

SPEKTROMETRIE V BLÍZKÉ INFRAČERVENÉ OBLASTI

Michaela Gráfová

Úvod

Spektrometrie v blízké infračervené oblasti (*"near-infrared spectrometry"* – NIR spectrometry) je metodou molekulové spektroskopie, která využívá spektrální oblast blízkého infračerveného záření, tj. oblast vlnových délek 800 – 2500 nm resp. vlnočtů 12500 – 4000 cm⁻¹. NIR oblast tak z jedné strany navazuje na viditelnou, z druhé pak na střední infračervenou. Hranice nejsou zcela ostré a fluktuují podle různých zdrojů informací v závislosti na tom, zda se tyto hranice vyvozují z možností spektrometrů pokrýt danou oblast, nebo z typu energetických přechodů, které se v dané oblasti pozorují.

Absorpce záření v NIR oblasti je obvykle způsobena energetickými přechody mezi vibračními hladinami molekul¹, a to přechody kombinačními² a svrchními tóny (overtony)³, nikoli přechody fundamentálními, které hrají dominantní roli ve střední infračervené oblasti (MIR). Kombinační přechody i svrchní tóny jsou významně méně pravděpodobné než přechody fundamentální, takže absorpce záření v NIR oblasti je při stejné tloušťce vzorku řádově (běžně o jeden až dva řády) slabší než v MIR oblasti, a proto se používají kyvety s delší optickou dráhou (běžně řádově v mm). Přiřazení absorpčních pásů jednotlivým kombinačním přechodům a svrchním tonům je poměrně obtížné, a proto se běžně neprovádí rozbor spekter směřující k identifikaci funkčních skupin v molekulách, jak je obvyklé při interpretaci spekter v MIR oblasti. Lze vymezit oblasti, kde jsou dominantní pásy kombinačních přechodů (cca 4000 – 5300 cm⁻¹), první overtony (cca 4600 – 7300 cm⁻¹), druhé overtony

(cca 6000 – 10000 cm⁻¹) a třetí overtony (cca 8800 – 14500 cm⁻¹). Z hlediska kvalitativní informace je možné srovnávat měřená spektra čistých látek s knihovnami spekter, a tak provádět identifikaci látek. K dispozici jsou například knihovny spekter polymerů či farmaceuticky důležitých chemikálií. Často se NIR spektra třídí a klasifikují s využitím chemometrických metod. Významnou měrou se NIR spektra využívají pro kvantitativní analýzu, a to i složitých vzorků v řadě odvětví jako je například petrochemie, farmaceutický, papírenský či potravinářský průmysl. V mnoha případech je možné stanovit více složek vedle sebe, aniž je nutné dělit složité směsi, a to přímo ve výrobním procesu.

¹ U některých látek či materiálů se v NIR oblasti uplatňují přechody mezi různými elektronovými stavy. Jedná se například o některé koordinační sloučeniny přechodných kovů či lanthanoidů. Těmito případy se v této úloze nebudeme zabývat.

² Kombinační přechody znamenají současnou excitaci několika vibračních modů (energie příslušného přechodu pak odpovídá součtu energií fundamentálních přechodů příslušných vibračních modů).

³ Svrchní tón (oveton) odpovídá excitaci daného vibračního modu do vyšší excitované hladiny. První oveton tak zhruba odpovídá dvojnásobku energie fundamentálního přechodu, druhý overton trojnásobku, třetí čtyřnásobku. Pro přesnější popis je třeba uvažovat anharmonicitu vibračních modů.

NIR spektrometrie se proto zařazuje mezi tzv. procesní analytické metody, kdy se klade důraz na rychlost samotné analýzy včetně možnosti kontinuální on-line analýzy ve výrobním procesu (na výrobní lince) nikoli na její přesnost. Takto lze například zároveň stanovit obsah tuků, bílkovin, laktózy a močoviny v mléce a mléčných výrobcích (v různých stádiích jejich zpracování), či obsah ethanolu a sacharidů v alkoholických nápojích (například během probíhajících kvasných procesů). NIR spektrometrie se v poslední době uplatňuje i při analýzách životního prostředí či v medicinální chemii. Samotné měření je poměrně rychlé⁴, často nedestruktivní a nevyžaduje obvykle žádnou speciální úpravu vzorku. Minimalizuje se tak spotřeba chemikálií, jednorázově použitelných analytických setů, a tím i generování životní prostředí zatěžujících odpadů. Lze měřit vzorky ve skleněných i některých dalších transparentních obalech. Voda v některých částech NIR oblasti významně absorbuje, přesto však lze analyzovat i relativně zředěné vodné roztoky. Mnohem pracnější a časově výrazně náročnější než samotné měření spekter je následné zpracování a vyhodnocování naměřených dat.

