

AZ ELEKTROFEROGRAMOK/KROMATOGRAMOK KIÉRTÉKELÉSE

Oktatási segédanyag műszeres analitika gyakorlathoz

Szükséges előismeret:

- kapilláris elektroforézis (pl. Műszeres analitika gyakorlat részeként), *vagy*
- nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (pl. Műszeres analitika gyakorlat részeként), *vagy*
- gázkromatográfia (pl. Műszeres analitika gyakorlat részeként)

Ezen a gyakorlaton az elektroferogramok/kromatogramok kiértékelésének legalapvetőbb módszereinek, a különböző kiértékelő szoftverek működési elvének tanulmányozására lesz lehetőség. Bár elsősorban a kapilláris elektroforézis (CE) módszerrel kapott elektroferogramok kiértékeléséről lesz szó, az itt szereplő fogalmak, módszerek, matematikai eljárások általánosan használtak más elválasztási módszerek esetén is, és a különböző, modern kromatográfias módszerekkel (HPLC, SFC, GC stb.) nyert kromatogramok kiértékelése is hasonlóképpen történik.

A gyakorlat anyagának összeállításakor a Chemstation 3D CE (Hewlett-Packard) és az Eurochrom 2000 (Knauer) számítógépes elektroferogram/kromatogram kiértékelő programok felépítését és működési sajátosságait vettük alapul.

Minden analitikai elválasztási eljárás célja, hogy választ tudjunk adni a következő kérdésekre:

1. Milyen összetevőkből áll a minta?
2. Milyen koncentrációban vannak jelen az összetevők a mintában?

Míg az első kérdés megválaszolásával a minőségi (kvalitatív) analízis foglalkozik, a második kérdésre a mennyiségi (kvantitatív) analízis ad választ.

A CE-nél a *minőségi analízis* alapja az elektroferogramon található csúcsok azonosítása. Ez egy adott csúcs migrációs idejének vagy mozgékonyságának egy ismert vegyület kísérletileg kapott megfelelő eredményeivel való összehasonlításával történhet. Ha ugyanazokat a migrációs időket, illetve mozgékonyági adatokat kapjuk, akkor lehet, hogy a két vegyület azonos. A csúcsok nagy biztonsággal való azonosításának eljárása az alábbi:

- Az injektálást megelőzően adjunk a mintához a kérdéses vegyületből. Az elektroferogramon így kapott csúcsnak nagyobbnak kell lennie az eredeti csúcsnál, még hozzá váll kialakulása nélkül.
- Hajtsuk végre az előző eljárást más elválasztási módszerekkel is (pl.: micelláris elektrokinetikus kromatográfia, HPLC). Ha nem kapunk más csúcsokat, akkor a csúcs azonosítását már szinte biztosra vehetjük.
- Teljes bizonyossággal akkor azonosíthatunk egy kérdéses csúcsot, ha kémiai szerkezeti információkat is nyerünk a vegyületről (pl.: CZE-MS technikával).

A csúcsoknak a migrációs idejük alapján történő összehasonlítása állandó kísérleti körülményeket feltételez. A működési paraméterek (pl.: hőmérséklet, a puffer pH-ja, puffer ionerőssége, stb.) kis mértékű megváltozása is hatással lehet a részecskék mozgékonyására, és így megbízhatatlanná válhat a csúcs azonosítása.

A *mennyiségi analízis* a minta egy összetevőjének mennyiségéről vagy koncentrációjáról ad információt az elektroferogram egy csúcsának magassága, vagy területe alapján. Míg a csúcsmagasság közvetlenül leolvasható az elektroferogramról, a csúcsterület meghatározásához egy integrálóegység (számítógépes szoftver) szükséges. Az anyag ismeretlen mennyisége vagy c_x koncentrációja az a_x csúcsterület és az ismert koncentrációjú standard minták $a_{1...n}$ csúcsterületeinek korrelációja alapján számolható ki. Ehhez két fő eljárás, a külső standard és a belső standard módszerek ismeretesek. Mindkét módszer széles körben használatos az analitikai kémiában.

1. A csúcsok integrálása

Amikor egy elektroferogramot integrálunk, a szoftver

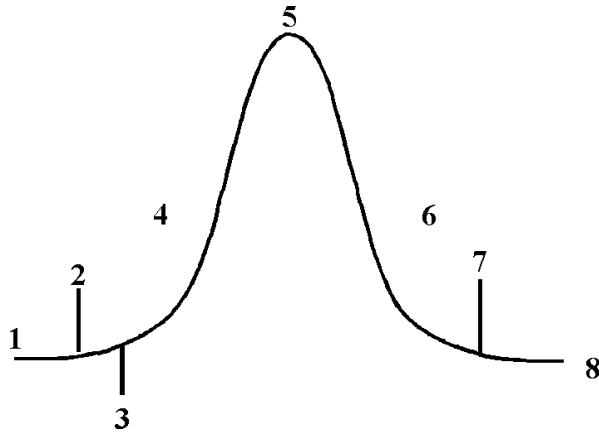
- megkeresi az összes csúcs kezdetét és végét, és azokat egy kis függőleges vonással jelöli meg,
- megkeresi az összes csúcs csúcspontját, vagyis meghatározza a migrációs időket,
- megszerkeszti az alapvonalat,
- kiszámolja az egyes csúcsok területét.

Az integrálási eljárás módját integrációs küszöbértékek határozzák meg. A két legfontosabb küszöbérték a jelmagasságra és csúcshélességre vonatkozik, melyeket az integrálás előtt meg kell adnunk.

A csúcsok felismerése

A csúcsok felismerésénél az integrátoregység feltételezi, hogy a csúcs első pontja az alapvonalon van. Ahogy az integrátoregység olvassa az adatokat, folyamatosan ún. mozgóátlagot számol a csúcshélességi küszöbértéknek megfelelő szakaszra. Ha a jel görbülete eléri a küszöbértékként megadott jelmagasságot, akkor ez egy csúcs kezdetét jelenti. Miután a jel ismét a küszöbértékek alá esik, az integrátor folytatja az adatok „letapogatását” az alapvonalon újabb csúcsokat keresve. Egy pozitív csúcs felismerésének folyamata a következő:

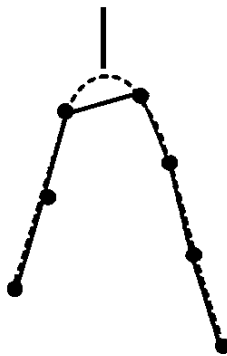
1. A meredekség és a görbület a küszöbérték alatt van: alapvonal követése.
2. A meredekség és a görbület a küszöbérték fölött van: csúcs lehetősége.
3. A meredekség a küszöbérték fölött marad: csúcs azonosítása.
4. A görbület negatívvá válik: elülső inflexiós pont.
5. A meredekség negatívvá válik: csúcspont azonosítása.
6. A görbület pozitívvá válik: hátsó inflexiós pont.
7. A meredekség és a görbület a küszöbérték alatt van: a csúcs végső szakasza.
8. A meredekség és a görbület a küszöbérték alatt marad: a csúcs vége, az alapvonal követése.

**1. ábra**

Nevezetes pontok egy csúcs felismerésénél
(A számok jelentését lásd a szövegben.)

A jelek csúcspontjának (csúcsmagasság és migrációs idő) meghatározásakor az integrátoregység azt használja ki, hogy ott a meredekség pozitív értékről negatívra vált. Az integrátoregység megkeresi a csúcs legnagyobb adatpontját, majd a mellette levő másikat, és ezekre egy másodfokú egyenlettel leírható görbét illeszt. Az egyenletet megoldva kapjuk meg a csúcsmaximum értékét (1. ábra).

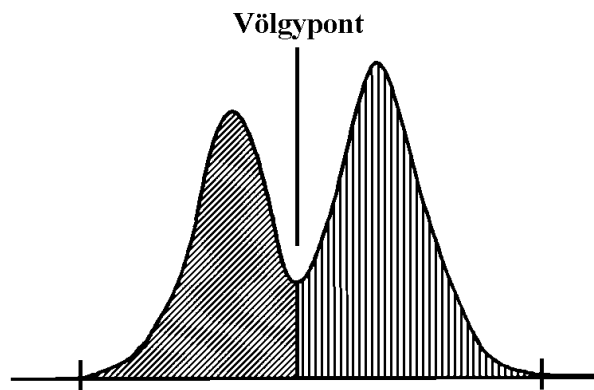
Csúcsmaximum

**2. ábra**

A csúcsmaximum meghatározása

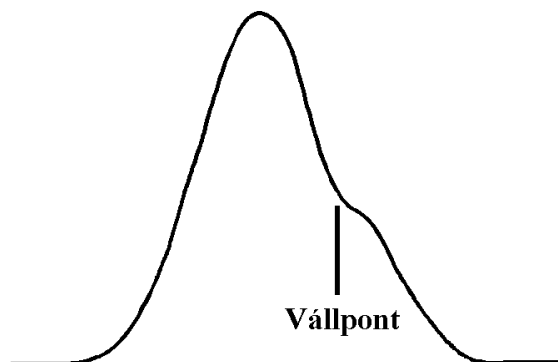
Néha két csúcs összeolvad, közöttük nincs alapvonal (3. ábra). Egy alapvonal-völgy (BV) és egy völgy-alapvonal (VB) csúcs esetén az integrátoregység a csúcsokat úgy választja szét egymástól, hogy a két csúcs közötti völgypontból egy

merőleges vonalat húz az alapvonalig. Ezután megkeresi az első csúcs elejét és elkezd az adatpontok gyűjtését mindaddig, amíg el nem éri a völgypontot, és ezt követően már a második csúcs adatpontjait gyűjti tovább.



