

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство - некомерцијално¹.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



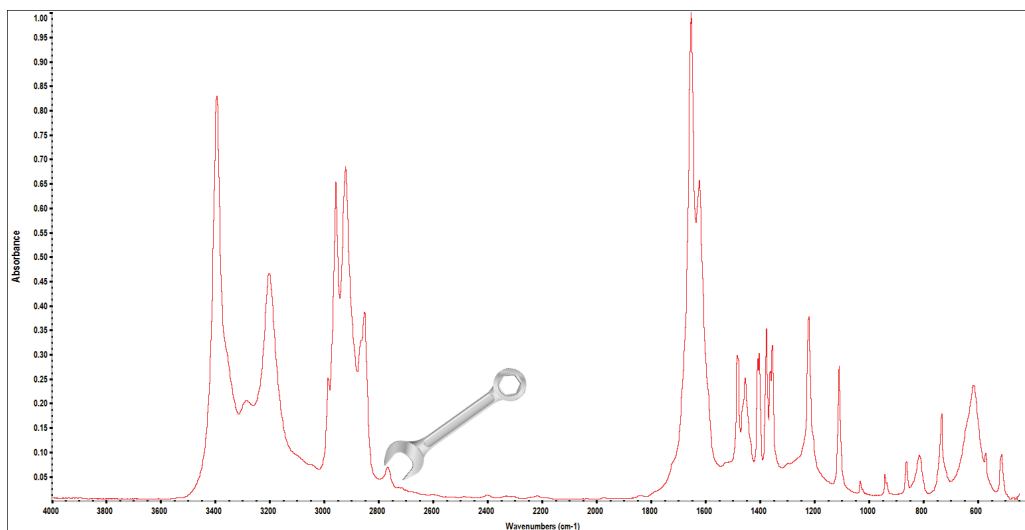
¹ Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси creativecommons.org.rs/?page_id=74.

"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."

"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU, BIOHEMIJU
I ZAŠTITU ŽIVOTNE SREDINE



INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

Branislav Jović

Novi Sad, 2021.

INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA

Branislav Jović

Izdavač
Univerzitet u Novom Sadu
Prirodno-matematički fakultet
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine
21000 Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3

Glavni i odgovorni urednik
Profesor dr Milica Pavkov Hrvojević
dekan Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu

Recenzenti
Dr Nemanja Banić, docent Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Dr Marko Panić, Naučni saradnik Instituta Biosens u Novom Sadu

Udžbenik je odobren za upotrebu na 35. sednici Nastavno-naučnog veća Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu održanoj 10.06.2021. godine (broj 0602-07-234/21-6).

CIP - Katalogizacija u publikaciji
Biblioteke Matice srpske, Novi Sad

543.422-74(075.8)

ЈОВИЋ, Бранислав, 1976-

Infracrvena spektroskopija [Elektronski izvor] / Branislav Jović. - Novi Sad : Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, 2021

Način pristupa (URL):

https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/jovic_infracrvena_sp_ektroskopija.pdf- Nasl. sa naslovnog ekrana. - Bibliografija.

Бранислав Јовић

а) Инфрацрвена спектроскопија

COBISS.SR-ID 42197001

Sva prava zadržana. Nije dozvoljeno da knjiga ili njeni delovi budu reprodukovani na bilo koji način bez dozvole izdavača ili autora.

ISBN: 978-86-7031-579-2

Tiraž: Digitalni udžbenik. Slog: Branislav Jović . Korice i obrada slika: Nada Popsavin.

Predgovor

Udžbenik Infracrvena spektroskopija namenjen je studentima na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Udžbenik u potpunosti pokriva gradivo predmeta *Primenjena infracrvena spektroskopija* koji studenti slušaju na prvoj godini master akademskih studija na studijskom programu diplomirani hemičar. Oblasti fizičke hemije, koje udžbenik obuhvata, neophodne su za usvajanje i razumevanje osnovnih koncepata vezanih za prirodu i karakteristike infracrvenog zračenja i njegove upotrebe u spektrohemijske svrhe. Knjiga je podeljena u osam poglavlja.

Knjiga predstavlja odraz dugogodišnjeg iskustva u teorijskoj i eksperimentalnoj nastavi iz molekulske spektroskopije na Katedri za fizičku hemiju Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine kako samog autora, tako i svih sadašnjih i bivših članova Katedre kojima autor duguju posebnu zahvalnost.

Autor je zahvalan recenzentima: Nemanji Baniću, docentu Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu kao i Marku Paniću Naučnom saradniku Instituta Biosens u Novom Sadu, na vrlo korisnim sugestijama i primedbama koje su značajno doprinele konačnom sadržaju i izgledu udžbenika.

Novi Sad, Jul 2021.

Autor

SADRŽAJ

Uvod	2
1. Teorijski osnovi infracrvene spektroskopije	4
2. Transmisija, apsorpcija i refleksija	13
3. Infracrveni spektrofotometar i obrada signala	20
4. Transmisione tehnike	35
5. Tehnika oslabljene totalne refleksije (ATR)	45
6. Tehnika FTIR difuzne refleksije (DRIFT)	48
7. Spektroskopija u bliskoj IR oblasti sa primenom hemometrike	51
8. Tabela karakterističnih traka funkcionalnih grupa	64

UVOD

Pojam infracrvenog zračenja se u najvećem broju slučajeva vezuje za pojam toplote. Proces koji prati oslobađanje topline vrlo često je praćen apsorpcijom infracrvenog zračenja. Veoma važno je praviti razliku između ova dva fenomena. Infracrveno zračenje može da se prostire kroz vakuum dok je toplota povezana sa kretanjem i kinetičkom energijom molekula i ne može se odvajati od pojma kretanja. Infracrvena spektroskopija proučava kako molekuli apsorbuju, reflektuju i propuštaju infracrveno zračenje i konvertuju ga u toplotu. Proučavanjem procesa apsorpcije moguće je dobiti značajne informacije o strukturi molekula. Infracrvena spektroskopija može da se posmatra kao „fotografisanje molekula“ iz kojeg može da se odredi parcijalna struktura molekula.

Da bi metode infracrvene spektroskopije bile uspešno primenjivane u bilo kojoj vrsti kvalitativne ili kvantitativne analize neophodno je poznavati osnovne teorijske postulate vezane za vibracije molekula kao i karakteristike zračenja u infracrvenoj oblasti.

U cilju što bolje interpretacije infracrvenih (Infrared, IR) spektara veoma je bitno što bolje upoznati model fizičkog procesa koji se odigrava pri interakciji zračenja sa molekulima. Fizički proces interakcije molekula sa zračenjem zahteva kvantno-mehanički pristup, odnosno matematičko razumevanje fenomena koji se dešavaju u diskretnim koracima. Kvantno-mehaničko objašnjenje interakcije zračenja sa molekulima je komplikovano, zahteva značajno poznavanje matematike i usvajanje dosta apstraktnih pojmova, te će u ovoj knjizi izlaganje u prvim poglavljima biti bazirano tj aproksimirano što je moguće više na klasičnoj fizici. Kada god bude potrebno (u prvim poglavljima) u ovoj knjizi će biti uvedena kvantno-mehanička objašnjenja i na način koji se na prvi pogled čini pojednostavljenim biće pokušano da se stvori što bolje objašnjenje infracrvene spektroskopije.

RAZVOJ INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE

Interakcija zračenja i materije predmet je interesovanja veoma dugo, još 130. godine nove ere *Ptolomej* izučava refrakciju svetlosti na različitim providnim materijalima, a 1305. godine *Fon Frajburg (T. Freiburg)* prvi simulira dugin spektar koristeći staklene sfere napunjene vodom. Sredinom osamnaestog veka, kroz radove velikih naučnika kao što su: *Snel, Hajgens i Njutn (W. Snell, C. Huygens, I. Newton)* formulisani su zakoni prelamanja i odbijanja zračenja, međutim za čitaoce ove knjige najvažnije je otkriće *ira Viliama Heršela (W. Herschel)*.

Heršchel je bio uspešan muzičar i astronom, godine 1800. napisao je dva značajna rada o toplotnom efektu sunčevog zračenja. U svojim eksperimentima *Herschel* je koristio veliku staklenu prizmu za disperziju sunčeve svetlosti. U pravcima dispergovane svetlosti postavljeni su termometri, temperatura je bila najviša u crvenom delu spektra, međutim ako se termometar postavi ispod crvene

boje gde nije postojala vidljiva svetlost, temperatura u termometru još više poraste. Ovaj novootkriveni fenomen Heršel je nazvao „zračeća toplota“ ili „termometrijski spektar“, pogrešno zaključivši da je u pitanju energija koja se razlikuje od svetlosti. Ovakav zaključak i ne čudi obzirom da tih godina još nije bio uspostavljen koncept elektromagnetnog spektra. Koristeći nove termoparove, Amper (*A.M. Amper*) 1835. godine dokazuje da ova energija ima iste osobine kao svetlost i naziva je „produženi spektar“.

Otkrićem da je fotografska ploča osetljiva na IR zračenje Abni i Festing (*W.W. Abney, E.R. Festing*) 1881. godine snimaju prvi IR spektar organskih supstanci, ovaj rad je od velikog značaja zbog interpretacije interakcije zračenja i materije.

Oduševljen radovima Abnija i Festing-a, Koblenc (*W. Coblentz*) konstruiše prvi spektrofotometar pomoću prizme od soli i termopara povezanog na galvanometar. Kompleksni mehanizam rotiranja prizme, i delova teleskopa omogućavao je da se snimi jedan spektar za jedan dan. Koblenc je u svojim radovima došao do veoma značajnih otkrića, otkrio je da dve različite komponente ne mogu imati isti spektar tj. da svako jedinjenje ima svoj spektroskopski „otisak prsta“, otkrio je takođe da jedinjenja koja sadrže -OH grupu (alkoholi i fenoli) apsorbuju na 2 μm . Na ovaj način Koblenc je hemičarima dao novo moćeno oružje za kvalitativu analizu i dobijanje strukturnih informacija.

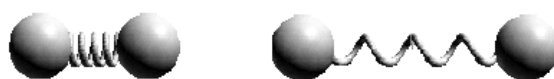
Tokom prvih godina 20. veka mnogi istraživači su proširivali spektroskopsku bazu podataka organskih jedinjenja, mada tih godina spektrometri još uvek nisu bili standardni deo laboratorijske opreme. U godinama koje su sledile, došlo je do novih značajnih eksperimenata: godine 1912. kvantitativno određivanje vlage u atmosferi, 1938. voda u želatinu, 1940. analize goriva, jestivih ulja i analiza debljine polimera.

Počevši od 1950. godine sa porstom zahteva za brze analize u raznim industrijama počeo je i razvoj instrumenta za IR spektroskopiju. Sedamdesetih i osamdesetih godina razvojem elektronike i mikroprocesora i IR spektroskopija je postajala moćnija tehnika. Moderna spektroskopija se bazira na upotrebi računara ne samo u smislu sakupljanja podataka nego i kalibracije i analize, u današnje vreme IR spektrofotometrija je nezaobilazan deo svake ozbiljne hemijske laboratorije.

1. TEORIJSKI OSNOVI INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE

1.1. Vibracije molekula i njihova interakcija sa energijom zračenja

Svaki molekul predstavlja dinamičan sistem u kojem atomi neprekidno vibriraju. Vibracije dvoatomskog molekula predstavljaju se kao prosto periodično jednodimenziono udaljavanje i približavanje jezgara od njihovog ravnotežnog položaja x_e duž linije veze. Slično istezanju i kompresiji elastične opruge ova vibracija sledi Hukov zakon (*R. Hooke*). Kod opisivanja molekulskih vibracija uvek se polazi od najjednostavnijeg slučaja, od dvoatomnog molekula harmonijskog oscilatora. Aproksimacija harmonijskog oscilatora ima smisla kada su amplitude vibracija molekula male. (slično rastezanju i savijanju elastične opruge).



Slika 1.1 Vibracija dvoatomskog molekula

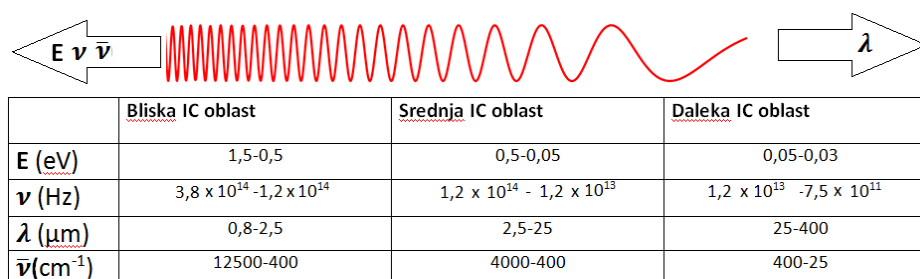
Primenom Huk-ovog zakona dobija se sledeći izraz za frekvenciju vibracije dvoatomnog molekula:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (1.1)$$

Gde je:

- μ -redukovana masa molekula (kg);
- k -konstanta sile koja opisuje jačinu date hemijske veze (J/cm).

Konstanta sile ima vrednost približno 500 J/cm za jednostruku hemijsku vezu, dva puta tj. tri puta višu vrednost za dvostruku odnosno trostruku vezu. Energije molekulskih vibracija su reda veličine od 5×10^{-22} do $2,5 \times 10^{-19}$ J tj. od 0,003 do 1,55 eV. U infracrvenoj spektroskopiji najčešće se koriste talasni brojevi u jedinicama cm^{-1} , takođe se vrlo često koriste i talasne dužine u mikrometrima (μm). Na slici 1.2 prikazan je opseg energija, frekvencija i talasnih dužina koji se koristi u infracrvenoj spektroskopiji.



Slika 1.2 Opseg energija, frekvencija i talasnih dužina u IR spektroskopiji

Apsorbujući energiju zračenja iz infracrvene oblasti, organski molekuli pretvaraju ovu energiju u vibracionu energiju molekula. Zakonima klasične fizike, prema kojima molekulski oscilator može imati bilo koju vrednost energije, ne mogu se objasniti principi apsorpcije energije molekulskog oscilatora. Za potpunije opisivanje principa interakcije molekulskog oscilatora i energije zračenja potreban je kvantno-mehanički pristup. Prema kvantno-mehaničkom objašnjenju principa infracrvene spektroskopije, apsorpcija IR zračenja je kvantizirana tj. dešava se u diskretnim nivoima. Molekulski oscilator može da absorbuje samo one frekvencije zračenja koje se poklapaju sa vibracionim frekvencijama unutar molekula. Kvantno-mehaničkim izračunavanjima definisani su uslovi pod kojima dolazi do interakcije infracrvenog zračenja i vibracija molekula, drugim rečima kvantna mehanika daje odgovore na pitanja zašto i kako nastaju nastaju infracrveni spektri i kakav je njihov izgled. Položaj i izgled traka je definisan energetskim vibracionim nivoima molekula, njihovom naseljenošću, temperaturom i drugim faktorima.

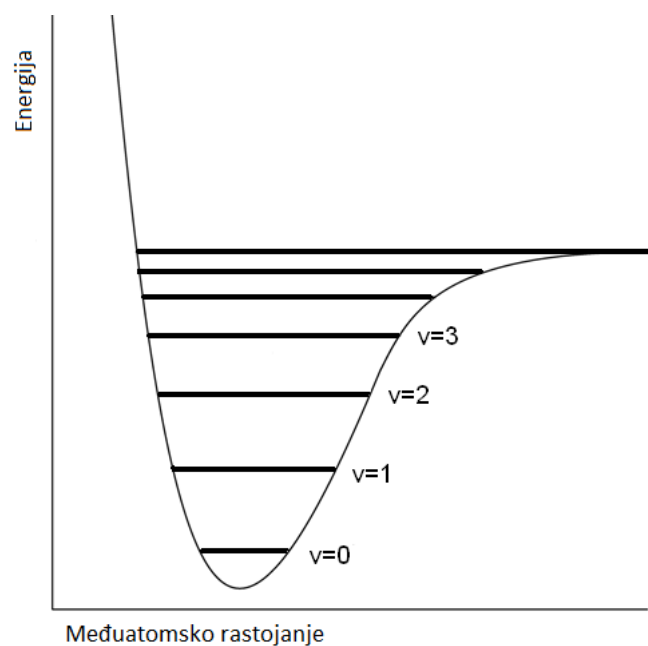
Kvantno-mehaničkim teorijskim razmatranjima definisani su sledeći principi infracrvene spektroskopije:

- Vibraciona energija molekula kao harmonijskog tj. u realnom slučaju anharmonijskog oscilatora za datu frekvenciju ν_0 može da ima samo određene diskretne vrednosti koje zavise od vibracionog kvantnog broja ν (slika 1.3). Na osnovu kvantno-mehaničkih izraza za energiju definišu se osnovne frekvencije tj. osnovne trake u infracrvenim spektrima.

$$E_\nu = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \quad \text{odnosno} \quad E_\nu = h \nu_0 \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \quad (1.2)$$

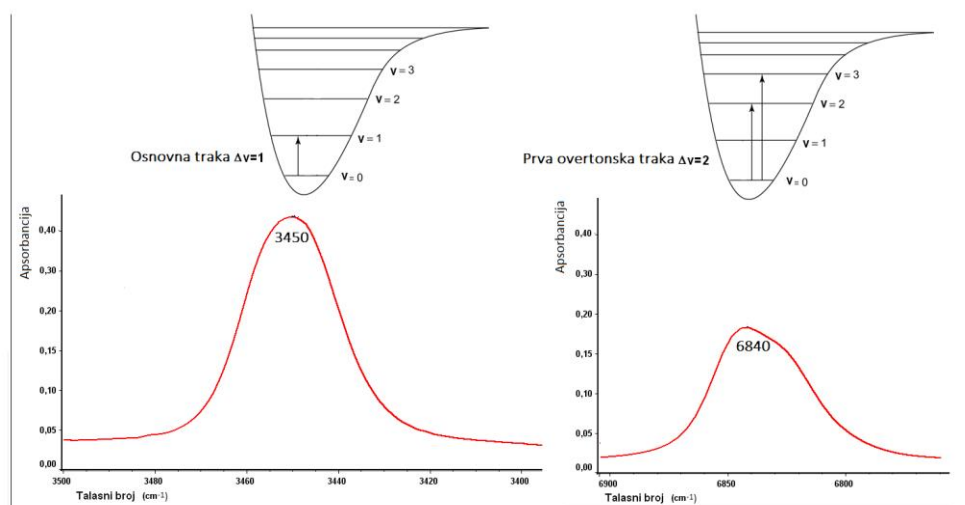
Gde je:

- h -Planckova konstanta ($6,626 \times 10^{-34}$ J/Hz);
- μ -redukovana masa molekula(kg);
- k -konstanta sile (J/cm);
- ν - vibracioni kvantni broj ()



Slika 1.3 Diskretne vrednosti energija molekularnih vibracija

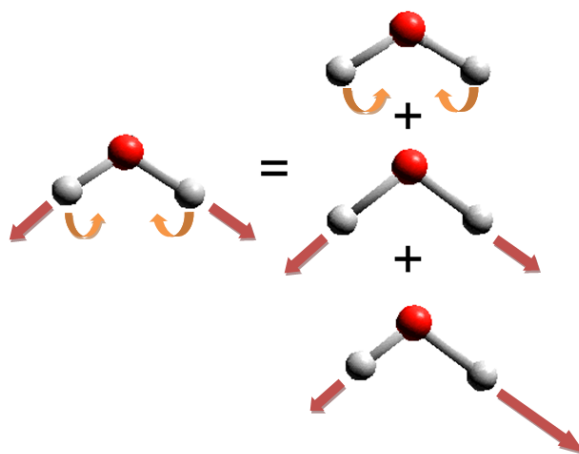
- Prvi uslov za nastanak infracrvenog spektra nekog molekula je da molekul poseduje dipolni momenat. Samo one vibracije koje dovode do promene dipolnog momenta molekula će dati trake u infracrvenim spektrima.
- Najverovatnija razmena energije (pobuđivanje vibracionih nivoa infracrvenim zračenjem) dešava se između susednih vibracionih nivoa, najčešće između nultog i prvog osnovnog vibracionog nivoa, ovi prelazi daju najintenzivnije trake u infracrvenim spektrima, takozvane osnovne trake. Osnovne trake se nalaze u srednjoj infracrvenoj oblasti od 400 do 4000 cm^{-1} .
- Ukoliko dolazi do vibracionih prelaza između nesusednih nivoa tj. između nultog i viših nivoa definisanih vibracionim kvantnim brojevima 2, 3... nastaju overtone trake (slika 1.4) koje su po intenzitetu duplo ili troduplo slabije od osnovnih i ove trake se pojavljuju u bliskoj infracrvenoj oblasti od 4000 do 12000 cm^{-1} .



Slika 1.4 Šema nastajanja osnovnih i overtonskih traka u infracrvenim spektrima

1.2. Vibracioni spektri višeatomskih molekula

Vibracije višeatomskih molekula predstavljaju složeno kretanje. Samim tim vibriranje višeatomskih molekula može se shvatiti kao zbir ograničenog broja linearnih vibracija (slika 1.5) koje se nazivaju **osnovne ili normalne vibracije**



Slika 1.5 Osnovne, normalne vibracije višeatomskih molekula

Pri svakoj normalnoj vibraciji svi atomi vibriraju oko svog ravnotežnog položaja istom frekvencijom i fazom. Broj normalnih vibracija zavisice od broja atoma koji grade molekul. Ako molekul sadrži N atoma, ukupan broj stepeni

slobode za tri oblika molekulskih kretanja (translaciju, rotaciju vibraciju) iznosi $3N$. Od toga tri stepena slobode pripadaju translaciji molekula (po x, y i z osi). Nelinearni molekuli imaju tri stepena slobode za rotaciju oko tri međusobno normalne ose rotacije, a linearni molekuli samo dva jer je moment inercije oko ose molekula jednak nuli. Prema tome broj vibracionih stepeni slobode kod višeatomskog molekula iznosi:

- a) $3N-6$ za nelinearne molekule i
- b) $3N-5$ za linearne molekule.

Vibracije se označavaju sa ν_n i svakoj osnovnoj vibraciji odgovara određena osnovna frekvencija koja zavisi od redukovane mase i jačine hemijske veze. Tako da postoji ukupno $3N-6$ odnosno $3N-5$ različitih osnovnih frekvencija a samim tim i traka u infracrvenom spektru.

