

Közeli infravörös spektroszkópia és mikroszkópia

black box
▼
grey box

(N)IR
elfogad-
tatása

Gergely Szilveszter

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

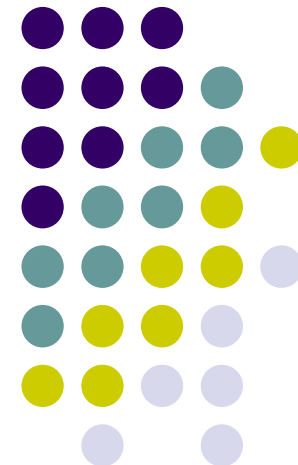
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

Optikai spektroszkópia

2014. október 29.



Rezgések és hullámok (USA vs. Magyarország)



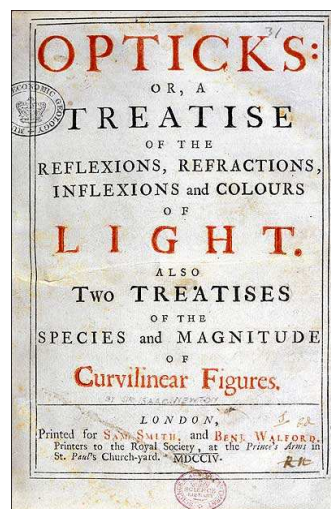
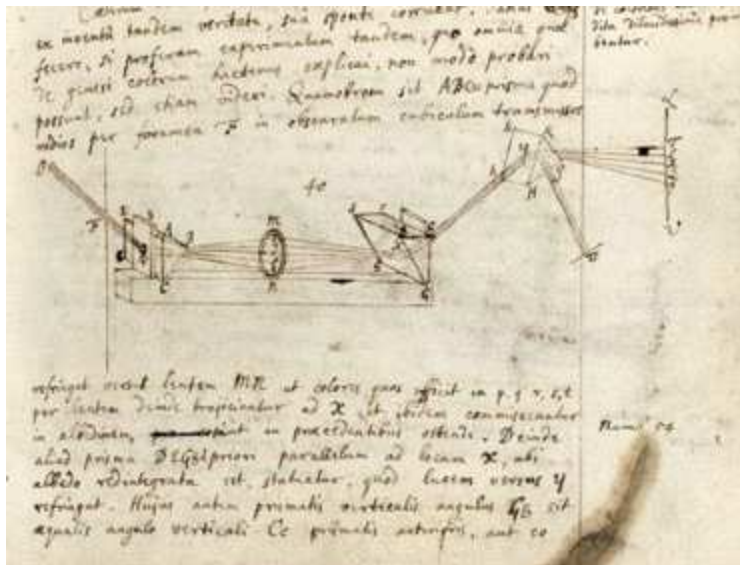
(Tacoma Narrows Bridge, “Gallopín’ Gertie”, 1940. november 7.)



BME:
Schönherz
Qpa
vs. 4-6
villamosok.

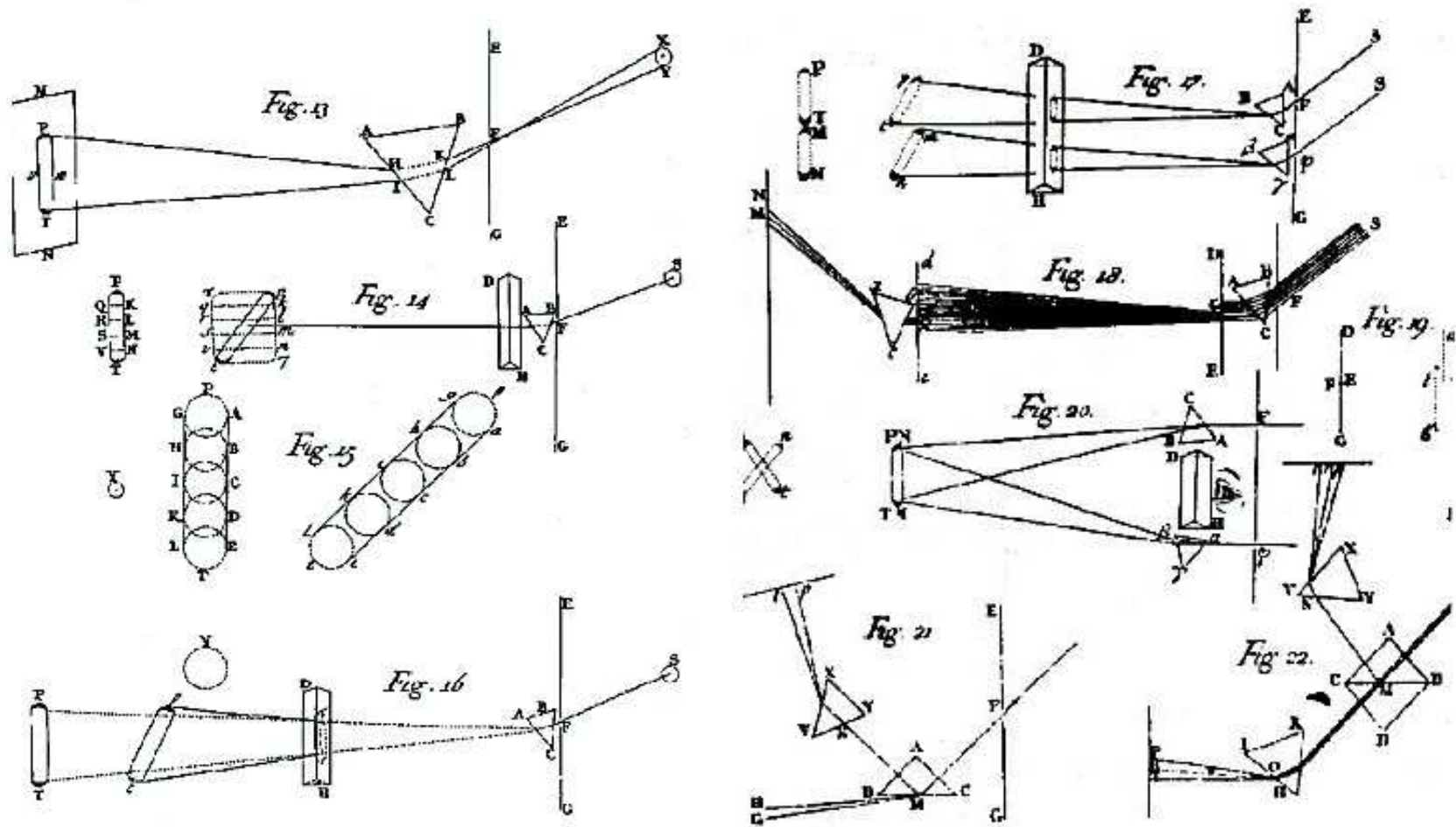
(egy budapesti villamos, “sárga szöcske”, 2011)

Newton kísérletei – a fehéren túl I.



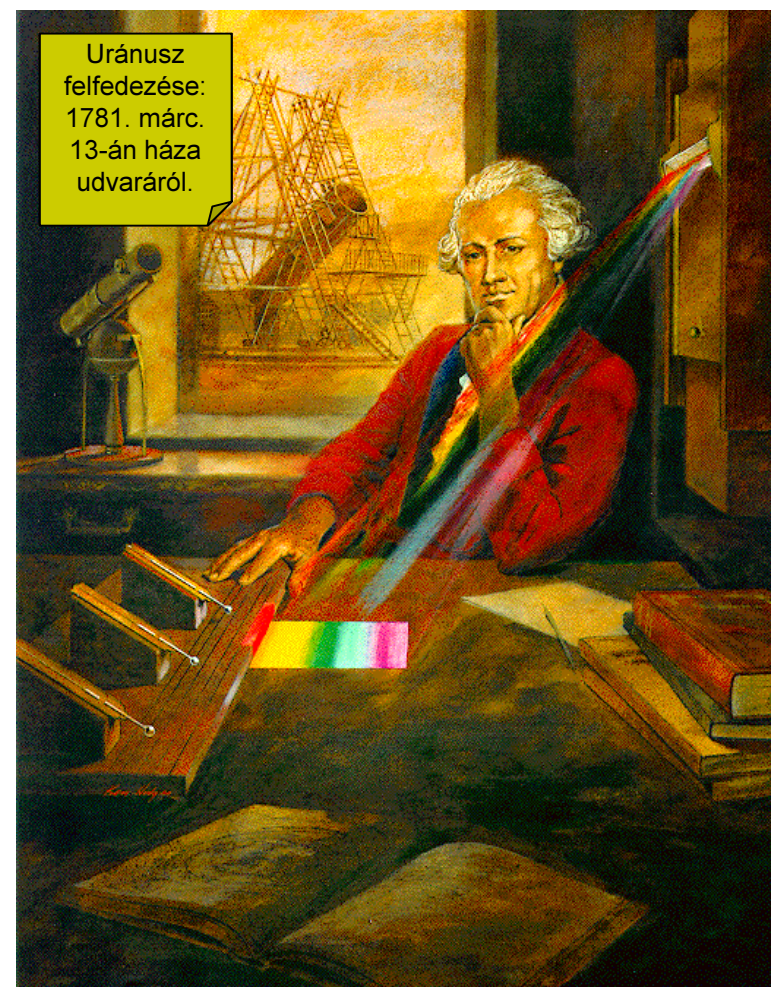
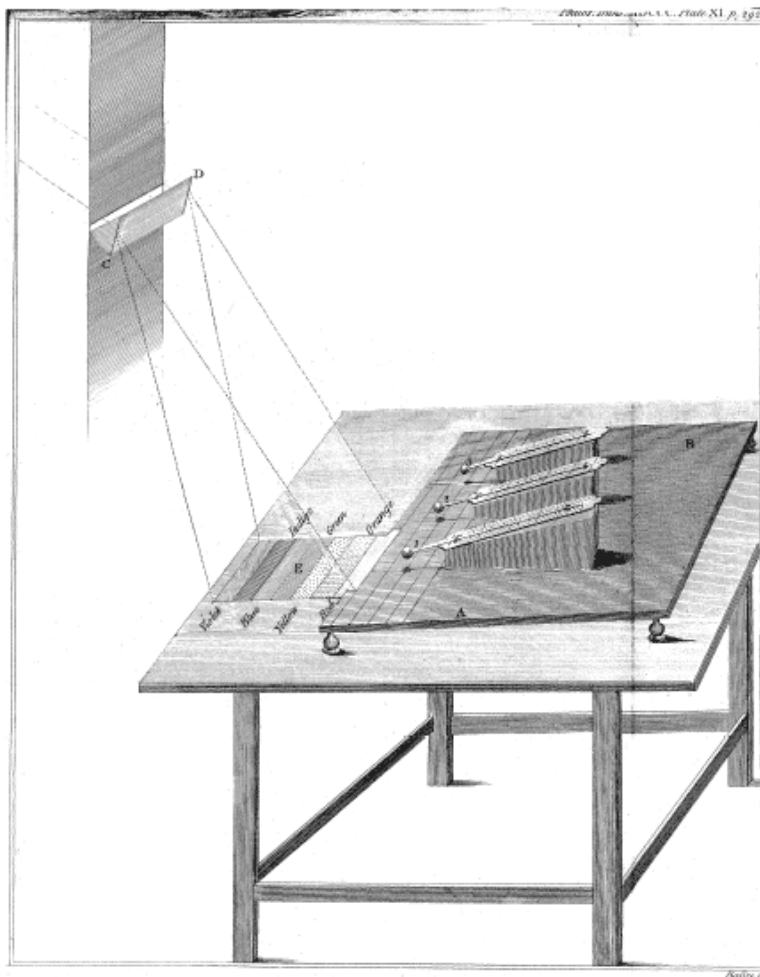
(1704)

Newton kísérletei – a fehérén túl II.



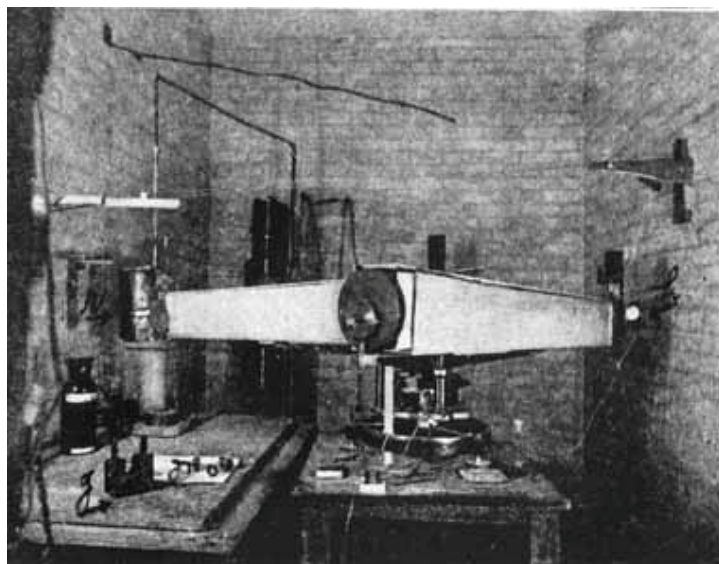
(1704)

Herschel kísérletei – a vörös alatt

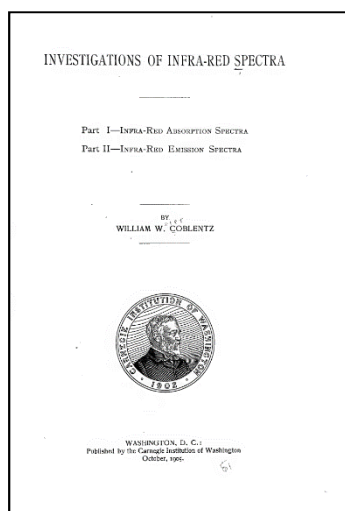


1800. február 11.

Coblentz kísérletei – az IR ujjlenyomat

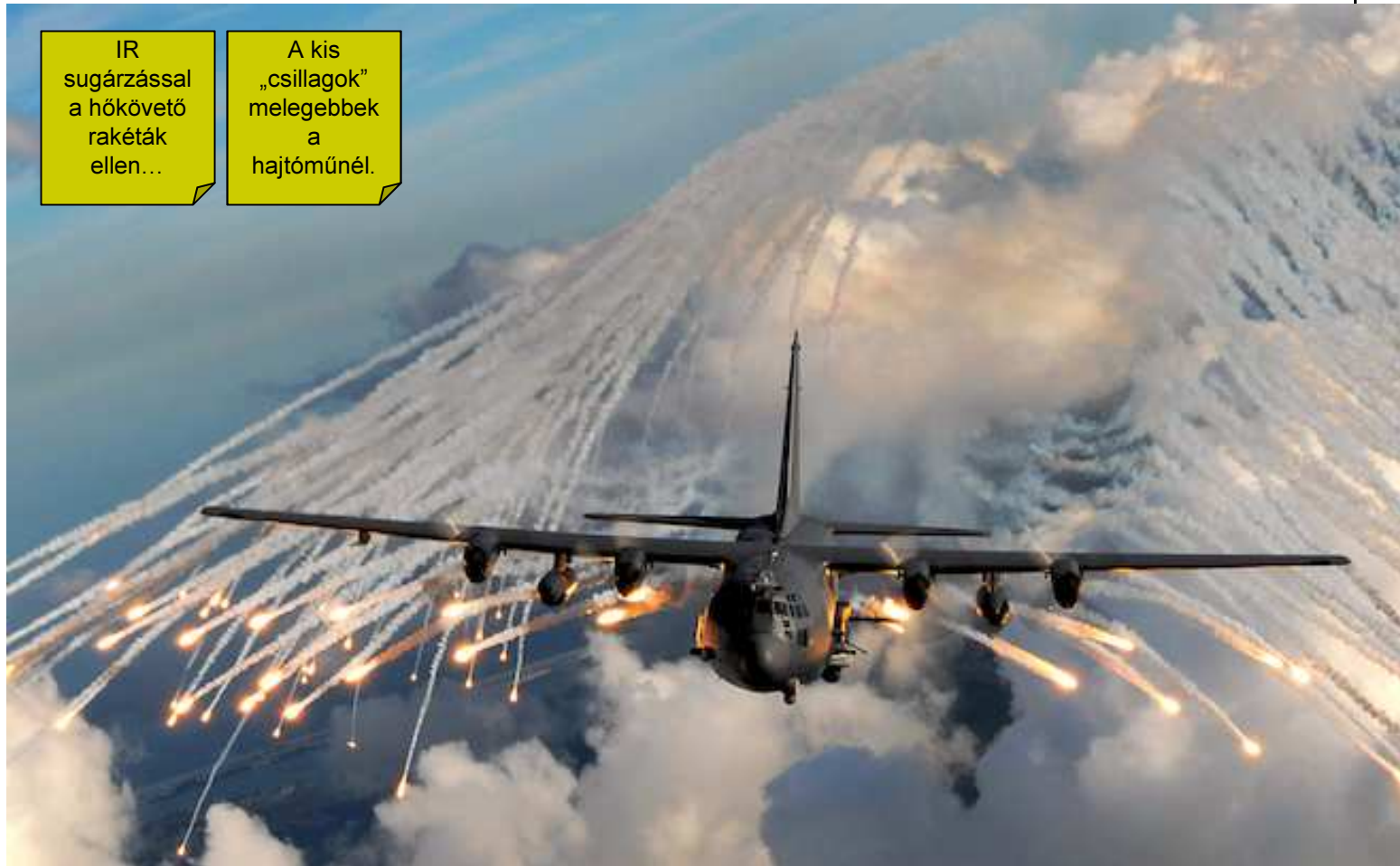


etanol
 $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$
dimetil-éter
 $\text{H}_3\text{C-O-CH}_3$
 $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$,
de IR sp. \neq !



(1905)

IR – hő – energia (egy régi trükk mai kivitelben)



An AC-130U gunship fires flares to emit masses of infrared and confuse heat seeking missiles.
<http://www.wired.com/dangerroom/2012/10/infrared-obscurant/>

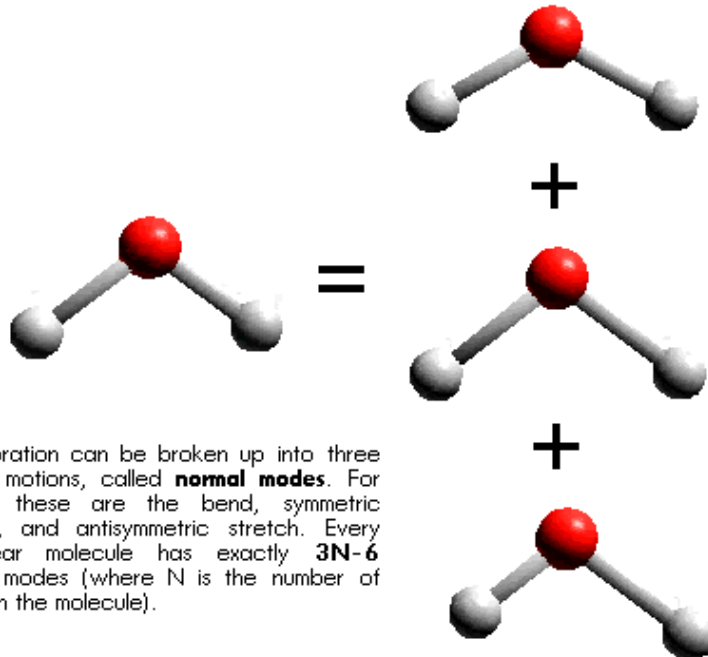
A molekulák rezgései

NIR:
molekula /
rezgési
spektrosz-
kópia



fény-anyag
kölcson-
hatás
(csúzlival
verébre)

Theory of Infrared Spectroscopy



The vibration can be broken up into three simpler motions, called **normal modes**. For water, these are the bend, symmetric stretch, and antisymmetric stretch. Every non-linear molecule has exactly $3N-6$ normal modes (where N is the number of atoms in the molecule).

- Deformációs rezgés
 - változás a **kötésszögben**
- Szimm. vegyértékrezgés
 - változás a **kötéshosszban**
- Aszimm. vegyértékrezgés
 - változás a **kötéshosszban**

PERKIN ELMER
IR Tutor Copyright © 1992-3 Charles B. Abrams

Main Menu

Help

Quit



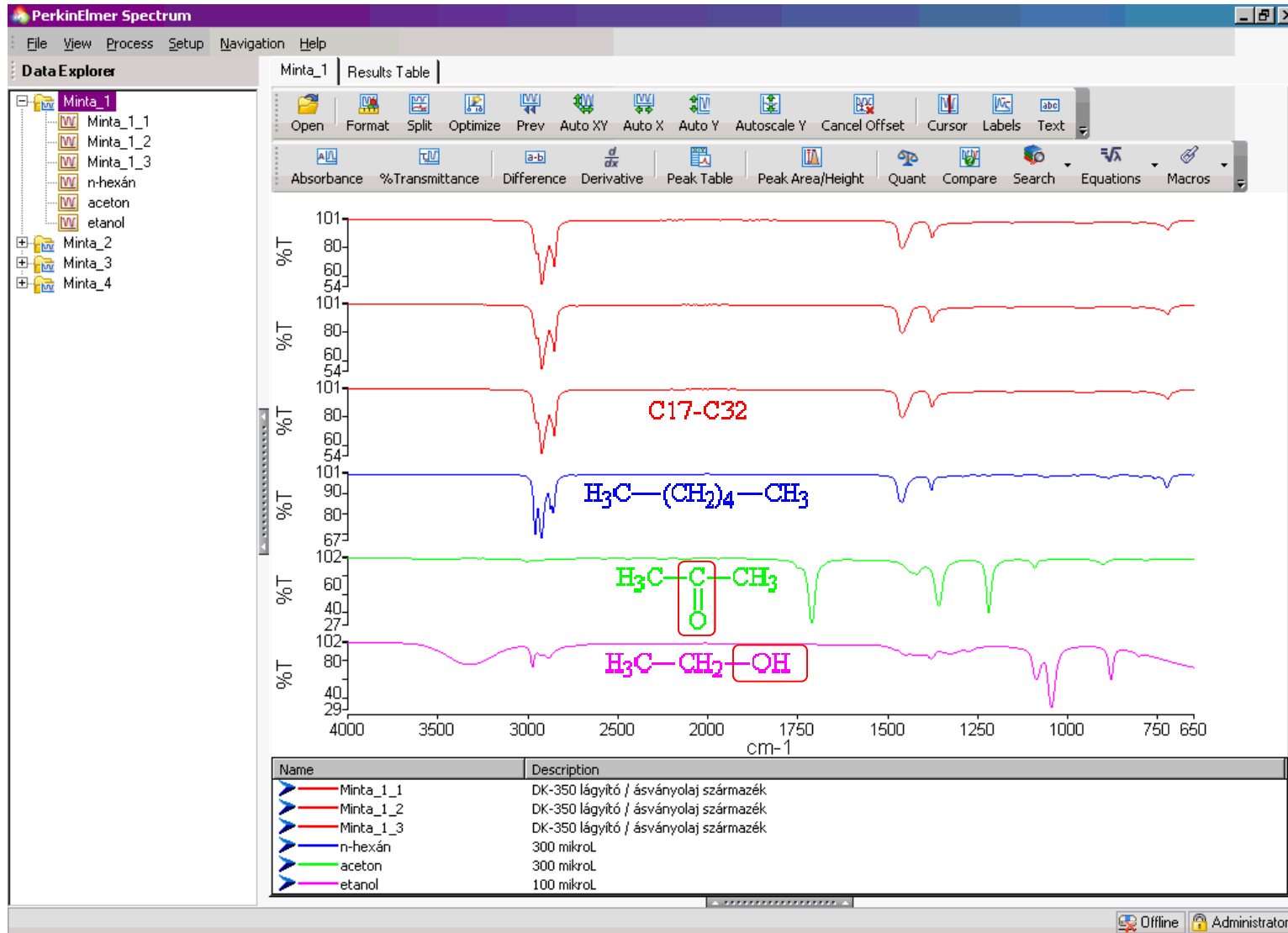
paradigma-
váltás
(kb.
évezred-
váltással)

A spektrum a molekuláris állapotváltozások összessége:
kémiai és fizikai „ujjlenyomat”.

Egy gyors példa a (M)IR-re

NIR : IR
1 : 100

De ATR előtt
gond a vizes
(pl. biológiai)
rendszerek-
kel...

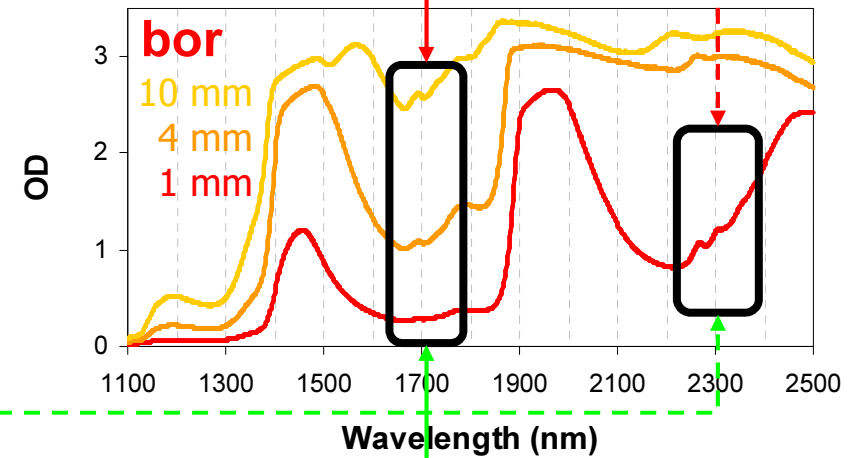
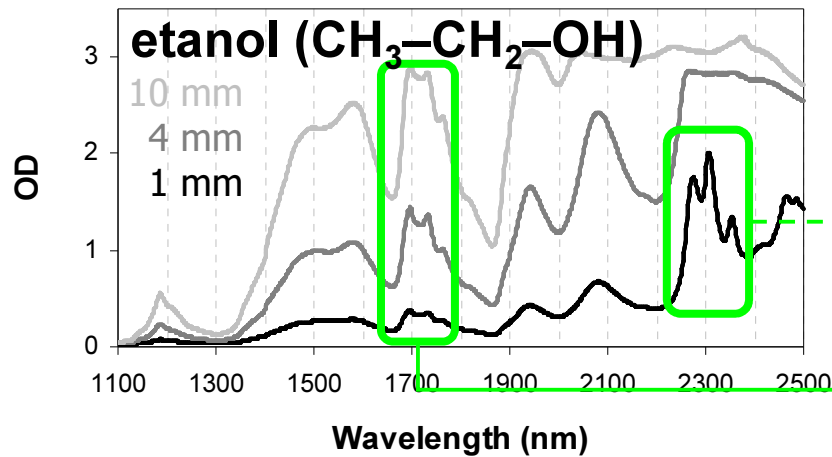
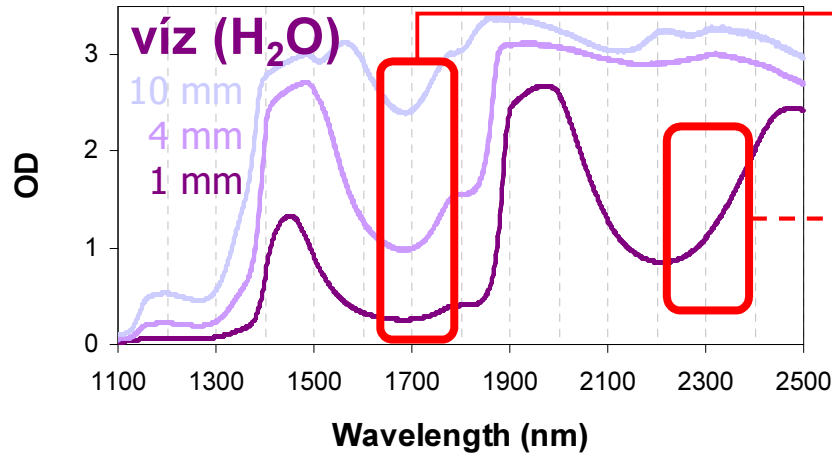


És egy másik gyors példa NIR-re

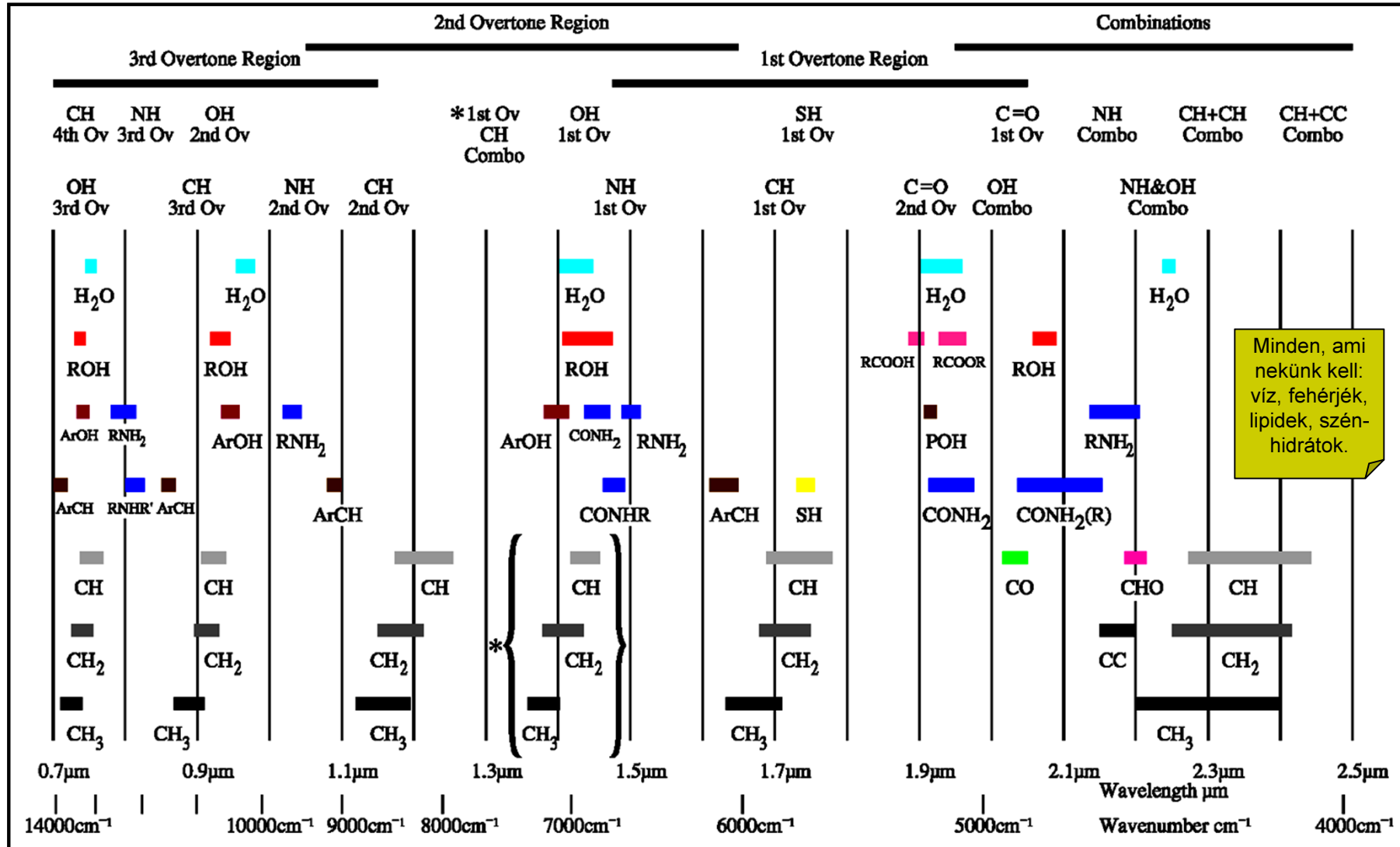


OBI
hatóság,
Villány, Mór,
Pannon-
halma...
termelők

sok változó,
kicsi
különbségek
▼
kemometria

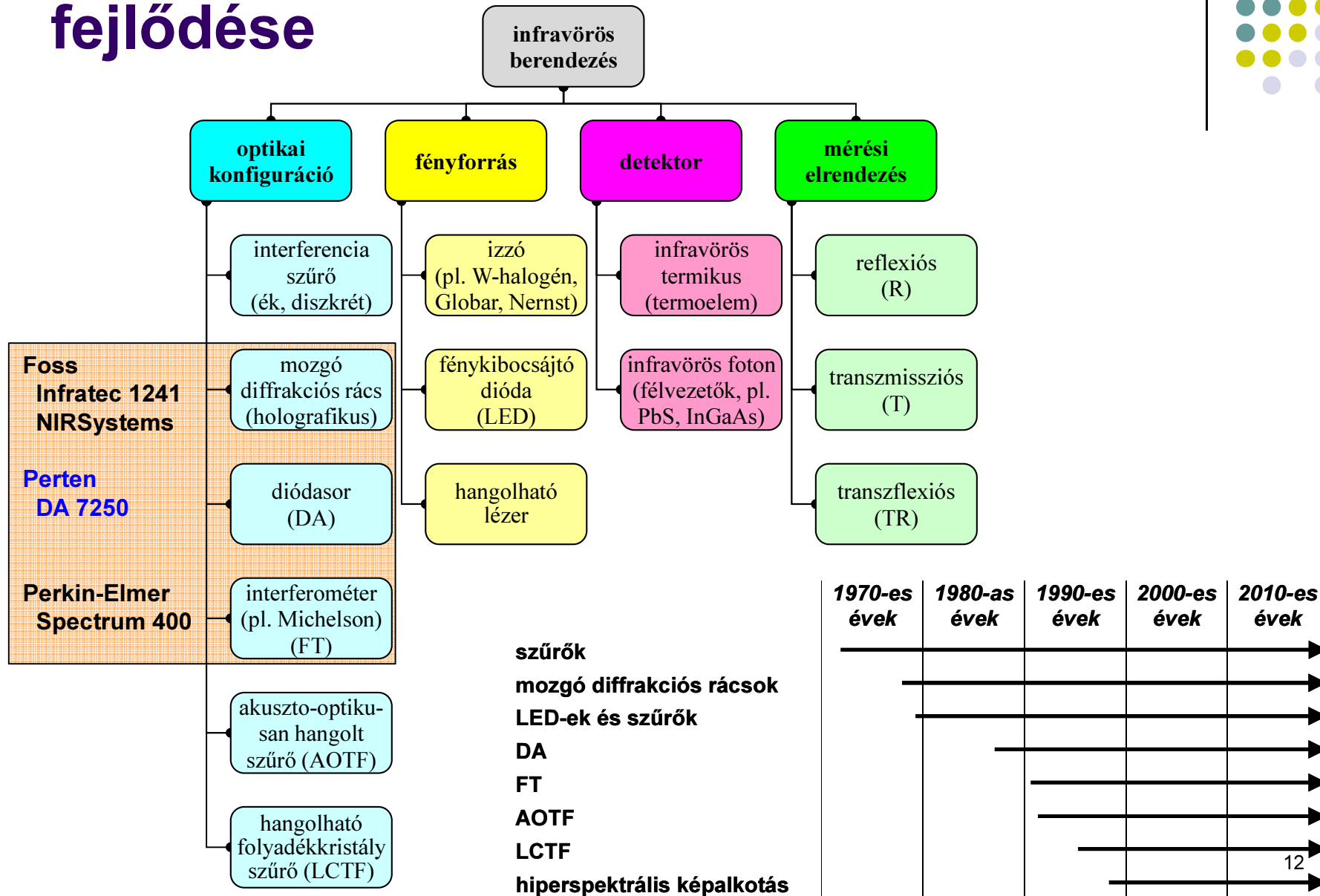


Jellemző NIR elnyelési sávok



Minden, ami nekünk kell: víz, fehérjék, lipidek, szénhidrátok.