3. ábra
Összeolvadt csúcsok

Akadnak olyan csúcsok is melyek oldalán olyan kisebb csúcs (váll) található, melynek felbontása a nagyobb csúcstól nem lehetséges (4. ábra). Ilyenkor nem találunk a főcsúcs és a váll között völgyet abban az értelemben, hogy a negatív meredekség nem vált át pozitívrá. Az integráló szoftverek mindig jelzik, ha egy csúcsonál vállat érzékeltek, ilyenkor figyelemmel kell lennünk arra, hogy a főcsúcs területe tartalmazza a váll(ak) területét is.

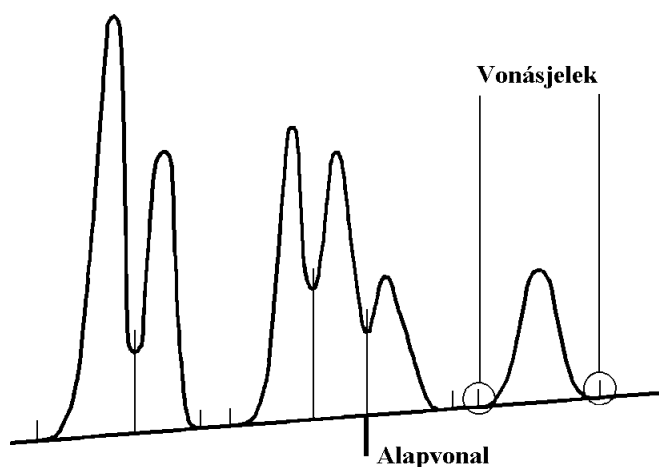


4. ábra
Vállal rendelkező csúcs

Az alapvonal megszerkesztése

A csúcs felismerését követően az alapvonal megszerkesztését a csúcs végső területének meghatározása követi. Az alapvonal megszerkesztésekor követni kell az elektroforetikus jel futását (5. ábra). Az integrátoregység az alapvonalat egyenes szakaszok sorozataként építi fel, tulajdonképpen a következő pontokat köti össze:

- az elektroforetikus mérés első pontja,
- a függőleges vonásjelek (melyek egy csúcs elejét és végét jelzik),
- az elektroforetikus mérés utolsó pontja.



5. ábra

Az alapvonal megszerkesztése

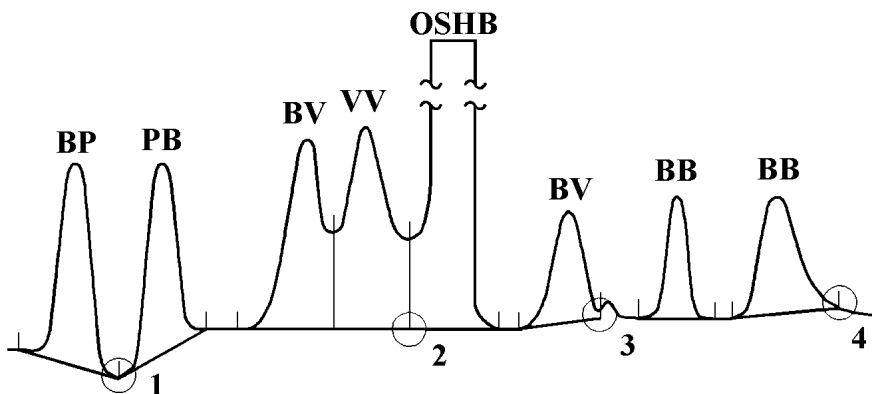
Minden egyes csúcsot egy olyan általánosan használt kétbetűs kóddal lehet jellemezni, amely megadja hogyan lett az elektroforetikus alapvonal megszerkesztve. A kód első betűje a csúcs kezdeténél jellemzi az alapvonalat, míg a második betű a csúcs végénél. A leggyakrabban használt kódjelzések az alábbiak:

B	a csúcs az elektroforetikus alapvonalon (Baseline) kezdődik vagy végződik
H	a csúcs a horizontális (Horisontal) alapvonalon kezdődik vagy végződik
N	negatív (Negative) csúcs
P	a csúcs akkor kezdődött vagy végződött, amikor az alapvonal besülylyedt (Penetrate)

S	az integrátoregység egy kifejezetten nagy csúcsot talált („oldószercsúcs”, Solvent peak)
T	a csúcs ott kezdődik vagy végződik, ahol érintővonal (Tangent) lett szerkesztve
V	a csúcs egy völgypontnál (Valley point) kezdődik vagy végződik
M	a csúcs integrálása manuálisan (Manually) történt

Az integrátoregység bizonyos esetekben módosítja a megszerkesztett alapvonalat. A módosítások a következő szabályok szerint történnek:

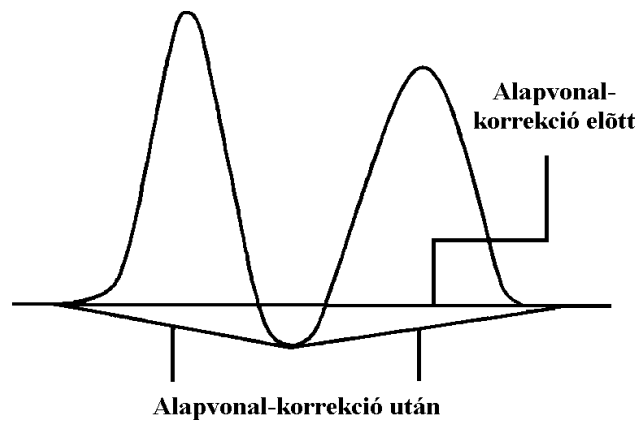
- Ha egy csúcsnál besüllyed az alapvonal (BP és PB), akkor az alapvonal is átmegy a csúcs legalsó pontján (6. ábra 1.).
- Ha egy oldószercsúcs nem az alapvonalról indul, akkor az alapvonal megszerkesztése úgy történik, hogy az alapvonal utoljára detektált pontjából az oldószercsúcs kezdetéhez horizontálisan húzunk egyenest (6. ábra 2.). (Az OSHB (Overflow Solvent Horizontal Baseline) jelölés a detektor lineáris tartományán túlérő oldószercsúcsra utal.)
- Ha egy csúcs völgyben végződik, de a völgyet követő csúcs területe nem éri el a beállított küszöbértéket, akkor az alapvonalat a alapvonal következő valódi pontjáig vetítődik ki (6. ábra 3.).
- Az alapvonalhoz lassan visszatérő (tailing) csúcsok esetén az integrálóegység meghatározza azt az időt ami alatt a csúcs eléri a felmenő, illetve lemenő meredekségi küszöböt, majd ennek az időnek az egynegyedét hozzáadja a csúcsvégéhez (6. ábra 4.).



6. ábra

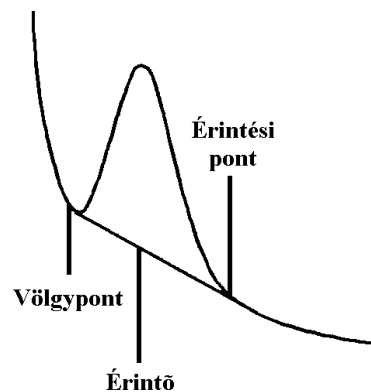
Az alapvonal szerkesztésének módosítása

Az alapvonal süllyedéséről (penetrációjáról) akkor beszélhetünk, ha a jel a megszerkesztett elektroforetikus alapvonal alá esik. Ha valahol alapvonal-süllyedés következik be, akkor azon a helyen alapvonalat újra kell rajzolni.



7. ábra
Alapvonal-süllyedés

Az oldószercsúcsok lefelé menő szakaszán található csúcsokhoz húzott érintő tekinthető az adott csúcs alapvonalának. Az integrálóegység oly módon húzza meg az érintőt, hogy a csúcs előtti völgypontot köti össze a csúcs utáni érintőponttal, ahol a detektorjel meredeksége megegyezik az érintő meredekségével (8. ábra).