Techniky měření NIR spekter

NIR spektra lze měřit jako zeslabení zářivého toku po průchodu záření vzorkem (transmisní měření) nebo po odrazu záření (reflexní techniky). V rámci reflexních technik se nejčastěji uplatňuje princip difúzní reflexe⁵, kdy se dopadající záření odráží od povrchu jednotlivých malých částic práškového vzorku. Tento přístup se často používá při analýzách ve farmaceutickém průmyslu či při analýze průmyslově vyráběných práškových krmiv pro zemědělskou výrobu.

Transmisní měření se využívá především v případě kapalin, kašovitých vzorků a polymerních folií. Kapalné vzorky je možné měřit v kyvetách ze speciálního skla (INFRASIL, SUPRASIL), které vykazuje vysokou propustnost v celé NIR oblasti. Tloušťka optické vrstvy u těchto kyvet je obvykle od 1 mm do cca 10 mm a jejich volba se optimalizuje v závislosti na koncentraci analytu v roztoku a optických vlastnostech rozpouštědla.

Vedle uvedených postupů, kdy je vzorek umístěn v držáku přístroje, se často NIR spektra měří s využitím vláknové optiky s různými typy sond, které mohou být umístěny například přímo v chemickém či biotechnologickém výrobním reaktoru.

NIR spektrometr

Pro NIR spektrometrii se používají jak disperzní spektrometry, které obvykle zároveň pokrývají oblasti viditelnou, případně i ultrafialovou, tak spektrometry s Fourierovou transformací (FT), které mnohdy umožňují měřit také ve střední (MIR), případně i vzdálené (FIR) infračervené oblasti. Jak disperzní, tak FT spektrometry jsou dnes běžně jednopaprskové, takže pro získání absorpčních charakteristik samotného vzorku je třeba získat referenční spektrum (spektrum pozadí – "background"). Pro NIR spektrometrii lze využít jak zdroj záření žárovky, dnes převážně halogenové, které pokrývají viditelnou oblast stejně jako rozsáhlou část infračervené oblasti. Jako optický materiál lze v NIR oblasti využít kvalitní křemenné sklo, takže se v této oblasti hojně uplatňuje křemenná vláknová optika.

⁴K záznamu jednoho spektra většinou stačí méně než jedna minuta, někdy i jen několik sekund.

⁵ Difúzně-reflexní princip měření FTIR spekter je mnohdy označován zkratkou DRIFT.

V laboratoři jsou instalovány dva FTIR spektrometry Nicolet NEXUS (Thermo USA), které jsou nakonfigurovány tak, že pokrývají oblasti NIR a MIR. Jsou vybaveny dvěma manuálně výměnnými, automaticky rozeznávanými děliči paprsků (KBr – především pro MIR s přesahem do NIR a CaF₂ především pro NIR s přesahem do MIR), dvěma softwarově měnitelnými zdroji záření (keramickou tyčinkou Everglo pro MIR s přesahem do NIR a halogenovou žárovkou pro NIR s přesahem do MIR i viditelné oblasti) a dvěma softwarově měnitelnými detektory (DTGS pro MIR s přesahem do NIR a InGaAs pro NIR). Kromě manuální výměny děličů paprsků, kterou je třeba provést před spuštěním řídicího programu OMNIC, jsou všechna ostatní základní nastavení součástí předpřipravených "experimentů", z nichž se vhodný výchozí zvolí bezprostředně po spuštění programu podle typu používaného nástavce v kyvetovém prostoru. Nastavení lze pak přizpůsobit konkrétnímu řešenému problému v nabídce "*Collect – Experiment Setup…*", kde lze pomocí diagnostických nástrojů zkontrolovat nastavení a funkčnost jednotlivých součástí přístroje.

Kvantitativní analýza

Jak již bylo uvedeno, NIR spektrometrie se výrazně uplatňuje v kvantitativní analýze. V rámci transmisních měření se obecně ve spektroskopii vychází z platnosti Lambertova-Beerova zákona, kdy pro každou jednotlivou složku i směsného vzorku platí následující vztah:

$$A_{\lambda,i} = \mathcal{E}_{\lambda,i} \cdot b \cdot c_i \tag{1},$$

kde $A_{\lambda,i}$ je příspěvek i-té složky k celkové absorbanci A_{λ} při dané vlnové délce λ , $\varepsilon_{\lambda,i}$ je molární absorpční koeficient i-té složky při dané vlnové délce λ , b je optická tloušťka absorbujícího prostředí, c_i je koncentrace i-té složky ve směsi. Celková absorbance A_{λ} při dané vlnové délce λ je pak součtem příspěvků od všech m nezávislých složek zkoumaného systému:

$$A_{\lambda} = \sum_{i=1}^{m} A_{\lambda,i}$$
(2).

