<u>การใช้โปรแกรม OPUS</u>

โปรแกรม OPUS เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการจัดการวิเคราะห์ผล spectrum ที่ได้จากการวัดตัวอย่างด้วย เทคนิค FTIR spectroscopy โดยสามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้หลายรูปแบบ เช่น ตัวอย่างทางชีววิทยา ได้แก่ เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชและสัตว์ ตัวอย่างแบคทีเรียและเชื้อรา เส้นผม เป็นต้น และตัวอย่างอื่น ๆ เช่น ตัวอย่างดิน polymer หรือ แผ่นฟิล์ม เป็นต้น โดยโปรแกรม OPUS จะสามารถจัดกลุ่มของตัวอย่างตามลักษณะของ spectrum ที่ปรากฏในแต่ละตัวอย่างนั้น ๆ

<u>การเริ่มต้นการใช้งานโปรแกรม OPUS</u>

1. เปิดโปรแกรม OPUS โดย double click ที่ไอคอน OPUS ดังรูป



2. จะปรากฎหน้าต่างให้ใส่ password "OPUS" จากนั้นคลิก login

OPUS Login		
User ID:	Default •	ADMINISTRATOR
Password:		
Assigned workspaces:	C:\0PUS_7.2.139.1294\default.ow	s
Login	Exit fro	om OPUS

3. จะปรากฎหน้าต่างแสดงการเข้าใช้งานโปรแกรม OPUS กด OK

OPUS - Operator: Default (Administrator) - [Display - defi	ultows]	R + Nutherstein	082
	bis 🔐 州	노 🏠 🗢 🕫 🖾 🚛 🍽 🖉 🔊 🖏 🖏 🐨 🖬 🖆 🗇 🖏 🚓	🗄 🔞 🛛
OPUS Browser a	S Evaluate Tobas	Eur wenő selieson Samb Liab	- 9×
	A-1	About OPUS	
	1 200	OPUS Version 7.2 Build: 7.2, 139, 1294 (2013)1089	
	00 ¹	Copylight = Blueker Copik Gradeh 2012 This Version of OPUS was Konneed to:	
	0000	TEBIOR 27 5/5154 Synchronic 1987 Present Justite 177 1730 3005559167520770	
	00 ¹ 0	Kay confirmed Available Packages	
	0.400	10 AR AR GRIDO DOUN ₩	
	002 0	Parts of this Software are based in part on the work of the independent JPEG Group.	
	0000		
	4000 3800	3000 3400 3200 3000 2800 2000 2400 2200 2800 1900 1000 1400 1200 1000 1	800 000 400
	t 🔲 Display	default.ows	¢ x
Info			

- 4. จะแสดงหน้าต่างโปรแกรม OPUS ซึ่งจะประกอบด้วย
 - File and window use list แสดงชื่อไฟล์ spectrum ที่เปิด
 - Spectrum window แสดง spectrum ตัวอย่าง
 - Overview window แสดงหน้าต่างมุมกว้างของ spectrum ทั้งช่วง
 - Tap of different OPUS view แสดงจำนวนหน้าต่างที่เปิด

OPUS - Operator: Default (Administrator) - (Display - default.ows)	
🗃 🗃 🖬 🔛 🖛 🏷 🐜 🎌 🏡 🏠 🍣 🕬	🖏 JA 111 🗩 📾 🔥 🕷 🖭 💷 🏥 🖄 🚸 🇮 🚷 🍴
🔿 Ele Edit Yew Window Measure Manipulate Evaluate Display Print Macro Validation Setup	Heb - 6 ×
	um window
File and window	
use list	
R o	- John M
3000 2960 2860 2780 2900 2900 2900 2900 2	280 2180 2880 1900 1800 1700 1888 1988 1980 1900 1200 1100 1988 900
Overview window	
	- Marine has
Info	Tab of different OPUS view

- 5. เมื่อคลิกขวาบริเวณ spectrum window จะปรากฏคำสั่งต่าง ๆ ประกอบด้วย
 - A : Zoom : In/out
 - B : Scale all spectra : Show spectra
 - C : Shift curve : Top/button/hole curve
 - D : Crosshair : Cursor point spectral peak
 - E : Change color
 - F : Remove from display : Not show in a spectral window
 - G : Add annotation : Add wavenumber
 - H : Copy/Copy all
 - I : Single peak pick : Add wavenumber
 - J : Properties : Properties of spectral window



