

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA ČERNILOGAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA ČERNOLOGAR

**RAZVOJ METODE ZA UGOTAVLJANJE ANIZIDINSKEGA,
KISLINSKEGA IN PEROKSIDNEGA ŠTEVILA Z
INFRARDEČO SPEKTROSKOPIJO**

**METHOD DEVELOPMENT FOR DETERMINATION OF
ANISIDINE, ACID AND PEROXIDE VALUE WITH
INFRARED SPECTROSCOPY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

LJUBLJANA, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočevar Glavač, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Mete Kokalj Ladan, mag. farm., univ. dipl. fiz. Priprava vzorcev rastlinskih olj in masel je potekala na Katedri za farmacevtsko biologijo, snemanja IR spektrov pa v laboratoriju Katedre za farmacevtsko kemijo.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. Nini Kočevar Glavač, mag. farm., za pomoč pri urejanju magistrske naloge in strokovno usmerjanje, somentorici, asist. dr. Meti Kokalj Ladan, mag. farm., univ. dipl. fiz., za vložen trud in potrpežljivost kljub časovni stiski ter prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm., za vse odgovore na moja vprašanja. Vsem trem se zahvaljujem za odzivnost in prijaznost.

Hvala tudi družini za spodbudo ter vsem prijateljem, ki so mi popestrili študijska leta.

Tomaž, brez tebe verjetno ne bi postala to, kar sem. Hvala ti za vse.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočevar Glavač, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Mete Kokalj Ladan, mag. farm., univ. dipl. fiz.

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Matej Sova, mag. farm.

Ljubljana, 2018

VSEBINA

KAZALO SLIK.....	II
KAZALO PREGLEDNIC.....	III
KAZALO DIAGRAMOV.....	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
KLJUČNE BESEDE	VII
KEY WORDS	VII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1 UVOD	1
1.1 Infrardeča spektroskopija.....	1
1.2 Kemijska sestava rastlinskih olj in masel	2
1.3 Farmakopejska števila.....	4
1.4 Izbor delov IR spektra za ugotavljanje farmakopejskih števil.....	5
1.5 Obdelava IR spektrov	5
1.6 Izdelava napovednih modelov	6
1.7 Vrednotenje napovednih modelov	7
1.8 Pregled uporabe IR spektroskopije v analizi rastlinskih olj in masel	8
2 NAMEN	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Vzorci.....	14
3.1.2 Razmere shranjevanja	14
3.2 Reagenti	15
3.3 Uporaba IR spektroskopije	16
3.3.1 Snemanje spektrov s tehniko oslavljenega popolnega odboja IR spektroskopije.....	16
3.3.2 Meritve vzorcev rastlinskih olj in masel	17
3.4 Obdelava spektrov	18
3.4.1 Izbor delov IR spektra na podlagi funkcionalnih skupin.....	20
3.5 Izdelava napovednih modelov	21
3.6 Vrednotenje modelov	22
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	25
4.1 Najboljši modeli za napovedovanje farmakopejskih števil	25

4.1.1	<i>Kislinsko število</i>	26
4.1.2	<i>Anizidinsko število</i>	27
4.1.3	<i>Peroksidno število</i>	29
4.2	Vrednotenje parametrov	32
4.2.1	<i>Ločljivost</i>	32
4.2.2	<i>Obdelave spektrov</i>	33
4.2.3	<i>Primerjava načinov izbora valovnih števil</i>	36
4.2.4	<i>Izbor delov spektra na podlagi funkcionalnih skupin</i>	37
4.2.5	<i>Izbor delov spektra na podlagi korelacije</i>	38
5	SKLEP	39
6	LITERATURA	41
7	PRILOGE	45
	Priloga 1	45
	Priloga 2	46
	Priloga 3	47
	Priloga 4	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz poti IR žarka pri tehniki oslabljenega popolnega odboja (n_1 : optično gostejša snov (diamantni kristal), n_2 : optično redkejša snov (vzorec), Θ : kot vpadne svetlobe). Prirejeno po: (46).	16
Slika 2: Prikaz uporabljenih setov meritev in načinov vrednotenja modelov	22
Slika 3: Pregled poteka izdelave modelov za ugotavljanje anizidinskega, kislinskega in peroksidnega števila.	24
Slika 4: Najboljši model za napovedovanje kislinskih števil. Uporabljeni parametri: ločljivost 16 cm^{-1} , obdelava SNV, izbor valovnih števil s korelacijo na podlagi Pearsonovega koeficienta.	26
Slika 5: Najboljši model za napovedovanje anizidinskih števil. Uporabljeni parametri: ločljivosti 4 cm^{-1} , obdelava drugi odvod SNV, izbor valovnih števil s korelacijo na podlagi Pearsonovega koeficienta.	27
Slika 6: Najboljši model za napovedovanje vrednosti peroksidnih števil. Uporabljeni parametri: ločljivosti 4 cm^{-1} , obdelava z normalizacijo, izbor valovnih števil s korelacijo na podlagi Pearsonovega koeficienta.	30

Slika 7: Primerjava števila uporabnih modelov med ločljivostma 4 cm ⁻¹ in 16 cm ⁻¹	32
Slika 8: Število modelov glede na vrednosti R^2 , ki smo jih dobili pri posamezni obdelavi spektrov pri obeh ločljivostih skupaj.....	33
Slika 9: Število modelov glede na vrednosti R^2 , ki smo jih dobili pri posamezni obdelavi spektrov pri ločljivosti 4 cm ⁻¹	34
Slika 10: Število modelov glede na vrednosti R^2 , ki smo jih dobili pri posamezni obdelavi spektrov pri ločljivosti 16 cm ⁻¹	35
Slika 11: Prikaz števila modelov, ki smo jih dobili z uporabo izbora delov spektra s korelacijo in glede na funkcionalne skupine.	36
Slika 12: Število modelov, ki smo jih dobili z izborom delov spektra na podlagi funkcionalnih skupin pri obeh ločljivostih.	37
Slika 13: Številčna razporeditev vzorcev učnega seta in validacijskega seta 1 po časovnih točkah.	47

