

LAPPEENRANNAN-LAHDEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

School of Engineering Science

Laskennallisen tekniikan koulutusohjelma

Kandidaatintyö

Tiina Nurmi

Näyteseoksen FTIR-spektrien erotteleminen

Ohjaajat: M.Sc. Tuomas Sihvonen ja Prof. Satu-Pia Reinikainen

TIIVISTELMÄ

Lappeenrannan-Lahden teknillinen yliopisto

School of Engineering Science

Laskennallisen tekniikan koulutusohjelma

Tiina Nurmi

Näyteseoksen FTIR-spektrien erottelu

Kandidaatintyö

2020

45 sivua, 26 kuvaa, 4 taulukkoa

Ohjaajat: M.Sc. Tuomas Sihvonen ja Prof. Satu-Pia Reinikainen

Avainsanat: Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia; taustankorjaus; spektroskopia;

Kandidaatintyön tavoitteena oli tunnistaa oluen FT-IR-spektristä Mosaic-humalan spektri sekä muut oluen makuun vaikuttavat komponentit. FT-IR on nopea ja käytännöllinen työkalu esimerkiksi erilaisten prosessien laadunvalvonnassa.

Työ alkaa FT-IR-tekniikan teoriaan ja spektrien matemaattiseen käsittelyyn tutustumisella. Kokeellisessa osassa spektrejä käsitellään matemaattisesti keskittyen polynomiaaliseen taustankorjaukseen.

Mosaic-humalan spektristä tunnistettiin kuusi erilaista spektriä, jotka aiheutuivat erilaisista humalan komponenteista, kuten kohumulonista, myrseenistä ja karyofylleenistä. Oluen spektristä löydettiin vastaavuuksia Mosaic-humalan spektriin verrattuna ja näin ollen tunnistettiin oluen makuun vaikuttavia komponentteja. Nämä komponentit vaikuttavat oluen katkeruuteen ja muodostavat esimerkiksi sitrus- ja puuromeita.

Taustafunktioksi Mosaic-humalalle asetui parhaiten toisen asteen polynomifunktio kolmen spektripisteen kautta kehitettynä. Taustafunktiota muodostettaessa täytyy huomioida se, että taustafunktio ei saa leikata alkuperäistä spektriä. Lisäksi funktion muodostamisessa käytettävät spektripisteet asettuvat nolllaksi, jolloin saatetaan menettää mahdollisia spektriä.

Sisältö

Symboli- ja lyhenneluettelo	5
1 JOHDANTO	6
1.1 Tausta	6
1.2 Tavoitteet ja rajaus	6
1.3 Rakenne	7
2 TEORIA	8
2.1 Infrapunaspektrometria	8
2.2 Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia	10
2.3 Fourier-muunnos FT-IR-spektroskopiassa	13
2.4 Infrapunaspektri	14
2.5 Spektrien matemaattinen taustankäsittely	17
3 AINEISTO JA OHJELMISTOT	20
4 KOKEELLINEN	22
5 TULOKSET	34
6 JOHTOPÄÄTÖKSET	40
7 YHTEENVETO	42
LÄHTEET	44
Taulukot	46

Symboli- ja lyhenneluettelo

ϵ	Absorptiivisuus
ν_i	Värähtelymoodin kvanttiluku
A	Absorbanssi
ATR	Attenuated Total Reflection
c	Konsentraatio
$C\equiv C$	Alkyyni
CH_2	Etyyliryhmä
CH_3	Metyyliryhmä
$C=O$	Karbonyyliryhmä
$COOH$	Karboksyyliryhmä
FIR	Far-infrared
FT-IR	Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia
h	Planckin vakio
HCl	Vetykloridi
H_2O	Vesimolekyyli
I_0	Taustan intensiteetti
I	Näytteen intensiteetti
IR	Infrapuna
l	Valon kulkema matka näytteessä
MIR	Mid-infrared
NH_2	Aminoryhmä
NIR	Near-infrared
OH	Hydroksyyliiryhmä
SNR	Signaali-kohinasuhde
ν_i	Värähtelymoodin taajuus
ZPD	Zero Path Difference

1 JOHDANTO

1.1 Tausta

Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia (FT-IR) on infrapunaspektroskopian laajiten käytetty sovellus. Se on erittäin hyödyllinen, koska sillä on monia erilaisia käyttökohteita. Sillä voidaan tutkia kiinteitä, nestemäisiä ja kaasumaisia näytteitä. Se on tärkeä biologisten näytteiden tutkimuksissa sekä parempi muihin kuvantamisteknologioihin nähden, koska sen avulla voidaan havaita tiettyjä molekyylien kemiallisten sidosten värähtelyjä ilman, että näytettä pitäisi värjätä. FT-IR:ää on muun muassa käytetty ihmisen kolorektaalisisä adenokarsinoomatutkimuksessa. Myös Alzheimerin tautia, johon liittyy β -amyloidiproteiinin sijoittuminen ihmisen aivokudoksessa, on tutkittu FT-IR:llä. (Sharma et al. 2018)

Verrattuna muihin infrapunaspektroskopiakoneihin, FT-IR:llä on selkeä etu muihin nähden. Sen signaali-kohinasuhde eli SNR on korkea, eli sillä pystytään mittaamaan spektrejä korkealla signaali-kohinasuhteella. FT-IR:ssä infrapunasäde ei kulkeudu prisman tai muiden komponenttien läpi, niin kuin muissa IR-spektroskopiaissa. Tällöin detektorille saapuva säde omaa suuren intensiteetin ja näin ollen nostaa signaalitasoa. (Smith 2011)

FT-IR on hyödyllinen työkalu oluen komponenttien tunnistamisessa sekä oluen laadunvalvonnassa nopeutensa ja helppokäyttöisyydensä vuoksi. FT-IR on menetelmänä näytettä vahingoittamaton, nopea, kustannustehokas ja ympäristöystävällinen, koska se ei tuota jäämiä (Jr. et al. 2018). Nopeana ja yksinkertaisena analyysimenetelmänä FT-IR on potentiaalinen erilaisten prosessien laadunvalvonnassa. Näin ollen sitä voidaan esimerkiksi soveltaa oluen komponenttien tunnistamisessa sekä varmistamassa tasaisen laadun saamisessa oluterien välillä.

1.2 Tavoitteet ja rajaus

Kandidaatintyön tavoitteena on tunnistaa oluen FT-IR-spektristä humalan spektri sekä muut oluen makuun vaikuttavat komponentit. Tutkimus aloitetaan ensin oluen Mosaic-humalan sekä α -hapon spektrien analysoinnilla. Lopulta siirrytään Mosaic-humalaa sisältävän oluen spektrin analysointiin. Jotta oluen spektristä olisi mahdollista tunnistaa humalan spektri ja humalasta aiheutuvat komponentit, täytyy spektriä käsitellä matemaattisesti, koska oluen raaka spektri sellaisenaan ei tuota tarpeeksi tarkkaa informaatiota.

Oluen spektriä käsitellään Lappeenrannan-Lahden teknillisen yliopiston ATR-FT-IR-spek-

trometrin ohjelmistolla. Tämän lisäksi mittauksista saatua spektridataa käsitellään Matlab-ohjelmistolla (MATLAB R2019b). Kandidaatintyön spektrien matemaattinen mallinnus rajataan taustankorjausalgoritmien käsittelyyn, koska pelkällä taustankorjauksella on suuri vaikutus spektrien muotoon sekä oluen komponenttien tunnistuksen helpottumiseen.

1.3 Rakenne

Tässä kandidaatintyön raportissa selvitetään ensin FT-IR-spektroskopian teoriaa fysikaalisesta ja kemiallisesta näkökulmasta katsoen. Tämän lisäksi tutustutaan spektrien matemaattisen käsittelyyn keskittyen erilaisiin matemaattisiin taustankorjausalgoritmeihin.

Työn kokeellisessa osassa ATR-FT-IR-spektrometrillä mitataan sekä tutkittavan oluen että sen komponenttien, kuten Mosaic-humalan ja α -hapon spektrejä. Spektrometrin ohjelmistolla suoritetaan spektrin laatua parantavia korjauksia ja kokeillaan erilaisten mittauserien vaikutusta spektrien laatuun. Nämä sekä MATLAB:lla suoritettavat matemaattiset mallinnukset kuvataan työn kokeellisessa osassa.

Lopuksi tuloksissa esitellään erilaisia taustafunktioita, joita spektreille saatiin muodostettua. Tuloksissa kerrotaan Mosaic-humalasta erotelluista spektriipiikeistä sekä siitä, mistä kyseisestä spektriipiikit aiheutuvat. Spektriipiikkien analyysi on toteutettu myös oluen spektrille. Johtopäätöksissä pohditaan taustankorjauksen ongelmakohtia.

2 TEORIA

2.1 Infrapunaspektrometria

Infrapunaspektrometria on yksi tärkeimmistä näytteen analyysimenetelmistä, koska sen avulla saadaan selville näytteessä olevat molekyylit sekä niiden konsentraatiot (Smith 2011). Infrapuna-alue sijoittuu näkyvän valon ja mikroaaltojen väliin sähkömagneettisen säteilyn spektrissä. IR-spektri voidaan jakaa NIR-, MIR- ja FIR-alueisiin taulukon 1 mukaisesti.

Taulukko 1. Infrapuna-alueen jaottelu aaltoluvuttain.

Infrapuna-alue	Aaltoluku [cm^{-1}]
Near-IR	14000-4000
Mid-IR	4000-400
Far-IR	400-40

Infrapunaspektrometriassa saatava infrapunaspektri muodostuu erilaisista siirtymistä kvantisoitujen värähtelyenergiatilojen välillä. Molekyylien värähtely on jatkuvaa ja sitä tapahtuu sekä kahden toisiinsa kemiallisin sidoksin kytketyn atomin välillä kuin myös monimutkaisempien moniatomisten molekyylien välillä. Molekyyyleillä, joilla on N kappaletta atomeja on $3N$ verran vapausasteita. Näistä vapausasteista kolme kuvaa translaatioliikettä keskenään kohtisuorissa suunnissa x -, y - ja z -akseleilla ja loput kolme kuvaavat pyörimisliikettä näiden akselien ympäri. Näin ollen jäljelle jäävät $3N - 6$ vapausastetta antavat värähtelymoodien lukumäärän. (Griffiths et al. 2007)

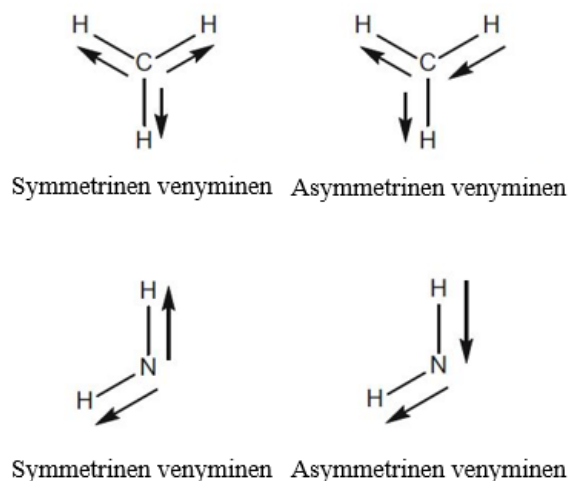
Jokainen värähtelymoodi sisältää atomien likimain harmonisen siirtymän pois tasapainoasestaan. Jokaisella värähtelymoodilla i atomit värähtelevät tietyllä karakterisella taajuudella ν_i . Värähtelyenergioiden tiloja V_{iv} , joissa atomit värähtelevät harmonisesti Hookeen lakia noudattaen, voidaan kuvata matemaattisesti yhtälöllä

$$V_{iv} = h\nu_i\left(v_i + \frac{1}{2}\right) \quad (1)$$

missä h on Planckin vakio, ν_i on tarkasteltavan värähtelymoodin perustaajuus ja v_i kertoo värähtelymoodin kvanttiluvun ($v_i = 0, 1, 2, \dots$). (Griffiths et al. 2007) Näin ollen jokaisella kemiallisella sidoksella on sille ominainen värähtelytaajuus, jonka mukaan molekyylin sidos absorboi infrapunasäteilyä (Sharma et al. 2018).

Jotta molekyylin funktionaaliset ryhmät (esimerkiksi hydroksyyli-ryhmä -OH ja karboksyyli-ryhmä -COOH) voidaan tunnistaa, sen täytyy olla infrapuna-aktiivinen. Yksittäisillä atomeilla ei ole kovalenttisia sidoksia eikä mitakaan kemiallisia sidoksia, joten ne eivät ole IR-aktiivisia. Symmetriset molekyylit eivät ole IR-aktiivisia, koska kemiallisten sidosten välillä ei ole dipolista momenttia. Sen sijaan esimerkiksi vetykloridi HCl on IR-aktiivinen, koska vety- ja klooriatomin välillä on elektronegatiivisuusero. Kun vetykloridia säteilytetään infrapunavalolla, varaus siirtyy kohti kloori-atomia, koska sen elektronegatiivisuusero on suurempi kuin vedyn. Cl-atomille syntyy negatiivinen osittaisvaraus ja H-atomille positiivinen osittaisvaraus. Näin ollen atomien välille syntyy nettodipolimomentti. (Sharma et al. 2018)

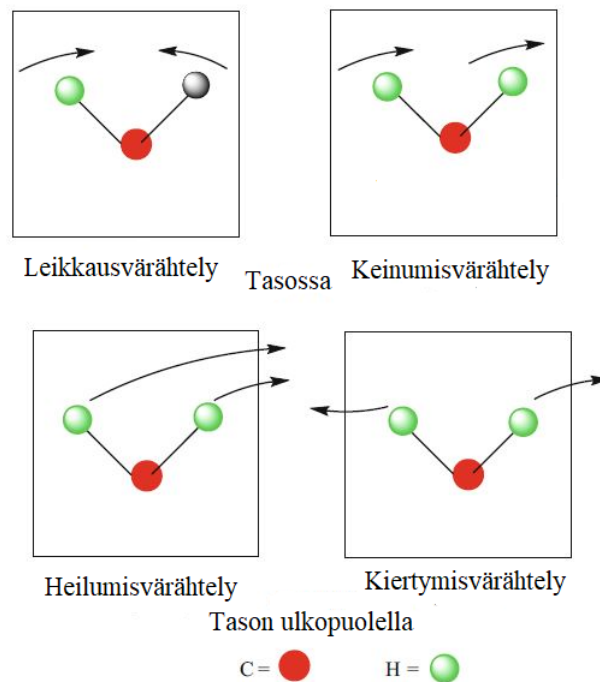
IR-aktiivisilla molekyyyleillä on kaksi värähtelytyyppiä: venymis- ja taipumisvärähtely. Esimerkiksi HCl-molekyylillä tapahtuu venymisvärähtelyä ja H₂O-molekyylillä taipumisvärähtelyä. Venymisvärähtely voi olla symmetristä tai asymmetristä. Kuvassa 1 on esiteltyä CH₃- ja NH₂-ryhmien asymmetristä ja symmetristä venymisvärähtelyä. Asymmetrisellä venymisellä on suurempi energia verrattuna symmetriseen venymiseen. Asymmetrisessä venymisessä sidoksen toinen pituus kasvaa ja toinen pienenee. Symmetrisessä venymisessä osallistuvien atomien sidospituudet joko kasvavat tai pienenevät samanaikaisesti. (S.A. et al. 2018)



Kuva 1. Esimerkki asymmetrisestä ja symmetrisestä venymisvärähtelystä CH₃- ja NH₂-ryhmillä (S.A. et al. 2018).

Taipumisvärähtelyyn lukeutuvat heiluminen, keinuminen, kiertyminen ja leikkaaminen. Taipumisvärähtely tapahtuu yleensä pienemmässä energiassa kuin venymisvärähtely. Taipumisvärähtely voidaan jakaa joko tasossa tapahtuvaan taipumiseen tai tason ulkopuolella tapahtuvaan taipumiseen. Tasossa tapahtuvaan taipumiseen lukeutuvat leikkausvärähtely ja keinumisvärähtely. Leikkausvärähtelyssä molemmat atomit liikkuvat joko toisiansa kohti tai

poispäin toisistaan. Keinumisvärähtelyssä sidoskulma pysyy muuttumattomana johtuen samaan suuntaan vaikuttavien atomien momentista. Tason ulkopuolella tapahtuvaan taipumiseen sisältyvät heilumis- ja kiertymisvärähtely, jossa sidoskulmat muuttuvat. Heilumisvärähtelyssä atomit liikkuvat tason yhteistä puolta kohden kun taas kiertymisvärähtelyssä atomit liikkuvat tason vastakkaisille puolille. (S.A. et al. 2018) Kuvassa 2 on kuvattuna CH₂-ryhmän erilaiset taipumisvärähtelymuodot.



