

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANKA STRAUS

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANKA STRAUS

**RAZVOJ METODE ZA UGOTAVLJANJE VSEBNOSTI
RUTINA, KVERCETINA IN KVERCITRINA V AJDI
(*Fagopyrum sp.*) Z INFRARDEČO SPEKTROSKOPIJO**

**THE DEVELOPMENT OF A METHOD FOR
QUANTIFICATION OF RUTIN, QUERCETIN AND
QUERCITRIN IN BUCKWHEAT (*Fagopyrum sp.*) USING
INFRARED SPECTROSCOPY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Mete Kokalj Ladan, mag. farm., univ. dipl. fiz.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in asist. dr. Meti Kokalj Ladan, mag. farm., univ. dipl. fiz. za trud, ideje, potrpežljivost, strokovno pomoč in dostopnost pri opravljanju magistrske naloge, pa tudi za vso predano znanje tekom celotnega študija.

Posebna zahvala gre tudi družini, Blažu in prijateljem, ki so vselej verjeli vame, me vzpodbujali in mi stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorice asist. dr. Mete Kokalj Ladan, mag. farm., univ. dipl. fiz.

Janka Straus

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Alenka Šmid, mag. farm.

Ljubljana, 2017

KAZALO VSEBINE

KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
KAZALO SLIK.....	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
KLJUČNE BESEDE	VIII
KEY WORDS	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD.....	1
1.2 Vloga flavonoidov v rastlinah in njihovi farmakološki učinki	2
1.3 Flavonoidi v ajdi	3
1.4 Analizne metode za ugotavljanje antioksidantov	5
1.5 IR spektroskopija	6
1.6 Dosedanje raziskave na področju IR spektroskopije	9
2 NAMEN DELA	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Izvor rastlinskega materiala	15
3.2 Priprava vzorcev	16
3.3 IR spektrofotometer in programska oprema	16
3.4 Potek merjenja IR spektrov za namen statistične obdelave	17
3.5 Potek merjenja IR spektrov vzorcev	18
3.6 Spektri in obdelava	20
3.7 Izdelava modelov	20
3.8 Vrednotenje modelov	23
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	24
4.1 Rezultati statistične analize.....	24
4.2 Najboljši modeli za izbrane spojine.....	26
4.2.1 Rutin	28
4.2.2 Kvercetin	29
4.2.3 Kvercitrin.....	30
4.2.4 Celokupni flavonoidi	31

4.3	Vrednotenje parametrov	32
4.3.1	Proučevana spojina	33
4.3.2	Ločljivost	34
4.3.3	Obdelava spektra	35
4.3.4	Izbrano IR območje	37
4.3.5	Priprava vzorcev	38
4.3.6	Uporabljen del rastline.....	39
5	ZAKLJUČEK	43
6	LITERATURA	45
7	PRILOGE	49
	Priloga 1: Razdelitev celih in mletih vzorcev na validacijski in učni set.....	49
	Priloga 2: IR spektri proučevanih spojin	53
	Priloga 3: IR spekter klorofila	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prednosti in slabosti IR spektroskopije v primerjavi s kromatografskimi analiznimi metodami, povzeto po (1).....	6
Preglednica II: Nastavite pri merjenju z ATR IR spektroskopijo	19
Preglednica III: Seznam uporabljenih parametrov pri postavitvi modela	21
Preglednica IV: Število točk za vsako informativno valovno število spektra iz referenc (42-46)	22
Preglednica V: Rezultati testa ANOVA, prikazani kot delež števila točk, kjer so razlike med skupinami statistično signifikantne ($p \leq 0,05$), vsako skupino predstavljajo 3 meritve enega lista	24
Preglednica VI: Rezultati testa ANOVA, prikazani kot delež števila točk, kjer so razlike med skupinami statistično signifikantne ($p \leq 0,01$), vsako skupino predstavljajo 3 meritve enega lista	25
Preglednica VII: Rezultati testa ANOVA, prikazani kot delež števila točk, kjer so razlike med skupinami statistično signifikantne ($p \leq 0,05$), vsako skupino predstavlja 15 meritev enega vzorca.....	25
Preglednica VIII: Rezultati testa ANOVA, prikazani kot delež števila točk, kjer so razlike med skupinami statistično signifikantne ($p \leq 0,01$), vsako skupino predstavlja 15 meritev enega vzorca.....	25
Preglednica IX: Seznam validacijskih in učnih celih vzorcev, kjer lahko del rastline razberemo iz barvne sheme (zelena – listi, oranžna – cvetovi, modra – luščine)	49
Preglednica X: Seznam validacijskih in učnih mletih vzorcev, kjer lahko del rastline razberemo iz barvne sheme (zelena – listi, oranžna – cvetovi).....	51
Preglednica XI: Značilni vrhovi IR spektrov proučevanih spojin v cm^{-1} (42-46)	53
Preglednica XII: Značilni vrhovi IR spektra klorofila a in klorofila b v cm^{-1} (51)	53

KAZALO SLIK

Slika 1: Analizirani flavonoidi prisotni v ajdi, povzeto po (2).....	3
Slika 2: Referenčne vrednosti HPLC analize v primerjavi z napovedanimi vrednostmi NIR spektroskopije za določitev dejanske vrednosti rutina v vzorcih ajde (zrna), povzeto po (20)...	9
Slika 3: Potek izvedbe metod za postavitve modela, prirejeno po (15)	14
Slika 4: Razdelitev uporabljenih vzorcev za generiranje modelov	15
Slika 5: Rezultati najboljšega modela v primeru proučevane spojine rutina	28
Slika 6: Rezultati najboljšega modela v primeru proučevane spojine kvercetina	29
Slika 7: Rezultati najboljšega modela v primeru proučevane spojine kvercitrina	30
Slika 8: Rezultati najboljšega modela v primeru celokupnih flavonoidov.....	31
Slika 9: Število napovednih modelov glede na proučevano spojino	33
Slika 10: Število napovednih modelov pri različnih ločljivostih	34
Slika 11: Število napovednih modelov pri uporabi različnih obdelav spektra, upoštevajoč vse ločljivosti	35
Slika 12: Število napovednih modelov pri uporabi različnih obdelav spektra v primeru ločljivosti 4 cm^{-1}	36
Slika 13: Število napovednih modelov pri uporabi različnih obdelav spektra v primeru ločljivosti 8 cm^{-1}	36
Slika 14: Število napovednih modelov pri različnih izbirah uporabljenega IR območja.....	37
Slika 15: Število napovednih modelov pri uporabi celih ali mletih vzorcev.....	38
Slika 16: Število napovednih modelov pri uporabi različnih delov rastline.....	39
Slika 17: Število napovednih modelov pri uporabi različnih delov rastline v primeru rutina...	40
Slika 18: Število napovednih modelov pri uporabi različnih delov rastline v primeru celokupnih flavonoidov	40
Slika 19: Število napovednih modelov pri uporabi različnih delov rastline v primeru kvercetina	41
Slika 20: Število napovednih modelov pri uporabi različnih delov rastline v primeru kvercitrina	41

POVZETEK

IR spektroskopija predstavlja, zaradi svojih prednosti, privlačno alternativo drugim analiznim metodam za določanje vsebnosti flavonoidov v rastlinah. Prednosti metode so enostavna priprava vzorca, hitra analiza in nizki stroški. Ker ni potrebna uporaba topil, je metoda prijazna do okolja.

Želeli smo dokazati, da je IR spektroskopija sklopljena s kemometrijo primerna metoda za ugotavljanje vsebnosti rutina, kvercetina, kvercitrina in celokupnih flavonoidov v različnih vrstah ajde (*Fagopyrum*). Kot referenčno metodo za pridobitev vsebnosti omenjenih flavonoidov smo uporabili podatke HPLC analize.

IR spektroskopske meritve smo izvedli na različne načine, izmerjene spektre pa smo uporabili za postavitev kemometričnih modelov. Ugotavljali smo, katera kombinacija parametrov daje najboljši napovedni model, ter iskali razloge za take rezultate. Proučevali smo vpliv ločljivosti (4 cm^{-1} , 8 cm^{-1} , 16 cm^{-1}), načina obdelave spektra (osnovni spekter, odvod, normalizacija, odvod normalizacije, normalizacija s standardnim odklonom, odvod normalizacije s standardnim odklonom), načina priprave vzorcev (uporaba celih ali mletih vzorcev), uporabe različnega dela rastline (listi, cvetovi ali vsi vzorci: listi, cvetovi in luščine) in načina izbire IR območij.

Na podlagi vrednotenja modelov z uporabo determinacijskega koeficienta in korena srednje kvadratne napake smo ugotovili vpliv proučevanih parametrov na napovedni model. Največ uporabnih napovednih modelov smo dobili za rutin in celokupne flavonoide, te koncentracije so v vzorcih najvišje in imajo zato največji doprinos k antioksidativni aktivnosti. Največ uporabnih modelov smo dobili pri ločljivosti 8 cm^{-1} , nekoliko manj pri 4 cm^{-1} , bistveno manj pa pri 16 cm^{-1} . Z uporabo proučevanih obdelav spektrov smo dobili izboljšanje modelov, v splošnem se pokaže tudi izboljšanje z uporabo odvoda. Rezultati kažejo, da predhodni izbor informativnih delov spektra izboljša napovedno vrednost modelov. Bistveno boljše rezultate dobimo z mletimi vzorci, največ dobrih modelov pa dobimo za ugotavljanje vsebnosti v vzorcih cvetov.

Delo v okviru magistrske naloge je objavljeno v članku z naslovom FT-IR-based method for rutin, quercetin and quercitrin quantification in different buckwheat (*Fagopyrum*) species, v reviji Scientific reports s faktorjem vpliva, avtorjev Kokalj Ladan M., Straus J., Tavčar Benković E. in Kreft S.

ABSTRACT

Infrared spectroscopy represents, due to its advantages, attractive alternative to other analytical methods for determination of flavonoid content in plants. Advantages of the method are simple sample preparation, rapid analysis, low – cost, and since no solvents are used, infrared spectroscopy is environmentally friendly.

We wanted to show that infrared spectroscopy coupled with chemometric analyses is a suitable method for determination of rutin, quercetin, quercitrin and total flavonoids content in buckwheat (*Fagopyrum*). As a reference method, results from previously carried out high-performance liquid chromatography were used.

After the IR spectra were measured, the models were built using different combinations of parameters. The influence of resolution (4 cm^{-1} , 8 cm^{-1} , 16 cm^{-1}), data preprocessing method (basic spectra, first derivative, normalization, first derivative of normalization, standard normal variate normalization, first derivative of this function), method of sample preparation (the use of whole or ground samples), use of different parts of the plant (leaves, flowers or all samples: leaves, flowers and husks) and the method of IR ranges selection were studied. The influence of these parameters on quality of the models were discussed.

Models were evaluated using coefficient of determination and root mean square error. Most of the models that are useful were obtained for rutin and total flavonoids, these are present in the highest concentrations and have the biggest contribution on antioxidative value. Most of the useful models used spectra collected at resolution 8 cm^{-1} , a little less with 4 cm^{-1} and the least with 16 cm^{-1} . All of the studied spectra preprocessing methods improved the usefulness of the models, also a positive influence of derivative was observed. Results show that preselecting informative parts of the spectra is useful. Also a great advantage of sample grounding was observed. Most of the good models were obtained for quantification of studied compounds in flowers.

Work within this master's thesis has been published in the article titled FT-IR-based method for rutin, quercetin and quercitrin quantification in different buckwheat (*Fagopyrum*) species, in the journal Scientific Reports with impact factor, authored by Kokalj Ladan M., Straus J., Tavčar Benković E. and Kreft S.

KLJUČNE BESEDE

Rutin, kvercetin, kvercitrin, ajda (*Fagopyrum*), infrardeča spektroskopija

KEY WORDS

Rutin, quercetin, quercitrin, buckwheat (*Fagopyrum*), infrared spectroscopy

SEZNAM OKRAJŠAV

ANOVA	Analiza variance
ATR	Oslabljen popolni odboj (ang. attenuated total reflectance)
CSV	Oblika zapisa, pri katerem so vrednosti med seboj ločene z vejico (ang. comma separated values)
FT-IR	Infrardeča spektrometrija s Fourierjevo transformacijo
GC	Plinska kromatografija (ang. gas chromatography)
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high-performance liquid chromatography)
IR	Infrardeče
LC	Tekočinska kromatografija (ang. liquid chromatography)
MIR	Srednje infrardeče
MS	Masna spektrometrija (ang. mass spectrometry)
NIR	Bližnje infrardeče
PLS	Regresija delnih najmanjših kvadratov (ang. partial least squares)
R ²	Determinacijski koeficient (ang. coefficient of determination)
RMSE	Koren srednje kvadratne napake (ang. root mean square error)
RMSECV	Koren povprečne kvadratne napake navzkrižne validacije (ang. root mean square error of cross-validation)
SEP	Standardna napaka napovedi (ang. standard error of prediction)
FT-Raman	Ramanska spektrometrija s Fourierjevo transformacijo (ang. Fourier transform Raman spectroscopy)
UV	Ultravijolično

1. UVOD

Vedno večji trg in želja potrošnikov po kakovostnih živilih s pozitivnimi učinki na zdravje sta ustvarila potrebno po učinkovitih in točnih analitskih metodah za kvantifikacijo bioaktivnih snovi v surovinah in končnih produktih. V zadnjih letih so strokovnjaki za hrano pokazali povečan interes za antioksidante v rastlinah, ki bi jih lahko uporabili v nespremenjeni obliki kot nadomestilo sinteznih snovi. Izvlečki rastlin vsebujejo mnogo antioksidantov, ki se pojavljajo v različnih oblikah in predstavljajo privlačno alternativo sinteznim antioksidantom. Majhen vnos teh snovi in njihova strukturna raznolikost zmanjšata tveganje za pojav alergije na hrano, dodatno pa so snovi izolirane iz užitnih rastlin manj toksične za človeško telo. Iz tega razloga lahko naravno bioaktivne snovi delujejo v sinergiji s sintezni učinkovinami. Kombinacija omenjenega bi omogočila uporabo sinteznih učinkovin v nižjih koncentracijah, učinkovitost zdravljenja pa bi bila večja (1,2).

Antioksidanti so heterogena skupina molekul. To so spojine ali sistemi, ki lahko varno interagirajo s prostimi radikali in ustavijo verižno reakcijo še preden so molekule ključnega pomena poškodovane. Antioksidanti imajo različne biološke učinke, kot so: protivnetno, antikancerogeno, antiaterosklerotično, zmanjšajo pojavnost koronarnih bolezni in prispevajo k ohranjanju dobrega zdravja z modulacijo mikrobnega ravnovesja. Glavne skupine spojin z antioksidativnim učinkom so: vitamini (vitamin C in E), karotenoidi (karoteni in ksantofili) ter polifenoli (flavonoidi, fenolne kisline, lignani in stilbeni) (3).

V nadaljevanju se bomo osredotočili na flavonoide prisotne v vrstah ajde (*Fagopyrum*). Raven različnih flavonoidov v rastlini je odvisna od stopnje razvoja rastline, tkiva, vrste in stresnih dejavnikov iz okolja (UV sevanje, suša, namakanje, obdelava tal, prisotnost škodljivih organizmov, uporaba pesticidov ali gnojil) (4).

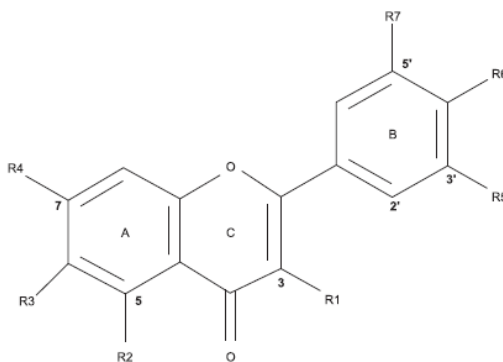
1.2 Vloga flavonoidov v rastlinah in njihovi farmakološki učinki

Flavonoidi so zelo razširjeni v kraljestvu rastlin, kjer se v glavnem proizvajajo kot rastlinski pigmenti v mnogih odtenkih in igrajo pomembno vlogo pri normalni rasti, razvoju in obrambi rastlin. Na biokemijski ravni flavonoidi delujejo kot inhibitorji encimov, zagotavljajo zaščito pred ultravijoličnim sevanjem, so kelirna sredstva za kovine in delujejo kot reducenti. Poleg tega so vključeni pri fotosenzitizaciji, prenosu energije, morfogenezi, fotosintezi in dihanju, procesih reguliranih z rastnimi hormoni rastlin, izražanju genov in interakcijah med rastlinami in žuželkami (5). Koncentracija flavonoidov pa vpliva tudi na interakcije med rastlinami – alelopatija. Interakcije so lahko negativne ali pozitivne. Flavonoidi se pogosto izločajo skozi korenine v zemljo, lahko pa jih najdemo tudi v listih ali celo v cvetnem prahu, ki po padcu na zemljo v okolici zavirajo kalitev drugih rastlin (6). Flavonoidi se sintetizirajo le v rastlinah. Pridobivamo jih iz sadja in zelenjave, flavonoide vsebujejo tudi pijače: rdeče vino, pivo, čaj in kava. Najdemo jih tudi v zdravilnih rastlinah in zeliščih, ki so se uporabljala v ljudskem zdravilstvu po vsem svetu. Znano je, da flavonoidi povzročajo širok razpon bioloških učinkov, kot so protibakterijsko, protivirusno, protivnetno, antialergeno ter vazodilatorno delovanje. Poleg tega inhibirajo peroksidacijo lipidov in agregacijo trombocitov in vplivajo na prepustnost in krhkost kapilar. Flavonoidi zavirajo aktivnost različnih metabolnih encimskih sistemov (ciklooksigenazo in lipooksigenazo), delujejo kot antioksidanti, lovilci prostih radikalov in kelatorji kationov. Uživanje flavonoidov je povezano z nižjo pojavnostjo koronarne srčne bolezni. Smrtnost zaradi bolezni srca je obratno sorazmerna z vnosom flavonoidov (7).

