

Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Cheminės fizikos institutas

Silvija Andrijauskaitė

KAVOS SAVYBIŲ TYRIMAS FTIR SPEKTROSKOPIJOS METODU

Bakalauro studijų baigiamasis darbas

Taikomosios fizikos studijų programa

Studentas

Silvija Andrijauskaitė

Leista ginti

Darbo vadovas

Rasa Platakytė

Instituto direktorius

prof. Valdas Šablinskas

Vilnius 2019

Turinys

Turinys.....	2
Įvadas.....	3
1 Literatūros apžvalga.....	4
1.1 Kava.....	4
1.1.1 Kavos rūšys	4
1.1.2 Kavos skonis ir kvapas	8
1.1.3 Kitos kavos kokybinės savybės.....	9
1.2 IR spektrometrija	11
1.2.1 IR sugerties eksperimento technika.....	15
1.2.2 FTIR-ATR spektroskopija.....	17
1.3 Principinių komponentų analizė	19
2 Eksperimentinė dalis.....	21
2.1 Bandiniai.....	21
2.2 Matavimo įranga.....	22
2.3 Matavimo eiga	22
2.4 Rezultatai ir jų analizė	24
Išvados.....	32
Summary	33
Literatūros sąrašas	34
Priedai.....	37

Įvadas

Kavos kultūra turi labai senas ir galias tradicijas. Pati kava yra kildinama iš Afrikos arba Arabijos pusiasalio, dėl tikslios kilmės vietos nėra galutinai sutariama. Ankstyviausi rašytiniai šaltiniai mini kavos gėrimo procesą arba žinių apie kavą perdavimą jau šeštajame amžiuje [1].

Šiais laikais kava yra labai didelės ekonominės svarbos prekė [2]. Kava ypač vertinama dėl stimuliuojančio poveikio organizmui bei aromatinių ir skoninių savybių, kurios priklauso nuo kavos rūšies, geografinių auginimo sąlygų, kavos pupelių amžiaus, kavos apdirbimo. Tik aukštos kokybės produktas gali varžytis dabartinėje kavos rinkoje. Didžiąją dalį kokybinių savybių nulemia kavos pupelių rūšis. Dvi didžiausios komercinės reikšmės kavos pupelių rūšys yra *arabica* ir *robusta*. *Arabica* pasižymi geresniu skoniu ir kvapu, tačiau yra brangesnė. Neteisingas tyčinis ir netyčinis rūšies įvardijimas gali sukelti didelių problemų bet kurioje kavos gamybos, tiekimo ar vartojimo grandyje [3]. *Robusta* ir *arabica* kavos pupeles galima atskirti vizualiai, tačiau vizualus skirtumas tarp kavos pupelių išnyksta, pupeles sumalus ir paskrudinus, todėl šiuolaikinėms kavos gamybą reguliuojančioms institucijoms reikalingi greiti ir kokybiški būdai kavos rūšinei identifikacijai.

Kavos rūšies ir kitiems kokybiniais tyrimams labai parankus infraraudonosios spinduliuotės Furjė vaizdavimo (angl. *Fourier transform infrared*, FTIR) spektroskopijos metodas. Šiuo metodu tiriami virpesiai molekulėse, todėl iš FTIR spektrų galima gauti informacijos apie medžiagos molekulinę struktūrą. FTIR pasižymi spartumu ir patikimumu, galima panaudoti ir be ilgo bandinių paruošimo, pavyzdžiui, spektrus registruojant FTIR pažeistojo visiško atspindžio metodu (angl. *attenuated total reflection*, ATR). Tai nedestruktyvus metodas, bandinių paruošimas nesudėtingas, galima tirti kietosios ir skystosios agregatinės būsenos medžiagas, todėl FTIR-ATR metodas labai tinkamas tirti kavos kokybei.

Šio darbo tikslas: ištirti kavos kokybines savybes pasinaudojant Furjė vaizdavimo infraraudonosios sugerties spektroskopiniu metodu.

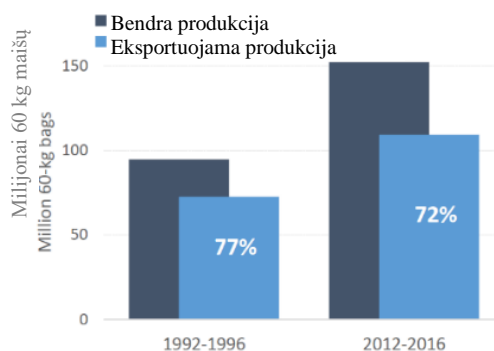
Darbo užduotys :

1. Užregistruoti skirtingų maltos kavos bei kavos ekstraktų FTIR-ATR spektrus.
2. Nustatyti spektrines žymes, pagal kurias galima indentifikuoti *robusta* ir *arabica* kavos rūšis.
3. Statistinės principinių komponentų analizės metodu identifikuoti kavos rūšis.

1 Literatūros apžvalga

1.1 Kava

Kava – vienas populiariausių gėrimų visame pasaulyje. „Jungtinių Tautų maisto ir žemės ūkio organizacijos“ (angl. *Food and Agriculture Organization*, FAO) ir „Tarptautinės kavos organizacijos“ (angl. *International Coffee Organization*, ICO) duomenimis kavamedžių plantacijų užimami plotai 2017 m. siekė 10840130 ha [4], o tais pačiais metais kavos pagaminta per 166,04 milijonų maišų (vieno maišo masė lygi 60 kg) [5]. Per pastaruosius du dešimtmečius vidutinis užauginamos kavos kiekis išaugo beveik 61 %, eksportuojamos kavos nuo bendro kiekio nukrito 5 % [6] (1 pav.). Kavos produkcijos lyderė – Pietų Amerika, antroje vietoje Azija ir Okeanija, trečioje – Meksika ir Centrinė Amerika, ketvirtoje – Afrika [5].



1 pav. Eksportuojama ir bendra kavos produkcija. Adaptuota pagal [5].

1.1.1 Kavos rūšys

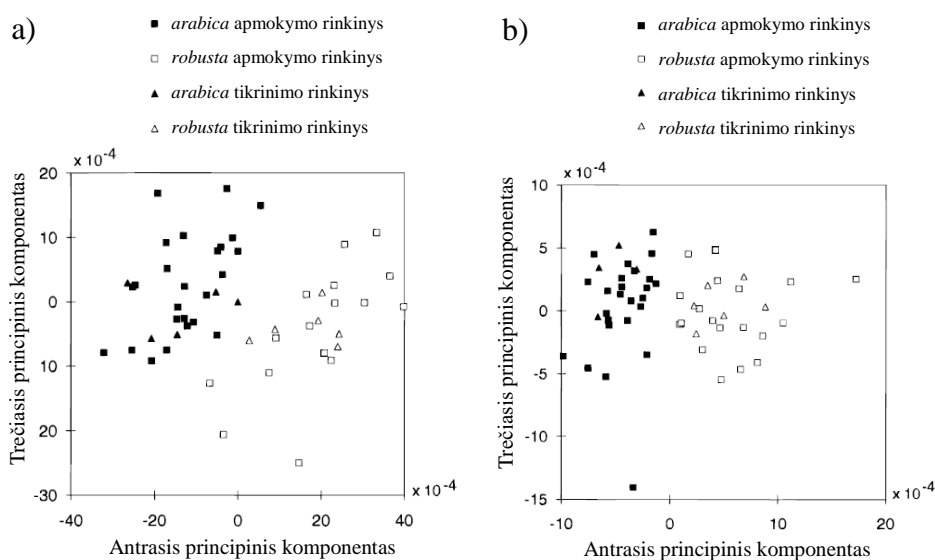
Pasaulyje žinoma daugiau nei 100 kavamedžių rūšių, iš kurių dvi labiausiai paplitusios – arabinis kavamedis (lot. *Coffea arabica*) ir didysis kavamedis (lot. *Coffea canephore*, sin. lot. *Coffea robusta*) [7]. Šios dvi kavamedžių rūšys toliau bus vadinamos *arabica* ir *robusta*. Paskutiniaisiais ICO duomenimis 2017 m. didžiąją rinkos dalį užėmė *arabica* rūšies pupelės – 61 %, *robusta* – 39 % [5]. *Arabica* kavamedžiai paprastai auga aukščiau kalnuose – nuo 600 m iki 2 200 m virš jūros lygio, *robusta* – dažniau auginama žemumose – nuo 0 m iki 800 m virš jūros lygio. Įprastai *arabica* medžiai užauga nuo 2 iki 4 metrų aukščio, o *robusta* net iki 6 metrų. *Arabica* rūšies kavamedžiai kur kas lėpesni, kavos pupelės ilgiau noksta, todėl nuimamas kur kas mažesnis derlius nei *robusta*. Tačiau *arabica* rūšies kava vertinama labiau dėl savo geresnio skonio ir stipresnio aromato, *robusta* – kartesnė, ne tokio malonaus skonio kaip *arabica*, kartais įvardijama kaip turinti „gumos“ skonį [8-9].

Dėl skoninių savybių *arabica* yra kur kas paklausesnė, tačiau ir brangesnė. 2019 m. balandžio mėnesio ICO duomenimis šių dviejų rūšių vieno kavos svaro kaina skyrėsi 32 %, *arabica* rūšies kavos vienas svaras vidutiniškai kainavo 95,31 Amerikos dolerių centų, *robusta* – 65,06 Amerikos dolerių centų [5].

Arabica ir *robusta* pupeles galima atskirti vizualiai: *arabica* pupelės didesnės, yra pailgos formos ir turi išlenktą griovelį per centrą, *robusta* – smulkesnės, apvalesnės, primenančios tablete, iš plokščiosios pupelės pusės turi tiesų griovelį [8]. Pupelės paskrudinus ir sumalus, vizualaus skirtumo tarp *arabica* ir *robusta* rūšies kavos pupelių nebelieka. Kadangi *arabica* ir *robusta* kavos rūšių ekonominės vertės labai skirtingos, neteisingas rūšies įvardijimas gali sukelti finansinių nuostolių, problemų, susijusių su pakavimu, sandėliavimu, transportavimu ir pan., pažeisti įstatymus. Todėl tiek gamintojams, tiek reguliuojančioms institucijoms reikalingi efektyvūs būdai kavos rūšies atskyrimui [3].

Kavos pupelių rūšies nustatymui anksčiau daugiausiai buvo naudojami cheminiai tyrimo metodai. Rūšies identifikacija rėmėsi mineralų, greitai garuojančių medžiagų, chlorogeninių rūgščių, kofeino kiekių skirtumais *arabica* ir *robusta* rūšių kavoje. Lipidų dalies nustatymas taip pat buvo populiarus būdas šiai identifikacijai, ypač tiriant sočiųjų rūgščių, sterolių, diterpenų ir tokoferolių skirtumus. Tačiau visi cheminiai metodai – ilgai užtrunkantys ir brangūs [11]. Pastaraisiais dešimtmečiais kavos rūšies ir kitų kavos savybių tyrimams sėkmingai pradėta taikyti vidurinėsios infraraudonosios spinduliuotės sugerties spektroskopija.

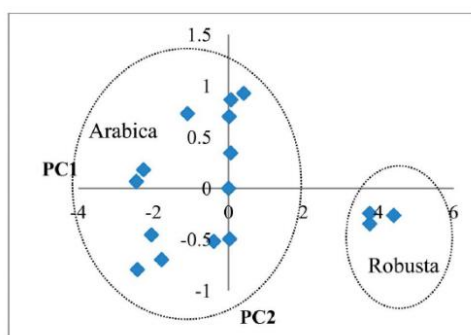
Romain Briandet, E. Katherine Kemsley ir Reginald H. Wilson tiriamajame darbe Furjė vaizdavimo infraraudonoji spektroskopija pateikiama kaip greitas, alternatyvus būdas cheminei kavos rūšies identifikacijai. Tyrimo objektas – liofilizuota kava. Liofilizacija yra kertinis procesas tirpios kavos ruošime, tai džiovinimas šaltyje, sušalęs koncentruoto kavos skonio, aromato ir spalvos skystis sublimuojamas iš maltos kavos žemoje temperatūroje, vakuume sąlygomis. Eksperimentas buvo atliktas dviem FTIR metodais – ATR (angl. *attenuated total reflection*) ir DRIFT (angl. *diffuse reflection infrared Fourier transform*). Kiekvienu metodu užregistruoti *arabica* ir *robusta* rūšies maltos kavos spektrai atsitiktinai buvo priskirti apmokymo (angl. *train*) ir tikrinimo (angl. *test*) rinkiniams. Pirmiausia principinių komponentų statistinė analizė (angl. *principal component analysis*, PCA), kuri plačiau paaiškinta tolimesniame 1. 3. skyrelyje, buvo pritaikyta apmokymo rinkiniui. *Robusta* ir *arabica* rūšies kavos spektrai sėkmingai sugrupuoti pagal rūšį (2 pav.). PCA metodu pritaikius tikrinimo rinkiniui visos kavų rūšys indentifikuotos teisingai.



2 pav. PCA rezultatai, pritaikius analizę ATR (a) ir DRIFT (b) metodais užregistruoties liofilizuotos kavos spektrams. Adaptuota pagal [12].

Taip pat pastebėta, kad gryno kofeino ir grynos chlorogeninės rūgšties mišinio spektras panašus į ATR metodu užregistruotą tirpios kavos spektrą. Padaryta išvada, kad tirpios kavos rūšies identifikacija labiausiai priklauso nuo chlorogeninės rūgšties ir kofeino kiekio tirpioje kavoje, nes *robusta* turi didesnę abiejų cheminių elementų kiekį nei *arabica* [12].

Kito FTIR-ATR eksperimento metu buvo tirtas iš žalių kavos pupelių pagamintas chlorogeninės rūgšties ekstraktas. Rezultatai parodė, kad pagrindinis skirtumas tarp *arabica* ir *robusta* kavos rūšių spektrų stebimas ties 1743 cm^{-1} spektrine juosta, kuri priskiriama chlorogeninių rūgščių ir lipidų esterių C=O cheminės jungties valentiniams virpesiams. Būtent šiai spektrinei juostai pritaikius PCA statistinį modelį, rezultatai sugrupuoti į dvi – *arabica* ir *robusta* – grupes (3 pav.) [13].