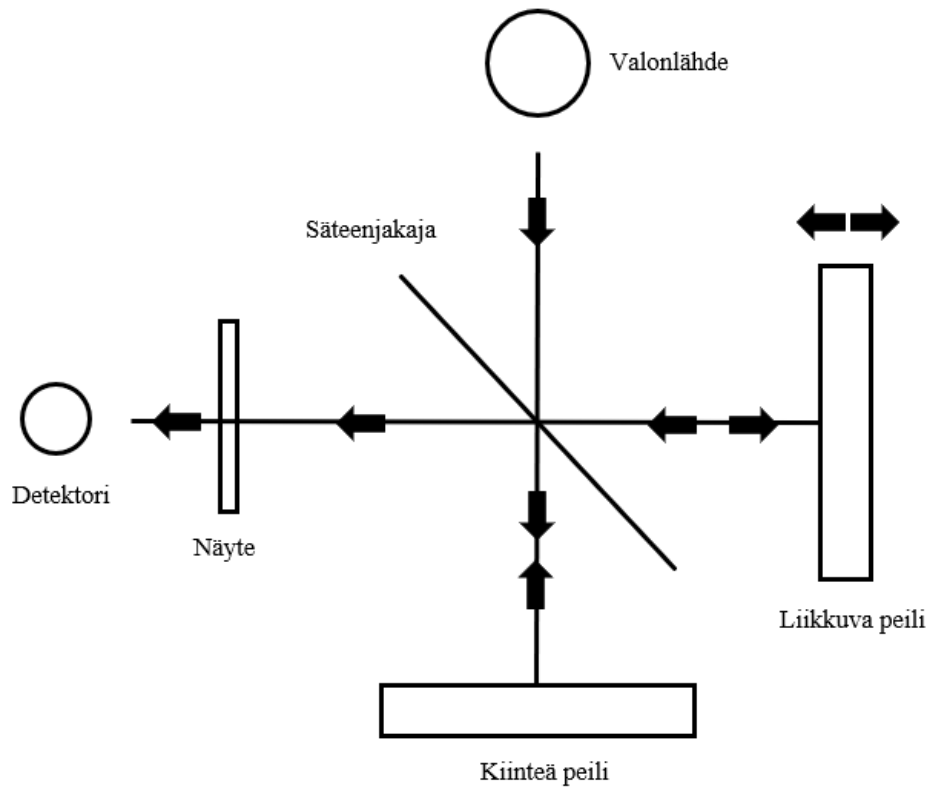
Kuva 2. Esimerkki CH₂-ryhmän erilaisista taipumisvärähtelymuodoista (S.A. et al. 2018).

Absorptiovoimakkuus riippuu molekyylin dipolimomentista. Esimerkiksi karbonyyliryhmän (C=O) venymistäajuuden amplitudi on paljon intensiivisempi kuin alkyynin (C≡C). Tämä johtuu siitä, että karbonyyliryhmä on polaarisempi kuin alkyyni. (S.A. et al. 2018)

2.2 Fourier-muunnos infrapunaspektroskopia

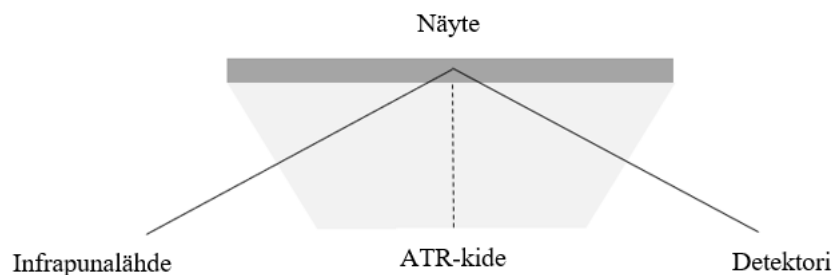
FT-IR-spektroskopia on infrapunaspektrometrian tärkein ja käytetyin sovellus. Tämä perustuu valon interferenssin eli valoaaltojen yhteisvaikutuksen hyväksikäyttöön ja Michelsonin interferometriin. Michelsonin interferometri koostuu kiinteästä ja liikkuvasta tasopeilistä sekä säteenjakajasta kuvan 3 mukaisesti. Peilien välinen kulma on yleensä 90 astetta, mutta myös muut kulman suuruudet ovat toteutettavissa. (Griffiths et al. 2007) Valonlähde luo säteilyä, joka kulkeutuessaan interferometrin läpi osuu tutkittavaan näytteeseen ja saavuttaa

lopulta detektorin. Tämän jälkeen saatua signaalia vahvistetaan ja muutetaan digitaaliseksi signaaliksi. Lopulta signaali muutetaan spektriksi Fourier-muunnoksen avulla. (Sharma et al. 2018)



Kuva 3. Yksinkertaistettu kuva Michelsonin interferometrin rakenteesta.

Tässä työssä on käytetty ATR-FT-IR-tekniikkaa (attenuated total reflection), jossa IR-säde kohtaa ATR-kiteen 45 asteen kulmassa kiteen pintaan nähden ja heijastuu kokonaan kide-näyterajapinnassa. Kun säde on heijastunut ATR-kiteessä yhden tai useamman kerran, se ohjataan pois kiteestä kohti detektoria. (Sharma et al. 2018) Työssä käytetyn ATR-FT-IR-spektrometrin säde heijastuu ATR-kiteessä vain kerran. ATR-menetelmä on yksinkertaisesti kuvattuna kuvassa 4.

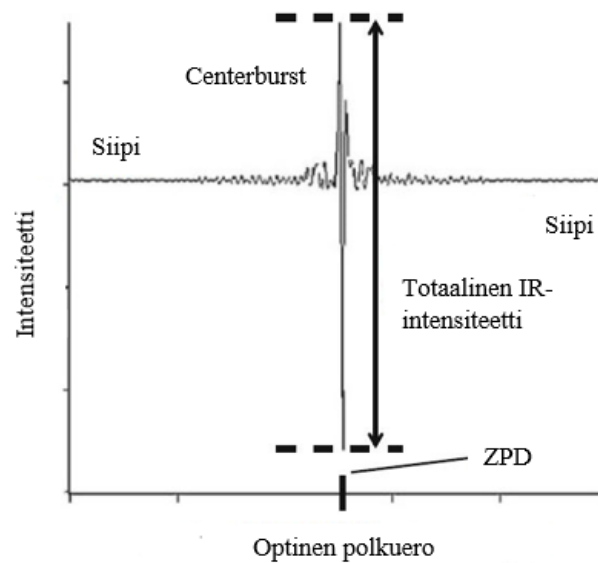


Kuva 4. Yksinkertaistettu kuva ATR-kiteen toimintaperiaatteesta.

Michelsonin interferometri jakaa säteen kahdelle polulle ja yhdistää säteet polkueron jälkeen. Säteenjakajassa ulkoisesta lähteestä saatava kollimoitu säde heijastetaan osittain sekä kiinteälle peilille että liikkuvalla peilillä. Säteiden heijastuessa peileistä takaisin säteenjakajalle tapahtuu joko konstruktioivinen tai destruktiivinen interferenssi ja säde jälleen jakautuu osittain heijastuneeksi sekä läpäisseeksi säteilyksi. (Griffiths et al. 2007)

Kiinteän ja liikkuvan peilin ollessa yhtä kaukana säteenjakajasta, peileistä heijastuvat säteet ovat samassa vaiheessa rekombinaation aikana säteenjakajassa. Tällaista tilannetta kutsutaan nolla-polkueroksi (ZPD). Näin ollen tapahtuu konstruktioivinen interferenssi, jolloin detektoriin saapuvan säteen intensiteetti on summa kiinteästä ja liikkuvasta peilistä heijastuneista säteistä. Kaikki IR-lähteestä peräisin oleva säteily saavuttaa siis detektorin eikä mitään säteilyä palaudu takaisin lähteelle. Jos polkueron kiinteästä ja liikkuvasta peilistä on täsmälleen puolet aallonpituudesta, niin säteet ovat vastakkaisessa vaiheessa saapuessaan säteenjakajalle, jolloin tapahtuu destruktiivinen interferenssi. Tällöin valo kulkeutuu takaisin lähteelle eikä mitään saavu detektorille. Interferenssistä johtuen detektoriin saapuvan sekä takaisin lähteeseen kulkeutuvan säteen intensiteetti riippuu optisesta polkuerosta interferometrillä kahdessa haarassa. Juurikin tämä säteiden välinen intensiteettien voimakkuuden ero optisen polkueron funktiona muodostaa spektrin FT-IR-spektroskopiassa. (Griffiths et al. 2007)

Liikkuvan peilin liikkeessä jatkuvasti, resultanttisäteiden intensiteetti kasvaa himmeämmäksi ja kirkkaammaksi sekä kulkee maksimien ja minimien läpi. Kun mitatun valon intensiteetistä tehdään kuvaaja optisen polkueron funktiona huomataan, että se näyttää kosiniaallolta. Se on sähköinen signaali, jonka y -akselilla on jännite ja x -akselilla optinen polkueron. IR-lähteestä saatava säde sisältää monia eri aallonpituuksia, jolloin jokaiselle aallonpituudelle eli aaltoluvalle on interferogrammi ainutlaatuisella Fourier-taajuudella. Detektori mittaa näiden yksittäisten interferogrammien summan, joka näkyy kuvassa 5. (S.A. et al. 2018)

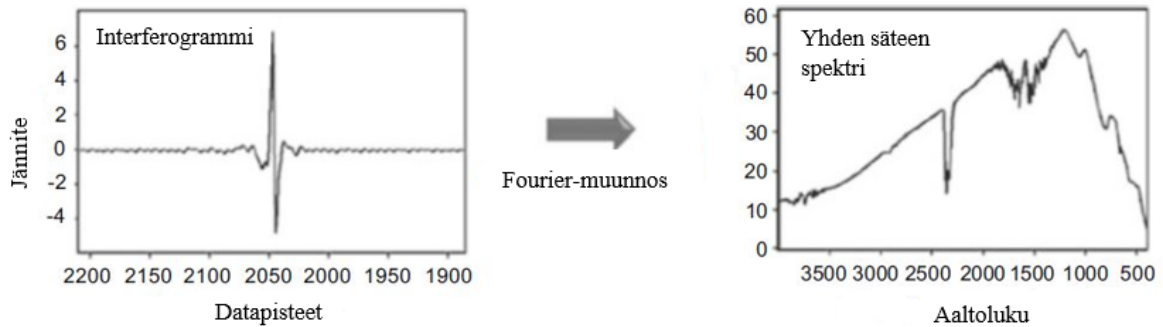


Kuva 5. Esimerkki interferogrammista, joka on muodostunut monen aaltoluvun interferogrammien summana (S.A. et al. 2018).

Kuvasta 5 huomataan myös korkea piikki nolla-polkueron (ZPD) kohdalla. Tätä kutsutaan centerburstiksi. Centerburst johtuu siitä, että nolla-polkueron kohdalla valon jokainen aallonpituus on samassa vaiheessa, jolloin ne interferoivat konstruktivisesti muodostaen korkean intensiteetin. Centerburst on verrannollinen detektoriin osuvan infrapunavalon kokonaismäärään. Optisen polkueron muuttuessa infrapunaintensiteetin voimakkuus laskee nopeasti interferogrammin molemmilla puolilla muodostaen siivet (wings). Matala intensiteetti saattaa johtua erilaisten Fourier-taajuuksien yhä vaiheittaisemmasta vaiheesta toistensa kanssa, koska optinen polkuero kasvaa. Tällöin tapahtuu destruktiivista interferenssiä. (S.A. et al. 2018)

2.3 Fourier-muunnos FT-IR-spektroskopiassa

Fourier-muunnos on matemaattinen menetelmä, jonka avulla funktio voidaan muuttaa toiseksi uudeksi funktioksi. FT-IR-spektroskopiassa sitä käytetään interferogrammista saatavan signaalin funktion muuntamisessa spektrin funktioksi. Interferogrammi on kuvaaja infrapunaintensiteeteistä optisen polkueron funktiona [cm]. Toisin sanoen interferogrammin aika-avaruudessa oleva signaali muunnetaan taajusavaruudessa olevaksi spektriksi. (Sharma et al. 2018) Kuvassa 6 näkyy interferogrammin signaali vasemmalla puolella ja oikealla puolella spektri, joka on saatu, kun signaaliin on tehty Fourier-muunnos. Näin ollen saatu spektrin funktio on infrapunaintensiteetti aaltoluvun funktiona, jonka yksikkö on [cm⁻¹].



Kuva 6. Ottamalla Fourier-muunnos interferogrammin signaalista, saadaan näytteen spektri (S.A. et al. 2018).

2.4 Infrapunaspektri

Infrapunaspektri on kuvaaja, joka kertoo mitatun infrapunavalon voimakkuuden verrattuna johonkin valon ominaisuuteen, kuten aallonpituuteen tai aaltolukuun. Tyypillisesti x -akselilla on aaltoluku, jonka suurin arvo on x -akselin vasemmassa päässä ja pienin arvo x -akselin oikeassa päässä. Absorbanssi, joka kertoo, kuinka paljon näyte on absorboinut valoa, sijaitsee y -akselilla. (Smith 2011) Näytteen absorbanssispektri lasketaan seuraavasti

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

missä A on absorbanssi, I_0 intensiteetti taustasta ja I intensiteetti näytteestä. Absorbanssin avulla voidaan laskea näytteen konsentraatio. (Smith 2011) Konsentraatio lasketaan Beerin lain mukaisesti

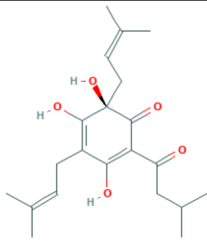
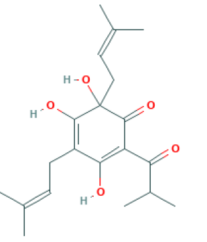
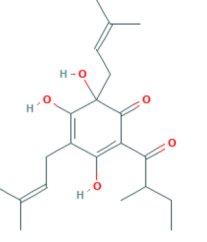
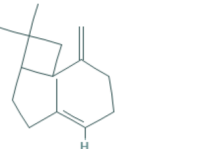
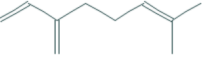
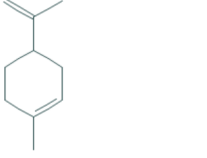
$$A = \epsilon lc \quad (3)$$

missä A on absorbanssi, ϵ absorptiivisuus, l valon kulkema matka näytteessä ja c konsentraatio. Spektrin absorbanssipiikki tai -pinta-ala on siis suoraan verrannollinen näytteen konsentraatioon. (Smith 2011)

Infrapunaspektrin avulla näytteessä olevat molekyylit ja funktionaaliset ryhmät saadaan tunnistettua (Smith 2011). Näin ollen oluen spektristä pystytään tunnistamaan komponentteja ja erottelemaan humalan spektri. Oluissa mahdollisesti esiintyviä, humalasta aiheutuvia komponentteja ja niiden ominaisuuksia (Nick Hines 2017) sekä rakennekaavat on esitelty

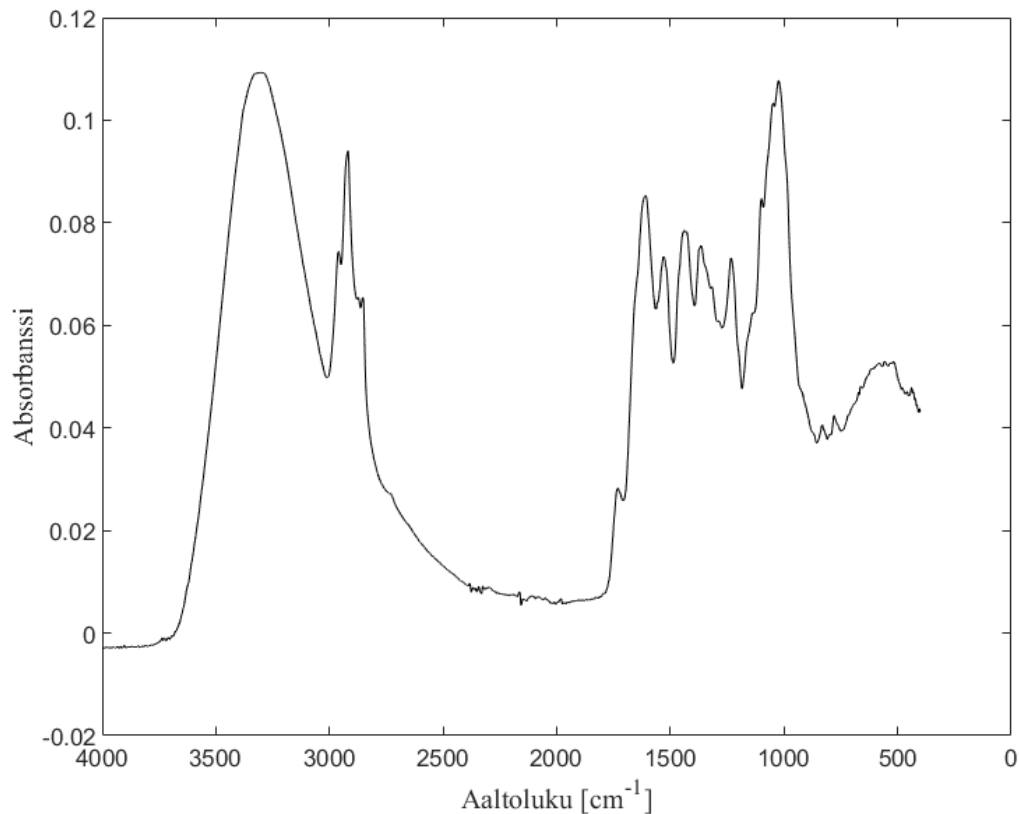
taulukossa 2. Tutkimalla infrapunaspektrissä olevien piikkien sijaintia ja muotoa molekyylinen rakenne voidaan identifioida. Jos jostain oluen komponentista, esimerkiksi α -haposta, löytyy tunnettu spektri eli referenssispektri, voidaan α -happonäytteestä saatua spektriä verrata referenssispektriin tarkastelemalla, kuinka hyvin piikkien sijainnit, leveydet ja korkeudet vastaavat toisiaan. (Smith 2011)

Taulukko 2. Humalan komponenttien ominaisuuksia. Komponenttien rakennekaavat on otettu seuraavista lähteistä: humuloni (Biotechnology Information. PubChem Database 2020d), kohumuloni (Biotechnology Information. PubChem Database 2020c), adhumuloni (Biotechnology Information. PubChem Database 2020a), karyofylleeni (Biotechnology Information. PubChem Database 2020b), myrseeni (Biotechnology Information. PubChem Database 2020f), limoneeni (Biotechnology Information. PubChem Database 2020e).

