

Anvendelse av synlig/nær-infrarød (VIS/NIR) spektroskopi for estimering av konsentrasjon av formazan-løsning

1 Introduksjon

Spektroskopi er studiet av absorpsjon og emisjon av lys fra materie. Teknikken involverer interaksjon på atom- og/eller molekylnivå med materien, avhengig av energien til det innkommende lyset ¹. Energien til lyset er større når det har høyere frekvens og kortere bølgelengder. Det elektromagnetiske spekteret er et kontinuerlig spekter som representerer de elektromagnetiske bølgene over et frekvensområde fra så lavt som 1 hertz (Hz) til over 10^{25} Hz [1,2,3]. Figur 1 viser spekteret av den elektromagnetiske strålingen med klassifikasjon basert på bølgelengden til bølgen. **I dette eksperimentet vil vi bruke den synlige og nær-infrarøde delen av spekteret til å analysere en prøve med formazan-løsning.**

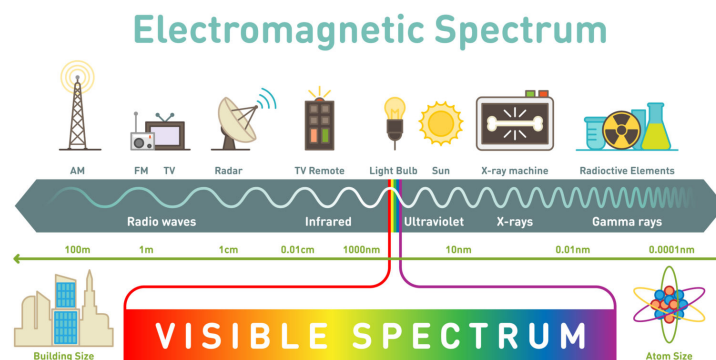


Figure 1: Skjematisk fremstilling av det elektromagnetiske spektrumet [4].

Infrarød (IR) spektroskopi er en teknikk for å analysere den kjemiske sammensetningen av materialer basert på hvordan materialet påvirker infrarød stråling. Denne teknikken kan brukes til å bestemme materialegenskaper og sammensetninger, og dermed identifisere ukjente materialer. Infrarød stråling strekker seg mellom 0,7-1000 μm av spekteret, som vist i figur 1. Det infrarøde området er videre delt inn i nær-infrarød (NIR) med bølgelengder mellom 0,7-2,5 μm), midt-infrarød (MIR) mellom 2,5-25 μm og fjern-infrarød (FIR) mellom 25-1000 μm . **Spektrometeret i dette eksperimentet vil bruke en NIR-sensor med et deteksjonsområde for stråling på 0,6-1 μm .**

Det finnes to ulike måter å utføre IR-spektroskopi på: refleksjonsmodus eller transmisjonsmodus, avhengig av plasseringen av detektoren/sensoren i forhold til strålingskilden, som vist i figur 2. Vi skal bruke transmisjonsmodus.

¹Når man nevner begrepet "lys", er det ikke begrenset til synlig lys. Det kan være hvilken som helst del av det elektromagnetiske spekteret med mindre det er spesifisert.

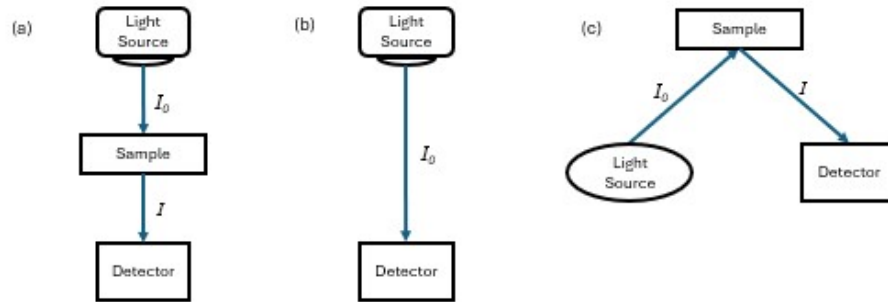


Figure 2: Skjematisk illustrasjon av (a) transmisjon, (b) transmisjon uten prøve, og (c) refleksjonsmoduser for IR-spektroskopi.

Oppsummert informasjon:

1. **Spektralområde:** VIS/NIR-området da vi vil bruke nano λ CMOS (Komplementær Metal-Oksid-Semiconductor)-sensoren som har et deteksjonsområde på 0,6-1 μ m.
2. **Lyskilde:** Glødepære, da den dekker spektralområdet nevnt i (1).
3. **Prøve:** Formazan oppløst i etanol (forskjellige konsentrasjoner) fordi det absorberer i området vi skal analysere.
4. **Spektroskopisk modus:** Transmisjonsmodus

2 Teori

2.1 Kirchhoffs og Plancks strålingslov

Når lys treffer et objekt eller en overflate, vil det bli send tilbake (reflektert), tatt opp (absorbert) eller gå gjennom (transmittert) som vist i figur 3. Alt lys som ikke blir transmittert eller reflektert, vil bli tatt opp (absorbert) av objektet. I dette eksperimentet trenger vi to fagbegreper:

- Transmittans (T): forholdet mellom mengde lys som går gjennom (blir transmittert) og mengde innfallende lys.
- Absorbans (A): Et mål på mengde absorbert lys relativt til mengden innfallende lys.

