFAC analízis eredményeivel kiderült, hogy a skálázást célszerűbb nem alkalmazni, ugyanis skálázás esetén a kapott eredményben egyrészt több számított spektrumhoz is ugyanaz a komponens/vegyület tartozott, másrészt némely “elválasztott” komponensre vonatkozóan negatív irányba mutató (és minimummal bíró) kromatográfiás csúcsot adó időgörbét kaptunk, ami nem fedi a realitást.

Azt is megállapíthattuk, hogy skálázatlan adathalmazon elvégzett ALS (Alternating Least Squares) mátrixinicializálási algoritmussal futtatott PARAFAC analízis alkalmas arra, hogy ismeretlen komponensszám esetén meghatározzuk a komponensek számát. Mivel a PARAFAC módszer megköveteli a futtatás előtt annak megadását, hogy hány komponensre vonatkozóan végezze el a számítást, ez akkor válhat fontossá, ha nincs mód Gram-Schmidt rekonstrukciót vagy más kromatogramot helyettesítő görbét előállítani a mért spektrumsorozatok alapján (vagyis nincs mód a tökéletesen elválasztott kromatográfiás csúcsok száma alapján megadni a komponensek számát). Lényegében, ha a számítás elején több komponensre adunk meg, mint amennyit az adatok ténylegesen reprezentálnak, akkor a többletkomponensekhez tartozó spektrumok spektrálisan értelmezhetetlenné, zajszerűvé válnak.



20. ábra. A skálázatlan (eredeti) adathalmazon ALS mátrixinicializációval futtatott PARAFAC analízis eredménye. A feltüntetett korrelációs értékek a referenciaspektrumokkal való egyezés mértékét mutatják; a + jel a referenciaspektrumhoz tartozó anyaggal való “egyezést”, míg a – jel az attól való eltérést jelzi.

A 20. ábra erre az esetre mutat egy példát. Ez az ábra ugyanakkor egy olyan számítási végeredményt mutat be, ahol a várt n-hexán eluens, valamint az „elválasztott” komponensek, vagyis az 1-klórhexán, 1,3-dioxolán, és 2-metoxi-1,3-dioxolán spektrumai közül egyedül az 1-klórhexán spektruma nem reprodukálódik úgy, hogy a megfelelő referenciaspektrummal való korreláció alapján, az Aldrich adatbázisban való elektronikus keresés eredményeként ezt a spektrumot valóban 1-klórhexánként azonosíthassuk. Ez a jelenség, vagyis az 1-klórhexánra vonatkozó spektrum kinyerésének nehézsége nemcsak ekkor, hanem a megfelelő komponensszám megadásával (és más paraméterezéssel) végzett PARAFAC számítások során is fellépett. Ennek okán, figyelembe véve, hogy a legkisebb koncentrációjú 1,3-dioxolán spektruma minden esetben kinyerhető volt, úgy gondoltuk (a PARAFAC számítások összes paraméterezési lehetőségének kipróbálása után), hogy a PARAFAC módszer számára nem a legkisebb (vagy bizonyos határ alatti) koncentrációban jelelő komponens spektrumának

kiszámítása okoz gondot, hanem az eluens spektrumához legjobban hasonlítóé. Vagy másképp fogalmazva: az olyan komponens spektrumának kiszámításáé, melyben igen kicsi azon hullámszámtartományok aránya, mely az eluensspektrumtól való eltérésért felelős.

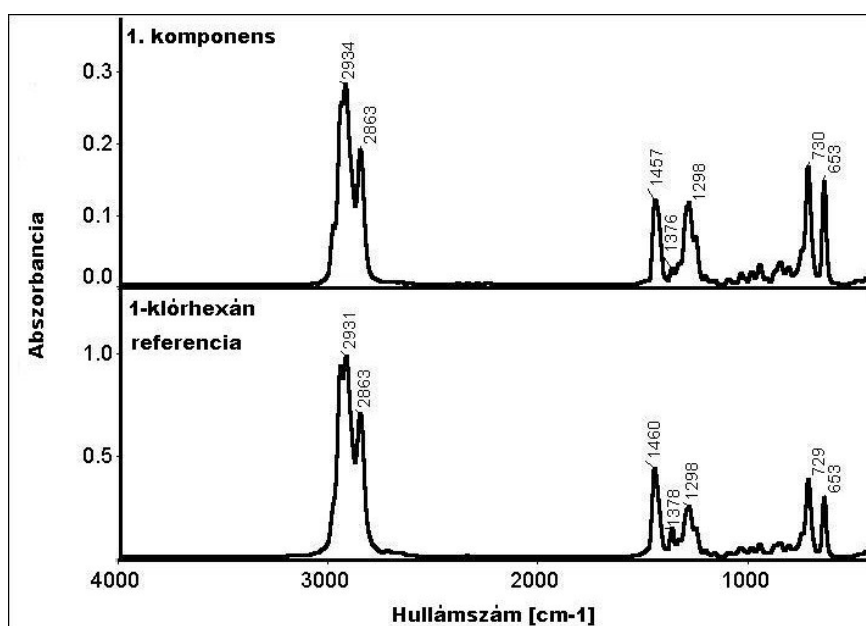
S bár a többi komponens esetén az egyezés mértéke a referenciával az azonosítási céloknak megfelelő volt (ld. ismét a 20. ábrát), az is megfigyelhető, hogy az eluens karakterisztikus sávjait tartalmazó hullámszámtartományokban ($3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, $1500\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$) az „elválasztott” komponensekhez tartozó spektrumok túlnyomóan negatív abszorbancia értékekkel szerepelnek. Mivel a PARAFAC mátrixinicializálási, vagyis kezdőértékadó, és a számítás menetét meghatározó eljárásai közül [ALS, TLD (TriLinear Decomposition), ATLD (Alternating TLD), SWATLD (Self Weighted ATLD), ASD (Alternating Slicewise Decomposition)] egy eljárás sem tudta biztosítani, hogy az eredményspektrumokban csakis pozitív abszorbancia adatok szerepeljenek, illetve az elúciós görbék (az „elválasztott” komponensekre vonatkozóan) csak pozitív irányultságú (és maximummal bíró) csúcsokat tartalmazzanak, a számítások paraméterezésénél a későbbiekben ezen profilokra vonatkozóan a nem-negativitás kritériumát alkalmaztuk. Így a számítások már valóban pozitív abszorbanciájú spektrumokat és maximumokat mutató elúciós görbéket adtak, de problémaként egyrészt megmaradt a koncentrációprofil reprodukálatlansága, másrészt az 1-klórhexán spektrumában a sávok intenzitásarányai továbbra sem feleltek meg olyan mértékben a referenciaspektrum-belinek, hogy az objektív (OMNICTM szoftverbe beépített) elektronikus spektrumkeresési eljárással ezt a komponenst azonosítani lehessen.

A PARAFAC és PARAFAC2 tesztelése során e módszerek paraméterezési lehetőségeinek megismerésén túl a PARAFAC analízis egy igen fontos tulajdonságára is fény derült. A PARAFAC számítás nem képes kezelni egy adott profil változását (szemben a PARAFAC2-vel). A profilváltozás pedig esetünkben (az eluens koncentrációjára vonatkozóan) fennáll, és a következőket jelenti:

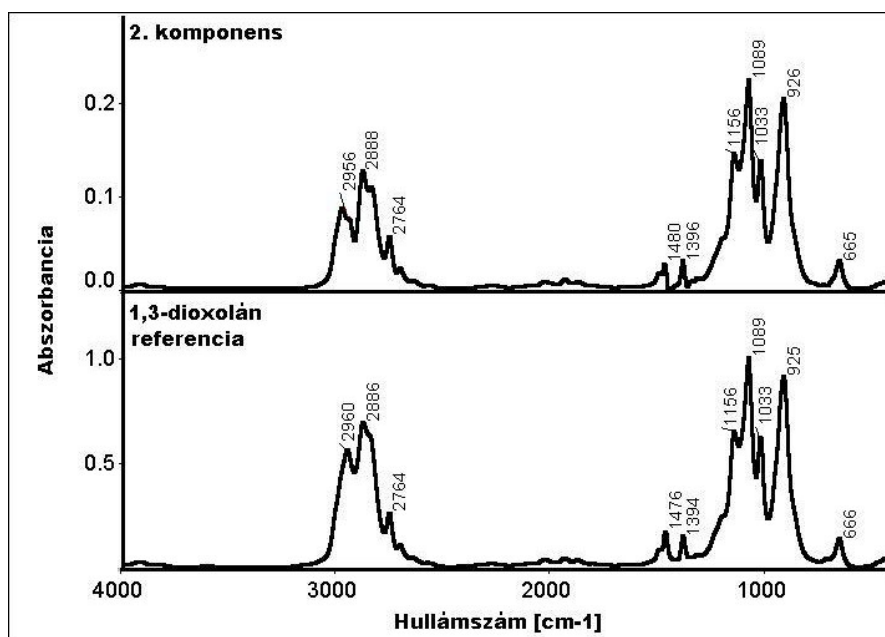
Míg az időprofilban a kromatográfiás csúcsterület alapján minden egyes elválasztott komponenshez 1 adott mennyiség (koncentráció) tartozik, addig az eluenshez annyi, amennyi elválasztott komponensünk van. Így az eluens (minden egyes mintára vonatkozó, mért vagy szimulált adatsorban) az időtengely mentén több mennyiséggel, azaz több koncentrációval jellemezhető, vagyis az eluens koncentrációprofilja minden egyes teljes „kromatográfiás futást” alapul véve változik. A PARAFAC2, mely egyetlen egy profil változását „megengedi”,

kitűnő eredményt szolgáltatott (szintén skálázatlan adathalmazon, és nem-negatív kritériumot alkalmazva a TLD algoritmus felhasználása mellett). A 21/a.-21/c. ábrák az így nyert spektrumok referenciaspektrumokkal való összehasonlítását, a 22. ábra pedig a számított (normált) elúciós görbék és a számított koncentrációértékek lineáris kombinációinak (számított kromatogramjainak) a szimulált kromatogramokkal való összehasonlítását mutatja be mintánként.

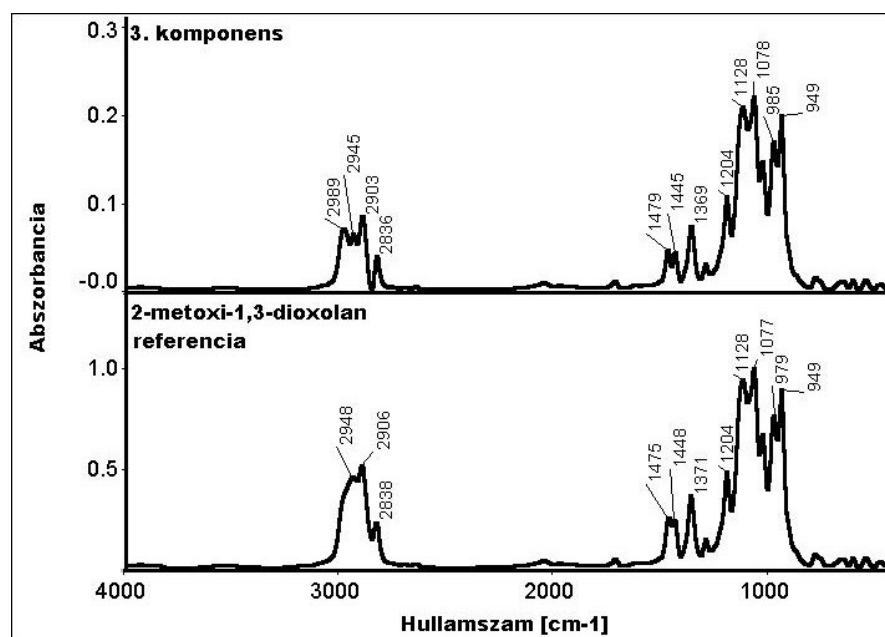
A 21/a.-21/c. ábrákon jól látszik, hogy a számított spektrumok hullámszámértékei mindegyik esetben jó egyezést mutatnak a referenciaspektrum-beliéekkel; a referenciától való kismértékű eltérést az (a) esetben az 1298, 730 és 653 cm^{-1} –nél lévő sávok 1457 cm^{-1} -es sávhoz viszonyított intenzitásainak nagyobb volta, míg a (b) és (c) esetekben a 3000-2800 cm^{-1} tartományban lévő sávoknak az elvárthoz képest kissé kisebb intenzitásai és felhasadásai okozzák. A korreláció mértéke azonban mindegyik esetben elegendően nagy ahhoz, hogy az Aldrich 10600 darab spektrumot tartalmazó adatbázisában történő elektronikus keresés eredményeként a komponensek helyes azonosítása megtörténjen.