1.3 Flavonoidi v ajdi

Ajda (*Fagopyrum*) je rastlinski rod z mnogimi vrstami, od katerih jih je večina divje rastočih, dve vrsti pa sta gojeni (navadna in tatarska ajda). Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*) se uporablja kot dober vir hranil, kot tudi del tradicionalne medicine po vsem svetu. V Evropi jo gojijo že od 16. stoletja dalje. Glavni proizvajalci ajde so Rusija, Kitajska, Ukrajina in Kazahstan. Poleg tega jo pridelujejo tudi v Sloveniji, na Poljskem in Madžarskem. Vsebuje veliko hranilnih in fitokemičnih snovi in zato ni le osnoven vir hranilnih snovi, pač pa ima tudi druge pozitivne učinke na zdravje. V nekaterih državah, kot so Japonska, Kitajska in Poljska, je ajda priznana kot dragocen vir in jo zato imenujejo »funkcionalno živilo«. Mehanizem farmakoloških učinkov ajde ostaja zaenkrat še nepojasnen, predpostavljajo se mehanizmi povezani z nizko prebavljivostjo beljakovin, dobro prehrabno vrednostjo ali posebnimi učinki fitokemičnih snovi, kot so na primer flavonoidi. Znano je, da imajo flavonoidi pomembno vlogo pri preprečevanju degenerativnih bolezni, vključno z rakom ter boleznimi srca in ožilja. Šest glavnih flavonoidov v ajdi je: rutin, kvercetin, orientin, homoorientin, viteksin in izoviteksin (8-11).

V magistrskem delu smo ugotavljali vsebnost treh flavonoidov v ajdi: rutina, kvercetina in kvercitrina. Njihove strukture so prikazane na sliki 1.



Sistematično ime (splošno ime)	Substituenti						
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
3, 5, 7, 3', 4'-pentahidroksi flavon (kvercetin)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Kvercetin 3-O-ramnozil-(1→6)-glukozid (rutin)	O-X	OH	H	OH	OH	OH	H
Kvercetin 3-O-ramnozid (kvercitrin)	O-Rha	OH	H	OH	OH	OH	H

Rha – ramnoza, X- ramnozilglukoza

Slika 1: Analizirani flavonoidi prisotni v ajdi, povzeto po (2)

Ajda je prevladujoč vir rutina s protivnetnimi, antimutagenimi, antikancerogenimi, antihiperglikemičnimi, antihipertenzivnimi in antioksidativnimi lastnostmi. Rutin tudi zmanjšuje prepustnost stene krvnih žil in ima antiedemno delovaje. Kvercetin je močan antioksidant, ima antiangiogeno in antikancerogeno delovanje. Kvercitrin, zlasti v kombinaciji z drugimi flavonoidi, pa ima antibakterijsko delovanje in ščiti organizem pred toksičnostjo naftodiantronov (11-13).

Zaradi številnih pozitivnih učinkov rutina, kvercetina in kvercitrina na zdravje in široke ter vedno večje uporabe rastlin z visoko vsebnostjo flavonoidov, je postalo pomembno ugotavljanje vsebnosti teh snovi v rastlinah in izdelkih. Cilj ugotavljanja vsebnosti je primerjava koncentracij flavonoidov v različnih delih rastlin, med različnimi vrstami in sortami rastlin, ugotavljanje spreminjanja vsebnosti tekom leta in v odvisnosti od različnih okoljskih dejavnikov. Metode za ugotavljanje vsebnosti flavonoidov so opisane v nadaljevanju.

1.4 Analizne metode za ugotavljanje antioksidantov

V zadnjem desetletju je bilo razvitih veliko metod za analizo antioksidantov. Metode vključujejo oceno celotne antioksidativne aktivnosti in individualno identifikacijo in kvantifikacijo različnih antioksidantov (3). Med njimi so dobro uveljavljene in visoko učinkovite metode: UV spektroskopija, plinska kromatografija (GC), tekočinska kromatografija (LC), masna spektrometrija (MS) in kapilarna elektroforeza (CE). Omenjene metode se rutinsko uporabljajo za določitev bioaktivnih spojin in antioksidantov v številnih prehrabnih izdelkih, zeliščih in rastlinskih izvlečkih. V zadnjih letih so GC povezana z MS in LC povezana z detektorjem z nizom diod (DAD) ali elektrokemičnim detektorjem (ECD) ter elektrosprej ionizacija in tandem masne spektrometrije (ESI-MS/MS) najbolj pogosto uporabljane analitske tehnike. GC omogoča višjo ločljivost in občutljivost kot LC, vendar je potrebna obsežna faza priprave vzorca, saj pogosto vključujejo izolacijo metabolitov z ekstrakcijo tekoče-tekoče (LLE) ali pa druge postopke ekstrakcije ter derivatizacije za povečanje hlapnosti analitov. V nasprotju z GC pa je pri LC analizi faza priprave vzorca hitrejša in enostavnejša ter zagotavlja zelo občutljivo metodo za kvantifikacijo izbranih fenolnih metabolitov, če je sklopljena z MS/MS. Čeprav te metode zagotavljajo visoko raven informacij o kemijskih značilnostih spojine, vzorec zahteva različne korake obdelave (na primer ekstrakcija in čiščenje) pred in med analizo (1). Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) zahteva veliko časa, dobro izobraženega analitika, ekstrakcijo vzorcev, drage naprave in kemikalije. Za analizo enega vzorca potrebujemo približno 1 uro, zato je metoda manj primerna za rutinsko analizo velikega števila vzorcev (14). Znanstveniki si prizadevajo, da bi našli enostavnejše in hitrejše postopke, ki bi dopolnili ali nadomestili trenutno uporabljene analizne metode. Ena izmed možnosti je IR spektroskopija.

1.5 IR spektroskopija

IR spektroskopija je metoda, ki je požela veliko zanimanje zaradi ugodnih lastnosti, kot so hiter čas analize, prijaznost okolju zaradi odsotnosti topil, visoka natančnost, nizki stroški, in enostaven način priprave vzorcev. Priprava vzorcev omogoči izboljšanje jakosti signala, izboljša razmerje med signalom in šumom ter zmanjša pojav prekrivanja vrhov na istem območju valovnih števil pri spojinah s podobno kemijsko strukturo. Priprava vzorca v obliki blage dehidracije zmanjša vpliv proste vode, za katero sta značilna vrhova pri 3300 cm^{-1} in 1700 cm^{-1} , ki lahko prekrijeta pomembne vrhove proučevane spojine. Zagotoviti je potrebno, da je velikost delcev med vzorci enaka, tako da je sipanje svetlobe med vzorci primerljivo. Ker priprava vzorcev ne zahteva ekstrakcije, lahko na ta način zmanjšamo pojav degradacije antioksidativnih komponent. Zaradi omenjenih lastnosti je IR spektroskopija odlično orodje za analizo spojin z antioksidativnimi lastnostmi. Zaradi sposobnosti obdelave velikega števila vzorcev v kratkem časovnem obdobju, jo pogosto uporabljajo za rutinsko analizo v živilski industriji. Široko se uporablja tudi na tako imenovanem področju »fito analitike«, vse bolj pogosto pa je vključena tudi v farmakopejo. Prednosti IR spektroskopije pred ostalimi opisanimi analiznimi metodami, ki temeljijo na kromatografiji, so opisane v preglednici I (1, 15, 16).

Preglednica I: Prednosti in slabosti IR spektroskopije v primerjavi s kromatografskimi analiznimi metodami, povzeto po (1)

Splošne značilnosti	IR spektroskopija	Kromatografske analize metode
Predpriprava vzorcev (ekstrakcija, redčenje, mletje)	Ni potrebna ali minimalna	Potrebna
Stroški	Relativno nizki	Srednji ali visoki
Hitrost analize	Visoka	Nizka do srednja
Standardi	Niso potrebni	Potrebni
Podatkovne analize in interpretacije	Potrebna kemometrija	Enostavne
Kvantitativna analiza	Da (kalibracija z znanimi vzorci)	Da
Kvalitativna analiza	Da	Da

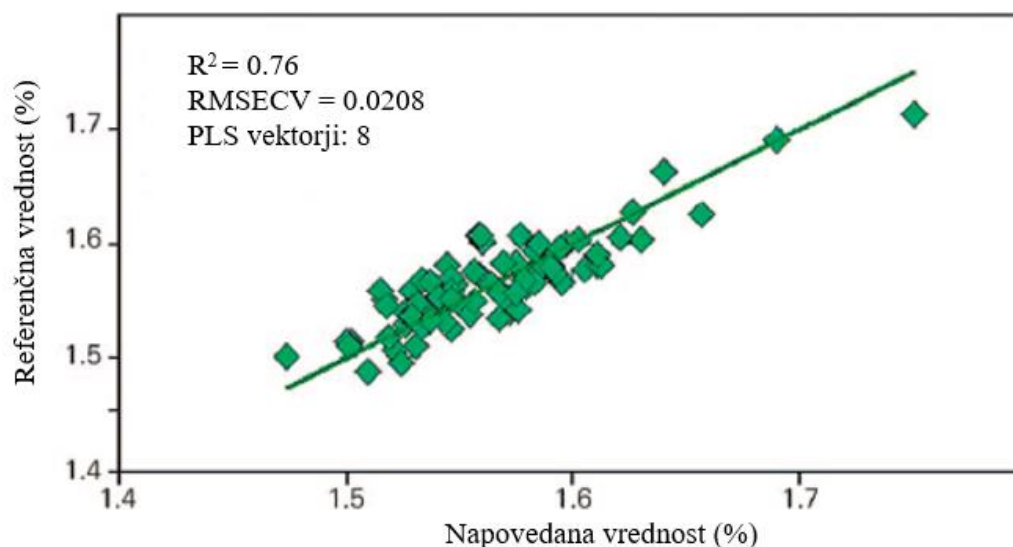
Razvoj in uvedba IR spektroskopije za analizo antioksidantov v rastlinskem materialu je postala mogoča zaradi razvoja multivariantnih podatkovnih metod in tehnik na področju tako imenovane kemometrije. Kemometrija predstavlja kemično disciplino, ki uporablja matematične in statistične metode za izbiro optimalnega eksperimentalnega postopka, obdelavo podatkov kemijskih analiz in izboljšanje razumevanja kemičnih informacij. Sočasno z razvojem računalnikov v zadnjih 30 letih je uporaba kemometrije postala vse bolj priljubljena med znanstveniki in analitiki. Vključitev računalnika kot sestavnega dela analize omogoča kontrolo inštrumentov in identifikacijo spektrov, ki jih uporabljamo pri izdelavi napovednih modelov. Velika prednost kemometrije je njena sposobnost za pridobivanje informacij na podlagi IR spektrov in raziskovanje le-teh za namen pridobivanja kvalitativnih in kvantitativnih informacij. Kemometrija je zelo uporabna pri NIR (bližnji infrardeči) spektroskopiji, kjer je interpretacija spektrov zahtevnejša v primerjavi z MIR (srednjo infrardečo) spektroskopijo, kjer lahko spektre, predvsem absorpcijske pasove, neposredno interpretiramo zaradi specifičnosti vrhov kemijskih funkcionalnih skupin. Ena izmed pogosto uporabljenih multivariantnih metod je regresija delnih najmanjših kvadratov (ang. PLS -partial least squares). Metoda omogoča ugotavljanje povezave med referenčnimi vrednostmi določene lastnosti (v našem primeru koncentracija analita) in informacijo IR spektra. Tako lahko izdelamo model, ki bo ugotovil vrednost proučevane lastnosti testnega vzorca na podlagi IR spektra. Z uporabo PLS metode na podlagi učnega seta vzorcev postavimo model, na podlagi validacijskega seta pa validiramo. Z nastalim modelom lahko napovemo koncentracijo novega, neodvisnega vzorca, v nekaj minutah, vključno s snemanjem spektra in pretvorbo podatkov. To zagotavlja zelo priročno in visoko učinkovito metodo v številnih situacijah, še posebno pri nadzoru kakovosti v živilski industriji, kjer mora biti hitro analiziranih veliko število vzorcev, hkrati pa ni časa in sredstev za uporabo konvencionalne referenčne metode. Poleg prednosti pa ima metoda tudi pomanjkljivosti. Ena izmed slabosti spektralne analize je ta, da je občutljiva le na določene komponente in v omejenem koncentracijskem območju. Nadalje, da napovedni model ostane zanesljiv, ga je potrebno redno preverjati in posodabljati kalibracije spektrov. To je dolgotrajen in težaven proces, hkrati pa zahteva konstantno preskrbo z referenčnim materialom oziroma vzorci. Zanesljivost modela pa omogočimo tudi s konstantnimi in standardiziranimi delovnimi pogoji in nastavitvami parametrov tekom merjenja.

Za izboljšanje razlik med vzorci je potrebna obdelava spektrov. Pri tem je pomembno zavedanje, kaj vsaka funkcija obdelave s podatki stori. Prekomerna obdelava spektrov ne sme biti nadomestilo za slabo kakovost posnetih spektrov. Ker je IR spektroskopija posredna metoda za kvantifikacijo, potrebujemo tudi referenčno metodo (na primer HPLC), s pomočjo katere zagotovimo kvantitativne podatke o proučevani spojini. Šele nato lahko postavimo PLS model. Na kakovost modela lahko vpliva veliko dejavnikov, zato je pomembno, da je vsak korak pri postavitvi modela validiran. Ker je metoda hitra in enostavna za uporabo, je bila široko sprejeta za rutinsko analizo antioksidantov na področju živil, rastlin in kmetijskih proizvodov. Čeprav IR spektroskopija v splošnem ne more izmeriti spojin z nizko koncentracijo, pa lahko s pomočjo »fingerprinta« IR spektra v kombinaciji s kemometrijo pojasnimo posamezne značilnosti komponent, česar ostale analizne metode ne omogočajo. Razvoj kalibracije je daleč najpomembnejši vidik za razvoj uspešne metode, ki temelji na IR spektroskopiji. Metoda zahteva visoko stopnjo izobraženosti, predvsem na področju kemometrije, kar je verjetno razlog, da se omenjena tehnologija še ni razširila na večje število področij in uporabnikov (1, 15, 17-19).

1.6 Dosedanje raziskave na področju IR spektroskopije

V študiji avtorjev Yang in Ren (20) so uporabili NIR v kombinaciji z PLS za ugotavljanje vsebnosti rutina v ajdi. Metoda za pridobitev referenčnih vrednosti je bila HPLC analiza. PLS model so ovrednotili glede na RMSECV (ang. root mean-square error of cross validation), SEP (ang. standard error of prediction) in R^2 (ang. coefficient of determination). Posnete spektre so razdelili na učni in validacijski set v razmerju 4:1.

Razvili so štiri modele na podlagi uporabe različnega števila PLS vektorjev, različnih načinov obdelave spektrov in uporabljenih območij valovnih dolžin. Omenjeni parametri so odražali različne vrednosti RMSECV in R^2 . Vsi štirje modeli so imeli podobne vrednosti območja vsebnosti. Najvišjo vrednost R^2 in najmanjšo vrednost RMSECV pa je imel model prikazan na sliki 2. Omenjen optimalni model je bil narejen na podlagi obdelave, ki odstrani konstanten odklik od bazne linije (ang. constant offset elimination), 85 vzorcev za kalibracijo, 8 PLS vektorjev in frekvenčnega območja $6192\text{-}5446,3\text{ cm}^{-1}$ in $4601,6\text{-}4246,7\text{ cm}^{-1}$ (20).



Slika 2: Referenčne vrednosti HPLC analize v primerjavi z napovedanimi vrednostmi NIR spektroskopije za določitev dejanske vrednosti rutina v vzorcih ajde (zrna), povzeto po (20)

Iz rezultatov so ugotovili, da je obdelava spektrov pomembna faza pri kalibraciji modela. Z obdelavo zmanjšamo razlike v spektrih, ki jih povzročajo različne debeline vzorcev. Število PLS vektorjev bistveno vpliva na kakovost modela. Model s prevelikim številom PLS vektorjev se bo bolje prilagajal učnem setu, vendar bo napoved za ostale vzorce slabša. V primeru premajhnega števila PLS vektorjev pa bo model slabše prilagodljiv zaradi pomanjkanja informacij. V študiji so ugotovili, da ima NIR spektrometrija številne prednosti pred HPLC analizo: je hitra, priprava vzorca je enostavnejša in uporabljenih je manj reagentov, kar zmanjšuje stroške in ponuja varno delovno okolje (20).

V študiji avtorja Lu in sodelavcev (14) so proučevali metodo za kvantitativno analizo kvercetina in derivatov v čebuli (*Allium cepa*) z infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo (FT-IR) s tehniko oslabiljenega popolnega odboja (ang. ATR - attenuated total reflectance) ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) v kombinaciji z multivariantno analizo kot nadomestno metodo za HPLC analizo. Za kvantitativno analizo flavonoidov in določitev linearne regresije med referenčnimi vrednostmi HPLC analize in napovedanimi vrednostmi FT-IR spektroskopije so uporabili PLS metodo z območjem valovnih dolžin med $1800-900\text{ cm}^{-1}$. V študiji je omenjeno, da mora imeti dober PLS model visoko vrednost determinacijskega koeficienta ($R^2 > 0,95$) in nizek RMSE tako validacijskega kot tudi učnega seta. Poleg tega je zaželeno, da omejimo vrednost latentnih spremenljivk pod 10, saj lahko preveliko prileganje modelu (ang. overfitting) povzroči slabo napovedno vrednost le-tega. Ugotovili so, da so bili rezultati FT-IR spektroskopije primerljivi z rezultati HPLC analize, v primeru FT-IR spektroskopije pa so dosegli celo boljšo ponovljivost med meritvami.

Poleg flavonoidov, ki jih najdemo v ajdi - rutina in kvercetina, so v študijah ugotavljali tudi vsebnost drugih antioksidantov.