Nimi	Rakennekaava	Ominaisuus
Humuloni		Katkeruus
Kohumuloni		Katkeruus
Adhumuloni		Katkeruus
Karyofylleeni		Mänty-, sitrus-, tupakka- ja salvia-aromit
Myrseeni		Puu- ja sitrusaromit, Hedelmäinen
Limoneeni		Sitrusaromi

2.5 Spektrien matemaattinen taustankäsittely

FT-IR-mittauksesta saatava spektri ei ole täydellinen, joten sen käsittelemiseen tarvitaan matemaattisia menetelmiä. Ideaalisessa tapauksessa FT-IR-spektrin taustaviiva on täysin suora, mutta todellisuudessa sen muotoon vaikuttavat muun muassa sironta, heijastus, lämpötila, konsentraatio sekä instrumenttien poikkeavuudet (Griffiths et al. 2007). Jotta spektristä saadaan todellisuutta kuvaava, taustaviiva täytyy korjata. Kuvassa 7 on Mosaic-humalan korjaamaton spektri, josta voidaan nähdä, kuinka taustaviiva ei ole suora ja vaatii näin ollen matemaattista korjausta.

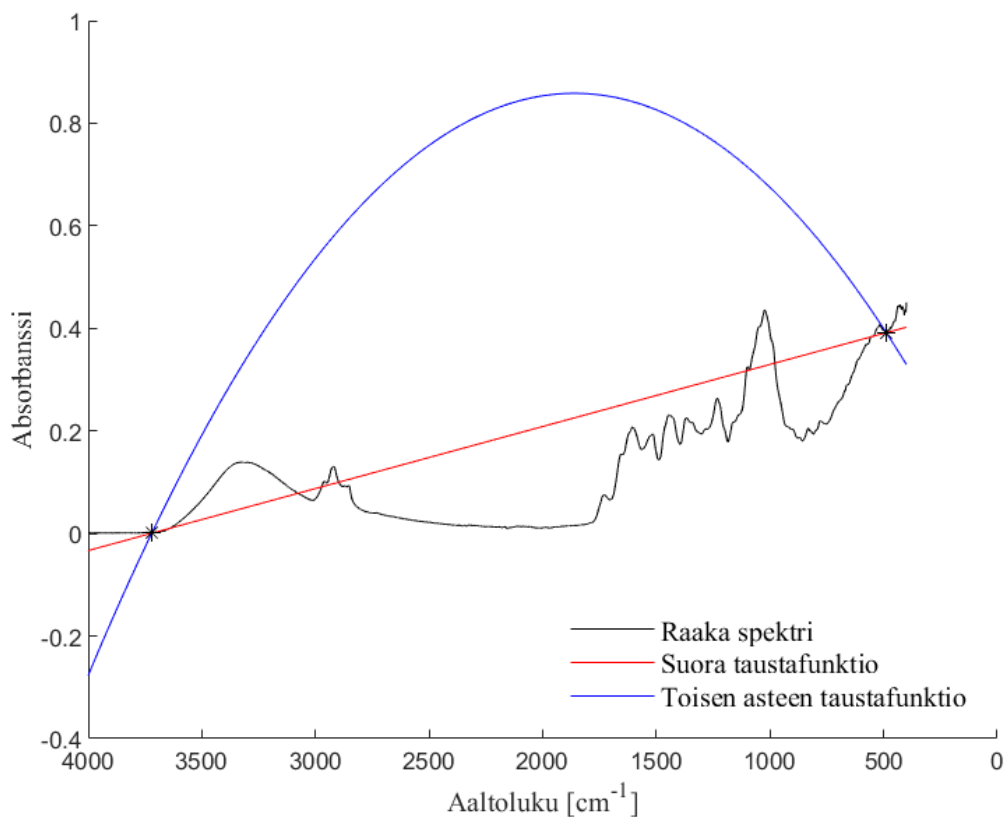


Kuva 7. Mosaic-humalan raaka ATR-FT-IR-spektri.

Spektrissä saattaa olla myös muitakin korjausta vaativia asioita, kuin taustankorjaus, mutta keskitymme nyt ainoastaan juurikin taustankorjaukseen. Taustankorjauksella voi olla suurikin vaikutus spektrin muotoon, joten sillä on tärkeä rooli spektrien käsittelyssä. Taustan korjaamisen jälkeen spektriin voitaisiin vielä tehdä esimerkiksi absorptiopiikkien kaventamista, jonka avulla absorptiopiikkien paikat spektrissä saataisiin tarkemmaksi ja mahdollisesti päällekkäin meneviä piikkejä saataisiin eroteltua toisistaan.

Spektrin taustan korjaamiselle on erilaisia matemaattisia mallinnuksia, joista voidaan valita tutkittavalle spektrille sopivin. Yksi tapa taustan korjaukselle on yhden pisteen taustankorjaus. Tämä matemaattinen korjaus toimii spektreihin, joissa on yksinkertaisin taustavirhe eli offset. Offset-korjauksessa kaikista spektripisteistä vähennetään vakio, joka on yleensä minimiarvo absorbanssispektristä. Tämän johdosta offset poistuu ja tausta saadaan korjattua nolla-absorbanssiin. Taustan ollessa nolla-absorbanssissa, spektriin amplitudi eli absorbanssi saadaan suoraan luettua kuvaajasta. (Griffiths et al. 2007)

Spektrin tausta voi olla kalteva. Kaltevan taustan saa suodatettua spektristä pois esimerkiksi kahden pisteen läpi suoritettavalla interpolaatiolla. Tässä menetelmässä raa'asta spektristä valitaan taustalle yksi piste spektrin alkupäästä ja toinen piste spektrin loppupäästä. Näiden pisteiden välille muodostetaan lineaarinen interpolaatio. Lineaarisen interpolaation seurakseen saadaan resultanttiviiva, joka voidaan vähentää raa'asta spektristä. Lopputuloksena saadaan taustakorjattu spektri, joka on lineaarinen absorbanssin suhteen. (Griffiths et al. 2007) Kuvassa 8 on mustalla Mosaic-humalan raaka spektri ja punaisella kahden spektripisteen välille, lineaarisen interpoloinnin seurauksena saatu suora taustafunktio.



Kuva 8. Esimerkki kahden pisteen välisestä taustankorjauksesta. Kahden datapisteen välille on asetettu sekä suora että toisen asteen käyrä.

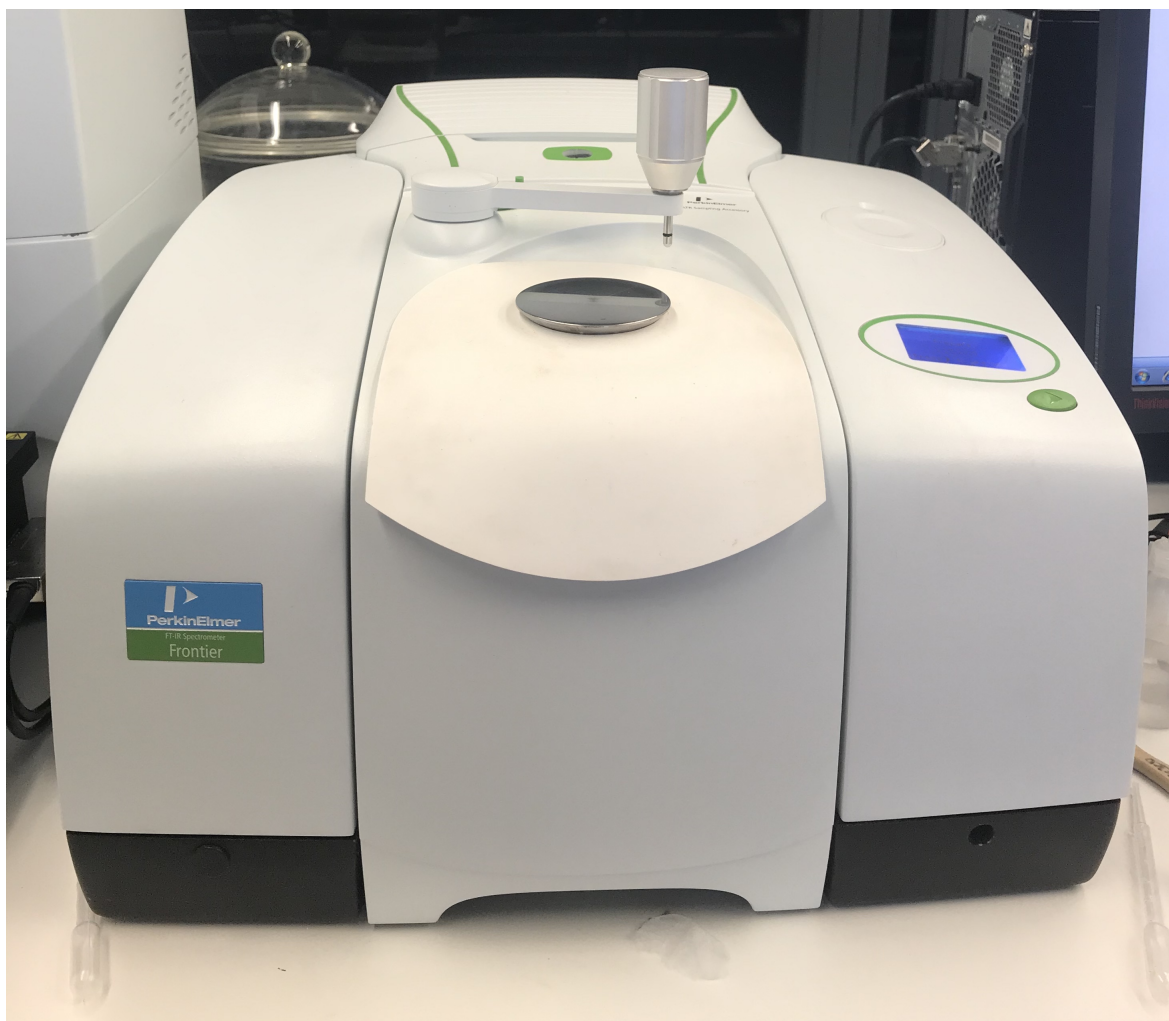
Kahden pisteen lineaarinen interpolaatio toimii hyvin spektreille, joiden tausta muuttuu hitaasti. Tätä matemaattista menetelmää voidaan jatkaa vielä siten, että interpolaatio tehdään useampien pisteiden välille kahden pisteen sijaan. Näin ollen lineaarinen interpolaatio tehdään jokaisen pisteparin välille ja saatu taustaviiva saadaan poistettua spektristä. Jos taustalla ei ole hitaasti muuttuvaa kaltevuutta, taustan funktioksi voidaan saada kaareva tai aaltoileva muoto. (Griffiths et al. 2007) Kuvassa 8 on esitetty toisen asteen käyrän sovitus kahden spektripisteen välille sinisellä värillä.

Epälineaariset taustan poikkeamat saadaan parhaiten korjattua siten, että spektristä vähennetään epälineaarinen taustan korjaus -funktio. Funktiota muodostettaessa on oltava varovainen, koska funktion muodostamisella saatetaan vahingossa luoda lisää taustavirheitä spektriin. Menetelmä perustuu siihen, että spektristä vähennetään polynomifunktio tai joku muu korkeamman asteen funktio, joka on sovitettu valittuihin spektripisteisiin. Polynomifunktiot rajoitetaan yleensä viidennen tai kuudennen asteen polynomifunktioihin, koska suuremman asteluvun funktioilla on mahdollista saada spektriin kuulumattomia maksimi- ja minimiarvoja. (Griffiths et al. 2007)

Spektreihin voidaan sovittaa erilaisia differentiaalisia algoritmeja. Yksi näistä on Savitzky-Golay-filtteri, joka laskee spektrin ensimmäisen ja toisen derivaatan sekä tasoittaa alkuperäistä spektriä ja laskettuja derivaattoja. Spektrien ja derivaattojen tasoittaminen perustuu paikalliseen pienimmän neliösumman polynomiaaliseen approksimaatioon (Schafer 2011).

3 AINEISTO JA OHJELMISTOT

Tutkittavat näytteet on mitattu kuvassa 9 näkyvässä PerkinElmerin Frontier IR Single-Range Systems -spektrometrilla (L1050101), johon on liitetty ATR-kide (KRS-5, talliumbromidi tai talliumjodidi). Kun spektrometrilla tehdään mittauksia, täytyy ensin suorittaa taustan mitaus, jonka jälkeen mitataan tutkittava näyte.



Kuva 9. Työssä käytetty ATR-FTIR-spektrometri.

Näytteen skannaus aloitetaan valitsemalla instrumenttiparametrit. Ensinnäkin valitaan skannauksen alue eli skannauksen alku- ja loppupiste, jotka on oletusarvoisesti asetettu spektrometriin aaltoluvuiksi. Seuraavaksi valitaan, kuinka paljon näytettä altistetaan eli kuinka monta skannauskertaa sille suoritetaan. Skannaukselle voi valita myös resoluution (cm^{-1}), jonka johdosta laite asettaa J-stopin (mm) oletusarvoksi resoluutiota varten. Näytteelle voi asettaa tunnisteet ja kuvauksen.

