

Düşük Sükroz Derişimlerinin Görünür Bölge Spektroskopisi ve Yapay Sinir Ağları ile Kestirimi

Estimation of Low Sucrose Concentrations by UV-Vis Spectroscopy and Artificial Neural Networks

Bahadır Mezgil¹, Duygu Erdoğan², Yeşim Alduran³, Ümit Hakan Yıldız³, Ahu Arslan Yıldız², Yalın Baştanlar¹

¹Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye

²Biyomühendislik Bölümü, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye

³Kimya Bölümü, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye

Özetçe—Çalışmamızda, immobilize altın nanoparçacıkların lokalize plazmon rezonans özelliği kullanılarak görünür bölge spektroskopisi ile düşük sükroz derişimli çözeltilerde hassas derişim kestirimi amaçlanmıştır. Elde edilen spektrum verisi ile çeşitli yapay sinir ağları (YSA) eğitilerek çözeltiler sükroz derişimi kestirilmiştir. MATLAB YSA araç kutusu kullanılmış, farklı girdi boyutları ve farklı gizli katman sayılarının sonuca etkisi irdelenmiştir. Spektrumların tepe noktası yerine tüm spektrumu kullanmanın sonuçları iyileştirdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler — Sükroz derişimi kestirimi, Yapay sinir ağları, Lokalize plazmon rezonans, Ultraviyole-Görünür bölge spektroskopisi

Abstract—Low sucrose concentrations in solutions is estimated by means of localized surface plasmon resonance of immobilized gold nanoparticles. The ultraviolet-visible spectra (UV-Vis) of samples with different sucrose concentrations were prepared and used to train artificial neural networks. In our study, MATLAB Neural Networks Toolbox was used and effect of different input sizes and network structures on the estimation accuracy is investigated. It is observed that using complete spectrum instead of peak point results in higher accuracy.

Keywords — Sucrose concentration estimation, Artificial neural networks, Localized plasmon resonance, UV-Vis spectroscopy

I. GİRİŞ VE LİTERATÜR ÖZETİ

Bir metal parçacık yüzeyi uygun frekanstaki elektromanyetik radyasyon (ışık) ile ışınlandığında, metalde bulunan elektronların eşevreli salınımı, ışığın yayılım yönüne dik olarak indüklenir. Boyut olarak metalik nanoparçacıkların gelen ışığın dalga boyundan daha küçük olduğu durumda, bu elektron bulutu salınımı 'plazmon' nanoparçacık yüzeyinde lokalizedir. Çoğu Lokalize Yüzey Plazmon (LSPR, Localized Surface Plasmon Resonance) uygulaması için optik özelliklerinden dolayı ve gümüş nanoparçacıklar kullanılmaktadır. Plazmon rezonansı ya çözücü kırılma indisi vasıtasıyla ya da bazı türlerin nanoparçacık yüzeye adsorbe edilmesi yoluyla değiştirilebilir [1]. Metal nanoyapıların plazmon rezonans frekansı, ortamı çevreleyen dielektrik özelliklerine oldukça bağlıdır ve bu da nanoyapıların yakın çevresinde oluşabilecek kırılma indisindeki küçük

değişikliklerin tespit edilmesini sağlar. Kırılma indisi hassasiyeti plazmonik nanomalzemeleri, moleküler bağlanma olaylarını izlemek için biyoanalitik cihazlarda, sinyal transdüserleri olarak cazip hale getirmektedir [2].

Bir çözeltideki çok küçük kırılma indisi değişimlerinin hızlı ve kolay ölçümü, optik biyosensör geliştirilmesi için ilk adımdır. Çalışmamızda bu özellik düşük miktarda sükroz içeren çözeltilerde sükroz derişimi kestirimi için kullanıldı. Farklı derişimlerde hazırlanan sükroz çözeltileri ile testler yapıldı. Kırılma indisi 1,33-1,383 arasında olan sükroz-su çözeltileri (0-50% w/v) ve ultra saf su kullanıldı. Altın nanoparçacık ile modifiye edilen yüzeyler mikropolaka spektrofotometri (Multiskan Go, Thermo) kullanılarak analiz edildi. Deney sonuçlarında aktarıldığı üzere düşük hata payları ile kestirim yapılabildi. Bu sonuç, önerilen metodolojinin ileride bakteriyolojik kontaminasyon tayininde kullanılma potansiyeline işaret etmektedir.