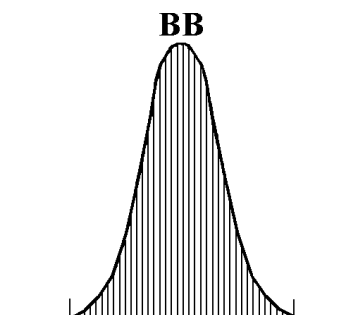


8. ábra
Az oldószercsúcsokon található csúcs alapvonalának meghúzása érintőmódszerrel

A csúcsterület meghatározása

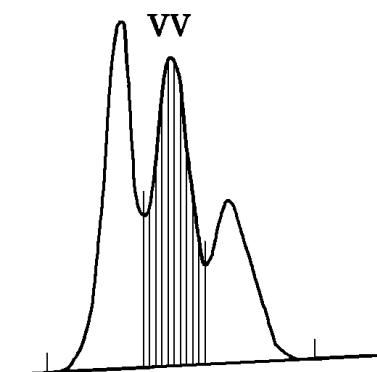
A csúcsok integrálásakor az utolsó lépés a csúcs területének meghatározása.

- Az alapvonal-alapvonal (BB) csúcsok területe a vonásjelek közötti alapvonalszakasz feletti területtel egyezik meg (9. ábra).

**9. ábra**

Alapvonal-alapvonal (BB) csúcsok területének meghatározása

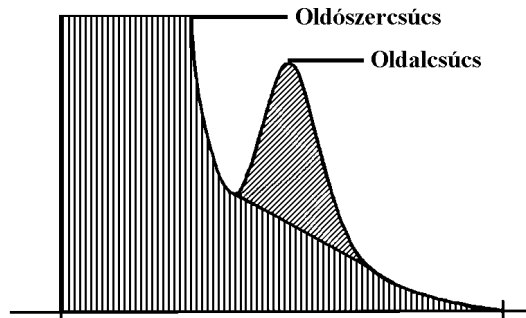
- A völgy-völgy (VV) csúcsok esetén a völgypontokból az alapvonalig húzott merőlegesek és az alapvonal által behatárolt rész területét kell meghatározni (10. ábra).

**10. ábra**

Völgy-völgy (VV) csúcsok területének meghatározása

- Oldalsúcsok (T) esetén a terület az érintő segítségével újrarajzolt alapvonal feletti rész területével egyezik meg (11. ábra).

- Az oldószercsúcsok területe az alapvonalnak a csúcs előtti utolsó, valódi pontjának horizontális meghosszabbításával kapott alapvonal feletti, és az oldalcsúcshoz húzott érintő alatti területnek felel meg (11. ábra).



11. ábra

Az oldószer- és oldalcsúcs területének meghatározása

Integrációs paraméterek

A négy leggyakrabban alkalmazott integrációs paraméter a következő:

Csúcsmagasságküszöb	Az ennél kisebb magasságú jeleket az integrátor elveti.
Csúcsterületküszöb	Az ennél kisebb területű jeleket az integrátor elveti.
Csúcsszélességküszöb	Az ennél kisebb féltértékszélességű jeleket az integrátor elveti.
Válldetektálás	Váll detektálásának ki/bekapcsolása.

A *csúcsmagasságküszöb* beállításával a kiszürendő zaj szintjét tudjuk megadni. A küszöb értékénél kisebb magasságú jeleket az integrátoregység figyelmen kívül hagyja. Ez a küszöbérték elsősorban nem a kis csúcsok kizárására szolgál, arra leginkább a csúcsterületküszöb használatos.

A *csúcsterületküszöb* a kis jeleket területük alapján szűri ki. A küszöbértéknél kisebb területű csúcsok nem kerülnek feldolgozásra.

A *csúcsszélességküszöb* beállításával jól szabályozható az integrátor szelektivitása, segítségével megkülönböztethetjük a csúcsokat az alapvonal zajától. A küszöbérték

megfelelő beállításával úgy szűrhetők ki zajok, kisebb csúcsok, hogy nem vesznek el hasznos információk. Ha a küszöbértéket túl alacsonyan határozzuk meg, akkor az integrátoregység a zajokat is csúcsokként értelmezheti.

A csúcscsúszélességküszöböt a legkeskenyebb csúcs szélességéhez kell állítani. Mivel az elektroforetikus mérés során a csúcsok szélessége az idővel általában nő, szükséges lehet a csúcscsúszélességküszöb időprogramozására, melyre a legtöbb integráló program lehetőséget nyújt. Sőt, sok program automatikusan frissíti (növeli) a kezdeti küszöbértéket (pl. $\text{küszöbérték} = (0,75 \times \text{aktuális küszöbérték}) + (0,25 \times \text{az aktuális csúcs szélessége})$).

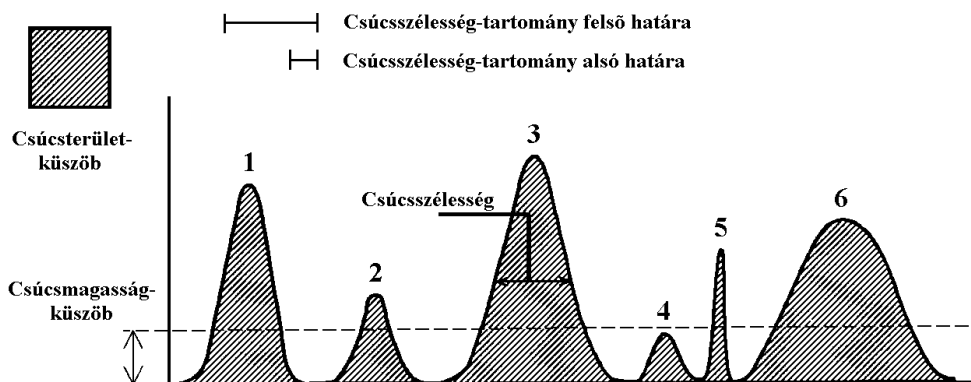
Ha a *válldetektálás* aktiválva van, az integrátoregység egy összetettebb csúcsintegrációs algoritmust alkalmaz, mely a vállakat azonosítani képes.

A fenti négy integrációs paraméteren kívül sok más paraméter is ismeretes, ezek közül megemlítjük még a *csúcscsúszélességi-tartomány küszöböt*, melynek alkalmazásával csak a tartományba eső csúcscsúszélességgel rendelkező csúcsok lesznek detektálva (lásd 12. ábra).

A csúcscsúszélesség- és a csúscsúsmagasságküszöb értékei nagyon fontosak az integrációs eljárás során, változtatásuk különböző eredményekkel járhat:

- A két küszöbérték növelése elsősorban olyan eseteknél hasznos, amikor főkomponenseket kell detektálni és erősen zajos környezetben kell mennyiségi meghatározást végezni. A nagyobb csúcscsúszélességküszöb fokozottabb jelszűrést okoz, a nagyobb jelmagasságküszöb pedig a véletlen zajt hagyja figyelmen kívül.
- A két küszöbérték csökkentése az olyan nyomkomponensek detektálásánál és mennyiségi kiértékelésénél hasznos, melyek magassága sokszor alig nagyobb a zaj szintjénél. A csúcscsúszélességküszöb hatása kisebb a jelszűrésre, mint a csúscsúsmagasságküszöb hatása.
- Az olyan esetekben amikor széles és keskeny csúcsokat egyaránt detektálnunk kell, a csúcscsúszélességküszöböt a legkeskenyebb csúcsnak megfelelően kell beállítani, míg a csúscsúsmagasságküszöböt annyira kell csökkenteni, hogy a szélesebb csúcsok is detektálhatók legyenek.

Az integrációs paramétereket gyakran meg kell változtatnunk, kis túlzással azt is mondhatjuk, hogy minden egyes elektroferogramhoz külön paraméterkombinációt kell alkalmaznunk. A 12. ábra a csúscsúsmagasság-, csúcscsúszélesség- és csúcssterületküszöb hatását mutatja be egy elektroferogram öt csúcsának integrálására.



12. ábra

Az integrálási paraméterek használata

Az integrátoregység egy csúcsot csak akkor fog integrálni, ha a csúcs mindhárom küszöbérték támasztotta követelménynek megfelel. A 12. ábrán látható csúcsokat és küszöbértékeket áttanulmányozva belátható, hogy az integrátornak csupán az 1 és 3 jelű csúcsokat kell integrálnia:

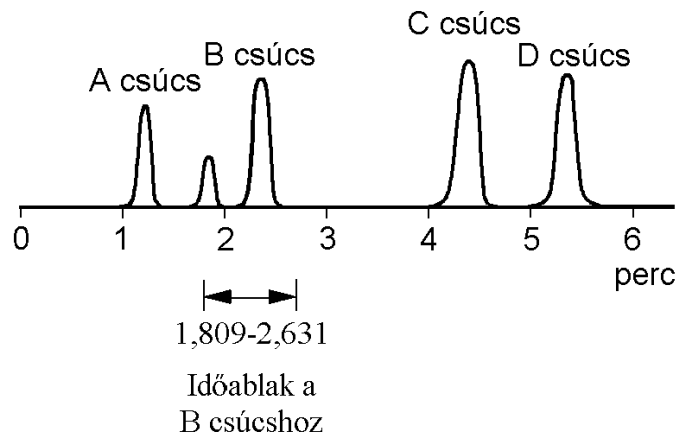
Integrációs paraméter	1. csúcs	2. csúcs	3. csúcs	4. csúcs	5. csúcs	6. csúcs
Csúcsmagasságküszöb	felett	felett	felett	alatt	felett	felett
Csúcsszélesség-tartomány	belül	belül	belül	belül	alatt	felett
Csúcsterületküszöb	felett	alatt	felett	alatt	felett	felett
Csúcsintegrálás?	igen	nem	igen	nem	nem	nem

2. A csúcsok azonosítása

A csúcsok azonosítása a minta ismeretlen komponenseinek azonosítását jelenti. A legtöbb elektroferogramot kiértékelő program az egyes komponensek elektroforetikus jellemzőit külön táblázatban (Kalibrációs táblázat) tárolja. Ezek a tárolt adatok a komponensek standard oldatainak meghatározásain alapulnak. A csúcsok azonosításakor a program a mintaoldal elemzésekor kapott csúcsokat a Kalibrációs táblázatban tárolt (várható) adatokkal hasonlítja össze. Az összehasonlítás végrehajtásánál 3 fő módszer ismeretes.

