

Blízká infračervená spektrometrie (NIR)

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Číslo projektu: 2016FVHE/2340/55

Bc. Tereza Michalková
MVDr. Michaela Králová, Ph.D.

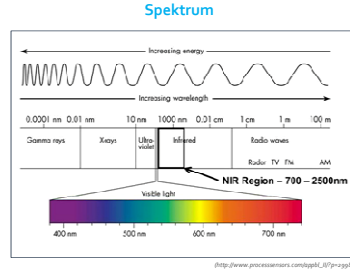


Princip infračervené spektrometrie

Měření absorpce infračerveného záření molekulami látek.

Infračervená oblast	zkratka	vlnová délka [μm]	vlnčet [cm ⁻¹]
Blízká	NIR	0,78 – 2,5	12800 – 4000
Střední	MIR	2,5 – 50	4000 – 200
Vzdálená	FIR	50 – 1000	200 – 10

Princip infračervené spektrometrie



Spektrum

Increasing energy

Increasing wavelength

0.0201 nm 0.01 nm 10 nm 100 nm 0.3 nm 1 cm 1 m 100 m

Gamma rays X-rays Ultra violet Infrared Radio waves

Radar TV FM AM

Visible light

400 nm 500 nm 600 nm 700 nm

NIR Region – 700 – 2500nm

(http://www.procesors.com/isp/017p1998)

Princip infračervené spektrometrie

Energie fotonů IR záření

- nestačí pro excitaci elektronů v molekulových orbitálech
- je dostatečná ke změně vibračního či rotačního stavu molekuly

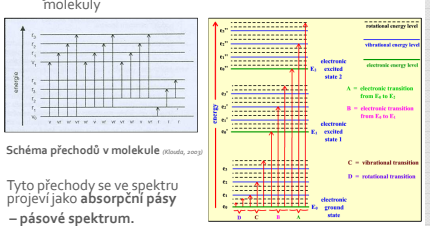


Schéma přechodů v molekule (Křída, 2007)

Tyto přechody se ve spektru projeví jako absorpční pásy – pásové spektrum.

(http://www.wag.cuhk.edu.hk/home/jiangcheng/inf/used.html)


Rotace a vibrace

Rotace

- molekula rotuje kolem svého těžiště
- energie rotace závisí na hmotnosti vázaných atomů a na délce vazby

Vibrace

- vazba mezi atomy se chová jako pružina – vázané atomy na ní vibrují
- energie vibrací závisí na pevnosti vazby a na hmotnosti vázaných atomů

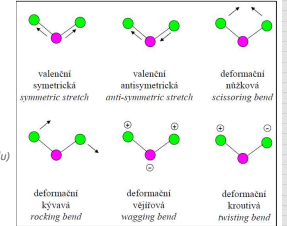


(http://www.physnet.org/edu/jwu/ast03/figs/) (http://www.chem.toronto.edu/chem100/chem100-01-general-chemistry-in-motion-energy-charges-and-the-bond.html)

Vibrace molekul

Vibrace molekul

- valenční (změna délky vazby)
 - symetrické
 - antisymetrické
- deformanční (změna valenčního úhlu)
 - rovinné
 - mimorovinné

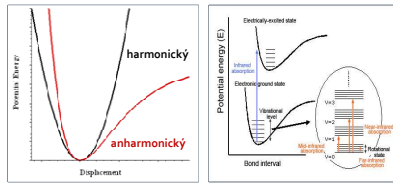


(http://www.wvsc.edu)

Harmonický a anharmonický oscilátor

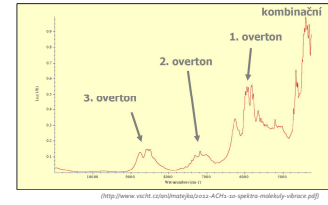
Vazba mezi vázanými atomy se chová jako pružina, na které atomy **vibrují**, můžeme ji tedy znázornit jako harmonický oscilátor.

Skutečné molekuly se však chovají spíše jako anharmonický oscilátor.

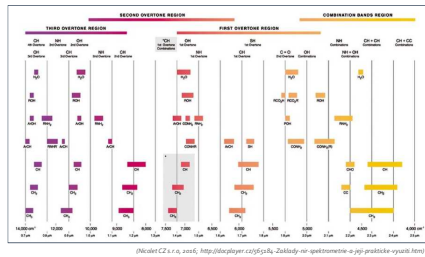


Typy vibračních přechodů

- fundamentální
- vyšší harmonické – svrchní tóny - overtóny
- kombináční



Absorpční pásy v NIR



Spektrum

Závislost transmittance nebo absorbance na vlnočtu dopadajícího záření.