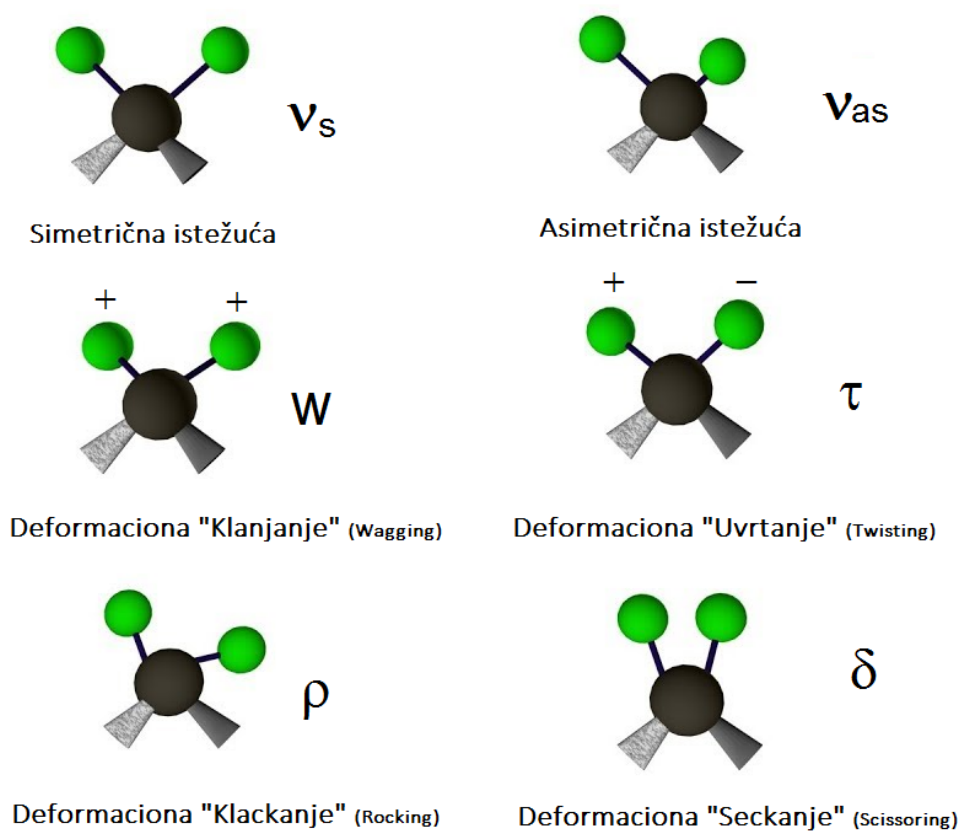
1.3. Vrste normalnih vibracija

U zavisnosti od toga da li se pri vibraciji menja dužina veza ili se menjaju uglovi između veza normalne vibracije se mogu podeliti na **valentne i deformacione**.

- Valentne ili valencione vibracije predstavljaju periodično približavanje i udaljavanje atoma duž linije veze pri čemu ugao između veza ostaje nepromenjen. Postoje simetrične i asimetrične valencione vibracije. Asimetrične valencione vibracije se javljaju na višim frekvencijama nego simetrične. Valentne vibracije se vrlo često nazivaju i istežuće tj. istežne vibracije. Valencione vibracije se obeležavaju sa grčkim simbolom ν . Simetrične vibracije se obeležavaju kao ν_s a asimetrične kao ν_{as} .
- Deformacione vibracije predstavljaju periodičnu promenu ugla među linijama veza pri čemu rastojanje između atoma ostaje nepromenjeno. Postoji četiri tipa deformacionih vibracija koje se dele na deformacione vibracije u ravni i van ravni.
 - Seckanje (*Scissoring*); Periodično približavanje i udaljavanje u ravni dva međusobno nevezana atoma.
 - Savijanje ili klackanje (*Rocking*); Zajedničko pomeranje u ravni za dva nevezana atoma pri čemu ugao između veza ostaje nepromenjen.
 - Klanjanje (*Wagging*); Pomeranje strukturne jedinice napred i nazad u odnosu na ravnotežnu ravan.

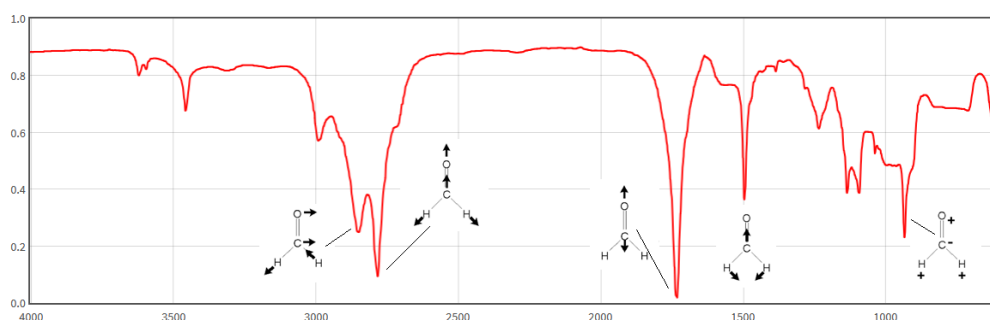
- Uvrtanje (*Twisting*) Vibracija dva atoma van ravnotežne ravni pri čemu se jedan kreće unapred a drugi unazad.

Deformacione vibracije se javljaju uvek na nižim frekvencijama (talasnim brojevima) nego valentne vibracije jer je za njihovo pobuđivanje potrebna niža energija. Uobičajeno je da se deformacione oscilacije u ravni označavaju sa δ a oscilacije van ravni sa γ .



Slika 1.6 Tipovi molekularnih vibracija: vibracije CH_2 i CH_3 grupa

Vibracije višeatomskog molekula se obeležavaju sa ν_n prema sledećem pravilu obeležavanja: prvo se obeležava simetrična vibracija sa višom frekvencijom ν_1 , zatim simetrična sa nižom frekvencijom ν_2 , zatim asimetrične sa višom frekvencijom ν_3 i tako dalje. Primer normalne oscilacije molekula formaldehida dat je na slici 1.7.



Slika 1.7 Osnovne vibracije i infracrveni spektar molekula formaldehida

1.4. Kombinacione trake, Fermijeva rezonanca, i skeletne vibracije

U infracrvenim spektrima pojavljuje se više traka u odnosu na teorijski određen broj vibracionih stepeni slobode ($3N-6$). Trake ovog tipa su veoma često bitne kod kvalitativne analize jer su karakteristične za određene molekule i kristalne strukture.

- Trake koje odgovaraju kombinaciji dva vibraciona prelaza, od kojih svaki pripada drugoj normalnoj vibraciji nazivaju se **kombinacione trake**, a postoje kao zbirne i diferencijalne kombinacione trake. Zbirne nastaju sabiranjem dva vibraciona prelaza, a diferencijalne oduzimanjem. Kombinacione trake su slabijeg intenziteta od osnovnih. Primer kombinacionih traka molekula SO_2 dat je u tabeli 1.1
- Kao posledica interakcije vibracionih nivoa bliskih energija (Fermijeva rezonanca) u infracrvenim spektrima se javljaju i takozvani **Fermijevi dubleti** koje karakteriše specifičan odnos intenziteta.

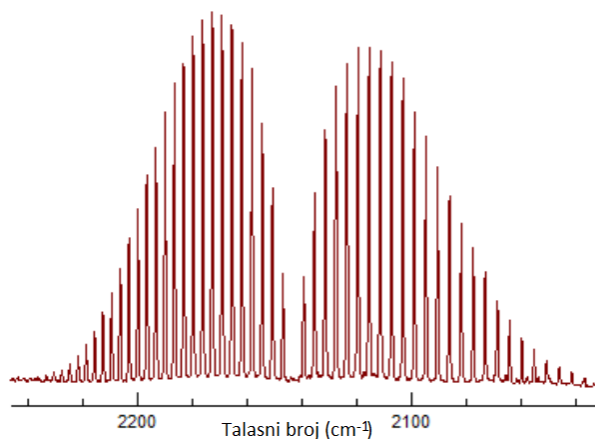
Vibracije pri kojima grupa atoma vibrira približno istim amplitudama nazivaju se **skeletne vibracije** i karakteristične su za linearne računice i prstenaste strukture koje formiraju atomi približno istih masa. Ovakve grupne atomske strukture imaju više različitih vibracija i prema tome više karakterističnih traka koje se javljaju u opsegu talasnih brojeva od približno $1400 - 700 \text{ cm}^{-1}$ i njihov izgled je prilično složen i u visokom stepenu tipičan za određenu strukturu molekula kao celine tako da se po njihovom prisustvu molekul može identifikovati. Ove trake se nazivaju “**otisak prsta molekula**” a oblast u kojoj se javljaju oblast otiska prsta ili “*Fingerprint region*”.

Tabela 1.1 Osnovne i kombinacione trake SO_2

Vibracija	Frekvencija (Cm^{-1})	Relativni intenzitet
ν_1	1151	565
ν_2	517	455
ν_3	1361	1000
$\nu_1 + \nu_3$	2499	20
$\nu_2 + \nu_3$	1875	6
$\nu_3 - \nu_2$	844	0,55

1.5. Uticaj agregatnog stanja molekula na karakteristike apsorpcionih traka

Infracrveni spektri molekula u gasovitoj fazi daju rotaciono vibracione spektre. U gasovitom stanju molekul poseduje slobodnu rotaciju koju je moguće pobuditi energijom infracrvenog zračenja. Vibracioni prelazi su kod molekula u gasovitoj fazi praćeni sa prelazima između rotacionih nivoa dva vibraciona stanja. Vibraciono rotacioni spektri imaju karakterističan izgled koji je prikazan na slici 1.8. Snimanjem infracrvenih spektara jednostavnijih molekula u gasovitom stanju moguće je odrediti međuatomska rastojanja.

**Slika 1.8** Izgled vibraciono rotacionog spektra HCl

Kod molekula u čvrstom i tečnom agregatnom tj. u kondenzovnom stanju slobodna rotacija je delimično ili potpuno onemogućena tako da nemaju jasno definisane rotacione nivoe. Infracrveni spektri snimljeni u tečnom i čvrstom agregatnom stanju imaju mnogo širu primenu od spektara gasovitih supstanci. Zbog jakih međumolekulskih interakcija i manjeg međumolekulskog rastojanja, trake u infracrvenim spektrima tečnosti i čvrstih supstanci se javljaju na nižim

frekvencijama. Ako se jedno isto jedinjenje snimi u sva tri agregatna stanja frekvencija njegove trake će biti pomerena po sledećem redosledu:

$$V_{\text{gasovito}} > V_{\text{tecno}} > V_{\text{čvrsto}}$$

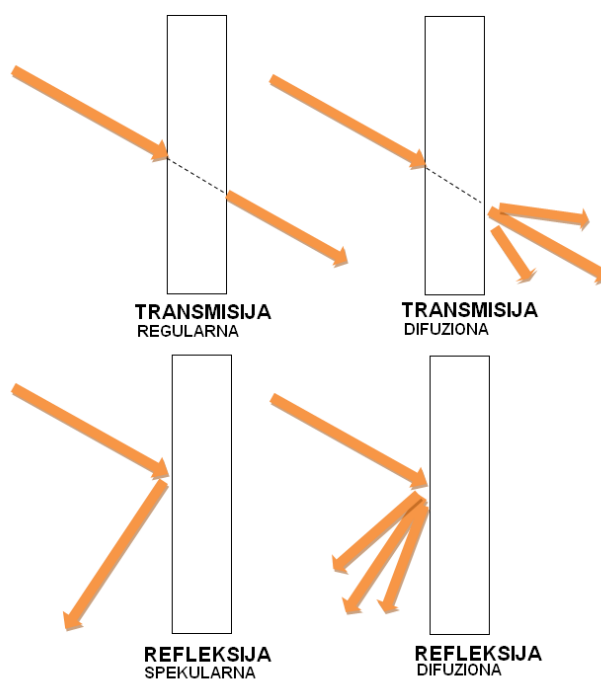
Mnoge trake se javljaju u istim opsezima talasnih brojeva tako da je teško utvrditi od koje funkcionalne grupe potiču. Za identifikaciju traka, odnosno funkcionalnih grupa, pored položaja od značaja je i oblik trake. Ova činjenica je veoma bitna kod primene infracrvene spektroskopije u kvalitativnoj analizi. Oblici traka u infracrvenoj spektroskopiji se obeležavaju na sledeći način:

- Veoma jaka i oštra traka – *very strong* (*vs*)
- Jaka traka – *strong* (*s*)
- Srednja traka – *medium* (*m*)
- Slaba traka – *weak* (*w*)

2. TRANSMISIJA, APSORPCIJA I REFLEKSIJA

Generalno se osnovne metode infracrvene spektroskopije mogu podeliti na transmisione i refleksione. Da bi se bolje razumele i uspešnije primenjivale metode infracrvene spektroskopije neophodno je prethodno definisati i objasniti pojave transmisije, refleksije i apsorpcije.

Transmisija zračenja predstavlja pojavu pri kojoj elektromagnetno zračenje prolazi kroz neku optički aktivnu sredinu. Refleksija zračenja predstavlja pojavu pri kojoj se elektromagnetno zračenje odbija na granici između dve optički aktivne sredine (površinska refleksija) ili unutar jedne iste sredine (zapreminska refleksija). Navedene pojave može da prati i pojava skretanja zračenja u više pravaca, ova pojava se naziva difuzija ili rasejanje zračenja. Kada ne dolazi do difuzije zračenja tada se kretanje zraka opisuje jednostavnim zakonima geometrijske optike i tada se govori o regularnoj ili spekularnoj refleksiji i transmisiji (slika 2.1). Zakoni po kojima se zračenje reflektuje i transmituje predmet su ispitivanja osnovnih kurseva fizike i geometrijske optike. Refleksija, transmisija i difuzija zračenja, ostavljaju energiju tj. frekvenciju zraka nepromenjenom. Za primenu infracrvene spektroskopije bitno je poznavati međuzavisnost između pojava refleksije i transmisije sa jedne strane i apsorpcije sa druge.

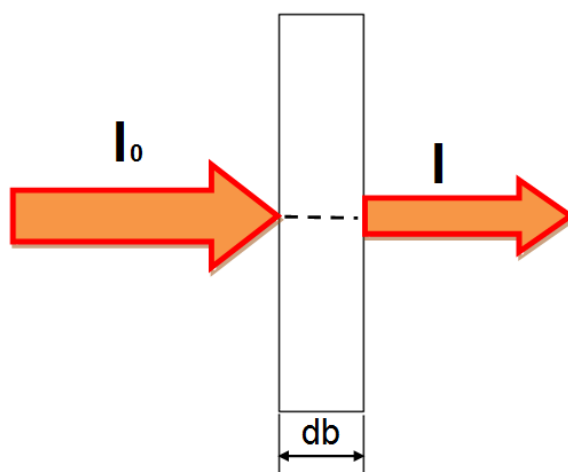


Slika 2.1 Transmisija i refleksija zračenja (shematski prikaz)

Bitno je naglasiti da sve tri pojave: transmisija, refleksija i apsorpcija zavise od talasne dužine zračenja i stoga se pri kvantifikaciji ovih pojava mora naglasiti da li se radi o monohromatskom ili polihromatskom zračenju.

Pored definisanja zakona apsorpcije bitno je naglasiti da reč apsorpcija potiče iz latinskog jezika i predstavlja „upijanje“ ili „primanje“ unutar nekog sistema. Termin apsorpcija ne treba zamenjivati sa drugim terminima (sorpcija, adsorbicija, apsorbancija) koji se koriste u nauci i imaju slično ali ne i isto značenje. Jedna od definicija opisuje apsorpciju zračenja kao pojavu pri kojoj se energija zračenja pri interakciji sa materijom transformiše („materija upija energiju zračenja“) u neki drugi vid energije najčešće toplotu. Apsorbovano zračenje dovodi do energetskih promena u atomima, molekulima i jonima ispitivane supstance. Apsorpcija infracrvenog zračenja pobuđuje molekulske vibracije, kako je to opisano u prvom poglavlju. Zakon koji opisuje apsorpciju zračenja naziva se *Lambert-Beer-ov zakon*.

Ukoliko monohromatski zrak intenziteta I prolazi kroz sloj supstance debljine db , smanjenje intenziteta zračenja zavisice od inteziteta zračenja i debljine sloja tj. dužine optičkog puta (slika 2.2).



Slika 2.2 Smanjanje intenziteta monohromatskog zraka prolaskom kroz materijal

$$-dI = kI db \quad (2.1)$$

k predstavlja koeficijent apsorpcije koji zavisi od talasne dužine i temperature. Ako se jednačina integrali definišući granice integrala, uzimajući u obzir da je pri debljini sloja $b=0$ intenzitet propuštenog jednak intenzitetu upadnog zračenja $I = I_0$ dobija se:

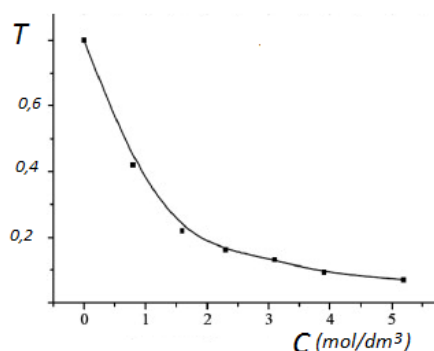
$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -\int_0^b k db \quad (2.2)$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -kb \quad (2.3)$$

Koeficijent apsorpcije k se može predstaviti kao proizvod ekstinkcionog koeficijenta ε i koncentracije apsorbujućih vrsta u materijalu c , tako da gornju jednačinu možemo da transformišemo u sledeći izraz:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-\varepsilon cb} \quad (2.4)$$

Količnik intenziteta propuštenog i upadnog zračenja se naziva transmitancija ili u nekim slučajevima transparentnost („propustljivost“) T i na osnovu gornje jednačine može se zaključiti da će propustljivost zračenja biti manja ukoliko je viša koncentracija apsorbujućih vrsta c i ukoliko je njihova sposobnost da apsorbuju energiju zračenja ε veća. Matematički rečeno transmitancija eksponencijalno opada sa koncentracijom (slika 2.3). Transmitancija kao količnik intenziteta propuštenog i upadnog zračenja može da ima vrednosti od 0 ($I=0$ ništa od zračenja nije propušteno) do 1 ($I=I_0$ svo upadno zračenje je propušteno), u procentima to su vrednosti od 0 do 100%.



Slika 2.3 Grafik zavisnosti transmitancije od koncentracije

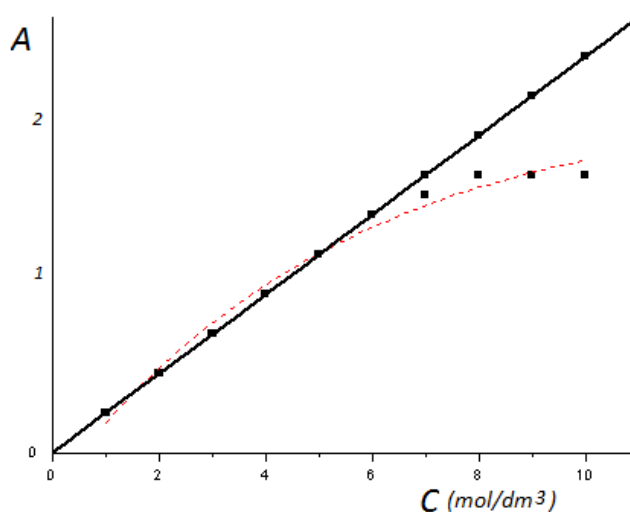
Ako se jednačina (2.4) transformiše logaritmovanjem, uvodi se nova veličina apsorbanacija. Ovim je definisan *Lambert-Beer-ov zakon*.

$$-\ln \frac{I}{I_0} = \ln \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon cb \quad \text{ili} \quad -\log \frac{I}{I_0} = \log \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon cb \quad (2.5)$$

Negativan logaritam količnika intenziteta upadnog i propuštenog zračenja se naziva apsorbanacija i na osnovu gornje jednačine može se zaključiti da će apsorpcija zračenja biti veća ukoliko je viša koncentracija apsorbujućih vrsta c i ukoliko je njihova sposobnost da apsorbuju energiju zračenja ε veća. Drugim

rečima apsorpcija linearno raste sa koncentracijom. Bitno je naglasiti da u slučaju definisanja apsorpcije dekadnim logaritmom ekstinkcioni koeficijent se množi faktorom 0,4343 ($10^{0,4343} = e$).

Lambert-Beer-ov zakon predstavlja osnovni zakon u spektrometrijskoj kvantitativnoj analizi i jedan je od najznačajnijih zakona u hemijskoj analizi uopšte. Na osnovu linearne zavisnosti apsorpcije od koncentracije, konstruišu se kalibracioni dijagrami (slika 2.4) za određivanja koncentracija različitih supstanci ne samo u infracrvenoj nego i u drugim oblastima elektromagnetnog spektra.



Slika 2.4 Zavisnost apsorpcije od koncentracije prema Lambert-Beer-ovom zakonu

Lambert-Beer-ov zakon važi samo pod sledećim uslovima:

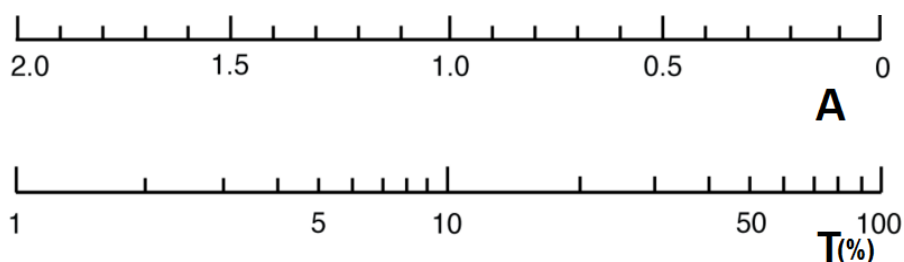
- Ako je upadno zračenje monohromatsko i pada paralelno na površinu apsorbujuće supstance;
- Ako apsorbujuća materija nije homogena;
- Ako se zanemare jake međumolekulske interakcije u koncentrovanim rastvorima.

U literaturi se za ekstinkcioni koeficijent ϵ veoma često mogu naći nazivi kao: molarna apsorptivnost, apsorbcioni koeficijent, linearni molarni apsorbcioni koeficijent ili apsorptivnost). Najpravilnije bi bilo koristiti termin linearni molarni apsorbcioni koeficijent zbog toga što je *Lambert-Beer-ov zakon* definisan za monohromatsko zračenje. Ekstinkcioni koeficijent se u infracrvenoj spektroskopiji izražava u jedinicama $\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$ i u infracrvenoj spektroskopiji njegove vrednosti se kreću od 10^3 za slabe do 10^6 za jake trake. Ekstinkcioni koeficijent zavisi od talasne dužine zračenja i ako se definiše za više talasnih dužina tada se naziva integralni molarni apsorbcioni koeficijent. Poznavanje zavisnosti ekstinkcionog koeficijenta od talasne dužine veoma bitno kod primene infracrvene spektroskopije u fundamentalnim istraživanjima i u hemometriji.

Radi lakše interpretacije infracrvenih spektara bitno je poznavati skale transmitancije i apsorpcije kao i njihov međusobni odnos. Skala transmitancije je linearna dok je skala apsorpcije logaritamska (slika 2.5) a transmitancija i apsorpcija stoje u sledećem odnosu.

$$A = -\log \frac{\%T}{100} \quad (2.6)$$

Na osnovu gornje jednačine može se lako dokazati da je apsorpcija jednaka nuli u slučaju kada je transmitancija jednaka 100%. U vezi sa apsorpcijom bitno je poznavati sledeće:



Slika 2.5 Odnos skala apsorpcije i transmitancije

- Apсорpcija je aditivna veličina, što znači da u sistemu koji sadrži više komponenti, koje apsorbuju elektromagnetno zračenje date talasne dužine, a koje međusobno ne reaguju, apсорpcija sistema jednaka je zbiru apсорpcija pojedinačnih komponenti

$$A_{ukupna} = \sum_{i=1}^n A_1 + A_2 + \dots + A_n \quad (2.7)$$

Aditivnost apсорpcije je veoma važna osobina koja omogućava raznovrsna kvantitativna određivanja.

