

Využití UV/VIS a IR spektrometrie v analýze potravin

Chemické laboratorní metody v analýze potravin

MVDr. Zuzana Procházková, Ph.D.

MVDr. Michaela Králová, Ph.D.



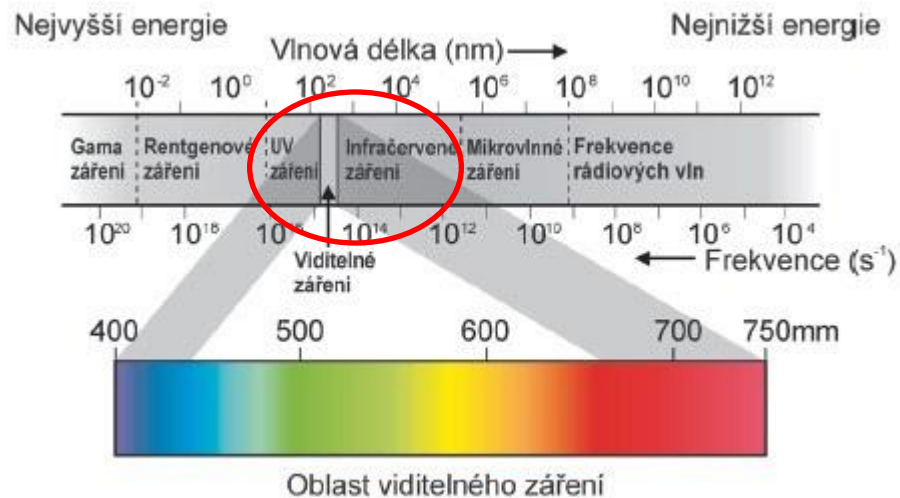
Spektrometrie: základy

- Interakce záření se studovanou hmotou

UV 400 - 10 nm

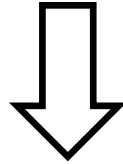
VIS 400 - 800 nm

IR 800 nm - 1000 μm



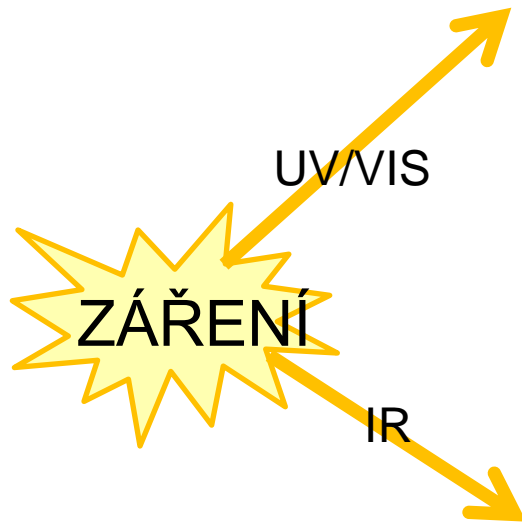
<http://energetika.tzb-info.cz>

elektromagnetické záření



změna energetického stavu molekuly

- změna elektronového stavu (obsazenost orbitalů)
- změna vibračního stavu
- změna rotačního stavu



- změna vibračního stavu
- změna rotačního stavu

Úvod

závislost spekter na periodickém pohybu

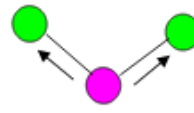
Každá čára vibračního spektra (IR) je svými vlastnostmi závislá na **počtu** a **hmotě** společně **kmitajících** atomů molekuly, na jejich **prostorovém uspořádání** a na vnitřně molekulovém **silovém poli**.

Prof. Dr. Arnošt Okáč (1948)

Vibrace molekul

Typy vibrací

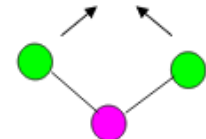
- **valenční:**
změna délky vazby
 - symetrické
 - antisymetrické
- **deformační**
změna valenčního úhlu
 - rovinné
 - mimorovinné



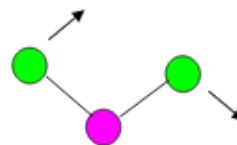
valenční
symetrická
symmetric stretch



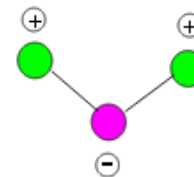
valenční
antisymetrická
anti-symmetric stretch