- transmittance (propustnost) = poměr intenzity záření, které prošlo vzorkem (I), k intenzitě záření vycházejícího ze zdroje (I_0)

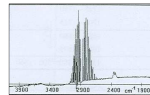
$$T = \frac{I}{I_0}$$

- absorbance $A = -\log T$

Spektrum

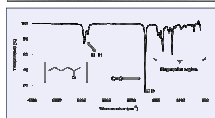
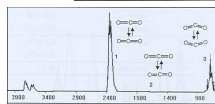
Oblast skupinových vibrací

- 4000 – 1500 cm^{-1}
- absorpční pásy vibrací různých funkčních skupin
- identifikace těchto skupin v molekule



Oblast otisku prstu

- 1500 – 400 cm^{-1}
- vibrace určené vibračním chováním celého skeletu molekuly
- knihovny spekter



(Kloda, 2007) <http://chemwiki.ucdavis.edu>

Které látky poskytují signál v IR spektru?

Látky poskytující signál v IR spektru

- látky, jejichž molekuly obsahují polární vazby
- = molekuly složené z různých atomů
- = organické a anorganické sloučeniny (H_2O , CO_2 , NO_2 , HCl , soli...)

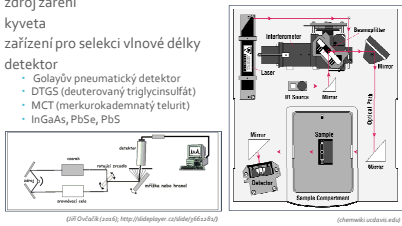
Látky neposkytující signál v IR spektru

- prvky v molekulovém nebo krystalickém stavu
- = např. O_2 , O_3 , N_2 , Cl_2 , Ar , S_8 , křemík, grafit, diamant

Signál molekuly v IR spektrometrii je úměrný druhé mocnině změny dipólového momentu molekuly během vibračního pohybu molekuly.

Instrumentace

- zdroj záření
- kyveta
- zařízení pro selekci vlnové délky
- detektor
 - Golayův pneumatický detektor
 - DTGS (deuterovaný triglycinsulfát)
 - MCT (merkurokadmerný telurit)
 - InGaAs, PbSe, PbS



©2011 Ovičák (2010), <http://dtkp.fyz.vutbr.cz> (schéma) ucdavis.edu

- disperzní IR spektrometry
- spektrometry s Fourierovou transformací (FT-IR)

FT-IR spektrometr

Základem je Michelsonův interferometr

- nahrazuje monochromátor,
- na principu interference zesiluje, resp. zeslabuje záření z polychromatického zdroje.

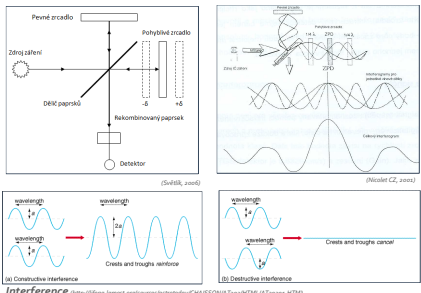
Výsledkem měření je interferogram = závislost odezvy detektoru na čase.

Po provedení Fourierovy transformace pomocí matematického výpočtu získáme infračervená spektra.

zdroj → interferometr → vzorek → detektor → počítač → vyhodnocení dat

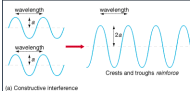
Schéma FT-IR spektrometru (Procházková, 2012)

Schéma Michelsonova interferometru




(Svobík, 2006) (Wolcott, 2002)

(a) Constructive interference

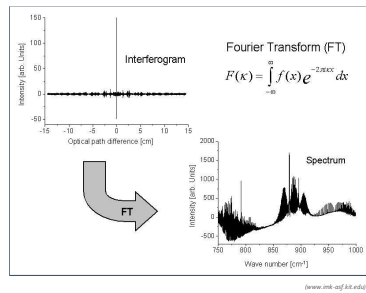


(b) Destructive interference



Interference (http://dtkp.fyz.vutbr.cz/our-area-of-research/FTIR/FTIR_A/FTIR_A_FTIR/)

