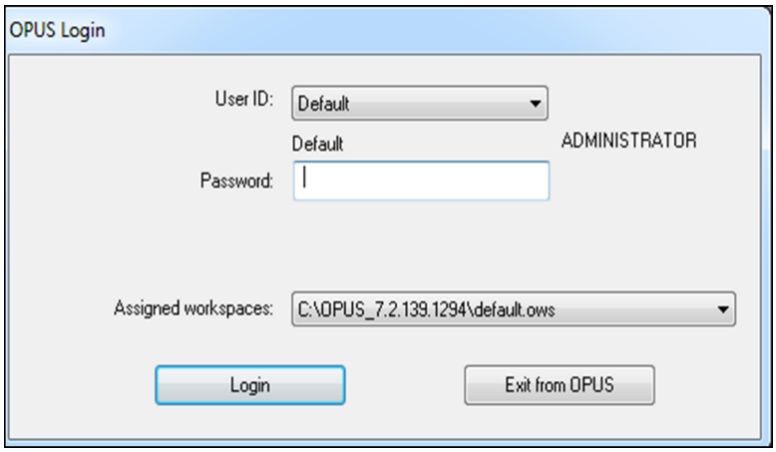
การใช้โปรแกรม OPUS

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

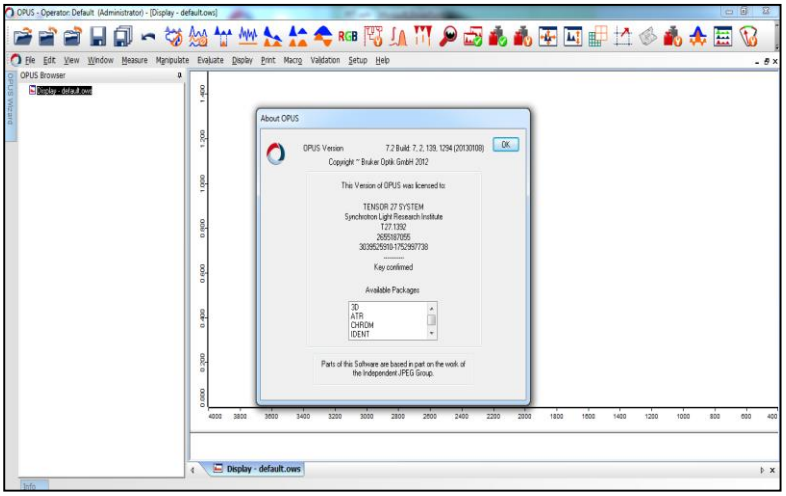
การเริ่มต้นการใช้งานโปรแกรม OPUS

1. เปิดโปรแกรม OPUS โดย double click ที่ไอคอน OPUS ดังรูป

2. จะปรากฏหน้าต่างให้ใส่ password “OPUS” จากนั้นคลิก login

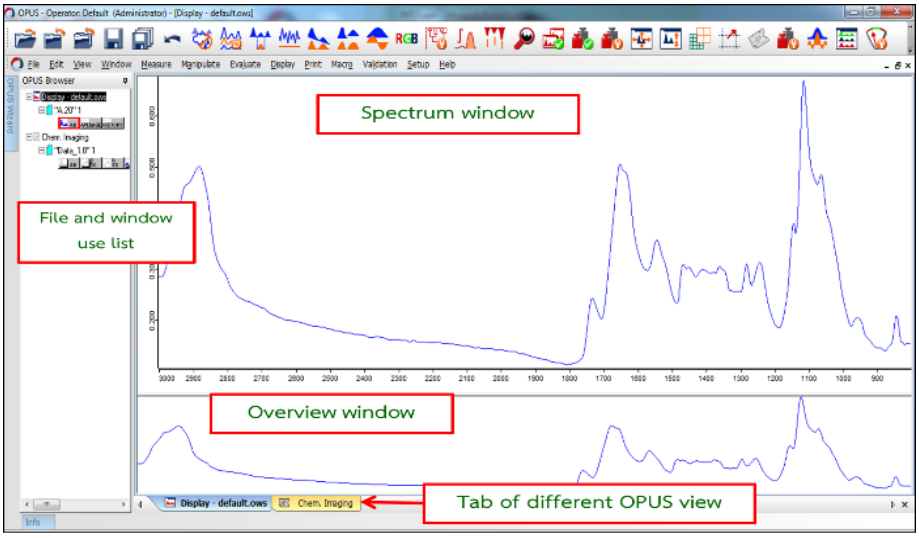


3. จะปรากฏหน้าต่างแสดงการเข้าใช้งานโปรแกรม OPUS กด OK



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



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

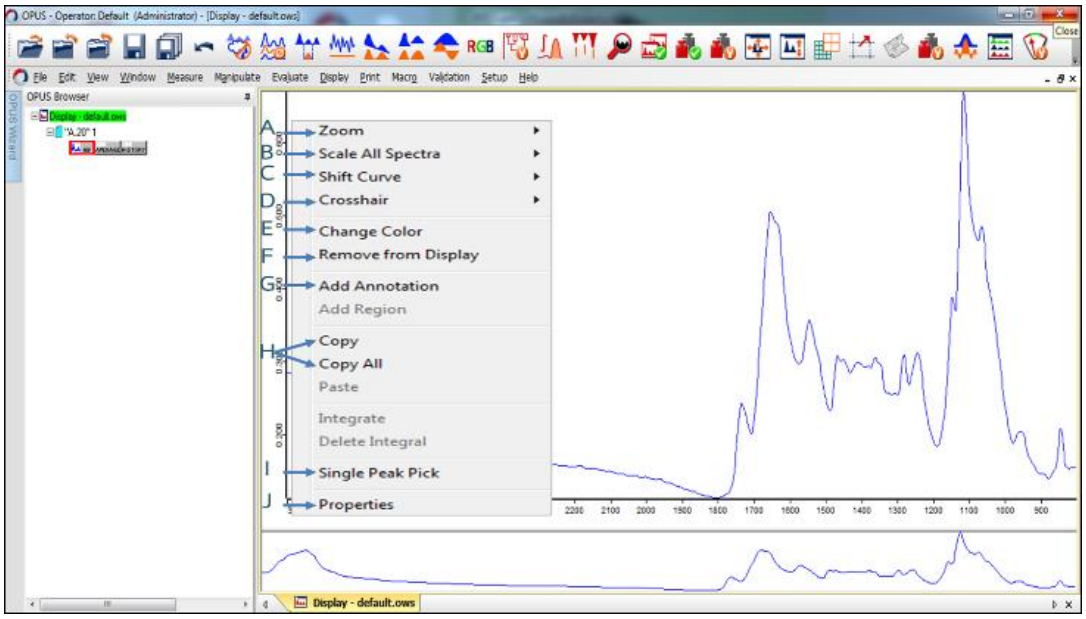
   F : Remove from display : Not show in a spectral window

   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

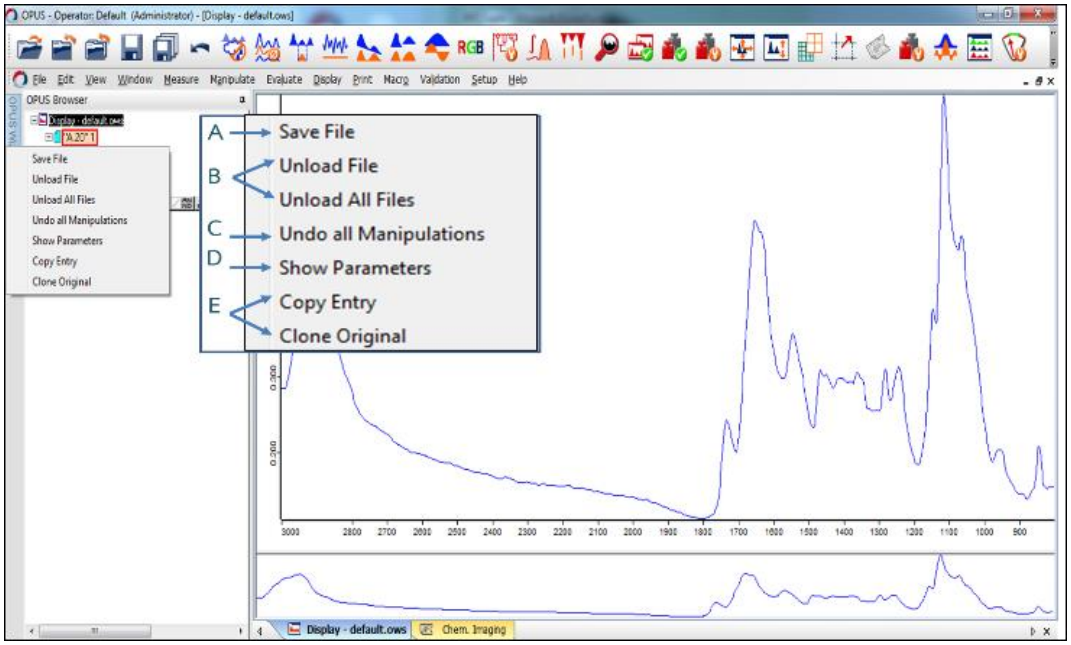
   B : Unload file ซปิดการแสดงข้อมูล ในหน้า spectrum window เฉพาะไฟล์ที่เลือก

   B : Unload all files : ปิดการแสดงข้อมูล ในหน้า spectrum window ทั้งหมด

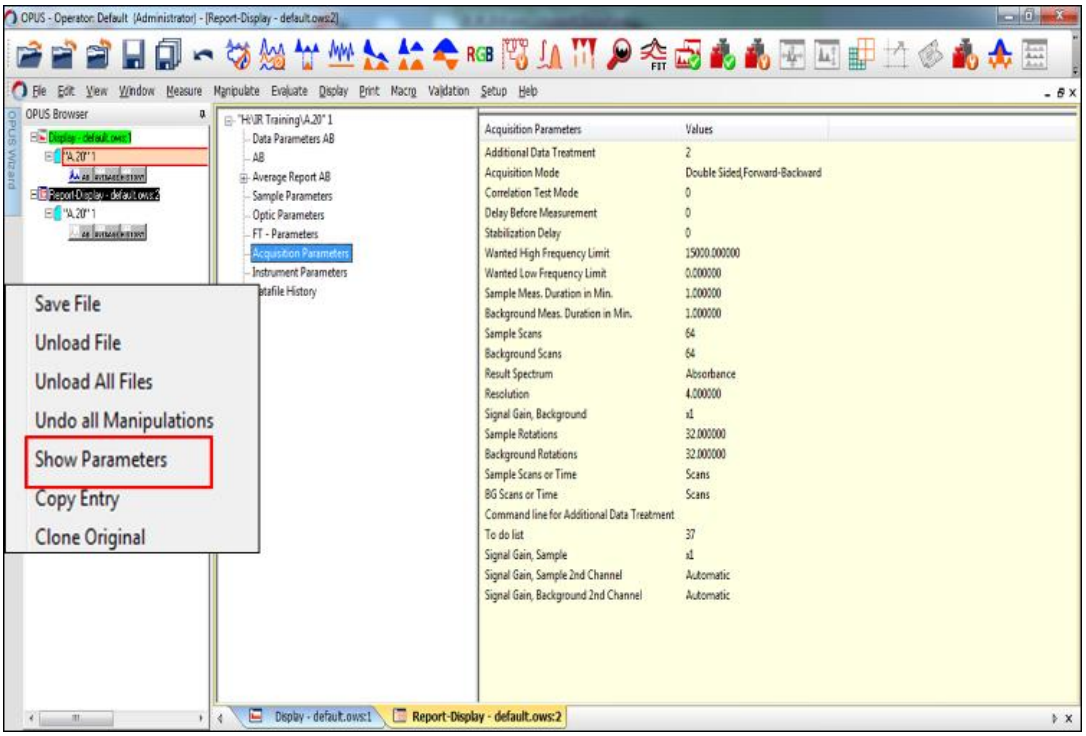
   C : Undo all manipulations

   D : Show parameters

   E : Copy entry/Clone original



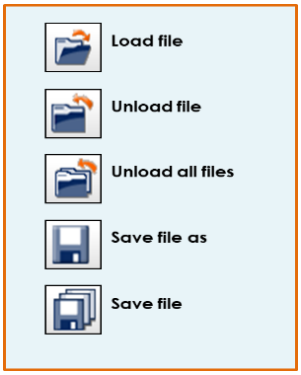
7. เมื่อคลิกขวาที่ file name แล้วเลือก show parameter จะปรากฏหน้าต่างแสดงค่า pareameter ในการวัดตัวอย่างเช่น วันที่, เวลา, mode of measument, scan time resolution เป็นต้น

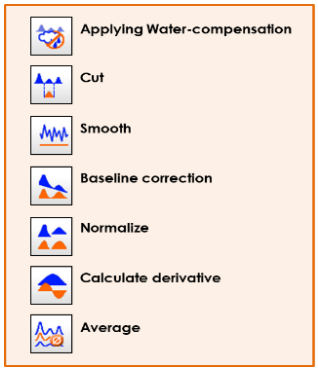


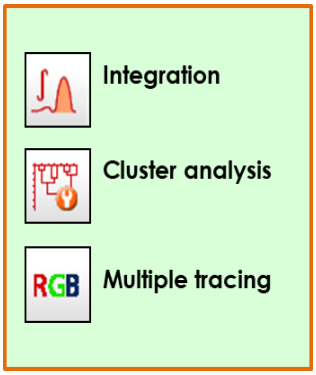
8. บริเวณด้านบนแถบเครื่องมือ จะปรากฏคำสั่งที่ใช้งานบ่อย ๆ เช่น
   - Load file แสดงการเปิดไฟล์
   - Unload file แสดงการปิดไฟล์ที่เลือก
   - Unload all files แสดงการปิดไฟล์ทั้งหมด
   - Save file as/save file การเซฟไฟล์
   -

คำสั่งในการทำ data preprocessing เช่น
- Applying water-compensation
- Cut
- Smooth
- Baseline correction
- Normalize
- Calculate derivative

คำสั่งในการจัดการวิเคราะห์ spectrum เช่น
- Average
- Integration
- Cluster analysis
- Multiple tracing
-



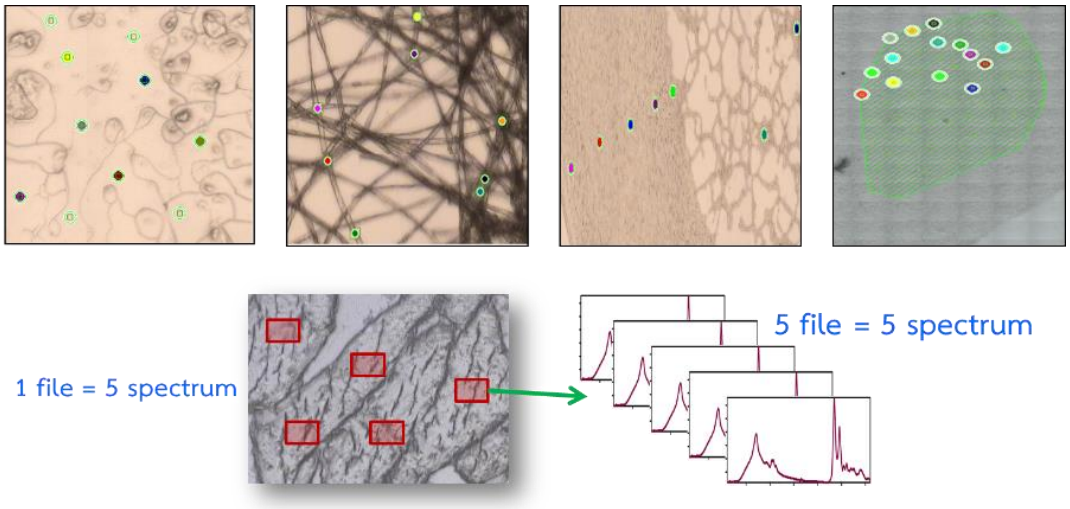




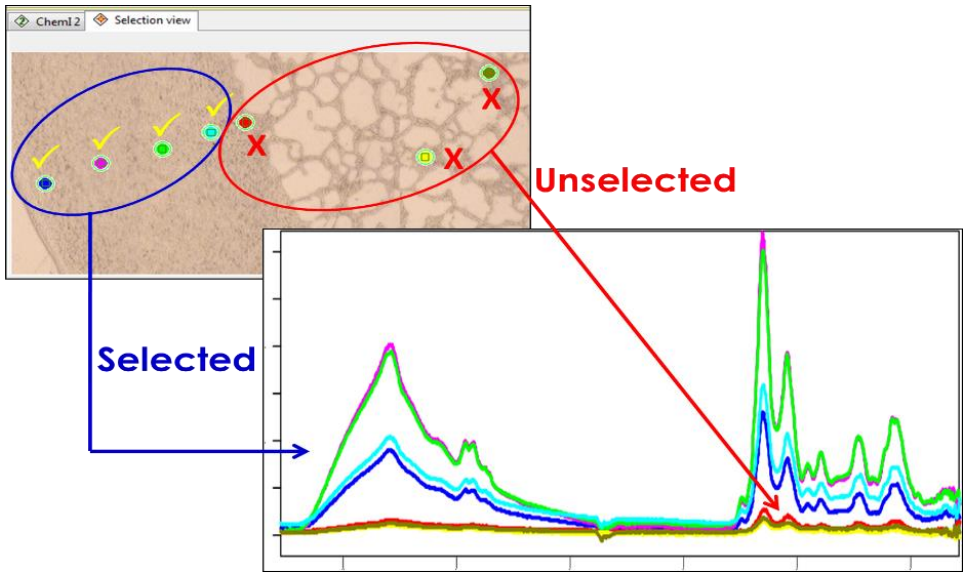
การ extract spectrum

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

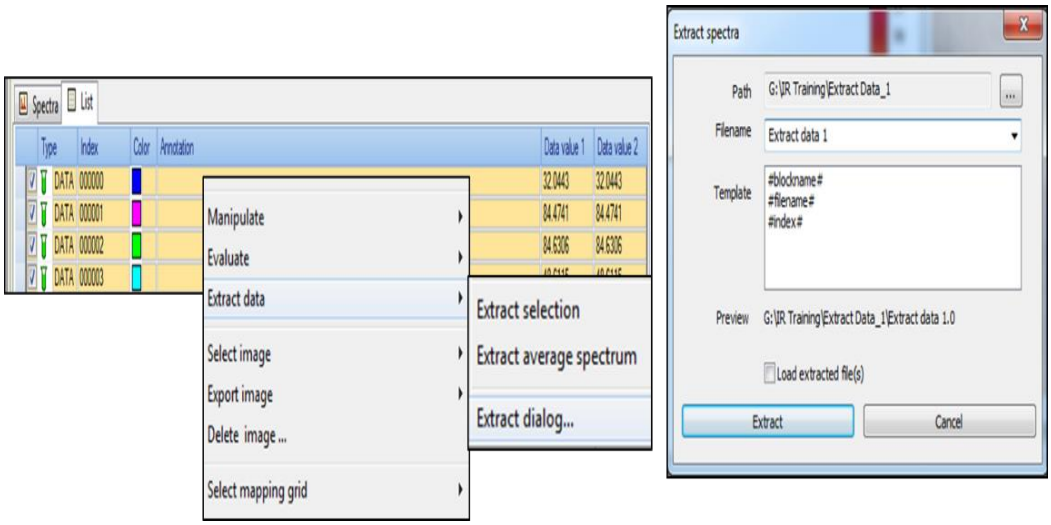
1. การวัดแบบ single point คือการเลือกวัดสเปคตรัมแบบสุ่มหลายๆ จุดจากหลายตำแหน่ง



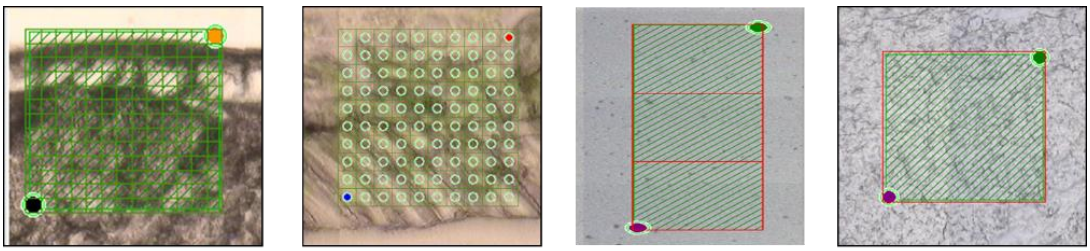
2. เมื่อต้องการ extract spectrum ให้โหลดไฟล์ spectrum ของตัวอย่างนั้น ๆ ขึ้นมา แล้วคลิกเลือก spectrum บริเวณตำแหน่งที่ต้องการ

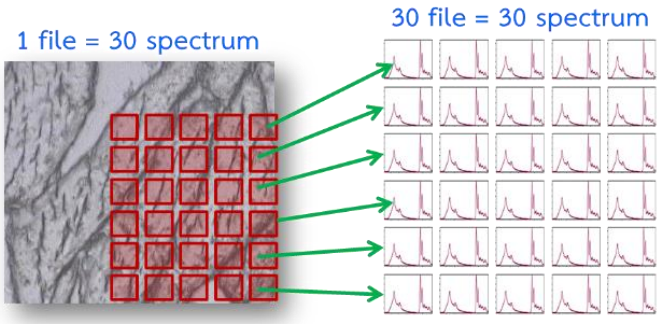


3. โดยรายชื่อ spectrum ที่เลือกจะปรากฏในหน้า list จากนั้นเลือก spectrum ทั้งหมด
   - คลิกขวา เลือก extract data
   - เลือก extract dialog
   - ตั้งชื่อไฟล์ แล้วกด extract



4. การวัดแบบ <u>mapping</u> คือการวัดสเปคตรัมในตำแหน่งพื้นที่ที่กำหนด

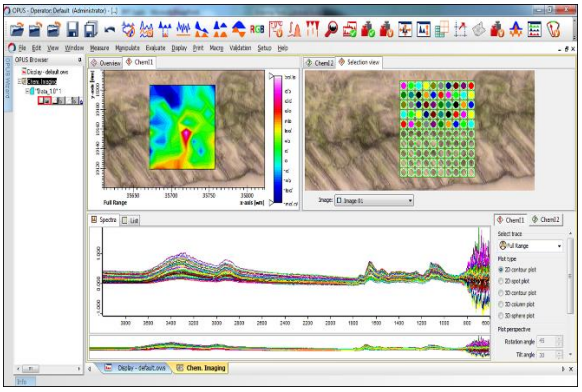


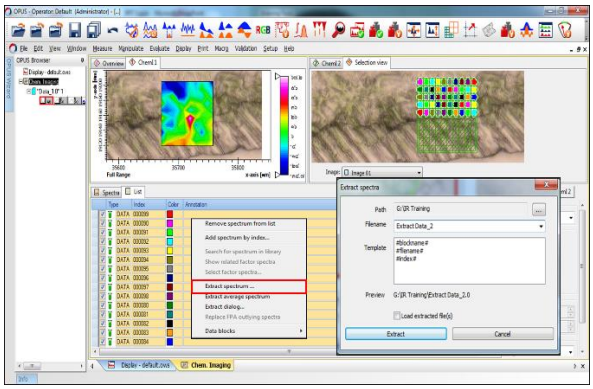


โดยสามารถ extract spectrum ได้ 2 วิธี คือ

4.1 เลือก Extract spectrum เฉพาะจุดที่ต้องการจากตัวอย่าง Mapping โดยใช้เมาส์คลิกเลือก spectrum ที่ต้องการทีละจุด