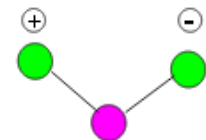
deformační
nůžková
scissoring bend



deformační
kývavá
rocking bend



deformační
vějířová
wagging bend

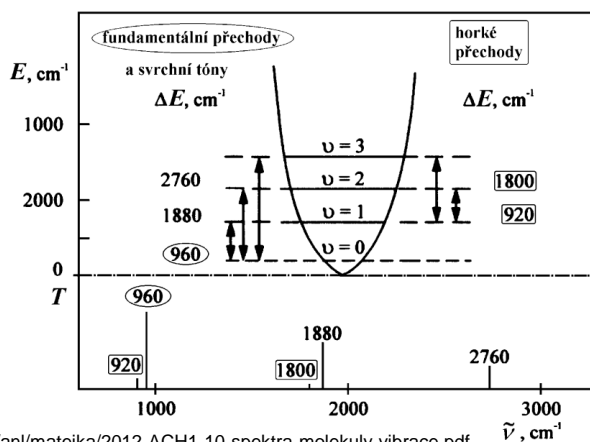


deformační
krouťivá
twisting bend

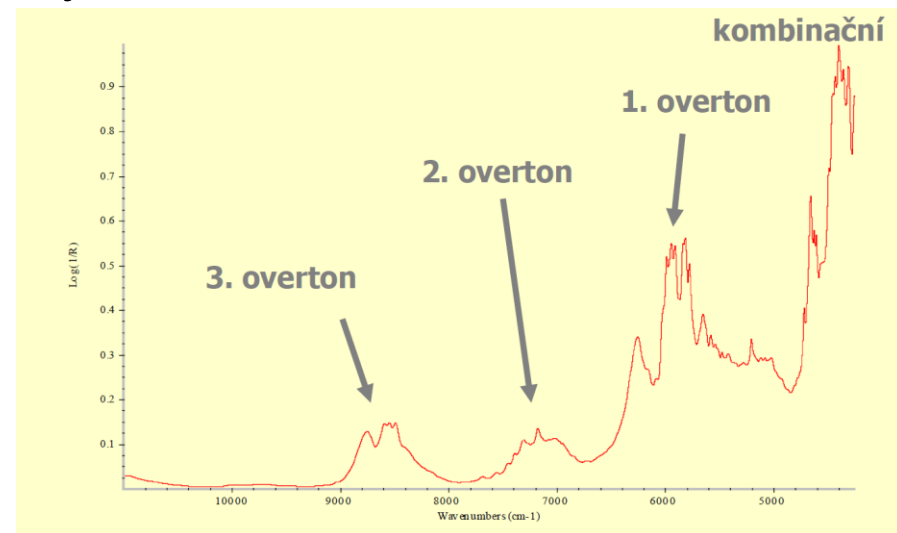
<http://web.vscht.cz>

Podstata IR spektrometrie

- přechody mezi vibračními (vibračně-rotačními) stavy
- typy přechodů při absorpci IR záření:
 - fundamentální (změna kvantového čísla o jednotku)
 - vyšší harmonické – svrchní tóny
 - kombinační



<http://www.vscht.cz/anl/matejka/2012-ACH1-10-spektra-molekuly-vibrace.pdf>



<http://www.vscht.cz/anl/matejka/2012-ACH1-10-spektra-molekuly-vibrace.pdf>

Infračervená spektroskopie

- Záření v rozsahu $12\ 500 - 10\ \text{cm}^{-1}$
- Měření IR záření absorbovaného nebo odraženého vzorkem
- Poskytuje informace o molekulách obsažených ve vzorku (funkční skupiny, mezimolekulové interakce)
- **Použití:**
 - analýza plynů, kapalin, tuhých vzorků
 - identifikace látek
 - kvantitativní analýza
- K identifikaci chemické struktury látek od 30. let 20. století
- Největší význam pro identifikaci organických látek má oblast spektra v oblasti $400 - 4000\ \text{cm}^{-1}$. Organické sloučeniny se zde projevují největším počtem absorpčních pásů

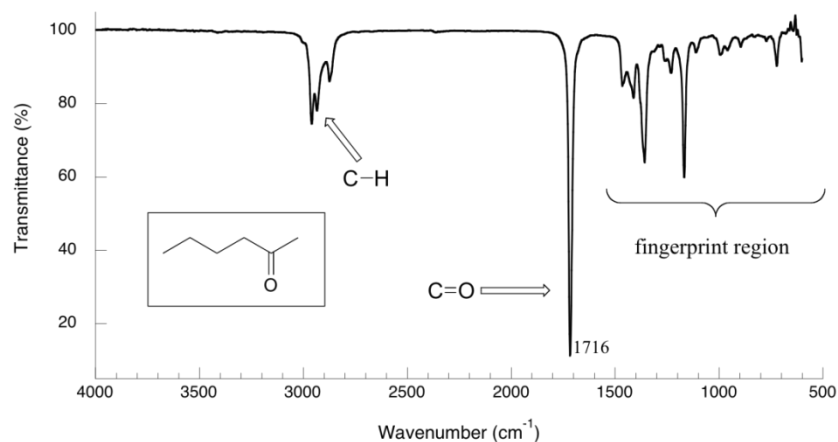
Výstupem měření je **spektrum**

= grafické znázornění funkční závislosti transmittance (T , v %) nebo absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření

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

Informace ze spektra:

- funkční skupiny molekul, konstituce molekul
- interakce molekul



<http://chemwiki.ucdavis.edu>

Které látky poskytují signál v IR spektru?