- 6. เมื่อคลิกขวาบริเวณ file name จะปรากฏคำสั่งต่าง ๆ ประกอบด้วย
 - A : Save file : Save ทับไฟล์เดิม
 - B : Unload file ซปิดการแสดงข้อมูล ในหน้า spectrum window เฉพาะไฟล์ที่เลือก
 - B : Unload all files : ปิดการแสดงข้อมูล ในหน้า spectrum window ทั้งหมด
 - C : Undo all manipulations
 - D : Show parameters
 - E : Copy entry/Clone original



7. เมื่อคลิกขวาที่ file name แล้วเลือก show parameter จะปรากฏหน้าต่างแสดงค่า pareameter ใน การวัดตัวอย่างเช่น วันที่, เวลา, mode of measument, scan time resolution เป็นต้น

OPUS - Operator: Default (Administrator) - [Report-Display - default ows2]	Address opening and	
🗃 🗃 🖬 🗐 🗢 🐄 🚧 🚧 🐜 📩	🗧 🚓 RGB 🎇 🕼 🚻 🔎 🚓	🗟 🔥 👘 🖾 🖽 🖽 🖽 🗰
O File Edit View Window Measure Manipulate Evaluate Display Print Macro	g Vajidation Setup Help	- 5
OPUS Browser ● "HUR Training/A.20"1 Output Original ● "HUR Training/A.20"1 Output Original ● OPUS Browser Save File Unload All Files Informet Parameters Unload All Files Informet Parameters Copy Entry Clone Original	Acquisition Parameters Additional Data Treatment Acquisition Mode Correlation Test Mode Delay Before Messurement Stabilization Oblay Wanted High Frequency Limit Wanted High Frequency Limit Wanted High Frequency Limit Sample Mess. Duration in Min. Background Mess. Duration in Min. Sample Scans Background Scans Background Scans Background Scans Background Stations Barple Scans or Time BG Scans or Time BG Scans or Time Command Line for Additional Data Treatment To do List Signal Gain, Background 2nd Channel Signal Gain, Background 2nd Channel	Values 2 Double Sided, Forward-Backward 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 100000 0 22,00000 22,00000 22,00000 Scans scans Scans strint 37 ad Automatic Automatic Automatic
+ + _ + _ E Display - default.ows:1 🛄	Report-Display - default.ows:2	b 3

- บริเวณด้านบนแถบเครื่องมือ จะปรากฏคำสั่ง
 ที่ใช้งานบ่อย ๆ เช่น
 - Load file แสดงการเปิดไฟล์
 - Unload file แสดงการปิดไฟล์ที่เลือก
 - Unload all files แสดงการปิดไฟล์ ทั้งหมด
 - Save file as/save file การเซฟไฟล์

คำสั่งในการทำ data preprocessing เช่น

- Applying water-compensation
- Cut
- Smooth
- Baseline correction
- Normalize
- Calculate derivative

คำสั่งในการจัดการวิเคราะห์ spectrum เช่น

- Average
- Integration
- Cluster analysis
- Multiple tracing

Load file	Applying Water-compensation	
Unload file		Integration
Unload all files	Baseline correction	Cluster analysis
Save file as	Normalize	
Save file	Calculate derivative	RGB Multiple tracing

<u>การ extract spectrum</u>

การ extract spectrum เป็นการแตก spectrum จากไฟล์ใหญ่ 1 ไฟล์ ออกเป็น spectrum หลาย ๆ spectrum โดยการ extract spectrum สามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับการเลือกวัดตัวอย่าง เช่น

1. การวัดแบบ single point คือการเลือกวัดสเปคตรัมแบบสุ่มหลายๆ จุดจากหลายตำแหน่ง



 เมื่อต้องการ extract spectrum ให้โหลดไฟล์ spectrum ของตัวอย่างนั้น ๆ ขึ้นมา แล้วคลิกเลือก spectrum บริเวณตำแหน่งที่ต้องการ



- 3. โดยรายชื่อ spectrum ที่เลือกจะปรากฏในหน้า list จากนั้นเลือก spectrum ทั้งหมด
 - คลิกขวา เลือก extract data
 - เลือก extract dialog
 - ตั้งชื่อไฟล์ แล้วกด extract



4. การวัดแบบ mapping คือการวัดสเปคตรัมในตำแหน่งพื้นที่ที่กำหนด





โดยสามารถ extract spectrum ได้ 2 วิธี คือ

- 4.1 เลือก Extract spectrum เฉพาะจุดที่ต้องการจากตัวอย่าง Mapping โดยใช้เมาส์คลิกเลือก spectrum ที่ต้องการทีละจุด
- คลิกขวา เลือก extract data
- เลือก extract spectrum
- ตั้งชื่อไฟล์ แล้วกด extract