- คลิกขวา เลือก extract data
- เลือก extract spectrum
- ตั้งชื่อไฟล์ แล้วกด extract

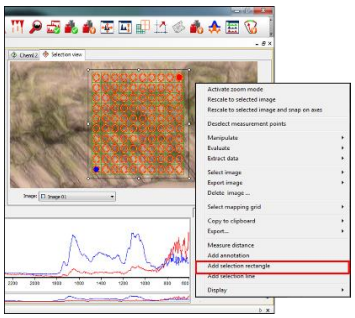


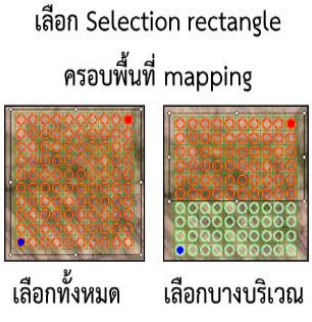


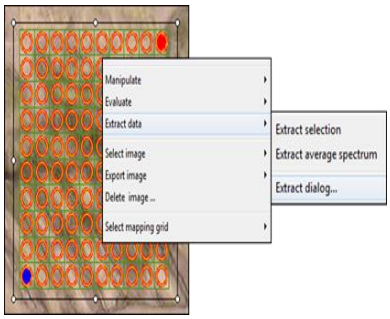
4.2 เลือกเอาเฉพาะสเปคตรัมบริเวณที่ต้องการ extract จากตัวอย่าง Mapping

4.3 เลือก extract spectrum ทั้งหมดจากตัวอย่าง Mapping

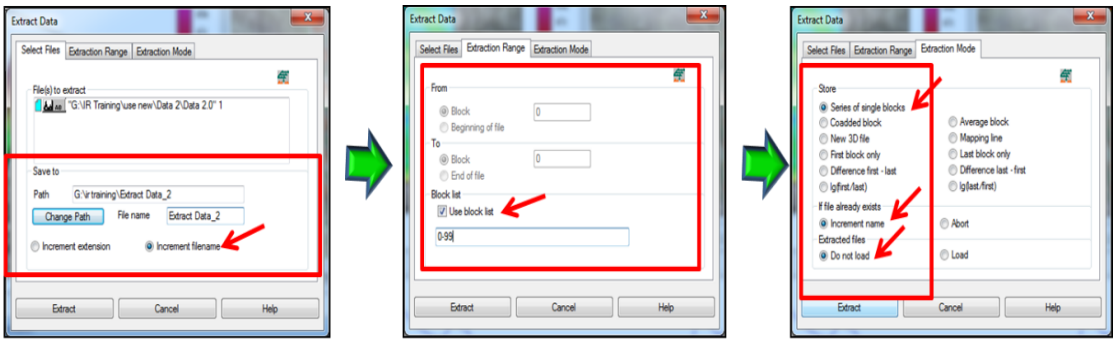
- คลิกขวาที่หน้า window spectrum เลือก add selection rectangular
- crop เลือกบริเวณที่ต้องการ extract spectrum
- คลิกขวา เลือก extract data
- เลือก extract dialog







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

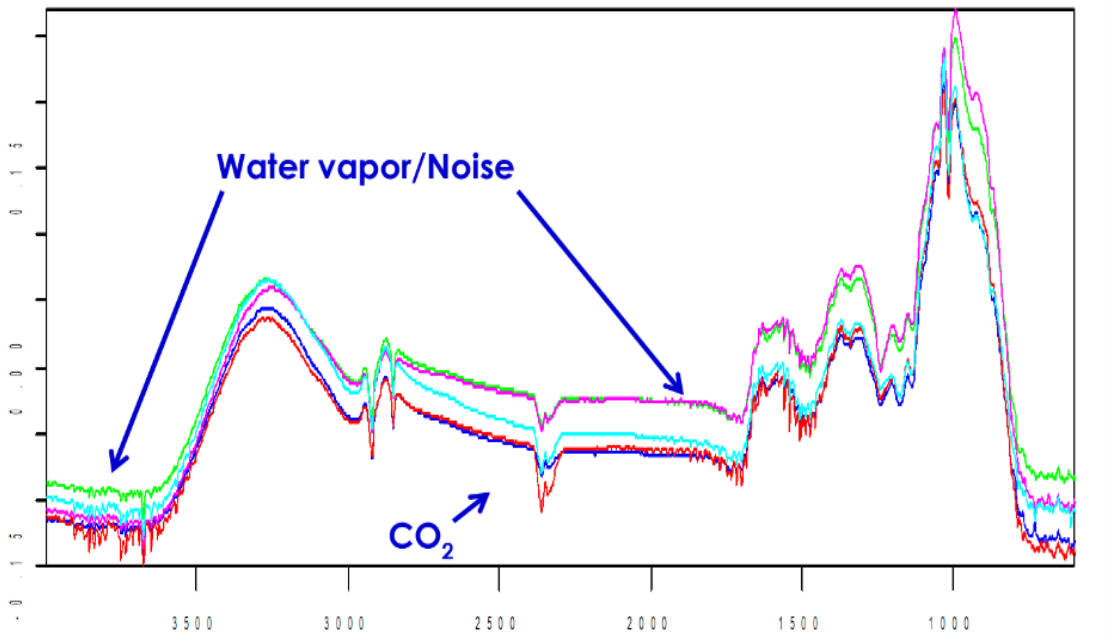
การทำ data preprocessing

เป็นการจัดการกับ spectrum ที่ได้จากการวัดตัวอย่างให้เหมาะสมต่อการนำไปวิเคราห์ โดยการทำ data preprocessing ประกอบด้วย

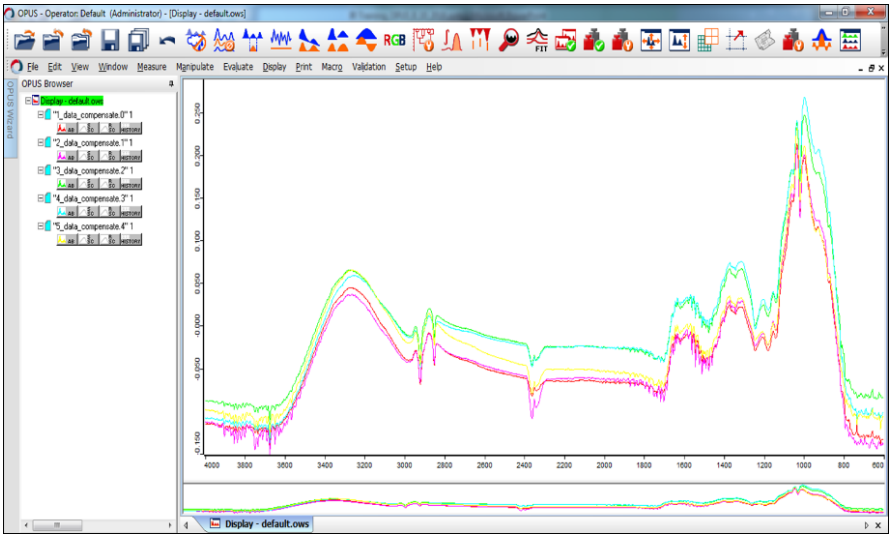
- Compensation
- Cut
- Smooth
- Baseline
- Normalization
- Derivative

Compensation

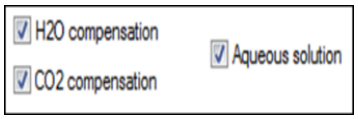
การทำ water compensation เป็นการลด noise ที่เกิดขึ้นจากสิ่งแวดล้อมในขณะวัดตัวอย่าง เช่นพีครบกวนที่เกิดจากความชื้นหรือคาร์บอนไดออกไซด์



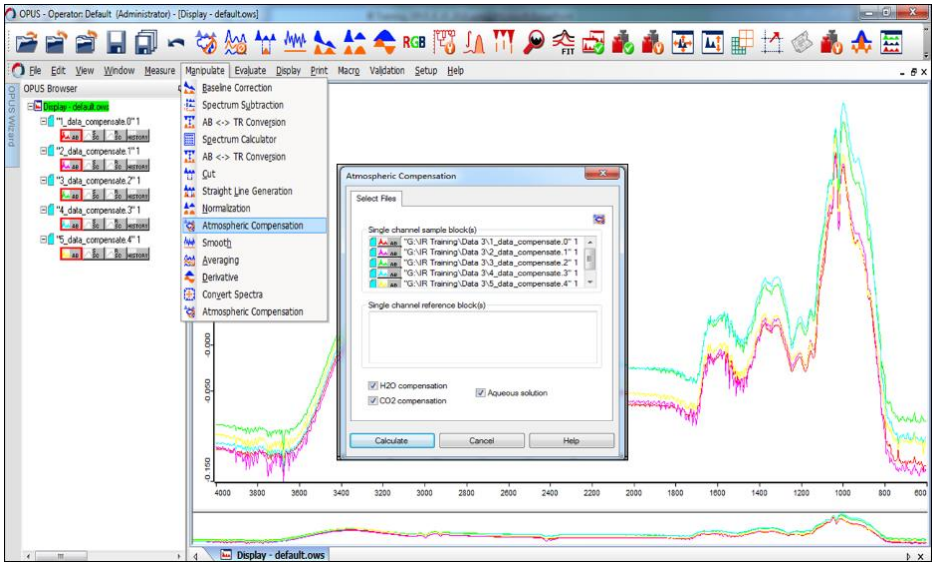
1. โหลดไฟล์ spectrum ที่ต้องการทำ data compensate ขึ้นมา



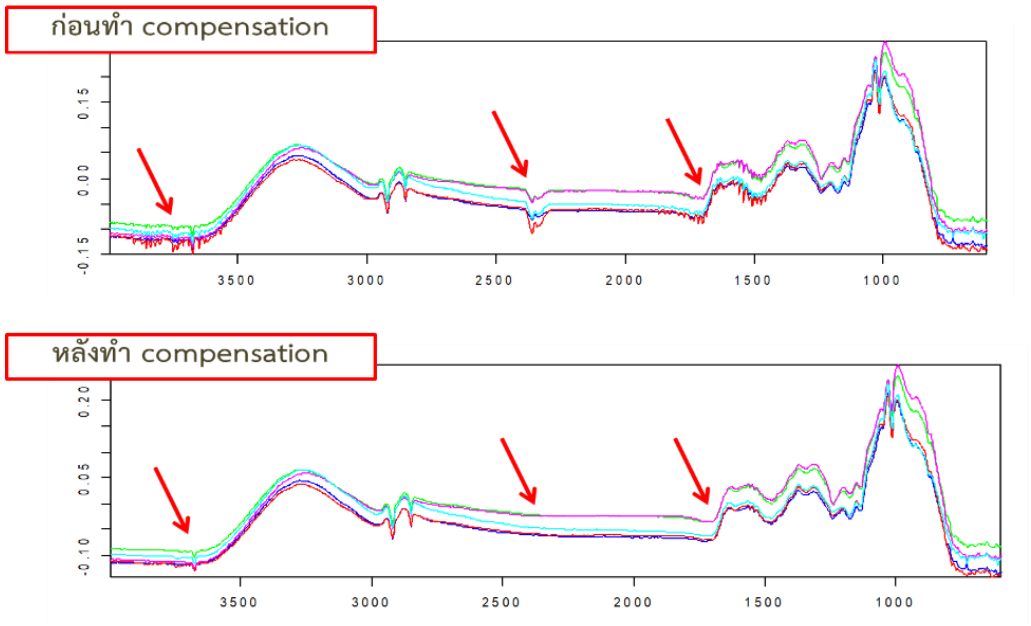
2. จากนั้น เลือกไฟล์ทั้งหมด เลือกที่ไอคอน Compensation หรือคลิกเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate



- จะปรากฏหน้าต่าง atmospheric compensation ให้คลิกเลือก
- เลือก calculate

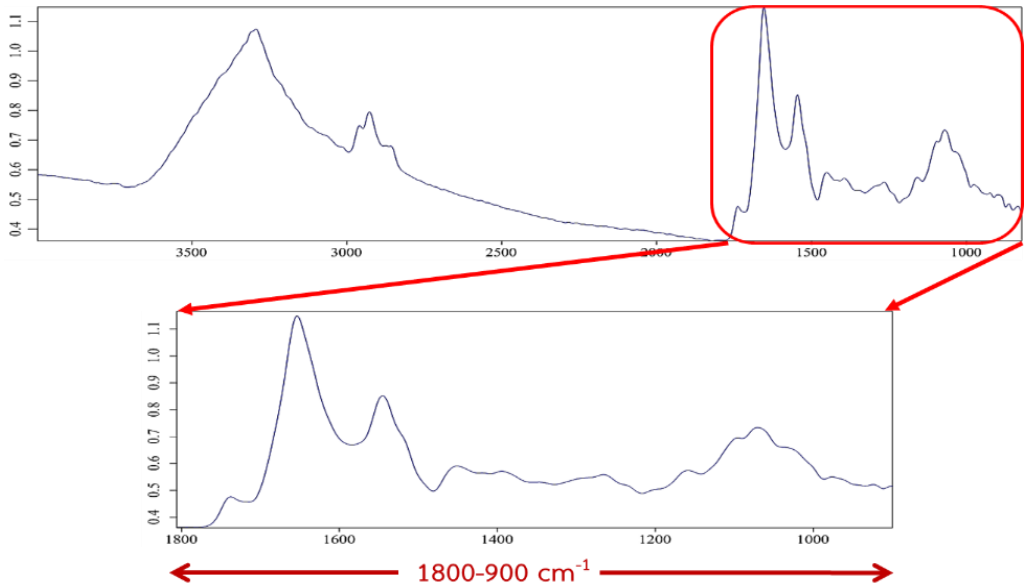


3. โดยจะพบว่า spectrum ที่ผ่านการทำ compensation จะปรากฏพีคของ noise ลดลง



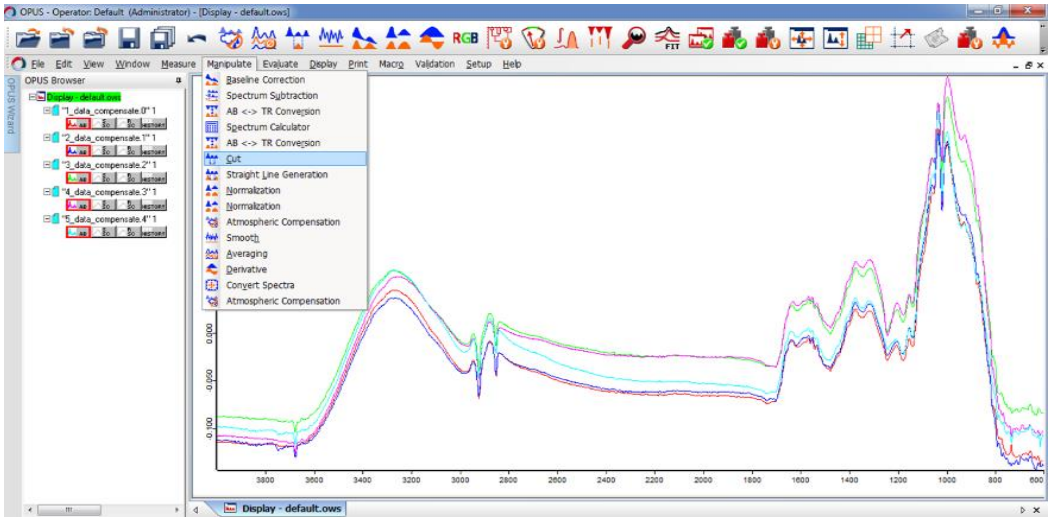
Cut

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



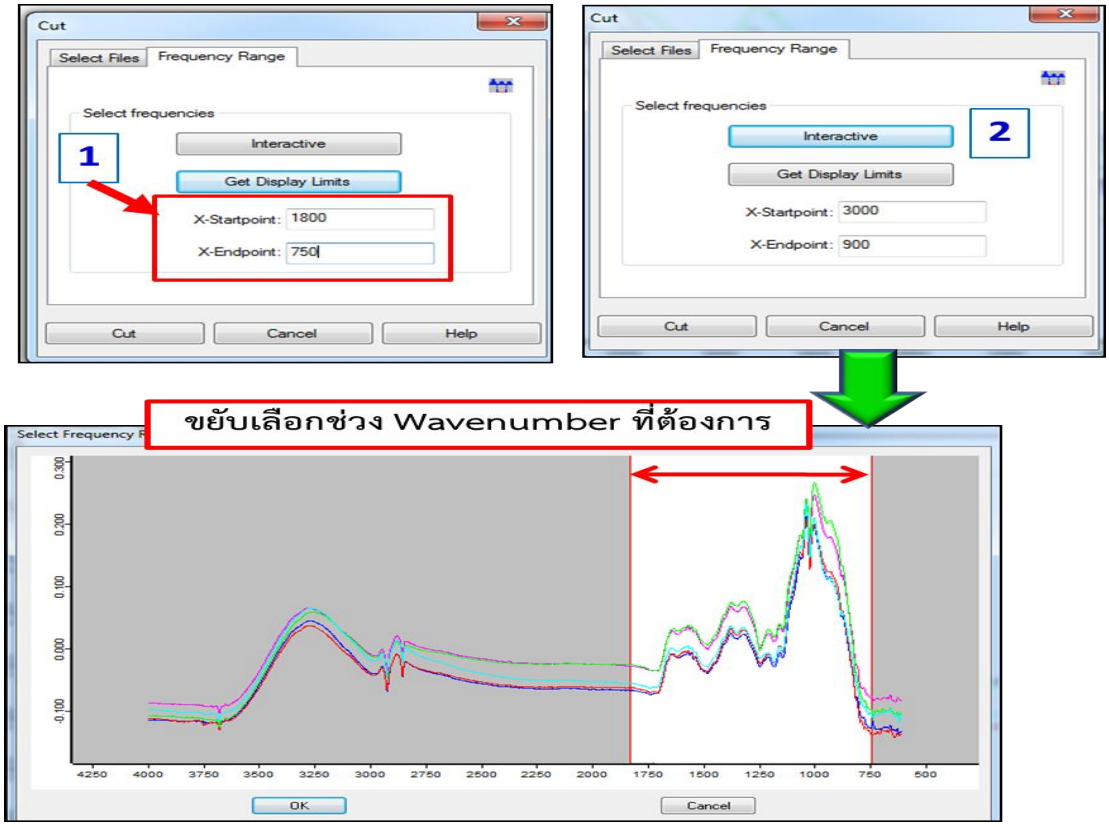
---

1. เลือก spectrum ที่ต้องการ cut จากนั้นคลิกที่ไอคอน cut หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate



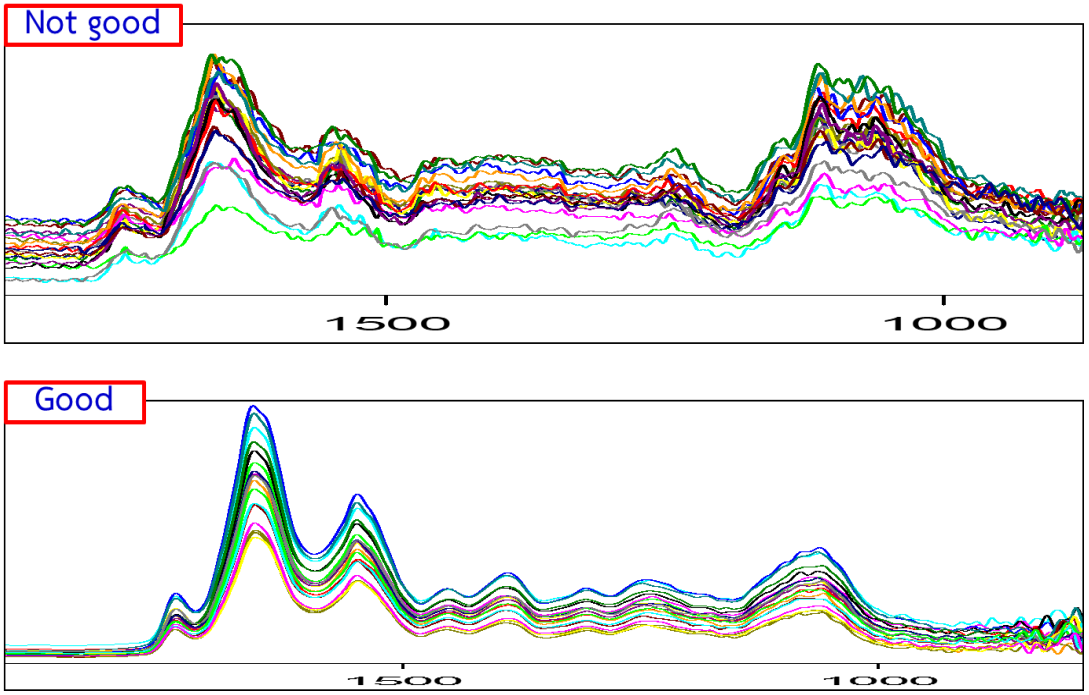
2. กำหนดค่า Wavenumber ที่ต้องการโดย

- พิมพ์ตัวเลขในช่อง x-start and end point หรือ
- เลือก Interactive เพื่อขยับเลือกช่วง Wavenumber ที่ต้องการ



