

SPEKTROMETRIE V BLÍZKÉ INFRAČERVENÉ OBLASTI

Pavel Matějka

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 $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. 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 $4000 - 5300 \text{ cm}^{-1}$), první overtóny (cca $4600 - 7300 \text{ cm}^{-1}$), druhé overtóny (cca $6000 - 10000 \text{ cm}^{-1}$) a třetí overtóny (cca $8800 - 14500 \text{ cm}^{-1}$). Z hlediska kvalitativní informace je možné srovnávat měřená spektra čistých látek s knihovny 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. NIR spektrometrie se proto zařazuje mezi tzv.

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 módů (energie příslušného přechodu pak odpovídá součtu energií fundamentálních přechodů příslušných vibračních módů).

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

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 medicíně. 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 životního 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. Kapalně 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

⁴ K 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.

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.

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:

$$A_{\lambda,i} = \epsilon_{\lambda,i} b c_i \quad (1),$$

kde $A_{\lambda,i}$ je příspěvek *i*-té složky k celkové absorbanci A_λ při dané vlnové délce λ , $\epsilon_{\lambda,i}$ 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:

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

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.

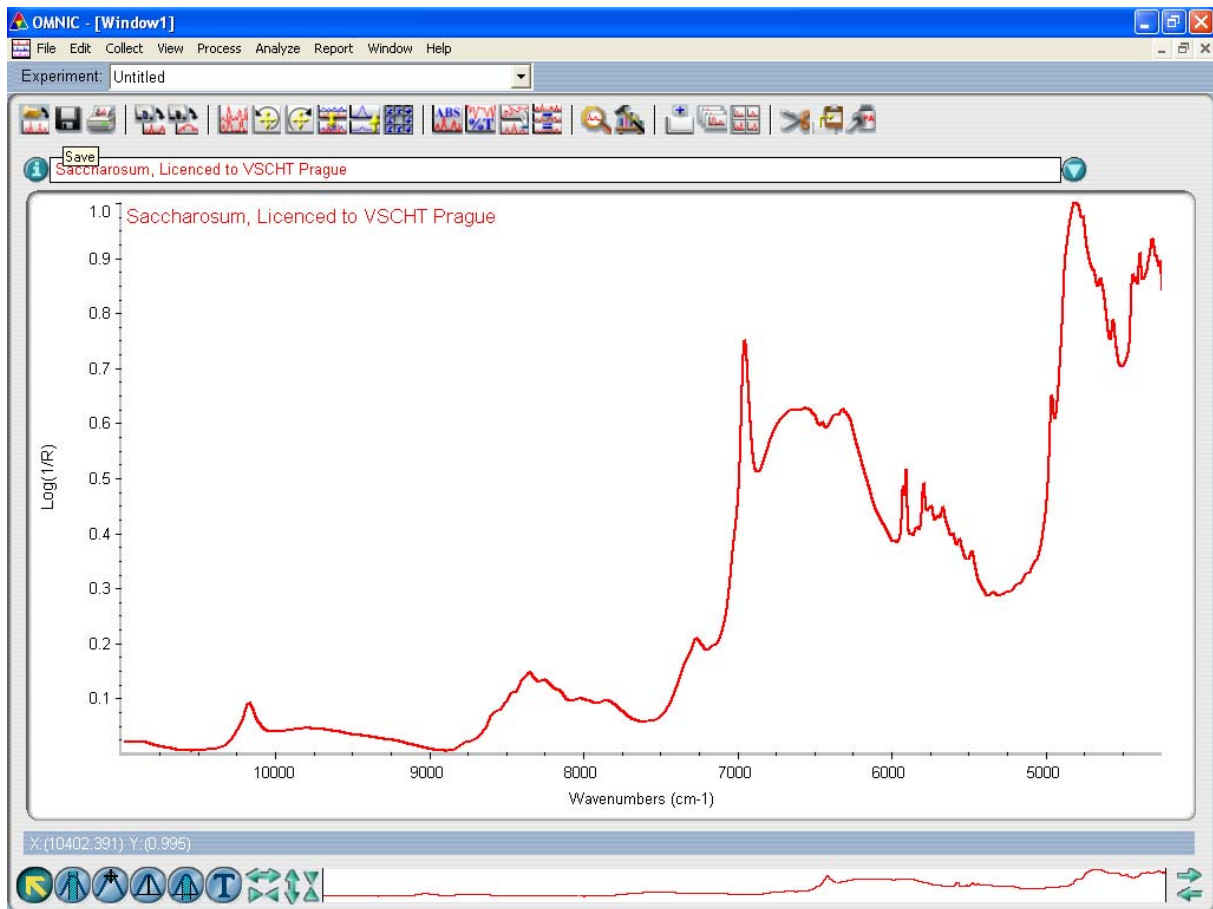
Vývoj robustních kalibračních modelů a jejich řádná validace jsou klíčovými a poměrně náročnými kroky kvantitativní analýzy pomocí NIR spektrometrie. Je třeba počítat s nutností přípravy nejen již zmiňovaných velmi rozsáhlých souborů kalibračních vzorků, ale i sad vhodně zvolených validačních vzorků (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“).