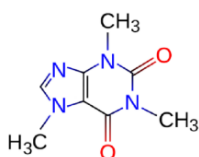


3 pav. PCA rezultatai, pritaikius analizę *robusta* ir *arabica* rūšių kavos spektrams. Adaptuota pagal [13].

Prie analogiškos išvados prieita, atlikus ir kitą FTIR-ATR eksperimentą, kurio metu buvo tiriami *arabica* ir *robusta* mišiniai: esterio sugerties juosta ties 1743 cm^{-1} gali būti naudojama kaip spektrinis žymuo, identifikuojant *arabica* ir *robusta* rūšis. Kita spektrinė juosta, kurios intensyvumas keitėsi dėl

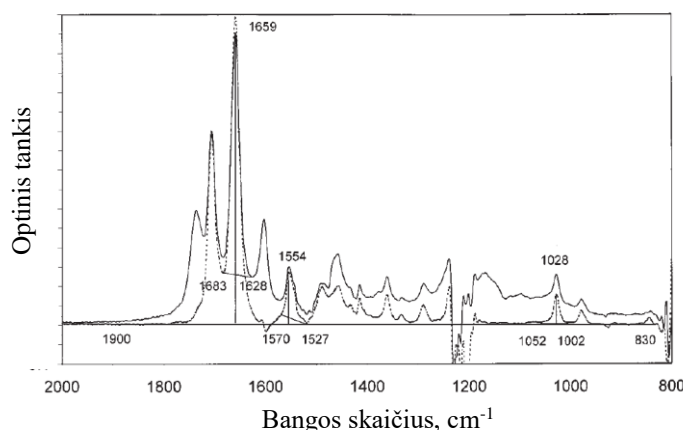
didėjančios *robusta* procentinės dalies mišinyje, buvo stebima tarp 2900 cm^{-1} ir 2800 cm^{-1} . Ši juosta priskiriama alifatinių junginių C–H cheminės jungties valentiniams virpesiams.

Kofeinas – tai neatsiejama kavos dalis, kuri taip pat lemia kavos skonį. Stimuliuodamas centrinę nervų sistemą, padidina budrumą, išsvermę, pagerina nuotaiką, virškinimo veiklą, suteikia žvalumo, padeda susikoncentruoti ir ilgiau išlaikyti dėmesį. Kofeino infraraudonosios sugerties juostos irgi galėtų būti svarbūs spektrinai žymenys rūšies identifikacijai, nes *robusta* rūšies kavoje yra dvigubai daugiau kofeino nei *arabica* rūšies kavoje. Kofeinas – tai 1,3,7-trimetilksantinas, egzistuojantis baltų miltelių pavidalu [15]. Jo molekulinė struktūra pavaizduota 4 pav.



4 pav. Kofeino ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$) molekulė. Adaptuota pagal [16].

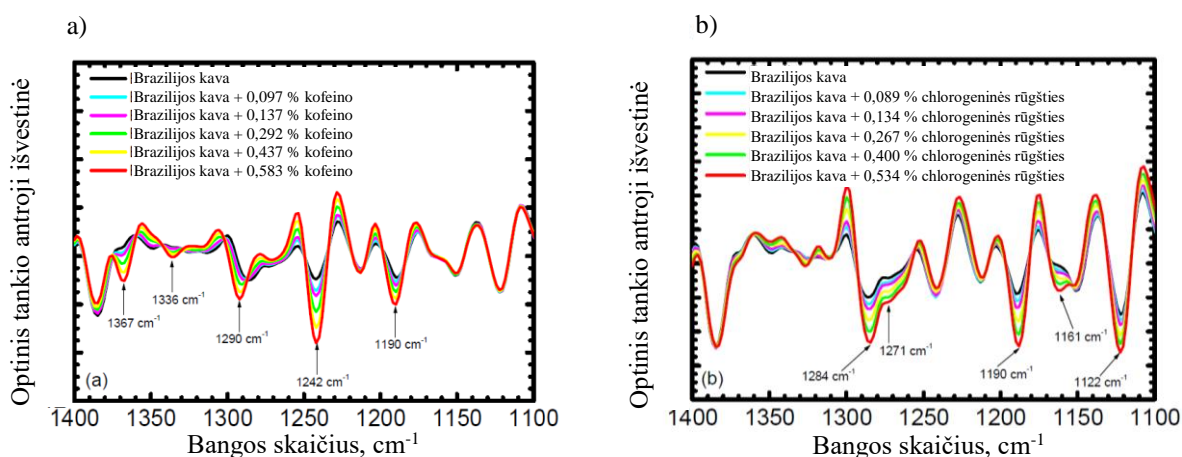
2000 m. buvo pasiūlytas naujas FTIR kofeino kiekio nustatymo metodas. Šis metodas buvo kur kas paprastesnis ir greitesnis nei tuo metu oficialus kofeino kiekio nustatymo cheminis metodas, kuris buvo paremtas mažo sėgio chromatografija. Malta kava buvo įberta į amoniaką (NH_3), tada pridėtas chloroformas (CHCl_3), po kiek laiko kavos nuosėdos pašalintos iš bandinio. Iš maltos kavos paruošto kofeino tirpalo spektras 5 pav. pažymėtas ištisine linija. Taip pat užregistruotas gryno kofeino tirpalo chloroforme spektras, kuris 5 pav. pažymėtas punktyrine linija. Kofeino kiekio nustatymui buvo pasirinkta sugerties juosta ties 1659 cm^{-1} dėl didelio intensyvumo. FTIR eksperimento metu apskaičiuotas kofeino kiekis buvo palygintas su chromatografiniu cheminiu metodu apskaičiuotu kofeino kiekiu, gauti labai panašūs rezultatai, FTIR eksperimentas buvo šiek tiek tikslesnis [17].



5 pav. Iš maltos kavos paruošto kofeino tirpalo ir gryno kofeino tirpalo chloroforme spektrai.

Adaptuota pagal [17].

Japonų mokslininkų atlikto FTIR-ATR eksperimento metu empiriškai buvo vertinami spektriniai pokyčiai, į kavos vandeninius ekstraktus pridedant papildomai kofeino arba chlorogeninės rūgšties. Spektrams buvo pritaikyta antroji išvestinė. Kofeino sugerties juostų intensyvumai ties 1367, 1336, 1290, 1242 ir 1190 cm^{-1} padidėjo, didinant procentinį kofeino kiekį. Chlorogeninių rūgščių sugerties juostų intensyvumai ties 1284, 1271, 1190, 1161, 1122 cm^{-1} taip pat padidėjo, didinant chlorogeninės rūgšties kiekį (6 pav.). Tyrimas parodė, kad tarp kofeino, chlorogeninės rūgšties ir kitų cheminių junginių vykstančios reakcijos kavoje – mažos reikšmės, todėl FTIR-ATR metodas galėtų būti naudojamas kofeino ir chlorogeninės rūgšties kiekio kavoje nustatymui [18].



6 pav. Brazilijos kavos vandeninio tirpalo su papildomai pridėtu kofeinu (a) ir chlorogenine rūgštimi (b) FTIR ATR sugerties spektrai. Adaptuota pagal [18].

1.1.2 Kavos skonis ir kvapas

Kavos kokybė yra asocijuojama su jos skoniu ir kvapu. Tik aukštos kokybės, gero skonio kavos pupelės gali sėkmingai varžytis dabartinėje kavos rinkoje [10]. Kavos klasifikavimo standartus apibrėžia „Ypatingos kavos asociacija“ (angl. *Specialty Coffee Association, SCA*). SCA protokoluotas kavos puodelio testavimas (angl. *coffee cupping*) yra vienas iš svarbiausių procesų, nustatant kavos aromatinės ir skonines savybes. Pagal sudarytą vertinimo sistemą ragautojas turi įvertinti pagrindinius skirtumus tarp skirtingų kavos rūšių bei įvardinti, kurioms kavos pupelėms teikia pirmenybę [19].

Kavos išskirtinį skonį sukuria aromato (per orą patenkačių medžiagų, dirginačių nosies receptorius) ir skonio (per burną patenkačių medžiagų, dirginančių liežuvio receptorius) junginys, kuris priklauso nuo daugelio faktorių:

- kavos rūšies,

- geografinių auginimo sąlygų (pvz., dirvožemio, aukščio, geografinės kilmės),
- kavos pupelių amžiaus,
- kavos apdirbimo (pvz, ar pupelės buvo apdirbtos šlapios, ar sausos) ir skrudinimo sąlygų,
- kavos gėrimo paruošimo [20, 21].

Skrudintoje kavoje yra daugiau nei 800 skirtingų elementų, kurių molekulinė struktūra varijuoja nuo paprasčiausių linijinių, šakotųjų iki sudėtingų ciklinių, heterociklinių ir pan. Lyman ir kt. FTIR-ATR eksperimento metu įvardijo 22 svarbiausius cheminius junginius, turinčius didžiausios įtakos skrudintos kavos skoniui. Jų didžiąją dalį sudarė ketonai, aldehydai, esteriai, rūgštys (1 lentelė). Aldehydai – aštraus kvapo, varijuojančio nuo primenančio medienos kvapą iki paskrudintų vaisių, riešutų. Ketonų kvapas ne toks aštrus, bet panašaus pobūdžio. Esteriai turi švelnesnį, labiau išreikštą vaisių skonį ir kvapą. Rūgštys gali pasireikšti acto, šokolado, degintos karamelės poskoniu, kai kurios neturi kvapo, kitos gali suteikti skoniui lengvumo. Taigi, karbonilo junginiai stipriai daro įtaką kavos skoninėms ypatybėms, kurių spektrinės juostos stebimos srityje nuo 1680 cm^{-1} iki 1800 cm^{-1} [21].

1 lentelė. Svarbiausi cheminiai junginiai, turintys įtakos kavos skoniui.

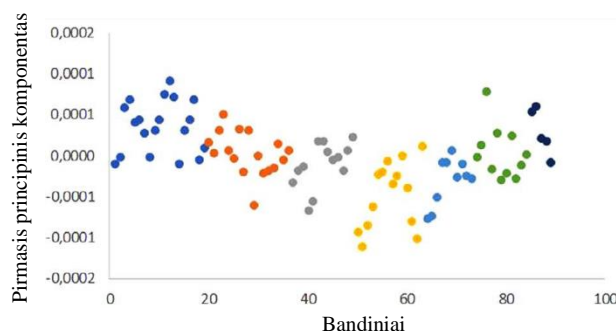
Pavadinimas	Infraraudonosios sugerties spektrinė sritis
Aromatinės rūgštys	$1680\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$
Alifatinės rūgštys	$1705\text{-}1714\text{ cm}^{-1}$
Ketonai	$1705\text{-}1725\text{ cm}^{-1}$
Aldehydai	$1724\text{-}1739\text{ cm}^{-1}$
Alifatiniai esteriai	$1740\text{-}1755\text{ cm}^{-1}$
Vinilo esteriai ir laktonai	$1762\text{-}1780\text{ cm}^{-1}$

Šiais metais buvo atliktas FTIR-ATR eksperimentas *espresso* kavai, kurio tikslas buvo taip pat išsiaiškinti *espresso* kavos skonines ir kvapines savybes. Nepaisant sudėtingos kavos cheminės sudėties, pavyko įvertinti, kurie cheminiai elementai sietini su šiomis charakteristikomis. Rūgštumas (angl. *acidity*) buvo siejamas su karboksilais, alkoholiais ir chlorogenine rūgštimi, skonis (angl. *taste*), poskonis (angl. *aftertaste*) ir bazė (ang. *body*) – su lipidų, proteinų ir, trigonelino, kofeino, karbohidridų, karboksilo ir chologeninių rūgščių kompozicija. Aldehydai, esteriai, ketonai, rūgštys buvo susiję su aromatu (angl. *aroma*) [22].

1.1.3 Kitos kavos kokybinės savybės

Terminas „kokybė“ yra oficialiai apibūdinamas: „Turimųjų požymių visumos atitikties reikalavimams laipsnis“ [23]. Brazilijoje *arabica* kavos kokybė rūšiuojama į septynias skirtingas

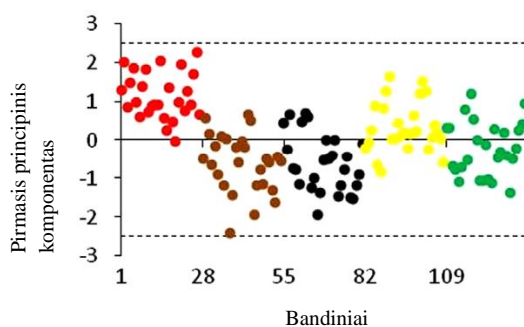
kategorijas: stipriai švelni (angl. *strictly soft*), vidutiniškai švelni (angl. *soft*), silpnai švelni (angl. *barely soft*), stipri (angl. *hard*), šiek tiek rio (angl. *rioysh*), rio (angl. *rio*) ir rio zonos (angl. *rio zone*). Atliktame tyrime buvo siekiama pagal FTIR-ATR metodu užregistruotus spektrus sugrupuoti juos pagal šias kategorijas. Geriausias rezultatas buvo pasiektas pritaikius antrąją išvestinę FTIR-ATR spektrui ruožuose $2960-2800\text{ cm}^{-1}$, $1800-1680\text{ cm}^{-1}$ ir $1249-1130\text{ cm}^{-1}$ ir pritaikius statistinį PCA metodą. Kavos kokybinės kategorijos atskirtos 95 % tikslumu (7 pav.) [24].



7 pav. PCA rezultatai, analizę pritaikius skirtingos kokybės kavos spektrams. Tamsiai mėlynais taškais pažymėta vidutiniškai švelni kava, orandžiniais – stipri, pilkais – šiek tiek rio, geltonais – rio, šviesiai žydrais – rio zonos, žaliais *arabica* ir *robusta* rūšies, tamsiai mėlynais *robusta* rūšies.

Adaptuota pagal [24].

Kito FTIR-ATR eksperimento metu buvo tirti kavos pupelių defektai (rūgščios, tamsios, nesubrendusios pupelės). Užregistruotiems spektrams pritaikius PCA, kavos pupelės buvo sėkmingai suskirstytos į dvi kategorijas: nedefektuotas - šviesias, rūgščias (angl. *non-defective – light, sour*) ir juodas – tamsias, rūgščias – nesubrendusias (angl. *black – dark, sour – immature*) [25]. Tos pačios mokslininkų grupės po kelių metų atlikto bandymo metu gauti dar tikslesni rezultatai. Sėkmingai atskirtos nedefektuotos (angl. *non-defective*), nesubrendusios (angl. *immature*), juodos (angl. *black*) ir rūgščios (angl. *sour*), pastarosios atskirtos į du pogrupius – šviesios ir tamsios (angl. *light and dark*) (8 pav.) [26].