Vzhledem k tomu, že pásy v NIR oblasti jsou obvykle široké i pro čisté látky, a dále nelze vyloučit překryvy pásů různých složek a vzájemné vlivy měnících se koncentrací jednotlivých složek na tvar příslušných absorpčních pásů, není v této metodě jednoduchý princip Lambertova-Beerova zákona obvykle splněn. Pro kalibraci je v NIR spektrometrii třeba vyvíjet kalibrační modely s využitím pokročilých chemometrických algoritmů, které však obvykle vyžadují rozsáhlou sadu standardů (běžně více jak 30 kalibračních vzorků). Taková sada musí dostatečně reprezentativní, musí pokrýt celou očekávanou či odhadnutelnou variabilitu charakteristik vzorků, které pak mají být kvantitativně analyzovány, a to nejen z pohledu obsahu sledovaných analytů, ale i z pohledu dalších proměnlivostí (ať již fyzikálních či chemických). Příprava takové sady kalibračních vzorků vyžaduje pečlivé plánování experimentu. Jako základní algoritmus pro tvorbu kalibračního modelu se dříve využívala vícenásobná lineární regrese (MLR – "multiple linear regression"), dnes se v rámci rozvoje chemometrického softwaru nejvíce uplatňují dvě regresní metody, a to regrese hlavních komponent (PCR - "principal component regression") a metoda částečných nejmenších čtverců (PLS – "partial least squares"). Při použití těchto regresních metod se v rámci kalibračního modelu využívají nikoli hodnoty absorbance v maximech vybraných pásů, ale většinou se vyhodnocují širší spektrální úseky či dokonce celá NIR spektra. Cílem je tak nalézt vztah mezi vícedimenzionální spektrální informací (reprezentovanou maticí hodnot absorbancí ve vybraných spektrálních úsecích pro sadu kalibračních vzorků) a složením vzorků (reprezentovaným maticí hodnot koncentrací skupiny sledovaných analytů v sadě kalibračních vzorků). V některých případech, kdy jsou absorpční pásy velmi široké, se pro kalibrační modely spektra předem upravují, např. výpočtem derivačních záznamů (především 1. a 2. derivace původního spekter). Podmínky měření všech spekter i způsoby jejich úprav a zpracování musí být zachovány od kalibračních, přes validační až po neznámé zkoumané vzorky.

Vývoj robustních kalibračních modelů a jejich řádná validace jsou klíčovými a poměrně náročnými kroky kvantitativní analýzy pomocí NIR spektrometrie. Je třeba počítat s nutností přípravy nejen již zmiňovaných velmi rozsáhlých souborů kalibračních vzorků, ale i sad vhodně zvolených validačních vzorků (který je mnohdy i dodatečně doplňován), testováním různých postupů předběžného zpracování spektrálních dat, hledáním vhodné regresní metody a optimalizací jejích parametrů a nezbytnými ověřovacími kroky, kdy je třeba testovat i odlehlé výsledky. Použití validačních měření je nutné pro vyhodnocení výkonnostních charakteristik kalibračního modelu. Plnohodnotná validace spočívá v analýze nezávislého souboru vzorků o známém složení s využitím vyvinutého kalibračního modelu. K předběžnému ověření kalibračního modelu lze využít i různých postupů křížové validace (*"cross-validation"*) včetně uplatnění principu postupného vylučování jednotlivých měření a jejich predikce na základě modelů konstruovaných pomocí ostatních měření (*"leave-one-out"*).

Metody PLS a PCR umožňují popsat strukturu souboru vícerozměrných dat transformací původní spektrální informace do nových proměnných – hlavních komponent, které jsou lineárními kombinacemi původních vlnočtů a jsou vzájemně nekorelované. Obě metody pracují s celým spektrem nebo pouze s jeho částmi. Výsledkem regresních metod jsou lineární regrese mezi vloženými daty koncentračních a spektrálních sad), střední kvadratická chyba kalibrace (RMSEC - "Root Mean Square Error of Calibration") a korelační koeficient R (vypovídající o kvalitě regresní závislosti mezi koncentračními hodnotami a hodnotami predikovanými pomocí kalibračního modelu). Obě techniky jsou podobné. Nicméně, kalibrace metody PCR může trvat déle, vzhledem k náročnosti celého výpočtu. Zatímco metoda PLS vytváří nový systém latentních proměnných pro vstupní data všech složek a regresní model pro všechny složky, metoda PCR po vytvoření nového systému hlavních komponent vytváří více regresních modelů pro jednotlivé složky. Důležitým diagnostickým nástrojem pro vývoj kalibračního modelu a určení optimálního počtu latentních proměnných, které popisují variabilitu zdrojové matice, je závislost (PRESS - "predicted residual sum of squares"- sumy čtverců rozdílů mezi predikovanými a reálnými N hodnotami analytů), na počtu hlavních komponent použitých ke kalibraci. Optimální počet hlavních komponent je volen v minimu funkce PRESS.