Kirchhoffs strålingslov sier at objektet vil utstråle samme mengde lys som det absorberer. Figur 3 viser en illustrasjon av reflektert, absorbert og transmittert lys.

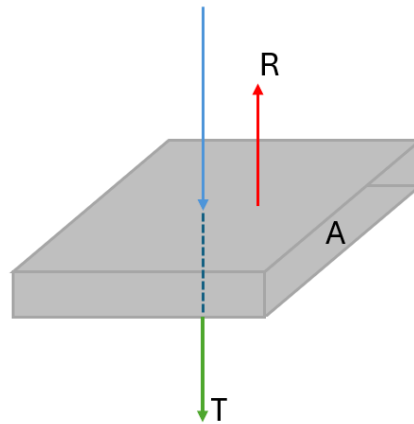


Figure 3: Illustrasjon av hva som skjer med innfallende lys (blå pil) når det treffer et objekt. Den grønne pila viser lyset som kommer gjennom objektet, og den røde pila viser lys som reflekteres av objektet.

Plancks strålingslov beskriver mengden stråling som sendes ut fra legemer ved ulike temperaturer. I figur 4 ser vi utstrålt effekt fordelt over bølglengdeområdet og med en topp ved en bestemt bølglengde. Ved å bruke **Wiens forskyvningslov** kan vi regne ut den bølglengden hvor et objekt med temperatur 'T' vil sende ut mest energi. Loven kan uttrykkes som:

$$\lambda_{max} = \frac{3000\mu m K}{T} \quad (1)$$

Ved å bruke likning 1, regner vi ut at bølglengden hvor lysutsendelsen vil være maksimal for et legeme ved 800K er 3,75 μm . Dette stemmer med bølgetoppen i figur 4.

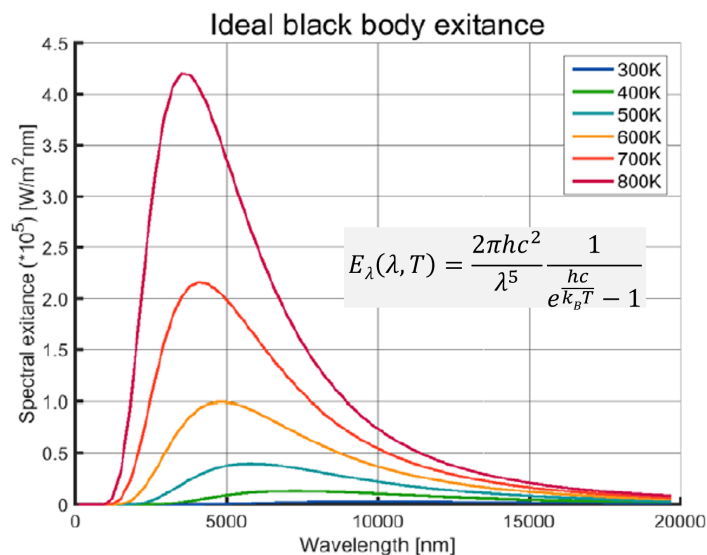


Figure 4: Spektrum som viser utsendt effekt som funksjon av bølglengde som stråles ut fra legemer med forskjellig temperatur [5]. Den inkluderte formelen kan brukes til å regne ut utsendt effekt ved hver bølglengde. nm er nanometer [$1\mu m = 1000 nm$].

2.2 Absorbans

Vi ser nå på hva vi måler når vi gjør transmisjonsspektroskopi. Når en elektromagnetisk bølge treffer et materiale (prøven) med intensitet I_0 , vil en del av strålingen bli absorbert (tatt opp). Resten vil gå gjennom prøven og bli målt av detektoren som I (figur 2(a)).

Vi definerer størrelsen *transmittans*(T) som forholdet mellom mengden lys som går gjennom prøven og mengden innfallende lys:

$$T(\lambda) = \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)} \quad (2)$$

Transmittansen er avhengig av bølgelengden til lyset vi sender inn og materialet i prøven.

I spektroskopi brukes oftere størrelsen *absorbans*(A) for å beskrive mengden av lys som absorberes av prøven. Absorbans er relatert til transmittans som

$$A(\lambda) = \log_{10}\left(\frac{1}{T(\lambda)}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)}\right). \quad (3)$$

Bruken av logaritmer gjør tallene enklere å regne med. Fra ligningen ovenfor ser vi at absorbansen er en funksjon av bølgelengden (λ), noe som betyr at prøven absorberer lys ulikt for ulike bølgelengder. Noen bølgelengder i spekteret fra lyskilden vil absorberes godt, mens andre bølgelengder vil kanskje ikke absorberes i det hele tatt. Mengden absorbert lys avhenger av prøvens kjemiske sammensetning.