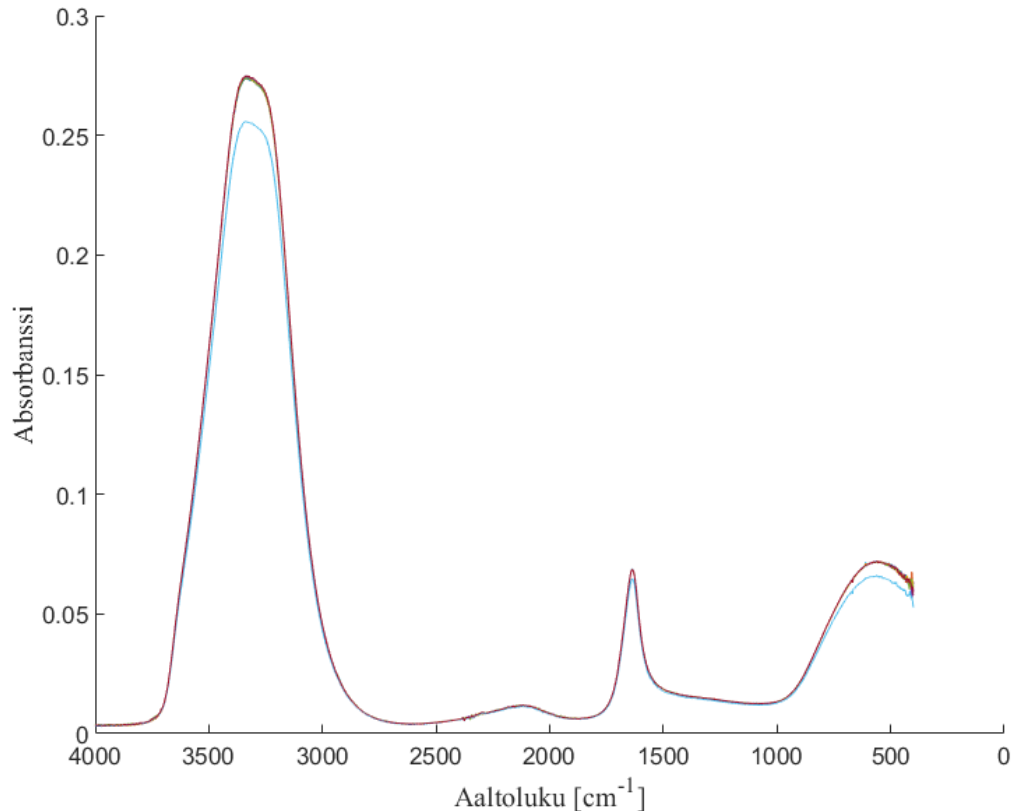
Skannauksien jälkeen spektriä voi käsitellä spektrometrissa olevien ohjelmien avulla. Valittavissa on monia erilaisia toimintoja, mutta tämän työn kannalta oleellisimpia ovat ATR-korjaus, taustankorjaus sekä normalisointi. ATR-korjaus on suoritettava, koska ATR-tekniikka aiheuttaa muutoksia piikkien intensiteettien voimakkuuksissa sekä muutoksia taajuuksiin, joissa piikit sijaitsevat. Näin ollen ATR-tekniikalla mitatut spektrit saadaan vertailukelpoiksi ilman ATR-kidettä mitattujen IR-spektrien kanssa. Spektrometrin ohjelmiston suorittama taustankorjaus valitsee spektristä muutaman datapisteen ja optimoi näiden datapisteiden välille taustafunktion. Tausta saadaan korjattua, kun spektristä suodatetaan pois taustafunktio. Normalisoinnissa ohjelmisto sijoittaa intensiteettiä nollan ja ykkösen välille. Normalisoinnin voi valita tehtävän joko korkeimman intensiteettiäpiikin mukaan tai jonkun tietyn alueen piikin mukaan.

Spektrometrissa on mahdollista valita laadunvarmistustoiminto. Tämä toiminto on varsin hyödyllinen, kun mittauksia suorittavalla henkilöllä ei ole paljon aikaisempaa kokemusta spektrimittauksista. Kun tämä toiminto on valittuna, spektrometri ilmoittaa mahdollisista skannauksen aikana spektriin kohdistuneista ongelmista käyttäjälle ja ehdottaa tapoja, joilla voi korjata ongelman. Laadunvarmistustoiminto sisältää erilaisia testejä, joita käyttäjä voi valita suoritettavan. Kun skannaus on suoritettu ja data kerätty, spektrometri ilmoittaa merkivalon joko vihreänä, keltaisena tai punaisena. Vihreä valo kertoo, että spektrin laatu on tyydyttävä. Keltaisella valolla spektrometri ilmoittaa havainneensa ongelman, jonka ratkaiseminen parantaa spektrin laatua. Punainen valo ilmestyy, kun spektrometri on havainnut vakavan ongelman ja kehottaa korjaamaan sen ennen kokonaisen spektrin keräämistä. (PerkinElmer 2013)

4 KOKEELLINEN

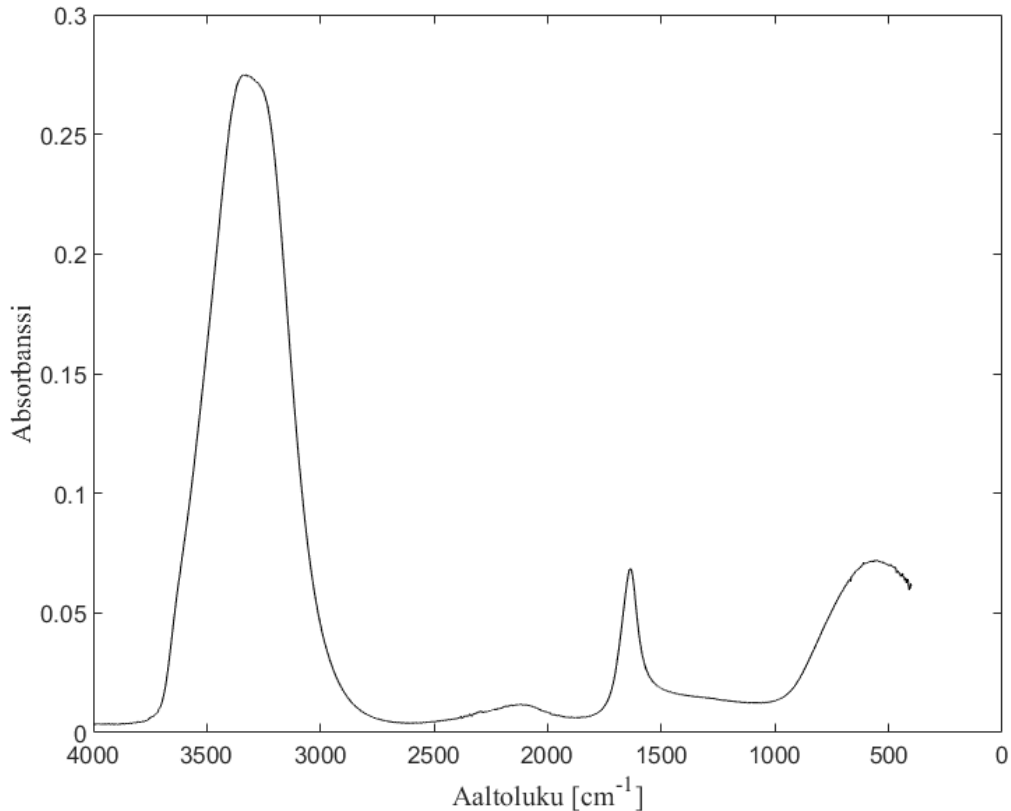
Kokeellisen osan spektrit on mitattu ATR-FTIR-spektrometrilla. Jokaisesta spektristä on otettu talteen raaka spektri, spektrometrin ATR-korjattu spektri sekä spektrometrin taustakorjaama spektri. Spektrien ensimmäisissä mittauksissa testattiin resoluution ja skannaussien vaikutusta spektrien tarkkuuteen. Mitä enemmän skannauksia oli sitä tarkempi spektri saatiin. 1 cm^{-1} resoluutiolla saatiin hieman tarkempia spektrejä kuin 4 cm^{-1} resoluutiolla. Spektrit mitattiin tästä huolimatta 4 cm^{-1} resoluutiolla, jotta mittaus saataisiin suoritettua lyhyemmässä ajassa. Skannaussien määräksi valittiin 10. Kokeellisessa osassa esitettyjen spektrien mittauksista kerrotaan tarkemmin Karri Koskisen kandidaatintyössä ”Humalan aromi- ja katkeroaineiden analysointi”(Koskinen 2020).

Oluen makuun ja katkeruuteen vaikuttavien komponenttien analysointi aloitettiin analysoimalla liuosta, johon on uutettu Mosaic-humalaa keittämällä. Liuoksesta otettiin erilaisia näytteitä aikasarjana. Näytteet skannattiin ATR-FTIR-spektrometrilla. Kuvassa 10 näkyy mittauksesta saadut spektrit, joihin on tehty spektrometrissä oleva ATR-korjaus.



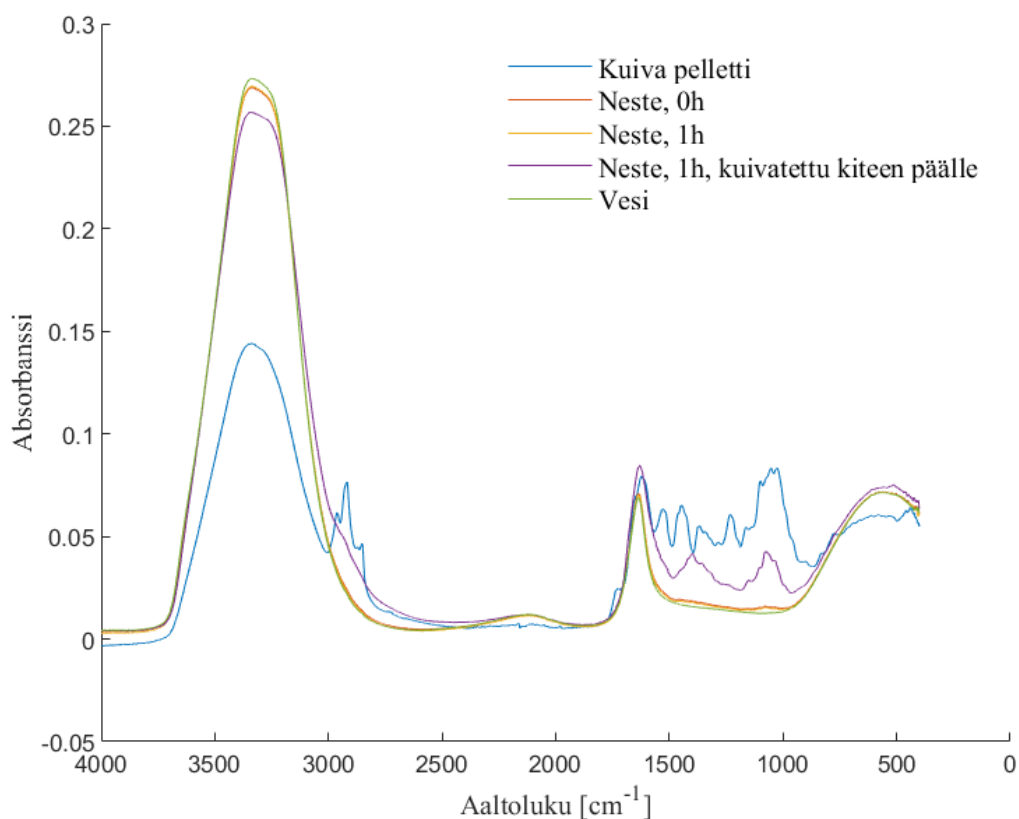
Kuva 10. ATR-FTIR-spektrometrilla mitatut Mosaic-humalan aikasarjaspektrit spektrometrin ATR-korjauksella.

Kuvan 10 spektreistä huomataan, että humalautoksessa oleva vesi vaikuttaa voimakkaasti spektrin muotoon. Vesi peittää alleen humalan komponenteista aiheutuvat piikit. Kuvassa 11 on ATR-FTIR-spektrometrillä mitattu veden spektri.



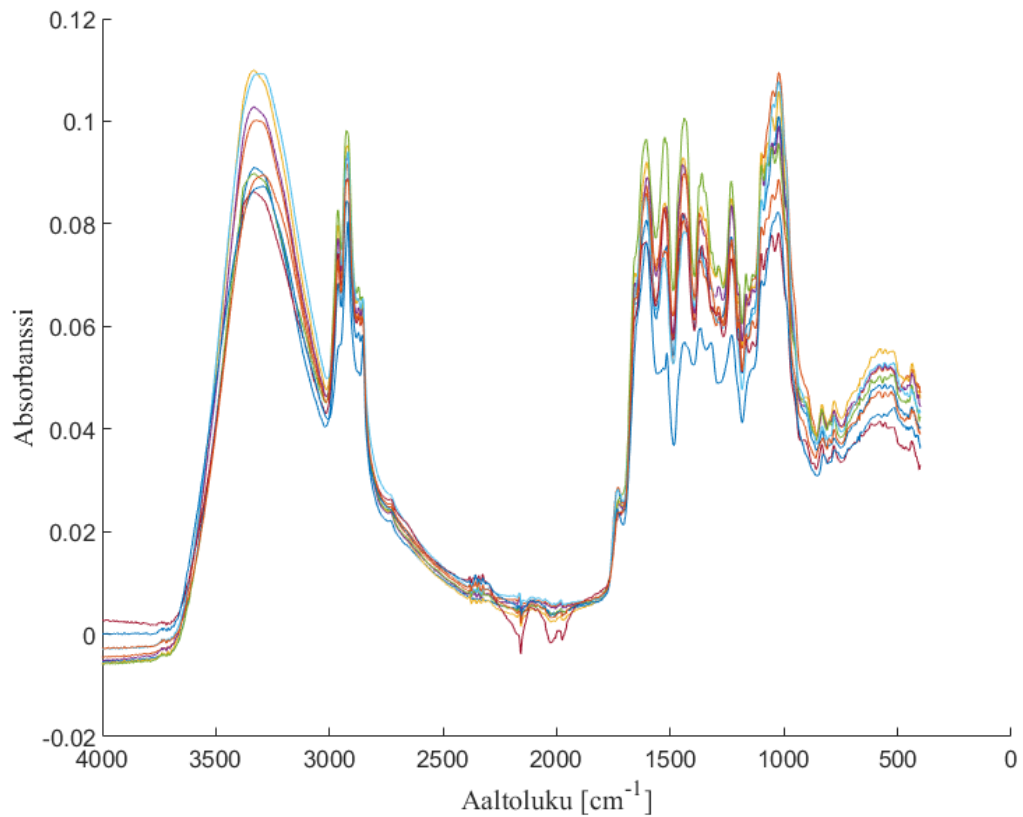
Kuva 11. ATR-FTIR-spektrometrillä mitattu veden spektri spektrometrin ATR-korjauksella.

Seuraavaksi kokeiltiin Mosaic-humalan kuivahumalointia. Humalaa uutettiin veteen eri pitoisuuksina seuraavasti: 0.5 g, 3 g ja 6 g. Näistä kolmesta liuksesta otettiin näytteitä aikasarjana seuraavasti: 1 h, 24 h ja 48 h. Kuvassa 12 on ATR-FTIR-spektrometrillä mitatut näytteet spektrometrin ATR-korjauksella. Koska humalan spektri näytti jäävän edelleen veden spektrin alle, kokeiltiin näytteen kuivattamista ATR-FTIR-spektrometrin kiteen päälle. Näin ollen näytteessä oleva vesi haihtui osittain pois, jolloin humalan erilaisista komponenteista aiheutuvia piikkejä saatiin näkyviin. Kuvassa 12 on Mosaic-humalan kuivahumaloinnista saadut spektrit ATR-FTIR-spektrometrin ATR-korjauksella.



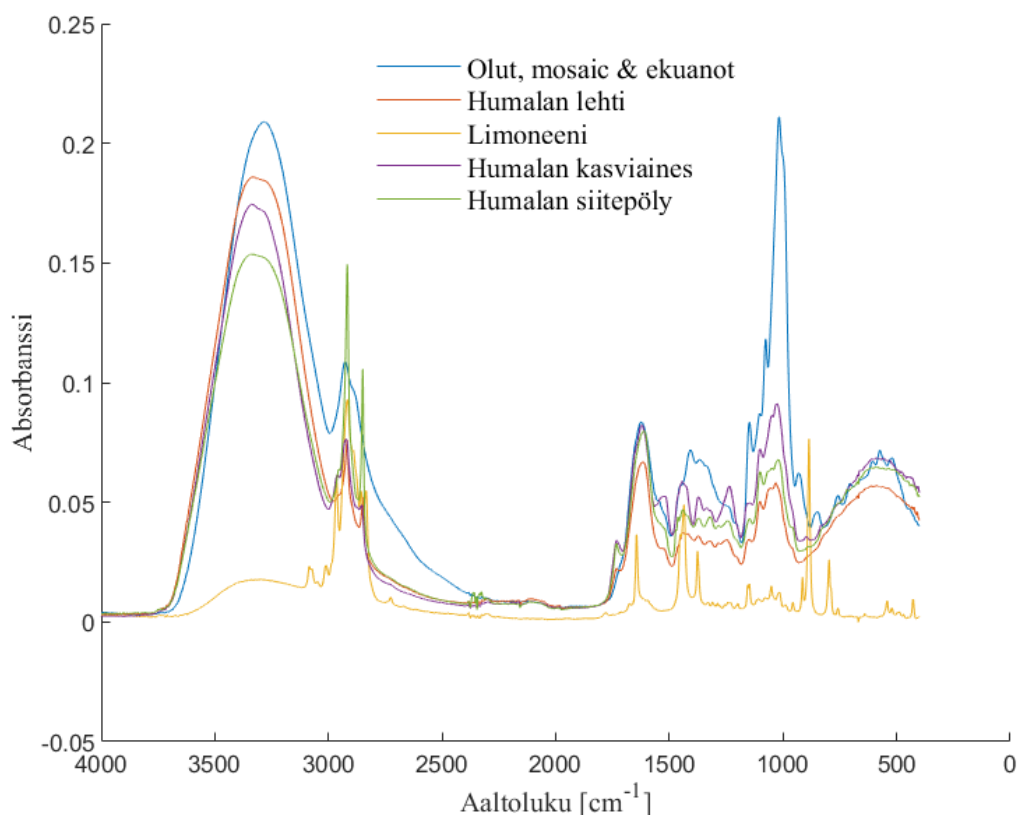
Kuva 12. ATR-FTIR-spektrometrillä mitatut Mosaic-humalan kuivahumalointispektrit spektrometrin ATR-korjauksella.