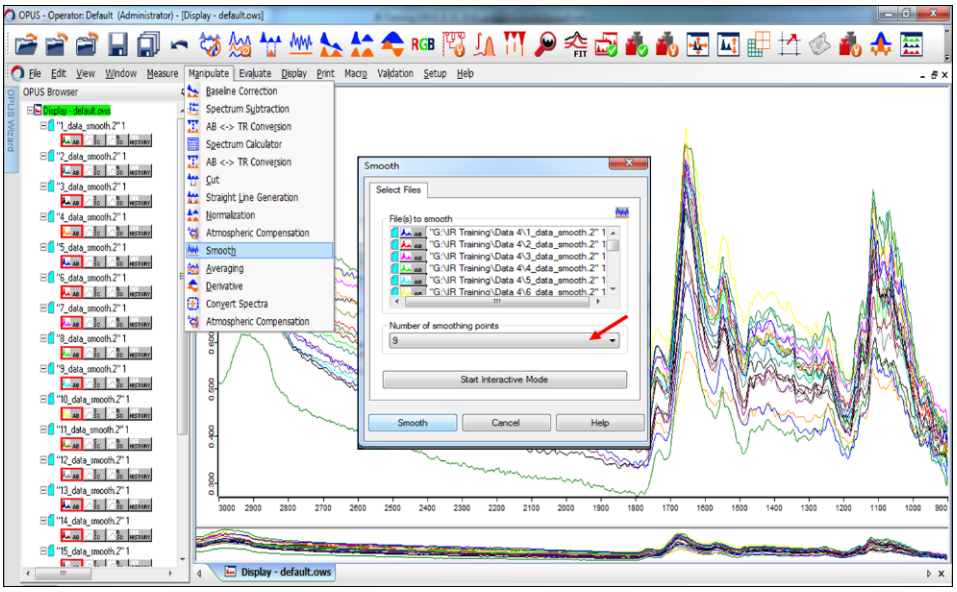
Smooth

การ smooth จะทำในกรณีที่ต้องการให้ spectrum ดูเรียบขึ้น เนื่องจาก spectrum ที่ได้จากบางตัวอย่างมี noise ที่เกิดขึ้นจากการตรียมตัวอย่างและจากสภาวะแวดล้อมขณะวัดตัวอย่างและไม่สามารถกำจัดแกหมดได้จากการทำ compensate ซึ่ง noise ที่เกิดขึ้นเหล่านี้สามารถทำให้ลดลงได้โดยการทำ smooth

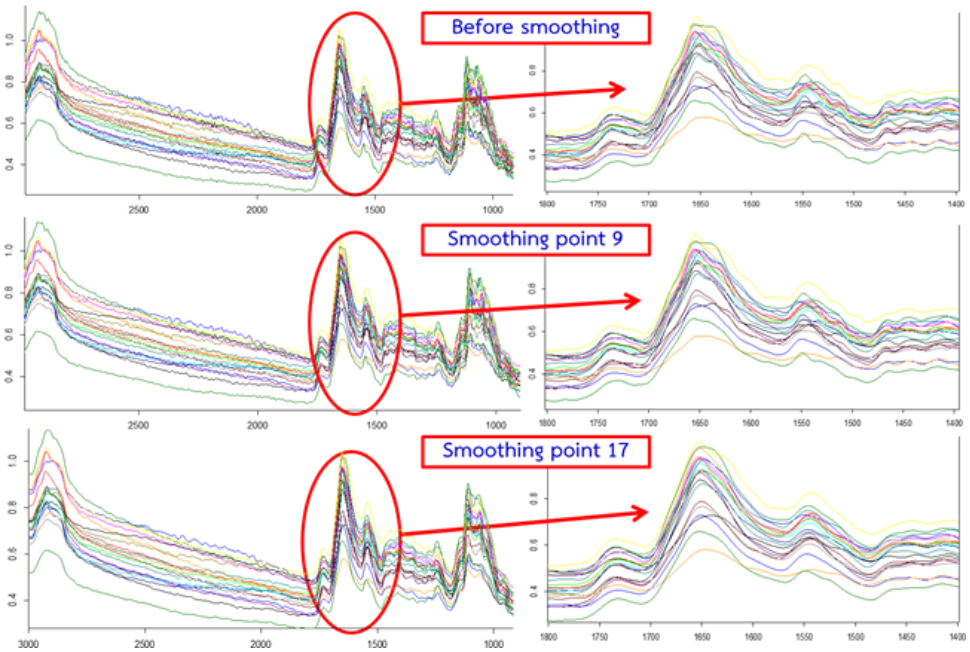


1. เลือกไฟล์ที่ต้องการ smooth จากนั้นคลิกเลือกไอคอน smooth หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate

- จากนั้นกำหนดค่า number of smoothing point โดยปกติจะกำหนดค่าที่ 9 เนื่องจากการทำ smooth ที่สูงขึ้นอาจทำให้รายละเอียดพีคเล็ก ๆ ที่มีนั้นหายไป
- กด smooth

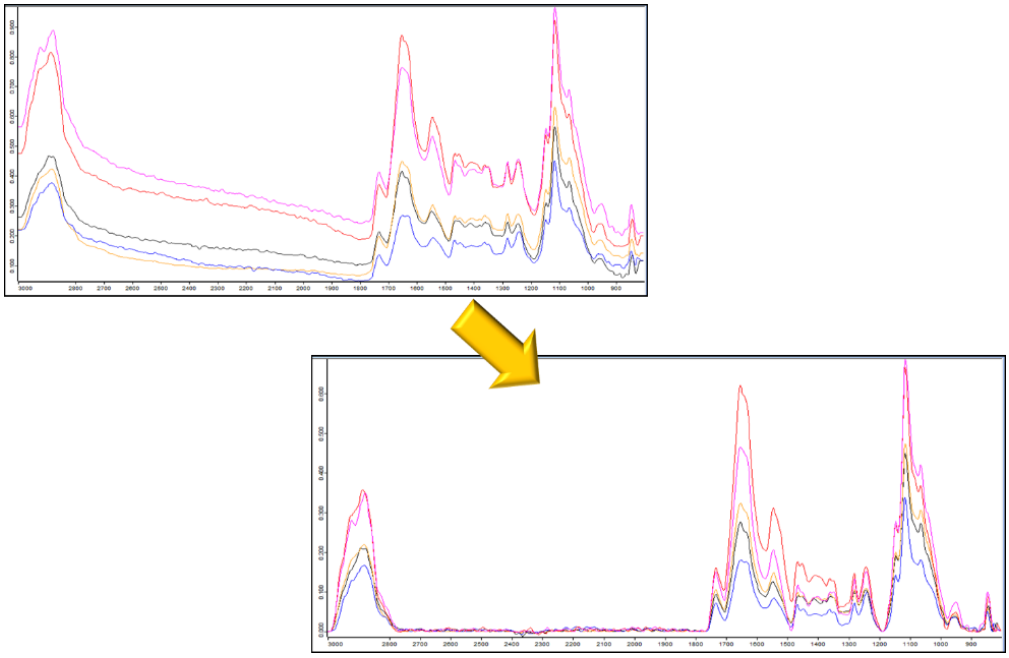


2. Spectrum ที่ผ่านการทำ smooth ที่ค่า number of smoothing point แตกต่างกัน

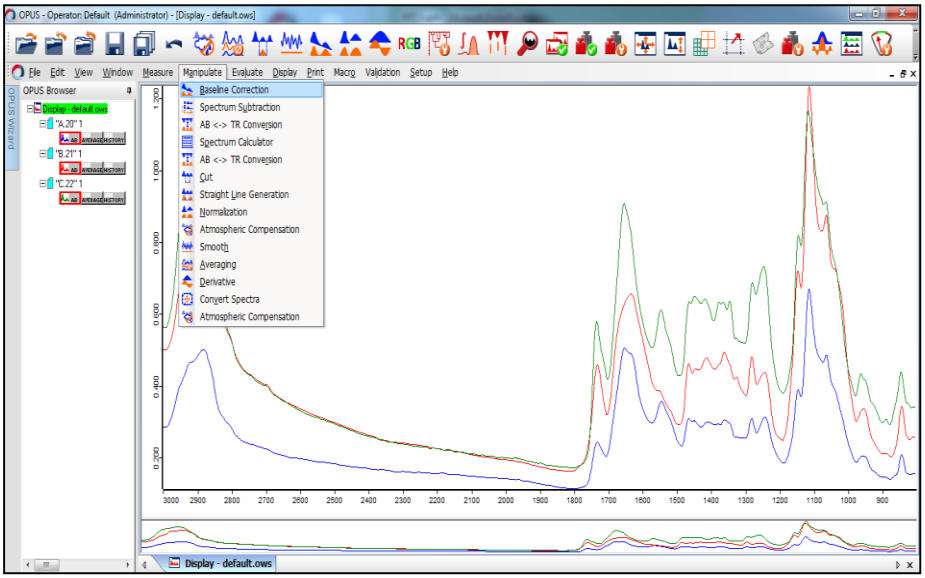


Baseline

ฐานของ spectrum ที่ได้จากการวัดตัวอย่างบางชนิดมีความเบี่ยงเบนไปจากค่าเริ่มต้นที่ 0 มาก ซึ่งสามารถทำ baseline เพื่อเป็นการปรับฐานพีคให้เริ่มต้นที่ค่าศูนย์

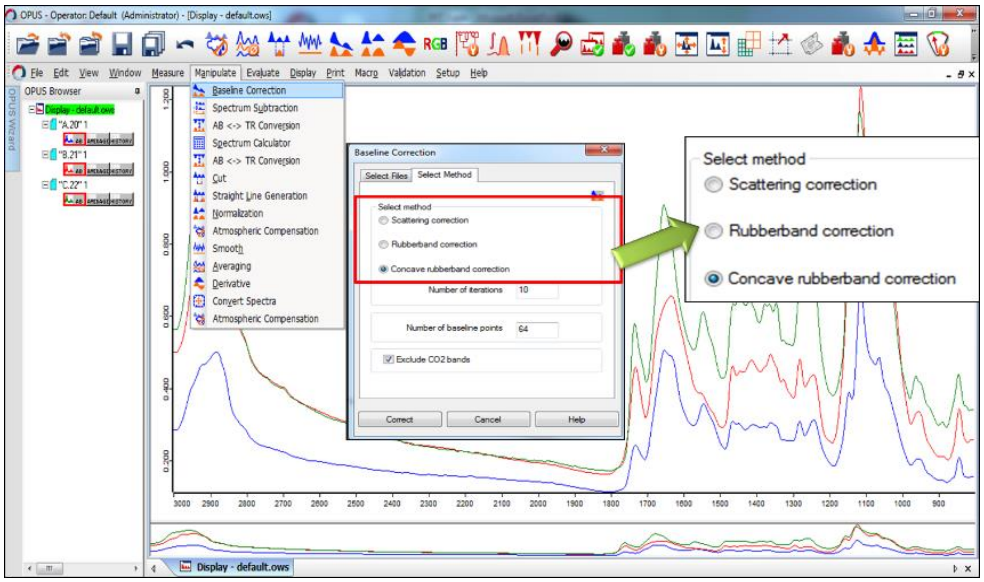


1. เลือกไฟล์ที่ต้องการทำ baseline จากนั้นคลิกเลือกไอคอน baseline หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate

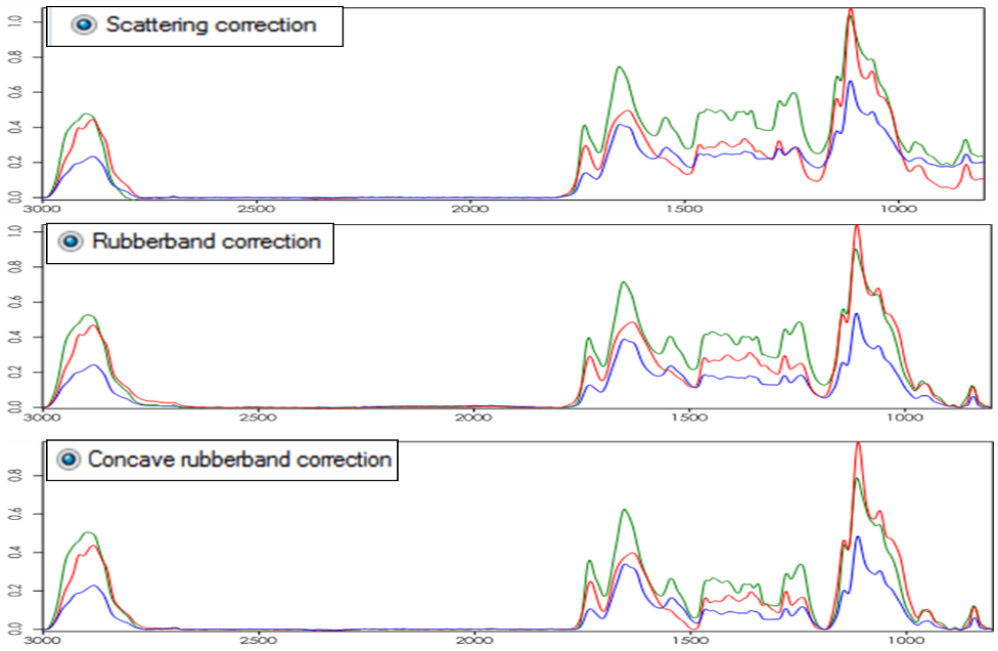


2. จะปรากฏหน้าต่าง baseline correction ให้เลือก method ประกอบด้วย

- Scattering correction เป็นการทำ baseline ช่วงสั้น ๆ
- Rubberband correction เป็นการทำ baseline ทั้งเส้น
- Concave rubberband correction เป็นการทำ baseline ทั้งเส้น



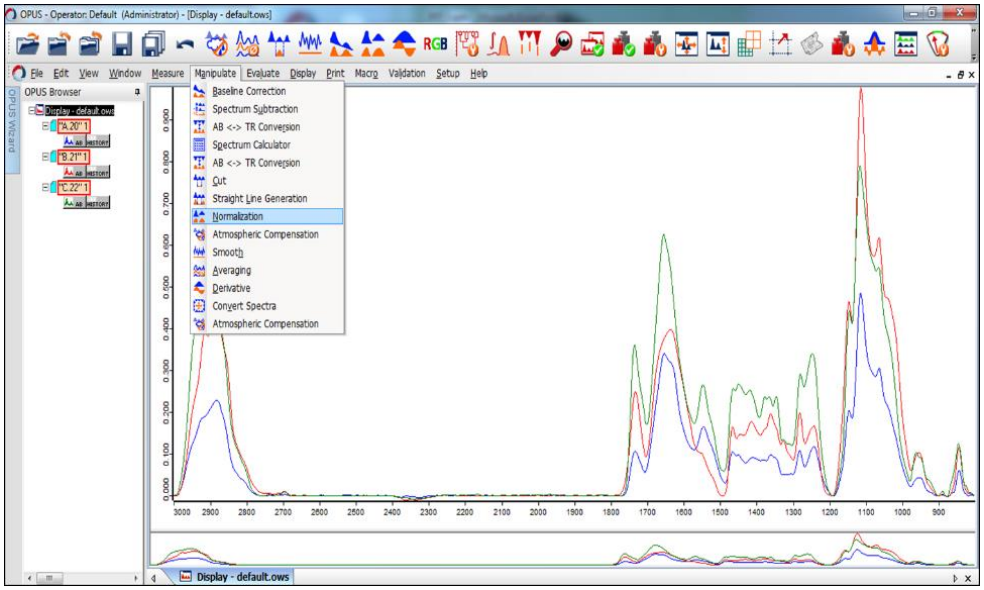
3. Spectrum ที่ผ่านการทำ baseline แต่ละชนิด



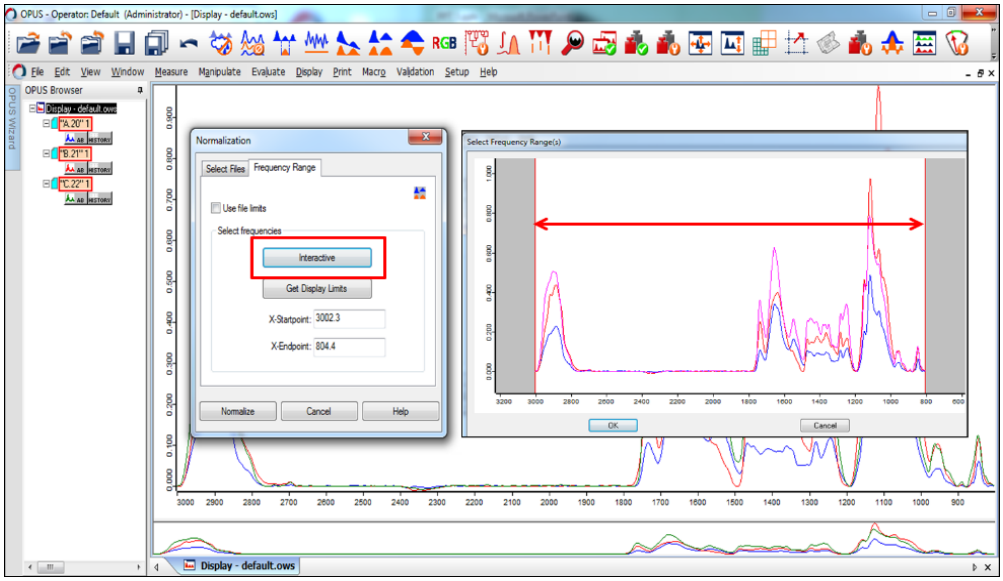
Normalization

เป็นการลด thickness effect จากตัวอย่างที่มีความหนาบางที่ไม่เท่ากัน เพื่อให้ข้อมูล spectrum ที่ได้สามารถนำมาเปรียบทียบกันได้

1. เลือกไฟล์ที่ต้องการทำ normalize จากนั้นคลิกเลือกไอคอน normalize หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate

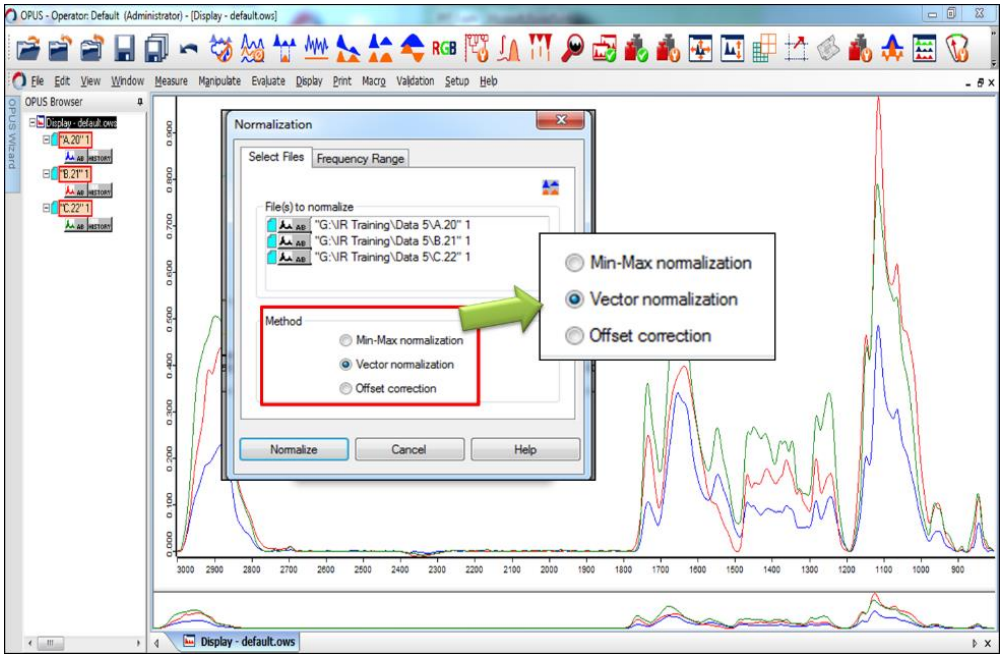


2. กำหนดค่า Frequency Range โดยสามารถพิมพ์ช่วง Wavenumber ที่ต้องการ หรือเลือก Interactive เพื่อกำหนดช่วงที่ต้องการ



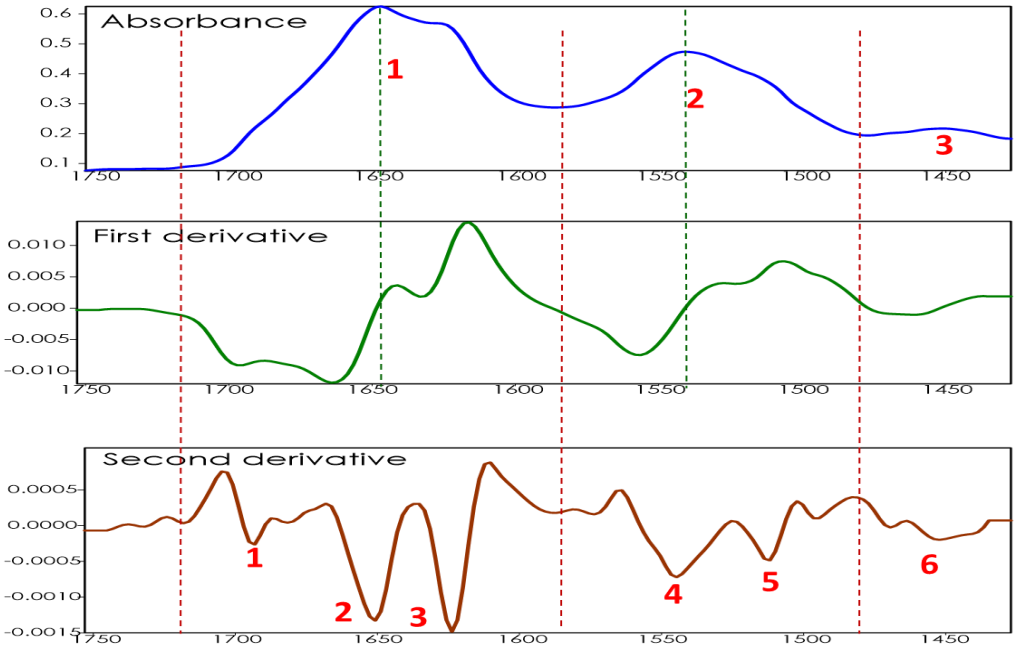
3. กำหนด Method ที่ต้องการทำ Normalization ประกอบด้วย

- Min-Max normalization เหมาะกับการทำ normalization ช่วงสั้น ๆ
- Vector normalization เป็นการทำ normalization เพื่อลด effect ที่เกิดจากความหนา-บางของตัวอย่าง
- Offset correction เป็นการดึง baseline ลงมาที่ค่าศูนย์