8 pav. PCA rezultatai, analizę pritaikius defektuotos ir nedefektuotos kavos spektrams: geltonais taškais pažymėtos nedefektuotos pupelės, žaliais – nesubrendusios, juodais – juodos, raudonais – šviesios, rūgščios, rudais – tamsios, rūgščios. Adaptuota pagal [26].

FTIR-ATR sėkmingai identifiko tokias priemaišas, kaip panaudotos kavos granulės, skrudintos kavos lukštai, skrudinti kukurūzai, skrudinti miežiai [27]. Kito tyrimo rezultatai parodė, kad FTIR spektroskopija yra tinkamas būdas aptikti neatpažintas, papildomai pridėtas medžiagas, tokias kaip gliukozė, krakmolas, cikorijs [28].

1.2 IR spektrometrija

Molekulių spektroskopijos metodai paremti elektromagnetinių bangų sąveika su molekulinėmis sistemomis, kuri gali pasireikšti sugertimi, atspindžiu ar sklaida. Pirmieji spektroskopiniai eksperimentai buvo pradėti regimojoje šviesoje dėl elementarios priežasties – detektoriumi galėjo būti akys. 1665 m. Niutonas (*Newton*) pirmasis panaudojo trikampę stiklinę prizmę išskirti baltos šviesos spektrą į spalvas. Tačiau tik 1860 m. profesoriai Bunsenas (*Bunsen*) ir Kirchhofas (*Kirchhoff*) sukonstravo pirmąją prizminę spektroskopą, atominė absorbcinė spektroskopija buvo pirmą kartą panaudota kaip analitinis metodas. Nors vandenilio atomo spektras buvo tiriamas jau anksčiau, tik 1885 m. Balmerio (*Balmer*) užrašyta formulė, nusakanti vandenilio atomo spektro linijų bangų ilgius, leido teoriškai paaiškinti kai kuriuos spektroskopinius bandymus. Su XX a. Šriodingerio (*Schrödinger*), Einšteino (*Einstein*) ir kitų vystyta kvantinė mechanika tapo įmanoma apskaičiuoti ir įvertinti daugelį eksperimentinių rezultatų. Didelius informacijos kiekius leido sėkmingai apdoroti tobulėjantys greiti kompiuteriai, kurie tapo prieinami nuo šeštojo dešimtmečio. Tai paskatino spartų spektroskopijos vystymąsi. Šiais laikais spektroskopija yra plačiai taikoma mokslo šaka [29].

Spektroskopijos rūšys klasifikuojamos pagal tai, kurioje srityje registruojami molekulių spektrai. Visa infraraudonoji spinduliuotė apima sritį nuo 14000 cm^{-1} iki 10 cm^{-1} [30] ir yra skirstoma į tris dalis:

- Artimąją IR (angl. *near infrared*, NIR) sritį nuo 14000 cm^{-1} iki 4000 cm^{-1} (nuo $0,7\text{ }\mu\text{m}$ iki $2,5\text{ }\mu\text{m}$),
- Viduriniąją IR (angl. *middle infrared*, MIR) sritį nuo 4000 cm^{-1} iki 400 cm^{-1} (nuo $2,5\text{ }\mu\text{m}$ iki $25\text{ }\mu\text{m}$),
- Tolimąją IR (angl. *far infrared*, FIR) sritį nuo 400 cm^{-1} iki 10 cm^{-1} (nuo $25\text{ }\mu\text{m}$ iki $300\text{ }\mu\text{m}$) [31].

MIR srityje galima stebėti virpesinius judesius, nes jai priklauso su virpesiniais energijos šuoliais susijusių elektromagnetinių bangų dažniai. Molekuliniams virpesiams yra vadinami periodiškai molekulę sudarančių atomų judesiai, kuriems vykstant branduoliai juda vienas kito atžvilgiu taip, kad

molekulės masių centras nekeičia savo padėties erdvėje. Iš Šriodingerio lygties harmoniniam osciliatoriui:

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} + \left(\frac{2\mu E}{\hbar^2} - \frac{\mu k x^2}{\hbar^2} \right) \psi = 0, \quad (1)$$

čia redukuota masė $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ (2), cheminio ryšio jėgos konstanta k . Dviatomės molekulės virpesiniai energijos lygmenys gali būti aprašomi tokia formule:

$$E = h\nu \left(\nu + \frac{1}{2} \right). \quad (3)$$

Virpesinis kvantinis skaičius $\nu = 0, 1, 2, \dots$, dažnio ν priklausomybė nuo jėgos konstantos k ir redukuotos masės μ dviatomei molekulei:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{k}{\mu} \right)^{1/2}. \quad (4)$$

Kuo didesnė cheminio ryšio konstanta k ir kuo lengvesni atomai molekulėje, tuo didesnis dažnis. Cheminio ryšio konstanta k priklauso nuo nagrinėjimo branduolio sąveikos su aplinkiniais branduoliais ir elektronais [29].

Molekulei pereinant iš vieno virpesinio energijos lygmens į kitą, vyksta elektromagnetinės spinduliuotės sugertis arba spinduliavimas. Kvantinėje mechanikoje įrodyta, kad vykstant priverstiniam šuoliui tarp virpesinių lygmenų ν' ir ν'' , šuolio tikimybė yra proporcinga šuolio dipoliniam momentui, kuris apibrėžiamas taip:

$$R_{\nu} = \int \psi_{\nu'}^* \mu \psi_{\nu''} dx, \quad (5)$$

Čia $x = r - r_e$ (6) – atstumo tarp branduolių pokytis, μ - dipolinio momento operatorius. Dviatomių molekulių, sudarytų iš vienodų branduolių, dipolinis momentas lygus nuliui, tai reiškia, kad homobranduolinių dviatomių molekulių virpesiai yra neaktyvūs IR sugerties spektruose. Heterobranduolinių dviatomių molekulių dipolinis momentas nėra lygus 0, dipolinio momento modulį išskleidus Teiloro eilute, gauname:

$$\mu = \mu_e + \left(\frac{d\mu}{dx} \right)_e + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2\mu}{dx^2} \right)_e + \dots \quad (7)$$

Į (5) formulę įstačius (7), dipolinio momento modulis lygus:

$$R_{\nu} = \int \mu_e \psi_{\nu'}^* \psi_{\nu''} dx + \left(\frac{d\mu}{dx} \right)_e \int \psi_{\nu'}^* \psi_{\nu''} dx + \dots \quad (8)$$

Kadangi banginės funkcijos ortogonalios, kai $\nu' \neq \nu''$:

$$\int \psi_v'^* \psi_v'' dx = 0. \quad (9)$$

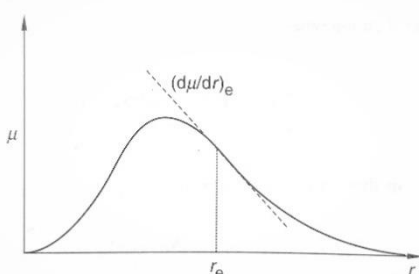
Tuomet (8) formulė tampa lygi:

$$\mathbf{R}_v = \left(\frac{d\mu}{dx} \right) \int \psi_v'^* x \psi_v'' dx + \dots \quad (10)$$

Šis integralas nelygus nuliui tik tuomet, kai

$$\Delta v = \pm 1. \quad (11)$$

Taigi, IR spektruose aktyvūs tik tie virpesiai, kurių virpesinis kvantinis skaičius pakinta vienetu arba minus vienetu. Spektrinės juostos stipris priklauso dipolinio momento modulio kvadrato $|\mathbf{R}_v|^2$, o taip pat pagal (10) formulę nuo dipolinio momento išvestinės $\frac{d\mu}{dx}$. 9 pav. pavaizduota tipinė heterobranduolinės dviatomės molekulės dipolinio momento priklausomybė nuo atstumo tarp branduolių.

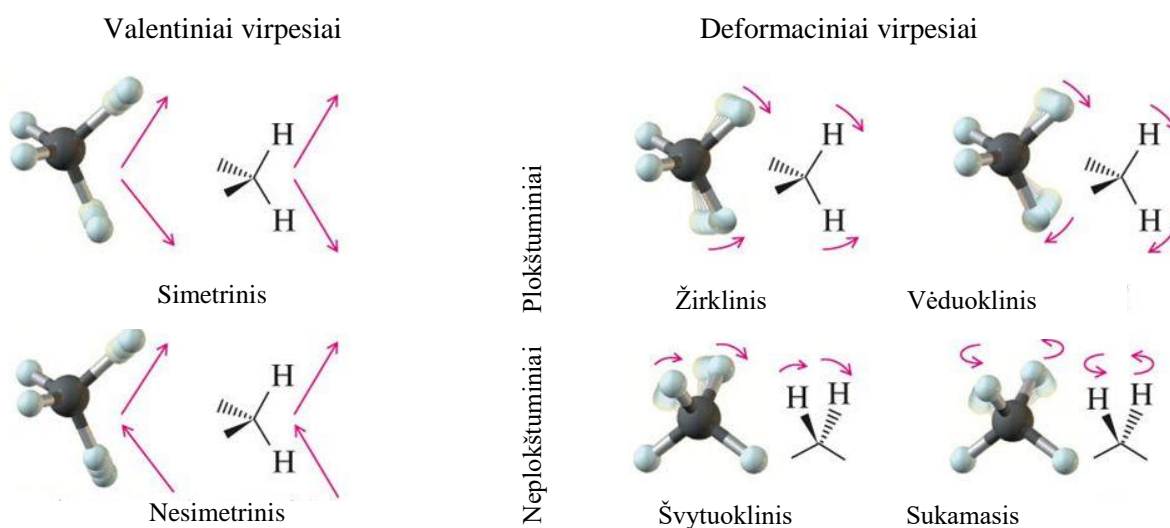


9 pav. Dipolinio momento priklausomybė nuo atstumo tarp branduolių heterobranduolinei molekulei. Adaptuota pagal [29].

Tarpbranduoliniui atstumui artėjant į nulį, dipolinis momentas taip pat artėja į nulį ($r \rightarrow 0, \mu \rightarrow 0$), tarpbranduoliniui atstumui artėjant į begalybę (pvz., neutralių molekulių atveju), dipolinis momentas artėja irgi į nulį ($r \rightarrow \infty, \mu \rightarrow 0$), todėl dipolinio momento maksimumas turi būti tarp $r = 0$ ir $r = \infty$. 9 pav. maksimumas pavaizduotas, kai tarpbranduolinis atstumas mažesnis nei pusiausvirinis tarpbranduolinis atstumas ($r < r_e$), dipolinio momento išvestinė neigiama. Jei tarpbranduolinis atstumas būtų didesnis nei pusiausvirinis tarpbranduolinis atstumas ($r > r_e$), dipolinio momento išvestinė būtų teigiama. Jei maksimumo vertė artima pusiausvirajam tarpbranduoliniui atstumui r_e , dipolinio lauko išvestinė artima nuliui, todėl atitinkama sugerties juosta bus silpna.

(8) formulėje atmesti aukštesnės eilės nariai ir atsižvelgta tik į jų priklausomybę nuo x. Griežtai kalbant, dipolinis momentas priklauso ir nuo aukštesniųjų narių, todėl dėl anharmoniškumo atrankos taisyklė $\Delta v = \pm 1$ pasikeičia į $\Delta v = \pm 1, 2, 3, \dots$. Spektrinės juostos, sąlygotos $\Delta v = \pm 2, 3, \dots$ vadinamos virštoniais, tačiau molekulių anharmoniškumas dažniausiai nežymus, todėl jo sąlygotų virštonių stipris mažas [29,32].

Daugiaatomių molekulių virpesių nagrinėjimas kur kas sudėtingesnis negu dviatomių molekulių, nes kiekviename virpesyje dalyvauja visi N molekulės branduoliai. Reikalingų nepriklausomų parametru kiekis nusakyti molekulės padėtį erdvėje vadinamas laisvės laipsnių skaičiumi. Atomo laisvės laipsnių skaičius – 3, kuris nusako Dekarto koordinatės, N dalelių sistemos laisvės skaičius – 3N. Molekulės slenkamajam judėjimui apibūdinti reikalingas laisvės laipsnių skaičius – 3, rotacinių laisvės laipsnių skaičius – 3 (nes molekulė gali sukstis apie tris nepriklausomas ašis), likusieji 3N-6 laisvės laipsniai yra virpesiniai. Tiesinei molekulei šių laisvės laipsnių skaičius yra 3N-5, nes ji turi tik 2 rotacinius laipsnius. Kadangi molekulės branduolys sąveikauja su kitais branduoliais, branduolių virpesius reikia nagrinėti kaip surištuosius, tokiu būdu molekulėje yra 3N-6 nepriklausomi virpesiai, kurie vadinami normaliaisiais virpesiais. Normaliųjų virpesių pavyzdžiai pateikti 10 pav. [32].



10 pav. Normaliųjų virpesių pavyzdžiai. Adaptuota pagal [33].

Šuolio tarp dviejų energijos lygmenų metu išspinduliuotų ar sugertų elektromagnetinių kvantų energiją galima įvertinti eksperimentiškai. Dažniau registruojama sugertis nei spinduliavimas, nes spinduliavimo spektrų registravimui būtinas terminis aukštesnių lygių sužadinimas, kuris gali sukelti molekulės disociaciją. Sugerties spektrai gaunami įvertinant į bandinį kritusios ir pro jį praėjusios spinduliuotės intensyvumus tam tikriems bangos ilgiams. Infraraudonosios spektrometrijos metodai pasižymi selektyvumu – kiekviena IR spektre aktyvi molekulė turi savo branduolių virpesių dažnių rinkinį, būdingas spektrines juostas infraraudonosios sugerties spektruose, kuriomis remiantis galima nustatyti bandinį sudarančius komponentus [32]. Charakteringos virpesinių dažnių sritys, joms priskiriami normalieji virpesiai ir cheminiai junginiai, kuriems jie būdingi, pateikiami 2-oje lentelėje.

2 lentelė. Charakteringos virpesinių dažnių sritys, joms priskiriami normalieji virpesiai ir cheminiai junginiai, kuriems jie būdingi. Adaptuota pagal [34].