Az eszközök csoportosítása, fejlődése



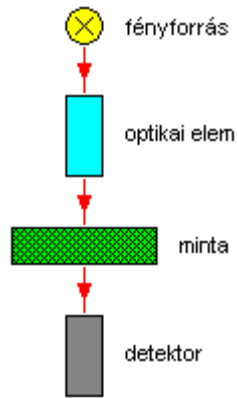
Mérési elrendezések – NIT és NIR

Ha
NIT & NIR,
akkor NIR ≠
... UV, VIS,
NIR, (M)IR,
FIR, ...



kisebb
hullámhossz
nagyobb
energia

transzmissziós
mérési elrendezés
(NIT)

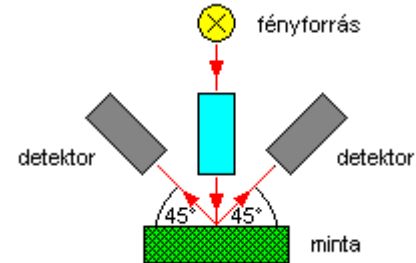


reflexiós
mérési elrendezés
(VIS-NIR / FT-NIR)

nagyobb
hullámhossz
kisebb
energia

$$\lambda < \lambda$$

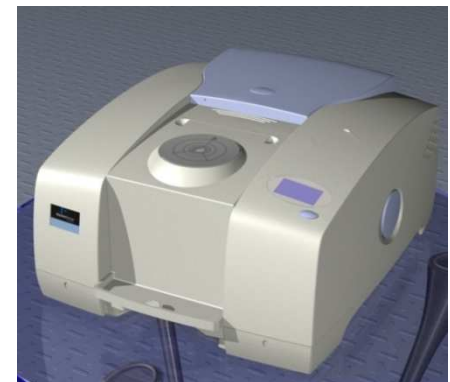
$$E > E$$



Foss Infratec 1241
GA



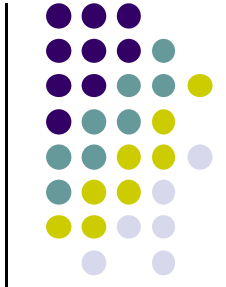
Foss NIRSystems 6500
+ RCA



PE Spectrum 400 13
+ NIRA

$$E < E$$

Mérési elrendezések – NIT és NIR



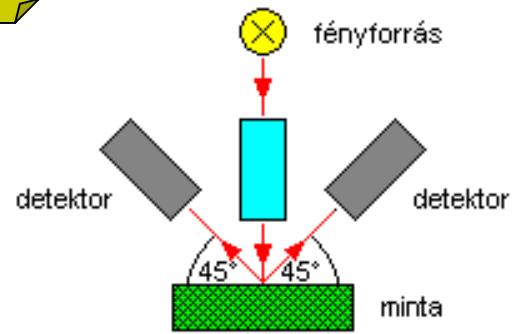
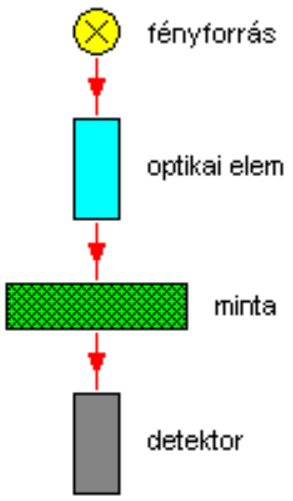
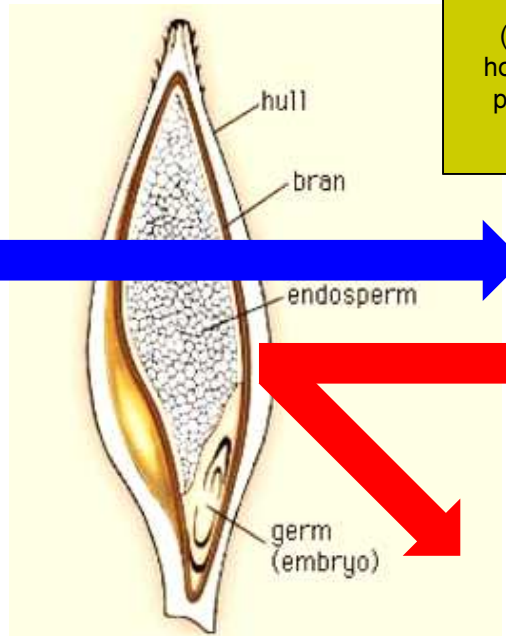
$E \gg \lambda$
 $\lambda \ll E$



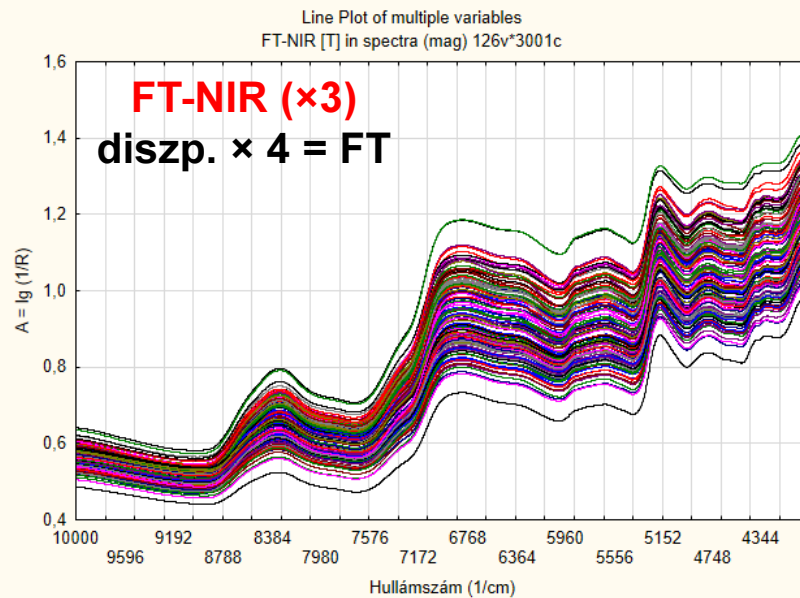
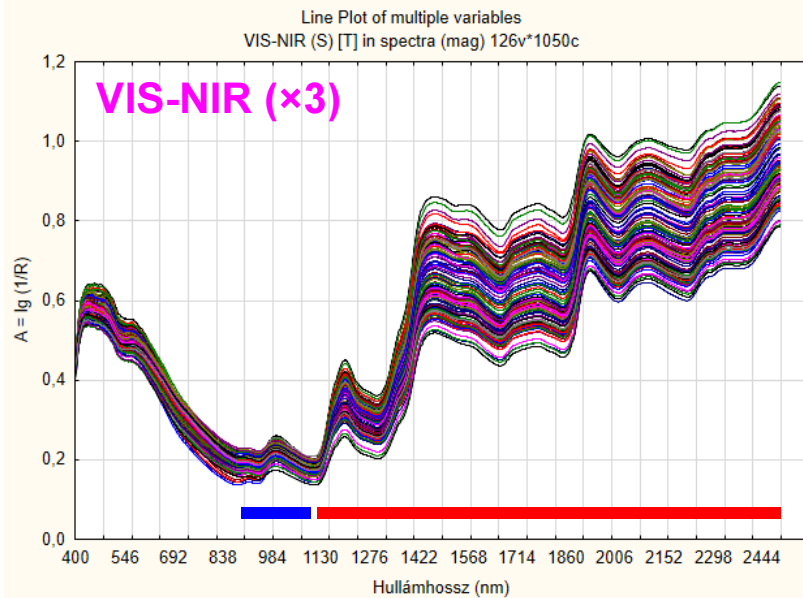
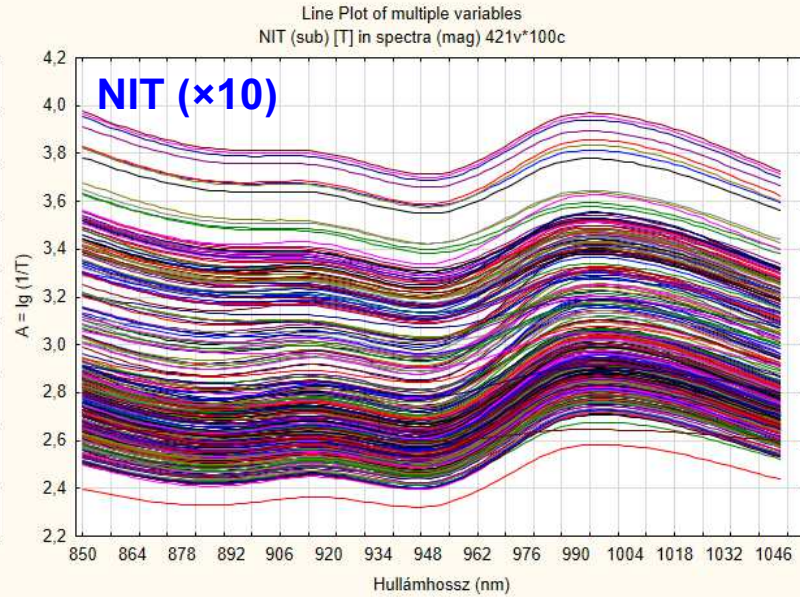
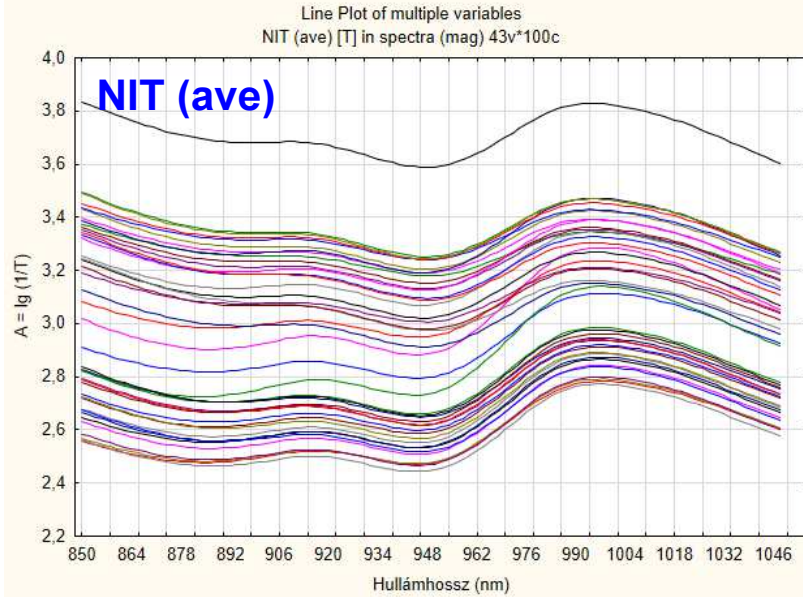
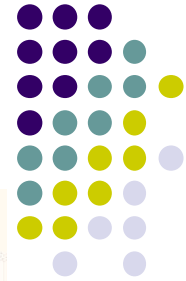
$\lambda \gg E$
 $E \ll \lambda$

(kvázi) inhomogén magok

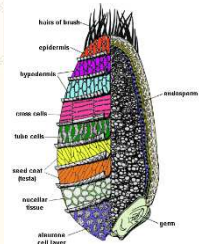
(kvázi) homogén pelletek



Közeli infravörös spektrumok



T



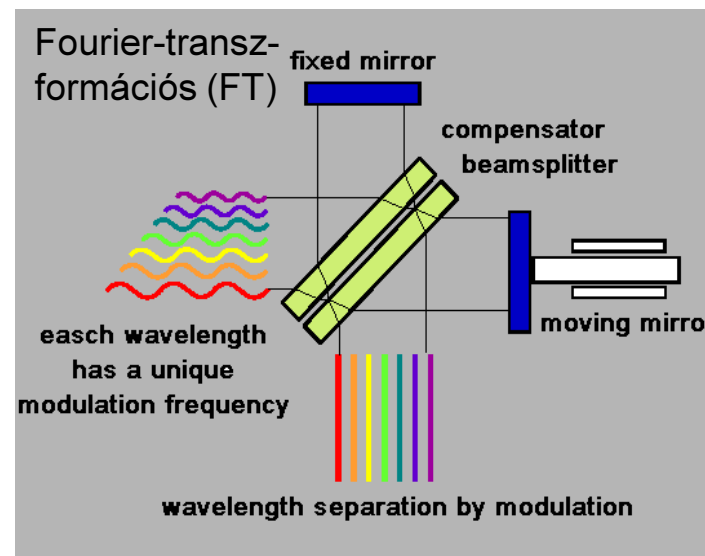
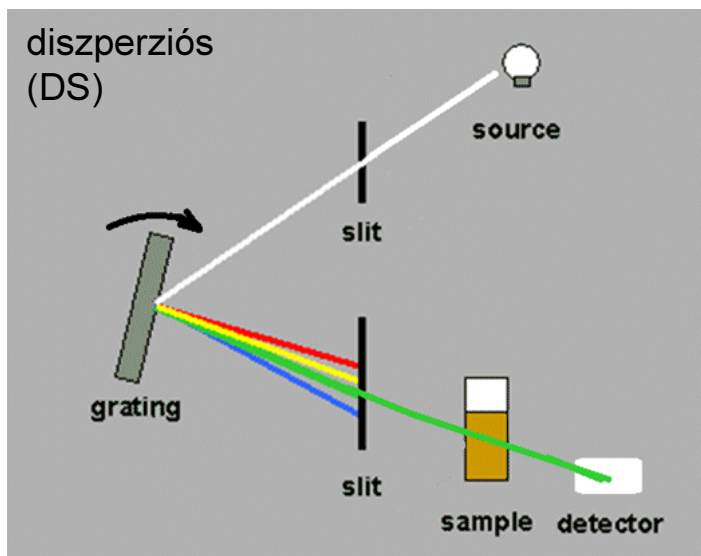
R



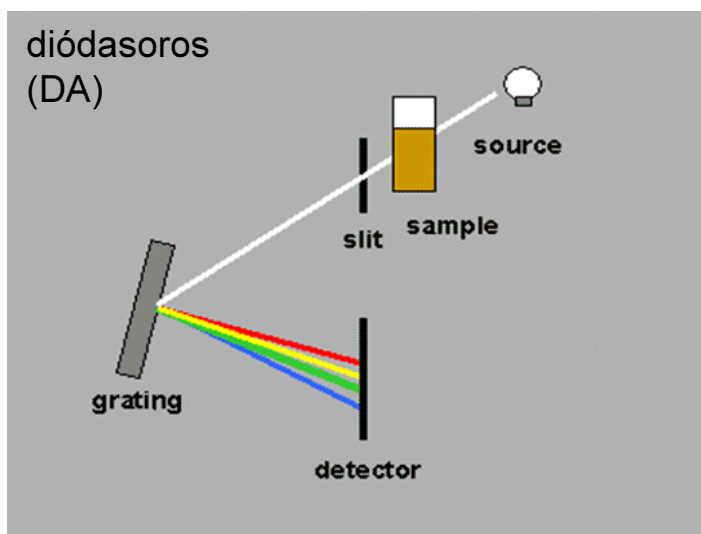
Hogyan mérjük? – 3-in-1

„bench-top”:
pre- ▶
„process”:
poszt-
diszperzív

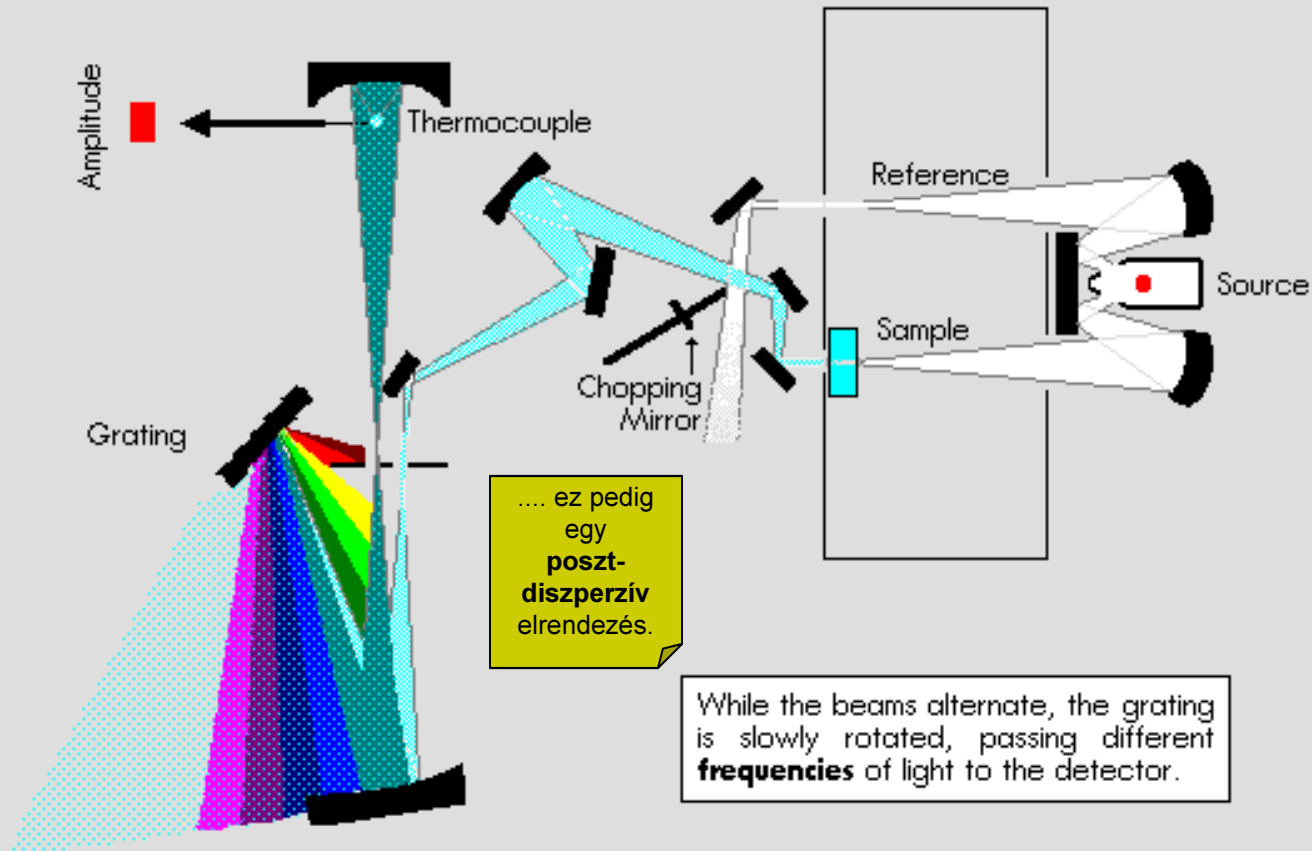
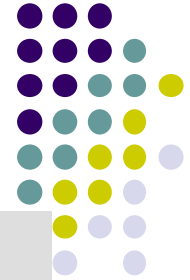
Ez most egy
pre-
diszperzív
elrendezés...



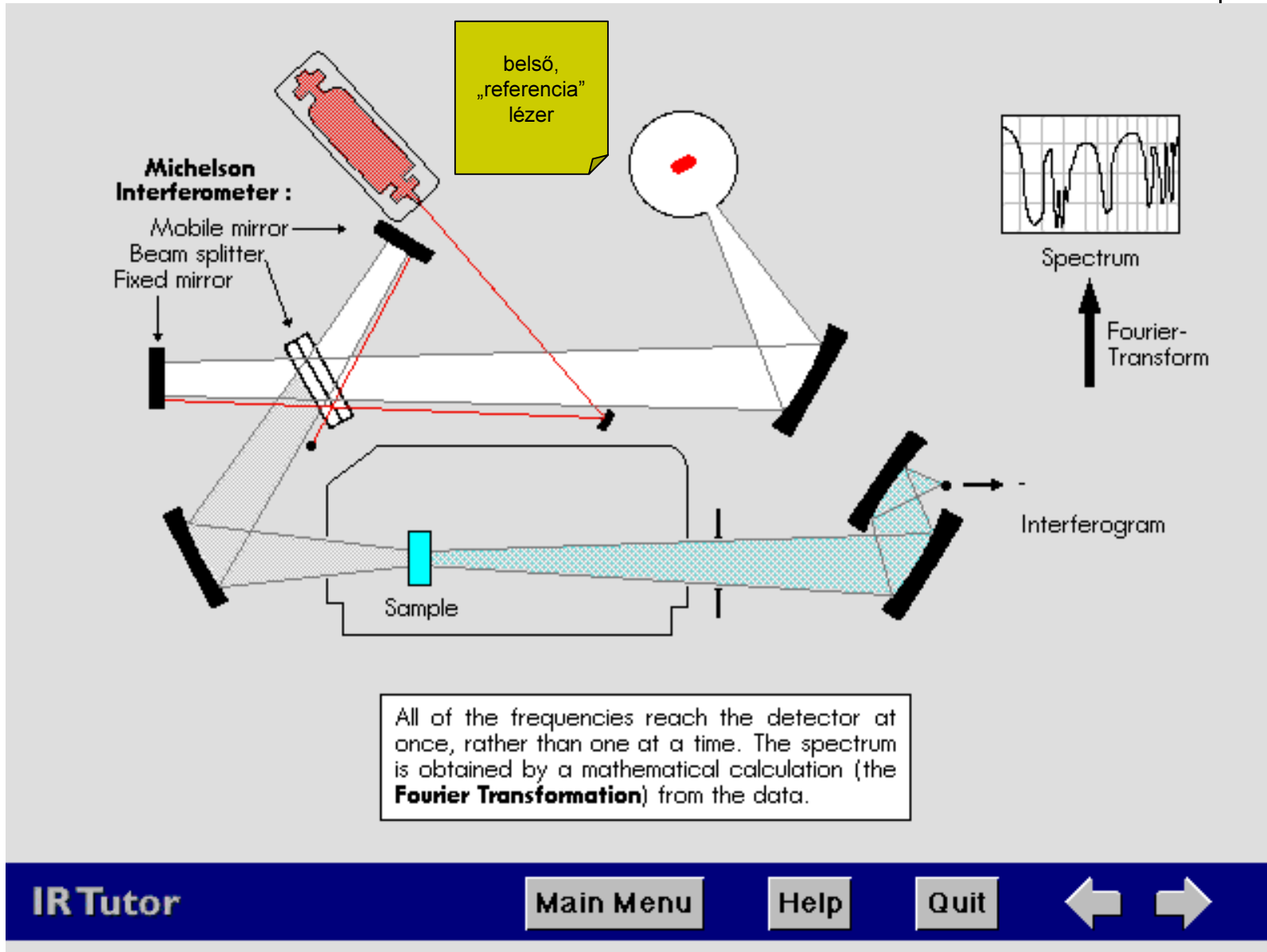
mindig
poszt-
diszperzív



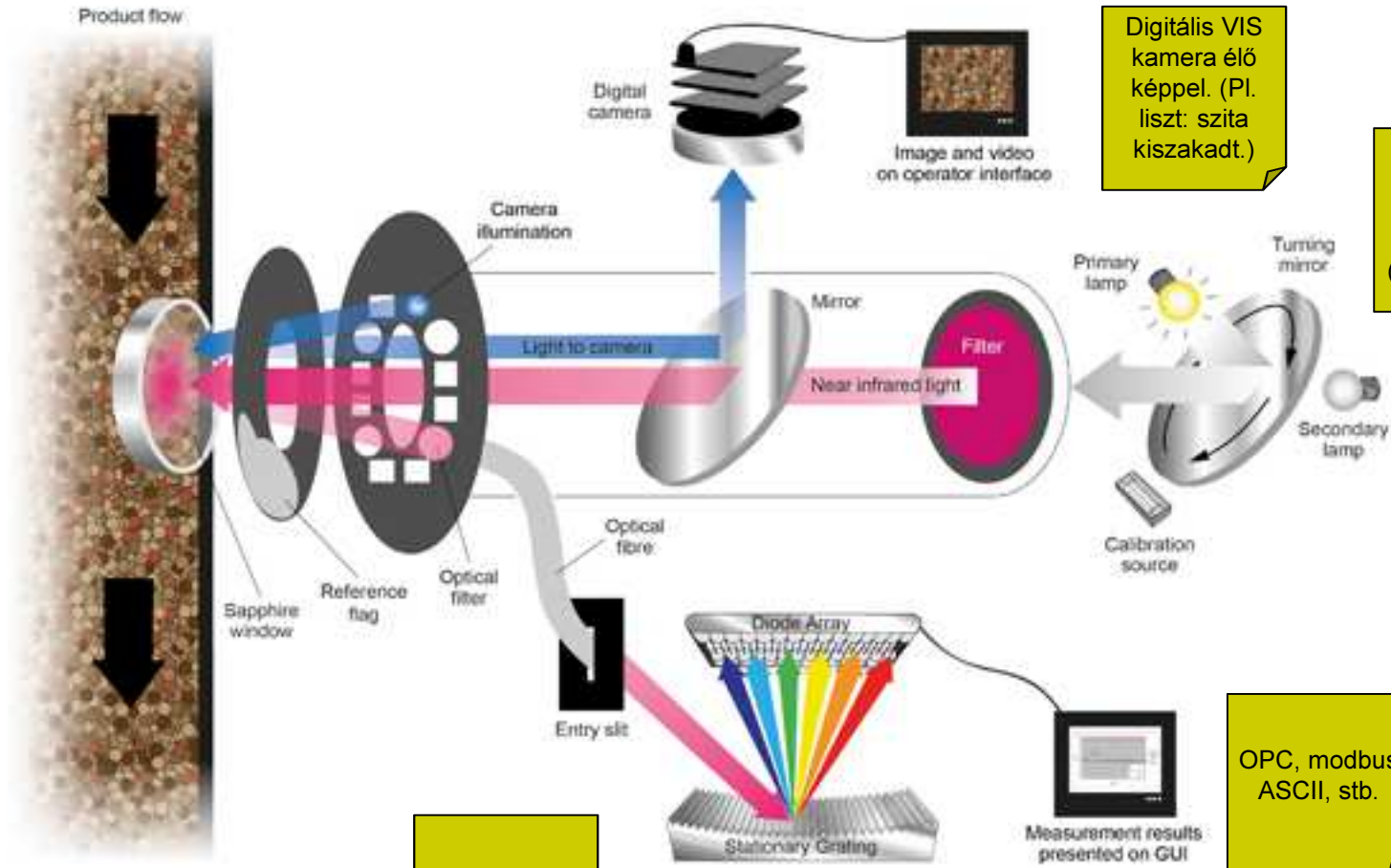
Hogyan mérjük? – diszperzió (DS)



Hogyan mérjük? – FT



Hogyan mérjük? – diódasor (DA)



Digitális VIS kamera élő képpel. (Pl. liszt: szita kiszakadt.)

Automata fényforrás-váltás = folyamatos (24/24) üzem.

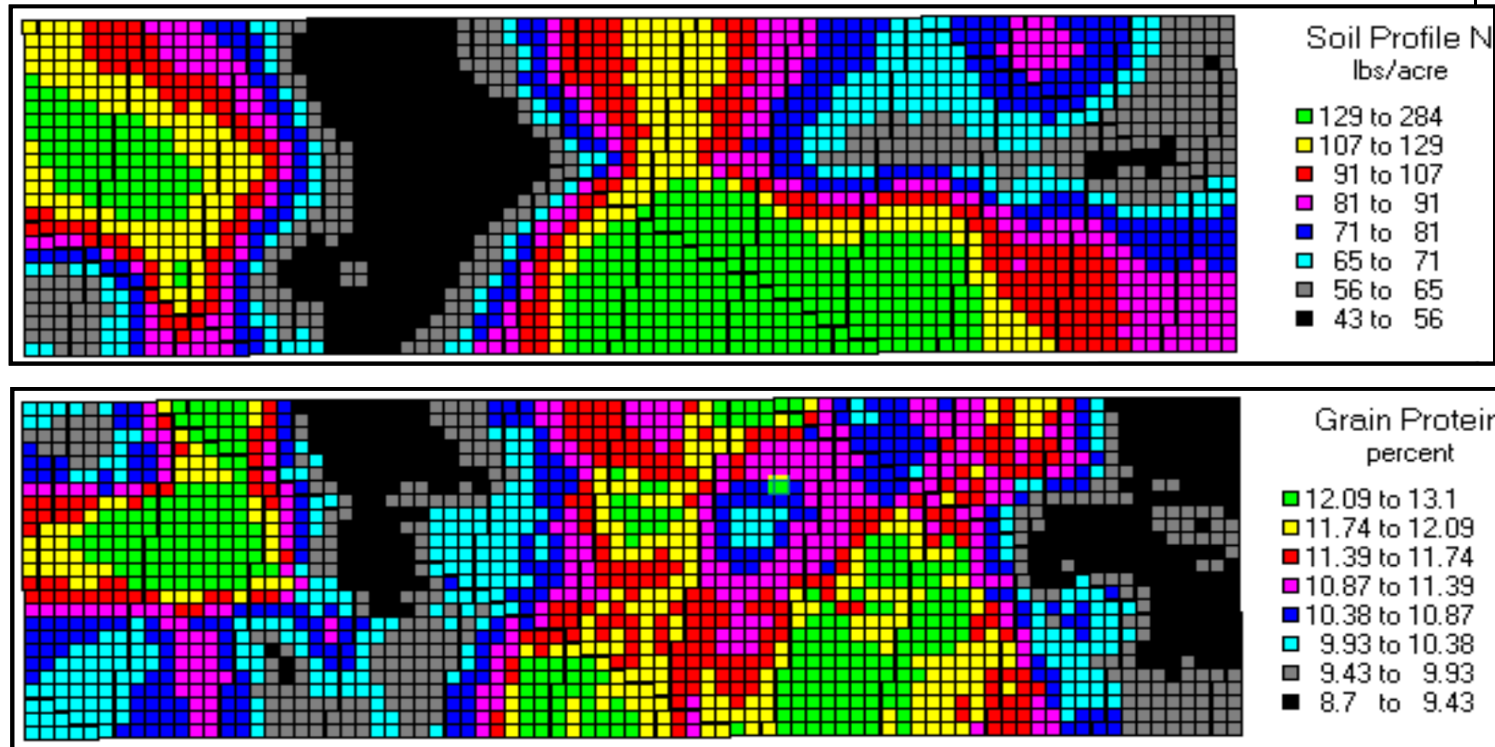
Mi mozog?
Semmi:
fix optikai rács.

OPC, modbus
ASCII, stb.

Precíziós mezőgazdaság: „on-combine” technikák



Precíziós mezőgazdaság: „on-combine” technikák



talaj nitrogén profilja (felső ábra)

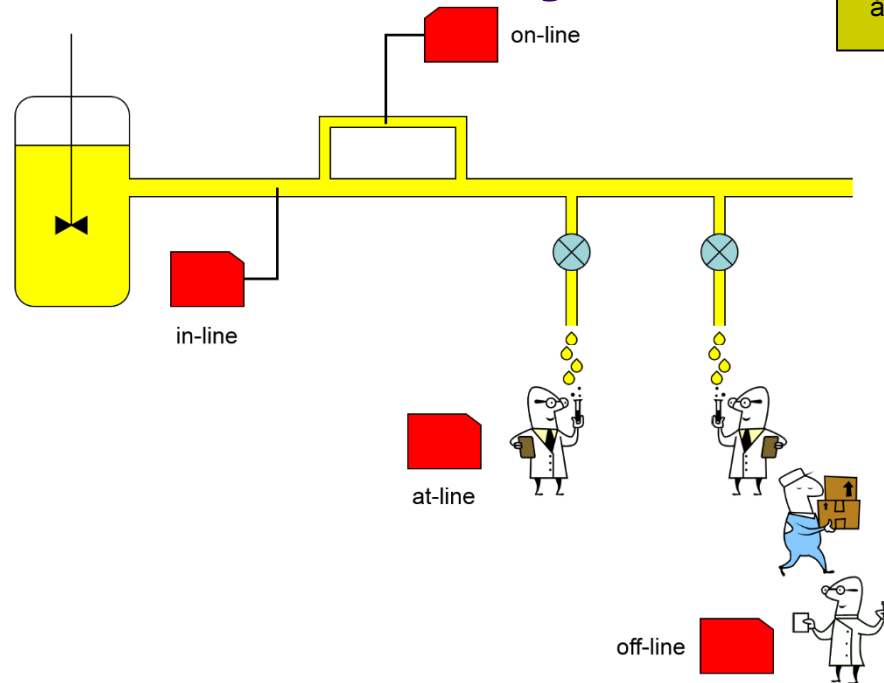
betakarított gabona „on-combine” NIR technikával mért fehérjetartalma (alsó ábra)

Long D.:

On-Combine Sensing of grain protein with application to precision agriculture.