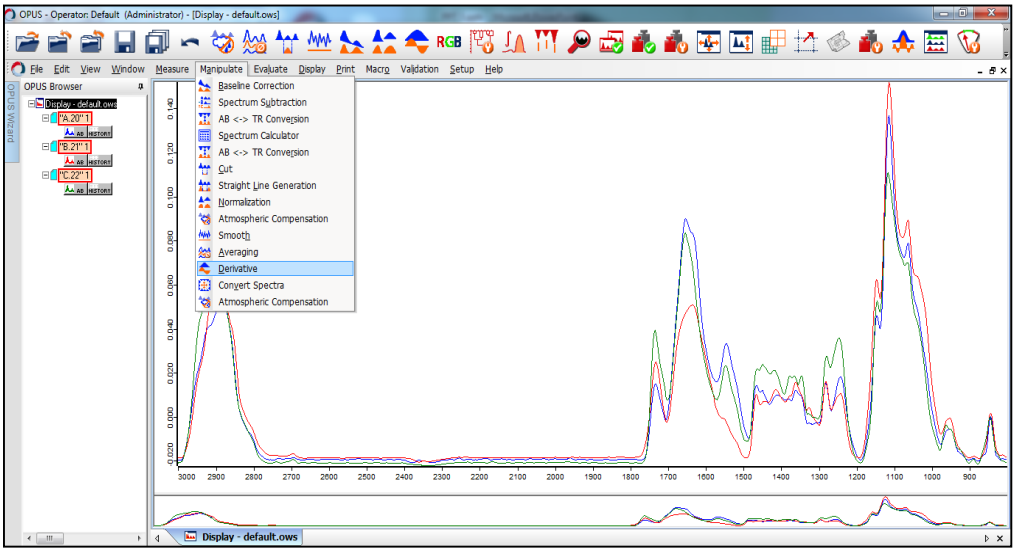


Derivative

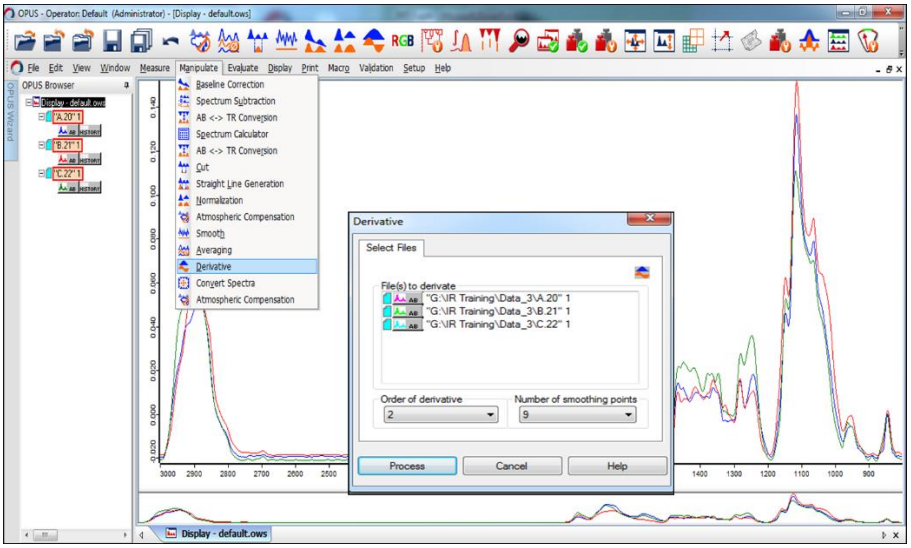
การทำ derivative เป็นการทำให้พีคที่ overlap กันอยู่ และไม่สามารถมองเห็นได้จาก original spectrum ชัดเจนขึ้น โดยจากภาพด้านล่าง จะเห็นได้ว่า จากoriginal spectrum 3 พีคหลัก เมื่อผ่านการทำ 1st และ 2nd derivative แล้ว สามารถให้รายละเอียดพีคที่ overlap กันอยู่ชัดเจนขึ้น



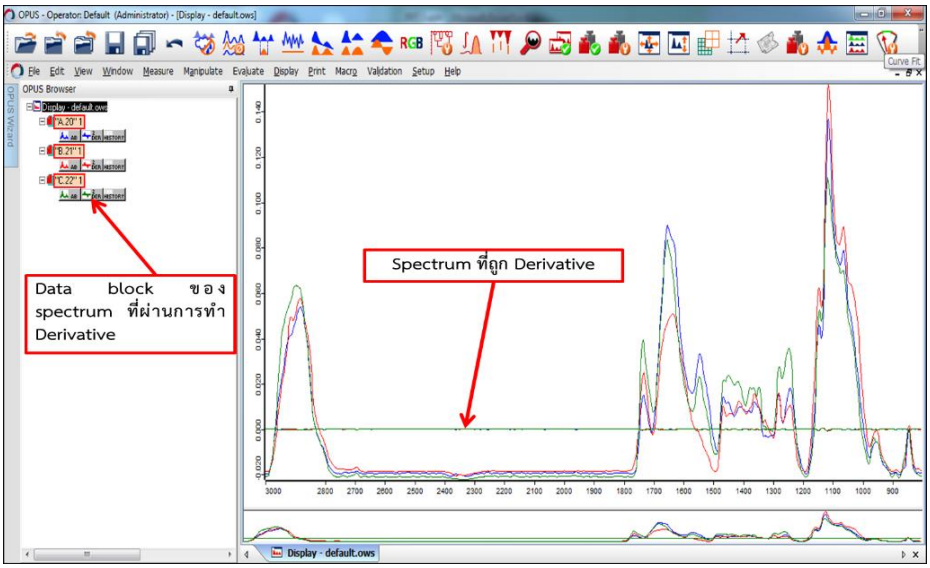
1. เลือกไฟล์ที่ต้องการทำ derivative จากนั้นคลิกเลือกไอคอน derivative หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate



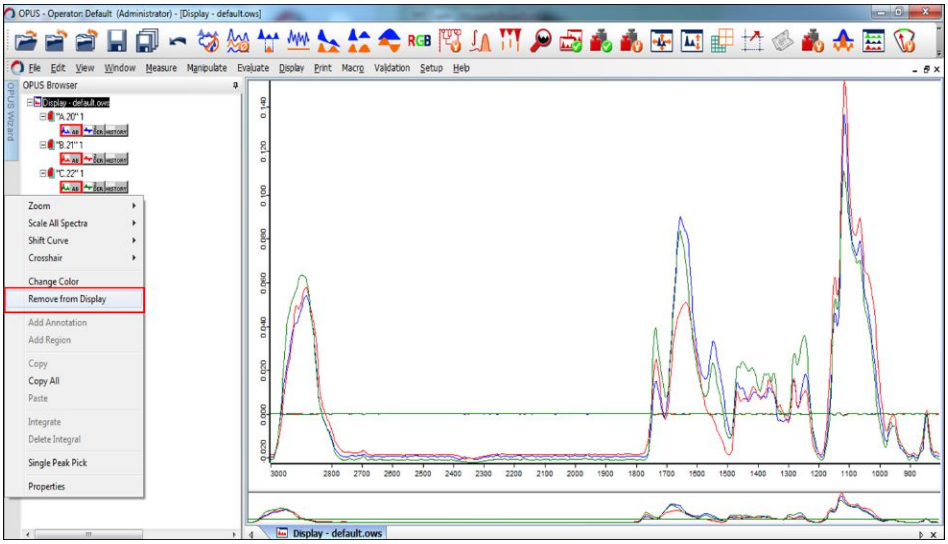
2. จะปรากฏหน้าต่างให้กำหนดค่า number of derivative และ number of smoothing points ให้กำหนดค่า (โดยปกติใช้ค่า second derivative และ number of smoothing point เท่ากับ 9) และคลิก process



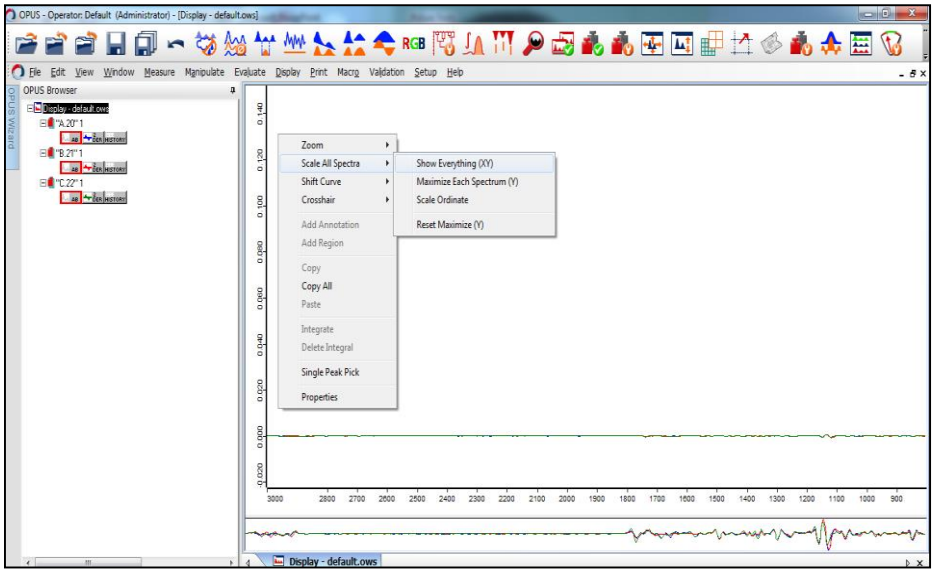
3. จะปรากฏ data block ที่ผ่านการทำ derivative และจะปรากฏ spectrum derivative บน window spectra



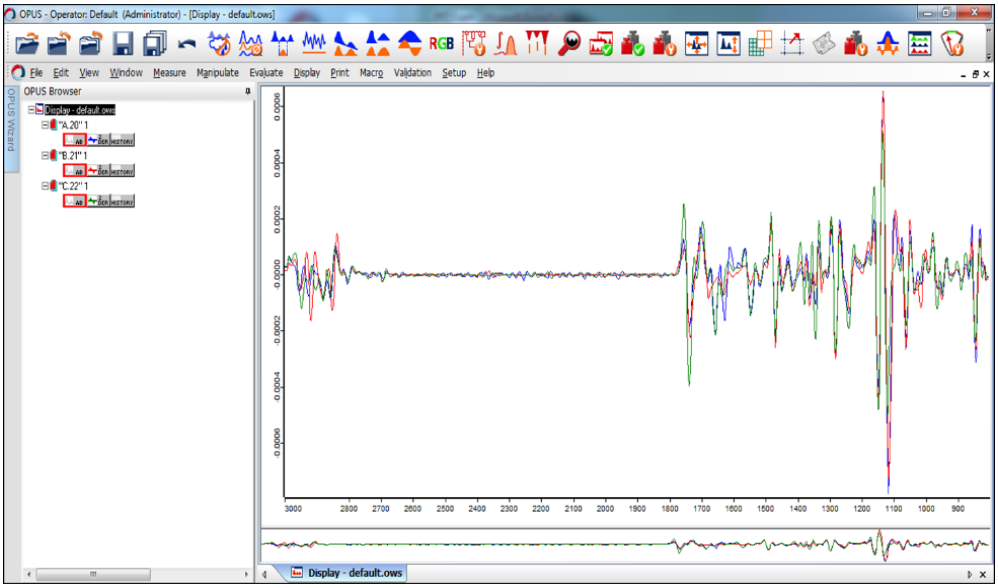
4. เลือก Data block ที่เป็น Original spectrum จากนั้น คลิกขวา เลือก Remove from Display



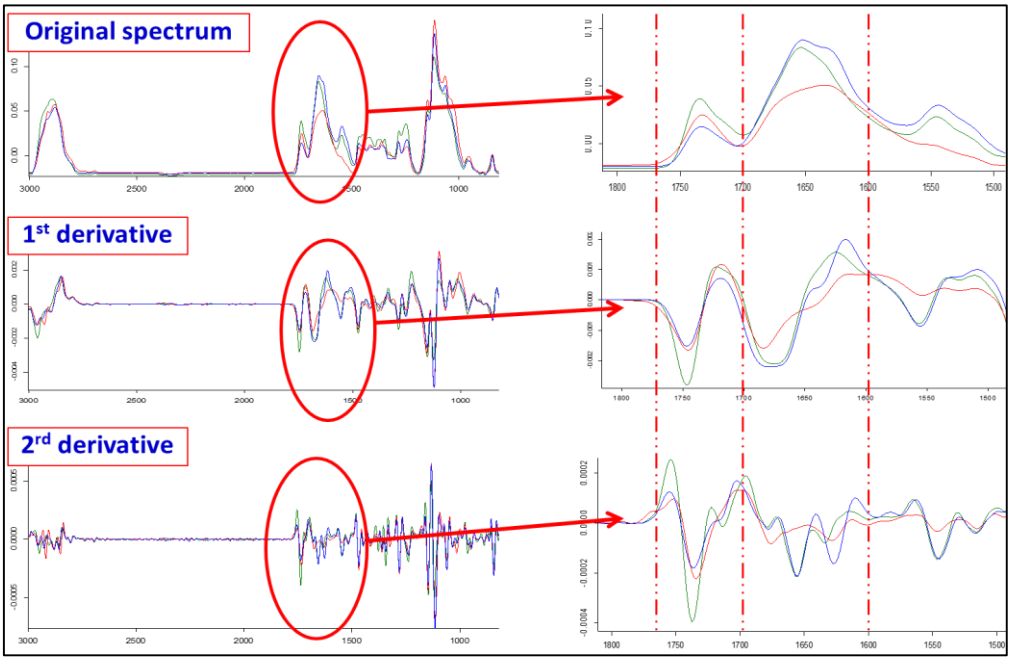
5. คลิกขวาบริเวณ spectrum window จากนั้นเลือก Scale All Spectra และเลือก Show Everything



6. จะปรากฏ spectrum ที่ผ่านการทำ derivative แล้ว

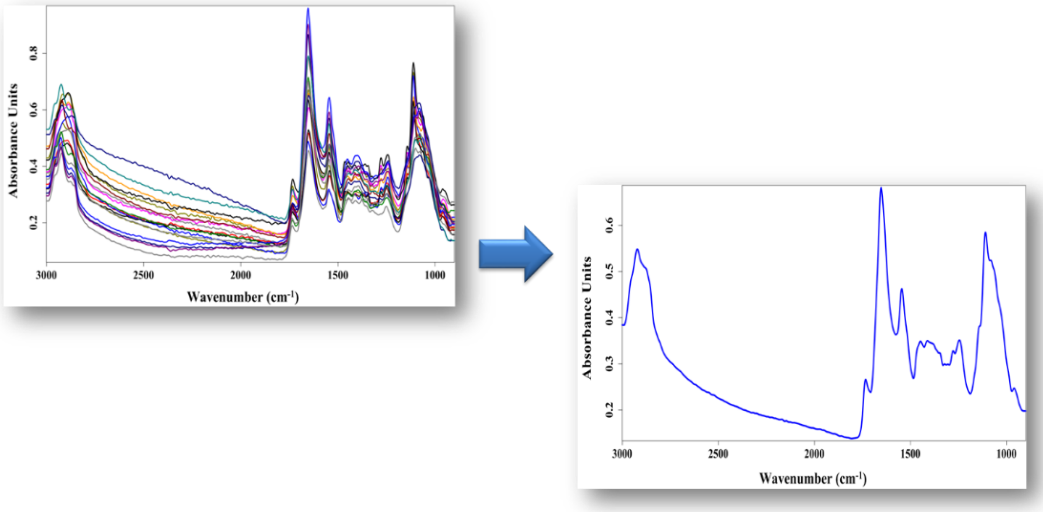


7. Spectrum ที่ผ่านการทำ 1st derivative และ 2nd derivative จะเห็นได้ว่า ที่การทำ 2nd derivative ที่ฐานของพีคตัดที่ค่าเริ่มต้นที่ศูนย์เหมือนกับ original spectrum และสามารถให้รายละเอียดของพีคได้ดีกว่าการทำ 1st derivative

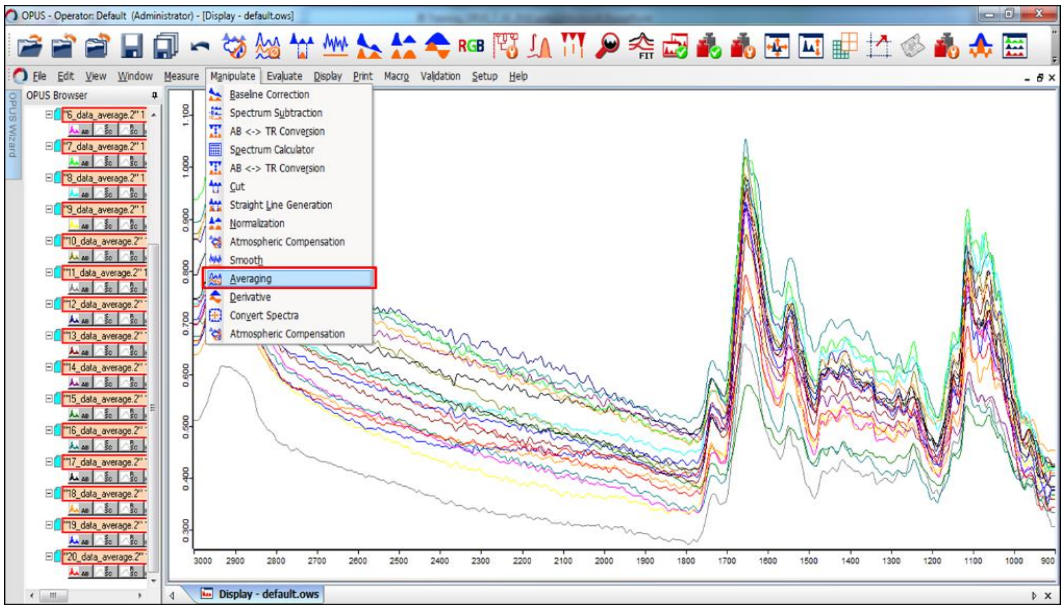


Averaging

เป็นการฉลี่ย spectrum จากทั้งหมดให้เหลือเพียง 1 spectrum เพื่อเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่ม spectrum



1. เลือกไฟล์ที่ต้องการ average จากนั้นคลิกเลือกไอคอน average หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ manipulate

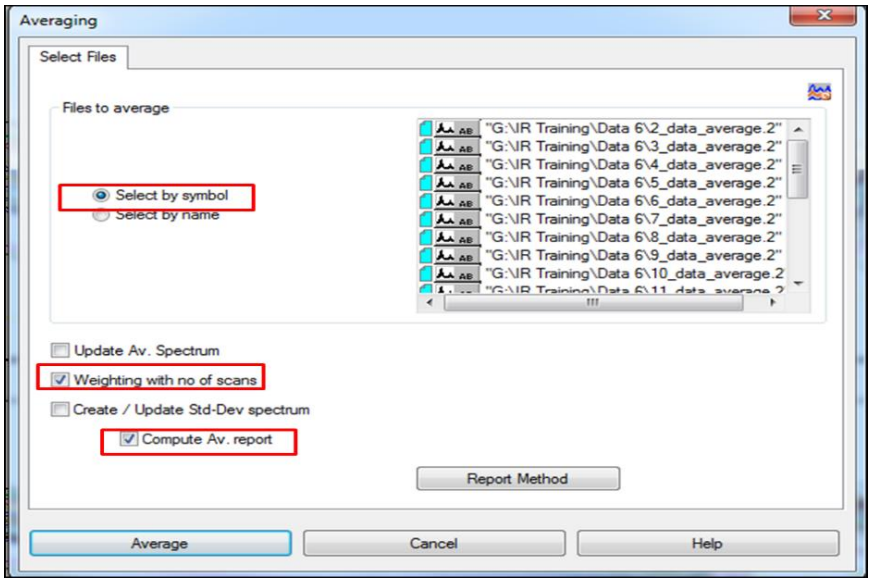


2. จะปรากฏหน้าต่าง Averaging ให้ กำหนดค่า

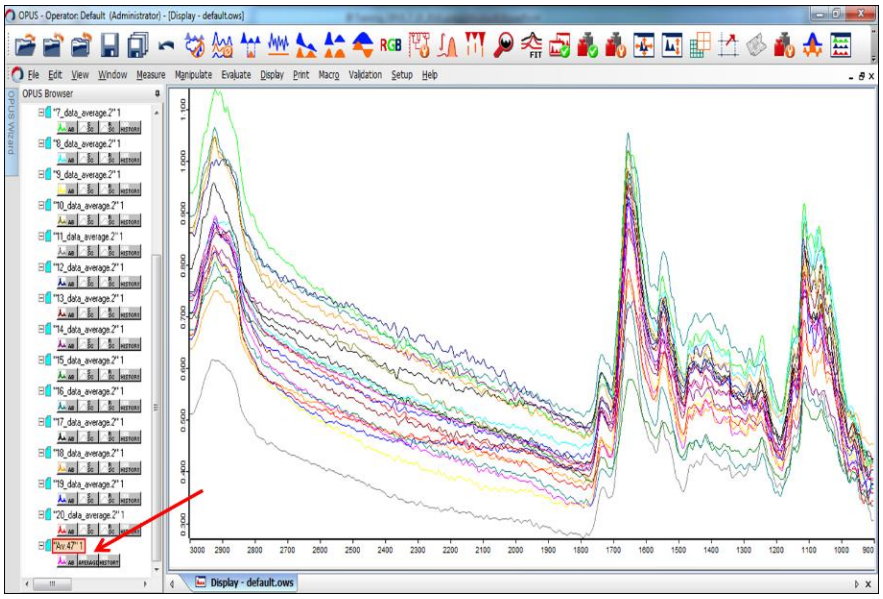
   - File to average (เลือก Select by symbol)

   - เลือก Weighting with no of scans/compute Av. Report

   - คลิก Average

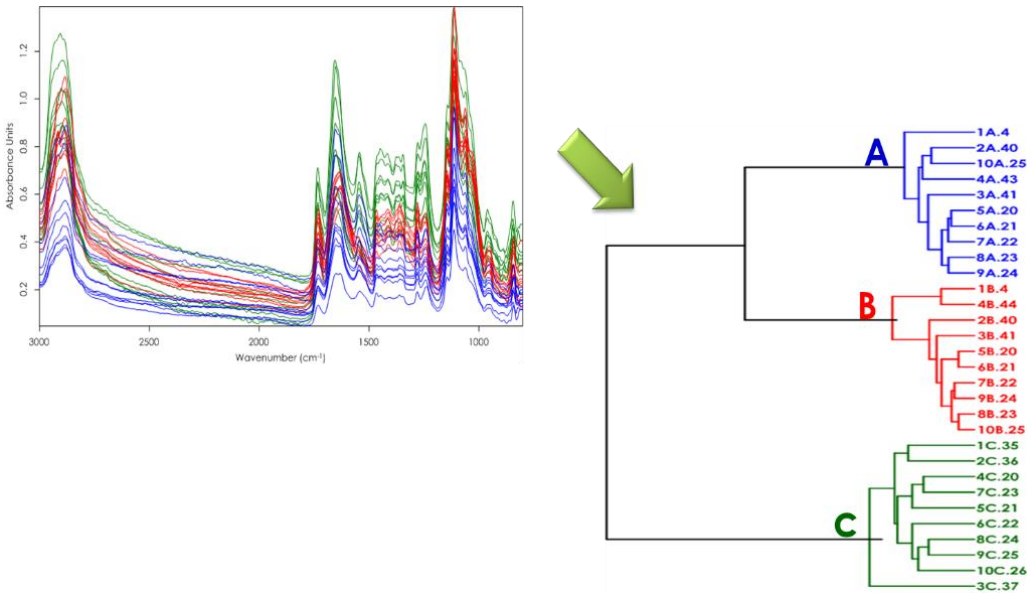


3. จะปรากฏ spectrum ใหม่ที่ได้จากการ Average ด้านล่างสุดของหน้าต่างแสดงลำดับ spectrum

