
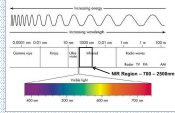


FT-NIR SPEKTROMETRIE - KVALITATIVNÍ ANALÝZA

Princípem infračervené spektrometrie (IR) je měření absorpce infračerveného záření molekulami látek. Infračerveným zářením rozumíme elektromagnetické záření v rozsahu vlnových 12 500 až 20 cm⁻¹ a vlnových délek 0,8 – 1000 μm. Energie fotonů infračerveného záření nepostačuje pro excitaci elektronů v molekulových orbitálech, ale je dostatečná ke změně vibračního stavu či rotačního stavu molekuly. Tyto přechody se ve spektru projeví jako absorpční pásy.

Dělení infračervené oblasti spektra (vlnová délka a vlnóčet)

- blízká infračervená oblast (NIR)**
0,78 – 2,5 μm, 12800 – 4000 cm⁻¹
- střední infračervená oblast (MIR)**
2,5 – 50 μm, 4000 – 200 cm⁻¹
- vzdálená infračervená oblast (FIR)**
50 – 1000 μm, 200 – 10 cm⁻¹

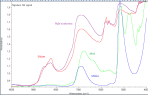

Obr. 1: Spektrometr Nicolet
Obr. 2: Spektrum

Kvalitativní analýza

- kvalitativní analýzu používáme pro potvrzení nebo vyvrácení tvrzení, zda hledaný analyt je obsažen ve zkoumaném vzorku nebo pro zařazení vzorku do třídy.
- metody kvalitativní analýzy:
 - Rozlišovací analýza
 - Test podobnosti
 - Test odlišnosti
 - Vyhledávání standardů v knihovně
 - Kontrola kvality – srovnání s třídami standardů


Rozlišovací analýza (Discriminant analysis)

- klasifikační technika určující třídu, které se neznámý materiál podobá
- třídy v kalibračním standardu jsou definovány nejméně dvěma standardy
- výsledkem je **Mahalanobisova vzdálenost**, tj. vzdálenost vzorku od těžiště vyhodnocené třídy

Obr. 6: Spektra (elidam, med, rybi svačkovina)
Obr. 7: Diskriminanti analýza

FT-IR spektrometr (s Fourierovou transformací)

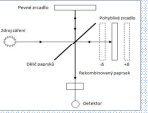
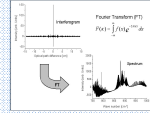


Obr. 3: Schéma FT-IR spektrometru (Procházková, 2012)

Michelsonův interferometr

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

- výsledkem měření je **interferogram** (závislost odezvy detektoru na čas)
- po provedení **Fourierovy transformace** pomocí matematického výpočtu získáme spektra

Obr. 4: Michelsonův interferometr (Světlík, 2006)
Obr. 5: Interferogram a spektrum (www.lmk-asf.kit.edu)

Práce vznikla za finanční podpory projektu NA VFU Brno č. 2016FVHE2340/55. Autoři: Bc. Tereza Michalčková, MUDr. Michaela Králová, Ph.D.

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA METODA ČÁSTEČNÝCH NEJMENŠÍCH ČTVERCŮ (PLS)

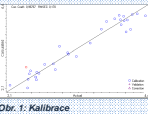
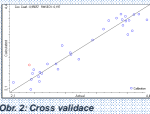
Metoda částečných nejmenších čtverců (PLS – Partial least squares) využívá vícerozměrný prostor a umožňuje nám komprimovat obsáhlá spektrální data. Počet spektrálních proměnných je ve spektrální matici převeden na menší počet faktorů (faktory PLS), odstraní se tak nepotřebné spektrální informace.

PLS metoda

- vhodná metoda pro nedefinované matrice analyzovaných vzorků a pro případy, kdy dochází k překrytí části spektrálních pásů
- výhodou je možnost stanovení více analytů z jednoho naměřeného spektra
- nevýhodou je složitý kalibrační model

Vytvoření kalibračního modelu

- slepoň 30 kalibračních standardů na každý stanovovaný analyt
- validační standardy by měly tvořit pětinu kalibračních standardů
- kalibrační a validační standardy nelze připravit pouze ředěním (nesmí vykazovat závislost)
- standardy kalibrační se využívají pro konstrukci kalibračního modelu a standardy validační pro zajištění predikčních schopností modelu
- pro vytvoření kalibračního modelu se používají naměřená infračervená spektra standardů a získané kvantitativní hodnoty hledaných analytů referenčními metodami

Obr. 1: Kalibrace
Obr. 2: Cross validate

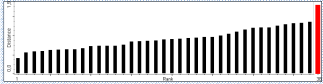
- výstupem metody je lineární regrese mezi vloženými kvantitativními hodnotami a hodnotami vypočtenými kalibračním modelem
- parametry charakterizující kvalitu vytvořeného modelu jsou hlavně korelační koeficient a další chyba kalibrace (RMSEC)
- výsledky analýzy validačních standardů slouží k výpočtu 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)

Další metody kvantitativní analýzy

- Lambert-Beerův zákon
- Metoda multikomponentní analýzy – Principal component regression (PCR)
- Stepwise multiple linear regression (SMLR)
- Classical least square (CLS)

Diagnostika Spectrum Outlier (odlehle standardy)

- slouží k identifikaci standardů, u kterých byly nepřesně stanoveny referenční hodnoty nebo se objevila spektrální odchylka



Obr. 3: Spectrum Outlier

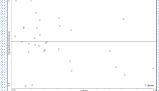

Počítá Mahalanobisovu vzdálenost spektra každého kalibračního standardu aktivní metody od spektra průměrného, a následně hledá spektra, která jsou nejvíce odlišná od ostatních standardů. Používá Dixonův nebo Chauvenetův test k posouzení, zda je odlišnost signifikantní. K výpočtu hodnoty Mahalanobisovy vzdálenosti jsou využívány spektrální informace pro každý standard a komponenty.

Diagnostika Leverage

- poskytuje informace o tom, jaký vliv má každý ze standardů na kalibrační model a jak přesně popisuje kalibrační model každý standard


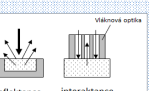
Diagnostika PRESS

- hodnota PRESS je indikátorem chyby kalibrace PLS metody.

Obr. 4: Leverage
Dávné body by měly být distribuovány zúsměrně po celém rozsahu generovaného grafu. Izolovaný bod indikuje rozdílnost korepondujícího standardu od ostatních v metodě.

Obr. 5: PRESS
Ideální tvar: S rostoucím počtem faktorů klesá parameter RMSECV.

Obr. 6: Transflekční kyveta
Obr. 7: Kompenční kyveta



Obr. 8: Techniky měření vzorků (Kawano, 2002)

Autoři: Bc. Tereza Michalčková, MUDr. Michaela Králová, Ph.D.
Práce vznikla za finanční podpory projektu NA VFU Brno č. 2016FVHE2340/55.