Úkoly

1. Proměřte vzorek vody, acetonu a zásobního vodného roztoku sacharózy v kyvetách s tloušťkou optické vrstvy 1, 2 a 5 mm. Ověřte na vybraných pásech závislost absorbance na tloušťce vrstvy absorbujícího prostředí.
2. Ze zásobního roztoku sacharózy připravte sadu kalibračních roztoků, vhodných pro vývoj kalibračního modelu, umožňujícího stanovení obsahu sacharózy ve vodném prostředí.
3. Proměřte sadu kalibračních roztoků ve vhodně zvolené kyvetě, a to s dvakrát opakovaným plněním kyvety.
4. Vyvíňte kalibrační model pro stanovení sacharózy ve vodných roztocích, testujte vliv výběru spektrální oblasti, regresní metody a počtu faktorů (hlavních komponent) na kvalitu kalibračního modelu (polovinu naměřených spekter použijte pro kalibraci, polovinu pro validaci).
5. Vyvinutý model využijte pro analýzu spekter změřeného zadaného neznámého vzorku (příp. více vzorků).

Měření NIR spekter

NIR spektra budete měřit v prostředí softwaru OMNIC, se kterým jste se seznámili v úloze „Infračervená spektrometrie“ v rámci „Laboratoří z analytické chemie I“. Základní přípravu přístroje a počítače k měření, výběr vhodného „experimentu“ a dalších parametrů přenecháte vyučujícímu, který Vás seznámí s obsluhou spektrometru a softwaru. FTIR spektrometr Nicolet NEXUS je jednopaprskový přístroj, takže před měřením vzorků je třeba zaznamenat referenční jednopaprskové spektrum („pozadí“) pomocí příkazu „Collect Background“. Po vložení kyvety se vzorkem do držáku v kyvetovém prostoru se pak zaznamená spektrum vzorku příkazem „Collect Sample“. Naměřené spektrum je třeba okamžitě uložit pomocí ikony „Save“, tak aby se minimalizovalo riziko ztráty dat. Je žádoucí, aby „Spectrum Title“, který vyplníte před zahájením záznamu příslušného spektra, byl použit jako název souboru „file name“. Jednotlivé popisy („Spectrum Title“) musí umožnit jednoduše identifikovat měřený vzorek, opakování měření a osobu operátora. Jednoznačná identifikace spekter je klíčová při vývoji kalibračního modelu, pro jejich zařazení do kalibrační či validační skupiny, a pro přiřazení známých kvantitativních charakteristik. Základní pravidla označování jednotlivých měření Vám budou sdělena při zahájení laboratorní práce. Veškerá měřená data ukládejte do jednoho vyučujícím určeného adresáře. Originální data pak zachováte v tomto adresáři. Pro další zpracování a vyhodnocování dat vytvoříte duplikáty spekter překopírováním do jiného (pracovního) adresáře. Z tohoto (pracovního) adresáře pak budete data načítat při tvorbě kalibračního modelu či při dalších předepsaných úkolech, aby se tak snížilo riziko náhodného přepisu původních dat daty modifikovanými.



