

CHEMOMETRICKÉ NÁSTROJE PRE KVANTITATÍVNU FTIR SPEKTROSKOPIU PÔD

IVAN ŠIMKOVIC

*Katedra pedológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava
ivan.simkovic@fns.uniba.sk*

Došlo 31.3.15, prepracované 26.2.16, prijaté 9.8.16.

Kľúčové slová: FTIR spektroskopia, pôda, kvantitatívna analýza, viacrozmerná štatistická kalibrácia, regresia hlavných komponentov, regresia čiastočných najmenších štvorcov, umelé neurónové siete

Obsah

1. Úvod
2. Základný rámec kvantitatívnej FTIR spektroskopie
3. Prieskum a príprava dát na kalibráciu
 - 3.1. Distribúcia hodnôt
 - 3.2. Odľahlé hodnoty
 - 3.3. Korekcie spektrálnych dát
4. Kalibrácia spektroskopického merania v infračervenej oblasti
 - 4.1. Regresia hlavných komponentov
 - 4.2. Regresia čiastočných najmenších štvorcov
 - 4.3. Umelé neurónové siete
5. Validácia kalibračných modelov
6. Záver

1. Úvod

Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou (FTIR) je v súčasnosti rutinnou analytickou metódou, ktorá sa často používa, či už pri analýze biotických a abiotických zložiek životného prostredia, alebo aj v rámci monitoringu technologických postupov syntézy a úpravy rôznych látok. Medzi jej prednosti patrí: rýchlosť merania, finančne a environmentálne šetrná prevádzka, možnosť detekcie organických aj anorganických štruktúr súčasne (ktoré môžu byť amorfnej aj kryštalickej povahy), dostupnosť rôznych technologických modifikácií (transmisné alebo reflexné techniky), možnosť analyzovať látky v rôznych skupenstvách, resp. stavoch (pevné častice, plyny, kvapaliny, zmesi, filmy). V modernom laboratóriu nachádza uplatnenie taktiež v kombinácii s inými metódami, v podobe vzájomne prepojených a zosynchronizo-

vaných prístrojov. Známe sú kombinácie napr. s termogravimetrickou analýzou, pyrolýzou alebo plynovou, prípadne kvapalinovou chromatografiou. Pokiaľ ide o konkrétne aplikácie FTIR spektroskopie, je možné menovať najmä využitia meraní difúznej reflexie v blízkej infračervenej oblasti (NIR), napr. v rôznych odvetviach poľnohospodárstva, potravinárskeho, textilného, farmaceutického, alebo petrochemického priemyslu¹. Ide o dobre etablované techniky merania, ktoré umožňujú nielen rýchlu kontrolu kvality materiálov, ale aj kvantitatívnu detekciu vybraných komponentov, a to aj v relatívne zložitých zmesiach.

Uvedené výhody FTIR spektroskopie boli užitočné aj v rámci odbornej komunity zaoberajúcej sa získavaním dát o pôde a počas uplynulých 10 až 15 rokov došlo k výraznému nárastu publikácií testujúcich možnosti kvantitatívnej FTIR analýzy pôd. V rámci metodiky zmienených štúdií možno vyčleniť niekoľko krokov, ktoré boli uplatnené u väčšiny z nich. Prvý spočíval v získaní referenčných hodnôt jedného, alebo viacerých parametrov pôd pre dostatočne početný súbor vzoriek, použitím štandardných laboratórných metód. Ďalším krokom bola realizácia a kalibrácia FTIR meraní za účelom predikcie daných vlastností z FTIR spektra (vrátane testovania správnosti predikcie modelov). V typickom prípade bola pri kalibrácii použitá niektorá z viacrozmerných štatistických (chemometrických) techník, napr. regresia hlavných komponentov (PCR), alebo regresia čiastočných najmenších štvorcov (PLS), prípadne ďalšie. Spektroskopické merania boli väčšinou realizované na zhomogenizovaných vysušených vzorkách (v pevnom skupenstve a práškovej podobe) metódou difúznej reflexie (DRIFT).

V súvislosti s víziou rýchleho a nenákladného získania údajov o pôde boli testované predikcie rôznych vlastností, od chemických cez mikrobiologické² až po fyzikálne³. Početné sú napr. publikácie zamerané na kvantifikáciu obsahu organicky viazaného uhlíka^{4,5}. Autori v rámci jednej štúdie neraz testujú predikciu viacerých pôdných vlastností súčasne⁶. K často kvantifikovaným parametrom patrí aj kationová výmenná kapacita pôd, prípadne obsah konkrétnych výmenných kationov⁷. Nárast počtu prác testujúcich FTIR spektroskopiu ako nástroj kvantitatívnej analýzy pôd dokazuje aj zoznam 19 štúdií⁸, v ktorých boli kvantifikované rôzne parametre pôd pomocou DRIFT techník s využitím nielen infračervenej, ale aj ultrafialovej a viditeľnej oblasti. Kalibrácie FTIR meraní boli zamerané taktiež na odhad mechanických, prípadne hydrologických parametrov ako sú obsah prachovej a ílovej frakcie, alebo vodoretenčnej kapacity pôd^{3,9}. Popri základných vlastnostiach sa v niektorých štúdiách stretávame aj s predikciou špecifických pôdných parametrov, akými sú napr. obsahy rizikových prvkov (As, Cr, Cu, Zn)¹⁰.

Samotnej kvantifikácii určitého parametra pôd predchádza kalibrácia FTIR merania. Spektrálne dáta, ktoré do nej vstupujú, môžeme vnímať ako viacrozmernú maticu, ktorá komplexným spôsobom odráža chemické zloženie vzoriek. Na spektrum jednej vzorky pripadá minimálne niekoľko stoviek, neraz aj tisícov hodnôt absorpcie, ktoré charakterizujú mieru absorpcie žiarenia v rôznych frekvenčných oblastiach. Súčasťou výstupu z FTIR meraní je však prekrytie pásov rôznych vibrácií, ako aj významná vzájomná autokorelácia absorpcií zaznamenaných pri rôznych vlnotoch (napríklad v rámci viacerých pásov tej istej chemickej zložky). Pri kalibrácii je cieľom získať z veľkého množstva spektrálnych dát takú informáciu, ktorá v rámci regresnej analýzy objasní dostatočný podiel variability cieľovej premennej. V tejto súvislosti nachádzajú uplatnenie rôzne metódy rozkladu spektrálnych matic (sprevádzané redukciami počtu premenných) v kombinácii s viacrozmernými regresnými postupmi. Napriek tomu, že štúdií, ktoré uvedené techniky kalibrácie použili, bolo publikovaných pomerne dosť, o samotných metódach a možnostiach, ktoré ponúkajú, sa v odborných periodikách píše v menšej miere. Čitateľ je tak odkázaný zväčša na štúdium knižných publikácií, kde sú danej problematike venované stovky strán. Cieľom tohto článku je podať zhrnutie podstatných informácií o kalibrácii FTIR meraní za účelom kvantitatívnej analýzy pôdnych vzoriek. Napriek tomu, že v texte sú často citované práce, v ktorých boli analyzované vzorky pôd, snahou bolo prezentovať poznatky aplikovateľné pri analýze širšieho spektra materiálov, použitím rôznych FTIR techník, ktoré sú v súčasnosti k dispozícii.

2. Základný rámec kvantitatívnej FTIR spektroskopie

Princíp kvantitatívnej spektrálnej analýzy v ultrafialovej (UV), viditeľnej (VIS) a infračervenej oblasti spočíva v tom, že miera absorbovaného žiarenia je proporcionálna obsahu zložky, ktorej množstvo chceme stanoviť. Bližšie túto zákonitosť definuje Lambertov-Beerov zákon, ktorý bol pôvodne ustanovený pre tekutiny (kvapaliny/plynny), v ktorých je analyzovaná zložka rovnomerne distribuovaná v neabsorbujúcom médiu, pričom jej zastúpenie vzhľadom na médium je výrazne nižšie. FTIR meranie vzorky v pevnom skupenstve transmisnou technikou je opísanej situácii veľmi podobné.

Základom detekcie komponentov v kvázi homogénnych zmesiach pomocou UV-VIS-IR spektroskopie je vzájomný pomer intenzít žiarenia zaznamenaného detektorom (I_T) a žiarenia dopadajúceho na vzorku (I_0). Oba parametre sa získajú priamo z prístroja, pričom jednoduché percentuálne vyjadrenie ich pomeru nazývame transmitanciou (T):

$$T = \frac{I_T}{I_0} \cdot 100$$

V prípade transmitancie však platí, že s narastajúcou hrúbkou optickej vrstvy alebo koncentrácie absorbujúcej zložky, hodnota T klesá exponenciálne. Ako zdroj analytického signálu sa pri UV-VIS-IR spektroskopii preto využíva najmä absorbanca (A), ktorá je logaritmom prevrátenej hodnoty T :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_T}\right) = \varepsilon cl$$

Druhá časť vzťahu hovorí, že absorbanca je (na rozdiel od T) lineárne úmerná veľkosti molárneho absorpčného koeficientu (ε), koncentrácii analyzovanej zložky (c), ako aj optickej vzdialenosti (l), ktorú lúč pri prechode uvažovanou sústavou (roztok, zmes vzorky s KBr) prekoná.

V súvislosti s analýzou pevných častíc rozptýlených v KBr pomocou IR spektroskopie nachádzame vo vybraných prácach¹¹ modifikácie Lambert-Beerovho vzťahu, ktoré pri vyjadrení absorpcie zohľadňujú aj ďalšie parametre. Napr. v rovnici:

$$A = \frac{m}{S\rho} \frac{k}{2,303}$$

sú m a ρ hmotnosť a hustota vzorky, S je plocha (KBr tablety), na ktorú dopadá žiarenie a k je absorpčný koeficient látok v pevnom skupenstve. Za predpokladu, že $cl = m/S\rho$ a $\varepsilon = k/2,303$, budú oba predchádzajúce vzťahy zhodné.