ANO

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

NE

- 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

Spektrální oblasti a rozdělení metod

	λ (μm)	$\tilde{\nu}$ (cm^{-1})
Blízká infračervená oblast (<i>near infrared</i> , NIR)	0,8 – 2,5	12 500 – 4 000
Střední infračervená oblast (<i>mid infrared</i> , MIR)	2,5 - 25	4 000 – 400
Vzdálená infračervená oblast (<i>far infrared</i> , FIR)	25 - 1000	400 - 10

MIR – normální vibrační přechody

NIR – vyšší harmonické vibrační přechody

FIR – mřížové frekvence a normální vibrace slabých vazeb a vazeb těžkých atomů

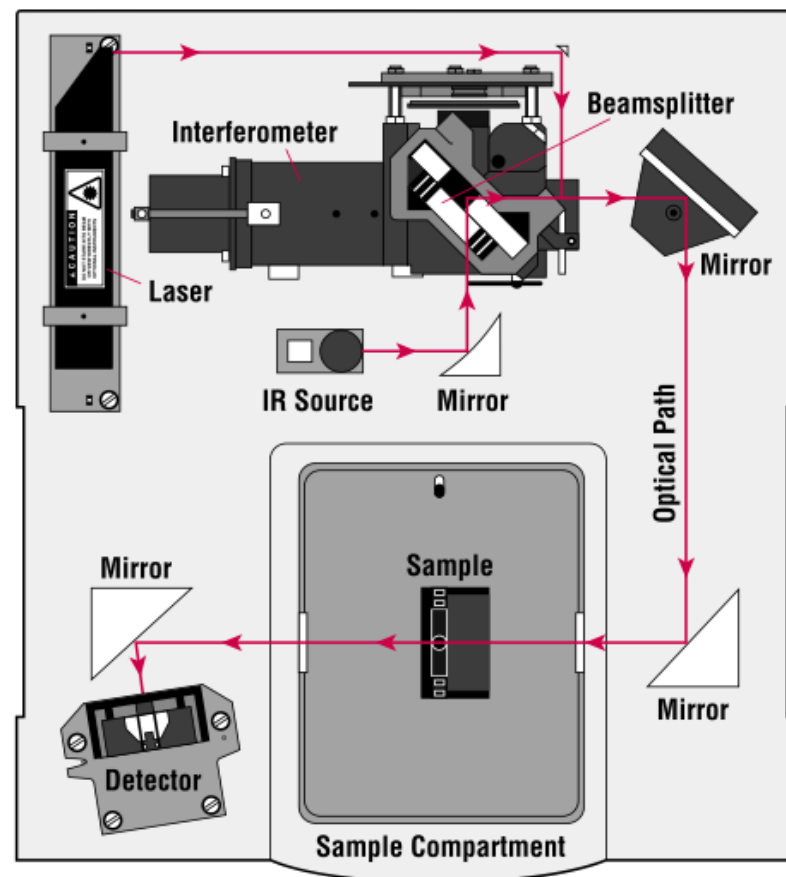
Instrumentace v IR spektrometrii

Základní součásti přístrojů

- zdroj
- měrná (a srovnávací) kyveta
- zařízení pro selekci vlnové délky
- detektor záření

Konstrukce

- jednoduché přístroje s filtrem
- klasické přístroje s disperzním systémem (monochromátorem)
- přístroje na principu interferometru (FTIR)



chemwiki.ucdavis.edu

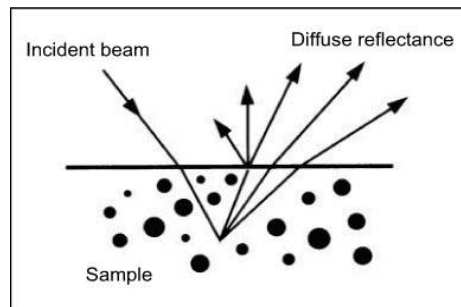
Techniky měření IR spekter

Transmisní metody – měření záření procházejícího vzorkem

- transmittance – měření záření po průchodu vzorkem
- absorbance – měření záření pohlceného vzorkem

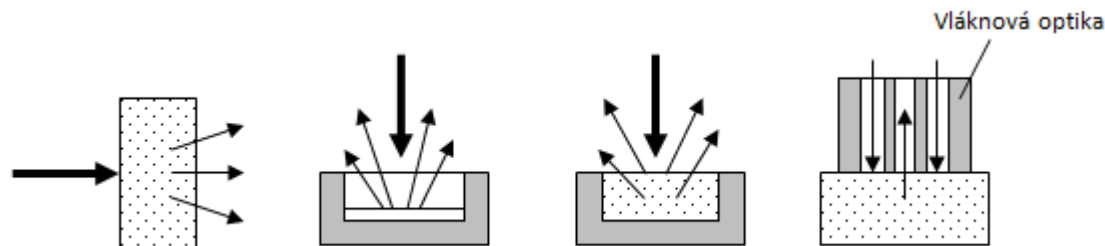
Reflexní metody – měření záření odraženého vzorkem

- spekulární reflexe
- difuzní reflexe (DRIFTS)