Sitten päädyttiin mittaamaan erilaisia humalalajikkeita kuivina pelletteinä. Humalalajikkeissa on vaihtelua α - ja β -hapon konsentraatioissa. Humalalajikkeita on eri maista sekä eri vuosina kasvatettuina. Kuvassa 13 on ATR-FTIR-spektrometrillä mitatut eri humalalajikkeet spektrometrin ATR-korjauksella. Erilaisia taustankorjausmenetelmiä toteutetaan näille humalien spektreille, koska kuivahumalien spektreissä erottui eniten humalan komponentteja.



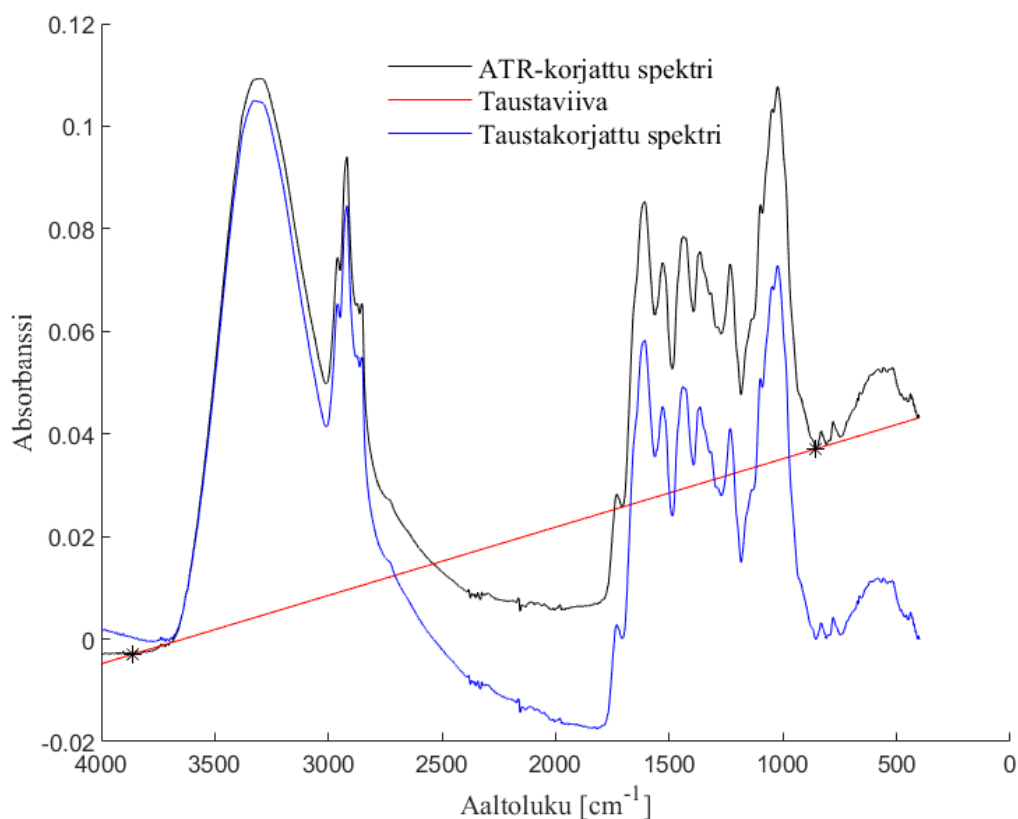
Kuva 13. ATR-FTIR-spektrometrilla eri humalalajikkeiden kuivista pelleteistä mitatut spektrit ATR-korjauksella.

Lopuksi mitattiin vielä lisää humalalajikkeita kuivapelletteinä, oluita, humalakasvin lehtiä sekä humalakasvissa olevaa siitepölyä ja yhtä humalan komponenttia limoneenia. Lisäksi mitattiin Mosaic-humalan tunnin kestäneessä keitoksessa syntynyttä humalan kasviainesta. Spektrit mitattiin ATR-FTIR-spektrometrilla ja niihin tehtiin spektrometrin ATR-korjaus ja taustankorjaus. Kuvassa 14 on esiteltyinä mittauksesta saadut oluiden spektrit, limoneenin spektri sekä humalakasvin eri spektrit ATR-FTIR-spektrometrin ATR-korjauksella.



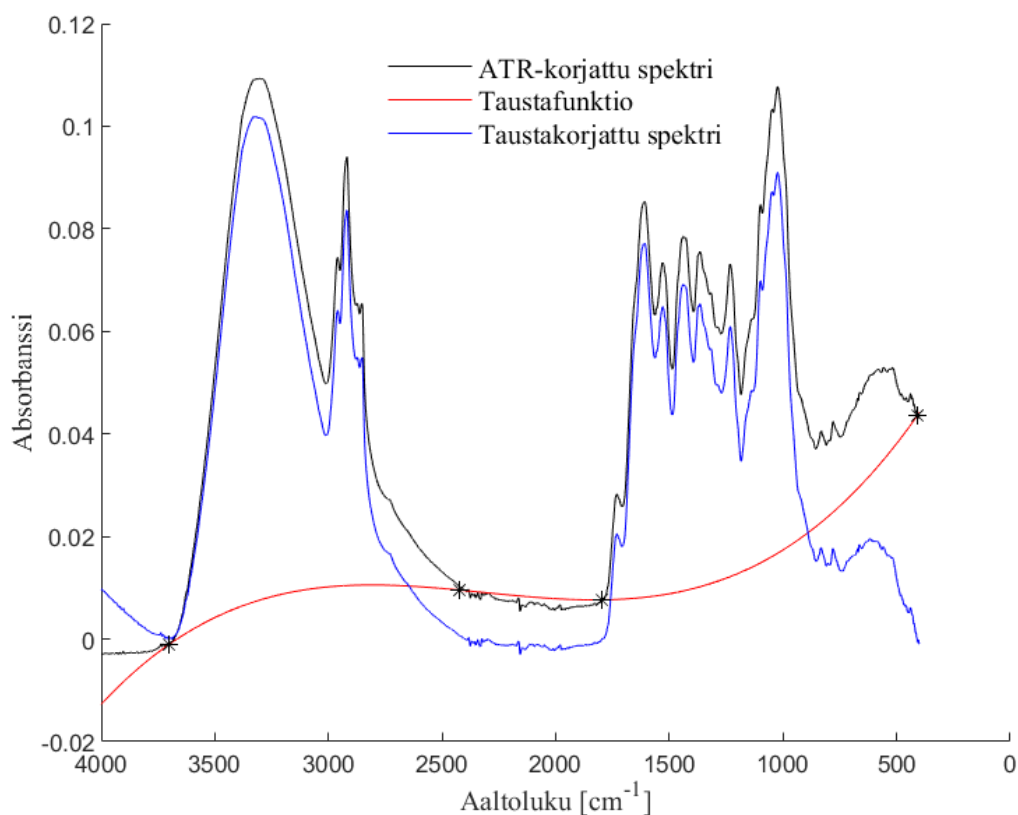
Kuva 14. ATR-FTIR-spektrometrilla mitatut humalakasvin, limoneenin ja oluen spektrit spektrometrin ATR-korjauksella.

Ensimmäisenä taustankorjausmenetelmänä kokeiltiin lineaarista interpolaatiota. Lineaarinen interpolaatio muodostettiin vuoden 2018 Mosaic-humalalle. Lineaarinen interpolaatio suoritettiin kahden spektripisteen kautta ATR-korjatulle spektrille siten, että spektrin alkupäästä ja loppupäästä valittiin halutut spektripisteet MATLAB:n `ginput`-toiminnon avulla. Näiden spektripisteiden välille sovitettiin taustaviivaksi ensimmäisen asteen funktio eli suora `polyfit`-komennolla. `Polyfit` ratkaisee suoran kulmakertoimen ja vakiotermin. Näin saatu taustaviiva vähennettiin ATR-korjatusta spektristä. Kuvassa 15 näkyy Mosaic-humalan alkuperäinen ATR-korjattu spektri, taustaviiva ja lineaarisessa interpolaatiossa käytetyt spektripisteet sekä lineaarisella interpolaatiolla taustakorjattu humalan spektri.



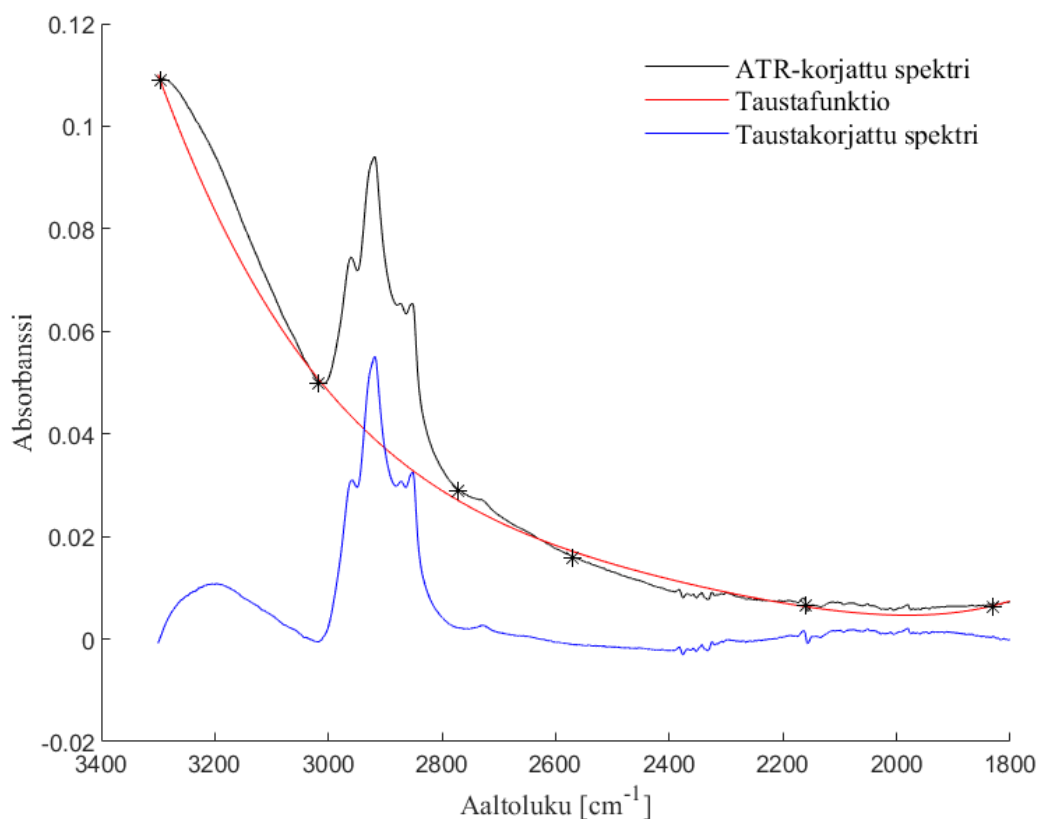
Kuva 15. Lineaarinen interpolaatio kahden datapisteen kautta ATR-korjatulle Mosaic-humalan spektrille.

Seuraavaksi kokeiltiin usean datapisteen kautta muodostetun taustafunktion poistamista Mosaic-humalan ATR-korjatusta spektristä. Taustafunktion muodostamista varten spektristä valittiin ensin MATLAB:n `ginput`-toiminnolla neljä spektripistettä. MATLAB:n `fit`-komennolla sovitettiin valittuihin spektripisteisiin kolmannen asteen polynomifunktio `fitType`:lla `poly3`. `Coeffvalues`-toiminnolla saatiin polynomisovituksessa käytetyt parametrit, joiden avulla kolmannen asteen taustafunktio saatiin muodostettua. Saatu taustafunktio vähennettiin ATR-korjatusta Mosaic-humalan spektristä. Kuvassa 16 on Mosaic-humalan ATR-korjattu spektri, neljän spektripisteen kautta muodostettu kolmannen asteen taustafunktio ja taustakorjattu spektri.



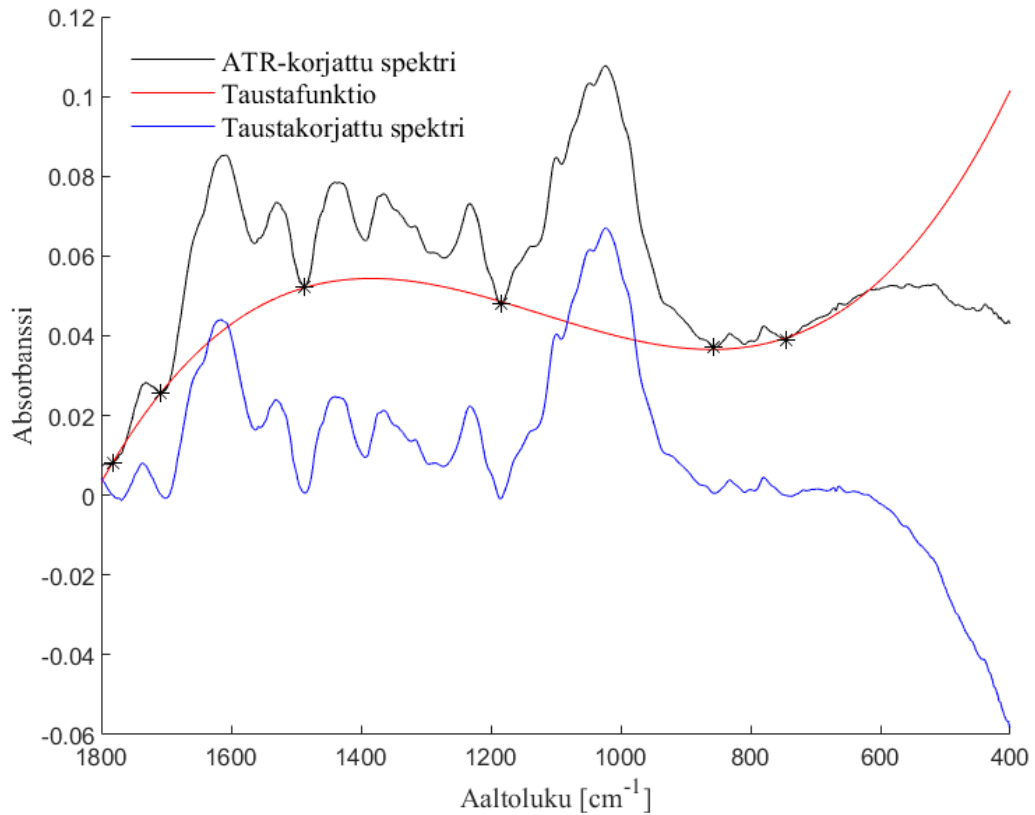
Kuva 16. Usean datapisteen kautta muodostettu polynomiaalinen taustankorjausfunktio.

Polynomiaalisen taustafunktion tutkimista jatkettiin siten, että taustafunktio muodostettiin paloittain spektrille. Ensin tutkittiin spektrin aaltolukualuetta välillä $3300\text{--}1801\text{ cm}^{-1}$. Tällä aaltolukualueella ilmenee vedestä aiheutuva leveä ja korkea spektriipiikki, joka pitäisi saada suodatettua pois. Spektrin perusteella taustafunktioksi sopii jokin neljännen asteen polynomifunktio. Täten MATLAB:n `ginput`-toiminnolla valittiin kuusi spektripistettä, joihin fit-komento sovitti neljännen asteen polynomifunktion `fitType`:lla `poly4`. Komennolla `coeffvalues` saatiin polynomisovituksessa käytetyt parametrit, joiden avulla neljännen asteen polynomifunktio muodostettiin. Lopulta ATR-korjatusta spektristä vähennettiin saatu taustafunktio. Kuvassa 17 on alueen $3300\text{--}1801\text{ cm}^{-1}$ ATR-korjattu spektri, taustafunktioksi muodostettu polynomifunktio ja sen sovituksessa käytetyt spektripisteet sekä taustakorjattu spektri.