Charakteringi dažniai, cm^{-1}	Virpesių tipas	Cheminiai junginiai
3800-3000	$\nu \text{ O-H}$	vanduo
3600-3200	$\nu \text{ O-H}$	alkoholiai
3300-2500	$\nu \text{ O-H}$	karboksirūgštys
3500-3300	$\nu \text{ N-H}$	aminai
3330-3270	$\nu \equiv \text{C-H}$	alkinai
3100-3000	$\nu = \text{C-H}$	alkenai
2980-2850	$\nu - \text{C-H}$	alkanai
2230-2260	$\nu \text{ C}\equiv\text{N}$	nitrilai
1750-1710	$\nu \text{ C=O}$	aldehidai, esteriai, ketonai
1670-1550	$\nu \text{ C=O}$	amidai
1680-1600	$\nu \text{ C=C}$	alkenai
1600-1400	$\nu \text{ C=C}$	aromatiniai junginiai
1300-1100	$\nu \text{ C-N}$	aminai
1750-1500	$\delta \text{ O-H}$	vanduo
1480-1350	$\delta - \text{C-H}$	alkanai
1000-675	$\delta = \text{C-H}$	alkenai
700-600	$\delta \equiv \text{C-H}$	alkinai

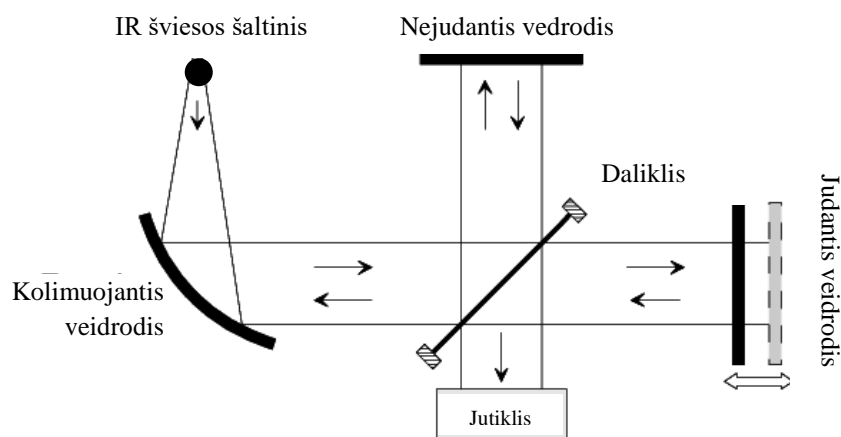
ν – valentiniai, δ – deformaciniai virpesiai.

1.2.1 IR sugerties eksperimento technika

IR spektrometrai yra klasifikuojami į kelis tipus: dispersiniai – prizminiai ir gardeliniai, bei Furjė vaizdavimo. Prizminiai ir gardeliniai pramoniniu būdu jau nebegaminami, IR spinduliuotės srityje juos pilnai iš rinkos išstūmė FT spektrometrai [29,32].

Furjė vaizdavimo pagrindą sudaro Maikelsono (*Michelson*) interferometras (11 pav.). Iš IR šviesos šaltinio spinduliuotė nukreipiama į kolimuojantį veidrodį, jis lygiagrečių šviesos pluoštelį nukreipia į spinduliuotės daliklį, kuris padalina pluoštelį į dvi lygias dalis. Vienas iš pluoštelių sklinda lygiagrečiai pradinei šviesos pluošto sklidimo kryptiai ir atsispindi nuo judančio veidrodžio, kitas –

statmenai ir atsispindi nuo nejudančio veidrodžio. Pluošteliai vėl patenka į spinduliuotės daliklį, kuriame interferuoja, jutiklis užfiksuoja pasiekiančio interferencinio pluoštelio stiprį [29, 32, 35].



11 pav. Maikelsono interferometro schema. Adaptuota pagal [36].

IR spektrometro užfiksuotas signalas yra vadinamas IR interferograma. Tai funkcijos grafikas, nusakantis spinduliuotės stiprio priklausomybę nuo laiko. Tačiau eksperimentiškai svarbesnę fizikinę prasmę turi IR spektras – funkcijos grafikas, nusakančios spinduliuotės intensyvumo priklausomybę nuo spinduliuotės bangos skaičiaus ν [32]. IR interferogramai paversti į IR spektrą naudojamas matematinis Furjė vaizdavimas, kuris pavadintas prancūzų matematiko Jozefo Furjė (*Joseph Fourier*) garbei [35]. Spinduliuotės intensyvumas $I(\Delta)$, kuris užregistruojamas jutikliu, yra išreiškiamas tokiu sąryšiu:

$$I(\Delta) = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} I(\nu)(1 + \cos(2\pi\nu\Delta)) d\nu = I(\Delta) = \frac{1}{2} I_0 + \frac{1}{2} \int_0^{\infty} I(\nu)(\cos(2\pi\nu\Delta)) d\nu. \quad (12)$$

Pirmoji integralo dalis skaitine verte lygi pusei spinduliuotės stiprio, kai optinis dviejų pluoštelių skirtumas Δ lygus nuliui. Antroji dalis yra vadinama interferograma. Norint gauti spinduliuotės stiprio priklausomybę nuo bangos skaičiaus ν , reikia atlikti interferogramos Furjė vaizdavimą:

$$I(\nu) = 4 \int_0^{\infty} I(\Delta)(\cos(2\pi\nu\Delta)) d\Delta \quad [32, 37]. \quad (13)$$

Furjė spektrometrai turi keletą privalumų. Pirmiausia, Furjė spektrometrai vienu metu registruoja labai plačią tiriamosios spinduliuotės juostą. Pavyzdžiui, dispersiniuose ir gardeliniuose spektrometruose registruojama tik siaura sritis, kuri yra apribota aparatinės funkcijos pločio. Tai sutrumpina eksperimento laiką, suvidurkinus spektrinius duomenis, gaunamas kokybiškesnis rezultatas. Antrasis privalumas susijęs su spinduliuotės kiekiu, patenkančiu į bandinį. Furjė prietaisuose spinduliuotė nėra ribojama plyšių. Trečiasis išskiriamas privalumas yra toks: bangos skaičius, dėl to ir spektrinių juostų pozicijos, kiekvieną kartą registruojant bandinio spektrą, nustatomi labai tiksliai. Furjė spektrometrų trūkumas yra tai, kad registruojant aplinkos (angl. *background*) ir

bandinio spektrus svarbu išlaikyti vienodas sąlygas, nes net ir įvertinus aplinkos sąlygas spektre gali būti stebimos spektrinės juostos (tokios, kaip vandens garų arba CO₂), kurios nepriklauso bandiniui [32, 38-39].

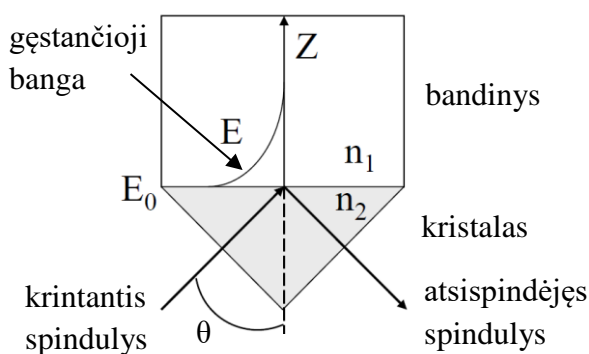
FTIR eksperimentas gali būti atliktas keliais skirtingais metodais, pavyzdžiui, pralaidumo, difuzinio atspindžio, ATR. Plačiau aptarsime tik šiame darbe taikytą FTIR–ATR metodą.

1.2.2 FTIR-ATR spektroskopija

FTIR pažeisto visiško atspindžio (angl. *attenuated total reflection*, ATR) spektrometrai pradėti naudoti šeštajame dešimtmetyje [32, 40]. Spinduliuotės visiškas vidaus atspindys gali vykti tik tuo atveju, kai spinduliuotė krenta iš optiškai tankesnės aplinkos (kurios lūžio rodiklis n_2) į optiškai retesnę aplinką (kurios lūžio rodiklis n_1) ir kai kritimo kampas θ viršija kritinį vidaus atspindžio kampą θ_k :

$$\sin \theta_k \geq \frac{n_1}{n_2}. \quad (14)$$

ATR eksperimento atveju, spinduliuotė yra atspindima riboje tarp ATR prizmės kristalo su lūžio rodikliu n_2 ir bandinio su lūžio rodikliu n_1 (12 pav.).



12 pav. Principinė ATR eksperimento schema. Adaptuota pagal [41].

Niutonas (*Newton*) pirmasis pastebėjo, kad elektromagnetinė spinduliuotė dalinai išsiskverbia į optiškai retesnę medžiagą, taip sukurdama gęstantįjį lauką (angl. *evanescent field*), – įvyksta pažeistasis visiškas vidaus atspindys [33]. Gęstančiojo lauko amplitudė gali būti išreikšta eksponentine funkcija:

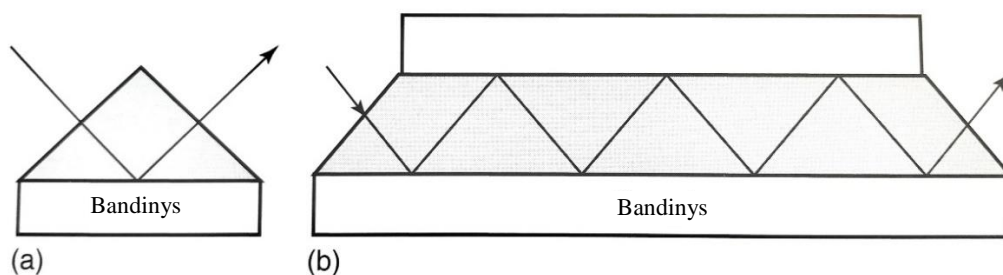
$$E = E_0 \exp \left[-z \frac{2\pi n_2}{\lambda} \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_1}{n_2} \right)^2} \right], \quad (15)$$

čia λ – bangos ilgis, E_0 – krintančiojo lauko amplitudė, z – įsiskverbimo atstumas z ašies kryptimi. Įsiskverbimo gylis (angl. *depth of penetration*) z_p yra toks atstumas, prie kurio gęstantysis laukas nusilpsta $e = 2,72$ kartų, jis gali būti išreikštas formule:

$$z_p = \frac{\lambda}{2\pi n_2 \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2}} \quad (7)$$

Iš šios formulės matyti, kad įsiskverbimo gylis priklauso nuo bangos ilgio λ , ATR kristalo lūžio rodiklio n_2 ir kritimo kampo θ . Kuo didesnis bangos ilgis, tuo didesnis įsiskverbimo gylis. Kuo didesnis prizmės lūžio rodiklis, tuo mažesnis įsiskverbimo gylis. Įsiskverbimo gylį galima keisti, naudojant ATR priedėlius su keičiama ATR prizme. Kritimo kampas priklauso nuo ATR priedėlio konstrukcijos, kai kuriuose priedėliuose jį galima keisti [29, 32, 35-36].

Moksliniuose tyrimuose naudojamos ir vieno atspindžio (13 pav. (a)), ir daugkartinio (21 pav. (b)) atspindžio prizmės.



13 pav. Spindulio eiga vieno ir daugkartinio atspindžio prizmėse. Adaptuota pagal [35].

Naudojant daugkartinio atspindžio prizmes gaunamas kur kas geresnis registruojamų spektrų signalo ir triukšmo santykis. Jei spektrai registruojami, naudojant vieno atspindžio prizmę, spektro signalo ir triukšmo santykį galima padidinti, prailginant registravimo laiką [32].

Pasirenkant prizmės medžiagą reikia atsižvelgti į eksperimentinius reikalavimus: bandinio kietumą, spektrinį intervalą, įsiskverbimo gylį, hidroskopiškumą. MIR srityje dažniausiai naudojamos cinko selenido, silicio, germanio ir deimantinės prizmės. Šiuo metu cinko selenido ATR prizmės yra vienos populiariausių dėl ypač mažos sugerties, kai bangos dažniai didesni nei 1000 cm^{-1} , tačiau jų paviršius lengvai pažeidžiamas. Kadangi eksperimento metu bandinys turi būti stipriai prispaustas prie prizmės, prizmės kietumas turi būti daug didesnis nei bandinio. Pagal kietumą universaliausia medžiaga ATR prizmei yra deimantas. Amorfinės medžiagos, praleidžiančios IR spinduliuotę, pavyzdžiui, amorfinis $\text{Ge}_{33}\text{As}_{12}\text{Se}_{55}$, prizmėms taip gali būti naudojamos, tokios prizmės labai homogeniškos [32, 39].

ATR metodas, lyginant su kitais spektroskopijos metodais, turi keliais privalumais:

- Bandinio paruošimas greitas ir nesudėtingas. Eksperimento metu spektrinė informacija gaunama iš kelių mikrometrų paviršinio sluoksnio, todėl papildomai nereikia mažinti bandinių optinio tankio, pavyzdžiui, tirpinant skaidriame tirpiklyje, formuojant plonas plėveles ar tabletes. Bandinys uždedamas ant nuvalyto kristalo, užregistruojamas spektras, bandinys nuimamas ir kristalas vėl nuvalomas.
- ATR metodas pritaikomas dviejų agregatinių būsenų bandiniams. Metodas nedestruktyvus, bandinio struktūra nepakeičiama. Tai pravartu, jei bandinys labai vertingas, turimas labai mažas bandinio kiekis arba tas pats bandinys naudojamas tolesniems tyrimams [32, 35].

Galima išskirti tokius ATR metodo trūkumus:

- Kai kurių, pavyzdžiui, cinko selenido, prizmių paviršius lengvai pažeidžiamas.
- ATR prizmės turi savo spinduliuotės sugerties juostas, todėl svarbus tinkamas prizmės pasirinkimas.
- ATR metodas yra vienas brangesnių, lyginant su kitais FTIR spektroskopijos metodais. Bazinės dalys gali kainuoti kelis tūkstančius eurų, o deimantinės prizmės dar daugiau [35].