Geçmiş çalışmalara bakıldığında, optik spektroskopi ile çözeltilerdeki glikoz, sükroz vb. maddelerin derişim kestiriminin uzun yıllardır araştırma konusu olduğu görülmektedir. Yapay öğrenme algoritmalarının son yıllarda artan başarımlar göstermesiyle birlikte, özellikle yapay sinir ağları (YSA) bu amaç için kullanılmaya başlanmıştır. Örnek çalışmalar bazıları kandaki glikoz derişimini ölçmek üzerinedir. [3]'de 1400-1800 nm dalga boyu aralığında kızılötesi ışınlar kullanılmışlar ve spektrumları YSA ile analiz etmişlerdir. İki farklı spektrumun her birinden üç ayrı dalga boyuna denk gelecek şekilde toplamda 6 değerlik bir girdi katmanı kullanılmıştır. [4]'de yine kan glikoz seviyesi üzerine çalışılmış olup, kan örneklerinin hazırlanma prosedürü daha farklı uygulanmış ve 1400-2500 nm aralığında elde edilen spektrumlardan kullanılan YSA'ya elle seçilmiş 6 frekanstaki değer verilmiştir. [5]'te YSA kullanmayan bir metot ile ve sadece 1450 nm dalga boyuna sahip LED ışığına verilen tepki kullanılarak kandaki glikoz derişimi kestirilmiştir.

Daha yakın tarihli başka bir çalışmada [6] yakın bölge kızılötesi (950-1100 nm aralığı) ve MATLAB YSA araç kutusu kullanılarak çözeltiler glikoz kestirimi yapılmıştır. Farklı glikoz derişimleri için 44 tane spektrum çıkarılmış, bunlardan

36 tanesi eğitim ve geçerleme kümesi olarak, 8 tanesi ise test kümesi olarak kullanılmıştır. YSA girdi katmanı olarak spektrumun en yüksek olduğu değer alınmış, dolayısıyla sadece spektrum tepe noktası öznelik olarak kullanılmıştır. Kestirim başarısı YSA regresyon sonucundaki hatanın gerçek çözelti derişimine oranı (bağıl hata) olarak verilmiş. En başarısız kestirimde bağıl hata %18'e kadar çıkmıştır. [7]'de üründe glikoz derişim kestirimi yapılmış, spektrumdan elde edilen 500'lük vektör büyük olduğundan girdi katmanının TBA (temel bileşenler analizi, principal component analysis) ile 8 değere indirildiği belirtilmiştir. [8]'de glikoz derişimi kestirimi için 2100-2400 nm aralığındaki spektrumun hepsi girdi olarak verilmiş, boyut indirgenmemiştir. Çalışmada YSA bağlanım, en küçük kareler bağlanım (least square regression) ve temel bileşen bağlanım (principal component regression) yöntemleri karşılaştırılmış, YSA başarımının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. [9]'da bal örneklerinde 4 farklı şekerin (glikoz, fruktoz, sükröz, maltoz) miktarlarını öğrenmek için Raman spektrum adlı farklı bir spektrum kullanılmış, kısmi en küçük kareler (partial least squares) ve YSA yöntemlerinin başarıları karşılaştırılmıştır. YSA'da girdi katmanı TBA ile 4'e indirilmiş, tek gizli katman kullanılmış ve bu katmandaki nöron sayısı alternatifleri sınanmıştır.