Oral presentation. 8th Annual Precision Agriculture Conference, Hays, KS, USA, January 19-20, 2005

...-line, ...-line, de melyik? I.



Hatalmas
potenciál:
sikerül a
falat
áttörnünk?



Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance

U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
Center for Veterinary Medicine (CVM)
Office of Regulatory Affairs (ORA)
Pharmaceutical CGMPs
September 2004

„[...] These measurements can be:

at-line:

Measurement where the sample is removed, isolated from, and analyzed in close proximity to the process stream.

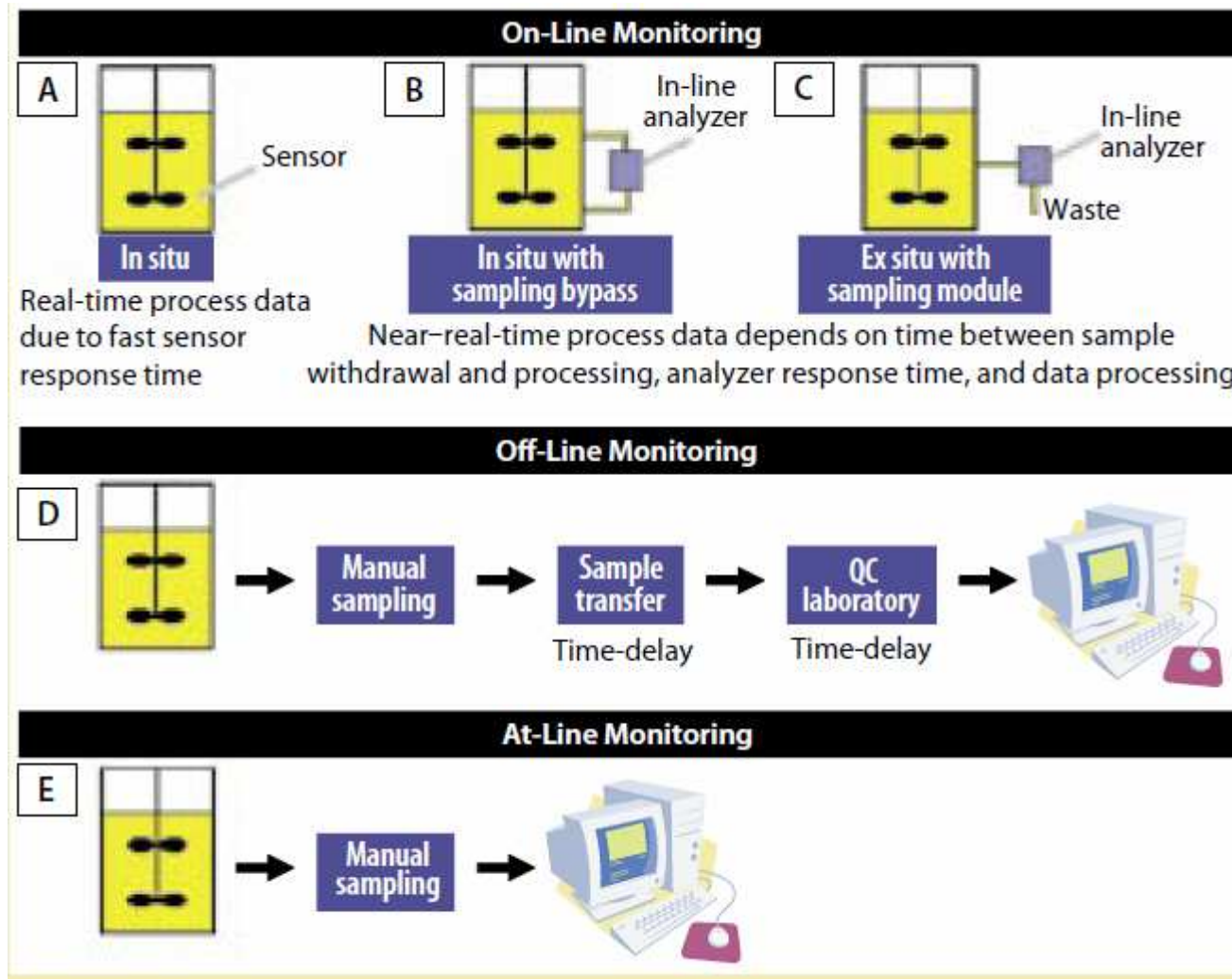
on-line:

Measurement where the sample is diverted from the manufacturing process, and may be returned to the process stream.

in-line:

Measurement where the sample is not removed from the process stream and can be invasive or noninvasive [...]"

...-line, ...-line, de melyik? II.



Az in-/on-line eszköze – a száloptika I.



Igen,
törhetnek,
drágák...
:(



Az in-/on-line eszköze – a száloptika II.



Az in-/on-line eszköze – a száloptika III.



Technológiába illeszthető (egyéb) eszközök I.

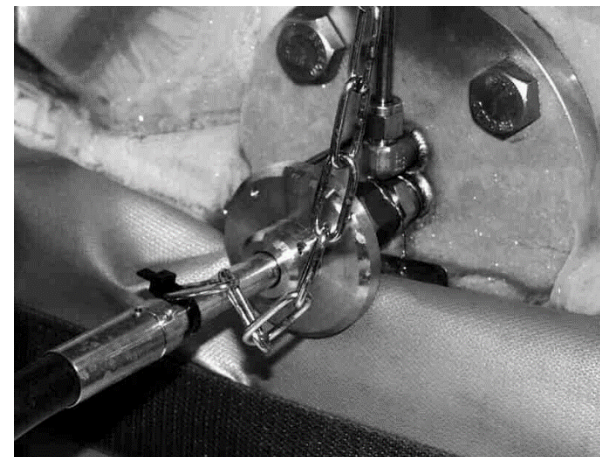
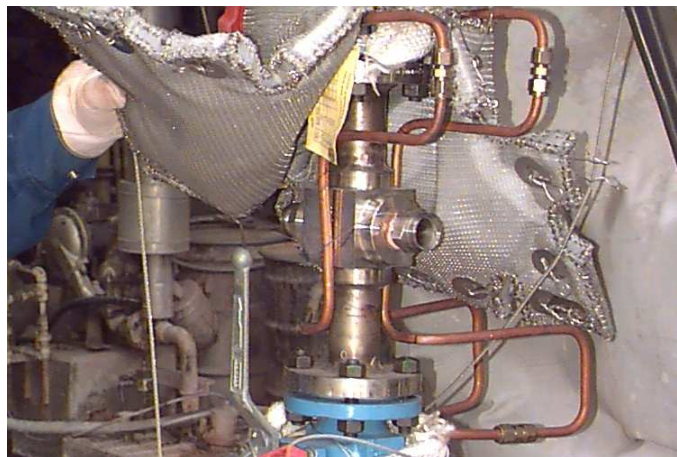


Valós idejű:
keverő
dobon (fix t
helyett adott
minőség).



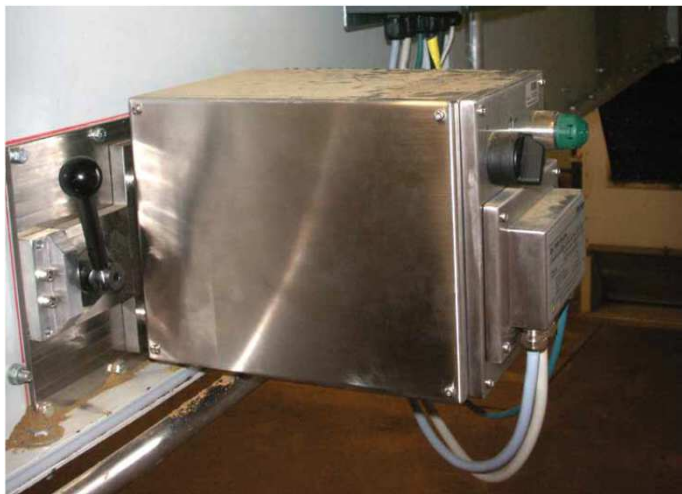
Több-
csatornás
elrendezés.

Technológiába illeszthető (egyéb) eszközök II.



In-line rendszerek – pl. őrlemények

Biztos, hogy mindig kell száloptika? Nem...



In-line rendszerek – pl. folyadékok



Mobil, hordozható (handheld) eszközök

Pl. Los Angeles-i rendőrség, futószőnyeg szeméttelép.



NIR



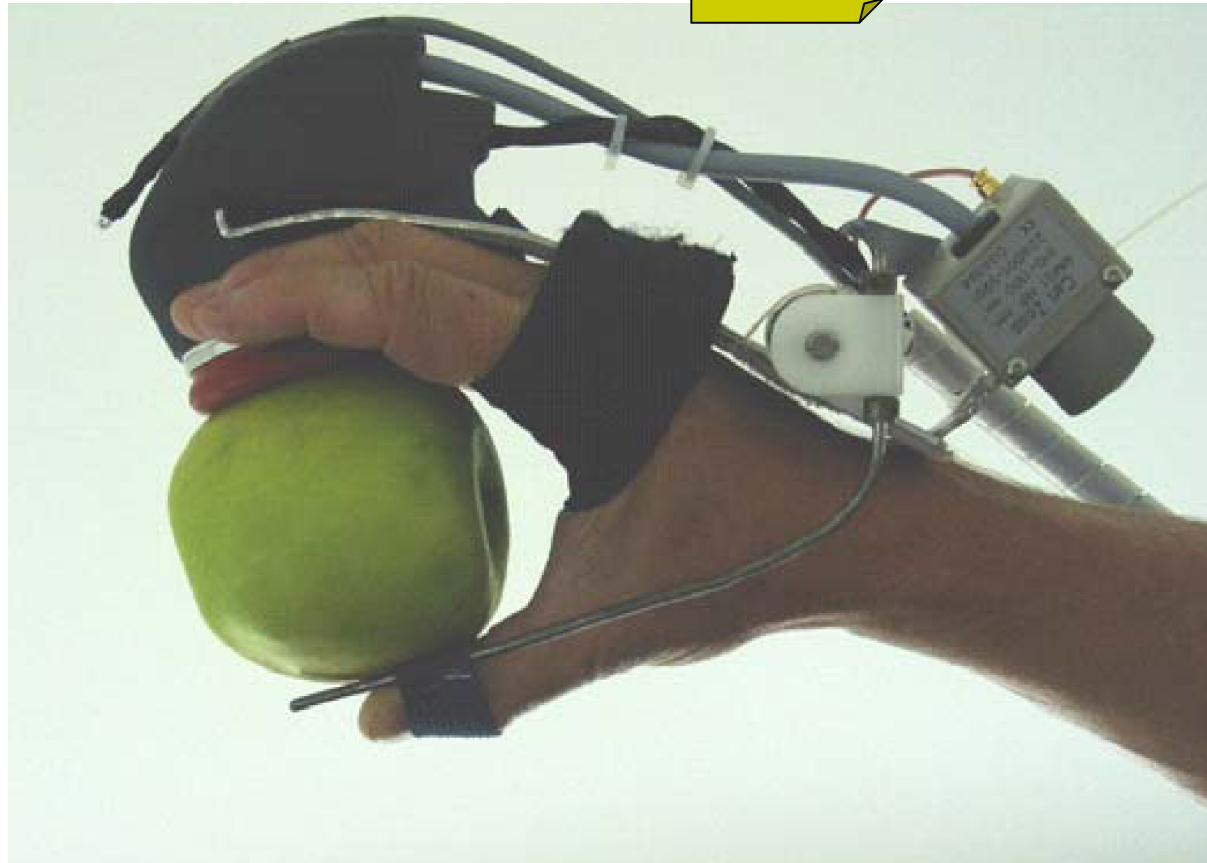
FT-IR



Raman

Ha egyedül nem megy

Áram drót
nélkül...



**A „NIR kesztyű” összetevői:
NIR – oldható cukrok • hangimpulzus – keménység,
Vis – érettség (klorofil) • potenciométer – méret**

Lee K.A.:
Review of applications of near infrared spectroscopy to food analysis.
The NIR Spectrum 2(2), 11–16 (2004)

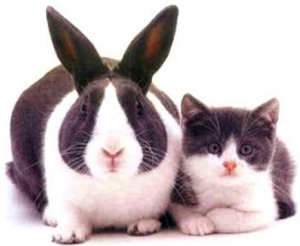


A feltárás lépései – $(IQ)Q = IQ^2$

A test („vas”)
rendben, de
mi van a
lélekkel?



- **I**dentification – azonosítás
 - Ki vagy te?
 - éles spektrális különbségek keresése
 - korreláció, euklédieszi távolság stb.

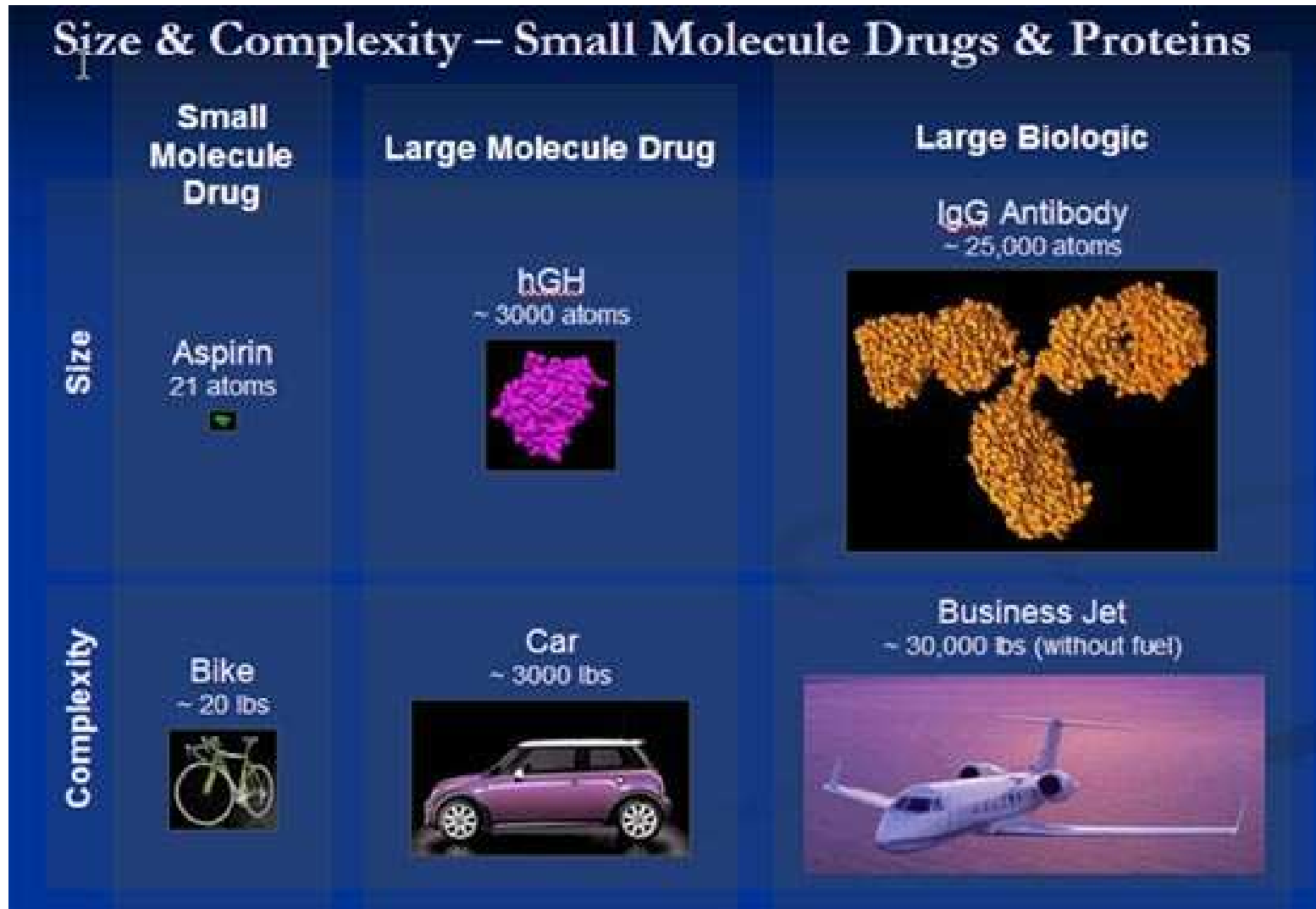


- **Q**ualification – minősítés
 - Hová tartozol?
 - szubpopulációk definiálása finomabb eltérések alapján
 - főkomponens analízis (PCA), Mahalanobis-távolság stb.



- **Q**uantification – mennyiségi meghatározás
 - Mennyi az anyyi?
 - referencia paraméterekkel kalibrációk
 - részleges legkisebb négyzetek (PLS) módszere stb.

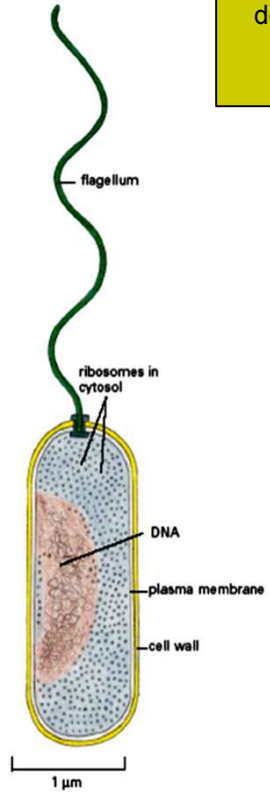
Klasszikus API vs. biomolekulák



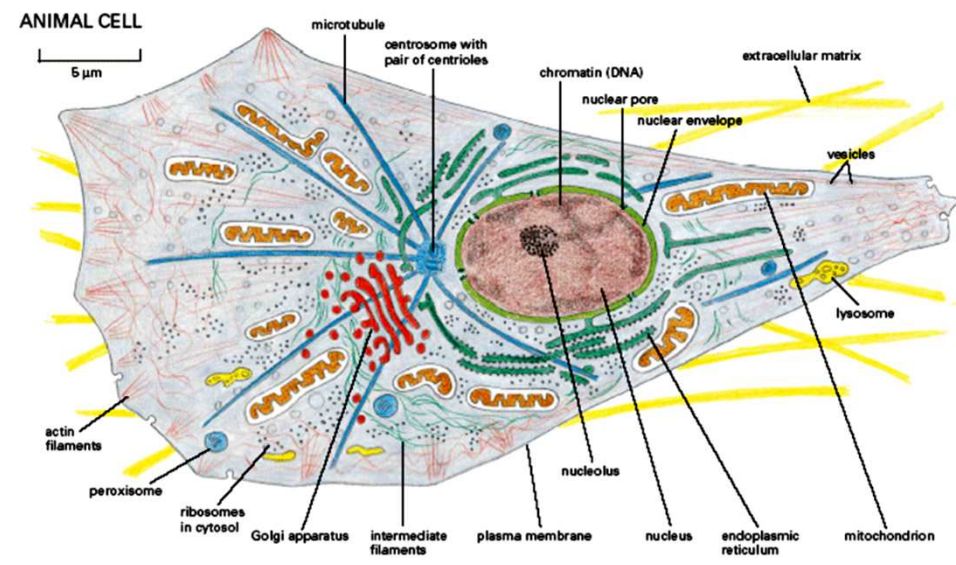
Kikkel termeltetünk?



Tabletta 1-2
paraméter,
de *E. coli*,
CHO ?

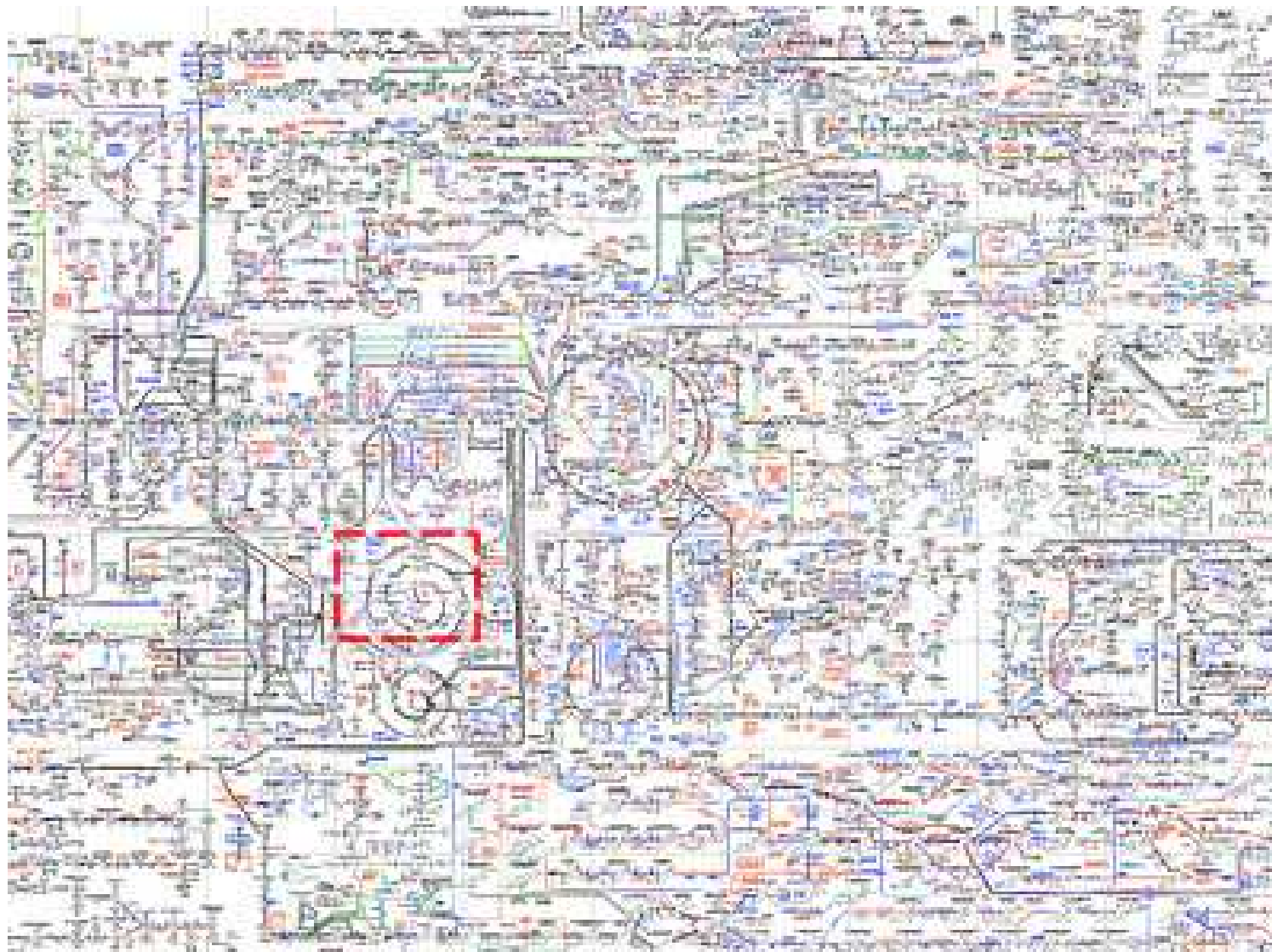


E. coli

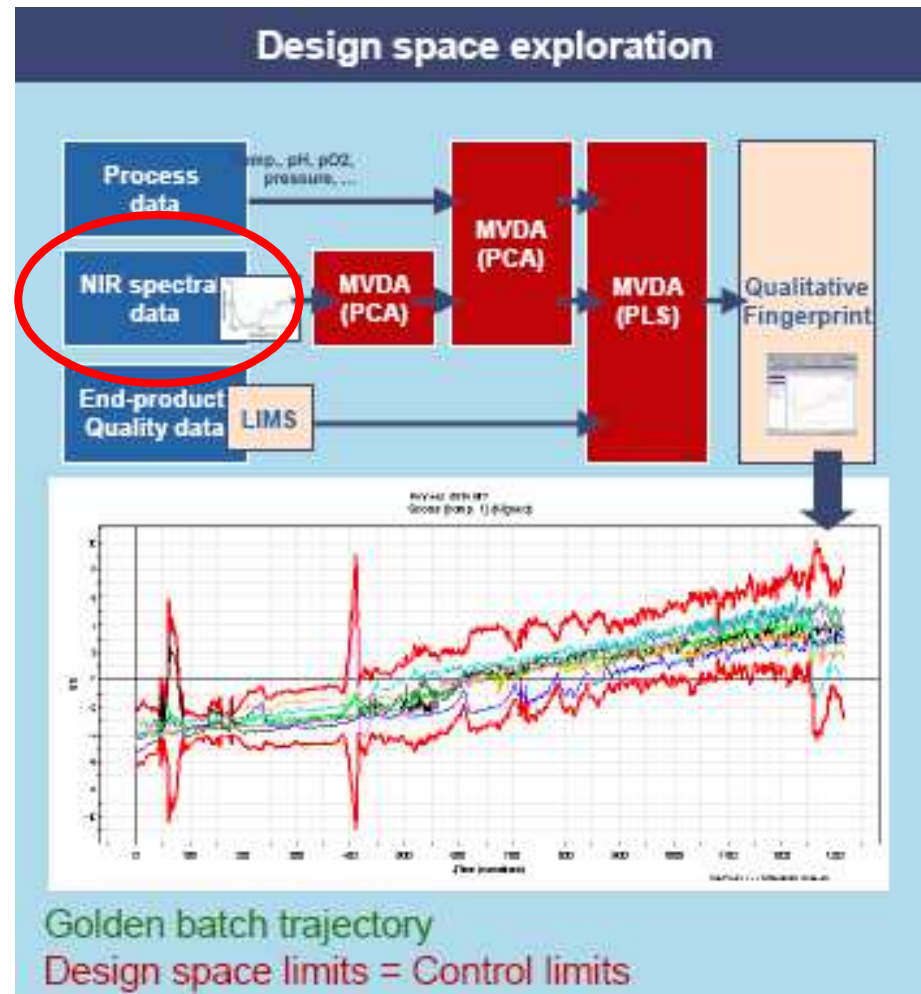


emlőssejtek

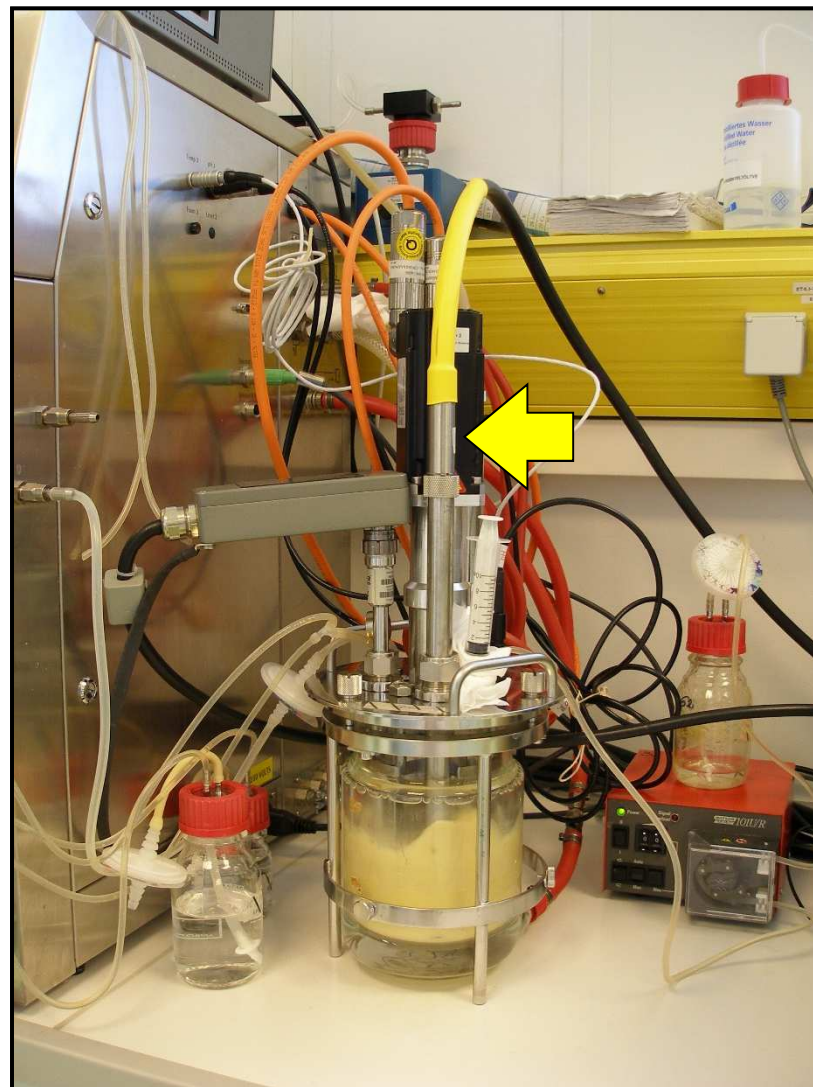
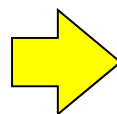
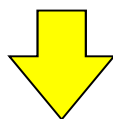
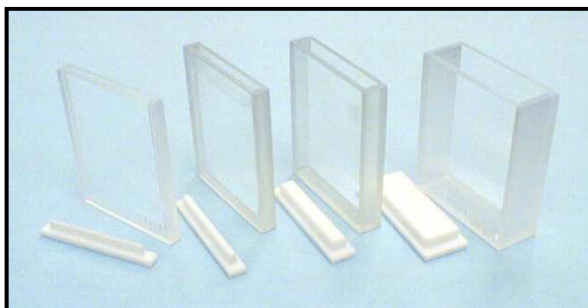
Na akkor, modellezzünk...