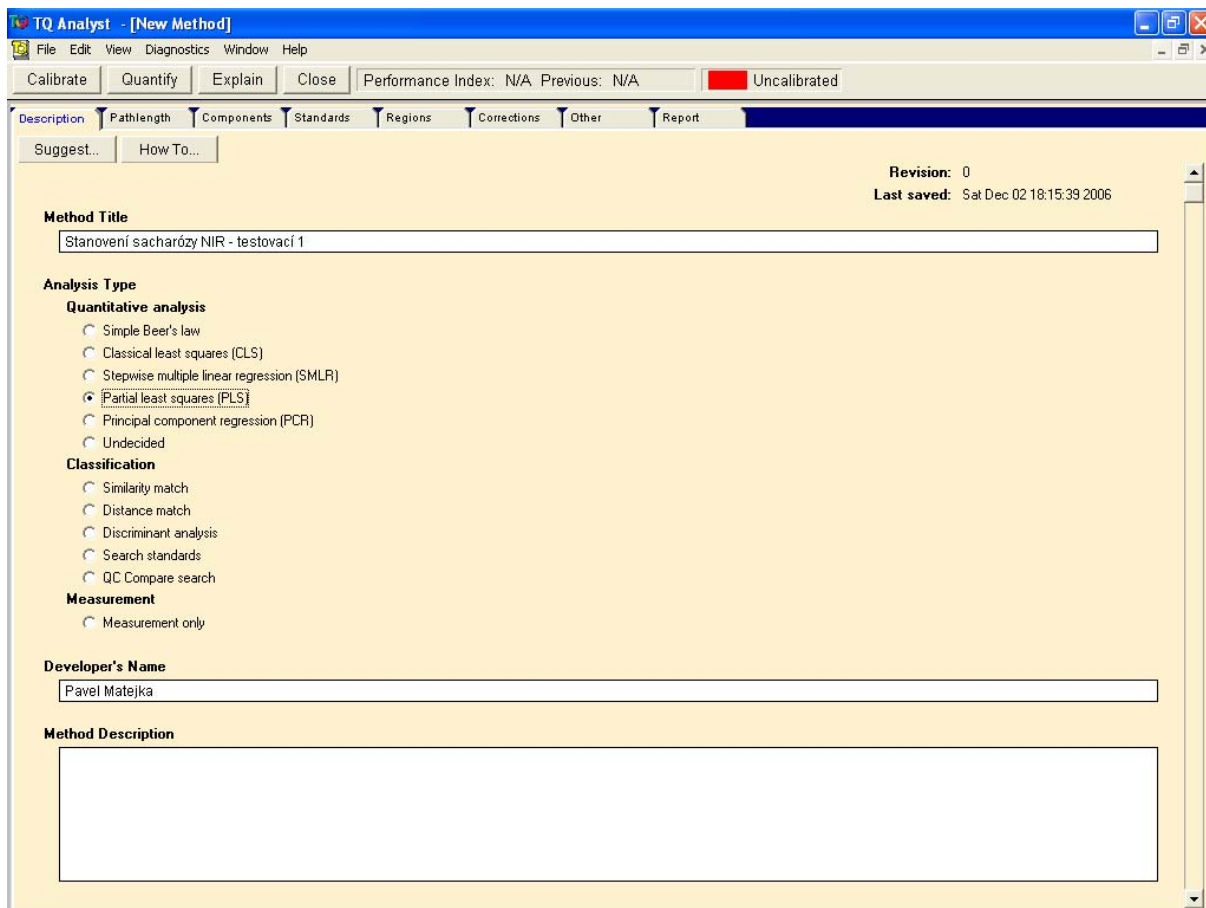
Základní okno programu OMNIC je obdobné u spektrometrů NEXUS, tak jak jste se s ním seznámili u spektrometrů Avatar v úloze „Infračervená spektrometrie“ v „Laboratořích z analytické chemie I“.