Úkoly

- Proměřte vzorek destilované vody, zásobního roztoku sacharosy a roztoku ethanolu 40% (V/V) v kyvetách s tloušťkou 1, 2 a 5 mm.
- 2. Určete v naměřených spektrech absorpční pásy overtonů a kombinačních přechodů. Ačkoliv NIR spketrometrie není primárně využívána k identifikaci látek, pokuste se zamyslet nad přiřazením absorpčních pásů vibračních přechodů v oblasti výskytu overtonů odpovídajícím funkčním skupinám látek v jednoduchých systémech voda, voda-ethanol -kde identifikace ještě možná je.
- 3. Ověřte na spektrálním záznamu závislost absorbance na tloušťce vrstvy absorpčního prostředí a zvolte kyvetu dané tloušťky, která bude vhodná pro proměření kalibrační sady roztoků a neznámých vzorků.
- 4. Navrhněte a připravte sadu kalibračních roztoků ze zásobního roztoku sacharosy a ethanolu tak, aby umožnila z kalibračního modelu stanovení obsahu sacharosy a ethanolu ve vodném prostředí při zastoupení jak jedné tak obou složek zároveň. Maximální koncentrace sacharosy by měla být přibližně 150 g/l a ethanolu 40% (V/V).
- 5. Proměřte sadu kalibračních roztoků ve zvolené kyvetě, a to s dvakrát opakovaným plněním kyvety každým roztokem.
- 6. Vyviňte kalibrační model pro stanovení sacharosy a ethanolu ve vodných roztocích a testujte vliv výběru spektrální oblasti, typ regresní metody a počtu faktorů u PLS (popř. hlavních komponent u PCR) na kvalitu kalibračního modelu. Polovinu naměřených spekter použijte pro účely kalibrace, druhou polovinu pro validaci.
- 7. Vyvinutý model využijte pro kvantitativní analýzu spekter změřených zadaných neznámých vzorků.

Měření NIR spekter

NIR spektra budete měřit v prostředí softwaru OMNIC, firmy Thermo Fisher Scientific Inc., se kterým jste se seznámili v úloze "Infračervená spektrometrie" v rámci "Laboratoří z analytické chemie I". Základní přípravu přístroje a počítače k měření přenecháte vyučujícímu, který Vás seznámí s obsluhou spektrometru a softwaru. Jedná se především o kontrolu zařazení správného děliče paprsku v interferometru, výběr vhodných experimentálních parametrů měření v nabídce "Experiment Setup". FTIR spektrometr Nicolet NEXUS je jednopaprskový přístroj, takže před měřením vzorků je třeba zaznamenat referenční spektrum "pozadí" pomocí příkazu "Collect Background" v "Collect" menu. Po vložení kyvety se vzorkem do držáku v kyvetovém prostoru lze zaznamenat spektrum vzorku příkazem "Collect Sample" (Obr. 1) ve výše zmíněném menu. Naměřené spektrum je důležité okamžitě uložit pomocí příkazu "Save" v menu "File", tak aby se minimalizovalo riziko ztráty dat. Je žádoucí, aby "Spectrum Title", který vyplníte před zahájením záznamu příslušného spektra, byl použit jako název souboru "Filename". Nastavení stejného označení vzorku lze provést pomocí tlačítka při ukládání "Set Filename to Title". Jednotlivé popisy ("Spectrum Title") musí umožnit jednoduše identifikovat měřený vzorek, opakování měření a osobu (např. GB 120116 eth40 a.spa znamenající iniciály operátora datum operátora

měření_označení vzorku_označení opakování.formát souboru). Jednoznačná identifikace spekter je klíčová při vývoji kalibračního modelu, pro jejich zařazení do kalibrační či validační skupiny, a pro přiřazení známých kvantitativních charakteristik. Veškerá měřená data ukládejte do jednoho vyučujícím určeného adresáře.