I eksperimentet skal vi bruke et stoff som heter formazan. Formazan er et fargestoff som absorberer stråling ved rundt 600 til 660 nm (se figur 5).

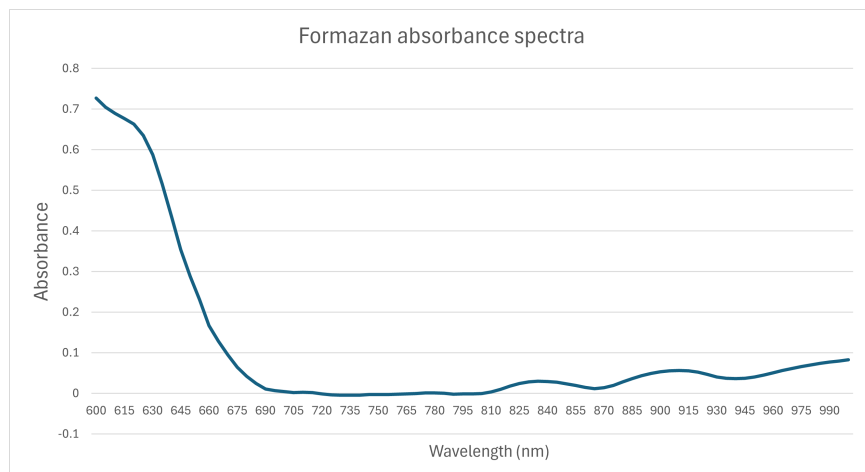


Figure 5: Formazan-absorbansspektra i VIS/NIR region.

2.3 Regresjonsanalyse

Regresjon er en nyttig statistisk metode som brukes til å finne en sammenheng mellom to eller flere uavhengige variabler og en avhengig variabel. Vi vil bruke regresjon til å bestemme en ukjent formazankonsentrasjon.

Først måler vi absorbansen for en rekke kjente konsentrasjoner. Så bruker vi lineær regresjon til å lage en modell for hvordan konsentrasjonen av formazan avhenger av absorbansen. Modellen er en lineær ligning på formen $y = mx + c$, hvor 'y' er konsentrasjonen av prøven og 'x' er absorbansen. Vi vil bruke regresjon i et digitalt verktøy (Excel/Geogebra) for å finne verdiene for m og c .

I den andre delen av eksperimentet måler vi absorpsjonen for en ukjent konsentrasjon. Så setter vi denne absorpsjonsverdien inn i modellen vår for å finne den ukjente konsentrasjonen.

3 Eksperiment

For dette eksperimentet vil vi bruke et spektrometer laget med en glødelampe og nano λ -sensoren som vist i figur 6 nedenfor. En Arduino MKR Zero [6] brukes til å motta og lagre verdiene for strålingsintensiteten sensoren måler. I den følgende delen vil vi se nærmere på hvordan dette gjøres.

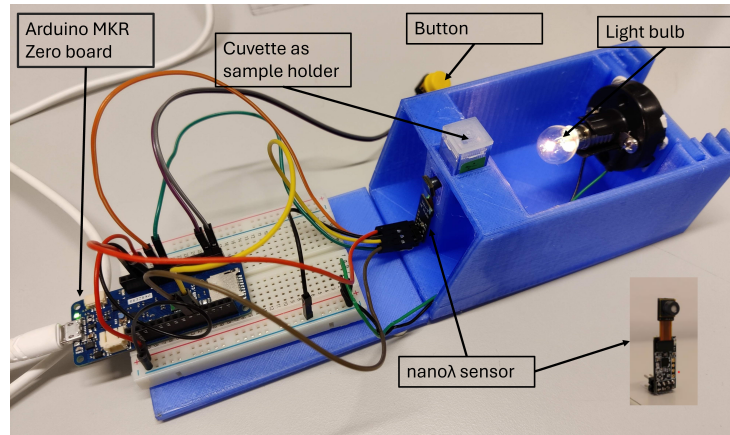


Figure 6: Spektrometer med glødepære som lyskilde og nano λ sensor.

Eksperimentet er delt inn i to hoveddeler:

1. Utføre eksperimentet og samle inn data.
2. Dataanalyse: Plotte absorpsjonsspektra, lage regresjonsmodell og bestemme konsentrasjonen av den ukjente løsningen.

3.1 Utføre eksperimentet og samle inn data

Dere skal få formazanprøver med forskjellige konsentrasjoner av formazan (0% ², 20%, 40%, 60%, 80%, og 'X%') i etanol som vist i figur 7. Beholderne til formazanprøvene kalles kuvetter. Dere skal måle på prøvene med kjent konsentrasjon og på en formazanløsning med ukjent konsentrasjon. For å bestemme absorpsjonen til en prøve ser vi fra ligning 3 at vi må vite bakgrunnsintensiteten I_0 , altså mengden lys som kommer ut fra lyskilden. Derfor skal dere gjøre **første måling med en tom kuvette**. Deretter måler dere intensiteten I til hver prøve.

