

На правах рукописи

Баюнов Александр Павлович

**ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ СПЕКТРОВ ДИФФУЗНОГО ОТРАЖЕНИЯ В
БЛИЖНЕМ ИК-ДИАПАЗОНЕ ПРИ АНАЛИЗЕ СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА
КОМБИКОРМОВ**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2013

Работа выполнена на кафедре неорганической и аналитической химии Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева

Научный руководитель: **Смарыгин Сергей Николаевич,**
кандидат химических наук, доцент, заведующий кафедрой неорганической и аналитической химии Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева

Официальные оппоненты: **Зайцев Петр Михайлович,**
доктор химических наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник аналитической лаборатории Научно-исследовательского института по удобрениям и инсектофунгицидам имени профессора Я.В.Самойлова

Дайдакова Ирина Викторовна,
кандидат химических наук, доцент, заведующая отделом Общества с ограниченной ответственностью «Аналитикум»

Ведущая организация: Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

Защита диссертации состоится «28» ноября 2013 г. в 11.30 на заседании диссертационного совета при Российском химико-технологическом университете имени Д.И. Менделеева по адресу: 125047, Москва А-47, Миусская пл., 9 (1-я Миусская ул. 3)

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат разослан «21» октября 2013 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
Д 212.204.07

Шаталов К.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Комбикорма - сложные смеси кормовых средств и микродобавок различной крупности. В процессе их производства необходим аналитический контроль сырья и готовой продукции. Большая часть методов, традиционно применяемых для анализа этих объектов требует существенных затрат времени, реактивов и средств. Фурье-спектроскопия в ближней инфракрасной области (**БИК-спектроскопия**) в сочетании с хемометрическим подходом для анализа данных позволяет осуществлять экспрессные и недорогие количественные и качественные анализы этих объектов (**БИК-анализ**). БИК-спектроскопия широко применяется для анализа объектов окружающей среды, нефтепродуктов, продукции сельского хозяйства, пищевой и фармацевтической промышленности. К числу преимуществ этого метода относятся высокая информативность, экспрессность (один спектр снимается в среднем не более минуты), минимальная пробоподготовка, отсутствие потребности в химических реактивах, возможность проведения неdestructивного анализа. Однако, несмотря на большое распространение метода, наличие на рынке широкой гаммы ИК-Фурье спектрометров, мало исследованы физические факторы, влияющие на конечный результат анализа и его метрологические характеристики. На формирование БИК-спектров, а, следовательно, и на их воспроизводимость оказывает влияние целый ряд факторов: содержание влаги в анализируемом образце и атмосфере, в которой находится прибор, постоянство температуры прибора (источник излучения, оптическая схема, детектор), физическое состояние пробы, ее однородность, размер частиц ее составляющих, воспроизводимость процедур юстировки прибора и т.д. При построении градуировочных моделей для количественного анализа имеется недостаточное число доступных баз данных по спектрам в ближнем ИК-диапазоне.

Изучение влияния факторов, оказывающих негативное влияние на воспроизводимость спектров на физическом уровне, может быть предпосылкой разработки способов улучшения метрологических характеристик метода, увеличения устойчивости градуировочных моделей. Разработка метода количественной оценки воспроизводимости спектров может позволить оценить достоверность результатов измерений еще до построения градуировочных моделей, что существенно сэкономит время и затраты труда пользователей БИК-спектрометров.

Цель работы - разработка метода повышения точности результатов спектроскопии диффузного отражения в ближнем ИК-диапазоне при анализе полидисперсных химически неоднородных объектов, в том числе комбикормов.

В соответствии с поставленной целью было необходимо решить следующие **задачи**:

- Разработать способ оценки воспроизводимости спектров диффузного отражения образцов, основанный на корреляционных зависимостях относительного стандартного отклонения от интенсивности усредненного ИК-спектра.
- Оценить особенности поведения метрологических характеристик градуировочных моделей на примере двухкомпонентных модельных смесей.

- Разработать способ количественного учёта влажности при помощи спектральной коррекции для снижения систематической погрешности градуировочной модели.
- Проверка применимости полученных результатов на примере анализа промышленных образцов кормов

Научная новизна работы.

Предложен способ оценки воспроизводимости спектров диффузного отражения образцов, основанный на корреляционных зависимостях относительного стандартного отклонения от интенсивности усредненного ИК-спектра. Применимость способа показана в результатах экспериментов с модельными системами, содержащими компоненты реальных кормов. Предложен способ подготовки полидисперсных объектов – таблетирование.

Построены градуировочные модели для определения содержания добавки аминокислоты в модельных смесях, имитирующих комбикорма, а также, градуировочная модель для определения содержания глюкозинолатов в семенах рапса. Было показано, что измельчение образцов семян рапса приводит к значительному ухудшению характеристик градуировочной зависимости.

Предложен способ количественного учёта влажности при помощи спектральной коррекции. Для этого разработан расчётный способ сравнения спектров с представлением результата в графическом виде для выявления спектральных диапазонов с максимально различающимися интенсивностями.

Практическая значимость.

- Разработанные в ходе диссертационного исследования подходы позволяют уменьшить время и стоимость БИК-анализа и повысить надёжность результатов.
- Предложенные в работе предварительные эксперименты позволяют оценить целесообразность планируемого анализа и *a priori* выбрать условия его проведения, а также оценить правильность результатов анализов, осуществляемых для контроля качества сырья для производства комбикормов и конечного продукта.