A végső cél



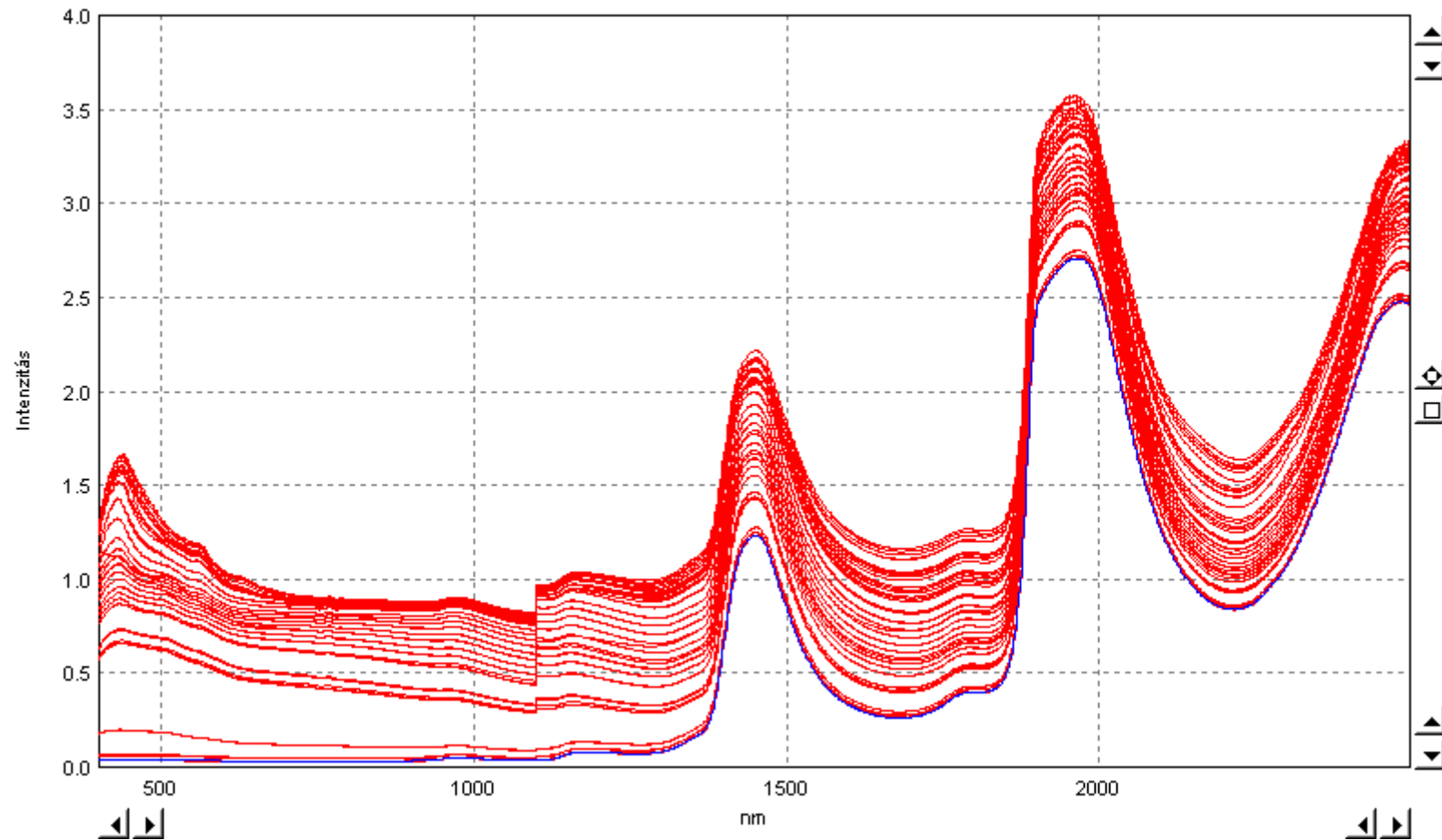
Off-line-tól a real-time-ig



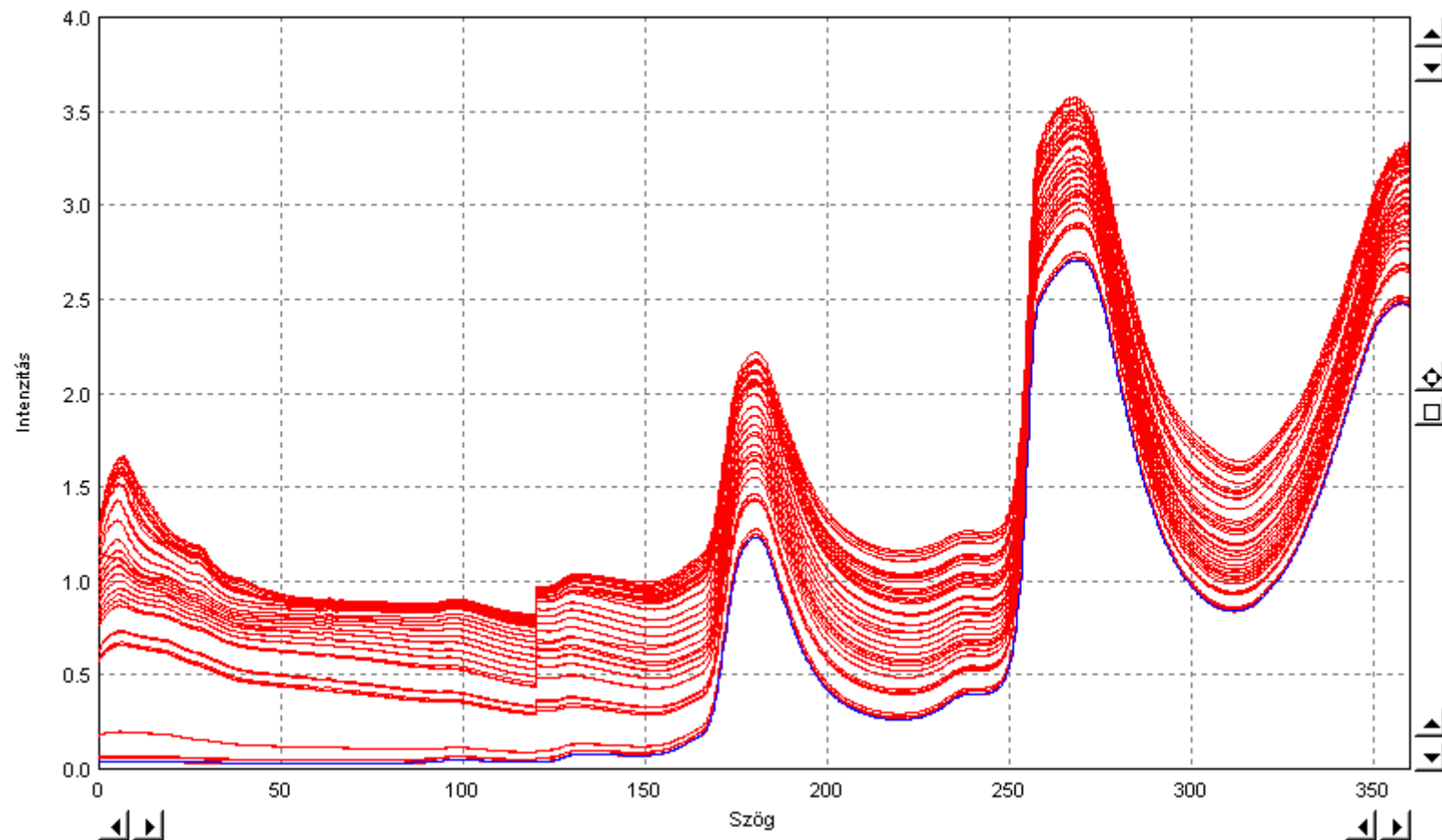
Fermentáció (*E. coli*) off-line nyomon követése: PQS módszer



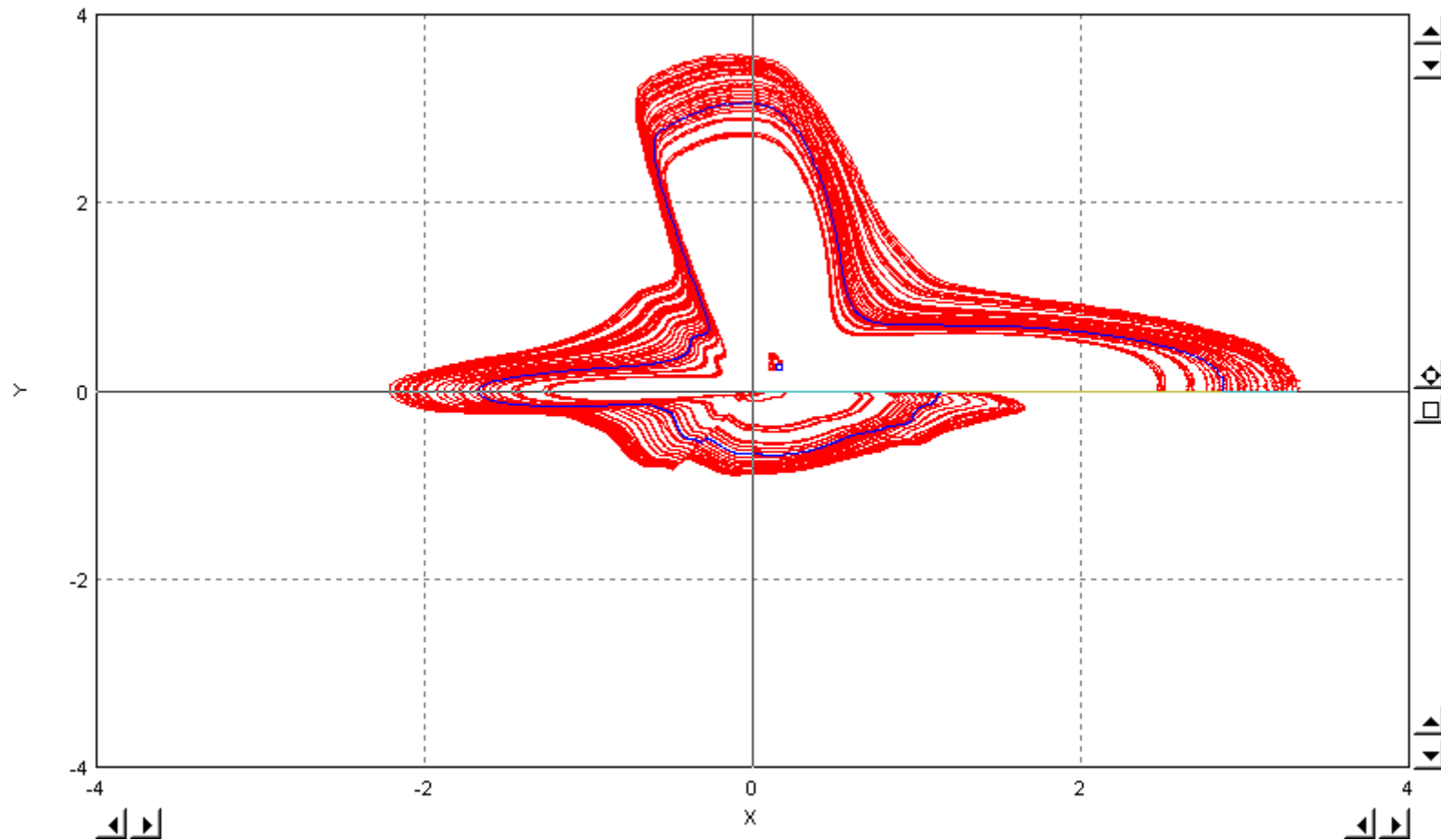
Ha megvan még a puttonyszám ...



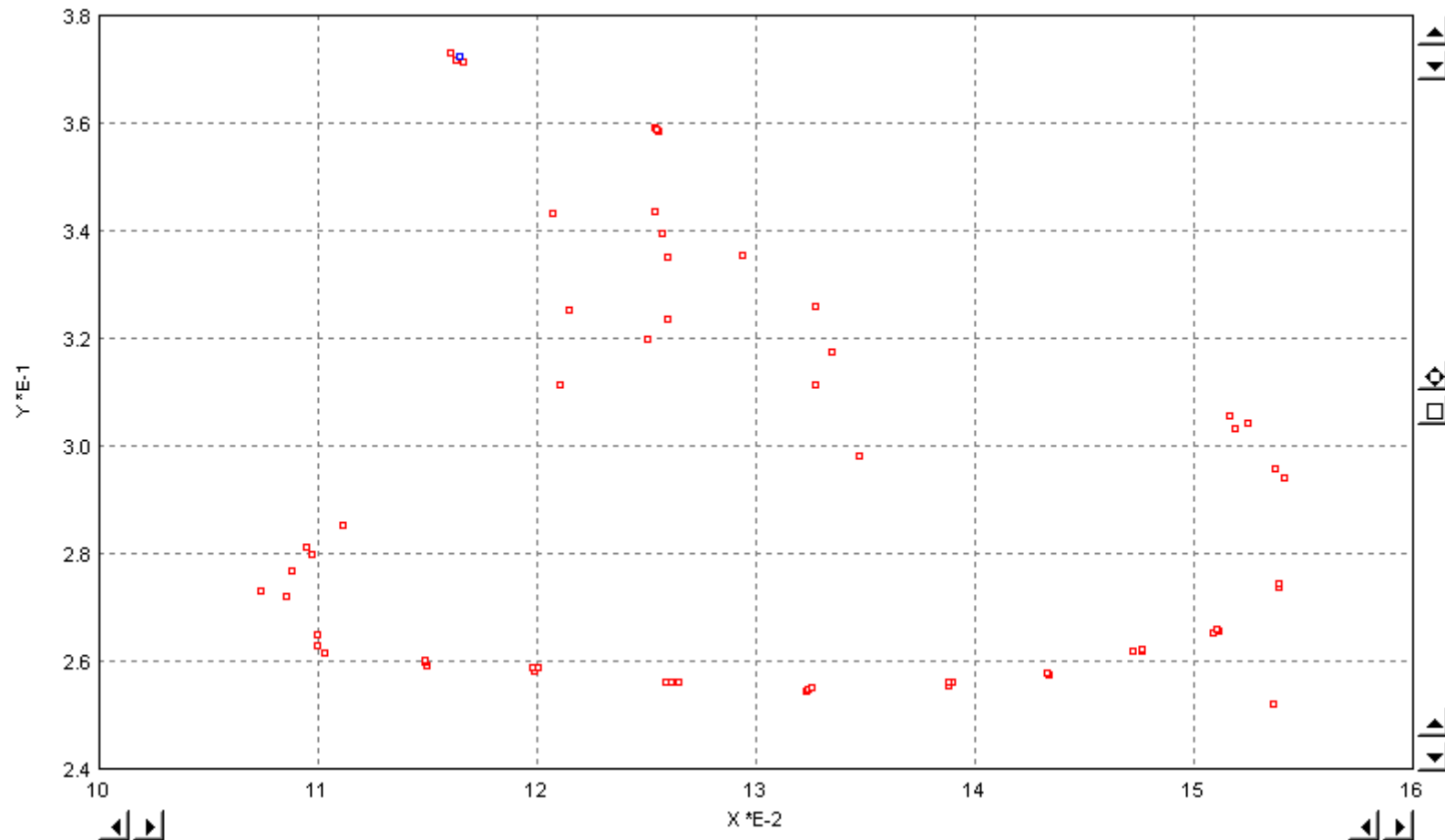
Fermentáció (*E. coli*) off-line nyomon követése: PQS módszer



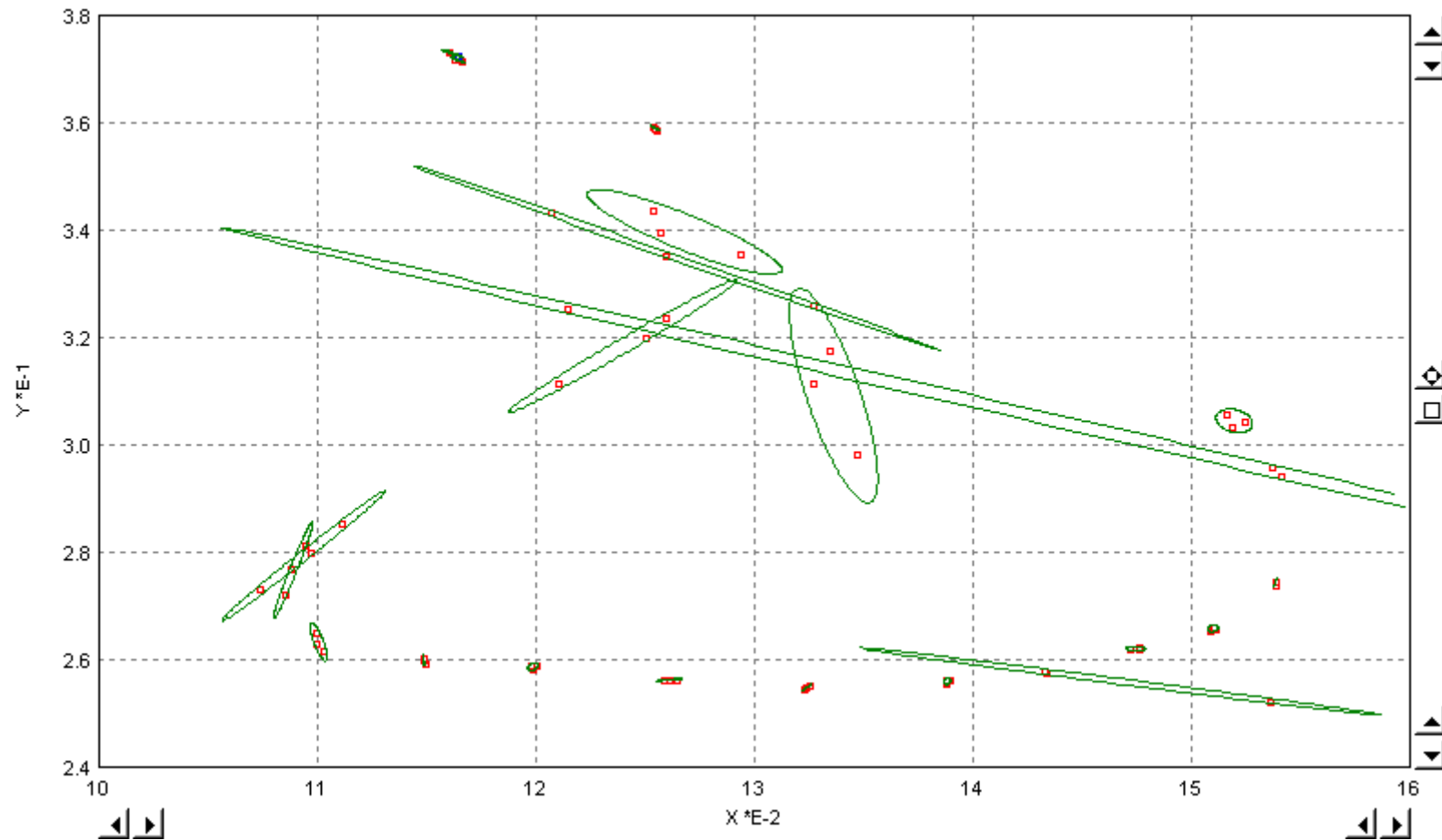
Fermentáció (*E. coli*) off-line nyomon követése: PQS módszer



Fermentáció (*E. coli*) off-line nyomon követése: PQS módszer



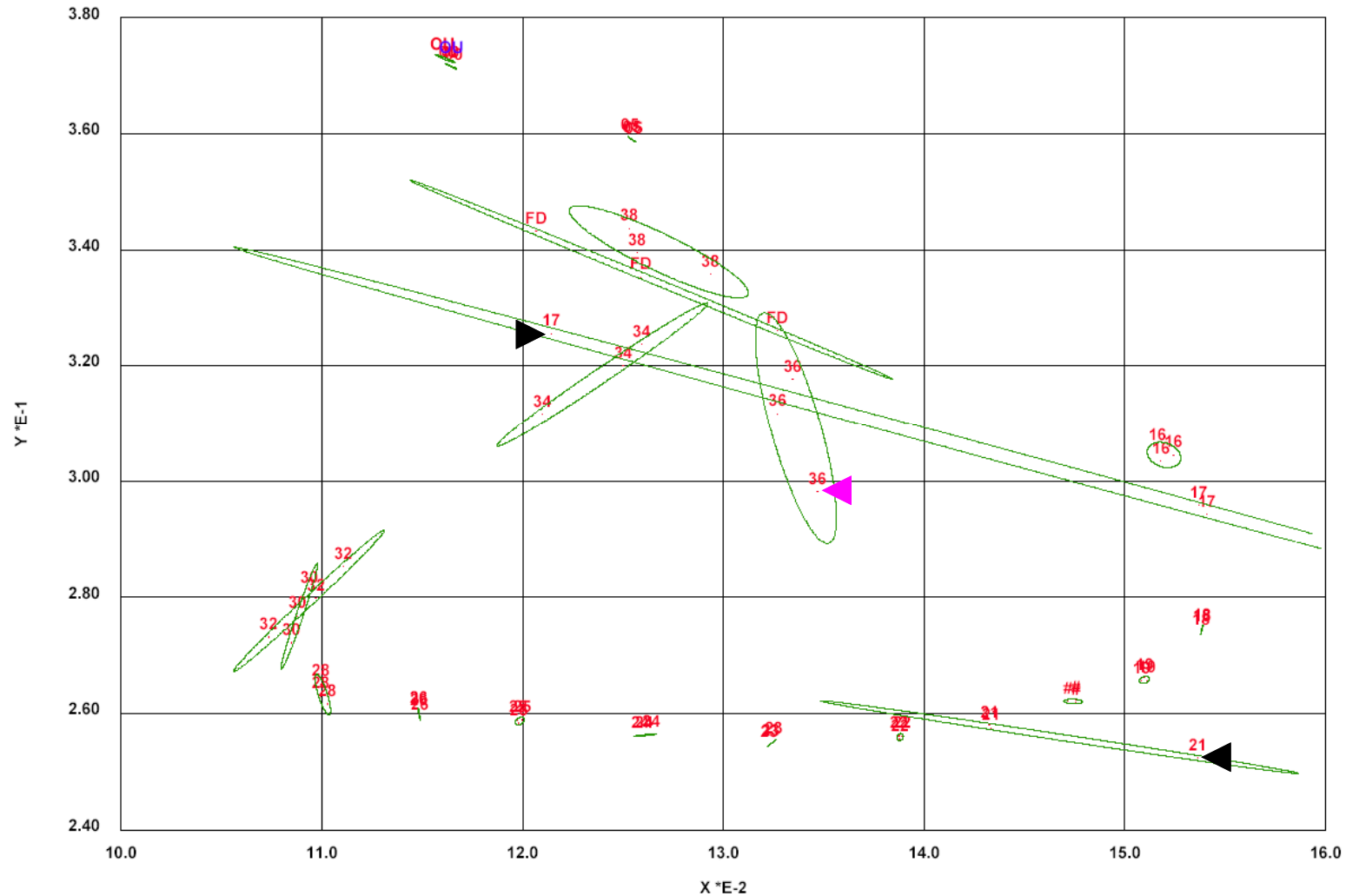
Fermentáció (*E. coli*) off-line nyomon követése: PQS módszer



Fermentáció (*E. coli*) off-line nyomon követése: PQS módszer



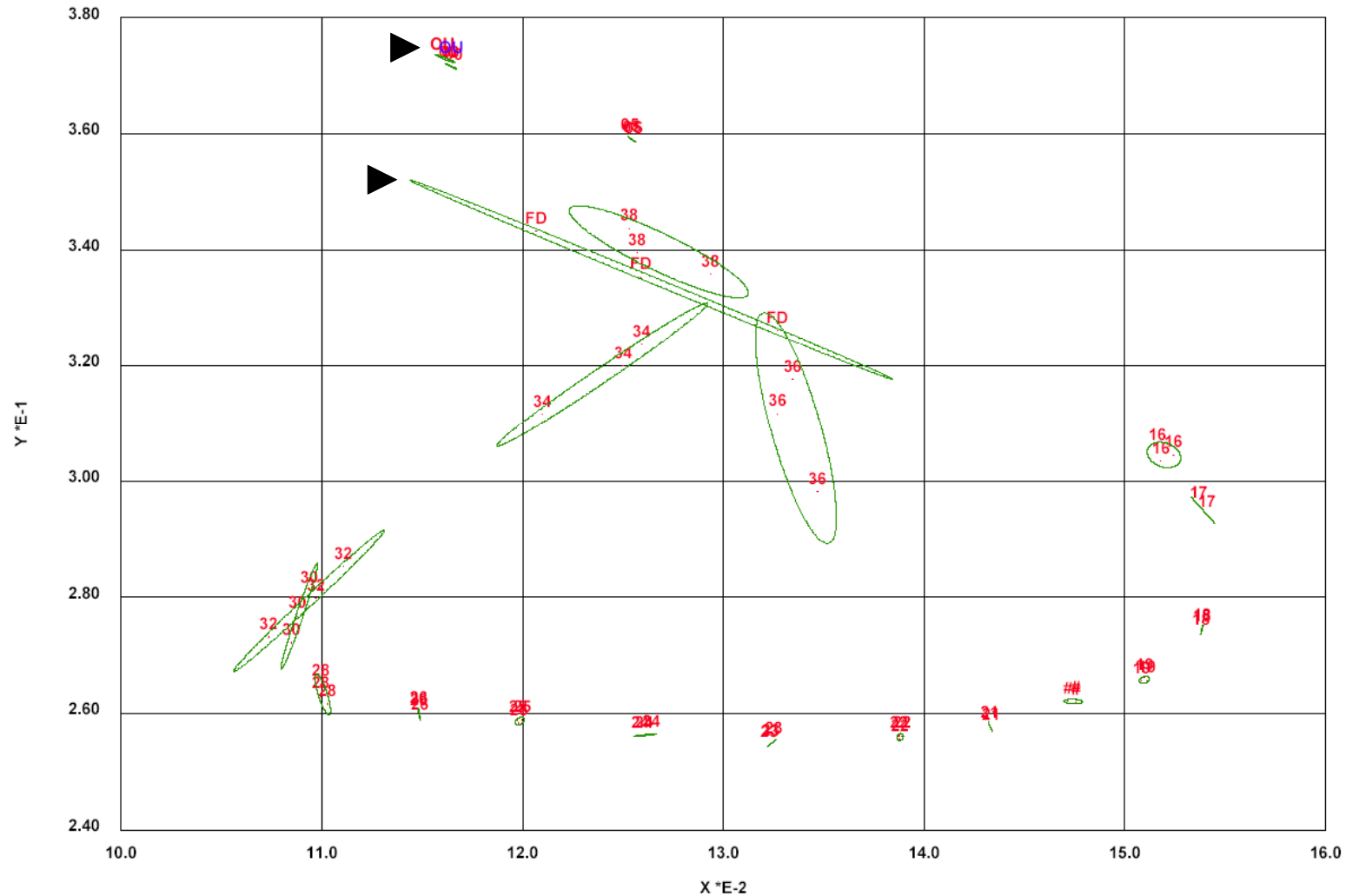
PQS32 Kiértékelő Program, Verzió: 1.37 (Prof. SALGO, BME) - [01_OU_a.txt] Spektrumok (01_OU_a.txt)



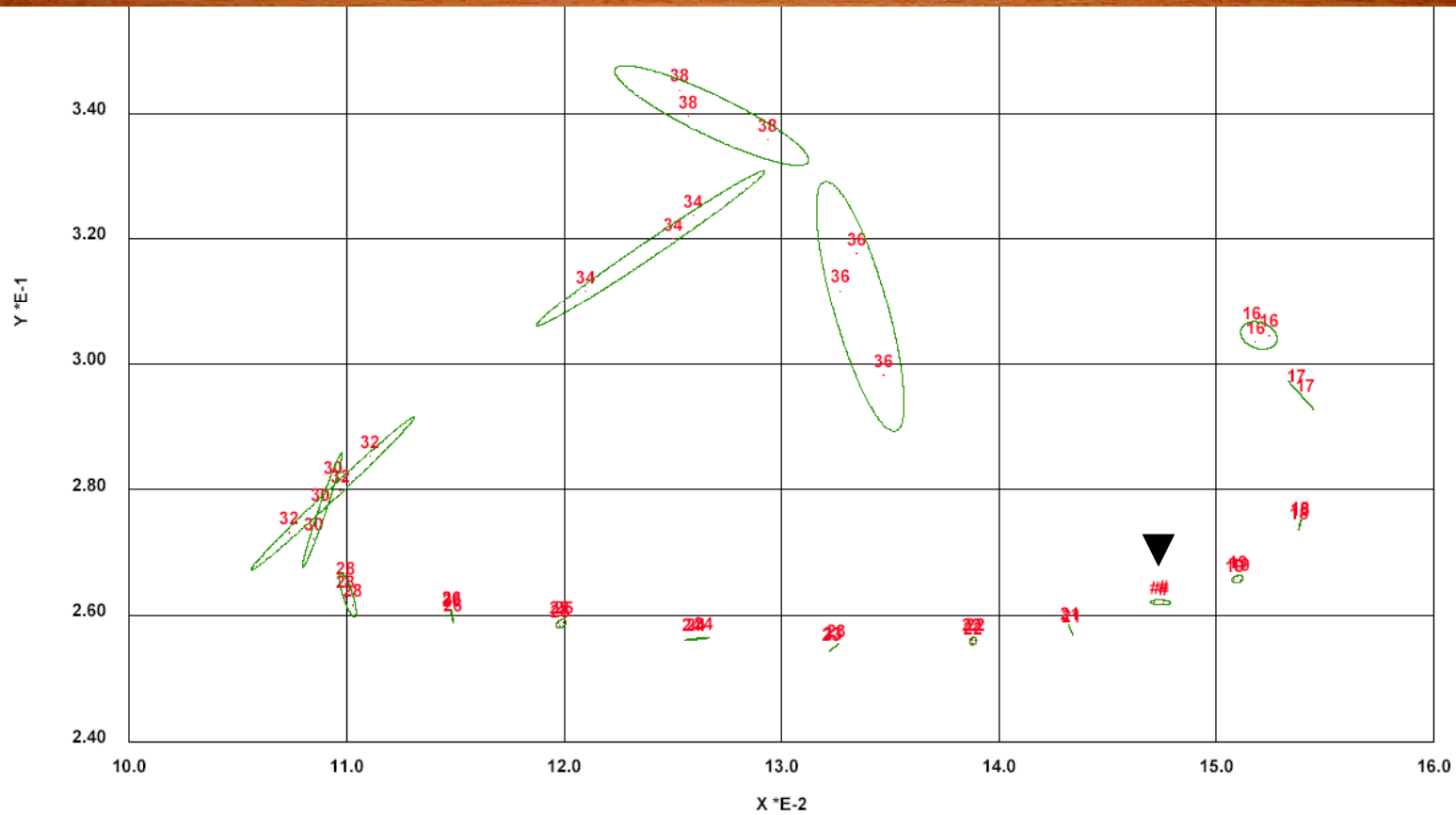
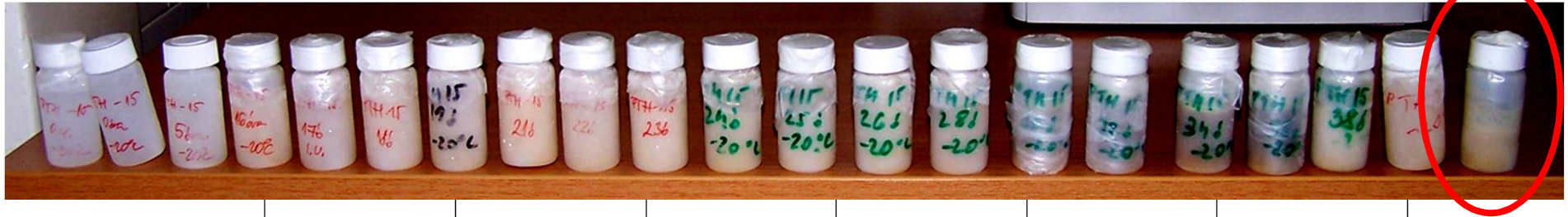
Fermentáció (*E. coli*) off-line nyomon követése: PQS módszer



PQS32 Kiértékelő Program, Verzió: 1.37 (Prof. SALGO, BME) - [01_OU_a.txt] Spektrumok (01_OU_a.txt)



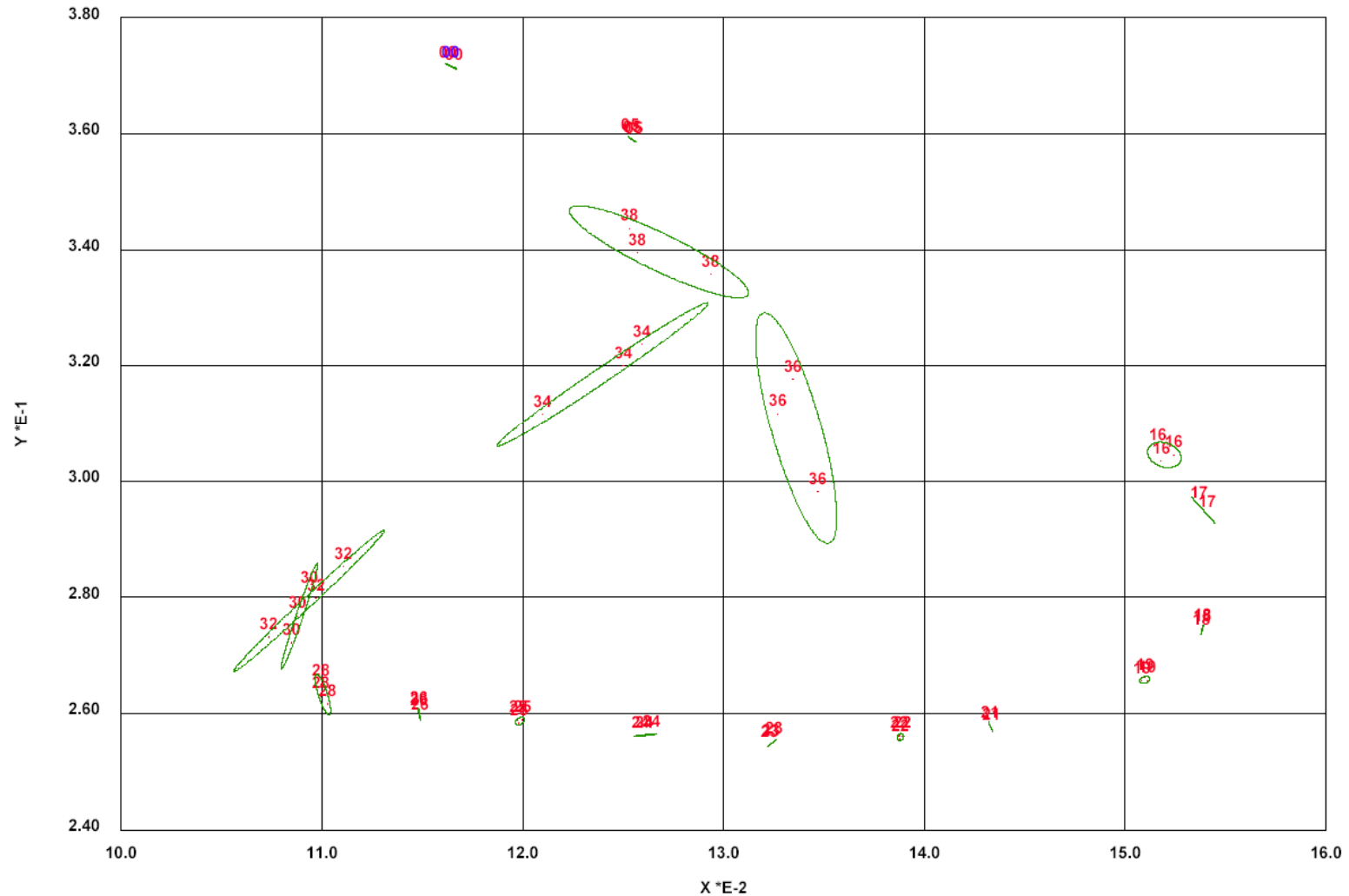
Fermentáció (*E. coli*) off-line nyomon követése: PQS módszer