4.2 เลือกเอาเฉพาะสเปคตรัมบริเวณที่ต้องการ extract จากตัวอย่าง Mapping

- 4.3 เลือก extract spectrum ทั้งหมดจากตัวอย่าง Mapping
- คลิกขวาที่หน้า window spectrum เลือก add selection rectangular
- crop เลือกบริเวณที่ต้องการ extract spectrum
- คลิกขวา เลือก extract data
- เลือก extract dialog



เลือก Selection rectangle ครอบพื้นที่ mapping





Manjulér Enlarté Enlarté Etract data Seleti mage Déléte image Seleti maging grid Seleti maging grid

เลือกทั้งหมด เลื

มด เลือกบางบริเวณ

- 5. จะปรากฏหน้าต่าง extract data ขึ้นมา
 - ในหน้า select file ให้ตั้งชื่อไฟล์ แล้วคลิกเลือก increment file name
 - ในหน้า extraction range เลือก use block list
 - ในหน้า extraction mode เลือก series of single blocks, inclement name และ do not load
 - จากนั้น กด extract



- 1. Select files
- 2. Extraction ranges
- 3. Extraction Mode

<u>การทำ data preprocessing</u>

เป็นการจัดการกับ spectrum ที่ได้จากการวัดตัวอย่างให้เหมาะสมต่อการนำไปวิเคราห์ โดยการทำ data preprocessing ประกอบด้วย

- Compensation
- Cut
- Smooth
- Baseline
- Normalization
- Derivative

Compensation

การทำ water compensation เป็นการลด noise ที่เกิดขึ้นจากสิ่งแวดล้อมในขณะวัดตัวอย่าง เช่นพี ครบกวนที่เกิดจากความชื้นหรือคาร์บอนไดออกไซด์



1. โหลดไฟล์ spectrum ที่ต้องการทำ data compensate ขึ้นมา



- 2. จากนั้น เลือกไฟล์ทั้งหมด เลือกที่ไอคอน Compensation หรือคลิกเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate
- จะปรากฏหน้าต่าง atmospheric compensation ให้
 คลิกเลือก

H2O compensation	
CO2 compensation	

- เลือก calculate



3. โดยจะพบว่า spectrum ที่ผ่านการทำ compensation จะปรากฏพีคของ noise ลดลง



<u>Cut</u>

เนื่องจาก spectrum ที่ได้จากการวัดตัวอย่าง แสดงเป็นช่วง range ของค่าความยาวคลื่น ตั้งแต่ช่วง 4000-400 cm-1 ดังนั้น สำหรับตัวอย่างที่ไม่ต้องการใช้ช่วง wavenumber ที่กว้าง สามารถตัด spectrum ออกให้เหลือเฉพาะช่วงที่ต้องการใช้ในการศึกษาได้



 เลือก spectrum ที่ต้องการ cut จากนั้นคลิกที่ไอคอน cut หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate



- 2. กำหนดค่า Wavenumber ที่ต้องการโดย
- พิมพ์ตัวเลขในช่อง x-start and end point หรือ
- เลือก Interactive เพื่อขยับเลือกช่วง Wavenumber ที่ต้องการ



<u>Smooth</u>

การ smooth จะทำในกรณีที่ต้องการให้ spectrum ดูเรียบขึ้น เนื่องจาก spectrum ที่ได้จากบาง ตัวอย่างมี noise ที่เกิดขึ้นจากการตรียมตัวอย่างและจากสภาวะแวดล้อมขณะวัดตัวอย่างและไม่ สามารถกำจัดแกหมดได้จากการทำ compensate ซึ่ง noise ที่เกิดขึ้นเหล่านี้สามารถทำให้ลดลงได้ โดยการทำ smooth





- เลือกไฟล์ที่ต้องการ smooth จากนั้นคลิกเลือกไอคอน smooth หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate
- จากนั้นกำหนดค่า number of smoothing point โดยปกติจะกำหนดค่าที่ 9 เนื่องจากการ ทำ smooth ที่สูงขึ้นอาจทำให้รายละเอียดพีคเล็ก ๆ ที่มีนั้นหายไป
- กด smooth