1.3 Principinių komponentų analizė

Per pastarąjį dešimtmetį statistiniai metodai, mažinantys duomenų imtį, labai išpopuliarėjo. Vienas iš tokių statistinių metodų – principinių komponentų analizė [13]. Pagrindinis PCA uždavinys yra sumažinti didelę duomenų imtį, neprarandant informacijos bei pasirenkant svarbiausias konfigūracijas, kurios vadinamos principiniais komponentais. Analizės metu tarpusavyje apskaičiuojami nekoreliuojančių pradinių kintamųjų X_1, X_2, \dots, X_k tiesiniai principiniai komponentai Y_1, Y_2, \dots, Y_k .

Principinis komponentas

$$Y_1 = \sum_{j=1}^k \alpha_{1j} X_j, \dots, \sum_{j=1}^k \alpha_{kj} X_j \quad (8)$$

tenkina tokias sąlygas:

$$1. \text{cov}(Y_i, Y_j) = 0, i, j = 1, \dots, k, i \neq j, \quad (9)$$

$$2. \mathbf{D}Y_1 \geq \mathbf{D}Y_2 \geq \dots \geq \mathbf{D}Y_k, \quad (10)$$

$$3. \sum_{j=1}^k \mathbf{D}Y_j = \sum_{j=1}^k \mathbf{D}X_j. \quad (11)$$

Iš (9-10) formuliu matyti, kad kintamieji Y_1, Y_2, \dots, Y_k nekoreliuoti, išdėstyti dispersijų mažėjimo tvarka ir jų dispersijų suma lygi pradinių kintamųjų dispersijų sumai. Principinių komponentų ieškojimas – tai koeficientų $\alpha_{ij}, i, j = 1, \dots, k$ ieškojimas. Trumpai aprašysime pagrindinių komponentų apskaičiavimo algoritmą.

Tarkime, kad

$$Y_1 = \alpha_{11}X_1 + \dots + \alpha_{1k}X_k. \quad (12)$$

Iš pradžių ieškoma $\alpha_{11}, \dots, \alpha_{1k}$, kurių dispersija didžiausia:

$$\mathbf{D}Y_1 = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \alpha_{1i}\alpha_{1j}\sigma_{ij}^2. \quad (13)$$

čia $\sigma_{ij}^2 = \text{cov}(X_i, X_j)$. Reikalinga sąlyga, kad gautume vienintelį sprendinį:

$$\sum_1^k \alpha_{1j}^2 = 1. \quad (14)$$

Taikant matricų algebros operacijas, galima įrodyti, kad šio uždavinio sprendinys $\alpha_1 = (\alpha_{11}, \dots, \alpha_{1k})$ yra pradinių kintamųjų kovariacijų matricijų matricos S tikrinis vektorius ir atitinka maksimalią matricos S tikrinę reikšmę. Ši tikrinė reikšmė lygi $\mathbf{D}Y_1$. Taip gaunamas kintamųjų Y_1, Y_2, \dots, Y_k principinis komponentas $Y_1 = \alpha_{11}X_1 + \dots + \alpha_{1k}X_k$. Jis paaiškina $100 \cdot \mathbf{D}Y_1/\mathbf{D}$ procentų nuo bendrosios dispersijos. Analogiškai apskaičiuojamas antrasis principinis komponentas $Y_2 = \alpha_{21}X_1 + \dots + \alpha_{2k}X_k$, kuris paaiškina $100 \cdot \mathbf{D}Y_2/\mathbf{D}$ procentų nuo bendrosios dispersijos [42].

Pagrindinės PCA prielaidos yra tiesiškumas – visos transformacijos tiesinės, antroji – didelė duomenų dispersija atspindi svarbiausias duomenų struktūras, trečioji – principiniai komponentai yra ortogonalūs vienas kitam. PCA metodu galima analizuoti visiškai nežinomus duomenis, registravimo būdas – nesvarbus, todėl kartais tikrieji dėsniumai gali būti neįžvelgiami. Dar vienas atvejis, kai metodas netinkamas – duomenų pokyčiai ne ortogonaliose koordinatėse [32].

2 Eksperimentinė dalis

2.1 Bandiniai

Šio eksperimento metu buvo tirta „Kavos banko“ skrudinta kava. Kavos pavadinimai, jų trumpiniai, kavos rūšys, kilmės šalys, malimo būdai pateiki 3-oje lentelėje. Iš 14 kavos rūšių 11 buvo *arabica*, 2 – *robusta*.

3 lentelė. Eksperimento metu tirtos kava.

Nr	Pavadinimas	Pavadinimo trumpinys	Rūšis	Kilmės šalis	Malimo būdas
1	Brazil Sul de Minas NY 2	Brazil 1	arabica	Brazilija	vidutinis
2	Brazil Yellow Bourbon Fazenda Rainha	Brazil 2	arabica	Brazilija	smulkus
3	Columbia Medellin Supremo	Columbia	arabica	Kolumbija	smulkus
4	Costa Rica San Rafael	Costa Rica	arabica	Kosta Rika	smulkus
5	Guatemala Arabica SHB EP Finca Ceylan	Guatemala 1	arabica	Gvatemala	smulkus
6	Guatemala shb Roble	Guatemala 2	arabica	Gvatemala	smulkus
7	Mexico Organic shg „Berilo“	Mexico 1	arabica	Meksika	smulkus
8	Mexico Maragogype	Mexico 2	arabica	Meksika	smulkus
9	Mexico shg Topacio	Mexico 3	arabica	Meksika	smulkus
10	Papua New Guinea	Guinea	arabica	Papua Naujoji Gvinėja	smulkus
11	Tanzania AA Utengule Estate	Tanzania	arabica	Tanzanija	smulkus
12	Nicaragua shg Talia AAA	Nicaragua	robusta/arabica	Nikaragva	vidutinis
13	India Robusta AA Monsooned Malabar	India	robusta	Indija	vidutinis
14	Vietnam Robusta	Vietnam	robusta	Vietnamas	vidutinis

Tirta gryna malta kava, jos mišiniai, pakartotinai sumalta kava bei kavos ekstraktai su etanoliu, vandeniu ir metanoliu.

1. Kavos rūšinės koncentracijos tyrimui kavos mišiniai padaryti sumaišant *arabica* rūšies *Columbia* ir *robusta* rūšies *Vietnam* maltą kavą. *Robusta* kavos koncentracija kavos mišiniuose buvo didinama kas 10 %.
2. Pakartotinai kavos malimo mašinėle permaltos 5 kavų rūšys, geriausiai atspindėtos rūšinės charakteristikos. Iš jų buvo 2 *arabica* rūšies (*Brazil 1*, *Columbia*), 1 *arabica* ir *robusta* mišinys (*Nicaragua*), 2 *robusta* rūšies (*India*, *Vietnam*).
3. Gaminant ekstraktus, 200 g kavos buvo pasverta laboratorinėmis svarstyklėmis ir stikliniuose buteliukuose sumaišyta su 3 ml vandens, etanolio arba metanolio, buteliukai užsukti

kamšteliais. Iš viso paruošti 14 kavos ekstraktų su vandeniu, 14 su etanoliu ir 5 su metanoliu (*Brazil 1, Columbia, Nicaragua, India, Vietnam*). Ekstraktai palaikyti vieną dieną, prieš registruojant jų spektrus.

2.2 Matavimo įranga

Kavos savybių tyrimas atliktas *Bruker* firmos FTIR-ATR spektrometru *ALPHA-P*.

ALPHA-P spektrometro pagrindinės sudedamosios dalys:

1. MIR spinduliuotės šaltinis – globaras, silicio karbido (SiC) strypas, kuris įkaista per jį leidžiant elektros srovę. Gali pasiekti iki 1650°C temperatūrą.
1. ROCKSOLID™ aukšto stabilumo Maikelsono tipo interferometras. Šiame interferometre naudojamas kalio bromido (KBr) spinduliuotės daliklis.
2. Vieno atspindžio deimantinis ATR kristalas, ant kurio uždedamas arba užlašinamas bandinys.
3. Didelės jautros piroelektrinis DLATGS (*Deuterated Lanthanum α Alanine doped TriGlycine Sulphate*) jutiklis, kurio elektrinė talpa proporcinga sugertos energijos kiekiui.
4. Helio – Neono lazeris, kurio skleidžiamas 632,8 nm spindulys padeda kontroliuoti judančio interferometro veidrodžio poziciją ir nustatyti tiriamojo bandinio vietą.

Registruojama spektro sritis siekia nuo 7500 cm⁻¹ iki 375 cm⁻¹. Bangos skaičiaus nustatymo tikslumas prie 2000 cm⁻¹ >0,05 cm⁻¹. Signalo ir triukšmo santykis >50000 (kai matavimo trukmė 1 minutė, skyra 4 cm⁻¹). Skyrą galima keisti nuo 0,8 cm⁻¹ iki 256 cm⁻¹. Visi veidrodžiai padengti aukso sluoksniu.

Spektrometras prijungtas prie kompiuterio. Duomenų registravimui ir duomenų apdorojimui naudota kompiuterinė programa *OPUS 6.5 SP2*.

2.3 Matavimo eiga

1. Pasiruošimas. Prieš kiekvieną matavimų seriją ATR kristalas švariai nuvalytas su servetėle ir distiliuotu vandeniu. Po to įjungta kompiuterinė įranga *OPUS 6.5 SP2*, kuri yra susieta su spektrometru. ATR spektrai buvo matuojami nuo 4000 cm⁻¹ iki 400 cm⁻¹. Spektras buvo registruojamas 128 kartus, po to suvidurkinamas. Norint pasiekti geresnį signalo ir triukšmo santykį, registruojant pakartotinai sumaltos kavos spektrus, spektas buvo registruojamas 256 kartus ir suvidurkinamas. Nustatytas spinduliuotės sugerties režimas. Tuomet užregistruotas foninis (be uždėto bandinio) spektas (angl. *background*)

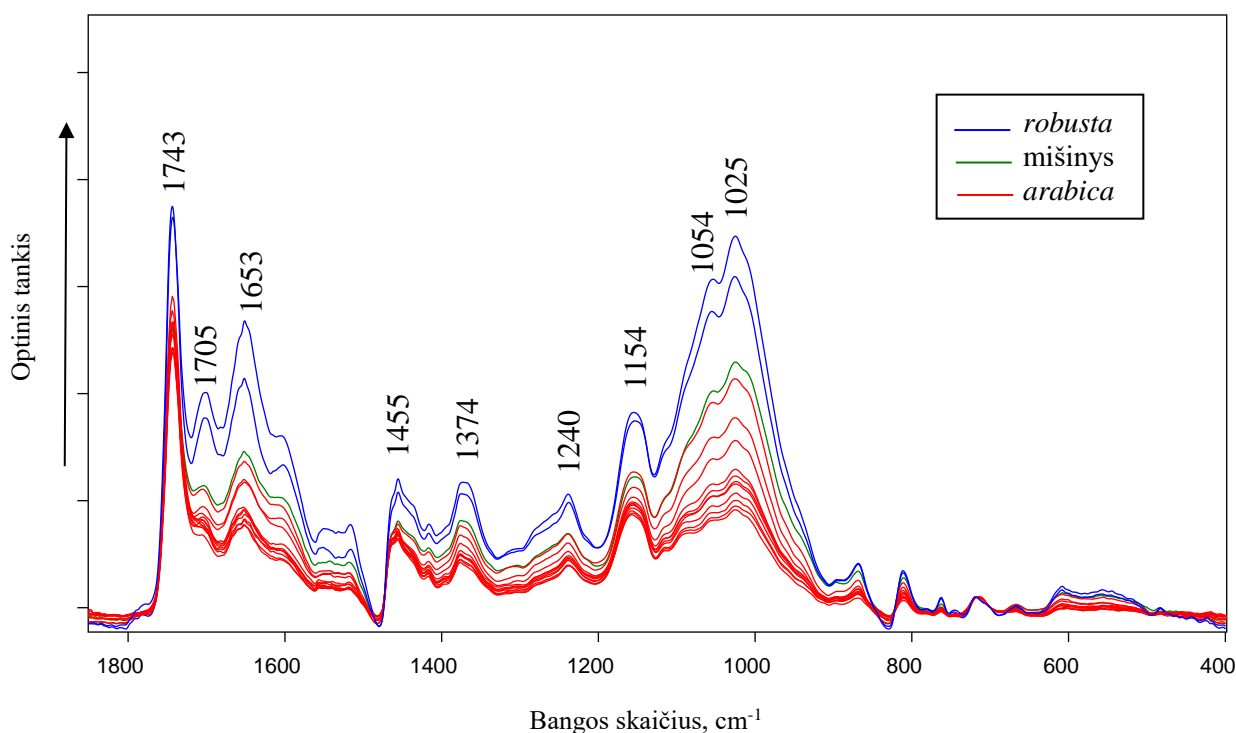
2. Spektrų registravimas. Ant ATR kristalo uždėtas maltos arba pakartotinai permaltos kavos bandinys, arba pipete užlašintas kavos ekstraktas (14 pav.). Kokybiškesnio spektro registravimui maltos ir permaltos kavos bei kavos mišinių bandiniai papildomai prispausti atsargiai nuleidžiant ir prisukant ATR spektrometro priedą, skirtą kietų bandinių prispaudimui. Ekstraktų prispausti nereikėjo, nes spektrai buvo sėkmingai užregistruoti iš susidariusios plėvelės. Ekstraktų spektrai matuoti užlašinus ir išdžiuvus atitinkamai vandeniui, etanoliui ir metanoliui. *OPUS* programa užregistruoti visų bandinių spektrai, prieš kiekvieną registravimą švariai nuvalius ATR kristalą.
3. Spektrinių duomenų apdorojimas. Kiekvienam spektrui buvo atlikta bazinės linijos korekcija (angl. *baseline correction*). Vizualiam spektrų pateikimui ir rezultatų analizei buvo pasinaudota *OPUS 6.5 SP2* ir *OriginPro 9.1* programomis. Visi spektrai buvo iškirpti 1850-400 cm^{-1} srityje ir nagrinėjama tik „pirštų atspaudų“ sritis.



14 pav. Užlašintas kavos ekstraktas ant ATR kristalo.

2.4 Rezultatai ir jų analizė

Pirmiausia buvo užregistruoti FTIR-ATR sugerties grynos maltos kavos spektrai. Kiekvienos rūšies (3 lent.) užregistruoti trijų bandinių spektrai ir apskaičiuoti jų vidurkiai. Ryškiausi spektriniai skirtumai tarp *arabica* ir *robusta* rūšies stebimi, kai spektrai sunormuojami pagal 717 cm^{-1} juostą. Spektrai pateikiami 15-ajame paveikslėlyje, raudona spalva pažymėta *arabica* rūšies kavos spektrai, mėlyna – *robusta* rūšies kavos spektrai, žalia – *arabica* ir *robusta* mišinio kavos spektras.

