



## Methodieken

**Het tweede en afsluitende deel over diode array detectie**

### III. Toepassingsmogelijkheden van DAD.

Het doel van het opnemen van een spectrum van een chromatografische piek is uiteraard het vaststellen van de identiteit van deze piek en daarnaast ook het vaststellen van de piekzuiverheid. Om dit te kunnen doen is het nodig om een verzameling spectra beschikbaar te hebben, dus een spectrale bibliotheek. Tot nu toe werden spectrale bibliotheken betrekkelijk weinig gebruikt, omdat:

- UV spectra van veel componenten weinig structurele informatie geven in verhouding tot bv een IR.
- UV spectra sterk afhankelijk zijn van de mobiele fase (pH).
- matrix effecten van monsters kunnen interfereren met het spectrum van een component.

Toch kan men, ondanks deze beperkingen goed gebruik maken van deze spectrale bibliotheken, indien men de omstandigheden waaronder de spectra zijn opgenomen goed definieert en constant houdt.

Er zijn diverse methoden om spectra met elkaar te vergelijken. De eenvoudigste manier is het over elkaar heen leggen van twee spectra.

Hierbij is het nodig dat eerst genormaliseerd wordt. Dit houdt in dat het hoogste absorptiemaximum van beide spectra gelijkgesteld wordt aan volle schaal gevoeligheid. Als de spectra precies over elkaar heen vallen, is hiermee de identiteit vastgesteld. Toch blijft deze manier van vergelijken erg subjectief en daarom zijn er diverse statistische methoden voor rekenkundige spectraverelijking ontwikkeld, welke door de verschillende fabrikanten worden toegepast in hun apparatuur. Bij deze methoden wordt een getal berekend, welke aangeeft in welke mate twee spectra overeenkomen. Hieronder worden een aantal berekeningen aangegeven; hierbij wordt niet verder ingegaan op de afleiding van de onderstaande formules.

1. Vergelijking van ratio's bij meerdere golflengten tussen twee spectra. Bij deze methode berekent men de ratio's bij negen golflengten (210-220-230-.....290 nm). De "match" faktor wordt berekend door de hoogste ratio te delen door de laagste ratio.  
 "match" faktor 1-1.3 : identieke spectra.  
 "match" faktor > 3 : zeer duidelijk verschillende spectra.  
 Een voordeel van deze methode is, dat deze zeer eenvoudig, eventueel zelfs handmatig uit te voeren is.

2. Eén van de bekendste manieren om spectra te vergelijken is dmv het berekenen van de correlatiecoëfficiënt tussen twee spectra (methode van de kleinste kwadraten).

"match" factor =

$$\frac{10^3 \times \{ (\sum x \times y - (\sum x \times \sum y) / i) \}^2}{\{ \sum x^2 - \frac{(\sum x \times \sum x)}{i} \} \times \{ \sum y^2 - \frac{(\sum y \times \sum y)}{i} \}}$$

Spectrum A  
 x1, x2, x3, x4, .....xi  
 Spectrum B  
 y1, y2, y3, y4, .....yi

"match" faktor > 990 identieke spectra.  
 "match" faktor < 900 duidelijk verschillende spectra.  
 Het voordeel van deze methode is

dat het een goede nauwkeurige vergelijking van spectra mogelijk maakt en rekenkundig waarschijnlijk de beste methode is. Het nadeel is dat de methode zeer bewerkelijk is (veel rekenwerk).

3. Similarity index / Dissimilarity index :

Bij deze vergelijkingsmethode wordt de cosinus/sinus berekend van de hoek, die de raaklijnen aan de spectra met elkaar maken. De spectra worden hierbij beschouwd als vectoren.

$$\text{Similarity} = \frac{\sum x_i \times y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \times \sum y_i^2}} = \cos \theta$$

$$\text{Dissimilarity} = \sin \theta = \sqrt{1 - \cos^2 \theta}$$

Hoe dichter de similarity index bij de 1 ligt en hoe dichter de dissimilarity index bij 0 ligt, des te beter komen de spectra overeen. Bij kleine verschillen tussen twee spectra, is het vooral de dissimilarity index die snel een duidelijke afwijking van 0 te zien geeft en daardoor een betere vergelijkingsparameter is dan de similarity index.

4. Goodness of Fit :

De Goodness of Fit is weer een zeer eenvoudig te berekenen faktor. Voorwaarde is evenwel dat eerst genormaliseerd wordt door de som van alle datapunten gelijk te stellen aan 1.

Spectrum A  
 x1, x2, x3, x4, .....xi       $\sum x_i = 1$   
 Spectrum B  
 y1, y2, y3, y4, .....yi       $\sum y_i = 1$

$$GF = \frac{2 - \sum |x_i - y_i|}{2}$$

Hoe dichter de GF bij 1 ligt des te beter komen de spectra overeen.

5. Root Mean Square :

Ook bij deze methode moet eerst genormaliseerd worden door de som

van alle datapunten gelijk aan 1 te stellen. De verschillen tussen de x- en y-waarden worden gekwadraterd en gesommeerd. Uit dit getal wordt de wortel getrokken.