На защиту выносятся:

- Способ оценки воспроизводимости спектров диффузного отражения образцов, основанный на корреляционных зависимостях относительного стандартного отклонения от интенсивности усредненного ИК-спектра.
- Градуировочные модели для определения содержания добавки аминокислоты в модельных смесях, имитирующих комбикорма.
- Градуировочная модель для определения содержания глюкозинолатов в семенах рапса.
- Способ количественного учёта влажности при помощи спектральной коррекции.
- Корреляционный способ сравнения спектров с представлением результата в графическом виде для выявления спектральных диапазонов с максимально различающимися интенсивностями.
- Таблетирование образцов как способ снижения случайной погрешности.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на: Международной конференции «Адаптация сельского хозяйства к меняющимся погодноклиматическим условиям» (Москва, 2010), Международной научной конференции молодых ученых и специалистов РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, посвященной 125-летию со дня рождения академика Н.И. Вавилова (Москва, 2011), Международной конференции «Физико-химический анализ органических соединений растительного происхождения» (Санкт-Петербург, 2011), Международной конференции «Проблемы развития АПК и сельских территорий в 21 веке» (Москва, 2011), VI Международной заочной научно-практической интернет-конференции «Инновационные фундаментальные и прикладные исследования в области химии сельскохозяйственному производству» (Орел, 2013), VII Всероссийской научно-практической конференции «Аграрная наука в XXI веке: проблемы и перспективы» (Саратов, 2013)

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 7 печатных работах, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Личное участие автора. Автор участвовал в постановке задач, решаемых в диссертационной работе, самостоятельно проводил большинство экспериментов, обработку и интерпретацию экспериментальных данных, осуществлял подготовку публикаций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора (глава 1), экспериментальной части (глава 2), результатов и их обсуждения (глава 3), выводов и списка литературы из 63 наименований. Диссертация включает в себя 132 страницы, 34 рисунка и 24 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы ее цель и задачи.

В первой главе проведен анализ литературных данных, посвященных анализу комбикормов. Проведено описание комбикормов и методов их анализа. Рассмотрены достоинства и недостатки методов анализа комбикормов, на основании чего в качестве основного метода исследования был выбран метод Фурье-спектроскопии в ближнем ИК-диапазоне. Описаны факторы, усложняющие анализ химически-неоднородных полидисперсных объектов (в т.ч., комбикормов и сырья, используемого для их производства) методом БИК-спектроскопии.

Во второй главе описаны методики экспериментов.

Измерение спектров диффузного отражения в диапазоне $4000\text{--}10000\text{ см}^{-1}$ проводили на ИК Фурье-спектрометре для ближней и средней области Spectrum 400 (Perkin Elmer, США) с интегрирующей сферой NIRA. Спектры в средней области ИК ($650\text{--}4000\text{ см}^{-1}$) снимали на том же приборе с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Обработку спектров и расчет результатов проводили с помощью программного обеспечения Spectrum (Perkin Elmer).

Градуировочные модели для количественного анализа строили методами регрессии на главных компонентах (Principal Component Regression, PCR) и методом наименьших дробных квадратов (Partial Least Squares, PLS1) в программном обеспечении Quant+ (Perkin Elmer).. При проверке градуировочных моделей для каждого контрольного образца рассчитывали дисперсию s^2 , стандартное отклонение s , стандартное относительное отклонение s_r . Однородность дисперсий проверяли по тесту Кохрена. Нормальность распределения результатов проверяли графическим способом квантилей. Оптимизацию градуировочных моделей проводили, пока значение стандартной ошибки предсказания SEP и абсолютной погрешности, средней для всех образцов и всех параллельных измерений Δ становились минимальными. Систематические погрешности выявляли с помощью t -критерия. Тренды оценивали с помощью анализа остатков.

Для построения градуировочных зависимостей в ближнем диапазоне ИК использовали образцы пшеницы различных сортов и годов урожая. Референтные значения содержания сырого протеина в зерне пшеницы получали методом Кьельдаля.

Была построена градуировочная модель для определения содержания глюкозинолатов в семенах рапса. В качестве референтного метода использовали метод ВЭЖХ.

Модели для идентификации белков животного и растительного происхождения строили с помощью алгоритма SIMCA на программном обеспечении AssureID (Perkin Elmer).

Сравнение информативности ближнего и среднего ИК-диапазонов проводили графически. По осям откладывали расстояния Махаланобиса каждого из разделяемых образцов относительно эталонного образца. Выбор эталонного образца был основан на том, чтобы он максимально отличался от других образцов (максимальное расстояние Махаланобиса). Расчёт расстояний Махаланобиса проводили в программном обеспечении AssureID.

Для изучения влияния влажности на формирование ИК-спектра образец пшеничной муки разового помола разделяли на две части. Одну часть сушили в эксикаторе с хлоридом кальция, вторую часть выдерживали в паровой камере. Фиксировали изменение масс навесок и приводили изменения массы влаги к массам исходных навесок. Различие во влажности между сухим и влажным образцами составило 18,4%. (Уменьшение массовой доли влаги при высушивании в эксикаторе составило 4,5%, а её увеличение в результате пребывания навески в паровой камере составило 13,9%). Снимали ИК-спектры диффузного отражения влажного и сухого образцов в диапазоне 4000-10000 см^{-1} в пяти повторностях, рассчитывали математическую разницу (выраженную в виде спектра), и делили её на числовое значение различия массовой доли влаги (18,4%), чтобы получить спектр, нормированный на 1% изменения массовой доли влаги. Строили градуировочную модель для определения массовой доли влаги по 2-м точкам в 5-ти повторностях (сухой и влажный образцы).

Для проверки эффективности способа устранения эффекта влажности использовали две градуировочные модели: а) для определения содержания аминокислоты в двухкомпонентных модельных смесях, состоящих из аминокислоты и пшеничной муки, б) для определения массовой доли влаги в муке. Градуировочную модель (а) построили и проверили на ис-

ходном наборе контрольных образцов, в течение одного рабочего дня. Дополнительный набор контрольных образцов приготовили через 45 суток из муки, хранившейся в контакте с атмосферным воздухом. Для оценки влияния различных факторов на показатели градуировочной модели провели анализ остатков. Второй (дополнительный) набор образцов состоял из муки, имеющей большую массовую долю влаги, чем исходный набор образцов, что было определено с помощью градуировочной модели для определения влаги в муке

Градуировочные и контрольные образцы для градуировок (а) и (б) готовили из DL-метионина квалификации ч.д.а. и муки разового помола из пшеницы сорта Ферругинеум урожая 2005 г., предоставленной кафедрой селекции и семеноводства полевых культур РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Градуировочные модели строили методом регрессии на главных компонентах (PCR). Использовали 21 градуировочный образец с различным содержанием DL-метионина, измерения проводили в пятикратной повторности. Диапазон содержаний (массовая доля) аминокислоты в градуировочных образцах варьировал от 0 до 100%. Проверку градуировочной модели проводили по 20-и контрольным образцам (5 повторностей для каждого), имевшим тот же состав, что и градуировочные образцы, но другое содержание DL-метионина. Оценку метрологических характеристик проводили по стандартной методике.