Bizim çalışmamızdaki başlıca fark, ilk defa metalik nanopartiküller kullanarak düşük sükröz derişimin tespit edilebilmesi ve bunun görünür bölge emilim spektrumu ile yapılabilesidir. Görünür bölge spektroskopisi, literatürdeki kızılötesi v.b. spektrum elde etme yöntemlerine göre oldukça düşük maliyetlidir. Bunun yanısıra, YSA kullanımında sadece spektrum tepe noktası veya birkaç dalga boyundaki değerleri değil tüm spektrumu, hatta farklı dakikalardaki spektrumları toplu şekilde, YSA'ya girdi olarak vererek sonuçlardaki iyileşmeyi gözler önüne seriyoruz. Ayrıca farklı gizli katman alternatifleri kullanmanın YSA sonucuna etkisini de irdeliyoruz.

II. SPEKTRUM VERİSİ

A. Spektrumların Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan sükröz çözeltilerinin derişimleri kütlece 0%, 10% (100mg/mL), 20% (200mg/mL), 30% (300mg/mL), 40% (400mg/mL), 50% (500mg/mL) olacak şekilde hazırlanmıştır. Analitik terazi kullanılarak tartımı yapılan katı sükröz örnekleri, 100 mL mezür yardımı ile hacmi ölçülmüş ultra saf suda (iletkenlik = 18M Ω) çözülerek stok çözeltiler haline getirilmiştir.

Polisitiren mikrokyucuklar üzerine iyonik etkileşim yardımı ile tutuklanan altın nanoparçacıkların optik özelliklerindeki değişim mikroploka spektrofotometri (Multiskan Go, Thermo) kullanılarak analiz edildi. 400-800 nm arası 1nm veri toplama hassasiyetinde tarama yapılarak spektrum kaydedildi. Örnek hacmi 300 μ L de sabit tutuldu. Önce ultra saf suyun, daha sonra artan konsantrasyonlarda sükröz çözeltilerinin ölçümü yapıldı. Her ölçüm arasında peşpeşe kullanılan kyucuklarda 3 kez yıkama yapıldı.

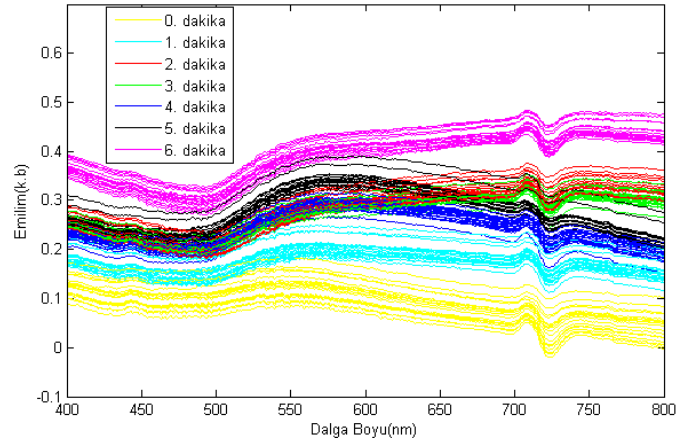
Sükröz derişimleri 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% olan derişim örnekleri hazırlandıktan sonra 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 dakikalarında 400-800 nm (görünür bölge) spektrumları kaydedilmiştir. Her bir derişim seviyesi

için 20 çözelti hazırlanmıştır. Dolayısıyla, toplamda 6 derişim için, 120 tane 14 (dakikalar) x 401 (dalga boyları) veri matrisi elde edilmiştir.