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prednosti uporabe IR spektroskopije.....	1
Preglednica II: Vsebnost posameznih maščobnih kislin v proučevanih vrstah rastlinskih olj in masel. Povzeto po (5).	2
Preglednica III: Vrednosti R^2 , $RMSEC$ in $RMSEC$ modelov za napovedovanje farmakopejskih števil.....	10
Preglednica IV: Analizirana rastlinska olja in masla; - podatki niso znani.....	14
Preglednica V: Časovni potek meritev.	15
Preglednica VI: Nastavitve parametrov pri izvajanju meritev vzorcev in ozadja z ATR-IR spektroskopijo.....	18
Preglednica VII: Uporabljene matematične funkcije za obdelavo spektrov v programu GUI Octave 4.2.1.	19
Preglednica VIII: Število modelov, ki so ustrezali postavljenim kriterijem glede na vrednosti R^2	25
Preglednica IX: Vrednosti $RMSE$ referenčnih metod za določanje peroksidnega, anizidinskega in kislinskega števila ($RMSE_{ref}$) v učnem setu in v validacijskih setih 1 in 2	25
Preglednica X: Pregled izbranih funkcionalnih skupin z valovnimi števili.	45

Preglednica XI: Izbrana območja valovnih števil, ki smo jih uporabili za izdelavo modelov.	46
Preglednica XII: Izračunani R^2 in $RMSE$ za posamezen model pri izbrani ločljivosti na učnem setu (UČNI 4/UČNI 16) in validacijskem setu 1 (VAL 4/VAL 16) pri izboru delov spektra s korelacijo ali glede na funkcionalne skupine za posamezno farmakopejsko število.	48

KAZALO DIAGRAMOV

<i>Diagram 1: Prikaz razmer shranjevanja preiskovanih vzorcev.</i>	15
--	----

POVZETEK

Infrardeča (IR) spektroskopija predstavlja pomembno orodje za analizo rastlinskih olj in masel, ki so zaradi svoje sestave podvržena oksidativnim procesom. Pri tem raziskovalnem delu smo IR spektroskopijo uporabljali v kombinaciji s kemometrijo z namenom izdelave modelov za ugotavljanje kislinskega, anizidinskega in peroksidnega števila v vzorcih rastlinskih olj in masel.

Pri delu smo uporabili pet rastlinskih olj in eno rastlinsko maslo različnih proizvajalcev, ki smo jih shranjevali pri različnih razmerah (temperatura, material vsebnika, prisotnost ali odsotnost argona). Meritve IR spektrov s tehniko oslabljenega popolnega odboja smo v obdobju devetih mesecev izvajali v trimesečnih intervalih, v katerih je potekalo tudi laboratorijsko določanje farmakopejskih števil. Pri snemanju spektrov vzorcev smo uporabljali ločljivost 4 cm^{-1} in 16 cm^{-1} . Spektre smo obdelali z uporabo devetih funkcij: osnovni spekter, prvi in drugi odvod, normalizacija, prvi in drugi odvod normalizacije, normalizacija s standardnim odklonom (SNV) ter njen prvi in drugi odvod. Na ta način smo dobili set neodvisnih spremenljivk za izdelavo napovednih modelov, pri čemer so odvisne spremenljivke predstavljale vrednosti farmakopejskih števil. Vzorce smo razdelili na učni set, na katerem smo izdelali model, ter na validacijski set, s katerim smo preverili ustreznost modela. Raziskali smo tudi, kakšen je vpliv izbora delov spektra na uporabnost modelov. Dele spektra smo izbrali z uporabo valovnih števil za posamezne funkcionalne skupine ter glede na največje absolutne vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije valovnih števil.

Najboljše rezultate smo dobili za ugotavljanje kislinskega števila, pri tem smo uporabili ločljivost 16 cm^{-1} , obdelavo SNV ter izbor delov spektra s korelacijo. Za ugotavljanje anizidinskega števila nismo dobili ustreznih rezultatov zaradi napake v izvedbi eksperimentalnega določanja anizidinskega števila. Tudi za ugotavljanje peroksidnega števila nismo dobili zadovoljivih modelov. Število modelov pri različnih uporabljenih obdelavah je bilo primerljivo, nekoliko več uporabnih modelov smo dobili pri večji ločljivosti (4 cm^{-1}). Največjo razliko smo opazili pri načinu izbora delov spektra, saj smo pri izboru s korelacijo dobili 88 uporabnih modelov, pri izboru na podlagi funkcionalnih skupin pa le 53 uporabnih modelov. Rezultati kažejo, da z našo metodo ne moremo dovolj natančno ugotavljati farmakopejskih števil, zato bi bile potrebne nadaljnje raziskave in izboljšave.

ABSTRACT

Infrared (IR) spectroscopy is an important tool in the analysis of vegetable oils and butters, which are prone to oxidation due to their composition. In our research, IR spectroscopy in combination with chemometrics was used with the goal to build models for the assessment of acid, anisidine and peroxide value in samples of vegetable oils and butters.

Samples of five vegetable oils and one vegetable butter from different producers were used, and stored in different conditions (temperature, container material, with or without argon). IR spectra were recorded with attenuated total reflectance method during nine months of storage in three-month intervals. The laboratory determination of pharmacopoeial values was performed at approximately the same time. Resolutions of 4 cm^{-1} and 16 cm^{-1} were used in our measurements. The spectra were processed using nine functions: basic spectra, first and second derivative, normalization, first and second derivative of normalization, standard normal variate (SNV) normalization, and its first and second derivative. In this way, a set of independent variables was obtained to build a model, in which the pharmacopoeial values represented the dependent variables. The model was built on the calibration set of samples and then tested on the validation set of samples to assess its adequacy. The influence of the choice of spectra parts on the usefulness of our models was also investigated. Parts of spectra were chosen based on wave numbers of individual functional groups and on the highest absolute value of Pearson correlation coefficient.

The best results were obtained for the assessment of the acid value using resolution of 16 cm^{-1} , SNV normalization and the choice of the spectra parts by correlation. We did not succeed at the assessment of anisidine value because of the experimental error that occurred during laboratory assessment of anisidine values. Our results for the assessment of peroxide value were also inadequate. The number of applicable models between the different functions that we used was similar, however, we got more models with the use of higher resolution (4 cm^{-1}). The biggest difference was seen in different ways of the choice of spectra parts, where we got 88 useful models by choosing the parts of spectra according to correlation and only 53 useful models by choosing spectra parts by functional group signals. In conclusion, our research did not result in satisfactory models, therefore, further research on the subject would be needed.