Для сравнения спектров двух образцов строили корреляционные зависимости интенсивности спектра одного образца от интенсивности спектра другого образца. Измерение спектров проводили в 5-ти повторностях для каждого образца. Для каждого спектра рассчитывали среднее. Корреляционные зависимости представляли в виде графиков.

Для выявления приборной погрешности снимали спектры неподвижного белого стандарта и неподвижного образца муки в кювете. Для выявления влияния возможной неоднородности дна пробирки перед каждым новым измерением пробирку с образцом поворачивали на угол 60° , не встряхивая образец. Чтобы выявить влияние состояния поверхности образца (взаимного расположения частиц образца на его поверхности), с учетом неоднородности распределения частиц различного размера в объеме пробы, перед каждым новым измерением образец встряхивали. В другой серии измерений для каждого измерения в пробирку-контейнер насыпали новый образец из всего объема используемого для экспериментов DL-метионина производства фирмы Degussa

Изучали корреляционные зависимости стандартного относительного отклонения s_r от интенсивности спектра диффузного отражения $\log(1/R)$ образцов пшеничной муки разового помола, DL-метионина производства фирмы Degussa (крупнокристаллического и растертого в агатовой ступке), кормов для собак "Омега Нео" производства ЗАО "НПП Фармакс". Стандартное относительное отклонение рассчитывали для $f = n - 1$ во всем спектральном диапазоне.

В третьей главе представлены результаты экспериментов и проведено их обсуждение.

Градуировочные модели для определения сырого белка в зерне пшеницы

Одной из самых распространенных классических задач спектроскопии ближнего ИК-диапазона является определение содержания белков в зерне пшеницы. Поскольку белки об-

ладают интенсивными полосами поглощения, а их содержание в подобных объектах достаточно высоко, возникает возможность построения таких градуировочных моделей. Референтным методом анализа здесь является метод Кьельдаля. Между результатами БИК-анализа и методом Кьельдаля наблюдали хорошую корреляцию ($r=0,96$) (рис.1). Относительное стандартное отклонение при проверке градуировочной модели методом БИК (3%) оказалось значительно ниже, чем в методе Кьельдаля (10%).

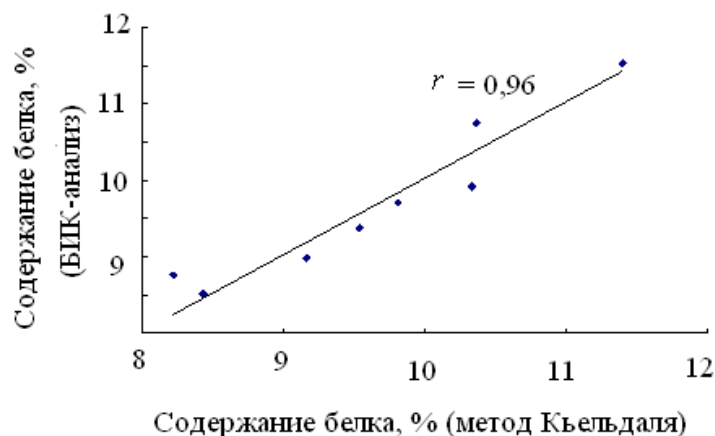


Рис.1. Корреляция результатов БИК-анализа и метода Кьельдаля

Отклонения средних найденных значений содержания белка от референтных значений не превышают 1%. В общем и целом, градуировочные модели из одной серии образцов для определения содержания белка в пшеничном зерне получаются стабильными: расхождения между средними значениями результатов ИК-анализа и референтными значениями не превышают 1% по массовой доле белка, что хорошо согласуется с литературными данными.

Однако, общая градуировочная модель в процессе проверки на контрольных образцах, принадлежащих независимой серии, давала неадекватные результаты, поскольку модель не распознавала данные образцы. Основные факторы, вносящие вклад в погрешность: различие образцов пшеницы в зависимости от сорта, региона и года урожая, неоднородность самих отдельно взятых образцов (различие между зёрнами).

Градуировочные модели для определения глюкозинолатов в семенах рапса

По сравнению с задачей определения общего белка в зерне пшеницы, определение тиогликозидов (глюкозинолатов) в семенах рапса осложнено следующими факторами: низкое содержание глюкозинолатов и их неравномерное распределение в самих семенах, отсутствие чётких полос поглощения в ближней ИК-области, и очень широкий размах варьирования содержания глюкозинолатов от семени к семени. Градуировочная модель, построенная по 10 главным компонентам, имеет суммарную погрешность определения содержания глюкозинолатов 2,35 ммоль/г и относительное стандартное отклонение 18,3%. Показатель стандартного относительного отклонения уже свидетельствует о том, что получение достоверных количественных результатов в таких условиях очень маловероятно (табл. 1). Значение отклонения среднего найденного содержания от референтного значения для различных контрольных образцов различно.

Кроме того, значение стандартного относительного отклонения для образца №2 (табл. 1) в 2 раза превышает данный параметр для остальных образцов. В отличие от зерна пшеницы, где белок распределён по всему объёму, тиогликозиды содержатся в поверхностном слое семени и не содержатся внутри семени. К тому же, рапс относится к масличным культурам, и при размалывании семян наблюдается разделение образца на две фазы: твёрдая (шрот) и жидкая (масло). Масло со временем окисляется кислородом воздуха (полимеризуется). Система после размалывания семян становится крайне неоднородной и нестабильной.

Таблица 1. Результаты определения глюкозинолатов в семенах рапса

№ образца	Содержание глюкозинолатов, ммоль/г		Дисперсия (s^2)	Относительная дисперсия	Стандартное отклонение, (s)	Относительное стандартное отклонение (s_r), %
	референтное	среднее расчетное				
1	20	19,4	5,74	0,015	2,40	12,3
2	12,2	11,8	10,71	0,077	3,27	27,8
3	13	14,8	4,23	0,019	2,06	13,9
4	11,2	14,7	4,66	0,021	2,16	14,7

Идентификация белков

При идентификации 22 образцов белков животного и растительного происхождения выявлено различие в информативности среднего и ближнего диапазонов ИК-спектра. Для этого была построена корреляционная зависимость расстояний Махаланобиса для каждого образца относительно эталонного образца для ближнего и среднего диапазонов ИК-спектров. Для ближнего ИК-диапазона значения отношения расстояний, приведенных к одному реперному образцу, выше, чем для среднего ИК-диапазона.