²0% formazan vil være 99% etanol

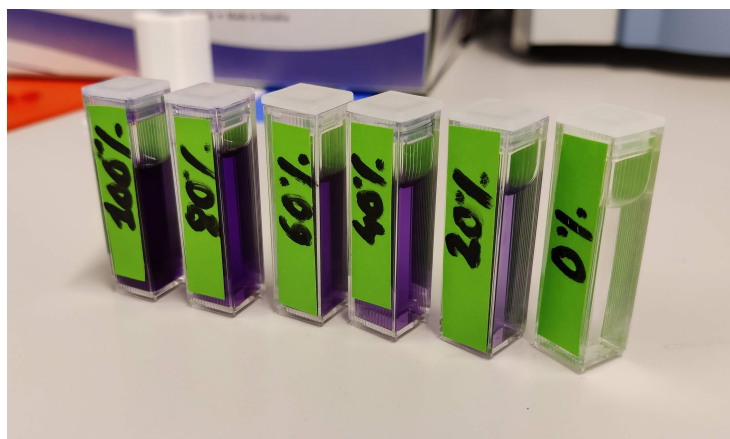


Figure 7: Formazan-prøver av forskjellige konsentrasjoner.

VIKTIG INFORMASJON FØR DERE BEGYNNER:

Formazan kan gi allergiske reaksjoner. Bruk hansker under eksperimentet. Unngå å søle.

Formazan brytes ned av synlig lys. Så hold prøvene tildekket hele tiden og ta dem ut bare når dere må sette dem inn i spektrometeret.

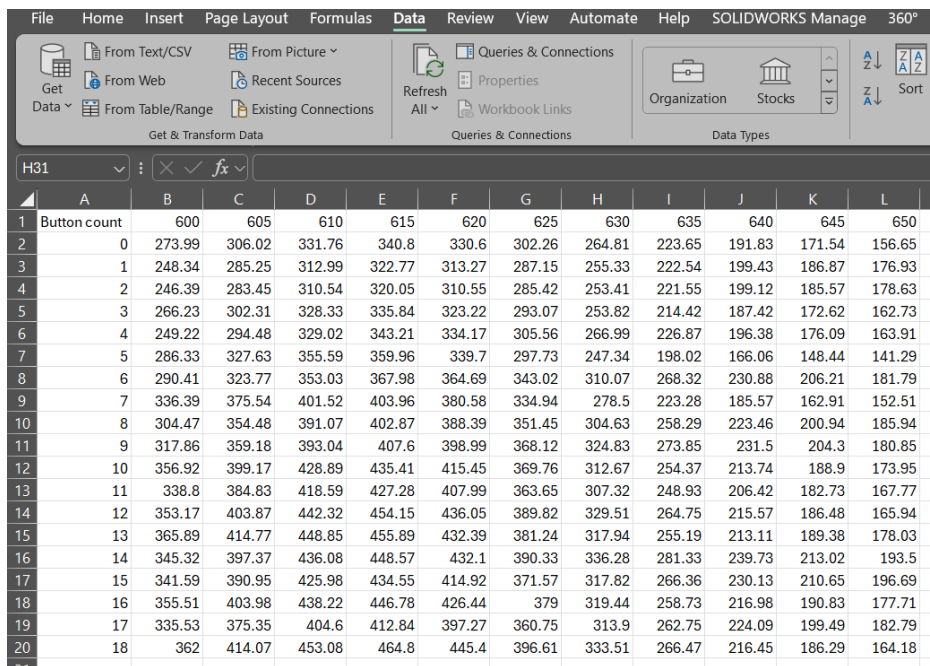
Verdiene for lysintensiteten måles av spektrometeret. De lagres på SD-kortet via Arduino-prosessoren som en CSV-fil (kommaseparerte verdier). **Formater (slett alle data på) SD-kortet før du starter målingene, i tilfelle det er tidligere lagrede data.** Filen du oppretter vil enten se ut som figur 8 eller 9. I de følgende avsnittene vil vi gå gjennom måleprosessen og dataanalysen i detalj.

Du vil ta tre tekniske replikater for hver prøve, altså tre målinger for samme prøve. Dette forklares nedenfor. Følgende trinn skal følges:

1. Plasser den tomme kuvetten i kuvettholderen på spektrometeret.
2. Trykk på knappen for å ta opp spekteret. Dette spekteret vil være et bakgrunnsspekter, altså I_0 (én måling er nok).
3. Bytt ut den tomme kuvetten med en fylt kuvett. Start med 0% formazanprøven.
4. Ta tre målinger for hver prøve ved å trykke på knappen tre ganger. Vent **5 sekunder** hver gang etter at du har trykket på knappen, før du trykker på knappen igjen.
5. Bytt kuvett til prøven med neste konsentrasjon. Gjenta trinn 4 for alle prøvene.
6. Last ned dataene fra SD-kortet ved hjelp av kortleseren og **lagre dem** på datamaskinen. Gi filen et navn slik at du kan gjenkjenne den senere.
7. På dette tidspunktet har du samlet inn data fra prøvene med kjent konsentrasjon. Nå er det på tide å gjøre det samme for prøven med ukjent konsentrasjon. Be om den.
8. Formater SD-kortet igjen og plasser det tilbake i spektrometeret.
9. Utfør trinn 1 til 4, denne gangen kun for den ukjente prøven, og lagre filen som instruert i trinn 6. Gi denne filen et annet navn.
10. Til slutt vil vi starte analysen av dataene.