A csúcsok *abszolút migrációs ideje* ún. migrációs időablak segítségével hasonlíthatók össze. Ezek az időablakok az elektroferogramnak egy olyan kis szakaszát jelentik, melyek középpontja az adott csúcs várható (a Kalibrációs táblázatból vett) migrációs ideje. A minta minden olyan csúcsa, amely belesik ebbe az ablakba, egy lehetséges jelöltnek számít az azonosításnál. A 13. ábra a B csúcs 1,809 perc-től 2,631 percig terjedő migrációs időablakát mutatja, melyben a

várható migrációs idő 2,22 perc. Ebben az ablakban a B csúcshoz két lehetséges csúcs felelhet meg. Az egyik migrációs ideje 1,85 perc, a másiké 2,33 perc. Ha a csúcs nem referencia-csúcs, akkor a 2,22 perc várható migrációs időhöz legközelebb eső csúcsot kell kiválasztani. Ha a várható csúcs egy (idő)referencia vagy belső standard csúcs, akkor az ablakban található legnagyobb csúcs kerül kiválasztásra. Mindkét esetben, B csúcsként a 2,33 percnél található csúcsot választja ki a program.

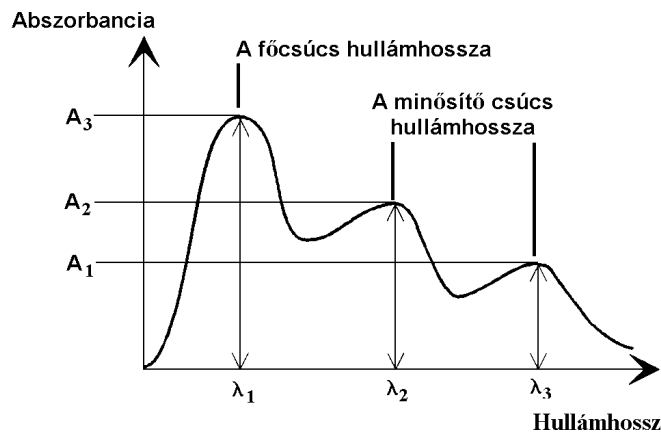


13. ábra
Migrációs időablak

Az ablakok szélességét általában úgy állítják be, hogy az az adott csúcs migrációs idejének körülbelül 5%-a legyen. Az 5%-os migrációs időablak azt jelenti, hogy a kérdéses csúcs migrációs ideje a Kalibrációs táblázatban található, várható migrációs időnél legfeljebb 2,5%-kal kisebb, illetve maximum 2,5%-kal nagyobb. Így például, egy kalibrációs oldat meghatározásakor kapott 2,00 perc migrációs idejű csúcshoz a későbbi mérések során 1,95 perc és 2,05 perc között kell megjelennie.

A csúcsok abszolút migrációs idején alapuló összehasonlítás egyszerű, de nem mindig megbízható. Az egyes migrációs idők csekély mértékben változhatnak az elektroforézis körülményeinek, illetve a készülék működési paramétereinek kis mértékű megváltozása miatt. Emiatt az egyes csúcsok az összehasonlító ablakon kívülre eshetnek, és ezért nem lesznek azonosíthatók. Az abszolút migrációs időknél tapasztalható, elkerülhetetlen ingadozások kezelése érdekében az egyes komponensek migrációs idejét egy vagy több referencia-csúcsokhoz viszonyítva fejezik ki, így kapjuk meg az adott csúcs *korrigált migrációs idejét*. A referencia-csúcsok a Kalibrációs táblázatban vannak megadva. A referencia-csúcsok használatával kompenzálni tudjuk a mintakomponens csúcsok migrációs idejének eltolódását. Ha az adott mérési módszernél nincs referencia-csúcs megadva, vagy

egy referenciacsúcsot sem tudunk azonosítani, a program az abszolút migrációs idők alapján végzi el a csúcsok azonosítását. A referenciacsúcs migrációs időablakában talált legnagyobb csúcsot kell a referenciacsúcsnak választani. A Kalibrációs táblázatban szereplő összes többi csúcs várható migrációs ideje módosul a referenciacsúcs várt és tényleges migrációs időinek arányának megfelelően. A migrációs időknek egyetlen referenciacsúccsal történő korrigálása azon a feltételezésen alapszik, hogy a tényleges migrációs idők eltérése a várható migrációs időktől egyformán és lineárisan változik az egész elektroforetikus elválasztás során. Sokszor azonban, különösen hosszabb mérési idők esetén a migrációs idők nem egyformán változnak. Ilyen esetekben több referenciacsúcsot érdemes alkalmazni bizonyos időközönként. Az így felosztott időintervallumokban azt feltételezzük, hogy a migrációs idők közötti eltérés lineárisan változik. Egy komponens több hullámhosszon is detektálható. Általában a legnagyobb elnyelést mutató hullámhosszhoz (λ_1 a 14. ábrán) közel történik a detektálás. Ezenkívül más, a Kalibrációs táblázatban nem szereplő hullámhosszakat (λ_2 és λ_3 a 14. ábrán) *csúcsminősítésre* használhatjuk.



14. ábra
Csúcsminősítés

Egy komponensre megadható egy olyan állandó, mely a különböző hullámhosszakon kapott jel nagyságok (abszorbanciák) hányadosa:

$$K = \frac{\lambda_1 \text{ hullámhosszon kapott jel}}{\lambda_2 \text{ hullámhosszon kapott jel}}$$

Ha a K értéke belül van egy adott értéken, akkor ez a komponens azonosításának helyességét erősíti meg.

3. Mennyiségi kiértékelés

Miután a csúcsoakat integráltuk és azonosítottuk, az analízis következő lépése a mennyiségi kiértékelés. A mennyiségi kiértékelésnél a csúcsoak területét vagy magasságát használjuk a mintakomponensek ismeretlen koncentrációjának meghatározásához. A mennyiségi kiértékelés 3 fő lépésből áll:

- Az adott komponens ismert mennyiségeit tartalmazó mintaoldatok (standardok) elemzése.
- Az adott komponens ismeretlen mennyiségben tartalmazó mintaoldat elemzése.
- Az ismeretlen és az ismert mennyiségekre kapott válaszjelek összehasonlítása, és ily módon a mintakomponens ismeretlen mennyiségének meghatározása. (Természetesen a jelek összehasonlítása csak akkor végezhető el, ha az elektroforézis, a kapott elektroferogram integrálása, az adatok meghatározása azonos körülmények között történt.)

A mintában található egyes komponensek ismeretlen mennyiségeinek kiszámítása a következő módszerekkel történhet:

- Százalékos összetétel meghatározása
- Normalizálás
- Külső standard módszer
- Belső standard módszer

A *százalékos összetétel meghatározásánál* nem szükséges kalibrációs eljárás végrehajtása. A százalékos összetétel meghatározása vagy csúcsterület, vagy csúcsmagasság alapján történik, ennek alapján beszélhetünk csúcsterület-százalékos, illetve csúcsmagasság-százalékos összetételről. A csúcsterület-százalékos összetétel használatakor minden egyes csúcs területét az elektroferogramon található összes csúcs összterületének a százalékos arányában kell megadni. A százalékos összetétel nem függ a minta injektált mennyiségétől. Csak abban az esetben kapnánk az egyes komponensek mennyiségére egy viszonylag jól közelítő eredményt, ha minden egyes komponens egyformán nyelne el a detektálási hullámhosszon. A területiszázalékot általában akkor használják, ha csak minőségi meghatározás a cél és más kalibrációs módszernél szükséges kalibrációs táblázat elkészítéséhez akarunk információt szerezni. A csúcsmagasság-százalékos összetétel megadásánál az egyes csúcsok magasságát az elektroferogramon található összes csúcs összesített magasságának a százalékos arányában kell megadni.