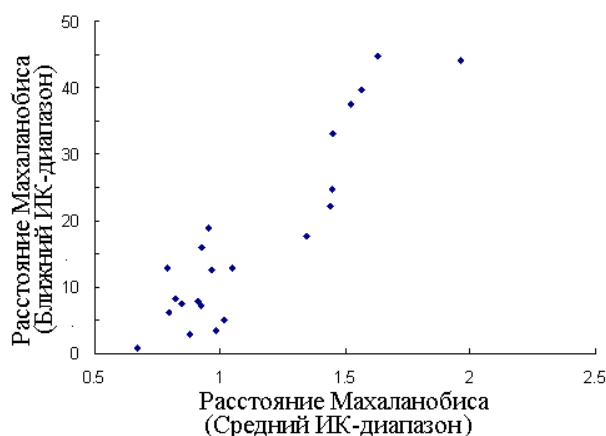


Рис.2. Сравнение информативности ближнего и среднего ИК-диапазонов

Кроме того, воспроизводимость спектров в среднем ИК-диапазоне значительно ниже, чем в ближнем. Поэтому, при решении подобных задач, более чувствительным оказывается применение диффузного отражения в ближнем ИК-диапазоне. Однако, ввиду высокой чувствительности спектроскопии в ближнем ИК-диапазоне, образцы, относящиеся к одному типу

белков модель распознавала как разные. Это может быть связано с небольшим различием в структуре этих образцов, или высоким стандартным отклонением спектров.

Объединяя спектры различных образцов, относящихся к одному классу, в “обучающем” наборе спектров, снижая таким образом чувствительность модели, удалось добиться эффективной идентификации образцов белков. Расстояния Махаланобиса приведены в табл.2. Однако, объединение образцов в классы оправдано, если между образцами нет выраженного различия (например, значительного различия в структуре частиц). Объединение в один класс образцов одинакового происхождения, но различной структуры приводило в резкому ухудшению характеристик идентификационной модели. Тем самым было доказано, что идентификация индивидуальных образцов белков методом БИК-анализа возможна.

Таблица 2. Расстояния Махаланобиса между классами образцов (1 – функциональный натуральный животный белок; 2 – соевая мука тонкого помола; 3 – концентрат соединительно-тканного белка из свиной шкурки; 4, 5, 6 – животный белок 3; 7 – изолят соединительно-тканного животного белка; 8, 9 – изолят соевого белка 1; 10 – соевый шрот;).

	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	8,91	1,96	2,33	4,04	4,48	3,78	13,8	7,74	6,4
2		6,63	8,09	7,37	12,9	8,12	7,09	4,33	3,79
3			2,9	5,51	7,34	4,49	10,6	6,7	6,17
4				4,46	6,11	4,5	12,2	7,44	6,36
5					6,53	5,18	12,9	5,91	5,65
6						4,82	16,9	11,4	7,95
7							12,4	7,5	5,99
8								9,86	6,28
9									4,29

Построение градуировочных моделей по содержанию аминокислоты в двухкомпонентных смесях.

При анализе реальных объектов методом спектроскопии в ближнем ИК-диапазоне имеет место ряд факторов, влияющих на формирование спектров, а, следовательно, и на точность результатов анализа. Данные факторы были изучены при помощи модельных экспериментов.

Одной из важных задач анализа методом ИК-спектроскопии в ближнем диапазоне является определение премиксов и добавок аминокислот в кормах, поэтому, построение градуировочной модели для определения содержания аминокислоты в простой смеси, имитирующей корм и состоящей из аминокислоты и пшеничной муки, представляет интерес с точки зрения изучения факторов, которые могут повлиять на точность анализа. Построенная нами градуировочная модель для определения содержания кристаллического метионина в смесях с пшеничной мукой разового помола представлена на рис.3 (а). Для выявления систематических погрешностей проводили анализ остатков (рис. 3 (б)). Суммарная абсолютная погрешность модели составила 0,62% по массовой доле аминокислоты, а относительное стандартное отклонение 4,4%. Предел обнаружения аминокислоты в данных смесях – 1,16%.

Однако при помощи зависимостей, аналогичных зависимости, приведенной на рис.3 (б), сложно делать выводы о наличии трендов, поэтому для проверки отсутствия систематических погрешностей осуществляли проверку соответствия распределения остатков нормальному закону (рис. 4). При этом вместо прямой, проходящей через нуль с коэффициентом наклона, равным 1, получали унимодальное, почти симметричное распределение. На рис. 4 можно видеть, по меньшей мере, три страта. Это свидетельствует о существовании несколько факторов, приводящих к возникновению систематических погрешностей.

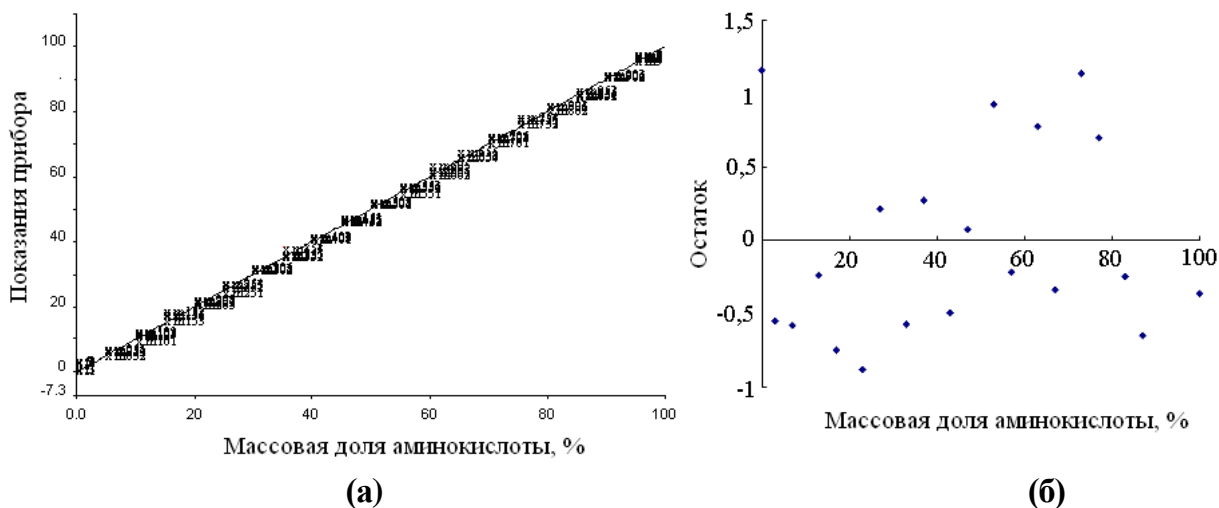


Рис.3. Градуировочная модель (а) и анализ остатков (б)