Zvláštní uspořádání

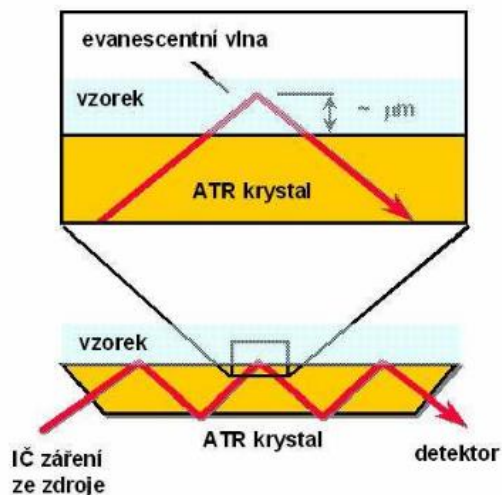
- transflektance
- interaktance



Technika ATR

= *attenuated total reflectance* (**zeslabený úplný obraz**)

- analýza materiálů, z nichž se obtížně připravují transparentní tenké vrstvy (pastovité vzorky, čokoláda...)
- vzorek se nanáší v kompaktní vrstvě na povrch měrného hranolu

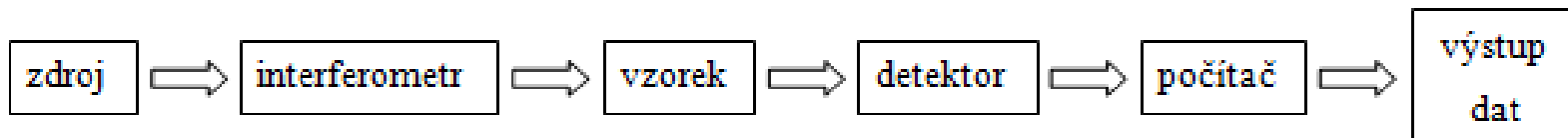
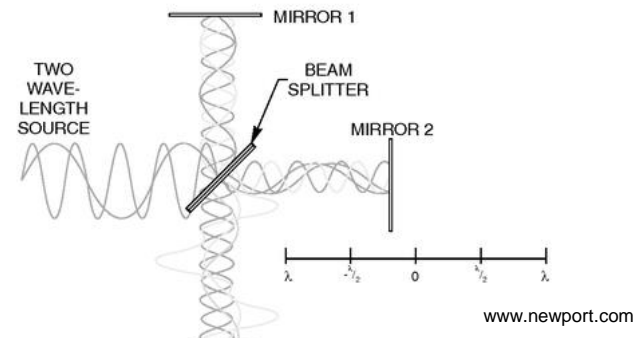
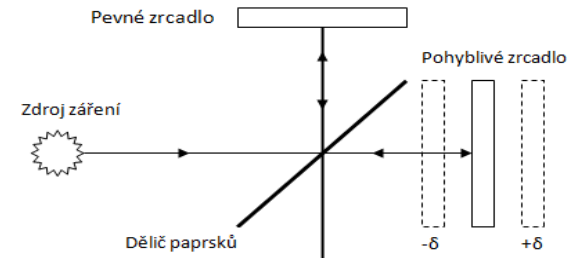


Spektrometry s Fourierovou transformací

- založeny na principu Michelsonova interferometru

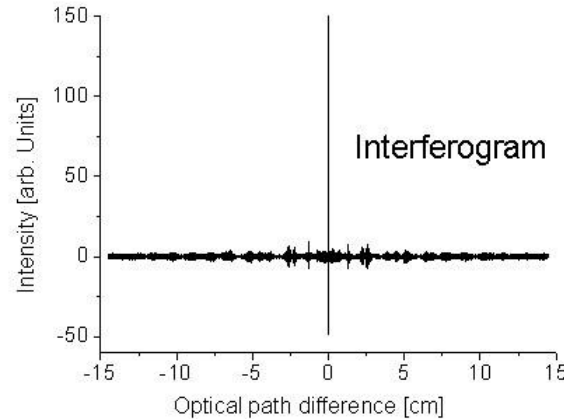
Výhody FTIR:

- není nutná disperzní optika → do vzorku vstupuje více energie
- rychlý záznam spektra (< 1s)
- vysoké rozlišení



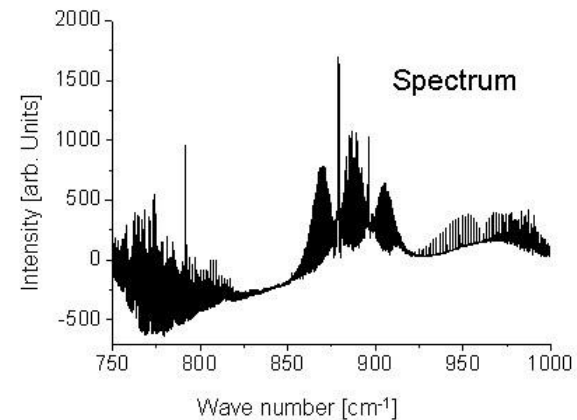
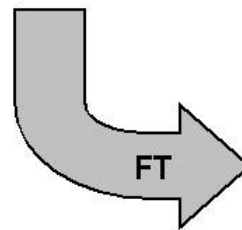
Spektrometry s Fourierovou transformací