Je vhodné uviesť, že existujú početné obmedzenia, ktorými je limitovaná platnosť Lambert-Beerovho vzťahu. Medzi základné predpoklady patrí napr. použitie monochromatického žiarenia, zanedbateľná reaktivita absorbujúcich zložiek, alebo dostatočné zriedenie vzorky vzhľadom na neabsorbujúce médium. Okrem toho je lineárna závislosť (medzi A a c) podmienená aj absenciou tzv. Christiansenovho efektu. Veľkosť častíc vzorky musí byť menšia ako hodnota vlnovej dĺžky aplikovaného žiarenia (napr. v prípade strednej IR oblasti $< 2 \mu\text{m}$) a rozptyl žiarenia by mal byť obmedzený na minimum. Ak sa meranie realizuje v lisovaných tabletách (KBr), je samozrejme potrebné predísť ich mechanickému poškodeniu¹².

V rámci prác zameraných na kvantitatívnu predikciu pôdnych parametrov sa pri kalibrácii často vychádza z meraní difúznej reflexie, pri ktorých sa práškový materiál vzorky tiež riedi s neabsorbujúcim médiom. Podstatným rozdielom je, že detektor prístroja sníma žiarenie po jeho odraze od vzorky, pričom signálom, ktorý vypovedá o štruktúre látky, je difúzno-reflexná zložka žiarenia. Na to, aby bolo reflexné spektrum (R) využiteľné pri kvantitatívnej analýze (aby sa dosiahla lineárna aproximácia podobne ako v prípade absorpcie), upravuje sa prostredníctvom vzťahu $\log(R_0/R)$, kde R_0 je reflektancia referenčného difúzneho – neabsorbujúceho média, ktorá sa definitívne rovná jednej¹³.

Napriek početným obmedzeniam je pri meraní možné väčšinu faktorov a premenných, ovplyvňujúcich absorbanciu, pomerne úspešne kontrolovať. V ideálnom prípade nám tak v Lambertovom-Beerovom vzťahu ostane jediná

neznáma, a tou je absorpčný koeficient, ktorý je špecifickou charakteristikou analyzovaného komponentu. Podobne ako pri jednoduchom kolorimetrickom meraní, aj v prípade FTIR spektroskopie je proces kalibrácie v podstate odhadom absorpčného koeficientu na základe regresnej analýzy závislosti referenčných hodnôt a ich spektrálnej odzvy. Avšak pre kalibráciu FTIR meraní je charakteristické použitie niektorej z viacrozmerných regresných metód, pričom jej výstupom je niekoľko regresných koeficientov, ktoré zohľadňujú rôzny vplyv absorpcie v tej ktorej oblasti IR spektra na cieľový parameter vzorky.

3. Prieskum a príprava dát na kalibráciu

Či už ide o spektroskopické alebo iné techniky chemickej analýzy, pred samotnou kalibráciou je vhodné súbor nameraných dát posúdiť z viacerých hľadísk a na základe príslušných zistení rozhodnúť o ďalšom postupe. V tejto súvislosti prichádza do úvahy napr. hodnotenie distribúcie číselných údajov, identifikácia odľahlých hodnôt (vzoriek), prípadne ďalšie kroky. Prieskum a prípadné úpravy dát na kalibráciu sa týkajú nielen údajov referenčnej premennej, ale aj nameraných spektrálnych dát.

3.1. Distribúcia hodnôt

Jedným z tradičných aspektov prieskumu dát je posúdenie ich distribúcie. Ak je kalibrácia založená na jednoduchej alebo viacrozmernej lineárnej regresii, je vhodné, aby hodnoty vysvetľovanej premennej splňali kritériá normálneho (Gaussovho) rozdelenia. Za týmto účelom sa používajú vybrané ukazovatele popisnej štatistiky, zohľadňujúce šikmosť a špicatosť rozdelenia, ako aj počet pozorovaní. V tejto súvislosti možno čitateľa odkázať na prehľad¹⁴ rôznych spôsobov testovania jednorozmernej distribúcie dát. Ak rozdelenie hodnôt vykazuje výrazne odlišný charakter vzhľadom na normálnu distribúciu, riešením môže byť ich transformácia použitím jednoduchých funkcií (častá je aplikácia logaritmov, alebo rôznych exponentov). Napriek tomu, že normálne rozdelenie hodnôt závislej premennej je pri kalibrácii výhodou, pri aplikácii niektorých metód (napr. PLS) sa stretávame aj s použitím netransformovaných hodnôt (Y) s pomerne výraznou mierou zošikmenia. Ako príklad možno uviesť práce zamerané na predikciu obsahu organicky viazaného uhlíka^{4,9}, kationovej výmennej kapacity¹⁵, alebo vodoretenčných charakteristík pôd³. V rámci prác používajúcich PLS regresiu, prípadne inú príbuznú metódu, sa často nehodnotí distribúcia vstupných dát Y pred kalibráciou v zmysle jej striktného porovnávania s normálnym rozdelením. Jednoducho sa vykoná viac kalibrácií, jednak s použitím neupravených, ako aj transformovaných hodnôt, a následne sa hodnotí presnosť predikcie jednotlivých modelov. Kritérium uplatnenia, resp. neuplatnenia transformácií teda nespočíva ani tak v distribúcii vstupných dát referenčných vlastností, ale v tom, ktorý z kalibračných variantov vykazuje vyššiu spoľahlivosť predikcie^{2,3}. Okrem toho, pri hodnotení nor-

mality distribúcie si nekladíme otázku, či súbor hodnôt má alebo nemá charakter normálneho rozdelenia, ale skôr, ako veľmi sa daná distribúcia od normálneho rozdelenia odlišuje¹⁶. Výraznejšia odchýlka distribúcie referenčných dát od normálneho rozdelenia môže byť pri regresii problémom najmä početne menších súborov. Je vhodné pripomenúť, že v rámci regresných metód sa podmienka normálnej distribúcie týka predovšetkým rozdelenia reziduálnych hodnôt¹⁷.

Odlišná situácia nastáva v prípade, ak je predmetom kalibrácie viacero parametrov vzorky súčasne. Vtedy je vhodné viacrozmerné testovanie normality distribúcie vysvetľovaných premenných matice Y . Je pritom potrebné brať do úvahy, že ak aj všetky premenné vykazujú normálne rozdelenia pri ich jednorozmernom posúdení, nie je to zárukou viacrozmernej normality Y (cit.¹⁸). Hodnotenie viacrozmernej distribúcie dát je v porovnaní s jednorozmerným o čosi zložitejšie, pričom aj v súčasnosti sa stále objavujú nové spôsoby jej posúdenia, čo dokazuje istú otvorenosť danej problematiky. Prehľad kritérií, ktoré sa v rámci rôznych testov viacrozmernej normality distribúcie dát uplatňujú, možno nájsť v konkrétnych zdrojoch^{17–19}.

3.2. Odľahlé hodnoty

Význam termínu „odľahlá hodnota“ môže byť v závislosti od kontextu jeho použitia chápaný rôzne. Ako odľahlý môžeme označiť kvantitatívny údaj určitej premennej pre nejakú vzorku, ktorý je významne odlišný v porovnaní so strednou hodnotou zvyšnej časti uvažovaného súboru. Tieto odľahlé hodnoty nachádzame na okrajoch súborov po ich zoradení (či už zostupne, alebo vzostupne). Atribút „odľahlá“ sa teda vzťahuje priamo na vzorku, ktorú na základe jej vlastností považujeme za významne odlišnú v porovnaní so zvyškom uvažovanej skupiny. Odľahlosť hodnôt súvisí s distribúciou dát, čím sa opäť dostávame k možnosti jednorozmerného a viacrozmerného posúdenia. V rámci jednorozmerného hodnotenia môžeme uplatniť napr. Dixonov Q test²⁰ alebo kritérium založené na Cookovej vzdialenosti²¹. Použitie uvedených testov je pritom podmienené predpokladom normálneho rozdelenia príslušných súborov dát. Pri spektroskopických meraniach sa na odľahlosť zvyknú testovať aj spektrá jednotlivých vzoriek. Odľahlé môže byť napr. spektrum, ktoré je zaťažené výrazným šumom, alebo sa z dôvodu intenzívnej absorpcie v určitej frekvenčnej oblasti výrazne odlišuje od zvyšných spektier (príčinou odľahlosti spektra môže byť aj uplatňovanie ďalších optických javov – rozptylu, odrazov, refrakcie). Ako ukazovateľ sa môže použiť napr. H hodnota, čo je index vychádzajúci z Mahalanobisovej vzdialenosti²². V tomto prípade ide o viacrozmerné testovanie odľahlosti daného spektra. Všetky doteraz zmienené spôsoby testovania sa aplikujú buď pred samotnou kalibráciou alebo v počiatočnej fáze vývoja kalibračného modelu.

Atribút odľahlosti sa môže vzťahovať aj na reziduálne hodnoty, kedy je rozdiel medzi referenčnou a odhadovanou hodnotou určitej vzorky výrazne vyšší v porovnaní so súborom reziduí ostatných vzoriek. Takáto

odľahlosť indikuje, že platnosť regresného vzťahu sa na danú vzorku vzťahuje len v obmedzenej miere. V tomto prípade odľahlé reziduálne hodnoty identifikujeme až po samotnej kalibrácii. Pri ich detekcii možno vychádzať z porovnania danej reziduálnej hodnoty so štandardnou chybou kalibrácie. Ak je rozdiel medzi referenčnou a predikovanou hodnotou v porovnaní so štandardnou chybou kalibrácie viac ako 2,5 násobný, je na mieste zvážiť opätovnú analýzu vzorky²³. Súčasťou regresnej PLS procedúry je projekcia vzoriek kalibračného súboru do niekoľkých hlavných komponentov, kde sú vzorky reprezentované viacrozmernými vzdialenosťami – hodnotami skóre. Vzájomná pozícia a usporiadanie jednotlivých skóre býva pri FTIR spektroskopii často používaným nástrojom na identifikáciu odľahlých vzoriek⁹. Aj tento spôsob detekcie možno aplikovať až po vykonaní kalibrácie. Neraz sa stáva, že použitím rôznych metód identifikujeme rovnaké vzorky. Sú prípady, kedy ani opätovná realizácia meraní situáciu nezlepší a vzorku je potrebné z procesu kalibrácie vyradiť. Je však vhodné, aby počet vyradených vzoriek bol v porovnaní s ich celkovým (pôvodným) množstvom zanedbateľný.