2. Spectrum ที่ผ่านการทำ smooth ที่ค่า number of smoothing point แตกต่างกัน



<u>Baseline</u>

ฐานของ spectrum ที่ได้จากการวัดตัวอย่างบางชนิดมีความเบี่ยงเบนไปจากค่าเริ่มต้นที่ 0 มาก ซึ่ง สามารถทำ baseline เพื่อเป็นการปรับฐานพีคให้เริ่มต้นที่ค่าศูนย์



 เลือกไฟล์ที่ต้องการทำ baseline จากนั้นคลิกเลือกไอคอน baseline หรือเลือกจากแถบ เครื่องมือ manipulate



- 2. จะปรากฏหน้าต่าง baseline correction ให้เลือก method ประกอบด้วย
- Scattering correction เป็นการทำ baseline ช่วงสั้น ๆ
- Rubberband correction เป็นการทำ baseline ทั้งเส้น
- Concave rubberband correction เป็นการทำ baseline ทั้งเส้น



3. Spectrum ที่ผ่านการทำ baseline แต่ละชนิด



Normalization

เป็นการลด thickness effect จากตัวอย่างที่มีความหนาบางที่ไม่เท่ากัน เพื่อให้ข้อมูล spectrum ที่ได้ สามารถนำมาเปรียบทียบกันได้

 เลือกไฟล์ที่ต้องการทำ normalize จากนั้นคลิกเลือกไอคอน normalize หรือเลือกจากแถบ เครื่องมือ manipulate



 กำหนดค่า Frequency Range โดยสามารถพิมพ์ช่วง Wavenumber ที่ต้องการ หรือเลือก Interactive เพื่อกำหนดช่วงที่ต้องการ



- 3. กำหนด Method ที่ต้องการทำ Normalization ประกอบด้วย
- Min-Max normalization เหมาะกับการทำ normalization ช่วงสั้น ๆ
- Vector normalization เป็นการทำ normalization เพื่อลด effect ที่เกิดจากความหนา-บางของตัวอย่าง
- Offset correction เป็นการดึง baseline ลงมาที่ค่าศูนย์

🗘 OPUS - Operator: Default (Administrator) - [Display - default.com] 💷 🗊	8
🖙 🖆 🖬 🗊 🗢 🏷 🏡 🧤 唑 🏡 🚓 🕬 🖾 🎝 🛤 🦉 🚛 👖 🖉 🖓 🚵 🐁 🐨 🖾	:
O Ele Edit Yew Window Measure Manpulate Evaluate Deplay Print Marry Valdation Setup Help	ð×
OPUS Brower a Image: Carbon Control Contecont Control Control Control Control Control Contro C	A
4 m bipby-default.ows	×

<u>Derivative</u>

การทำ derivative เป็นการทำให้พีคที่ overlap กันอยู่ และไม่สามารถมองเห็นได้จาก original spectrum ชัดเจนขึ้น โดยจากภาพด้านล่าง จะเห็นได้ว่า จากoriginal spectrum 3 พีคหลัก เมื่อผ่าน การทำ 1st และ 2nd derivative แล้ว สามารถให้รายละเอียดพีคที่ overlap กันอยู่ชัดเจนขึ้น



 เลือกไฟล์ที่ต้องการทำ derivative จากนั้นคลิกเลือกไอคอน derivative หรือเลือกจากแถบ เครื่องมือ manipulate



 จะปรากฏหน้าต่างให้กำหนดค่า number of derivative และ number of smoothing points ให้กำหนดค่า (โดยปกติใช้ค่า second derivative และ number of smoothing point เท่ากับ 9) และคลิก process



 จะปรากฏ data block ที่ผ่านการทำ derivative และจะปรากฏ spectrum derivative บน window spectra



 เลือก Data block ที่เป็น Original spectrum จากนั้น คลิกขวา เลือก Remove from Display



5. คลิกขวาบริเวณ spectrum window จากนั้นเลือก Scale All Spectra และเลือก Show Everything



6. จะปรากฏ spectrum ที่ผ่านการทำ derivative แล้ว



7. Spectrum ที่ผ่านการทำ 1st derivative และ 2nd derivative จะเห็นได้ว่า ที่การทำ 2nd derivative ที่ฐานของพีคตัดที่ค่าเริ่มต้นที่ศูนย์เหมือนกับ original spectrum และสามารถให้ รายละเอียดของพีคได้ดีกว่าการทำ 1st derivative



<u>Averaging</u>

เป็นการฉลี่ย spectrum จากทั้งหมดให้เหลือเพียง 1 spectrum เพื่อเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม spectrum