Vývoj kalibračního modelu

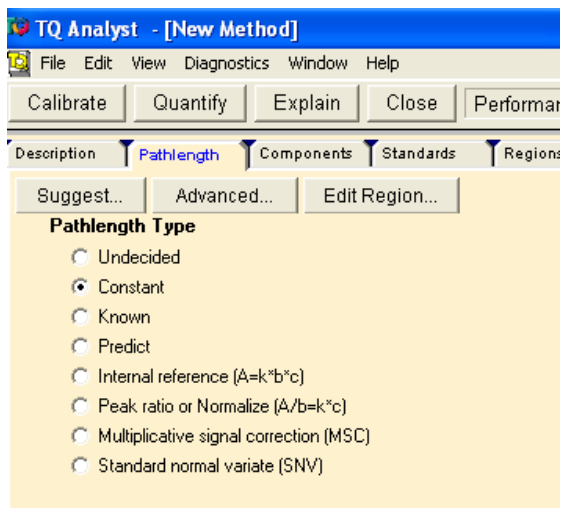
Jak již bylo řečeno, klíčovým krokem kvantitativní analýzy pomocí NIR spektrometrie je vývoj a optimalizace kalibračního modelu. Vývoj kalibračního modelu budete provádět v programu TQ Analyst, který úzce spolupracuje s programem OMNIC. Není tak nutná žádná formátová konverze uložených spektrálních dat.

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 jednu 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.

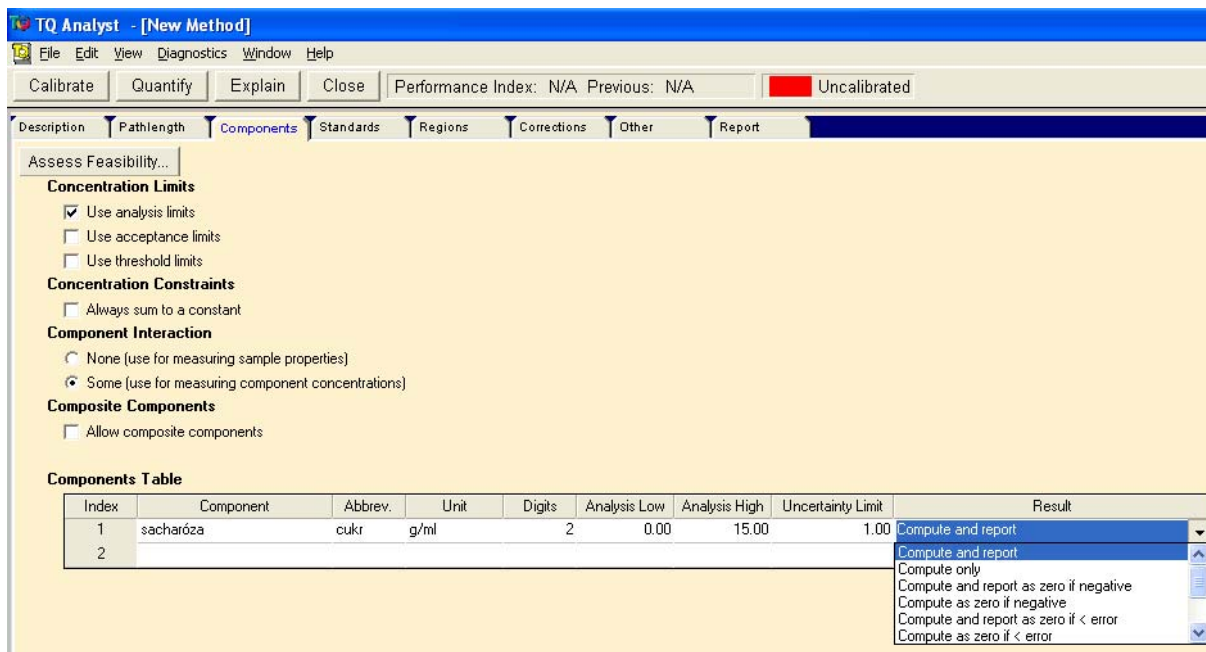
To umožňuje lépe sledovat postupný vývoj kalibračního modelu a jeho optimalizaci. Cílem úlohy je zvládnout princip tvorby kalibračního modelu, z časových příčin je počet zpracovávaných vzorků a spekter velmi omezený, což může limitovat výkonnostní charakteristiky konstruovaných modelů.



Na vstupní obrazovce vyplníte název metody, typ regresní metody a vaše jméno, poté přepnete na záložku „Pathlength“, kde se vybere typ tloušťky absorpčního prostředí. Pro měření v kvetě zaškrtněte položku „Constant“.



Poté přepněte na záložku „Components“, kde je především 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.