3.3. Korekcie spektrálnych dát

Takmer v každej práci orientovanej na kvantitatívnu predikciu parametrov (nielen pôdnych) vzoriek použitím FTIR meraní bola aplikovaná nejaká forma matematickej úpravy spektrálnych dát. Jedným zo základných krokov po získaní spektra je vymedzenie tzv. základnej línie (baseline). Základná línia je všeobecné označenie pre sekvenciu bodov, ktoré oddeľujú analytický signál od pozadia. Pri jej korekcii sa často vychádza z regresnej analýzy, kde môžu byť uplatnené lineárne alebo aj polynomicke vzťahy. V rámci uvažovaného spektrálneho rozsahu tak môže byť základná línia kompenzovaná iba jednou úsečkou, niekoľkými úsečkami, alebo aj polynómom n -tého stupňa, po prípade segmentovou funkciou²². Pri technikách zameraných na blízku infračervenú oblasť môže byť korekcia základnej línie problematická z dôvodu prítomnosti kombinačných vibrácií a overtónov. K základným úpravám radíme normovanie spektier, ktoré má za následok proporcionálnu zmenu absorbancie všetkých bodov spektra napríklad tak, aby na bod s maximálnou intenzitou absorpcie pripadala hodnota 1. Okrem toho poznáme tiež vektorovú normalizáciu, pri ktorej sa každý záznam v rámci spektra určitej vzorky vydělí tzv. Euklidovskou normou, čo je odmocnina zo sumy umocnených absorbancií daného spektra. Štandardným krokom prípravy FTIR dát je „stĺpcové“ centrovanie, kedy sa v rámci určitej sady meraní od každého spektra odráta spektrum priemerné. Úpravu dát centrovaním možno kombinovať so škálovaním na smerodajnú odchýlku, čo znamená, že po odpočítaní aritmetického priemeru sa získaná hodnota delí smerodajnou odchýlkou daného vektora. Delenie hodnôt, či už centrovaných alebo pôvodných, smerodajnou odchýlkou má za následok, že rozptyl takto upravených premenných bude rovný jednej. Z tohto dôvodu má stĺpcové škálovanie

pri kalibrácii význam napr. vtedy, keď sa ako vysvetľujúce premenné použijú vlastnosti, ktoré sú z metrologického hľadiska navzájom odlišné. V prípade absorpčných spektier však pre použitie škálovania nie je dôvod, nakoľko všetky vektory matice X sú uvádzané v rovnakých jednotkách²⁴. V súvislosti s korekciou spektier zameraných na blízku infračervenú oblasť sa používa opačný („riadkový“) spôsob centrovania, resp. škálovania. Postup je v princípe rovnaký ako v predošlom prípade, avšak priemer a smerodajná odchýlka sú vypočítané zo spektra, ktoré upravujeme. Takéto individuálne centrovanie a škálovanie spektier (Standard Normal Variate, SNV) môže čiastočne zmierniť skreslenie spektier vyvolané rozptylom žiarenia¹⁵.

Za účelom eliminácie skreslenia z výstupov FTIR spektroskopie sa používajú rôzne filtrovacie, vyhladzovacie, alebo korekčné algoritmy. V zásade platí, že pri hodnotení kvality signálu sa môžeme zamerať buď na časovú alebo frekvenčnú sekvenciu dát, pričom ich vzájomná konverzia sa realizuje pomocou dvojice Fourierových transformačných vzťahov²⁵. Východiskovú kvalitu spektra možno ovplyvniť jednak zadaním vhodného spektrálneho rozlíšenia, ako aj počtu záznamov, z ktorých sa vypočíta výsledné (priemerné) spektrum. Voľba týchto parametrov procesu merania je dôležitá, nakoľko väčšina z úprav, ktoré sú následne aplikované, má za následok stratu časti analytického signálu. Najjednoduchší z vyhladzovacích algoritmov spočíva v priemerovaní absorbancií v rámci pohyblivého intervalu vlnočtov. Z nepárneho počtu absorbancií zvolenej sekvencie spektra sa vypočíta (vážený) priemer (alebo medián), ktorý je „novou“ y hodnotou upraveného spektra pre prostredný bod zvolenej skupiny. S narastajúcim počtom priemerovaných bodov sa zvyšuje miera redukcie šumu, ale aj riziko straty spektrálnej informácie a spektrálneho rozlíšenia. Pri reflexných technikách je podstatná časť skreslenia spektier spôsobená rozptylom žiarenia, ku ktorému dochádza v dôsledku variability veľkosti, tvarov a hutnosti častíc analyzovaného materiálu. Okrem už zmieného individuálneho centrovania škálovania spektier (SNV) sa používajú aj ďalšie korekcie rozptylu, napr. MSC (Multiplicative Scatter Correction). Táto metóda má viacero modifikácií, pričom v základnej podobe ide o lineárnu korekciu spektra použitím koeficientov, ktoré sa získajú na základe regresnej analýzy. V nej pôvodné (neupravené) spektrum vystupuje v úlohe závislej premennej, pričom vysvetľujúcim parametrom je priemerné spektrum uvažovanej skupiny vzoriek²⁶. K populárnym úpravám patrí tiež Savitsky-Golay (SG) filter, pri ktorom sú sekvencie zvoleného počtu susediacich bodov spektra aproximované polynomickými funkciami n -tého rádu. Absorbancia každého bodu upraveného spektra je v podstate polynomicou funkciou absorbancií susedných bodov pôvodného záznamu. Podobne ako pri priemerovaní absorbancie v rámci pohyblivého intervalu, aj v prípade SG algoritmu sa posúvajúce „okno“ filtra skladá z nepárneho počtu bodov (napr. 3, 5, 7 alebo 9) a korekcia sa vykoná vždy na prostrednom z nich. Okrem počtu bodov je potrebné zvoliť aj stupeň polynómu. Za zmienku stojí, že pri

určitom počte bodov (napr. 9), dosiahneme použitím kvadratickej funkcie rovnaký výsledok ako použitím kubickej. Zhodný výstup z filtrovania pozorujeme aj pri aplikácii polynómov 4. a 5. stupňa²⁷.

S vyhladzovaním a filtrovaním FTIR spektier súvisí aj derivácia spektrálneho záznamu. Koncept derivácie spektra sa dobre demonštruje na Gaussovej krivke. Po derivácii sa maximá píkov pôvodného záznamu dostávajú na nulovú úroveň, pričom body situované (pred deriváciou) v miestach najväčších sklonov sú po úprave spektra novými maximami alebo minimami v závislosti od toho, či išlo pôvodne o sklon pozitívny alebo negatívny (pri prechádzaní krivky zľava doprava). Prvá derivácia spektra má za následok praktickú elimináciu základnej línie píku, pričom druhá derivácia spôsobí okrem odstránenia základnej línie aj elimináciu prípadného lineárneho trendu pôvodného záznamu²⁸. S každým stupňom derivácie sa tak zhoršuje pomer signál/šum. Napriek tomu, že jednotlivé píky spektra určitej reálnej vzorky sa zvyknú aproximovať Gaussovými krivkami, surový výstup z FTIR merania je často skreslený, podieľa sa na ňom šum, a preto sa pred prípadnou deriváciou spektier pristupuje najprv k jeho vyhladeniu. Je vhodné pripomenúť, že podmienkou existencie derivácie funkcie v určitom bode je spojitost danej funkcie v tomto bode. Experimentálne spektrum, podobne ako výstupy z iných meracích zariadení, zapísané v digitálnej forme na pamäťové médiá, však nemá spojitý charakter, a preto je výstižnejšie namiesto o derivácii hovoriť skôr o jej numerickom odhade. Keďže pri FTIR spektroskopii sa absorbanca spravidla zaznamenáva v rovnakých frekvenčných intervaloch, pod deriváciou sa v praxi často myslí rozdiel medzi absorbanciami susedných bodov upraveného spektra. Rôzne algoritmy slúžiace na vyhladenie spektrálneho záznamu zároveň predstavujú konkrétne spôsoby odhadu derivácie. Okrem SG filtra k používaným úpravám patrí aj metóda Norris-Williams, ktorú možno v princípe prirovnáť k priemerovaniu absorbancie v rámci pohyblivého intervalu vlnových dĺžok. V rámci techník manipulácie so spektrami existujú aj ďalšie pokročilé metódy (napr. konvolúcia a dekonvolúcia spektier, transformácie vlnových funkcií), avšak ich charakteristika presahuje rámec tejto časti práce. Podrobnejšie informácie o spôsoboch úpravy dát matic X a Y , možnostiach ich transformácie a aplikácii rôznych filtrov, sú prezentované v citovaných literárnych zdrojoch^{24,27,28}.

4. Kalibrácia spektroskopického merania v infračervenej oblasti

Podstatnou súčasťou získavania kvantitatívnych údajov pomocou rôznych techník inštrumentálnej analýzy je kalibrácia merania (zahŕňajúca aj validáciu metódy). Týmto pojmom označujeme súbor úkonov, ktorými sa ustanoví (alebo aj overí) vzťah medzi číselnými údajmi určitej premennej, ktorá je predmetom merania a ukazovateľom, resp. signálom meracieho zariadenia alebo systému²⁹.

Kalibrácia spektroskopického merania často vychádza z regresnej analýzy, pričom v najjednoduchšom prípade môžeme uvažovať iba o dvoch premenných: zaznamenané spektrálnej veličine (x) a vlastnosti, ktorú chceme kvantifikovať (y). Vysvetľujúcou premennou (x) môže byť napr. plocha píku charakterizujúca absorpciu IR žiarenia v určitom frekvenčnom pásme³⁰, alebo vzájomný pomer absorbancii v rôznych (napr. dvoch) frekvenčných oblastiach³¹. Medzi parametrom vzorky, ktorý kvantifikujeme a spektrálnou odozvou prístroja, môže v takom prípade byť jednoduchá lineárna závislosť. Podmienkou úspešnej aplikácie uvedeného zjednodušenia je, aby sa v rámci zvoleného frekvenčného pásu prejavovali iba tie skupiny atómov, ktoré sú predmetom kvantifikácie. Napriek tomu, že v určitých prípadoch je možné pomocou FTIR meraní presne kvantifikovať vybraný parameter na základe jednoduchej alebo násobnej lineárnej regresie, v publikovaných prácach prevažuje použitie komplexnejších kalibračných postupov.