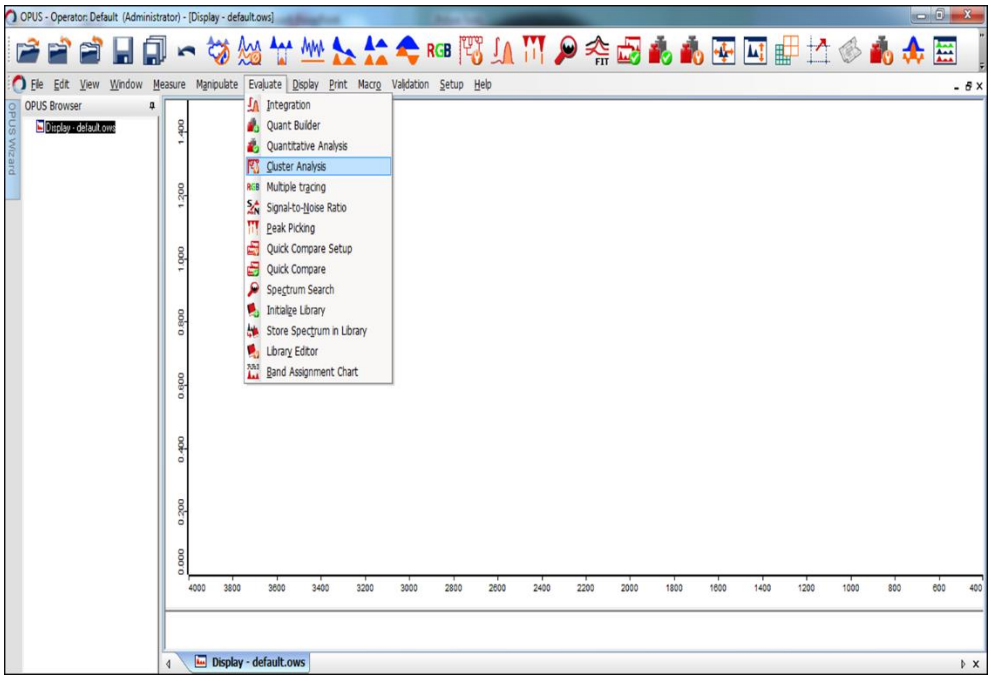


Cluster analysis

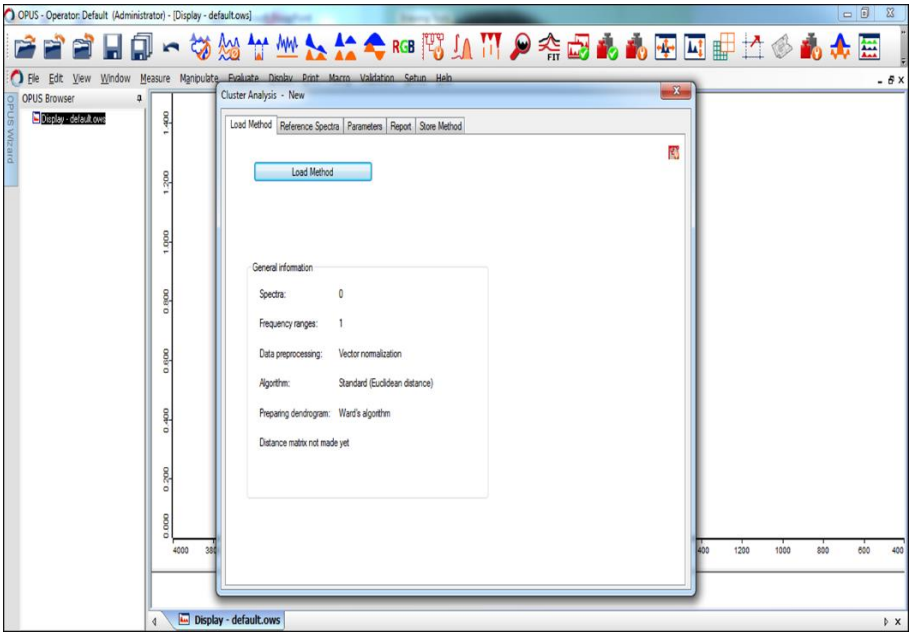
เป็นการทำ classification ของกลุ่มตัวอย่าง โดยแยกจากความแตกต่างของลักษณะ spectrum ที่ปรากฏ



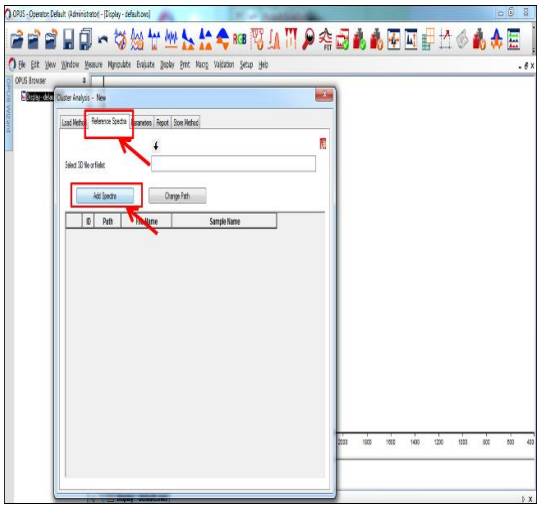
1. คลิกเลือกไอคอน cluster analysis หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ evaluate

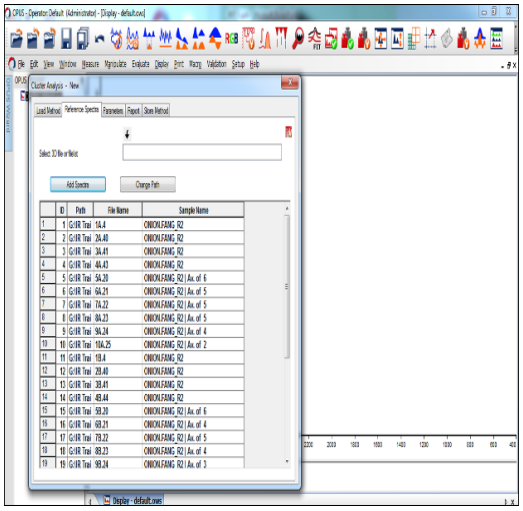


2. จะปรากฏหน้าต่าง cluster analysis



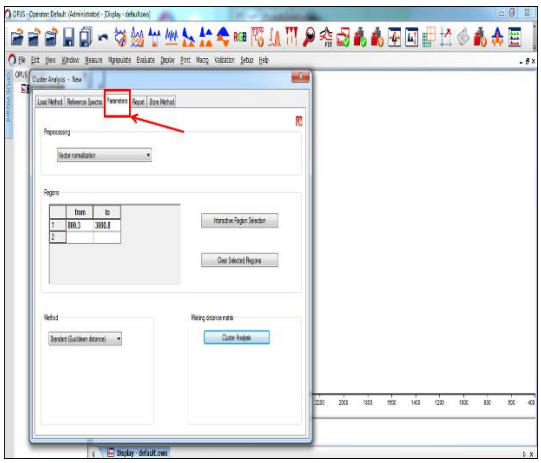
3. เลือก Reference Spectra เพื่อโหลด spectrum ที่ต้องการทำ Cluster จากนั้นเลือก Add Spectra

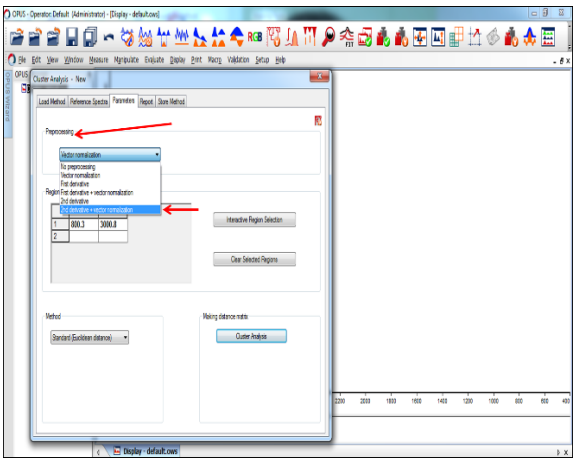




4. เลือก parameter จะปรากฏหน้าต่างให้กำหนดค่า Preprocessing

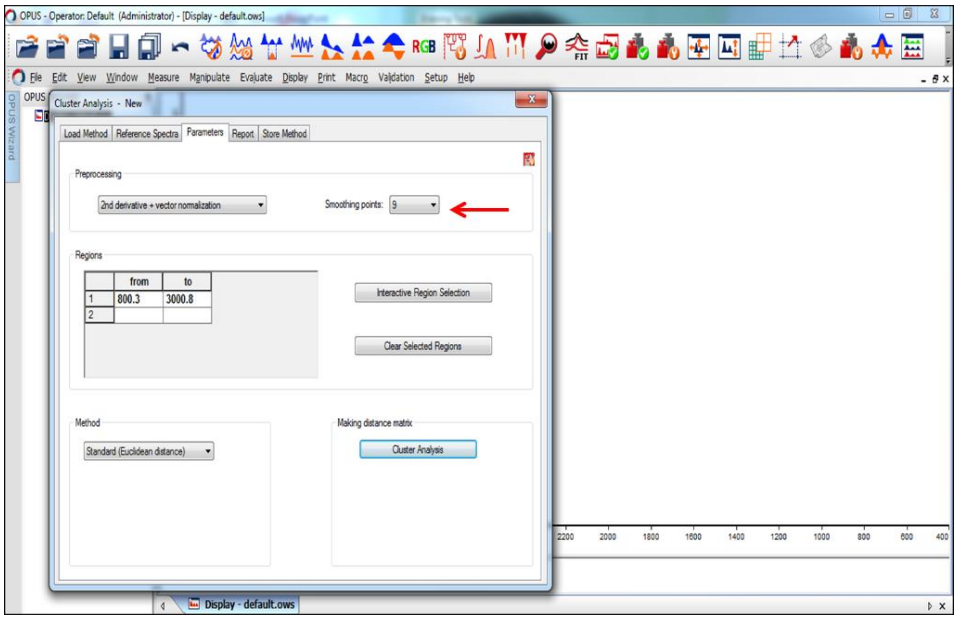
- เลือก 2nd derivative + vector normalization



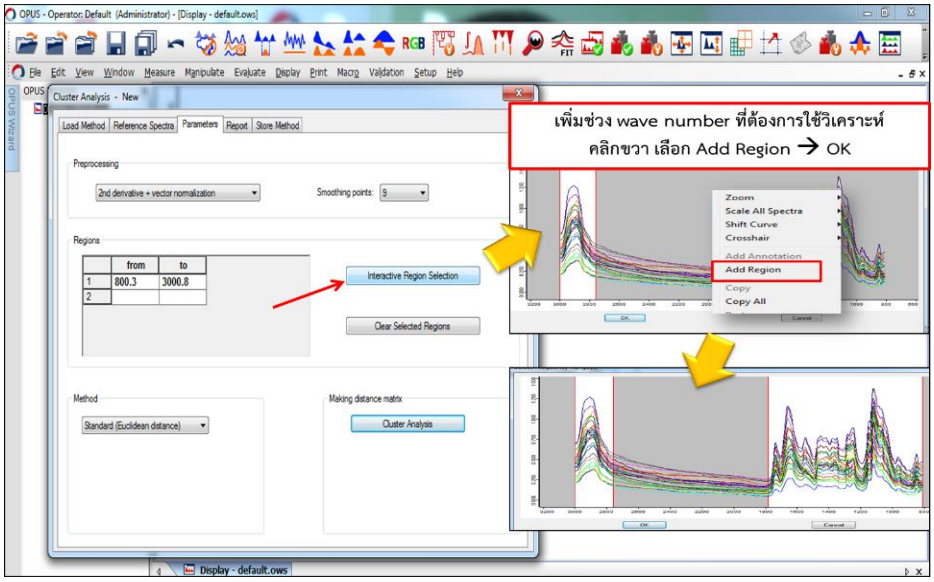


5. ในกรณีที่เลือกทำ derivative จะปรากฏหน้าต่างให้กำหนดค่า number of smoothing point

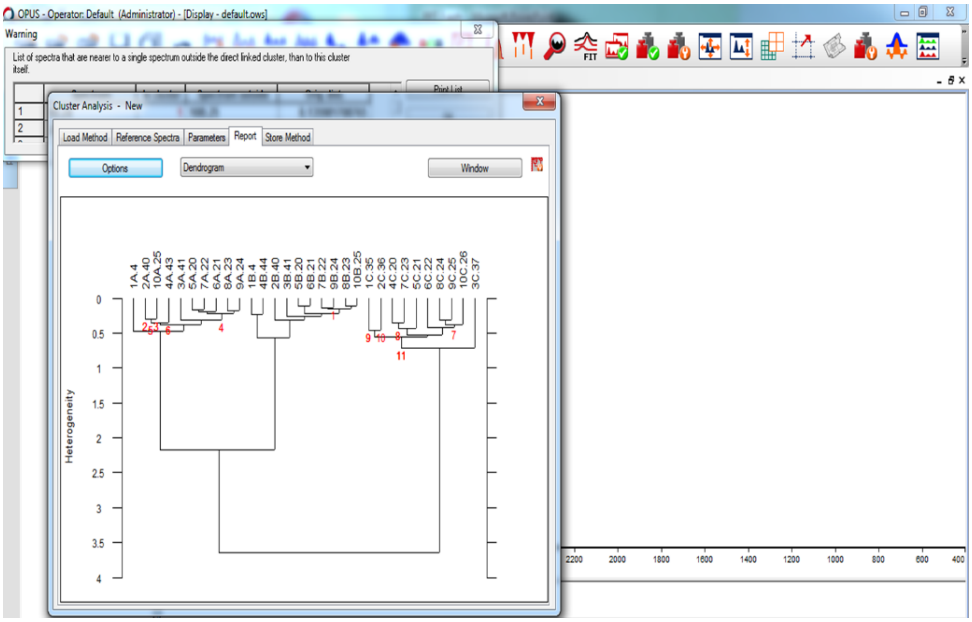
- กำหนดค่า Smoothing point เท่ากับ 9



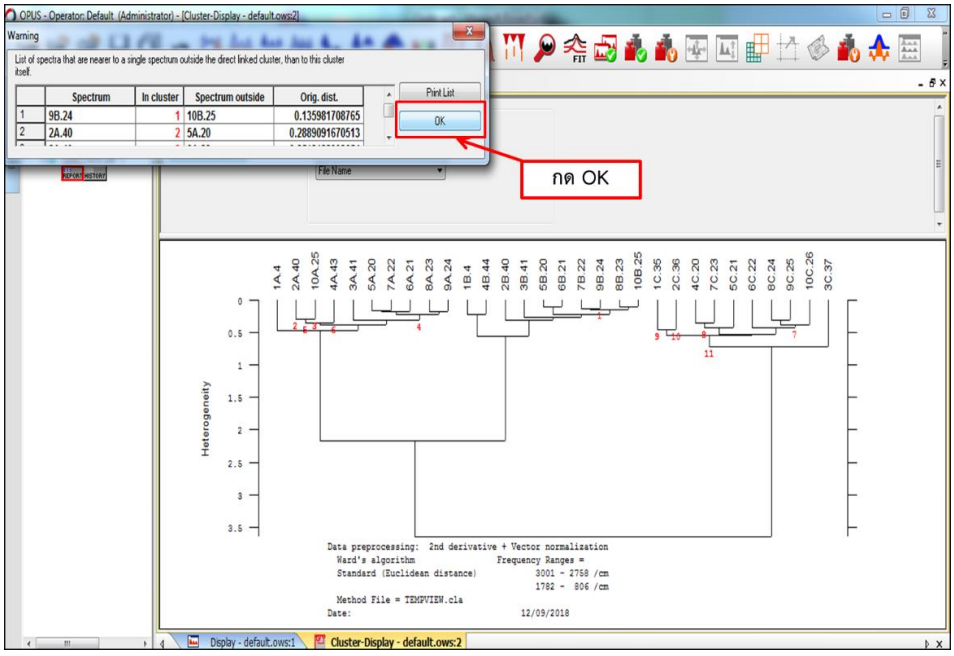
6. กำหนด Interaction Region Selection จากนั้น คลิก cluster analysis



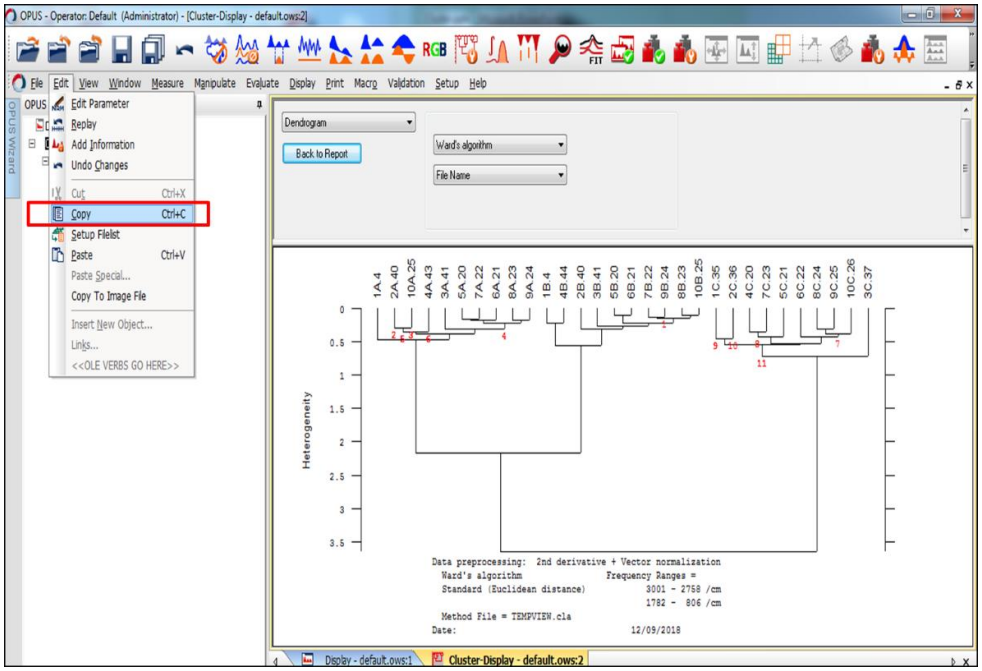
7. คลิก report จะแสดงผลการทำ cluster analysis ในกรณีที่ต้องการคัดลอกข้อมูล ให้คลิกที่ปุ่ม window



8. คลิกที่ OK

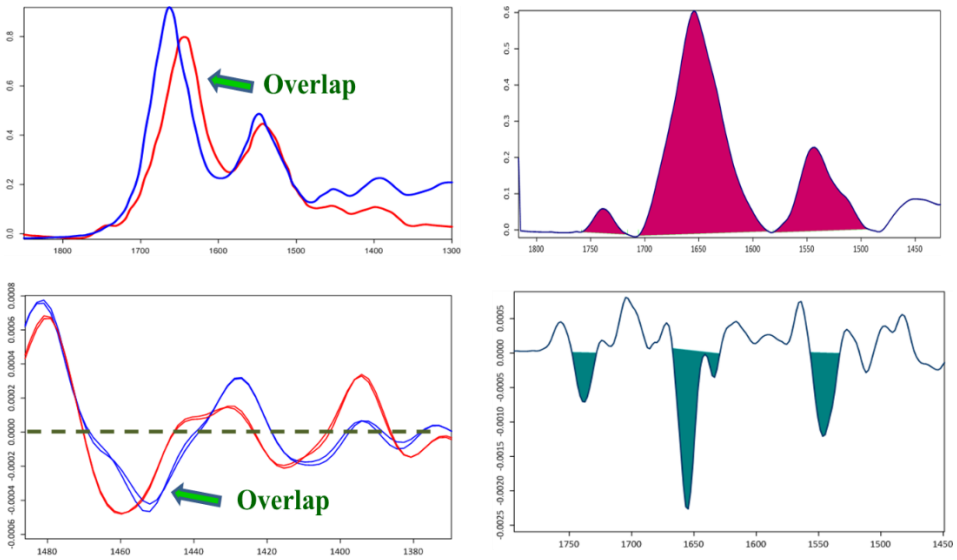


9. คลิกที่แถบเครื่องมือ edit เลือก copy จะสามารถคัดลอกข้อมูลการทำ cluster ออกมาได้



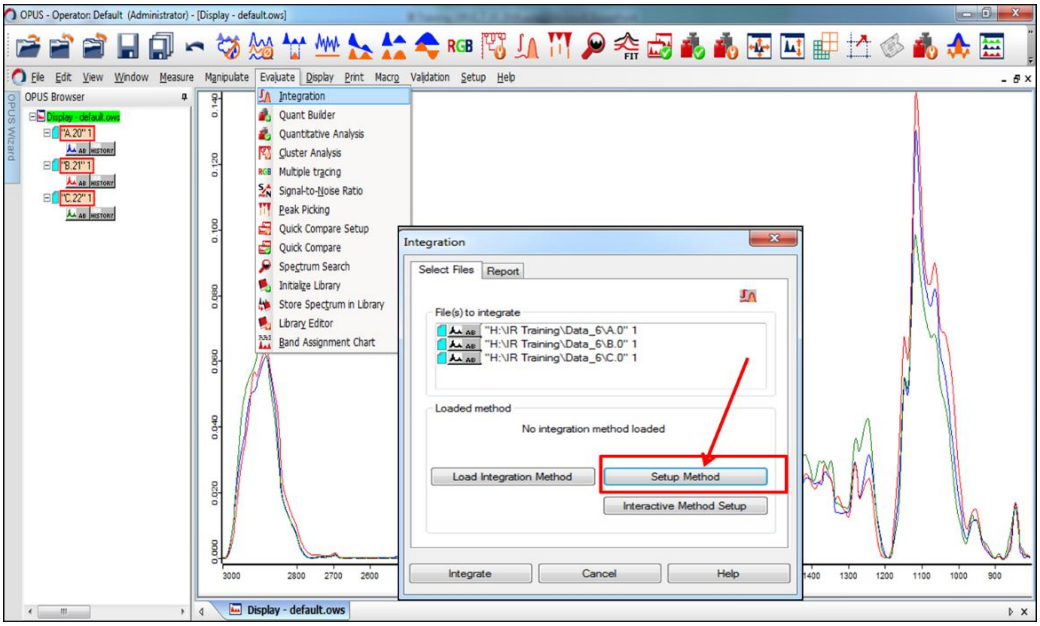
Integration

เป็นการหาพื้นที่ใต้กราฟเพื่อทำการเปรียบเทียบเชิงปริมาณ โดย spectrum ที่จะนำมาเปรียบเทียบกันได้นั้น ต้องผ่านการทำ data preprocessing และ normalize มาแล้ว