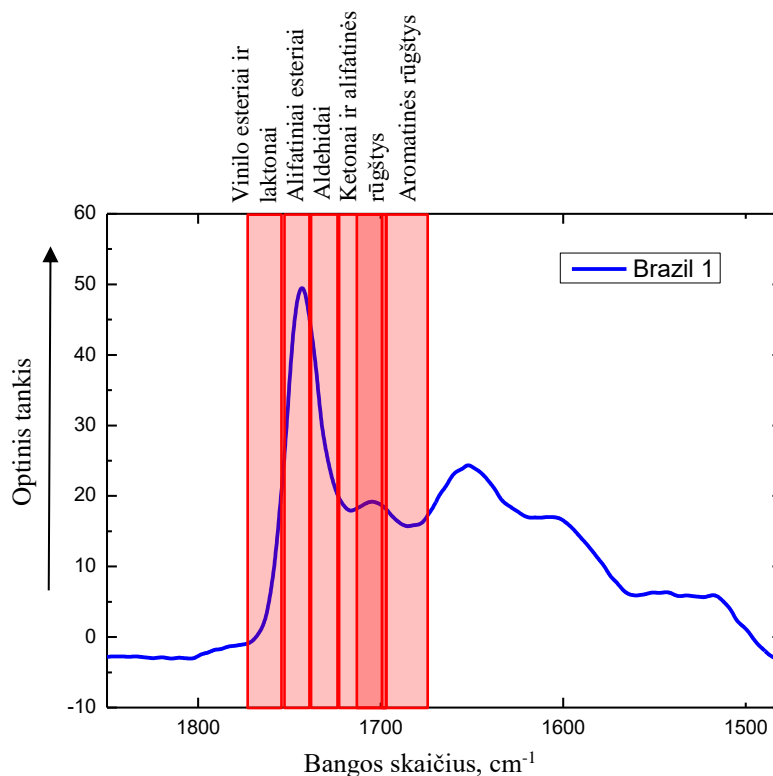


15 pav. Maltų kavų FTIR-ATR sugerties spektrai.

Iš spektrų matyti, kad *robusta* spektrinių juostų intensyvumas didesnis nei *arabica*. *Arabica* ir *robusta* mišinio (pažymėto žaliai) spektrinių juostų intensyvumas buvo mažesnis nei *robusta* rūšies kavos, bet didesnis nei *arabica* rūšies kavos spektrinių juostų intensyvumas (15 pav.).

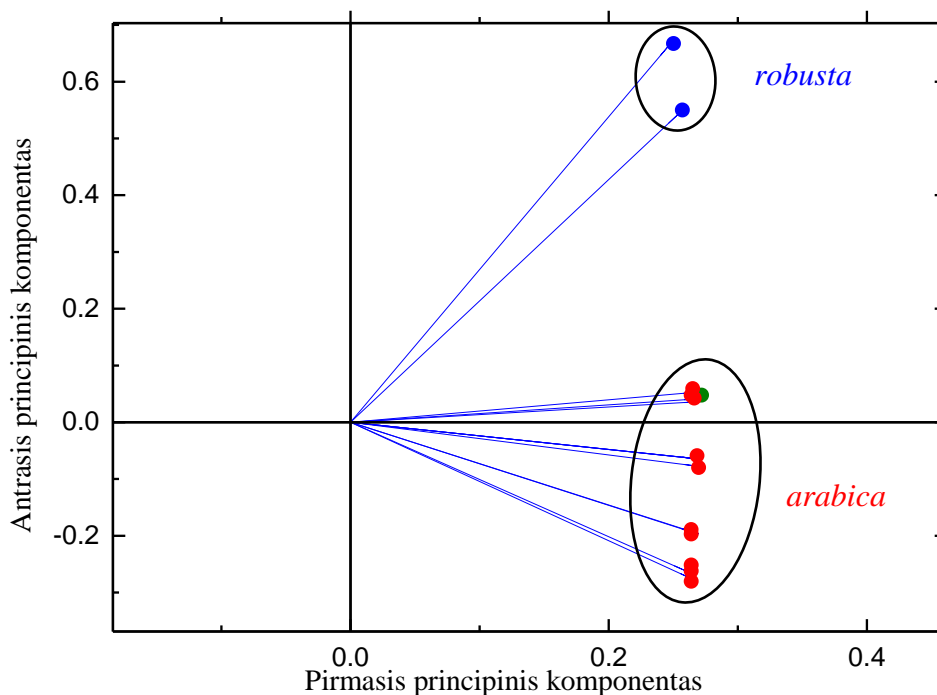
$1650\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ srities sugerties juostas lemia cheminės jungties C=O valentiniai virpesiai. Spektrinė juosta ties 1743 cm^{-1} prisikiriama esterių C=O valentiniams virpesiams, 1705 cm^{-1} – ketonų ir alifatinių rūgščių C=O valentiniams virpesiams. 1653 cm^{-1} sugerties juosta stebima dėl C=O ir C=C valentinių virpesių. 1455 cm^{-1} sugerties juostai priskiriami C–H deformaciniai virpesiai, 1374 cm^{-1} – O–H deformaciniai virpesiai, 1240 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} – C–O valentiniai virpesiai, 1025 cm^{-1} – C–C valentiniai virpesiai [24, 32, 44].

Kavos skoniui didžiausią reikšmę turinčių cheminių junginių infraraudonosios sugerties sritys pažymėtos 16 pav. Jų sugerties juostos stebimos 1750-1680 cm^{-1} srityje: aromatinių rūgščių – 1680-1700 cm^{-1} , alifatinių rūgščių – 1705-1714 cm^{-1} , ketonų – 1705-1725 cm^{-1} (alifatinių rūgščių ir ketonų spektrinės juostos dalinai persikloja), alifatinių esterių – 1755-1740 cm^{-1} , vinilo esterių ir laktonų – 1762-1780 cm^{-1} (16 pav.).



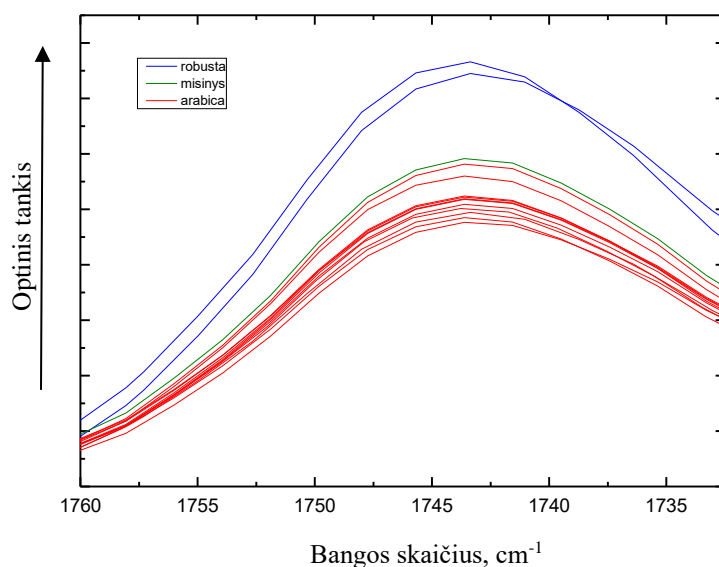
16 pav. Cheminių junginių, turinčių didžiausią reikšmę kavos skoniui, sugerties sritys.

Maltos kavos spektrams pritaikytas statistinis principinių komponentų analizės metodas, rezultatai pavaizduoti 17 pav. Pagrindinis PCA uždavinys yra neprarandant informacijos sumažinti didelę duomenų imtį, pasirenkant svarbiausias konfigūracijas, kurios vadinamos principiniais komponentais. Maltos kavos spektrus identifikuojantys taškai projektuojami į pirmąjį ir antrąjį principinį komponentą. Pirmuoju komponentu paašikinta 96,65 % kavos spektrų intensyvumo verčių dispersijos (atsitiktinio dydžio išsibarstymo), antruoju – 2,64 %. Iš PCA rezultatų matome, kad šis metodas sėkmingai suskirstė spektrus į dvi grupes pagal *arabica* ir *robusta* kavos rūšį. Kavos mišinys iš *arabica* ir *robusta* rūšies kavos pupelių buvo priskirtas *arabica* rūšies kavos grupei. Nors antrasis komponentas paašikino tik 2,64 % dispersijos, jis yra svarbesnis, nes kavos rūšinės grupės pasiskirsto antrojo komponento atžvilgiu. Galima daryti išvadą, kad pritaikius maltos kavos FTIR-ATR spektrams pritaikius PCA metodą, įmanoma identifikuoti *arabica* ir *robusta* kavos rūšis, tačiau mišiniams iš *arabica* ir *robusta* rūšies kavos šis metodas netinkamas, nes mišinio spektras gali būti priskirtas vienai iš dviejų rūšių.



17 pav. PCA rezultatai, analizę pritaikius maltos kavos spektrams.

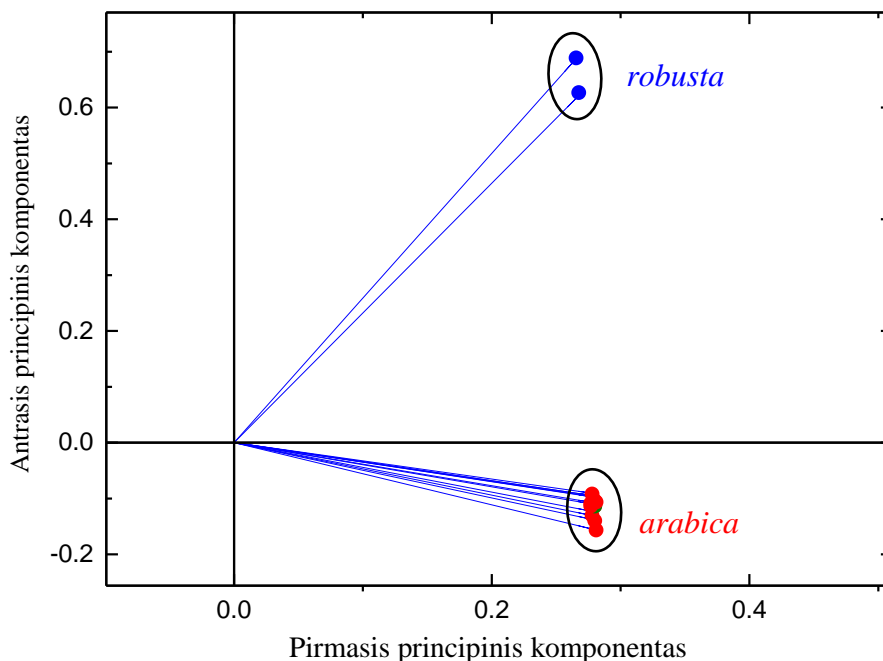
Pagal literatūrą spektrinė juosta, kurios intensyvumo maksimumas yra ties 1743 cm^{-1} (18 pav.) gali būti kaip naudojama kaip spektrinis žymuo, nustatant kavos rūšį [12, 13].



18 pav. Maltos kavos spektrinė juosta, kurios intensyvumo maksimumas yra ties 1743 cm^{-1} .

Todėl šiai spektrinei juostai analogiškai buvo pritaikytas statistinis PCA metodas (19 pav.). Spektrai taip pat sėkmingai suskirstyti į dvi *arabica* ir *robusta* rūšines grupes, kaip ir PCA metodą taikant visai spektrinei sričiai nuo 1850 cm^{-1} iki 400 cm^{-1} , tik šį kartą kavos spektrus identifikuojantys taškai labiau

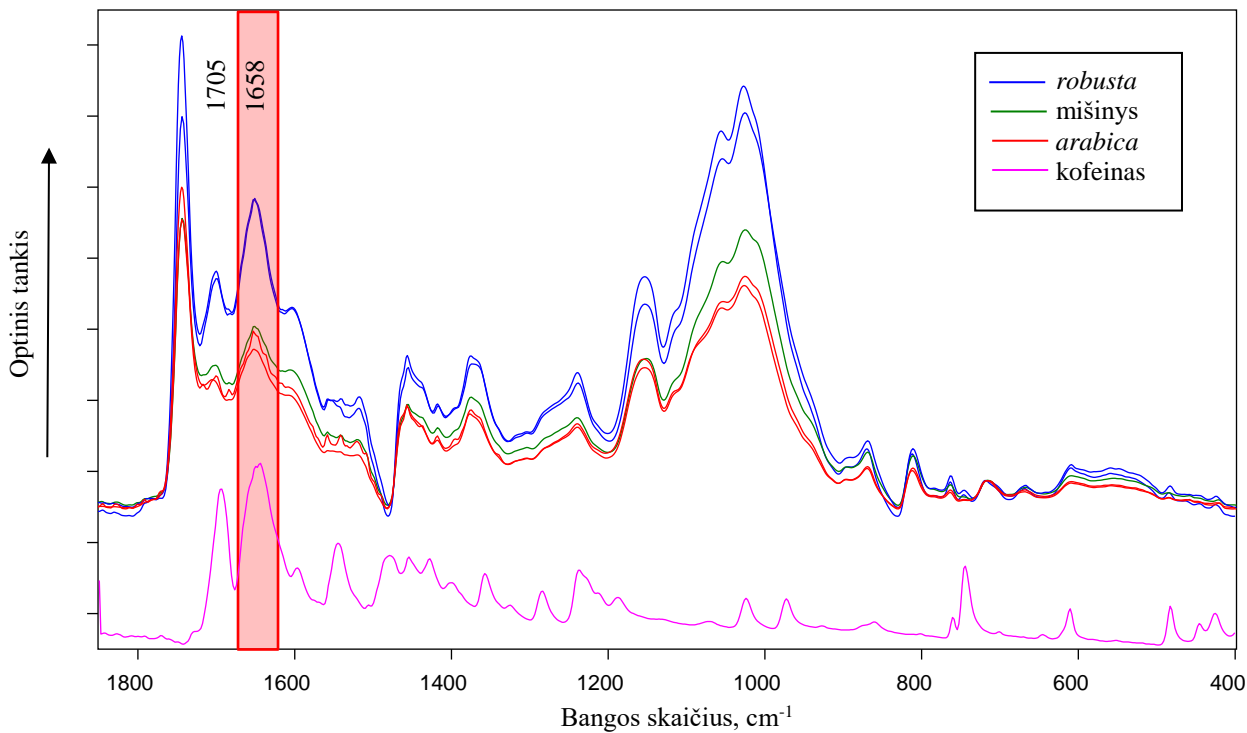
sutelkti. Pirmasis komponentas irgi svarbesnis, nes jo pasiskirsčiusios kavos rūšys. Pirmuoju komponentu paaiškinta 98,22 % dispersijos, antruoju – 1,73 %. Mišinio spektras iš *arabica* ir *robusta* kavos pupelių priskirtas vėl prie *arabica* grupės.