K populárnym viacrozmerným kalibračným metódam, najmä u reflexných techník, patria regresia hlavných komponentov (PCR) a regresia čiastočných najmenších štvorcov (PLSR). S ich použitím sa pri kvantitatívnej analýze pôd spája niekoľko metodických krokov. Referenčné hodnoty vlastností vzoriek kalibračného súboru sa nezískavajú na základe prípravy štandardov alebo primiešania známych množstiev analyzovaných komponentov do analyzovaného materiálu. Namiesto toho sa vo vzorkách určitou štandardnou (referenčnou) metódou kvantitatívne stanoví údaj, ktorý má byť predmetom kalibrácie. Kým pri uplatnení klasickej regresie sa ako vysvetľujúce premenné testujú priamo spektrálne charakteristiky, pri PCR alebo PLS regresii úlohu nezávislých premenných plnia tzv. metaparametre (latentné premenné), ktoré sú so spektrálnej matice odvodené. Za týmto účelom sa používajú metódy rozkladu matice spektrálnych dát (X), ktoré možno realizovať v rámci zvolených frekvenčných intervalov, ale napr. aj na celých spektrách. Obvyklou podmienkou použitia PCR alebo PLS regresie je vykonanie veľkého počtu meraní. Kvalitný regresný model tak vychádza z výsledkov minimálne desiatok a často aj stoviek analýz. Výhodou týchto štatistických techník je aj to, že čiastočne riešia problém vzájomnej korelácie jednotlivých vektorov matice absorbancii, ktorý je častým problémom výstupov z FTIR meraní. Všeobecne možno odhad regresného koeficientu u daných metód vyjadriť ako³²:

$$\hat{b} = X^{-1}y$$

kde X^{-1} označuje zovšeobecnenú inverznú maticu X . Jednotlivé metódy sa odlišujú v konkrétnom spôsobe výpočtu X^{-1} .

4.1. Regresia hlavných komponentov

Ako už názov napovedá, metóda vychádza z prieskumnej analýzy hlavných komponentov (PCA). Tá nám umožňuje modelovať variabilitu komplexných súbo-

rov dát pomocou niekoľkých vzájomne nekorelovaných (ortogonálnych) premenných, ktoré sa zvyknú nazývať aj vlastné vektory (eigenvektory), alebo hlavné komponenty. Ide o latentné premenné, ktoré sú lineárnymi kombináciami pôvodných spektrálnych dát. V názve metódy slovo „hlavný“ znamená, že variabilita pôvodnej matice dát je pri PCA pospísovaná iba tými komponentmi, ktoré majú významný vzťah k jej rozptylu. Prvý hlavný komponent popisuje najväčšiu časť rozptylu analyzovanej matice, druhý popisuje najväčšiu časť z jej zvyšného podielu (ktorú prvý nepopisuje), atď. Prvý hlavný komponent je teda takou lineárnou kombináciou pôvodných dát, ktorá pokrýva najväčšiu časť variability v porovnaní so všetkými ostatnými lineárnymi kombináciami. V praxi sa s ohľadom na spektrálne korelácie často stáva, že podstatná časť variability je pokrytá prvými dvoma až piatimi komponentmi a zvyšné sa týkajú v podstate iba šumu. Rozdiel medzi PCA a PCR spočíva v tom, že zatiaľ čo pri PCA slúžia hlavné komponenty na modelovanie rozptylu matice X , pri PCR nám lineárne kombinácie vstupných spektrálnych dát umožňujú kvantifikovať určitú vlastnosť vzorky.

Prvým krokom pri PCR je realizácia samotnej PCA na matici X . Existuje viacero spôsobov ako pri PCA postupovať, pričom často používanou a zároveň výpočtovo stabilnou metódou je tzv. singulárny rozklad³³ zdrojovej matice $X_{n \times p}$:

$$X_{n \times p} = U_{n \times n} \Lambda_{n \times n} P'_{n \times p} = T_{n \times n} P'_{n \times p}$$

Uvedený vzťah hovorí, že pôvodnú maticu absorbancií môžeme vyjadriť ako lineárny produkt troch resp. dvoch matíc, ktoré sú z pôvodnej odvodené nasledovným postupom. Ak maticu $X_{n \times p}$ transponujeme, dostávame $X'_{n \times p}$. Násobením pôvodnej X a transponovanej X' dostávame symetrickú, štvorcovú maticu s rozmermi $n \times n$ (A). Každý symetrickej matici $n \times n$, ktorej členy sú reálne čísla, možno priradiť (vypočítať) množinu n skalárov λ_i a k nim prislúchajúcim n nenulových vektorov \bar{x}_i , pre ktoré platí:

$$A\bar{x}_i = \lambda_i \bar{x}_i$$

Úpravou vzťahu dostaneme:

$$A\bar{x}_i - \lambda_i \bar{x}_i = 0$$

$$(A - \lambda_i I)\bar{x}_i = 0, \quad i = 1, 2, 3, \dots, n$$

Aby bolo možné vyňať \bar{x}_i pred zátvorku, do rovnice bol vložený člen I (jednotková matica). Skalár totiž nie je možné od matice odčítať, avšak maticu, ktorá je násobkom daného skalára a jednotkovej matice, áno. Rovnica:

$$(A - \lambda_i I)\bar{x}_i = 0$$

má nenulové riešenie iba vtedy, ak je determinant $(A - \lambda I)$ rovný 0, čo zapisujeme:

$$|(A - \lambda_i I)| = 0$$

Nakoľko narábame s maticou typu $n \times n$, determinant $(A - \lambda I)$ je polynómom n -tého stupňa s koreňmi $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_n$. Tie potrebujeme vypočítať. Keďže pri kvantitatívnej FTIR spektroskopii sa počet kalibračných vzoriek (n) pohybuje prinajmenšom v desiatkach, nájdenie týchto koreňov (t.j. vlastných hodnôt) môže byť po výpočtovej stránke náročná úloha, pričom platí, že polynóm n -tého stupňa bude mať maximálne n nenulových riešení. V optimálnom prípade tak pre maticu XX' získame maticu vlastných vektorov ($U_{n \times n}$), ako aj diagonálnu maticu vlastných hodnôt, ktoré k daným vektorom prislúchajú. Podobne postupujeme aj v prípade matice $p \times p$, ktorú dostaneme násobením transponovanej X' pôvodnou X . K tejto matici analogickým spôsobom získame maticu vlastných vektorov P' s rozmermi $n \times p$. Matica vlastných hodnôt prislúchajúca k vektorom matice P' , obsahuje na diagonále n členov, ktoré sú zároveň vlastnými hodnotami k vektorom matice U . Obe matice (XX' a $X'X$) teda zdieľajú časť vlastných hodnôt, pričom rozdiel je iba v tom, že $X'X$ je rozmernejšou, čo pri výpočte vyústi do väčšieho počtu vlastných hodnôt. Odmocnením vlastných hodnôt λ_i dostávame singulárne hodnoty diagonálnej matice $L_{n \times n}$. Základné vektory matíc $U_{n \times n}$ a $P'_{n \times p}$ sú navzájom ortogonálne a naškálované tak, že platí:

$$U'U = P'P = I$$

Pokiaľ ide o rozdiel medzi maticami U a T , tak pre T platí, že jej členy sú vážené singulárnymi hodnotami matice A (čo znamená, že členy T nie sú normované). Uvedené dve matice (U a T) sa zvyknú nazývať maticami komponentných skóre (scores), zatiaľ čo matica P' označuje tzv. maticu komponentných záťaží (loadings).

Jednotlivé singulárne hodnoty sú naprieč diagonálnou maticou A usporiadané zostupne:

$$\lambda_1^{1/2} > \lambda_2^{1/2} > \dots > \lambda_n^{1/2}$$

Pri PCA veľkosť vlastných hodnôt (a tým pádom aj jednotlivých $\lambda_i^{1/2}$) súvisí s tým, ako sa k nim prislúchajúce vlastné vektory podieľajú na modelovaní rozptylu pôvodnej matice X . Na druhej strane, pri PCR sa využíva lineárna kombinácia niekoľkých vektorov matíc T a P za účelom kvantifikácie určitej vlastnosti vzorky, pričom na predikcii sa významne môžu podieľať aj vektory, ku ktorým prislúchajú nižšie vlastné hodnoty. Podmienkou je, že množstvo hlavných komponentov použitých v regresnom modeli (r) musí byť $< n - 1$. V praxi je však množstvo použitých komponentov často výrazne nižšie (< 20) v porovnaní s množstvom vzoriek (n). Regresná rovnica vyjadrujúca vzťah medzi T a vlastnosťou, ktorá je predmetom záujmu, má tvar:

$$y_{n \times 1} = T_{n \times r} b_{r \times 1} + e_{n \times 1}$$

kde

$$b_{r \times 1} = (T'_{r \times n} T_{n \times r})^{-1} T'_{r \times n} y_{n \times 1}$$

Uvedené vzťahy možno použiť aj v prípade predikcie

hodnoty y pre neznámu vzorku a to tak, že sa dané spektrum (prípadne jeho časť) najprv dosadí do rovnice x_{1xp} :

$$t_{1xn} = x_{1xp} P_{pxn}$$

pričom hodnotu y získame použitím prvého z dvoch vyššie uvedených vzťahov.