V študiji avtorjev Pedro in Ferreira (21) so prvič uporabili IR spektroskopijo, natančneje NIR, z uporabo PLS metode za določitev vsebnosti likopena v paradižniku in dosegli zadovoljive rezultate. Nadalje so v študiji avtorja Baranska in sodelavcev (22) ugotavljali vsebnost likopena v paradižniku z uporabo FT-Raman, ATR-IR in NIR spektroskopije. Ugotovili so, da z uporabo ATR-IR spektroskopijo dosežejo najboljše rezultate ($R^2 = 0.98$), NIR pa daje najslabše rezultate ($R^2 = 0.85$).

V študiji avtorjev Kupina in Shrikhande (23) in v študiji avtorja Cuadrado in sodelavcev (24) so obširno raziskovali vsebnost taninov z uporabo FT-IR in NIR spektroskopije. V obeh študijah so na kristal IR spektrofotometra neposredno nanесли tekoč vzorec vina. Ugotovili so, da se absorpcijski vrhovi etanola, vode in organskih kislin pojavljajo v istem MIR območju kot tanini ter na ta način prekrijejo značilne vrhove fenolov. Kemometrijski modeli imajo pomembno vlogo pri rešitvi tega problema.

V študiji avtorja Wu in sodelavcev (25) so s pomočjo NIR spektroskopije določevali α -linolno in α -linolensko kislino v jedilnih oljih. Rezultate predhodnih študij so izboljšali z izbiro selektivnih regij valovnih dolžin. Ugotovili so, da NIR spektroskopija v kombinaciji z PLS metodo predstavlja hitro in natančno metodo za določevanje α -linolne in α -linolenske kisline v jedilnih oljih. Rezultate analize lahko uporabimo za ugotavljanje vsebnosti esencialnih maščobnih kislin v jedilnih oljih.

V študiji avtorja Che Man in sodelavcev (26) so določevali α -tokoferol v palminem olju z metodo FT-IR spektroskopije. V študiji avtorja Szlyk in sodelavcev (27) so uporabili NIR za določitev α -tokoferola v rastlinskih oljih. Da bi zmanjšali motnje in povečali občutljivost, so raziskovalci pred analizo izvedli ekstrakcijo z etanolom. Primerjali so natančnost in točnost NIR spektroskopije in HPLC analize in dokazali prednosti NIR spektroskopije v rutinski analizi α -tokoferola v rastlinskih oljih.

V študiji avtorjev Yang in Irudayaraj (28) so kombinirali NIR, MIR in FT-Raman spektroskopijo za določitev vitamina C v praških in raztopinah. Večina raziskav na tem področju je kvantificirala čisti vitamin C v prahu in na žalost je zelo malo raziskav, kjer so analizirali vitamin C prisoten v hrani.

V študiji avtorja Whitacre in sodelavcev (29) so uporabili metodo NIR spektroskopije za napovedovanje procianidinov v kakavovih zrnih. Kot referenčno metodo so uporabili HPLC analizo. Ugotovili so, da NIR spektroskopija zagotavlja dobro presejalno orodje za zagotavljanje kakovosti kakava.

V študiji avtorjev Brenna in Berardo (30) in v študiji avtorja Berardo in sodelavcev (31) so z metodo NIR spektroskopije in HPLC analizo kot referenčno metodo ugotavljali vsebnost luteina v koruzi, v študiji avtorja Chen in sodelavcev pa vsebnost luteina v kitajskem ohrovtu (32). V študiji avtorjev Brenna in Berardo (30) so ugotovili, da lahko z omejitvijo območja valovnih dolžin ustvarijo bolj robusten PLS model v primerjavi z modelom, ki je bil zgrajen iz celotnega območja valovnih dolžin. V študiji avtorja Chen in sodelavcev (32) so prav tako uporabili le značilna območja valovnih dolžin za lutein in potrdili ugotovitev, da selektivne regije valovnih dolžin izboljšajo PLS model.

V študijah avtorjev Iacopini in sodelavcev (33), Luypaert in sodelavcev (34) ter Chen in sodelavcev (35) so uporabili NIR spektroskopijo za določanje katehinov v zelenem čaju.

V študiji avtorja Allison in sodelavcev (36) so s pomočjo FT-IR spektroskopije in PLS metode določali raven hidroksicimetne kisline v treh rodovih trave za krmo. Kljub temu, da je bil prvotni namen raziskave ugotavljanje vsebnosti inhibitornih snovi, ki bi lahko vplivale na kakovost krme, je iz študije razvidno, da bi bilo mogoče opredeliti koncentracijo hidroksicimetne kisline v rastlinskih materialih.

2 NAMEN DELA

V magistrski nalogi bomo razvili metodo za ugotavljanje vsebnosti flavonoidov v vzorcih ajde z metodo IR spektroskopije v kombinaciji s kemometrijo. Uporabili bomo tehniko oslabljenega popolnega odboja (ATR) in regresijo delnih najmanjših kvadratov (PLS) kot multivariantno metodo.

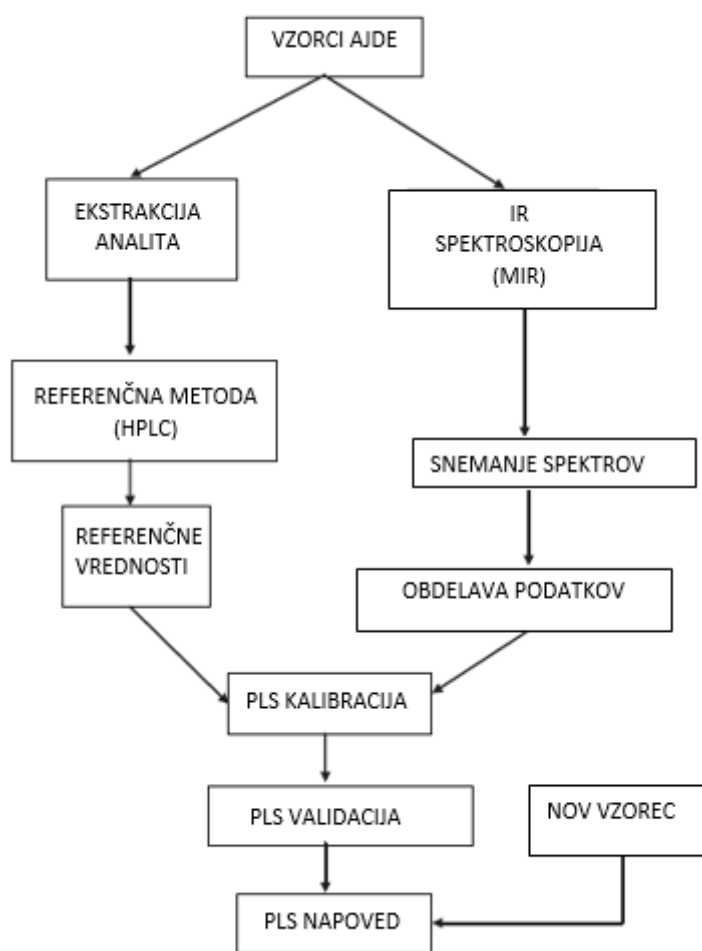
Uporabili bomo več vzorcev ajde in razvili model za določanje koncentracije flavonoidov rutina, kvercetina, kvercitrina in celokupnih flavonoidov, ki bodo predstavljale odvisne spremenljivke. Točke IR spektra pa bodo neodvisne spremenljivke. Kot referenčno metodo bomo uporabili podatke HPLC analize iz predhodno izvedenega eksperimentalnega dela. Uporabljene vzorce bomo naključno razdelili na učni in validacijski set. Podatki učnega set nam bodo služili za postavitev modelov, s pomočjo validacijskega seta pa bomo ovrednotili uspešnost postavljenih modelov.

S spreminjanjem parametrov bomo izdelali različne modele in ugotavljali, katera kombinacija parametrov daje najboljše rezultate in zakaj. Za snemanje spektrov bomo uporabili različne ločljivosti (4 cm^{-1} , 8 cm^{-1} , 16 cm^{-1}), spektre bomo obdelali na različne načine (uporabili bomo osnovni spekter, odvod, normalizacijo, odvod normalizacije, normalizacijo s standardnim odklonom in odvod normalizacije s standardnim odklonom), uporabili bomo mlete in cele vzorce ter različne dele rastlin (liste, cvetove in luščine). Uporabljeno IR območje valovnih števil bomo izbrali na različne načine (uporabili bomo le značilne vrhove IR spektrov proučevanih spojin in še nekaj sosednjih točk ali pa celoten spekter valovnih števil). Za vrednotenje napovednih modelov bomo uporabili vrednosti R^2 in RMSE.

Na podlagi rezultatov želimo ugotoviti, ali je omenjena metoda primerno nadomestilo za dolgotrajnejše in zahtevnejše analizne metode za ugotavljanje vsebnosti flavonoidov v ajdi.

3 MATERIALI IN METODE

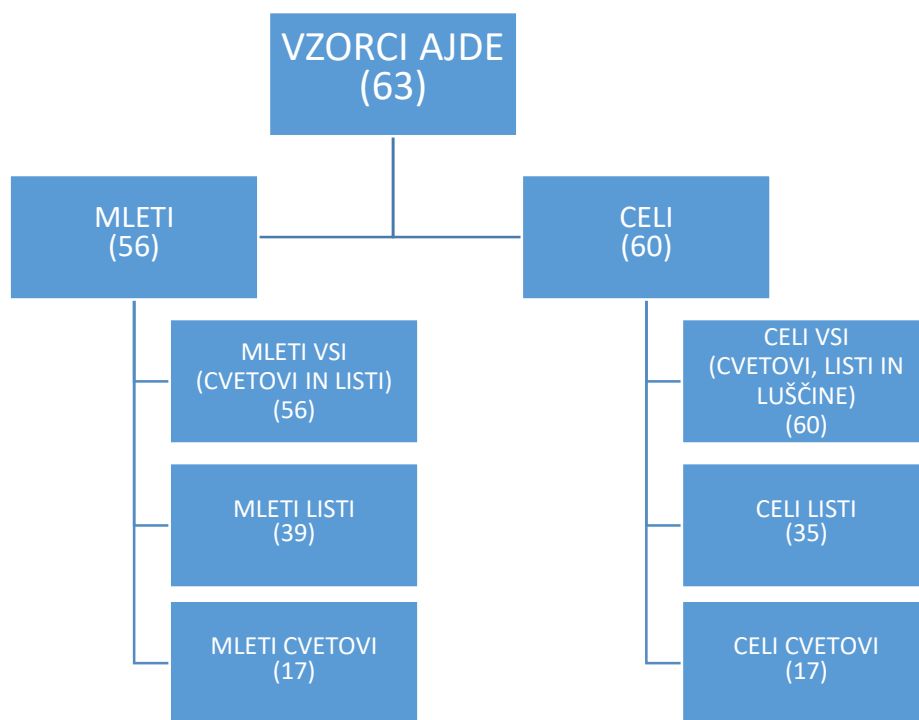
Razvoj metode za ugotavljanje vsebnosti antioksidantov z IR spektroskopijo je zapleten proces, ki zahteva ustrezne materiale in metode. Za postavitev in validacijo modela moramo najprej pridobiti referenčne vrednosti, obenem pa zbrati tudi spektre proučevane snovi. Ko je model postavljen in testiran, lahko nove vzorce analiziramo neposredno z IR spektroskopijo (15). Omenjen proces prikazuje slika 3.



Slika 3: Potek izvedbe metod za postavitev modela, prirejeno po (15)

3.1 Izvor rastlinskega materiala

Podatki o vzgoji rastlin in pridobivanju vzorcev so navedeni v magistrski nalogi Neže Vrečar (37). V analizo smo vključili vzorce ajde, bolj podrobno liste, cvetove in luščine plodov rastlin. Uporabili smo cele in mlete vzorce. V primeru mletih vzorcev smo uporabili le liste in cvetove, pri celih pa poleg listov in cvetov tudi luščine. Nekaterih vzorcev je zmanjkalo zaradi drugih analiz, zato nabor mletih vzorcev ni identičen naboru celih vzorcev listov in cvetov. Slika 4 prikazuje razdelitev uporabljenih vzorcev za generiranje napovednih modelov, kjer številke v okroglih oklepajih predstavljajo število vzorcev v posamezni skupini.



Slika 4: Razdelitev uporabljenih vzorcev za generiranje modelov

3.2 Priprava vzorcev

Priprava vzorcev je potekala maja 2016 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani (Katedra za farmacevtsko biologijo). Priprava celih vzorcev cvetov in listov ni bila potrebna. Luščine plodov smo pred analizo očistili s pomočjo čopiča in igle, da delci endosperma prisotni na površini luščin ne bi motili snemanja spektra ter da ostrejši trdi delci ne bi poškodovali diamantnega kristala. Za pripravo mletih vzorcev cvetov in listov smo uporabili dve metodi. Vzorce ajde *F. esculentum* Moench sorta Darja smo mleli v mlinčku IKA® 01.776055 model A 10 B do nastanka homogeno zmletega vzorca. Vzorce tujih ajd, pri katerih je bilo materiala manj, smo dali v 2 ml plastične epruvete in jih zmleli z 2 mm debelim zaobljenim vrtečim kovinskim pestilom lastne izdelave, ki je bil priključen na električni brusilnik Bruder Mannesmann Center line 130W model Hobby Tool kit. Za določitev optimalnega časa in hitrosti mletja smo, zaradi lažje dostopnosti, uporabili vzorce lipe in mete. Glede na homogenost zmletih vzorcev smo določili čas mletja 2 minuti pri največji hitrosti. V primeru vzorca s trdo konsistenco pa smo čas mletja podaljšali za dodatni 2 minuti. Vzorce luščin smo skušali zmleti s prej omenjenima metodama, pa tudi v terilnici s klasičnim keramičnim pestilom. Nobeden od omenjenih načinov ni dal zadovoljivih rezultatov, saj tudi po več minutnem mletju nismo uspeli pridobiti zadostne količine ustrezno zmletega vzorca, ki bi ga lahko uporabili za analizo. Zaradi nastalega problema smo se odločili, da mletih vzorcev luščin ne bomo vključili v analizo.

3.3 IR spektrofotometer in programska oprema

Meritve vzorcev smo opravili med majem in julijem 2016 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani (Katedra za farmacevtsko kemijo). Za snemanje spektrov s tehniko oslabiljenega popolnega odboja (ATR) smo uporabili spektrometer z enojnim odbojem, proizvajalca Nicolet Instrument Co, Madison, ZDA z devteriranim triglicin sulfatnim (DTGS) detektorjem in merilnim nastavkom Dura SamplIR Technologies, Danbury, ZDA. Omenjen nastavek sestavlja diamantni kristal premera 1 mm, ki je nameščen vzporedno glede na ploščo, kar zagotavlja optimalen kontakt vzorca s kristalom. Vijak, ki je prav tako del nastavka, pa omogoča enakomeren pritisk vzorca na kristal. Za snemanje vzorcev smo uporabili program Omnic E.P.S., verzijo 5.2. Spektre smo shranili v obliki CSV formata (ang. comma separated values).

3.4 Potek merjenja IR spektrov za namen statistične obdelave

Pred začetkom analize vzorcev smo izvedli statistično analizo osnovnih in obdelanih spektrov, kjer smo uporabili liste *F. esculentum* Moench sorta Darja. Teh vzorcev je bilo dovolj, da smo lahko izvedli obširnejše meritve in analizo, katere namen je bil ocenjevanje in vrednotenje razlik med spektri različnih vzorcev. Meritve smo izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani (Katedra za farmacevtsko kemijo) tekom aprila in maja 2016. Uporabili smo 13 vzorcev, ki so bili z rastlin pobrani vsake štiri dni tekom rastne sezone, od začetka avgusta do konca septembra 2015. Iz vsakega vzorca smo izbrali 5 različnih, čim manj nagubanih in ožiljenih listov. Na vsakem posameznem listu smo posneli spektre na treh različnih delih lista, pri štirih različnih ločljivostih (2 cm^{-1} , 4 cm^{-1} , 8 cm^{-1} in 16 cm^{-1}). Spektre ozadja smo snemali pred vsako novo izbiro ločljivosti. Za posamezno ločljivost smo na koncu dobili 195 spektrov (13 vzorcev, 5 listov, 3 ponovitve na vsakem listu), ki smo jih shranili v obliki CSV formata. Za vse nadaljnje analize smo uporabljali program Octave-4.0.0 (GUI). Pred uvozom podatkov v program Octave-4.0.0 smo vse decimalne vejice zamenjali s pikami, saj program Octave pravilno prepozna in naloži le datoteke s tako obliko zapisa. To smo naredili s pomočjo programa Notepad++. Nadalje smo podatke za posamezno ločljivost zložili v matrike s programom Octave. Spektre smo obdelali na različne načine, izračunali smo odvod, normalizacijo, normalizacijo s standardnim odklonom, odvod normalizacije in odvod normalizacije s standardnim odklonom. Odvod uporabimo za odstranjevanje vpliva razpršenosti svetlobe oziroma odstranjevanje premika bazne linije. Z uporabo prvega odvoda poudarimo spremembe v naklonu, tako da postanejo veliki vrhovi, ki se prekrivajo, in majhni vrhovi bolj vidni. Odvod vrhove zoži in jih naostri. Normalizacija je zelo pomemben način obdelave, saj kompenzira razlike v debelini vzorca, sipanju svetlobe in nihanju v moči vira (IR sevanje). Normalizacijo torej uporabimo za zmanjšanje razlik med vzorci. Normalizacijo s standardnim odklonom uporabljamo, da zmanjšamo razlike v velikosti delcev v snovi in razlike v razpršenosti svetlobe (15, 38-40).