19 pav. PCA rezultatai, analizę pritaikius maltos kavos spektrinei juostai ties 1743 cm^{-1} .

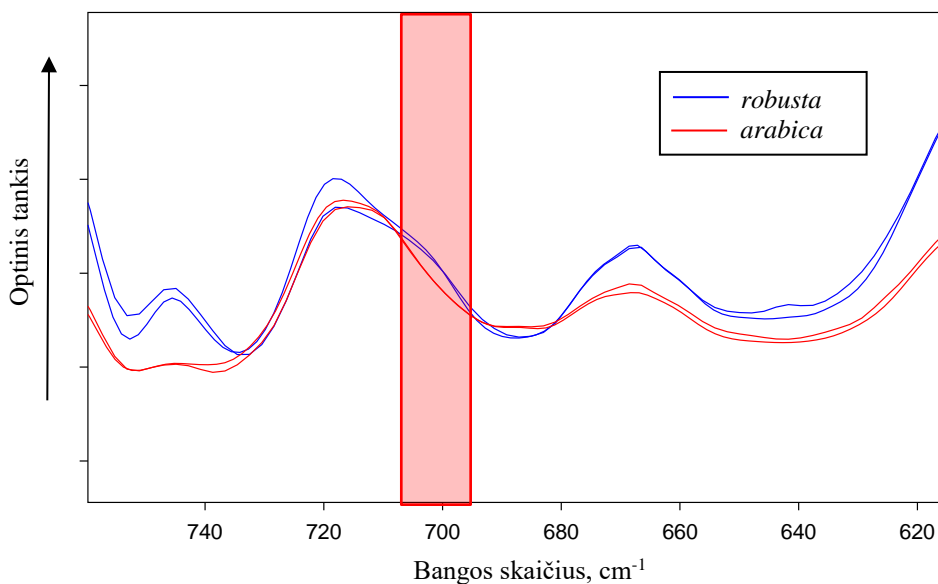
Buvo paruoštos 5 pakartotinai sumaltos kavų rūšys. Tiksliesniems rezultatams kiekvienos pakartotinai sumaltos kavos spektras užregistruotas po 10 kartų, kiekvieną kartą uždedant naują bandinį ant ATR kristalo. Šiems spektrams apskaičiuoti vidurkiai, kurie pavaizduoti 20 pav. Visi spektrai sunormuoti pagal 717 cm^{-1} juostą.

Robusta rūšies kavos pupelėse kofeino yra dvigubai daugiau nei *arabica* rūšies, todėl tai svarbus spektrinis žymuo, norint identifikuoti kavos rūšį. Kofeino spektras violetine linija pavaizduodas taip pat 20 pav. Dvi intensyviausios gryno kofeino juostos stebimos ties 1705 cm^{-1} ir 1658 cm^{-1} (cheminės jungties C=O valentiniai virpesiai). Kavos spektrų intensyvumo vertė ties 1705 cm^{-1} didesnė nei ties 1658 cm^{-1} , todėl tolesniam santykiniam kofeino santykinės koncentracijos nustatymui buvo naudojama ši kofeino sugerties juosta (20 pav. pažymėta raudonu kvadratu). Norint palyginti kofeino santykinės koncentracijas *robusta* ir *arabica* rūšies kavoje, pirmiausia prilyginome permaltos kavos spektro juostas, kurios intensyvumas didžiausias, integralą 100 %. Atitinkamai suintegravus visų spektrų juostų plotus, *robusta* rūšies santykinis koncentracijos kiekis buvo 100 %, *robusta* ir *arabica* mišinio - 59 %, *arabica* rūšies - 50 % ir 55 %. Santykinė kofeino koncentracija tarp *robusta* ir *arabica* rūšies kavos skyrėsi apytiksliai du kartus.



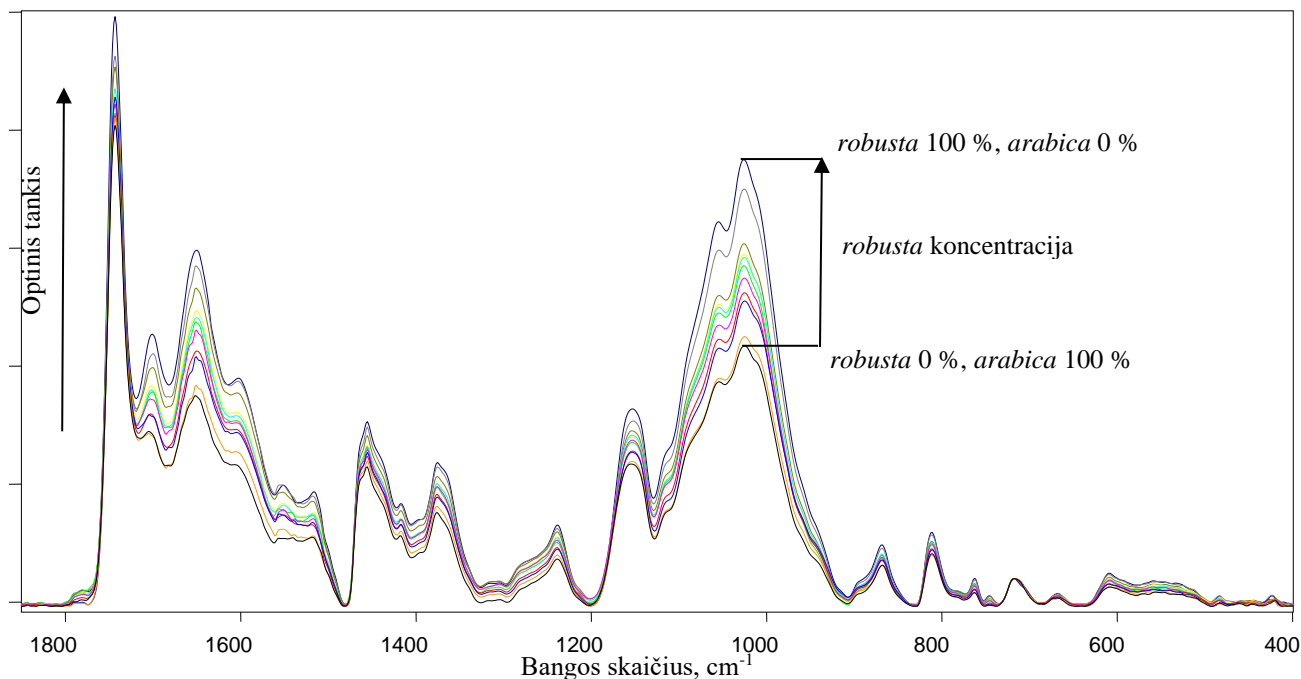
20 pav. Pakartotinai sumaltos kavos ir kofeino FTIR-ATR sugerties spektrai.

Analizuojant pakartotinai sumaltos kavos spektrus $760\text{-}615\text{ cm}^{-1}$ srityje, ties 700 cm^{-1} stebimas kitas svarbus spektrinis žymuo - *robusta* rūšies kavos spektrų petys (21 pav.). Spektrai pastumti vienas kito atžvilgiu optinio tankio ašies kryptimi, siekiant geriau pastebėti skirtumus tarp spektrų.



21 pav. *Arabica* ir *robusta* rūšies pakartotinai sumaltos kavos FTIR-ATR sugerties spektrai $760\text{-}615\text{ cm}^{-1}$ srityje.

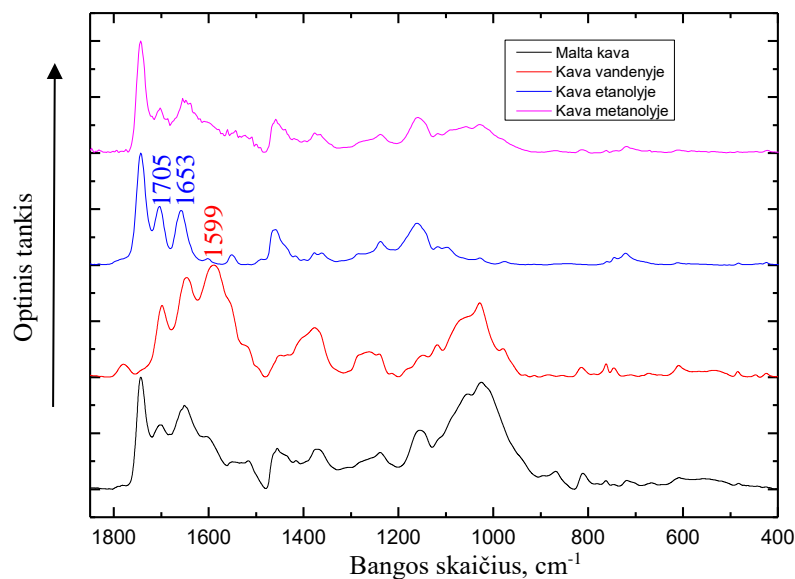
Laboratorijoje sumaišytų *arabica* ir *robusta* rūšies kavos mišinių spektrai pateikti 22 pav. Visi spektrai sunormuoti pagal 717 cm^{-1} juostą. Mažiausio intensyvumo spektras atitinka 100 % *arabica* rūšies kavos spektrą, didžiausio intensyvumo spektras atitinka 100 % *robusta* rūšies kavos spektrą. Spektrinių juostų intensyvumas didėja, didinant *robusta* rūšies koncentraciją (*robusta* koncentracija buvo didinama kas 10 %). Mišinių, kai *robusta* arba *arabica* rūšies kavos koncentracija didesnė nei 10 %, spektrinių juostų intensyvumai kinta tolygiai. Didžiausi intensyvumo verčių pokyčiai dėl *robusta* procentinės dalies didėjimo *arabica* ir *robusta* mišiniuose stebimi srityse 1500-1750 cm^{-1} ir 1100-950 cm^{-1} srityse.



22 pav. Mišinių FTIR-ATR sugerties spektrai.

Buvo paruošti kavos ekstraktai su vandeniu, etanolu ir metanolu. Vanduo pasirinktas dėl akivaizdžios priežasties – kavos gėrimo pagrindą sudaro vanduo. Alkoholių – etanolio ir metanolio – pasirinkimą lėmė chlorogeninių rūgščių tirpumas šiuose tirpikliuose. *Robusta* rūšies kavos pupelės turi daugiau chlorogeninės rūgšties nei *arabica* rūšies. Visų kavos vandeninių ir alkoholinių kavos ekstraktų spektrai pateikti 1-ajame priede. Tipiniai vienos rūšies kavos spektrai pavaizduoti 23 pav. Visi spektrai sunormuoti pagal minimumų ir maksimumų vertes.

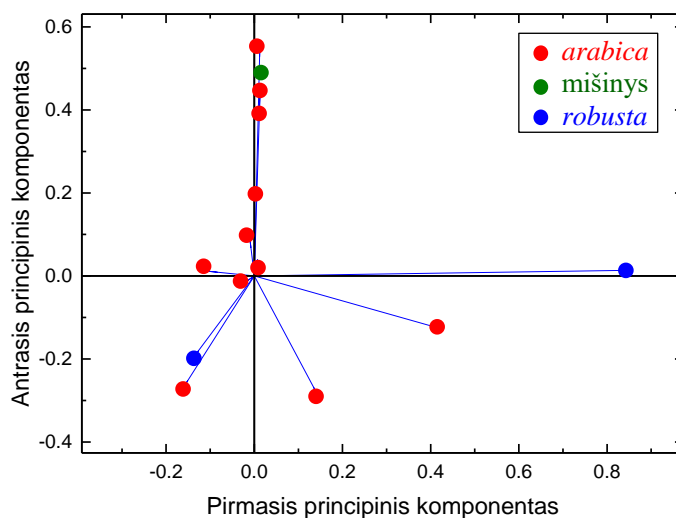
Kavos ekstrakto su vandeniu užregistruotame spektre stebimas $-\text{CO}_2$ antisimetrinių valentinių virpesių sustiprėjimas ties 1599 cm^{-1} spektrine juosta. Kofeiną charakterizuojančių juostų intensyvumas ties 1705 cm^{-1} ir 1653 cm^{-1} nepasikeitė, nepriklausomai nuo ekstrakto. Etanolio ir metanolio spektrai labai panašūs. Chlorogeninės rūgšties sugertis stebima 1700-1740 cm^{-1} ir 1300-1150 cm^{-1} srityse.



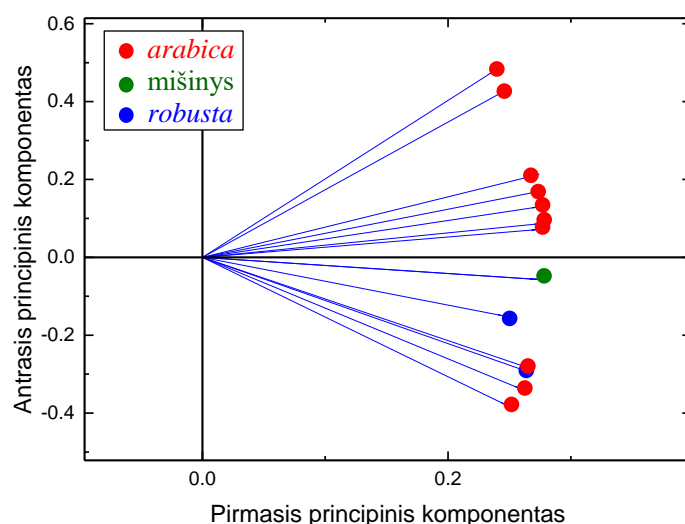
23 pav. Kavos ekstraktų FTIR-ATR spektrai.