- matematická úprava Fourierovou transformací → spektrum



Fourier Transform (FT)

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



www.imk-asf.kit.edu

IR pro analýzu potravin

- **NIR spektrometrie:** kvantitativní nedestruktivní analýza hlavních složek vzorků, identifikace látek
- **MIR spektrometrie:** identifikace organických látek
 - z MIR spektra je možné určit jaké funkční skupiny molekula obsahuje (*oblast charakteristických vibrací* – 4 000 - 1 250 cm^{-1}), příp. určit totožnost látky srovnáním s atlasem (knihovnou) spekter (tzv. *oblast otisku palce* – 1 250 - 400 cm^{-1})
 - v menší míře ke kvantitativní analýze

NIR pro analýzu potravin

- mléko, mléčné výrobky
 - maso, masné výrobky
 - obilniny a výrobky z nich
 - vejce a výrobky z nich
 - nápoje
 - ovoce, zelenina
 - plodiny...
- kvalitativní analýza
 - kvantitativní analýza

NIR pro analýzu potravin

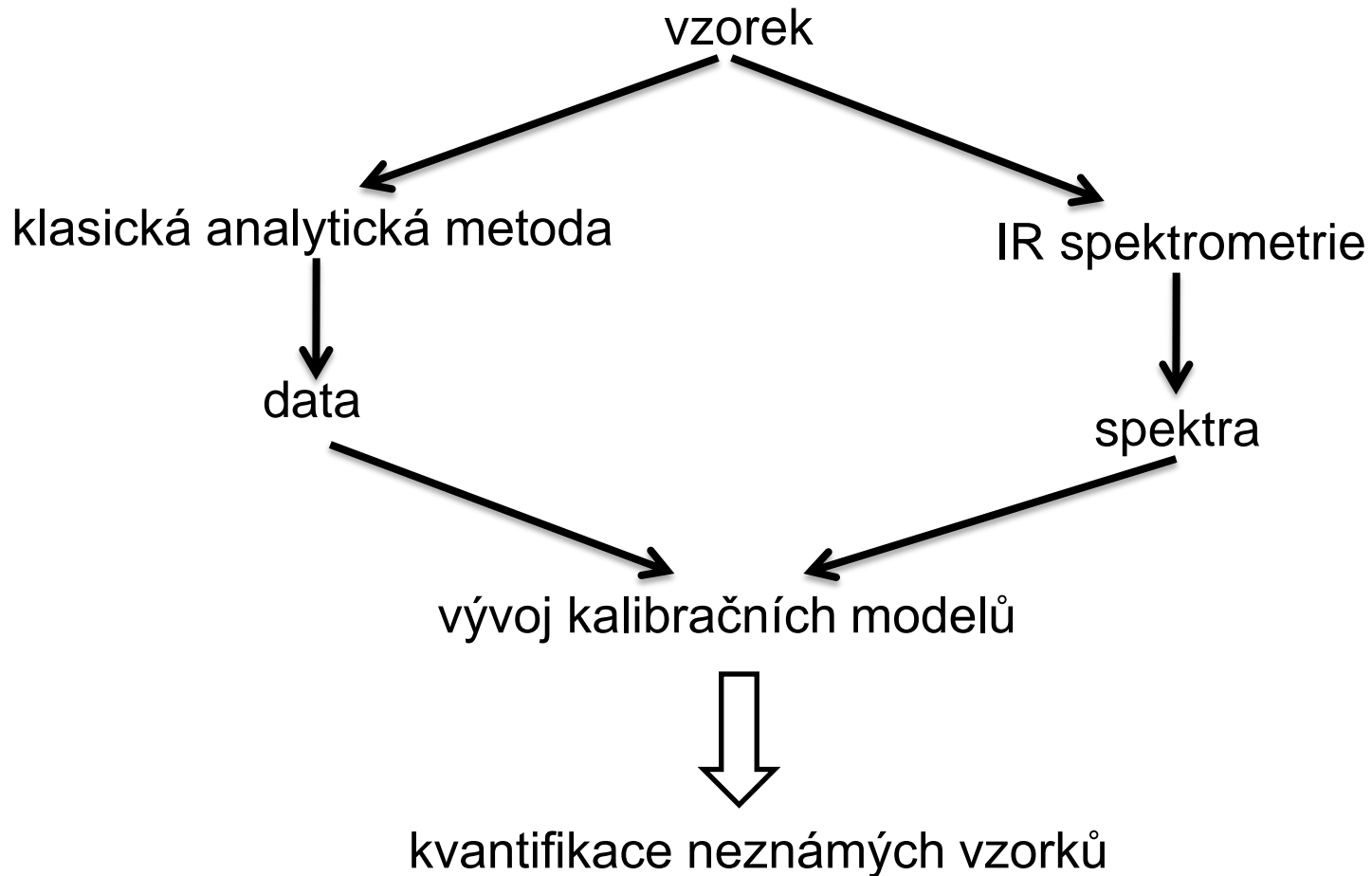
Kvantitativní analýza

- chemické parametry: obsah vody, sušiny, tuku, bílkovin, sacharidů...
- fyzikální parametry: a_w , elektrická vodivost, pH...
- technologické parametry: barva, čerstvost, vaznost vody...
- bakteriální parametry (MIR)

Kvalitativní analýza

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

NIR spektrometrie není primární metoda!