Interferogram a spektrum



Fourier Transform (FT)

$$F(x) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-2\pi i x \xi} d\xi$$

FT

(www.mik-ugf.de)

Techniky měření IR spekter

Transmisní

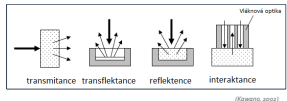
- transmittance
- absorbance

Reflexní

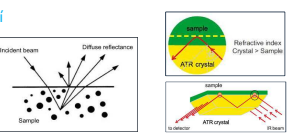
- spekulární reflexe
- difúzní reflexe (DRIFT)
- zeslabená totální reflexe (ATR – attenuated total reflectance)

Zvláštní uspořádání

- reflektance
- interakce




(Kováč, 2002)




(http://www.edmgr.com/journalArticle.aspx?ArticleID=55529)

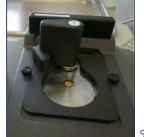
Typy kyvet



Transflekční kyveta



Kompresní kyveta



Spinner

Analýza potravin

NIR spektrometrie

- kvantitativní nedestruktivní analýza hlavních složek vzorků, identifikace látek

MIR spektrometrie

- identifikace organických látek
- z MIR spektra je možné určit:
 - funkční skupiny molekuly (*oblast charakteristických vibrací*; 4 000 - 1 250 cm^{-1})
 - totožnost látky - knihovny spekter (tzv. *oblast otisku palce*; 1 250 - 400 cm^{-1})
- ke kvantitativní analýze

NIR spektrometrie

Analýza potravin

Analýza potravin

- mléko a mléčné výrobky
- maso a masné výrobky
- vejce a výrobky z nich
- obiloviny a výrobky z nich
- nápoje
- ovoce
- zelenina
- a další

Kvantitativní analýza

- bílkoviny, tuk, sacharidy, sušina, voda,...
- pH, aw, el. vodovost, hustota,...
- senzorní vlastnosti

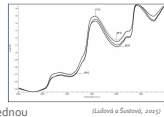
Kvalitativní analýza

- fáze výroby, zrání
- odlišení podobnosti vzorků
- rozdělení vzorků do skupin dle vybraných parametrů

NIR spektrometrie

Výhody

- rychlost měření
- snadná obsluha
- nedestruktivní metoda
- nevyžaduje speciální přípravu vzorku
- měření přes transparentní obaly
- možnost stanovení více parametrů najednou
- možnost využití přímo v provozu



Nevýhody

- nevhodná technika pro stopovou analýzu
- obtížná interpretace spekter, složité vyhodnocení - chemometrie
- pro každý parametr samostatná kalibrace
- závislost na přesnosti použité referenční metody
- vyšší pořizovací cena přístroje
- velká citlivost na fyzikální změny analyzovaného materiálu (homogenita, distribuce velikosti částic, teplota, vlhkost apod.)

Typy analýz

program TO Analyst (Nicolet CZ)

Kvalitativní analýzy

- Rozlišovací analýza
- Test podobnosti
- Test odlehlosti
- Vyhledávání standardů v knihovně
- Kontrola kvality – srovnání s třídami standardů

Kvantitativní analýzy

- Partial Least Squares (PLS)
- Lambert-Beerův zákon
- Principle Component Regression (PCR)
- Classical Least Square (CLS)
- Stepwise Multiple Linear Regression (SMLR)

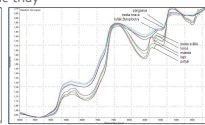
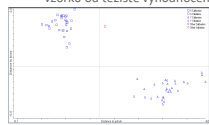
Kvalitativní analýzy

Discriminant Analysis

Kvalitativní analýzu používáme pro **potvrzení** nebo **vyvrácení** tvrzení, zda **hledaný analyt je obsažen** ve zkoumaném vzorku nebo pro **zařazení** vzorku do tříd.