 เลือกไฟล์ที่ต้องการ average จากนั้นคลิกเลือกไอคอน average หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate



- 2. จะปรากฏหน้าต่าง Averaging ให้ กำหนดค่า
 - File to average (เลือก Select by symbol)
 - เลือก Weighting with no of scans/compute Av. Report
 - คลิก Average

Averaging	×
Select Files	
Files to average Select by symbol Select by name	Image: The second se
Update Av. Spectrum Update Av. Spectrum Weighting with no of scans Create / Update Std-Dev spectrum Compute Av. report	
Average	Cancel Help

 จะปรากฏ spectrum ใหม่ที่ได้จากการ Average ด้านล่างสุดของหน้าต่างแสดงลำดับ spectrum



Cluster analysis

เป็นการทำ classification ของกลุ่มตัวอย่าง โดยแยกจากความแตกต่างของลักษณะ spectrum ที่ ปรากฏ



1. คลิกเลือกไอคอน cluster analysis หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ evaluate



2. จะปรากฏหน้าต่าง cluster analysis

OPUS - Operator: Default (Administrator) - [Display - d	lefault.ows]	
🗃 🗃 🖬 🗐 🖛 🤯	🏡 ╁ 🚧 ⊱ 🛟 🍫 RGB 🕅 🗍 111 🗩 🕫	🏠 🛃 🔥 🐺 🛄 🖶 📩 🚸 🚊 🍐
Ele Edit View Window Heasure Mathodal OPUS Former 2 OPUS F	Evaluate Databus Print Marra Validation Seturn Help Clutter Analysis - New Load Method Load Method Load Method General information Spectra: 0 Regionary angles: 1 Data preprocessing: Vector nomalization Agorther: Standard Euclidean distance) Preparing deridingsen: Ward's sjorthm Defance matrix not made yet	
d 🔚 Disp	lay - default.ows	,

3. เลือก Reference Spectra เพื่อโหลด spectrum ที่ต้องการทำ Cluster จากนั้นเลือก Add Spectra

) ONS-Operator: Default: (Administrator) - (Display - Lefaultions)	🕽 (PHS - Cpenter Désut (Idrinistrato) - [Display - désuttons] 👘 👘 👘 👘 👘 👘 👘 👘 👘 👘
ᄚᄙᄙᆝᇕᆞᅕᄵᇮᄫᄴᇗᄿᆃᄤᅑᇧᅑᄵᅕᆋᇵᅕᅑᄧᆗᅜᄻᇵᅕᇓᆝ	ᄚᄚᄚᇦᇦᆠѷᢢᅷᄴᇗᅕᆃᄚᄚᄮᄭᄵᇾᆋᇵᇓᅖᆈᇞᆎᄼᄻᇥᆃᆖᆝ
C Bie Eit View Window Manoute Englate Body Brit Maco Valiation Setup Heb	🔿 Be Eit jew lintow Heasure Nationate Evaluate Dealer Bint Marry Validation Schup Help
1 ye ga gan gan gan gan gan gan gan gan gan	Control and a control and control and control and a control and a control and a control and
	A TO Review defeat over

- 4. เลือก parameter จะปรากฏหน้าต่างให้กำหนดค่า Preprocessing
- เลือก 2nd derivative + vector normalization

🗘 OPUS - Opentor: Detailt (Administrator) - Display - defuiltance) 👘 💿 💿 👘	🔿 ORUS - Operator: Default (Idaministrator) - (Display - default.com)
ᄚᄙᄚᆝᇍᇦᆃᄷᇔᄿᄴᅕᅕᆃᄤᅑᄮᅑᅌᇓᅆᆋᇓᆥᆋᆋᆘᄼᄻᇥᆃᆖᆝ	ᄚᄙᄙ闄ឰ∽ऄ‰∀ᄴ▙⅍♣┉ॺ҄҄҄҄҄ѧҬ҄҄҄҄҂ѽѽѦ҆ѦҨҨѱҌѽѦѦШ
🔿 fie Ett jew Kindow Hease Nanduzte Enlanz (kolar 2mt Nacy valation Setus Heb . # x	O Bie Edt Wew Window Messure Namburke Englaste Bandav Bert Warry Vakhtion Betup Help - 8×
Officiency Image: Text and the second seco	Of Control And International Torrest
220 201 181 190 141 120 100 100 100 40	2000 2013 1800 1600 1600 600 600 400
4 🖉 🖬 Display - default.com	(🔪 🔤 Display - default.ows 🔰 🕹

