

Anden-ordens kalibrering – et paradigme-skift i analytisk kemi

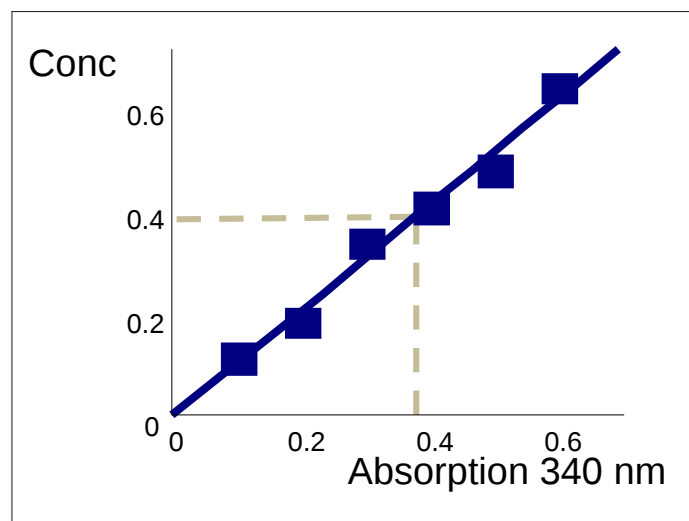
Med trevejs-data kan man lave kalibreringsmodeller, som er mere generelle og anvendelige end traditionelle kalibreringsmodeller. Det kaldes anden-ordens kalibrering og var det, der startede multivejsanalyse i kemometrien.

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

Den traditionelle metode til at opbygge kalibreringsmodeller, involverer typisk en række enhedsoperationer. Ved at lave ekstraktion, fældning osv. kan man opnå, at den analyserede prøve kun indeholder det stof, man er interesseret i at kvantificere. Dermed er det nemt at kvantificere ved f.eks. at lave en standardrække af prøver med kendt koncentration. Disse måles med en passende teknik, som giver et signal, der er lineært

en nulte-ordens tensor, og derfor kaldes sådan kalibrering også nogle gange *nulte-ordens kalibrering*.

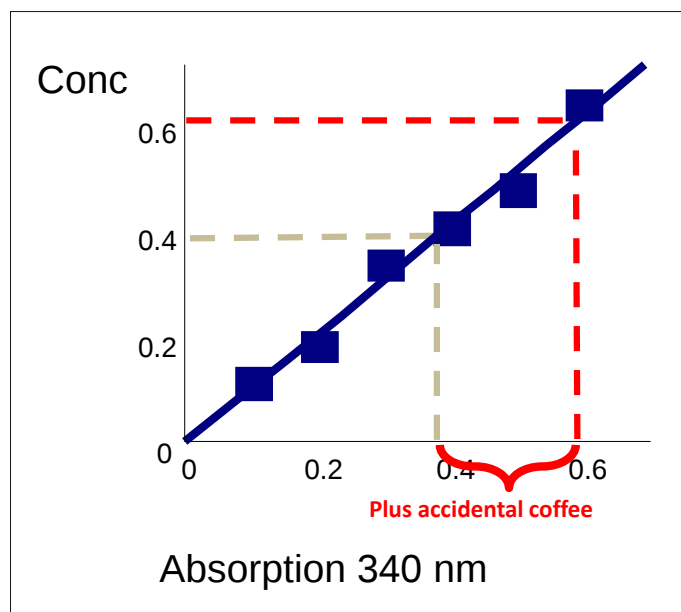
Der er flere krav til, hvordan man sikrer gode resultater, og et af de vigtige aspekter er, at signalet, man måler, skal være selektivt. Er der andre stoffer i prøven, som også giver signal, såkaldte interferenser, så kan man ikke stole på prædiktionerne (figur 2). Hvad, der måske endda er endnu værre, er, at man ikke kan kontrollere sin måling for at verificere om målingen er i orden. Man kan ikke se på en absorbans-måling på 0.8, om det er passende eller ej. Det vil sige at nulte-ordens data ikke tillader en intern kvalitetskontrol.



Figur 1. Eksempel på opbygning af kalibreringsmodel ved en standardrække af seks prøver og en lineær regressionsmodel.

med koncentrationen i det ønskede område. Det kunne være absorption ved 340 nm. Nu kan man så kvantificere analytten i en ukendt prøve blot ved at måle absorptionen ved 340 nm og så aflæse koncentrationen i sin kalibreringsmodel (regressionsmodel) som vist i figur 1.