Fermentáció (*E. coli*) off-line nyomon követése: PQS módszer



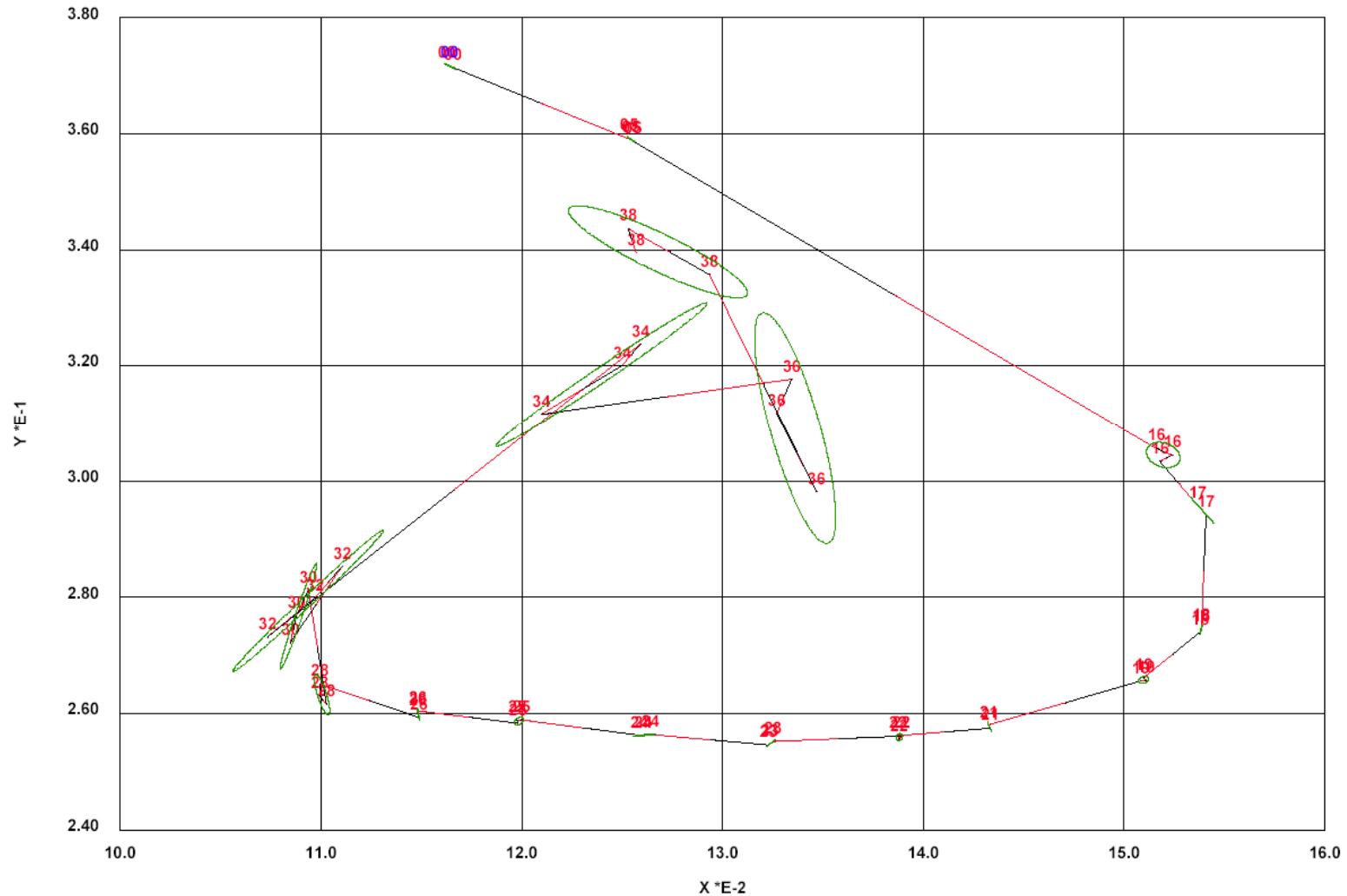
PQS32 Kiértékelő Program, Verzió: 1.37 (Prof. SALGO, BME) - [02_00_a.txt] Spektrumok (02_00_a.txt)



Fermentáció (*E. coli*) off-line nyomon követése: PQS módszer



PQS32 Kiértékelő Program, Verzió: 1.37 (Prof. SALGO, BME) - [02_00_a.txt] Spektrumok (02_00_a.txt)



A változékonyság leírása: PCA

- Méret (PC1)



nagy (kapu)



átlagos (ajtó)



kicsi (asztal)

- Kulcs feje (PC2)



kerek



ovális



téglalap



sokszögű

- Szín (PC3)



oxidált



fém



kék

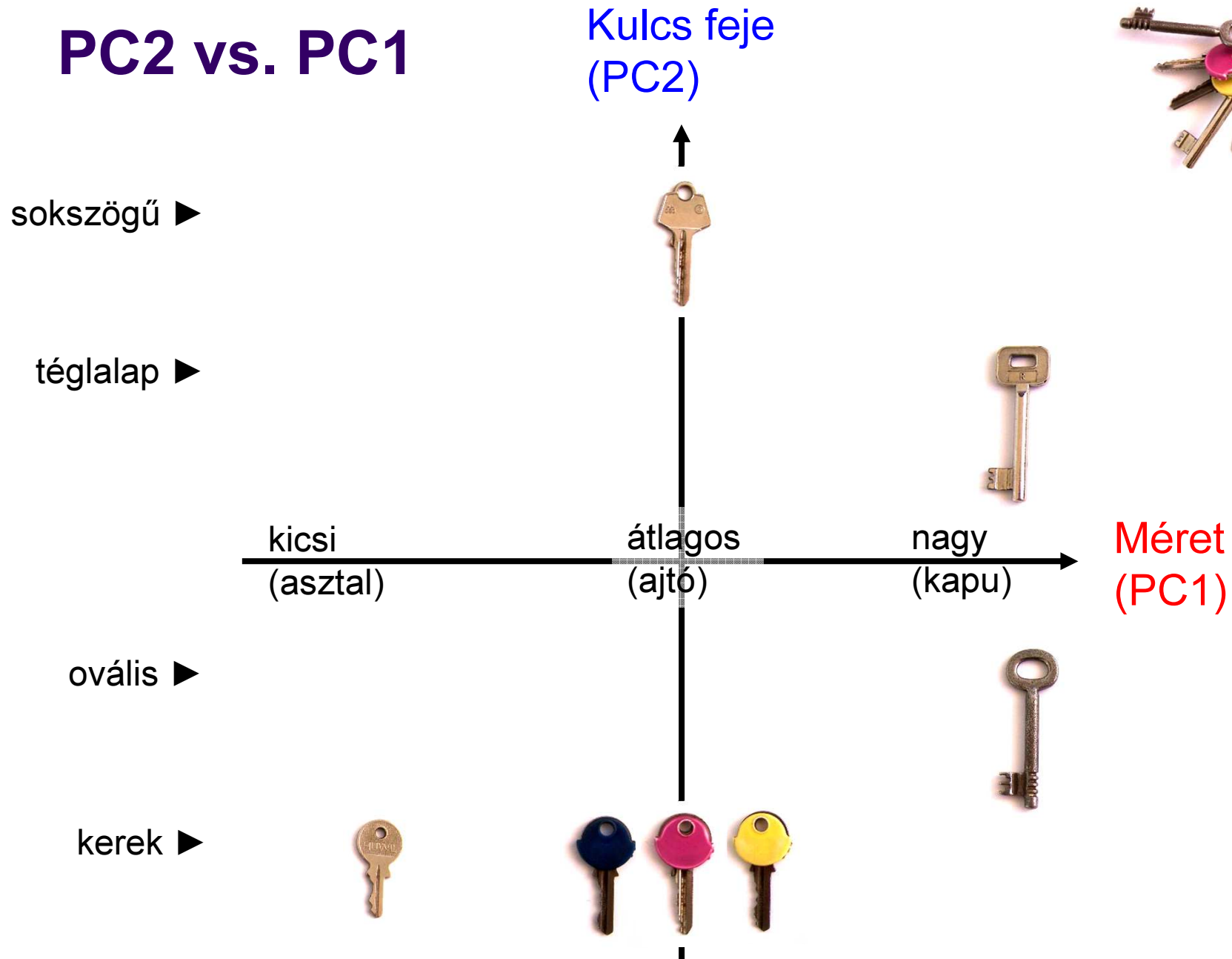


ciklámen



sárga

PC2 vs. PC1



PC2 vs. PC3

Kulcs feje
(PC2)



sokszögű ▶



téglalap ▶



oxidált fém

ovális ▶



kék ciklámen sárga

Szín
(PC3)

kerek ▶

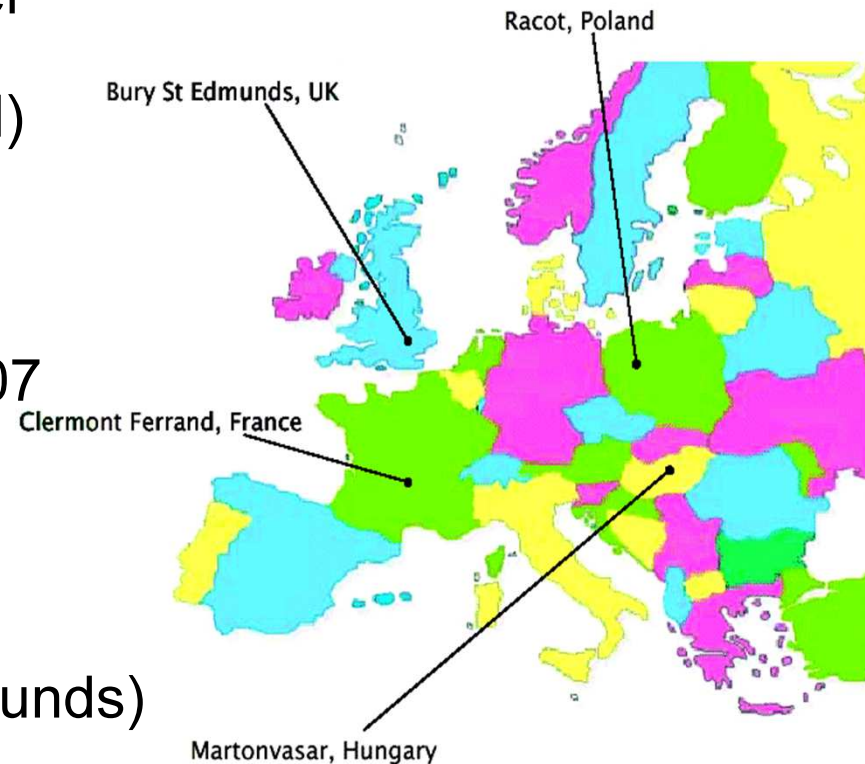


G×E hatás vs. PCA I.

Mert:
bio.



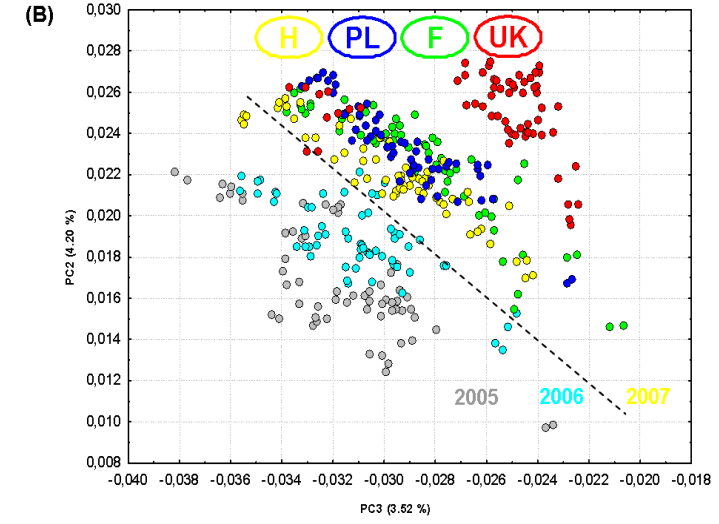
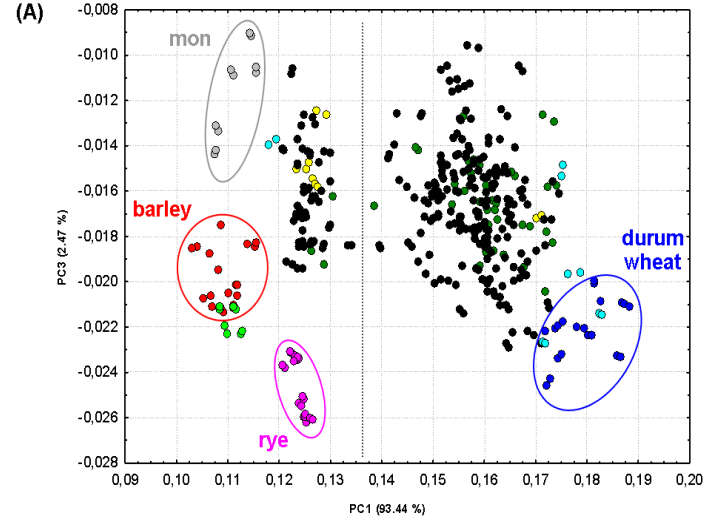
- Gabona minták termesztési helyei
- Franciaország (Clermont-Ferrand)
betakarítás éve: 2007
- Magyarország (Martonvásár)
betakarítás éve: 2005, 2006, 2007
- Lengyelország (Dankow/Choryn)
betakarítás éve: 2007
- Egyesült Királyság(Bury St. Edmunds)
betakarítás éve: 2007



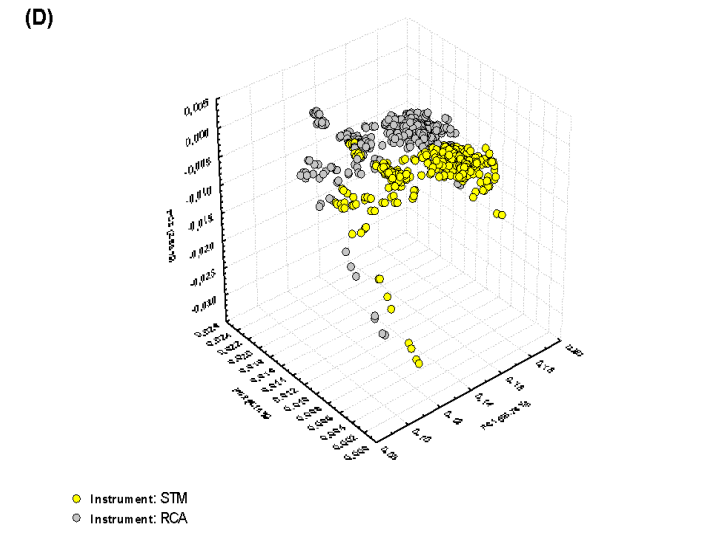
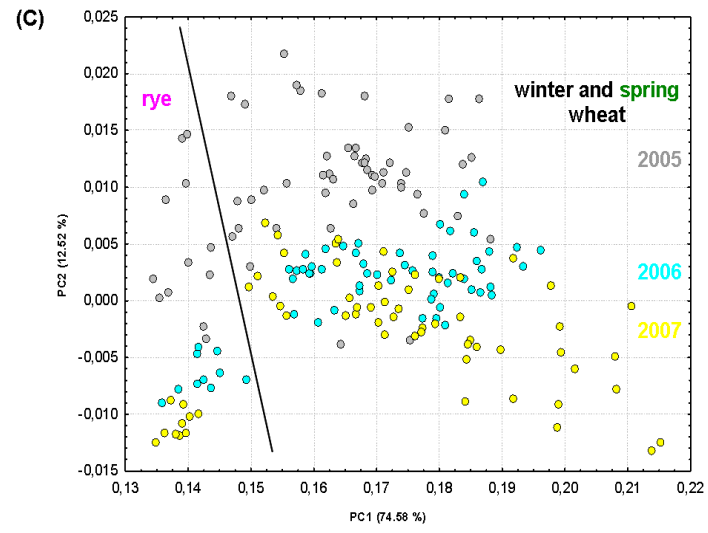
G×E hatás vs. PCA II.



fajta



évjárat



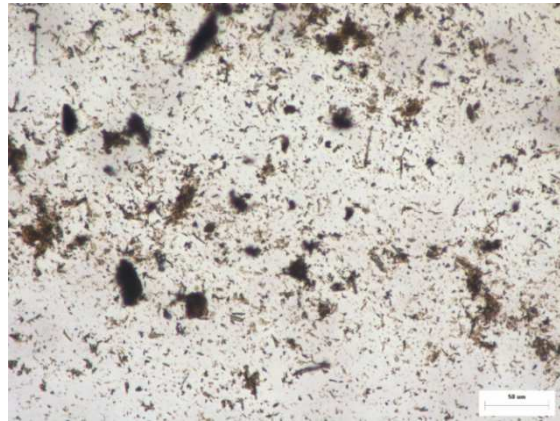
G×E

készülék

Polimorf transzformációs vizsgálat: fénymikroszkópos felvételek



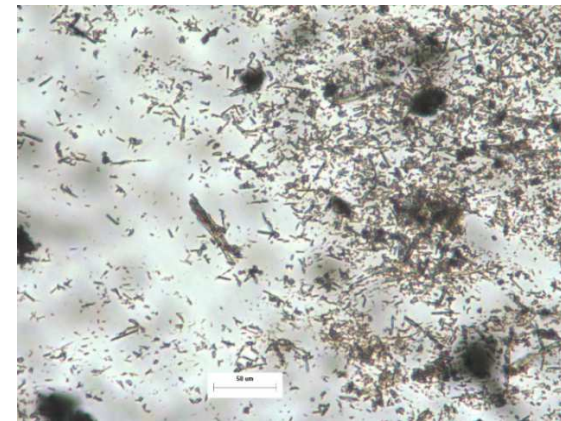
Forma 1



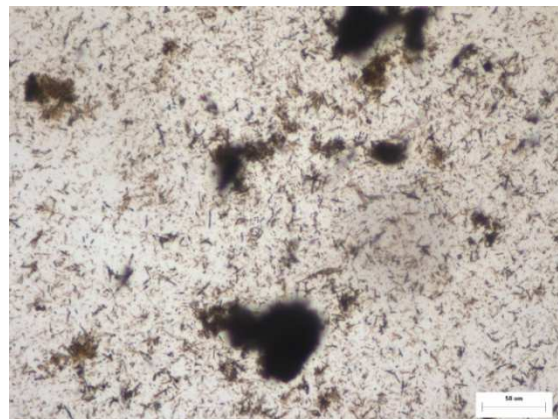
Forma 2



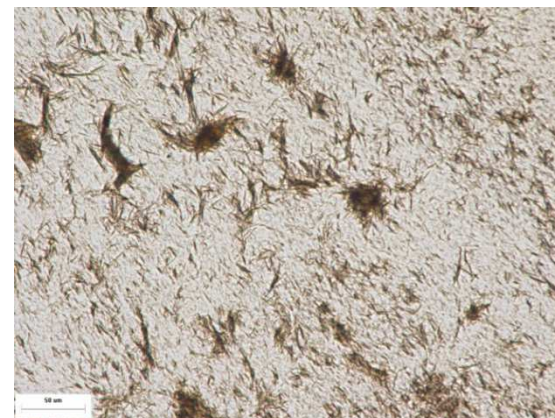
Forma 3



Forma 4



Forma 5



Forma 2







Forma 1

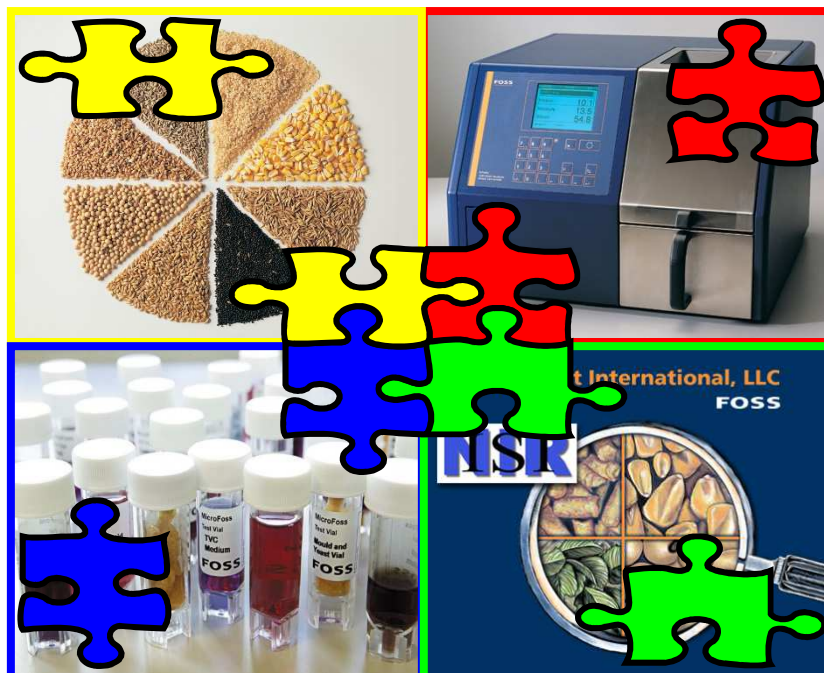


Forma 5



A kalibrálás és validálás elemei

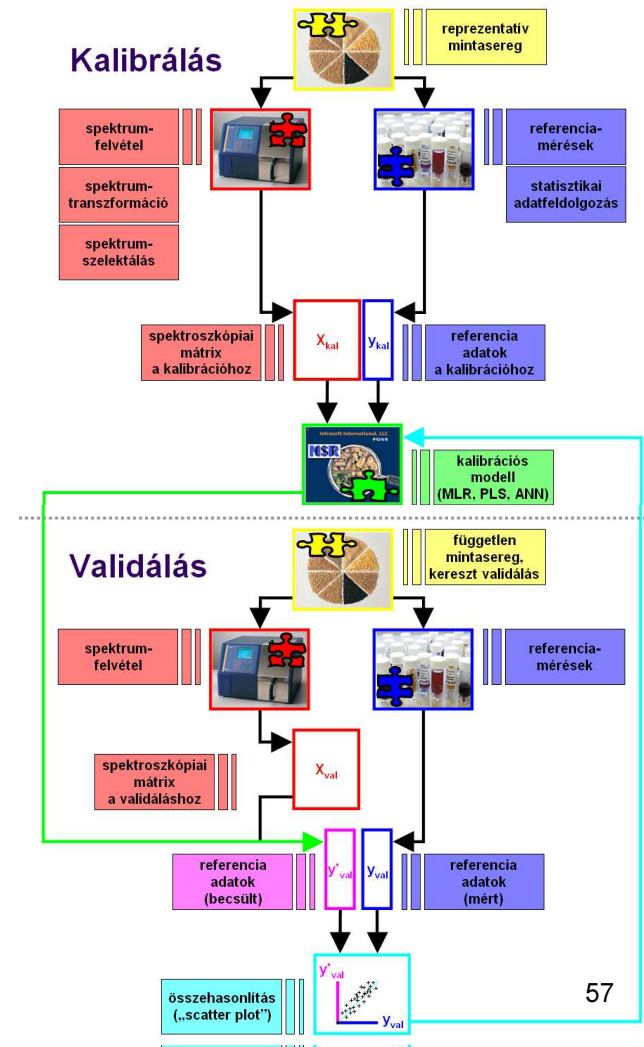
- Fő(bb) kellékei
 -  jól definiált mintasereg
 -  pontos referencia módszerek
 -  megbízható spektroszkópai eszközök
 -  egzakt matematikai, statisztikai, kemometriai eljárások



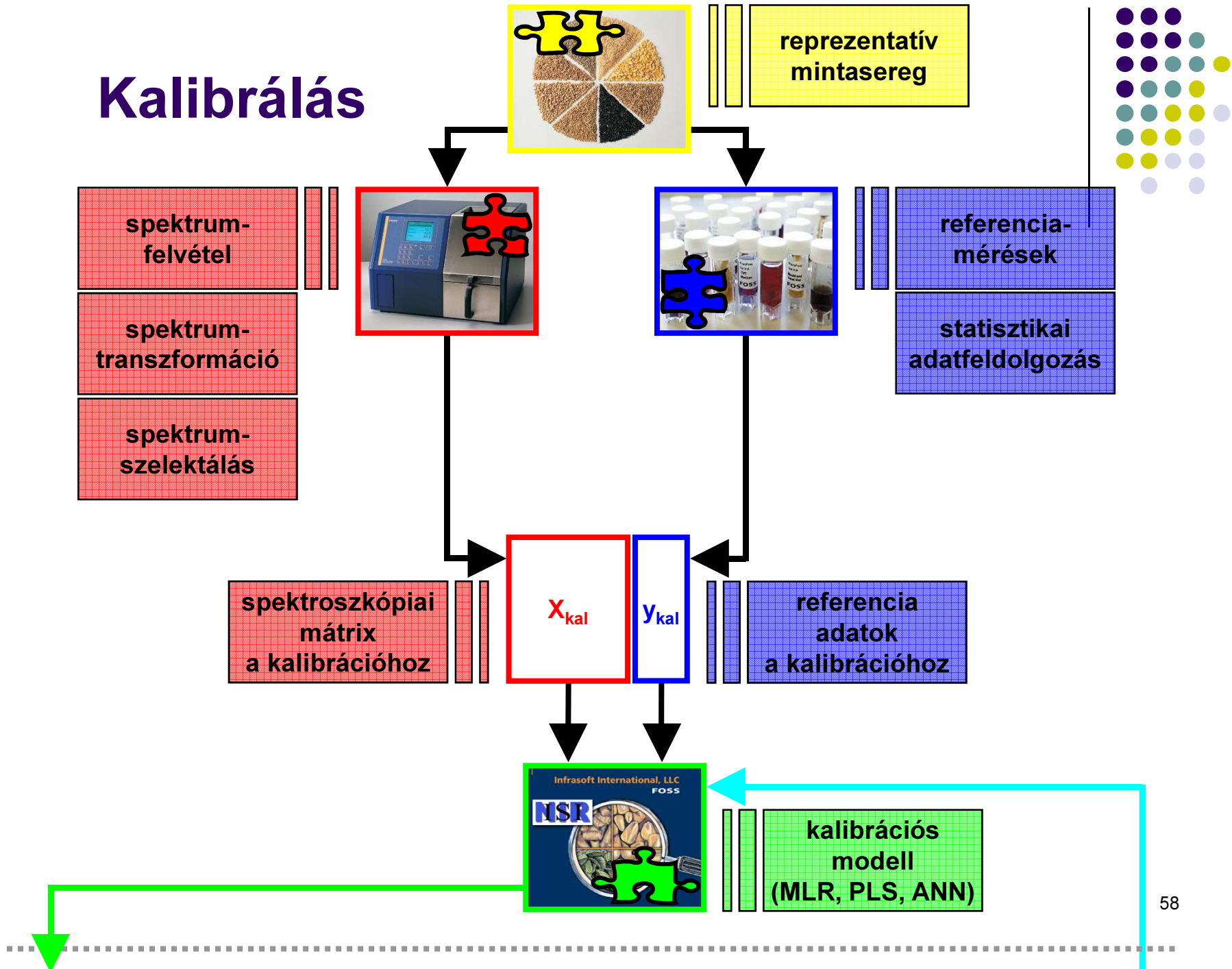
A kalibrálás és validálás áttekintése



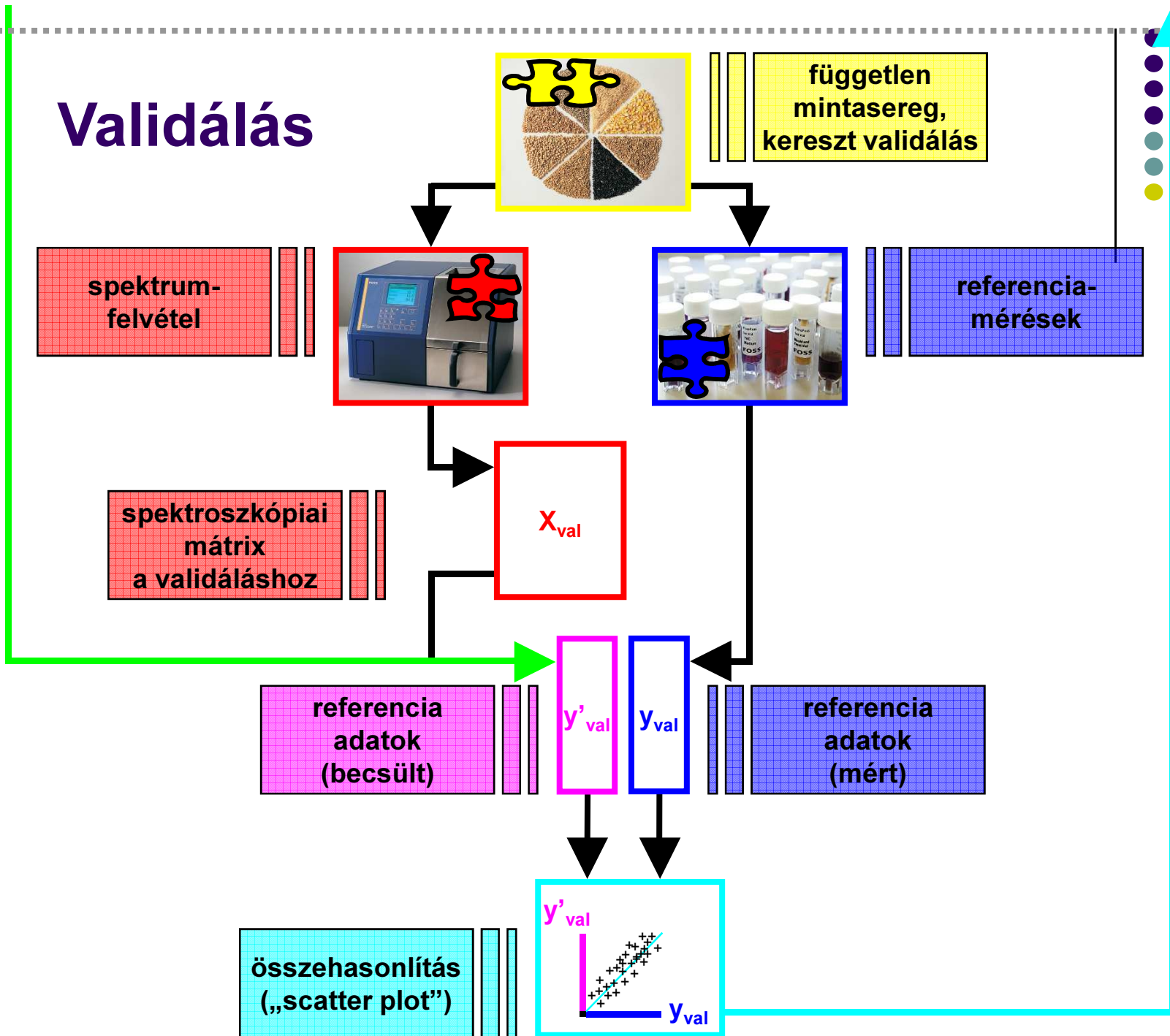
- Kalibrálás
 - többváltozós összefüggések, korrelációk keresése a spektroszkópiai és a referencia adatsorok között
- Validálás
 - a kalibrációs modell teljesítményének értékelése független mintasorozattal vagy kereszt validálással



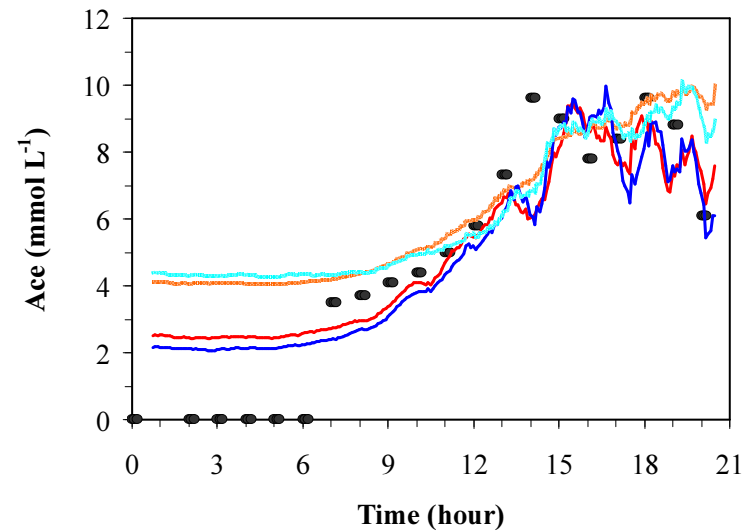
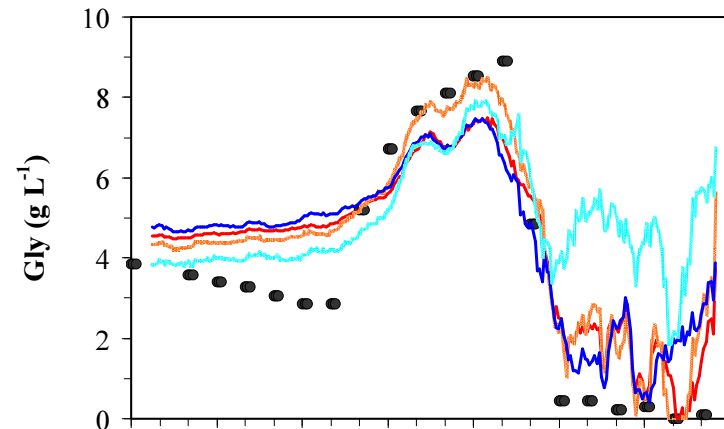
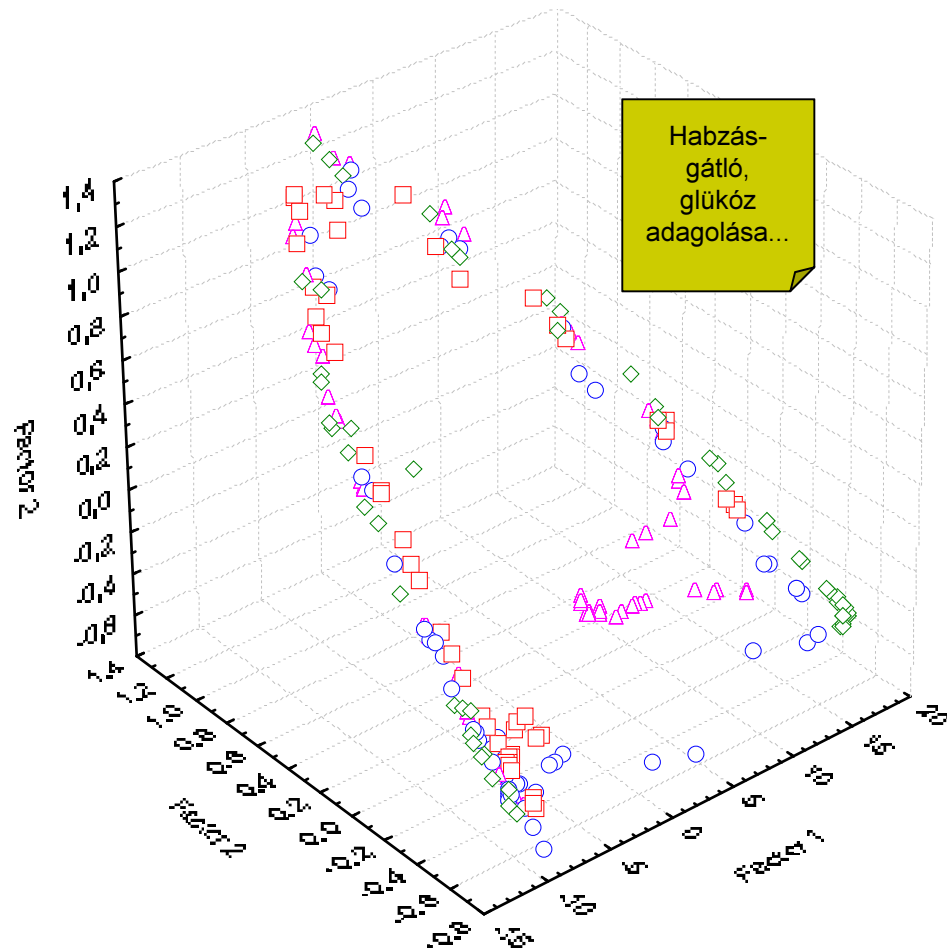
Kalibrálás



Validálás



Fermentáció (*E. coli*) in-line nyomon követése: diszp. NIR-rel PCA, PLS



Léptéknövelés: 1 litertől 5000 literig



Greiner István: Biotechnológiai gyógyszergyártás.