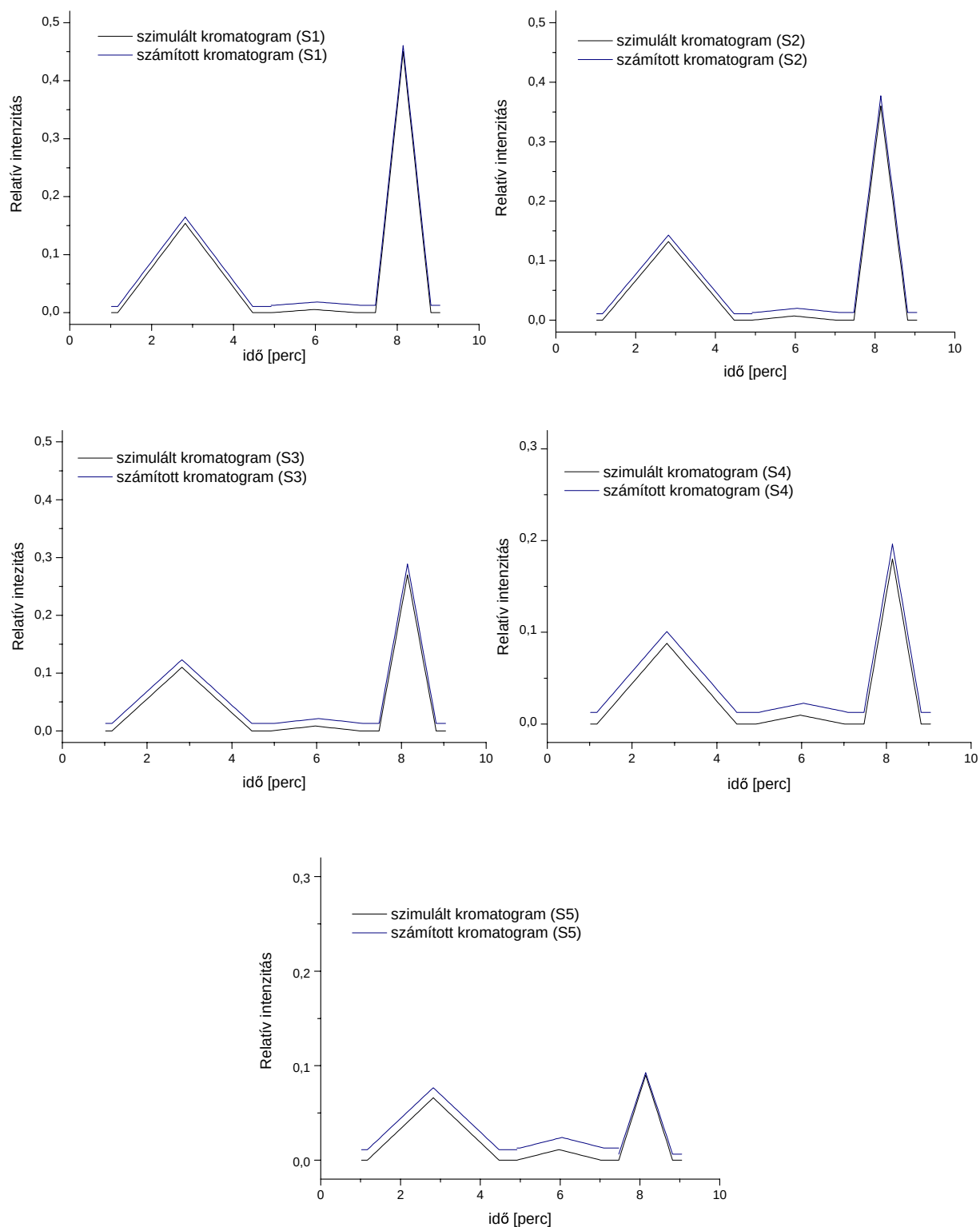
21/a. ábra. A PARAFAC2 módszerrel számított 1. komponenshez tartozó spektrum és a referenciaspektrum összehasonlítása. Az egyezés (korreláció) mértéke 94.96%.



21/b. ábra. A PARAFAC2 módszerrel számított 2. komponenshez tartozó spektrum és a referenciaspektrum összehasonlítása. Az egyezés (korreláció) mértéke 97.68%.



21/c. ábra. A PARAFAC2 módszerrel számított 3. komponenshez tartozó spektrum és a referenciaspektrum összehasonlítása. Az egyezés (korreláció) mértéke 98.40%.



22. ábra. Az S1, S2, S3, S4 és S5 minta szimulált és PARAFAC2 módszerrel kiszámított kromatogramjai mintánként.

5.5.2. A mért HPLC-IR adatok kiértékelése a PARAFAC2 és OSSS-IU-PARAFAC2 módszerekkel

A valós mérésekből származó HPLC-IR adathalmaz PARAFAC2-vel történő kiértékelésekor sajnos gyorsan világossá vált, hogy a szimulált adathalmazon kapott jó eredmény a használt adatmodell speciális voltának köszönhető, vagyis a legegyszerűbb, elkülönülő háromszög-alakú kromatográfiás csúcsok használatának és az adatok időfüggő zajtól való mentességének. A mért adatoknak nemcsak a realisztikus kromatográfiás csúcsai, hanem az eluens-eluátum kölcsönhatásból származó spektrális módosulásai is hozzájárulhattak ahhoz, hogy a PARAFAC2-vel való különböző próbálkozásaink kudarcba fulladtak; a különböző algoritmusok és peremfeltételek alkalmazása során a számítások nem konvergáltak. Mivel a leggyakoribb probléma a számított spektrumok tekintetében az volt, hogy több (matematikai értelemben vett) komponens is az eluent reprezentálta az "eredményben", ezért olyan továbbfejlesztett módszert igyekeztünk kialakítani a PLS_Toolbox-szal futtatott program (és a feldolgozandó kiindulási adattömb) módosítása által, amely az eluens jelenlétének hatását igyekszik kiküszöbölni.

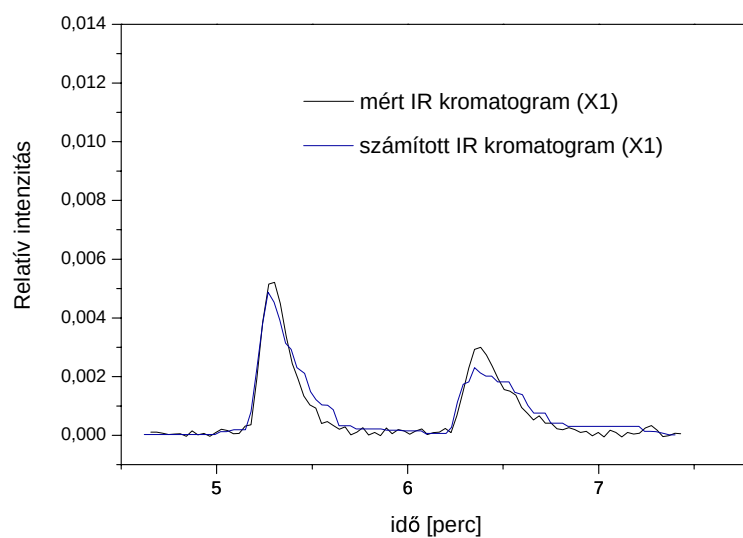
Összehasonlítva a szimulált adathalmazban lévő eluensspektrumok hányadát ($21/108 \approx 20\%$) a mért adathalmazban lévővel ($190/260 \approx 70\%$), valószínűsíthető, hogy a kemometriai felbontásra szánt kiindulási adattömb által reprezentált eluensspektrum-hányad nagysága is befolyásolja a számítás végeredményét. Számításaink további szakaszában ezért sort kerítettünk a mért adattömb értelemszerű megcsonkítására, vagyis kihagytuk azokat az időszakaszokat a hozzájuk tartozó spektrummal együtt, melyekhez csak eluensspektrum rendelhető (konkrétan: az első kromatográfiás csúcs előtti és az utolsó kromatográfiás csúcs utáni spektrumsorozatok). A megmaradt (163-228. sorszámú időpontokhoz tartozó) adathalmaz zajának csökkentése érdekében - a spektrumok hullámszámfüggő zajának elemzése után - csak a legkevésbé zajos és egyben az azonosítási szempontból legértékesebb tartományt, az $1800-650\text{ cm}^{-1}$ közötti részeket használtuk fel; illetve e tartományon belül a spektrumok 1-nél nagyobb abszorbanciájú, Lambert-Beer törvényt nem követő részeit (vagyis az $1490-1425\text{ cm}^{-1}$, $1392-1365\text{ cm}^{-1}$ és $739-714\text{ cm}^{-1}$ tartományokat, ahol egyébként az eluens erős elnyelési sávjai találhatóak) kihagytuk. Mivel az így előkészített redukált adattömbön végzett számítások sem hoztak átütő sikert, nem csak a kiindulási adathalmazt, hanem a

kezdőértékeket tartalmazó mátrix értékeit is megváltoztattuk, mégpedig egy olyan iteratív előfeldolgozási eljárás kidolgozása és alkalmazása által, mely a spektrális kezdőértékek mátrixában az eluens (oldószer) hatását tovább csökkenti. Az összefoglaló számítási eljárásnak az OSSS-IU-PARAFAC2 nevet adtuk (Objective Subtraction of Solvent Spectrum with Iterative Use of PARAFAC2), mely lényegében a következő (programozott) műveletek elvégzését jelenti:

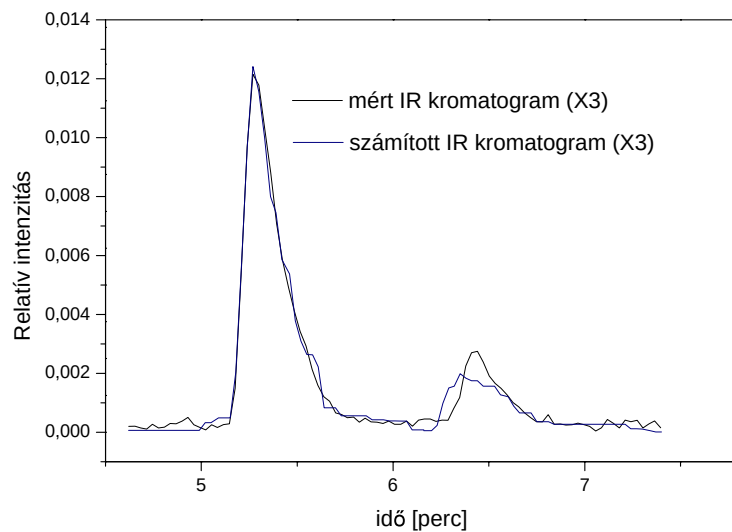
Mivel valós mérések során a felhasznált eluenst és így a hozzátartozó spektrumot is ismerjük, ezt a mért spektrumot a redukált adattömb minden egyes spektrumából való kivonásra használhatjuk fel. A kivonás során először az adattömb minden egyes időpontjához (spektrumához) egy olyan kivonási szorzófaktor algoritmikus meghatározására kerül sor, mellyel megszorozva az eluens spektrumát és kivonva az adott időpontbeli spektrumból, az eredmény spektrum még éppen nem tartalmaz 0-nál kisebb abszorbanciaértékeket. A következő lépésben a TLD algoritmus kerül elindításra, majd a szorzófaktorok megállapítását és kivonást tartalmazó lépés kerül ismét sorra. E két lépés mindaddig ismétlődik, míg a TLD által kiszámított előző ciklusvégi és aktuális ciklusvégi elúciósprofilok közötti különbség négyzetösszege el nem éri a konvergenciakritériumot, vagyis jelen esetben kisebb nem lesz, mint 5×10^{-5} .

Az is kiderült a számítások és a további adatvizsgálat során, hogy mivel a valós mérésünkénél (az eluenshez tartozó koncentrációprofilrész változása által) nem csak egyetlen profil, a koncentrációprofil, hanem az elúciósprofil is változott, vagyis a kromatográfiás csúcsok helye (maximumának időpontja) a különböző minták kromatogramjában a leggondosabb mérésindítás mellett sem egyeztek meg, ezért jobb eredményt kaphattunk az OSSS-IU-PARAFAC2 számítással, ha csak az egyező csúcsmaximum hellyel bíró, vagyis az 1. és 3. minta kromatogramjait használjuk fel.

Az így tovább redukált adattömbön végzett OSSS-IU-PARAFAC2 módszer számítása által kapott spektrumok mindegyike továbbra is inkább az eluenst, mintsem a várt toluol és 1-klórhexán spektrumait reprezentálták, viszont igen nagy továbblépést történt: a mért adatokkal már igen jól egyező elúciógörbe-alakokat (és ehhez tartozó koncentrációprofil) kaptunk. A számított (normált) elúciógörbék és a számított koncentrációértékek lineáris kombinációiból képzett IR kromatogramoknak a mért IR kromatogramokkal való összehasonlítása ezt mutatja be a 23. és 24. ábrákon.



23. ábra. Az X1 minta mért és az OSSS-IU-PARAFAC2 módszerrel számított IR kromatogramjainak összehasonlítása.

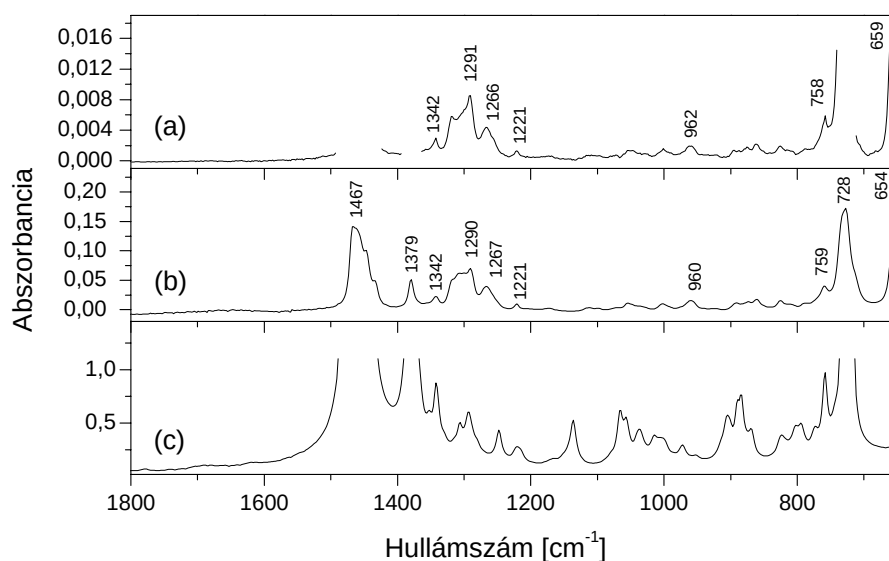


24. ábra. Az X3 minta mért és az OSSS-IU-PARAFAC2 módszerrel számított IR kromatogramjainak összehasonlítása.

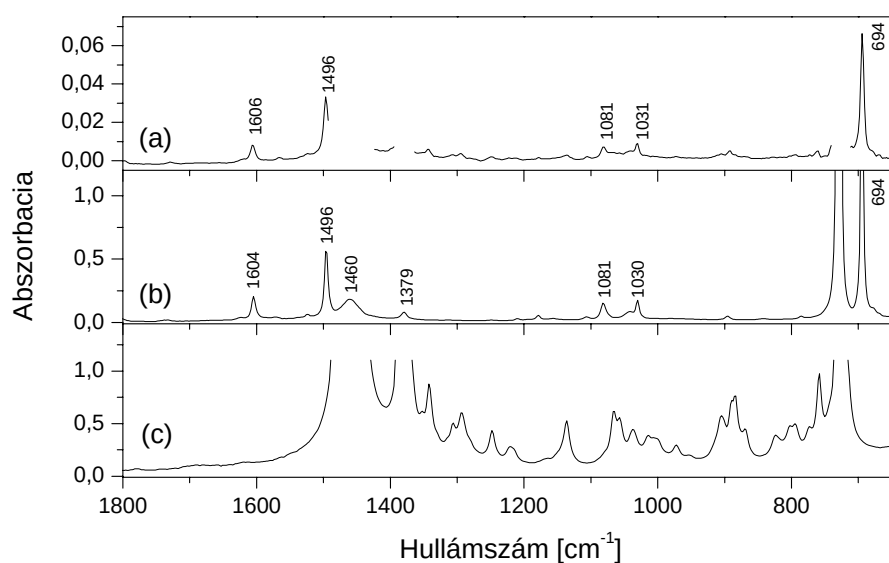
Az ábrák azt is megmutatják, hogy mind az X1, mind az X3 jelű mintákban a számított első csúcs alakja és területe jobban megközelíti a mértet, mint a második csúcs esetében. A második számított csúcs által reprezentált mintamennyiségnek a mérés során injektált mennyiségtől való eltérése már sokkal inkább megjelenik a számított és mért csúcsmagasságok jobban vizualizálható különbségében, vagyis a mért és számított koncentrációk különbségében.