Pomocné informace a tipy pro měření:

- Pro rychlé přikazování úkonů a obsluhu přístroje je dobré užívat klávesových zkratek, které jsou vypsány při rozbalení jednotlivých menu v základním oknu programu OMNIC.
- Pro uložení spektrálních dat používejte vhodné typy formátu souboru, např. *.spa, *.spc, *.jdx . Pro uložení obrázkového souboru disponuje program OMNIC formátem TIFF.
- 3. Při změně měřícího roztoku vzorku v kyvetě proplachujte kyvetu i špičku pipety roztokem, který budete měřit v následujícím kroku.
- 4. Odměrné baňky a další laboratorní sklo pro přípravu kalibrační sady roztoků by mělo být na počátku přípravy suché.
- 5. Pomozte si vysátím roztoku z úzkých kyvet buničinou.



Obr. 1: Spektrum ethanolu 40% (V/V) ve vodném prostředí v oblasti NIR.

Vývoj kalibračního modelu

Jak již bylo popsáno výše, klíčovým krokem kvantitativní analýzy pomocí NIR spektrometrie je vývoj a optimalizace kalibračního modelu. Vývoj kalibračního modelu budete provádět v programu TQ Analyst, též firmy Thermo Fisher Scientific Inc. Není tedy nutná žádná formátová konverze uložených spektrálních dat. Obsluha programu TQ Analyst je uživatelsky přívětivá, kromě běžné nabídky *"Help"* naleznete nápovědy v základní tlačítkové liště pod tlačítkem *"Explain"*, které otevírá kontextové nápovědy podle zvolené záložky, kterou právě zpracováváte. Během vývoje kalibračního modelu jej po zpracování každé záložky ukládejte, tak abyste neztratili jednou zaznamenané údaje. Při modifikaci parametrů modelu jej ukládejte pod jiným jménem (s rostoucím pořadovým číslem). V každém okamžiku je ze základní lišty patrné, zda se jedná o "nekalibrovanou metodu" (*"Uncalibrated"*) či o metodu, kde byl proveden kalibrační výpočet (*"Calibrated"*). Na základní obrazovce lze sledovat datum a čas posledního uložení modelu a pořadové číslo revize. To umožňuje lépe sledovat postupný vývoj kalibračního modelu a pořadové číslo

Při spuštění TQ Analyst na vstupní obrazovce v záložce popis (*"Description"*) (Obr. 2) vyplníte název metody, typ regresní metody a vaše jméno, poté přepnete na záložku délka dráhy (*"Pathlength"*) (Obr. 3), kde se vybere typ tloušťky absorpčního prostředí.

cription Pathlength uggest How To	10.577	Periormanc	e Index: N/A	Previous: N/A	Unc	alibrate		
uggest How To	Components	Standards	Spectra	Regions	Corrections	Other	Report	
								Revision: U Last saved: Wed.Jan 1317:13:13:2016 (GMT+01:00)
Method Title								
Stanoveni sacharosy	a ethanolu NIR							
Analysis Type								
Quantitative analysis								
C Simple Beer's law								
🜔 Classical least squ	ares (CLS)							
C Stepwise multiple I	inear regression (SMLP	0						
 Partial least square 	es (PLS)							
C Undersided	nt regression (PCR)							
C Cambina multiple s	an the selection of the							
Classification	netrious							
C Similarit/match								
C Distance match								
C Discriminant analy	sis							
C Search standards								
O QC Compare sean	sh							
Measurement								
C Measurement only								
Developer's Name								
Michaela Grafova								

Obr. 2: Volba typu chemometrické metody v programu TQ Analyst.



Obr. 3: Typ tloušťky absorpčního prostředí lze zvolit v záložce délka dráhy ("Pathlength").

Poté přepněte na záložku "*Components*" (Obr. 4), kde je třeba vyplnit tabulku "*Components Table*", kde uvedete název stanovované složky, její zkratku, jednotky veličiny použité pro kvantitativní analýzu, dolní a horní limit analýzy, limit akceptované nejistoty a způsob prezentace výsledku výpočtu. V této tabulce je obecně třeba specifikovat všechny stanovované analyty, protože způsob vyplnění této tabulky ovlivňuje způsob zobrazení dalších záložek. To znamená, že v jednom řádku budete mít uvedenou sacharosu, v druhém ethanol.



Obr. 4: Tabulka *"Components Table"* bude obsahovat všechny složky, pro které budete chtít stanovit koncentraci pomocí zvolené regresní metody.