Dále je třeba vyplnit údaje pod záložkou „Standards“. Pomocí tlačítka „Open Standard...“ vyberete a otevřete 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.

TQ Analyst - [c:\Voslar\TQ\PLS-Voslar-02-upr02.qnt]

File Edit View Diagnostics Window Help

Calibrate Quantify Explain Close Performance Index: 89.2 Previous: 74.9 Calibrated

Description Pathlength Components Standards Regions Corrections Other Report

Suggest... Evaluate... Open Standard... View Standards Sort Standards Ignore Missing Data

Standards

- Show spectrum titles
- Show spectrum file names
- Allow spectral processing
- Show processed spectra in View Standards
- Restrict Y-axis range in standard spectra
 - Restrict Y-axis range in sample spectra

0.000 Start 1.500 End

Missing Data

-100.000 Indicator value

Standards Table: 143 Calibration, 50 Validation

Index	Select	Spectrum Title	Usage	sifran	sificitan	S4	S3	thiosfran
1		BSubtraction Result:trithionan15mM-02- Validation		0.0000	0.0000	0.0000	15.0000	0.0000
2		BSubtraction Result:3,75mMtetrathionan Calibration		7.5000	0.0000	3.7500	3.7500	7.5000
3		BSubtraction Result:3,75mMtetrathionan Calibration		7.5000	0.0000	3.7500	3.7500	7.5000
4		BSubtraction Result:3,75mMtetrathionan Calibration		7.5000	0.0000	3.7500	3.7500	7.5000
5		BSubtraction Result:3,75mMtetrathionan Validation		7.5000	0.0000	3.7500	3.7500	7.5000
6		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+E Calibration		10.0000	0.0000	5.0000	5.0000	0.0000
7		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+E Calibration		10.0000	0.0000	5.0000	5.0000	0.0000
8		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+E Validation		10.0000	0.0000	5.0000	5.0000	0.0000
9		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+E Calibration		10.0000	0.0000	5.0000	5.0000	0.0000
10		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+1 Calibration		10.0000	0.0000	5.0000	0.0000	10.0000
11		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+1 Calibration		10.0000	0.0000	5.0000	0.0000	10.0000
12		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+1 Validation		10.0000	0.0000	5.0000	0.0000	10.0000
13		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+1 Calibration		10.0000	0.0000	5.0000	0.0000	10.0000
14		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+1 Calibration		0.0000	0.0000	5.0000	5.0000	10.0000
15		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+1 Calibration		0.0000	0.0000	5.0000	5.0000	10.0000
16		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+1 Validation		0.0000	0.0000	5.0000	5.0000	10.0000
17		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+1 Calibration		0.0000	0.0000	5.0000	5.0000	10.0000
18		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+10n Calibration		10.0000	0.0000	0.0000	5.0000	10.0000
19		BSubtraction Result:5mMtetrathionan+10n Calibration		10.0000	0.0000	0.0000	5.0000	10.0000

TQ Analyst - [c:\Voslar\TQ\PLS-Voslar-02-upr02.qnt]

File Edit View Diagnostics Window Help

Calibrate Quantify Explain Close Performance Index: 89.2 Previous: 74.9 Calibrated

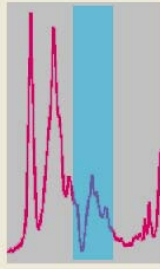
Description Pathlength Components Standards Regions Corrections Other Report

Suggest... Edit Regions...

Regions Table

Index	Region	Start	End	Offset
1	Spectrum Range			
2				


Suggest Regions



TQ Analyst will analyze the components and standards data. It will identify spectral regions which correlate to component concentration. Suggestions for baseline handling within each region will also be provided.

If the pathlength type is Undecided, TQ Analyst will also suggest a pathlength type at this time.

You must enter component concentrations and collect spectra of each standard before continuing.