A számított spektrumokból a számítás során is felhasznált mért eluensspektrum utólagos kivonásával (mindegyik számított spektrumra vonatkozóan egyetlen egyedi kivonási faktor felhasználása mellett) a várt 1-klórhexán és toluol spektrumokat kaptuk meg (ld. a 25. és 26. ábrákat), ezért egyértelmű, hogy ugyan a komponensek spektrumait a módszer helyesen szétválasztotta, az eluens fent részletezett matematikai eliminálása viszont nem volt teljes.

Az iterációs eljárásba egy további helyesen megválasztott értékű és spektrumprofilra vonatkozó konvergenciakritérium beépítése valószínűleg a kívánt spektrumkomponensek kinyeréséhez vezetne. (Vagyis például a kiindulási, s így jellemzően eluenst reprezentáló spektrum és az aktuális ciklusban kiszámított spektrumkomponensek közötti maximális eltérést lehetne egy korrelációs értékkel jellemezni, és a korreláció (vagyis itt a korrelálatlanosság) mértékét konvergenciakritériumként felhasználni.) Ez az eljárás azonban nem tudná kiküszöbölni – az ismételt mérések kromatográfiás csúcsmaximumainak manuális injektálás mellett fellépő szórását, vagyis az elúciósprofil változását. Ezért a továbbiakban olyan programfejlesztési irány mellett döntöttünk, amellyel nemcsak a spektrumokat tartalmazó mátrix *kezdeti* értékeit, hanem a másik két profilra vonatkozó mátrix *kezdeti* értékeit is a kiszámítandó értékekhez közelebbi értékekkel lehet majd feltölteni. Az ilyen típusú [“önmodellező görbefelbontó” (Self Modelling Curve Resolution, SMCR) módszeren alapuló] mátrixinicializáció mindhárom profil *kezdeti* mátrixértékeit az adott SMCR módszer által szolgáltatott megoldástományból tölti majd fel (szemben az eddigi random számokkal vagy legkisebb négyzetösszegek kiszámításán alapuló mátrixfeltöltéssel). Az adott SMCR algoritmus [138], valamint a kemometriai módszerekkel kapott eddigi eredményeink [139] a közeljövőben kerülnek publikálásra.



25. ábra. (a) utólagos spektrumkivonással kapott “számított” IR spektrum, (b) az 1-klórhexán statikus (nem HPLC-IR) körülmények között mért referencia IR spektruma, (c) a n-hexán eluens HPLC-IR körülmények között mért IR spektruma. Az (a) és (c) esetekben a számításnál fel nem használt $1490\text{--}1425\text{ cm}^{-1}$, $1392\text{--}1365\text{ cm}^{-1}$, valamint a $739\text{--}714\text{ cm}^{-1}$ tartományokat nem ábrázoltuk.



26. ábra. (a) utólagos spektrumkivonással kapott “számított” IR spektrum, (b) a toluol statikus (nem HPLC-IR) körülmények között mért referencia IR spektruma, (c) a n-hexán eluens HPLC-IR körülmények között mért IR spektruma. Az (a) és (c) esetekben a számításnál fel nem használt $1490\text{--}1425\text{ cm}^{-1}$, $1392\text{--}1365\text{ cm}^{-1}$, valamint a $739\text{--}714\text{ cm}^{-1}$ tartományokat nem ábrázoltuk.

5.6. A szimulált és mért HPLC-IR adatok kemometriai kiértékeléssel kapott eredményeinek összegzése

A szimulált HPLC-IR adatok kemometriai kiértékeléssel kapott eredményei olyan adathalmaz felhasználásával születtek, mely adathalmazról utóbb kiderült, hogy túl speciális, vagyis a valódi mérési adatokhoz képest több olyan leegyszerűsítést is tartalmazott, mely a tesztelt módszerek valódi mérési adatokra történő módosítások nélküli átvitelét akadályozta. A PARAFAC valamint a PARAFAC2 tesztelése során kapott kezdeti eredmények azonban arra ösztönöztek bennünket, hogy a szimulált adattömbnek a módszerek alkalmazhatóságát alapvetően eldöntő tulajdonságain túli egyéb tulajdonságait, valamint e tulajdonságoknak a tesztelt módszerekkel való illeszthetőségét is megvizsgáljuk. Mivel e tulajdonságok közül az eluens koncentrációprofiljának időbeli változása nem csak a szimulált adattömbre, hanem a valós mérési adattömbre is jellemző, a szimulált adatokon végzett tesztek nem váltak haszontalanná: joggal várhattuk, hogy a mért adatok profilokra bontásánál is eredményesebb lesz a PARAFAC2 módszer, mint a PARAFAC.

A valódi mért adatok kemometriai felbontásánál több olyan módosítást is bevezettünk, melyek végül partikuláris megoldáshoz vezettek, vagyis a számított három profil közül az elúciós- és koncentrációprofil (illetve ezek lineáris kombinációi) kielégítő egyezést mutattak a mért adatokkal. A számított spektrumprofil (vagyis a komponensekhez rendelt egyes spektrumok) nem mutattak megfelelő korrelációt az 1-klórhexán és toluol referenciaspektrumokkal. A számított spektrumokból az eluens spektrumának utólagos kivonásával kapott eredmények referenciával való nagymértékű egyezései azonban megmutatták, hogy az egyes kémiai komponensekhez rendelhető spektrumok elkülönítése – a módosításaink eredményeként létrejött OSSS-IU-PARAFAC2 módszer alkalmazásának köszönhetően – megtörtént, csupán az eluens matematikai eliminálásának *mértéke* nem volt elegendő.

Az általunk eddigiekben kialakított OSSS-IU-PARAFAC2 eljárás a mátrixinicializációs lépésben csak a spektrumokat tartalmazó mátrix kezdeti értékeit tölti fel a kiszámítandó értékekhez közelebbi értékekkel. A mért HPLC-IR adatok várhatóan sikeres (és alapvetően az eddig kialakított eljárason alapuló) analíziséhez a közeljövőben olyan SMCR módszeren alapuló mátrixinicializálási eljárást kívánunk bemutatni [138], amely nemcsak a spektrumok,

hanem a másik két profil kezdeti értékeit is a kiszámítandó értékekhez közelebbi tartományokból veszi.

6. A β -cipermetrin izomerek HPLC-IR vizsgálata

6.1. A β -cipermetrin izomerek HPLC-IR méréseinek kísérleti körülményei

6.1.1. Felhasznált anyagok és mintakészítés

A HPLC-IR méréseknél és a mintaoldatok készítésénél felhasznált oldószerek mindegyike (acetonitril, diklórmétán, 2-propanol és tetrahidrofurán) HPLC-s minőségű volt (Sigma-Aldrich Co., USA). A mintaoldatok az Agro-Chemie Kft-től beszerzett, rovarölő tulajdonságú és diasztereomereket tartalmazó β -cipermetrin megfelelő mennyiségének 20/80 v/v%-os CH_2Cl_2 /n-hexán elegyben való oldásával készültek, úgy, hogy 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 és 4.0 mg/ml-es koncentrációjú oldatokat 5 ml össztérfogatban kapjunk.

Az elválasztási feladat során a következő elegyek mobilfázisként való alkalmazására került sor: CH_2Cl_2 /n-hexán (35/65 v/v%), tetrahidrofurán/n-hexán (2/98 v/v%), 2-propanol/n-hexán (0.1/99.9 v/v%) és acetonitrillel telített n-hexán (2.0 v/v% acetonitril, 23 °C-on). A poláris módosítók koncentrációját úgy optimalizáltuk, hogy a retenciók idői lehetőleg 10 perc alatt maradjanak, és a második kromatográfiás csúcsra vonatkoztatva megközelítőleg azonosak legyenek az összes kísérlet során (az áramlási sebességet konstans 2 ml/perc értéken tartva).

6.1.2. Műszerek és mérési paraméterek

Az elválasztásokhoz DuPont gyártmányú ZORBAX-Sil (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm) oszlopot használtunk, melyet a használt mobilfázissal (mérés előtt, minden mobilfázis csere alkalmával) mostunk és egyensúlyi állapotba hoztunk. Az injektálásokat távolról irányított VICI (Valco Instruments Co. Inc.) típusú injektorral végeztük; az injektált térfogat (huroktérfogat) 20 μl volt. A mobilfázisokat a csatolt HPLC-IR rendszeren keresztül egy

ISCO 2350-es pumpa továbbította. A rendszer kromatográfiai és IR spektrometriai része közötti kapcsolatot átfolyós folyadékccellával (Spectra-Tech Inc., USA) biztosítottuk, melyet gondosan az FTIR spektrométer mintaterének fókuszpontjába pozícionáltunk. (A pozícionáláshoz a fókuszpont helyét és átmérőjét egy házikészítésű, x-y-z irányban mozgatható mintatartó, valamint egy erre rögzíthető blende segítségével állapítottuk meg.) A 10.8 μl -es átfolyós folyadékcella NaCl ablakokkal, és az analitikai kromatográfoknál általában használt 0.01"-es belső, és 1/16"-es külső átmérőjű rozsdamentes acél be-, illetve kivezető csövekkel volt ellátva. A kromatográfias oszlop és a folyadékcella közötti acélcső hossza 15 cm volt.

Az elválasztott komponensek IR abszorpciós spektrumait a két detektorral ellátott Nicolet Magna 750-es FTIR spektrométerrel mértük; a mérések során a $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ tartományban működő, cseppfolyós N_2 -vel hűtött igen gyors és nagyérzékenységű MCT-A detektort használtuk. Annak érdekében, hogy a legnagyobb energiaáteresztést, vagyis a legnagyobb detektorjelet kapjuk, az interferogram maximalizálását a standard apertura érték 6-ról 26-os értékre állításával értük el. A spektrumokat tipikusan 8 vagy 16 cm^{-1} spektrális felbontás mellett, spektrumonként 16 illetve 32 interferogram scan akkumulálásával vettük fel. Az ún. "valós idejű" (real time) adatgyűjtési rendszer használata mellett (5.0632 cm/s tükrömozgatási sebességnél, a mozgó tükör 1.25 illetve 0.625 mm-es maximum elmozdulásánál), ez 2.35 illetve 3.22 másodperces időfelbontást eredményezett az "IR kromatogram"-ban.

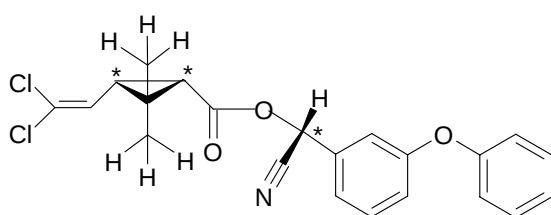
Az IR spektrumsorozatok megfelelő időfelbontással történő mérésének feladatát az OMNICTM szoftvercsomag (Thermo Nicolet Inc.) Series programmodulja irányította. Az on-line mérések során, minden egyes mintaspektrumhoz az aktuális mobilfázis 256 scan-es egysugaras spektruma szolgáltat háttérpektrumként, mely háttérpektrum közvetlenül a HPLC-IR mérés előtt, áramlási körülmények között került megmérésre. Ez az eljárás rögtön az analizálandó anyag abszorbanciaspektrumát adta, s így nem volt szükség semmiféle spektrális kivonás elvégzésére a mérés után. A Kemigram (vagyis a felhasználó által kiválasztott kémiai funkciócsoportra jellemző hullámszámtartomány integrált IR abszorpciós intenzitásán alapuló kromatogram), valamint a teljes IR-tartományban vett kromatogramnak tekinthető, ún. Gram-Schmidt rekonstrukció [140] valós idejű előállítására szintén a Series szoftvert használtuk.

Referenciaként a β -cipermetrin minta konvencionális normál fázisú HPLC-s elválasztását szintén elvégeztük, ugyanazon a ZORBAX-Sil oszlopon, mint amit a HPLC-IR mérések során használtunk, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{n-hexán}$ (25/75 v/v%) izokratikus elúciójával, 2 ml/perc áramlási sebesség mellett. A használt Spectra Focus HPLC rendszer (Thermoseparation Products, CA) egy Spectra P2000-es pumpából, Rheodyne injektorból, és egy Spectra UV2000-es detektorból állt. Az injektált térfogat 20 μl volt, és az UV abszorpciót 240 nm-en detektáltuk.

6.2. A β -cipermetrin izomerek HPLC-IR vizsgálati eredményeinek tárgyalása

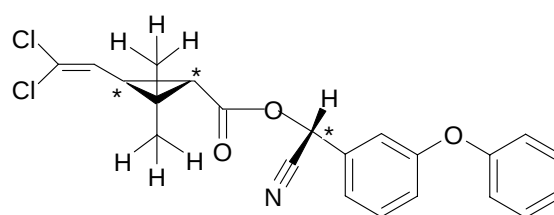
6.2.1. Az IR detektálási tartományok összehasonlítása

A HPLC-IR mérések előtt a β -cipermetrin minta összetételét konvencionális HPLC analízissel ellenőriztük. A β -cipermetrin molekula három aszimmetriacentrumot tartalmaz; ennek megfelelően a minta 8 sztereoizomer keveréke, amely négy enantiomerpárnak (tükörképi párnak) felel meg, s melyből két pár sokkal nagyobb mennyiségben van jelen a mintában, mint a másik kettő. A két nagyobb mennyiségben jelenlévő sztereoizomerpárt (illetve mindegyik párból csak az egyik enantiomert) a 27. ábra mutatja be.