KLJUČNE BESEDE

Infrardeča spektroskopija, regresija delnih najmanjših kvadratov (PLS), farmakopejska števila, rastlinska olja in masla.

KEY WORDS

Infrared spectroscopy, Partial least squares (PLS), pharmacopoeial chemical values, vegetable oils and butters.

SEZNAM OKRAJŠAV

<i>Okrajšava</i>	<i>Razlaga okrajšave</i>
ATR	Tehnika oslavljenega popolnega odboja
CSV	Format spektra, ki številčne vrednosti ločuje z vejico.
DTGS	Devteriran triglicin sulfat (material IR detektorja)
FTIR	Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
IR	Infrardeča (spektroskopija)
NIR	Bližnje območje infrardečega spektra
NMR	Jedrska magnetna resonanca
N	Število vzorcev olj in masel
Nor	Spekter, obdelan z normalizacijo.
Nor2odv	Spekter, obdelan z drugim odvodom normalizacije.
Odv	Spekter, obdelan s prvim odvodom.
Odv2	Spekter, obdelan z drugim odvodom.
OSC	Ortogonalna korekcija signala
Osn	Osnovni spekter, brez obdelav
PLS	Metoda najmanjših delnih kvadratov
R²	Determinacijski koeficient
RMSE	Koren srednje kvadratne napake
RMSEC (RMSE_{učni})	RMSE kalibracijskega/učnega seta vzorcev
RMSECV	RMSE navzkrižne validacije
RMSEP (RMSE_{val})	RMSE napovednega/validacijskega seta vzorcev
RMSE_{ref}	RMSE referenčne metode
SD	Standardni odklon

SNV	Normalizacija s standardnim odklonom
Snv	Spekter, obdelan z normalizacijo s standardnim odklonom.
SnvOdv	Spekter, obdelan s prvim odvodom normalizacije s standardnim odklonom.
Snv2Odv	Spekter, obdelan z drugim odvodom normalizacije s standardnim odklonom.
SPA	Format programa OMNIC
T(0-3)	Časovna točka merjenja vzorcev pri povišani temperaturi
UV	Ultravijolično sevanje
VAL1	Validacijski set vzorcev 1
VAL2	Validacijski set vzorcev 2

1 UVOD

1.1 Infrardeča spektroskopija

IR (infrardeča) spektroskopija je analizna metoda, ki ima zaradi različnih možnosti izvedbe meritev na vzorcih anorganskega kot tudi organskega materiala pomembno vlogo v farmaciji, kemiji, kozmetični in prehranski industriji ter na številnih drugih področjih. Z uporabo IR spektroskopije lahko na podlagi prisotnosti določenih absorpcijskih pasov sklepamo na prisotnost posameznih funkcionalnih skupin. Prav ta značilnost IR spektroskopije je specifična in zato zelo uporabna, saj je pridobivanje informacije o kemijski strukturi preiskovane spojine z uporabo drugih analiznih metod pogosto bolj zahtevno ali celo nemogoče. Posamezne spojine imajo običajno značilne IR spektre, ki nam omogočajo njihovo identifikacijo. To s pridom izkoriščajo tudi farmakopejski predpisi za ugotavljanje istovetnosti snovi s pomočjo primerjave z IR spektri ustreznih standardov. V območju IR spektrov med 1500 in 650 cm^{-1} je t. i. regija »prstnega odtisa« (*fingerprint region*), ki z visoko specifičnostjo omogoča ugotavljanje prisotnosti posameznih spojin. Nekatere prednosti uporabe IR spektroskopije pred drugimi analiznimi metodami, kot so kromatografija, masna spektrometrija in NMR, so navedene v preglednici I (1–4).

Preglednica I: Prednosti uporabe IR spektroskopije.

Opazovana lastnost	Prednost IR spektroskopije
<i>Destruktivnost</i>	Ni destruktivna
<i>Priprava vzorca</i>	Predpriprava ni potrebna ali pa je manj zahtevna (izdelava KBr tablet)
<i>Reagenti</i>	Cenovno ugodni, ne toksični
<i>Trajanje analize</i>	Rezultati so na voljo v nekaj minutah
<i>Cena</i>	Cenovno ugodno
<i>Uporabnost</i>	Kvalitativna in kvantitativna analiza

1.2 Kemijska sestava rastlinskih olj in masel

Maščobne kisline

Rastlinska olja in masla so navadno v 98 do 99 % sestavljena iz trigliceridov. Trigliceridi so estri glicerola in maščobnih kislin. Za olja je značilno, da vsebujejo večji delež nenasičenih maščobnih kislin, zaradi česar so pri sobni temperaturi običajno v tekočem stanju. V rastlinskih maslih je prisotnih več nasičenih maščobnih kislin, zato so pri sobni temperaturi običajno v poltrdnem ali trdnem stanju (5). V preglednici II so navedene maščobne kisline v trigliceridih in njihovi okvirni deleži v rastlinskih oljih in maslih, ki smo jih proučevali v naši raziskavi.

Preglednica II: Vsebnost posameznih maščobnih kislin v proučevanih vrstah rastlinskih olj in masel. Povzeto po (5).

<i>Olje/maslo</i>	<i>Makovo olje</i>	<i>Laneno olje</i>	<i>Olje granatnega jabolka</i>	<i>Borečevo olje</i>	<i>Olivno olje</i>	<i>Karitejevo maslo</i>
<i>Maščobna kislina*</i>						
<i>Palmitinska (C₁₆:0)</i>	10 %	7 %	3 %	10 %	12 %	4 %
<i>Stearinska (C₁₈:0)</i>	2 %	5 %	3 %	4 %	2 %	38 %
<i>Oleinska (C₁₈:1, ω-9)</i>	12 %	15 %	7%	15 %	73 %	49 %
<i>Linolna (C₁₈:2, ω-6)</i>	75 %	14 %	3%	41 %	9 %	5 %
<i>α-Linolenska (C₁₈:3, ω-3)</i>	/	58 %	/	/	/	/
<i>γ-Linolenska (C₁₈:3, ω-6)</i>	/	/	/	23 %	/	/
<i>Erucinska (C₂₂:1, ω-9)</i>	/	/	/	3 %	/	/
<i>Punicinska (C₁₈:3, ω-5)</i>	/	/	80 %	/	/	/
<i>Gondojska (C₂₀:1, ω-9)</i>	/	/	1 %	/	/	/
<i>Vakcenska (C₁₈:1, ω-7)</i>	1 %	1 %	/	/	/	/
<i>Palmitoleinska (C₁₆:1, ω-7)</i>	/	/	/	/	1 %	/

* Oznake: C_(n) – n predstavlja število C atomov v verigi maščobne kisline. Števila 0, 1, 3 označujejo število dvojnih vezi v verigi maščobne kisline.