3.2 Dataanalyse: Plotting av absorbansspektra og bestemmelse av ukjent konsentrasjon.

Dere skal nå ha to filer med måledata som viser intensiteten av lys gjennom prøvene for ulike bølgelengder. Nå skal dere beregne absorbansspektraene for alle prøvene. Hvis Excel-filene dine er normalt satt opp og ser ut som i figur 8 nedenfor, trenger du **ikke** å følge oppskriften i neste avsnitt, men kan gå videre til avsnittet som heter “**Absorbansspektraene**”.

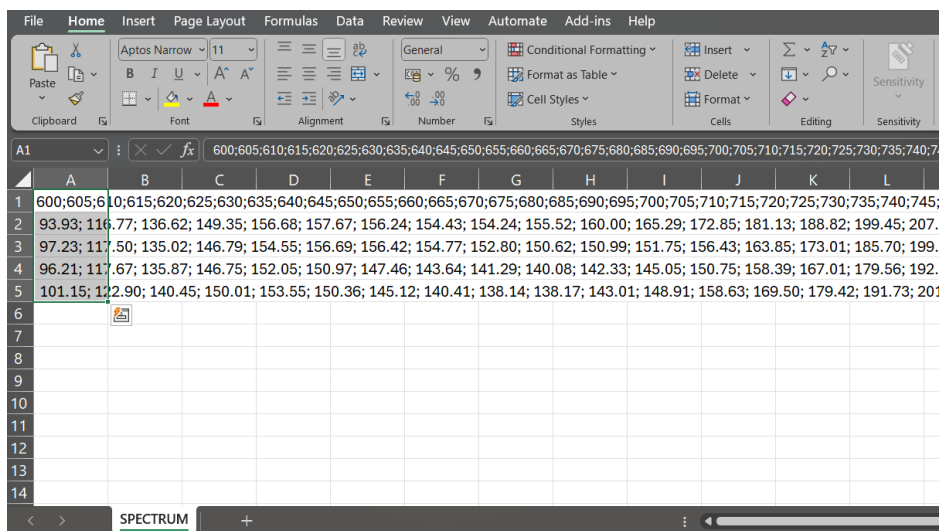


	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Button count	600	605	610	615	620	625	630	635	640	645	650
2	0	273.99	306.02	331.76	340.8	330.6	302.26	264.81	223.65	191.83	171.54	156.65
3	1	248.34	285.25	312.99	322.77	313.27	287.15	255.33	222.54	199.43	186.87	176.93
4	2	246.39	283.45	310.54	320.05	310.55	285.42	253.41	221.55	199.12	185.57	178.63
5	3	266.23	302.31	328.33	335.84	323.22	293.07	253.82	214.42	187.42	172.62	162.73
6	4	249.22	294.48	329.02	343.21	334.17	305.56	266.99	226.87	196.38	176.09	163.91
7	5	286.33	327.63	355.59	359.96	339.7	297.73	247.34	198.02	166.06	148.44	141.29
8	6	290.41	323.77	353.03	367.98	364.69	343.02	310.07	268.32	230.88	206.21	181.79
9	7	336.39	375.54	401.52	403.96	380.58	334.94	278.5	223.28	185.57	162.91	152.51
10	8	304.47	354.48	391.07	402.87	388.39	351.45	304.63	258.29	223.46	200.94	185.94
11	9	317.86	359.18	393.04	407.6	398.99	368.12	324.83	273.85	231.5	204.3	180.85
12	10	356.92	399.17	428.89	435.41	415.45	369.76	312.67	254.37	213.74	188.9	173.95
13	11	338.8	384.83	418.59	427.28	407.99	363.65	307.32	248.93	206.42	182.73	167.77
14	12	353.17	403.87	442.32	454.15	436.05	389.82	329.51	264.75	215.57	186.48	165.94
15	13	365.89	414.77	448.85	455.89	432.39	381.24	317.94	255.19	213.11	189.38	178.03
16	14	345.32	397.37	436.08	448.57	432.1	390.33	336.28	281.33	239.73	213.02	193.5
17	15	341.59	390.95	425.98	434.55	414.92	371.57	317.82	266.36	230.13	210.65	196.69
18	16	355.51	403.98	438.22	446.78	426.44	379	319.44	258.73	216.98	190.83	177.71
19	17	335.53	375.35	404.6	412.84	397.27	360.75	313.9	262.75	224.09	199.49	182.79
20	18	362	414.07	453.08	464.8	445.4	396.61	333.51	266.47	216.45	186.29	164.18

Figure 8: CSV-filstruktur nødvendig for absorbannberegning.