1-es vegyület:

(R)- α -ciano-3-fenoxibenzil
(1S)-*cisz*-3-(2,2-diklórvinil)-
-2,2-dimetilciklopropánkarboxilát

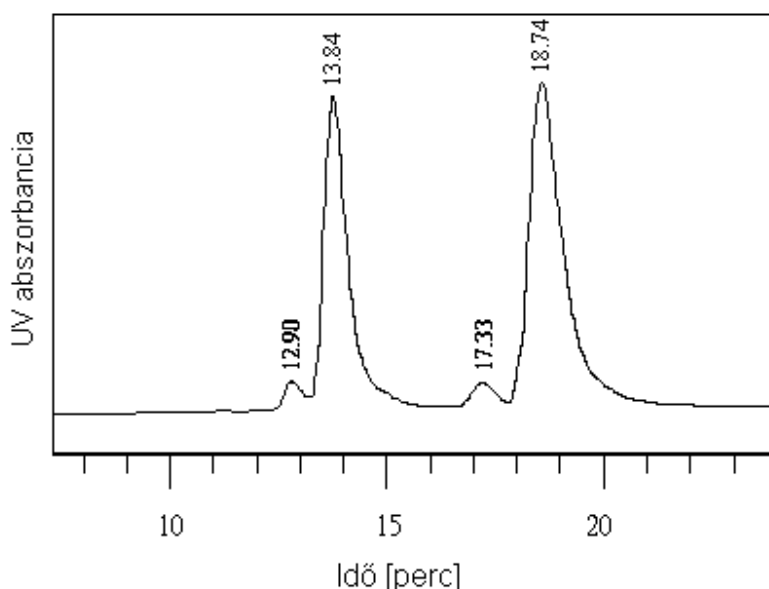


2-es vegyület:

(R)- α -ciano-3-fenoxibenzil
(1S)-*transz*-3-(2,2-diklórvinil)-
-2,2-dimetilciklopropánkarboxilát

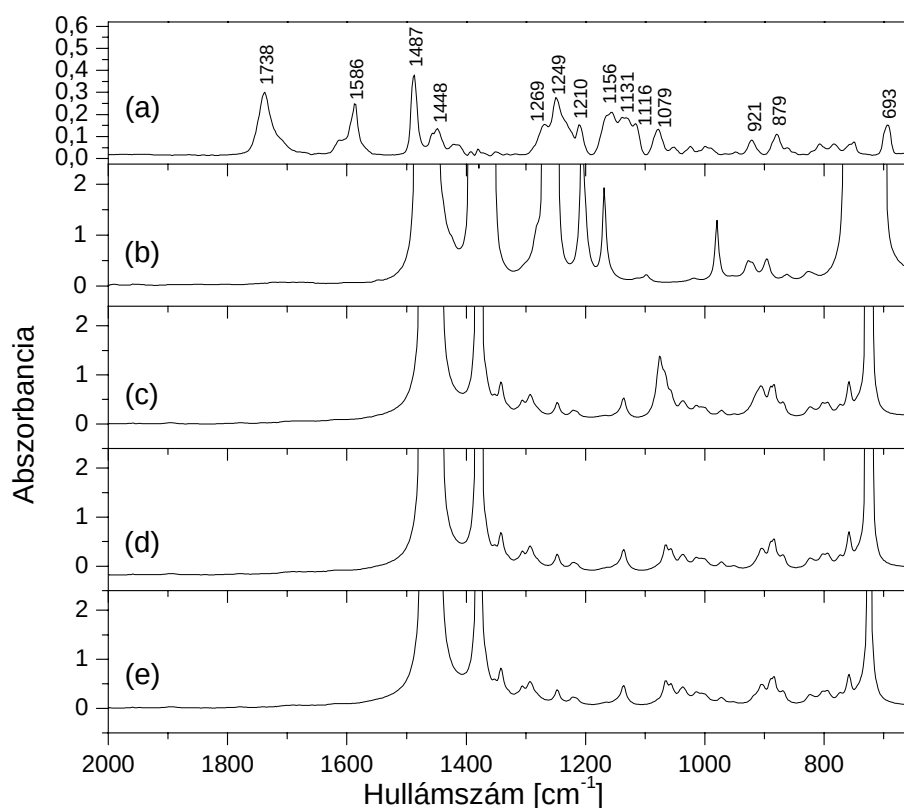
27. ábra. A β -cipermetrin diasztereomerek két fő komponensének kémiai szerkezete és hivatalos IUPAC neve.

A kromatogramban, ha akirális állófázist használunk, csak a diasztereomereket lehet egymástól megkülönböztetni, míg az enantiomereknek ugyanolyan retenciós idejük lesz. Így két nagy és két kisebb kromatográfiás csúcsnak kell megjelennie a kromatogramban, ahogyan az UV detektálással ezt meg is figyeltük (ld. a 28. ábrát). A 13.84 és 18.74 percnél eluálódó két főbb csúcs rendre az **1** és **2**-vel jelölt szerkezetnek felel meg a 27. ábrán. A csúcsterületeknek megfelelően, ezek tömegaránya 40/60. A 28. ábrán látható két kisebb csúcs a β -cipermetrin két fennmaradó entantiomerpárjának köszönhető. Várható, hogy a HPLC-IR mérések során csak a két főbb komponens lesz megfigyelhető.



28. ábra. A kereskedelmi β -cipermetrin termék UV detektálás mellett kapott normálfázisú HPLC kromatogramja. Az első főbb csúcs (13.84 percnél) a *cisz* szerkezethez (az **1**-es vegyülethez), míg a második főbb csúcs (18.74 percnél) a *transz* szerkezethez (a **2**-es vegyülethez) tartozik.

A 29. ábrán a sztereoizomer keverék szilárdfázisú IR spektrumát a négy használt mobilfáziskeverék abszorpciós spektrumával együtt mutatjuk be, hogy illusztráljuk a β -cipermetrinek átfolyós folyadékcélában történő IR spektroszkópai detektálásának előfeltételeit. Megjegyzendő, hogy azok a spektrális tartományok, ahol a mozgó fázis abszorbanciája meghaladja a 2 abszorbania egységet, használhatatlanok a vizsgálandó mintakomponens detektálására (bár a Fourier-transzformációs IR mérés alapelvének köszönhetően ezeket a tartományokat szintén tartalmazza a mérés).

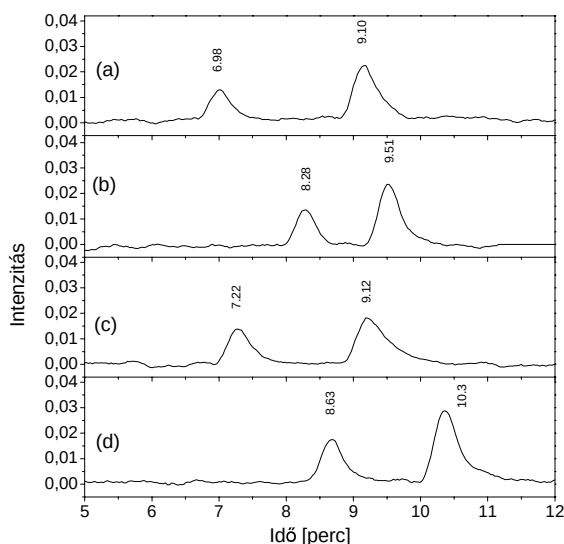


29. ábra. A sztereoizomerkeverék és a négy mobilfáziskeverék IR spektrumának összehasonlítása: (a) a sztereoizomerkeverék szilárdfázisú IR spektruma, (b) DKM/nHEX, (c) THF/nHEX, (d) IPA/nHEX, és (e) AN/nHEX mobilfáziskeverék IR spektruma.

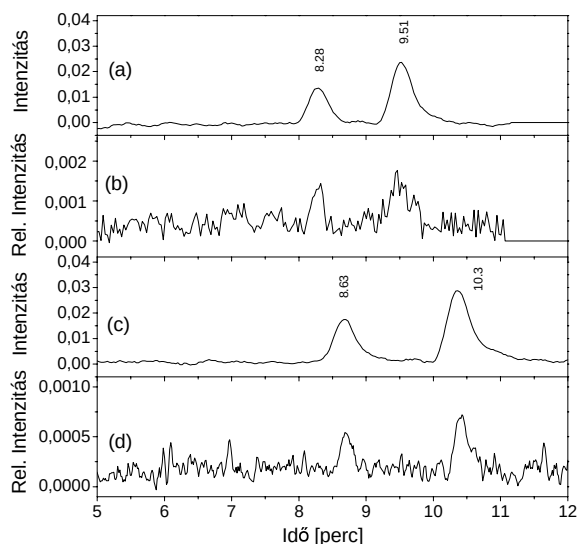
A mintakeverék 29/a. ábrán látható, KBr pasztillában felvett, szilárdfázisú IR spektrumát összehasonlítva a mobilfáziskeverékek 29/b-29/e. ábrákon látható spektrumaival, nyilvánvaló, hogy az 1500 cm^{-1} feletti sávok a legalkalmasabbak a mennyiségi elemzésre (különösen az erős $\nu\text{C=O}$ sáv 1740 cm^{-1} -nél), minthogy ezek a sávok mentesek a mobilfázis okozta interferenciától. A mintakeverék 1478 cm^{-1} -nél lévő legerősebb sávja a mi céljaink szempontjából használhatatlan, mivel ez abba a tartományba esik, ahol a n-hexán elnyeli a teljes energiát. Az 1350 cm^{-1} -től 750 cm^{-1} -ig terjedő tartomány vizsgálata szintén fontos lehet, minthogy az elválasztott diaszteromerek megkülönböztetésére alkalmas spektrális különbségek megjelenése itt, a vázdeformációs rezgések tartományában várható.

A legjobb HPLC-IR kemigramok, melyeket a karbonil abszorpciós tartomány felhasználása mellett a négyféle mobilfázissal kaptunk, a 30. ábrán láthatóak. Ezen kemigramok közül kettőt

a megfelelő Gram-Schmidt rekonstrukciókkal (vagyis teljes IR kromatogramokkal) a 31. ábrán hasonlítottunk össze.



30. ábra. A 4 mg/ml injektált koncentrációjú β -cipermetrin minta 1760-1720 cm^{-1} spektrális tartomány alapján kapott HPLC-IR kemigramjai, a négy különböző mobilfáziskeverék esetén: (a) DKM/nHEX, (b) THF/nHEX, (c) IPA/nHEX, és (d) AN/nHEX.



31. ábra. Kétféle mobilfázissal külön-külön nyert β -cipermetrin kemigram és az ezeknek megfelelő Gram-Schmidt-rekonstrukciós kromatogramok összehasonlítása (4 mg/ml injektált koncentráció): (a) kemigram THF/nHEX, (b) GSR THF/nHEX, (c) kemigram AN/nHEX illetve (d) GSR AN/nHEX eluenssel végzett HPLC-FTIR mérés esetén.

Az összehasonlítás jól mutatja, hogy a “karbonil kemigramok” sokkal intenzívebb csúcsokat adtak, s így előnyösebben alkalmazhatóak a komponensek detektálására, mint a Gram-Schmidt rekonstrukciók. Az előbbiek akkor adták a legmagasabb jelintenzitást a kromatográfiás csúcsmaximumban, ha a szűk 1760-1720 cm^{-1} hullámszámtartományra korlátoztuk a mérési tartományt. A két főbb diasztereomerpár mindegyikének ebben a tartományban vannak a legintenzívebb IR abszorpciós sávjai, és ez az a tartomány, ahol sem a n-hexán, sem pedig az alkalmazott mobilfáziskeverékek nem zavarják a mintakomponensek detektálását.

Ezzel szemben sokkal nehezebbnek bizonyult bármiféle jelet detektálni a Gram-Schmidt rekonstrukciókban (GSR-ekben). Még a legnagyobb (4 mg/ml) koncentrációjú minták is csak két esetben, a tetrahidrofurán/n-hexán (THF/nHEX) és az acetonitril/n-hexán (AN/nHEX) alkalmazásakor mutattak detektálható jelet (3 körüli jel/zaj-aránybeli elvárás mellett). Kisebb koncentrációknál a sikertelenség oka annak a ténynek volt köszönhető, hogy az intenzitás-szintek és a jel/zaj arányok a GSR-ekben törvényszerűen (a Gram-Schmidt Rekonstrukció képzéséből adódóan) kisebbek, mint a megfelelően kiválasztott keskeny tartományú kemigramokban. Míg a maximum kemigramintenzitások a 4 mg/ml-es mintáknál (abszorbancia egységben) 0.018-0.029 között változtak a használt mobilfázistól függően (ld. a 30. ábrát), addig a maximum GSR-intenzitások rendre legalább egy nagyságrenddel kisebbek (0.0018 és 0.0007 körüli értékűek) voltak a THF/nHEX, illetve AN/nHEX mobilfázisoknál. Mint ahogyan a 30. ábrán látható, a kemigramintenzitások és csúcsalakok meglehetősen jól reagáltak a mobilfázisok tulajdonságaira; a különböző kemigramokban mért csúcsintenzitások összehasonlíthatóak, és látható hogy azonos nagyságrendűek maradtak. A GSR-ek esetében (ld. a 31/b. és 31/d. ábrákon), a detektált csúcsintenzitások nem hasonlíthatóak össze a relatív intenzitásokat feltüntető skálán. Itt a csúcsintenzitásokat a mobilfázisnak nem a kromatográfiai, hanem a spektroszkópiai viselkedése szabta meg (visszatükrözve a - teljesen elnyelő tartományokat is tartalmazó – teljes spektrum átlagos jel/zaj arányát). Vagyis a minta abszorpciós intenzitásában beálló ugyanolyan kicsiny mértékű változásnak a különböző mobilfázisokhoz tartozó teljes spektrális intenzitásokkal való elosztása, a relatív intenzitás-skálán különböző maximum jelszinteket eredményez. Ennek következtében az azonos mintakonzentrációk összehasonlíthatatlanul gyengébb csúcsintenzitásokat adnak a GSR-ekben, és ez magyarázza a 4 mg/ml-es minták diklórmétán/n-hexánnal (DKM/nHEX) és

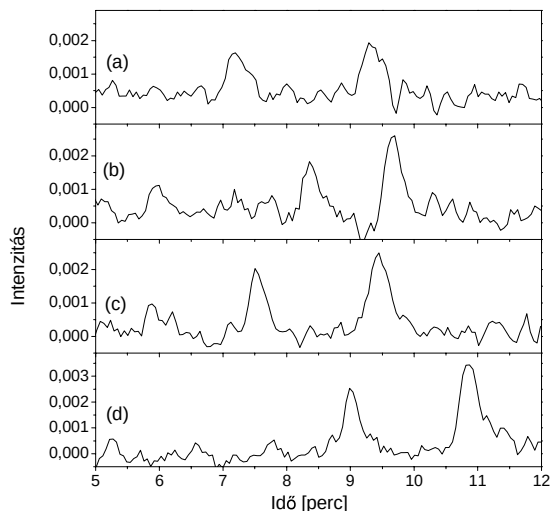
az izopropanol/n-hexánnal (IPA/nHEX) való mérésének sikertelenségét. Így azt a következtetést vonhatjuk le - ha egyedül a kromatográfiai vonatkozásokat vesszük figyelembe -, hogy a β -cipermetrinek HPLC-IR elválasztásakor mobilfázisnak a THF/nHEX vagy az AN/nHEX a legjobb választás, detektálási módszerként pedig a kemigram-típusú kromatogram használata tekinthető jó megoldásnak.