- Grafički prikaz zavisnosti apсорpcije od talasne dužine zračenja (ili frekvencije) za konstantnu debljinu sloja, koncentraciju i temperaturu naziva se apсорpcioni IR spektar supstance
- U infracrvenim spektrima apсорpcione trake koje imaju vrednost apсорpcije višu od 2 zovu se totalno apсорbujuće trake i ne uzimaju se za analizu. Ukoliko se u spektru jave totalno apсорbujuće trake, uzorak je potrebno razblažiti ili mu smanjiti debljinu.

Fenomen refleksije zračenja osnova je primene dve veoma moderne i korisne tehnike infracrvene spektroskopije a to su: tehnika oslabljene totalne refleksije (Attenuated total reflection, ATR) i tehnika difuzione refleksije (Diffuse reflectance, DR). Da bi ove tehnike bile uspešno primenjivane neophodno je poznavati pojam refleksivnosti tj. reflektancije R i takođe poznavati odnos reflektancije i apсорpcije. Reflektancija ili kako se najčešće koristi procenat

reflektancije u najširem smislu predstavlja odnos intenziteta reflektovanog zračenja od strane uzorka i intenziteta upadnog zračenja .

$$R = \frac{I_s}{I_b} \quad \% R = \frac{I_s}{I_b} \times 100 \quad (2.8)$$

Gde I_s predstavlja intenzitet zračenja reflektovanog od strane uzorka, dok I_0 predstavlja intenzitet upadnog zračenja. Sa pojmom reflektanse treba biti oprezan, jer pojavu refleksije veoma često prati i pojava apsorpcije zračenja. Prema *Frensel*-ovoj jednačini reflektansa zraka koji pod pravim uglom dospeva na ravnu površinu je data jednačinom 2.9.

$$R = \frac{[(n^2 - 1) + K^2]}{[(n^2 + 1) + K^2]} \quad (2.9)$$

Gde n predstavlja indeks refrakcije supstance a K predstavlja konstantu koja povezuje ekstinkcioni koeficijent ϵ i talasnu dužinu λ (jednačina 2.10)

$$K = \frac{\epsilon \lambda}{4} \quad (2.10)$$

Ukoliko zračenje dospeva pri uglu koji je različit od normalnog, izraz za reflektansu predstavlja kompleksnu trigonometrijsku funkciju koja u obzir uzima i rasipanje zračenja. S obzirom da reflektansa predstavlja kompleksan pojam koji uključuje indeks refrakcije, ekstinkcioni koeficijent, talasnu dužinu i rasipanje zračenja, kod primene refleksionih tehnika veoma je bitno poznavanje ovih parametara. Da bi primena refleksionih tehnika bila moguća u kvantitativnoj analizi potrebno je da postoji linearna zavisnost između reflektanse i koncentracije, analogno odnosu apsorpcije i koncentracije u *Lambert-Beer*-ovom zakonu. U novijim komercijalnim softverima za obradu infracrvenih spektara često se koristi jednačina 2.11.:

$$A \approx \log \frac{1}{R} \quad (2.11)$$

Na osnovu gornjeg izraza moglo bi se zaključiti da je zavisnost reflektancije i koncentracije linearna, međutim to nije slučaj zbog uticaja rasipanja zračenja na različitim talasnim dužinama. U svrhe kvantitativne analize bolje je koristiti takozvane *Kubelka-Munk* jedinice. Korišćenjem *Kubelka-Munk* jedinica eliminišu se negativni efekti uticaji rasipanja na linearnost između reflektance i koncentracije i povećava se tačnost kvantitativnih određivanja. *Kubelka-Munk* vrednost za određenu frekvenciju se definiše jednačinom 2.12.

$$KM = \frac{(1-R)^2}{2R} = 2,303 \epsilon \frac{c}{s} \quad (2.12)$$

Gde s predstavlja koeficijent rasipanja zračenja, ukoliko je njegova vrednost konstantna za određeni interval talasnih dužina, primena *Kubelka Munk* jedinica je utoliko bolja a kvantitativna određivanja preciznija.

U tehnikama difuzione i totalno oslabljene refleksije, reflektancija R se definiše kao odnos reflektivnosti uzorka i referentnog materijala o čemu će biti reči u narednim poglavljima.

3. INFRA CRVENI SPEKTROMETAR I OBRADA SIGNALA

Prvobitni infra-crveni spektrometri bili su disperzionog tipa, takozvani disperzioni spektrometri. Ovakvi instrumenti su razlagali pojedinačne frekvencije emitovane od strane izvora svetlosti. Razlaganje tj izdvajanje pojedinačnih frekvencija moguće je upotrebom disperzionog elementa tj prizme. Infracrvena prizma razdvaja na pojedinačne frekvencije polihromatsku svetlost na principu različitog prelamanja svetlosti u zavisnosti od talasne dužine. Dalje, kod disperzionih spektrometara razdvojene pojedinačne monohromatske komponente prolaze kroz uzorak i dolaze do detektora koji meri energiju prispelog zračenja. Kao rezultat merenja na ovakvim spektrometrima dobija se infracrveni spektrometar koji predstavlja zavisnost intenziteta prispele svetlosti od frekvencije.

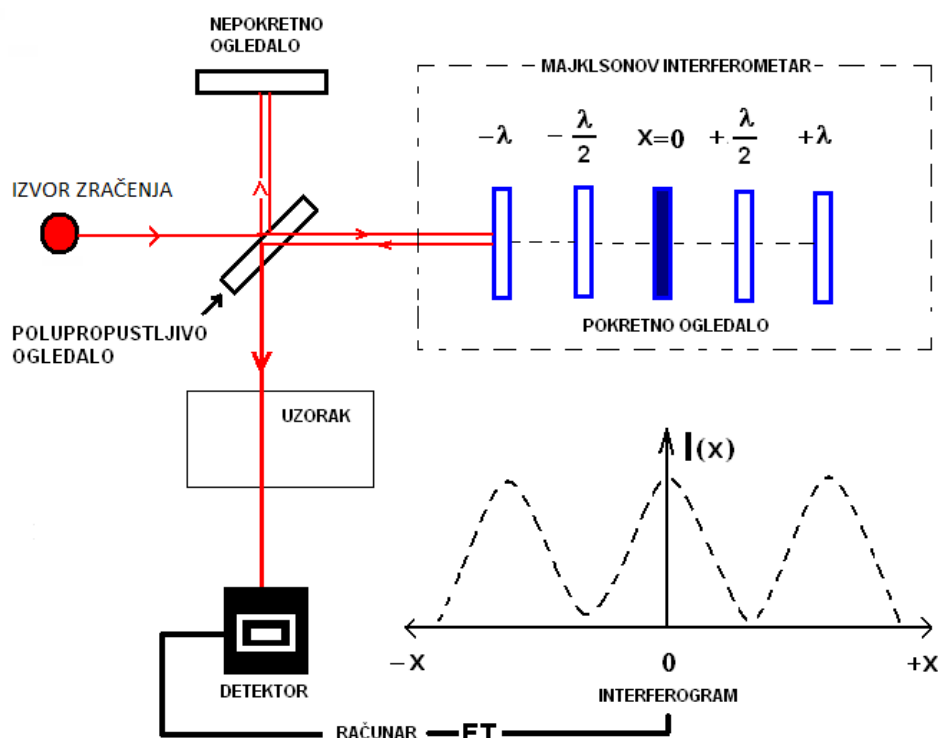
U novije vreme disperzioni infracrveni spektrometri su skoro potpuno izbačeni iz upotrebe i zamenjeni novim tipom infra crvenih spektrometara. Moderni infra crveni spektrometri koji predstavljaju nezaobilazan deo svake kvalitetnije istraživačke ili kontrolne laboratorije su infra crveni spektrometri sa Furijeovom transformacijom (Fourier Transform InfraRed – **FTIR**). U narednom poglavlju dat je opis principa rada kao i opis karakteristike osnovnih delova FTIR spektrometara. Osnovne prednosti korišćenja FTIR spektrometara nad disperzionim su sledeće:

- Velika brzina snimanja spektara - kod disperzionih spektrometara snimanje spektra traje od 5 do 10 minuta dok kod infra crvenih FTIR spektara je za snimanje potrebno nekoliko desetina sekundi.
- Viša osetljivost - energija zračenja koja dospeva na detektor kod FTIR spektrometara znatno je veća nego kod disperzionih a samim tim osetljivost je viša i granice detekcije su niže.
- Visoka moć razlaganja (bolja rezolucija) – kod FT spektrometara moguće je postići odlično razlaganje i spektralnu rezoluciju do 0.005 cm^{-1}
- Bolji odnos snage signala i snagešuma (odnos signal-šum) - FT spektrometri u odnosu na disperzione imaju mnogo bolji odnos odnos signal-šum toj jest mnogo bolje razdvajaju korisne od nekorisnih informacija dobijenih u spektru.

Pojmovi osetljivosti, rezolucije i odnosa signal-šum biće detaljnije objašnjeni u narednim poglavljima.

3.1.Princip rada FTIR spektrofotometra

Kod FT IR spektrometara, kao i kod disperzionih spektrometara uzorak se ozračuje polihromatskom svetlošću, međutim ne vrši se razlaganje svetlosti te nema potrebe ni za monohromatorom tj prizmom. Najbitniji deo FT infracrvenog spektrometra je Majklsonov interferometar, koji je razvijen još u 19. veku, ali je svoju punu primenu pronašao baš u FT-IR spektrometrima. Na slici 3.1 data je shema FT-IR spektrometra.



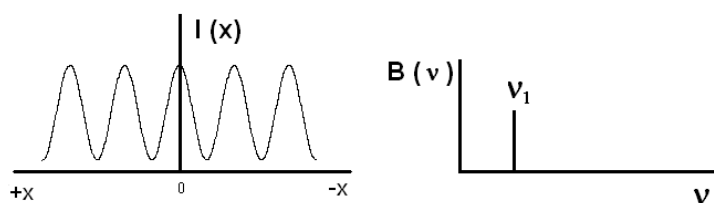
Slika 3.1 Shema FT-IR spektrometra

Izvor svetlosti emituje polihromatsku svetlost koja dolazi do polupropustljivog ogledala (razdeljivač zraka-„beamspliter“), koje polovinu zračenja propušta ka pokretnom ogledalu a drugu polovinu reflektuje na nepokretno ogledalo. Oba zraka reflektuju se od ogledala i vraćaju na polupropustljivo ogledalo, gde se usmeravaju ka detektoru. Pri tome dolazi do njihove interferencije, zavisno od toga koliki su put pre toga prešli, odnosno zavisno od položaja pokretnog ogledala. Ako sa x označimo pomeranje pokretnog ogledala, imaćemo promenu intenziteta signala u detektoru, $I(x)$, u funkciji pomeranja ogledala ili retardacije kao što je prikazano na slici 3.2. Ovo razmatranje važi za monohromatsko zračenje koje dospeva iz izvora. Može se uočiti da ako je x jednako celobrojnim umnošcima talasne dučine zračenja ($x = n\lambda$, $n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$), dolazi do konstruktivne interferencije tj detektor će registrovati maksimalan signal, dok za $x = (n+1/2)\lambda$ dolazi do uzajamnog poništenja talasa tj destruktivne interferencije, te se na detektoru ne registruje signal.

Matematički izražena ova periodična promena koja se registruje na detektoru $I(x)$ u funkciji x ima sledeći oblik:

$$I(x) = B(\nu) \cos(2\pi x \nu) \quad (3.1)$$

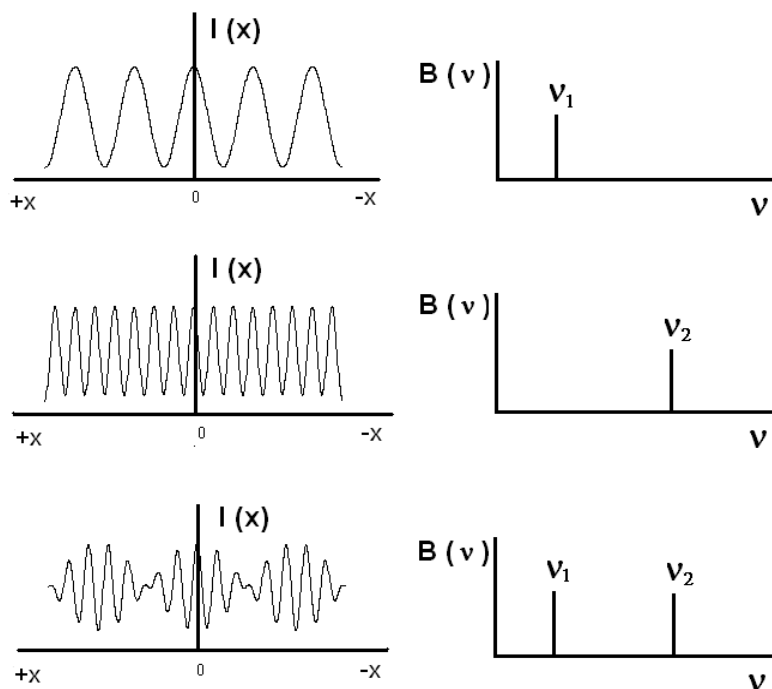
gde je ν frekvencija zračenja a $B(\nu)$ intenzitet emitovanog zračenja u funkciji frekvencije



Slika 3.2 Levo: Promena signala $I(x)$ na detektoru (interferograma) u slučaju monohromatske svetlosti zavisno od pomereja x , Desno: Intenzitet emitovanog zračenja B na frekvenciji ν_1

Ako svetlosni izvor umesto jedne emituje dve frekvencije (slika 3.3) tada će se na poluogledalu susretati dva kosinusna talasa, pa će rezultujući interferogram biti:

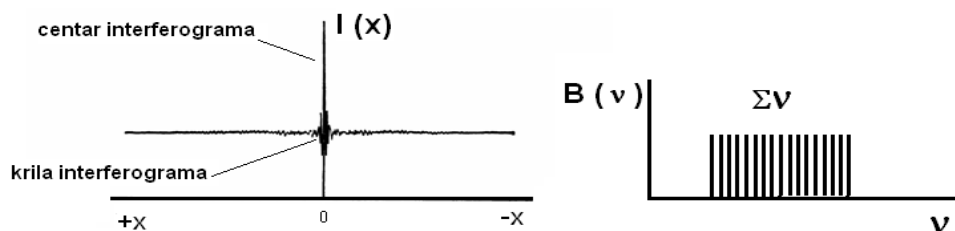
$$I(x) = B(\nu_1)\cos(2\pi x \nu_1) + B(\nu_2)\cos(2\pi x \nu_2) \quad (3.2)$$



Slika 3.3 Promena signala na detektoru (interferograma) u slučaju emitovanja jedne ili dve monohromatske frekvencije sa izvora

Međutim, izvori infracrvenog zračenja emituju gotovo kontinualno u širem opsegu frekvencija, te umesto sume možemo pisati integral:

$$I(x) = \int_0^{\infty} B(\nu)\cos(2\pi x \nu)d\nu \quad (3.3)$$

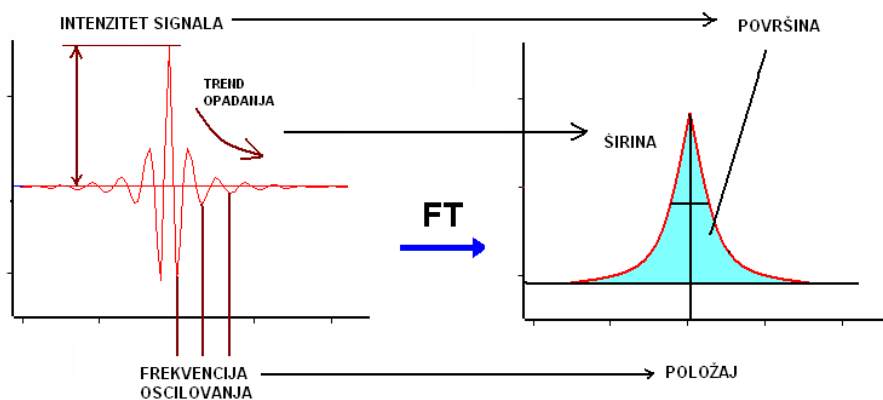


Slika 3.4 Izgled interferograma u slučaju emitovanja polihromatskog zračenja sa izvora

Na slici 3.3 se može uočiti da detektor registruje maksimalan signal pri optičkoj retardaciji $x=0$ kada su svi emitovani talasi od strane izvora u istoj fazi, ovaj deo interferograma se naziva centar interferograma. Pomeranjem ogledala iz položaja $x=0$ u oba smera prouzrokuje opadanje intenziteta signala interferograma. Spektroskopski značajne informacije dobijaju se iz centra i krila interferograma primenom Furijeove transformacije (FT) nad signalom interferograma. Operacijom Furijeove transformacije, signal na detektoru se prevodi iz prostornog u frekventni domen a kao rezultat dobija se zavisnost intenziteta zračenja od frekvencije-spektar:

$$FT(I(x)) = B(v) \quad (3.4)$$

U smislu što bolje primene infra crvene spektroskopije bitno je poznavati glavne relacije između interferograma i spektra, radi što boljih uslova snimanja i dobijanja što kvalitetnijeg spektra. Na slici 3.5 prikazani su glavni parametri interferograma i spektralne trake kao i njihov odnos.



Slika 3.5 Odnos važnijih parametara interferograma i spektralne trake

- što je veća učestalost promene znaka signala interferograma (njegovog preseka sa x osom) tim je spektralna traka šira odnosno postoji prisustvo visokih frekvencija u spektru.

- Što je viši intenzitet signala interferograma u $x = 0$ to je veća površina dobijene trake u spektru

Pre svakog snimanja infracrvenog spektra potrebno je podesiti uslove i parametre snimanja (skeniranja), stoga je neophodno definisati najvažnije parametre u cilju dobijanja što kvalitetnijeg spektra koji sadrži maksimalnu količinu informacija. Optimalno podešavanje parametara je od suštinskog značaja kod primene infracrvene spektroskopije u kombinaciji sa hemometrikom o čemu će biti više reči u narednim poglavljima.

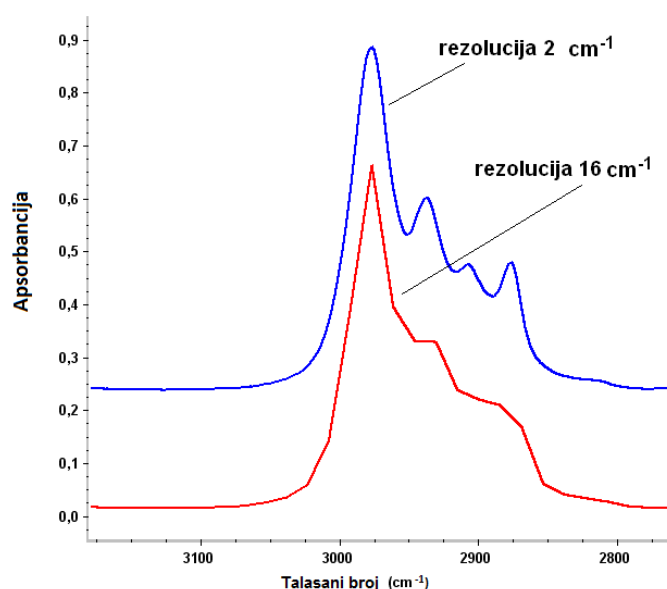
3.2. Značajni parametri pri snimanju spektara

3.2.1. Rezolucija

IUPAC definiše rezoluciju u optičkoj spektroskopiji kao minimalnu razliku u talasnom broju, frekvenciji ili talasnoj dužini koja se može postići između dve linije u spektru. Rezolucija se definiše na razne načine, može se definisati kao $\Delta\lambda$, $\Delta\nu$ ili u infracrvenoj spektroskopiji kao $\Delta\bar{\nu}$. Kod infracrvenih spektrometara rezolucija raste sa retardacijom odnosno pređenim putem pokretnog ogledala.

$$\Delta\bar{\nu} = \frac{1}{\Delta} (\text{cm}^{-1}) \quad (3.5)$$

Gde Δ predstavlja maksimalnu retardaciju (pomeraj pokretnog ogledala), obzirom da je kretanje pokretnog ogledala ograničeno i rezolucija ima svoja ograničenja zbog funkcija apodizacija. Na slici 3.6 se jasno može uočiti koliko se korisnih informacija iz spektra može dobiti pri višoj rezoluciji od 2cm^{-1} .



Slika 3.6 Poređenje spektara snimaljenih pri različitim rezolucijama

3.2.2. Vreme skeniranja (broj skenova)

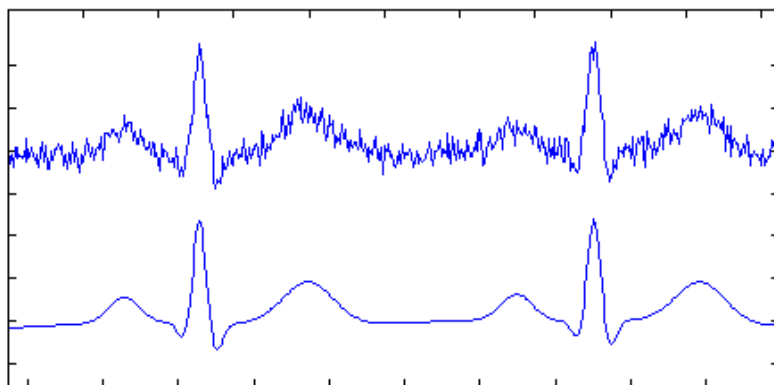
Jedan "sken" na FTIR spektrometru predstavlja kompletan pomeraj pokretnog ogledala od početne do krajnje pozicije. Veća pređena razdaljina pokretnog ogledala odgovara boljoj rezoluciji i radi dobijanja što kvalitetnijeg spektara preporučljivo je da vreme skeniranja (broj skenova) bude što veći.

3.2.3. Odnos signal / šum (Signal to noise ratio, SNR ratio)

Nijedan instrument nije savršen pa ni IR spektrometar i svaki dobijeni signal sa detektora sadrži šum. Šum se može definisati kao signal koji ne sadrži korisnu informaciju. Na signal je uvek u većoj ili manjoj meri pridodat na šum i to se može napisati kao:

$$x = x^* + e \quad (3.6)$$

Gde x^* predstavlja savršeni ili pravi signal, dok e predstavlja šum. Na slici 3.7 prikazan je signal sa šumom i signal bez šuma.