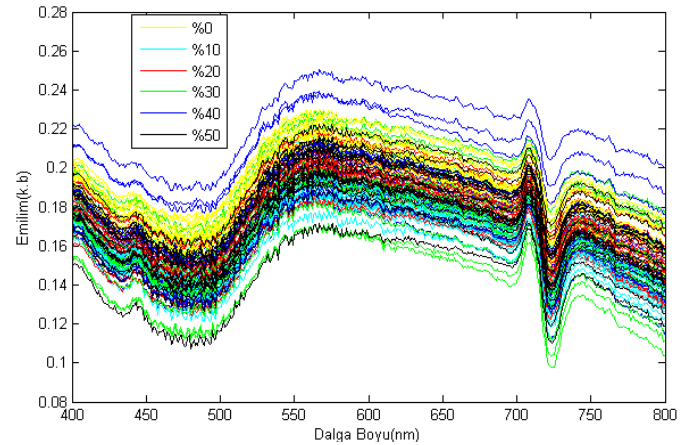
B. Veri Hazırlığı

Elde edilen spektrum verileri MATLAB ortamına aktarılmış ve her bir çözelti için çizdirilerek incelenmiştir. Şekil 1'de %40 derişimli örneklerin 0'dan 6'ncı dakikaya kadar olan spektrumları görülmektedir. Farklı renkler farklı dakikalara işaret etmektedir. Şekil 2'de ise aynı dakika için farklı glikoz derişimlerinin spektrumları aynı anda yer almaktadır. Özellikle Şekil 2'deki renklerin birbiri içine girmesinden anlıyoruz ki sadece tepe noktasına (veya spektrumun bazı noktalarına) bakmak farklı derişimler için ayırt edici değildir. Dolayısıyla tüm spektrumun kullanılması çalışmamızda değerlendirilmiştir. Literatürdeki çalışmalardan edinilen bilgi de esas alınarak, YSA kullanılmasının daha uygun olacağına kanaat getirilmiştir.

Her bir deney için elde edilmiş verilerinin 0, 1, 2, 3, 4, 5 dakikalarında bulunan ölçüm değerleri birleştirilerek 120(toplam deney sayısı) x 2406(401 dalga boyu sayısı x 6 dakika sayısı) yeni bir veri matrisi elde edilmiştir.



Şekil 1. 40% çözelti derişimi için her bir örneğin 0'dan 6'ncı dakikaya kadar olan spektrumları



Şekil 2. %0'dan %50'ye kadar tüm derişimlerdeki örneklerin 1. dakika spektrumları

III. YSA İLE BAĞLANIM

Bağlanım deneylerimizde üç yaklaşımı birbiriyle karşılaştırdık: *i*) 1. dakikadaki spektrum tepe nokta dalgaboyu değerini girdi olarak vermek, *ii*) 1. dakikadaki tüm spektrumu (401 değer) girdi olarak vermek, *iii*) 0., 1., 2., 3., 4. ve 5. dakikalardaki tüm spektrum değerlerini birleştirerek (2406 değer) girdi olarak vermek. Bu girdi katmanları MATLAB YSA araç kutusu ile farklı sayıdaki gizli katman ve bu gizli katmanlardaki farklı sayıdaki nöronlara sahip YSA'lar 100 defa çalıştırılarak ve test verisetine ait ortalama mutlak hata (OMH) değerlerinin ortalaması alınarak karşılaştırılmıştır. Tüm YSA'larda Ölçekli Eşlenik Gradyan Geri yayılım (Scaled conjugate gradient backpropagation) algoritması seçilmiş, regularizasyon parametresi 0.7 alınmıştır.

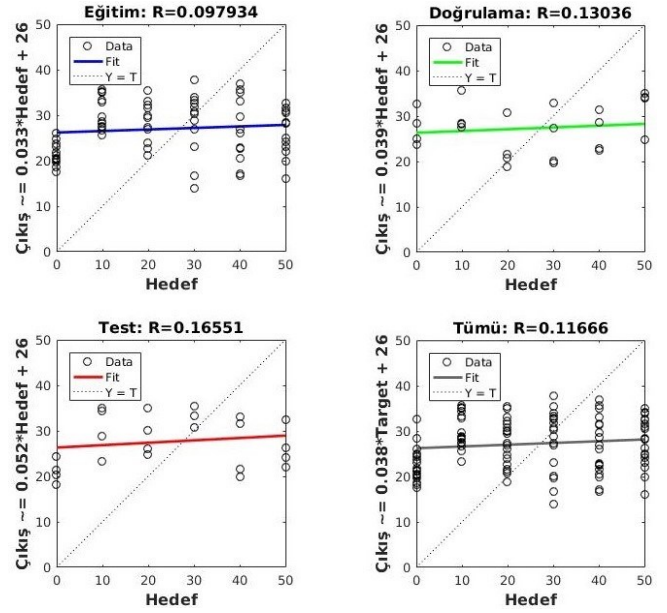
YSA eğitimi için elimizdeki 120 deney (veri kümesi), %60 eğitim, %20 doğrulama, %20 de test kümesi olacak şekilde her bir çözelti örneğinden eşit miktarda bulunma şartıyla rasgele bölünmüştür. Dolayısıyla eğitim kümesi için 72 adet deney ve her bir çözelti derişiminden 12'şer adet örnek, doğrulama ve test kümelerinde ise 24'er adet deney ve her bir çözelti derişiminden 4'er adet örnek bulunmaktadır.