6.2.2. Mintaazonosítási és detektálási határok

A detektálási/azonosítási határok tanulmányozásakor mefigyeltük, hogy a 4, 2, és 1 mg/ml-es koncentrációjú minták jól értelmezhető kemigramokat adtak 8 cm^{-1} felbontás és spektrumonként 16 akkumulált scan esetén, míg a 0.5 és 0.3 mg/ml-es koncentrációjú minták a kemigramban csúcsokat nem adván, a mérési paraméterek további változtatását igényelték. Egy jel időbeli változása estén (ahogy a kemigramban is történik) az akkumulált scan-ek számának növelésével óvatosan kell bánni, mivel a scan-ek számának egy bizonyos ponton túli növelése többé már nem javítja a felvett spektrum minőségét (jel/zaj arányát) [141]; ezzel szemben, a kemigramban lerontja az időfelbontást és (az átlagolás miatt) csökkenti a maximum csúcsintenzitást. A 32 scan-es spektrális akkumuláció a kemigramcsúcsok zajból való kiemelkedését figyelembe véve (jel/zaj > 3 mellett) hatékonynak tűnt, de ez az $1350\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ tartományban spektrális információvesztéssel járt együtt. Esélyünk nem lévén az azonosításra, azért, hogy a kemigramokban jobb időbeli felbontást érjünk el, 16 cm^{-1} spektrális felbontást választottunk (a 8 cm^{-1} helyett). Mint ahogyan a 32. ábra mutatja, a β -cipermetrinek kemigramcsúcsai így a 0.3 mg/ml-es mintánál mind a négy mobilfázis esetén detektálhatóak voltak (16 cm^{-1} -es felbontás és 32 scan akkumulálása mellett). Bár a THF/nHEX (32/b.) és IPA/nHEX (32/c.) mobilfázisokkal nyert kemigramok kétséget ébresztenek a nem várt 6. perc környéki zajos maximum miatt, ellenőrizve az időskála minden egyes adatpontjához tartozó spektrum $1900\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ tartományát, az 1744 cm^{-1} és 1588 cm^{-1} -es sávokat (melyek mindkét diasztereomerpárra jellemzőek) csak a 32/b. ábrán lévő 8.3 és 9.5 perces csúcsoknál, valamint a 32/c. ábrán lévő 7.5 és 9.4 perces csúcsoknál figyelhettük meg. Vagyis a 6-perces csúcsok csak mérési zajnak bizonyultak.

A 0.3 mg/ml-es minta esetén kapott kemigram zajszintjét figyelembe véve, a 0.3 mg/ml-es koncentráció a β -cipermetrinek általános detektálási határának bizonyult. Ugyanakkor az

acetonitril/n-hexán mobilfázis esetében a becsült detektálási határ legalább 0.1 mg/ml, melyet tesztmérésekkel bizonyítottunk.

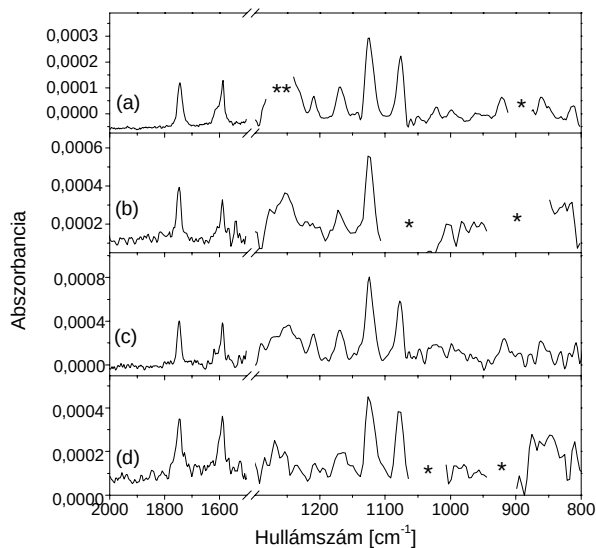


32. ábra. A 0.3 mg/ml –es injektált koncentrációjú mintára vonatkozó ($1760\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$ spektrális tartomány alapján kapott) β -cipermetrin kemigramok (a) DKM/nHEX, (b) THF/nHEX, (c) IPA/nHEX illetve (d) AN/nHEX eluenssel végzett HPLC-FTIR mérések esetében.

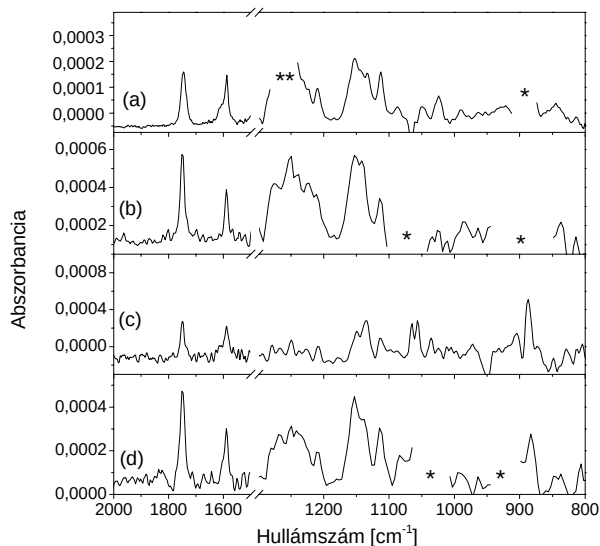
Másrészt, figyelembe véve, hogy az 1 mg/ml-es mintáknál nem csak kromatográfiai, hanem spektrális információkat is tudunk nyerni az $1350\text{--}750\text{ cm}^{-1}$ tartomány elvesztése nélkül (8 cm^{-1} spektrális felbontás és spektrumonkénti 16 scan akkumulálása mellett), megállapíthatjuk, hogy pozitív mintakomponens azonosítás (vagyis a diasztereomerek megkülönböztetése) 1 mg/ml koncentrációjú minták esetén lehetséges.

A négyféle mobilfázis esetében az 1 mg/ml-es minták két jól elkülönülő kromatográfiai csúcsából kinyert spektrumainak összehasonlítása megmutatja (ld. a 33. és 34. ábrákat), hogy a sztereoizomer keverék két fő komponense jellegzetes különbségeket mutat, különösen az $1300\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ -ig terjedő spektrális tartományban, ami alkalmassá teszi a spektrumokat az adott mintakomponensek azonosítására. Az is nyilvánvaló, hogy a spektrális azonosítás szempontjából a mobilfáziskeverékek között határozott különbségek lehetnek. Míg a n-hexán teljes abszorpciót mutató sávjai ($1500\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ -ig, valamint 800 cm^{-1} alatt) ugyanazon spektrális tartományokat blokkolják és a spektrumokat ugyanolyan módon befolyásolják mind a négy esetben, a körülményekbeli különbségeket elsődlegesen a poláris módosítók azon

abszorpciós sávjai határozzák meg, melyek a mintakomponens sávjaival összemérhető intenzitásúak.



33. ábra. Az 1 mg/ml-es injektált koncentrációjú minták *első* kemigramcsúcsaiból kinyert IR spektrumai a négy mobilfázis (a) DKM/nHEX, (b) THF/nHEX, (c) IPA/nHEX, illetve (d) AN/nHEX esetében.



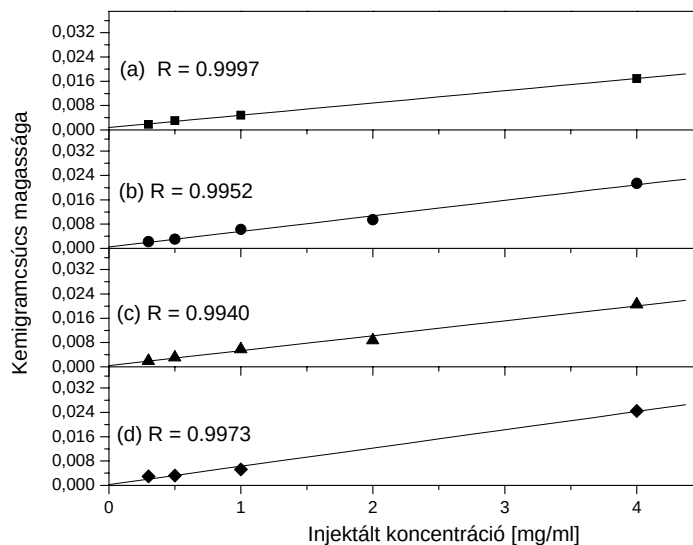
34. ábra. Az 1 mg/ml-es injektált koncentrációjú minták *második* kemigramcsúcsaiból kinyert IR spektrumai a négy mobilfázis (a) DKM/nHEX, (b) THF/nHEX, (c) IPA/nHEX, illetve (d) AN/nHEX esetében.

Miként egy nemrégiben megjelent áttekintő tanulmányban megjegyzik [113], a poláris módosítók kis mennyiségben való használata bizonyos régiókban megakadályozhatja a hatékony detektálást. Mások azt állítják [141], hogy számos kisebb mennyiségben (<5%) hozzáadott módosító a kromatográfiás elválasztást további spektrális információvesztés nélkül képes befolyásolni. A mi kísérleti körülményeink között a kis koncentrációjú módosítók végül többletként megjelenő abszorpciós sávjainak kompenzálódnia kellett volna a mérés folyamán, de a módosító és a mintakomponens közötti molekuláris kölcsönhatások miatt ezek a sávok enyhén eltorzulhattak/eltolódhattak, s így az elválasztott mintakomponens spektrumában pozitív vagy negatív zavaró sávokként mégis jelentek meg. (Az e hatás által befolyásolt spektrális intervallumokat kivágtuk és csillaggal jelöltük a 33. és 34. ábrákon.)

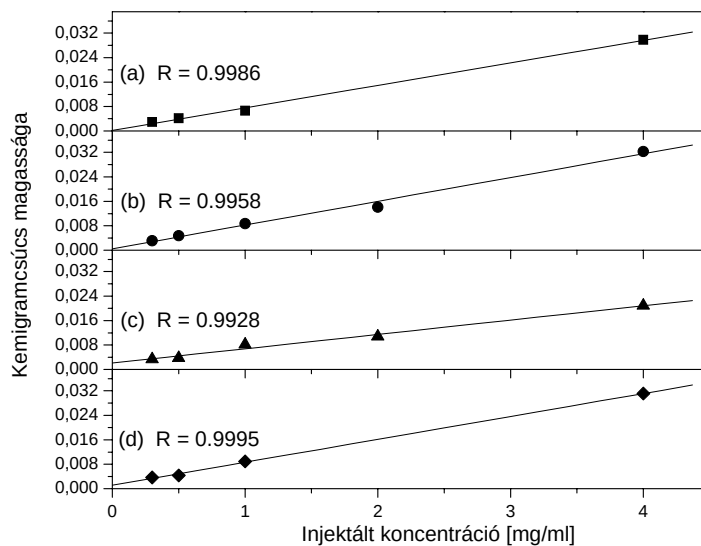
A 33/a. és 34/a. ábrák azt mutatják be, hogy a nagyobb arányban (35%) alkalmazott DKM módosító 1230-1270 cm^{-1} közötti sávja a mintakomponens ezen értékes spektrumtartományát elfedte (ezt a tartományt kettős csillaggal jelöltük), mely egyértelmű hátrány. Az IPA/nHEX mobilfázis sem tekinthető jó választásnak, a második kromatográfiás csúcshoz tartozó spektrum 1050-1300 cm^{-1} közötti spektrális információvesztése miatt (ld. a 34/c. ábrát). Annak a ténynek köszönhetően, hogy a THF és AN sávok a mintakomponensnek csak a kis információtartalmú (a 33/b. és 33/d., valamint 34/b. és 34/d. ábrákon csillaggal jelölt), 1050 cm^{-1} alatti spektrumtartományait érintették, a spektrumok karakterisztikusabb részeit érintetlenül hagyva, a THF/nHEX és AN/nHEX eluensekkel végzett mérések szolgáltatták a legjobb minőségű spektrumokat.

6.2.3. Koncentrációfüggés

Tanulmányozva az 1760-1720 cm^{-1} közötti spektrális tartományra vonatkozó kemigramok csúcsintenzitásainak válaszát a koncentrációváltozásra, az összes mobilfázis esetén meglehetősen jó lineáris összefüggést találtunk a csúcsmagasságok és koncentrációk között a 0.3 - 4.0 mg/ml-es koncentrációtartományban, miként ezt a 35. és 36. ábrák, valamint a lineáris illesztések 5. táblázatban feltüntetett korrelációs együtthatói (R) és szórásai (SD) mutatják. A lineáris regresszió korrelációs együtthatói 0.9997 és 0.9940 között változtak az első kemigramcsúcs esetén (1 –es vegyület, ld. a 35. ábrán és az 5. táblázatban), valamint 0.9986 és 0.9928 között a második kemigramcsúcs esetén (2 –es vegyület, ld. az 36. ábrán és az 5. táblázatban).



35. ábra. Az *első* kemigram csúcs ($1760\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ spektrális tartományra vonatkozó) intenzitásának koncentrációfüggése az (a) DKM/nHEX, (b) THF/nHEX, (c) IPA/nHEX és a (d) AN/nHEX mobilfázisok esetében. A lineáris regresszió korrelációs együtthatói (R) az ábrán láthatóak.



36. ábra. A *második* kemigram csúcs ($1760\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ spektrális tartományra vonatkozó) intenzitásának koncentrációfüggése az (a) DKM/nHEX, (b) THF/nHEX, (c) IPA/nHEX és a (d) AN/nHEX mobilfázisok esetében. A lineáris regresszió korrelációs együtthatói (R) az ábrán láthatóak.