3.2.1 Oppskrift for å få lest inn en csv-fil i Excel

Hvis Excel-filen din ser ut som i figur 9 nedenfor, må du endre på innstillingene i Excel. Arduino lagrer dataene i semikolonseparert format. Vi må fra Excel til å plassere hver verdi i en separat celle.

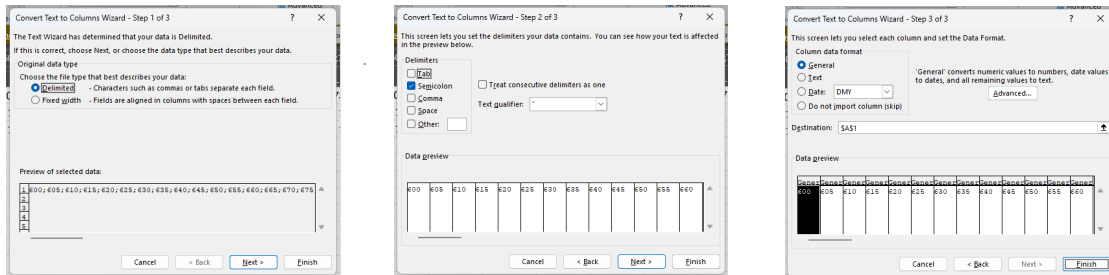


A1	600;605;610;615;620;625;630;635;640;645;650;655;660;665;670;675;680;685;690;695;700;705;710;715;720;725;730;735;740;745;93.93;116.77;136.62;149.35;156.68;157.67;156.24;154.43;154.24;155.52;160.00;165.29;172.85;181.13;188.82;199.45;207.97.23;117.50;135.02;146.79;154.55;156.69;156.42;154.77;152.80;150.62;150.99;151.75;156.43;163.85;173.01;185.70;199.96.21;117.67;135.87;146.75;152.05;150.97;147.46;143.64;141.29;140.08;142.33;145.05;150.75;158.39;167.01;179.56;192.101.15;122.90;140.45;150.01;153.55;150.36;145.12;140.41;138.14;138.17;143.01;148.91;158.63;169.50;179.42;191.73;201												
1	600;605;610;615;620;625;630;635;640;645;650;655;660;665;670;675;680;685;690;695;700;705;710;715;720;725;730;735;740;745;93.93;116.77;136.62;149.35;156.68;157.67;156.24;154.43;154.24;155.52;160.00;165.29;172.85;181.13;188.82;199.45;207.97.23;117.50;135.02;146.79;154.55;156.69;156.42;154.77;152.80;150.62;150.99;151.75;156.43;163.85;173.01;185.70;199.96.21;117.67;135.87;146.75;152.05;150.97;147.46;143.64;141.29;140.08;142.33;145.05;150.75;158.39;167.01;179.56;192.101.15;122.90;140.45;150.01;153.55;150.36;145.12;140.41;138.14;138.17;143.01;148.91;158.63;169.50;179.42;191.73;201												
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13													
14													

Figure 9: Illustrasjon av hvordan data vil se ut i csv-filen.

Følgende trinn viser hvordan du gjør det:

- Marker alle cellene som inneholder informasjon.
- Velg **Data**-fanen og deretter alternativet **Tekst til kolonner**.
- Følg trinnene som vist i figuren nedenfor som .



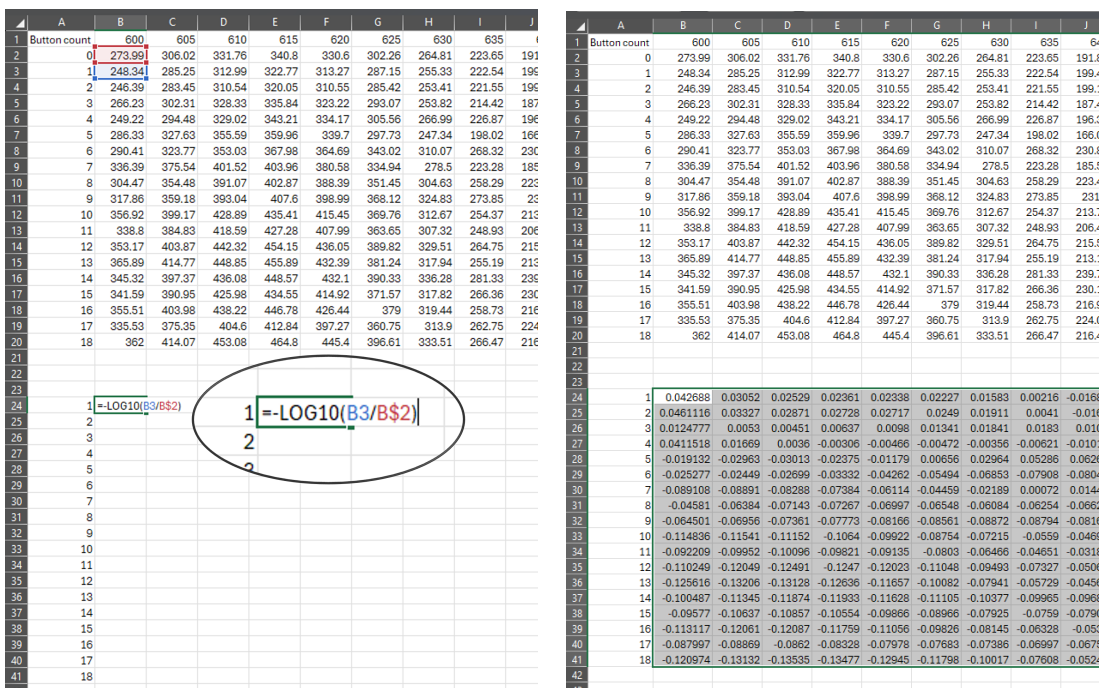
- Intensitetsverdiene ved hver bølgelengde vil til slutt bli separert og vises som i figur ??