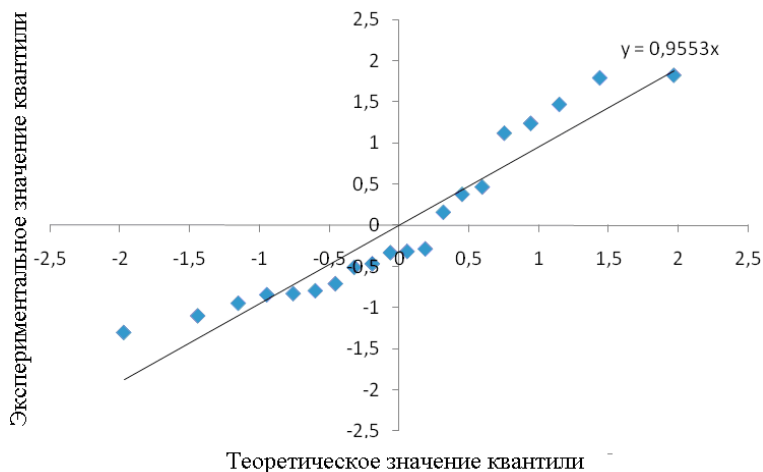


Рис. 4. Проверка нормальности распределения остатков через квантили распределения

Возможность приборного тренда была исключена благодаря тому, что спектры снимали на прогретом приборе, базовая линия которого поверялась каждые 5 минут, и прибор юстировали по линии метана каждый раз перед началом анализа.

Способ спектральной коррекции влияния влажности для снижения систематической погрешности

Для проверки влияния контакта образца с атмосферным воздухом образцы, использованные для построения градуировочной модели, выдержали в открытых сосудах в течение 45

суток. Анализ остатков для построенной при помощи этих образцов градуировочной модели показал наличие явного тренда, имеющего концентрационную зависимость (числовое значение остатка снижается с ростом содержания аминокислоты).

Обычно эффект влияния влажности устраняется высушиванием образцов при 105 °С. Однако, данный метод приводит к изменению структуры материала и состава образца, поскольку разрушаются такие компоненты, как аминокислоты.

Нами предложен метод спектральной коррекции влажности для снижения систематической погрешности, суть которого заключается во внесении поправок в спектры анализируемых образцов путем сложения с поправочным спектром, умноженным на массовую долю влаги (%) в анализируемом образце, или вычитания этого спектра.

Вычитания или. Значения влажности анализируемых образцов рассчитывали на основании БИК спектров. К преимуществам предложенного метода можно отнести неdestructивность и отсутствие изменения состава образцов.

Один из компонентов модельной смеси – метионин - негигроскопичен и не впитывает влагу из воздуха. Второй компонент смеси - мука - достаточно гигроскопична, и взаимодействие её частиц с влагой сопровождается набуханием, в результате которого изменяется размер частиц, что отражается на спектрах диффузного отражения.

Вода имеет очень чёткий и интенсивный спектр в ближнем ИК-диапазоне. Поэтому, градуировочные модели для определения влаги в образцах сырья для производства комбикормов получаются весьма устойчивыми, а сама задача определения содержания влаги представляет собой одно из самых распространённых и наглядных применений ИК-спектроскопии в ближнем диапазоне в количественном анализе.

Для экспериментальной проверки эффективности способа спектральной коррекции влияния влажности были проведены модельные эксперименты в пятикратной повторности. В каждом эксперименте снимали спектры для двух навесок одного образца пшеничной муки. Предварительно одну навеску высушивали в эксикаторе, а вторую выдерживали в паровой камере. На рис. 5 показана математическая разность между усредненными спектрами увлажнённых и высушенных образцов. Разность спектров напоминает спектр поглощения воды. Двум пикам в спектре поглощения воды соответствуют пики 1 и 3 на рис. 5, которые характеризуются волновыми числами 5155 и 7042 см⁻¹ соответственно. Данный спектр отражает изменение спектра образца пшеничной муки в зависимости от изменения влажности. Однако разность спектров не тождественна истинному спектру поглощения воды, поскольку при изменении влажности изменяется и структурные особенности образца (например, размер и состояние поверхности частиц).

Градуировочную модель (а) после построения проверили дважды: первый раз в день приготовления градуировочных и контрольных образцов, второй раз с использованием образцов, приготовленных из DL-метионина и муки, хранившейся в течение 45 дней в контакте с атмосферным воздухом для моделирования обычных условий хранения образцов комбикормов. Для определения содержания влаги в муке использовали градуировочную модель (б).

Число главных компонент составило 2. Для первой главной компоненты коэффициент корреляции с данными по влажности составил 99,36%, а ее спектр совпал со спектром на рис.5. Второй набор образцов включал в себя муку с большим содержанием влаги. При помощи анализа остатков, было выявлено влияние влажности на результаты определения содержания DL-метионина в контрольных образцах. Причем, значение систематической погрешности снижалось с ростом содержания аминокислоты, что можно объяснить тем, что влияние влажности на муку значительно выше, чем на аминокислоту (метионин).