A. Spektrum Tepe Noktası Kullanılarak

Öncelikle, geçmiş bazı çalışmalardaki gibi spektrumun tepe noktasının olduğu yerdeki dalga boyu YSA'ya girdi olarak verilerek bağlanım yapılmıştır. Dolayısıyla YSA'nın girdi katmanında sadece bir değer vardır. Dakika 1 verisi ile farklı yapıdaki YSA'larının 100 defa çalıştırılması ile elde edilen ortalama OMH değerleri Tablo 1'de gözlenmektedir. Farklı YSA'ların başarı sırasına göre dizildiği Tablo 1'e göre en az ortalama OMH tek gizli katmanda 5 nöron ile elde edilmiştir. Ancak diğer yapılarda da benzer hata miktarları görülmekte, kestirilen derişim ile gerçek derişim arasında ortalama %15-16 hata oluşmaktadır. Örnek bir çalıştırma sonuçları Şekil 3'te verilmiştir. Görüldüğü üzere YSA tahminleri (Çıkış) gerçek derişim değerleri (Hedef) ile bağlantılı çıkmamıştır. 0% derişimli örnekler için tahminler %20-%30'larda, diğer derişimler için tahminler de %20-%40 aralığında değişmektedir. Test verileri için ideal durumda kırmızı çizginin sol alt köşeden sağ üst köşeye gitmesini beklerdik.

TABLE I. SADECE SPEKTRUM TEPE NOKTASI KULLANILAN KESTİRİM DENEMELERİNİN FARKLI YSA YAPILARI İÇİN HATA MİKTARLARI

Başarı Sırası	YSA Gizli Katman Sayısı ve Katmanlardaki Nöron Sayısı	Ortalama Mutlak Hata (%)
1	5	14.981004
2	5-10-5	15.160458
3	5-5-5	15.211768
4	5-5	15.26343
5	10-5	16.01593
6	10-20-10	16.144603
7	10-10-10	16.151125
8	10-10	16.359318
9	10	16.499666
10	20	16.892505



Şekil 3. Spektrum tepe noktası kullanılarak 120 örnek ile yapılan bir bağlanım sonucu. X eksenini (hedef) örneklerdeki gerçek sükröz derişimi, y eksenini (çıkış) ise YSA bağlanım kestirimidir. Aradaki ilişki eğitim, doğrulama, test ve tüm veriler olarak ayrı ayrı gösterilmektedir. Test kümesi grafiğindeki kırmızı çizgi YSA çıktısının gerçek derişimle olan bağıntısıdır.

B. Tüm Spektrum Kullanılarak

İlk olarak, YSA girdi katmanında Dakika 1 spektrumu için tüm verileri (400nm'den 800nm'ye toplam 401 adet) vererek çözelti derişim kestiriminde bulunuldu. Gizli katman sayısının ve bu katmanlarda bulunacak olan nöron sayısının sınanması için yine aynı yöntem izlenmiş, farklı YSA yapılarının 100 defa çalıştırılması ile elde edilen ortalama OMH değerleri Tablo 2'de verilmiştir. En az ortalama OMH tek gizli katmanlı ve 20 nöronlu YSA ile elde edilmiş ve %7.6 hata verdiği görülmüştür. Hatanın sadece tepe noktası değerini kullanmaya göre oldukça düştüğü görülmüştür. Farklı YSA yapılarında ise hatada artış gözlenmektedir.