Za ugotavljanje statistično signifikantnih razlik med vzorci smo uporabili analizo variance (ANOVA). ANOVA je močno statistično orodje, ki se uporablja za testiranje razlik med dvema ali več neodvisnih skupin, ki temeljijo na izračunih F vrednosti. F vrednost primerja variance povprečij med skupinami vzorcev in variance povprečij znotraj vzorcev. Večja F vrednost pomeni večjo verjetnost, da skupine pripadajo različnim populacijam (16, 41). V našem primeru je bil test ANOVA izveden za tri meritve enega lista in za petnajst meritev enega vzorca, pri stopnjah tveganja $\alpha = 0,05$ in $\alpha = 0,01$. Na podlagi rezultatov smo se odločili, da bomo nadaljnje spektre posneli pri ločljivostih 4 cm^{-1} , 8 cm^{-1} in 16 cm^{-1} . Meritve ostalih vzorcev bomo izvedli trikrat na različnih listih enakega vzorca.

3.5 Potek merjenja IR spektrov vzorcev

Pred začetkom merjenja vzorcev smo želeli določiti optimalne pogoje merjenja. V ta namen smo uporabili vzorce ajde *F. esculentum* Moench sorta Darja. Optimalne pogoje smo določili posebej za cele liste, cvetove in luščine ter mlete liste in cvetove. Snemanje spektrov celih listov smo optimizirali in poenotili tako, da smo izbrali čim manj naguban in ožiljen del lista, pri merjenju pa smo ga vedno obrnili z zgornjo listno ploskvijo obrnjeno proti kristalu. Pri celih vzorcih cvetov smo ugotavljali pojav razlike med spektri belih in rožnatih cvetov. Ker je razlika obstajala, smo se odločili, da bomo v analizo vključili le cvetove bele barve, saj so vzorce sestavljali večinoma beli cvetovi, rožnatih je bilo manj. Ugotovili smo tudi, da dajejo socvetja bolj primerljive rezultate, kot če posnamemo spekter posameznega cveta, zato smo pri meritvah vzorcev posneli spekter socvetja. Pri celih vzorcih luščin smo najprej zagotovili, da je bil le-ta pred meritvijo ustrezno očiščen, namestili pa smo ga tako, da je bila zunanja stran luščine obrnjena proti kristalu. Mletih vzorcev smo nanegli na kristal spektrometra s plastično žličko zgolj toliko, da je bil kristal v celoti pokrit. Spektre smo posneli pri sobni temperaturi, med 500 cm^{-1} in 4000 cm^{-1} in pri 50 ponovitvah snemanja. Glede na dobljene rezultate statistične analize smo se prehodno odločili, da bomo meritve vseh vzorcev izvedli pri ločljivostih 4 cm^{-1} , 8 cm^{-1} in 16 cm^{-1} . Nastavitve pri merjenju prikazuje preglednica II.

Preglednica II: Nastavitve pri merjenju z ATR IR spektroskopijo

Parameter	ATR IR spektroskopija
Ozadje	Zrak
Število ponovitev snemanja	50
Ločljivost (cm^{-1})	4, 8, 16
Območje snemanja spektra (cm^{-1})	500 - 4000
Delilec žarka	ZnSe
Format	% prepustnosti
Detektor	DTGS KBr

Pred vsako novo izbiro ločljivosti smo posneli ozadje, ki vsebuje atmosferske pline (vodo in CO_2) in ga računalnik samodejno odšteje od spektra vzorca. Vsako meritev pri isti ločljivosti smo trikrat ponovili, vendar na različnem listu, cvetu ali luščini istega vzorca. V primeru, da je bila pri katerem izmed treh vzorcev slaba ponovljivost, smo izvedli še eno dodatno meritev. Med vsako meritvijo smo kristal in vijak očistili s 96 % etanolom, počakali, da se posušita in nanесли nov list, cvet ali luščino. Celoten proces merjenja enega vzorca je trajal približno 15 minut.

Skozi celoten proces merjenja smo zagotovili, da so bili delovni pogoji, nastavitve parametrov in temperatura merjenja standardizirani in konstantni, sicer bi lahko omenjeni faktorji vplivali na zanesljivost spektrov in natančnost nastalega modela (15).

Za namen rezultatov in razprave smo posneli tudi spektre standarda rutina (Roth, Karlsruhe), kvercetina (Kemika, Zagreb) in kvercitrina (Roth, Karlsruhe). Snemanje smo izvedli pod enakimi pogoji, kot jih prikazuje preglednica II, le da smo merili samo pri ločljivost 4 cm^{-1} . Vsak standard smo posneli dvakrat. Snemanje je potekalo pri sobni temperaturi v septembru 2016 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani na Katedri za farmacevtsko kemijo.

3.6 Spektri in obdelava

Z omenjeno metodo smo posneli 1044 spektrov: 60 celih in 56 mletih vzorcev pri treh različnih ločljivostih, vsako meritev pri izbrani ločljivosti in vzorcu pa smo trikrat ponovili. Za obdelavo in analizo spektrov smo uporabili program Octave-4.0.0 (GUI). Pred uvozom podatkov v program Octave smo vse decimalne vejice zamenjali s pikami, saj program Octave pravilno prepozna in naloži le datoteke s tako obliko zapisa. To smo naredili s pomočjo programa Notepad++. Sledila je obdelava spektrov, ki je eden izmed ključnih korakov pri analizi podatkov. Izračunali smo odvod, normalizacijo, normalizacijo s standardnim odklonom, odvod normalizacije in odvod normalizacije s standardnim odklonom.

3.7 Izdelava modelov

Z modelom smo s pomočjo posnetih spektrov želeli napovedati odvisne spremenljivke: koncentracijo rutina, kvercetina, kvercitrina in celokupnih flavonoidov. Vzorce smo razdelili v dve neodvisni skupini. Večja skupina vzorcev je predstavljala učni set, manjša pa validacijski set vzorcev (preglednici IX in X v prilogi 1). Učni set smo uporabili za izdelavo modela, validacijski set pa za preverjanje ustreznosti modela. Validacijski set smo določili ločeno za cele in mlete vzorce. Pomagali smo si s premico z naklonom 1, na kateri smo skušali validacijski set izbrati tako, da ne bi vseboval vzorcev na skrajnih koncih celotnega koncentracijskega območja. Razen v primeru, ko je bilo vzorcev skoncentriranih na začetku premice več – v tem primeru smo v validacijski set vključili tudi te vzorce. Validacijske vzorce smo izbrali naključno z upoštevanjem opisane omejitve. Validacijske vzorce smo izbirali na setu vseh vzorcev pri čemer smo število vzorcev, ki so predstavljali liste, cvetove in luščine vnaprej opredelili. Problem je nastal, ko je bil v primeru vseh vzorcev določen vzorec na sredini premice, ko pa smo vzorce filtrirali le na cvetove, pa je bil predhodno izbran validacijski vzorec na koncu premice, oddaljen od večine ostalih vzorcev. To lahko opazimo tudi na grafu med rezultati (slika 6). Razmerje med številom vzorcev v učnem in validacijskem setu je bilo med 4:1 in 3:1.

Za izdelavo modela s pomočjo Octave smo potrebovali tudi ustrezen seznam referenčnih vrednosti, ki smo jih pridobili iz magistrske naloge Neže Vrečar (37). S pomočjo programa v Octave, smo izdelali modele za kombinacije v naprej določenih parametrov. Uporabljeni parametri so prikazani v preglednici III.

Preglednica III: Seznam uporabljenih parametrov pri postavitvi modela

Ločljivost (cm⁻¹)	4, 8, 16
Obdelava spektra	osnovni spekter, odvod, normalizacija, odvod normalizacije, normalizacija s standardnim odklonom, odvod normalizacije s standardnim odklonom
Priprava vzorca	celi, mleti
Del rastline	listi, cvetovi, vsi
IR območja*	vsa, IR območja 1, IR območja 2

*Pripravili smo tri različne nabore IR območij valovnih števil, za vsako ločljivost posebej. V literaturi smo poiskali IR spektre rutina, kvercetina in kvercitrina in njihove najznačilnejše vrhove (preglednica XI v prilogi 2). Za vsakega od teh vrhov smo v spektru izbrali določeno število sosednjih točk pri referenčni valovni dolžini. Število izbranih točk je bilo odvisno od ločljivosti, saj smo pri vseh želeli izbrati enak delež točk, za IR območja 1 približno 1/3 celotnega spektra, za IR območja 2 pa približno 1/2. Način izbire valovnih števil za IR območja 1 in IR območja 2 je prikazana v preglednici IV. V primeru vseh IR območij smo v analizo vključili celoten spekter pri določeni ločljivosti.

Preglednica IV: Število točk za vsako informativno valovno število spektra iz referenc (42-46)

Ločljivost (cm^{-1})	4	8	16
IR območja 1	8 točk	4 točke	2 točki
IR območja 2	16 točk	8 točk	4 točke

Omenjeni trije nabori IR območij so predstavljali prvo izbiro, temu pa je sledila druga izbira, kjer smo z uporabo funkcije korelacije izračunali Pearsonov koeficient korelacije med vsakim valovnim številom in referenčno vrednostjo odvisne spremenljivke. To smo storili posebej za vsa IR območja, IR območja 1 in IR območja 2. Pearsonov koeficient korelacije nam podaja številsko vrednost, ki pove, kako sta spremenljivki linearno povezani med seboj. Dobljene rezultate je program razporedil glede na absolutno vrednost koeficientov korelacije. Vrednosti -1 in 1 pomenijo, da korelacija obstaja, vrednosti blizu nič pa, da korelacije ni (38). Glede na omenjene vrednosti je program izbral 100 (v primeru ločljivosti 4 cm^{-1} in 8 cm^{-1}) oziroma 50 najboljših valovnih števil. Na tak način smo iz celotnega nabora točk spektra izbrali le manjši delež (v primeru ločljivosti 4 cm^{-1} to predstavlja približno 6 % celotnega spektra, v primeru ločljivosti 8 cm^{-1} in 16 cm^{-1} pa približno 11 % celotnega spektra) informativnih točk, oziroma neodvisnih spremenljivk. Na podlagi teh spremenljivk smo v naslednjem koraku izdelali PLS model, ki je občutljiv na preveliko število neinformativnih vhodnih spremenljivk (16).

Nadalje smo s PLS metodo izračunali vrednosti koeficientov modelov za kombinacije parametrov opisanih v preglednici III. Vhodne podatke so predstavljali predhodno izbrani deli spektra in podatki za referenčne koncentracije učnega seta. Prav tako pa moramo opredeliti število latentnih faktorjev PLS modela. V analizo smo vključili 10 latentnih faktorjev. V primeru, da izberemo preveliko število latentnih faktorjev, se bo model bolje prilegal učnemu setu, medtem ko bo napovedna moč za druge vzorce postala slabša (»overfitting«): ne glede na to kako »slab« je model, bo preveliko število faktorjev vedno zagotovilo »dober« model. Premajhno število latentnih faktorjev pa bo zmanjšalo uporabnost modela, saj v postavitev modela ne bodo vključeni vsi pomembni podatki (»underfitting«) (15, 20). Izračunane koeficiente smo nato uporabili za napovedovanje vrednosti odvisnih spremenljivk.

3.8 Vrednotenje modelov

Ustreznost izdelanih modelov smo preverili na validacijskem setu vzorcev. Sledilo je vrednotenje modela z uporabo R^2 in RMSE. Determinacijski koeficient (R^2) predstavlja orodje v statistični analizi, s katerim vrednotimo linearno povezavo med odvisno in neodvisno spremenljivko. V primeru $R^2 = 0$ pomeni, da odvisne spremenljivke ne moremo napovedati na podlagi neodvisne spremenljivke, $R^2 = 1$ pomeni, da lahko odvisno spremenljivko brez napak napovemo na podlagi neodvisne spremenljivke, R^2 med 0 in 1 pa pove, v kolikšni meri je odvisna spremenljivka predvidljiva (47). Koren srednje kvadratne napake (RMSE) pa je pokazatelj ne-točnosti napovedne metode. Zaželeno so čim nižje vrednosti, saj je merilo napake. Odvisen je od vrednosti spremenljivke, zato ga lahko uporabimo le za primerjavo točnosti modelov zgrajenih na podlagi istih spremenljivk (39). S programom smo izračunali R^2 in RMSE za učni in validacijski set vzorcev. Rezultati, ki jih je program izpisal so vsebovali podatke za R^2 in RMSE za učni in validacijski set vzorcev, vrednosti koncentracij pridobljenih z modelom za učni in validacijski set vzorcev ter seznam v modelu uporabljenih valovnih števil.

Na podlagi vrednosti R^2 validacijskega seta vzorcev smo izbrali najboljše modele za vsako spojino posebej. Pri štirih izbranih najboljših modelih smo na podlagi prave in napovedane vrednosti izračunali standardno deviacijo ter absolutno in relativno napako. Za vsako omenjeno napako pa smo izračunali še maksimalno in minimalno vrednost, povprečje in standardno deviacijo.

Želeli smo primerjati tudi RMSE validacijskega seta vzorcev za izbrane najboljše modele za vsako spojino in standardni odklon koncentracij referenčnih vzorcev. Ker RMSE in standardni odklon nista neposredno primerljiva, smo izpeljali enačbo, ki je povezovala omenjeni vrednosti in ju primerjali. Želeli smo, da bi bili vrednosti čim bolj podobni.

Ugotavljali smo tudi vpliv izbire parametrov na število boljših in slabših modelov.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Rezultati statistične analize

S testom ANOVA smo želeli ugotoviti, ali se s spreminjanjem ločljivosti in obdelave spektrov pojavljajo razlike v deležu števila točk, kjer so razlike med vzorci statistično signifikantne. Večji delež točk pomeni, da daje več valovnih števil statistično signifikantne razlike med vzorci. Ker je namen našega dela napovedovanje koncentracij različnih vzorcev aje, ki se med seboj razlikujejo, iščemo valovna števila, ki so sposobna razlikovati med vzorci. V analizo smo vključili 3 meritve enega lista in 5 listov vsakega vzorca, kar da skupaj 15 meritev za vsakega od trinajstih vzorcev. Predvidevamo, da bo pri skupinah iz 3 meritev enega lista manj valovnih števil, ki bi dala statistično signifikantne razlike, v primerjavi s skupinami iz 15 meritev enega vzorca. To bi pomenilo, da so razlike znotraj vzorca manjše od razlik med vzorci. Izračunali smo deleže števila točk spektra, v katerih so razlike med skupinami statistično signifikantne ($p \leq 0,05$ oziroma $p \leq 0,01$) pri različnih izbirah α in obdelavah spektra. Rezultati statistične analize so prikazani v preglednicah V – VIII.

Preglednica V: Rezultati testa ANOVA, prikazani kot delež števila točk, kjer so razlike med skupinami statistično signifikantne ($p \leq 0,05$), vsako skupino predstavljajo 3 meritve enega lista

Obdelava	Ločljivost [cm^{-1}]			
	2	4	8	16
Osnovni spekter	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Odvod	0,9997	0,9994	0,9989	0,9978
Normalizacija	0,9997	1,0000	1,0000	1,0000
Normalizacija s standardnim odklonom	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Odvod normalizacije	0,9997	0,9994	0,9989	0,9978
Odvod normalizacije s standardnim odklonom	0,9997	0,9994	0,9989	0,9978
Povprečje	0,9998	0,9997	0,9994	0,9989

Preglednica VI: Rezultati testa ANOVA, prikazani kot delež števila točk, kjer so razlike med skupinami statistično signifikantne ($p \leq 0,01$), vsako skupino predstavljajo 3 meritve enega lista

Obdelava	Ločljivost [cm^{-1}]			
	2	4	8	16
Osnovni spekter	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Odvod	0,9978	0,9989	0,9978	0,9978
Normalizacija	0,9997	1,0000	1,0000	1,0000
Normalizacija s standardnim odklonom	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Odvod normalizacije	0,9972	0,9989	0,9967	0,9978
Odvod normalizacije s standardnim odklonom	0,9972	0,9989	0,9967	0,9978
Povprečje	0,9987	0,9994	0,9985	0,9989

Preglednica VII: Rezultati testa ANOVA, prikazani kot delež števila točk, kjer so razlike med skupinami statistično signifikantne ($p \leq 0,05$), vsako skupino predstavlja 15 meritev enega vzorca

Obdelava	Ločljivost [cm^{-1}]			
	2	4	8	16
Osnovni spekter	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Odvod	0,9634	0,9730	0,9890	0,9912
Normalizacija	0,9997	0,9994	1,0000	1,0000
Normalizacija s standardnim odklonom	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Odvod normalizacije	0,9573	0,9576	0,9769	0,9802
Odvod normalizacije s standardnim odklonom	0,9567	0,9554	0,9725	0,9780
Povprečje	0,9795	0,9809	0,9897	0,9916

Preglednica VIII: Rezultati testa ANOVA, prikazani kot delež števila točk, kjer so razlike med skupinami statistično signifikantne ($p \leq 0,01$), vsako skupino predstavlja 15 meritev enega vzorca

Obdelava	Ločljivost [cm^{-1}]			
	2	4	8	16
Osnovni spekter	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Odvod	0,8152	0,8783	0,9372	0,9560
Normalizacija	0,9997	0,9983	0,9956	1,0000
Normalizacija s standardnim odklonom	0,9994	1,0000	1,0000	0,9956
Odvod normalizacije	0,7978	0,8194	0,8855	0,9231
Odvod normalizacije s standardnim odklonom	0,7961	0,8122	0,8744	0,9143
Povprečje	0,9014	0,9180	0,9488	0,9648

V primeru osnovnih spektrov so pri vseh valovnih številih razlike med skupinami statistično signifikantne (delež je 1,00), ne glede na stopnjo tveganja in izbiro skupine. Z obdelavo spektrov deleži malo variirajo, vendar so v vseh primerih še vedno veliki (delež je povsod večji od 0,90). Rezultati, kjer vsako skupino predstavljajo 3 meritve enega lista (preglednici V in VI), kažejo, da so deleži primerljivi (vsi nad 0,99), ne glede na stopnjo tveganja in obdelavo spektra. Pri rezultatih, kjer so skupine sestavljene iz 15 meritev enega vzorca (preglednici VII in VIII) vidimo trend, ki nakazuje, da delež raste z manjšo ločljivostjo (pri ločljivosti 2 cm^{-1} je delež najmanjši, pri ločljivosti 16 cm^{-1} pa največji). Ta trend je bolj opazen v primeru stopnje tveganja $\alpha = 0,01$ kot pri $\alpha = 0,05$. Torej imajo spektri, posneti pri manjši ločljivosti, nekoliko večji delež točk, v katerih so razlike med vzorci statistično signifikantne. Ta ugotovitev je skladna z rezultati magistrske naloge avtorice Nataše Kopač (39), v kateri je bilo ugotovljeno, da dajejo meritve pri ločljivostih 8 cm^{-1} in 4 cm^{-1} boljše rezultate od meritev pri ločljivosti 2 cm^{-1} . Odločili smo se, da bomo nadaljnje spektre posneli pri ločljivostih 4 cm^{-1} , 8 cm^{-1} in 16 cm^{-1} . Meritve bomo izvedli trikrat na različnih listih enakega vzorca.