5. táblázat. A kemigram csúcsmagasságok és koncentrációk közötti kapcsolat lineáris illesztésének eredménye

Kemigram csúcs	Mobulfázis	A lineáris illesztés eredménye					
		A	A hibája	B	B hibája	R	SD
<i>Első</i>	DKM/nHEX	$8.1152 \cdot 10^{-4}$	$1.5604 \cdot 10^{-4}$	0.0040	$0.7494 \cdot 10^{-4}$	0.9997	$2.2340 \cdot 10^{-4}$
	THF/nHEX	$4.6215 \cdot 10^{-4}$	$6.0083 \cdot 10^{-4}$	0.0051	$2.9083 \cdot 10^{-4}$	0.9952	$8.8079 \cdot 10^{-4}$
	IPA/nHEX	$4.1639 \cdot 10^{-4}$	$6.4675 \cdot 10^{-4}$	0.0049	$3.1306 \cdot 10^{-4}$	0.9940	$9.4810 \cdot 10^{-4}$
	AN/nHEX	$2.5617 \cdot 10^{-4}$	$6.5682 \cdot 10^{-4}$	0.0060	$3.1547 \cdot 10^{-4}$	0.9972	$9.4271 \cdot 10^{-4}$
<i>Második</i>	DKM/nHEX	$2.1690 \cdot 10^{-4}$	$5.6500 \cdot 10^{-4}$	0.0073	$2.7137 \cdot 10^{-4}$	0.9986	$8.1092 \cdot 10^{-4}$
	THF/nHEX	$4.6818 \cdot 10^{-4}$	$8.4876 \cdot 10^{-4}$	0.0078	$4.1084 \cdot 10^{-4}$	0.9958	$1.2400 \cdot 10^{-3}$
	IPA/nHEX	$2.1000 \cdot 10^{-3}$	$6.7197 \cdot 10^{-4}$	0.0047	$3.2526 \cdot 10^{-4}$	0.9928	$9.8551 \cdot 10^{-4}$
	AN/nHEX	$1.1600 \cdot 10^{-3}$	$3.3338 \cdot 10^{-4}$	0.0075	$1.6012 \cdot 10^{-4}$	0.9995	$4.7848 \cdot 10^{-4}$

A: az $y = A+B \cdot x$ típusú lineáris függvénnel illesztett egyenes tengelymetszete az abszcisszán,

B: az illesztett egyenes meredeksége,

R: az illesztés korrelációs együtthatója,

SD: az illesztés Standard Deviációja (szórása)

Összegezve elmondható, hogy a linearitás kritériuma egyik tesztelt mobulfáziskeveréket sem zárja ki a használatból, viszont a spektrumok hasznos ($1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ és $1300\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$) részének minősége egyértelműen jelzi, hogy a THF/nHEX vagy az AN/nHEX a legjobb mobulfázis választás, ha a főkomponens azonosítást is feladatnak tekintjük.

6.3. A β -cipermetrin izomerek HPLC-IR vizsgálati eredményeinek összegzése

Kísérleteink demonstrálták, hogy az *analitikai* HPLC on-line összekapcsolása egy átfolyós folyadékcellán keresztül egy kutatási céloknak megfelelő minőségű (gyors és nagy érzékenységű IR detektorral, valamint sorozatmérésre alkalmas szoftverrel felszerelt) FTIR spektrométerrel, életképes módszert kínál a szerves kémiai termékek főbb komponenseinek elválasztással egybekötött detektálása és azonosítása számára. Az ide vonatkozó, főárambeli szakirodalommal szemben megmutattuk, hogy a szokásos poláris módosítót tartalmazó kromatográfiás mobulfázisok ilyen mérések során is használhatóak, bár e technikának a mobulfázisok és a vizsgálandó minta spektroszkópiai tulajdonságaitól függően egyértelmű korlátai vannak.

Megállapítottuk, hogy abban az esetben, ha a mintakomponensnek erős IR abszorpciós sávja van a mobilfázis abszorpciós sávajaitól mentes tartományban, az IR kromatogramok, — felhasználva az olyan szűk tartományon vett kemigram-típusú detektálást mely a célvegyület spektális tulajdonságaira van hangolva —, alkalmasak főkomponens detektálásra. A teljes IR spektrumon alapuló (és a GC-IR méréseknél igen sikeres) Gram-Schmidt rekonstrukciós kromatogramok regisztrálására irányuló próbálkozások a minta 4 mg/ml-es injektált koncentrációjánál sikertelenek voltak.

Felhasználva a “karbonil-kemigram”-okat, a tanulmányozott β -cipermetrin mintában lévő két fő diasztereomer kvantitatív meghatározása megfelelő linearitást mutatott a 0.3-4.0 mg/ml-es koncentrációtartományban. Az 1 mg/ml-es injektált koncentráció még a diaszteromerek spektrális megkülönböztetését is megengedő azonosítási határnak bizonyult, míg a legtöbb mobilfázis alkalmazása mellett a 0.3 mg/ml volt a vizsgált β -cipermetrinek detektálási határa. Az acetonitril/n-hexán mobilfázis esetében (ahol a kemigramcsúcs magasabb volt a többi mozgófázissal kapott csúcshoz képest) 0.1 mg/ml-nek becsültük a detektálási határt.

S bár az injektált koncentrációk, injektált térfogat, valamint a csúcsterületek és a spektrumok kinyeréséhez felhasznált részcsúcsterületek ismeretében kiszámítható lenne a mintakomponensek spektrumok által reprezentált mennyisége, munkánkkal (csak az *injektált* koncentrációk megadásával) a kromatográfiai igények kielégítésére törekedtünk: meghatároztuk, hogy egy valódi (és valószínűleg hígabb koncentrációjú), feltételezeten β -cipermetrint tartalmazó minta esetében milyen mértékű koncentrációt kell elvégezni ahhoz, hogy az analitikai rendszerű, folyadékcellával felszerelt HPLC-IR műszeregyüttessel a komponensek jelenlétét az IR spektrumok alapján bizonyítani/elvetni lehessen.

Ugyanakkor a fentiek értelmében az is megállapítható, hogy ha mérés előtti koncentráló lépés nélkül kívánjuk használni a HPLC-FTIR készülékegyüttest, akkor e műszerkombináció - figyelembevétel a módszer korlátait - bizonyos élelmiszeripari, környezetvédelmi és termékminősítési problémák megoldásában hasznos segítséget nyújthat az elválasztott komponensek azonosításában.

7. Összefoglalás

A Raman és IR spektroszkópia elválasztástechnikával kombinált lehetséges alkalmazásai közül TLC-Raman, TLC-SERS, valamint HPLC-IR alkalmazásokkal kapcsolatos vizsgálatokat végeztünk, s az alábbi eredményeket értük el.

I/A. TLC-Raman vizsgálatok:

I/A/1. Megállapítottuk, hogy a vizsgált hétféle esszenciális aminosav (Gly, Ala, Ser, Val, Pro, HO-Pro, Phe) különböző gerjesztőlézerek mellett kivitelezett TLC-Raman mérésekor a Nd:YAG lézer 1064 nm-es gerjesztésének határozott jel/zaj aránybeli és háttérszórásbeli előnye van a Raman mikroszkóp 532, 633 és 785 nm-es gerjesztőlézereivel szemben.

I/A/2. Megmutattuk, hogy a vizsgált gyenge Raman szórású tulajdonságú alifás aminosavak detektálása és azonosítása az 1064 nm-es gerjesztéssel kivitelezett FT-Raman spektroszkópia alkalmazása és spektrumadatbank-beli elektronikus keresés mellett 100 µg nagyságrendű mintamennyiséget igényel.

I/A/3. Rámutattunk arra, hogy a vizsgált TLC lapok közül a legkisebb háttérszórással a *Kieselgel 60* bír; az ezen adszorbeálódott aminosavak Raman spektrumai pedig meglehetősen nagy hasonlóságot mutatnak az olyan vizes oldatok Raman spektrumaival, ahol az oldat koncentrációja az adott aminosav oldhatóságával egyezik meg.

I/B. TLC-SERS vizsgálatok:

I/B/1. Megállapítottuk, hogy az aminosavak TLC foltjainak felületerősített Raman spektrumai (vagyis SERS spektrumai) a mintafolt tetejére cseppentett Ag-szol hozzáadásával és a mérés ideje alatti nedvesen tartás módszerével sikeresen előidézhetőek.

I/B/2. Megállapítottuk, hogy az elérhető erősítés mértéke 10- és 1000-szeres nagyságrend között van: legnagyobb az 532 nm-es, legkisebb pedig az 1064 nm-es gerjesztőlézer alkalmazása esetén.

I/B/3. A TLC-Raman és TLC-SERS mérések eredményeit összevetve rámutattunk arra, hogy a TLC-SERS spektrumok kevésbé alkalmasak a mintaazonosításra (különösen a Raman mikroszkóp mikroszkópikus inhomogenitásokra érzékeny nagy laterális felbontása mellett), mint azok a konvencionális Raman spektrumok, melyeket az 1064 nm-es gerjesztőlézerrel felszerelt (NIR) FT-Raman műszerrel lehet nyerni.

II. HPLC-IR adatok kemometriai kiértékelése

Az eluenselimináció nélküli HPLC-IR mérések kiértékelésének elősegítésére megvizsgáltuk bizonyos kemometriai módszerek alkalmazhatóságát.

II/1. A *szimulált* HPLC-IR adatok PARAFAC és PARAFAC2 kemometriai módszerek segítségével való felbontása során rámutattunk, hogy a tiszta (eluensmentes) kémiai komponensek spektrumait a PARAFAC2 módszer helyesen számítja ki; a referenciaspektrumoknak a számított spektrumokkal való egyezése 95-98 %-os. A kiszámított elúciósprofil és koncentrációsprofil, illetve ezek megfelelően képzett lineáris kombinációi, a szimulált IR kromatogramokkal szintén kielégítő egyezést mutattak.

II/2. A *mért* (molekuláris kölcsönhatásokat és mérési zajt is tartalmazó) HPLC-IR adatok esetében a PARAFAC2 módszer algoritmusát tovább kellett fejleszteni, és létrehoztuk az “Objective Subtraction of Solvent Spectrum with Iterative Use of PARAFAC2” (OSSS-IU-PARAFAC2) módszert.

II/3. A mért adatok OSSS-IU-PARAFAC2 módszerrel történő kiértékelésekor rámutattunk arra, hogy a kémiai komponensekhez tartozó spektrumokat a módszer helyesen szétválogatja, de az eluens matematikai eliminálása nem teljes. Az elúciósprofil és

koncentrációprofil, illetve ezek lineáris kombinációi, a mért IR kromatogramokkal megfelelő mértékű egyezést mutattak.

III. β -cipermetrin izomerek HPLC-IR vizsgálata

III/1. Kísérleteink demonstrálták, hogy az *analitikai* HPLC on-line összekapcsolása egy átfolyós folyadékcellán keresztül egy kutatási céloknak megfelelő minőségű FTIR spektrométerrel életképes módszert kínál a szerves kémiai termékek főbb komponenseinek elválasztással egybekötött detektálása és azonosítása számára.

III/2. A főárambeli szakirodalommal szemben megmutattuk, hogy a szokásos poláris módosítót tartalmazó kromatográfiás mobilfázisok a folyadékcellával összekötött HPLC-IR mérések során is használhatóak (bizonyos feltételek teljesülése mellett).

III/3. Megmutattuk, hogy HPLC-IR mérések esetében a kemigram-típusú IR kromatogramok (a GC-IR méréseknél egyébként igen sikeres) Gram-Schmidt rekonstrukciós kromatogramokkal szemben alkalmasabbak főkomponens detektálásra.

III/4. Megállapítottuk, hogy a kemigram típusú IR kromatogramok felhasználásával, a β -cipermetrin mintában lévő két fő diasztereomer kvantitatív meghatározása megfelelő linearitást mutat a 0.3-4.0 mg/ml-es koncentrációtartományban.

III/5. Megállapítottuk, hogy a diklórmétán/n-hexán, tetrahidrofurán/n-hexán, illetve izopropanol/n-hexán mobilfázis alkalmazása mellett a vizsgált β -cipermetrinek HPLC-IR detektálási határa 0.3 mg/ml, az acetonitril/n-hexán mobilfázis esetében pedig 0.1 mg/ml-re becsülhető.

III/6. Megállapítottuk, hogy a β -cipermetrin diaszteromerek spektrális megkülönböztetését is megengedő azonosítási határ 1 mg/ml-es injektált koncentrációnál van.

8. Summary

Among many possible applications of Raman and IR spectroscopy coupled with separation techniques, we have made examinations connected to TLC-Raman, TLC-SERS and HPLC-IR applications, and have achieved the following results.

I/A. TLC-Raman investigations:

I/A/1. Based on TLC-Raman measurements of seven essential amino acids (Gly, Ala, Ser, Val, Pro, HO-Pro, Phe), it has been established that excitation of the spectra with the 1064 nm Nd:YAG laser has definite background and Signal/Noise advantages over the 532, 633 and 785 nm excitations of a Raman microscope.

I/A/2. It has been shown that Raman detection and identification of weekly scattering aliphatic amino acids by FT-Raman spectroscopy (with the 1064 nm excitation) and computer assisted spectral search require sample amounts in the 100 µg range.

I/A/3. It has been pointed out that the *Kieselgel 60* type plate has the smallest background scattering among the examined TLC plates, and the Raman spectra of amino acids adsorbed on it are very similar to those of their aqueous solutions, where the concentration of solution is equal to the solubility of the amino acid.

I/B. TLC-SERS investigations:

I/B/1. It has been established that surface enhanced Raman spectra (*i.e.* SERS spectra) of TLC spots of amino acids can be generated by adding Ag-sol on top of the analyte spot and keeping the sample wet during the measurement.

I/B/2. It has been established that the magnitude of attainable enhancement is 10-1000 fold, greatest with the 532 nm exciting laser and smallest with the 1064 nm exciting laser.

I/B/3. Comparing the results of the TLC-Raman and TLC-SERS measurements, we have pointed out that the TLC-SERS spectra are less suitable for analyte identification (especially at high lateral resolution of a Raman microscope) than those conventional Raman spectra obtainable with a (NIR) FT-Raman instrument equipped with 1064 nm exciting laser.

II. Chemometric analysis of HPLC-IR data

In order to facilitate the interpretation of the results of HPLC-IR measurements done without eluent elimination, we have examined the applicability of certain chemometric methods.