Absorbansspektrene

La oss kort forklare innholdet i filene så langt. I figur 8 er den første kolonnen kalt **“Button count”**. Den viser antall ganger du har trykket på knappen. Første gang du trykker på knappen vil være ‘0’, og dette er bakgrunnsintensiteten I_0 ved hver bølgelengde. Deretter vil tallene fra 1 til 18 være en for hver av prøvene, dvs. 6 prøver x 3 replikater hver. Kolonnene til høyre for disse verdiene er intensitetsverdiene I for hver av bølgelengdene.

Nå skal vi beregne absorbansen. Ut fra definisjonen av absorbans i ligning 3 må vi dele hver målte intensitet I med bakgrunnsintensiteten I_0 . Som vi ser i figur 8 betyr det at vi skal dele hver av verdiene i rad nummer 1 til 18 med verdien i rad nummer 0. Følg disse trinnene for å beregne absorbansspektrene:

1. Kopier cellene i den første kolonnen fra tallene 1 til 18 og lim dem inn nedenfor som vist i figur 11a nedenfor.



(a)

(b)

Figure 11: Absorbansspektraberegning

2. Skriv inn ligningen som vist i figur 11a for å beregne absorbansen av replikat 1 ved 600 nm og trykk 'Enter'.
3. Dra den lille firkanten nederst til høyre i denne cellen ned til slutten av kolonnen ved nummer 18 for å kopiere formelen til alle cellene nedover.
4. Velg denne kolonnen og dra den lille firkanten helt til slutten av dataene til høyre, dvs. til 1000 nm for å kopiere formelen til alle bølgelengdene. Da skal det se ut som i figur 11b.
5. Nå har du absorbansspektrene for alle replikatene for alle prøvene.
6. Så skal du plote spektrene ved hjelp av **Linjediagram** under **Sett inn**-fanen som vist i figur 12 nedenfor. Velg alle absorbansverdiene du nettopp har beregnet før du går til **Sett inn**-fanen.

Hver linje i grafen viser verdiene for absorbansen for en bestemt måleserie. Tallene langs x-aksen er nummerering av verdiene, hvor hvert nummer tilsvarer en bølgelengde. Tre og tre av linjene er for samme konsentrasjon.