Rozlišovací analýza (Discriminant Analysis)

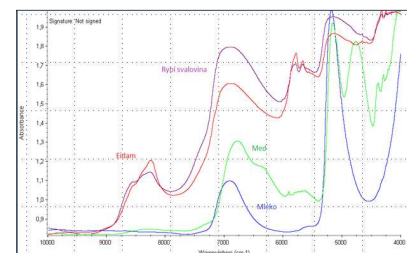
- klasifikační technika
- určuje nám **třidu**, které se neznámý materiál **podobá**
- výsledkem je **Mahalanobisova vzdálenost** = vzdálenost vzorku od těžiště vyhodnocené třídy



Diskriminační analýza

Spektra (Břehová et al., 2012)

Spektrum



Kvantitativní
analýza - PLSMetoda částečných nejmenších čtverců
(PLS - Partial Least Squares)

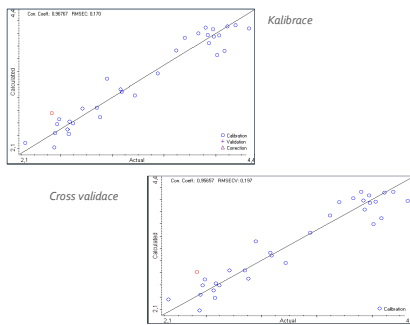
- využívá **vícerozměrný prostor** a pomáhá nám komprimovat obsáhlá spektrální data
- počet spektrálních proměnných je převeden na **menší počet faktorů** (faktory PLS) – odstraní se **nepotřebné** spektrální informace
- vhodná pro nedefinované matrice analyzovaných vzorků, nebo pokud dochází k **překrytí části** spektrálních pásů
- možnost stanovení **více analytů** z jednoho naměřeného spektra
- nevýhodou je **složitý kalibrační model**

PLS analýza

Vytvoření kalibračního modelu

- minimálně **30 kalibračních standardů** pro každý stanovovaný analyt
- **validační** standardy by měly tvořit $\approx 1/5$ kalibračních standardů
- kalibrační a validační standardy nelze připravit pouze ředěním (nesmí vykazovat závislost)
- standardy kalibrační se využijí pro **konstrukci kalibračního modelu** a standardy validační pro **zajištění predikčních schopností modelu**
- pro **vytvoření kalibračního modelu** se používají naměřená **infračervená spektra standardů** a **kvantitativní hodnoty** hledaných analytů získané **referenčními metodami**

PLS analýza



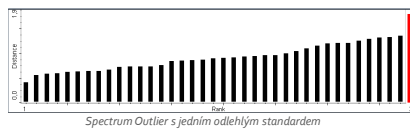
PLS analýza

- výstupem metody je **lineární regrese** mezi vloženými kvantitativními hodnotami a hodnotami **vypočtenými** kalibračním modelem
- parametry **charakterizující** kvalitu vytvořeného modelu jsou hlavně **korelační koeficient** a **dále chyba kalibrace (RMSEC)**
- výsledky analýzy validačních standardů slouží k výpočtu **chyby validace (RMSECV)** a **chyby predikce (RMSEP)**, což je parametr **predikční schopnosti** vytvořeného kalibračního modelu
- **spolehlivost kalibrace** lze posoudit na základě **kalibračního variačního koeficientu (CCV)** a **predikčního variačního koeficientu (PCV)**

PLS analýza

Diagnostika Spectrum Outlier (odlehle standardy)

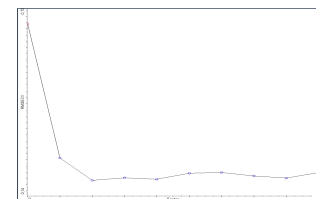
- slouží k **identifikaci standardů**, u kterých byly **nepřesně** stanoveny referenční hodnoty nebo se objevila **spektrální odchylka**
- počítá **Mahalanobisovu vzdálenost** spektra každého kalibračního standardu aktivní metody od spektra průměrného, a následně hledá spektra, která jsou **nejvíce odlišná** od ostatních standardů



PLS analýza

Diagnostika PRESS

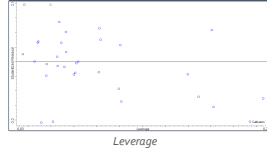
- hodnota PRESS je indikátorem **chyby kalibrace PLS metody**



PLS analýza

Diagnostika Leverage

- poskytuje informace o tom, jaký vliv má každý ze standardů na kalibrační model a jak přesně popisuje kalibrační model každý standard
- datové body by měly být distribuovány **souměrně** po celém rozsahu generovaného grafu
- **izolovaný bod** indikuje rozdílnost korespondujícího standardu od ostatních v metodě



- Děkuji za pozornost.