Výhody NIR spektrometrie:

- nedestruktivní, rychlá, jednoduchá metoda
- možnost použití přímo v provozu
- stanovení mnoha parametrů najednou

Nevýhody NIR spektrometrie:

- nevhodné pro stanovení minoritních látek
- pro každou složku samostatná kalibrace přístroje
- vysoká pořizovací cena přístroje

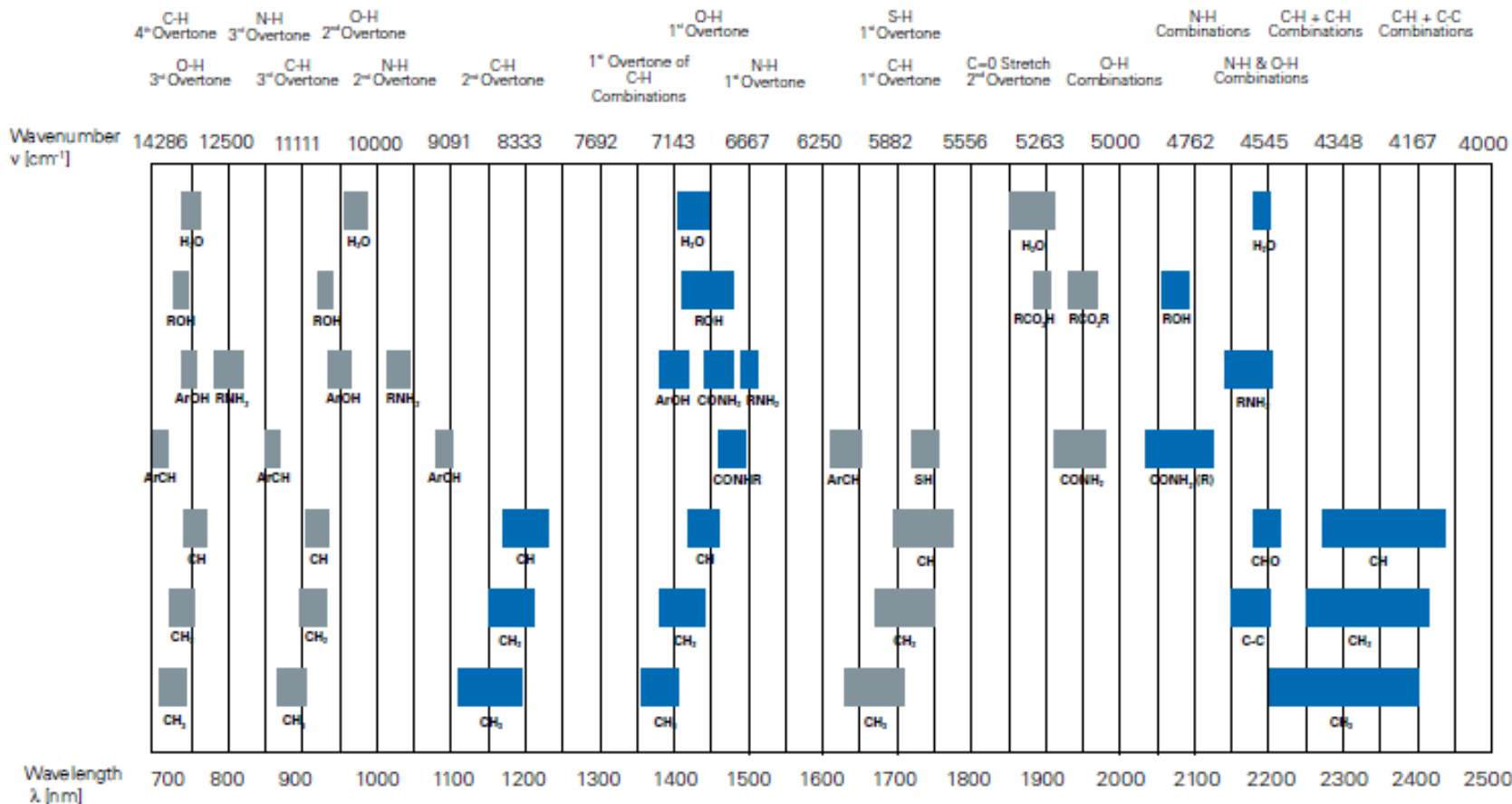
Near Infrared Band Assignment Table

Second Overtone Region

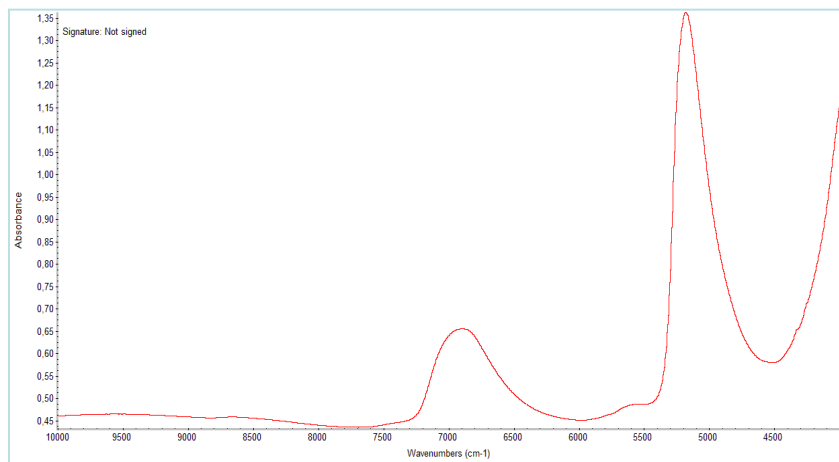
Combinations

Third Overtone Region

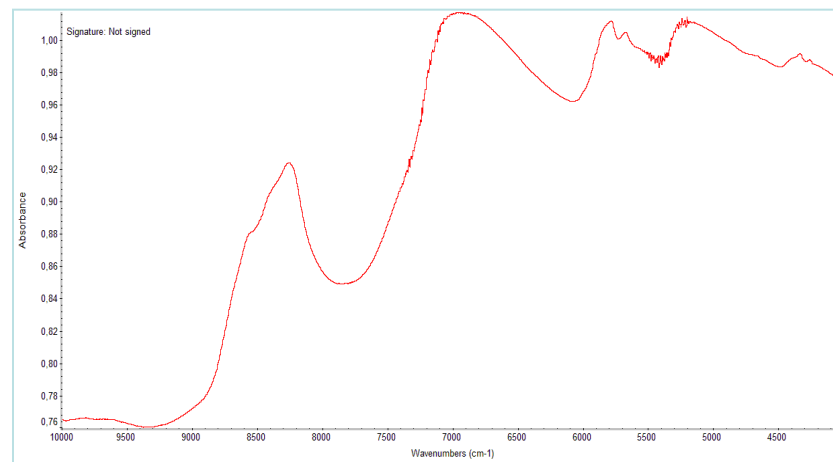
First Overtone Region



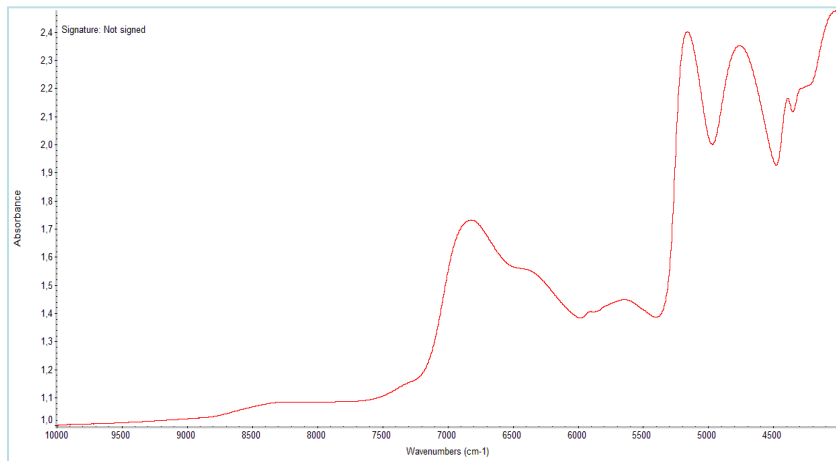
Spektrum syrové kravské mléko



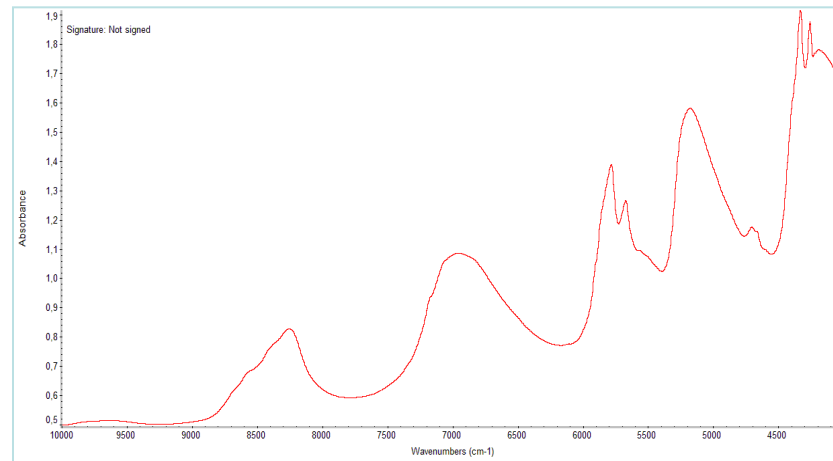
Spektrum salám Vysočina



Spektrum med



Spektrum máslo



UV/VIS spektrometrie

- absorpce zářivé energie molekulami analytu při průchodu paprsku vzorkem → valenční elektrony přechází na vyšší energetickou hladinu
- absorpce je dána přítomností chromoforu v molekule
- CHROMOFORY = atomové skupiny v molekulách organických látek, jež způsobují barevnost sloučeniny
- Absorpce v UV oblasti:
 - chromofory: $-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$, $>\text{C}=\text{O}$, $>\text{C}=\text{N}-$, $-\text{N}=\text{N}-$, aromatická jádra
 - nasycené sloučeniny absorbují jen ve vakuové oblasti