Kava pilnai neištirpsta nei vandenyje, nei etanolyje, nei metanolyje, todėl pipete užlašinus bandinį, ant ATR kristalo galėjo patekti skirtingas nuosėdų kiekis. Kavos ekstraktų spektrų atsikartojamumas nebuvo įvertintas, užregistravus kelių to paties ekstrakto bandinių spektrus. Todėl galimai nebuvo tinkamai įvertinti kavoje ištirpusių medžiagų (pvz., chlorogeninės rūgšties) spektrai, pagal kuriuos galima būtų įvertinti kavos rūšį. Taip pat nebuvo patikrinta, ar ekstrahentą ir kavą sumaišius tokiomis pačiomis koncentracijomis, ekstraktų spektrai būtų vienodi.

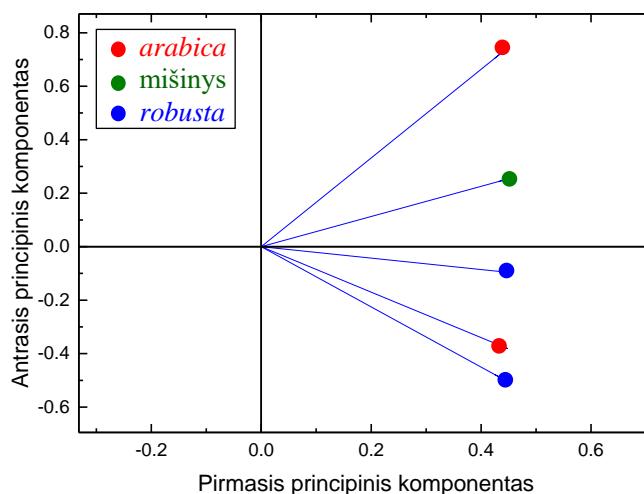
Skirtingų ekstraktų su vandeniu, etanoliu ir metanoliu spektrams buvo pritaikytas statistinis PCA metodas (24-26 pav.). Matome, kad nei vienu atveju nebuvo sėkmingai identifikuotos *arabica* ir *robusta* rūšys.



24 pav. PCA rezultatai, analizę pritaikius kavos ekstraktų su vandeniu spektrams.



25 pav. PCA rezultatai, analizę pritaikius kavos ekstraktų su etanoliu spektrams.



26 pav. PCA rezultatai, analizę pritaikius kavos ekstraktų su metanoliu spektrams.

Principiniais komponentais paaiškinamos dispersijos procentinės dalys kavos ekstraktams su vandeniu, etanoliu ir metanoliu pateikiamos 4-oje lentelėje. Iš 24-26 pav. matyti, kad pritaikius PCA kavos ekstraktams su vandeniu, etanoliu ir metanoliu, kavos ekstraktų spektrus identifikuojantys taškai labiausiai išsibarstę (pirmuoju principiniu komponentu paaiškinama 44,25 % duomenų, antruoju – 21,47 %).

4 lentelė. Dispersijos procentinės dalys kavos ekstraktams su vandeniu, etanoliu ir metanoliu.

	Kavos ekstraktas su vandeniu	Kavos ekstraktas su etanoliu	Kavos ekstraktas su metanoliu
Pirmasis principinis komponentas	44,25 %	89,34 %	96,49 %
Antrasis principinis komponentas	21,47 %	7,74 %	2,19 %

Išvados

1. Nustatyti spektriniai žymenys, kuriais galima remtis, nustatant kavos rūšį: sugerties juostos ties 1743 cm^{-1} ir ties 1658 cm^{-1} , kurios priskiriamos cheminės jungties C=O valentiniam virpesiams, bei petys ties 700 cm^{-1} *robusta* rūšies kavos spektruose.
2. Užregistruotiems FTIR-ATR spektrams pritaikius statistinį principinių komponentų analizės metodą sėkmingai identifikuotos maltos kavos *arabica* ir *robusta* rūšys.
3. Pritaikius PCA metodą kavos ekstraktams su vandeniu, etanoliu ir metanoliu, nebuvo galima nustatyti *arabica* ir *robusta* kavos rūšių.

Coffee Quality Analysis Using FTIR-ATR Spectroscopy

Summary

Silvija Andrijauskaitė

Coffee is a commodity of a big economical value. It is appreciated because of its aroma and taste, which depend on a number of factors, such as species of coffee beans, geographical growing conditions, processing and roasting conditions, age of coffee beans, coffee cup preparation. Coffee species greatly attribute to coffee quality. There are two main coffee species of a commercial value, they are called *arabica* and *robusta*. They differ not only with taste (*arabica* is appreciated more), but the price as well (*arabica* is more expensive). Accidental and fraudulent species mislabeling can lead to financial loss, problems related to distribution, law breaking. Therefore it is important to discriminate these two major species, which greatly attribute to the quality.

The aim of this bachelor thesis is to examine coffee quality characteristics using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy.

This bachelor thesis objectives are:

1. Acquire ground coffee and coffee extracts spectra by FTIR attenuated total reflectance (ATR) sampling technique.
2. Specify spectral references for coffee species authentication.
3. Identify coffee species using principal component analysis.

In this work, Fourier transform infrared spectroscopy is explored as a method for identification of coffee products. Principal component analysis (PCA) is applied to spectra of ground coffee and its extracts with water, ethanol, methanol, acquired by ATR sampling technique.

Spectral references for the coffee species identification were found to be infrared absorbance bands at 1743 cm^{-1} and 1658 cm^{-1} , *robusta* spectra shoulder at 700 cm^{-1} . FTIR-ATR spectroscopy combined with PCA successfully discriminated *arabica* and *robusta* coffee species. It wasn't possible to identify coffee species when PCA was applied to coffee extracts with water, ethanol and methanol spectra.

Literatūros sąrašas

1. Barbin, D. F., de Souza Madureira Felicio, A. L., Sun, D.-W., Nixdorf, S. L., Hirooka, E. Y. Application of Infrared Spectral Techniques on Quality and Compositional Attributes of Coffee: An Overview. *Food Research International* 61: 23-32. 2014.
2. International Trade Center. *The Coffee Exporter's Guide*. Ženeva. 2011.
3. Weinberg, B., Bealer, B. K. *Caffeine: The Science and Culture of the World's Most Popular Drug*. New York, London: Routledge. 2002.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations statistics. <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>> (žiūr. 2019 05 23).
5. International Coffee Organization. *Coffee Market Report*. 2019. <<http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-0419-e.pdf>> (žiūr. 2019 05 23).
6. International Coffee Organization. *Development of Coffee Trade Flows*. 2018. <<http://www.ico.org/documents/cy2017-18/icc-121-4e-trade-flows.pdf>> (žiūr. 2019 05 23).
7. *Coffea* plant list. <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=coffea>> [žiūr. 2019 05 10].
8. Haines, D. What is Robusta Coffee? Robusta vs Arabica: 12 Differences. 2018. <<https://enjoyjava.com/robusta-coffee/>> [žiūr. 2019 05 10].
9. Pabari, S. 10 Differences Between Robusta & Arabica Coffee. 2014. <<https://theroasterspack.com/blogs/news/15409365-10-differences-between-robusta-arabica-coffee>> [žiūr. 2019 05 10].
10. Kavos klubas. Kavos pupelių klasifikavimas. <<https://www.elektromarkt.lt/lt/kavos-klubas-arabika-ir-robusta>> [žiūr. 2019 05 10].
11. Rubayiza, A. B., Meurens, M. Chemical Discrimination of Arabica and Robusta Coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4654-4659. 2005.
12. Briandet, R., Kemsley, E. K., Wilson, R. H. Discrimination of Arabica and Robusta in Instant Coffee by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 170-174. 1996.
13. Deshpande, S., El-Abassy, R. M., Jaiswal, R., Eravuchira, P., Kammer, B., Materny, A., Kunhert, N. Which Spectroscopic Technique Allows the Best Differentiation of Coffee Varieties: Comparing Principal Component Analysis Using Data Derived From CD-, NMR- and IR- Spectroscopies and LC-MS in the Analysis of the Chlorogenic Acid Fraction in Green Coffee Beans. *Analytical Methods*, 6: 3268-3276. 2014.
14. Radigya, M. C., Loureiro, L. B., Rodrigues, R. R. T., Costa, H. B., Oliveira, B. G., Filgueiras P. R. Thompson, C. J., Lacerda, V., Romão, W. Chemical Profiles of Robusta and Arabica Coffee by ESI(-)FT-ICR MS and ATR-FTIR: a Quantitative Approach. *Analytical Methods*, 8: 7678-7688. 2016.

15. Šimonytė, G., Banelytė, S., Čerčikienė, I., Jurkevičiūtė, J. Kofeino ir polifenolinių junginių kiekio nustatymas žaliojoje arbatoje. Vilnius: Vilniaus kolegija. 2017.
16. Kofeino molekulė <<https://maistologija.wordpress.com/2010/08/08/kofeinas/kofeino-molekule/>> [žiūr. 2019 05 10].
17. Garrigues, J. M., Garrigues, Z. B. S., de la Guardia, M. Fourier Transform Infrared Determination of Caffeine in Roasted Coffee Samples. *Journal of Analytical Chemistry* (366):319–322. 2000.
18. Hashimoto, A., Mori, H., Kanou, M., Yamanaka, A., Kameoka, T. Mid-Infrared Spectroscopic Analysis on Brewed Coffee Characteristics. *Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering congress program and abstracts*, 702. 2004.
19. Specialty Coffee Organization. Protocols and Best Practices. <<https://sca.coffee/research/protocols-best-practices>> [žiūr. 2019 05 23].
20. Craig, A. P., Botelho, B. G., Oliveira, L.S., Franca, A. S. Mid Infrared Spectroscopy and Chemometrics as Tools for the Classification of Roasted Coffees by Cup Quality. *Food chemistry*, 245: 1052-1061. 2018.
21. Lyman, D., Benck, R., Dell, S., Merle S., Murray-Wijelath, J. FTIR-ATR Analysis of Brewed Coffee: Effect of Roasting Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3268-3272. 2003.
22. Belchior, V., Botelho, B. G., Oliveira, L. S., Franca, S. A. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Spectroscopy (ATR-FTIR) and Chemometrics for Discrimination of Espresso Coffees with Different Sensory Characteristics. *Food Chemistry*, 273: 178-185.
23. ISO. ISO 9000. Quality Management Systems. Ženeva. 2019.
24. Craig, A. P., Botelho, B. G., Oliveira, L.S., Franca, A. S. Mid Infrared Spectroscopy and Chemometrics as Tools For the Classification of Roasted Coffees by Cup Quality. *Food Chemistry*, 245: 1052-1061. 2018.
25. Craig, A. P., Franca, A. S., Oliveira, L. S. Evaluation of the Potential of FTIR and Chemometrics for Separation Between Defective and Non-defective Coffees. *Food Chemistry*, 132: 1368 - 1374. 2012.
26. Craig, A. P., Franca, A. S., Oliveira, L. S., Irudayaraj, J., Ileeleji, K. Application of Elastic Net and Infrared Spectroscopy in the Discrimination Between Defective and Non-defective Roasted Coffees. *Talanta*, 128: 393-400. 2014.
27. Reis, N., Botelh, B. G., Franca, A. S., Oliveira, L. S. Simultaneous Detection of Multiple Adulterants in Ground Roasted Coffee by ATR-FTIR Spectroscopy and Data Fusion. *Food Analytical Methods*, 10: 2700-2709.
28. Briandet, R., Kemsley, E. K., Wilson, R. K. Approaches to Adulteration Detection in Instant

- Coffees Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71: 359-366. 1996.
29. Hollas, J., M., *Modern Spectroscopy*, England: John Wiley & Sons, Ltd. 2004.
 30. Derrick M. R., Stulik D., Landry J. M. *Infrared Spectroscopy in Conservation Science: Scientific tools for conservation*. Los Angeles: The Getty Conservation Institute. 1999.
 31. Theophanides, T. *Introduction to Infrared Spectroscopy*. Athens: National Technical University of Athens, Chemical Engineering Department, Radiation Chemistry and Biospectroscopy, Zografou Campus. 2012. <<https://www.intechopen.com/books/infrared-spectroscopy-materials-science-engineering-and-technology/introduction-to-infrared-spectroscopy>> [žiūr. 2019 04 25].
 32. Čeponkus, J., Šablinskas, V., *Modenioji molekulių virpesinė spektrometrija*. 2014.
 33. *Infrared Spectroscopy and Mass Spectrometry*. <<https://slideplayer.com/slide/14812040/>> [žiūr. 05 23].
 34. Socrates, G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. Niujorkas: John Wiley & Sons <<https://socratic.org/questions/how-does-infrared-spectroscopy-identify-functional-groups>>[žiūr. 05 23].
 35. Brian C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, JAV, FL: Taylor and Francis Group, LLC. 2011.
 36. Schematic layout of a Michelson interferometer. <https://www.researchgate.net/figure/Schematic-layout-of-a-Michelson-interferometer_fig5_40618970> [žiūr. 05 23].
 37. Liu, X. *Fourier Transform Interferometer*. <http://www.physics.drexel.edu/~bob/Term_Reports/Liu_2012.pdf> [žiūr. 05 23].
 38. Šablinskas, V., *Paviršiaus optinės spektrometrija*, Vilnius: Leidykla TEV. 2008.
 39. Red. Gauglitz, G., Moore, D., S., *Handbook of spectroscopy*, Weinheim: Wiley-VCH, 2014.
 40. Mirabella, F. *Modern techniques in applied molecular spectroscopy*. Niujorkas: John Wiley & Sons, Inc. 1998.
 41. Lefèvre, G., Preočanin, T. Lützenkirchen, J. *Attenuated Total Reflection – Infrared Spectroscopy Applied to the Study of Mineral - Aqueous Electrolyte Solution Interfaces: A General Overview and a Case Study*. 2012. <<https://www.intechopen.com/books/infrared-spectroscopy-materials-science-engineering-and-technology/attenuated-total-reflection-infrared-spectroscopy-applied-to-the-study-of-mineral-aqueous-el>> [žiūr. 05 23].
 42. Čekanavičius, V., Murauskas, V. *Statistika ir jos taikymai II*. Vilnius: Leidykla TEV. 2002.
 43. Wang, N., Fu, Y., Lim, L.-T. *Feasibility Study on Chemometric Discrimination of Roasted Arabica Coffees by Solvent Extraction and Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 3220-3226. 2011.

Priedai

1 priedas. Kavos ekstraktų su vandeniu (a), etanoliu (b) ir metanoliu (c) FTIR-ATR sugerties spektrai.