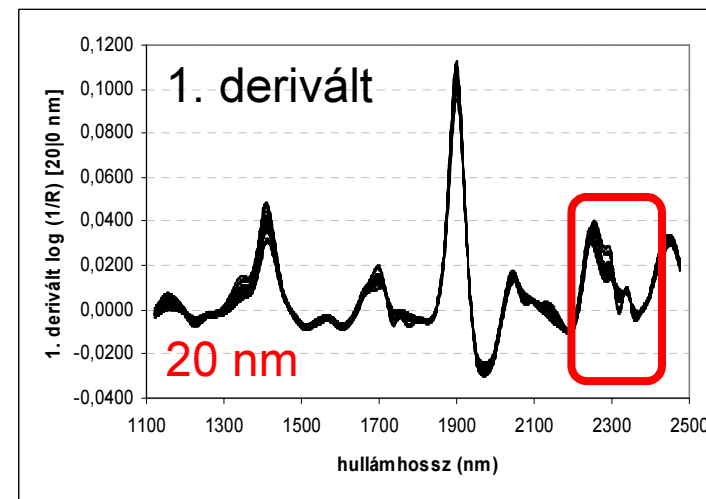
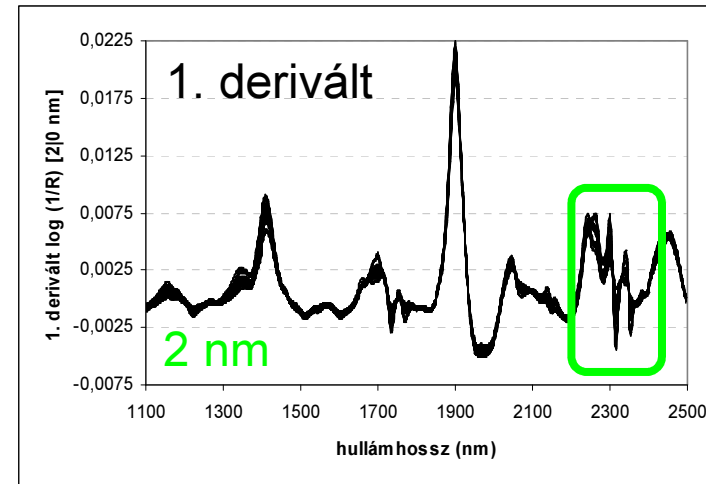
A Magyar Tudomány Ünnepe – 2013. Az MTA Kémia Tudományok Osztályának előadói ülése. „Kémia a jobb életminőségért” (2013. november 6.)
<http://www.chemonet.hu/osztaly/kemia/tudnap13/greiner.pdf>

API meghatározása – simítás hatása a derivált képzésére



- Az első és második deriváltak képzése a kezeletlen spektrumokból más-más beállításokkal történik:
 - **Diszperziós NIR** esetén:
2, 4, 8, 12, 16, 20 nm-es (1, 3, 5, 7, 9, 11 pontos) kapu
[„gap-segment” derivált]
 - **FT-NIR** esetén:
5, 9, 13, 19, 25, 37, 49, 149 pontos kapu
[Savitzky-Golay derivált]

NIR

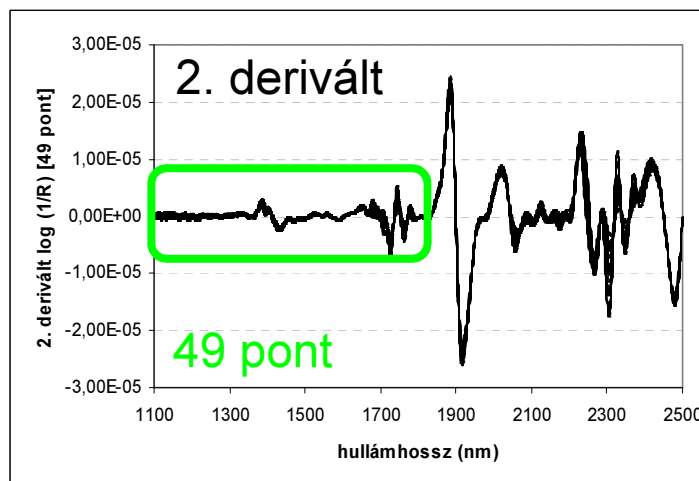
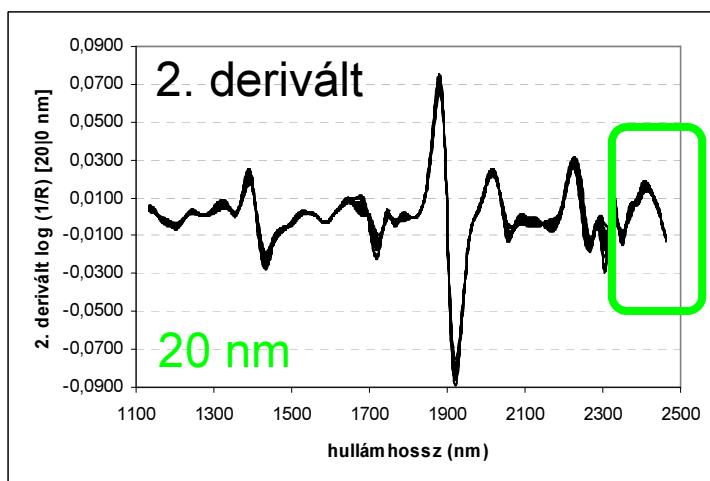
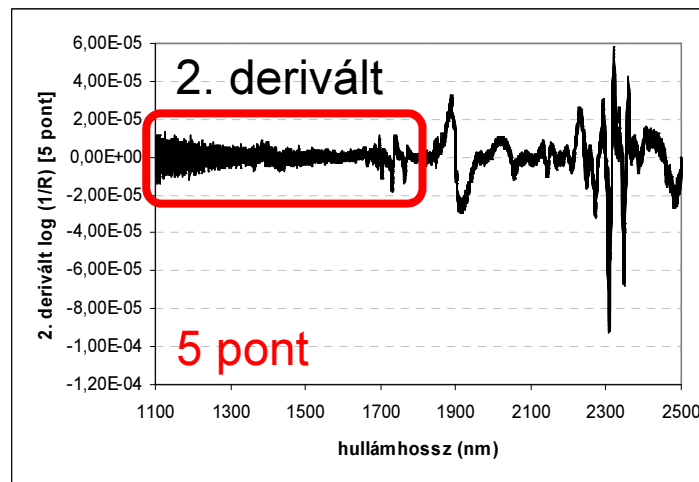
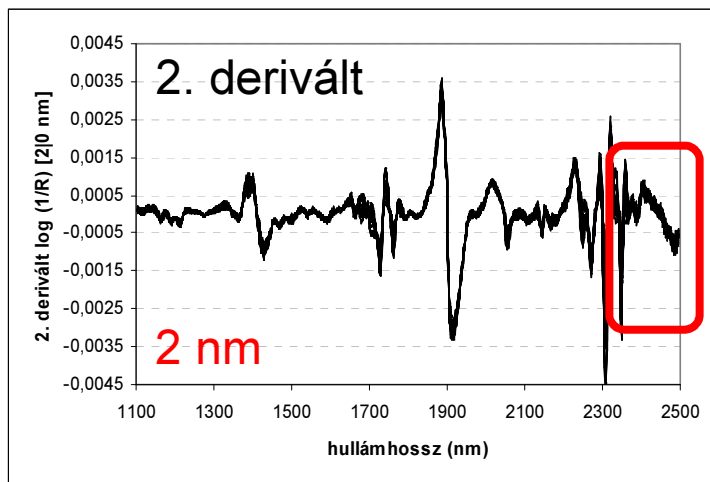


API meghatározása – diszperziós vs. FT (pl. detektorok)

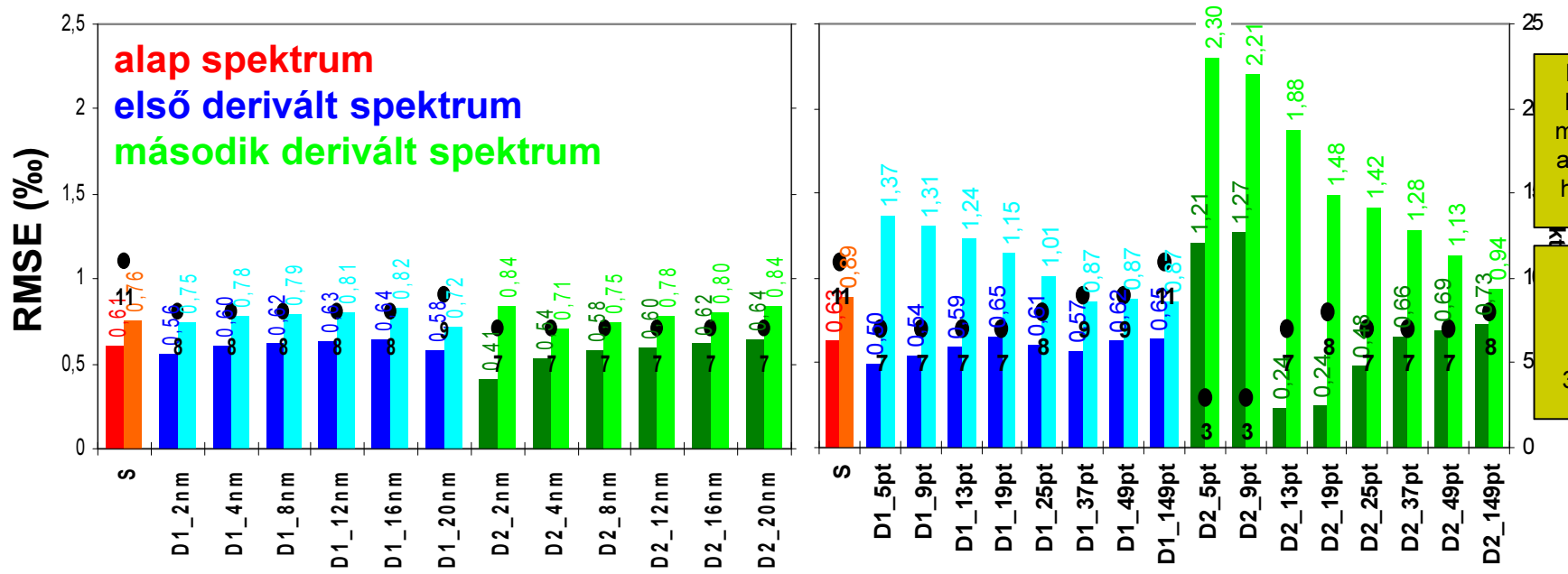
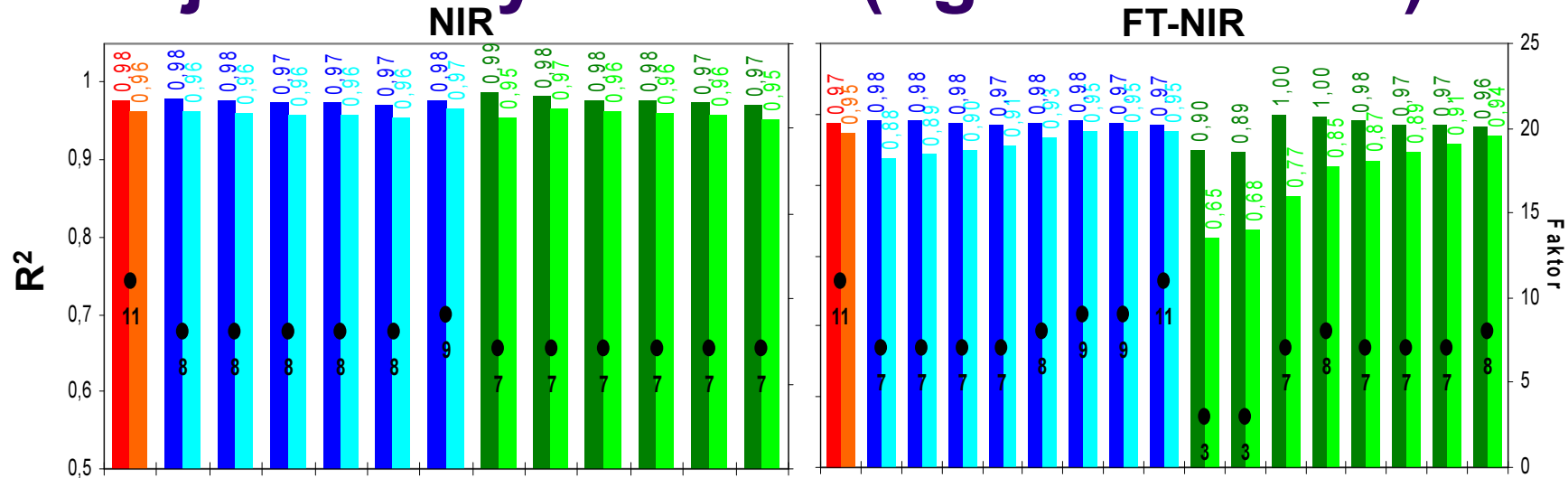


NIR

FT-NIR



API meghatározása – teljesítménymutatók (figure of merit)



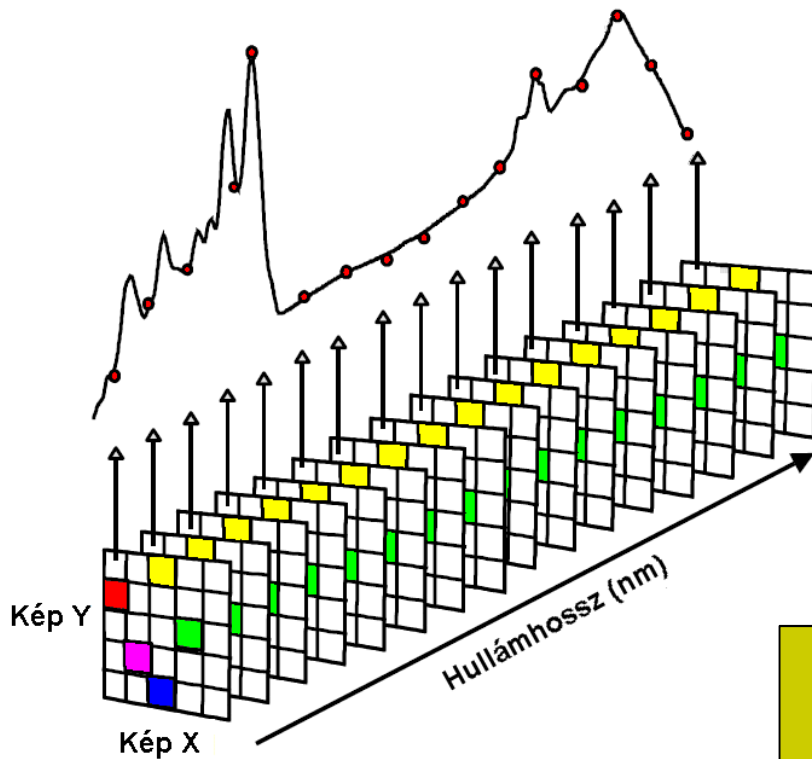
Élelmiszer botrányok: mert jobb az analitika + a hiráramlás.

Kritikus - kontrollált példa: Down-kor 35 év alatt.

Spektrális hiperkocka vs. tudomány



- Spektrális hiperkocka



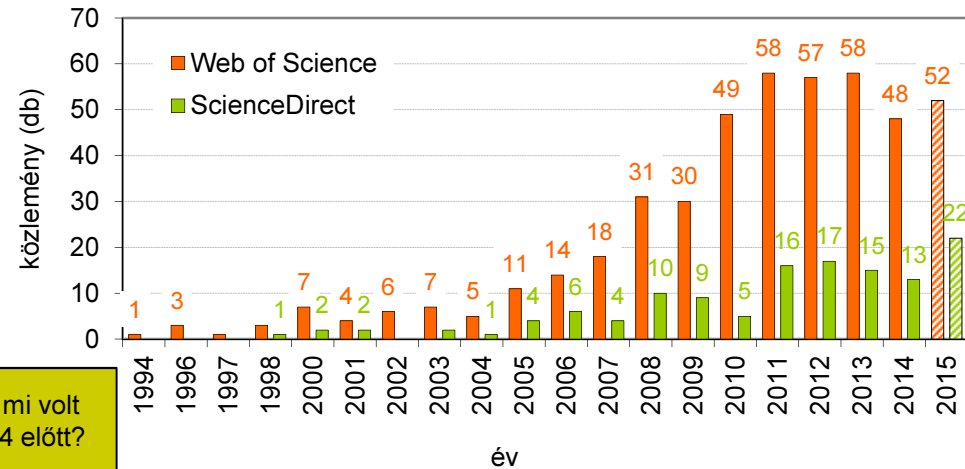
- „near-infrared AND imaging AND pharma” kulcsszóra történő keresés

• Web of Science

• ScienceDirect



- Progresszív fejlődés



De mi volt 1994 előtt?
Gyilok.

Lewis E.N., Carroll J.E., Clarke F.:
A near infrared view of pharmaceutical formulation analysis.
NIR news 12(3), 16–18 (2001)

Az eszközök fejlődése – (hideg) háborúkon keresztül (II. világháború)

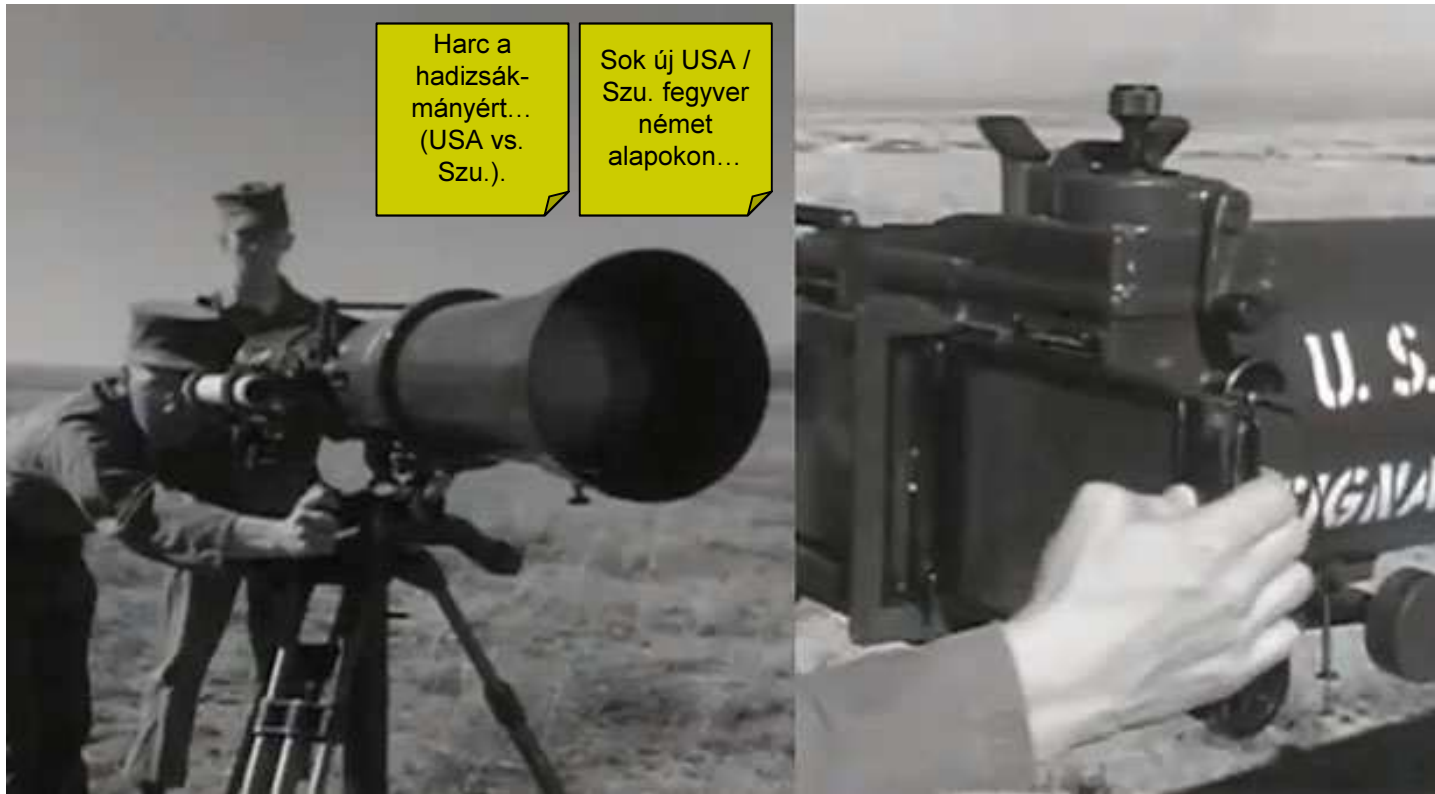


Éjjellátók kezdete: „vampir egység” (németek).



WunderWaffe 1 - vampire vision: could be used by the snipers at night because of its infrared vision.
http://obviousmag.org/en/archives/2010/07/extraordinary_weapons_of_the_nazi_germany_-_techno.html#ixzz2ahKgFiQw

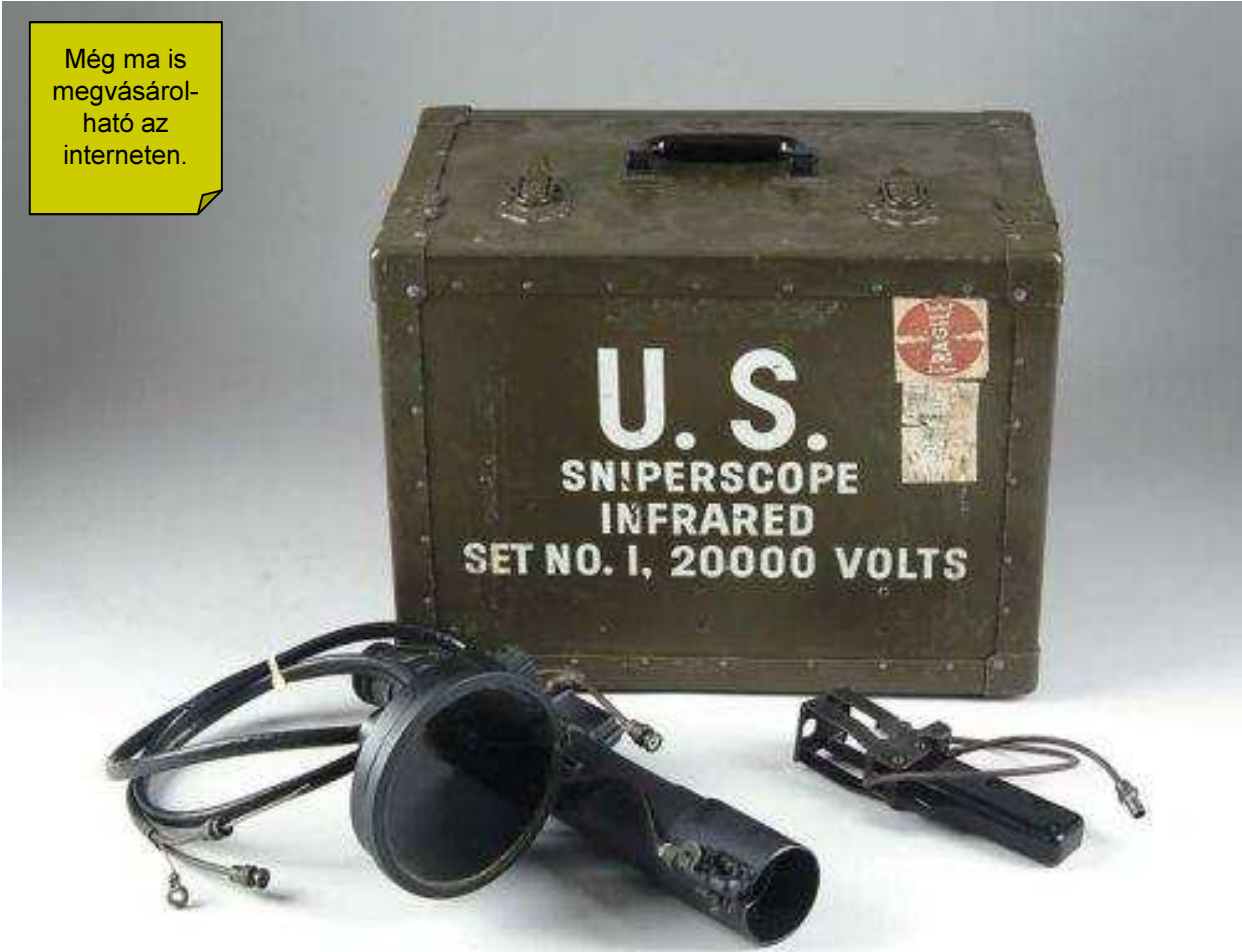
Az eszközök fejlődése – (hideg) háborúkon keresztül (hideg háború)



Az eszközök fejlődése – (hideg) háborúkon keresztül (Korea, Vietnam)



Még ma is megvásárolható az interneten.



Az eszközök fejlődése – (hideg) háborúkon keresztül (pl. Irak)



Civil alkalmazások – hideg/meleg I.

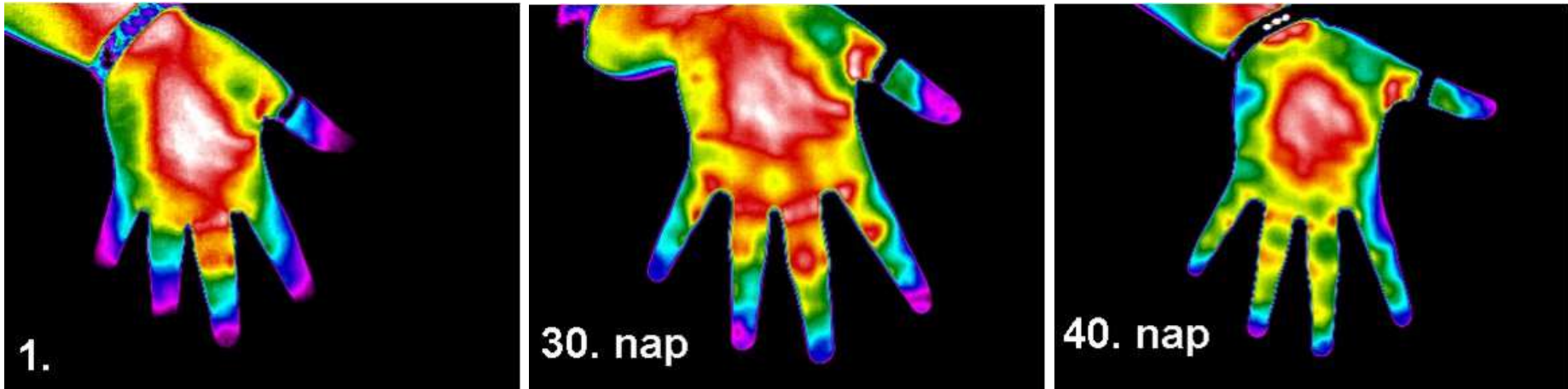


Energia-
osztályba
sorolás:
hol szökik a
hő...

Civil alkalmazások – hideg/meleg II.

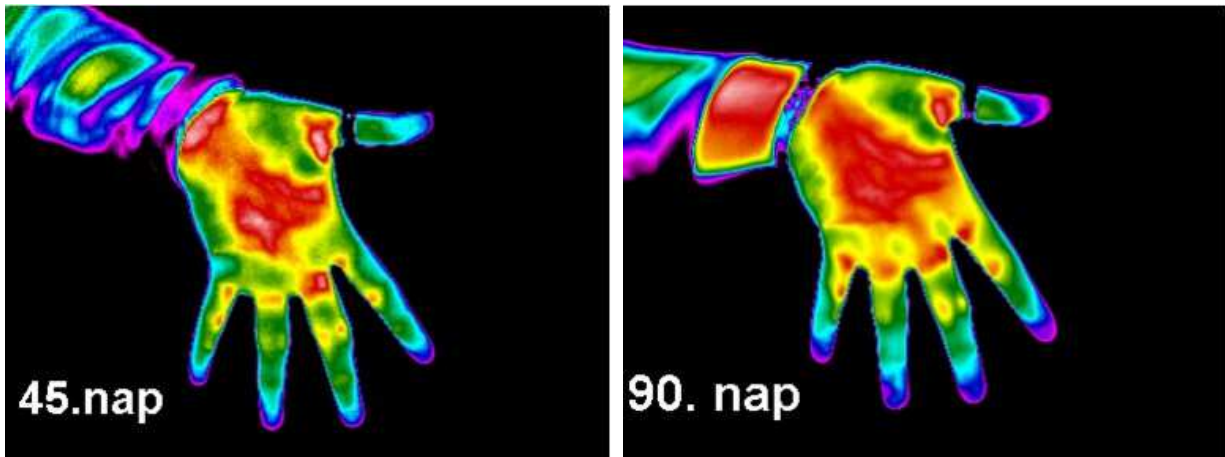


Civil alkalmazások – hideg/meleg III.



Törött
középső ujj
gyógyulása

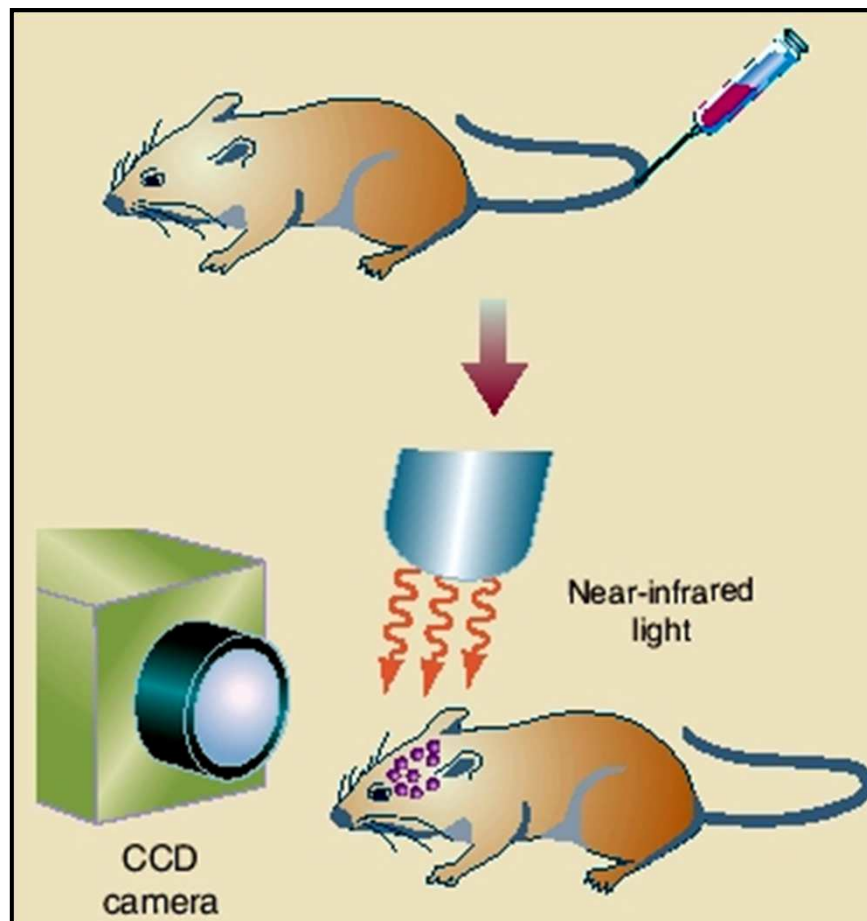
Szomato infra:
+ : gyulladás
vagy több ér
(daganat)
- : lipóma



Egér a Marsról I.