- Absorpce ve viditelné oblasti:
 - sloučeniny chromoforů: $-\text{N}=\text{N}-$, $\text{C}=\text{S}$, $-\text{N}=\text{O}$ v konjugaci s $-\text{C}=\text{C}-$ a (heterocyklickými) aromatickými jádry
 - vícejaderné aromatické a heterocyklické sloučeniny

UV/VIS spektrometrie

- Jako barevné se jeví látky, které absorbují ve viditelné oblasti
- Barva vzorku je dána odraženým zářením (látka má barvu komplementární k té, která byla absorbována):

Vlnová délka světla	Barva světla	Barva roztoku
400-435 nm	fialová	žlutozelená
435-480 nm	modrá	žlutá-žlutooranžová
480-490 nm	zelenomodrá	oranžová
490-500 nm	modrozelená	červenooranžová
500-560 nm	zelená	červená-purpurová
560-580 nm	zelenožlutá	fialová
580-595 nm	žlutooranžová	modrá
595-610 nm	červenooranžová	zelenomodrá
620-760 nm	červená	modrozelená

UV/VIS spektrometrie

Podmínky pro spektrofotometrické měření:

- přístroj (jedno nebo dvoupraprskový)
- vlnová délka → druh kyvety
- šířka štěrbiny
- koncentrace absorbující látky a tloušťka kyvety
- druh rozpouštědla

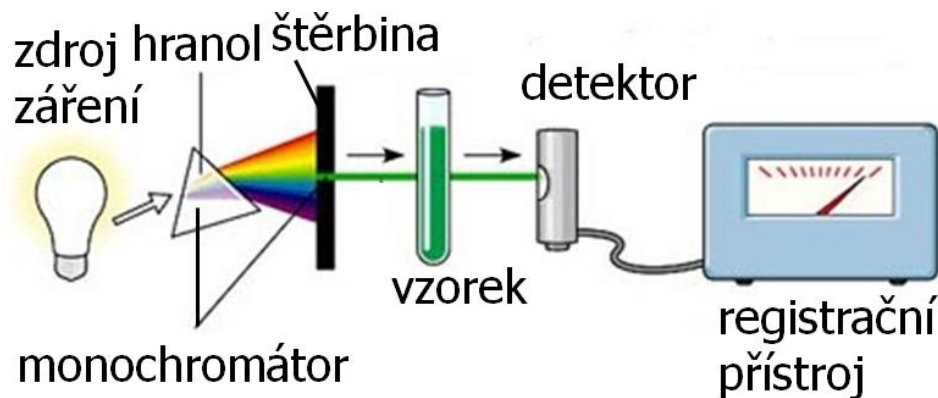
Kyvety:

- Kyvety musí být z materiálu, který neabsorbuje používané záření ⇒ kyvety pro měření ve VIS oblasti mohou být skleněné, kyvety pro měření v UV musí být křemenné

UV/VIS spektrometr