Univariat kalibrering anvendes i en lang række situationer og er den dag i dag den fremherskende metode i analytisk kemisk kalibrering. Kalibreringsmodellen er baseret på måling af et tal for hver prøve; dvs. en skalar måling. En skalar kaldes også

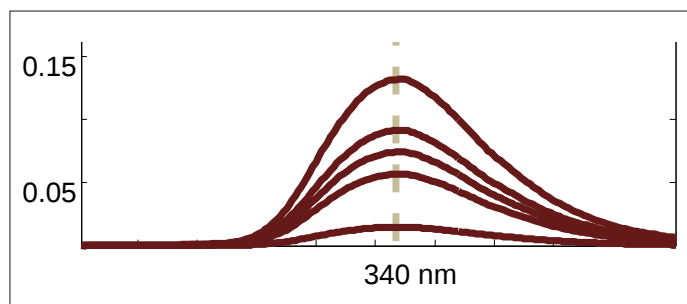


Figur 2. Samme som i figur 1, men prøven indeholder nu en ukendt interferens, som også giver signal. Dermed bliver den estimerede koncentration i prøven forkert.

Første-ordens kalibrering

I kemometrien har man løst problemet med interferenser vha. multivariat kalibrering som eksempelvis partial least squares regression (PLS). I multivariat kalibrering anvender man ikke blot én variabel, f.eks. én bølgelængde, men anvender i stedet ►

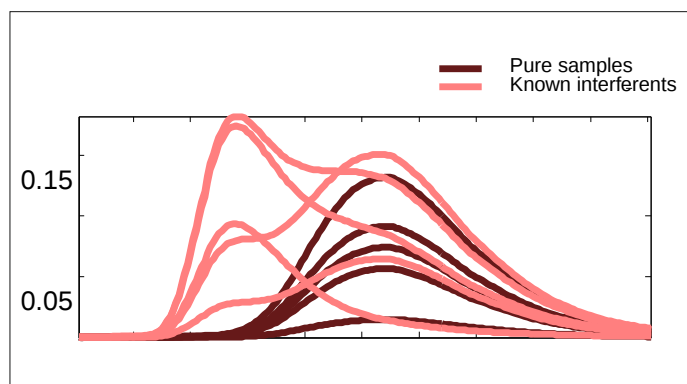
DET KEMOMETRISKE RUM



Figur 3. Spektralt datasæt. Frem for blot én bølgelængde kan man i f.eks. PLS-baseret kalibrering anvende det fulde spektrum.

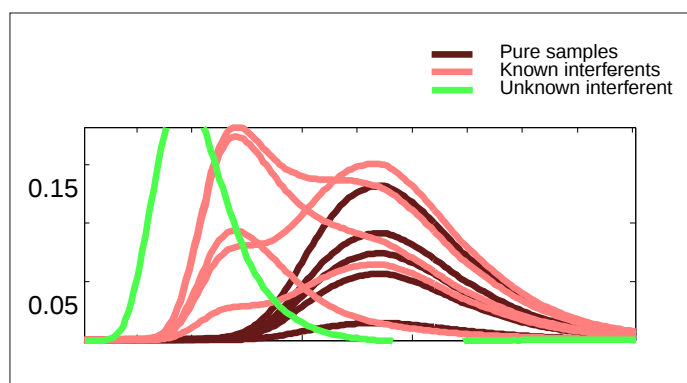
mange målinger eller målepunkter for hver prøve. Det kan være i form af et spektrum som vist i figur 3. Multivariat kalibrering kaldes også *første-ordens kalibrering*, fordi hver måling nu er en vektor (første-ordens tensor) fremfor en skalar.

Dermed behøver man ikke længere at have selektive signaler; altså fuldstændigt rene signaler. Man kan håndtere ukendte interferenser, så længe man sikrer sig, at også disse varierer i det datasæt, man anvender til kalibrering (figur 4).



Figur 4. PLS-kalibrering gør det muligt at håndtere ukendte interferenser, så længe disse varierer i kalibreringsdatasættet.

Man får i tillæg også mulighed for at kontrollere om en ny prøve, der skal præsiktes, passer i modellen. Ud fra prøvens form kan man se, om prøven er af samme type som kalibreringsprøverne (outlier-kontrol – Dansk Kemi, 89(3), 2008). Det betyder, at første-ordens kalibrering tillader ikke-selektive signaler og har indbygget intern kvalitetskontrol (figur 5).