A detektor az egyes komponensekre általában nem egyformán érzékeny, vagyis azonos mennyiségű komponensek nem azonos nagyságú (területű) csúcsot

szolgáltatnak. A különböző mintakomponensek detektálási érzékenységében történő különbségek kompenzálása miatt a *normalizációs módszernél* az egyes komponensek csúcsterületéhez (vagy magasságához) ún. érzékenységi faktorokat (f_i) számolnak ki:

$$f_i = \frac{c_i}{A_i} \quad (1)$$

c_i : az i -edik komponens koncentrációja

A_i : az i -edik komponens területe

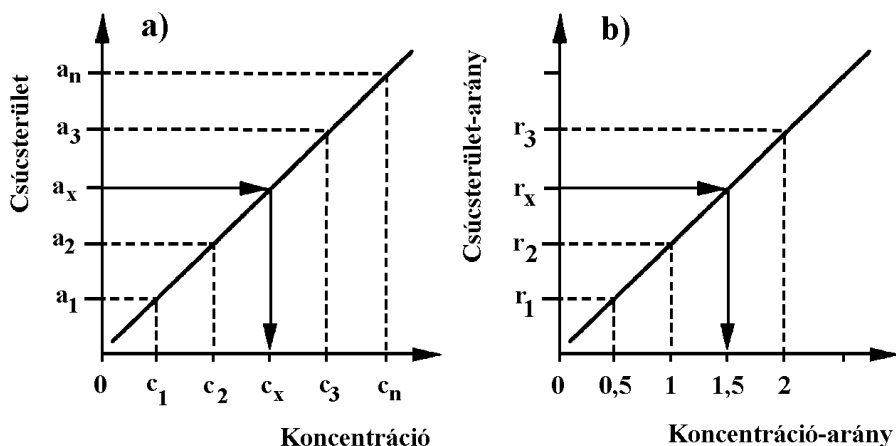
A faktor függ a komponens minőségétől, a detektor típusától, a CE készüléktől és az elválasztás körülményeitől. Az egyes komponensek normalizált százalékos (norm%) összetétele a következőképpen számolható ki:

$$\text{norm}\%_i = \frac{f_i \cdot A_i}{\sum_1^n f_i \cdot A_i} \cdot 100 \quad (2)$$

A *külső standard módszer* a legalapvetőbb mennyiségi meghatározási módszer. A minta ismeretlen mennyisége az ismeretlen mintára és a referencia oldatokra (külső standardok) kapott eredmények összehasonlítása alapján számolható ki. Ideális esetben a standard oldatokat olyan koncentrációban kerülnek elemzésre, hogy a kapott jelek detektor lineáris tartományán belül maradnak. A standard oldatok elemzését követően a mintát injektáljuk a rendszerbe, és elemzését, illetve a megfelelő csúcsok területének meghatározását ugyanúgy végezzük, mint ahogy azt a standardok esetén tettük. A csúcsterületeket a koncentráció függvényében ábrázolva ideális esetben egy egyenest kapunk (15.a, ábra), melyből a minta ismeretlen koncentrációja könnyen számolható. Mivel a külső standard módszernél az egymást követő elemzések csúcsterületeit hasonlítjuk össze, pontos és nagyon jól reprodukálható mintabevitelre van szükség.

A *belső standard módszernél* egy ismert anyagot (belső standard) adnak mind a referencia oldatokhoz, mind a mintaoldathoz. A minta vizsgált komponensének koncentrációját a belső standard és a vizsgált komponens csúcsainak arányának a referencia oldatok megfelelő csúcsainak arányához való hasonlítása alapján kapjuk meg (15.b, ábra). A kicsit bonyolultnak tűnő definíció megértését a következő példával igyekszünk megkönnyíteni. Tegyük fel, hogy egy minta fenilalanin koncentrációjának meghatározása a feladatunk, és ehhez tirozint használunk belső standardként (eredetileg nincs a mintaoldatban). Ekkor a következő lépéseket kell végrehajtanunk:

- Készítsük el a meghatározott koncentrációjú (pl.: 2,5 mM; 5,0 mM; 7,5 mM és 10,0 mM) fenilalanin referencia oldatokat.
- Adjunk ismert mennyiségben (pl., hogy 5 mM legyen a végső koncentrációja) tirozint az összes referencia oldathoz.
- Végezzük el az összes referencia oldat elemzését és határozzuk meg mindkét komponens csúcsterületeit. Számoljuk ki a koncentrációk, illetve a megfelelő csúcsterületek arányát és rajzoljuk meg a kalibrációs egyenest (15.b, ábra).
- Adjunk ismert mennyiségben (pl., hogy 5 mM legyen a végső koncentrációja) tirozint a mintaoldathoz és elemezzük.
- Számoljuk ki a fenilalanin és a tirozin csúcsterületeinek arányát.
- Határozzuk meg a mintaoldat koncentráció arányát a kalibrációs egyenes (15.b, ábra) alapján és számoljuk ki a fenilalanin ismeretlen koncentrációját.



15. ábra

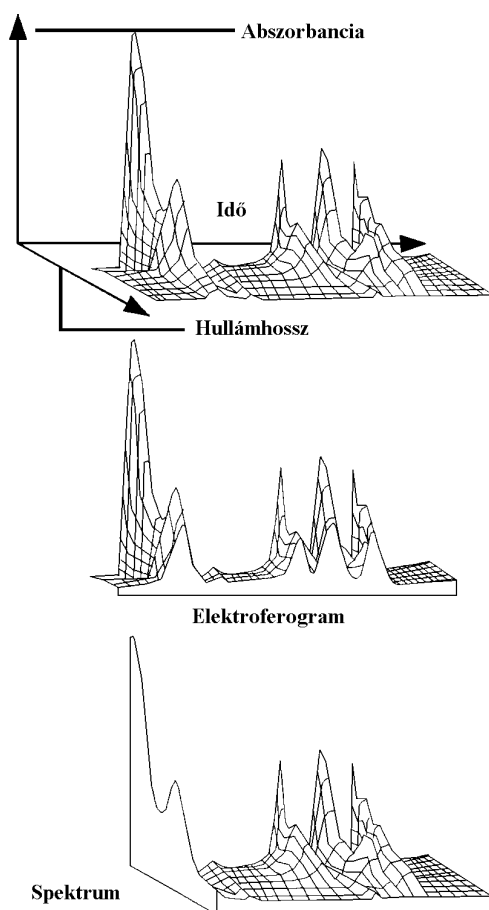
Kalibrációs egyenesek megszerkesztése külső standard (a), illetve belső standard (b) módszerek segítségével

A belső standard módszer használatakor számos követelménynek kell teljesülnie. A belső standard nem lehet jelen az eredeti mintában, másrészt az anyagnak tisztának, jól definiáltnak kell lennie, melynek elektroforetikus és detektálhatósági tulajdonságai hasonlóak a meghatározandó anyag ugyanezen tulajdonságaihoz. Harmadrészt, a belső standardnak a minta egyes komponenseitől jól elváló csúcsot kell adnia. Mivel a belső standardot az injektált mintához adjuk, az injektálási térfogat kismértékű ingadozásai nincsenek hatással a módszer, illetve a detektálás ismételtetésére.

4. Spektrumelemzés

Spektrumelemzés során az UV-látható tartományban működő diódasoros detektorral kapott spektrumadatok feldolgozása történik. A spektrumadatok analízise a CE elemzésnél kapott elektroforetikus adatokat három dimenzióssá bővíti (16. ábra). A spektrumadatok feldolgozásának célja lehet

- a csúcsok tisztaságának ellenőrzése,
- az egyes komponensek minőségének meghatározása a spektrumkönyvtár segítségével,
- az egyes komponensek optimális detektálási hullámhosszának meghatározása.



16. ábra

A CE analitikai adatok háromdimenziós ábrázolása

Csúcstisztasági vizsgálatok

Az elektroforetikus elemzéseknél (mint ahogy más elválasztási módszereknél is) az egyik legfontosabb kérdés mindig az, hogy vajon a kapott csúcs egy vagy több komponensnek felel-e meg. A minőségi elemzéseknél a rejtett szennyeződések meghamisítják az eredményt, illetve ha egy csúcsban egy komponens rejtve marad, akkor lényeges információk vesznek el.

A csúcstisztasági vizsgálatoknál tehát azt kell megállapítanunk, hogy az adott csúcs tiszta-e, vagy esetleg szennyeződést tartalmaz. Ennek megállapítása a csúcs elúciója során kapott spektrumok összehasonlítása alapján történik. Általában csúcsonként 3 spektrumot használnak a tisztaság megállapításához. Két spektrumot a csúcs két inflexiós pontjánál, egy spektrumot a csúcs tetőpontján (maximumán) szoktak felvenni. (Ha azonban szükség van rá, akkor a tisztaságvizsgálat több pontban is, akár a csúcs összes pontjában felvett spektrum alapján is történhet.)

Ha ez a három spektrum nem egyforma, akkor a csúcs spektrális szennyeződést tartalmaz, melyet egy vagy több komponens okoz, vagy esetleg háttérabszorpció eredménye. Meg kell még jegyeznünk, hogy ha a spektrumok megegyeznek, attól a csúcsok még tartalmazhatnak szennyeződést. Ez leginkább akkor fordulhat elő, ha a szennyező komponens fényelnyelése kicsi a főkomponens elnyeléséhez képest, vagy a szennyezők és a főkomponens spektrumai közel azonosak. A háttérabszorpció a pufferrendszer megváltoztatásával csökkenthető.