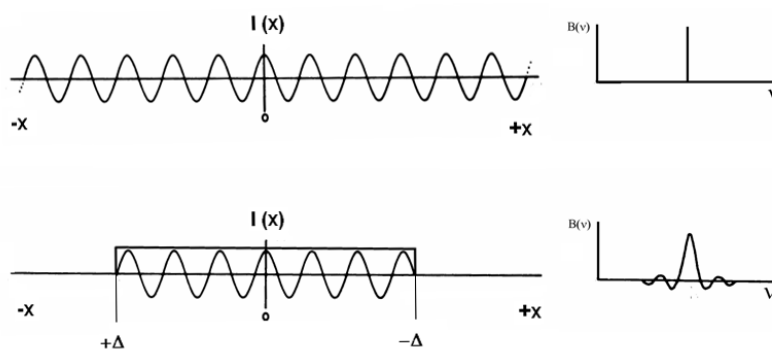


Slika 3.7 Izgled zapisa signala sa (gore) i bez šuma (dole)

Da bi što više korisnih informacija moglo da se dobije iz spektara neophodno je da ovaj odnos realnog signala i šuma bude što viši. Glavni šum koji se javlja u IR spektroskopiji potiče od detektora i zavisi od broja skenova, duže skeniranje, veći broj skenova daje bolji odnos signala prema šumu i bolju baznu liniju. Kod snimanja transmisionih spektara uzoraka u kondenzovanom stanju minimalan broj skenova je 4 da bi se dobio relativno dobar spektar. Za gasovite uzorke potrebno je minimalno 16 skenova, dok je kod snimanja spektara refleksionim tehnikama (ATR, difuzino refleksiona DRIFT) potrebno bar 50 skenova da bi se dobio spektar koji sadrži korisne informacije.

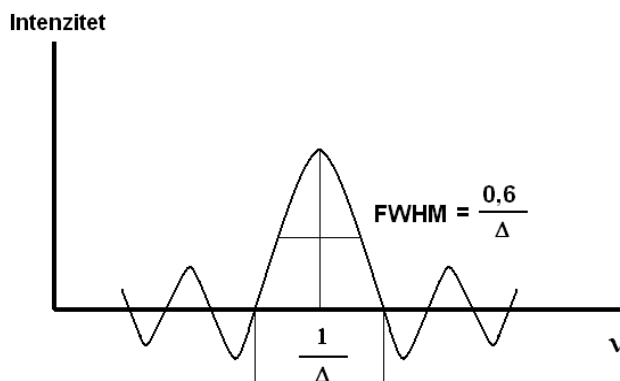
3.2.4. Skraćivanje interferograma i apodizacija

U Furijeovom paru jednačina, integracija ide od $+$ do $-$ beskonačnog, naravno pokretno ogledalo ima ograničenja u kretanju i može da se kreće do konačnih rastojanja od $+(\Delta)$ do $-(\Delta)$. Zato se mora izvršiti trunkacija (skraćivanje) interferograma tako što će se intenzitet $I(x)$ izjednačiti sa nulom za sve vrednosti veće od $+(\Delta)$ i manje od $-(\Delta)$ (slika 3.8.)



Slika 3.8 Skraćivanje (apodizacija) interferograma

Postoje različite vrste skraćivanja interferograma a najpoznatije su: pravouglo (Boxcar), trouglasto (Triangular) ili trapezoidno skraćivanje. U uslovima neograničenog interferograma dobija se beskonačno tanka linija za neku apsorbovanu frekvenciju, slika 3.8 (gore desno), dok u uslovima ograničenog interferograma pri skraćivanju dobijamo šire trake spektra sa bočnim pozitivnim i negativnim vrednostima.



Slika 3.9 Signal dobijen pravouglim skraćivanjem i njegove osobine

Na slici 3.9 prikazan je signal dobijen pravouglim skraćivanjem koji se matematički može predstaviti kao funkcija oblika $\sin x/x$, poluširina na polovini visine pika (Full width at half maximum FWHM) zavisi od pomeranja ogledala. Apodizacija je korektivni postupak za modifikovanje osnovnog integrala Furijeove transformacije. Interferogram se obično pomnoži apodizacionom

funkcijom koja uklanja lažne bočne režnje u transformisanim spektrima nastalih skraćivanjem interferograma. Lažni bočni režnjevi u spektrima izgledaju poput stopala u spektru tako da je reč apodizacija odgovarajuća (*apodal*=bez stopala) Pored nabrojanih metoda skraćivanja interferograma, odnosno apodizacije u praksi se koriste i druge apodizacione funkcije, od kojih se najčešće koriste *Happ-Genzel* i *Norton Beer* apodizacione funkcije.

3.3. Osnovni delovi FTIR spektrometra

Na slici 3.1 prikazana je šema FTIR spektrometra, pored poznavanja glavnih delova i karakteristika Majkelsonovog interferometra koji predstavlja najvažniji deo aparata, veoma je bitno poznavati karakteristike izvora zračenja, polupropustljivog ogledala i detektora.

3.3.1. Izvor infracrvenog zračenja

U infracrvenim spektrometrima najčešće se koriste dva tipa izvora zračenja a to su: Nernstov štapić i Globar. Nernstov štapić predstavlja izvor kontinualnog zračenja (pogodan za srednju infracrvenu oblast zračenja) i sastoji se od cilindra ili cevi u kojoj se nalazi smeša oksida cirkonijuma (ZrO_2), itrijuma (Y_2O_3) i erbijuma (Er_2O_3) u odnosu 90:7:3. Nernstov štapić emituje polihromatsko zračenje u infracrvenom opsegu zagrevanjem na $2000\text{ }^\circ\text{C}$ i zbog toga ga je potrebno hladiti. Dimenzije su najčešće: visina 2–5 cm i prečnik 1–3 mm.

Globar se proizvodi od silicijum-karbida SiC, zagrevanjem na $1100\text{ }^\circ\text{C}$ emituje polihromatsko zračenje u infracrvenom opsegu, odlikuje ga stabiliniji rad u odnosu na Nernstov štapić i ne zahteva spoljašnje hlađenje.

3.3.2. Delilac snopa zračenja (beam splitter) i laser

Delilac snopa zračenja, polupropustljivo ogledalo je veoma bitan deo infracrvenog spektrometra. U zavisnosti od toga u kojoj IR oblasti zračenja se vrši određivanje koriste se različiti delioci zračnog snopa.

Za srednju infracrvenu oblast ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) koristi se delilac napravljen nanošenjem tankog sloja čistog germanijuma na transparentnu pločicu od kalijum-bromida (KBr). Cela pločica KBr-a je prekrivena germanijumom osim na centru zbog potrebe transparentnosti. Za blisku infracrvenu oblast korise se na isti način pripremljeni delioci samo što se na pločicu od cezijum-jodida (CsI) nanosi čist silicijum.

Laser se koristi za kalibraciju FTIR spektrometra jer emituje zračenje poznate konstantne frekvencije. Takođe, pomaže u kontroli pozicije ogledala i signalizira snimanje podataka.

3.3.3. Detektor

U savremenim FTIR spektrometrima najčešće se koriste piroelektrični i fotoinduktivni detektori. Piroelektrični detektori su specijalna vrsta toplotnih

detektora koji sadrže tanak piroelektrični kristal kao što je deuterisani triglicin sulfat (DTGS) ili litijum tantalat (LiTaO_3). Piroelektrični kristal se polarizuje pod uticajem prispelog infracrvenog zračenja, kristal ostaje polarizovan i posle dejstva infracrvenog zraka zbog efekta rezidualne električne polarizacije. Ova rezidualna polarizacija je osetljiva na promene temperature.

Kod fotoinduktivnih detektora dolazi do povećanja električne provodljivosti pri interakciji sa infracrvenim zračenjem. Ovi detektori imaju veoma visoku osetljivost. Najčešće korišćeni detektor iz ove grupe je živin kadmijum telurid (Mercury cadmium teluride, MCT) koji radi na temperaturi tečnog azota zbog bolje osetljivosti.



Slika 3.10 Izgled važnijih delova FTIR spektrometra a) izvor, b) delilac snopa zračenja, c) laser i d) detektor

3.4. Oblici traka i obrada signala

Infra crveni spektri se sastoje od serije vrhova pikova i različitih linija koje se nalaze iznad nivoa šuma. Svaki pik predstavlja karakterističnu apsorbciju ili karakteristični strukturni deo komponente. U mnogim slučajevima pikovi su iskrivljeni, zamagljeni ili se preklapaju sa drugim pikovima. Položaj i oblik pika u spektru je rezultat kombinacije fizičko hemijskih procesa vezanih za proces interakcije molekula i zračenja kao i uslova snimanja. Jedan od glavnih zahteva za uspešnu primenu infracrvene spektroskopije je dobijanje čistih pravilnih i

neiskrivljenih pikova. Pikovi mogu da se okarakterišu na više načina najčešći je prikazan na slici 3.11.

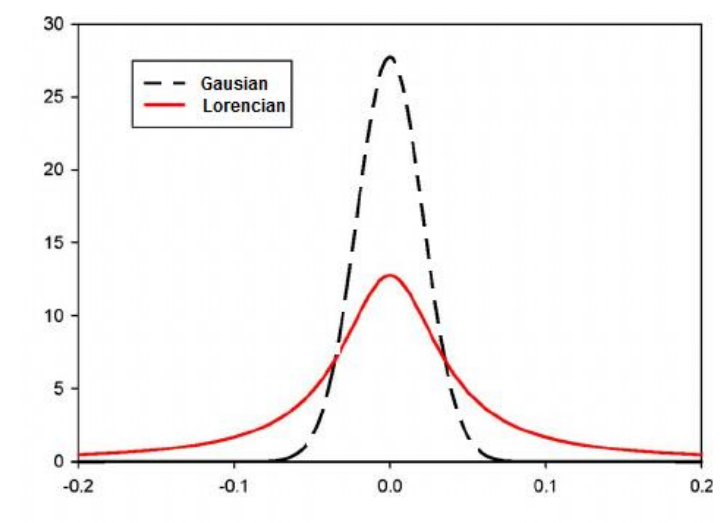


Slika 3.11 Karakteristični parametri pikova

- pozicija centra (spektralna frekvencija–kvalitativna informacija)
- širina na polovini visine ili poluširina pika (FWHM-*Full Width at Half Maximum*)
- površina

Poznavanje položaja pika u infracrvenom spektru osnova je za primenu kvalitativne hemijske analize u infra crvenoj spektroskopiji, dok je poznavanje visine i površine pika osnova za razvoj i primenu kvantitativne hemijske analize. U cilju što uspješnije primene infracrvene spektroskopije neophodno je poznavati neke osnovne pojmove vezane za matematičku interpretaciju i digitalnu obradu signala.

Pozicije, visine i površine pikova u modernim uređajima određuju se lako korišćenjem korisniku prilagođenih softvera. Pri dizajniranju ovih softvera koriste se neke osnovne teorije iz matematike i fizike i u ovom poglavlju će biti u najkraćim crtama pomenute. Najčešći oblici pikova koji se u praksi u infra crvenoj spektroskopiji javljaju su takozvani Gaus-ovi i Lorenc-ovi pikovi. Na slici 3.12 su prikazane pojednostavljene funkcije za Gausovu i Lorencovu krivu.



Slika 3.12 Osobine nekih karakterističnih pikova u infracrvenoj oblasti

Lorencovi pikovi

$$x_i = A/[1 + (x_i - x_0)^2/s^2]$$

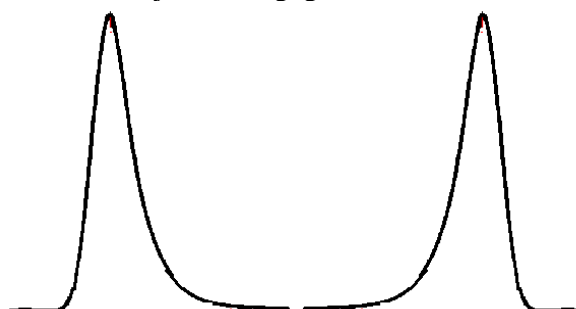
Gausovi pikovi

$$x_i = A \exp[-(x_i - x_0)^2/s^2]$$

gde su: x_0 =Pozicija centra pika; A =visina centra pika; s =parametar širine pika

Glavna razlika između Gausovih i Lorencovih pikova je u tome što su Lorencovi pikovi uslovno rečeno širi i imaju veće "repove" kako je i prikazano na slici 3.12. Pored ova dva osnovna tipa pikova koji se sreću u infra crvenoj spektroskopiji, ponekad se javljaju pikovi *Voigt*-ovog tipa.

U nekim spektroskopskim tehnikama je teško dobiti simetrične pikove, premda postoji velik broj sofisticiranih metoda. Najjednostavnije ih je prvo aproksimirati kao Gausove ili Lorencove. Sledeća slika (3.13) predstavlja asimetrične pikove gde su strane pikova aproksimirane: kod prvog je leva strana Gausova a desna Lorencova dok je kod drugog obrnut redosled.



Slika 3.13 Izgled asimetričnih pikova

Kako je već pomenuto u ovom poglavlju, oblik pika zavisi od uslova snimanja odnosno od njegove tehničke prirode. Da bi obrada infra crvenih spektara bila jasnija bitno je poznavati digitalnu prirodu infracrvenog spektra kao signala u najširem smislu.

3.5. Infracrveni spektar kao digitalni signal

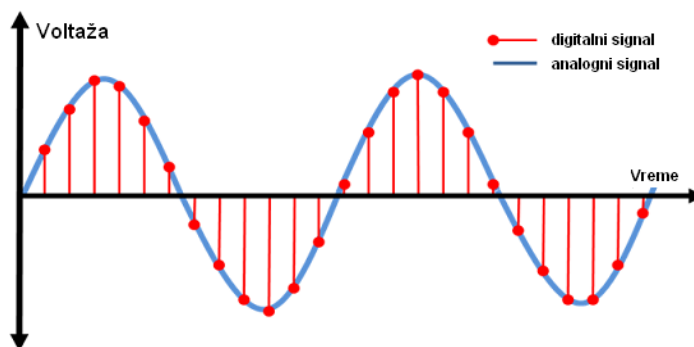
Signal predstavlja bilo koju fizičku veličinu koja se menja kao funkcija vremena prostora ili neke druge promenjive ili promenljivih. Na primer, jedan od najčešćih signala u analognoj elektronici predstavlja napon koji se menja sa vremenom. S obzirom da za oba parametra možemo da pretpostavimo kontinualni opseg vrednosti ovakav signal zovemo kontinualni signal. Prolaskom ovakvog signala kroz analogno-digitalni konverter oba parametra bivaju kvantizovani. Na primer ako je konverzija izvršena sa 12 bita na 1000 uzoraka po sekundi a napon je "iseckan" na 4096 (2^{12}) mogućih binarnih nivoa, a vreme je tada definisano u intervalima od milisekunde. Signali kod kojih su parametri formirani i predstavljeni na ovaj način zovu se diskretni signali, dok digitalni signali predstavljaju podgrupu diskretnih signala. Najčešće su kontinualni signali zastupljeni u prirodi, dok digitalni egzistiraju unutar računara (sa izuzecima na obe strane). Vertikalna osa može predstavljati apsorbanciju, napon, intenzitet zračenja, pritisak zvuka ili beskonačan broj drugih parametara. S obzirom da ne znamo šta predstavlja u konkretnom slučaju daćemo mu opšti naziv amplituda. Ovaj parametar takođe poseduje još nekoliko načina označavanja: y -osa, zavisno promenjiva, opseg ili ordinata.

Horizontalna osa predstavlja drugi parametar signala koji takođe ima različite nazive: x -osa, nezavisna promenjiva, domen ili apscisa. Vreme je parametar koji se najčešće pojavljuje na horizontalnoj osi, dok se i drugi parametri javljaju u raznim aplikacijama. Horizontalnu osu takođe nazvaćemo opštim imenom Broj uzoraka (Sample number).

Ova dva parametra signala generalno nisu razmenjivi. Parametar na $-y$ osi (zavisno promenljiva) je funkcija parametra na $-x$ osi (nezavisno promenljiva). Drugim rečima nezavisno promenjiva opisuje kako ili kada je svaki uzorak uzet (snimljen), dok zavisno promenljiva predstavlja stvarni pravi rezultat merenja. Znajući vrednosti sa $-x$ ose mi uvek možemo naći odgovarajuću vrednost sa $-y$ ose, u obrnutom smeru to je moguće samo u nekim posebnim slučajevima.

Bitno je posebno obratiti pažnju na reč domen to je termin koji se široko primenjuje u procesima obrade signala. Na primer signal koji sadrži vreme kao nezavisno promenljivu kaže se da je u vremenskom domenu. Sledeća najčešća vrsta signala koja se koristi, kao nezavisnu promenljivu ima frekvenciju, tako da imamo termin frekventni domen. Takođe signali koji kao nezavisno promenljivu imaju rastojanje kaže se da su u prostornom domenu. Tip parametra na horizontalnoj osi definiše domen signala. U slučaju digitalnih signala nezavisna promenjiva uzima vrednosti u jednakim intervalima pa se često onda na x osi te vrednosti predstavljaju preko rednog broja uzorka jer postoji parcijalna uredjenost između njih. Ovo nije slučaj za prostorne signale gde je nezavisna promenljiva

predstavljena sa dve vrednosti (x,y) koordinata u prostoru , tj nemamo parcijalnu uredjenost u domenu nezavisne promenljive.



Slika 3.14 Razlika između analognih i digitalnih signala

Svaka moderna laboratorija danas dobija podatke pomoću računara u digitalnom obliku češće nego u analognom, stoga je veoma važno shvatiti kako digitalna rezolucija utiče na mogućnost razdvajanja pikova. Mnoge tehnike koje se koriste kao rezultat daju mali broj tačaka po pik (Samples). Tipičan infra crveni pik, može biti od nekoliko cm^{-1} na poluširini pogotovo ako je dobra rezolucija. Razmotrimo primer gde je spektar snimljen tako da se 8192 tačke koristi za predstavljanje 5000cm^{-1} , tada svaka tačka predstavlja $1,64\text{cm}^{-1}$ ($8192 / 5000$). Širina pika od 2 cm^{-1} je tada predstavljena sa samo 1,22 tačke. Slaba digitalna rezolucija može bitno da utiče na mogućnost dobijanja informacija, korisno je znati kolike su te greške.

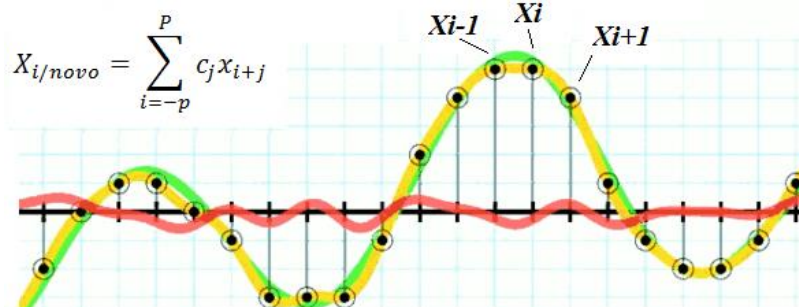
3.5.1. Obrada spektra kao digitalnog signala („peglanje spektara“)

U radu sa signalima jedan od glavnih ciljeva je dobijanje korisnog signala odvajanjem šuma iz podataka. Kada su sekvencijalno dobijeni podaci u vremenskom ili frekventnom domenu, signali se dobijaju kao suma glatkih monotoni funkcija sa šumom koji predstavlja nepotrebnu informaciju tj ometajuću funkciju. Metoda za otkrivanje signala odnosno eliminaciju šuma je Smooth funkcija poznata kao "peglanje" spektara. Princip metode je takav da je potrebno „ispeglati“ tj izglačati (otkloniti) šum metodom tako da glavne informacije u signalu spektra ostanu nepromenjene. Ovaj pristup zavisi od širine pika i od rezolucije kojom je spektar snimljen, te ako je rezolucija slaba pik se pojavljuje kao „špic“ (delta impuls) i meša se sa šumom.

Bitno je pronaći odgovarajući filter (Smooth funkciju), ako previše „ispeglamo“ funkciju signal će izgubiti na intenzitetu, s druge strane ako koristimo slabu Smooth funkciju šum će ostati u podacima.

- Pokretno usrednjavanje (Moving average, MA)

Konceptualno, najjednostavnija metoda ovog tipa je linearni filter gde rezultujući "ispeglani" podaci predstavljaju linearnu funkciju sirovih podataka. Ova metoda uključuje korišćenje susednih tačaka iz signala spektra, na primer vrednosti signala spektra u tri tačke se koristi za reuzračunavanje vrednosti signala spektra za tačku i , algebarski ova linearna transformacija se može izraziti kao:



Slika 3.15 Shema linearnog pokretnog filtra

, gde su c_j koeficijenti linearnog filtra koji množe vrednosti signala spektra u pomenutim tačkama.

Najjednostavnija situacija je pokretni prosek od tri tačke, svaka tačka je zamenjena sa prosečnom vrednosti tri vrednosti: date tačke, prethodne i sledeće tačke. Za gonji primer važi: $\mathbf{p} = \mathbf{1}$, $\mathbf{c} = \mathbf{1/3}$ za sve tri tačke. Filter može takođe biti proširen na 5, 7 ili više tačaka, tada bi imali ($p=2$, $c=1/5$) iz ovoga možemo zapamtiti dve činjenice:

- Što veći broj tačaka primenjenih za filter bolja je redukcija šuma, ali i veća opasnost od oštećenja signala
- Parametar p predstavlja broj suseda koji se koristi prilikom izračunavanja filtrirane vrednosti
- Broj tačaka u filteru se zove prozor (*Window*) što je definisano u dostupnim softverskim paketima

Filter se kreće duž serije tačaka u spektru i svaka tačka biva zamenjena odgovarajućom filtriranom vrednošću.

- *Savicky-Golay* filter

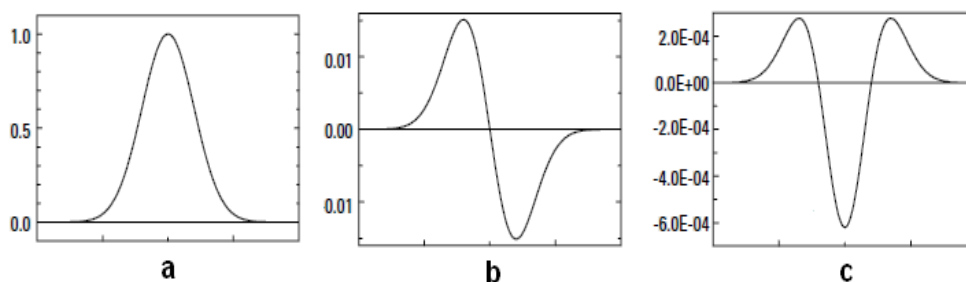
MA filtri imaju tu manu što koriste linearnu aproksimaciju za podatke. U praksi pikove je najbolje aproksimirati krivama (polinomima) naročito na centru pika gde se korišćenjem linearnog modela zapostavlja intenzitet. Kvadratni ili kubni modeli bolje aproksimiraju stanje na vrhu pika. Princip pokretnog usrednjavanja može biti proširen. Savitzky-Golay filtri imaju opšti oblik:

$$y_i = \frac{1}{h} \left(\sum_{j=-\frac{np-1}{2}}^{\frac{np-1}{2}} C_j X_{i+j} \right) \quad (3.7)$$

gde se vrednosti za h i C_j mogu naći u tablicama, np predstavlja ukupan broj tačaka koeficijenti C_j su simetrični ($C_j=C_{-j}$).