Če primerjamo delež točk, kjer so razlike statistično signifikantne, v primeru treh meritev enega lista in petnajstih meritev enega vzorca opazimo, da se rezultati ne ujemajo z našo predpostavko, da naj bi bile razlike znotraj vzorca manjše kot razlike med vzorci.

4.2 Najboljši modeli za izbrane spojine

Glede na izračunan R^2 validacijskega seta vzorcev smo za vsako spojino posebej določili najboljši napovedni model. Namen omenjene analize je bil opredelitev parametrov analize, pri katerih dobimo najboljši model za ugotavljanje koncentracije proučevanih flavonoidov v vzorcih ajde. Zanimalo nas je, ali bi lahko za doseg najboljšega modela v primeru vseh spojin izbrali enake parametre, ali pa se parametri razlikujejo glede na izbrano spojino. Nadalje smo želeli dokazati, da natančnost izhodnih podatkov HPLC analize vpliva na uspešnost napovednega modela. Za vrednotenje napovednega modela smo uporabili podatke o RMSE za validacijski set vzorcev, ki smo jih primerjali z vrednostmi, ki smo jih dobili na podlagi standardne deviacije referenčnih vrednosti (enačba 1), pri čemer smo izračunali referenčne RMSE_{ref} vrednost tako, da smo za napako vzeli standardne deviacije meritev dobljenih s HPLC.

V enačbi 1 v imenovalcu nastopa število 17, ki predstavlja število vzorcev. Želeli smo, da bi bili omenjeni vrednosti čim bolj podobni. Nadalje smo za vsak model opredelili ločljivost, obdelavo spektrov, izbrano IR območje, predpripravo vzorcev in del rastline, pri katerih je bil model za izbrano proučevano spojino najboljši. Izračunali smo tudi standardno deviacijo, relativno in absolutno napako glede na prave in napovedane vrednosti. Nato smo za relativno in absolutno napako izračunali še maksimalne in minimalne vrednosti, pa tudi povprečno vrednost in standardno deviacijo napak. Pri primerjavi napak smo upoštevali relativne napake, saj lahko le-te med sabo neposredno primerjamo. Dobljene rezultate smo želeli povezati z izhodnimi podatki HPLC analize in ugotoviti, zakaj smo za proučevano spojino dobili določene rezultate.

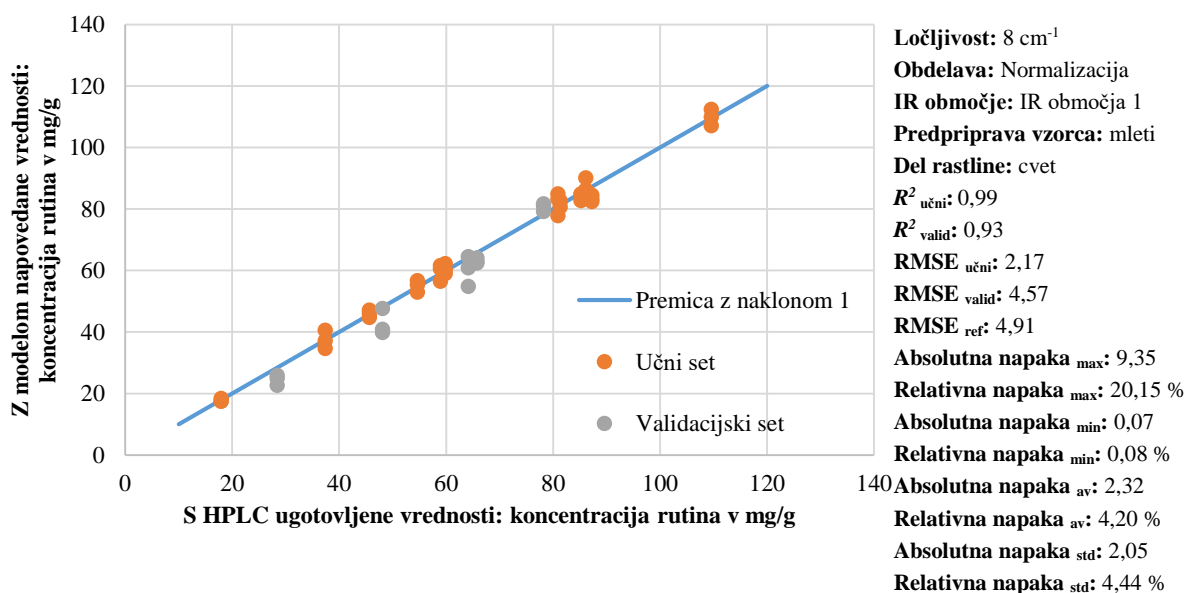
$$RMSE_{ref} = \sqrt{\frac{\sum \sigma_i^2}{17}}$$

Enačba 1

σ_i – standardni odklon vrednosti HPLC analize

4.2.1 Rutin

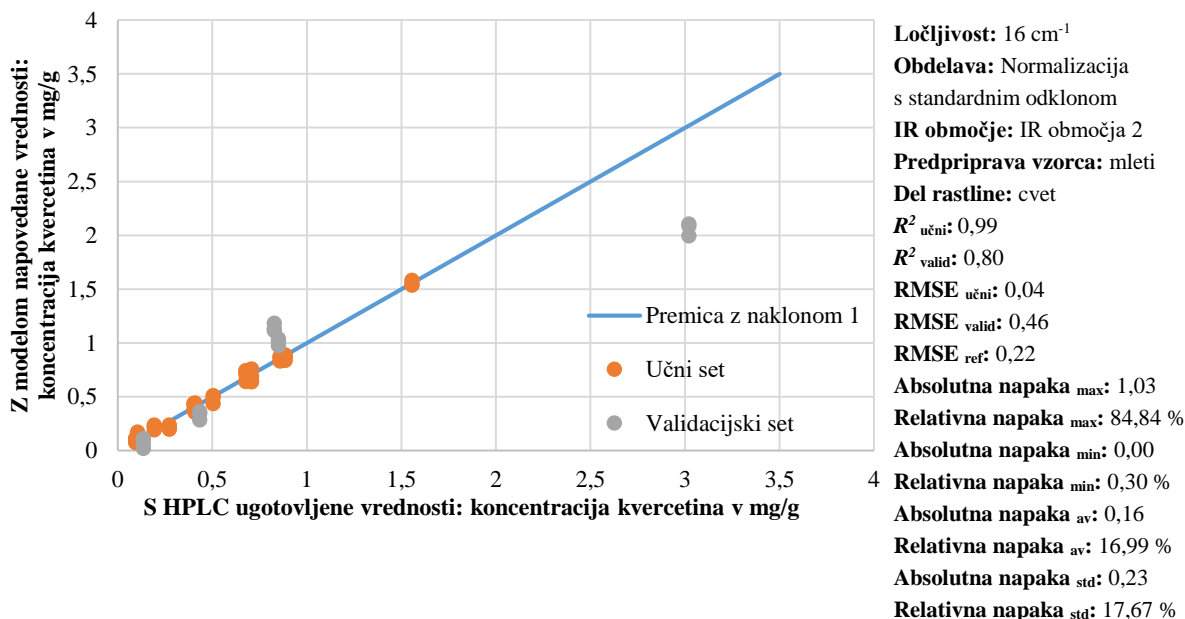
Od treh obravnavanih flavonoidov je rutina v ajdi največ, kar je potrdila tudi HPLC analiza. V primeru rutina smo dobili najboljši napovedni model z uporabo mletih cvetov in snemanju spektrov pri ločljivost 8 cm^{-1} , uporabili smo normalizirane spektre, spremenljivke pa so bile izbrane na podlagi IR območja 1. R^2 validacijskega seta vzorcev je bil v tem primeru 0,93, R^2 učnega seta pa 0,99. Če primerjamo RMSE validacijskega seta (4,57) in RMSE_{ref} (4,91) opazimo, da sta vrednosti zelo podobni, kar potrjuje ugotovitev, da smo za rutin dobili najboljše rezultate glede na ostale spojine. Relativna napaka je bila med 0,08 % in 20,15 % (slika 5). Če primerjamo relativno napako v primeru najboljšega modela za rutin z najboljšimi modeli za ostale spojine, ugotovimo, da smo v primeru rutina dobili najmanjše relativne napake, torej dobimo v primeru spojine rutina najbolj kakovosten napovedni model. Koncentracije rutina so bile najvišje v primerjavi s kvercetinom in kvercitrinom, zato smo pričakovali, da bo ta model najlažje zgraditi.



Slika 5: Rezultati najboljšega modela v primeru proučevane spojine rutina

4.2.2 Kvercetin

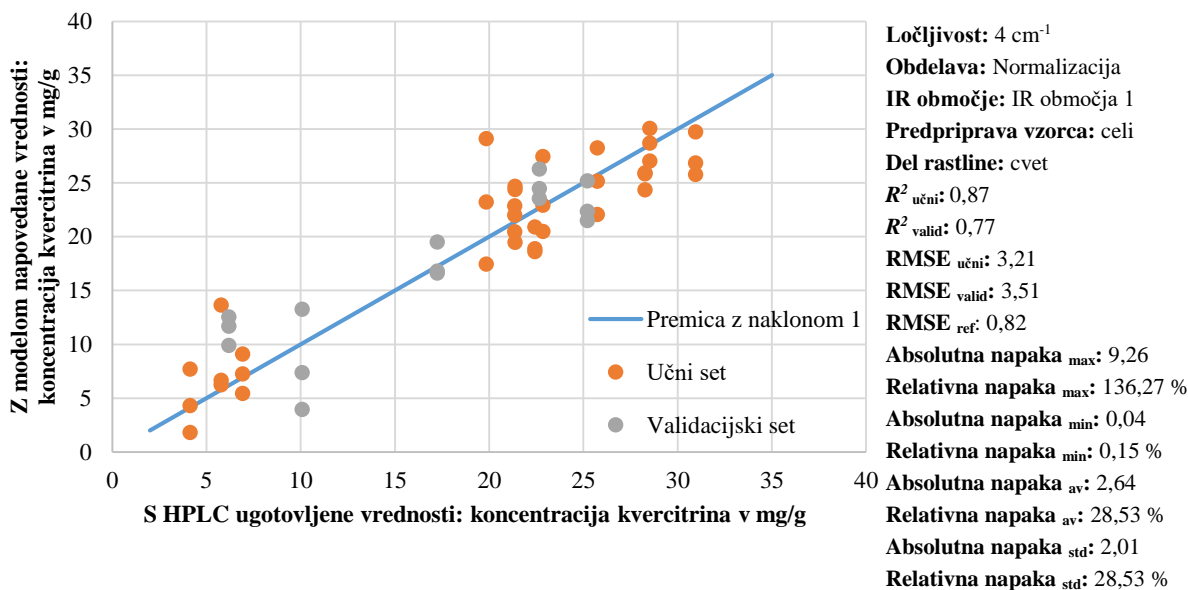
Kvercetin je v vzorcih ajde najmanj, približno 10-krat manj kot kvercitrin in 30-krat manj kot rutina. Na sliki 6 lahko opazimo tudi pojav, da so skoraj vsi vzorci skoncentrirani pri nižjih vrednostih koncentracije kvercetina. Vzorcev s koncentracijo kvercetina nad 1 mg/g je malo. Ob naključni izbiri validacijskega seta vzorcev smo po nesreči izbrali ravno dva vzorca izven glavnega intervala. V primeru kvercetina smo dobili najboljši napovedni model z uporabo mletih cvetov in snemanju spektrov pri ločljivosti 16 cm^{-1} , uporabili smo spektre obdelane s funkcijo normalizacije s standardnim odklonom, spremenljivke pa so bile izbrane na podlagi IR območja 2. R^2 validacijskega seta vzorcev je bil v tem primeru 0,80, R^2 učnega seta pa 0,99. Če primerjamo RMSE validacijskega seta vzorcev (0,46) in RMSE_{ref} (0,22) vidimo, da je vrednost RMSE za validacijski set vzorcev višja. Relativna napaka je bila med 0,30 % in 84,84 % (slika 6). Rezultati za kvercetin so v primerjavi z rutinom slabši, v primerjavi s kvercitrinom pa boljši. Sklepamo lahko, da je na slabše rezultate vplivala majhna koncentracija kvercetina in izbira validacijskega seta vzorcev izven glavnega intervala vrednosti.



Slika 6: Rezultati najboljšega modela v primeru proučevane spojine kvercetina

4.2.3 Kvercitrin

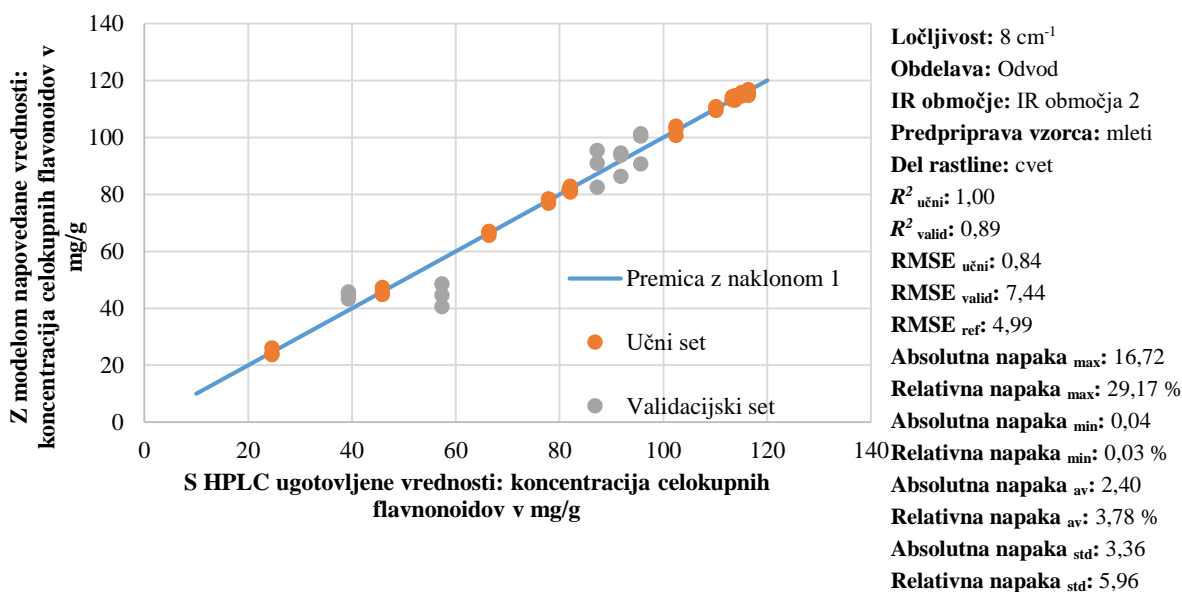
Glede na nižje izhodne koncentracije kvercitrina pridobljene s HPLC analizo smo predpostavili, da bomo v tem primeru dobili večje napake in manj boljših modelov kot v primeru rutina. Poleg omenjenega pa smo zaradi pomanjkanja literaturnih virov v analizo kvercitrina vključili najmanj podatkov o omenjeni spojini in njenih najznačilnejših vrhovih IR spektra. V primeru kvercitrina smo dobili najboljši napovedni model z uporabo celih cvetov in snemanju spektrov pri ločljivosti 4 cm^{-1} , uporabili smo normalizirane spektre, spremenljivke pa so bile izbrane na podlagi IR območja 1. R^2 validacijskega seta je bil v tem primeru 0,77, R^2 učnega seta pa 0,87. Če primerjamo RMSE validacijskega seta (3,51) in RMSE_{ref} (0,82) vidimo, da je vrednost RMSE validacijskega seta precej višja. Relativna napaka je bila med 0,15 % in 136,27 % (slika 7). Za kvercitrin smo dobili najslabše rezultate v primerjavi z ostalimi spojinami.



Slika 7: Rezultati najboljšega modela v primeru proučevane spojine kvercitrina

4.2.4 Celokupni flavonoidi

Pri ugotavljanju koncentracije celokupnih flavonoidov pričakujemo boljše rezultate, saj celokupni flavonoidi predstavljajo vsoto koncentracij vseh flavonoidov, kar pomeni dovolj visoke koncentracije, pa tudi ločevanje med kemijsko podobnimi spojinami ni potrebno. V primeru celokupnih flavonoidov smo dobili najboljši napovedni model z uporabo mletih cvetov in snemanju spektrov pri ločljivosti 8 cm^{-1} , uporabili smo spektre obdelane s funkcijo odvoda, spremenljivke pa so bile izbrane na podlagi IR območja 2. R^2 validacijskega seta je bil v tem primeru 0,89, R^2 učnega seta pa 1,00. Če primerjamo RMSE validacijskega seta (7,44) in RMSE_{ref} (4,99) vidimo, da je vrednost RMSE za validacijski set vzorcev višja. Relativna napaka je bila med 0,03 % in 29,17 % (slika 8). Rezultati celokupnih flavonoidov so primerljivi z rezultati rutina. Tudi v primeru celokupnih flavonoidov se izkaže, da dosežemo v primeru višjih koncentracij boljše rezultate.