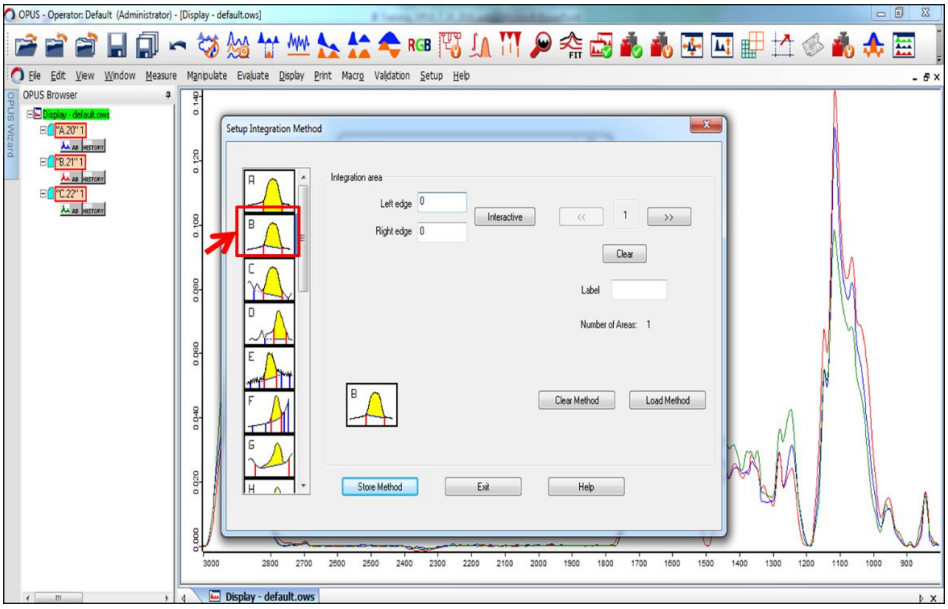


การ integrate จาก original spectrum

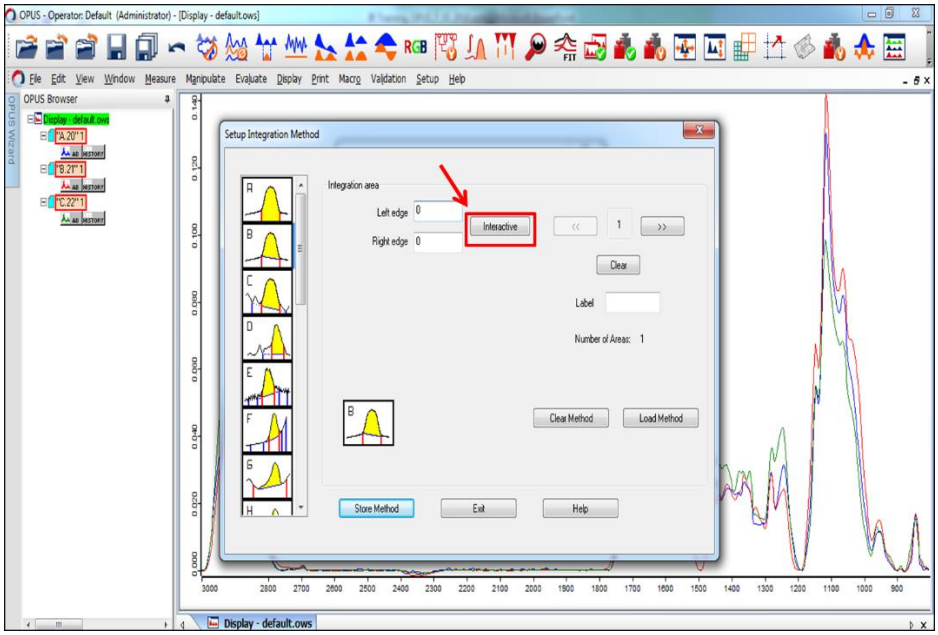
1. คลิกเลือกไอคอน integration หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ evaluate จะปรากฏหน้าต่าง Integration เลือก Setup Method



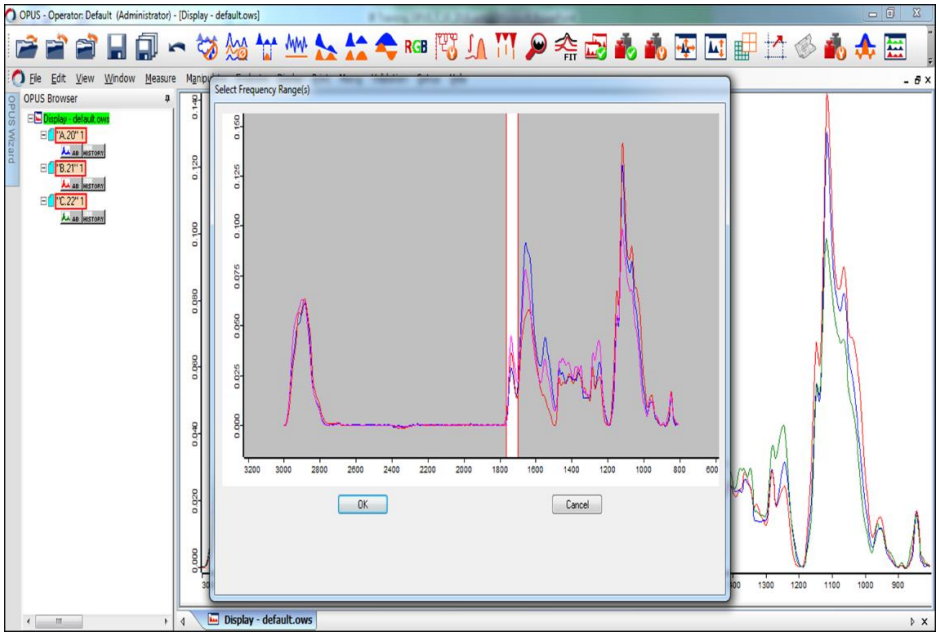
2. เลือกชนิดของพื้นที่ใต้กราฟที่ต้องการ โดยเลือกชนิด B



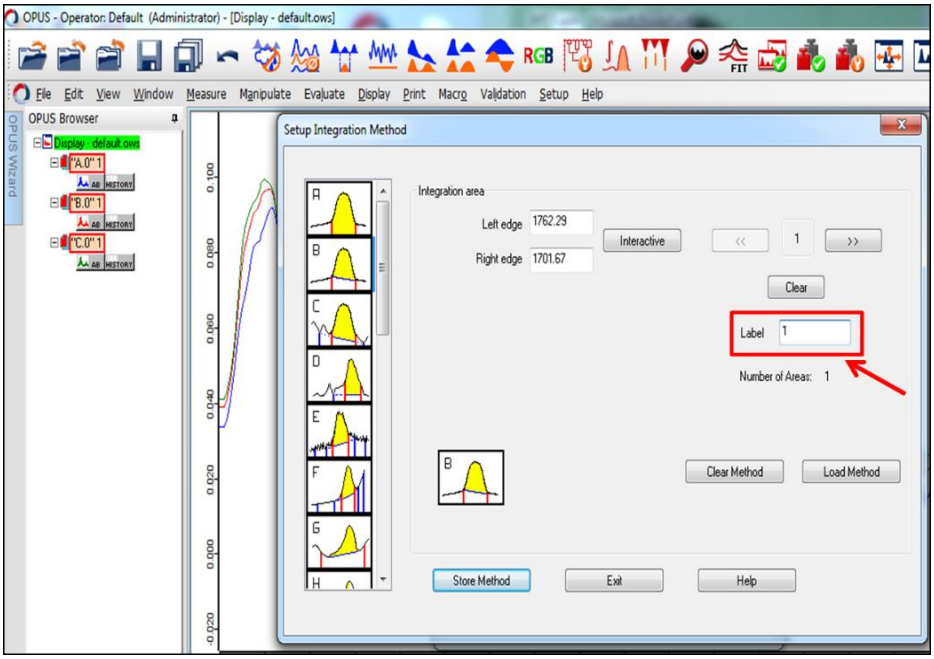
3. เลือก Interaction เพื่อกำหนดค่า Wavenumber ของพีคที่ต้องการหาพื้นที่



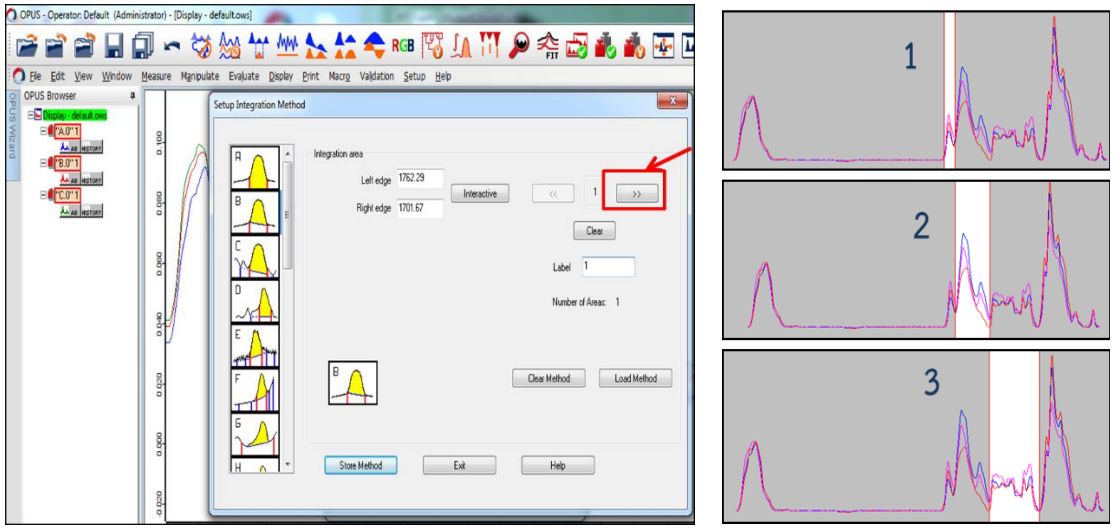
4. ขยับเลื่อนตำแหน่งให้เส้นจุดตัดอยู่ที่ฐานพีค คลิก OK



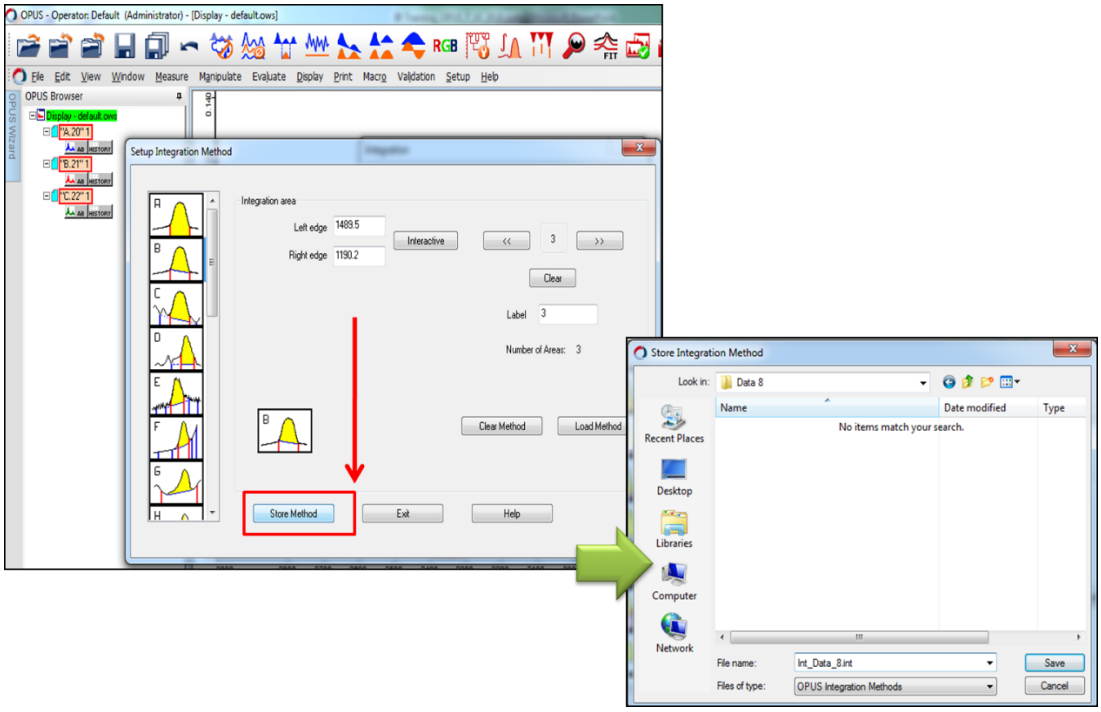
5. ใส่ลำดับพีคที่ integrate



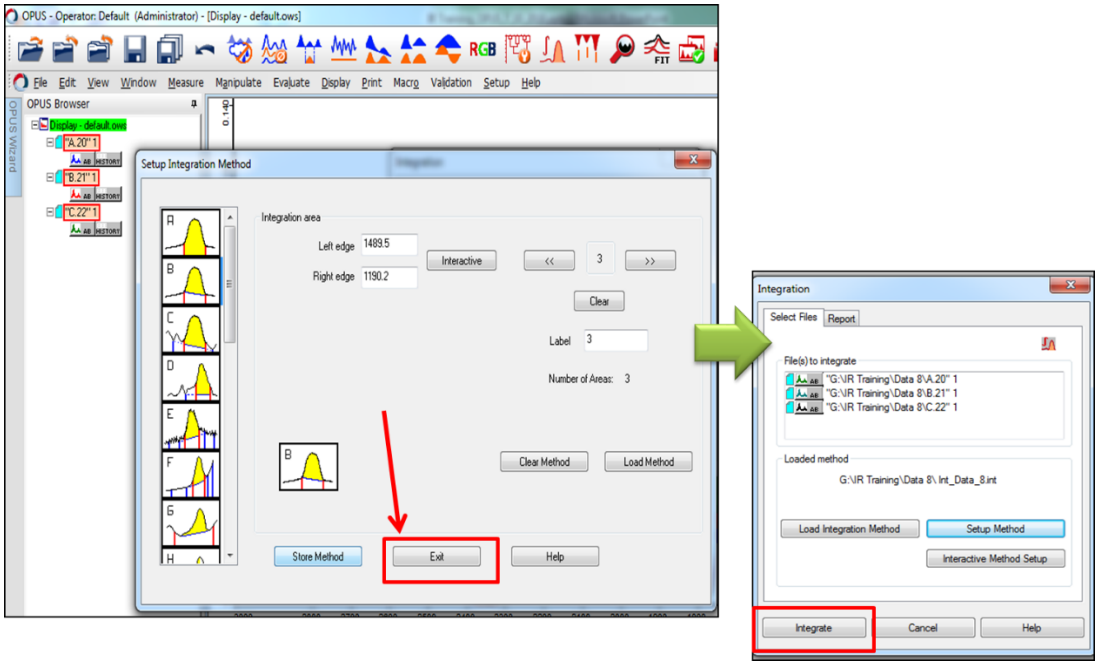
6. คลิก >> เมื่อต้องการ integrate พีคถัดไป



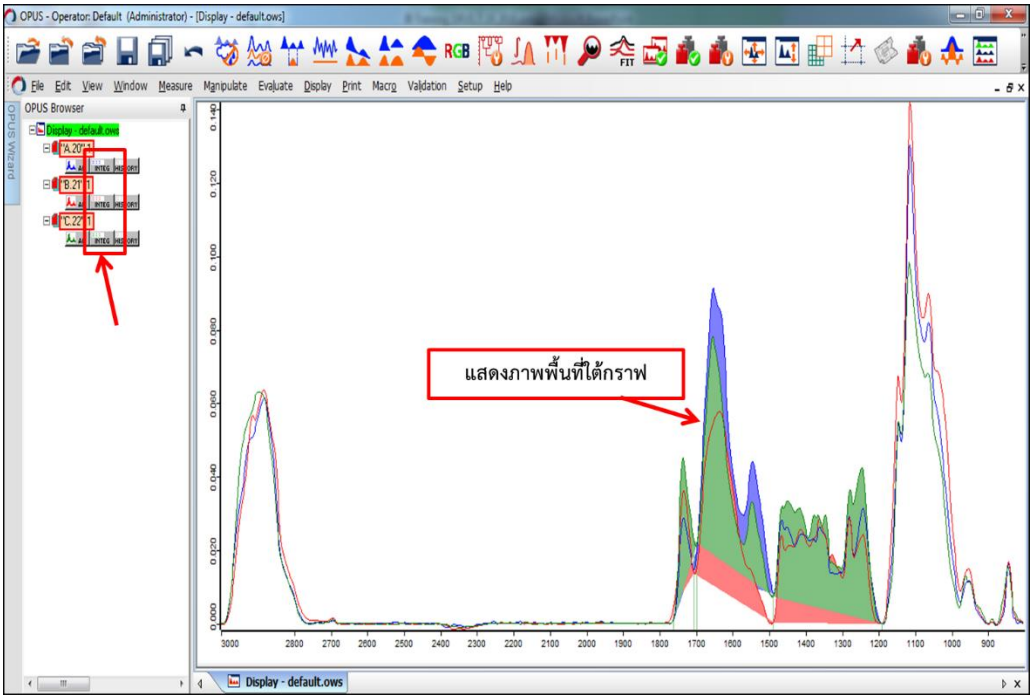
7. เมื่อกำหนดค่าครบทุกพีคที่ต้องการแล้ว ให้เลือก Store Method จะปรากฏหน้าต่างให้ save method ที่ใช้ integrate



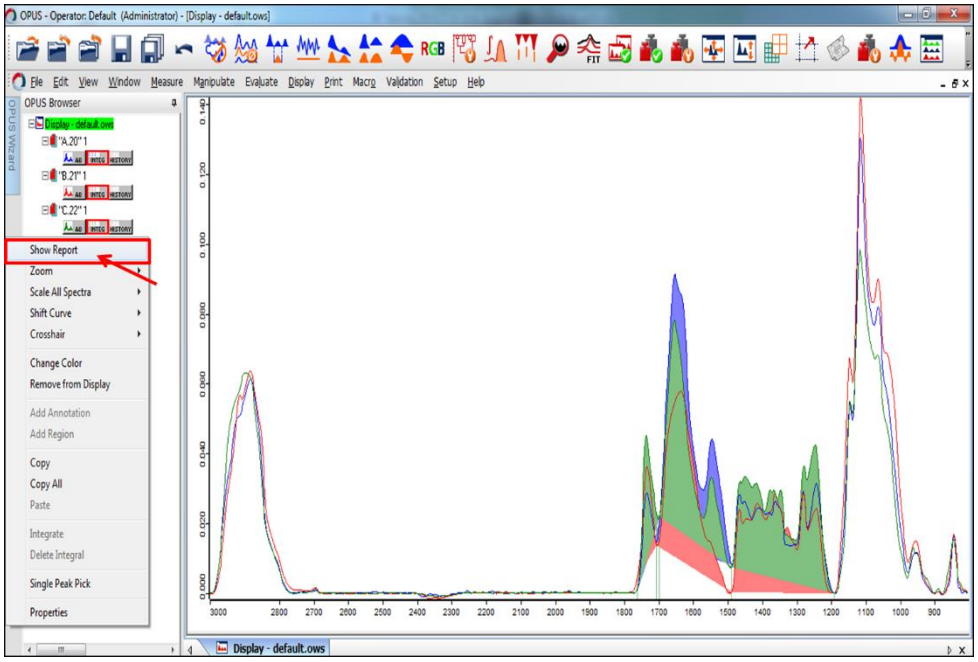
8. เลือก Exit จะปรากฏหน้าต่าง Integration เลือก Integrate



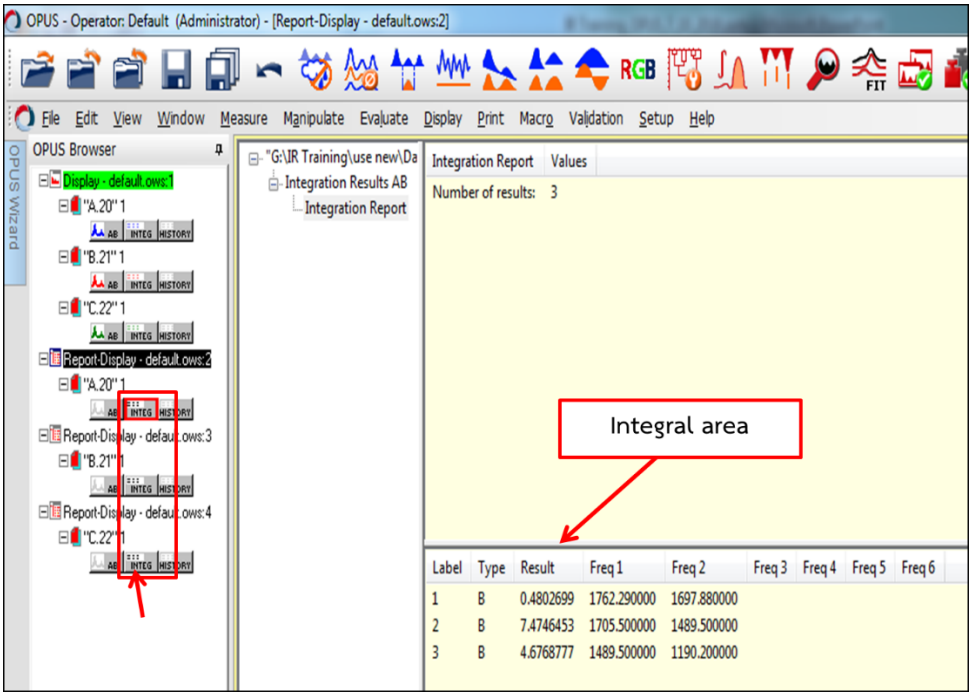
9. จะปรากฏ data block แสดงผลการ integrate