Lipidna oksidacija

Oksidacija lipidov (predvsem maščobnih kislin) v rastlinskih oljih pomembno vpliva na kakovost in sprejemljivost olj z vidika uporabnika. Pri oksidaciji maščobnih kislin nastajajo spojine, ki imajo lahko pri uživanju neugoden vpliv na zdravje, vplivajo pa tudi na organoleptične lastnosti olj. Na potek lipidne oksidacije vplivajo predvsem izpostavljenost svetlobi, povišani temperaturi in kisiku. Odvisna je tudi od posameznih komponent olja, ki lahko proces pospešijo (katalizatorji) ali pa ga upočasnijo (antioksidanti) (6, 7). Lipidna oksidacija najpogosteje poteka spontano kot avtooksidacija.

Avtooksidacija lipidov poteka v obliki verižne reakcije, ki se prične z odstranitvijo vodikovega atoma, pri čemer nastane lipidni radikal. Za to je potrebna zadostna energija, še posebej z lahkoto pa se odstrani vodikov atom, pripet na ogljik med dvema dvojnima vezema. Pri tem s premikom ogljikovega radikala pogosto nastanejo konjugirani dieni in trieni, ki zavzamejo *trans* obliko z nižjo energijo. Nastali lipidni radikal zelo hitro reagira s tripletnim kisikom ($^3\text{O}_2$) do peroksilnega radikala. Ta odzame vodikov atom drugi lipidni molekuli, pri čemer nastane lipidni hidroperoksid ter novi lipidni radikal, oksidacija pa se tako nadaljuje. Primarni produkti (avto)oksidacije so hidroperoksidi, sekundarni produkti pa ketoni, aldehidi, alkoholi, laktoni in drugi. Dovzetnost olj za avtooksidacijo je odvisna predvsem od maščobnokislinske sestave. Znano je, da avtooksidacija poteka hitreje pri večji vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin (6).

Hitrost oksidacije lipidov se poveča pri povišani temperaturi, poleg tega pa ta posledično vpliva tudi na povečano topnost kisika v rastlinskem olju, kar prav tako pomembno pospeši oksidacijo. Pri višji temperaturi je gibanje molekul v olju pospešeno, kar omogoča učinkovitejše prehajanje kisika v globlje plasti olja (6). Oksidacijo lipidov pospeši tudi UV-svetloba, saj vzbuja tripletni kisik, da nastane singletni kisik, ki nato vstopa v reakcije z dvojnimi vezmi nenasičenih maščobnih kislin, produkt pa je alilni hidroperoksid. Svetloba krajših valovnih dolžin v večji meri spodbuja oksidacijo kot svetloba daljših valovnih dolžin. Rastlinska olja svetlobo krajših valovnih števil v večini absorbirajo, svetlobo daljših valovnih dolžin pa prepuščajo. Absorpcija svetlobe je ključna za sprožitev procesov fotooksidacije (8). Uporaba prozorne plastične ovojnine povzroči hitrejšo oksidacijo (9).

Nerafinirana rastlinska olja navadno vsebujejo sledove kovin, kot sta baker in železo. Prisotnost kovinskih ionov z vidika stabilnosti ni najbolj ugodna, saj delujejo kot katalizatorji v procesih lipidne avtooksidacije. Vpleteni so v nastanek lipidnih radikalov, singletnega kisika in hidroksilnih radikalov, povečajo pa tudi razpad hidroperoksidov (ROOH) v alkoksi ($\text{RO}^\bullet$) ali lipidne peroksi ($\text{ROO}^\bullet$) radikale (6, 10).

Prisotnost antioksidantov upočasnjuje oksidacijo lipidov preko različnih mehanizmov delovanja (6). Učinkovitost posameznih antioksidantov je pogosto manjša od učinkovitosti kombinacije antioksidantov, kot na primer kombinacija kelatorja kovin in lovilca radikalov (9).

1.3 Farmakopejska števila

Peroksidno število

S peroksidnim številom kvantificiramo lipidne hidroperoksidge (11). Osnova določanja je jodometrična reakcija, v kateri v prvem koraku hidroperoksidna skupina reagira z jodidnim ionom do elementarnega joda, ki ga nato določimo s titracijo s standardno raztopino natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Peroksidno število izražamo v miliekvivalentih kisika na 1000 g vzorca (12). Večja vrednost peroksidnega števila običajno nakazuje na procese primarne oksidacije, vendar se vrednost peroksidnega števila zmanjša ob pojavu sekundarnih produktov oksidacij (13). O kakovosti rastlinskega olja tako ne moremo sklepati le na podlagi peroksidnega števila, zato je analizo smiselno kombinirati z metodami, ki omogočajo tudi dokazovanje prisotnosti sekundarnih produktov (na primer anizidinsko število).

Anizidinsko število

Anizidinsko število daje informacijo o sekundarnih produktih lipidne oksidacije, ki nastanejo pri razgradnji hidroperoksidov (11). V fazi sekundarne oksidacije hidroperoksidge razpadajo na karbonilne in druge spojine, značilen je predvsem nastanek aldehydov (2-alkenali in 2,4-alkadienali). V metodi aldehydi v preiskovanem vzorcu rastlinskega olja reagirajo s *p*-anizidinom v kislem mediju (7).

Kislinsko število

S kislinskim številom ugotavljamo vsebnost prostih maščobnih kislin oziroma karboksilnih skupin, ki nastajajo v procesih razpada molekul trigliceridov (11). Definirano je kot masa kalijevega hidroksida v miligramih, ki je potrebna za nevtralizacijo prostih kislin v 1 gramu vzorca (12). Večje vrednosti kislinskega števila nakazujejo na hidrolizo trigliceridov, do katere prihaja primarno kot posledica delovanja encima lipaze. Aktivnost lipaze je lahko posledica shranjevanja olja pri povišani temperaturi ali vlažnosti ter neustrezne pridelave olja. Izvor encima je lahko rastlinsko tkivo ali pa kontaminacija z mikroorganizmi (6).