Základní součásti absorpčního spektrofotometru:

- zdroj záření (180 – 360 nm deuteriová výbojka, > 360 nm wolframová lampa)
- disperzní systém (monochromátor)
- kyveta se vzorkem (srovnávací kyveta)
- detektor (fotonásobič nebo DAD)



mefanet-motol.cuni.cz/download.php?fid=798

UV/VIS spektrometrie

- zachycení změn barev nebo zjištění barevnosti vzorku
- stanovení koncentrace látek na základě barevných změn (standards, kalibrační přímka)
- stanovení průběhu enzymatických reakcí
 - často se měří (spřažené) reakce, v nichž je koenzymem $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$

Vzorky musí být ve formě roztoků!

Použití vhodných rozpouštědel!

Analytické aplikace UV/VIS spektrometrie

- Spektrální charakterizace neznámých látek
- Fotometrická indikace při titracích s barevným indikátorem
- Stanovení barevných látek (přírodní i syntetická barviva)
- Stanovení látek absorbujících v UV oblasti
 - bílkoviny (aromatické AMK), nukleotidy a nukleové kyseliny, některé vitaminy a kofaktory enzymů, fenolové látky, aromatické uhlovodíky, heterocyklické sloučeniny (alkaloidy)
- Stanovení neabsorbujících látek po jejich konverzi na látky absorbující
 - aminokyseliny, produkty dehydratace cukrů, cholesterol, enzymy
- Selektivní detekce v kapalinové chromatografii