4.2. Regresia čiastočných najmenších štvorcov

Podobne ako pri PCR, aj pri regresii čiastočných najmenších štvorcov (Partial Least Squares Regression, skrátene PLSR), sa využíva v princípe analogický postup rozkladu matíc viacrozmerných dát. Jedným z podstatných rozdielov v porovnaní s PCR je, že pri PLSR sa rozkladá nielen matica X , ale aj matica vysvetľovaných premenných Y . Z tejto skutočnosti vyplýva, že pri PLSR je možné regresne analyzovať viacero závislých premenných súčasne. Ako už bolo spomenuté v predchádzajúcej časti, pri PCA, resp. pri znižovaní rozmernosti matíc s množstvom vysvetľujúcich premenných, je možné postupovať viacerými spôsobmi. V tejto súvislosti bol opísaný singulárny rozklad matice (SVD). Okrem tohto postupu sa zvyknú používať aj tzv. nelineárne iteratívne algoritmy, konkrétne NIPALS (Nonlinear Iterative Partial Least Squares). Rozdiel v porovnaní s SVD spočíva v tom, že pri uplatnení algoritmu NIPALS sa hlavné komponenty počítajú postupne. Zatiaľ čo v súvislosti s PCR autori chemometricky orientovaných prác zvyknú uvádzať oba spôsoby výpočtu hlavných komponentov (SVD aj NIPALS), pri PLS regresii prevažuje iteratívny spôsob výpočtu hlavných komponentov. Algoritmus NIPALS je po výpočtovej stránke síce menej náročný, avšak metóda SVD je považovaná za stabilnejšiu. V praktických situáciách vedú obidva spôsoby väčšinou k dosiahnutiu zrovnateľných, resp. podobných výsledkov.

Na základe počtu vysvetľovaných premenných rozlišujeme niekedy medzi dvoma základnými typmi regresie PLS1 a PLS2. Zatiaľ čo v prípade PLS1 objasňujeme variabilitu iba jednej premennej y , pri PLS2 je regresná analýza zameraná na variabilitu dvoch, alebo viacerých y súčasne. Od tohto aspektu sa odvíja konkrétna podoba algoritmu NIPALS. V prípade, ak je prítomná iba jedna vysvetľovaná premenná, nie je dôvod nazývať algoritmus iteratívnym. Vo všeobecnosti možno princíp použitia algoritmu NIPALS za účelom PLS regresie opísať nasledovne³⁴:

- (1) Je potrebné získať počiatočný vektor u . Zvyčajne pôjde o jeden zo stĺpcov Y . V prípade, ak má Y iba jeden stĺpec, $u = y$
- (2) Vypočítame váhy X , w : $w = X^T u / u^T u$, ktoré následne normujeme tak aby platilo $\|w\| = 1$
- (3) Vypočítame skóre X , t : $t = Xw$
- (4) Vypočítame váhy Y , c : $c = Y^T t / t^T t$
- (5) Vypočítame aktualizovaný súbor skóre Y , u : $u = Yc / c^T c$
- (6) Po zmene t sa testuje konvergencia, podľa vzťahu:

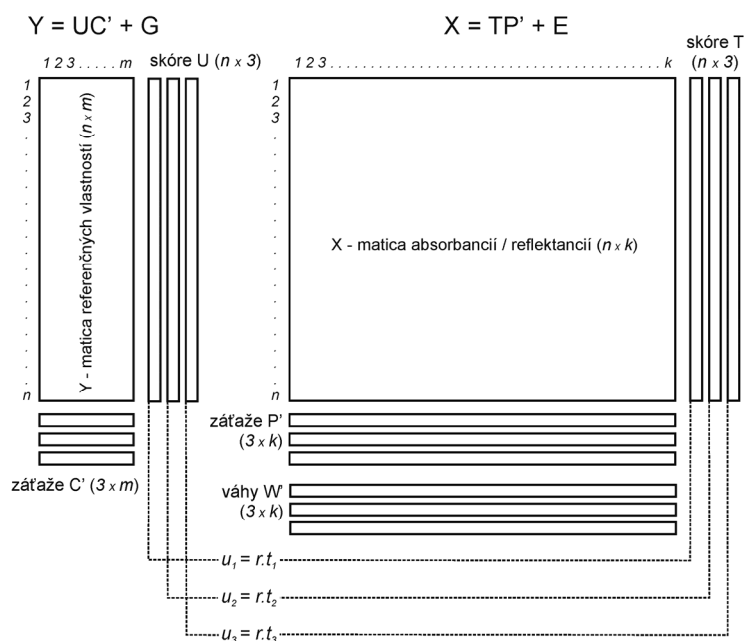
$$\|t_{staré} - t_{nové}\| / \|t_{nové}\| < \varepsilon$$

pričom hodnota ε by mala byť dostatočne nízka (napr. 10^{-6} až 10^{-8}). V prípade, ak táto podmienka nie je splnená, je potrebné sa vrátiť k bodu 2. V opačnom prípade, ako aj v situácii, keď má matica Y len jeden rozmer, sa pokračuje ďalej.

- (7) V ďalšom kroku je každá z matíc (X a Y) zbavená istého podielu informácie. Od X sa odčíta súčin komponentového skóre (t) a komponentového vektora záťaže (p) matice X , a od Y súčin komponentového skóre (t) a komponentových váh (c) matice Y .
- (8) Celý proces sa opakuje od začiatku (bod 1, zvolením nového u) dokiaľ matica X obsahuje informácie o variabilite Y , čo môžeme posúdiť napr. krížovým overovaním. Schematické znázornenie jednotlivých vektorov, resp. matíc PLS modelu, ktoré boli zmienené v tejto časti, prezentuje obr. 1.

4.3. Umelé neurónové siete

Umelé neurónové siete (al. skrátene neurónové siete, Artificial Neural Networks, ANN) je označenie pre množinu matematických modelov, ktorých architektúru možno prirovnáť k sieťam neurónov v biologických systémoch. Existuje viacero typov ANN, pričom ich spoločným menovateľom je koncepcia vzájomne prepojených výpočtových uzlov. Aktivita neurónu je daná vstupnou premennou, váhovým a prahovým koeficientom (bias) a prenosovou (aktivačnou) funkciou. Do jedného neurónu môže vstupovať jedna skalárna hodnota, alebo aj usporiadaná n -tica hodnôt (vektor). Každý člen vstupnej premennej je násobený váhovým koeficientom, získané súčiny sú následne sčítané a k výsledku sa priráta ešte prahový koeficient (bias). Po sčítaní je hodnota spracovaná prenosovou funkciou. V tejto súvislosti môžu byť použité rôzne funkcie, napr. diskretná (skoková), lineárna, ako aj spojité nelineárne funkcie (napr. sigmoidálna, alebo radiálna bázová f.). Váhové a prahové koeficienty sú modifikovateľné, pričom bias sa môže alebo nemusí použiť. Opísaný model neurónu sa v literatúre označuje aj ako perceptrón³⁵. Pre topológiu väčšiny modelov ANN, ktoré boli doposiaľ použité pri kalibrácii spektroskopických meraní, je charakteristické usporiadanie neurónov vo vrstvách. Každý uzol jednej vrstvy je prepojený s každým uzlom susednej vrstvy, avšak neuróny v rámci tej istej vrstvy prepojené nie sú. Spravidla rozlišujeme medzi tromi typmi vrstiev: jednou vstupnou, jednou výstupnou a variabilným počtom skrytých vrstiev. Práve neuróny skrytej vrstvy (vrstiev) sú zodpovedné za modelovanie vstupnej premennej. Váhové a prahové koeficienty neurónov jednotlivých vrstiev sa nastavujú iteratívne v procese učenia, resp. tréningu siete, pričom algoritmus tohto procesu závisí od konkrétneho modelu. Napr. pri ANN, ktoré spracúvajú vstupnú hodnotu jednosmerne naprieč jednotlivými vrstvami (feed-forward), sa často stretávame s metódou spätného šírenia (back propagation), ktorá mení nastavenia jednotlivých uzlov od konca, t.j. od výstupnej vrstvy k vstupnej. Iný mechanizmus sa uplatňuje pri tzv. rekurentných sieťach, kde si časť neurónov po určitú dobu uchová informáciu

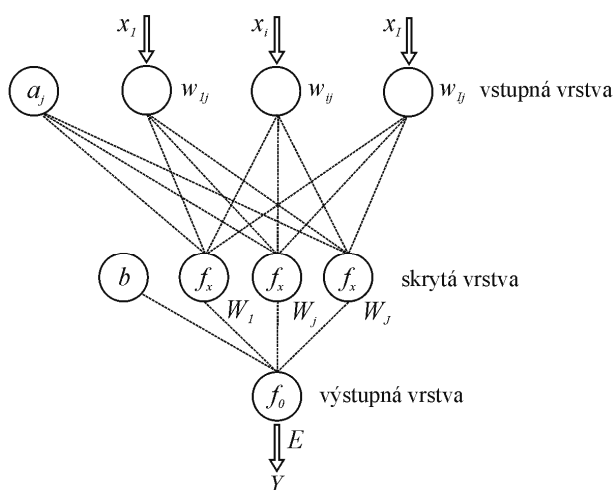


Obr. 1. Znáznornenie súčastí PLS modelu: každá z matic (Y, X) je vyjadrená ako súčin matice skóre a matice záťažei (v tomto prípade ide o trojkomponentový model, čiže každú maticu reprezentujú tri vektory skóre a tri vektory záťažei); pri výpočte vektorov (skóre a záťažei) sa uplatňuje kritérium, aby získané skóre matice X vykazovali maximálnu koreláciu s vektormi skóre matice Y

o svojich aktiváciách v predchádzajúcich krokoch. Tie sú následne odoslané tzv. kontextovým neurónom na to, aby mohli byť zohľadnené na vstupe pri opätovnej aktivácii skrytej vrstvy v nasledujúcom kroku. Rekurencia ANN jednak zavádza obojsmernú komunikáciu jednotlivých vrstiev neurónov a zároveň vytvára dobrý predpoklad na predikciu časovo variabilných hodnôt³⁶. Z pohľadu architektúry, ako aj algoritmu tréovania siete, predstavujú samostatnú skupinu modely ANN, ktoré pri tréovaní nemajú informáciu o požadovanom výstupe. V takomto prípade model upravuje váhové koeficienty na základe štruktúry dát vstupnej premennej. Príkladom uvedeného typu ANN sú Kohonenove samoorganizujúce sa mapy. Ide o model jedno, dvoj, alebo viacrozmernej mriežky neurónov s pravidelným usporiadaním, kde susedné uzly sú navzájom prepojené (často používanými sú 2D siete). K vrstve neurónov korešponduje vrstva váh, ktorá je zároveň vstupnou vrstvou. V prvom kroku tréovania sa váham neurónov priradia náhodné hodnoty, s ktorými je následne konfrontovaný vstupný vektor. Neurón, ktorého váhový vektor je najbližšie k aktuálnemu vstupu v zmysle euklidovskej vzdialenosti, sa označí ako víťazný. Hodnoty ostatných váhových vektorov sú následne prepočítané na základe zvoleného polomeru a konkrétnej funkcie okolia víťazného neurónu. Po adaptácii váh sa opätovne identifikuje víťazný neurón a celý cyklus sa opakuje podľa zvoleného počtu iterácií³⁷. Výsledkom tréovania siete je rozčlenenie neurónov do zhlukov, na základe asociácií detegovaných v matici vstupných dát. Keďže tieto ANN v rámci procesu učenia nepoznajú referenčnú hodnotu