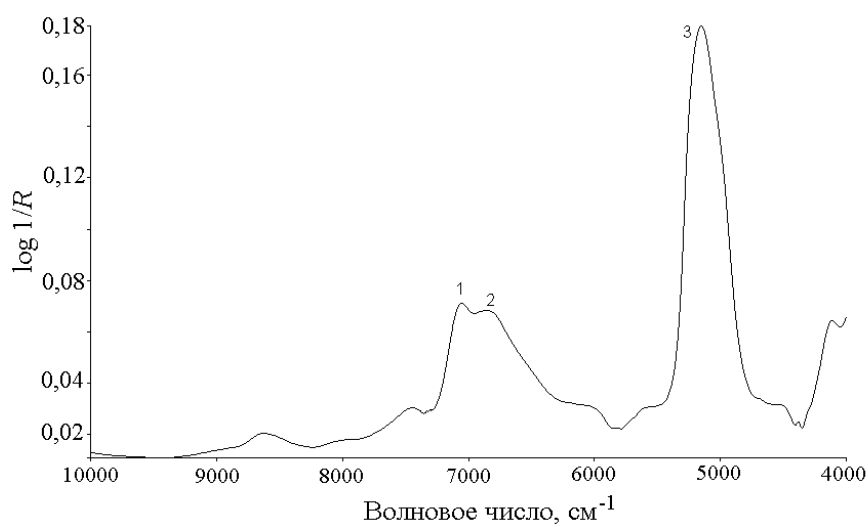


Рис. 5. Математическая разность спектров увлажненного и высушенного образцов (R – коэффициент отражения). Положения пиков: 1 – 7056 см^{-1} ; 2 – 6852 см^{-1} ; 3 – 5155 см^{-1} .

Чтобы нивелировать различие, обусловленное влажностью, между исходным и дополнительным набором образцов, нормированный на 1% спектр, умноженный на разность массовых долей влаги в образцах муки из данных наборов, которая составляет 0,38%, вычли из спектров образцов дополнительного набора с поправкой, учитывающей массовую долю муки в каждом конкретном образце. Данный подход позволил снизить систематическую погрешность, связанную с влажностью, и частично устранить тренд. Показатель правильности снизился с 1,10% до 0,74%.

Применение такого подхода оправдано в случаях, когда классический способ контроля влажности (сушка при температуре 105°C) может привести к разрушению компонентов состава, или изменению структуры анализируемых образцов.

Корреляционный способ сравнения спектров с графическим представлением

Сравнение спектров используют для поиска участков, обладающих той или иной степенью информативности при решении конкретной аналитической задачи. Как правило, сравнение спектров сводится к нахождению разности между сравниваемыми спектрами или отношения этой разности к интенсивности исходных спектров. Поиск спектральных различий также проводят с помощью моделей математической статистики. Данные методы требуют специальных расчётов и не дают наглядного представления.

Нами предложен наиболее простой, быстрый и наглядный способ сравнения спектров, заключающийся в построении корреляционной зависимости значений интенсивности двух сравниваемых спектров при одинаковых значениях волновых чисел. Полная идентичность спектров приводит к появлению на графике прямой под углом 45° по отношению к осям. В случае пропорционального различия между спектрами, получается прямая, угол наклона которой определяется коэффициентом пропорциональности между спектрами. В случае качественного различия между спектрами, сдвигами по длинам волн, график сильно отличается от прямой, имеет ступени, петли и т.д.

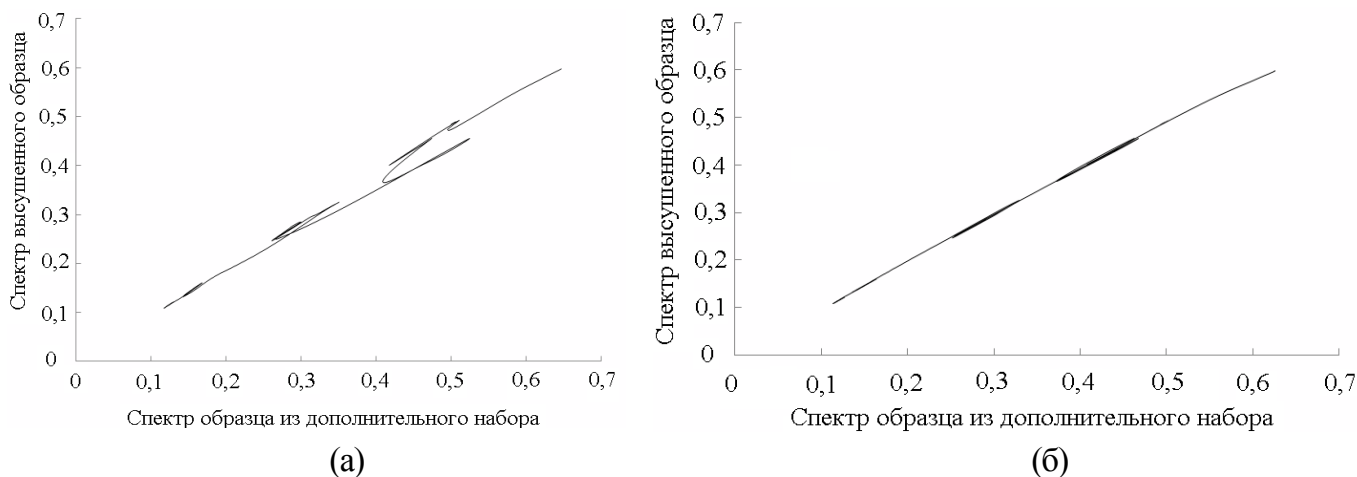


Рис.6. Сравнение спектров до внесения поправки (а) и внесения поправки (б), по осям отложены значения $\log 1/R$, где R – коэффициент отражения

Например, при сравнении спектра муки из дополнительного набора (см. предыдущий раздел) образцов со спектром высушенного в эксикаторе образца муки, получили кривую, которая свидетельствует о заметном различии между этими спектрами (рис.6 (а)). При сравнении спектров тех же образцов после приведения спектра образца из дополнительного набора к спектру высушенного образца (посредством вычитания из него «нормированного на 1% спектра» с соответствующим коэффициентом) видно, что эти различия стали значительно меньше (рис. 6 (б)).

Способ оценки воспроизводимости спектров диффузного отражения

Для изучения случайных погрешностей в классической аналитической химии строят скедастические зависимости (зависимости дисперсии, стандартного отклонения или относительного стандартного отклонения от содержания определяемого вещества). Аналогичный подход можно было бы применить для оценки случайных факторов при формировании БИК-спектров диффузного отражения, строя зависимости относительного стандартного отклонения интенсивности спектра от значения интенсивности спектра при каждом значении волнового числа.