Spectrum A  
 $x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_i$      $\Sigma x_i = 1$   
 Spectrum B  
 $y_1, y_2, y_3, y_4, \dots, y_i$      $\Sigma y_i = 1$

$$RMS = \sqrt{\sum (x_i - y_i)^2}$$

Dit is, evenals de dissimilarity index, een zeer gevoelige vergelijkingsparameter en geeft bij kleine afwijkingen tussen de spectra een duidelijke afwijking van 0.

#### 6. Purity parameter :

De Purity parameter is niet een vergelijkingsfaktor tussen twee spectra. Het is een getal, dat iets zegt over één bepaald spectrum. Dit getal is de gewogen gemiddelde golflengte over een bepaald golflengte gebied van het spectrum. Door bij deze weging van de golflengte, de absorptie te kwadrateren, wordt dit getal het sterkst beïnvloed door het hoogste absorptiemaximum en komt hierbij in de buurt te liggen. Als men de Purity parameters van twee spectra vergelijkt, vergelijkt men dus twee getallen met elkaar. Hierdoor is de Purity parameter ook zeer geschikt om in grote spectrabibliotheken op een snelle manier een voorselectie te maken.

$$PUP = \frac{\sum x_i^2 \times i}{\sum x_i^2}$$

$x_i$  = absorptie bij golflengte  $i$   
 $i$  = golflengte.

Factoren die de "match" faktor beïnvloeden :

#### Absorbance threshold.

Wanneer spectra vergeleken worden over een golflengte gebied waar beide geen

absorptie vertonen, resulteert dit in een hoge "match" faktor. Dit is juist niet de bedoeling, aangezien dit gebied niet erg karakteristiek is.

Daarom moet een "threshold" worden ingesteld : alleen punten boven een ingesteld absorptienivo worden meegenomen. Als aanbevolen threshold level geldt een instelling van 3 tot 6 maal de spectrale ruis.

#### Spectrale ruis.

De betrouwbaarheid van een vergelijking neemt snel af als de spectrale ruis groter wordt. Uit experimenten blijkt dat een relatief ruisnivo van 2% tov het absorptiemaximum geen significante invloed heeft op de "match" faktor. Bij het gebruik van ruis filters (smoothing) kan dit nog een faktor 2 (=ruisnivo 4%) beter worden. Echter hoe groter de filterbreedte, des te groter de kans dat de fijne structuur van een spectrum verloren gaat.

#### Matrix absorptie.

Met biologische monsters is er altijd een mogelijkheid dat matrix componenten storen. De invloed hiervan is moeilijk te bepalen, omdat het spectrum van een stoorcomponent niet bekend is. Vaak kan een matrixeffect geëlimineerd worden door van het spectrum op de piek-top, het spectrum van de voor- of achterkant af te trekken, voordat spectra vergeleken worden.

Er zijn tegenwoordig diode array detectoren met software in de handel, die na een chromatografische run, een rapport produceren waarbij de pieken niet alleen op grond van hun retentietijd maar ook op grond van hun spectrum worden geïdentificeerd. In een kleine spectrumbibliotheek worden de bij deze analyse behorende spectra opgeslagen. Na de run wordt gezocht of deze pieken in het chromatogram voorkomen. Tevens wordt dan de piekzuiverheid aangegeven.

Bij de bepaling van piekzuiverheid heeft men in feite te maken met een bijzonder geval van spectravergelijking, aangezien men bij deze procedure meestal het spectrum aan de voorkant van een piek vergelijkt met het spectrum aan de achterkant van een piek. Hierop kunnen weer dezelfde wiskundige bewerkingen worden toegepast als bij de normale vergelijking van twee spectra.

Wanneer men in geval van toxicologisch onderzoek naar een onbekende stof gaat zoeken in een groot bestand zal het

zoeken veel te lang duren als men de stoffen één voor één gaat vergelijken. Hiervoor is het noodzakelijk dat men een ruwe voorscheiding maakt. Dit kan op diverse manieren :

- door een retentietijdwindow in te geven en/of
- zoeken op een relatief eenvoudig te bepalen parameter van het spectrum zoals ratio tussen twee golflengten of PuP(zie boven).

Vervolgens kan uit de geselecteerde spectra met één van de eerdere genoemde berekeningsmethoden bepaald worden welk spectrum het best overeen komt.

Het is duidelijk dat de Diode Array Detectie, in combinatie met HPLC en de juiste software, nu al grote voordelen biedt t.o.v de UV-detector

- meer informatie over monstersamenstelling.
- grotere betrouwbaarheid analyses door controle piekzuiverheid.

- diverse mogelijkheden op het gebied van toxicologie.
- ontwikkeling nieuwe analyses.
- onderzoek naar ontledingsprodukten (houdbaarheidsonderzoek).

Het valt te verwachten dat de toepassing van de Diode Array Detectie in de toekomst nog vele ongekende mogelijkheden zal bieden.

Berend Sikkema.  
Apotheek Nij Smellinghe.  
Drachten.