 < Back Next > Cancel

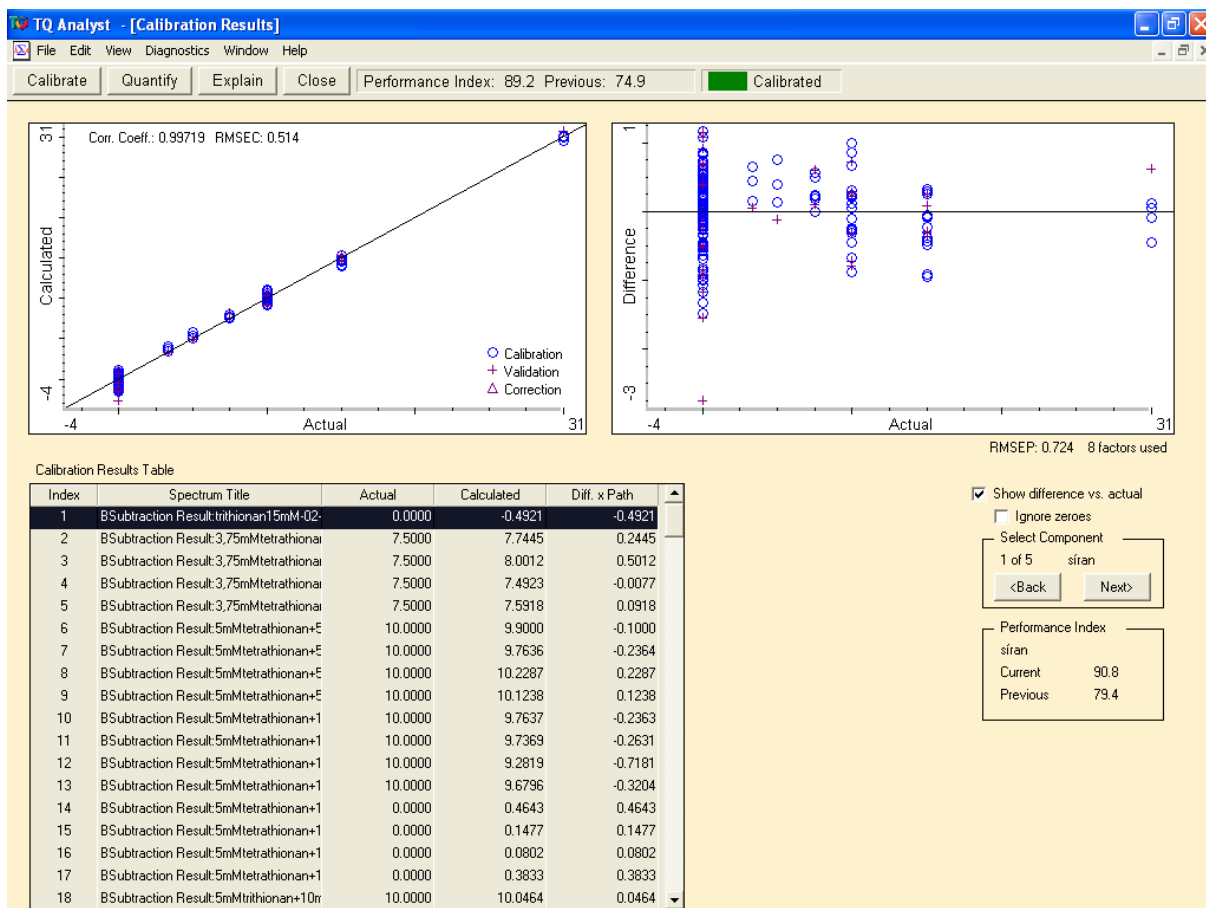
Components in Regions Table

Index	Measurement Location
1	1299.79

Další záložka „Regions“ se týká výběru spektrální oblasti, která bude zpracovávána 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“, kde lze interaktivně provést úpravu zvoleného rozsahu, prohlédnout spočítaná statistická spektra a modely spekter čistých složek „Pure Component Spectra“. Případné změny se ukládají tlačítkem „Save“.

