

Spektroskopianalyse av alger og syrup med UV/vis-spektroskopi

Lars Berggren og Jorid Holmen

15. mars 2022

Sammendrag

I denne labøvelsen har det blitt gjennomført spektroskopi på alger og syrup, og dataen har gått gjennom en hovedkomponentanalyse (PCA). Målet er å se om PCA er en bra måte å gruppere dataene på, og om preprossesering har en påvirkning. Resultatene sier PCA er en bra måte å gruppere på, men ikke med preprossesering.

1 Innledning

Når lys treffer en objekt blir noe av strålingen absorbert, imens resten blir reflektert. Den fargen som er mulig å se med øyet er den fargen som blir reflektert, og ikke den som blir absorbert. Dette er interessant å analysere med UV-vis spektroskopi [2].

I denne labrapporten er det mulig å lese om UV/vis-spektroskopi, hovedkomponent analyse (PCA), før det blir gjennomgått fremgangsmåte, resultat, diskusjon, og tilsutt en konklusjon.

I labøvelsen skal det utføres UV-vis spektroskopi på alger og syrup. Deretter skal det gjennomgås PCA og preprossesering for å se om det er mulig å finne en gruppering.

synlig lys som blir absorbert eller transmittert gjennom en prøve. Absorpsjonsmengden av en prøve må sammenlignes med en referanse. Vann blir ofte brukt som referanse, siden det er mange stoffer som inneholder vann, og derfor kan en teste mange ulike stoffer, og samtidig ha et felles referansegrunnlag for sammenligning mellom ulike prøver. [1]

Beer-Lambert's lov:

$$I(\omega, l) = I_0(\omega)e^{\alpha(\omega)l} \quad (1)$$

Beer-Lambert's likning

$$OD = -\log_{10}(I/I_0) = \alpha^*l, \quad (2)$$

der

$$\alpha^* = \alpha \cdot \log_{10}(e), \quad (3)$$

viser at absorbanse OD er lik negativ logaritmen av I dividert på I_0 . I_0 er valigvis intensiteten på lyset før den passerer prøven, og I er intensiteten på lyset etter den har passert prøven. Det skal derimot nevnes at I_0 ikke alltid er intensiteten før den passerer prøven, men også kan være en referanse. Dette kommer an på hvordan hvert individuelt forsøk er blitt satt opp. Fraksjonen I dividert på I_0 blir også kalt transmittans [3], [2].

2 Teori og metode

2.1 UV/vis-spektroskopi

En kan bruke ulike metoder for å gjennomføre UV-spektroskopi. De mest brukte metodene er basert på enten absorpsjon, emisjon eller fluorescens av stråling. I denne rapporten er det blitt brukt en metode som baserer seg på absorpsjon, og kalles UV/Vis spektroskopi. Dette er en målemetode som måler mengden av enten UV-stråling eller

Lys har en viss mengde energi, som er invers proporsjonal til lysets bølgelengde. Dette medfører at lys med kortere bølgelengder har mer energi enn lys med lengre bølgelengder. I UV/Vis-spektroskopi er det de ytterste elektronene i molekylene eller atomene som er involvert i prosessen. Det kreves en viss mengde energi for å få et elektron opp til et høyere energinivå. Når en prøve blir eksponert for UV/Vis-stråling, betyr det at prøven absorberer energien. Når et elektron har absorbert nok energi til å gå opp til et høyere energinivå, vil dette detekteres, og en kan da se på hvilken bølgelengde dette skjedde på. Derav har en et verktøy som kan identifisere hvilke atomer en prøve inneholder, og konsentrasjonen av ulike stoffer i prøven. [3]

2.2 Principal Component Analyse

Hovedkomponentanalyse analyserer større mengder data. PCA gjør dimensjonene til et stort datasett mindre ved å transformere de til mindre datasett som fortsatt inneholder det viktigste av informasjonen.

Grunnen til at vi bruker PCA er for å observere grupper, trender, hull og liknende som er utenfor det vanlige.

2.2.1 Preprossesering

Preprossesering er en måte å redusere støy og andre uønskede effekter [4]. I denne labøvelsen brukes det preprosseseringsfiltrene EMSC og Savitzky-Golay-filter.

Savitzky-Golay-filteret er et filter brukt i preprossesering for å øke presisjonen av spekteret utenom å forvrengte signaler. Den gjør det ved å lage et polynom utifra forskjellige punkter på spekteret, også kalt vinduer, og deriverer dette polynomet. Det er mest vanlig å ha 11 vinduer. Graden av polynomet bestemmer hvor fleksibel den er. Her er det mest vanlig å ha 2 som polynomgrad [4].