II/1. In the course of analyzing *simulated* HPLC-IR data by chemometric methods, PARAFAC and PARAFAC2, it has been pointed out that PARAFAC2 can calculate spectra of the chemical compounds (that free from eluent) properly; the match index between the calculated and reference spectra is 95-98 %. The calculated time profile and concentration profile were recovered appropriately, and their proper linear combinations have also shown satisfactory agreement with the simulated IR chromatograms.

II/2. In case of measured HPLC-IR data containing molecular interactions and measurement noise, the algorithm of PARAFAC2 method had to be improved, and the “Objective Subtraction of Solvent Spectrum with Iterative Use of PARAFAC2” (OSSS-IU-PARAFAC2) method was developed.

II/3. Analysing measured HPLC-IR data by the OSSS-IU-PARAFAC2 method, it has been pointed out that the method separates spectra of chemical compounds properly, but elimination of the eluent is not complete. The linear combinations of the calculated time profile and concentration profile has shown satisfactory agreement with the measured IR chromatograms.

III. HPLC-IR investigation of β -cypermethrin isomers

III/1. It has been demonstrated that on-line coupling of *analytical* HPLC with a research grade FTIR spectrometer by means of a flow-through cell is a viable approach to major component detection and identification of organic chemical products.

III/2. In contrast to the related main-stream literature, it has been shown that the usual chromatographic mobile phases containing polar modifiers can also be used during flowcell-interfaced HPLC-IR measurements (under certain conditions).

III/3. It has been shown that chemigram-type IR chromatograms are more suitable for major component detection in HPLC-IR measurements than Gram-Schmidt reconstructed chromatograms (which is a highly successful method in GC-IR measurements).

III/4. It has been established that quantitative determination of the two major diastereomers in the β -cypermethrin sample using the chemigram type IR chromatogram shows good linearity in the concentration range from 0.3-4.0 mg/ml.

III/5. It has been established that the HPLC-IR detection limit for the β -cypermethrins examined is 0.3 mg/ml when dichloromethane/n-hexane, tetrahydrofuran/n-hexane or isopropanol/n-hexane mobile phase is applied, and it is estimated to be 0.1 mg/ml in case of acetonitrile/n-hexane mobile phase.

III/6. It has been established that HPLC-IR identification limit still allowing spectral discrimination of β -cypermethrin diastereomers is at an injected concentration of 1 mg/ml.

9. Irodalomjegyzék

- [1] I. S. Krull, R. L. Stevenson, K. Mistry, M. E. Swartz (Eds.), *Capillary Electrochromatography and Pressurized Flow Capillary Electrochromatography: An Introduction*, HNB Publishing (2000).
- [2] M.J.D. Low, S.K. Freeman, *Anal. Chem.*, **39**, 194 (1967).
- [3] K.L. Norton, A.J. Lange, P.R. Griffiths, *J. High Res. Chromatogr.*, **14**, 225 (1991).
- [4] D.W. Vidrine, D.R. Mattson, *Appl. Spectr.*, **32**, 502 (1978).
- [5] <http://www.labconnections.com/Model180.htm>.
- [6] R. Vonach, B. Lendl, R. Kellner, *Anal. Chem.*, **69**, 4286 (1997).
- [7] R. Vonach, B. Lendl, R. Kellner, *J. Chromatogr. A.*, **824**, 159 (1998).
- [8] H.R. Garner, H. Packer, *Appl. Spectrosc.*, **22**, 122 (1968).
- [9] J. M. Chalmers, M.W. Mackenzie, J.L. Sharp, R.N. Ibbett, *Anal. Chem.*, **59**, 415 (1987).
- [10] T. Iwaoka, S. Tsutsumi, K. Tada, F. Suzuki, *Sankyo Kenkyusho Nempo*, **40**, 39 (1988).
- [11] C.J. Percival, P.R. Griffiths, *Anal. Chem.*, **47**, 154 (1975).
- [12] M.M. Gomez-Taylor, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, **31**, 528 (1977).
- [13] M.P. Fuller, P.R. Griffiths, *Anal. Chem.*, **50**, 1906 (1978).
- [14] M.P. Fuller, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, **34**, 533 (1980).
- [15] L.B. Lloyd, R.C. Yeates, E.M. Eyring, *Anal. Chem.*, **54**, 549 (1982).
- [16] R.L. White, *Anal. Chem.*, **57**, 1819 (1985).
- [17] G.K. Bauer, K.A. Kovar, *J. Planar Chromatogr.*, **11**, 30 (1998).
- [18] G.E. Zuber, R.J. Warren, P.P. Begosh, E.L. O'Donnell, *Anal. Chem.*, **56**, 2935 (1984).
- [19] C. Fujimoto, T. Morita, K. Jinno, *J. Chromatogr.*, **438**, 329 (1988).
- [20] G. Glauniger, K.A. Kovar, V. Hoffman, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **338**, 710 (1990).
- [21] K.H. Shafer, J.A. Herman, H. Bui, *Am. Lab.*, **20**, 142 (1988).
- [22] T. Tajima, K. Ichimura, *Vib. Spectrosc.*, **3**, 211 (1992).
- [23] C.M. Harrys, *Anal. Chem.*, **74**, 87A (2002).
- [24] K.H. Shafer, P.R. Griffiths, *Anal. Chem.*, **55**, 1939 (1983).
- [25] P. Morin, M. Claude, J. Rosset, *J. Chromatogr.*, **407**, 87 (1987).
- [26] M.A. Healy, T.J. Jenkins, M. Poliakoff, *Trends Anal. Chem.*, **10**, 92 (1991).

- [27] M.W. Raynor, G.F. Shilstone, K.D. Bartle, A.A. Clifford, M. Cleary, B.W. Cook, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **12**, 300 (1989).
- [28] P. Morin, B. Beccard, M. Caude, R. Rosset, *J. High Res. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.*, **11**, 697 (1988).
- [29] J.H. Raymer, M. A. Moseley, E.D. Pellizzari, G.R. Velez, , *J. High Res. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.*, **11**, 209 (1988).
- [30] J. W. Hellgeth, J.W. Jordan, L.T. Taylor, M.S. Khorassani, *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 183 (1986).
- [31] M.A. Khorassani, L.T. Taylor, *Anal. Chem.*, **61**, 145 (1989).
- [32] S. Shah, L.T. Taylor, *J. High Res. Chromatogr.*, **12**, 599 (1989).
- [33] E.M. Calvey, R.E. McDonald, S.W. Page, M.M. Mossoba, L.T. Taylor, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 542 (1991).
- [34] P.R. Griffiths, A.M. Haefner, K.L. Norton, D.J.J. Fraser, D. Pyo, H. Makishima, *J. High Res. Chromatogr.*, **12**, 119 (1989).
- [35] K.L. Norton, A.J. Lange, P.R. Griffiths, *J. High Res. Chromatogr.*, **14**, 225 (1991).
- [36] K.L. Norton, P.R. Griffiths, *J. Chromatogr. A.*, **703**, 503 (1995).
- [37] http://www.casss.org/pd/pd_reviews3.htm.
- [38] J.L. Jarman, R.A. Todebush, J.A. de Haseth, *J. Chromatogr. A.*, **976**, 19 (2002).
- [39] J.L. Jarman, R.A. Todebush, J.A. de Haseth, *Anal. Chem.*, **75**, 1393 (2003).
- [40] E. Roth, W. Kiefer, *Appl. Spectrosc.*, **48**, 1193 (1994).
- [41] K.T. Carron, B.J. Kennedy, *Anal. Chem.*, **67**, 3353 (1995).
- [42] P.C. Chen, C.C. Joyner, S.T. Patrick, R.M. Royster, L.L. Ingham, *Anal. Chem.*, **75**, 3066 (2003).
- [43] H.G.M. Edwards, A.F. Johnson, I.R. Lewis, *J. Raman Spectrosc.*, **24**, 435 (1993).
- [44] *Chromatographic Characterization of Polymers, Advances in Chemistry Series*, Edited by T. Provder, M.W. Urban, H.G. Barth; Oxford University Press (1995).
- [45] M. D'Orazio, U. Schimpf, *Anal. Chem.*, **53**, 809 (1981).
- [46] T.D.N. Hong, M. Jouan, N.Q. Dao, M. Bouraly, F. Mantisi, *J. Chromatogr. A*, **743**, 323 (1996).
- [47] R. Steinert, H. Bettermann, K. Kleineremanns, *Appl. Spectrosc.*, **51**, 1644 (1997).

- [48] G.W. Somsen, S.K. Coulter, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.T. Brinkman, *Anal. Chim. Acta*, **349**, 189 (1997).
- [49] R.M. Seifar, M.A.F. Altelaar, R.J. Dijkstra, F. Ariese, U.A.T. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chem.*, **72**, 5718 (2000).
- [50] R.D. Freeman, R.M. Hammaker, C.E. Meloan, W.G. Fateley, *Appl. Spectrosc.*, **42**, 456 (1988).
- [51] R. Sheng, F. Ni, T.M. Cotton, *Anal. Chem.*, **63**, 437 (1991).
- [52] L.M. Cabalin, A. Ruperez, J.J. Laserna, *Anal. Chim. Acta*, **318**, 203 (1996).
- [53] R.J. Dijkstra, A.N. Bader, G.Ph. Hoornweg, U.A.T. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chem.*, **71**, 4575 (1999).
- [54] B.J. Marquardt, P.G. Vahey, R.E. Synovec, L.W. Burgess, *Anal. Chem.*, **71**, 4808 (1999).
- [55] R.J. Dijkstra, C.J. Slooten, A. Stortelder, J.B. Buijs, F. Ariese, U.A.T. Binkman, C. Gooijer, *J. Chromatogr. A*, **918**, 25 (2001).
- [56] A. Ruddick, D.N. Batchelder, K.D. Bartle, A.C. Gilby, G.D. Pitt, *Appl. Spectrosc.*, **54**, 1857 (2000).
- [57] S.K. Doorn, R.E. Fields, I.H. Hu, M.A. Hamon, R.C. Haddon, J.P. Selegue, V. Majidi, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 3169 (2002).
- [58] S.K. Doorn, M.S. Strano, M.J. O'Connell, E.H. Haroz, K.L. Rialon, R.H. Hauge, R.E. Smalley, *J. Phys. Chem. B*, **107**, 6063 (2003).
- [59] J. Von Czarnecki, H.W. Hiemesch, *Actual Chim.*, **4**, 55 (1980).
- [60] D.M. Adams, J.A. Gardner, *J. Chem. Soc. Perkin II.*, 2278 (1972).
- [61] J.P. Havenne, G. Vergroten, J. Charlier, Y. Moschetto, G. Fleury, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. C.*, **286**, 633 (1978).
- [62] J.P. Havenne, G. Vergroten, G. Fleury, *Proc. Int. Raman Spectrosc. 6th*, **2**, 518 (1978).
- [63] P. Fredericks, C. de Bakker, E. Martinez, *SPIE*, 1575 (1991) 468.
- [64] N.J. Everall, J.M. Chalmers, I.D. Newton, *Appl. Spectr.*, **46**, 597 (1992).
- [65] A. Rau, *J. Raman Spectrosc.*, **24**, 251 (1993).
- [66] J.P. Caudin, A. Beljebbar, G.D. Sockalingum, J.F. Angiboust, M. Manfait, *Spectrochim. Acta A*, **51**, 1977 (1995).
- [67] M. Fleischman, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.*, **26**, 163 (1974).

- [68] J.A. Creighton, *Spectroscopy of Surfaces*, R.J.H. Clark, R.E. Hester (Eds.), Wiley & Sons, p 39 (1988).
- [69] M. Moskovits, *Reviews of Modern Physics*, **57** (3), Part I., 783 (1985).
- [70] A. Otto, In M. Cardona, G. Güntherodt (Eds.), *Light Scattering in Solids IV*, Springer (1984).
- [71] T.M. Cotton, *Spectroscopy of Surfaces*, R.J.H. Clark, R.E. Hester (Eds.), Wiley & Sons, p 93 (1988).
- [72] S. Nie, S.R. Emory, *Science*, **275**, 1102, (1997).
- [73] E. Koglin, *J. Mol. Struct.*, **173**, 369 (1988).
- [74] S.A. Soper, T. Kuwana, *Appl. Spectrosc.*, **43**, 1180 (1989).
- [75] E. Horváth, J. Mink, J. Kristóf, *Mikrochim. Acta*, **14**, S745 (1997).
- [76] L. Kocsis, E. Horváth, J. Kristóf, R.L. Frost, Á. Rédey, J. Mink, *J. Chromatogr. A*, **845**, 197 (1999).
- [77] E. Horváth, Gz. Kátay, E. Tyihák, J. Kristóf, Á. Rédey, *Chromatographia*, **51**, S297 (2000).
- [78] Y. Wang, S.Y. Wang, Y.X. Zhao, G.F. Ren, F.L. Zi, *Spectrosc. Spect. Anal.*, **22**, 43 (2002).
- [79] J.Z. Zhang, Y. Wang, *Spectrosc. Spect. Anal.*, **23**, 67 (2003).
- [80] P. Matějka, J. Stávek, K. Volka, B. Schrader, *Appl. Spectrosc.*, **50**, 409 (1996)
- [81] N.J. Szabó, J.D. Winefordner, *Appl. Spectrosc.*, **51**, 965 (1997).
- [82] P.C. Lee, J. Meisel, *J. Phys. Chem.*, **86**, 3391 (1982).
- [83] J.A. Creighton, C.G. Blatchford, M.G. Albrecht, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **75**, 790 (1979).
- [84] K.L. Kizer, A.W. Mantz, L.C. Bonar, *Am. Lab.*, **7**, 85 (1975).
- [85] D.W. Vidrine, *J. Chromatogr. Sci.*, **17**, 477 (1979).
- [86] S. Wachholtz, H. Geissler, J. Bleck, *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 779 (1988).
- [87] C.C. Johnson, J.W. Hellgeth, L.T. Taylor, *Anal. Chem.*, **57**, 610 (1985).
- [88] J.W. Hellgeth, L.T. Taylor, *Anal. Chem.*, **59**, 295 (1987).
- [89] R.S. Brown, L.T. Taylor, *Anal. Chem.*, **55**, 723 (1983).
- [90] R.S. Brown, L.T. Taylor, *Anal. Chem.*, **55**, 1492 (1983).