(požadovaný výstup), s ich priamym využitím na predikciu parametra vzorky sa väčšinou nestretávame. Na druhej strane uvedené modely môžu byť nápomocné pri riešení problémov s nelinearitou kalibrácie spektroskopických meraní (AAS)³⁸. Keďže problematika ANN je značne komplexná, cieľom tejto časti je podať iba základné informácie o ich architektúre a fungovaní. Často uvádzaným dôvodom ich využitia pri kalibrácii FTIR merania je, že v porovnaní s konvenčnými postupmi lepšie modelujú prípadnú nelinearitu medzi parametrom vzorky a jeho spektrálnou odozvou³⁹. Techniky ANN možno navyše kombinovať či už s PCR, alebo PLS regresiou, čo znamená, že vstupnou premennou pre model nemusia byť spektrá, ale napr. vybrané PCR alebo PLS skóre.

Ako už bolo naznačené, pri kalibrácii kvantitatívneho FTIR merania nachádzajú uplatnenie najmä modely doprednej neurónovej siete so spätným šírením (feedforward back-propagation). Konkrétny príklad aplikácie tohto typu ANN pri kalibrácii FTIR analýz pôdnych vzoriek možno nájsť v práci austrálskych autorov⁹. Do daného modelu vstupujú tri premenné x , ktoré sú spracúvané dvoma vrstvami neurónov, vstupnej vrstvy I a skrytej J , pričom každá z nich je tvorená tromi uzlami (obr. 2). Aktivita uzlov vo vrstve I je charakterizovaná váhovými koeficientmi (w_{ij}) a sigmoidálnou aktivačnou funkciou (f_x). V rámci vrstvy J je aktivita skrytých neurónov tiež charakterizovaná váhovými koeficientmi W_j a ďalšou sigmoidálnou funkciou f_0 . Okrem zmienených členov sú súčasťou modelu koeficienty a_j a b , ktoré slúžia na modelovanie systematickej chyby (bias) vo vstupnej a skrytej vrstve, ako aj koeficient E ,



Obr. 2. Schematické znázornenie modelu doprednej ANN so spätným šírením, ktorý bol použitý na predikciu viacerých pôdnych vlastností⁹

ktorý modeluje zostatkovú (náhodnú) chybu. Výsledkom výstupného uzla je odhadovaná hodnota cieľného parametra (Y). Vstupnými hodnotami x_i pre I vzoriek môže byť napr. súbor bodov spektrálnych dát a Y môžu byť požadované koncentrácie určitých zložiek. Opísaný model možno vyjadriť nasledovne:

$$Y = f_0 \left[\sum_{j=1}^J W_j f_x \left(\sum_{i=1}^I w_{ij} x_i + a_j \right) + b \right] + E$$

Parametre a_j , b , w_{ij} , W_j a E sa získajú vo fáze tréovania siete. Koeficienty w_{1i} až w_{Ij} predstavujú vstupné váhy jednotlivých neurónov vrstvy I , ktorými je násobená každá z hodnôt x_i , pričom váhami W_1 až W_J sa násobí obsah každého neurónu skrytej vrstvy. Funkcie f_0 a f_x môžu byť buď lineárne alebo nelineárne. Okrem zmieného sigmoidu možno použiť aj ďalšie, napr. hyperbolické funkcie. Na to, aby mohol byť uskutočnený výpočet predikcie, je potrebné najprv kalibráciou získať hodnoty w_{ij} a W_j pre každú premennú s podmienkou, aby bola hodnota E minimálna.

5. Validácia kalibračných modelov

Rutinne používaným ukazovateľom kvality rôznych regresných modelov je koeficient determinácie (R^2), ktorý vyjadruje pomer objasneného rozptylu premennej y k jej celkovému rozptylu. Pri kalibráciách sa za účelom posúdenia kvality predikcie používajú aj ďalšie ukazovatele a diagnostické nástroje, napr. stredná kvadratická chyba kalibrácie (Root Mean Square Error of Calibration, RMSEC), stredná kvadratická chyba predikcie modelu (RMSEP), alebo stredná kvadratická chyba krížového overovania modelu (RMSECV)³².

Chybu kalibrácie možno vyjadriť mierou zhody medzi hodnotami koncentrácií, ktoré boli získané predikciou

a referenčnými hodnotami kalibračných vzoriek:

$$RMSEC = \left[\frac{1}{n-m-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \right]^{1/2}$$

Pre RMSEC je charakteristické, že môže nadhodnocovať predikčnú schopnosť modelu, nakoľko časť šumu prítomného v štandardoch je modelovaná odhadovanými parametrami. Hodnota RMSEC navyše často klesá iba následkom použitia viacerých hlavných komponentov v rámci určitého modelu, čo neodráža presnosť odhadu pri jeho použití v praxi⁴⁰. Aj preto sa v rámci testovania kvality predikcie zvyknú počítať aj ďalšie charakteristiky, ktoré si okrem kalibračných vzoriek vyžadujú aj vzorky validačné.

Ak máme k dispozícii dostatočný počet spektroskopických meraní a k nim prislúchajúcich referenčných hodnôt, je vhodné buď rozdeliť súbor na dva (kalibračný a validačný), alebo iteratívne vyčleňovať z kalibračného súboru konkrétne počty vzoriek a na nich overovať predikčnú schopnosť modelu. Počet validačných vzoriek by mal byť dostatočný na to, aby hodnota odhadutej predikčnej chyby odrážala všetky zdroje variability, ktoré sú v kalibračnej metóde zahrnuté. RMSEP sa vypočíta podľa vzťahu:

$$RMSEP = \left[\frac{1}{P} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \right]^{1/2}$$

kde P je počet validačných vzoriek. Na odhad predikčnej schopnosti sa používa tiež metóda krížového overovania (Cross Validation, CV). Jej najjednoduchšou verziou je krížové overovanie s vynechaním jednej vzorky (Leave One Out Cross Validation, LOOCV). V tomto prípade sa postupne z kalibračného súboru vyraduje vždy jedna vzorka, na ktorej sa následne (po vykonaní kalibrácie použitím spektier zvyšných vzoriek) otestuje predikcia príslušného parametra. Takto sa postupne vyradí každá zo vzoriek kalibračného súboru. Vzťah pre výpočet RMSECV je v podstate rovnaký ako RMSEP, s tým rozdielom, že v prípade RMSECV sa suma štvorcov odchýlok nedelí P , ale počtom vzoriek v kalibračnom súbore (n).

V rámci krížového overovania možno samozrejme vyradovať aj väčší počet vzoriek ako jednu. Cieľom ich vyradovania a opätovnej recalibrácie býva, nielen nájdenie takej skupiny vzoriek, u ktorých kalibrácia povedie k uspokojivo presnej predikcii, ale aj identifikácia odľahlých vzoriek a optimálny výber hlavných komponentov, ktoré sa pri kalibrácii používajú. Je na mieste spomenúť, že v niektorých prípadoch ani RMSECV nemusí byť vhodným ukazovateľom pre posúdenie kvality regresného modelu. To sa vzťahuje napr. na situáciu, ak je pri krížovom overovaní vyradovaná iba jedna vzorka a zároveň nedostupujeme dostatočným počtom meraní³². Príkladom kritického posúdenia je, keď počet validačných vzoriek prevyšuje počet kalibračných. Tento prístup je známy aj pod názvom Monte Carlo CV (alebo aj Leave Multiple Out CV). Pri hodnotení kvality modelov sa zvyknú používať aj ďalšie ukazovatele, napr. pomer smerodajnej odchýlky súboru referenčných hodnôt a strednej kvadratickej chyby

Tabuľka I

Príklady parametrov pôdnych vzoriek, ktoré boli úspešne kvantifikované použitím FTIR spektroskopie (každá vlastnosť má priradený frekvenčný interval merania, kalibračnú metódu, počet kalibračných /validačných vzoriek, hodnotu R^2 a číslo lit. zdroja v zozname)