EMSC modellerer rundt et referansespektrum til å estimere parametere for å korrigere spekteret. Den gjør dette for å bli kvitt basislinjer og skaleeringseffekten, noe som det er ugunstig å ha i en PCA-analyse [4].

2.3 Utstyr

Spektrometeret brukt i laben er et trådløst PASCO transmittans spektrometer. Det opererer i det synlige spektraet som er mellom 380-950 nm, og det har en usikkerhet på 2,5 nm [2]. I laben blir absorpsjonsmodusen brukt. For å kunne bruke spektromet må det lastes ned software fra PASCO sin nettside.

2.4 Gjennomføring av UV/vis spektroskopi

For å gjennomføre målingen måtte spektrometeret kobles til en datamaskin. Først skulle den kalibreres, som ble gjort ved å måle med fingeren over prøven. Deretter ble en kuvette fylt med vann, og så ble den målt. Dette er fordi alle prøvene er løst ut med vann, og derfor er vann referansepunktet. Etter det kunne prøvene bli målt. Det var viktig å ha en balanse mellom hvor mye den skulle glattes ut, for å ikke miste for mye data.

I laben ble det sett på to forskjellige typer prøver med UV/vis-spektroskopi. Først ble syrup som hadde blitt farget av produsenten med forskjellige farger sett på. Det er disse fargene som skal undersøkes. Det var tre forskjellige farger: rød, blå og oransje. Disse ble målt tre ganger hver, og deretter ble de blandet etter et simple-lattice design (<https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section5/pri542.htm>) og hver av disse ble også målt tre ganger.

Etter det gjennomført målinger på fem forskjellige alger: *Chlorella vulgaris* (CVU), *Botryococcus Braunii* (BBR), *Vischeria polyphem* (VPO), *Neochloris oleoabundans* (NOL) og *Scenedesmus* sp. (SSP). Disse ble også målt tre ganger hver. Deretter ble de vannet ut med 1/3 vann, etter det ble de vannet ut med 2/3 vann, og målt tre ganger hver.

Når alle prøvene er tatt har det blitt produsert et excel-skjema med absorbansen.

2.5 Gjennomføring av PCA

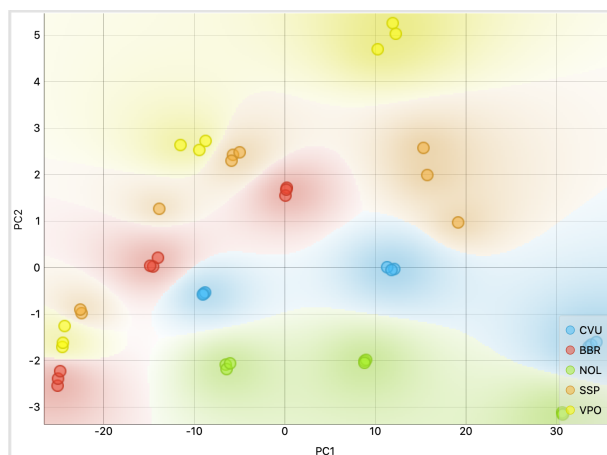
For å gjennomføre hovedkomponentanalysen ble excel-skjemaet lastet opp på Quasar. Der ble det lagd en klasse for alger og en klasse for syrup,

slik at det skulle bli enklere å holde styr på dem. Etter dette ble det gjennomført en PCA-analyse, som ble plottet i et spredningsplott. Deretter ble det prøvd litt forskjellig typer preprossesering før det endte opp på EMSC og Savitzky-Golay filter med et vindu på 11.

3 Resultat

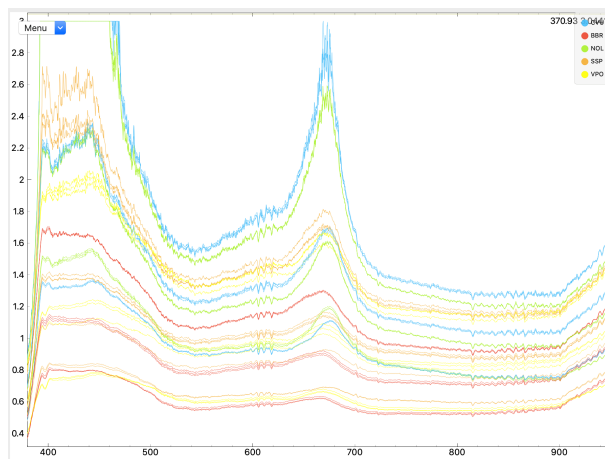
Spredningsplottet av hovedkomponentanalysen til alger kan man se i figur 1.