- [91] C.C. Johnson, L.T. Taylor, *Anal.Chem.*, **56**, 2642 (1984).
- [92] C.C. Johnson, L.T. Taylor, *Anal.Chem.*, **55**, 436 (1983).
- [93] P.G. Amateis, L.T. Taylor, *Anal.Chem.*, **56**, 966 (1984).
- [94] D. Kuehl, P.R. Griffiths, *J. Chromatogr. Sci.*, **17**, 471 (1979).
- [95] C.M. Conroy, P.R. Griffiths, K.Jinno, *Anal.Chem.*, **57**, 822 (1985).
- [96] K.S. Kalasinsky, J.A.S. Smith, V.F. Kalasinsky, *Anal.Chem.*, **57**, 1969 (1985).
- [97] K. Jinno, C. Fujimoto, Y. Hirata, *Appl. Spectrosc.*, **36**, 67 (1982).
- [98] C. Fujimoto, T. Oosuka, K. Jinno, *Anal. Chim. Acta*, **178**, 159 (1985).
- [99] G.W. Somsen, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, *Journal of Chromatogr. A*, **811**, 1 (1998).
- [100] M.W. Raynor, K.D. Bartle, B.W. Cook, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **15**, 361 (1992).
- [101] J.J. Gagel, K. Biemann, *Anal. Chem.*, **59**, 1266 (1987).
- [102] Lab Connections Inc., Marlborough, MA, USA.
- [103] Bourne Scientific Inc., Acton, MA, USA.
- [104] X. Liu, D.K. Ryan, *Environmental Tech.*, **18**, 417 (1997).
- [105] S.H. Smidht, S.L. Jordan, L.T. Taylor, J. Dwyer, J. Willis, *J. Chromatogr. A*, **764**, 295 (1997).
- [106] M. Ashraf-Khorassani, M.T. Combs, L.T. Taylor, J. Willis, X.J. Liu, C.R. Frey, *Appl. Spectrosc.*, **51**, 1791 (1997).
- [107] S.J. Kok, N.C. Arentsen, P.J.C.H. Cools, Th. Hankemeier, P.J. Schoenmakers, *J. Chromatogr. A*, **948**, 257 (2002).
- [108] J.C. Jones, D. Littlejohn, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, **53**, 792 (1999).
- [109] M. Sano, *Chromatography*, **21**, 338 (2000).
- [110] J.M. Treubig Jr., P.R. Brown, *J. Chromatogr. A*, **960**, 135 (2002).
- [111] Y. Li, P. R. Brown, *J. Chromatogr. Sci.*, **41**, 96 (2003).
- [112] W.R. LaCourse, C.O. Dasenbrock, *Anal.Chem.*, **70**, 37R (1998).
- [113] G.W. Somsen, T. Visser, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Ed.), Wiley & Sons Ltd., p 10837, (2000).
- [114] K.S. Kalasinsky, V.F. Kalasinsky, *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, J.M. Chalmers, P.R. Griffiths (Eds.), Wiley & Sons Ltd., p 1641, (2002).

- [115] M. Kolhed, P. Hinsmann, P. Svasek, J. Frank, B. Karlberg, B. Lendl, *Anal. Chem.*, **74**, 3843 (2002).
- [116] A. Edelmann, J. Diewok, J.R. Baena, B. Lendl, *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**, 92 (2003).
- [117] A. Edelmann, C. Ruzicka, J. Frank, B. Lendl, *J. Chromatogr. A*, **934**, 123 (2001)
- [118] M. Kolhed, P. Hinsmann, B. Lendl, B. Karlberg, *Electrophoresis*, **24**, 687 (2003).
- [119] G.Kowalik, K. Rogosz, T. Kowalska, *J. Am. Off. Anal. Chem. Assoc. Int.*, **82**, 297 (1999).
- [120] G.Kowalik, K. Rogosz, T. Kowalska, *J. Planar Chromatogr.*, **13**, 384 (2000).
- [121] A. Mortensen, D.H. Christensen, O.F. Nielsen, *J. Raman Spectrosc.*, **24**, 667 (1993).
- [122] Y. Chen, J. Hyldtoft, C.J.H. Jacobsen, O.F. Nielsen, *Spectrochim. Acta*, **51A**, 2161 (1995).
- [123] M.J. Deveney, A.G. Walton, J.L. Koenig, *Biopolymers*, **10**, 615 (1971).
- [124] L. Kocsis, E. Horváth, J. Kristóf, R.L. Frost, Á. Rédey, J. Mink, *J. Chromatogr. A*, **845**, 197 (1999).
- [125] R.P. Cooney, T.P. Mernagh, M.R. Mahoney, J.A. Spink, *J.Phys.Chem.*, **87**, 5314 (1983).
- [126] K.Okada, S. Komatsu, T. Ishigaki, S. Matsumoto, Y. Moriyoshi, *Appl. Phys.*, **60**, 959 (1992).
- [127] F. Li, S.J. Lannin, *Appl. Phys. Lett.*, **61**, 2116 (1992).
- [128] N.J. Szabo, J.D. Winefordner, *Appl. Spectrosc.*, **51**, 965 (1997).
- [129] I.R. Nabiev, V.A. Savchenko, E.S. Efremov, *J. Raman Spectrosc.*, **14**, 375 (1983).
- [130] S.Emory, W.E. Haskins, S. Nie, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8009 (1998).
- [131] R.C. Weast, D.R. Lide, M.J. Astle, W.H. Beyer (Eds.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 70th edition, CRC Press (1989).
- [132] Merck katalógus 2000/2001.
- [133] Fluka katalógus 2000/2001.
- [134] Alfa Aesar katalógus (High Purity Inorganics) 2002/2003.
- [135] The Mathworks Inc., MATLAB®, Version 6.1. (R12.1), Natick, MA, 2000.
- [136] Wise BM, Gallagher NB, Bro R, Shaver JM, *PLS_Toolbox 3.0 for use with MATLAB™*, Eigenvector Research, Manson, WA, 2002.

- [137] Borosy A. P., Héberger K., Horvai Gy., Kolossváry I., Lengyel A., Paksy L., Rajkó R., Szepesváry P., *Sokváltozós adatelemzés (Kemometria)*, Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Budapest, 2001.
- [138] R. Rajkó, K. István, G. Keresztury, *J. Chemometr.*, (2004), to be published
- [139] K. István, R. Rajkó, G. Keresztury, *Anal. Chim. Acta*, (2004), to be published
- [140] P.R. Griffiths, J.A. de Haseth (Eds.), *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, Wiley & Sons (1986), p 600.
- [141] J.W. Hellgeth, L.T. Taylor, *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 519 (1986).

10. Az értekezés alapját képező és egyéb publikációk

10.1. Az értekezés alapját képező közlemények, előadások

Közlemények:

1. **K. István**, G. Keresztury:
TLC-Raman and TLC-SERS measurements of compounds containing amino and carboxyl groups
Proceedings of XVIIIth International Conference on Raman spectroscopy, p.313, 2002
2. **K. István**, G. Keresztury, A. Szép:
Normal Raman and surface enhanced Raman spectroscopic experiments with thin layer chromatography spots of essential amino acids using different laser excitation sources
Spectrochim. Acta., **59A**, 1709-1723, 2003
3. **K. István**, G. Keresztury, J. Fekete:
A normal phase HPLC/FT-IR detection and identification of β -cypermethrins by the Flow-Through Cell method: advantages and limitations
J. Liq. Chromatogr. R.T., XXX, YYY-YYY, 2004 (közlésre elfogadva)
4. **K. István**, R. Rajkó, G. Keresztury:
Towards the solution of the eluent elimination problem in HPLC-IR measurements by chemometric methods
Anal. Chim. Acta, 2004 (közlésre beküldve)

Előadások:

1. **István K.**, Keresztury G.:
Aminosavak detektálása kromatográfiás vékonyrétegeken FT-Raman spektroszkópiai módszerekkel
MTA IV. Doktori Kémiai Iskola, Mátraháza, 2001. május 20-22.
2. **K. István**, G. Keresztury:
Detecting amino acids on TLC plates by FT-Raman spectroscopy?
1st International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, Turku, Finland,
19-24 Aug., 2001; Poster No.: P14.172
3. **K. István**, G. Keresztury:
TLC-Raman and TLC-SERS measurements of compounds containing amino and carboxyl groups
VIIIth International Conference on Raman Spectroscopy, Budapest, Hungary,
25-30 Aug., 2002; Poster No.: 70/M
4. **István K.**, Rajkó R., Keresztury G.:
A HPLC/FT-IR csatolt rendszer működési elvei, problémák és a potenciális megoldás(ok)
46. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés, Szeged, 2003. jún. 30 – júl. 2.
5. **K. István**, R. Rajkó, G. Keresztury:
Working principles of an HPLC/IR system: problems and a possible solution to obtaining useful analytical information
Advances in Chromatography and Electrophoresis-Conferentia Chemometrica, Budapest, Hungary, 27-29 Oct., 2003, Poster No.: P13
6. R. Rajkó, **K. István**, G. Keresztury:
Towards the solution of the solvent/eluent problem in HPLC/IR (FTC) determination by chemometric methods
Advances in Chromatography and Electrophoresis-Conferentia Chemometrica, Budapest, Hungary, 27-29 Oct., 2003, Poster No.: P57
7. R. Rajkó, **K. István**, G. Keresztury:
Towards the solution of the solvent/eluent problem in HPLC/IR (FTC) determination by chemometric methods
VI. Nemzetközi Élelmiszertudományi Konferencia, Szeged, 2004. máj.21-22., No.: 22
8. Rajkó R., **István K.**, Keresztury G.:
HPLC/FT-IR mérések és kemometriai szemléletű megoldásuk
47. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés (Vegyészkonferencia 2004), Balatonföldvár, 2004. jún. 30-júl. 2.

9. R. Rajkó, **K. István**, G. Keresztury:
Another look at the self-modeling curve resolution (SMCR) of spectral data
9th Chemometrics in Analytical Chemistry, Lisbon, Portugal, 20-23 Sept., 2004,
Poster Session 3, [Abstract 153].

10.2. Az értekezéssel kapcsolatos közlemények

1. R. Rajkó, **K. István**, G. Keresztury:
Analytical solution for determining feasible regions of Self-Modeling Curve Resolution (SMCR) method based on computational geometry
J. Chemometr., 2004 (közlésre beküldve)

10.3. További közlemények, előadások

Közlemények:

1. C.Y. Panicker, H.T. Varghese, A. John, D. Philip, **K. Istvan**, G. Keresztury:
FT-IR, FT-Raman and SERS spectra of 4-aminosalicylic acid sodium salt dihydrate
Spectrochim. Acta, **58A**, 281-287, 2002
2. **K. István**, G. Keresztury, O. Berkesi, T. Sundius:
The DFT force field of acetate ion – difficulties encountered with the SQM approach
Proceedings of XVIIIth International Conference on Raman spectroscopy, p.113, 2002
3. G. Keresztury, T. Sundius, **K. István**:
Applicability of the SQM force field to the vibrational spectra of sodium acetate
Proceedings of the XXXVII Annual Conference of the Finnish Physical Society, p. 71, 2003
4. G. Keresztury, S. Holly, **K. István**, T. Sundius, T. Lóránd:
Analysis of vibrational spectra of some new E- and Z-4-arylidene-3-isochromanones
Part2. Isomers and conformers of the 2'-pyrrolyl and 2'-nitrophenyl derivatives
J. Biochem. Bioph. Meth., **61**, 107-118, 2004
5. G. Keresztury, **K. István**, T. Sundius:
Applicability of the SQM force field method to the vibrational spectra of charged molecules – I. sodium acetate
J. Phys. Chem., (közlésre beküldve)

Előadások:

1. **K. István**, G. Keresztury, O. Berkesi, T. Sundius:
Vibrational spectra and force field of acetate ion – difficulties encountered with the SQM approach
VIIIth International Conference on Raman Spectroscopy, Budapest, Hungary,
25-30 Aug., 2002; Poster No.: 13/M
2. **K. István**, G. Keresztury, O. Berkesi, T. Sundius:
Vibrational spectra and force field of acetate ion – difficulties encountered with the SQM approach
XXVIth European Congress on Molecular Spectroscopy, Villeneuve d'Ascq, France,
1-6 Sept., 2002; Poster No.: P14.19
3. G. Keresztury, M. Rogojerov, **K. István**, and B. Jordanov:
Advances in determination of transition moment directions by IR-LD spectroscopy and computational methods
XXVIth European Congress on Molecular Spectroscopy, Villeneuve d'Ascq, France,
1-6 Sept., 2002; Poster No.: P14.18
4. J. Halász, **K. István**, I. Ráthonyi, Z. Kónya:
Identification of active centers of Sb-Sn-V oxide catalysts by FT-IR and Raman spectroscopy
XXVIth European Congress on Molecular Spectroscopy, Villeneuve d'Ascq, France,
1-6 Sept., 2002
5. G. Keresztury, T. Sundius, **K. István**:
Applicability of the SQM force field to the vibrational spectra of sodium acetate
XXXVII Annual Conference of the Finnish Physical Society, Helsinki, Finland,
20-22 March, 2003

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek **Dr. Keresztury Gábornak** és **Dr. Halász Jánosnak**, hogy lehetővé tették számomra, hogy nyugodt körülmények között végezhessem munkámat; Lejtoviczné Egyed Orsolyának és Dr. Holly Sándornak, hogy a gyakorlati munkám során felmerülő kérdéseimre mindig készségesen és türelemmel válaszoltak.

Köszönet illeti mindazokat, akik eszközökkel, anyagokkal segítették kísérleti munkámat: Forgácsné Tóth Esztert, Dr. Riedl Zsuzsannát (HPLC készülék kölcsönzése), Pajer Károlyt, Szerecz Ferencet, Szegedi Ágneszt, Dr. Horváth Erzsébetet és a Ubichem Kutató Kft-t.

Publikációim, és e dolgozat sem jöhetett volna létre, ha a dolgozat témáját illető munkámat nem egészíti ki legjobb tudása szerint Szép Andrea (diszperzív Raman spektrometriai mérések támogatása) és Rajkó Róbert (kemometriai módszerek és fejlesztésük).

Végül, de nem utolsó sorban, a rezgési spektroszkópa területén nyújtott kiemelkedő szakmai-szellemi segítségét köszönöm Dr. Keresztury Gábornak, a kiemelkedően hatékony kromatográfiai útmutatásait pedig **Prof. Fekete Jenőnek**.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.