TABLE II. DAKIKA 1 SPEKTRUMUNUN TÜMÜ KULLANILAN KESTİRİM DENEMELERİNİN FARKLI YSA YAPILARI İÇİN HATA MİKTARLARI

Başarı Sırası	YSA Gizli Katman Sayısı ve Katmanlardaki Nöron Sayısı	Ortalama Mutlak Hata (%)
1	20	7.603267
2	15	8.781096
3	10	9.212433
4	20-20	9.842914
5	5	10.901851
6	10-5	11.049451
7	10-10	11.611666
8	10-20-10	12.375369
9	5-5	12.543871
10	5-10-5	12.68897

Elde edilen sonuçların daha fazla iyileştirilmesi için son olarak 0., 1., 2., 3., 4. ve 5. dakikalardaki tüm spektrumların ölçüm değerleri kullanılmıştır. Burada amaç, bazı dakikalardaki spektrumların ayırt edici özelliği daha yüksek ise bundan faydalanmaktır. Bu yüzden YSA giriş katmanında 2406 adet (401 dalga boyu sayısı x 6 toplam dakika sayısı) nöron bulunacak şekilde yine farklı YSA yapıları sınanmış ve aynı şekilde ortalama OMH hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Tablo 3'te gösterilmektedir.

En az ortalama OMH tek gizli katmanlı ve 10 nöronlu YSA ile elde edilmiş fakat diğer yapılarda da benzer hatalar alındığı görülmüştür. Tüm dakika spektrumlarını kullanmanın sadece belirli bir dakikanın spektrumunu kullanmaya göre biraz daha iyi sonuçlar ürettiği ve değişen YSA yapılarında düşük hatalar üretmeye devam ettiği söylenebilir. Örnek bir YSA bağlanım deneyi sonucu Şekil 4'te verilmiştir. Özellikle Şekil 3 ile karşılaştırıldığında hedef değerler ile çıkış değerleri arasında iyi bir bağıntı elde edildiği görülmektedir. Test örnekleri üzerinde hataların ortalaması %7'dir.

TABLO III. TÜM DAKIKALARIN SPEKTRUMLARINI KULLANAN KESTİRİM DENEMELERİNİN FARKLI YSA YAPILARI İÇİN HATA MİKTARLARI

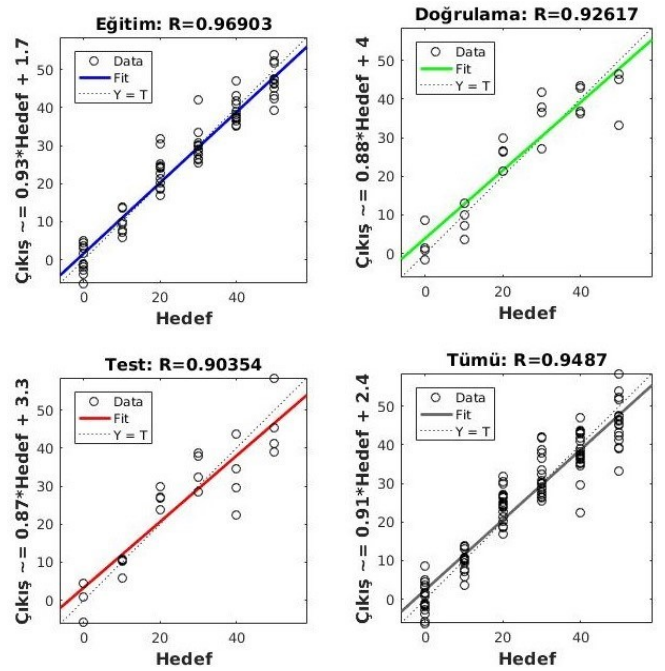
Başarı Sırası	YSA Gizli Katman Sayısı ve Katmanlardaki Nöron Sayısı	Ortalama Mutlak Hata (%)
1	10	7.135334
2	15	7.386299
3	10-5	7.504594
4	5	7.564112
5	20	7.731399
6	10-10	7.912316
7	20-20	8.091047
8	10-20-10	8.267725
9	5-5	8.348342
10	5-10-5	8.766688