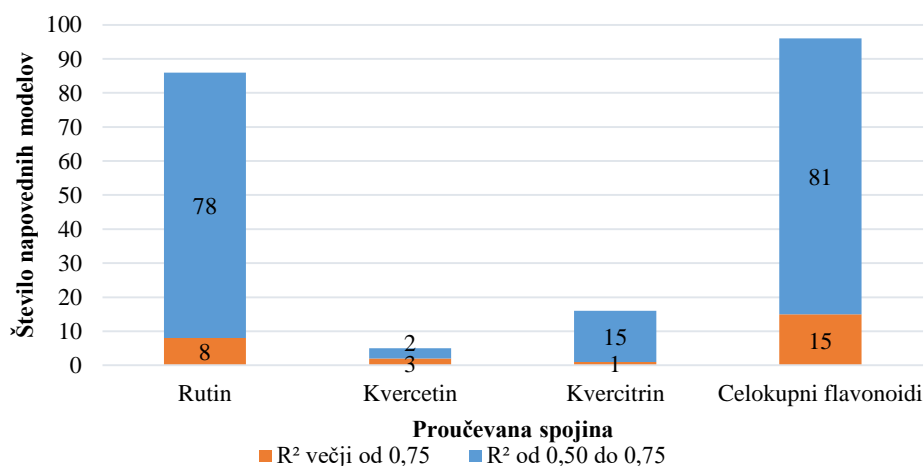
Slika 8: Rezultati najboljšega modela v primeru celokupnih flavonoidov

4.3 Vrednotenje parametrov

Namen analize je bil ugotavljanje in opredelitev optimalnih parametrov, ki omogočajo najboljše rezultate. Želeli smo dokazati, da daje metoda pri izbranih parametrih dovolj dobre rezultate, da bomo lahko model uporabili v prihodnosti na neodvisnih vzorcih. Glede na vrednost R^2 validacijskega seta vzorcev smo opredelili število boljših in slabših modelov. Boljši napovedni modeli so bili tisti, kjer je bila vrednost R^2 validacijskega seta večja od 0,75. Slabši napovedni model pa je bil v primeru, ko je bila vrednost R^2 validacijskega seta med 0,50 in 0,75. Modelov z vrednostmi R^2 validacijskega seta manjšimi od 0,50 v rezultatih nismo obravnavali.

4.3.1 Proučevana spojina

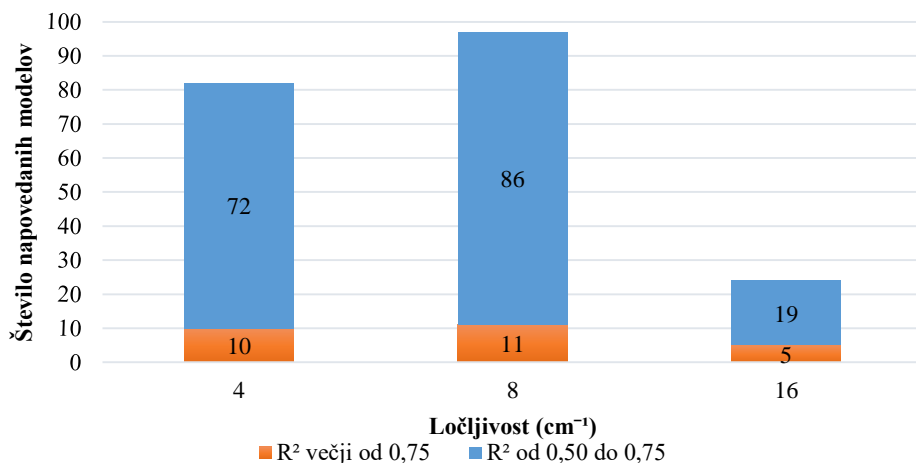
Glede na izbrano spojino – rutin, kvercetin, kvercitrin in celokupni flavonoidi – smo želeli opredeliti število boljših in slabših modelov ter potrditi predpostavke in rezultate, ki smo jih pridobili v poglavju Najboljši modeli za izbrane spojine. Najboljše rezultate dajeta rutin in celokupni flavonoidi, saj smo v tem primeru dobili največ modelov, kjer je vrednost R^2 validacijskega seta vzorcev nad 0,75. V primeru kvercetina in kvercitrina pa smo dobili zelo malo modelov z vrednostjo R^2 validacijskega seta višjo od 0,75. Tudi modelov z vrednostjo R^2 validacijskega seta med 0,75 in 0,50 je bilo malo. Ugotovitve iz slike 9 se skladajo s slikami 5-8, kjer smo pri rutinu in celokupnih flavonoidih dobili boljše rezultate, pri kvercetinu in kvercitrinu pa so bili rezultati slabši.



Slika 9: Število napovednih modelov glede na proučevano spojino

4.3.2 Ločljivost

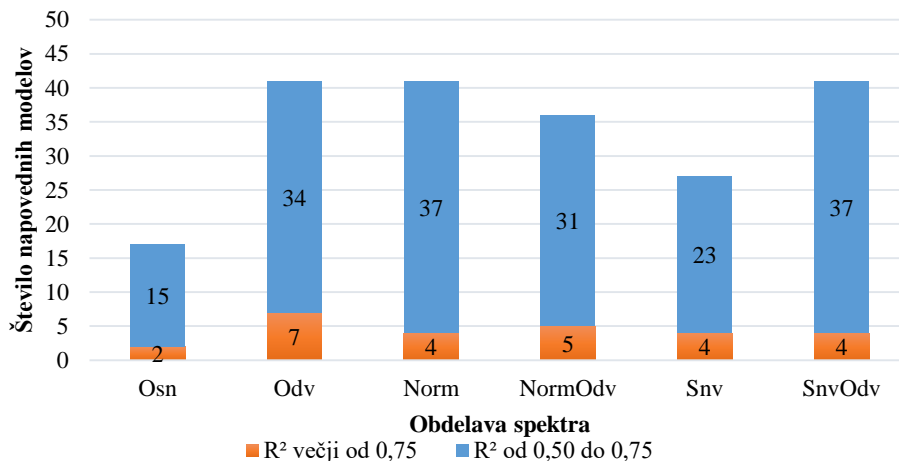
Z analizo smo želeli ugotoviti, kako se s spremembo ločljivosti spreminja uspešnost dobljenih modelov. Ugotavljali smo nastavitev ločljivosti, ki omogoča najboljše rezultate, dodatno pa smo želeli, da bi bila izbrana ločljivost tudi časovno učinkovita. Izmed izbranih ločljivostih 4 cm^{-1} , 8 cm^{-1} in 16 cm^{-1} se je izkazalo, da dobimo najboljše rezultate pri ločljivosti 8 cm^{-1} , nekoliko slabše pri ločljivosti 4 cm^{-1} , najslabše rezultate pa pri ločljivosti 16 cm^{-1} . Glede na rezultate slike 10 lahko sklepamo, da ločljivost 16 cm^{-1} vsebuje premalo pomembnih informacij o spektru in zato s to ločljivostjo težje dosežemo dober model. V statistično obdelavo smo vključili tudi meritve pri ločljivosti 2 cm^{-1} , za katero pa smo ugotovili, da je manj primerna (Rezultati statistične analize).



Slika 10: Število napovednih modelov pri različnih ločljivostih

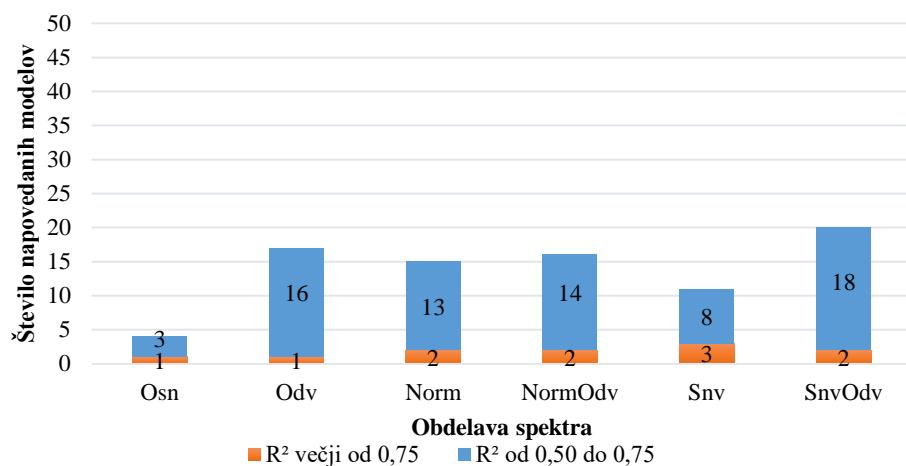
4.3.3 Obdelava spektra

Zanimalo nas je, kateri način obdelave spektrov daje najboljše rezultate in ali je vpliv obdelave spektrov odvisen od ločljivosti. Glede na rezultate ugotovimo, da dobimo najboljše in med sabo primerljive rezultate v primeru uporabe odvoda, normalizacije, odvoda normalizacije in odvoda normalizacije s standardnim odklonom. Slika 11 prikazuje rezultate v primeru vseh ločljivostih.

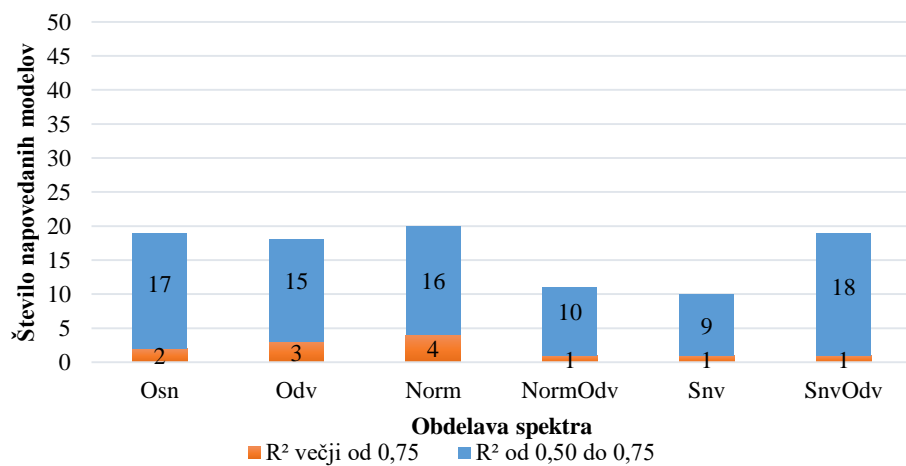


Slika 11: Število napovednih modelov pri uporabi različnih obdelav spektra, upoštevajoč vse ločljivosti

Sliki 12 in 13 prikazujeta rezultate dobljene z različnimi obdelavami spektrov pri ločljivostih 4 cm^{-1} in 8 cm^{-1} , takega grafa pri ločljivosti 16 cm^{-1} nismo prikazali, saj je tam modelov premalo, da bi izpeljali splošne zaključke. Če na slikah primerjamo sosednje stolpce opazimo, da pri večji ločljivosti (4 cm^{-1}) z odvodi izboljšamo napovedne modele (slika 12), pri manjši ločljivosti (8 cm^{-1}) pa jih z odvodi v večini primerov poslabšamo (slika 13). V splošnem z odvodom poudarimo naklone v spektru in lažje ločujemo prekrите vrhove, kar se pri ločljivosti 4 cm^{-1} izkaže kot smiselno, pri ločljivosti 8 cm^{-1} pa pomembne informacije te vrste manjkajo.



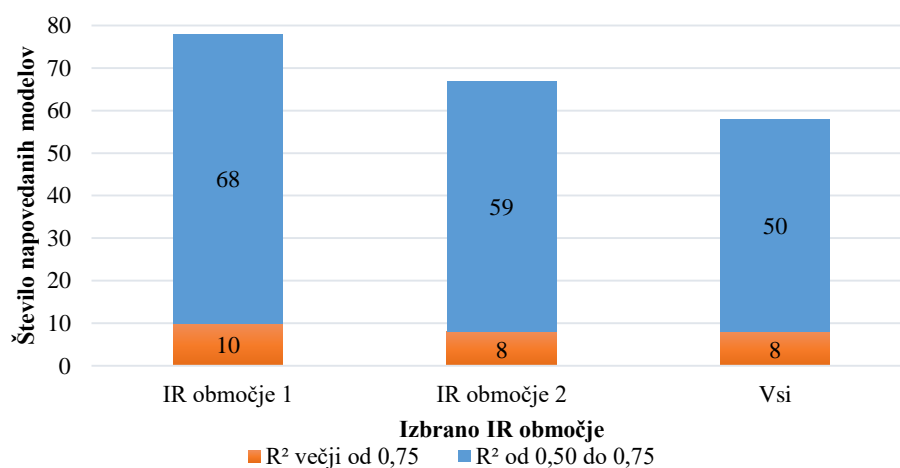
Slika 12: Število napovednih modelov pri uporabi različnih obdelav spektra v primeru ločljivosti 4 cm⁻¹



Slika 13: Število napovednih modelov pri uporabi različnih obdelav spektra v primeru ločljivosti 8 cm⁻¹

4.3.4 Izbrano IR območje

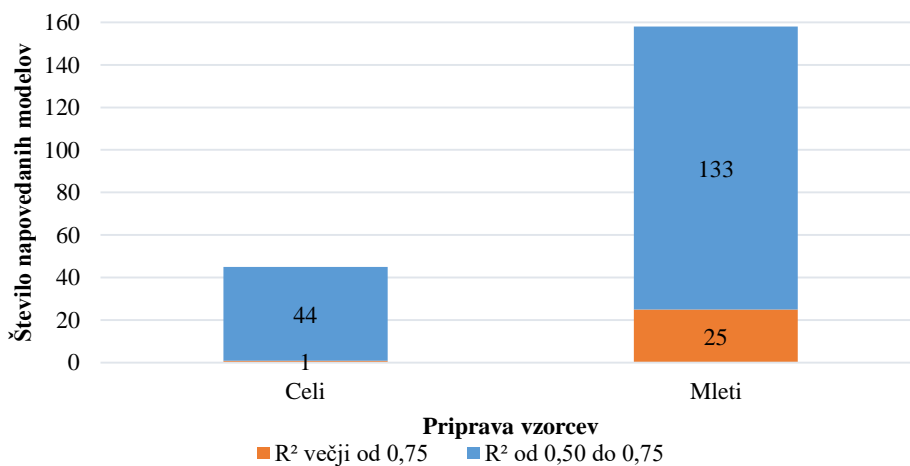
Želeli smo ugotoviti, kako predizbira valovnih števil vpliva na uspešnost napovednih modelov. Iz slike 14 je razvidno, da smo v primeru, ko so bila valovna števila izbrana le na podlagi korelacije (stolpec Vsi), dobili najslabše rezultate. V primeru IR območja 1 in IR območja 2, kjer smo valovna števila predhodno omejili na dva različna načina (preglednica IV) pa so bili rezultati boljši. Trdimo lahko, da je takšna predhodna izbira valovnih števil smiselna, saj na ta način izločimo nepomembne informacije, pomembne informacije pa so vključene v postavitev modela.



Slika 14: Število napovednih modelov pri različnih izbirah uporabljenega IR območja

4.3.5 Priprava vzorcev

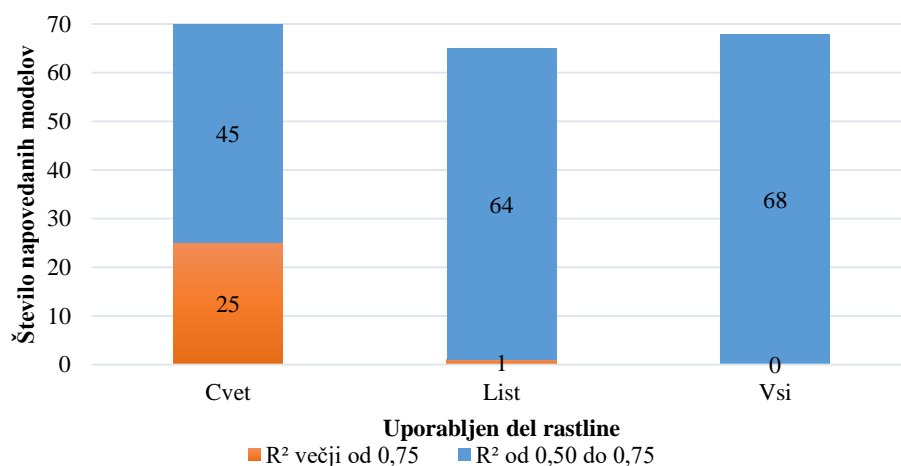
Zanimalo nas je, kakšen je vpliv priprave vzorca na uspešnost napovednega modela. Ugotovili smo, da dobimo v primeru mletih, torej obdelanih vzorcev, boljše rezultate kot v primeru celih, neobdelanih vzorcev. V primeru celih vzorcev smo dobili zgolj 1 boljši model, v primeru mletih vzorcev pa 25 boljših modelov (slika 15). Spektre celih vzorcev smo posneli tako, da smo mesto analize za vsako ponovitev spremenili. Nekateri spektri so bili posneti na robu lista, drugi pa v sredini. Pričakujemo lahko, da se s spreminjanjem mesta vzorca, kjer smo snemali spekter, spremenijo tudi lastnosti spektra. S HPLC analizo dobimo koncentracije, ki ustrezajo povprečju vzorca, saj so bili analizirani ekstrakti uprašene droge. V primeru celega vzorca pa smo posneli spekter v točno določenem kvadratnem milimetru vzorca, za katerega ne poznamo točne koncentracije. Z mletjem dosežemo tudi večjo homogenost vzorcev in zato bolj primerljive spektre in boljše rezultate.