Dále je třeba vyplnit údaje pod záložkou *"Standards"* (Obr. 5). Po umístění kurzoru do prázdného řádku tabulky lze pomocí tlačítka *"Open Standard…"* vybrat a otevřít spektra změřených vzorků, která budete používat pro kalibraci i validaci. Poté v tabulce vyplníte

způsob použití příslušného spektra a budete specifikovat údaje o složení příslušného kalibračního/validačního vzorku. Polovinu naměřených spekter použijte pro kalibraci, polovinu pro validaci (nad tabulkou standardů máte udán počet a způsob použitých spekter).

Eile Edit V	view Diagn	ostics <u>W</u> indow Help)							
alibrate	Quantify	Explain Close	Performan	ice Ind	dex: N/A Prev	vious: 97,7	Unc	alibrate		
cription	Pathlength	Components	Standards	T	Spectra	Regions	Corrections	Other	Report	
uggest	Evaluate	Open Standard	View Stand	lards	Sort Standa	rds Ignore N	lissing Data			
Standards			1							
🔽 Show sp	pectrum titles									
Show sp	pectrum file na	mes								
Automa	atically convert	spectrum to Wavenumbe	ers							
Automat	itically convert	spectrum to Absorbance		Hondo	rda Casatra					
Hestrict	t Y-axis range i	n standard spectra	3	tanua Ye	rus spectra	Nevonumbore (c	m-1)			
0.000	Start	1.000 End		Ya	xis unit	Absorbance	(i) i)			
Missing Dat	ta			Spect	ral range	3999,640 - 12400,	.041		-	
-100,000	Indicator valu	18		Data	spacing	3,8569		→	Vyborto použití	spoktra (Izo rovněž
									vyberte pouziti	spektra (ize rovilez
Standards T	Table: 18 Ca	libration, 18 Validatio	n		/				zvolit nabídku i	gnorovat v případě
Index	Select	Spectrum Title	anesil		salarosa	ethanol			200 millionalia i	Blieferaterplipade
macx	ocidet	opecium rue	ouge	/		Candillor			pozdějšího zjište	éní, že spektrum
1	66'+	eth_40_a	Calibration	-	0,0000	40,00				
2	60'	eth_4U_b	Validation	^	150 7000	40,00			nevystihuje kali	brační model).
4	00.+	sach h	Correction		150,7030	0.00				
5	66+	voda a	Cross-corre	c	0.0000	0.00	\mathbf{i}			
6	66	voush	Target Validation	¥	0,0000	0,00				
7	66	kal1_a	Calibration	-	135,6388	4,00			Dopinte dané ko	oncentrace složek.
8	66	kal1_b	Validation	•	135,6388	4,00				
9	66	kal2_a	Calibration	-	120,5678	8,00				
10	66	kal2_b	Validation	$\mathbf{\Sigma}$	120,5678	8,00			r	
11	66	kal3_a	Calibration	•	105,4969	12,00			Domocí tlačítka	brúlí Izo cpoktro
12	66	kal3_b	Validation	•	105,4969	12,00				bi yii ize spekti d
13	66	kal4_a	Calibration	•	90,4259	16,00			označit křížkom	a problédnout
14	60	Kal4_b	Validation	•	90,4259	16,00				
15	60	kalu_d	Validation	-	75,3549	20,00			pomocí stisknut	í "View Standards"
17	6.0	kal6 a	Calibration	-	60,0049	24.00				,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,
18	60	kal6 b	Validation	-	60,2839	24.00			nebo zobrazit v	/braná spektra v okn
19	66	kal7_a	Calibration	-	45,2129	28,00				· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
20	66	kal7_b	Validation	-	45,2129	28,00			"Region Selectio	on" v následujícím
21	66	kal8_a	Calibration	-	30,1420	32,00			lunalis	
22	66	kal8_b	Validation	•	30,1420	32,00			Kroku.	
		and the second se								

Obr. 5: Při vyplňování tabulky standardů buďte obezřetní případných překlepů.

Další záložka "*Regions*" se týká výběru spektrální oblasti, která bude použita při výpočtu kalibračního modelu. Pro první "nástřel" můžete využít pomoc průvodce "*TQ Expert*", kterého spustíte tlačítkem "*Suggest…*". Nechte prozkoumat celý rozsah zaznamenaných NIR spekter a po dokončení průvodce se objeví navržená oblast (navržené oblasti) v tabulce "*Regions Table*". Stisknutím tlačítka "*Edit Regions…*" lze otevřít okno "*Region Selection*" (Obr. 6), kde lze interaktivně provést úpravu zvoleného rozsahu, prohlédnout spočítaná statistická spektra a modely spekter čistých složek "*Pure Component Spectra*"(Obr. 7) (lze i z menu "Diagnostics"). Případné změny se ukládají tlačítkem "*Save*". Po návratu do záložky "*Regions*" si zkontrolujte tabulku "*Components in Regions Table*", zda máte křížkem označeny správně regiony pro dané složky, pro které bude sestaven kalibrační model.