1.4 Izbor delov IR spektra za ugotavljanje farmakopejskih števil

Peroksidno število

Pri ugotavljanju peroksidnega števila so opazili povečanje intenzitete signala v območjih okoli 968 in 986 cm^{-1} , kar so pripisali nastanku *trans* dvojnih vezi. Obenem je prišlo do zmanjšanja intenzitete signala pri 710 cm^{-1} zaradi manjšega števila *cis* dvojnih vezi ter zmanjšanja intenzitete signala pri 3006 cm^{-1} . Slednji je značilen za raztezanje C-H skupine *cis* dvojnih vezi in tudi nakazuje na njihovo zmanjšano število. Kot posledica nastajanja peroksidov se je povečala intenziteta signala tudi okoli 3500 cm^{-1} (14). Spremembe okoli 3470 cm^{-1} so pripisali povečanju koncentracije hidroperoksidov v začetni fazi oksidacije, po njihovem razpadu do sekundarnih produktov pa zmanjšanju koncentracije hidroperoksidov (15).

Anizidinsko število

Ob pojavu sekundarnih produktov oksidacije je prišlo do nastanka novih signalov v območju okoli 3530 cm^{-1} (15). Za napovedovanje anizidinskega števila so izbrali območje med 2800 in 2600 cm^{-1} ter od 1750 do 1600 cm^{-1} , saj v teh območjih absorbirajo aldehydne skupine, ki jih ugotavljamo z anizidinskim številom (16).

Kislinsko število

S kislinskim številom je povezan vrh absorbanca v IR spektru pri 3535 cm^{-1} , značilen za O-H vez karboksilne skupine (-COOH). V območju 3340–3390 cm^{-1} so v kombinaciji z vrhom 3535 cm^{-1} in minimumom pri 3508 cm^{-1} ugotovili dobro ujemanje vrednosti kislinskih števil, pridobljenih z metodo titracije, s kislinskimi števili, pridobljenimi z metodo FTIR (IR spektroskopija s Fourierjevo transformacijo) v kombinaciji z multivariabilno linearno regresijo ($R^2 = 0,9929$) (17).

1.5 Obdelava IR spektrov

Pred uporabo metod za izdelavo napovednih modelov je običajno potrebna obdelava spektrov z uporabo različnih funkcij. Namen obdelav spektrov je odstranjevanje šuma in ojačenje za analizo pomembnih signalov spektra oziroma poudarjanje razlik med posameznimi spektri. Z obdelavami tako zmanjšamo verjetnost za pojav sistematičnih napak pri postavitvi modelov (18). Neustrezna izbira metod za obdelavo spektrov lahko zmanjša natančnost modela, zato je pri izboru potreben temeljit premislek (19).

Povprečenje spektrov

Povprečenje spektrov izboljša razmerje med signalom in šumom (*signal-to-noise ratio*) (20). Razmerje se povečuje s kvadratnim korenom števila ponovitev snemanj. Spekter vzorca je povprečje vseh spektrov ponovitev snemanj. Z večjim številom ponovitev snemanj povečamo občutljivost metode (21).

Odvod

Z uporabo odvodov lahko zmanjšamo prekrivanje vrhov ter odstranimo odmike bazne linije med posameznimi meritvami (22). Najpogosteje uporabljamo prvi in drugi odvod. Drugi odvod omogoča ločevanje prekrivajočih se vrhov spektra (20). Slabost uporabe odvodov je možnost povečanja šuma (22).

Normalizacija

S pomočjo normalizacije odpravljamo razlike v premikih spektrov istega vzorca, posnetih ob različnih časih, ki nastanejo kot posledica nihanj izvora IR sevanja, debeline nanosa vzorca in drugih vzrokov (23).

Normalizacija s standardnim odklonom (SNV)

Z normalizacijo SNV izenačimo razlike v spektrih istih vzorcev, ki so nastale zaradi sprememb bazne linije in sipanja svetlobe. Te so običajno posledica fizikalnih razlik med vzorci, kar lahko vodi do netočnih rezultatov. Zato je pomembno, da z obdelavo zmanjšamo fizikalne vplive in tako dobimo boljše informacije o kemijski zgradbi (22).

1.6 Izdelava napovednih modelov

Kemometrija je uporaba matematičnih in statističnih metod z namenom boljšega razumevanja podatkov o kemijski sestavi vzorcev in povezovanja izbranih parametrov ali fizikalnih lastnosti s pridobljenimi instrumentalnimi podatki (3). Za kemometrijo je značilna obravnava več spremenljivk hkrati (multivariabilna analiza). Na ta način matematično opišemo stopnjo povezave med spremenljivkami oziroma postavimo model regresije, z uporabo slednjega pa iz vrednosti neodvisnih spremenljivk (izmerjene vrednosti) izračunamo vrednosti odvisnih spremenljivk. Pomembno je, da uporabimo optimalno število spremenljivk modela. Pri velikem številu spremenljivk lahko pride do prevelike odvisnosti modela od uporabljenega seta podatkov, posledično pa ima takšen model slabo napovedno vrednost (*overfitting*).

Ta je zmanjšana tudi v primeru premajhnega števila spremenljivk, saj model ne zajame ustrezne variabilnosti podatkov, ki je potrebna za ustrezno napoved rezultatov (*underfitting*). V splošnem velja, da se večje število vključenih vzorcev odraža v boljši napovedni vrednosti (4).

Med najpogosteje uporabljane multivariabilne analize uvrščamo metodo regresije najmanjših delnih kvadratov (PLS). PLS pogosto uporabljamo v kombinaciji z analiznimi metodami, ki generirajo veliko število podatkov (24). V našem primeru smo PLS uporabili v kombinaciji z IR spektroskopijo, saj so IR spektri kompleksni in vsebujejo veliko število spremenljivk (odstotki transmitance pri različnih valovnih številih). S pomočjo PLS lahko uporabimo neodvisne spremenljivke (odstotki transmitance pri različnih valovnih številih) za napovedovanje odvisnih spremenljivk (farmakopejska števila). PLS omogoča dobro napovedovanje tudi v primerih, ko je število odvisnih spremenljivk veliko večje od števila neodvisnih spremenljivk (25). Poleg tega za razliko od multiple regresije, ki spremenljivke obravnava ločeno, PLS spremenljivke obravnava v »blokih« oziroma skupinah, kar omogoča boljšo napovedno vrednost (25).