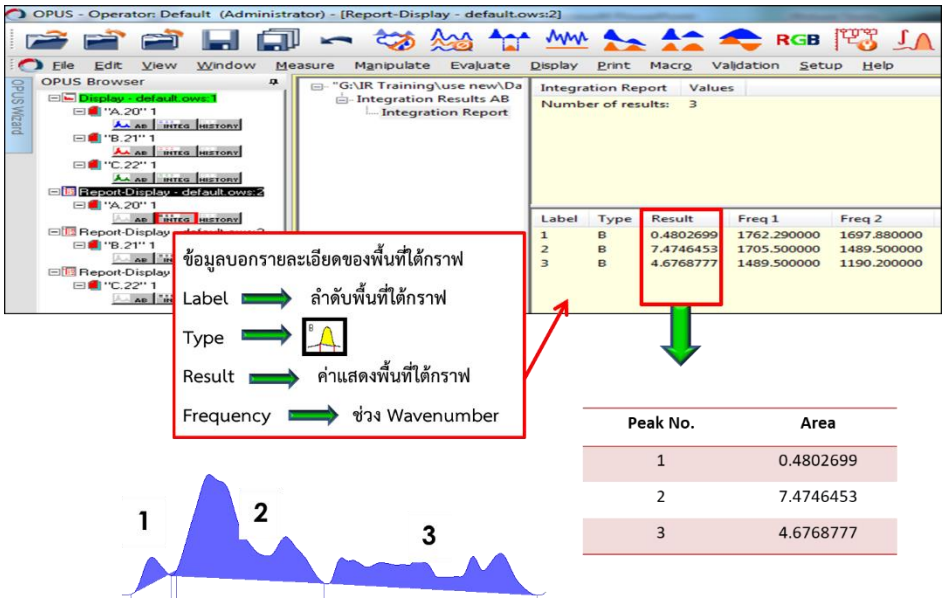
10. คลิกขวาที่ data block เลือก show report



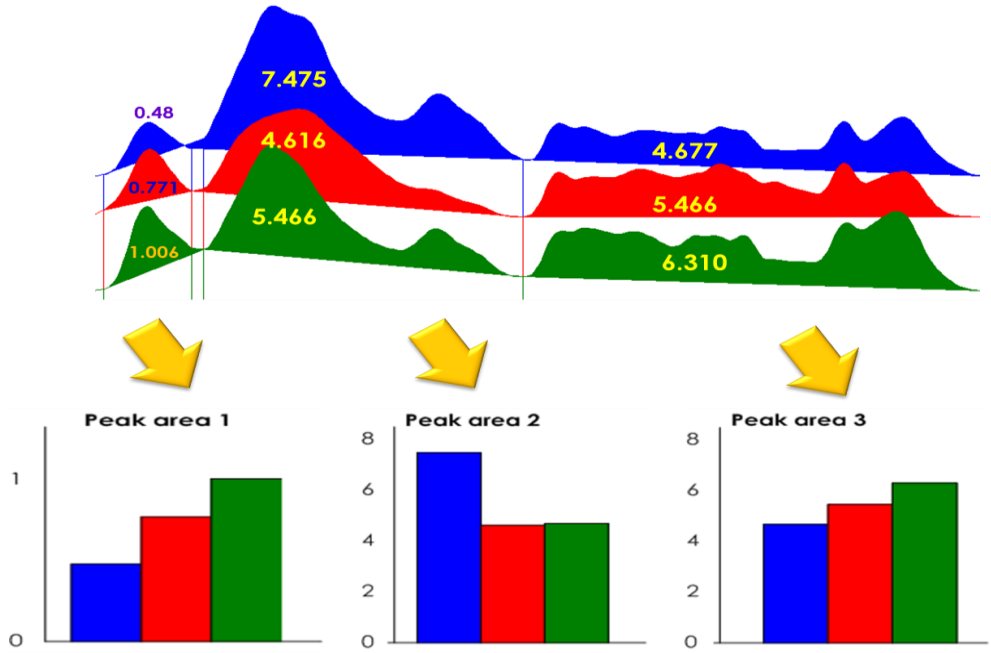
11. เมื่อคลิกที่ data block จะปรากฏพื้นที่ใต้กราฟออกมาเป็นตัวเลข



12. โดยจะปรากฏข้อมูลรายละเอียดของพื้นที่ใต้กราฟ ประกอบด้วย label, type, result และ frequency

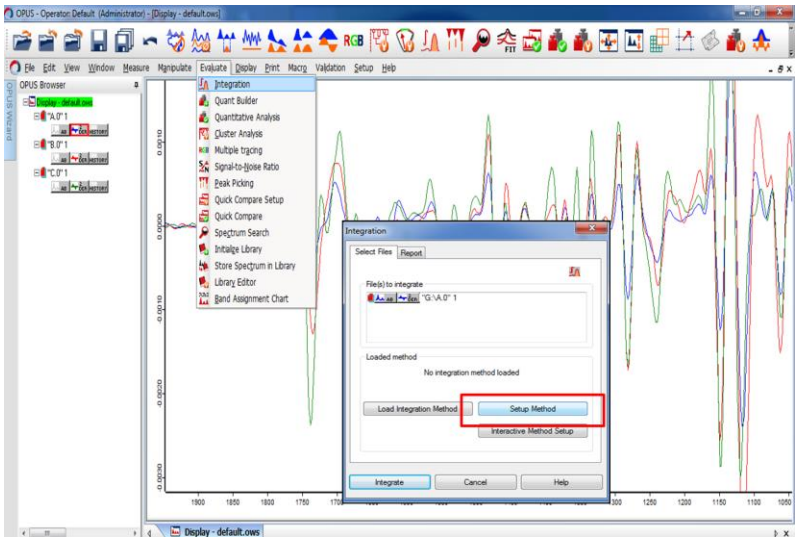


13. เมื่อนำค่าตัวเลขที่ได้มา plot กราฟ จะสามารถแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ในเชิงปริมาณของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ได้

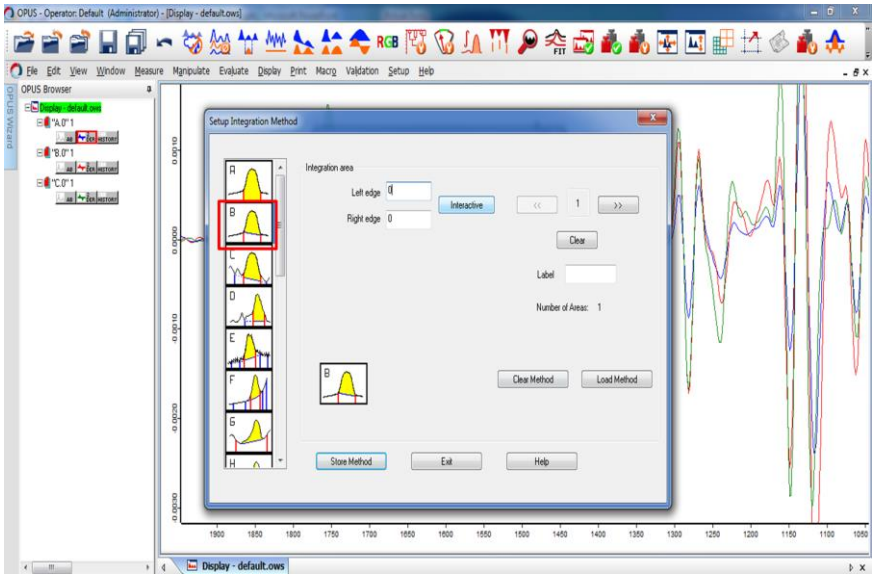


การ integrate จาก derivative spectrum

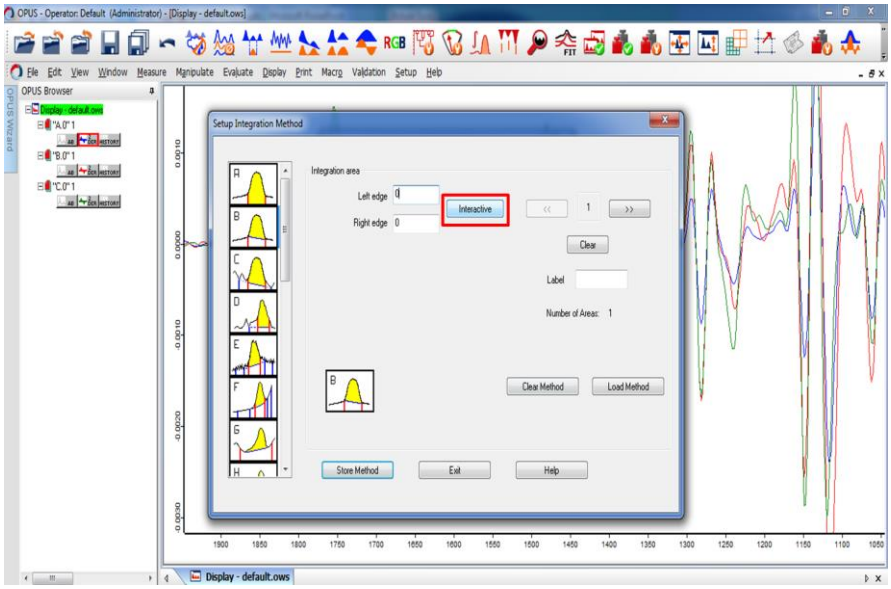
1. คลิกเลือกไอคอน integration หรือเลือกจากแถบเครื่องมือ evaluate จะปรากฏหน้าต่าง Integration เลือก Setup Method



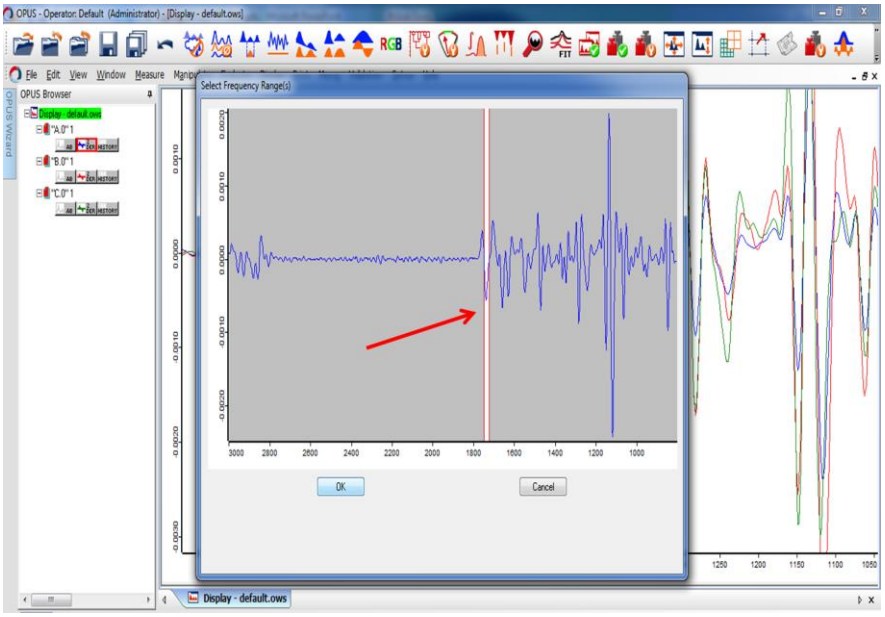
2. เลือกชนิดพื้นที่ใต้กราฟ โดยเลือกชนิด B



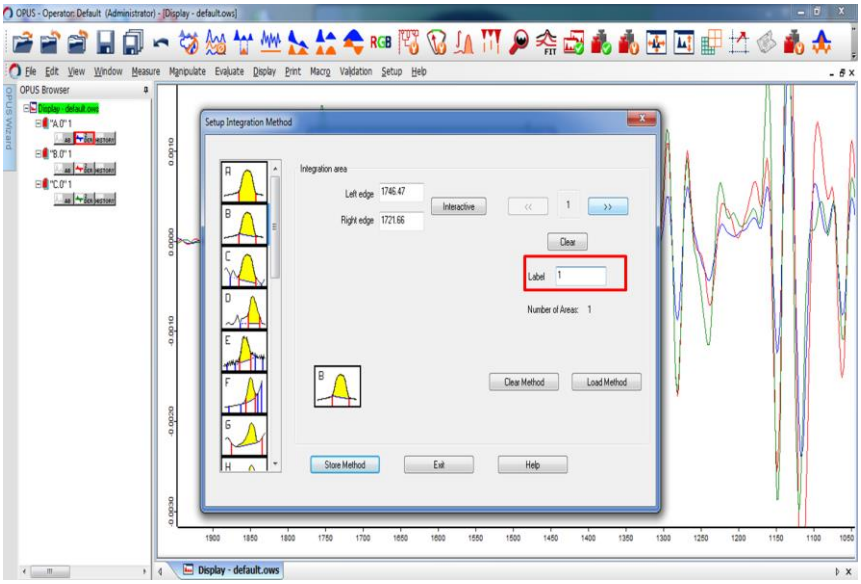
3. เลือก Interaction เพื่อกำหนดค่า Wavenumber ของพีคที่ต้องการหาพื้นที่



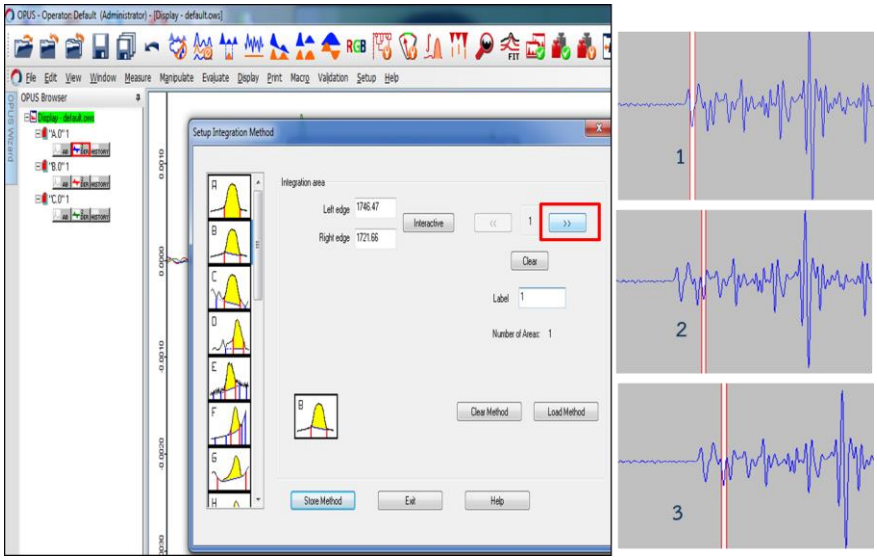
4. ขยับเลื่อนตำแหน่งให้จุดตัดที่ฐานพีคอยู่ที่ศูนย์



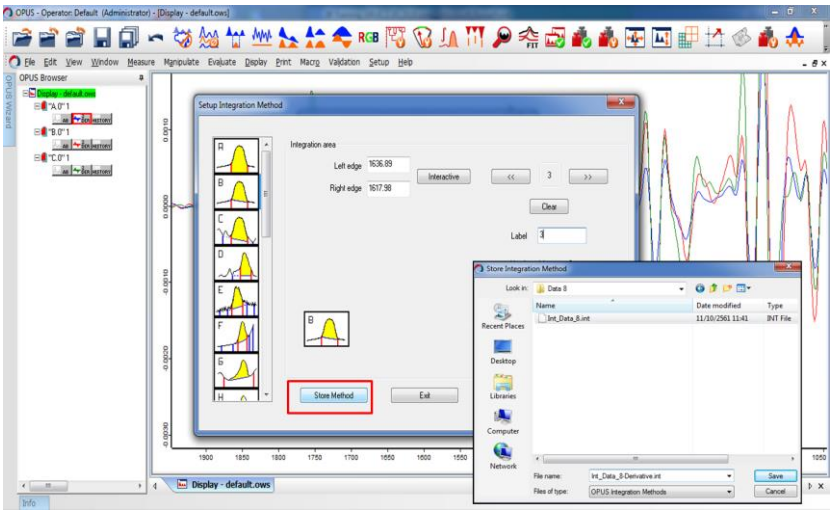
5. ใส่ลำดับพื้นที่ integrate



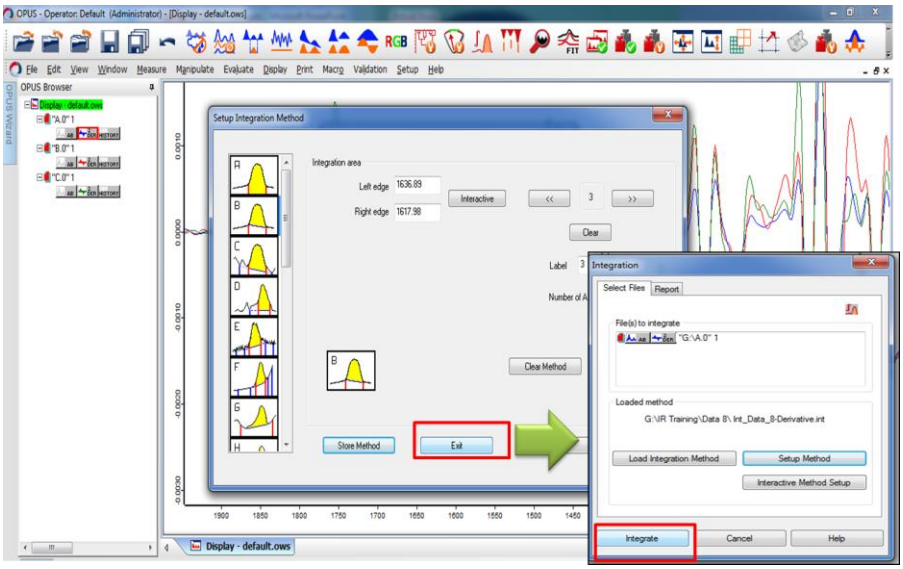
6. คลิก >> เมื่อต้องการ integrate พีคถัดไป



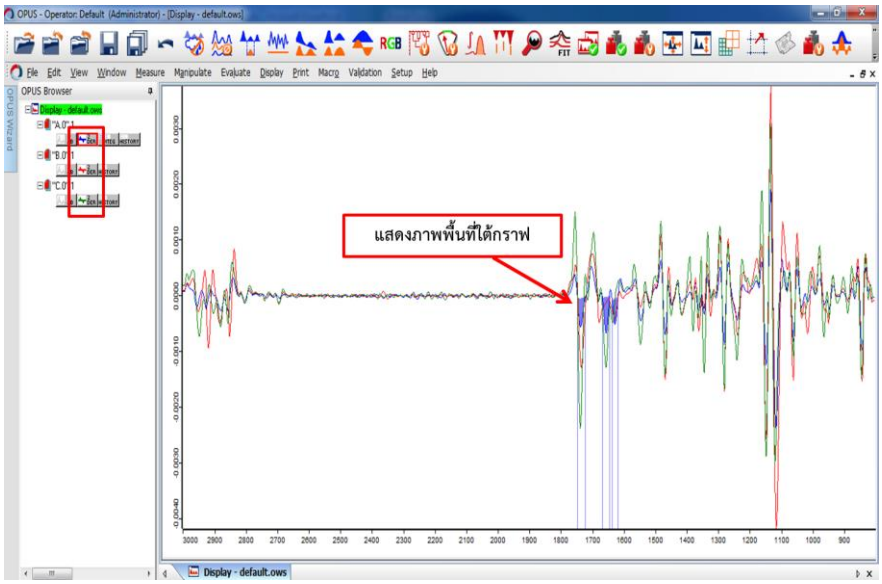
7. เมื่อกำหนดค่าครบทุกพีคที่ต้องการแล้ว ให้เลือก Store Method จะปรากฏหน้าต่างให้ save method ที่ใช้ integrate



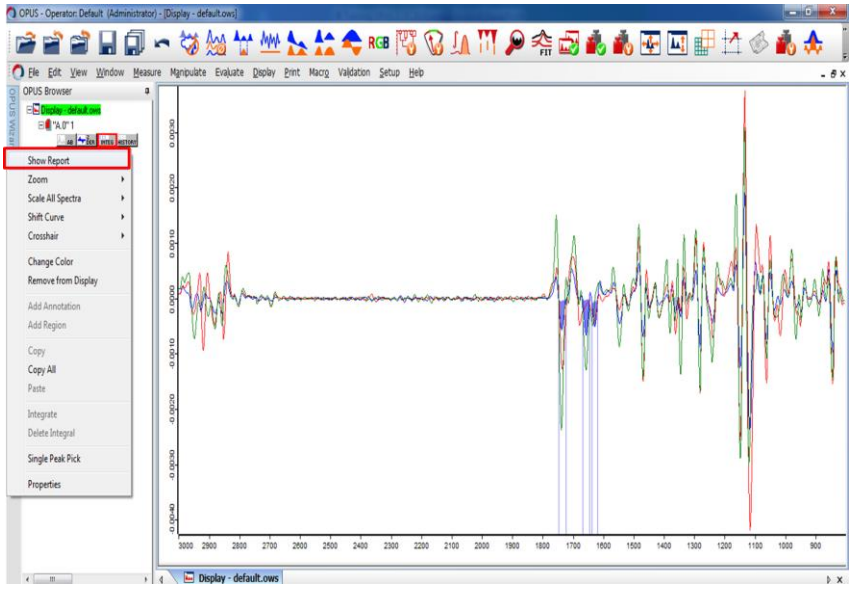
8. เลือก Exit จะปรากฏหน้าต่าง Integration เลือก Integrate



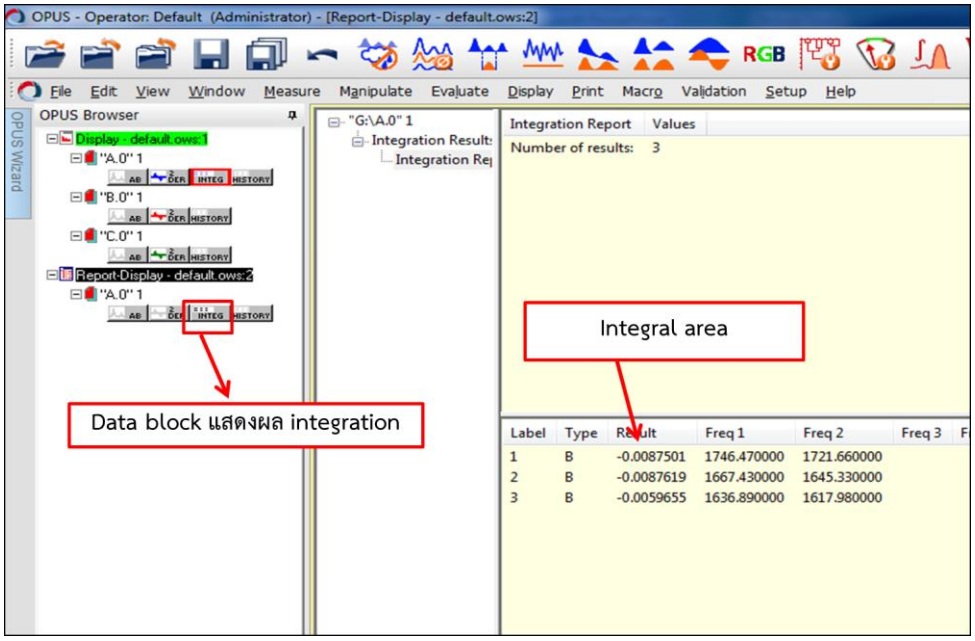
9. จะแสดง data block ที่ผ่านการทำ integrate และพื้นที่ใต้กราฟแสดงบน window spectrum