Obr. 6: Okno pro výběr oblasti ("Region Selection").



Obr. 7: V okně "Pure Component Spectra" můžete zobrazit jednotlivá vypočtená spektra čistých složek.

Výše uvedeným zadáním stanovované složky, výběrem standardů a specifikací jejich složení a volbou analyzované spektrální oblasti jsou shromážděna veškerá data nutná pro provedení kalibračního výpočtu, který se spustí stisknutím tlačítka "*Calibrate"*. Po úspěšném provedení výpočtu se zobrazí okno "*Calibration Results"* (Obr. 8), kde se graficky i tabulkově zobrazí výsledky kalibrace, spočívající v porovnání spočítaných hodnot se zadanými pod záložkou "*Standards"*, a to jak pro kalibrační, tak validační spektra. Pokud se pro jednotlivé spektrum dramaticky liší spočtený výsledek od původně zadané hodnoty, je třeba zvažovat vyloučení příslušného měření z kalibrační sady (ignorovat). Důležitým kritériem je dále i hodnota výkonnostní charakteristiky "*Performance Index"*, která může nabývat hodnot od minimálních (záporných) –100 (záporná korelace ve vstupních datech) až po maximálních +100 (pozitivní korelace). Čím blíže je hodnota RMSE (*"Root Mean Square Error")* k nule, tím menší jsou rozdíly mezi vypočítanými hodnotami koncentrací a skutečnými hodnotami. Změny hodnoty výkonnostního indexu lze sledovat v závislosti na editaci použité spektrální oblasti, případně způsobu jejího zpracování.

Pro vývoj a optimalizaci kalibračního modelu slouží nástroje přístupné v menu "Diagnostics".



Obr. 8: Okno "Calibration Results" s výsledky kalibrace.

Při vývoji kalibračního modelu pomocí regresních metod PLS a PCR je třeba věnovat pozornost především diagnostickému nástroji, označovanému zkratkou PRESS v menu *"Diagnostics"*. Samotná hodnota *"sumy čtverců odchylek" se vynáší graficky proti hodnotě počtu použitých hlavních komponent (PC - <i>"principal component"*) v případě PCR, resp. proti hodnotě počtu PLS faktorů u PLS regrese. Testovat a zoptimalizovat je třeba počet použitých

PC/faktorů. Optimální počet PC/faktorů odpovídá oblasti okolo minima na zmíněné PRESS křivce (Obr. 9). V rámci této oblasti je však vhodné volit raději nižší počet PC/faktorů, protože příliš vysoký počet použitých PC/faktorů snižuje kvalitu predikce pro jiná než kalibrační měření. Kalibrační model pak totiž zahrnuje stále větší podíl šumové složky analyzovaných kalibračních dat; popisuje tak stále "dokonaleji" kalibrační data včetně všech chyb a nahodilých jevů v nich obsažených. Nevhodný je pochopitelně i model s malým počtem PC/faktorů, kdy dostatečně nevyužíváme veškeré relevantní informace. Počet použitelných PC/faktorů je ovlivněn i počtem kalibračních měření. Čím větší je počet kalibračních vzorků i spekter, tím vyšší počet PC/faktorů můžeme principiálně využít. V uvedené laboratorní úloze je tak možnost použití většího počtu PC/faktorů limitována právě omezeným počtem připravených vzorků. Vedle již uvedených diagnostických nástrojů jsou k dispozici, jak v programu TQ Analyst, tak v jiných chemometrických softwarech další procedury, umožňující například testovat a vylučovat odlehlá data ("Spectrum Outlier") (Obr. 10), zobrazovat spektrální průběhy zátěží pro jednotlivé PC apod. Účinné uplatnění těchto nástrojů je však možné po hlubším seznámení s multivariačními chemometrickými metodami a není tudíž proveditelné v rámci této laboratorní úlohy.



Obr. 9: Okno křivky PRESS, zobrazující hodnoty RMSECV (*Root Mean Square Error of Cross-Validation*) v závislosti na počtu použitých faktorů.

Z obrázku okna věnovaného diagnostice PRESS je možné posoudit, zda průběh PRESS odpovídá teoretickým předpokladům, jaké počty faktorů je třeba testovat (v případě uvedeném na obrázku zřejmě sedm až deset) a jaký počet faktorů je softwarem doporučován (v tomto případě 7). V našem případě, pokud bude použito 9 faktorů, zlepší se výkonnostní index metody na 98,1.

