

# Overlappende toppe i kromatografi

Inden vi afrunder multivejsmetoderne, skal vi lige se på en sidste anvendelse, der får stigende betydning inden for metabolomics og beslægtede områder. Det drejer sig om at adskille overlappende kromatografiske toppe, når man har spektral detektion.

Af Rasmus Bro, Søren Balling Engelsen, Institut for Fødevarevidenskab, Københavns Universitet og Lars Nørgaard, FOSS

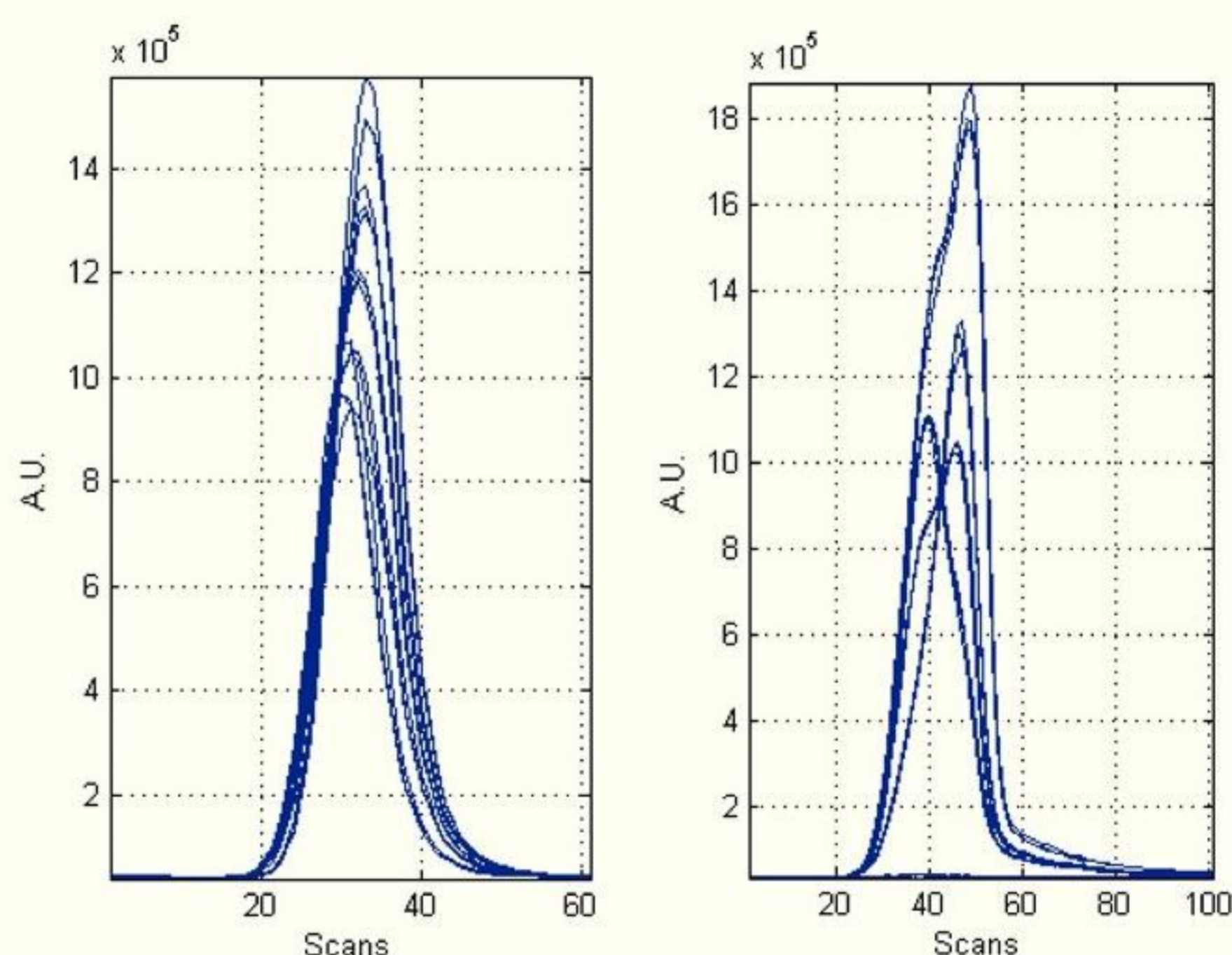
Kromatografi er en ualmindelig vigtig analytisk teknik med et utal af anvendelser. En kromatografisk analyse adskiller ideelt en prøve i sine enkeltbestanddele og gør det muligt at identificere og specielt kvantificere mængden af de kemiske komponenter.

Nogle gange sker det, at to stoffer ikke lader sig adskille. Det kan være, fordi prøven er meget kompleks eller fordi man kører såkaldt untargeted profiling, hvor man ikke optimerer metoden efter én specifik komponent, men i stedet prøver at bestemme alle stoffer lige godt. Dette anvendes eksempelvis i metabolomics og mere eksplorative studier, hvor man ikke på forhånd ved hvilke komponenter, der er vigtige.