IV. VARGILAR

Bu çalışma sonunda, metalik nanoparçacıklar kullanılarak hazırlanan çözeltilerden elde edilen görünür bölge emilim spektrumları yapay sinir ağlarına girdi olarak verilerek çözelti glikoz derişim kestiriminin yapılabileceği gözlemlenmiştir. Özellikle, spektrum tepe noktasının dalga boyu yerine tüm spektruma, hatta farklı dakikalardan alınmış tüm spektrumlara bakmanın sonuçları iyileştirdiği deneysel olarak gösterilmiştir. İleride çalışma, daha düşük derişimli çözeltiler için tekrarlanacaktır. Önerilen metodoloji olan metal nanoparçacık kullanılarak düşük derişimlerin kestirimi, gelecekte bakteriyolojik kontaminasyon tayininde kullanılma potansiyeline sahiptir.

BİLGİLENDİRME

Bu çalışma, İYTE BAP 2015-5 kapsamında desteklenmiştir.



Şekil 4. Altı farklı dakikadaki tüm spektrum verisi kullanılarak 120 örnek ile yapılan bir bağlanım sonucu. X eksen (hedef) gerçek sükröz derişimi, y eksen (çıkış) ise YSA bağlanım kestirimidir. Aradaki ilişki eğitim, doğrulama, test ve tüm veriler olarak ayrı ayrı gösterilmektedir. Test kümesi grafiğindeki kırmızı çizgi YSA çıktısının gerçek derişimle olan bağıntısıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Anker, J.N., Hall, W.P., Lyandres, O., Shah, N.C., Zhao, J., Van Duyne, R.P. "Biosensing with plasmonic nanosensors" *Nature Materials* 7, 442-453, 2008.
- [2] Martinsson, E., Sepulveda, B., Chen, P., Anders, E., Liedberg, B., Aili, D. "Optimizing the Refractive Index Sensitivity of Plasmonically Coupled Gold Nanoparticles" *Plasmonics* 9: 773, 2014.
- [3] Zeng, B., Wang, W., Wang, N., Li, F., Zhai, F., Hu, L. "Noninvasive Blood Glucose Monitoring System Based on Distributed Multi - Sensors Information Fusion of Multi - Wavelength NIR", *Engineering*, 5, 553 - 560, 2013.
- [4] Trabelsi, A., Boukadoum, M., Siaj, M. "A Preliminary Investigation into the Design of an Implantable Optical Blood Glucose Sensor", *American Journal of Biomedical Engineering*, 1(2): 62 -67, 2011.
- [5] Chua, C.D., Gonzales, I.M., Manzano, E., Manzano, M.C. "Design and Fabrication of a Non - Invasive Blood Glucometer Using Paired Photo - Emitter and Detector Near - Infrared LEDs", *DLSU Research Congress*, 2014.
- [6] Gülderen, A., Anutgan, T., Anutgan, M. "Estimation of Glucose Concentration in Solution using Near Infrared Spectroscopy and Artificial Neural Network", *IEEE Conference on Signal Processing and Applications (SIU)* 2016.
- [7] Malik, B.A., Naqash, A., Bhat, G.M. "Backpropagation Artificial Neural Network for Determination of Glucose Concentration from Near-infrared Spectra", *Intl. Conference on Advances in Computing, Communications and Informatics (ICACCI)*, 2016.
- [8] Liu, W., Yang, W., Liu, L., Yu, Q. "Use of Artificial Neural Networks in Near-Infrared Spectroscopy Calibrations for Predicting Glucose Concentration in Urine, ICIC 2008, LNCS 5226, pp. 1040 - 1046, 2008.
- [9] Ozbalci, B., Boyaci, İ.H., Topcu, A., Kadilar, C., Tamer, U., "Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks", *Food Chemistry* 136, 1444-1452, 2013.