A csúcstisztasági diagram a három spektrumot normalizált és egymással fedésbe hozott formában tartalmazza. A tisztasági faktor a spektrumalakzatok hasonlóságának mértéke. A csúcstisztaság megállapítása a spektrumok vizuális összehasonlítása alapján meglehetősen hosszadalmas eljárás lenne, ráadásul automatizált üzemmódnál nem alkalmazható. A spektrumok automatizált összehasonlítása különféle statisztikai módszerekkel történhet. A legtöbb elektroferogram kiértékelő programnál egyetlen parancs kiadásával matematikai módszerekkel történik két spektrum összehasonlítása, a program kiszámolja a spektrumok hasonlósági fokát, azaz a tisztasági faktort is, amely a következőképpen adható meg:

$$\text{tisztaságifaktor} = \frac{10^3 \cdot \left[\sum x \cdot y - \left(\frac{\sum x \cdot \sum y}{n} \right) \right]^2}{\left[\sum x^2 - \left(\frac{\sum x \cdot \sum x}{n} \right) \right] \cdot \left[\sum y^2 - \left(\frac{\sum y \cdot \sum y}{n} \right) \right]} \quad (3)$$

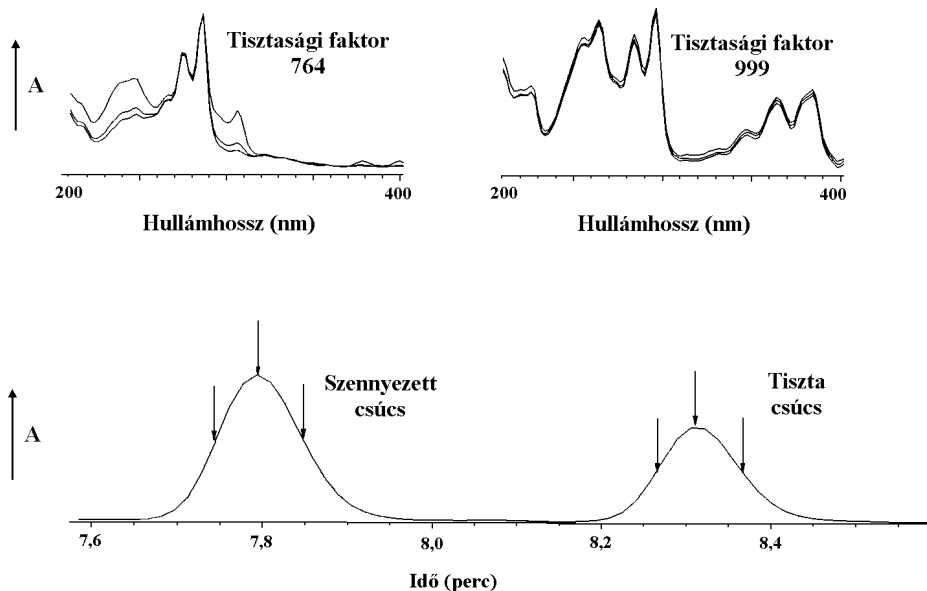
Az x és y a két spektrumon az azonos hullámhosszon mért abszorbancia értékek, n az adatpontok száma. A 0 tisztasági faktor azt jelzi, hogy egyáltalán nincs hasonlóság a két spektrum között, míg az 1000-es érték a teljes azonosságról árulkodik. Általában ha a tisztasági faktor 990-nél nagyobb, akkor szinte

bizonyosra vehetjük a csúcs szennyeződéstől való mentességét, míg 900 és 990 közötti értékek esetén az eredményeket óvatosan kell kezelni. A 900 alatti értékek a spektrumok egyértelmű különbözőségét jelzik.

A csúcstisztasági vizsgálatok csak alapvonal-alapvonal (BB) csúcsokra végezhetők el. Ha a csúcsok nem az alapvonalról indulnak, akkor a csúcstisztaság megállapítása komplikáltabb, mert mindegyik csúcs a szomszédját is tartalmazza kis mértékű szennyeződésként. Egy csúcs tisztaságának megítéléséhez többfajta módszert is használhatunk, melyek közül a két leggyakoribb

- a spektrumok normalizálása,
- két vagy több hullámhosszon kapott abszorbancia értékek arányának ábrázolása az idő függvényében.

A *spektrumok normalizálása* kompenzálja a detektoron áthaladó komponensek eltérő koncentrációit. Általában a csúcs két inflexiós pontjánál és a csúcs maximumán felvett spektrumokat hasonlítják össze. A spektrumokat normalizálják és egymásra vetítve ábrázolják. Az egymásra vetített spektrumok mellett a programok gyakran feltüntetik az inflexiós pontokon felvett spektrumok összehasonlításából számolt tisztasági faktorokat is (17. ábra). A spektrumok vizuális összehasonlítása, illetve a program által kiszámolt tisztasági faktor segítségével egyértelmű különbség tehető a tiszta és a szennyezett csúcs között.



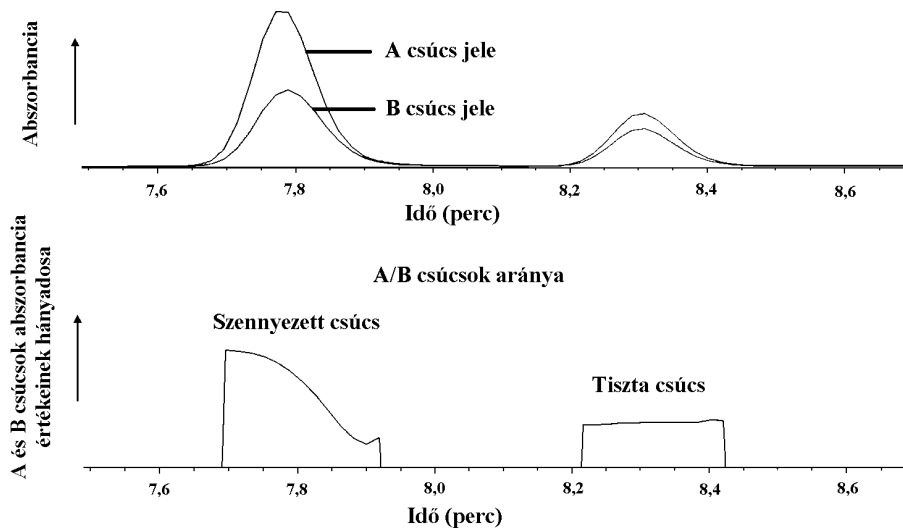
17. ábra

A csúcsok tisztaságának ellenőrzése egymásra vetített spektrumok segítségével

A különböző hullámhosszakon kapott *abszorpciós jelek arányának* idő függvényében történő ábrázolása is hasznos információkat nyújthat egy csúcs tisztaságának megítéléséhez. Egy tiszta vegyület esetén a λ_1 hullámhosszra érvényes A moláris abszorpciós együttható egyenesen arányos egy másik hullámhosszon (λ_2) használható együtthatóval:

$$A(\lambda_1) = K \cdot A(\lambda_2) \quad (4)$$

ahol a K állandó a kiválasztott hullámhosszakon jellemző az adott vegyületre. Tiszta vegyület esetén a két hullámhossz közötti abszorbanciaarány állandó. Az abszorbanciaarány idő függvényében történő ábrázolásakor tiszta csúcsok esetén lapos vonalat kapunk, míg szennyező komponensek jelenléte esetén a K értékek különbözőek (18. ábra).

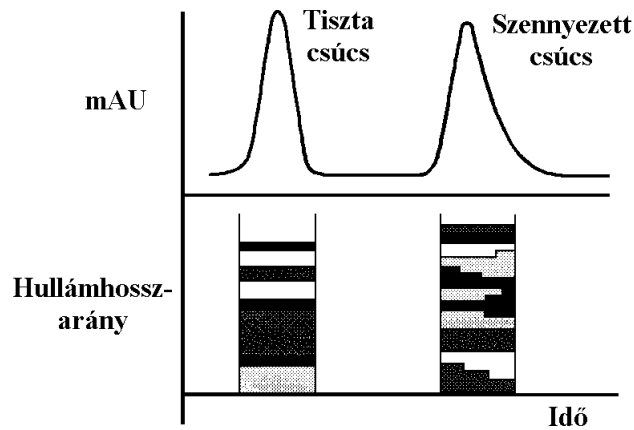


18. ábra

Abszorbanciaarányok ábrázolása szennyezett és tiszta csúcsok esetén

Az abszorbanciaarányok számításának és ábrázolásának egy másik módja az aránydiagram (ratiogram) elkészítése. Az aránydiagram elkészítésénél nemcsak két hullámhosszon kapott abszorbanciajелеkből képzünk arányszámot, hanem az összes detektálási hullámhosszon kapott jelből és a maximális abszorbanciajelből. Az aránydiagram úgy ábrázolható, hogy a vízszintes tengely az idő, a függőleges tengely pedig a hullámhossz (19. ábra). A színek az abszorbanciaarányokat reprezentálják. Ez a diagram egy elektroferogram csúcsainak tisztaságának egy nagyon gyors áttekintéséhez nyújt lehetőséget. Ha egy csúcs tiszta, akkor az aránydiagramon párhuzamosan futó sávok jelennek meg és ezeknek a sávoknak a

színe nem változik a csúcs teljes elúciós időtartamán keresztül. A tiszta csúcsok abszorbanciaaránya állandó a csúcs teljes szélességében. Ha a csúcs szennyeződést tartalmaz, a sávok futása az időben változik, az abszorbanciaarány nem állandó.