I det følgende antager vi, at vi anvender en form for spektral detektion såsom massespektrometri eller UV-Vis-detektion. Så længe to overlappende stoffer ikke har eksakt samme elueringsprofil og ej heller samme spektrum, så er det faktisk muligt at adskille overlappende toppe matematisk. Denne egenskab gør, at kemikeren kan have mindre fokus på den kromatografiske resolution og i stedet rette opmærksomheden mod reproducerbarheden. Den efterfølgende matematiske resolution skal også tages med i billedet, hvorved der viser sig en række nye muligheder. En kromatografisk analyse er typisk meget tidskrævende, netop for at opnå høj kemisk opløsning. Når dette ikke længere er et ultimativt krav, kan man i stedet fokusere på en hurtig kemisk analyse med deraf følgende fordele som f.eks. højere reproducerbarhed.

## PARAFAC er langt bedre end standardsoftware

I figur 1 ses to eksempler på elueringsprofiler (TIC – Total Ion Count) af en række prøver. I begge eksempler er der to stoffer, hvis elueringsprofiler overlapper fuldstændig. Specielt i højre figur er det nærmest umuligt at skelne to toppe. Og da stofferne (diacetyl og 2-pentanon) har næsten ens massespektre, er det nærmest håbløst at skelne stofferne ad traditionel vej. Men da man har adgang til måling af mange prøver, over mange elueringstider med tilhørende massespektre, så er der tale om et trevejsdatasæt (prøver  $\times$  tider  $\times$  m/z). Ydermere, så vil PARAFAC være en passende model. Hvert stof har et karakteristisk massespektrum og en karakteristisk kromatografisk elueringsprofil. Og fordobles koncentrationen, så fordobles signalet. Der er altså tale om linearitet og additivitet ligesom eksempelvis i fluorescensspektroskopi. I stedet for emissions- og excitationsspektre, er der blot tale om elueringsprofil og massespektrum.



Figur 1. (venstre) elueringsprofil (TIC) af 3-metylbutanol og 2-metylbutanol og (højre) diacetyl og 2-pentanon. Begges GC-MS profiler kan håndteres af PARAFAC, mens traditionel software ville have problemer, specielt i eksemplet til højre. Figur modificeret fra [2].

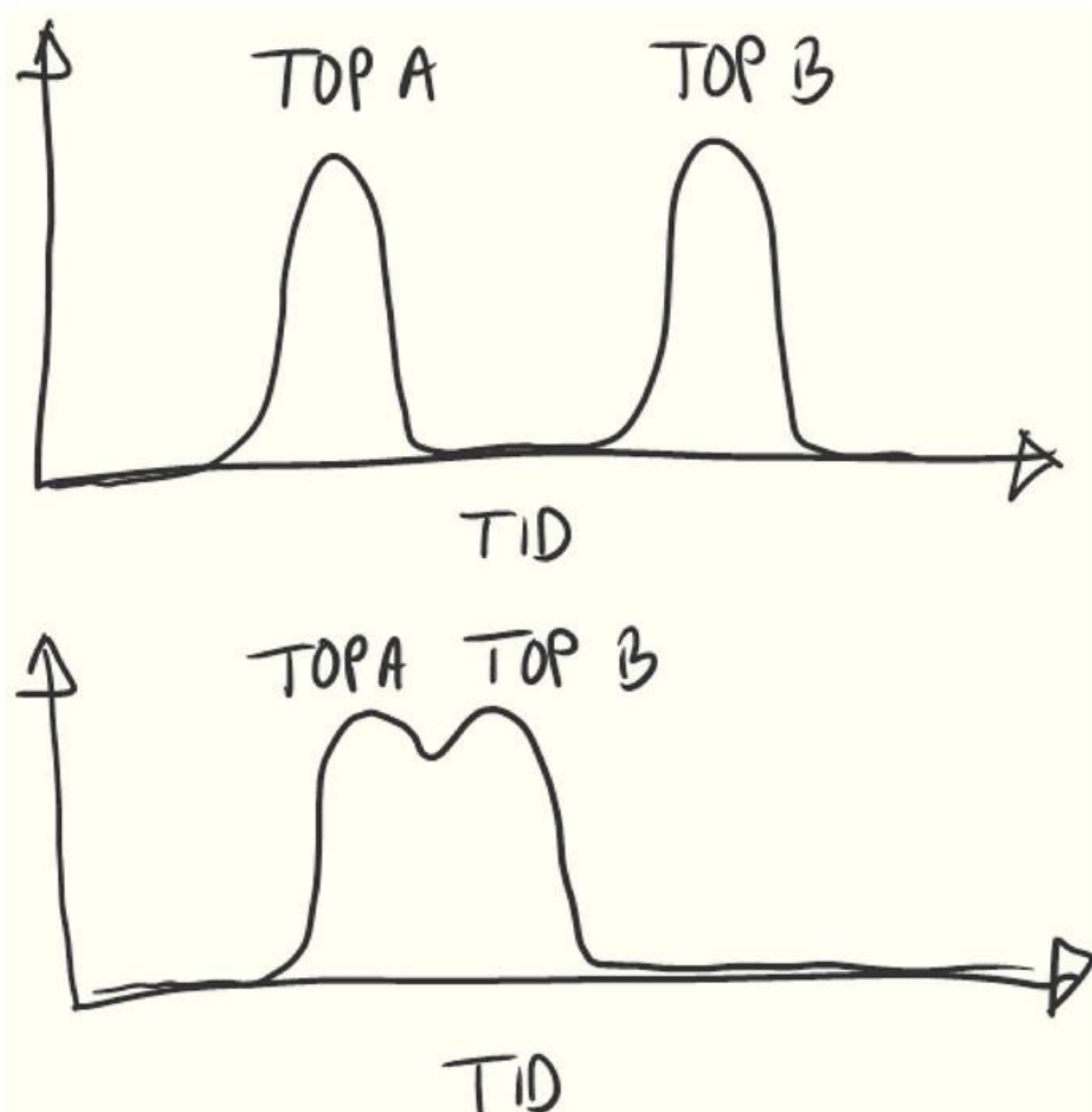
I artiklen, hvor disse kromatografiske data blev præsenteret [3], blev der beregnet to-komponent PARAFAC-modeller på data. PARAFAC kunne adskille og kvantificere uanset, at den kommercielle software kun var i stand til at adskille overlappende toppe i visse tilfælde. PARAFAC er således et meget stærkt redskab til at håndtere overlappende toppe.