1.7 Vrednotenje napovednih modelov

Koeficient determinacije

Koeficient determinacije (R^2) opiše, v kolikšnem deležu z neodvisno spremenljivko opišemo odvisno spremenljivko. Večja vrednost R^2 pomeni, da je v model vključena večja variabilnost podatkov, kar nakazuje na boljši prikaz dejanskega stanja v primerjavi z manjšimi vrednostmi R^2 (26).

Koren srednje kvadratne napake

Koren srednje kvadratne napake ($RMSE$) je merilo za opazovanje razlik med pravimi vrednostmi in vrednostmi, napovedanimi z uporabo modela (27). Enot $RMSE$ so enake enotam odvisne spremenljivke, ki jo želimo ugotavljati z modelom. $RMSE$ običajno obravnavamo skupaj z R^2 , pri čemer sta za dobre modele značilni majhna vrednost $RMSE$ in velika vrednost R^2 . $RMSE$ je zaradi korena vrednosti srednje kvadratne napake v primerjavi z R^2 zelo občutljiv na pojav posameznih večjih odklonov od pravih vrednosti. Če je takšnih odklonov več, je vrednost $RMSE$ običajno povečana (28).

Kljub uporabni vrednosti $RMSE$ in R^2 je lahko uporaba teh parametrov brez grafične analize zavajajoča. Problem je že leta 1973 opisal statistik Anscombe, ki je poudaril pomen grafične predstavitve rezultatov. V svojem primeru je pokazal, da so lahko različni seti vzorcev z enakimi vrednostmi statističnih parametrov, kot so povprečje, koeficient korelacije, R^2 idr., v grafičnem prikazu odvisnih in neodvisnih spremenljivk zelo različni. Izpostavil je tudi, da napovedane vrednosti odvisnih spremenljivk, ki močno odstopajo od ostalih vrednosti, pomembno zmanjšajo R^2 in povečajo standardno napako. Kljub temu je pomembno, da takšnih vrednosti ne izločimo brez premisleka, temveč obrazložimo njihov prispevek h korelaciji (29).

1.8 Pregled uporabe IR spektroskopije v analizi rastlinskih olj in masel

Ugotavljanje stopnje oksidacije lipidov v rastlinskih oljih

IR spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR) se je izkazala kot primerna metoda za ugotavljanje stopnje oksidacije rastlinskih olj. Uporabili so jo za proučevanje oksidacije olj v različnih razmerah (temperatura 70 do 75 °C ter 100, 130 in 230 °C), pri čemer so opazili značilno večje spremembe v absorpcijskih pasovih posnetih spektrov. Za boljše razločevanje kemijskih sprememb v oljih barvilnega rumenika in bombaža so uporabili razmerje spektrov oksidiranega vzorca olja in referenčnega vzorca olja. Referenčne vzorce so pripravili tako, da so referenčnemu olju dodali po eno vnaprej pripravljeno spojino, ki je predstavljala oksidativni produkt (alkohol, aldehyd, keton, hidroperoksid idr.). Referenčna olja ne smejo vsebovati produktov oksidacije, ker bi zaradi absorpcije teh spojin dobili napačne rezultate. Prečiščenost referenčnih olj so preverjali z določanjem peroksidnega in anizidinskega števila ter prostih maščobnih kislin. Metoda poleg relativne ocene stopnje oksidacije olj omogoča tudi spremljanje oksidacije v realnem času (30).

Yildiz in sodelavci so IR spektroskopijo (bližnje območje) uporabili za ugotavljanje oksidacije sojinega olja pod vplivom fluorescenčne svetlobe, pri čemer so za kalibracijo modelov uporabili peroksidno število, število konjugiranih dvojnih vezi in anizidinsko število. Ugotovili so, da je bila ponovljivost kemijske (farmakopejska števila) in instrumentalne metode (IR spektroskopija) primerljiva. Pri obdelavi spektrov so v splošnem na podlagi determinacijskega koeficienta (R^2) dobili boljše napovedi z uporabo metode najmanjših delnih kvadratov (PLS) kot pri uporabi multiple linearne regresije. Z uporabo NIR (*near-IR*) spektroskopije so lahko pri sojinemu olju uspešno napovedali peroksidno

število, napoved anizidinskega števila pa je bila slabša, saj v bližnjem IR območju karbonilne skupine, s katerimi reagira *p*-anizidin, nimajo absorpcijskih pasov (31). Anizidinsko število so določali tudi palmovemu olju s transmisijsko tehniko IR spektroskopije s Fourierjevo transformacijo (FTIR) in metodo PLS. Uporabili so kalibracijski in validacijski set vzorcev ($R^2_{\text{kalibracija}} = 0,996$; $R^2_{\text{validacija}} = 0,990$) ter zaključili, da je model ustrezen za napovedovanje anizidinskega števila z vrednostmi, manjšimi od 17 (16).

S FTIR spektroskopijo so preiskovali peroksidno število kokosovega (32) in orehovega (33) olja. Na IR spektrih vzorcev so uporabili metodo PLS. V obeh primerih so modele vrednotili na podlagi R^2 in *RMSEP* (*root mean square error of prediction*, koren srednje kvadratne napake validacijskega seta vzorcev), pri tem pa dobili najboljše vrednosti R^2 , večje od 0,98, in vrednosti *RMSEP*, manjše od 0,5. Na podlagi rezultatov so zaključili, da je za napovedovanje peroksidnega števila uporaba FTIR spektroskopije smiselna alternativa kemijskim metodam (32, 33).

FTIR spektroskopijo so uporabili za spremljanje oksidacije v koruznem olju. Po izpostavljanju vzorcev povišani temperaturi in UV sevanju, so raziskovalci posneli IR spektre pri različnih temperaturah. Opazili so širjenje pasu okoli valovnega števila 1746 cm^{-1} , kjer absorbira skupina C=O, kar so pojasnili z nastankom aldehydov in drugih sekundarnih produktov oksidacije. Opazovali so tudi vpliv povišane temperature na spremembo peroksidnega števila. Pri tem so ugotovili, da se pri temperaturah, višjih od $200\text{ }^{\circ}\text{C}$, eksponentno poveča količina karbonilnih skupin v vzorcu ob hkratnem zmanjšanju vrednosti peroksidnega števila (34). Pojav so pripisali razpadu primarnih produktov oksidacije in nastanku sekundarnih produktov oksidacije (15, 34).