- Derivacija infracrvenih spektara

Procesom peglanja uklanjamo ili smanjujemo šum, povećanjem rezolucije bolje razdvajamo pikove. Jedan od jednostavnijih i češće korišćenih načina za razdvajanja pikova je metoda derivacije pikova. Princip je taj da tačke koje su bliske u originalnom piku posmatranog signala bivaju razdvojene u deriviranom piku. Prva i druga derivacija pika Gausovog tipa prikazane su na sledećoj slici:



Slika 3.16 Derivacije pikova a) osnovni pik, b) prvi izvod, c) drugi izvod

- Prva derivacija jednaka je nula na centru osnovnog pika i ovo je dobar način da se odredi tačna pozicija centra pika, prva derivacija ima dve prevojne tačke.
- Druga derivacija dostiže minimum na vrednosti osnovnog centra pika, prolazi kroz nulu na vrednosti prevojnih tačaka prve derivacije, i pokazuje još dve prevojne tačke.
- Koristeći derivacije širina pika se smanjuje.

Deriviranje pikova je korisno u situacijama kada imamo dva bliska preklapajuća pika i želimo da ih razdvojimo. Deriviranje pikova ima nedostatak jer dovodi do povećanja vrednosti šuma i zato pre svake derivacije potrebno je filtrirati podatke nekom od ranije navedenih metoda (*Savitzky-Golay*).

4. TRANSMISIONE TEHNIKE

4.1. Uslovi snimanja transmisionih spektara

Transmisiona tehnika je najšire korišćena u IR analizi različitih tipova uzoraka. U ovom poglavlju biće opisane glavne osobine transmisione spektroskopije, osnovne operacije, princip kvalitativne i kvantitativne analize i najčešći problemi koji se javljaju pri snimanju spektara.

Pitanje koje se često postavlja tiče se odabira odgovarajuće tehnike za snimanje uzoraka. Najprikladnija tehnika koja će se koristiti zavisi od osobina samog uzorka. Fizičke osobine uzorka su najvažnije kod različitih vrsta IR ispitivanja, a svakako treba voditi računa i o vremenu trajanja analize. Takođe se može postaviti pitanje, kakva informacija nam je potrebna o uzorku? U najvećem broju slučajeva su potrebne informacije o unutrašnjosti ili površini uzorka. Kada se rade analize unutrašnjosti uzorka infracrveni zrak se prostire kroz uzorak i koriste se transmisione tehnike, dok se kod analize površina koriste refleksione tehnike. Važniji faktori o kojima treba voditi računa pri uzorkovanju i snimanju uzoraka transmisionim a uopšte i drugim tehnikama su:

- Agregatno stanje uzorka;
- Okolina uzorka (uslovi pod kojima se uzorak snima);
- Integritet uzorka (razblaživanje i koncentrovanje);
- Količina uzorka;
- Vreme i cena po uzorku;

Agregatno stanje uzorka definiše se pod uslovima pod kojima se uzorak snima. Na primer, ako imamo neku supstancu rastvorenu u vodi na sobnoj temperaturi uzorak je u tečnom stanju. Tri osnovne kategorije su: čvrsti, tečni i gasoviti uzorci. Okolina uzorka definiše pod kojim uslovima se vrši ispitivanje uzorka, ako na primer, hoćemo da ispitujemo nusprodukte sagorevanja, uzorak moramo zagrevati da bi tokom snimanja uzorak ostao u gasovitom agregatnom stanju. Neki uzorci zahtevaju niže temperature ili odsustvo vode ili ugljen dioksida pa se snimaju u atmosferi čistog azota. Određene transmisione tehnike zahtevaju da uzorak bude razblažen ili koncentrovan da bismo dobili merljive pikove u spektru. Pojedine supstance daju veoma intenzivne trake te ih je potrebno snimati u veoma tankim slojevima ili kivetama. Određeni materijali u kojima se uzorci snimaju takođe donekle apsorbuju u IR oblasti, te je stoga bitno odvojiti apsorbanciju matriksa od apsorbancije ispitivane supstance. U refleksionim tehnikama uzorci se snimaju „čisti“ u prirodnom stanju bez prethodne pripreme. Kada se bira odgovarajuća tehnika bitna nam je dostupna količina uzorka za analizu. Ukoliko imamo veliku količinu uzorka za analizu, nije problem uzeti odgovarajući deo za analizu, a ukoliko imamo malu količinu uzorka što često može da bude slučaj tada nam količina uzorka predstavlja ograničavajući faktor. Kada se bira tehnika snimanja uzoraka treba voditi računa o potrošenom vremenu i ceni analize po uzorku. Ovo je veoma bitno kod rutinskih analiza kada imamo veliku količinu

uzoraka, zato je pogodno kupiti specijalne dodatke za infracrveni spektrometar koji skraćuju vreme analize i lako se održavaju.

Pre snimanja infracrvenih spektara uzoraka transmisionom ili bilo kojom drugom tehnikom bitno je podesiti softverske i hardverske uslove snimanja. Parametri koje treba pratiti i kontrolisati su sledeći:

- Podešavanje broja skenova i rezolucije;

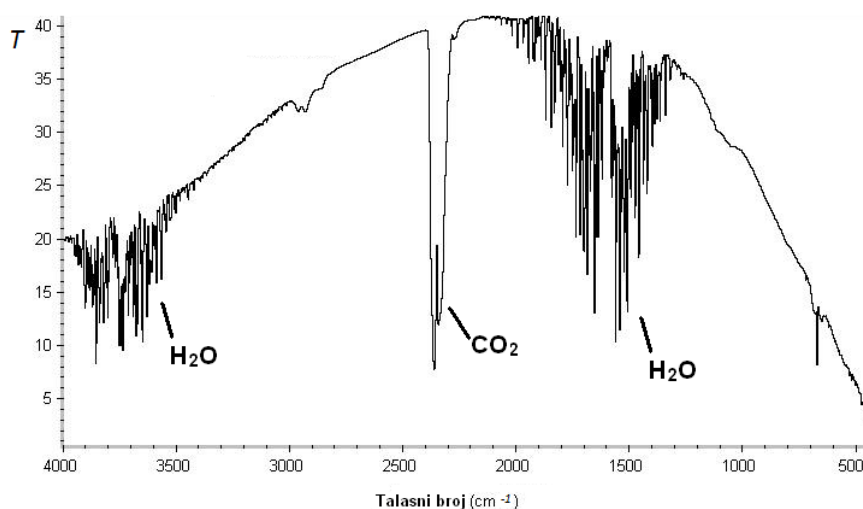
Kod rutinskih analiza transmisionom tehnikom, da bi dobili što bolji odnos pik-šum najčešće se koristi 32 skena. Kada se rade osetljivije analize, kao na primer analiza komponenata u tragovima ili kada se ispituju međumolekulske interakcije, bolje je snimati uzorak sa što većim brojem skenova da bi odnos pik-šum bio što veći. Za transmisione tehnike uobičajena je rezolucija od 4 cm^{-1} , ova rezolucija sa brojem skenova od 32 daje optimalno vreme snimanja spektara kod rutinskih analiza. Snimanje pod ovim uslovima traje manje od jednog minuta, a kvalitet dobijenog spektra je na visokom nivou.

- Podešavanje finalnog formata spektra i korišćenje automatskih korekcija

Mnogi analitičari kao krajnji format u spektru biraju transmitanciju ili apsorbciju zavisno od toga kako im je lakše da prepoznaju i razlikuju pikove. Mnogi referentni materijali daju spektre u % transmitancije, dok je za poređenje intenziteta pikova zgodnija apsorbcija. Posle analize i pre snimanja spektra moguće je automatski korigovati pikove koji potiču od vode i ugljen dioksida koji se često nalaze u okolnoj atmosferi. Ukoliko postoji softverska mogućnost automatske korekcije pikova CO_2 i H_2O treba je koristiti.

- Snimanje spektra pozadine (*Background*)

Spektar polihromatskog zračenja, u odsustvu apsorbujućeg uzorka odgovara spektru zračenja crnog tela i prisutnim sastojcima u aparatu (vlaga, CO_2 , zaštitni premaz na poluogledalu, prozori na detektoru i sl.). Ovaj spektar predstavlja spektar pozadine. U prisustvu apsorbujućeg uzorka dobijeni spektar sadrži sve karakteristike pozadine i uzorka (slika 4.1). Da bi se dobio spektar uobičajenog izgleda mora se izvršiti oduzimanje spektra pozadine od ukupnog spektra *pozadina + uzorak*. Oduzimanje se obavlja softverski, tako što se prvo snimi spektar pozadine i unese u memoriju računara. Svi kasnije dobijeni spektri uzorka (pod uslovom da nije došlo do promene uslova snimanja) se automatski koriguju zapamćenim spektrom pozadine.



Slika 4.1 IR spektar pozadine

Kod većine transmisionih tehnika nije potrebno snimati spektar pre svakog uzorka, optimalno je snimati spektar svakih pola sata u tu svrhu moguće je podesiti u softveru opciju za automatsko snimanje spektra pozadine. U sledećim slučajevima potrebno je snimati spektar pozadine:

- Kada se menja oprema ili tehnika snimanja;
- Kada se menjaju parametri eksperimenta (broj skenova, rezolucija, intenzitet izvora...);
- Kada se primeti promena količine vode ili ugljen dioksida u spektru;
- Kada se primete neočekivane promene na baznoj liniji;
- Kada se primeti prevelik šum u spektru.

Kako treba da izgleda dobro snimljen spektar?

Da bi smo dobili kvalitetan spektar potrebno je obratiti pažnju na uslove snimanja i ispoštovati sve pripremne procedure. Posle ovih pripremnih operacija uzorak se postavlja u spektrometar i snima. Trake u dobro snimljenom spektru moraju biti oštre i ne previše široke, glavne trake moraju da se protežu kroz najveći deo opsega spektra i ne smeju izlaziti iz opsega. Bazna linija mora biti ravna i konzistentna i što bliža vrednosti od 100% transmitancije (0 apsorbancije). U ovako snimljenom spektru lakše je meriti intenzitete traka, obrađivati spektre i porediti ih sa spektrima iz baze podataka.

4.2. Tehnika snimanja spektara gasova

Gasovi se snimaju u specijalnim gasnim kivetama koje se održavaju na određenoj temperaturi i pritisku. Prozori koji potpuno propuštaju IR zrake nalaze se na početku i na kraju ćelije. Jedinjenja koja se koriste za izradu IR transparentnih prozora prave se od jonskih jedinjenja (NaCl, KBr, BaF₂, CaF₂).

S obzirom da su gasoviti uzorci uglavnom u malim koncentracijama (pri niskim pritiscima) u ćeliji se nalaze ogledala koja višestruko reflektuju zrak kroz uzorak i na taj način iz uzorka dobijamo više informacija. Ukoliko se gasoviti uzorak u gasnu ćeliju uvodi direktno iz boce pod pritiskom što je redak slučaj, bitno je raditi veoma oprezno zbog mogućeg pucanja gasne kivete. Gasne kivete koje se koriste mogu biti dužine od 10 cm (slika 4.2) do nekoliko desetina metara.



Slika 4.2 Izgled gasne kivete

Da bi dobijeni spektar gasa bio što kvalitetniji neophodno je snimiti gas pod odgovarajućim pritiskom (koncentracijom), u slučaju lošeg uzorkovanja gasa (slab pritisak) u dobijenom infracrvenom spektru se zapaža rotaciona struktura molekula (trake funkcionalnih grupa su isprekidane).

4.3. Tehnika snimanja čvrstih uzoraka u tabletama

U ovom potpoglavlju objasnićemo tehniku analiziranja praškova i čvrstih uzoraka koji se mogu usitniti. Uzorak se usitni do određene veličine čestica i zatim meša sa nekim neapsorbujućim materijalom kalijum bromidom (KBr). Dobijena smeša se presuje u IR transparentnu tabletu koja se postavlja u specijalni držač i zatim snima spektar. Tehnika snimanja uzoraka u tabletama može da se koristi za snimanje velikog broja jedinjenja: prahova, kristala, materija koje se mogu usitniti do čestica istih malih dimenzija, polimera, plastike, gume i boja. Uzorci koji su lepljivi ne mogu da se analiziraju ovom tehnikom, teško ih je samleti, a dobijeni spektar ima iskrivljenu baznu liniju zbog rasipanja zračenja. Takođe materije koje reaguju sa neapsorbujućim materijalom (KBr) ne mogu se analizirati ovom tehnikom. Ova tehnika se retko koristi u rutinskim analizama zbog relativno zahtevne pripreme uzoraka.

Kvalitet tablete i samog infracrvenog spektra zavisi od:

- Veličine čestica uzorka;
- Indeksa refrakcije uzorka i matriksa (KBr);
- Debljine tablete.

Obzirom da se tablete prave od sitnih čestica, čest je slučaj da je bazna linija iskrivljena zbog rasipanja zračenja.

Da bi analizirali uzorke u obliku tableta potreban je sledeći pribor:

- Ahatni avan;
- Metalna špatula;
- Prašak kalijum bromida spektrometrijske čistoće;
- Četkica (može i slikarska) ili vata;
- Kalup za tablete;
- Presa za tabletriranje;
- Držać tablete;

Oprema koja se koristi za pripremu uzoraka ovom tehnikom uglavnom se dobija kao sastavni deo dodatne opreme koja ide uz kupljeni infracrveni spektrometar.

Osnovne operacije kod analize tableta su sledeće:

- Mlevenje uzorka - malu količinu uzorka usitniti ručno u avanu (ili po potrebi u mehaničkom mlinu);
- Homogenizacija - uzorku dodati malu količinu KBr-a, izmešati i samleti sa uzorkom u avanu (voditi računa da u smeši ne bude vlage);
- Prebacivanje u kalup - u kalup za tabletiranje preneti smešu uzorka i KBr-a, pri prenosu koristiti špatulu, a preostali deo preneti četkicom ili vatom i kalup zatvoriti;
- Presovanje - kalup postaviti u presu i presovati, pritisak od 10 t/cm^2 je sasvim odgovarajući;
- Snimanje spektra - dobijenu tabletu pažljivo izvaditi iz kalupa, postaviti u nosač i snimiti spektar.

Kod analize u tabletama treba razmotriti sledeće faktore vezane za matriks:

Odabir matriksa - materijal koji se najčešće koristi u ovoj vrsti analize je kalijum bromid jer ne apsorbuje u IR oblasti, dostupan je i jeftin. Ostali jonski halidi koji se mogu koristiti su: KCl, CsI i AgI.

IR oblast od interesa - ako se radi analiza u srednjoj IR oblasti kao matriks se koristi KBr, KCl, CsI. Ako se radi u dalekoj IR oblasti koristi se polietilen velike gustine (High density polyethylene, HDPE) ili dijamantska prašina. U bliskoj IR oblasti koristi se: KBr, KCl ili TlBr.

Indeks refrakcije - najkvalitetnije spektre ćemo dobiti ako su indeksi refrakcije uzorka i matriksa slični. Što je veća razlika u indeksu refrakcije između uzorka i matriksa tableta je manje transparentna što može da predstavlja problem jer tableta koja nije transparentna u vidljivoj može biti transparentna u IR oblasti.

Stabilnost - Potrebno je razmotriti stabilnost dobijene smeše, ako uzorak sadrži vodu, rezultat će biti slab jer se KBr u vodi rastvara. Takođe mnoge jonske soli su nestabilne na višim temperaturama (na višim temperaturama koristiti dijamantsku prašinu).

Čistoća - KBr koji se koristi mora biti spektrometrijske čistoće. Preporučljivo je svaku novu bočicu ispitati snimanjem čiste KBr tablete. Otprilike 100 g KBr-a može da posluži za pravljenje od 150 do 400 tableta debljine 13 mm.

Mlevenje uzorka i podešavanje odnosa uzorak/matriks - pre nego što se napravi smeša, uzorak i matriks treba usitniti do veličine čestica manjih od talasne dužine zračenja (zbog rasipanja zračenja). Ako se radi u srednjoj IR oblasti idealna veličina čestica je 2 μm , u praksi dobijanje čestica ovih dimenzija je naporno, najčešće su to čestice od oko 5 μm . Postoje dve osnovne vrste mlevenja to su čvrsto i mokro.

Suvo mlevenje - u ahatni avan potrebno je odmeriti od 10 do 15 mg uzorka i oko 100 mg matriksa, kružnim pokretima tučkom pritiskati smešu uz avan, pa zatim špatulom rasutu smešu sakupiti na gomilicu, posupak ponoviti 3 - 4 puta. Ukoliko se uzorak tokom mlevenja zagreva i raspada praviti povremene pauze i hladiti smešu. Ukoliko je materijal veoma čvrst koristiti mehanički mlin sa kuglama.

Vlažno mlevenje (kod mnogih neorganskih i nekih organskih supstanci) - u ahatni avan odmeriti od 10 do 15 mg uzorka, zatim kapalicom dodati par kapi pogodnog rastvarača (najčešće etanol) pa kružnim pokretima tučkom pritiskati smešu uz avan, a zatim špatulom rasutu smešu skupiti na gomilicu, posupak ponoviti 3 - 4 puta dok sav rastvarač ne ispari.

KBr koji se koristi kao matriks treba sušiti povremeno u sušnici na 105 °C pa zatim do upotrebe čuvati u eksikatoru. Da bi se napravila standardna tableta potrebno je u avan sipati od 0,5 do 2 mg uzorka. Količina uzorka će zavisiti prvenstveno od njegovih apsorpcionih osobina. Pravilo je da uzorak mora da čini od 0,1 do 0,2% matriksa. Ako imamo uzorak nepoznatih osobina najbolje je početi sa odnosom 1 : 100.

Punjenje kalupa i presovanje - usitnjenu smešu pomoću špatule (na vrh špatule) preneti u kalup koji odgovara presi, pomoću četkice ili vate obrisati i ostatke. Pomoću špatule zatim rastresti smešu i ravnomerno je rasporediti. Na kalup postaviti metalni zatvarač, a zatim i poklopac. Nekoliko puta okrenuti srednji klip da se smeša bolje rasporedi. Zatvoreni kalup zatim postaviti u presu i primeniti pritisak od 10 t /cm². Postoji više tipova različitih presa za pravljenje tableta. Ako tablete pravimo povremeno korisna i laka za upotrebu je ručna presa. Ručna presa je jeftina i jednostavna, može da pravi tablete u dve veličine (od 1,3 i 7 mm). Vrlo često se koristi i cilindrični kalup i hidraulična presa za veće pritiske, neke od presa mogu i da rade pod sniženim pritiskom da bi se eliminisala vlaga iz tableta. Kod cilindričnih hidrauličkih presa potrebno je imati zaštitno staklo, obzirom da se za

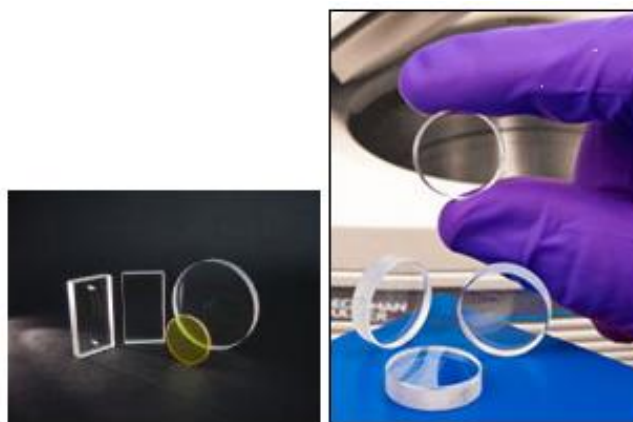
pravljenje tableta primenjuju visoki pritisci 10 t/cm^2 , postoji mogućnost ozbiljnih povreda ukoliko kalup pukne.

4.4. Tehnika snimanja tankih filmova na pločicama od soli

Veoma često se za potrebe brze kvalitativne analize koristi tehnika snimanja čvrstih i tečnih uglavnom organskih uzoraka na tankim pločicama od soli. Kod ove tehnike analize veoma je bitno sledeće:

- Treba razlikovati dobro pripremljenu pločicu od loše i treba posvetiti posebnu pažnju održavanju pločica, da dobra pločica ne postane loša;
- Potrebno je na odgovarajući način pripremiti uzorak zavisno od toga da li je tečan ili čvrst.

Održavanje pločica: Pločice koje se koriste u ovoj vrsti analiza prave se od soli jonskih jedinjenja, najčešće natrijum hlorida ili kalijum bromida. Pored ovih soli koriste se još i barijum i kalcijum florid kao i cezijum jodid. Ove pločice su dosta skupe jer se dobijaju od velikih kristala koji su lomljivi i veoma osetljivi na vlagu, čak i vlagu sa prstiju. Ukoliko ovakva pločica dospe u kontakt sa vodom rastvara se. Ako nepravilno držimo pločicu vlaga sa naših prstiju ostaviće beli trag na pločici tačnije otisak prstiju. Da se ovo ne bi desilo pločicu držati sa strane kako je prikazano na slici 4.4.

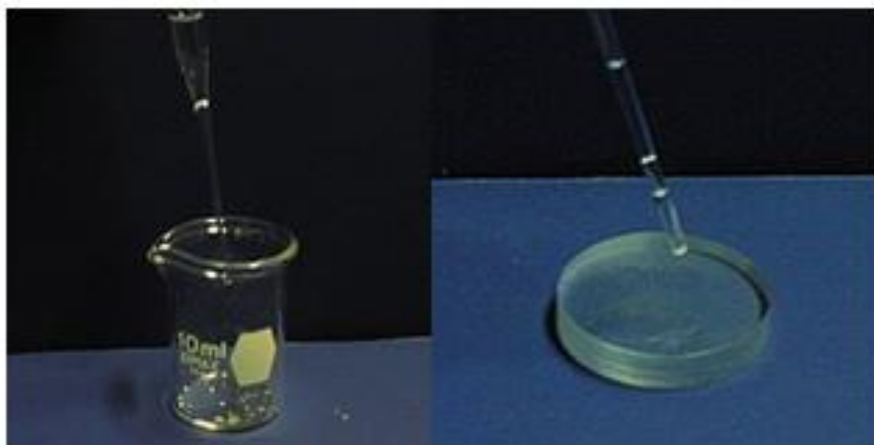


Slika 4.4 Transparentne IR pločice i način držanja pločica

Oštećena pločica može da izgleda belo i zamagljeno od vlage sa prstiju ili iz atmosfere, zbog toga pločice treba obavezno držati u eksikatoru, posle upotrebe očistiti apsolutnim etanolom zbog sadržaja vode i ispolirati na pogodnoj podlozi. Takođe napukle i polomljene pločice ne smeju se koristiti i potrebno ih je zameniti.