10. เมื่อต้องการนำข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟเป็นตัวเลขออก
คลิกขวาที่ data block integrate เลือก show report

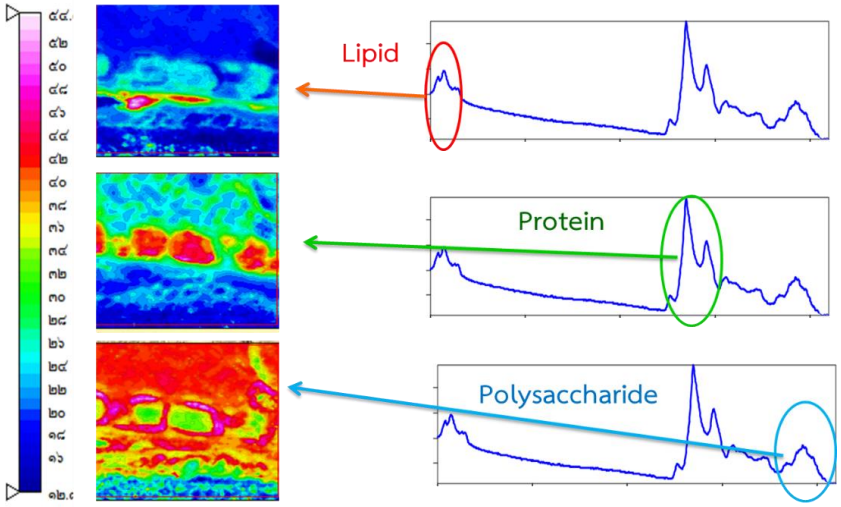


11. ตารางแสดงผลพื้นที่ใต้กราฟจะแสดงในช่อง result ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้เป็นค่าติดลบ เนื่องจากพีคที่ integrate ผ่านการทำ second derivative ทำให้พีคที่ได้กลับหัว ดังนั้น การคำนวนพื้นที่ใต้กราฟให้ตัดเครื่องหมายลบ ให้แสดงเป็นค่าบวกเท่านั้น

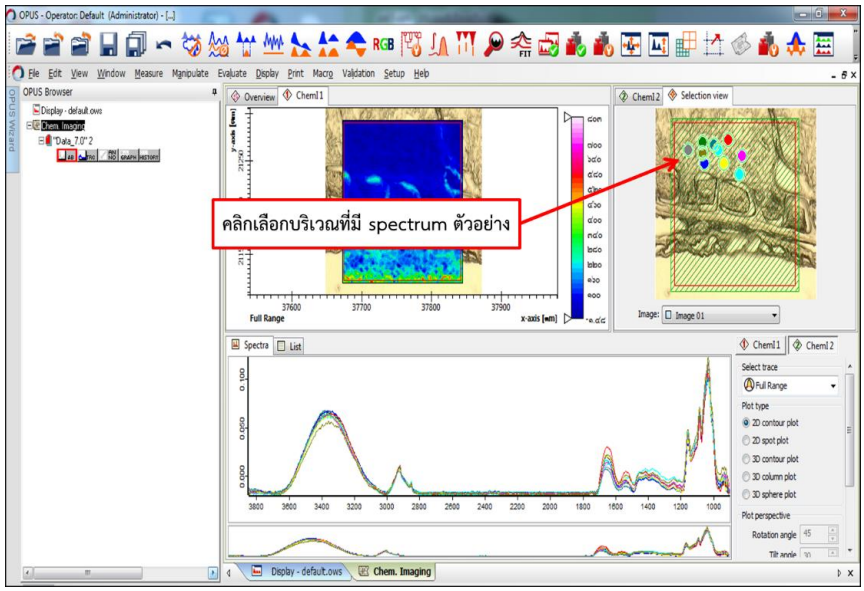


RGB

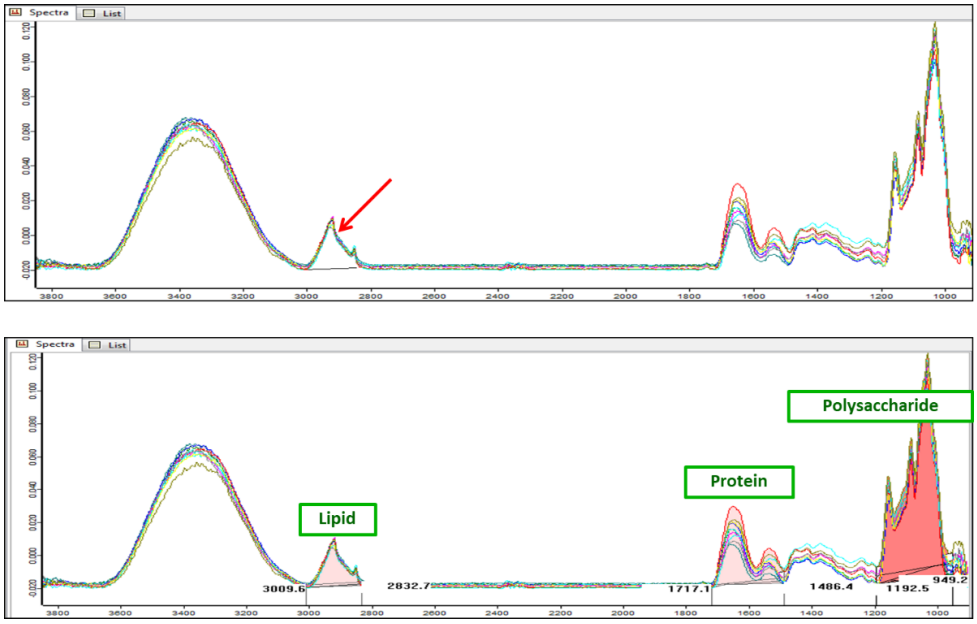
การสร้างภาพ RGB (red, green, blue) เป็นการวิเคราะห์ผลแสดงการกระจายตัวของสารหรือพีคที่สนใจจากการวัดตัวอย่างแบบ mapping เพื่อให้ได้ภาพออกมาเป็น imaging และดูการกระจายตัวของสารในตัวอย่างได้ โดยตัวอย่างที่ต้องการทำ RGB ต้องผ่านการทำ data preprocessing และ normalization มาแล้ว



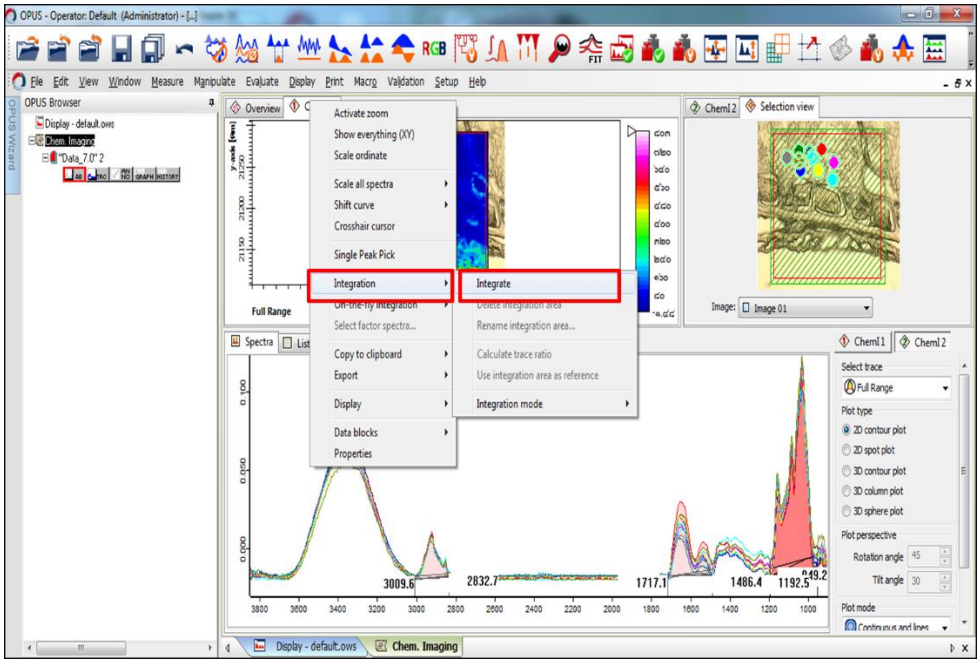
1. เปิดไฟล์ตัวอย่างขึ้น และคลิกเลือกบริเวณที่มีตัวอย่างให้ spectrum ปรากฏบน spectrum window



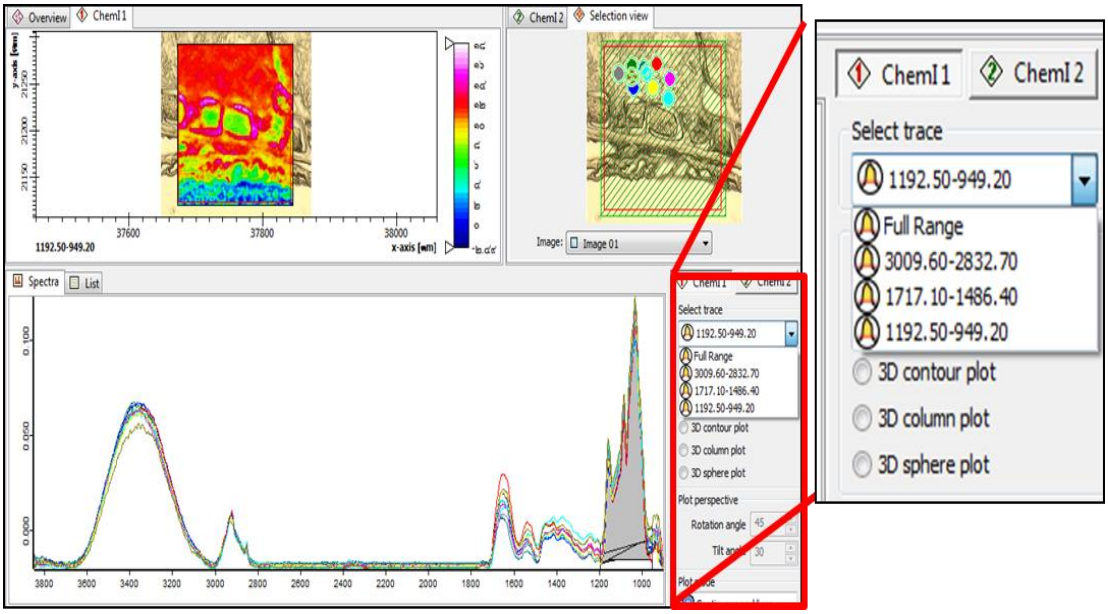
2. ลากเส้นตามฐานพีคที่ต้องการ integrate หาพื้นที่



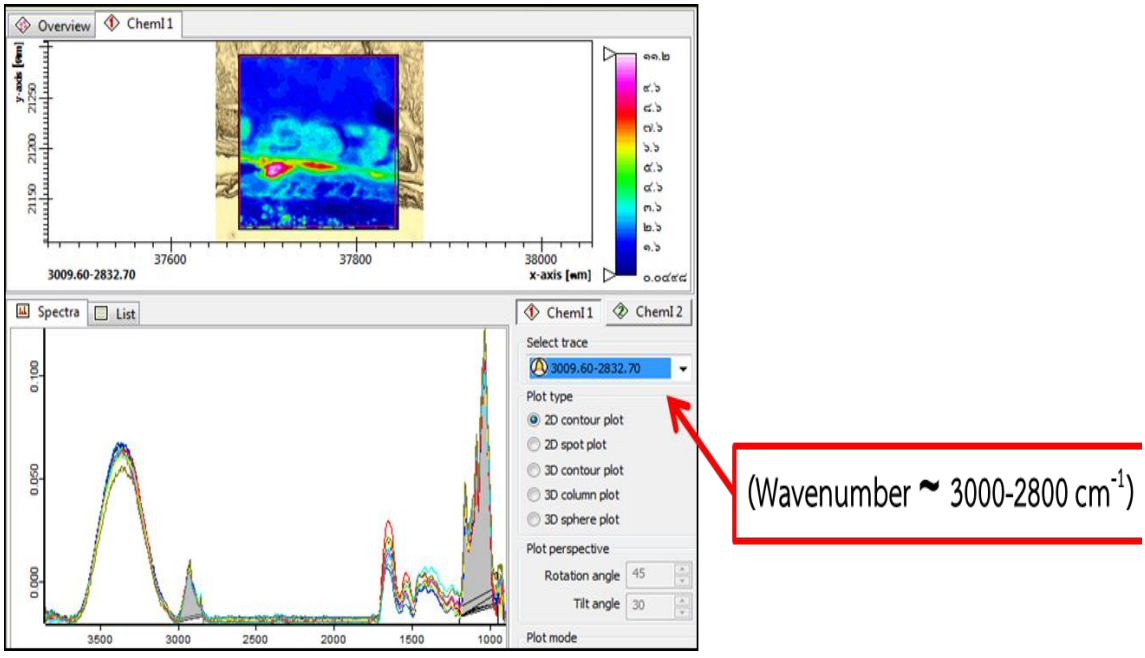
3. คลิกขวาเลือก integration เลือก integrate



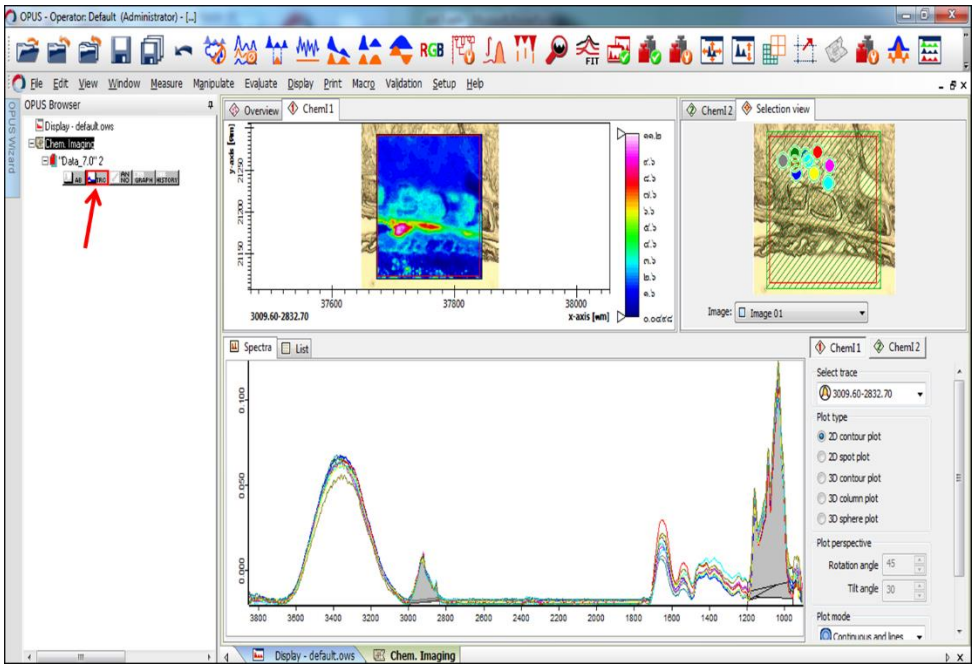
4. ค่าแสดงช่วง Wavenumber ที่ integrate จะปรากฏในช่อง Select trace



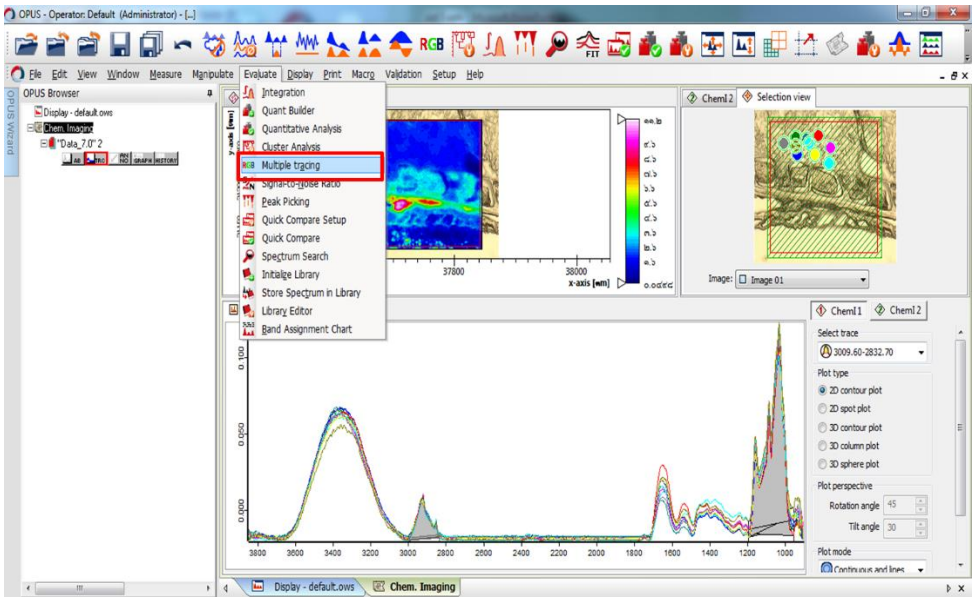
5. สามารถเลือกดูการกระจายตัวของสารได้ โดยเลือกพื้นที่ใต้กราฟตามช่วง wave number



6. คลิกเลือก data block TRC

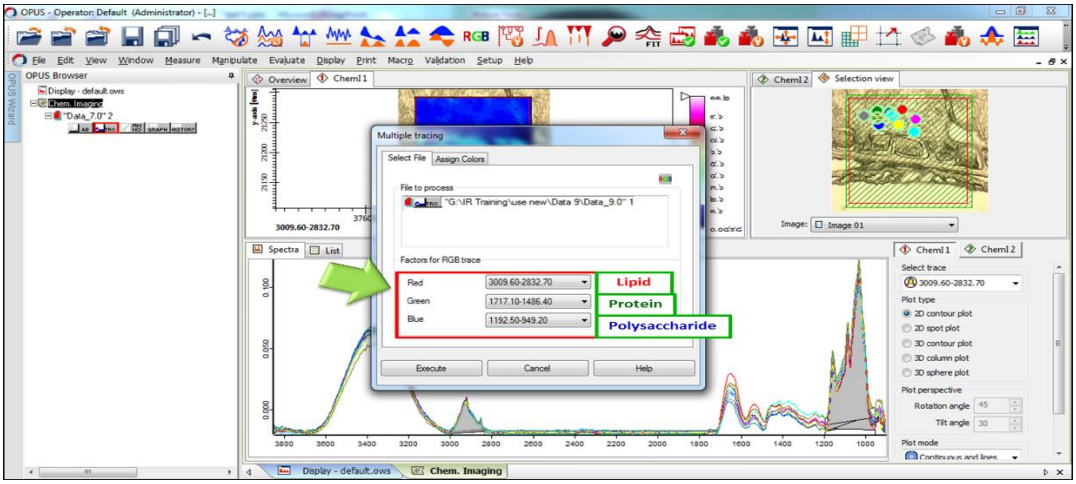


7. เลือกแถบเครื่องมือ Evaluate แล้วเลือก Multiple tracing

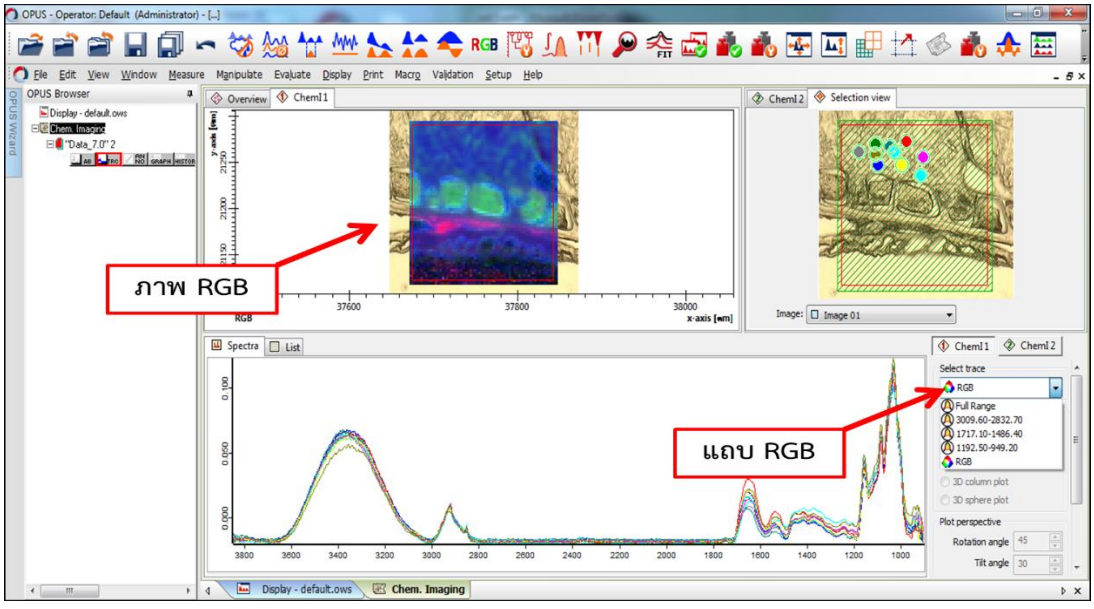


8. กำหนดค่า Factors for RGB trace โดยกำหนดให้

- 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 จะแสดงการกระจายตัวของพีคที่เป็นตัวแทนของสารชีวเคมีในแต่ละกลุ่มที่ได้ define ไว้ ประกอบด้วย lipid แทนด้วยสีแดง จะพบว่ามีการกระจายตัวของ lipid อยู่มากบริเวณด้านล่างของชิ้นตัวอย่าง, protein แทนด้วยสีเขียว ซึ่งจะมีการกระจายตัวอยู่ทั่วทั้งชิ้นตัวอย่าง แต่มีปริมาณมากในชั้นถัดจากขอบล่างของชิ้นตัวอย่าง, polysaccharide แทนด้วยสีน้ำเงิน จะพบการกรพจายตัวอยู่ทั่วทั้งชิ้นตัวอย่าง แต่มีปริมาณมากบริเวณด้านบนของชิ้นตัวอย่าง