Itt már aktív:
IR besugárzás, DE
roncsolásmentes

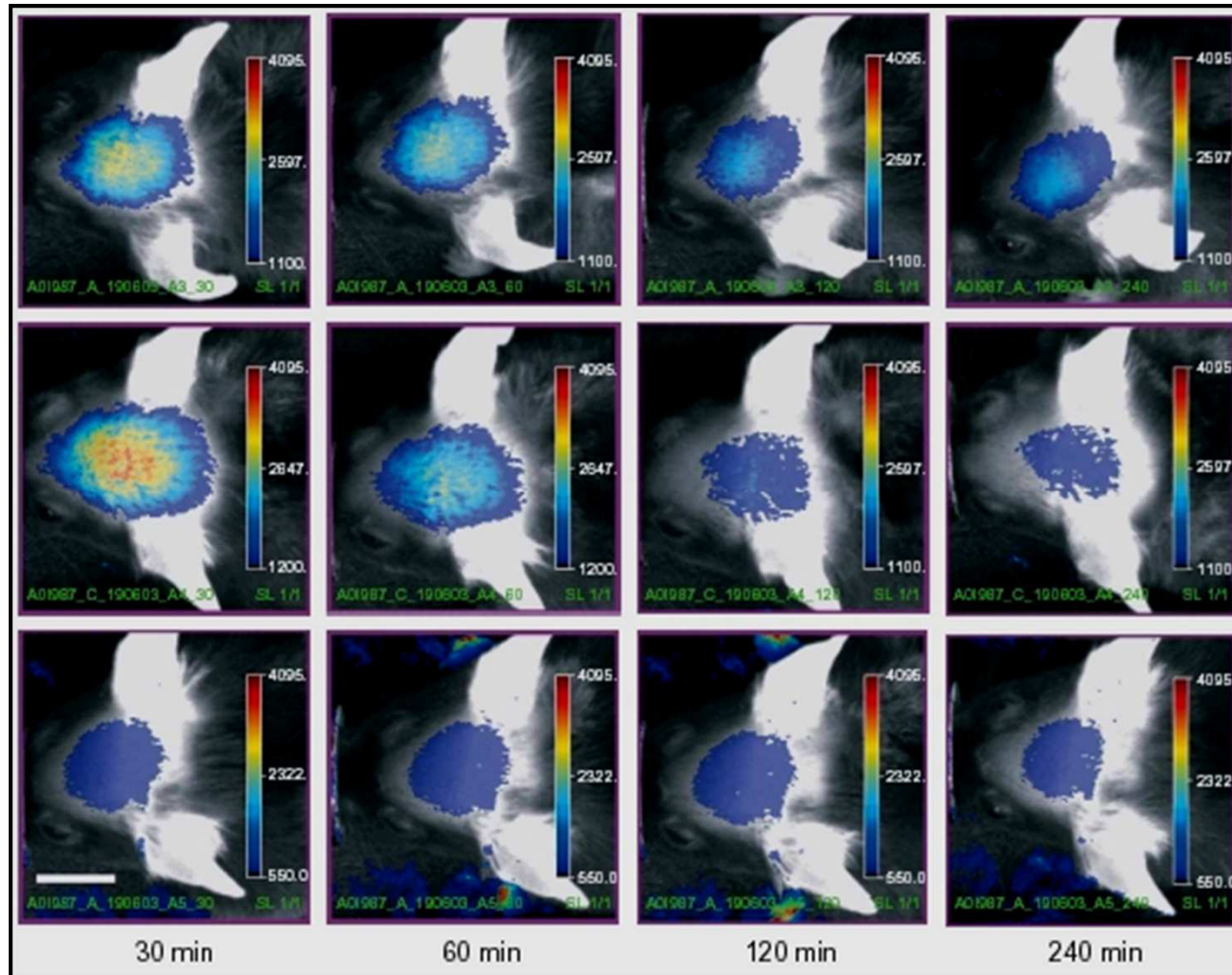


Sokszor csak
a bonc-
asztalon látjuk
az Alzheimer-
kór állapotát.

Korai észlelés
és terápia:
jobb esélyek.
NIR kamera
segít.

Golde T.E., Bacskai B.J.:
Amyloid deposits can be rapidly detected in the brains of living mice using a novel ligand and near-infrared fluorescence imaging.
Nat. Biotechnol. 23(5), 552–554 (2005)

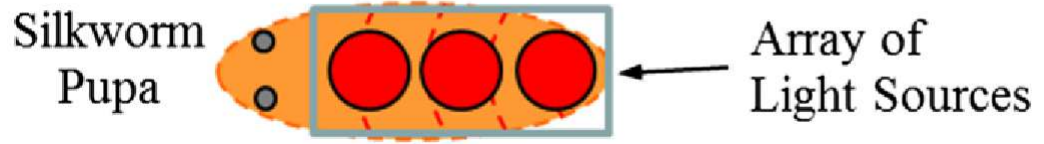
Egér a Marsról II.



Hintersteiner M. *et al.*:
In vivo detection of amyloid- β deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe.
Nat. Biotechnol. 23(5), 577–583 (2005)

Szexálás I.

TOP VIEW

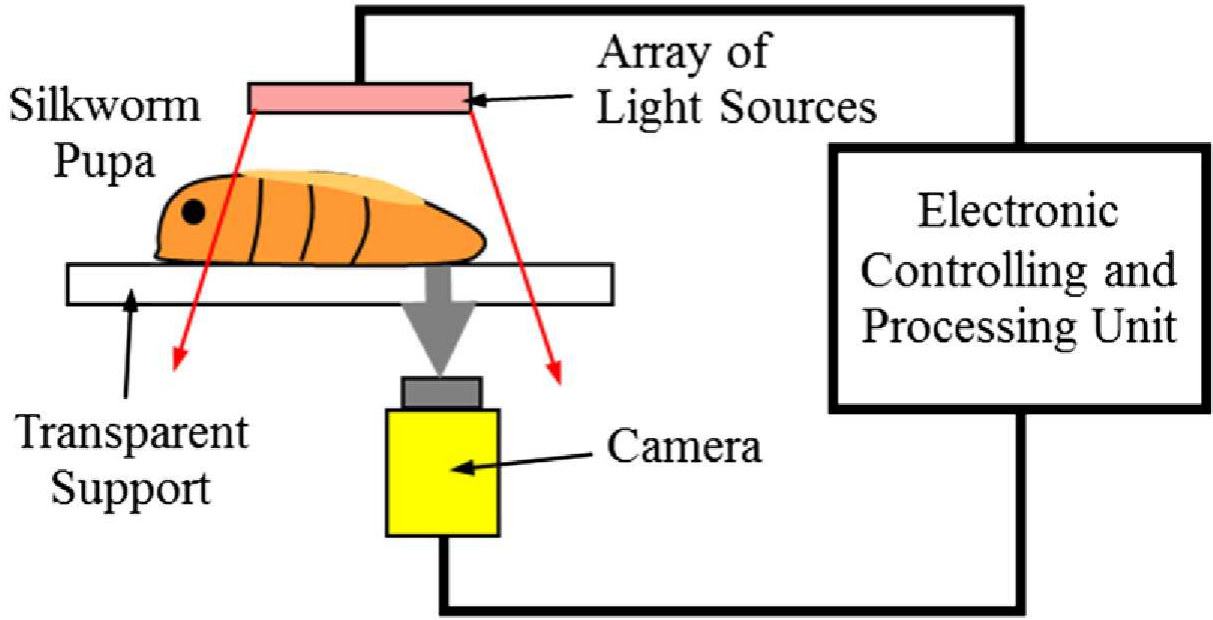


Tenyésztés szempontjából fontos, hogy mi van a bábban.

Bábot megbontani nem lehet, mert akkor elpusztul...



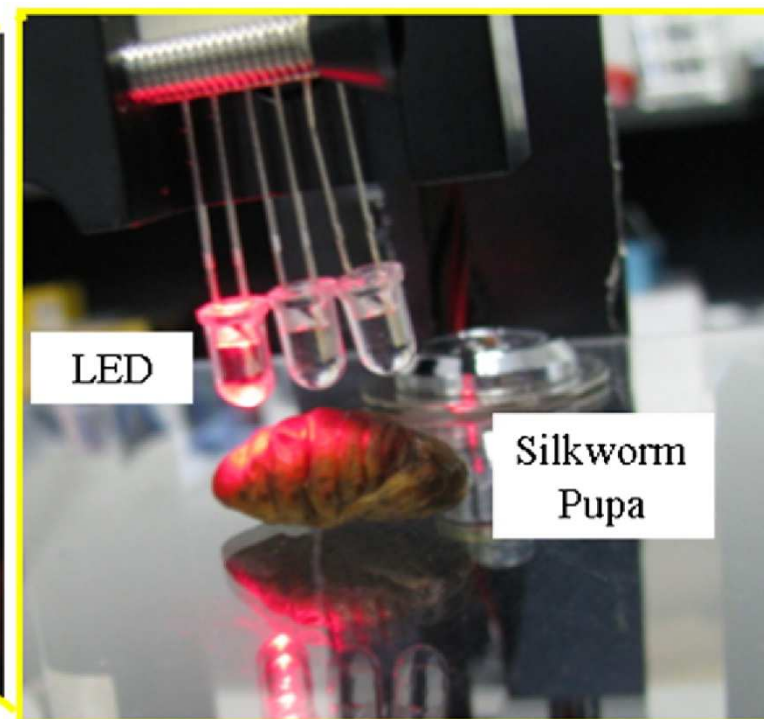
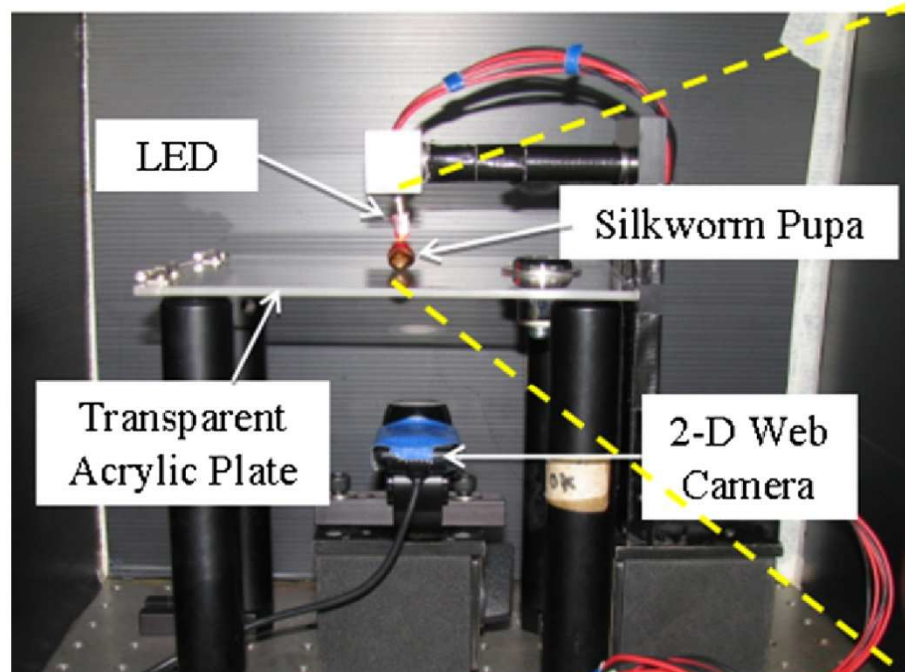
SIDE VIEW



Szexálás II.



Nézzünk bele a NIR segítségével a selyemhernyó bájbjába!

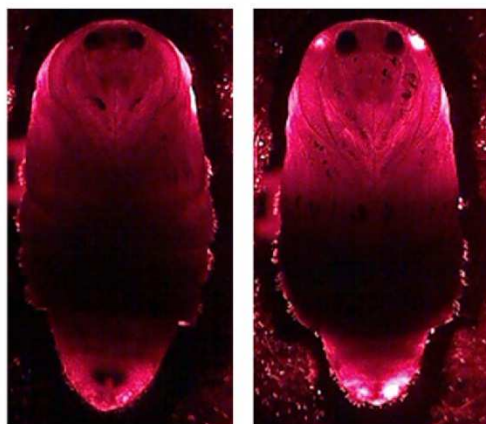


Close Up View

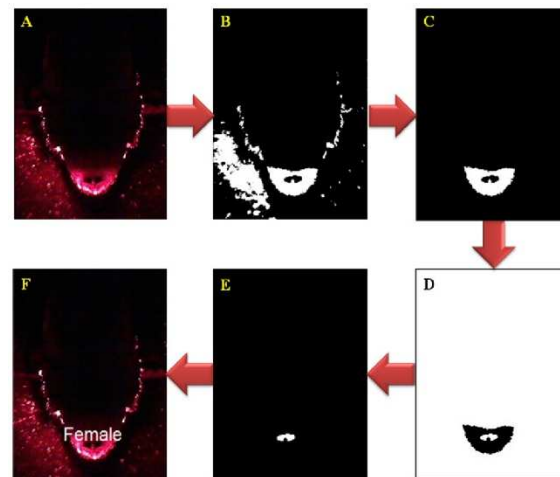
Szexálás III.



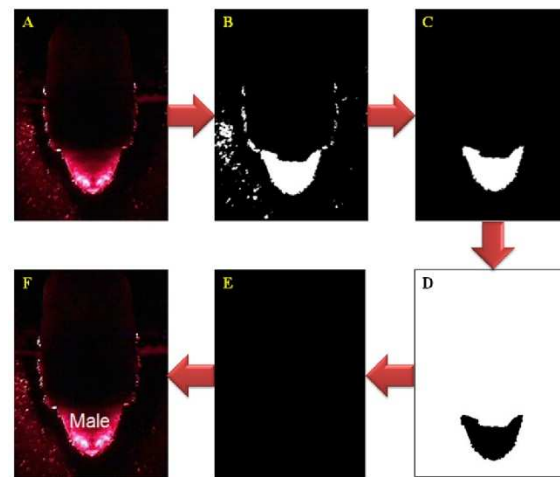
(a)



(b)



(a)



(b)

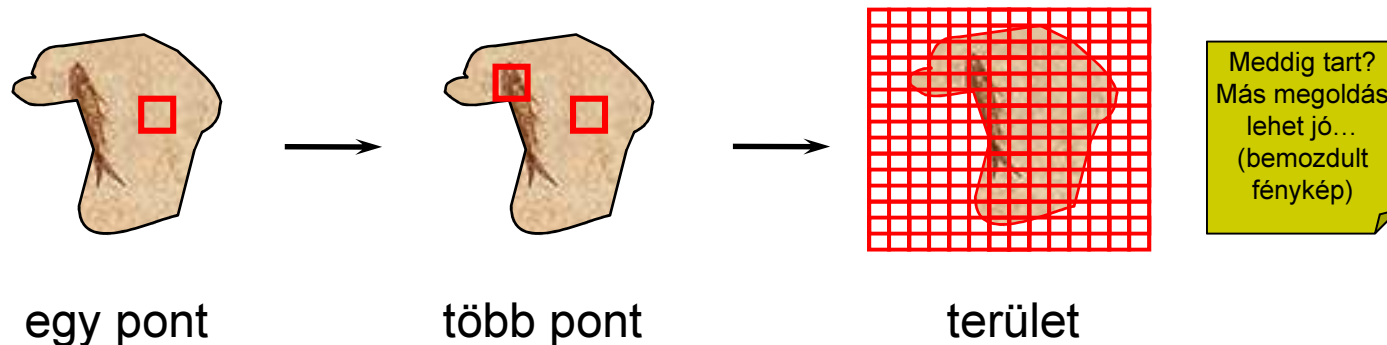
Lányoknál
semmi
extra ...

... de a fiúknak
világít
a „farkuk”.

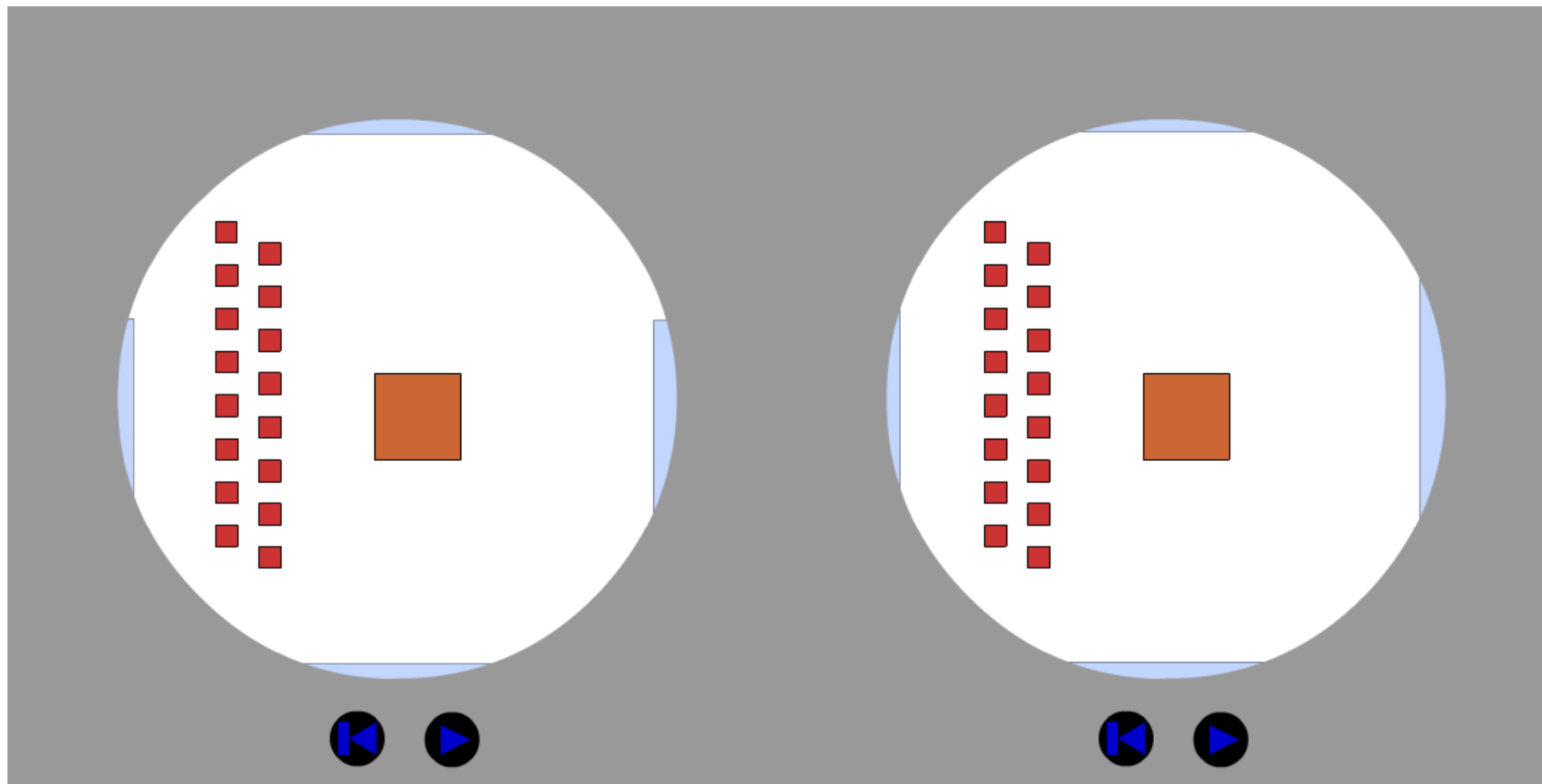
Mikro/makroszkópos képalkotás I.



- Pár/tíz mikrométeres nagyságrendek(től)
- Látható kép: vizsgálandó terület megkeresése, majd (N)IR mérés
- Nem, vagy csak kis mintaelőkészítést igényel: kevesebb hiba
- Különböző mérési módok: heterogén minták könnyebb vizsgálata



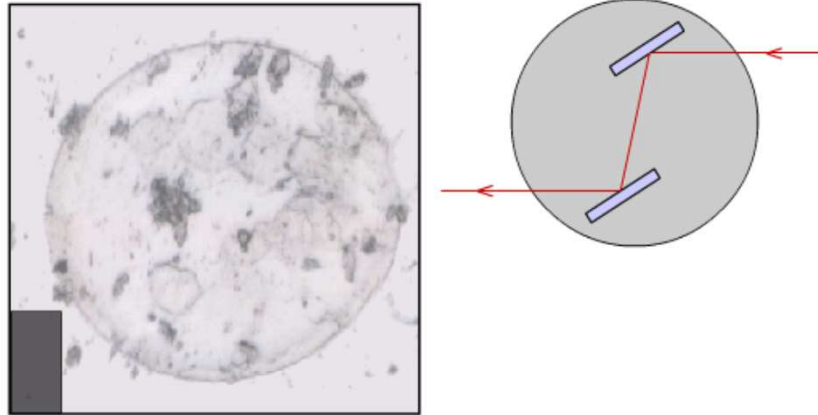
Mikro/makroszkópos képalkotás II.



pont

kép

Mikro/makroszkópos képalkotás II.

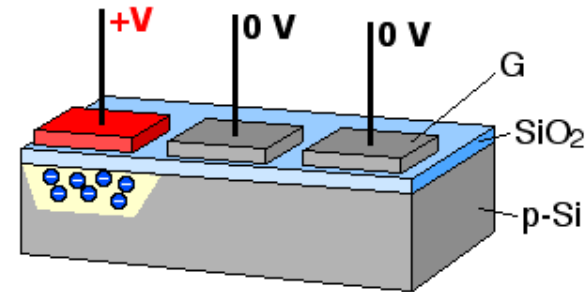


- A 16 elemből álló detektorsor a mintát $100\ \mu\text{m} \times 6,25\ \mu\text{m}$ vagy $400\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$ blokkokban látja (NIR esetén, IR: $1,56\ \mu\text{m}...$)
- 10 lépés másodpercenként, avagy 170 spektrum egy másodperc alatt ($16\ \text{cm}^{-1}$ mellet)

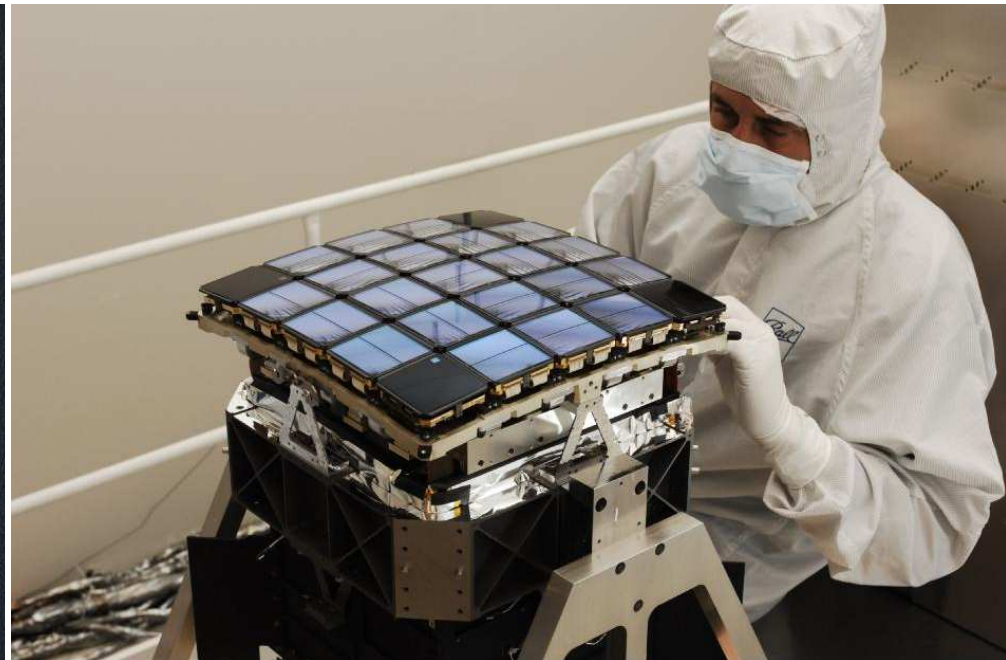
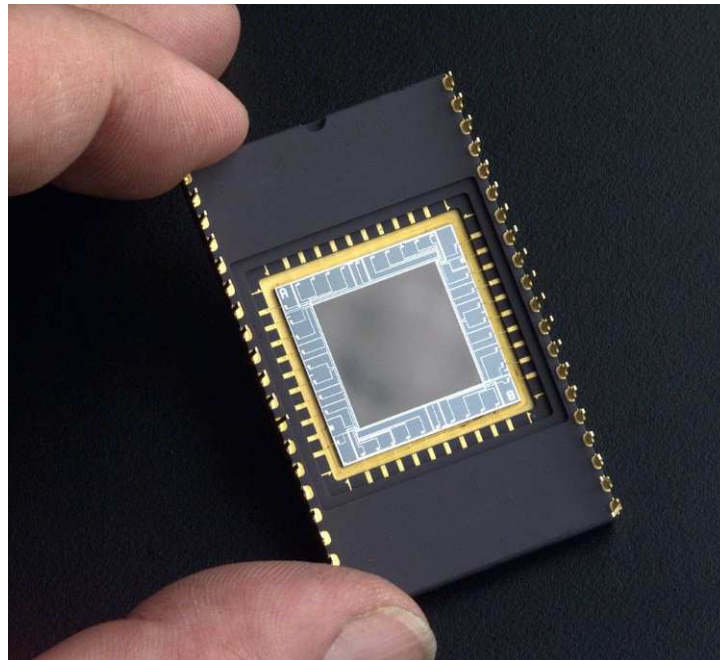
Mikro/makroszkópos képalkotás IV.



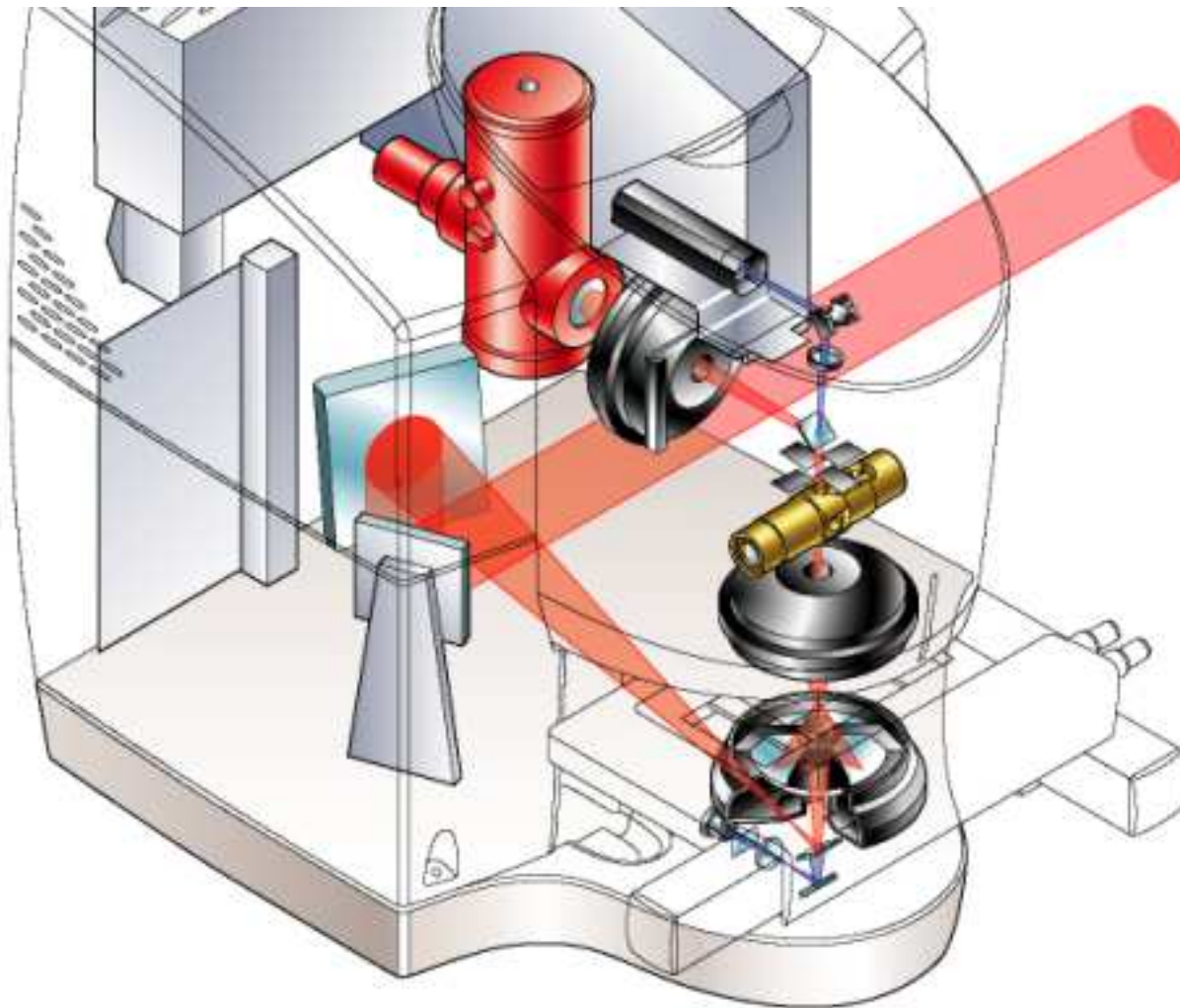
- FPA (Focal Plane Array)



videotelefon fejlesztése (AT&T): 1969!

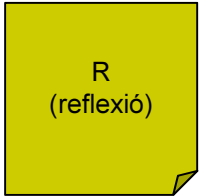


Mikro/makroszkópos képalkotás V.

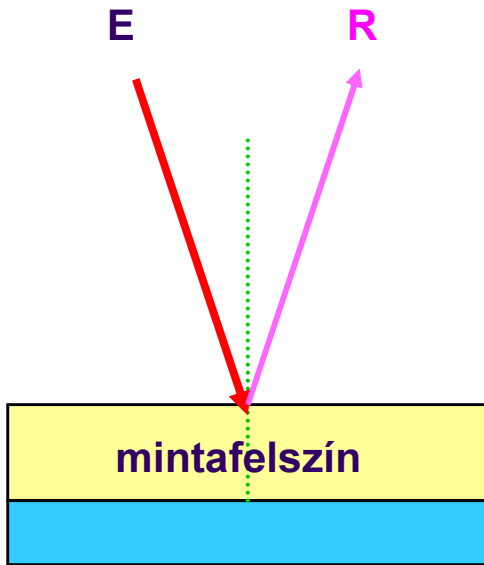


T
(transz-
misszió)

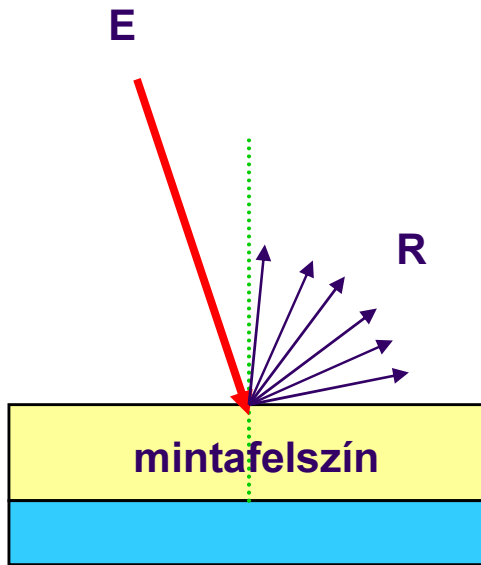
Mikro/makroszkópos képalkotás VI.