Priprema i analiza tečnih i čvrstih uzoraka: Kod analize tečnih uzoraka nije potreban rastvarač, uzorci se direktno analiziraju na sledeći način: dve pločice se postavje na čistu površinu (najbolje je koristiti filter papir). Koristeći kapalicu na jednu pločicu nanese se mala kap tečnosti tako da se što bolje razlije po pločici, pri

nanošenju kapalicom ne treba dodirivati pločicu (slika 4.5). Drugu pločicu potrebno je postaviti preko prve tako da se tečnost razvije u tanak film kroz koji može proći zrak. Držeći ih sa strane pločice postaviti u držač uzorka i snimiti spektar. Posle snimanja pločice skinuti razdvojiti, zatim na malo parče vate naneti apsolutni etanol (nikad vodu) i pločice dobro očistiti, posle toga pločice ispolirati i postaviti u eksikator. Kod analize tečnih uzoraka potreban je pogodan rastvarač koji ima malo traka u infracrvenom spektru i koji brzo i lako isparava. Kao pogodni rastvarači najčešće se koriste metilen hlorid i hloroform u nekim slučajevima apsolutni metanol. U čašicu ili na sahatno staklo potrebno je sipati vrlo malo čvrstog uzorka nekoliko miligrama i dodati par kapi metilen hlorida ili hloroforma. Ako je čvrst uzorak u čašici, epruveti ili balonu potrebno je direktno dodati par kapi rastvarača kapalicom. Kada se dobije rastvoren čvrst uzorak dalji postupak analize je isti kao u slučaju tečnih uzoraka.



Slika 4.5 Nanošenje tečnih uzoraka na IR pločice

Količina uzorka na pločici ne sme biti premala ili prevelika, u slučaju prevelike količine uzorka na pločici dobijeni spektar sadrži totalno apsorbujuće (vrednosti za A veće od 2). U tom slučaju potrebno je povlačenjem jedne pločice preko druge ukloniti višak uzorka ili ponoviti postupak nanošenja na pločicu.

4.5. Tehnika snimanja tečnosti u zatvorenim kivetama

Zatvorene kivete se retko koriste za analize čistih tečnosti, najčešće se koriste za analize suspenzija i rastvora organskih rastvarača. Viskozne tečnosti, ulja i lepкови se nikada ne analiziraju tehnikom u kiveti nego tehnikom kapilarnog filma nanošenjem na pločice KBr-a ili ATR tehnikom. Kod analiza u kivetama bitna je dužina optičkog puta kivete i materijal od kojeg je sačinjen prozor kivete. Tehnike snimanja tečnih uzoraka su dobro razrađene, jednostavne i daju kvalitetne spektre. Aparatura koja je potrebna za ove analize je jednostavna i pristupačna. Priprema uzorka traje kratko i ćelija se lako čisti. Takođe postoje tehnike kod kojih

skoro da i nema pripreme uzoraka. Pribor za ove tehnike je malo skuplji ali se isplati kod rutinskih analiza.

Postoje dva osnovna tipa kiveta zatvorene i rasklapajuće kivete. Zatvorene kivete se sastoje od dva IR transparentna prozora razdvojena graničnikom tačno definisane debljine što definiše i dužinu optičkog puta koji je bitan kod kvantitativne analize, dostupne su kivete sa različitim dužinama optičkog puta. Zatvorene kivete su permanentno zatvorene, a prozori i graničnik se ne pomeraju i često se koriste kod kantitativnih određivanja. Rasklapajuće kivete (slika 4.6) su isto dizajnirane kao i zatvorene s tom razlikom što mogu da se otvore radi čišćenja.



Slika 4.6 Izgled zatvorene tanke kivete za snimanje

Dužina optičkog puta kivete je rastojanje između dva prozora zatvorne kivete. Kada se kiveta napuni uzorkom, uzorak zauzima sav prostor između dva prozora. Što je veće rastojanje među prozorima veći broj molekula reaguje sa IR zračenjem, što više molekula reaguje sa zračenjem u spektru dobijamo intenzivnije trake. Kivete koje se koriste imaju sledeće dužine optičkog puta: 0,015 mm, 0,025 mm, 0,05 mm, 0,1 mm, 0,2 mm, 0,5 mm. Idealna dužina optičkog puta zavisi od apsorpcionih karakteristika uzorka i karaktera analize. Za kvalitativne i kvantitativne analize najintenzivnije trake ne bi trebalo da prelaze 1,5 jedinica apsorpcije. Kod analize nepolarnih supstanci najbolje je početi sa dužinom od 0,1 mm dok je kod analize polarnih najbolje koristiti kivete od 0,05 do 0,2 mm.

Kod analiza u zatvorenoj kiveti treba razmotriti sledeće faktore:

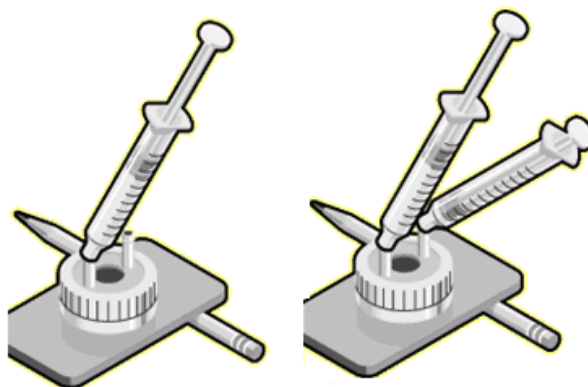
Matrijal od kojeg je sačinjen prozor kivete - materijali od kojih su napravljeni prozori kiveta koji se najčešće koriste su: kalijum bromid, kalijum hlorid, natrijum hlorid, cink selenid i barijum fluorid. Svi ovi materijali obezbeđuju širok IR opseg i pristupačna im je cena. KBr i KCl su higroskopni i kada se ne koriste čuvaju se u eksikatoru. Ovi materijali ne apsorbuju u IR oblasti i veoma su pogodni, relativno su jeftini i lako se nabavljaju.

Indeks refrakcije - spektri najboljeg kvaliteta se dobijaju kada je razlika u indeksima refrakcije između uzorka i materijala mala, ukoliko ovo nije slučaj javljaju se gubici usled refleksije i spektar je lošeg kvaliteta.

Kompatibilnost - bitno je da uzorak ne reaguje sa materijalom od kojeg je napravljena pločica, na primer vodeni uzorci ne smeju se snimati na pločicama od KBr i ostalih jonskih jedinjenja da se pločice ne bi rastvorile. Za vodene kisele i alkalne tečnosti mogu se koristiti CaF_2 ili BaF_2 prozori ali oni imaju mali spektralni opseg, ZnSe je takođe hemijski otporan ali ima prevelik indeks refrakcije.

Tehnika punjenja kivete

Procedura punjenja zavisi od dužine optičkog puta, ako je dužina veća od 1 mm koristi se jedan špric, jednim špricom uzorak se polako ubrizgava dok je drugi otvor otvoren da bi izašao višak vazduha. Ako je dužina manja od 1 mm koriste se dva šprica, jedan špric se napuni uzorkom i postavi u otvor dok se drugim praznim uzorak lagano uvlači u kivetu (slika 4.7).



Slika 4.7 Punjenje kivete

Ukoliko uzorak predstavlja supstancu rastvorenu u nekom rastvaraču (na primer CCl_4) pre snimanja uzorka snimi se spektar čistog rastvarača, nakon toga se od spektra uzorka oduzme spektar rastvarača da bi se eliminisale trake koje potiču od rastvarača.

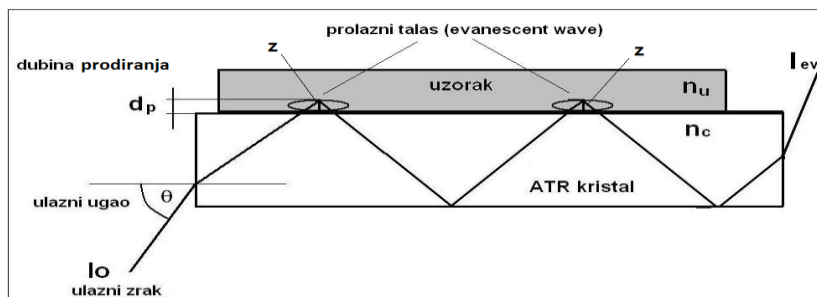
Posle svakog snimljenog uzorka potrebno je što bolje očistiti kivetu, prvo je potrebno skinuti kivetu, skinuti čepove i pomoću šprica izvući što više tečnosti. Ukoliko je tečnost isparljiva u jedan od otvora staviti špric i vući klip dok ne budemo sigurni da tečnost nije isparila. U slučaju da tečnost nije isparljiva ponoviti isti postupak samo ne sa praznim špricom nego ga napuniti pogodnim (imati na umu polarno u polarnom i reakcija sa materijalom prozora) lako isparljivim rastvaračem.

5. TEHNIKA OSLABLJENE TOTALNE REFLEKSIJE (Attenuated total reflection, ATR)

ATR spektroskopija je moderna tehnika IR spektroskopije koja se koristi u širokom spektru analiza najrazličitijih vrsta uzoraka. Problemi vezani za pripremu uzoraka i spektralnu reproduktivnost koji se javljaju kod “klasičnih” transmisionih tehnika, upotrebom ATR tehnike se u dobroj meri prevazilaze. Jedna od najvećih prednosti ATR spektroskopije je njena brzina zbog male ili skoro nikakve pripreme uzoraka. Ova IR tehnika našla je najveću primenu u analizi površina materijala svih agregatnih stanja naročito čvrstih praškastih i polimernih materijala.

5.1. Teorijski principi

ATR tehnika se zasniva na merenju promena koje se dešavaju pri totalnoj refleksiji infracrvenog zraka u kontaktu sa uzorkom. Kada se infracrveni zrak pod određenim uglom usmeri na optički gust kristal (visok indeks refrakcije) dolazi do stvaranja stojećeg “prolaznog” talasa koji interaguje sa uzorkom koji je u kontaktu sa kristalom (slika 5.1). Prolazni talas se javlja pri svakoj refleksiji o unutrašnju stranu kristala.



Slika 5.1 Shematski prikaz principa ATR tehnike

Prolazni talas prodire unutar površine uzorka nekoliko mikrometara (0,5 - 10) i pri interakciji sa uzorkom energija IR zraka se smanjuje. Smanjena energija talasa nastavlja dalje prema detektoru gde se generiše IR spektar. Odnos između intenziteta upadnog i izlaznog zraka data je jednačinom:

$$I_{ev} = I_0 \exp\left(-\frac{z}{d_p}\right) \quad (5.1)$$

Gde je:

- I_{ev} - intenzitet izlaznog oslabljenog zračenja;
- I_0 - intenzitet upadnog zračenja;
- z - normalno rastojanje od vrha talasa do površine kristala;
- d_p - dubina prodiranja.

Dubina prodiranja prolaznog talasa u uzorak pri refleksiji data je sledećom jednačinom:

$$d_p = \frac{\lambda}{2n_c \pi \sqrt{\sin^2 \theta - (n_u/n_c)^2}} \quad (5.2)$$

Gde je:

- d_p - dubina penetracije;
- n_c - indeks prelamanja kristala;
- n_u - indeks prelamanja uzorka;
- λ - talasna dužina upadnog zračenja;
- θ - upadni ugao.

Na osnovu jednačina 5.1 i 5.2 može se zaključiti da dubina prodiranja raste sa porastom talasne dužine što znači da je intenzitet zračenja većih talasnih dužina niži u poređenju sa transmisionim spektrima. Većina modernih FTIR spektrofotometara sa ATR dodatkom softverski koriguje efektivnu dužinu optičkog puta.

Da bi ATR tehnika bila uspešno primenjivana dva osnovna zahteva moraju biti ispunjena:

- Uzorak mora biti u čvrstom i direktnom kontaktu sa kristalom da bi se omogućila što bolja interakcija sa prolaznim talasom;
- Indeks prelamanja kristala mora biti značajno veći od indeksa prelamanja uzorka, u protivnom neće doći do refleksije nego do transmisije zraka.

5.2. Faktori koji utiču na kvalitet ATR spektara - ATR kristali

Tehnika ATR spektroskopije primenjuje se korišćenjem takozvanih „pametnih“ dodataka za FTIR spektrofotometre (Smart accessories). ATR dodatak za moderan FTIR spektrofotometar postavlja se lako i jednostavno između izvora zračenja i detektora. Najbitniji deo dodatka za ATR tehniku je ATR kristal. Glavni kriterijumi koje treba uzeti u obzir pri izboru kristala za ATR spektroskopsku analizu su:

Indeks refrakcije - kristal bi trebao da ima viši indeks refrakcije od uzorka. Većina organskih uzoraka ima indeks refrakcije u području od oko 1,5. Indeks refrakcije standardnih ATR kristala kreće se u rasponu 2,4 - 4,0 što u većini slučajeva osigurava dovoljnu razliku indeksa prelamanja uzorka i kristala. Loš odnos indeksa prelamanja kristala i uzorka može uzrokovati loše spektralne karakteristike uzorka (nesimetrični pikovi, pojava "ramena", problemi sa baznom linijom).

Spektralni opseg - svi ATR kristali imaju različite spektralne opsege. Na primer, donja granica spektralnog opsega u srednjem infracrvenom opsegu se kreće od oko 780 cm^{-1} za germanijum do 250 cm^{-1} za KRS-5. U određenoj meri na spektralne opsege kristala utiče i njihova debljina. U svetlu tih činjenica, važno je utvrditi da li za spektralne karakteristike uzorka odgovara spektralni opseg odabranog ATR kristala. Spektralni opsezi najčešće korišćenih kristala dati su u tabeli 5.1.

Fizičko-hemijske osobine - iz očitih razloga, ATR mora biti kristalno hemijski i fizički u skladu s uzorkom. Neki od kristalnih materijala mogu reagovati s uzorcima. To obično može oštetiti površinu kristala i može izazvati neugodne nuspojave (npr. kiseli rastvori, $\text{pH} < 5$, mogu reagovati sa ZnSe kristalom i generisati toksične selenide vodonika). Fizičke karakteristike su jednako važne ako su neki kristali osetljiviji na promene pritiska i temperature od drugih.

Osetljivost - Efektivni optički put infracrvenog zraka u uzorku mora biti dovoljan za generisanje spektra odgovarajućeg kvaliteta. Na ovaj parametar utiče broj refleksija (više refleksija daje veću apsorbciju), i dubina prodiranja koja je funkcija indeksa refrakcije i upadnog ugla. Većina ATR dodataka već su optimizovani za pružanje najbolje moguće osetljivosti. Standardne konfiguracije ATR dodataka omogućavaju od 9 do 20 refleksija pri upadnom uglu od 45° . Promena ovih parametara, što je moguće s ATR dodatkom sa promenljivim upadnim uglom može poboljšati rezultate u nekim slučajevima. Međutim, pri odabiru posebne konfiguracije sledeće činjenice treba uzeti u obzir:

- Veći upadni ugao rezultuje sa manje refleksija i manjom dubinom prodiranja što uzrokuje slabiju apsorbciju. Ovakva konfiguracija je pogodna za analizu visoko apsorbujućih uzoraka koji imaju velik indeks refrakcije.
- Manji upadni ugao rezultuje sa više refleksija i većom dubinom prodiranja što uzrokuje veliku apsorbciju i osetljivost. Korišćenje ovakve konfiguracije može prouzrokovati distorziju pikova i zato treba biti oprezan kod korišćenja ATR dodataka sa ovakvim parametrima.

Tabela 5.1 Karakteristike ATR kristala

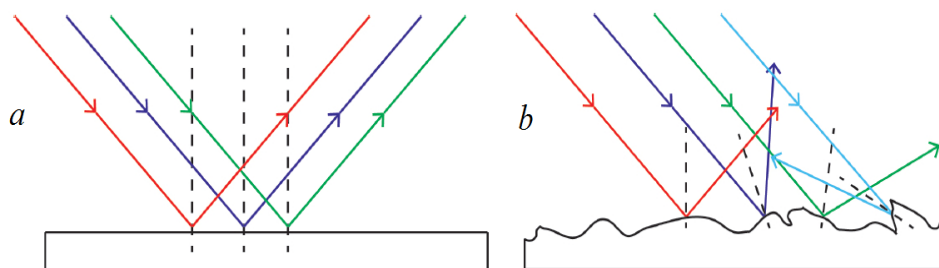
	n	d_p ($n_u \sim 1,5, \lambda = 1000\text{ cm}^{-1}, \theta = 45^\circ$)	Rastvorljivost u vodi (g/100 g)	pH opseg	Tvrdoća (Kg/mm ²)
AMTIR	2,5	1,46	nerastvorljiv	1-9	170
Dijamant	2,4	1,66	nerastvorljiv	1-14	5700
Germanijum	4,0	0,65	nerastvorljiv	1-14	550
KRS-5	2,4	1,73	0,05	5-8	40
Silicijum	3,4	0,84	nerastvorljiv	1-12	1150
ZnS	2,2	2,35	nerastvorljiv	5-9	240
ZnSe	2,4	1,66	nerastvorljiv	5-9	120

6. TEHNIKA FTIR DIFUZNE REFLEKSIJE (Diffuse reflectance infrared Fourier transform, DRIFT)

Tehnika difuzne refleksije u okviru FTIR spektroskopije (DRIFT) je moćna i moderna tehnika koja prikuplja i analizira energije rasutog infracrvenog zračenja. DRIFT tehnika se najčešće koristi za snimanje IR spektara sitnih čestica praha kao i grubih površina. Uzorkovanje je brzo i lako, jer se zahteva malo ili nimalo pripreme uzorka.

6.1. Teorijski principi

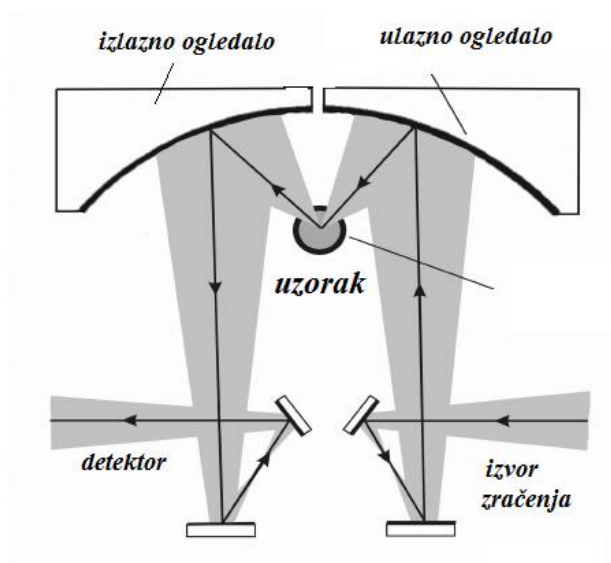
Refleksija zračenja sa glatkih površina, kao što su ogledala predstavlja vrstu refleksije poznatu kao spekularna refleksija. Refleksije sa grubih površina kao što su papir, ili asfalt kolovoza predstavlja vrstu refleksije poznatu kao difuzna refleksija. Na slici 6.1 prikazani su pravci i smerovi upadnog i reflektovanog zračenja sa glatke i grube površine.



Slika 6.1 Shematski prikaz refleksije a) spekularna refleksija b) difuzna refleksija

U slučaju spekularne refleksije upadno zračenje predstavlja skup zraka koji putuju paralelno jedan sa drugim. Pri refleksiji o glatku površinu zraci nastavljaju kretanje paralelno u istom pravcu (slika 6.1a). U slučaju difuzne refleksije upadni zraci posle kontakta sa grubom površinom nastavljaju kretanje u različitim pravcima (slika 6.1b). Za svaki tip refleksije, svaki pojedinačni zrak sledi zakone prelamanja. Svaki zrak se prelama u odnosu na normalu koja je različita zbog hrapavosti materijala. Na slici 6.1a se može videti da upadni zrakovi slede zakone prelamanja u odnosu na normalu i da su reflektovani zraci u različitim pravcima.

Ako pomoću sistema ulaznih ogledala (slika 6.2) usmerimo IR zračenje na praškasti uzorak, zračenje će intereagovati sa uzorkom pri čemu će doći do višestruke refleksije od grube površine uzorka, odnosno doći će do difuzne ali i spekularne refleksije. Pomoću izlaznog ogledala difuzno i spekularno reflektovani zraci se prikupljaju i šalju ka detektoru da bi se generisao IR spektar.



Slika 6.2 Shematski prikaz dobijanja IR spektara difuznom refleksijom

U cilju dobijanja što kvalitetnijeg spektra DRIFT dodaci imaju za cilj da maksimalno pojačaju difuzno reflektovano zračenje i minimalizuju spekularno reflektovane zrake koji se u ovom slučaju javljaju kao smetnja. Spekularno reflektovano zračenje kod DRIFT tehnike može da izazove smetnje u vidu invertovanih traka ili traka koje imaju oblik prvog izvoda spektra, ovakve trake se nazivaju *Restrahlen*-ove trake.

6.2. Faktori koji utiču na kvalitet spektara

Da bi se što više korisnih informacija dobilo iz DR spektra mora se obratiti pažnja na sledeće faktore:

Indeks refrakcije uzorka - što je viši indeks refrakcije uzorka, uzorak daje i više spekularno reflektovanog zračenja. Spekularno reflektovano zračenje dovodi do distorzije i proširenja traka a odnos intenziteta trake i koncentracije postaje nelinearan. Mnoge neorganske supstance koje dobro reflektuju zračenje daju potpuno invertovane *Restrahelen*-ove trake. Da bi se umanjio procenat spekularno reflektovanog zračenja korisno je uzorak pomešati sa usitnjenim prahom KBr-a.

Veličina čestica uzorka - što je veličina čestica uzorka veća to je veća mogućnost pojave spekularne refleksije na njenoj površini. Da bi se što više

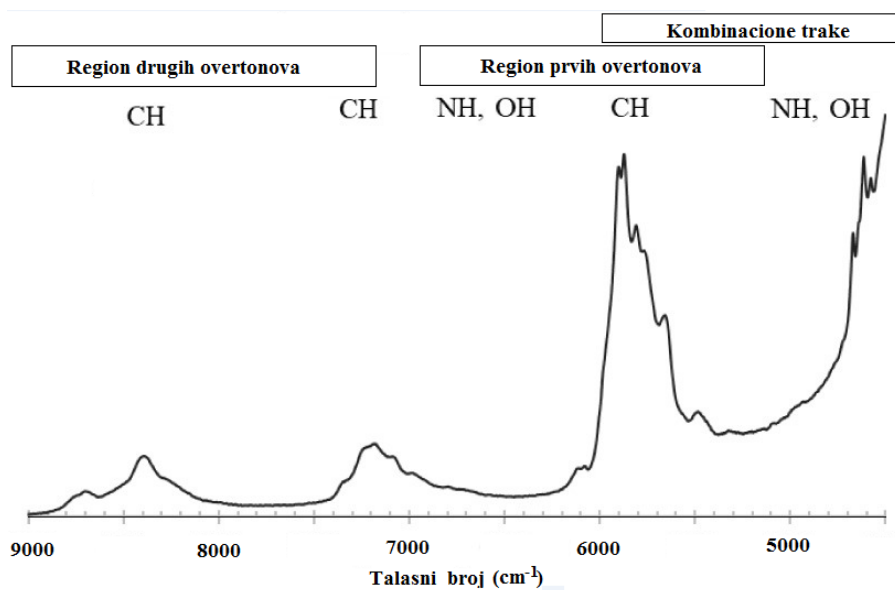
smanjio negativan uticaj zbog veličine čestica, uzorak se mora više usitniti i pomešati sa difuziono refleksionim materialom, sa KBr-om ako je potrebno. Preporuka je da čestice uzorka za analizu budu veličine od 2 do 5 μm .