- 5. ในกรณีที่เลือกทำ derivative จะปรากฎหน้าต่างให้กำหนดค่า number of smoothing point
- กำหนดค่า Smoothing point เท่ากับ 9

O OPUS - Op	erator: Default (Administrator) - [Display - default.ows]	ingt-se and	and the second							_		x
	î 🗃 🔒 🗊 🖛 🤯 🕍 🐈	🚧 🏡 🏠 🗢 RGI		🎾 🔎	i 🛃 i	b 📩	÷		8	il 🙏		-
O Ele Ed	lit <u>V</u> iew <u>W</u> indow <u>M</u> easure M <u>a</u> nipulate Evaluate <u>D</u> is	play <u>P</u> rint Macr <u>o</u> Validation <u>S</u>	etup <u>H</u> elp	_							-	đ×
OPUS C	luster Analysis - New			X								
IS WI	Load Method Reference Spectra Parameters Report Store Met	hod										
card	Preronassing			R								
	2nd derivative + vector normalization	Smoothing points: 9	• ←									
	Regions											
	from to 1 800.3 3000.8 2	Interactive Regio	on Selection									
		Clear Selected	Regions									
	Standard (Euroidaan distance)	Making distance matrix	vaia									
	crainda (conneau rasa rea)											
				2200	2000	1800	1600 14	00 1200	1000	800	600	400
C	👌 🔚 Display - default.ows	1									1	×
												_

6. กำหนด Interaction Region Selection จากนั้น คลิก cluster analysis



 คลิก report จะแสดงผลการทำ cluster analysis ในกรณีที่ต้องการคัดลอกข้อมูล ให้คลิกที่ ปุ่ม window



8. คลิกที่ OK



9. คลิกที่แถบเครื่องมือ edit เลือก copy จะสามารถคัดลอกข้อมูลการทำ cluster ออกมาได้



Integration

เป็นการหาพื้นที่ใต้กราฟเพื่อทำการเปรียบเทียบเชิงปริมาณ โดย spectrum ที่จะนำมาเปรียบเทียบกัน ได้นั้น ต้องผ่านการทำ data preprocessing และ normalize มาแล้ว



การ integrate จาก original spectrum

 คลิกเลือกไอคอน integration หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ evaluate จะปรากฏหน้าต่าง Integration เลือก Setup Method



2. เลือกชนิดของพื้นที่ใต้กราฟที่ต้องการ โดยเลือกชนิด B

🕐 OPUS - Operator: Default (Administrator) - [Display - default.ows]	0 11
🖻 🖆 🗑 🗐 🖛 🤯 🏡 🕁 唑 🏡 🛠 🕫 🕫 🎵 🕼 🔟 👂 🚓 🦝 🖾 🖧 🐨 🖬 🖄	
🕐 Ele Edit. View Window Measure Manpulate Evaluate Display Print Macro Valdation Setup Helo	- 8×
OPUS Bouxer a Aus entrant a B a	A. Coe
implementation of the second secon	Þ X

3. เลือก Interaction เพื่อกำหนดค่า Wavenumber ของพีคที่ต้องการหาพื้นที่



ขยับเลื่อนตำแหน่งให้เส้นจุดตัดอยู่ที่ฐานพีค คลิก OK



5. ใส่ลำดับพีคที่ integrate

🔿 OPUS - Operator: Default (Administrator) - [Display - default.ows]							
🖻 🖬 🖬 🖬] 🗝 🖏	ð 🏡 🔐 🙅 📐 🛧 🗢 RGB 🕅 JA 🚻 🔎 🚓 🛃 📥 🐺 🛛					
Die Edit View Window	<u>M</u> easure M <u>a</u> nipula	iate Evaļuate <u>D</u> isplay <u>P</u> rint Macr <u>o</u> Valīdation <u>S</u> etup <u>H</u> elp					
OPUS Browser 4 ■ Declar detautore ■ ************************************	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	Setup Integration Method X Image: Setup Integration area Left edge Left edge 1752.23 Right edge 1701.57 Dear Label Image: Setup Integration area Left edge Image: Setup Integration area Label Image: Setup Integration area Label					

6. คลิก >> เมื่อต้องการ integrate พีคถัดไป



 เมื่อกำหนดค่าครบทุกพีคที่ต้องการแล้ว ให้เลือก Store Method จะปรากฏหน้าต่างให้ save method ที่ใช้ integrate