19. ábra
Az aránydiagram

A spektrumkönyvtár használata

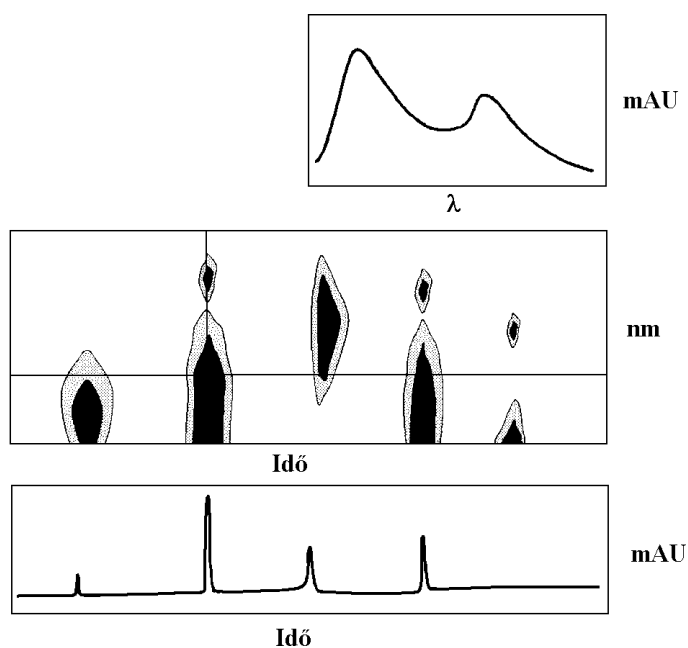
A kapilláris elektroforézisnél a csúcsoknak integrálás vagy mennyiségi meghatározás céljából történő azonosításához az abszolút vagy korrigált migrációs időket lehet alkalmazni. Ez az eljárás azonban nem megfelelő ismeretlen összetételű minták esetén. Ha a minta teljesen ismeretlen, spektroszkópiás módszerek szükségesek a komponensek azonosításához.

A legtöbb elektroferogram kiértékelő program rendelkezik egy ún. spektrumkönyvtárral, mely hasznos segítséget nyújthat a mintakomponensekre kapott csúcsok azonosításához. A spektrumkönyvtárban sok vegyület spektruma megtalálható, és a spektrumok száma növelhető (a felhasználó munkája során folyamatosan bővítheti az azonosított komponensek spektrumának elmentésével). A program képes egy ismeretlen komponens spektrumának a spektrumkönyvtárban található összes spektrummal való gyors összehasonlítására, és így módon lehetséges azonosítására. A spektrumok hasonlósága a hasonlósági faktor megadásával jellemezhető.

Sok mintánál a minta mátrixvegyületei vagy a puffer zavarhatja a kérdéses vegyület azonosítását, mivel e zavaró hatások hatással vannak a spektrumokra. A puffer vagy a mátrixanyag okozta háttér zavaróhatásokat úgy lehet kiküszöbölni, ha a csúcsmaximumon felvett spektrumból kivonjuk az alapvonal spektrumát, és csak ezt követően indítjuk a spektrumkönyvtárban való keresést.

Az optimális detektálási hullámhossz meghatározása

Az adott analitikai feladat megoldásához szükséges módszer kifejlesztésekor, a csúcsok elválasztásához megfelelő körülmények kidolgozását követően, meg kell találni az egyes csúcsok detektálásához optimális hullámhosszat. Az optimális detektálási hullámhossz meghatározásának egyik módszere az abszorbancia, a hullámhossz és az idő ábrázolása kontúrtérképes, ún. izoabszorpciós grafikonos formában. Ennél a módszernél az izoabszorpciós (azonos abszorbancia értékű pontok alkotta) koncentrikus vonalakat a hullámhossz és az idő függvényében kell ábrázolni (20. ábra középső grafikonja).

**20. ábra**

Az izoabszorpciós pontok ábrázolása

Ez a módszer igen hasznos az egyes csúcsok külön-külön detektálásához optimális hullámhossz megállapításához. A kurzor horizontális helyzete az izoabszorpciós grafikonon a hullámhossznak felel meg. Ha a kurzort a hullámhossz tengely mentén mozgatjuk, az elektroferogram egy másik diagramban újrarajzolódik (20. ábra alsó grafikonja).

Kiegészítés a mérési eredmények eloszlásának statisztikai jellemzéséhez

A valódi érték és a mérési eredmény közötti kapcsolat megvilágítására vezették be a mérési hiba fogalmát. Az analitikai kémiai mérések során fellépő mérési hiba kétféle - az ún. módszeres (szisztematikus) és az ún. véletlen - hiba összegeződéséként adódik. A *véletlen hibák* a mérések korlátozott pontosságából erednek. A véletlen hiba mértéke a mérések többszöri ismétlésével csökkenhető. A *módszeres hiba* a mérési hiba egy állandó arányú része (állandó hiba). Ez a hiba nem csökkenthető a mérések többszöri ismétlésével. A módszeres hiba megállapításához standardokat kell elemezni, így módon a későbbi elemzések korrigálhatók.

Tegyük fel, hogy egy mérési sor eredményeit (pl. párhuzamos spektrofotometriás méréseket, lásd 1. táblázat) csak véletlen hiba terhel, és ábrázoljuk a mérési adatoknak 12 előre meghatározott intervallumra eső gyakoriságát (lásd 2. táblázat). A párhuzamos mérési eredmények grafikus eloszlási diagramjának megrajzolásával információt nyerhetünk a mérési eredmények eloszlásáról (lásd 21. ábra).

1. táblázat

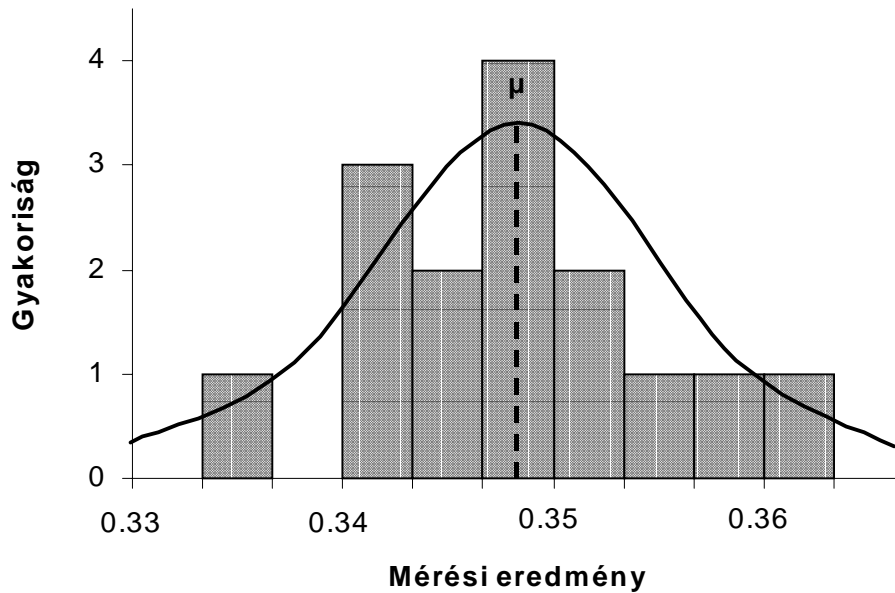
Egy mintaoldat 15 ismétléssel kapott eredményei (abszorbancia értékek) spektrofotometriás meghatározás során

Mérés	Érték	Mérés	Érték
1.	0,3410	9.	0,3430
2.	0,3350	10.	0,3420
3.	0,3470	11.	0,3560
4.	0,3590	12.	0,3500
5.	0,3530	13.	0,3630
6.	0,3460	14.	0,3530
7.	0,3470	15.	0,3480
8.	0,3460		

2. táblázat

Mérési eredmények eloszlási gyakorisága (mérési adatokat lásd az 1. táblázatban)

Tartomány	Gyakoriság	Relatív gyakoriság (%)
0,3300-0,3333	0	0
0,3333-0,3367	1	6,67
0,3367-0,3400	0	0
0,3400-0,3433	3	20,00
0,3433-0,3467	2	13,33
0,3467-0,3500	4	26,67
0,3500-0,3533	2	13,33
0,3533-0,3567	1	6,67
0,3567-0,3600	1	6,67
0,3600-0,3633	1	6,67
0,3633-0,3667	0	0
0,3667-0,3700	0	0