Parameter pôdnej vzorky	Spektrálna oblasť [nm]	Kalib. metóda	nkal/nval	R^2	Lit.
Ca (g/kg)	VIS-NIR (400–2500)	modif. PLSR	309	0,9	23
Mg (g/kg)	VIS-NIR (400–2500)	modif. PLSR	315	0,9	23
OM (%)	VIS-NIR (400–2500)	ANN	41	0,86	42
As (mg/kg)	NIR (830–2500)	PLSR	67 33	0,86	10
Cu (mg/kg)	NIR (830–2500)	PLSR	56 27	0,85	10
Zn (mg/kg)	NIR (830–2500)	PLSR	64 31	0,86	10
As (mg/kg)	MIR (2500–25000)	PLSR	68 34	0,85	10
Zn (mg/kg)	MIR (2500–25000)	PLSR	60 29	0,9	10
Corg (%)	NIR (1100–2500)	RBFN	140 60	0,96	43
C-CO ₃ (g/kg)	VIS-NIR (400–2498)	PLSR	76 32	0,96	44
Ctot (g/kg)	VIS-NIR (400–2498)	PLSR	76 32	0,91	44
Ntot (g/kg)	VIS-NIR (400–2498)	PLSR	76 32	0,86	44
Corg (g/kg)	VIS-NIR (400–2498)	PLSR	76 32	0,89	44
Ctot (g/kg)	VIS-NIR (400–2498)	PCR	30 119	0,87	45
Ntot (g/kg)	VIS-NIR (400–2498)	PCR	30 119	0,85	45
CEC (cmol/kg)	MIR (2500–25000)	PLSR	183	0,88	46
Exch-Ca (cmol/kg)	MIR (2500–25000)	PLSR	183	0,89	46
Ntot (%)	MIR (2500–25000)	PLSR	188	0,86	46
Corg (%)	MIR (2500–25000)	PLSR	188	0,93	46
LR (t/ha)	MIR (2500–25000)	PLSR	188	0,86	46
CEC (cmol/kg)	MIR (2500–20000)	PLS-ANN	708 256	0,91	9
Exch-Ca (cmol/kg)	MIR (2500–20000)	PLS-ANN	708 256	0,89	9
Exch-Mg (cmol/kg)	MIR (2500–20000)	PLS-ANN	708 256	0,92	9
P-sorp (mg/kg)	MIR (2500–20000)	PLS-ANN	708 256	0,87	9
Ctot (%)	MIR (2500–20000)	PLS-ANN	708 256	0,94	9
OM (%)	MIR (2500–25000)	PLSR	31 x-val	0,98	47
C-CO ₃ (g/kg)	MIR (2500–25000)	PLSR	177 60	0,98	4
Ctot (g/kg)	MIR (2500–25000)	PLSR	177 60	0,95	4
C-CO ₃ (g/kg)	NIR (1100–2498)	PLSR	177 60	0,87	4
Ctot (g/kg)	NIR (1100–2498)	PLSR	177 60	0,86	4
Corg (g/kg)	MIR (2500–25000)	PLSR	177 60	0,94	4
Ntot (mg/kg)	NIR (1100–2300)	PLSR	180 x-val	0,94	6
Corg (mg/kg)	NIR (1100–2300)	PLSR	180 x-val	0,94	6
Ntot (mg/kg)	NIR (1100–2498)	PLSR	120 59	0,95	48
Nact (mg/kg)	NIR (1100–2498)	PLSR	120 59	0,92	48
CEC (cmol/kg)	VIS-NIR (350–2500)	MARS	493 247	0,88	7
Exch-Ca (cmol/kg)	VIS-NIR (350–2500)	MARS	493 247	0,88	7
Corg (g/kg)	NIR (830–2630)	PLSR	393 x-val	0,98	2
Ntot (g/kg)	NIR (830–2630)	PLSR	393 x-val	0,95	2
CEC (cmol/kg)	NIR (830–2630)	PLSR	265 x-val	0,92	2

Tabuľka I
Pokračovanie

	Parameter pôdnej vzorky	Spektrálna oblasť [nm]	Kalib. metóda	nkal nval	R ²	Lit.
Fyzikálne vlastnosti	w po vysušení v lab. (g/g)	UV-VIS-NIR(250–2500)	PCR	121 40	0,85	49
	častice s veľk. 2-0,25mm (%)	MIR (2500–25000)	PLSR	88	0,94	46
	w30kPa (%)	MIR (2500–25000)	PLSR	23	0,9	46
	w1500kPa (%)	MIR (2500–20000)	PLSR	96 x-val	0,85	3
	PWP (%)	MIR (2500–20000)	PLS-ANN	708 256	0,89	9
	w (%)	MIR (2500–20000)	PLS-ANN	708 256	0,89	9
	w-10kPa (%)	MIR (2500–25000)	PLSR	93 39	0,8	15
	w-1500kPa (%)	MIR (2500–25000)	PLSR	91 39	0,82	15
	lineárne zmršťovanie pôdy	MIR (2500–25000)	PLSR	80 27	0,87	15
	w (%)	NIR (830–2630)	PLSR	393 x-val	0,96	2
	WHC (%)	NIR (830–2630)	PLSR	393 x-val	0,86	2
Biologické vlastnosti	MBC (mg/kg)	NIR (830–2630)	PLSR	393 x-val	0,91	2
	BSR (mg C-CO ₂ /kg/h)	NIR (830–2630)	PLSR	393 x-val	0,92	2
	Fosfatáza (μmol PNP/g/h)	NIR (830–2630)	PLSR	393 x-val	0,93	2
	β-Glukozidáza (μmol PNP/g/h)	NIR (830–2630)	PLSR	393 x-val	0,93	2
	Baktérie (nmol/g)	NIR (830–2630)	PLSR	60 x-val	0,93	2
	G+ baktérie (nmol/g)	NIR (830–2630)	PLSR	60 x-val	0,91	2
	Aktinomycéty (nmol/g)	NIR (830–2630)	PLSR	60 x-val	0,92	2
	VAM huby (nmol/g)	NIR (830–2630)	PLSR	60 x-val	0,91	2
	MCB PLFAs (nmol/g)	NIR (830–2630)	PLSR	60 x-val	0,91	2

OM organický podiel, Corg organický uhlík, C-CO₃ anorganický (karbonátový) uhlík, Ctot celkový uhlík, Ntot celkový dusík, CEC kationová výmenná kapacita, Exch-Ca výmenný vápnik, Exch-Mg výmenný horčík, P-sorp sorbovaný fosfor, Nact aktívny dusík, w vlhkosť pôdy, LR potreba vápnenia, PWP bod vädnutia, WHC vododržná kapacita, MCB mikrobiálne viazaný uhlík, BSR bazálna respirácia pôdy, MCB PLFA biomasa mikroorganizmov vyjadrená sumou fosfolipidových mastných kyselín, RBFN radial basis function networks, MARS multivariate adaptive regression splines

predikcie (Ratio of Performance to Deviation, RPD)^{2,5}. Hodnota RPD zo štatistického hľadiska vyjadruje v podstate to isté ako koeficient determinácie (R²), a preto pri už takpovediac štandardnom použití R² nie je dôvod uvádzať aj RPD. Okrem toho je známe, že v prípade zošikmených súborov hodnôt, smerodajná odchýlka nie je optimálnym ukazovateľom ich variability. Ak vo vzťahu pre RPD nahradíme smerodajnú odchýlku, hodnotou rozpätia medzi prvým a tretím kvartilom príslušného súboru, dostaneme ukazovateľ, ktorého použitie nebude obmedzené normálnou distribúciou hodnôt daného súboru (ako je tomu pri RPD)⁴¹.

6. Záver

Príklady konkrétnych prác, v ktorých sa potvrdilo, že FTIR meranie môže viesť k uspokojivo presnému odhadu

rozličných parametrov pôd, uvádza tab. I. Ide o zoznam kvantifikovateľných vlastností, kde sú pre každú z nich uvedené: frekvenčný rozsah IR merania, použitá kalibračná metóda, počet kalibračných a validačných vzoriek (ak boli použité), pozorovaná hodnota koeficientu determinácie (R²), spolu s odkazom na zdrojový dokument. Z údajov vyplýva, že okrem rôznych frakcií pôdneho uhlíka (C_{org}, C-CO₃, C_{tot}), sa v rámci citovaných prác podarilo kvantifikovať aj obsahy iných prvkov, konkrétne Ca, Mg, Zn, Cu a As. Ďalšou vlastnosťou, ktorá bola viac krát predmetom úspešnej predikcie, sú charakteristiky tzv. sorpčného komplexu pôd. Ide buď o celkové množstvo výmenných kationov, ktoré pôda vďaka zápornému náboju koloidných látok viaže (kationová výmenná kapacita, CEC), alebo o obsah konkrétneho kationu (napr. Ca²⁺, Mg²⁺). Spomedzi fyzikálnych charakteristík je vhodné spomenúť predovšetkým vlhkosť pôdy, resp. obsah vody, ktorý si pôda udrží pri pôsobení určitého sacieho tlaku (hydrolimity pôd). Hoci na

predikciu biologických vlastností pôdy bolo doposiaľ zameraných menej prác, sú známe prípady kvantifikácie enzymatickej aktivity alebo odhady abundancie konkrétnych skupín pôdných mikroorganizmov.

Aj keď vo všeobecnosti možno konštatovať, že FTIR spektroskopia môže byť efektívnym nástrojom na získavanie kvantitatívnych dát o pôde, niektoré dôležité aspekty danej problematiky boli doposiaľ hodnotené len v obmedzenej miere. V prácach neraz absentuje informácia o konkrétnych hodnotách frekvenčných intervalov, v rámci ktorých boli hodnoty absorpcie použité ako nezávislá premenná regresného modelu (resp. ako vstup pre PCR alebo PLS procedúru). Publikácie často prezentujú iba všeobecný údaj o použití strednej, alebo blízkej časti IR spektra, pričom nie je jasné, či v celej jeho šírke, alebo v rámci vybraných intervalov, resp. konkrétnych hodnôt vlnočtov. V zásade platí, že čím väčší rozsah IR spektra sa pri regresii použije, tým ťažšie je interpretovať štatistickú závislosť, ktorú daný kalibračný model pri kvantifikácii využíva. S identifikáciou konkrétnych funkčných skupín atómov, na základe štatisticky významného vzťahu medzi absorpciou žiarenia s určitou vlnovou dĺžkou a kvantifikovanou vlastnosťou, sa v daných publikáciách stretávame len sporadicky. Je vhodné uviesť, že interpretácia PLSR, PCR alebo ANN modelov je z objektívnych dôvodov problematická¹⁵, pričom PLS faktory, a k nim prislúchajúce záťaž a hodnoty skóre, môžu mať v niektorých prípadoch iba štatistický význam. Tým pádom je problematické určiť, či je daný kalibračný vzťah založený na detekcii tých skupín atómov, ktorých relatívna početnosť priamo ovplyvňuje vlastnosť, ktorá je predmetom kvantifikácie (napr. organické funkčné skupiny pri kvantifikácii C_{org}). V prípade špecifických pôdných parametrov, akým je napr. obsah rizikových prvkov, sa môže stať, že model hodnoty odhadne na základe vibrácií funkčných skupín látok, s ktorými sa dané prvky v pôdach viažu (organická hmota, hydratované oxidy Fe, ílová frakcia). U pôd vyznačujúcich sa síce vyšším zastúpením týchto zložiek, ale zároveň nižšou koncentráciou uvažovaných prvkov, môže byť ich odhadnuté množstvo skreslené. Typickým príkladom nepriameho stanovenia je FTIR kvantifikácia hydrolimitov pôd. Vysvetľujúcim parametrom regresného modelu pre odhad vodoretennej schopnosti pôd bývajú hodnoty absorpcie, charakteristické pre ílové minerály a pôdnu organickú hmotu, keďže je známe, že tieto dve zložky významne ovplyvňujú vododržnú kapacitu pôdy¹⁶.