🔞 TQ Anal	yst - [Spectrum	Outlier]													-		×
Calibrate	it <u>V</u> iew <u>D</u> iag	nostics <u>W</u> in Explain	dow <u>H</u> elp Close	Performanc	e Index: 98.1	Previous: 97.9		Calibrated								-	6 ×
				1													
5,1																	
															02	-	
4															0.0		
e													-	_ 1			
anc											-	_					
list									-								
1																	
0,0																	
1	1 1 G						Rank	1 1		1			•			-	36
The last 2	standards failed t	the Chauvenet	test														
Index	Spect	rum Title		-tank	Jistance -												
3	sach a			35	1,876												
14	kal4_b			34	1,526												
6	voda_b			33	1,518												
1	eth_40_a			32	1,291												
2	eth_40_b			31	1,263												
35	kal15_a			30	1,108												
36	kall5_b			29	1,093												
25	kall a			20	1,076												
4	sach h			26	0.989												
31	kal13_a			25	0,986												
21	kal8_a			24	0,977												
10	kal2_b			23	0,957												
30	kal12_b			22	0,946												
24	kal9_b			21	0,885												
23	kal9_a			20	0,872												
29	kal12_a			19	0,855												
26	kal10_b			18	0,824												
16	Kal5_b			17	0,797 👻												

Obr. 10: Okno "Spectrum Outlier" pro testování odlehlých dat.

Pomocné informace a tipy pro práci s TQ Analyst:

- 1. K zobrazení spekter v různém měřítku vůči sobě lze využít několik způsobu zobrazování z menu "View" a to "Full Scale", "Common Scale", "Match Scale", "Offset Scale".
- 2. V záložce *"Other"* lze přepisovat počet použitých faktorů v tabulce *"Factors for last calibration"* dle minima na křivce PRESS, popř. nechat spočíst větší počet faktorů.
- 3. Při nahrávání standardů je potřeba mít kurzor vždy umístěn v prázdném řádku tabulky standardů, nebo dojde k přepisu již nahraných dat.
- 4. S každou další pozdější úpravou regionů po kalibraci je potřeba znovu zkontrolovat počet použitých faktorů, odpovídající minimu na křivce PRESS.
- 5. Pokud budete chtít umazat řádek v tabulce standardů, je potřeba ho celý označit a poté použít příkaz "*Delete Row*" z menu "*Edit*".
- 6. Pro vyvinutí regresní metody PCR lze využít již vytvořenou a uloženou metodu PLS tak, že se pouze změní typ metody v záložce "Description" a znovu se uloží pod novým názvem a popisem. Data se do dalších záložek už nemusí vkládat. Stačí pouze dát nakalibrovat metodu, zkontrolovat spektrální oblasti v záložce "Regions" a model optimalizovat pomocí diagnostických nástrojů.

Obsahové body do protokolu:

- 1. Princip: velmi stručně popište metodu.
- 2. Úkoly: opište ze zadání.
- 3. Přístroje, pomůcky, chemikálie a použitý software: uveďte typ měřícího přístroje, zdroj záření, dělič paprsků, detektor, typ kyvet,verze použitého softwaru, výběr měřícího experimentu, nastavení počtu skenů a rozlišení.
- 4. Vypracování: bude obsahovat tabulku složení kalibračních roztoků, obrázek a komentář vysvětlující výběr vhodné tloušťky kyvety pro vaše měření, obrázek spekter sacharosy a ethanolu ve vodném prostředí a komentář výběru spektrálních rozsahů pro regresní chemometrickou metodu, kalibrační model pro sacharosu a pro ethanol s výkonnostními indexy, průměrný výkonnostní index celé regresní metody, komentář popisující veškeré změny v nastavení regresní metody- které pomohly k zlepšení výkonnostního indexu, tabulku vypočtených koncentrací sacharosy a ethanolu v neznámých vzorcích, typové výpočty.
- 5. Závěr: uveďte průměrnou koncentraci sacharosy a ethanolu v neznámých vzorcích a průměrný výkonnostní index vaší regresní metody.

Kontrolní otázky

- 1. Jakými hodnotami vlnové délky resp. vlnočtu je vymezena blízká infračervená (NIR) oblast?
- 2. Jaké přechody jsou příčinou absorpce záření látkami v NIR oblasti?
- 3. K jakému účelu mohou sloužit knihovny NIR spekter?
- 4. V čem spočívá hlavní analytické využití NIR spekter?
- 5. Jaké regresní metody se využívají při vývoji kalibračního modelu?
- 6. Jaký je význam kalibračních a validačních měření?