## Kromatografiske profiler er sjældent ideelle

Desværre er der en vigtig forudsætning for, at man kan anvende PARAFAC. Det ligger indbygget i PARAFAC-modellen, at eksempelvis spektret af pentanon skal være det samme i alle prøver. Hver gang pentanon findes i en prøve, vil PARAFAC modellere dette spektrum med samme form. Denne forudsætning er normalt opfyldt, men på fuldstændig analog vis skal elueringsprofilen *også* have samme form i alle prøver. Det vil altså sige, at hvis pentanon eluerer efter tyve minutter i en prøve, ja så skal den eluere efter tyve minutter *hver* gang.

Denne forudsætning er et stort problem for kromatografiske anvendelser, for meget ofte forekommer variation i elueringstider fra prøve til prøve. Det gælder specielt, hvor der er store forskelle kemisk imellem prøverne, eller hvor prøver måles over mange dage (kolonneslid). Der er forskellige løsninger på dette problem. Den simpleste løsning kan være at *aligne* eller *warpe* signalet (se klumme Dansk Kemi, 9 og 10, 2010). Alignment kan flytte elueringsprofilerne, således at pentanon eluerer

præcis efter tyve minutter i hver eneste prøve. På den måde kan man forbehandle sine kromatografiske data, så PARAFAC efterfølgende kan anvendes.



Figur 2. Øverst et kromatogram med to toppe. Nederst en tilsvarende prøve, men nu lapper de to stoffer over.

### Tæt på umuligt

Desværre kan der opstå en situation, hvor to toppe overlapper i nogle prøver, men ikke gør det i andre (se figur 2). Af kemiske eller andre årsager kan en situation opstå, hvor forskellige toppe i kromatogrammet ikke rykker sig lige meget. Det er et problem, fordi alignment kun kan korrigerer data, hvis alle toppe rykker sig analogt. Man kan ikke korrigerer to overlappende toppe til at være ikke-overlappende og vice versa. Dermed er det umuligt at håndtere problemet ad den vej.

### Outro

I næste klumme skal vi se på en videreudvikling af PARAFAC-modellen som rent faktisk kan håndtere alle de ovenstående problemer, og som har vist sig som et meget værdifuldt redskab til håndtering af komplekse kromatografiske data.

### E-mail-adresser

Rasmus Bro: rb@life.dk.

Søren Balling Engelsen: se@life.ku.dk

Lars Nørgaard: LNO@foss.dk

### Referencer

1. J. M. Amigo, T. Skov, J. Coello, S. MasPOCH, R. Bro. Solving GC-MS problems with PARAFAC2. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 27 (8):714-725, 2008.
2. D. Ballabio, Thomas Skov, R. Leardi, R. Bro. Classification of GC-MS measurements of wines by combining data dimension reduction and variable selection techniques. *Journal of Chemometrics* 22:457-463, 2008.
3. T. Skov, R. Bro. Solving fundamental problems in chromatographic analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390:281-285, 2008.



Nyt om ...

## ... Sulfilimin, en ny binding i biologien

Collagen-netværk er gammelkendte som fundament i membraner. Disse netværk holder sammen på vævene. Hvordan de gør det har længe været en gåde. Man vidste, at der var nogle cross-links og troede længe, at de bestod af disulfidbroer  $-S-S-$ ; men det er nu vha. Fourier-transform-ion cyclotron resonansmassespektrometri kombineret med NMR-spektrometri lykkedes at vise, at cross-linkene dannet mellem hydroxylysin og methionin består af en hidtil ukendt bindingstype i biologien indeholdende en l4-sulfanimingruppe  $-N=S<$  (af CAS kaldet en "sulfilimin").

Carl Th.

1. A Sulfilimine Bond Identified in Collagen IV, *Science* 325, 2009, side 1230