21. ábra

A 2. táblázatban szereplő mérési adatok eloszlási diagramja és az elméleti Gauss-féle eloszlást reprezentáló görbe

Ha a mérések számát a végtelenségig növeljük, az intervallumok nagyságát pedig ezzel párhuzamosan csökkentjük, akkor egy harang alakú eloszlási görbét kapunk, amelyet Gauss- vagy normális eloszlású görbének neveznek. A Gauss-féle eloszlás matematikailag a következőképpen fejezhető ki:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

ahol

$f(x)$ a normális eloszlás eloszlásfüggvénye

σ a mérések standard deviációja

μ a mérések átlaga

x az adott mérési eredmény (változó)

A mérési adatok szóródását az átlag érték körül a standard deviáció (σ) és annak négyzete a variancia (σ^2) írja le (22. ábra). Mivel azonban a valóságban csak véges számú méréseket tudunk elvégezni, az átlagot és a standard deviációt meg kell

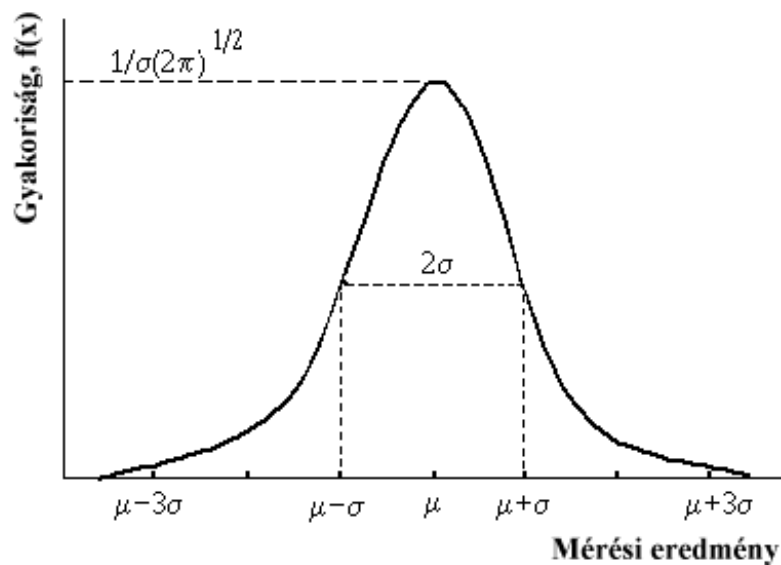
becsülünk. A becsült paramétereket tartalmazó Gauss-féle eloszlás így módon a következőképpen alakul:

$$f(x) = \frac{1}{s\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\bar{x})^2}{2s^2}}$$

ahol

s a standard deviáció becsült (legvalószínűbb) értéke

\bar{x} az átlag becsült (legvalószínűbb) értéke



22. ábra

A Gauss-féle eloszlás valószínűségi sűrűségfüggvénye (μ : az átlag, σ : a standard deviáció)

A mérés legvalószínűbb értékül az n mérési adat \bar{x} számtani közepét fogadjuk el:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

A standard deviáció becsléséhez pedig az alábbi egyenletet használhatjuk:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

A standard deviáció mellett a mérési pontok szórásának jellemzésére gyakran használják a relatív standard deviációt (s_r):

$$s_r(\%) = \frac{s}{\bar{x}} 100$$

A standard hibán az n mérés átlagának átlagos hibáját értjük:

$$s_x = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Az analitikus célja a valódi érték minél jobb becslése. Azt már megállapítottuk, hogy ha nem lép fel módszeres hiba, akkor a mintaátlaggal becsüljük a valódi értéket. Azt is tudjuk már, hogyha normális eloszlásúnak tekinthető a mérési eredményünk, akkor a mintaátlaggal történő becslés "jó" becslés lesz. Kihasználva azonban azt a feltételezést, hogy az eredmény eloszlása normális, ennél többet is tehetünk, meg tudunk adni egy intervallumot (megbízhatósági- vagy konfidenciaintervallumot) az átlag érték körül, amelyben adott valószínűséggel ($1-\alpha$) ott lesz a keresett valódi érték. A konfidenciaintervallum kiszámításához a Student-eloszlás t -értéke a mérések száma ($n-1$) és a valószínűségi szint ($1-\alpha$) alapján meghatározható, vagy táblázatokból kikereshető. Az átlagra vonatkozó konfidencia-intervallum:

$$\Delta x = \frac{t_{(1-\alpha; n-1)} \cdot s}{\sqrt{n}}$$

Vagyis, ha a mérési eredményekről feltételezhető, hogy normális eloszlású, továbbá, hogy nem terheli módszeres hiba, akkor statisztikai szempontból a párhuzamos mérések eredményeként egy

$$\bar{x} \pm \Delta x$$

intervallumot kell megadni, és azt állíthatjuk, hogy $1-\alpha$ valószínűséggel ezen intervallumban helyezkedik el a keresett valódi érték (az intervallum megadásakor fel kell tüntetni α és n értékét is).

FELADATOK

1. feladat

Az F-1. ábrán bemutatott kromatogram csúcsait jellemezze kódjelzések segítségével. A kódokat írja be az F-1. táblázat megfelelő oszlopába.

2. feladat

Milyen integrációs paramétereket (csúcsmagasság-, csúcsterület- és csúcshélességkülönböző értéket) adna meg az F-1. ábrán bemutatott kromatogram integrálásához, hogy a szoftver mind a 16 csúcsot értékelje, viszont a 85.551 perces retenciós időnél megjelenő kis csúcsot a szoftver ne kezelje hasznos csúcsként. E kis csúcs paraméterei:

Ret.idő (perc)	Csúcs kezdete (perc)	Csúcs vége (perc)	Magasság	Terület	Szélesség $w_{1/2}$ (perc)
85.551	84.33	86.28	11.085	14.1964	1.750

3. feladat

Különböző integrációs paraméterek hatásának vizsgálata az integrálási folyamatra. (Ezt a feladatot a gyakorlatvezető mutatja be a HP ChemStation programmal.)

4. feladat

Adja meg az F-1. ábrán szereplő kromatogram komponenseinek csúcsmagasság- és csúcsterület-százalékos összetételét. Használja az F-1. táblázatot.

5. feladat

Számolja ki az elméleti tányérszám értékeket az F-1. ábrán szereplő kromatogram 1-5 komponenseire. Számolja ki a felbontás értékét a 6-7, a 8-9, 10-11 és a 12-13 komponenspárok esetére. Használja az F-1. táblázatot.

6. feladat

Egy minta kromatográfiás elemzéséhez 15 ismételt mérést végeztek, az adott komponensre kapott abszorbancia értékeket az F-2. táblázat tartalmazza. Adja meg a mérések átlagát, szórását (standard deviációt), szórásnégyzetet (varianciát), a relatív standard deviációt, és a standard hibát.

7. feladat

Egy minta 10 ismételt elemzésekor kapott 2 csúcs migrációs időit foglalja össze az F-3. táblázat. Adja meg a két csúcs migrációs időinek relatív standard deviációját. Számolja ki az egyes mérések esetén a 2. csúcsnak az 1. csúcsra vonatkozó korrigált migrációs idejét, és adja meg ezek relatív standard deviációját.

8. feladat

4 komponensű (1, 2, 3 és 4 jelzésű) külső standard kalibráló oldatokra kapott elektroferogramok (F-2. ábra) alapján rajzolja meg a kalibrálógörbét.

Önállóan vagy a gyakorlatvezető segítségével MS Excel programmal is ábrázolja a kalibrációs pontokat, illesszenek a pontokra egyenest/görbét, adja meg a korrelációs együttható értékét és az egyenes/görbe egyenletét.

Egy minta a négy komponens ismeretlen koncentrációban tartalmazza. A komponenseknek megfelelő csúcsok integrált területei: 1: 2.186; 2: 4.092; 3: 6.972 és 4: 3.421. Határozza meg az ismeretlen koncentrációkat a kalibrációs diagramok alapján, illetve az egyenes/görbe egyenlete segítségével.

9. feladat

Az előző feladatot hajtsa végre a belső standard módszert használva. (Az F-2. ábrán a B.S. jelű csúcs jelzi a belső standardnak megfelelő csúcsot.) A belső standard koncentrációja mind a standard, mind az ismeretlen mintában azonos, 20 mg/L volt.

10. feladat

Az F-3. ábrán A, B és C komponensek kontúrtérképes izoabszorpciós grafikonja látható. Adja meg az egyes komponensek optimális detektálási hullámhossz-tartományát. Mi az optimális detektálási hullámhossz-tartomány az A és B, az A és C, illetve az A, B és C komponensek esetén.

11. feladat

Az F-4. ábrán 4 komponensből álló minta elektroferogramjának 3 dimenziós diagramja látható. Jellemezze az elemzést az elválaszthatóság, a detektálhatóság és a komponensek azonosíthatósága szempontjából. Mi lehet az optimális detektálási hullámhossz?

12. ábra

Értelmezze egy csúcstisztasági vizsgálatnak az F-5. ábrán bemutatott diagramjait és eredményeit.