Homogenost i koncentracija uzorka - bolji linearan odnos između intenziteta trake i koncentracije se dobija kod homogenih uzoraka. Da bi se dobio što bolji spektar potrebno je uzorak što bolje usitniti i pomešati sa KBr-om. Takođe je bitno uzorak pripremati neposredno pre samog snimanja. Visoka koncentracija uzorka koji imaju visok indeks refrakcije takođe može da izazove spekularnu refleksiju te stoga treba voditi računa o odnosu uzorka i KBr-a u smeši.

Uslovi snimanja spektara - obzirom da je put IR zraka kroz sistem za difuznu refleksiju sporiji, kod snimanja spektara se preporučuje snimanje sa što većim brojem skenova. Za snimanje se preporučuje minimalno 64 skena. Takođe, zbog osetljivih spektralnih karakteristika raznih praškastih uzoraka preporučuje se rezolucija od 2cm^{-1} .

7. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA U BLISKOJ IR OBLASTI (Near-infrared spectroscopy, NIRS) SA PRIMENOM HEMOMETRIKE

Infracrvena spektroskopija u bliskoj oblasti (NIRS) predstavlja značajnu vrstu infracrvene spektroskopije sa veoma širokom primenom. Oblast bliskog infracrvenog (Near infrared, NIR) zračenja može se podeliti na dve podoblasti: oblast dugih frekvencija od 13000 do 9000 cm^{-1} i oblast kratkih frekvencija od 9000 do 4000 cm^{-1} . Kao i u fundamentalnoj oblasti, interakcija između NIR zračenja i materije pruža korisne informacije o kvalitativnim i kvantitativnim osobinama uzorka. U infracrvenoj spektroskopiji u bliskoj oblasti posmatraju se, kako je to već pomenuto u uvodnom delu ove knjige overtone i kombinacione trake uglavnom najkarakterističnijih valencionih (CH, NH, OH) vibracija funkcionalnih grupa hemijskih jedinjenja (slika 7.1). Pošto su molarne apsorptivnosti (ekstinkcioni koeficijenti) overtone i kombinacionih traka veoma niske, materijali koji se koriste u ovoj oblasti su osetljiviji na transmisiju zračenja i skuplji.



Slika 7.1 Karakteristične trake u NIR oblasti

NIRS uzorci se snimaju najčešće u transmisionom ili refleksionom modu. Snimanje transmisionih spektara u NIR oblasti zahteva istu pripremu uzoraka kao i u fundamentalnoj oblasti, koriste se tehnike snimanja na pločici, u KBr tableti ili kivetama. Za snimanje refleksionih spektara koriste se tehnike oslabljene totalne refleksije kao i difuzno refleksione tehnike. Kod refleksionih tehnika veoma često nije potrebna prethodna priprema uzoraka, međutim postoje uslovi koje je bitno poznavati u cilju dobijanja što kvalitetnijeg spektra.

Temperatura uzorka - temperatura uzorka utiče na spektre vodenih rastvora i drugih tečnosti koje formiraju vodoničnu vezu, razlika od nekoliko stepeni može rezultovati značajnim promenama u spektru.

Prisustvo vlage i rastvarača - prisustvo vlage ili rastvarača u uzorku može značajno da utiče na izgled spektra, stoga je neophodno da se pre snimanja ovakvih uzoraka proveri prisustvo ovih komponenata u uzorku nezavisnim metodama. Ukoliko se određuje vlaga spektroskopski ovi uslovi ne važe.

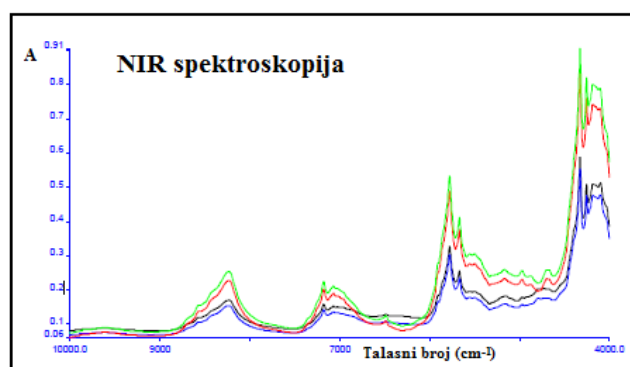
Debljina uzorka - debljina uzorka je poznat uzrok spektralne varijabilnosti i mora biti dobro proučena i kontrolisana. U transmisionim tehnikama debljina uzorka se kontroliše korišćenjem fiksiranih kiveta. Kod refleksionih tehnika debljina uzoraka kontroliše se korišćenjem uzoraka koji su „beskonačno tanki“ u odnosu na dubinu prodiranja NIR zraka u čvrsti materijal. „Beskonačno tanak“ uzorak je onaj kod kojeg se spektar ne menja ukoliko se debljina uzorka dvostruko poveća.

Optičke osobine uzorka - kod ispitivanja čvrstih uzoraka bitno je poznavati osobine površine uzorka kao i mogućnost rasipanja zračenja na uzorku. Kao i kod svake ATR i DRIFT tehnike pre analize treba razmotriti morfologiju površine uzorka, veličine čestica i indeks refrakcije uzorka.

Polimorfizam - varijacije u kristalnoj strukturi (polimorfizam) kod materijala istog hemijskog sastava mogu da utiču na izgled dobijenog spektra. Različite polimorfne i amorfne forme kao i različite hidratizane i solvatisane strukture čvrstih materijala mogu biti razlikovane na bazi NIR spektara.

Starost uzorka - tokom vremena uzorci mogu da menjaju svoje fizičko-hemijske osobine i zato je potrebno voditi računa o starosti uzoraka koji se analiziraju i koji se koriste za kalibraciju kao standardi.

Primena infracrvene spektroskopije u bliskoj oblasti bez korišćenja hemometrike izuzetno je ograničena, veoma je malo metoda kvalitativne i kvantitativne analize koje se koriste bez primene softvera i kompleksnih matematičkih modela. Kombinacija NIR spektroskopije sa hemometrikom predstavlja moćnu i modernu oblast analitičke hemije sa sve većom primenom u najrazličitijim vidovima analize raznih materijala. Na slici 7.2 prikazano je u svrhu kojih određivanja i predviđanja može uspešno da se primenjuje NIR spektroskopija sa hemometrikom.



+

Multivarijantna analiza $|Cov - \lambda I| = \begin{vmatrix} s_{x1}^2 - \lambda & C \\ C & s_{x2}^2 - \lambda \end{vmatrix} = 0$ $\begin{cases} y_1 = a_{10} + a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1n}x_n + e_1 \\ y_2 = a_{20} + a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \dots + a_{2n}x_n + e_2 \end{cases}$

Određivanje i predviđanje

=

Koncentracija	Starost
Hemijska osobina	Čistoća
Poreklo	Fizička osobina
Prihvatiti/odbaciti	Bioaktivnost

Slika 7.2 Primena NIRS u kombinaciji sa multivarijantnom analizom

Hemometrika u najopštijem smislu predstavlja metode procesiranja podataka različitim numeričkim tehnikama u cilju izdvajanja korisnih informacija. Hemometrijske tehnike su evoluirale u poslednjih 20 godina zahvaljujući dostupnosti moćnim i ne tako skupim računarima kao i razvoju različitih softvera.

Mnogi istraživači na polju analitičke hemije imaju poteškoće kod primene hemometrijskih tehnika u svom radu. Matematika koja se koristi može biti teško razumljiva i mnoge tehnike koriste apstraktne vektorske prostore koji se često čine kontrainuitivnim. Ovo su glavne ulazne barijere koje stvaraju poteškoće za primenu hemometrike.

U današnje vreme, hemometrika predstavlja oblast hemijske analize sa sve širom primenom, u ovoj knjizi ukratko će biti objašnjene samo osnove organizacije podataka i osnove nekih hemometrijskih metoda koje se najčešće koriste uz primenu NIRS a to su:

- Faktorski bazirane tehnike (analiza glavne komponente);
- Tehnike multi linearne regresije.

7.1 Organizacija podataka kod NIR hemometrijskih analiza

Kada se razmatra primena NIRS sa hemometrikom mora se suziti razmišljanje na to koja merenja se mogu koristiti i koje osobine predviđati. Uopšteno govoreći o ovoj tehnici, matematičari merenu osobinu obično nazivaju *nezavisna promenljiva* ili *x-promenljiva* ili *x-blok podataka*. Na sličan način osobina koja se želi predvideti naziva se *zavisno promenljiva*, *y-promenljiva* ili *y blok podataka*. Uzeto zajedno, set odgovarajućih *x* i *y* vrednosti jednog uzorka naziva se objekat. Ovaj sistem nomenklature je precizan i mnogi istraživači shvataju da ih ovaj sistem „drži između“ njih i podataka.

Kod primene hemometrike koristi se mnogo podataka i zbog toga veoma je korisno organizovati ih na dobar način. U suštini korisno je organizovati zavisno i nezavisno promenljive u odvojene matrice. U slučaju NIRS ako merimo apsorbancione spektre velikog broja uzoraka poznatih koncentracija, sve ove spektre organizujemo u takozvanu matricu apsorbancije. Takođe sve vrednosti koncentracija uzoraka postavljamo u odvojenu matricu koju zovemo matrica koncentracija. Matrica apsorbancije predstavlja *x blok* podataka a koncentraciona matrica sadrži zavisne promenljive, odnosno *y blok* podataka.

Prva stvar koju je potrebno rešiti je da li da se matrice organizuju u smislu kolona ili redova. Spektar jednog uzorka sastoji se od niza individualnih apsorbancija za svaku talasnu dužinu na kojoj je uzorak bio meren. Postavlja se pitanje da li da apsorbancije budu predstavljene u kolonama ili redovima. Ista odluka se mora doneti i kod matrice koncentracija. Ova odluka je totalno proizvoljna, jer matematičke operacije na matricama mogu se primeniti i na kolona i red definisane matrice.

Uopšteno, tehnike multilinearne regresije (Multiple linear regression, MLR) i faktorske tehnike poznate kao tehnike regresije glavne komponente (Principal component regression, PCR) organizuju matrice na oba načina i kao kolona i kao red-vektore. U ovoj knjizi biće objašnjeno organizovanje podataka u kolona vektore.

- Kolona organizovane matrice podataka za MLR i PCR

Matrica apsorbancije

Koristeći ovaj način organizacije podataka matrica apsorbancija sadrži spektralne podatke. Svaki spektar je postavljen u matricu kao kolona vektor.

$$\begin{array}{cccc}
 A_{11} & A_{12} & A_{13} & A_{1s} \\
 A_{21} & A_{22} & A_{23} & A_{2s} \\
 A_{31} & A_{32} & A_{33} & A_{3s} \\
 A_{w1} & A_{w2} & A_{w3} & A_{ws}
 \end{array} \tag{7.1}$$

Gde je A_{ws} apsorbancija na w -toj talasnoj dužini za uzorak s . Ako merimo spektre 30 uzoraka na 15 talasnih dužina, svaki spektar će se nalaziti u matrici kao

kolona vektor i sadržiće 15 vrednosti apsorbancije. Dimenzije ove matrice biće 30×15 (30 kolona 15 redova).

Matrica koncentracija

Matrica koncentracija sadrži podatke o koncentraciji, koncentracije komponenata uzorka su postavljene u matricu kao kolona vektori.

$$\begin{matrix} C_{11} & C_{12} & C_{13} & C_{1s} \\ C_{21} & C_{22} & C_{23} & C_{2s} \\ C_{31} & C_{32} & C_{33} & C_{3s} \\ C_{c1} & C_{c2} & C_{c3} & C_{cs} \end{matrix} \quad (7.2)$$

Gde je C_{cs} koncentracija c -te komponente uzorka s . Pretpostavimo da merimo koncentracije 4 komponente na svih 30 uzoraka, predhodno prikazanih. Koncentracije za svaki uzorak biće kolona vektori i sadržiće 4 vrednosti. Matrica će imati dimenzije 30×4 (30 kolona i 4 reda).

Uzete zajedno matrice apsorbancije i koncentracije čine „set“ podataka. Osnovno je da kolone ove dve matrice odgovaraju istoj smeši. Drugim rečima s -ta kolona matrice apsorbancije mora sadržavati spektar čije su koncentracije komponenata sadržane u s -toj koloni u matrici koncentracije. „Set“ podataka za jedan uzorak sadržavao bi apsorbancionu matricu sa jednom kolonom koja sadrži jedan spektar, sa odgovarajućom matricom koja sadrži takođe jednu kolonu koja sadrži koncentracije komponenata datog uzorka. Kako je rečeno ranije, takav podatak o jednom uzorku zove se objekat.

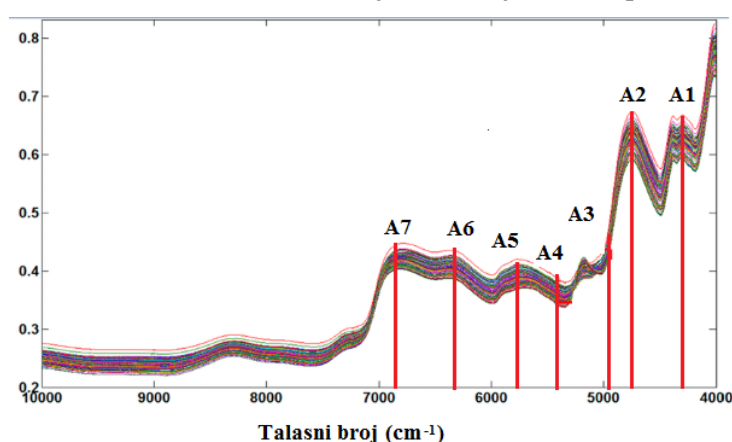
Kolona matrica se može pretvoriti u red matricu i obrnuto operacijom transponovanja matrice.

7.2 Analiza glavnim komponentama (Principial Component Analysis, PCA)

Analiza glavnim komponentama predstavlja rotaciju i transformaciju originalnih n osa koje predstavljaju originalne promenljive u glavne komponente, nove ose, dimenzije. Ova transformacija se vrši tako da nove ose leže u pravcu maksimalne varijanse i ortogonalne su što znači da nove ose ne koreliraju. Dva su osnovna razloga za korišćenje analize glavnih komponenata:

- Analiza glavnim komponentama se koristi da bi se redukovao multidimenzioni prostor promenljivih. Ako je neki sistem opisan sa n promenljivih, korišćenjem PCA linearnom kombinacijom originalnih promenljivih dobijaju se nove promenjive p koje mogu da opišu većinu varijanse sistema;
- Drugi razlog za korišćenje PCA je da ova kombinacija novih osa, dimenzija može otkriti neke skrivene strukture i interpretirati ih u hemijskom ili fizičko-hemijskom smislu.

Linearna kombinacija promenljivih izračunava se tako da se najbolje opiše n -dimenziona distribucija podataka. Potrebno je pronaći linearnu kombinaciju sa najvišom varijansom, sa normalizovanim koeficijentima primenjenim na promenljive koje se koriste za linearnu kombinaciju. Ova osa se zove glavna osa ili glavna komponenta. Kada se ona pronađe sledi traženje druge normalizovane linearne kombinacije koja opisuje preostalu varijansu i ne korelira sa prvom glavnom komponentom. Proces se ponavlja dok se ne izračunaju sve glavne komponente. U tom slučaju $p = n$ i odabere se podgrupa glavnih komponenata za dalju analizu i interpretaciju. Pre objašnjenja kako se izračunavaju glavne komponente bitno je grafički prikazati njihove strukture i karakteristike. Primer je dat u tabeli 7.1 u kojoj je predstavljeno 11 uzoraka polimera proizvedenih i tretiranih hlorom na različite načine za koje su snimljeni NIR spektri (slika 7.3).



Slika 7.3 Karakteristične trake uzoraka različito tretiranih polimera u NIR oblasti

Tabela 7.1 ApSORBANCije karakterističnih traka uzoraka polimera

	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7
1	0,98	0,81	0,45	0,28	0,31	0,22	0,26
2	0,97	0,88	0,61	0,25	0,33	0,25	0,28
3	0,93	0,82	0,52	0,23	0,35	0,23	0,27
4	0,99	0,87	0,55	0,41	0,32	0,24	0,28
5	0,94	0,84	0,43	0,33	0,33	0,23	0,29
6	0,95	0,85	0,66	0,37	0,34	0,22	0,29
7	0,99	0,86	0,39	0,39	0,34	0,24	0,28
8	0,88	0,84	0,42	0,45	0,38	0,26	0,27
9	0,89	0,85	0,57	0,26	0,33	0,25	0,28
10	0,90	0,84	0,51	0,27	0,34	0,24	0,28
11	0,92	0,83	0,39	0,47	0,34	0,24	0,27

Da bi se pronašla linearna kombinacija promenljivih $A_1 - A_7$, glavna komponenta koja opisuje najviše varijanse i koja najbolje opisuje 7-dimenzionu distribuciju podataka prvo je potrebno odrediti matricu kovarijanse za podatke. Matrica kovarijanse data je u tabeli 7.2.

Tabela 7.2 Matrica kovarijanse za podatke

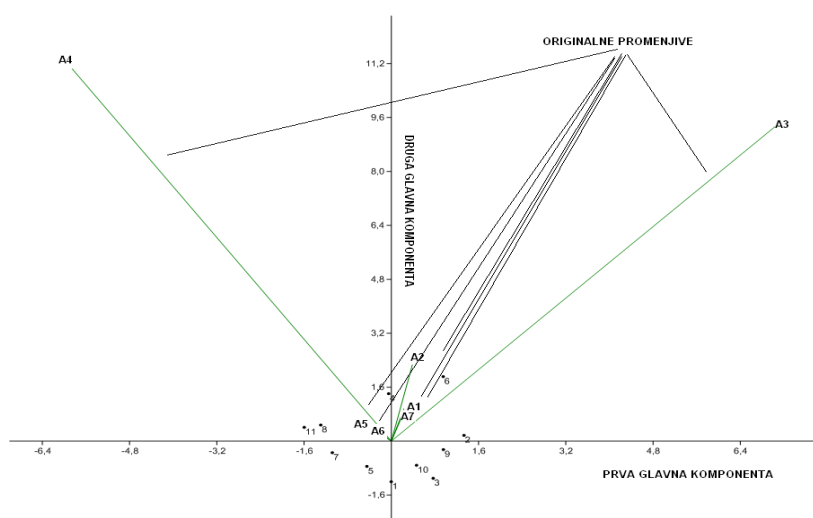
	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7
A_1	0,0016	0,0002	0,0002	-0,00012	-0,00045	-0,00023	0,00002
A_2	0,0002	0,0005	0,0008	0,00022	-0,00026	0,00011	0,00011
A_3	0,0002	0,0008	0,0083	-0,00351	-0,00036	-0,00015	0,00036
A_4	-0,0001	0,0002	-0,0035	0,00721	0,00054	0,00022	0,00018
A_5	-0,0004	-0,0003	-0,0004	0,00051	0,00032	0,00011	-0,00081
A_6	-0,0002	0,0001	-0,0001	0,00026	0,00011	0,00015	-0,00045
A_7	-0,0002	0,0001	0,0004	0,00018	-0,00016	-0,00054	-0,00081

Na matricu kovarijanse primenjuje se opšti problem svojstvenih vrednosti, to jest za matricu kovarijanse se pronalaze svojstveni vektori i odgovarajuće svojstvene vrednosti. Generalno, svojstvena vrednost je faktor (skalar) koji je pridružen određenom operatoru A (npr. matrici kovarijanse) preko jednačine:

$$A \cdot x = \lambda \cdot x \quad (7.3)$$

gdje je x svojstveni vektor, a λ svojstvena vrednost.

Svaka svojstvena vrednost definiše dužinu nove ose-glavne komponente koja je linearna kombinacija originalnih promenljivih. Svojstveni vektori definišu nagibe novih osa, odnosno glavnih komponentata.



Slika 7.4 Odnos originalnih promenljivih i glavnih komponenata

Glavne komponente su ortogonalne i mogu se definisati pomoću sledećih izraza:

$$GK_1 = 0,026A_1 + 0,046A_2 + 0,761A_3 - 0,643A_4 - 0,057A_5 - 0,023A_6 - 0,024A_7$$

$$GK_2 = 0,067A_1 + 0,170A_2 + 0,626A_3 - 0,754A_4 - 0,036A_5 - 0,019A_6 - 0,057A_7$$

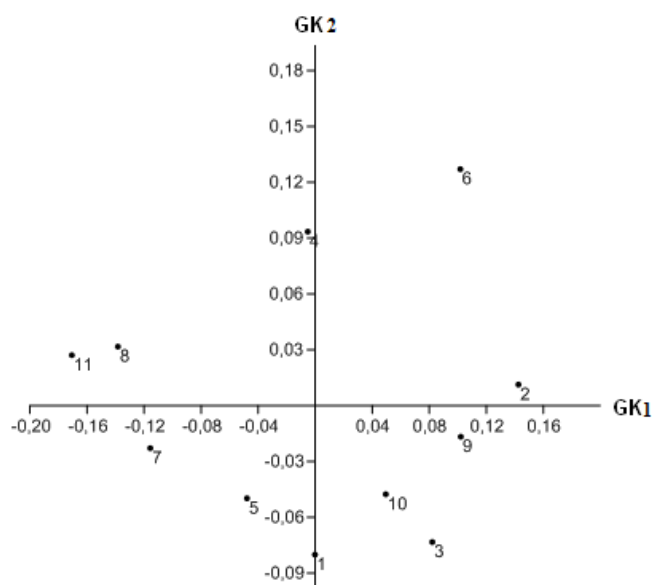
Koeficijenti u jednačini glavne komponente predstavljaju koeficijente za originalne podatke i nazivaju se „loadings“ vrednosti. Ove vrednosti nam govore koliki je doprinos originalnih promenljivih novoj raspodeli podataka u sistemu glavnih komponenata. U gornjem primeru promenljive A_3 i A_4 su najodgovornije za raspodelu uzoraka u sistemu glavnih komponenata, što vodi razdvajanju i klasterovanju uzoraka. U tabeli 7.3 prikazan je doprinos prve tri glavne komponente ukupnoj varijansi podataka.