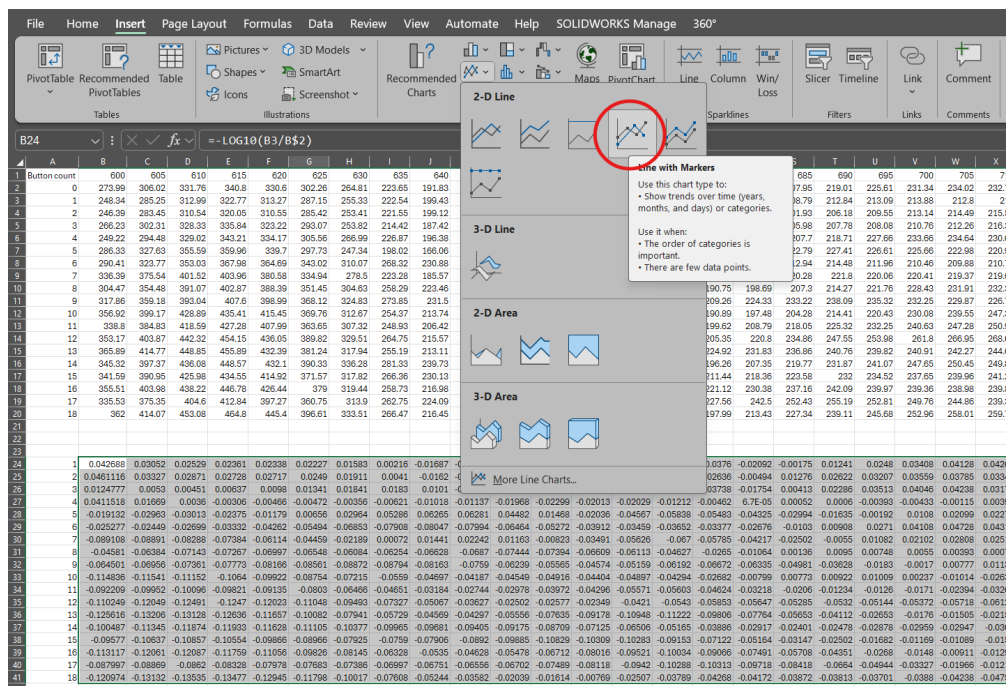


Figure 12: Velg alternativet merket med rødt for å plote spektrene til prøvene.

Regresjonsanalyse

Vi går nå videre til oppgaven med å estimere konsentrasjonen av den ukjente prøven 'X'. Da velger vi ut en bestemt bølgelengde som vi vil bruke som utgangspunkt. Det er lurt å velge en bølgelengde med "gode" måleresultater, det vil si at alle tallene er forskjellig fra null, og det er en tydelig forskjell i verdier for de ulike konsentrasjonene. Velg en av bølgelengdene mellom 605 til 625 nm som grunnlag for regresjonsanalysen. I regnearket betyr det at du skal velge ut en av kolonnene, og bare bruke disse verdiene videre.

Du kan velge om du vil gjøre regresjonsanalysen i Excel eller Geogebra ut fra hva du er kjent med. Dersom du ikke vet hvordan du gjennomfører en slik analyse, kan du gjøre det i Excel ved å følge oppskriften nedenfor.

3.2.2 Oppskrift for å bestemme konsentrasjonen av den ukjente prøven i Excel

1. Lag et nytt Excel-ark og opprett en tabell som vist i figur 13 nedenfor. For kolonnen "Absorbans", kopier absorbansverdiene for alle prøver ved bølgelengden du valgte, og lim dem inn i denne kolonnen. Når du limer inn, høyreklikk på en tom celle og velg **Lim inn som verdier**.

Concentration(%)	Absorbance
0	-0.027371519
0	-0.017130374
0	-0.031114697
20	0.1332708
20	0.162677763
20	0.15650241
40	0.309450621
40	0.280937544
40	0.292792785
60	0.447508812
60	0.444828279
60	0.420296215
80	0.557322445
80	0.517097114
80	0.500807728
100	0.581809224
100	0.625396328
100	0.589658408

Figure 13: Tabell for konsentrasjon vs absorbans.

- Gå til **Data**-fanen og velg ‘Dataanalyse’. Hvis du ikke har dette alternativet, skriv “**Tillegg**” i søkefeltet, velg “**Analyseverktøy**” og trykk ‘OK’.
- Velg ‘Regresjon’ og velg kolonnen med absorbansverdier sammen med ‘Absorbans’-cellene som ‘Inndata X-område’ og konsentrasjonsverdiene sammen med ‘Konsentrasjon’-cellene som ‘Inndata Y-område’, og trykk ‘OK’. Huk av for ‘Etiketter’.
- Et nytt ark vil vises med mange parametere og verdier. Hent verdiene fra kolonnen Koefisienter’ som vist.

	Coefficients
Intercept (c)	-1.210154249
Absorbance (m)	155.058555

Ligningen vi kan danne er

$$\text{Ukjent konsentrasjon} = m * x + c \tag{4}$$

- Her vil du trenge absorbansverdiene du beregnet for den ukjente prøven.
- Skriv inn absorbansverdiene for ukjent konsentrasjon som x’ i ligning 4, som gir deg konsentrasjonen av den ukjente prøven.
- Du vil ha tre verdier for konsentrasjonen. Ta gjennomsnittet for å finne din endelige verdi for den ukjente konsentrasjonen.

References

- [1] Britannica, “spectroscopy,” 2024. <https://www.britannica.com/science/spectroscopy>.
- [2] S. NOTES, “Electromagnetic spectrum definition and explanation,” 2023. <https://sciencenotes.org/electromagnetic-spectrum-definition-and-explanation/>.
- [3] J. Zwinkels, “Light, electromagnetic spectrum,” *Encyclopedia of Color Science and Technology*, vol. 8071, pp. 1–8, 2015.

- [4] Inspirit, “Electromagnetic spectrum study guide,” 2023. <https://www.inspiritvr.com/electromagnetic-spectrum-study-guide/>.
- [5] L. Herding, S. Caron, V. Nickich, and F. Sutter, “Spectral characterisation of high temperature solar absorber coatings,” in *2018 7th International Energy and Sustainability Conference (IESC)*, pp. 1–11, IEEE, 2018.
- [6] A. Docs, “Mkr zero.” <https://docs.arduino.cc/hardware/mkr-zero/>.