Den prøven som er lengst til høyre av hver farge er ublanda, den som er i midten har 1/3 vann, og den mot venstre har 2/3 vann. De prøvene med minst vann har altså høyere verdi på PC1. VPO, CVU og SSP har cirka samme verdi på PC2 på alle prøvene. BBR og SSP har mye større variasjon i PC2.



Figur 1: spredningsplot av hovedkomponentanalysen på alger uten preprossesering.

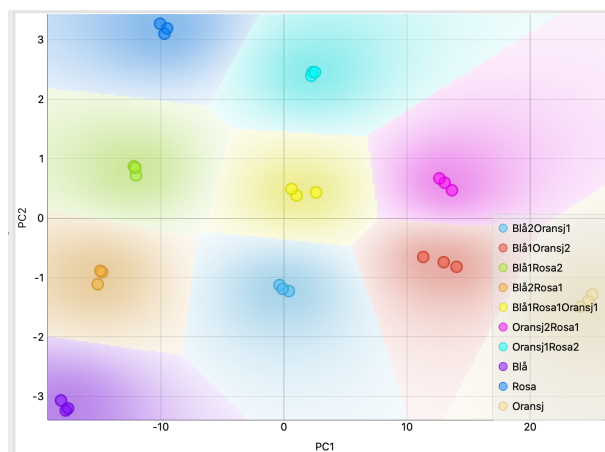
Spekteret til alger er i figur 2. Der kan man se at de prøvene med minst vann har høyere absorpsjon.



Figur 2: Spekteret til alger.

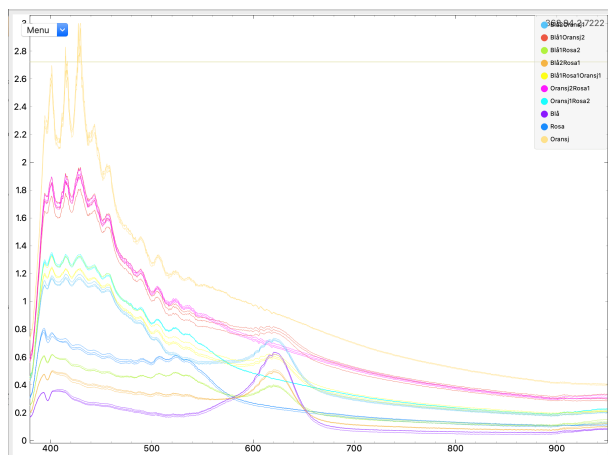
Spredningsplottet av hovedkomponentanalysen til syrup kan man se i figur 3.

Før preprossesering var dataene fra syrupen bra gruppert. Man kan se at blå er i nederste venstre hjørne, rosa er i øverste venstre hjørne og oransj i nedre halvdel på høyre side. De forskjellige blandningene har lagt seg et sted mellom de fargene de har blitt blanda med, og den prøven med alle tre fargene har lagt seg i midten.

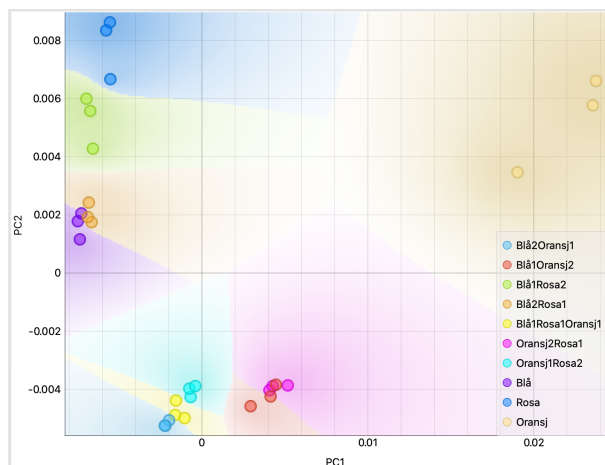


Figur 3: spredningsplot av hovedkomponentanalysen på syrup uten preprossesering.

Spekteret til syrup er i figur 4. Spekteret viser at oransj og rosa syrup, og løsninger med deler av de, har høyere absorpsjon, enn det løsninger med blå syrup har. Differansen mellom oransj og rosa syrup, kontra blå syrup er størst på lavere bølgelengder.