Tabela 7.3 Doprinos glavnih komponenata ukupnoj varijansi

	GK_1	GK_2	GK_3
Varijansa	0,0114	0,0044	0,0017
% Varijanse	63	25	10
Kumulativni doprinos %	63	88	98

Prema vrednostima iz gornje tabele se može videti da preko 97% ukupne varijanse može biti opisano sa prve tri glavne komponente. Na ovaj način izvršena je redukcija multidimenzionog prostora, drugim rečima varijacije za 11 uzoraka polimera skoro su potpuno opisane sa tri glavne komponente umesto sa 7 promenljivih.

''Skor'' (score) grafik prve dve glavne komponente otkriva evidentne obrasce među uzorcima prema spektroskopskim parametrima, odnosno talasnim dužinama datim u podacima.



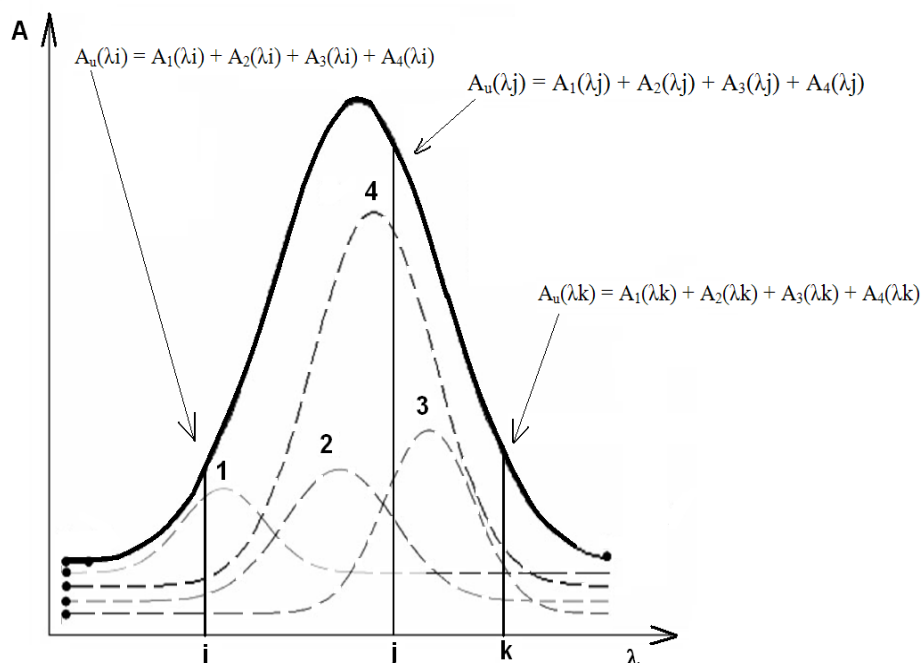
Slika 7.5 "Skor" grafik za prve dve glavne komponente

Na osnovu položaja uzoraka u "score" grafiku može se zaključiti da uzorci 11, 7 i 8 kao i uzorci 10 i 3 čine dva klastera sličnih osobina, dok se uzorci 2, a naročito 6 ponašaju potpuno atipično.

7.3. Tehnike multi linearne regresije

Kalibracija u analitičkoj hemiji opisuje relaciju između domena uzorka i domena merenja (domen signala) i izražava se analitičkom funkcijom koja sa jedne strane kao nezavisno promenjivu ima koncentraciju uzorka, a sa druge strane kao rezultat merenja ili zavisno promenjivu ima vrednosti nekih fizičko-hemijskih parametara, podatke sa spektara ili hromatograma.

Tehnike multilinearnih kalibracija baziranih na primeni IR spektara najbolje se mogu objasniti na primerima kalibracionih spektara kod kojih se određuje više komponenata na više talasnih dužina. Kao primer pretpostavimo da imamo IR spektar koji pokazuje apsorbcije četiri komponente koje želimo kvantitativno da odredimo, a koje apsorbuju na tri različiti talasne dužine. Ako se posmatraju podaci na slici 7.6, a koja prikazuje apsorbciju četvorokomponentnog uzorka može se uočiti da ukupna apsorbcija kompleksnog pika na nekoj talasnoj dužini j predstavlja zbir apsorbcija četiri apsorbujućih vrsta koje se nalaze u uzorku u datom vremenu.



Slika 7.6 IR spektar za apsorpciju tri komponente u smeši na četiri talasne dužine

Na osnovu aditivnosti *Lambert-Beer*-ovog zakona mogu se za tri talasne dužine i, j, k pisati sledeće izrazi:

$$\begin{aligned} A_u(\lambda_i) &= A_1(\lambda_i) + A_2(\lambda_i) + A_3(\lambda_i) + A_4(\lambda_i) \\ A_u(\lambda_j) &= A_1(\lambda_j) + A_2(\lambda_j) + A_3(\lambda_j) + A_4(\lambda_j) \\ A_u(\lambda_k) &= A_1(\lambda_k) + A_2(\lambda_k) + A_3(\lambda_k) + A_4(\lambda_k) \end{aligned} \quad (7.4)$$

$$\begin{aligned} A_u(\lambda_i) &= C_1 S_1(\lambda_i) + C_2 S_2(\lambda_i) + C_3 S_3(\lambda_i) + C_4 S_4(\lambda_i) \\ A_u(\lambda_j) &= C_1 S_1(\lambda_j) + C_2 S_2(\lambda_j) + C_3 S_3(\lambda_j) + C_4 S_4(\lambda_j) \\ A_u(\lambda_k) &= C_1 S_1(\lambda_k) + C_2 S_2(\lambda_k) + C_3 S_3(\lambda_k) + C_4 S_4(\lambda_k) \end{aligned} \quad (7.5)$$

Gde C predstavlja koncentraciju apsorbujuće vrste, a S predstavljaju ekstinkcione koeficijente date komponente na datim talasnim dužinama. Gornji sistem jednačina se može predstaviti u matricnom obliku:

$$A = C \times S \quad (7.6)$$

Gde A predstavlja matricu apsorpcije kod koje broj redova predstavlja broj spektara za kalibraciju a broj kolona broj talasnih dužina na kojima se vrši određivanje. C predstavlja matricu koncentracija kod koje je broj redova broj spektara za kalibraciju a broj kolona broj komponenta čije se koncentracije

određuju. S predstavlja matricu ekstinkcionih koeficijenata kod kojih broj redova predstavlja broj komponenata a broj kolona broj talasnih dužina. U slučaju kada imamo jedan kalibracioni spektar kako je prikazano na slici 7.6 jednačina u matičnom obliku glasi:

$$\begin{bmatrix} A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \end{bmatrix} x \begin{bmatrix} S_{1\lambda i} & S_{1\lambda j} & S_{1\lambda k} \\ S_{2\lambda i} & S_{2\lambda j} & S_{2\lambda k} \\ S_{3\lambda i} & S_{3\lambda j} & S_{3\lambda k} \\ S_{4\lambda i} & S_{4\lambda j} & S_{4\lambda k} \end{bmatrix} \quad (7.7)$$

U slučaju kada bi se kalibracija određivala pomoću 5 spektara matična jednačina bi glasila:

$$\begin{bmatrix} A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \\ A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \\ A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \\ A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \\ A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \\ C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \\ C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \\ C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \\ C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \end{bmatrix} x \begin{bmatrix} S_{1\lambda i} & S_{1\lambda j} & S_{1\lambda k} \\ S_{2\lambda i} & S_{2\lambda j} & S_{2\lambda k} \\ S_{3\lambda i} & S_{3\lambda j} & S_{3\lambda k} \\ S_{4\lambda i} & S_{4\lambda j} & S_{4\lambda k} \end{bmatrix} \quad (7.8)$$

S obzirom da svako određivanje sadrži određenu slučajnu eksperimentalnu grešku u slučaju IR spektroskopije to je šum, da bi sa što većom preciznošću i tačnošću odredili koncentracije komponenata potrebno je u matičnu jednačinu dodati i matricu grešaka tako da konačna jednačina glasi:

$$A = C \times S + E \quad (7.9)$$

U slučaju kalibracije sa pet spektara:

$$\begin{bmatrix} A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \\ A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \\ A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \\ A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \\ A_{\lambda i} & A_{\lambda j} & A_{\lambda k} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \\ C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \\ C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \\ C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \\ C_1 & C_2 & C_3 & C_4 \end{bmatrix} x \begin{bmatrix} S_{1\lambda i} & S_{1\lambda j} & S_{1\lambda k} \\ S_{2\lambda i} & S_{2\lambda j} & S_{2\lambda k} \\ S_{3\lambda i} & S_{3\lambda j} & S_{3\lambda k} \\ S_{4\lambda i} & S_{4\lambda j} & S_{4\lambda k} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} E_{\lambda i} & E_{\lambda j} & E_{\lambda k} \\ E_{\lambda i} & E_{\lambda j} & E_{\lambda k} \\ E_{\lambda i} & E_{\lambda j} & E_{\lambda k} \\ E_{\lambda i} & E_{\lambda j} & E_{\lambda k} \\ E_{\lambda i} & E_{\lambda j} & E_{\lambda k} \end{bmatrix} \quad (7.10)$$

Ova jednačina predstavlja klasičan multiregresioni model napisan u matičnom obliku i definiše zavisnost apsorbancije od koncentracije komponenata za višekomponentni sistem na više talasnih dužina. Snimanjem kalibracionih spektara poznatih multikomponentnih smeša (kalibracionih rastvora) mogu se odrediti ekstinkcioni koeficijenti definisani matricom S i na taj način mogu se kvantitativno određivati koncentracije komponenata merenjem apsorbancija na

definisanim talasnim dužinama. Kvantitativna određivanja baziraju se na korišćenju takozvane inverzne kalibracije. U klasičnom univarijantnom kalibracionom modelu baziranom na *Lamber-Beer*-ovom zakonu koncentracija je povezana sa apsorbcijom na sledeći način:

$$A=a+bC \quad (7.11)$$

Gde a predstavlja odsečak dok b predstavlja nagib (ekstinkcioni koeficijent). Inverzioni kalibracioni model dat je sledećom jednačinom:

$$C=A-a/b \quad (7.12)$$

Na ovaj način koncentracija se dobija direktno kao funkcija spektralnih merenja. Inverzioni model se pokazao kao pouzdan zbog bolje osetljivosti (bolja eliminacija šuma iz spektralnih merenja) i tačnosti u odnosu na direktni model.

Nedostatci kalibracionih modela kako direktnog tako i inverzionog su najčešće kolinearnost među nezavisno promenljivim veličinama. Da bi se uspostavila zavisnost između zavisno i nezavisno promenljivih veličina i konstruisao kalibracioni model potrebno je odrediti matricu ekstinkcionih koeficijenata S . Rešenje za jednačinu 7.9 u matricnom obliku glasi:

$$S=(A^T \times A)^{-1} \times A^T \times C \quad (7.13)$$

Problem koji se najčešće javlja je problem kolinearnosti, da bi se rešila matrica koeficijenata S , determinanta matrice nezavisno promenjive A ne sme biti jednaka 0. U slučajevima kada kolone u matrici apsorbcije imaju vrednost 0 ili kada su vrednosti dveju kolona identične ili pokazuju visoku korelaciju, tada je matrica A singularna i ne može se rešiti. Da bi se rešio ovaj problem najčešće se povećava broj standarda za kalibraciju i vrši se pažljiva selekcija talasnih dužina na kojima će se vršiti određivanja.

Regresione metode bazirane na kompresiji podataka

Cilj svakog kvantitativnog određivanja baziranog na primeni spektroskopije i hemometrike je dobijanje što je moguće više informacija iz spektralnih podataka i prevazilaženje problema kolineranosti koji se javljaju kod sistema jednačina. Na polju hemometrike su razvijene tehnike i metode analize koje uspešno rešavaju ove probleme. Zajedničko za sve ove metode je da se baziraju na kompresiji podataka, naime, kako je objašnjeno u prethodnom poglavlju (analiza glavnih komponenta) originalne promenjive se kombinuju u nove promenjive koje predstavljaju linearne kombinacije originalnih promenljivih. Ove nove promenjive se nazivaju glavne komponente, latentne varijable ili faktori. Ovakvom kompresijom podataka smanjuje se broj promenljivih za analizu i rešava se problem kolinearnosti. Dve metode koje se najčešće koriste su metoda regresije glavnih komponenta i metoda parcijalnih najmanjih kvadrata. Kod obe metode zajedničko je da se vrši regresija, odnosno uspostavlja se linearna zavisnost između

koncentracije i glavnih komponenata. Detaljniji opis ovih metoda prevazilazi okvire ove knjige, velika količina informacija o ovima metodama kao i o primeni istih u raznim oblastima može se pronaći u literaturi.

TABELA KARAKTERISTIČNIH TRAKA FUNKCIONALNIH GRUPA

Grupa	Intenzitet	Opseg frekvencija (cm ⁻¹)
C-H VALENCIONA		
Alkani	(m-s)	2962-2853
Alkeni, monosupstituisani (vinil)	(m)	3040-3010 3095-3075
Alkeni, disupstituisani, <i>cis</i>	(m)	3040-3010
Alkeni, disupstituisani, <i>trans</i>	(m)	3040-3010
Alkeni, disupstituisani, <i>gem</i>	(m)	3095-3075
Alkeni, trisupstituisani	(m)	3040-3010
Alkini	(s)	~3300
Aromatični	(v)	~3300
C-H DEFORMACIONA		
Alkani, C-H	(w)	~1340
Alkani, -CH ₂ -	(m)	1485-1445
Alkani, -CH ₃	(m)	1470-1430
	(s)	1380-1370
Alkani, <i>gem-dimetil</i>	(s)	1385-1380
	(s)	1370-1365
Alkani, <i>terc-butil</i>	(m)	1395-1385
	(s)	~1365
Alkeni, monosupstituisani (vinil)	(s)	995-985
	(s)	915-905
	(s)	1420-1410
Alkeni, disupstituisani, <i>cis</i>	(s)	~690
	(s)	
Alkeni, disupstituisani, <i>trans</i>	(s)	970-960
	(m)	1310-1295
Alkeni, disupstituisani, <i>gem</i>	(s)	895-885
	(s)	1420-1410
Alkeni, trisupstituisani	(s)	840-790
Alkini	(s)	~630
Aromatična, supstitucija tipa:		
• 5 susednih atoma vodonika	(v, s)	~750
• 4 susedna atoma vodonika	(v, s)	~750
• 3 susedna atoma vodonika	(v, m)	~780
• 2 susedna atoma vodonika	(v, m)	~830
• 1 susedni atoma vodonika	(v, m)	~880
(C=C, C≡C) VALENCIONA VIŠESTRUKA		
Alkani, nekonjugovani	(v)	1680-1620
Alkeni, monosupstituisani (vinil)	(m)	~1645
Alkeni, disupstituisani, <i>cis</i>	(m)	~1658

Alkeni, disupstituisani, <i>trans</i>	(m)	~1645
Alkeni, disupstituisani, <i>gem</i>	(m)	~1675
Alkeni, trisupstituisani	(m)	~1653
Alkeni, tetrasupstituisani	(w)	~1669
Dieni	(w)	1650
Alkini monosupstituisani	(m)	2140-2100
Alkini disupstituisani	(v,w)	2260-2190
Aleni	(m)	1950
Aromatični	(v)	~1600
	(v)	~1580
	(m)	~1500
	(m)	~1450

C=O KARBONILNA VALENCIONA**C=O Karbonilna valenciona grupa kod ketona**

Zasićeni aciklični	(s)	1725-1705
Zasićeni ciklični	(s)	
6-i višočlani	(s)	1725-1705
5-člani	(s)	1750-1740
4-člani		~1775
α , β Nezasićeni aciklični	(s)	1685-1665
α , β Nezasićeni ciklični	(s)	
6-i višočlani	(s)	1685-1665
5-člani	(s)	1724-1708
Aril	(s)	1700-1680
Diaril	(s)	1670-1660
α -Diketoni	(s)	1730-1710
β -Diketoni (enolni)	(s)	1640-1540
1,4-Hinoni	(s)	1690-1660
Keteni	(s)	~2150

C=O Karbonilna valenciona grupa kod aldehida

Zasićeni alifatični	(s)	1740-1720
α , β , Nezasićeni alifatični	(s)	1705-1680
α , β , γ , δ , Nezasićeni alifatični	(s)	1680-1660
Aril	(s)	1715-1695

C=O Karbonilna valenciona grupa kod estara

Zasićeni aciklični	(s)	1750-1720
Zasićeni ciklični		
δ - laktoni (i veći prstenovi)	(s)	1750-1735
γ - laktoni	(s)	1780-1760
β - laktoni	(s)	~1820
Nezasićeni		
Vinil estri	(s)	1800-1770
α , β - nezasićeni i aril	(s)	1730-1717
α , β - nezasićeni δ -laktoni	(s)	1730-1717
α , β -nezasićeni γ -laktoni	(s)	1760-1740
β , γ -nezasićeni γ -laktoni	(s)	~1880

α - ketoestri	(s)	1755-1740
β - ketoestri (enolni)	(s)	~1650
Karbonati	(s)	1780-1740

C=O Karbonilna valenciona grupa kod karboksilnih kiselina
--

Zasićeni alifatični	(s)	1725-1700
Nezasićeni alifatični	(s)	1715-1690
Aril	(s)	1700-1680
Karboksilatni anjon	(s)	1610-1550
	(s)	1400-1300

C=O Karbonilna valenciona grupa kod anhidrida
--

Zasićeni aciklični	(s)	1850-1800
	(s)	1790-1740
α , β - nezasićeni i aril, aciklični	(s)	1830-1780
	(s)	1770-1720
Zasićeni 5-člani prsten	(s)	1870-1820
	(s)	1800-1750
α , β - nezasićeni, 5-člani prsten	(s)	1850-1800
	(s)	1830-1780

C=O Karbonilna valenciona grupa kod acil halida
--

Acil fluoridi	(s)	~1850
Acil hloridi	(s)	~1795
Acil bromidi	(s)	~1810
α , β - nezasićeni i aril	(s)	1780-1750
	(m)	1750-1720
COF ₂	(s)	1928
COCl ₂	(s)	1828
COBr ₂	(s)	1828

C=O Karbonilna valenciona grupa kod amida
--

Primarni, u čvrstom stanju i koncentrovani rastvori	(s)	~1650
Primarni razblaženi	(s)	~1690
Sekundarni u čvrstom stanju i koncentrovani rastvori	(s)	1680-1630
Sekundarni razblaženi	(s)	1700-1670
Tercijarni čvrsti i u svim rastvorima	(s)	1670-1630
Ciklični, - laktami, razblaženi	(s)	~1680
Ciklični, - laktami, razblaženi	(s)	~1700
Ciklični, - laktami, vezani za prsten, razblaženi	(s)	1750-1700
Ciklični, - laktami, razblaženi	(s)	1760-1730
Ciklični, -laktami, vezani za prsten, razblaženi	(s)	1780-1770
Uree aciklični	(s)	~1660
Uree ciklični		
6 - člani	(s)	~1640

5 - člani	(s)	~1720
Uretani	(s)	1740-1690
Imidi aciklični	(s)	~1710
Imidi ciklični		
6 - člani	(s)	1730
5 - člani	(s)	1770
N-H valenciona grupa kod amida		
Primarna slobodna dve trake	(m)	~3500, ~3400
Primarna vezana dve trake	(m)	~3350, ~3180
Sekundarna slobodna	(m)	~3430
Sekundarna vezana	(m)	3320-3140
N-H deformaciona grupa kod amida		
Primarni amididi razblaženi rastvori	(s)	1620-1590
Sekundarni amididi razblaženi rastvori	(s)	1550-1510
O-H valenciona grupa kod alkohola i fenola		
Slobodna O-H	(v,sh)	3600-3590
Intermolekulski vezana O-H grupa		
Dimeri	(v,sh)	3550-3450
Polimeri	(s,b)	3400-3200
Intramolekulski vezana O-H grupa		
Dimeri	(v, sh)	3570-3450
Helati	(w,b)	3200-2500
O-H deformaciona grupa i C-O valenciona kod alkohola i fenola		
Primarni alkoholi	(s)	~1050
	(s)	1135-1260
Sekundarni alkoholi	(s)	~1100
	(s)	1350-1260
Tercijarni alkoholi	(s)	~1150
	(s)	1410-1310
Fenoli	(s)	~1200
	(s)	1410-1310
N-H valenciona vibracija kod amina		
Primarna slobodna dve trake	(m)	~3500
Primarna vezana dve trake	(m)	~3400
Sekundarna slobodna dve trake	(m)	3500-3310
Imini jedna traka	(m)	3400-3300
Amino soli	(m)	3130-3030
N-H deformaciona vibracija kod amina		
Primarni	(s,m)	1650-1590
Sekundarni	(w)	1650-1550
Amino soli	(s)	1600-1575
C-N vibracije kod amina		
Aromatični, primarni	(s)	1340-1250
Aromatični, sekundarni	(s)	1350-1280
Aromatični, tercijarni	(s)	1360-1310

Alifatični	(w)	1220-1020
C≡N Valencione vibracije <u>specifična azotova jedinjenja</u>		
Alkil nitrili	(m)	2260-2240
Aril nitrili	(m)	2235-2215
Izocijanati	(m)	2240-2220
Izocijanidi	(m)	2275-2240
C=N (imini oksimi) Valencione vibracije <u>specifična azotova jedinjenja</u>		
Alkil	(v)	1690-1640
Nezasićene komponente	(v)	1660-1630
-N=N- azo komponente	(v)	1630-1575
-N=C=N- diimidi	(s)	2155-2130
-N ₃ azidi	(s)	2160-2120
C-NO ₂ nitrokomponente -aromatične	(s)	1570-1500
C-NO ₂ nitrokomponente -alifatične	(s)	1380-1370
O-NO ₂ nitrati	(s)	1650-1600
C-NO nitrozo komponente	(s)	1600-1500
O-NO nitriti	(s)	1680-1650
Halogene komponente i jedinjenja sa sumporom		
C-F	(s)	1400-1000
C-Cl	(s)	800-600
C-Br	(s)	600-500
C-I	(s)	500
S-H	(w)	2600-2550
C=S	(s)	1200-1050
S=O	(s)	1070-1030

- Veoma jaka i oštra traka – *very strong* (vs)
- Jaka traka – *strong* (s)
- Srednja traka – *medium* (m)
- Slaba traka – *weak* (w)

LITERATURA

1. A. Antić-Jovanović, Molekulska spektroskopija, Fakultet za fizičku hemiju Beograd 2016.
2. H. Gunzler, H.U. Gremlich, Uvod u infracrvenu spektroskopiju, Školska knjiga Zagreb, 2006.
3. P.W. Atkins, J. De Paula, Physical Chemistry, Oxford University Press, 2010.
4. J.M. Chalmers, P.R. Griffiths, Handbook of Vibrational Spectroscopy Vol. 4, Wiley, 2002.
5. D.A. Burns, E.W. Ciurczak, (Eds.) Handbook of Near-Infrared Analysis, Marcel Dekker, Inc 2001.
6. W.G. Richards, P.R. Scot, Structure and Spectra of Molecules, Wiley, 1985.
7. A.M.C Davies, R. Giangiacomo, (Eds.) Near Infrared Specroscopy (*Proceedings of the 9th International Conference*) Verona Italy, Nir Publications 2000.