Slika 15: Število napovednih modelov pri uporabi celih ali mletih vzorcev

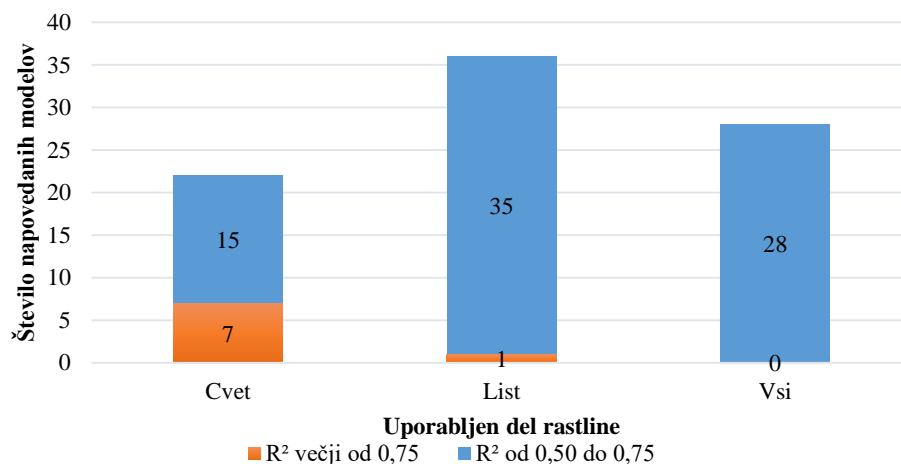
4.3.6 Uporabljen del rastline

Želeli smo ugotoviti, ali je lažje narediti model le za določen del rastline oziroma ali se število boljših modelov razlikuje med proučevanimi deli rastline. Ker so cvetovi najbolj bogat vir flavonoidov, med njimi prevladuje rutin, pričakujemo, da bomo najboljše rezultate dosegli v primeru vzorcev cvetov in spojine rutina. V primeru uporabe različnega dela rastline, smo najboljše rezultate dobili pri analizi cvetov: 25 modelov je imelo R^2 validacijskega seta vzorcev več kot 0,75. V primeru listov ali vseh vzorcev pa je imel tako vrednost zgolj 1 model oziroma nobeden (slika 16). Tak rezultat lahko pripišemo dejstvu, da vsebuje ajda največji delež flavonoidov prav v cvetovih (48, 49). Večja koncentracija omogoča boljšo analizo, manjše napake in napovedovanje modelov. Število modelov, kjer je R^2 validacijskega seta vzorcev med 0,50 in 0,75 pa je v primeru analize listov in vseh vzorcev večje kot v primeru cvetov.



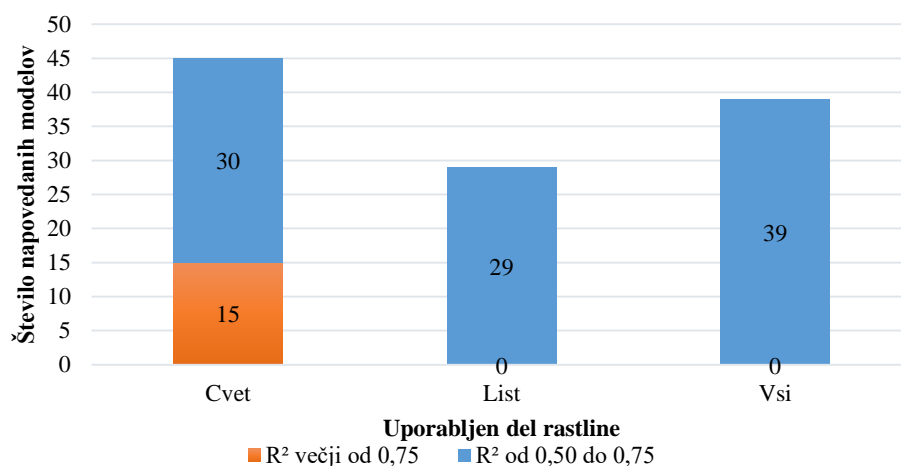
Slika 16: Število napovednih modelov pri uporabi različnih delov rastline

Največje število boljših napovednih modelov dobimo s cvetovi tudi v primeru, ko upoštevamo samo meritve za rutin. Največje število modelov, kjer je R^2 validacijskega seta vzorcev med 0,50 in 0,75 pa dobimo v primeru analize listov (slika 17).



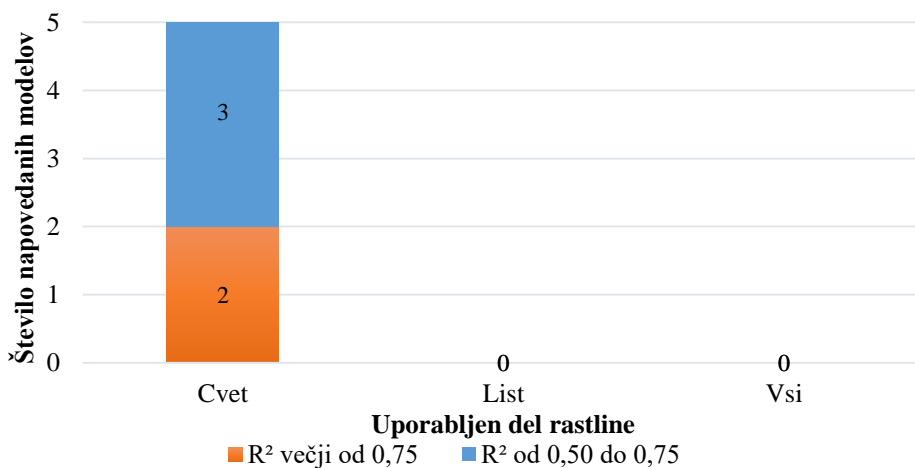
Slika 17: Število napovednih modelov pri uporabi različnih delov rastline v primeru rutina

Podobne rezultate lahko vidimo na sliki 18, kjer so prikazani rezultati za celokupne flavonoide.

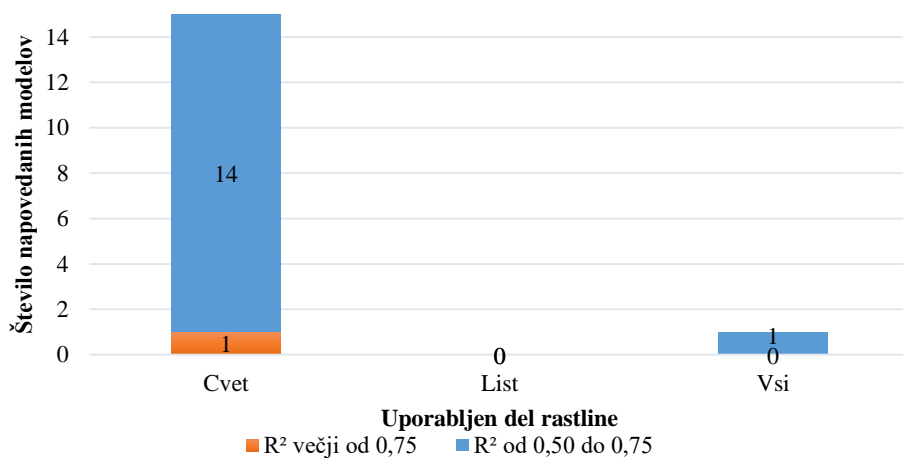


Slika 18: Število napovednih modelov pri uporabi različnih delov rastline v primeru celokupnih flavonoidov

V primeru upoštevanja samo meritev za kvercetin oziroma kvercitrin pa v primeru listov in vseh vzorcev ne dobimo skoraj nobenega modela, kjer bi bil R^2 validacijskega seta vzorcev nad 0,50 (sliki 19 in 20). Pri modelih za ti dve spojini dobimo boljše modele le pri cvetovih.



Slika 19: Število napovednih modelov pri uporabi različnih delov rastline v primeru kvercetina



Slika 20: Število napovednih modelov pri uporabi različnih delov rastline v primeru kvercitrina

Kljub temu, da sta obdelava (mletje) in analiza cvetov zahtevnejši in časovno zahtevata več časa v primerjavi z listi, sta se omenjena parametra izkazala kot zelo učinkovita pri postavljanju napovednih modelov, saj smo v primeru mletih cvetov in spojine rutina dobili najboljše rezultate. Poleg dejstva, da so cvetovi najbolj bogat vir flavonoidov, smo želeli poiskati še dodatno razlago, zakaj so rezultati v primeru cvetov boljši od listov. Razlaga bi lahko bila, da listi vsebujejo veliko barvil (predvsem klorofila) in obstaja možnost, da značilni IR vrhovi klorofila (preglednica XII v prilogi 3) prekrijejo pomembne vrhove IR spektrov proučevanih spojin (preglednica XI v prilogi 2). Primerjali smo spektre in ugotovili, da vrhovi značilni za O-H, C-H, C=O (keton) in C=C vez v strukturi klorofila a in poleg omenjenih vrhov še dva dodatna vrhova značilna za C-H in C=O vez aldehida v klorofilu b prekrivajo vrhove v spojinah rutina in kvercetina (za kvercitrin v literaturi ti vrhovi niso bili omenjeni).

5 ZAKLJUČEK

Najboljše rezultate smo dobili v primeru proučevane spojine rutina. Glede na izhodne podatke HPLC analize opazimo, da je prevladujoč flavonoid v vseh analiziranih vrstah ajde rutin, kar je tudi razlog, da so bile prav pri modelu za rutin napake najmanjše, število modelov z R^2 validacijskega seta vzorcev večjim od 0,75 pa največje. Tudi vrednosti RMSE validacijskega seta vzorcev in $RMSE_{ref}$ sta bili najbolj primerljivi. Slabše napovedne modele smo dobili v primeru kvercetina in kvercitrina. Za kvercitrin smo v literaturi dobili najmanj podatkov o značilnih vrhovih, zaradi česar lahko sklepamo, da je prišlo do »underfittinga«, saj v postavitev modela niso bili vključeni vsi pomembni podatki. Omenjeno težavo bi lahko rešili tako, da bi namesto literaturnih virov za spekter kvercitrina upoštevali spekter standarda kvercitrina, ki smo ga posneli in na ta način v analizo vključili kakšno dodatno informativno valovno število. Razlog za slabe rezultate v primeru kvercetina pa lahko iščemo v rezultatih in sklepu magistrske naloge Neže Vrečar (37), kjer je bilo ugotovljeno, da se je kot najbolj variabilen flavonoid izkazal kvercetin, poleg tega pa je njegova koncentracija v ajdi najmanjša in zato analiza in izdelava napovednih modelov najzahtevnejši.

Kot najboljši ločljivosti za napovedovanje modelov sta se izkazali 4 cm^{-1} in 8 cm^{-1} . Z uporabo največje (2 cm^{-1}) in najmanjše (16 cm^{-1}) ločljivosti smo dobili slabše rezultate. Največja ločljivost vnese v model preveč informacij, od katerih niso vse pomembne, pri tej ločljivosti je v spektru tudi več šuma, pri najmanjši ločljivosti pa se nekaj pomembnih informacij izgubi. Glede na to, da dajeta ločljivosti 4 cm^{-1} in 8 cm^{-1} zelo primerljive rezultate, bi zaradi hitrejše in enostavnejše analize kot optimalno ločljivost izbrali 8 cm^{-1} .

Ugotovili smo, da dobimo z obdelavo spektrov boljše rezultate. Najboljši načini obdelave so bili različni, odvisno od izbire ločljivosti. Pri ločljivosti 4 cm^{-1} je uporaba odvoda izboljšala rezultate. Pri ločljivosti 8 cm^{-1} pa so se v nekaterih primerih z uporabo odvoda rezultati izboljšali, nekje pa poslabšali.

Ugotovili smo, da se s predhodno selektivno izbiro značilnih valovnih števil rezultati izboljšajo. IR območje 1, kjer smo uporabili najmanjše število valovnih števil, vsebuje dovolj pomembnih informacij, da lahko z njimi postavimo dober model. Če bi želeli ugotoviti, kakšno je minimalno število valovnih števil, ki še daje dobre rezultate, bi lahko izvedli analizo tako, da bi vzeli še manjše število valovnih števil kot jih vsebuje IR območje 1 in postopek analize ponovili.

Mletje vzorcev se je izkazalo kot odlična metoda za izboljšanje rezultatov. Kljub temu, da je mletje vzorcev časovno dolgotrajen proces, dosežemo z mletjem boljše rezultate, zato bi obdelavo (mletje) vzorcev opredelili kot nujen parameter pri postavitvi analizne metode.

Kot najboljši del rastline za izdelavo modela so se izkazali cvetovi. Razlog za take rezultate je gotovo dejstvo, da so cvetovi najbolj bogat vir flavonoidov. Večja vsebnost omogoča lažjo identifikacijo, boljšo analizo in manjše napake. Predpostavljamo tudi, da smo v primeru listov dobili slabše rezultate, ker le-ti vsebujejo večjo količino barvil, predvsem klorofila, katerega IR spekter prekrije spektre proučevanih spojin, kar je razlog za slabše rezultate. Obe dejstvi potrjujejo tudi rezultati najboljših modelov za posamezne spojine, kjer opazimo, da smo v vseh primerih dobili model, kjer so bili uporabljeni cvetovi.

IR spektroskopija je primerna metoda za določevanje flavonoidov v vzorcih ajde, vendar le v primeru izbire ustreznih pogojev. Omenjena metoda se je izkazala kot najprimernejša za merjenje spojine rutina pri ločljivosti 8 cm^{-1} , na vzorcih mletih cvetov. V izbrano IR območje bi bilo potrebno vključiti valovna števila, ki zajemajo najznačilnejše vrhove rutina in še nekaj sosednji točk pri referenčnih valovnih dolžinah. Število sosednjih točk bi moralo biti čim manjše, vendar še vedno dovolj veliko, da bi z njim zajeli vse pomembne informacije. Spektre bi bilo potrebno tudi ustrezno obdelati. V analizo bi bilo potrebno vključiti zadostno število ponovitev. V predhodnih raziskavah (50) so običajno tri meritve spektrov istega vzorca povprečili, to bi bilo smiselno preizkusiti tudi v tem primeru, saj bi na ta način odstranili nekaj variabilnosti znotraj vzorca. Prav tako smo dobili dober model za celokupne flavonoide, ki so najbolj neposredno povezani z antioksidativnim delovanjem. Zato je pomemben zaključek tudi, da bi za vsebnost celokupnih flavonoidov kot pomembno lastnost rastlinskega izdelka lahko postavili dobro metodo, ki bi temeljila na IR spektroskopiji.

6 LITERATURA

1. Cozzolino D: Infrared Spectroscopy as a Versatile Analytical Tool for the Quantitative Determination of Antioxidants in Agricultural Products, Foods and Plants. *Antioxidants* 2015; 4: 482-97.
2. Materska M: Quercetin and Its Derivatives: Chemical Structure and Bioactivity – A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 2008; 58, 4: 407-13.
3. Oroian M, Escriche I: Antioxidants: Characterization, Natural Sources, Extraction and Analysis. *Food Research International* 2015; 74: 10-36.
4. Kalinova J, Vrchotova N: The Influence of Organic and Conventional Crop Management, Variety and Year on the Yield and Flavonoid Level in Common Buckwheat Groats. *Food Chemistry*, 2011; 127: 602-8.
5. Simmonds M: Importance of Flavonoids in Insect – Plant Interactions: Feeding and Oviposition. *Phytochemistry*, 2001; 56: 245-52.
6. Mierziak J, Kostyn K, Kulma A: Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, 2014; 19: 16240-65.
7. Sellappan S, Akoh C: Flavonoids and Antioxidant Capacity of Georgia – Grown *Vidalia* Onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50, 19: 5338-42.
8. Wieslander G, Norbäck D: Buckwheat Consumption and Its Medical and Pharmacological Effects – A Review of the Literature. The proceeding of the 8th ISB 2001; 608-612.
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.531.3577&rep=rep1&type=pdf> (dostopano 04.12.2016)
9. Quingguo T, Dan L, Bhimanagouda P: Identification and Determination of Flavonoids in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench, Polygonaceae) by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Photodiode Array Ultraviolet Detection. *Phytochemical Analysis* 2002; 13: 251-6.
10. Lan-Sook L, Eun-Ji C, Chang-Hee K, Jung-Min S, Young-Boong K, Dong-Ho S, Hyun-Wook C, Yun-Sang C, Jun-Seok K, Jong-Dae P: Contribution of Flavonoids to the Antioxidant Properties of Common and Tartary Buckwheat. *Journal of Cereal Science* 2016; 68: 181-6.
11. Bystricka J, Musilova J, Tomas J, Vollmannova A, Lachman J, Kavalcova P: Changes of Polyphenolic Substances in the Anatomical Parts of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) during Its Growth Phases. *Foods* 2014; 3: 558-68.
12. Oomah DB, Mazza G: Flavonoids and Antioxidative Activities in Buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1996; 44: 1746-50.
13. Fabjan N, Rode J, Košir IJ, Wang Z, Zhang Z, Kreft I: Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a Source of Dietary Rutin and Quercitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 6452-55.
14. Lu X, Ross C, Powers J, Rasco B: Determination of Quercetins in Onion (*Allium cepa*) Using Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59: 6376-82.
15. Lu X, Rasco B: Determination of Antioxidant Content and Antioxidant Activity in Foods using Infrared Spectroscopy and Chemometrics: A Review. *Food Science and Nutrition* 2012; 52, 10: 853-75.