Figur 5. Ikke-kalibrerede interferenser (grønt spektrum) kan ikke håndteres, men disse kan detekteres som outliers.

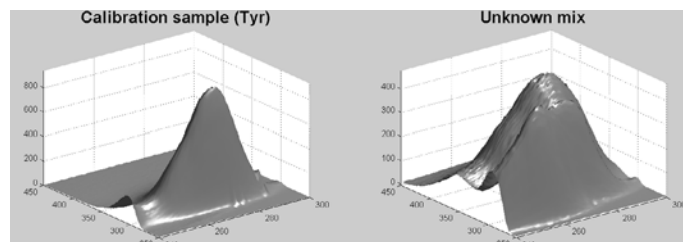
En håbløs situation

Første-ordens kalibrering løser mange af de problemer, som den traditionelle analytisk kemiske metode byder på. Men ikke alle problemer! Antag at man ønsker at kvantificere en analyt i en kompleks prøve, hvor mange forskellige kemiske komponenter (interferenser) giver signal. Og antag at man kun har adgang til en ren standard til formålet. Nulte-ordens kalibrering kommer til kort, hvis man ikke kan fjerne interferenserne, og første-ordens kalibrering kan heller ikke løse problemet, fordi man ikke har de nødvendige data til at opbygge en kalibreringsmodel.

Anden-ordens kalibrering

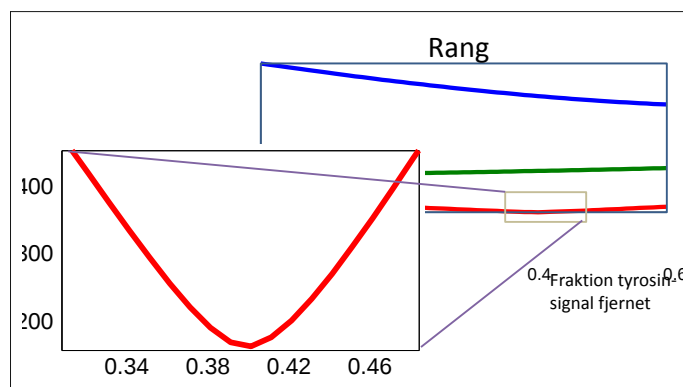
Der findes imidlertid en metode, som hedder anden-ordens kalibrering, og den rummer løsningen på problemerne i såvel klassisk som moderne kalibrering. Metoden kan bedst eksemplificeres på den måde, som den oprindeligt blev udviklet i sluthalvfjerdsene og firserne. I anden-ordens kalibrering er hver prøves måling ikke en vektor (et spektrum), men derimod en tabel/matrix (et landskab af spektre).

I figur 6 er vist et eksempel på et typisk kalibreringsproblem i anden-ordens kalibrering.



Figur 6. Til højre fluorescens-EEM af ukendt prøve, der bl.a. indholder tyrosin. Til venstre fluorescensmåling af ren tyrosinprøve med kendt koncentration.

Vi ønsker at bestemme koncentrationen af tyrosin i en ukendt prøve (figur 6 til højre). Prøven indeholder imidlertid også signal fra andre fluoroformer, og vi har dermed ikke et selektivt signal fra tyrosin. Ud over den ukendte prøve har vi også et kalibreringsdatasæt. Det består af én ren prøve, hvori vi kender koncentrationen af tyrosin. Den er 13,3 μM . Nu er problemet at kunne bestemme koncentrationen af tyrosin i den ukendte prøve. Den traditionelle anden-ordens kalibrering fungerer ved, at man trækker en vægtet udgave af standardprøven fra den



Figur 7. "Rang" (egentlig singulære værdier) af trekomponent-system som funktion af subtraktion af en ren tyrosinprøve. Ren tyrosinprøve er 13,3 μM , så den ukendte prøve må have en koncentration på $13,3 \cdot 0,4 = 5,3 \mu\text{M}$ – i virkeligheden er koncentrationen 5,44.

ukendte prøves måling. Den ukendte prøve har i dette tilfælde en rang på tre, fordi der er tre kemiske stoffer, der giver signal. Hvis man trækker præcis så meget af standarden fra, at tyrosins signal forsvinder fra den ukendte prøve, så falder rangen til to. Dermed har man en metode til at kvantificere tyrosin. Man prøver at trække forskellige fraktioner af den rene prøves signal fra den ukendte og følger rangen som funktion af dette. Ved den rette fraktion ændres rangen som vist i figur 7.