Metodo oslabljenega popolnega odboja (ATR, *attenuated total reflectance*) FTIR spektroskopije (FTIR-ATR) so raziskovali za namene celovite analize sprememb v rastlinskih oljih med segrevanjem. Hkrati so želeli napovedovati kislinsko in peroksidno število ter odstotek petih maščobnih kislin (palmitinska, stearinska, oleinska, linolna, linolenska) v trigliceridih, in sicer v olju za cvrtje (zmes palmovega, sončničnega ter sojinega ali bombažnega olja), repičnem, koruznem in sončničnem olju. V vseh primerih so najboljše modele pridobili z uporabo ortogonalne korekcije signala (OSC, *orthogonal signal corection*), ki je metoda za zmanjšanje vpliva ozadja. Kislinsko in peroksidno število so z modeli napovedali slabše kot vsebnosti maščobnih kislin, kar so pripisali eksperimentalnim napakam pri titracijah (35, 36).

Vrednosti R^2 , $RMSEC$ (root mean square error of calibration, koren srednje kvadratne napake učnega seta vzorcev) in $RMSEP$ za modele, s katerimi so v opisanih in drugih študijah napovedovali peroksidno, anizidinsko in kislinsko število, so zbrane v preglednici III.

Preglednica III: Vrednosti R^2 , $RMSEC$ in $RMSEP$ modelov za napovedovanje farmakopejskih števil.

	<i>Peroksidno število</i>	<i>Anizidinsko število</i>	<i>Kislinsko število</i>
Kalibracija			
R^2	0,9918 ^a ; 0,701 ^b , 0,71 ^c ; 0,75 ^c ; 0,99 ^c ;	0,994 ^e , 0,996 ^f	0,88 ; 0,87 ; 0,99 ^c
$RMSEC$	0,4838 ^a , 0,54 ^c ; 0,50 ^c ; 0,01 ^c	/	0,31; 0,33; 0,03 ^c
Validacija			
R^2	0,9903 ^a ; 0,52 ^c ; 0,50 ^c ; 0,99 ^c , 0,9826 ^d	0,998 ^e , 0,990 ^f	0,79; 0,79; 0,86 ^c
$RMSEP$	0,3545 ^a , 0,75 ^c ; 0,79 ^c ; 0,14 ^c , 0,4978 ^d	/	0,55; 0,55; 0,46 ^c

^a Liang in Chen: *Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Oxidation and Peroxide Value Evaluation in Virgin Walnut Oil* (33).

^b Wójcicki et. al.: *Near and mid infrared spectroscopy and multivariate data analysis in studies of oxidation of edible oils* (14).

^c Yousefinejad et al.: *Prediction of the acid value, peroxide value and the percentage of some fatty acids in edible oils during long heating time by chemometrics analysis of FTIR-ATR spectra* (35).

^d Marina et. al.: *Quantitative Analysis of Peroxide Value in Virgin Coconut Oil by ATRFTIR Spectroscopy* (32).

^e Van de Voort et al.: *Quantitative Fourier Transform Infrared Analysis for Anisidine Value and Aldehydes in Thermally Stressed Oils* (37).

^f Che Man et. al.: *Determination of Anisidine Value in Thermally Oxidized Palm Olein by Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (16).

Proučevanje ponarejanja rastlinskih olj

Olivno olje je pomemben del vsakodnevne prehrane. Vse pogostejše je ponarejanje olivnega olja z dodajanjem drugih, cenejših rastlinskih olj, kar lahko močno vpliva na oksidativno stabilnost dobljene oljne zmesi. FTIR spektroskopija je v kombinaciji s PLS in z drugimi metodami kemometrije postala pomembno orodje za odkrivanje tovrstnih ponaredkov rastlinskih olj. V različnih študijah so z uporabo IR spektroskopije kvantificirali sončnično (34, 38, 39), koruzno (38, 39), arašidovo (40), sojino (34, 41) in sezamovo (34) olje v zmesih z olivnim oljem.

Vlachos in sodelavci so opazovali razlike v IR spektrih ponarejenih olivnih olj pri valovnih številih okoli 3006 cm⁻¹, kjer zaznamo raztezanje (*stretching vibration*) *cis* dvojne vezi (HC=CH). Položaj absorpcijskega vrha je odvisen od sestave olja in se premakne glede na

spremembo v deležih maščobnih kislin. Pri olivnem olju je bil maksimum absorbance pri 3006 cm^{-1} , ob dodanih ostalih oljih (sončnično, sojino, koruzno, sezamovo) se je maksimum absorbance premaknil na približno 3009 cm^{-1} (34).

Rohman in sodelavci so za kvantifikacijo koruznega in sončničnega olja, dodanega olivnemu olju, uporabili metodo PLS. Opisali so problematiko pretiranega prilagajanja modelov (*overfitting*) na primeru uporabe obdelave spektra s prvim odvodom. Model za napovedovanje prisotnosti dodanega koruznega olja, za katerega so v kalibracijskem setu izračunali največji R^2 ($R^2_{\text{kalibracija}} = 1,000$) in najmanjši $RMSEC$ (0,019 % v/v) se na validacijskem setu ni najbolje obnesel, saj je bila vrednost $RMSEP$ izrazito večja (2,34 % v/v). Za kvantifikacijo koruznega olja so za PLS uporabili osnovni spekter, pri sončničnem olju pa prvi odvod, saj so v teh dveh primerih dobili največje vrednosti R^2 in najmanjše vrednosti $RMSEC$ ter $RMSEP$ (38).