16. Kokalj M, Krajšek Strgulc S, Omahen Bratuša J, Kreft S: Comparison and Improvement of Commonly Applied Statistical Approaches for Identification of Plant Species from IR Spectra. *Journal of Chemometrics*, 2010; 23, 10: 611-6.
17. Otto M: *Chemometrics*, 2nd Edition, Wiley – VCH Verlag, Weinheim, 2007: 1-2.
18. Roggo Y, Chalou P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N: A Review of Near Infrared Spectroscopy and Chemometrics in Pharmaceutical Technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; 44: 683-700.
19. Wulandari L, Retnaningtyas Y, Lukman N, Lukman H: Analysis of Flavonoid in Medical Plant Extract Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2016; 6: 1-6.
20. Yang N, Ren G: Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy to the Evaluation of Rutin and D-*chiro*-Inositol Contents in Tartary Buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56, 3:761-4.
21. Pedro A, Ferreira M: Nondestructive Determination of Solids and Carotenoids in Tomato Products by Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Analytical Chemistry* 2005; 77, 8: 2505-11.
22. Baranska M, Schütze W, Schulz H: Determination of Lycopene and β -Carotene Content in Tomato Fruits and Related Products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR Spectroscopy. *Analytical Chemistry* 2006; 78, 24: 8456-61.
23. Kupina S, Shrikhande A: Evaluation of a Fourier Transform Infrared Instrument for Rapid Quality – Control Wine Analyses. *American Journal of Enology and Viticulture* 2003; 54, 2: 131-4.
24. Cuadrado MU, Castro MDL, Juan PMP, Gomez-Nieto MA: Comparison and Joint Use of Near Infrared Spectroscopy and Fourier Transform Mid Infrared Spectroscopy for the Determination of Wine Parameters. *Talanta*, 2005; 66: 218-24.
25. Wu D, Chen X, Shi P, Wang S, Feng F, He Y: Determination of α -Linolenic Acid and Linoleic Acid in Edible Oils Using Near-Infrared Spectroscopy Improved by Wavelet Transform and Uninformative Variable Elimination. *Analytica Chimica Acta*, 2009; 634: 166-71.
26. Che Man YB, Ammanwath W, Mirghani MES: Determining α -Tocopherol in Refined Bleached and Deodorized Palm Olein by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Chemistry* 2005; 90: 323-7.
27. Szlyk E, Szydłowska-Czerniak A, Kowalczyk-Marzec A: NIR Spectroscopy and Partial Least-Squares Regression for Determination of Natural α -Tocopherol in Vegetable Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53, 8: 6980-7.
28. Yang H, Irudayaraj J: Rapid Determination of Vitamin C by NIR, MIR and FT- Raman Techniques. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2002; 54, 9: 1247-55.
29. Whitacre E, Oliver J, Van Den Broek R, Van Engelen P, Kremers B, Van Den Horst B, Stewart M, Jansen-Beuvink A: Predictive Analysis of Cocoa Procyanidins Using Near-Infrared Spectroscopy Techniques. *Journal of Food Science*, 2003; 68, 9: 2618-22.
30. Brenna VO, Berardo N: Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to the Evaluation of Carotenoids Content in Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004; 52, 18: 5577-82.

31. Berardo N, Brenna OV, Amato A, Valoti P, Pisacane V, Motto M: Carotenoids Concentration Among Maize Genotypes Measured by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2004; 5, 3: 393-8.
32. Chen X, Wu J, Zhou S, Yang Y, Ni X, Yang J, Zhu Z, Shi C: Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy to Evaluate the Lutein and β -Carotene in Chinese Kale. *Journal of Food Composition and Analysis* 2009; 22, 2: 148-53.
33. Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L: Catechin, Epicatechin, Quercetin, Rutin and Resveratrol in Red Grape: Content, *in Vitro* Antioxidant Activity and Interactions. *Journal of Food Composition and Analysis* 2008; 21: 589-98.
34. Luybaert J, Zhang MH, Massart DL: Feasibility Study for the Use of Near Infrared Spectroscopy in the Qualitative and Quantitative Analysis of Green tea, *Camellia sinensis* (L.). *Analytica Chimica Acta*, 2003; 478, 2: 303-12.
35. Chen Q, Zhao J, Chaitep S, Guo Z: Simultaneous Analysis of Main Catechins Contents in Green Tea (*Camellia sinensis* (L.)) by Fourier Transform Near Infrared reflectance (FT-NIR) Spectroscopy. *Food Chemistry*, 2009; 113, 4: 1272-7.
36. Allison G, Thain S, Morris P, Morris C, Hawkins S, Hauck B, Barraclough T, Yates N, Shield I, Bridgwater A, Donnison I: Quantification of Hydroxycinnamic Acids and Lignin in Perennial Forage and Energy Grasses by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy and Partial Least Squares Regression. *Bioresource Technology* 2009; 100, 3: 1252-61.
37. Vrečar N: Ugotavljanje vsebnosti rutina, kvercetina in kvercitrina v različnih vrstah ajde (*fagopyrum sp.*). Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo. Ljubljana, 2016.
38. Gautam R, Vanga S, Ariese F, Umpathy S: Review of Multidimensional Data Processing Approaches for Raman and Infrared Spectroscopy. *EPJ Techniques and Instrumentation* 2015, 2, 8: 1-38.
39. Kopač N: Razvoj metode za vrednotenje rastlinskih olj z infrardečo spektroskopijo. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2016: 13, 53-56.
40. Jakovac A: Napovedovanje lastnosti papirja iz spektrometričnih podatkov s strojnim učenjem. Diplomsko delo. Fakulteta za računalništvo in informatiko, Ljubljana 2011: 20
41. Bolton S, Bon C: *Pharmaceutical Statistics Practical and Clinical Applications*, Fourth Edition, Marcel Dekker, New York, 2004: 215-6.
42. Paczkowska M, Lewandowska K, Bednarski W, Mizera M, Podborska A, Krause A, Cielecka-Piontek J: Application of Spectroscopic Methods for Identification (FT-IR, Raman Spectroscopy) and Determination (UV, EPR) of Quercetin-3-O-Rutinoside. Experimental and DFT Based Approach. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2015; 140: 132-9.
43. Sathyadevi M, Subramanian S: Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Flavonoids from the Fruits of *Physalis peruviana Linn* Extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 20145; 8, 1. 152-7.
44. Selvaraj K, Chowdhury R, Bhattacharjee C: Isolation and Structural Elucidation of Flavonoids from Aquatic Fern *Azolla Microphylla* and Evaluation of Free Radical Scavenging Activity. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2013; 5, 3: 743-9.

45. Chourasiya A, Upadhayay A, Shukla RN: Isolation of Quercetin – From the Leaves of *Azadirachta Indica* and Anti – Diabetic Study of the Crude Extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2012; 25, 25: 179-81.
46. Kumari A, Yadav S, Pakade Y, Kumar V, Singh B, Chaudhary A, Yadav S: Nanoencapsulation and Characterization of *Albizia Chinesis* Isolated Antioxidant Quercitrin on PLA Nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011; 82: 224-32.
47. Berman H: *Statistics and Probability*. Stat Trek 2017.
http://stattrek.com/statistics/dictionary.aspx?definition=coefficient_of_determination
(dostopano 10.12.2016)
48. Kreft S, Knapp M, Kreft I: Extraction of Rutin from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Seeds and Determination by Capillary Electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999; 47, 11: 4649-52.
49. Zielińska D, Turemko M, Kwiatkowski J, Zieliński H: Evaluation of Flavonoid Contents and Antioxidant Capacity of the Aerial Parts of Common and Tartary Buckwheat Plants. *Molecules* 2012; 17: 9668-82.
50. Rihtarič M: Ugotavljanje vrstne pripadnosti vzorcev vrbovcev in krčnic s transmisijsko infrardečo spektroskopijo. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo. Ljubljana, 2010.
51. Holt AS, Jacobs EE: *Plant Physiology*, 6th Edition, Department of Botany, University of Illinois, Urbana, Illinois, 1955:553-9.

7 PRILOGE

Priloga 1: Razdelitev celih in mletih vzorcev na validacijski in učni set

Preglednica IX: Seznam validacijskih in učnih celih vzorcev, kjer lahko del rastline razberemo iz barvne sheme (zelena – listi, oranžna – cvetovi, modra – luščine)

VRSTA IN SORTA OZIROMA LINIJA	REFERENČNA OZNAKA VZORCA	OZNAKA SPEKTRA	SET
<i>F. esculentum</i> Darja	L2	C L2	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L3	C L3	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L4	C L4	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L5	C L5	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L6	C L6	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L7	C L7	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	L8	C L8	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L9	C L9	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L10	C L10	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L11	C L11	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	L12	C L12	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	L13	C L13	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L14	C L14	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C2	C C2	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	C3	C C3	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C4	C C4	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C5	C C5	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C6	C C6	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C7	C C7	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C8	C C8	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	C9	C C9	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	C10	C C10	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C11	C C11	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C12	C C12	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	C13	C C13	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C14	C C14	UČNI
<i>F. esculentum</i>	CVETОВI	Cvz1	UČNI
<i>F. esculentum</i>	LISTI 3	Cvz2	UČNI
<i>F. esculentum</i>	LUŠČINE	Cvz3	UČNI
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LISTI 1	Cvz4	VALIDACIJSKI
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LISTI 2	Cvz5	UČNI
<i>F. tataricum</i> Nepal 1302	LUŠČINE	Cvz45	VALIDACIJSKI
<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	LISTI 2	Cvz7	VALIDACIJSKI

<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	LISTI 3	Cvz8	UČNI
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LUŠČINE	Cvz9	UČNI
<i>F. tataricum</i> Wild	LISTI 3	Cvz11	VALIDACIJSKI
<i>F. tataricum</i> Wild	LUŠČINE	Cvz12	UČNI
<i>F. rotundatum</i>	LISTI 3	Cvz14	UČNI
<i>F. rotundatum</i>	LUŠČINE	Cvz15	VALIDACIJSKI
<i>F. giganteum</i> 1976	LISTI 1	Cvz17	UČNI
<i>F. giganteum</i> 1976	LISTI 2	Cvz18	UČNI
<i>F. giganteum</i> 1976	LIST 3	Cvz49	VALIDACIJSKI
<i>F. giganteum</i> 1976	CVETОВИ	Cvz48	VALIDACIJSKI
<i>F. giganteum</i> 1976	LUŠČINE	Cvz19	UČNI
<i>F. giganteum</i> 1978	LISTI 1	Cvz21	UČNI
<i>F. giganteum</i> 1978	LISTI 2	Cvz22	UČNI
<i>F. giganteum</i> 1978	LISTI 3	Cvz23	VALIDACIJSKI
<i>F. giganteum</i> 1978	LUŠČINE	Cvz24	UČNI
<i>F. leptopodum</i> 19711	LISTI 3	Cvz27	UČNI
<i>F. leptopodum</i> 1977	LISTI 2	Cvz29	UČNI
<i>F. leptopodum</i> 1977	LISTI 3	Cvz30	UČNI
<i>F. gracilipes</i>	LISTI 1	Cvz47	UČNI
<i>F. gracilipes</i>	LISTI 2	Cvz32	UČNI
<i>F. gracilipes</i>	CVETОВИ	Cvz34	UČNI
<i>F. cymosum</i>	LISTI 1	Cvz37	VALIDACIJSKI
<i>F. cymosum</i>	LISTI 2	Cvz38	UČNI
<i>F. cymosum</i>	LUŠČINE	Cvz40	UČNI
<i>F. cymosum</i> 4n	LISTI 2	Cvz42	VALIDACIJSKI
<i>F. cymosum</i> 4n	LISTI 3	Cvz43	UČNI
<i>F. cymosum</i> 4n	CVETОВИ	Cvz44	UČNI

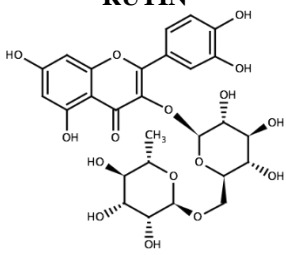
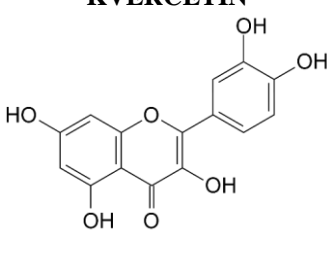
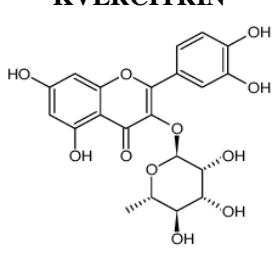
Preglednica X: Seznam validacijskih in učnih mletih vzorcev, kjer lahko del rastline razberemo iz barvne sheme (zelena – listi, oranžna – cvetovi)

VRSTA IN SORTA OZIROMA LINIJA	REFERENČNA OZNAKA VZORCA	OZNAKA SPEKTRA	SET
<i>F. esculentum</i> Darja	L1	M L1	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L2	M L2	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L3	M L3	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L4	M L4	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L5	M L5	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L6	M L6	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L7	M L7	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	L8	M L8	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L9	M L9	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L10	M L10	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L11	M L11	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	L12	M L12	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	L13	M L13	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	L14	M L14	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C2	M C2	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	C3	M C3	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C4	M C4	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C5	M C5	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C6	M C6	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C7	M C7	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C8	M C8	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	C9	M C9	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	C10	M C10	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C11	M C11	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C12	M C12	VALIDACIJSKI
<i>F. esculentum</i> Darja	C13	M C13	UČNI
<i>F. esculentum</i> Darja	C14	M C14	UČNI
<i>F. esculentum</i>	CVETОВI	Mvz1	UČNI
<i>F. esculentum</i>	LISTI 3	Mvz2	UČNI
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LISTI 1	Mvz4	VALIDACIJSKI
<i>F. tataricum</i> Nepal 1301	LISTI 2	Mvz5	UČNI
<i>F. tataricum</i> Nepal 1302	LIST 3	Mvz6	UČNI
<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	LISTI 2	Mvz7	VALIDACIJSKI
<i>F. tataricum</i> Nepal 1303	LISTI 3	Mvz8	UČNI
<i>F. tataricum</i> Wild	LISTI 3	Mvz11	VALIDACIJSKI
<i>F. rotundatum</i>	LISTI 3	Mvz14	UČNI
<i>F. giganteum</i> 1976	LISTI 1	Mvz17	UČNI

<i>F. giganteum</i> 1976	LISTI 2	Mvz18	UČNI
<i>F. giganteum</i> 1976	LIST 3	Mvz49	VALIDACIJSKI
<i>F. giganteum</i> 1976	CVETОВI	Mvz48	VALIDACIJSKI
<i>F. giganteum</i> 1978	LISTI 1	Mvz21	UČNI
<i>F. giganteum</i> 1978	LISTI 2	Mvz22	UČNI
<i>F. giganteum</i> 1978	LISTI 3	Mvz23	VALIDACIJSKI
<i>F. leptopodum</i> 19711	LISTI 3	Mvz27	UČNI
<i>F. leptopodum</i> 1977	LISTI 2	Mvz29	UČNI
<i>F. leptopodum</i> 1977	LISTI 3	Mvz30	UČNI
<i>F. gracilipes</i>	LISTI 1	Mvz47	UČNI
<i>F. gracilipes</i>	LISTI 2	Mvz32	UČNI
<i>F. gracilipes</i>	LIST 3	Mvz33	VALIDACIJSKI
<i>F. gracilipes</i>	CVETОВI	Mvz34	UČNI
<i>F. cymosum</i>	LISTI 1	Mvz37	VALIDACIJSKI
<i>F. cymosum</i>	LISTI 2	Mvz38	UČNI
<i>F. cymosum</i>	LISTI 3	Mvz39	UČNI
<i>F. cymosum</i> 4n	LISTI 2	Mvz42	VALIDACIJSKI
<i>F. cymosum</i> 4n	LISTI 3	Mvz43	UČNI
<i>F. cymosum</i> 4n	CVETОВI	Mvz44	UČNI

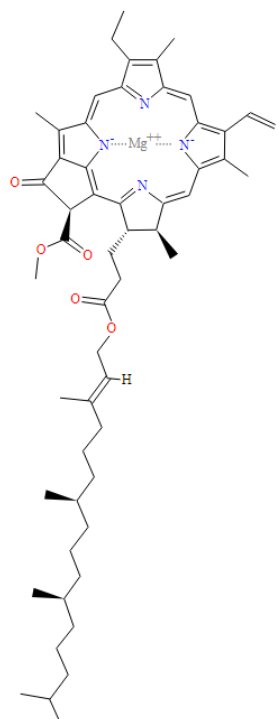
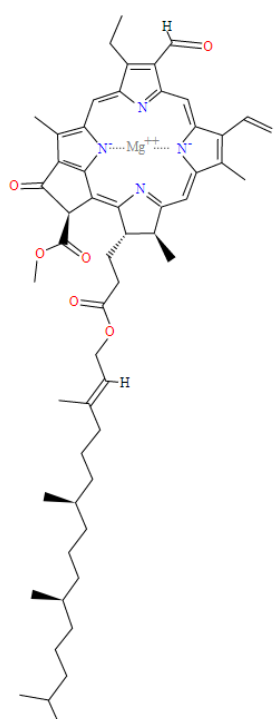
Priloga 2: IR spektri proučevanih spojin

Preglednica XI: Značilni vrhovi IR spektrov proučevanih spojin v cm^{-1} (42-46)

<p style="text-align: center;">RUTIN</p> 	<p style="text-align: center;">KVERCETIN</p> 	<p style="text-align: center;">KVERCITRIN</p> 
<p>630, 654, 729, 879, 808, 912, 944, 972, 1011, 1043, 1062, 1094, 1133, 1149, 1166, 1205, 1348, 1362, 1383, 1295, 1462, 1494, 1504, 1553, 1556, 1573, 1599, 1655, 1669, 2714, 2843, 2924, 2931, 3321, 3408, 3483</p>	<p>602.3, 677, 821.4, 940.6, 1167, 1203, 1265, 1318.9, 1362, 1383.1, 1457, 1489, 1608.8, 1663.8, 1673, 2872, 2986, 3350, 3369, 3428</p>	<p>866.2, 1383.6, 1456, 1618.5</p>

Priloga 3: IR spekter klorofila

Preglednica XII: Značilni vrhovi IR spektra klorofila a in klorofila b v cm^{-1} (51)

<p style="text-align: center;">KLOROFIL a</p> 	<p style="text-align: center;">KLOROFIL b</p> 
<p>3350; 2920; 1730; 1690; 1610</p>	<p>3550; 2920; 2710; 1730; 1690; 1650; 1610</p>