В идеальном случае, когда вклад в случайную погрешность вносят только факторы, обусловленные шумом прибора, абсолютное отклонение базовой линии спектра равномерно распределено по всему диапазону длин волн и имеет постоянное значение. Тогда значение относительного стандартного отклонения для спектров диффузного отражения (полагая, что пики

БИК-спектров диффузного отражения описываются распределением Лоренца) должно снижаться с ростом интенсивности спектра. Поскольку интенсивность спектров диффузного отражения никогда не достигает верхней границы динамического диапазона спектрометра, увеличения относительного стандартного отклонения при росте интенсивности спектра быть не может.

На реальные спектры диффузного отражения, особенно на спектры измельченных материалов, имеющих различный гранулометрический состав, существенное влияние оказывают размер частиц, их распределение и форма, поэтому погрешность спектра неравномерна во всем диапазоне длин волн и форма корреляционной кривой существенно отличается от идеальной. Например, два измельченных образца кормов для собак, принадлежащих одной партии, приготовленных в схожих технических условиях, но имеющих различный гранулометрический состав, дают зависимость, весьма далекую от идеальной (рис. 7 (а)).

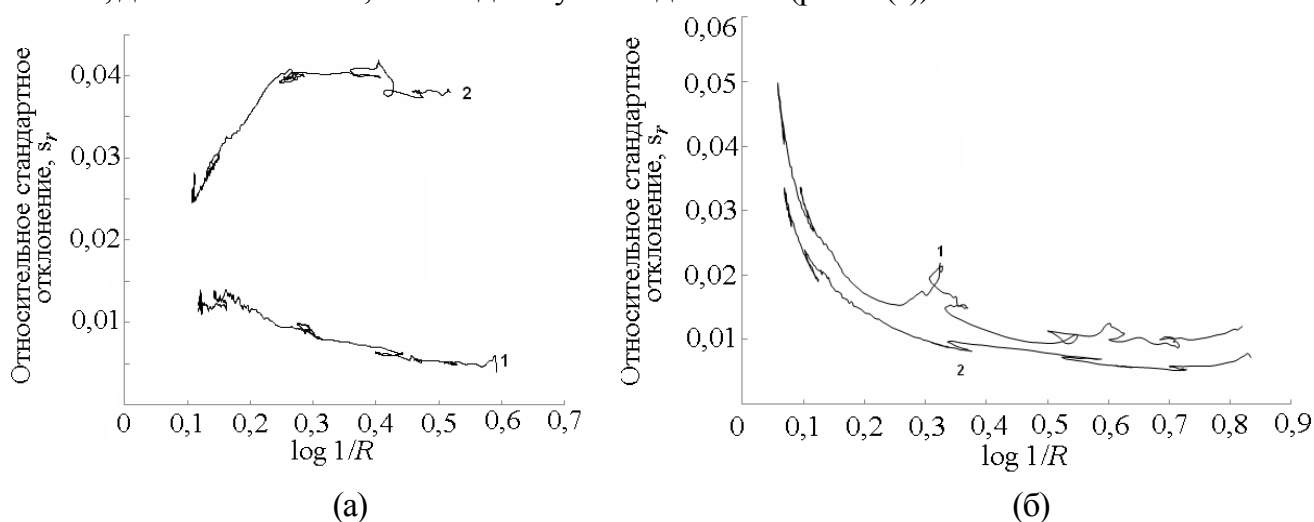


Рис. 7. Корреляционные зависимости при изучении воспроизводимости спектров образцов комбикормов различной однородности (а) и спектров таблеток (б), спрессованных из исходного образца (кривая 1) и из измельченного образца (кривая 2)

В данном случае образцы, принадлежащие одной партии, имеют резко отличающиеся корреляционные зависимости относительного стандартного отклонения от интенсивности спектра (т.е. для каждого из образцов имеются свои факторы, влияющие на воспроизводимости спектров). На этом основании можно утверждать, что образцы не принадлежат одной статистической выборке и не могут быть использованы для построения одной градуировочной модели.

Снижение случайной погрешности при помощи таблетирования сыпучих образцов

Для того чтобы уменьшить отличия образцов друг от друга с точки зрения воспроизводимости спектров, нужно стремиться к тому, чтобы факторы вносящие вклад в случайную погрешность были исключены, а если это невозможно, то эти факторы должны быть одинаковыми для всех образцов. Добиться этого в случае полидисперсных объектов анализа можно при помощи таблетирования образцов.

При сравнении корреляционных зависимостей 1 и 2 (рис. 7) видно, что в результате таблетирования их характер изменяется. Зависимости для таблетированных образцов кормов для собак спектрально более однородны, чем зависимости для рассыпных образцов тех же

кормов. Информативные участки зависимостей расположены в одном диапазоне относительного стандартного отклонения s_r (0,015-0,03). Это означает, что влияние таких факторов, как гранулометрический состав образца и распределение частиц в объёме для обоих образцов стало одинаковым. Кроме того, благодаря снижению рассеяния и увеличению диффузного отражения света, возросла интенсивность спектра, а, следовательно, и соотношение сигнал/шум. На кривой 1 наблюдается петля в диапазоне $0,3 - 0,4 \log(1/R)$. Наличие петель свидетельствует о смещении пиков, что говорит о неполном устранении влияния на воспроизводимость спектров факторов, связанных с неоднородностью пробы.

Данные образцы полидисперсны (т.е. включают в себя фракции частиц различных размеров), и разделение на фракции может иметь место в процессе прессования таблеток, поскольку при насыпании в пресс-форму более мелкая фракция просыпалась вниз, а более крупная оставалась сверху. Ухудшение воспроизводимости спектров при работе с таблетками могло быть также связано с несимметричностью пресс-формы, когда стороны таблетки неодинаковы. Вращение таблетки вокруг вертикальной оси приводит к 0,5% относительного стандартного отклонения. При переходе от одной таблетки к другой наблюдаемое значение относительного стандартного отклонения 1,1% говорит о том, что в данной ситуации неоднородность самого образца не вносила значительного вклада в случайную погрешность. Наибольшее значение относительного стандартного отклонения (2,2 %) имело место при переворачивании таблетки. Это может быть связано как с различным фракционным составом на поверхностях таблетки, так и с ее геометрической асимметрией. Геометрическая асимметрия обусловлена различием поверхностей пресс-формы и плунжера.