OPUS - Operator: Default (Administrator) - [Display - de	efault.ows]	COLUMN STREET,					
🗃 🖆 🖆 🔒 🗊 🖙 🤯	🏡 ╁ 🚧 🛼 🛟 🇢	: RGB 📆 🚛 🚻 🔎 🕏	≒ 🛃 i				
C Ele Edit View Window Measure Manipulat	e Evajuate <u>D</u> isplay <u>P</u> rint Macr <u>o</u> Validat	ion <u>S</u> etup <u>H</u> elp					
O DPUS Browser C C □ Diplay default over C C □ Diplay default over	_						
Setup Integration Method	Impeter		×				
	Integration area Left edge 1483.5	erius (/ 3)					
	Right edge 1190.2						
		Clear					
		Label 3					
		Number of Areas: 3	O Store Integ	ration Method			×
EA			Look	in: 퉬 Data 8	-	G 🤌 📂 🖽 •	
			Ca.	Name	*	Date modified	Туре
F		Clear Method Load Me	Recent Place	s	No items match your	search.	
6 A	V						
			Desktop				
	Store Method Exit	Help					
			Libraries				
LU 8888		0000 0000 0000					
			Computer				
			Network	•	m		•
				File name:	Int_Data_8.int	-	Save
				Files of type:	OPUS Integration Methods	-	Cancel

8. เลือก Exit จะปรากฏหน้าต่าง Integration เลือก Integrate



9. จะปรากฏ data block แสดงผลการ integrate



10. คลิกขวาที่ data block เลือก show report



11. เมื่อคลิกที่ data block จะปรากฏพื้นที่ใต้กราฟออกมาเป็นตัวเลข

OPUS - Operator: Default (Administrator) - [Report-Display - default.ows:2]										
🖻 🖹 🗋 🗐	I 🖛 🤝 🕍 ╁	MM			RGB	to 1	L III	Þ	FIT	🛃
O File Edit View Window M	easure M <u>a</u> nipulate Evaluate	<u>D</u> isplay	<u>P</u> rint	Macr <u>o</u> Va	alidation <u>S</u> etu	up <u>H</u> elp				
OPUS Browser P Image: State of the sta	□- "G:\IR Training\use new\Da - Integration Results AB - Integration Report	Integra Numb	tion Re	port Value ults: 3	s Integ	gral area	a]		
		Label	Туре	Result	Freq 1	Freq 2	Freq 3	Freq 4	Freq 5	Freq 6
T I		1	В	0.4802699	1762.290000	1697.880000				
		2	В	7.4746453	1705.500000	1489.500000				
		5	Б	4.0/08///	1489.200000	1190.200000				

12. โดยจะปรากฏข้อมูลรายละเอียดของพื้นที่ใต้กราฟ ประกอบด้วย label, type, result และ frequency



13. เมื่อนำค่าตัวเลขที่ได้มา plot กราฟ จะสามารถแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในเชิงปริมาณของ ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ได้



<u>การ integrate จาก derivative spectrum</u>

1. คลิกเลือกไอคอน integration หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ evaluate จะปรากฏหน้าต่าง

Integration เลือก Setup Method



2. เลือกชนิดพื้นที่ใต้กราฟ โดยเลือกชนิด B



3. เลือก Interaction เพื่อกำหนดค่า Wavenumber ของพืคที่ต้องการหาพื้นที่

OPUS - Operator: Default (Administrator)-[Display-defaultows] – 0 X
* * * 1 0	∽ 🖏 🖞 🖞 🏡 📩 🗢 🛤 🕅 🕼 🚛 🎮 🖉 🤹 🖍 🐨 💷 🔡 🏠 🚸 🌲
O Ele Edit View Window Measu	re Manipulate Evaluate Display Print Macro Valdation Setup Heb - 5 x
0 PPUS Browser 0 0 PPUS Browser 0 0 PPUS Browser 0 PPUS Br	Old Steep Integration Method Integration were Lat edge Integration were Integration were Integration were<
	1800 1850 1800 1750 1700 1850 1850 1850 1850 1450 1400 1359 1300 1259 1200 1150 1100 1850
·	e 🖸 Display - default.ows