Ovenstående kalibreringsmetode hedder RAFA (rank annihilation factor analysis) og var den første af en række metoder, der anviste de unikke muligheder i anden-ordens kalibrering [1-2].

Outro

I kalibrering gælder det, at nulte-ordens kalibrering kræver selektivitet og ikke tilbyder nogen form for "indbygget" kvalitetskontrol. Første-ordens kalibrering virker også på ikke-selektive

signaler og har endda indbygget kvalitetskontrol. Her har vi set, at anden-ordens kalibrering tilbyder endnu flere muligheder. I næste klumme vil vi se nærmere på dette, som i litteraturen benævnes *anden-ordens fordel*.

E-mail-adresser

Rasmus Bro: rb@life.dk.

Søren Balling Engelsen: se@life.ku.dk

Lars Nørgaard: lno@foss.dk

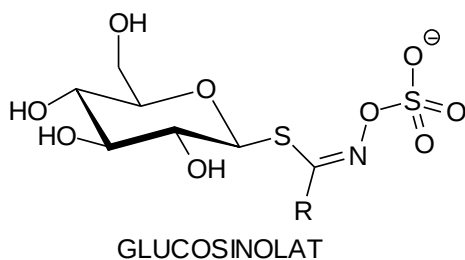
Referencer

1. C. N. Ho, G. D. Christian, E. R. Davidson. Application of the method of rank annihilation to quantitative analyses of multicomponent fluorescence data from the video fluorometer. *Anal.Chem.* 50:1108-1113, 1978.
2. L. Nørgaard, C. Ridder. Rank annihilation factor analysis applied to flow injection analysis with photodiode-array detection. *Chemom.Intell.Lab.Syst.* 23:107-114, 1994.



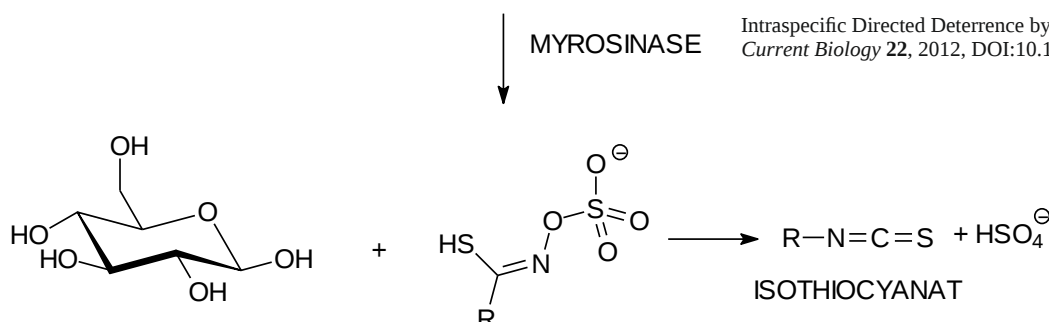
Nyt om ...

... Spyttende mus sår buske i ørkenen



En mus i den israelske ørken sørger for spredning af en buskagtig plante *Ochradenus baccatus*, som gror i ørkenen. Ulig andre ørkenplanter har *O. baccatus* saftige og sukkerholdige frugter, som spises af en mus *Acomys cahirinus*. Frugtens frø indeholder imidlertid glucosinolater, som herhjemme er kendt fra de korsblomstredes familie. Når frøene knuses reagerer glucosinolaterne med et enzym myrosinase, der spalter dem til glucose og isothiocyanater samt hydrogensulfat, som vist, på samme måde som vi kender det fra vor hjemlige sennep. Såvel isothiocyanaterne som hydrogensulfaten giver musen en ubehagelig fornemmelse i munden, hvorfor den kun spiser frugtkødet og spyttede frøene ud. Den spiser imidlertid ikke frugterne lige ved planten; men søger, før den fortærer dem, hen i en klippespalte, hvor der er skygge og på den måde bliver frøene spredt og sået et sted, hvor der er rimelige spirebetingelser.

Carl Th.



Intraspecific Directed Deterrence by the Mustard Oil Bomb in a Desert Plant
Current Biology 22, 2012, DOI:10.1016/j.cub.2012.04.051.