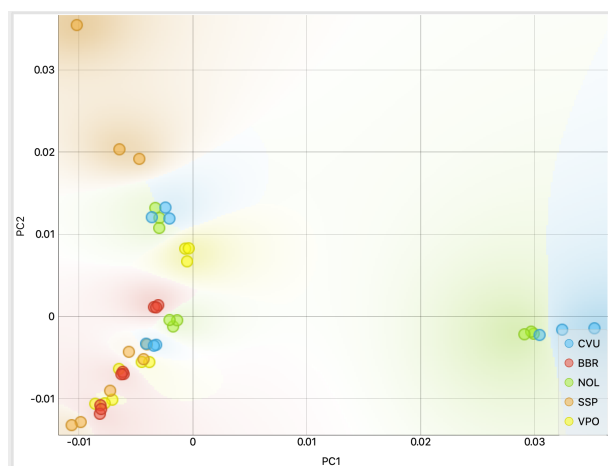
Figur 4: Spekteret til syrup



Figur 6: spredningsplot av hovedkomponentanalysen på syrup med preprossesering.

Resultatet av hovedkomponentanalysen etter preprosseseringen til alger er i figur 5.

Alle prøvene har ganske lave verdier for PC1, bortsett fra ublanda CVU og NOL. De prøvene med minst vann har høyere verdier på PC2.



Figur 5: spredningsplot av hovedkomponentanalysen på alger med preprossesering.

Resultatet av hovedkomponentanalysen etter preprosseseringen til syrup er i figur 6.

Alle prøvene i gruppen nederst inneholder oransj. Den gruppen øverst til venstre inneholder prøver med enten rosa, som er øverst i gruppen, eller blå, som er nederst i gruppen.

4 Diskusjon

Med tanke på alger er det en viss gruppering i spredningsplottet for hovedkomponentanalysen både med og uten preprossesering. De har derimot gruppert seg på forskjellige måter. Det er enklere og mer logisk og se hva de forskjellige gruppene tilhører uten preprossesering. Det er også flere outliers etter preprossesering.

Akkurat det samme gjelder syrup. Dette får en til å tenke at preprossesering kanskje ikke er den beste måten å gruppere på under UV/vis-spektroskopi.

4.1 Feilkilder

En ting som kan ha bidratt til dårligere resultater er at blandingsforholdene ble tatt på øyemål. Dette kan føre til dårligere gruppering. I tillegg skulle det helst ikke være fingeravtrykk på to av sidene til kuvettene. Det var fort gjort å få fingeravtrykk på de, og dermed kan det ha skjedd uten å ha blitt oppdaga.

4.2 Motivasjon til videre forskning?

Som nevnt i resultatdelen, så absorberer oransj og rosa syrup mer stråling enn blå syrup, og spesielt på lavere bølgelengder. Rapportens forfattere har stilt seg spørsmålet om dette er et resultat av at oransj og rosa syrup, som er sukkerfri saft, mens

blå syrup er Powerade, kan ha en påvirkning på denne oppdagelsen. Er fraværet av karbohydrater, og dermed energi, en medvirkende årsak til at rosa og oransj syrup får mye høyere absorbans? Og at det derfor krever mindre energi å få et elektron i blå syrup opp et energinivå enn rosa og oransj, fordi det allerede er en del energi i blå syrup?

Som en videre følge; viser da spektraet til syrupene, hvis en ser på arealet under spektrallinjen, hvor mye energi en kan øke Powerade med, før løsningen er "mettet"? Det vil si; kan en bruke spektroskopi til å finne ut hvor mye energi det maksimalt kan være i en løsning?

5 Konklusjon

Målet med labøvelsen var å se om hovedkomponentanalyse var en bra måte å gruppere dataene på, og om preprossesering hadde noen innvirkning på dette. Det konkluderes med at det er mulig å se en gruppering på spredningsplottet ved PCA. Ved bruk av preprossesering var det ingen forbedring i grupperingen, det ble heller verre. Preprossesering er dermed ikke passende på denne typen UV/vis-spektroskopi. Vi har i tillegg sett resultater som motiverer til videre forskning.

Referanser

- [1] Einar Skarstad Egeland. Uv-spektroskopi. <https://snl.no/UV-spektroskopi>, 2020. [Online; accessed 14. 03, 2022].
- [2] E. FYS103. Spectral analysis of algae and syrups by uv/vis-spectroscopy. *Physics institute, Faculty of Science and Technology, Norwegian University of Life Sciences*, pages 1–5, 2022.
- [3] Justin Tom. Uv-vis spectroscopy: Principle, strengths and limitations and applications. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>, 2021. [Online; accessed 14. 02, 2022].
- [4] A. Kohler. Forelesning preprosessering i infrarød spektroskopi, Januar 2022.