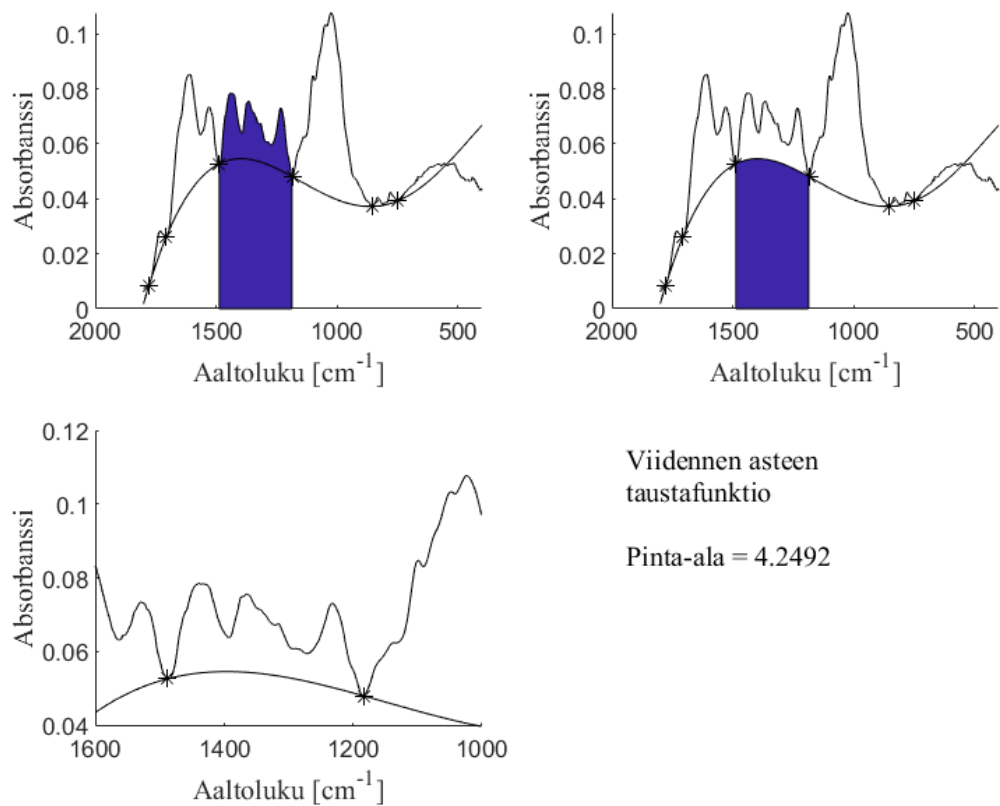
Kuva 17. Alueelle 3300-1801 cm^{-1} suoritettu polynomiaalinen taustankorjaus.

Sitten tutkittiin samalla menetelmällä Mosaic-humalan niin kutsuttua sormenjälkialuetta välillä 1800-400 cm^{-1} . Tällä alueella taasen on monia humalan komponenteista aiheutuvia spektriipiikkejä. Spektrin perusteella kolmannen asteen polynomifunktio sopii taustafunktioksi. Jälleen MATLAB:n `ginput`-toiminnolla valittiin 6 spektripistettä, joihin `fit`-komento sovitti kolmannen asteen polynomifunktion `fitType`:lla `poly3`. `Coeffvalues`-komennolla saatiin polynomisovituksessa käytetyt parametrit, joiden avulla taustafunktio muodostettiin. Lopulta sormenjälkialueen spektristä vähennettiin taustafunktio. Kuvassa 18 on sormenjälkialueen ATR-korjattu spektri, taustafunktioksi muodostettu polynomifunktio ja sen sovituksessa käytetyt spektripisteet sekä taustakorjattu spektri.



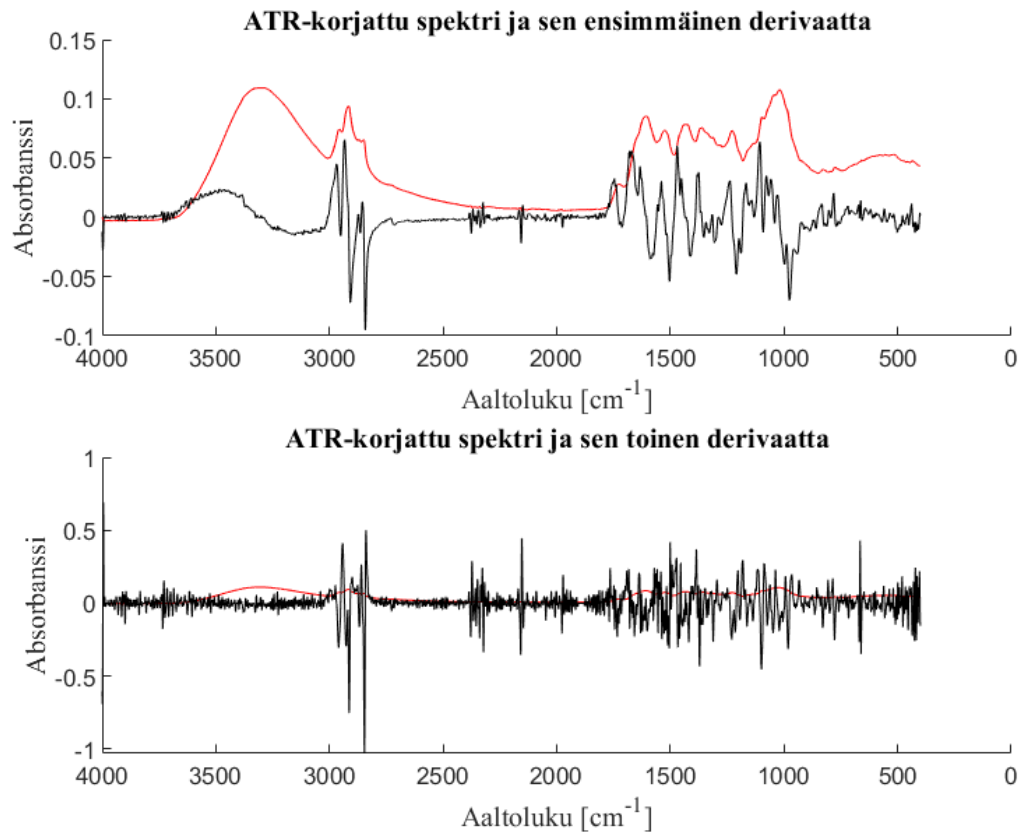
Kuva 18. Sormenjälkialueelle suoritettu polynomiaalinen taustankorjaus.

Sormenjälkialueelle sovitetun taustafunktion polynomiasteen vaikutusta pinta-alaan, joka jää raan spektrin, taustafunktion ja datapisteiden $x = 1487 \text{ cm}^{-1}$ ja $x = 1186 \text{ cm}^{-1}$ välille tutkittiin. Tarkasteltava alue on esitelty kuvassa 19. Taustafunktiot muodostettiin 6 datapisteen kautta fit-komennolla vaihdellen polynomifunktion astetta fitType:lla. Coeffvalues-komennolla saatiin polynomisovituksen parametrit, joilla taustafunktio muodostettiin. Lopuksi pinta-ala laskettiin trapz-funktiolla siten, että ensin laskettiin raan spektrin ja x -akselin väliin jäävä pinta-ala, jota rajoittaa suorat $x = 1487 \text{ cm}^{-1}$ ja $x = 1186 \text{ cm}^{-1}$. Tästä pinta-alasta vähennettiin taustafunktion ja x -akselin väliin jäävä pinta-ala samoilla rajoituksilla. Sama laskukaava toistettiin eri asteisille taustafunktioille. Lopuksi pinta-aloja verrattiin keskenään toisiinsa suhteellisenä muutoksena. Tulokset löytyvät taulukosta 3.



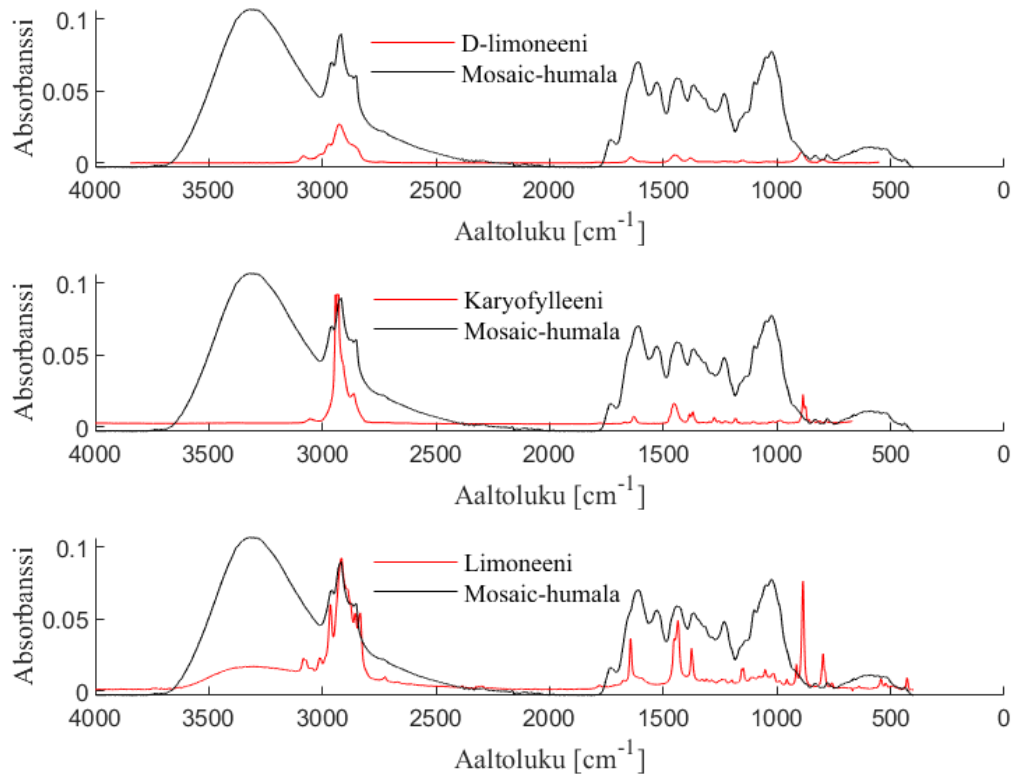
Kuva 19. Taustafunktion vaikutus pinta-alaan.

Mosaic-humalan spektrille kokeiltiin Savitzky-Golay-filtteriä, joka laskee konvoluutiokerroimet, signaalin ensimmäisen ja toisen derivaatan sekä approksimoi dataa polynomilla käyttäen pienimmän neliösumman parametriarviointia (Martin 2020). Kuvassa 20 on esiteltyä Savitzky-Golay-filtterin käyttö Mosaic-humalan ATR-korjatulle spektrille.



Kuva 20. Derivatiivinen Savitzky-Golay-filtteri ATR-korjatulle Mosaic-humalan spektrille.

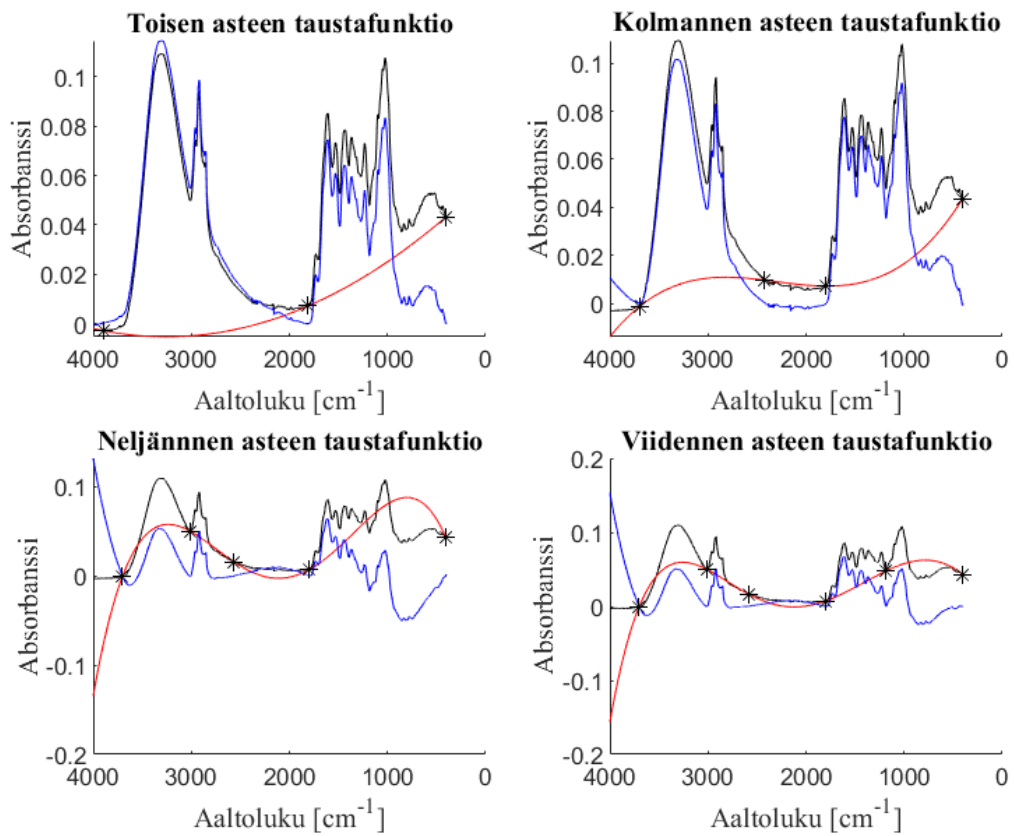
Humalan eri komponenttien puhtaita spektrejä löytyi NIST National Institute of Standards and Technology datapankista. Datapankista sai D-limoneenin (Standards et al. 2020b) ja karyofylleenin (Standards et al. 2020a) transmittanssispektrejä JCAMP-DX formaatissa. Nämä spektrit ladattiin MATLAB:iin `jcampread`-komennolla ja kuvaajat sai piirrettyä `jcampStruct`-Blocks-toiminnon kautta `plot`-komennolla. Koska spektrit olivat transmittanssispektrejä, piti spektrit muuttaa ensin absorbanssispektreiksi, jotta ne ovat vertailukelpoisia ATR-FTIR-spektrometrilla mitattujen spektrien kanssa. Lopuksi humalan komponenttien spektrit piirrettiin samaan kuvaan ATR-FTIR-spektrometrilla mitatun ja taustakorjatun Mosaic-humalan kanssa. Näin ollen kuvasta voi päätellä, mitkä humalan komponentit vaikuttavat Mosaic-humalan spektriipiikkeihin sijainnin, muodon ja korkeuden perusteella. Kuvassa 21 on Mosaic-humalan taustakorjattu spektri sekä D-limoneenin, karyofylleenin ja ATR-FTIR-spektrometrilla mitatun limoneenin spektrit.



Kuva 21. D-limoneenin ja karyofylleenin puhtaat spektrit sekä ATR-FTIR-spektrometrilla mitatut ja taustakorjatut Mosaic-humalan ja limoneenin spektrit.