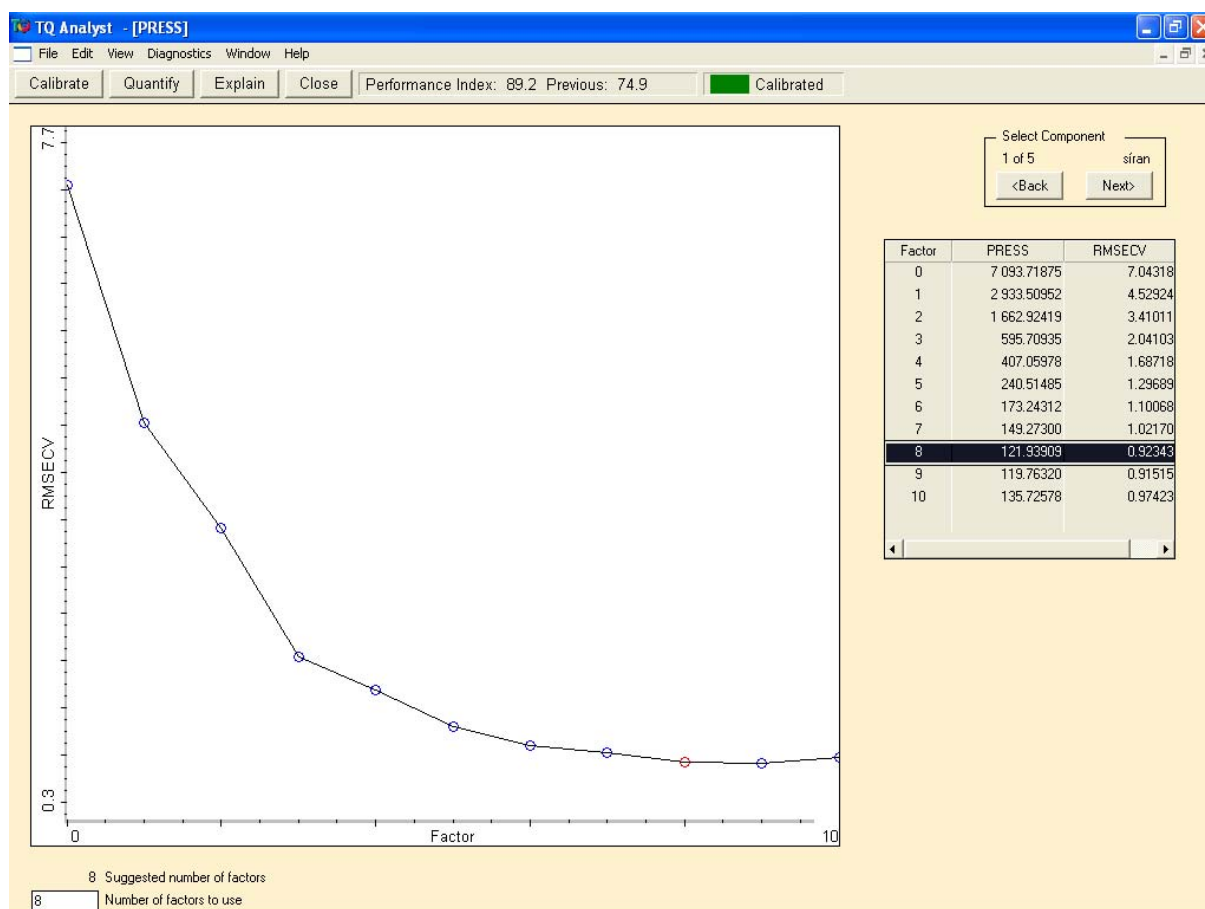
Výše uvedeným zadáním stanovované složky, výběrem standardů a specifikací jejich složení a volbou analyzované spektrální oblasti jsou shromážděna veškerá data nutná pro provedení kalibračního výpočtu, který se spustí stisknutím tlačítka „Calibrate“. Po úspěšném provedení výpočtu se zobrazí okno „Calibration Results“, 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. Důležitým kritériem je dále i hodnota výkonnostní charakteristiky „Performance Index“, která může nabývat hodnot od minimálních (záporných) –100 (nevýkonný, velmi nevhodný model) až po maximálních +100 (nejvýkonnější model). Změny této hodnoty 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“.



Při vývoji kalibračního modelu pomocí regresních metod PLS a PCR je třeba věnovat pozornost především diagnostickému nástroji, označovanému zkratkou PRESS („predicted residual sum of squares“). Samotná hodnota „sumy čtverců“ se vynáší graficky proti hodnotě počtu použitých hlavních komponent (PC - „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. 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 („outliers“), 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.



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 8).

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?