Влияние разделения на фракции можно уменьшить, проводя тщательную гомогенизацию образца растиранием его в агатовой ступке до тонкого порошка.

Устранение влияния фактора сегрегации путем измельчения образца дает значительное улучшение формы корреляционной зависимости (рис. 11, кривая 2). При этом и сам диапазон стандартного относительного отклонения смещается в сторону более низких значений. Форма зависимости становится почти идеальной, что говорит об устранении влияния значимых факторов.

В отсутствие расслоения на фракции, вклад различия формы сторон таблетки можно устранить, проводя анализ по одной стороне таблетки (например, со стороны плунжера). Причём форма данной зависимости не зависит от числа параллельных измерений. То есть, вклад случайных составляющих оказывается меньшим.

Таким образом, корреляционные зависимости относительного стандартного отклонения от интенсивности спектра можно использовать для оценки влияния различных случайных факторов на воспроизводимость спектров, а, следовательно, и для оценки однородности образцов. Прессование таблеток в качестве способа пробоподготовки позволяет унифицировать образцы и в сочетании с дополнительным измельчением образца позволяет добиться приближения к идеальным условиям, что подтверждается формой полученных корреляционных зависимостей.

Выводы:

1. Построены градуировочные модели для определения сырого белка в зерне пшеницы на основе результатов, полученных методом Кьельдаля. Показано, что градуировочная модель проявляет нестабильность по отношению к образцам из независимой серии. Значительный вклад в нестабильность градуировочных моделей вносят различия между сортами пшеницы.
2. Изучена возможность построения градуировочных моделей для определения глюкозинолатов в семенах рапса. Показано, что построенная модель проявляет нестабильность по отношению к некоторым контрольным образцам. Метрологические характеристики данного анализа хуже метрологических характеристик анализа зерна пшеницы ввиду следующих факторов: низкое содержание определяемых веществ, неоднородное распределение определяемого вещества в семени, низкая воспроизводимость спектров.
3. Построена и изучена модель для идентификации белков различного происхождения. При идентификации отдельных образцов, образцы, принадлежащие одному классу разделяются, что свидетельствует с одной стороны, о высокой информативности метода в ближней ИК-области, с другой стороны, о наличии факторов, вызывающих неоднородность (крупность частиц, структура белков). Данную проблему удалось решить путём значительного снижения чувствительности модели и объединения образцов в классы.
4. Предложен способ сравнения информативности средней и ближней ИК-областей.
5. Показана возможность построения градуировочных моделей для определения аминокислоты в смесях с пшеничной мукой, имеющих неоднородный гранулометрический состав.
6. Предложен способ спектральной коррекции влажности для снижения систематической погрешности.
7. Предложен корреляционный способ сравнения спектров с графическим представлением.
8. Предложен новый подход для оценки однородности образцов с точки зрения воспроизводимости на основе изучения зависимостей стандартного относительного отклонения от интенсивности спектров. Изучены зависимости различных образцов. Показано, что с помощью данного подхода появляется возможность предварительно устанавливать принадлежность образцов к одному классу (с точки зрения метрологических характеристик), и, таким образом, делать вывод о применимости образцов для построения градуировочных моделей.
9. Предложен способ пробоподготовки – таблетирование образцов. Оно позволяет снизить влияние различных факторов, являющихся источниками случайной погрешности, и улучшить воспроизводимость спектров. Получены зависимости стандартного относительного отклонения от интенсивности спектров, близкие к идеальным.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях

1. Баюнов А.П. Использование модельных систем для получения градуировочных моделей в методе ближней инфракрасной спектроскопии /А.П. Баюнов, С.Н. Смарыгин// Вестн. Казан. Техн. Ун-та, №11, 2011, С. 23-30.
2. Баюнов А.П. Protein identification with Fourier-transform infrared spectroscopy / А.П. Баюнов, С.Н. Смарыгин //Тезисы докладов Международной конференции «Возобновляемые лесные и растительные ресурсы: химия, технология, фармакология, медицина», С.-Петербург, 21-24 июня 2011, стр. 263-264
3. Баюнов А.П. Особенности метрологических характеристик метода ИК Фурье-спектроскопии в ближнем диапазоне / А.П. Баюнов, С.Н. Смарыгин // Доклады ТСХА. Вып. 283, М.; 2011, стр. 400-404
4. Баюнов А.П. Влияние таблетирования образцов на метрологические характеристики анализа комбикормов методом спектроскопии в ближнем ИК-диапазоне/А.П. Баюнов, С.Н. Смарыгин// Бутлеровские сообщения, Т.32, №13, 2012, С. 47-54.
5. Баюнов А.П. Влияние влажности на результаты БИК-анализа комбикормов и способы её учёта /А.П. Баюнов, С.Н. Смарыгин// Научно-технический вестник Поволжья, 2013, №1, стр. 50-56
6. Баюнов А.П. Оценка вклада различных факторов в погрешность определения содержания аминокислот методом ИК-спектроскопии/ А.П. Баюнов, С.Н. Смарыгин // Доклады ТСХА. Вып. 284, М.; 2012, стр. 238-240
7. Баюнов А.П. Метрологические характеристики БИК-анализа при определении глюкозинолатов в семенах рапса/ А.П. Баюнов, С.Н. Смарыгин //Материалы VI Международной заочной научно-практической интернет-конференции «Инновационные фундаментальные и прикладные исследования в области химии сельскохозяйственному производству.». 8 апреля 2013 г. стр. 3-7.

Автор выражает благодарность руководителю Учебно-научного центра коллективного пользования «Сервисная лаборатория комплексного анализа химических соединений» РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева проф. Н.М. Пржевальскому, заведующему кафедрой селекции и семеноводства полевых культур РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева проф. В.В. Пыльневу, профессору кафедры агрономической, биологической химии и радиологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева В.В. Кидину, ведущему научному сотруднику Института биохимической физики им Н.М. Эммануэля РАН А.Н. Щеголихину, специалисту по молекулярной спектроскопии компании Scheltec AG (Швейцария) Я.В. Соковикову за помощь в работе и консультации.