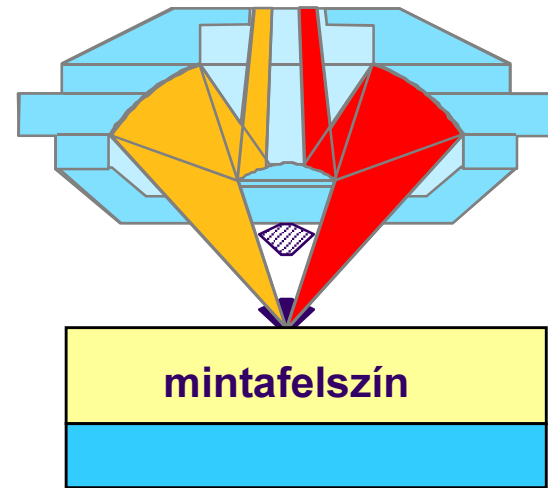
spekuláris
reflexió



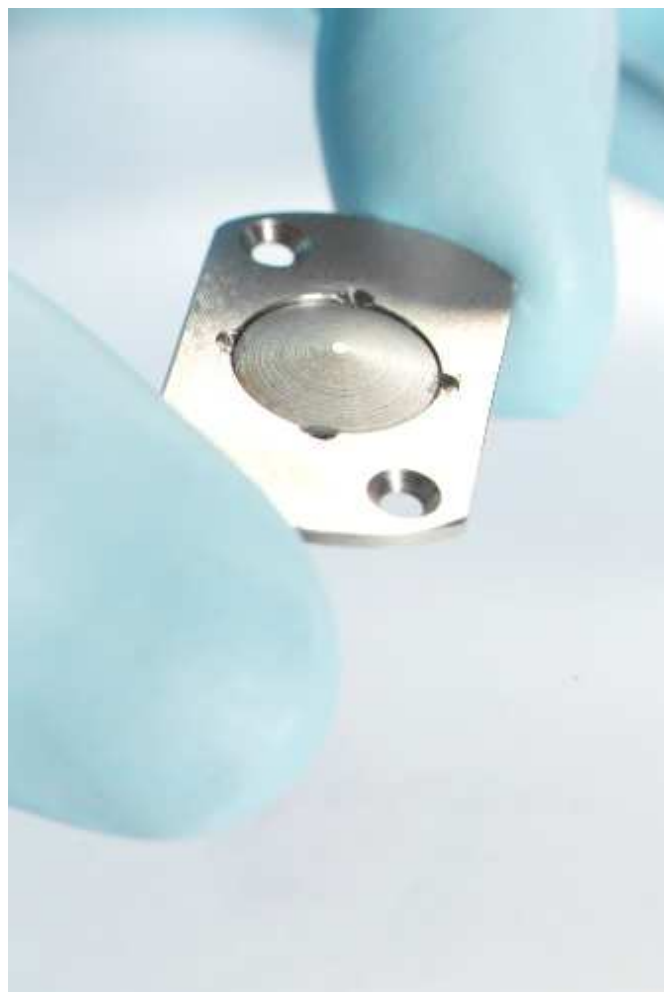
diffúz
reflexió



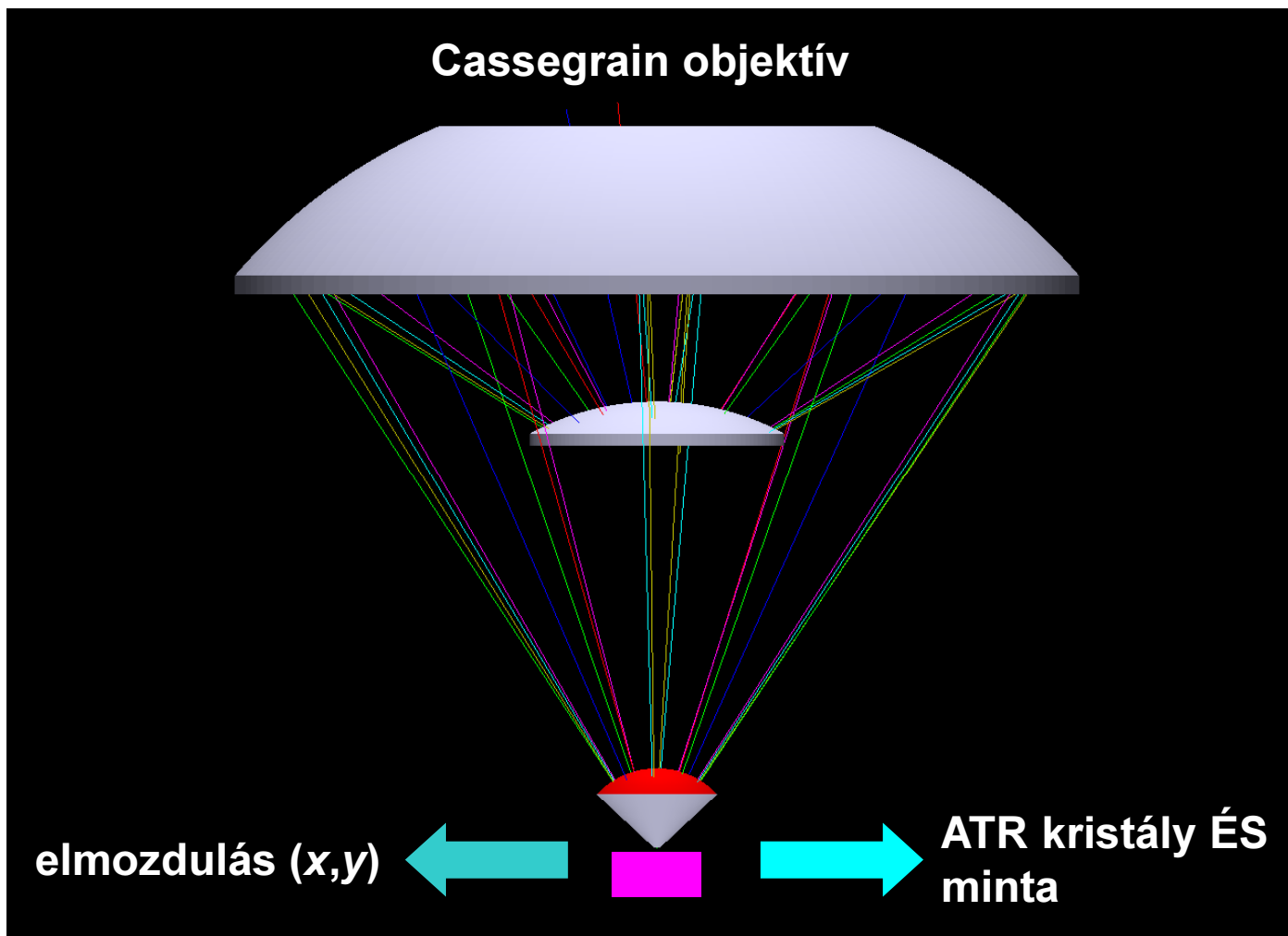
gyengített
teljes reflexió
(ATR)



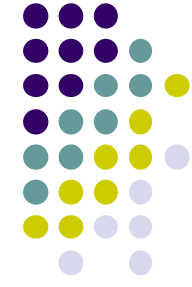
Mikro/makroszkópos képalkotás VII.



Mikro/makroszkópos képalkotás VIII.

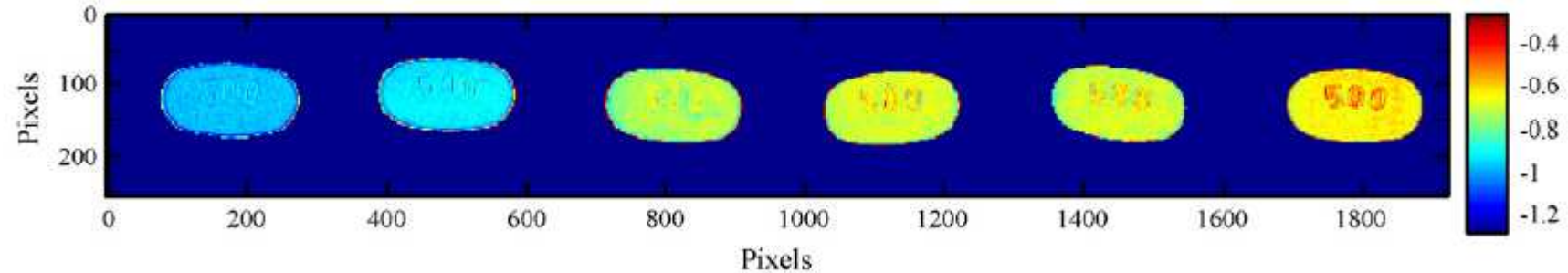


Képkötés – tablettavizsgálatok

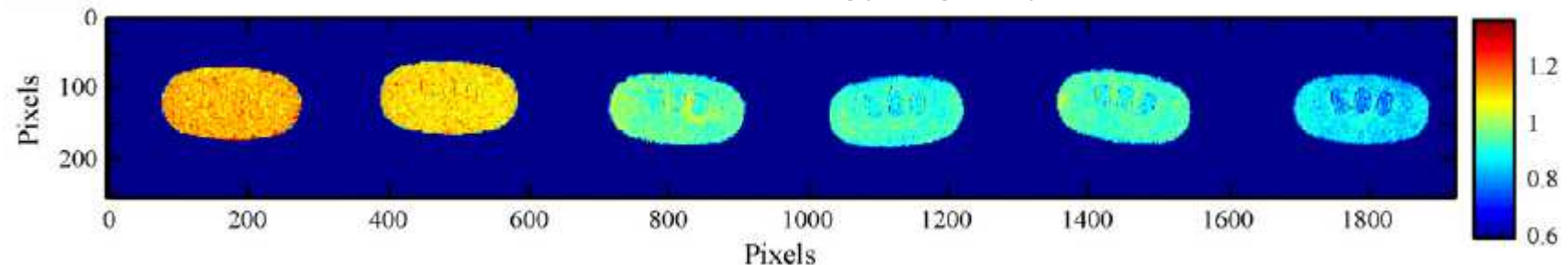


- Technológia nyomon követése I.
 - bevonás

1390nm **bevonat** (Opadry Pink): idő előrehaladtával erősödő jel 1390 nm-en

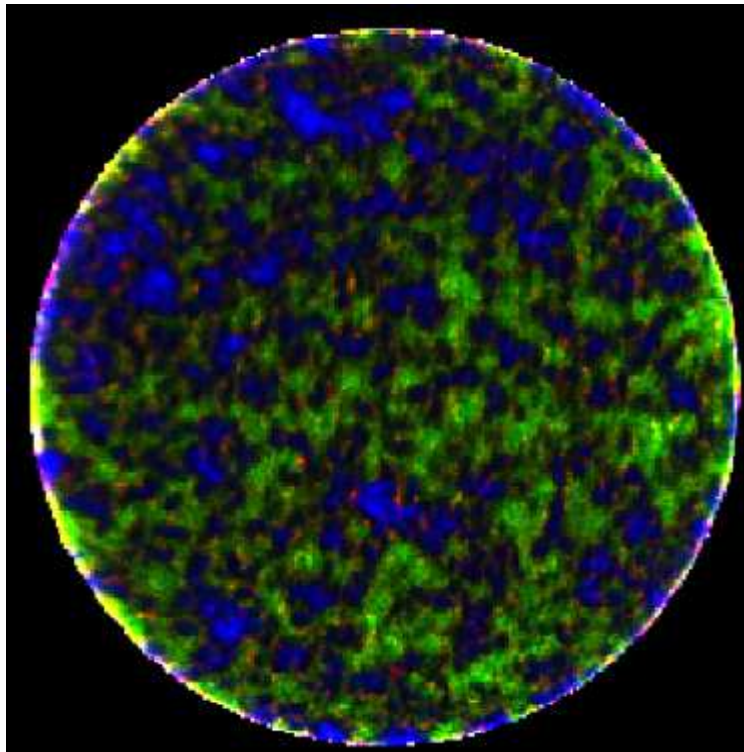


2120nm **korpusz**: idő előrehaladtával gyengülő jel 2120 nm-en



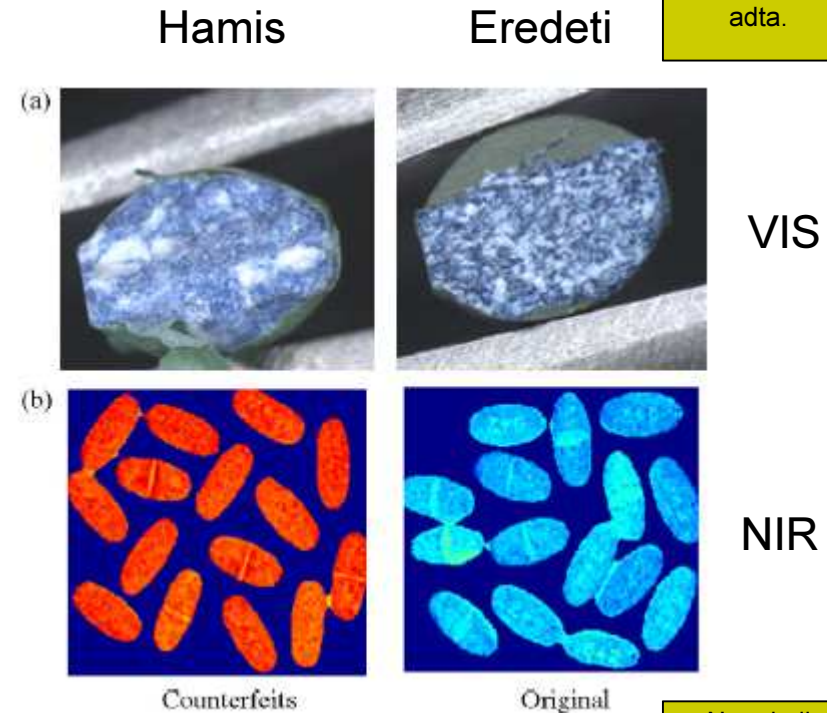
Képkötés – tablettavizsgálatok

- Technológia nyomon követése II.
 - keverés



Gendrin C. *et al.*:
Content uniformity of pharmaceutical solid dosage forms by near infrared hyperspectral imaging: A feasibility study. *Talanta* 73(4), 733–741 (2007)

- Eredetiségvizsgálat



Gendrin C. *et al.*:
Pharmaceutical applications of vibrational chemical imaging and chemometrics: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48(3), 533–553 (2008)



PI. hamis Viagraban a kék színt patkányméreg adta.

VIS

NIR

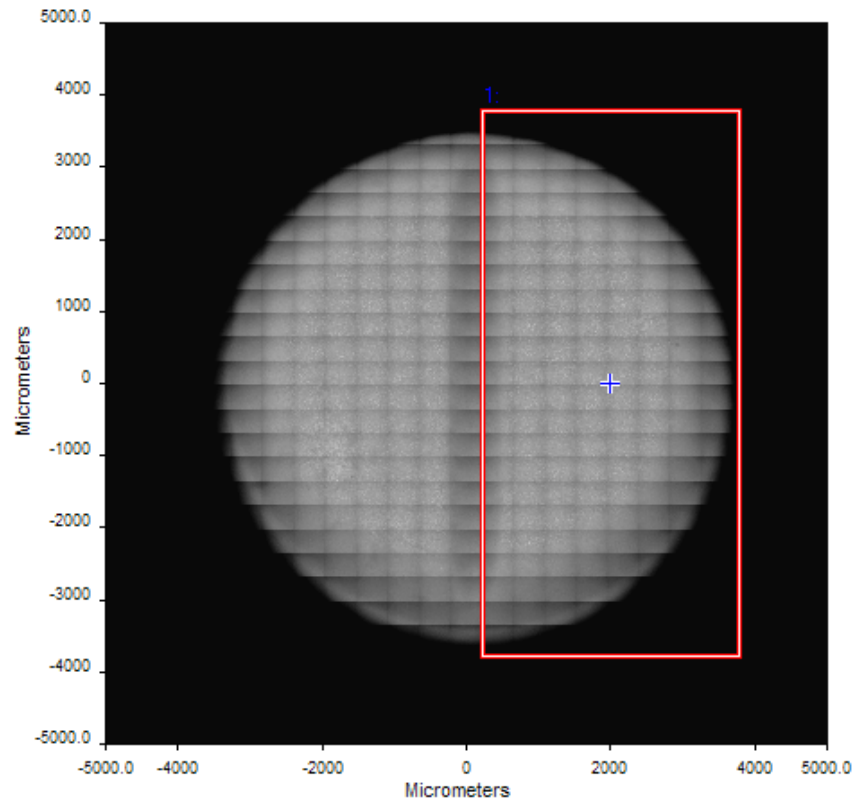
Nem kell eltörni, a „NIR” beelát. (Megmarad a bizonyíték.)

Eredetiségvizsgálat vs. imaging: makro (VIS)

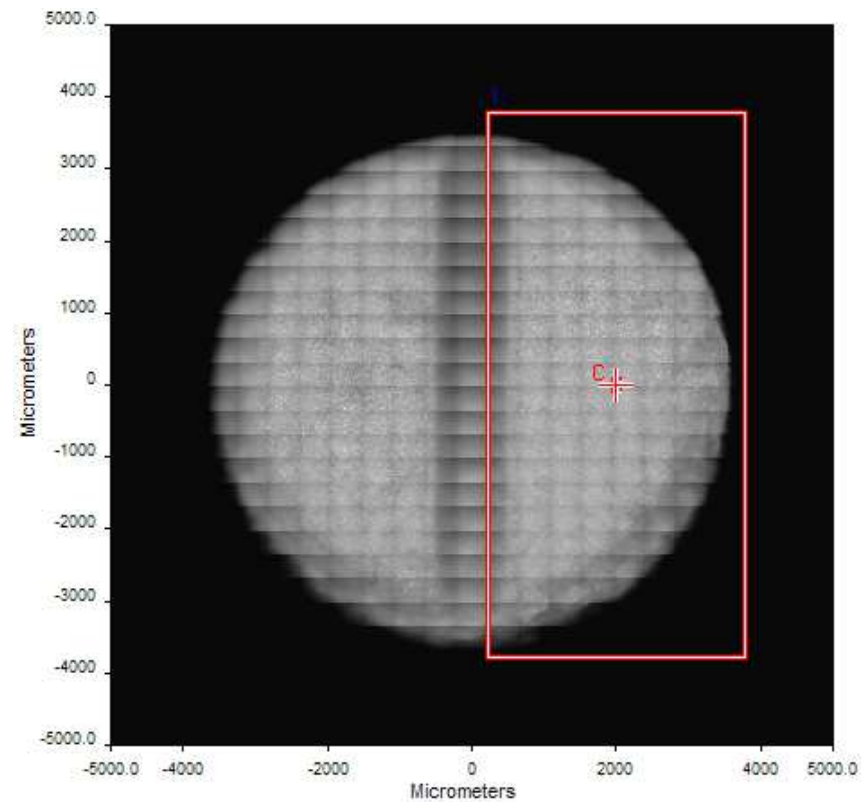
Edzőteremben
izomnövelő
helyett
„barkács
cucc”.



- Eredeti



- Hamis



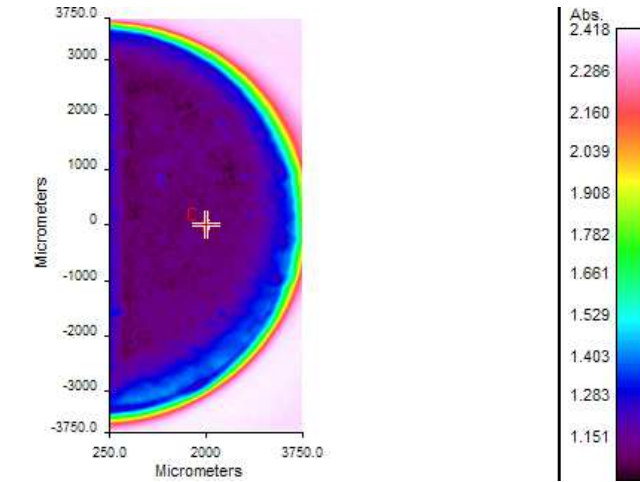
Eredetiségvizsgálat vs. imaging: makro (NIR)

Mátrixhatás.

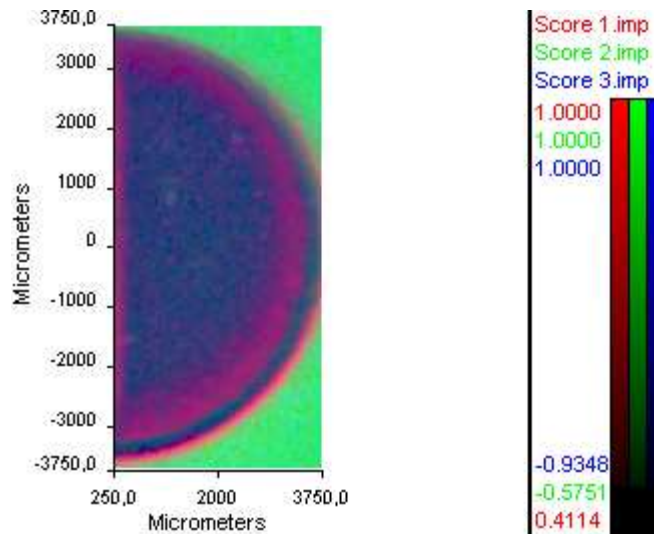


- Eredeti

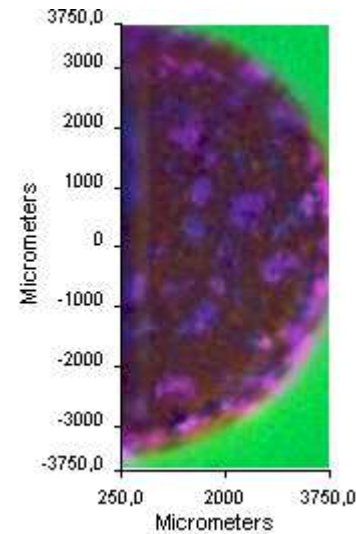
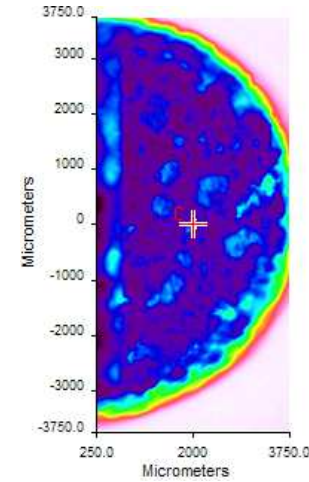
Abs.



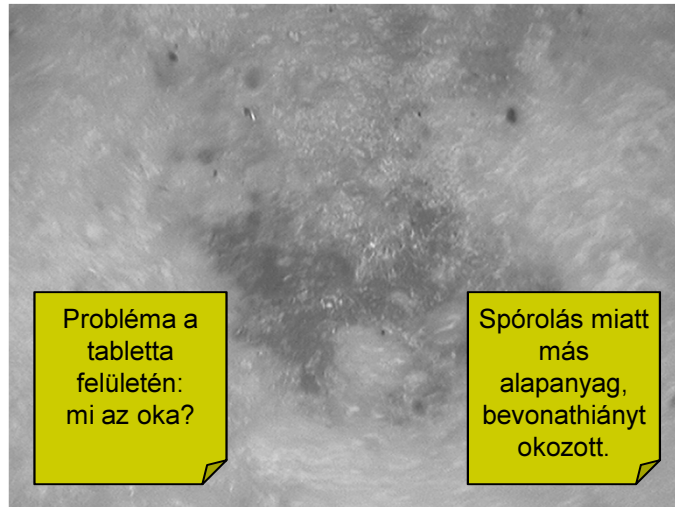
PCA



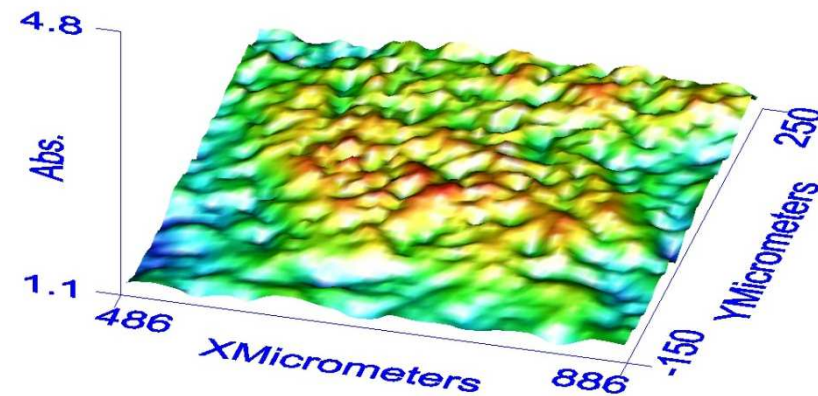
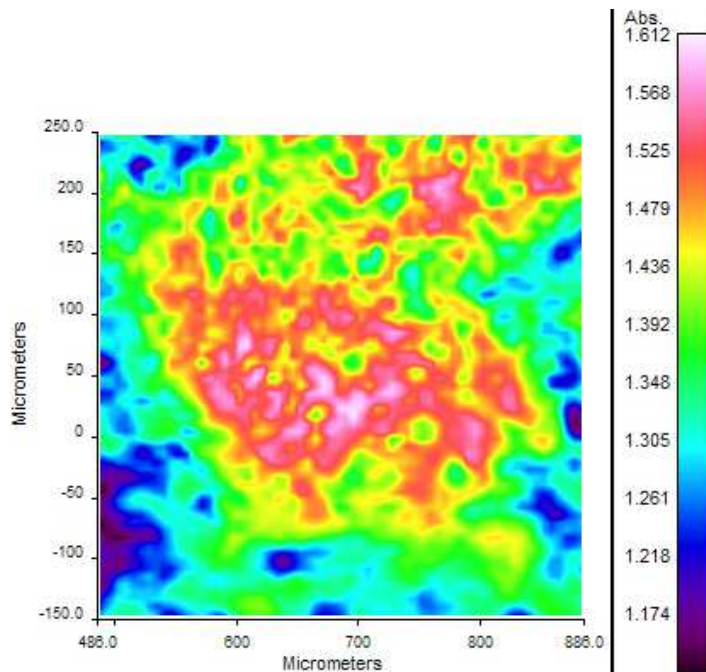
- Hamis



Technológiai probléma vs. imaging



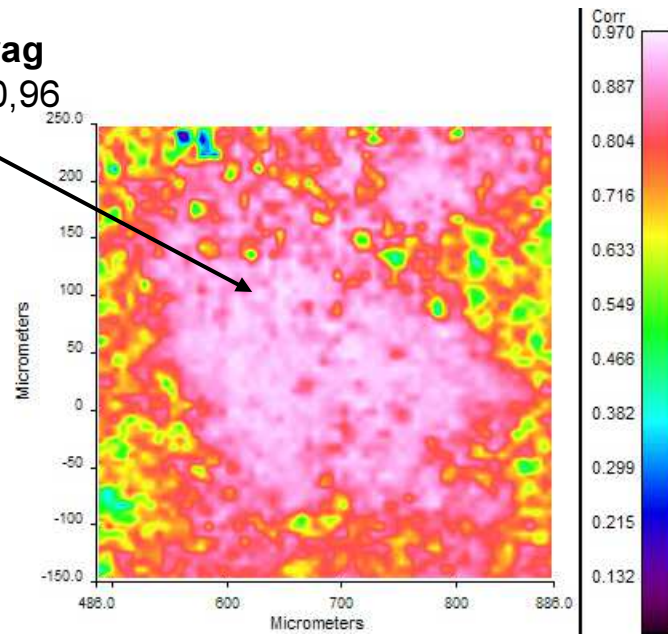
- Képképzés NIR tartományban: nincs roncsolás
- $400 \times 400 \mu\text{m}$ méretű mérési tartomány, $6,25 \times 6,25 \mu\text{m}$ méretű képpontokkal
- 64×64 pont, azaz összesen 4096 pont, pontonként 128 spektrum átlagolásával
- Átlagos abszorbancia értékek alapján színezett ábrák



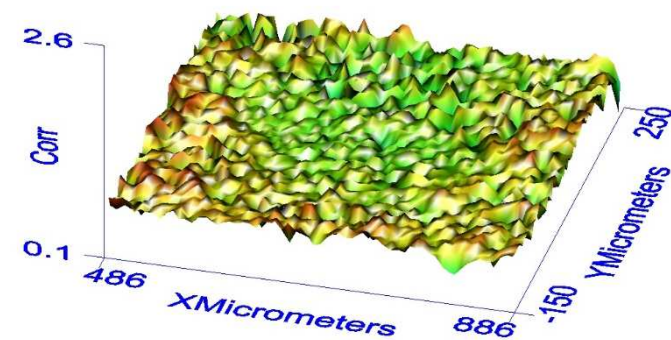
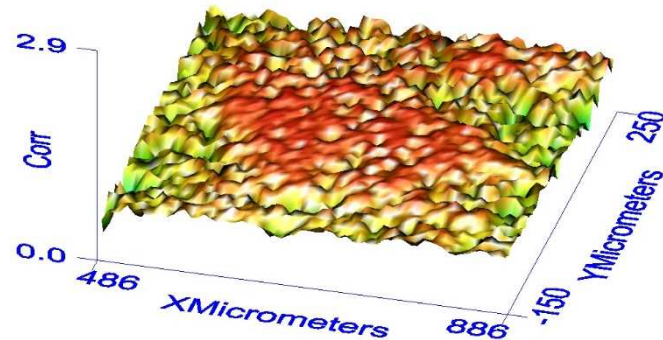
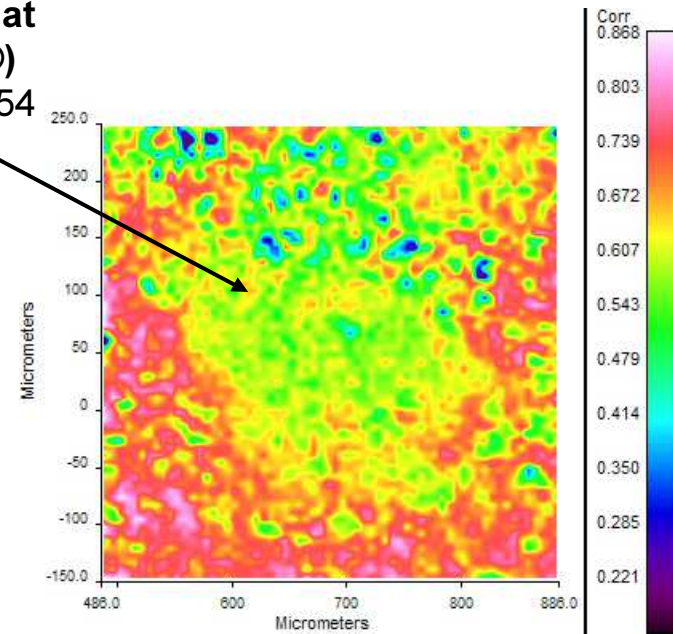
Technológiai probléma vs. imaging: korrelációs térképek (2D és 3D)



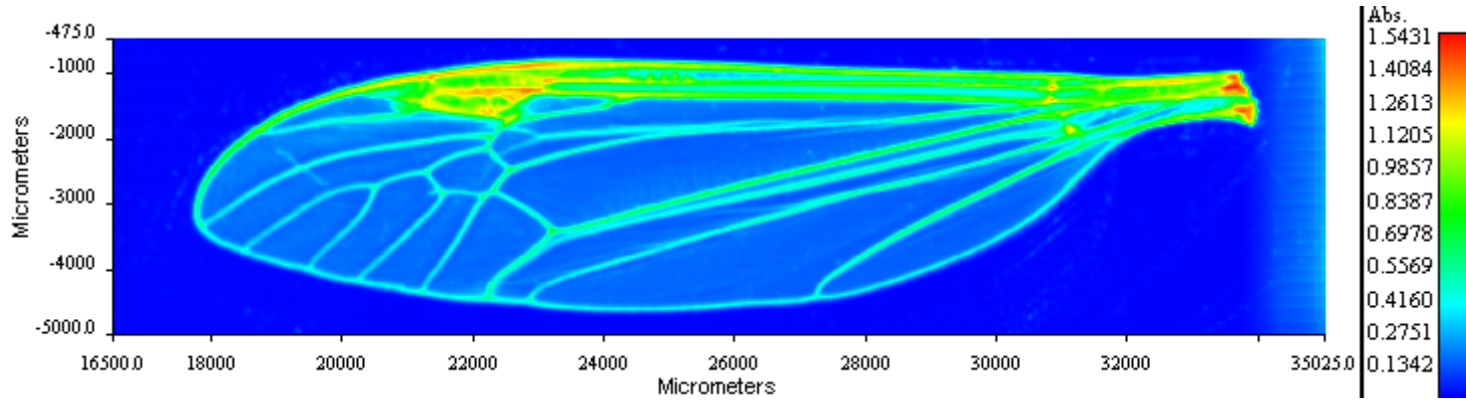
Hatóanyag
 $R^2=0,88-0,96$



Filmbevonat
(Opadry®)
 $R^2=0,41-0,54$

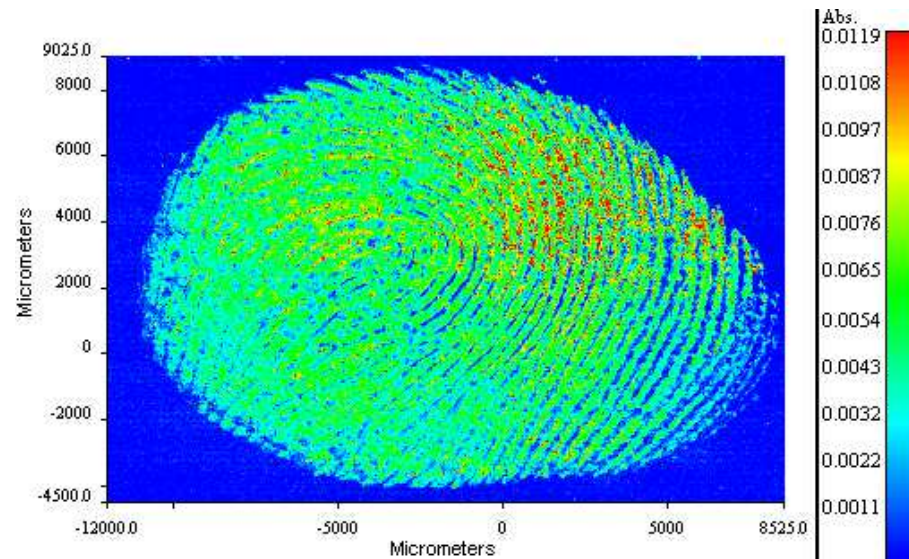


Képes képtelenségek



Szerkezet, összetétel megállapítása roncsolás nélkül.

lószyonyog szárnya: 18,5 mm × 4,5 mm = 132 000 spektrum



Anyagok azonosítása (vegyszer, lőpor) az ujjlenyomaton.

ujjlenyomat: 20 mm × 13,5 mm = 450 000 spektrum

A (N)IR módszerek, technológiák előnyei



- Roncsolásmentes (fermentáció, anyagazonosítás, homogenitás, bevonat, hamisítás, visszáru, csomagolóanyag stb.)
- Gyors (jelsorozatok (másod)perces nagyságrendben képezhetők)
- Rengeteg rejtett információ megfejthető (adatbányászat, oknyomozások)
- Gyors visszacsatolás a technológiába, minőségellenőrzésbe, minőségbiztosításba
- FDA „alternatív” módszere
- Költséghatékony, nagy áteresztőképességű
- Tudásintenzív módszerek

A nemtudás
tudása
a tudás
kezdeté...

Köszönetnyilvánítás



Párta László¹, Ballagi András¹

Kiss Violetta², Finta Zoltán²

Horgos József^{3,4}, Zelkó Romána⁴

Jekő József⁵, Csorvássy István⁵

Lakatos László⁶, Axel Rau⁷

Izsó Eszter⁸, Tieger Eszter⁸, Lőrincz Áron⁸, Kontsek Endre⁸

¹ Richter Gedeon Nyrt.

² sanofi-aventis Zrt.

³ Hungaropharma Zrt.

⁴ SE Egyetemi Gyógyszertár, Gyógyszerügyi Szervezési Intézet

⁵ Nyíregyházi Főiskola, Kémia Intézeti Tanszék / Alkaloida Vegyészeti Gyár Zrt.

⁶ PER-FORM Hungária Kft., Analitikai Divízió

⁷ PerkinElmer, Rodgau

⁸ BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