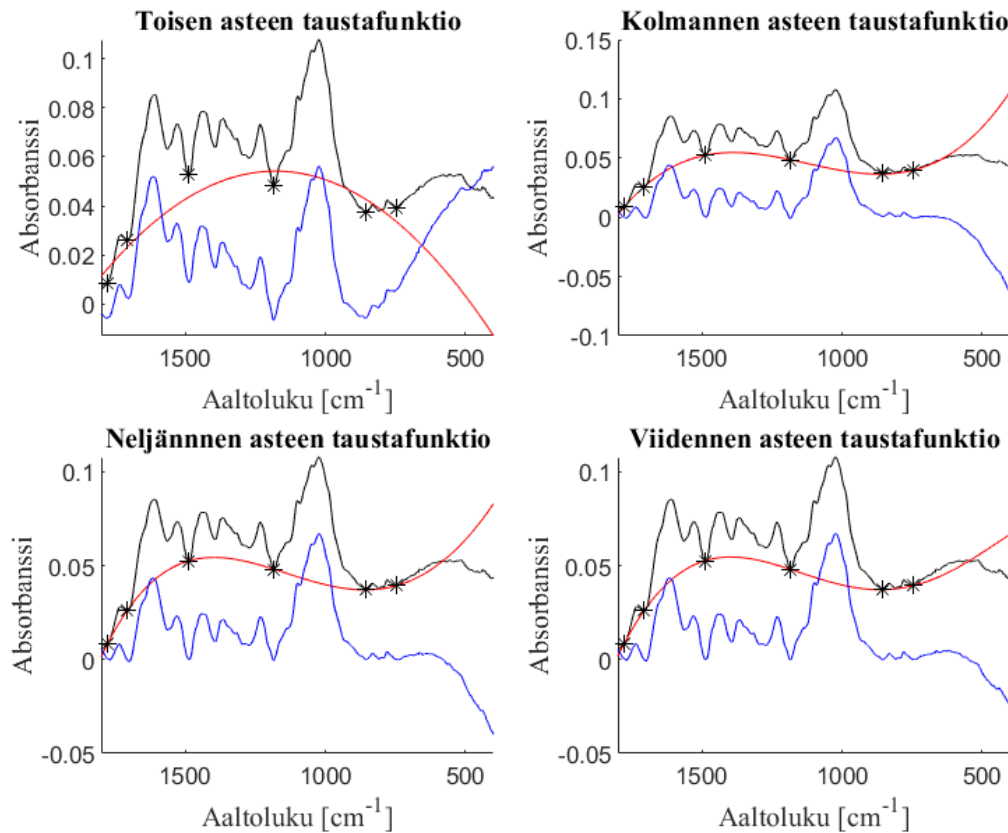
5 TULOKSET

Mosaic-humalan ATR-korjatulle spektrille muodostetut eri asteen taustafunktiot ovat kuvattuna kuvassa 22. Kuvassa näkyy, kuinka sovitukseen käytettyjen spektripisteiden määrän ja taustafunktion aste vaikuttavat taustakorjatun spektrin laatuun. Käytettäessä MATLAB:n fit-komentoa, sovituksessa käytettävien spektripisteiden lukumäärä täytyy olla vähintään yhden verran suurempi kuin sovitettavan taustafunktion aste.



Kuva 22. Taustafunktion sovitukseen käytettyjen spektripisteiden ja taustafunktion asteen vaikutus taustankorjaukseen.

Sormenjälkialueelle sovitettujen eri asteisten taustafunktioiden vaikutusta pinta-alaan, joka jää raan spektrin, taustafunktion ja suorien $x = 1487 \text{ cm}^{-1}$ sekä $x = 1186 \text{ cm}^{-1}$ välille käsiteltiin kuvassa 19. Tulokset on esitelty taulukossa 3. Toisen asteen taustafunktiolla jää selkeästi eniten pinta-alaa kuvattun alueen välille. Kuvassa 23 on esitelty eri asteen taustafunktioiden sovitus sormenjälkialueen raan alle spektrille.



Kuva 23. Taustafunktion asteen vaikutus taustankorjaukseen sormenjälkialueella.

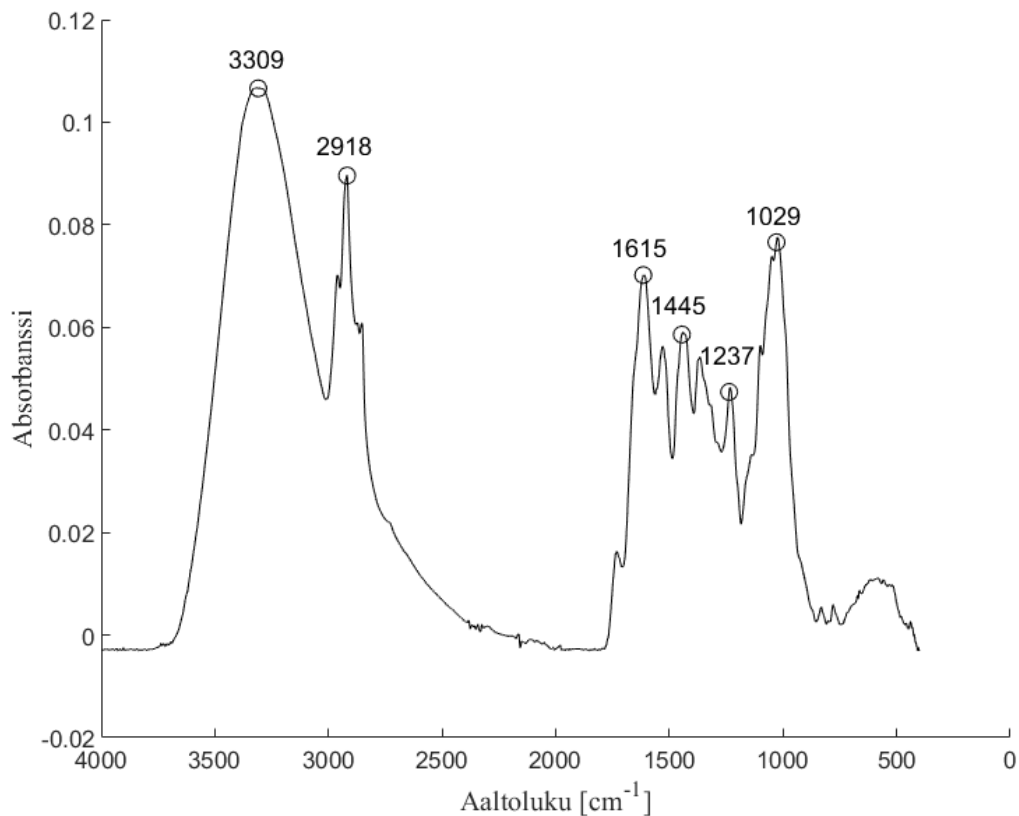
Taulukko 3. Tulokset taustafunktion vaikutuksesta pinta-alaan.

Taustafunktion asteluku	Pinta-ala	Suhteellinen muutos edelliseen verrattuna
2	4.8987	0
3	4.1662	-0.1495
4	4.2847	0.0284
5	4.2492	-0.0083

Savitzky-Golay-filtterin tulokset on esitelty kuvassa 20. Kuvasta huomataan, että ATR-korjatun Mosaic-humalan ensimmäinen derivaatta erottelee spektriipiikkejä ja tuo pienempiä piikkejä esiin. Esimerkiksi aaltolukualueella 2400 cm^{-1} - 2000 cm^{-1} tulee esiin piikkejä, joita ei alkuperäisessä spektrissä näy. Näin ollen derivaattaa voisi käyttää avuksi pienimpien spektriipiikkien löytämisessä. Toki spektrin derivointi siirtää spektriipiikkien paikkoja, jolloin komponenttien tunnistus hankaloituu. Spektrin toisen derivaatan tulkinta on vaikeampaa, koska

se on paljon kohinaisempi verrattuna ensimmäiseen derivaattaan.

ATR-FTIR-spektrometrin taustakorjaamasta Mosaic-humalan spektristä tunnistettiin spektri-
riipikejä IR-spektritaulukon avulla, jossa kaikki tunnetut spektri-riipikit on jaoteltu taajuusa-
alueittain (Merck KGaA 2020). Mosaic-humalan spektristä löydettiin kuusi riipikettä, joille
löydettiin vastaavuudet IR-taulukosta. Nämä riipikit on esitelty kuvassa 25.



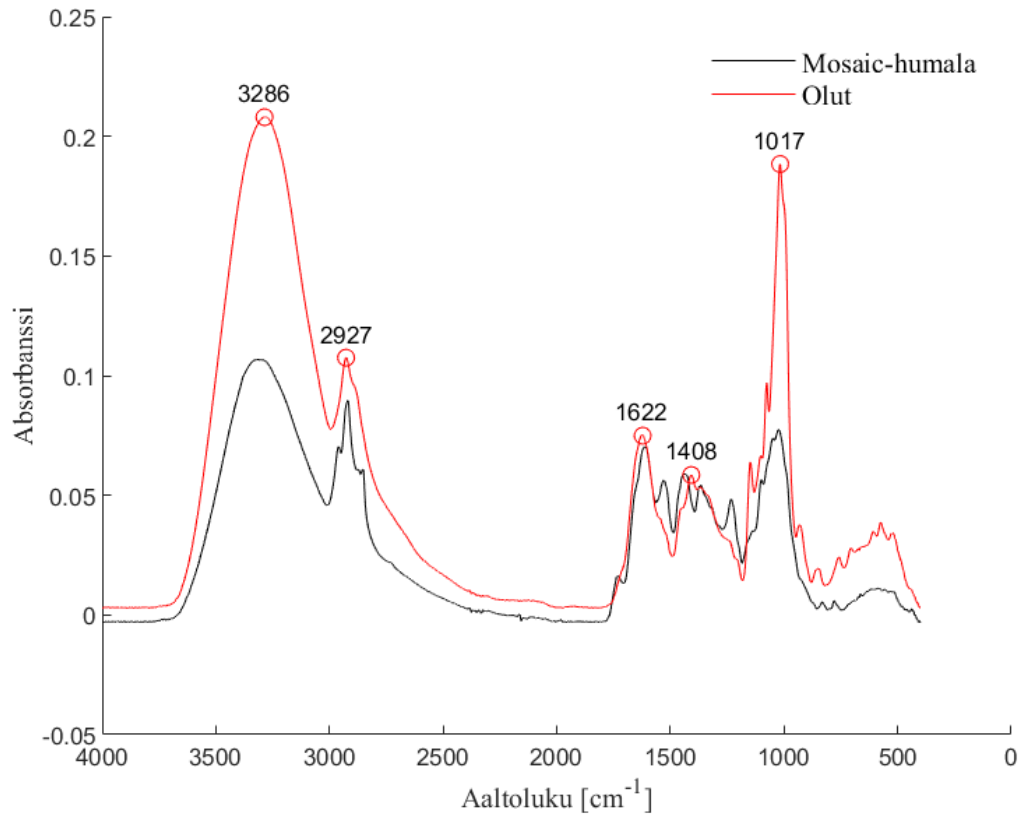
Kuva 24. Mosaic-humalan spektri-riipikkien analyysi.

Voimakas ja laaja riipike kohdassa $x = 3309 \text{ cm}^{-1}$ viittaa O-H-venymiseen, joka aiheutuu vedestä ja alkoholista. Kohumuloni on yksi humalan komponenteista, jossa on O-H-ryhmiä. Voimakas ja kapea riipike kohdassa $x = 2918 \text{ cm}^{-1}$ johtuu C-H-venymisestä. Riipike, joka on kohdassa $x = 1445 \text{ cm}^{-1}$ aiheutuu taasen C-H-taipumisesta. C-H-sidokseen liittyvää värähtelyä löytyy melkein jokaisesta humalan komponentista. Kohdan $x = 1615 \text{ cm}^{-1}$ riipike johtuu C=C-venymisestä. Kyseisiä kaksoissidoksia löytyy ainakin seuraavista humalan komponenteista: kohumuloni, myrseeni, humuleeni, karyofylleeni ja limoneeni. Riipike kohdassa $x = 1237 \text{ cm}^{-1}$ aiheutuu C-O-venymisestä. Kohdan $x = 1029 \text{ cm}^{-1}$ riipike taasen johtuu C-N-venytyksestä. Taulukossa 4 on koottuna spektristä löytyneet riipikit.

Taulukko 4. Mosaic-humalan spektristä tunnistetut piikit.

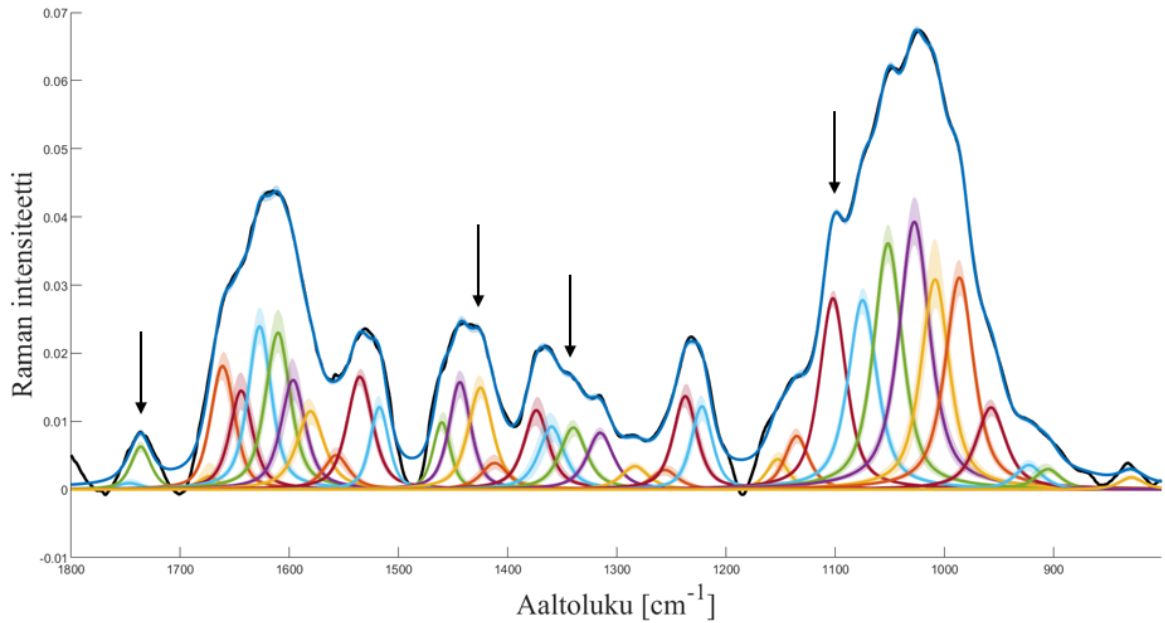
Piikki [cm⁻¹]	Ryhmä	Värähtely	Komponentti
3309	O-H	Venyminen	Kohumuloni
2918	C-H	Venyminen	Suurin osa humalan komponenteista
1615	C=C	Venyminen	Kohumuloni, myrseeni, humuleeni, karyofylleeni, limoneeni
1445	C-H	Taipuminen	Suurin osa humalan komponenteista
1237	C-O	Venyminen	Ei tunnistettu
1029	C-N	Venyminen	Ei tunnistettu

Mosaic-humalaa sisältävästä oluesta saatiin tunnistettua spektri-*piikkejä*, jotka löytyivät myös Mosaic-humalan spektristä. Kuvassa 25 on ATR-FTIR-spektrometrin taustakorjaamat Mosaic-humalan spektri ja Mosaic-humalaa sisältävän oluen spektri. Kuvaan on merkitty spektri-*piikit*, jotka osuvat kohdakkain molemmissa spektreissä. Humalan O-H- ja C-H-venyminen sekä C=C- ja C-N-taipuminen osuvat kohdakkain. Piikki kohdassa $x = 1408 \text{ cm}^{-1}$ taasen ei osu niin hyvin kohdakkain Mosaic-humalan spektrin kanssa. IR-spektritaulukon mukaan kyseisessä kohdassa on mahdollisesti O-H-taipumista (Merck KGaA 2020). Näin ollen oluen voidaan olettaa sisältävän ainakin kohumulonia, myrseeniä, humuleenia, karyofylleeniä ja limoneenia. Nämä komponentit vaikuttavat oluen katkeruuteen ja tuovat olueen muun muassa sitrus- ja puuaromeita.



Kuva 25. Mosaic-humalaa sisältävän oluen spektriipiikkien analyysi.

Spektriipiikkien tunnistamisen tueksi käytettiin Teemu Härkösen koodaamaa ohjelmaa, joka muodostaa spektrille taustamallin sekä laskee dekonvoluution ja tilastollisen piikkisovituksen (Härkönen 2020). Tällä ohjelmalla tehtiin dekonvoluutio ja tilastollinen piikkianalyysi jo valmiiksi taustakorjatuille Mosaic-humalan spektreille sormenjälkialueella. Tilastollinen piikkisovitus on mallinettu julkaisun ”Bayesian Modelling and Quantification of Raman Spectroscopy” mukaisesti käyttäen Lorentzin, Gaussin tai pseudo-Voigtin funktiota (Moore et al. 2016). Tässä tapauksessa mallinnuksessa on käytetty Voigt-funktiosta saatavia viivanmuotoja. Kuvassa 26 on tilastollinen piikkisovitus Mosaic-humalan sormenjälkialueelle, johon on sovitettu neljännen asteen taustafunktio. Kuvan haalealla värillä piirretyt alueet kuvaavat spektriipiikkien 95 % ennustevälejä. Spektriipiikin odotusarvo on kuvattu haaleata aluetta vastaavalla viivalla.



Kuva 26. Tilastollisen piikkianalyysin tulokset Mosaic-humalan sormenjälkialueelle.