4. ขยับเลื่อนตำแหน่งให้จุดตัดที่ฐานพีคอยู่ที่ศูนย์



5. ใส่ลำดับพื้นที่ integrate

O OPUS - Operator: Default (Administrator) - Display - default.ovs) O X
☞ ☞ ☞ 🖬 🗊 ∽ ☜ 🐜 ☆ 唑 🏡 🏠 🗢 🕫 🔞 🕼 💭 🖉 🎄 歳 🖬 🖬 🖽 🏠 🚓 🗍
🕐 Ele Edit View Window Measure Manpulate Evaluate Disolay Pint Marry Valdation Setup Help - & ×
Open state Image: State Image: State
1900 1950 1900 1750 1700 1850 1600 1550 1600 1450 1400 1350 1220 1220 1150 1100 1550
< m > (Display - default.ows > ×

6. คลิก >> เมื่อต้องการ integrate พีคถัดไป



 เมื่อกำหนดค่าครบทุกพีคที่ต้องการแล้ว ให้เลือก Store Method จะปรากฏหน้าต่างให้ save method ที่ใช้ integrate

OPUS - Operator: Default (Administrator) - [Displa	ny-defaultons)	
O Ele Edit View Window Measure Man	pulate Evaluate Display Print Macro Validation Setup Help	- 61
C OPOS Boover B S C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	Setup Integration Method	
		Recent Race Deskap Compute Compute Recent Race Recent Race Recen

8. เลือก Exit จะปรากฏหน้าต่าง Integration เลือก Integrate



9. จะแสดง data block ที่ผ่านการทำ integrate และพื้นที่ใต้กราฟแสดงบน window spectrum



10. เมื่อต้องการนำข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟเป็นตัวเลขออก

คลิกขวาที่ data block integrate เลือก show report



11. ตารางแสดงผลพื้นที่ใต้กราฟจะแสดงในช่อง result ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้เป็นค่าติดลบ เนื่องจากพีคที่ integrate ผ่านการทำ second derivative ทำให้พีคที่ได้กลับหัว ดังนั้น การคำนวนพื้นที่ใต้กราฟให้ตัดเครื่องหมายลบ ให้แสดงเป็นค่าบวกเท่านั้น



<u>RGB</u>

การสร้างภาพ RGB (red, green, blue) เป็นการวิเคราะห์ผลแสดงการกระจายตัวของสารหรือพีคที่ สนใจจากการวัดตัวอย่างแบบ mapping เพื่อให้ได้ภาพออกมาเป็น imaging และดูการกระจายตัวของ สารในตัวอย่างได้ โดยตัวอย่างที่ต้องการทำ RGB ต้องผ่านการทำ data preprocessing และ normalization มาแล้ว



 เปิดไฟล์ตัวอย่างขึ้น และคลิกเลือกบริเวณที่มีตัวอย่างให้ spectrum ปรากฏบน spectrum window



2. ลากเส้นตามฐานพีคที่ต้องการ integrate หาพื้นที่



3. คลิกขวาเลือก integration เลือก integrate



4. ค่าแสดงช่วง Wavenumber ที่ integrate จะปรากฏในช่อง Select trace



5. สามารถเลือกดูการกระจายตัวของสารได้ โดยเลือกพื้นที่ใต้กราฟตามช่วง wave number



6. คลิกเลือก data block TRC



7. เลือกแถบเครื่องมือ Evaluate แล้วเลือก Multiple tracing



- 8. กำหนดค่า Factors for RGB trace โดยกำหนดให้
- ช่วง 3000-2800 แทน lipid
- ช่วง 1700-1500 แทน protein
- ช่วง 1200-900 แทน polysaccharide
- คลิก Execute



9. จะปรากฏภาพ RGB แสดงการกระจายตัวของปริมาณสารชีวเคมีที่สนใจ



10. โดยภาพ RGB ที่แสดงบนตัวอย่าง จะแสดงการกระจายตัวของพีคที่เป็นตัวแทนของสารชีวเคมี ในแต่ละกลุ่มที่ได้ define ไว้ ประกอบด้วย lipid แทนด้วยสีแดง จะพบว่ามีการกระจายตัว ของ lipid อยู่มากบริเวณด้านล่างของชิ้นตัวอย่าง, protein แทนด้วยสีเขียว ซึ่งจะมีการ กระจายตัวอยู่ทั่วทั้งชิ้นตัวอย่าง แต่มีปริมาณมากในชั้นถัดจากขอบล่างของชิ้นตัวอย่าง, polysaccharide แทนด้วยสีน้ำเงิน จะพบการกรพจายตัวอยู่ทั่วทั้งชิ้นตัวอย่าง แต่มีปริมาณ มากบริเวณด้านบนของชิ้นตัวอย่าง