Dôležitým aspektom použitia FTIR predikcií, ktorému doposiaľ nebola venovaná náležitá pozornosť, je vzájomná príbuznosť uvažovaných vzoriek pôd z pohľadu ich genézy. Napr. viaceré práce citované v tomto príspevku pri kalibrácii vychádzali z FTIR analýzy austrálskych vzoriek, ktoré majú svoje špecifiká. Pôdy z tejto oblasti sú často intenzívne zvetrané, s prevahou hrubozrnného materiálu, nízkym podielom organickej frakcie, pričom môžu tiež obsahovať významné množstvá vysoko rozpustných solí. Vzhľadom na pôdy, ktoré sú charakteristické napr. pre stredoeurópsky región, ide o typy s výrazne odlišnou genézou a vlastnosťami. Štúdie, ktoré by pri zostavovaní kalib-

račných a validačných súborov kládli dôraz na optimálne zastúpenie pôd rôznej genézy, alebo hodnotili povedzme geografickú obmedzenosť použitia modelov, zatiaľ chýbajú. Aj napriek uvedenému je celkový prínos FTIR merania a realizovaných prác pre získavanie reprezentatívnych dát o pôde značný. Hodnota a jedinečnosť FTIR spektroskopie spočíva najmä v tom, že z jedného spektra umožňuje odvodiť niekoľko kvantitatívnych parametrov súčasne, čo z nej (FTIR) robí nástroj pre komplexnú charakterizáciu pôdnej vzorky.

Táto práca vznikla vďaka podpore vedeckej grantovej agentúry VEGA pre projekty 1/0614/17 a 1/0945/15, ako aj OP Výskum a vývoj pre projekt CEIPO (ITMS 26240120004), ktorý je spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

LITERATÚRA

1. Burns D. A., Ciurczak E. W. (ed.): *Handbook of Near-Infrared Analysis. Practical Spectroscopy Series*, zv. 35, CRC Press, Taylor & Francis Group, 3. vyd., New York 2008.
2. Zornoza R., Guerrero C., Mataix-Solera J., Scow K. M., Arcenegui V., Mataix-Beneyto J.: *Soil Biol. Biochem.* 40, 1923 (2008).
3. Janik L. J., Merry R. H., Forrester S. T., Lanyon D. M., Rawson A.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 207 (2007).
4. McCarty G. W., Reeves III J. B., Reeves V. B., Follett R. F., Kimble J. M.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 640 (2002).
5. Bartholomeus H. M., Schaepman M. E., Kooistra L., Stevens A., Hoogmoed W. B., Spaargaren O. S. P.: *Geoderma* 145, 28 (2008).
6. Reeves III J. B., McCarty G. W.: *J. Near Infrared Spec.* 9, 25 (2001).
7. Shepherd K. D., Walsh M. G.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66, 988 (2002).
8. Viscarra Rossel R. A., Walvoort D. J. J., McBratney A. B., Janik L. J., Skjemstad J. O.: *Geoderma* 131, 59 (2006).
9. Janik L. J., Forrester S. T., Rawson A.: *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 97, 179 (2009).
10. Dong Y.-W., Yang S.-Q., Xu C.-Y., Li Y.-Z., Bai W., Fan Z.-N., Wang Y.-N., Li Q.-Z.: *Pedosphere* 21, 591 (2011).
11. Bertaux J., Fröhlich F., IldDefonse P.: *J. Sediment. Res.* 68, 440 (1998).
12. Van Der Marel H. W., Beutelspacher H.: *Atlas of Infrared Spectroscopy of Clay Minerals and their Admixtures*. Elsevier, Amsterdam 1976.
13. Bellon-Maurel V., McBratney A.: *Soil Biol. Biochem.* 43, 1398 (2011).
14. Henderson A. R.: *Clin. Chim. Acta* 366, 112 (2006).
15. Minasny B., McBratney A. B.: *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 94, 72 (2008).
16. Stehlik M., Štěpánek L., Thulin M.: *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 130, 98 (2014).

17. Rawlings O., Pantula S. G., Dickey D. A.: *Applied Regression Analysis: A Research Tool*. Springer, 2. vyd. London 1998.
18. Meloun M., Militký J.: *Statistická analýza experimentálních dat*, str. 293. Academia, Praha 2004.
19. Mecklin C. J., Mundfrom D. J.: *Int. Stat. Rev.* 72, 123 (2004).
20. Haswell S. J., v kniže: *Practical Guide to Chemometrics* (Haswell S. J., ed.), kap. 2. Marcel Dekker Inc., New York 1992.
21. Huang X., Senthikumar S., Kravchenko A., Thelen K., Qi J.: *Geoderma* 141, 34 (2007).
22. Workman Jr. J. J., v kniže: *Handbook of Near-Infrared Analysis* (Burns D. A., Ciurczak E. W., eds.) kap. 7. Practical Spectroscopy Series, zv. 35, 3. vyd., CRC Press, Taylor & Francis Group, New York 2008.
23. Cozzolino D., Morón A.: *Soil Till. Res.* 85, 78 (2006).
24. Meloun M., Militký J.: *Statistická analýza experimentálních dat*, str. 278. Academia, Praha 2004.
25. Brown S. D., v kniže: *Practical Guide to Chemometrics* (Gemperline, P. ed.), kap. 10. 2. vyd. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006.
26. Helland I. S., Naes T., Isaksson T.: *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 29, 233 (1995).
27. Brereton R. G.: *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, str. 133. J. Wiley, Chichester 2003.
28. Rinnan Å., van den Berg F., Engelsen S. B.: *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 28, 1201 (2009).
29. McNaught A. D., Wilkinson A. (ed.): *Compendium of Chemical Terminology (the „Gold Book“)*, 2. vyd. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997.
30. Tatzber M., Stemmer M., Spiegel H., Kitzberger C., Haberhauer G., Gerzabek M. H.: *Environ. Chem. Lett.* 5, 9 (2007).
31. Reig F. B., Gimeno Adelantado J. V., Moya Moreno M. C. M.: *Talanta* 58, 811 (2002).
32. Kalivas J. H., Gemperline P. J., v kniže: *Practical Guide to Chemometrics* (Gemperline, P. ed.), kap. 5, 2. vyd. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2006.
33. Rawlings O., Pantula S. G., Dickey D. A.: *Applied Regression Analysis: A Research Tool*, str. 60, 2. vyd. Springer, London 1998.
34. Wold S., Sjöström M., Eriksson L.: *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 58, 109 (2001).
35. Hagan M. T., Demuth H. B., Beale M. H., De Jesús O.: *Neural Network Design*, kap. 2 až 4, 2 vyd. Martin Hagan, 2014. <http://hagan.okstate.edu/NNDesign.pdf>, staženo 25.3.15.
36. Kvasnička V., Beňušková Ľ., Pospíchal J., Farkaš I., Tiňo P., Král A.: *Úvod do teórie neuronových sietí*. kap. 5 a 6, IRIS, Bratislava 1997.
37. Rojas R.: *Neural Networks: A Systematic Introduction*. str. 396, 1. vyd. Springer, Berlin 1996.
38. Heyden Y. V., Vankeerberghen P., Novic M., Zupan J., Massart D. L.: *Talanta* 51, 455 (2000).
39. Dou Y., T. Zou T., Liu T., Qub N., Ren Y.: *Spectrochim. Acta A* 68, 1201 (2007).
40. Brereton R. G.: *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, str. 314. J. Wiley, Chichester 2003.
41. Bellon-Maurel V., Fernandez-Ahumada E., Palagos B., Roger J.-M., McBratney A.: *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 29, 1073 (2010).
42. Daniel K. W., Tripathi N. K., Honda K.: *Aust. J. Soil Res.* 41, 47 (2003).
43. Fidêncio P. H., Poppi R. J., De Andrade J. C.: *Anal. Chim. Acta* 453, 125 (2002).
44. Chang C.-W., Laird D. A.: *Soil Sci.* 167, 110 (2002).
45. Chang C.-W., Laird D. A., Mausbach M. J., Hurburgh Jr. C. R.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65, 480 (2001).
46. Janik L. J., Merry R. H., Skjemstad J. O.: *Aust. J. Exp. Agr.* 38, 681 (1998).
47. Masserschmidt I., Cuelbas C. J., Poppi R. J., De Andrade J. C., DeAbreu C. A., Davanzo C. U.: *J. Chemometr.* 13, 265 (1999).
48. Reeves III J. B., McCarty G. W., Meisinger J. J.: *J. Near Infrared Spec.* 7, 179 (1999).
49. Islam K., Singh B., McBratney A. B.: *Aust. J. Soil Res.* 41, 1101 (2003).

I. Šimkovic (*Department of Soil Science, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava*):
Chemometric Tools for Quantitative FTIR Spectroscopy of Soils

The potential of FTIR spectroscopy to provide reliable quantitative data on soils has been explored intensively within last decade and a number of works dealing with this subject have been published. In these studies (similarly as in other areas of chemical analysis), calibration of FTIR data was performed mainly by use of multivariate statistical techniques. In this context, principal component regression (PCR) or partial least squares regression (PLS) has been frequently employed. In some studies, however, more advanced calibration models, such as artificial neural networks (ANN) have been used. The aim of the present contribution was to summarize basic knowledge of multivariate calibration techniques used in quantitative FTIR spectroscopy of soils. It reviews fundamental aspects of quantitative measurement using FTIR, characterizes the principles of the preliminary data exploration, and discusses pre-processing possibilities of collected spectra. A substantial part of the text deals with the PCR and PLS techniques, the use of which is characteristic for the FTIR calibration. Besides PCR and PLS, the theory of ANN is briefly discussed and the example of its use is included. Particular methods which serve for accuracy assessment of calibration models are presented as well.