Tilastollisen piikkianalyysin perusteella ja pienemmän tarkastelualueen ansiosta taustakorjauksesta Mosaic-humalan sormenjälkialueen spektristä erottuu useita piikkejä. Piikit tunnistettiin IR-spektritaulukon avulla (Merck KGaA 2020). Huomattavin ero kuvaan 24 verrattuna on se, että kuvan 26 spektrin kohdassa $x = 1737 \text{ cm}^{-1}$ esiintyy piikki, joka ei ole niin helposti tunnistettavissa kuvan 24 spektrissä. Tämä piikki aiheutuu C=O-venymisestä. Kyseisiä C=O-sidoksia löytyy muun muassa humulonista, kohumulonista ja adhumulonista, joten kyseisen piikin olettaisi löytyvän humalan spektristä. Lisäksi kohdista $x = 1425 \text{ cm}^{-1}$ ja $x = 1340 \text{ cm}^{-1}$ löytyy O-H-venymistä. Kohdassa $x = 1102 \text{ cm}^{-1}$ on taasen C-O-venymistä.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Oikean taustamallin valinta tarkasteltavalle spektrille ei ole suoraviivaista. Jos taustamalliksi sovitetaan polynomifunktiota, voi spektrin muodon perusteella päätellä polynomifunktion asteluvun. Selkeästi lineaarisesti muuttuvalle spektrille sopii taustafunktioksi suoran funktio. Jos spektrin taustalla on havaittavissa kaarevuutta, sopii taustafunktioksi paremmin esimerkiksi toisen asteen tai kolmannen asteen polynomifunktio. Muodostettu taustafunktio ei saa leikata alkuperäistä raakaa spektriä, koska silloin spektriipiikit saattavat vääristyä.

Tarkastellessa kuvaa 22 voidaankin todeta, että parhaiten Mosaic-humalan spektrin taustafunktioksi sopii toisen asteen polynomifunktio, joka on kehitetty kolmen datapisteen kautta. Taustafunktio ei leikkaa alkuperäistä spektriä ja se silmämääräisesti asettuu oikealle kohdalle. Kuvasta huomataan myös taustafunktion muodostamisessa käytettävien spektripisteiden määrän vaikutus taustankorjauksen laatuun. Näyttää siltä, että mitä enemmän spektripisteitä käytetään sovituksessa sitä huonommin taustafunktio asettuu spektriin. Esimerkiksi kuvasta 22 huomataan, että taustafunktion sovittamisessa käytettyjen spektripisteiden lisääntyessä taustafunktio ei asetu enää yhtä hyvin spektrin taustaksi. Lisäksi taustafunktion asteluvun kasvaessa taustafunktio leikkaa useammin alkuperäistä spektriä, jolloin taustakorjattu spektri on vääristynyt.

Polynomifunktion sovituksessa käytettävien spektripisteiden valinta ei ole yksinkertaista. Valinnassa täytyy ottaa huomioon se, että kyseinen kohta spektrissä asettuu nollassi, kun alkuperäisestä spektristä vähennetään taustankorjausfunktio. Tällöin saattaa vahingossa menettää spektriipiikin. Tämän perusteella kuvassa 22 olevat neljännen ja viidennen asteen taustafunktiot ovat kyseenalaisia, koska varsinkin sormenjälkialueella ($1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) saattaa ilmetä piikkejä, jotka tulevat vasta dekonvoluution avulla erotetuksi muiden piikkien joukosta.

Tarkasteltaessa Mosaic-humalan sormenjälkialuetta, taustafunktioksi näyttäisi parhaiten asetuvan kuvan 23 perusteella joko neljännen tai viidennen asteen polynomifunktio kuuden spektripisteen kautta kehitettynä. Taustafunktiot näyttävät ulkoisesti samalta, mutta taulukosta 3 huomataan, että viidennen asteen polynomifunktio kaartuu enemmän kohti raakaa spektriä kolmannen ja neljännen spektripisteen välillä, koska spektrin ja taustafunktion väliin jäävä pinta-ala tällä alueella on pienempi. Lisäksi huomattavaa on se, että polynomifunktion muodostamisessa käytettyjä spektripisteitä on valittu myös sormenjälkialueen keskeltä, jolloin on mahdollisuus vahingossa menettää jokin spektriipiikki.

Tilastollisen piikkianalyysin myötä pienien ja spektrissä piilossa olevien piikkien tärkeys korostuu. Esimerkiksi prosessin laadunvalvonnassa juuri nämä piikit saattavat vaikuttaa mer-

kittävästi prosessiin. Pohdittavaa on kuitenkin se, että prosessin laadun varmistamiseksi koko spektrin tarkkailu ei välttämättä ole oleellista, jolloin taustankorjausta ei tarvitse tehdä koko spektrille. Näin ollen voidaan keskittää seuranta pienemmälle alueelle, jolle saadaan optimoitua sopivin taustankorjaus.

7 YHTEENVETO

Työn tarkoituksena oli tunnistaa oluen spektristä humalan spektri ja erotella oluen makuun vaikuttavia komponentteja. ATR-FTIR-spektrometrillä analysoitiin eri humalalajikkeita sekä humalan komponentteja, kuten α -happoa ja limoneenia. ATR-FTIR-spektrometrillä analysoitiin myös erilaisia oluita, humalakasvia sekä humalakeitoksia. Työ rajattiin keskittymään Mosaic-humalan spektriin sekä Mosaic-humalaa sisältävään olueen. Humalan komponenttien tunnistus aloitettiin itse humalan spektristä, josta siirryttiin tunnistamaan vastaavia komponentteja oluen spektristä.

Työ aloitettiin tutustumalla Fourier-muunnos infrapunaspektroskopian teoriaan. Ensin käsiteltiin infrapunaspektroskopiaa, jossa keskusteltiin infrapunaspektrin muodostumisesta, molekyylien infrapuna-aktiivisuudesta sekä infrapuna-aktiivisten molekyylien värähtelytyypeistä. Sitten siirryttiin itse Fourier-muunnos infrapunaspektroskopiaan, jossa keskusteltiin tekniikan toimintaperiaatteesta, Michelsonin interferometristä ja FT-IR-spektrometriin liitettävästä ATR-kiteestä. Lopuksi käsiteltiin itse Fourier-muunnoksen merkityksestä FT-IR-spektroskopian suhteen ja vielä tarkemmin infrapunaspektristä.

Jotta komponenttien tunnistus olisi mahdollista, spektrejä piti käsitellä matemaattisesti, koska raaka spektri sellaisenaan ei tuota tarpeeksi informaatiota. Spektrien matemaattinen käsittely tehtiin MATLAB-ohjelmistolla. Matemaattiseen käsittelyyn sisältyi polynomiaalinen taustankorjaus, spektrin pinta-alan laskenta ja derivatiivinen Savitzky-Golay-filtteri. Spektreihin tehtiin myös Teemu Härkösen kehittämällä ohjelmalla dekonvoluutio ja tilastollinen piikkianalyysi.

Spektreille saatiin muodostettua erilaisia polynomiaalisia taustankorjausfunktioita. Kokonaiselle Mosaic-humalan spektrille taustafunktioksi asetui parhaiten toisen asteen polynomifunktio kolmen spektripisteen kautta kehitettynä. Paloittain tarkasteltuna Mosaic-humalan sormenjälkialueelle taustafunktioksi asetui parhaiten neljännen tai viidennen asteen polynomifunktio, joka oli kehitetty kuuden spektripisteen kautta. Mosaic-humalan aaltolukualueelle $3300\text{-}1801\text{ cm}^{-1}$ taustafunktioksi asetui neljännen asteen polynomifunktio. Savitzky-Golayn derivatiivisen menetelmän tuloksista ensimmäinen derivaatta erotteli spektriipikkejä ja toi pienempiä piikkejä esiin. Ensimmäistä derivaattaa pystyi käyttämään apuna pienempien spektriipikkien löytämisessä. Menetelmän toinen derivaatta oli paljon kohinaisempi verrattuna ensimmäiseen derivaattaan, jolloin sen tulkinta oli vaikeampaa.

Mosaic-humalan spektristä tunnistettiin kuusi piikkiä. Piikit viittasivat siihen, että humalan komponenteissa on O-H-, C-H-, C=C-, C-O- ja C-N-värähtelyä. Näistä C-O- ja C-N-värähtelyä ei tunnistettu entuudestaan tiedossa olevista Mosaic-humalan komponenteista.

Tilastollisen piikkianalyysin ja pienemmän tarkastelualueen myötä Mosaic-humalan sormenjälkialueelta tunnistettiin myös C=O-väriähtelyä. Oluesta löydettiin vastaavuuksia Mosaic-humalan spektriin. Oluen todettiin sisältävän ainakin kohumulonia, myrseeniä, humuleenia, karyofylleeniä ja limoneenia. Nämä komponentit vaikuttavat oluen katkeruuteen ja tuovat olueen muun muassa sitrus- ja puuaromeita.

Polynomiaalisen taustafunktion sovittaminen raakaan spektriin ei ole suoraviivaista, koska sovituksessa käytettävien spektripisteiden valinta vaatii huolellisuutta. Spektripisteiden valinnassa täytyy ottaa huomioon se, että kyseiset pisteet asettuvat taustakorjatussa spektrissä nol-laksi. Tällöin on mahdollisuus vahingossa menettää jokin spektriipiikki. Lisäksi taustafunktion asteluvun valinnassa täytyy ottaa huomioon raan spektrin taustan muoto. Linearisesti muuttuvalle spektrille sopii taustafunktioksi parhaiten suoran funktio. Kaarevalle taustalle asettuu taasen paremmin esimerkiksi kolmannen asteen polynomifunktio. Tärkeintä polynomifunktion sovituksessa taustan malliksi on se, että taustafunktio ei leikkaa alkuperäistä spektriä, koska tällöin taustakorjattu spektri on vääristynyt.

Tilastollisen piikkianalyysin perusteella pystyttiin todistamaan se, että myös pienet piikit ovat tärkeitä. Tilanteesta riippuen taustankorjauksen voi keskittää kokonaisen spektrin sijaan vain esimerkiksi sormenjälkialueelle, jolloin muu osa spektristä ei vaikuta sormenjälkialueelle asetettavaan taustafunktioon. Näin ollen saadaan optimaalisin taustafunktion sovitus halutulle alueelle. Toisaalta kokonaisen spektrin tulkinta on myös tärkeää, koska pienikin muutos tarkasteltavan alueen ulkopuolella saattaa vaikuttaa esimerkiksi prosessin laatuun.

Lähteet

- Biotechnology Information. PubChem Database, National Center for (2020a). *Adhumulone*, *CID=193681*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Adhumulone> (viitattu 25. 04. 2020).
- (2020b). *Caryophyllene*, *CID=5354499*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5354499> (viitattu 25. 04. 2020).
- (2020c). *Cohumulone*, *CID=196915*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cohumulone> (viitattu 25. 04. 2020).
- (2020d). *Humulone*, *CID=442911*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Humulone> (viitattu 25. 04. 2020).
- (2020e). *Limonene*, *CID=22311*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Limonene> (viitattu 25. 04. 2020).
- (2020f). *Myrcene*, *CID=31253*. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Myrcene> (viitattu 25. 04. 2020).
- Griffiths, Peter R. ja Haseth, James A. de (2007). *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. A John Wiley Sons Inc. Publication.
- Härkönen, Teemu (2020). Tekniikan kandidaatti. Lappeenrannan-Lahden teknillinen yliopisto. Haastattelu. 20.4.2020.
- Jr., Julio C. Machado, Faria, Miguel A., Ferreira, Isabel M.P.L.V.O., Páscoa, Ricardo N.M.J. ja Lopes, João A. (2018). “Varietal discrimination of hop pellets by near and mid infrared spectroscopy”. *Talanta* 180, s. 69–75.
- Koskinen, Karri (2020). *Humalan aromi- ja katkeroaineiden analysointi*. Kandidaatintyö, Lappeenrannan-Lahden teknillinen yliopisto.
- Martin (2020). *Savitzky-Golay Differentiation FIR filter (Generalized)*. <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/68342-savitzky-golay-differentiation-fir-filter-generalized>. MATLAB Central File Exchange. Retrieved March 29, 2020.
- Merck KGaA Darmstadt, Germany and/or its affiliates (2020). *IR Spectrum Table by Frequency Range*. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html> (viitattu 25. 04. 2020).

- Moores, Matthew, Gracie, Kirsten, Carson, Jake, Faulds, Karen, Graham, Duncan ja Girolami, Mark (2016). *Bayesian modelling and quantification of Raman spectroscopy*. arXiv: 1604.07299 [stat.AP].
- Nick Hines, Vinepair (2017). *These Are the Chemical Compounds That Make Beer Taste So Good*. URL: <https://vinepair.com/articles/chemical-compounds-beer/> (viitattu 16.04.2020).
- PerkinElmer (1. heinäkuuta 2013). *Frontier IR Single-Range Systems User's Guide*. English. PerkinElmer. 99 s. Hyväksytty julkaistavaksi.
- S.A., Khan, S.B., Khan, L.U., Khan, A., Farooq, K., Akhtar ja A.M., Asiri (2018). *Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization*. Springer, Cham.
- Schafer, R. W. (2011). "What Is a Savitzky-Golay Filter? [Lecture Notes]". *IEEE Signal Processing Magazine* 28, s. 111–117.
- Sharma, Surender Kumar, Verma, Dalip Singh, Khan, Latif Ullah, Kumar, Shalendra ja Khan, Sher Bahadar (2018). *Handbook of Materials Characterization*. Springer, Cham.
- Smith, Brian C. (2011). *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press Taylor Francis Group.
- Standards, National Institute of ja Technology, U.S. Department of Commerce (2020a). *Carryophyllene*. URL: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=87-44-5&Units=SI&cIR=on> (viitattu 27.04.2020).
- (2020b). *Limonene*. URL: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C138863&Units=SI&Type=IR-SPEC&Index=4#IR-SPEC> (viitattu 27.04.2020).

Taulukot

1	Infrapuna-alueen jaottelu aaltoluvuttain.	8
2	Humalan komponenttien ominaisuuksia.	16
3	Tulokset taustafunktion vaikutuksesta pinta-alaan.	35
4	Mosaic-humalan spektristä tunnistetut piikit.	37

Kuvat

1	CH ₃ - ja NH ₂ -ryhmien symmetrinen ja asymmetrinen venymisvärähtely. . .	9
2	CH ₂ -ryhmän taipumisvärähtely.	10
3	Yksinkertaistettu kuva Michelsonin interferometrin rakenteesta	11
4	Yksinkertaistettu kuva ATR-kiteen toimintaperiaatteesta.	11
5	Esimerkki interferogrammista, joka on muodostunut monen aaltoluvun interferogrammien summana.	13
6	Fourier-muunnos spektrin muodostamisessa.	14
7	Mosaic-humalan raaka ATR-FT-IR-spektri.	17
8	Esimerkki kahden pisteen välisestä taustankorjauksesta.	18
9	Työssä käytetty ATR-FTIR-spektrometri.	20
10	ATR-FTIR-spektrometrillä mitatut Mosaic-humalan aikasarjaspektrit spektrometrin ATR-korjauksella.	22
11	ATR-FTIR-spektrometrillä mitattu veden spektri spektrometrin ATR-korjauksella.	23
12	ATR-FTIR-spektrometrillä mitatut Mosaic-humalan kuivahumalointispektrit spektrometrin ATR-korjauksella.	24
13	ATR-FTIR-spektrometrillä eri humalalajikkeiden kuivista pelleteistä mitatut spektrit ATR-korjauksella.	25
14	ATR-FTIR-spektrometrillä mitatut humalakasvin, limoneenin ja oluen spektrit.	26
15	Lineaarinen interpolaatio kahden datapisteen kautta ATR-korjatulle Mosaic-humalan spektrille.	27
16	Usean datapisteen kautta muodostettu polynomiaalinen taustankorjausfunktio.	28
17	Alueelle 3300-1801 cm ⁻¹ suoritettu polynomiaalinen taustankorjaus. . . .	29

18	Sormenjälkialueelle suoritettu polynomiaalinen taustankorjaus.	30
19	Taustafunktion vaikutus pinta-alaan	31
20	Derivatiivinen Savitzky-Golay-filtteri ATR-korjatulle Mosaic-humalan spektrille.	32
21	D-limoneenin ja karyofylleenin puhtaat spektrit sekä ATR-FTIR-spektrometrilla mitatut ja taustakorjatut Mosaic-humalan ja limoneenin spektrit.	33
22	Taustafunktion sovitukseen käytettyjen spektripisteiden ja taustafunktion asteen vaikutus taustankorjaukseen	34
23	Taustafunktion asteen vaikutus taustankorjaukseen sormenjälkialueella . . .	35
24	Mosaic-humalan spektrioppiikkien analyysi	36
25	Mosaic-humalaa sisältävän oluen spektrioppiikkien analyysi.	38
26	Tilastollisen piikkianalyysin tulokset Mosaic-humalan sormenjälkialueelle.	39