Z uporabo FTIR-ATR spektroskopije so s PLS regresijo zasnovali metodo, ki omogoča ločevanje med zmesmi olj z vsebnostjo olivnega olja z več kot 50 % w/w in z manj kot 50 % w/w. Sprva so želeli kvantificirati vsebnost olivnega olja v zmesih, ki so vsebovale 10–90 % w/w, vendar je bil model v tem primeru slabši. Z metodo navzkrižne validacije so izračunali $R^2 = 0,734$, parameter $RMSECV$ (*root mean square error of cross validation*, koren srednje kvadratne napake navzkrižne validacije) z vrednostjo 14,39 pa je bil manj ustrezen. Pri zmesih z manj kot 50 % w/w olivnega olja v posameznih rastlinskih oljih (repično, koruzno, arašidovo, sezamovo idr.), so bolje napovedali vsebnost olivnega olja z $R^2 = 0,79$ in $RMSEC = 8,28$. Nekoliko slabšo napovedno vrednost so pripisali kompleksnosti in variabilnosti vzorcev (42).

Rohman in Ariani sta proučevala uporabo IR spektroskopije v kombinaciji z multivariabilno analizo pri ugotavljanju avtentičnosti olja črne kumine. Razlike v spektrih med oljem črne kumine, koruznim oljem in sojinim oljem so bile opazne predvsem v območjih spektra okoli $1750\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ ter $1128\text{--}1084\text{ cm}^{-1}$, vendar je bila zaradi prekrivanja absorpcijskih pasov in interferenc za natančnejšo analizo potrebna uporaba metode PLS. Na podlagi največjih vrednosti R^2 in najmanjših vrednosti $RMSEC$ ter $RMSEP$ so izbrali najboljše modele, s katerimi so lahko napovedali prisotnost olja črne kumine v zmesih s sojinim oljem (binarne mešanice) ter zmesih s sojinim in koruznim oljem (zmesi treh olj).

Najboljši model za ugotavljanje vsebnosti olja črne kumine v binarnih zmesih so dobili s kombiniranjem prvega odvoda spektra in izborom valovnih števil: 2985–3024 in 752–1755 cm^{-1} ($R^2_{\text{kalibracija}} = 0,997$; $RMSEC = 0,47 \text{ \% v/v}$). Pri zmesih treh olj so vsebnost olja črne kumine najboljše napovedali z uporabo drugega odvoda in izborom valovnih števil v območjih: 2977–3028, 1666–1739 in 740–1446 cm^{-1} ($R^2_{\text{kalibracija}} = 0,993$; $RMSEC = 0,86 \text{ \% v/v}$) (24).

Podobno študijo so izvedli tudi na konopljinih oljih različnega porekla, ki so jih proučevali v binarnih zmesih z oljem oljne ogrščice, sezamovim in sončničnim oljem. Z uporabo PLS so uspešno napovedali odstotke vsebnosti posameznega olja, dodanega konopljinemu olju ($R^2_{\text{validacija}} > 0,995$; $RMSEP = 1,0\text{--}3,2 \text{ \%}$) (43).

Pri avokadovem olju z dodanimi sončničnim in sojinim oljem ter oljem oljne ogrščice, so želeli dodana olja kvantificirati in obenem napovedati vrednosti njihovih peroksidnih in jodnih števil z uporabo metode PLS. Proučevane binarne zmesi olj so poleg avokadovega olja vsebovale 2–50 $\text{\% v/v}$ drugega dodanega olja. ($R^2_{\text{kalibracija}} > 0,98$, $RMSEC = 0,04\text{--}1,47$; $R^2_{\text{validacija}} > 0,97$, $RMSEP = 0,09\text{--}2,81$) (44).

2 NAMEN

V magistrski nalogi bomo preiskovali metodo za ugotavljanje vrednosti kislinskega, anizidinskega in peroksidnega števila rastlinskih olj in masel. Metoda temelji na IR spektroskopiji, uporabili bomo ATR-IR spektroskopijo v kombinaciji z metodo regresije najmanjših delnih kvadratov (PLS) za izdelavo modelov. Meritve spektrov bomo izvajali na vzorcih različnih rastlinskih olj in masel, shranjevanih v različnih razmerah, v daljšem časovnem obdobju. Tako bomo pridobili veliko število vzorcev, kar izboljša napovedno moč modela. Spektre posameznih olj in masel bomo povezali z izmerjenimi vrednostmi anizidinskih, kislinskih in peroksidnih števil ter z uporabo kemometrije izračunali modele, s katerimi bomo v nadaljevanju napovedovali vrednosti teh farmakopejskih števil.

Opazovali bomo vpliv izbire parametrov na pridobljene rezultate. Spektre bomo posneli pri različnih ločljivostih (4 in 16 cm^{-1}), za obdelavo spektrov bomo uporabili 9 različnih funkcij (osnovni spekter, prvi in drugi odvod, normalizacija, prvi in drugi odvod normalizacije, SNV, prvi in drugi odvod SNV). Valovna števila za izvedbo PLS bomo izbrali na podlagi največjega Pearsonovega koeficienta korelacije in glede na območja IR spektra, kjer absorbirajo funkcionalne skupine, povezane z obravnavanimi farmakopejskimi števili. Modele bomo vrednotili z uporabo R^2 in $RMSE$ in grafične analize rezultatov.

Glavni cilj magistrske naloge je razviti orodje, ki bi ga lahko v prihodnosti uporabili kot zamenjavo za proučevane kemijske metode ugotavljanja farmakopejskih števil.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci

Za analizo smo uporabili pet različnih vrst rastlinskih olj in eno vrsto rastlinskega masla različnih proizvajalcev. Proizvajalci: All Natural Treasures (AOT), Nemčija, Oljarna Pečarič (OP), Slovenija, Histria Botanica (HB), Slovenija, in Afrikahandel CSR Projekt U.G. (SG), Nemčija. Uporabljeni vzorci in podatki o proizvajalcih, poreklu in o datumu pridelave so navedeni v preglednici IV.

Preglednica IV: Analizirana rastlinska olja in masla; - podatki niso znani.

Vzorec	Proizvajalec	Datum iztiskanja	Poreklo surovine	Številka vzorca
<i>Makovo olje</i>	AOT	junij 2016	Turčija	1
<i>Makovo olje</i>	OP	24. 01. 2017	Turčija	2
<i>Laneno olje</i>	AOT	november 2016	Nemčija	3
<i>Laneno olje</i>	OP	avgust 2016	Turčija	4
<i>Olje granatnega jabolka</i>	AOT	julij 2016	Turčija	5
<i>Borečevo olje</i>	AOT	julij 2016	-	6
<i>Olivno olje</i>	AOT	november 2016	Tunizija	7
<i>Olivno olje</i>	HB	6. 12. 16	Slovenija	8
<i>Karitejevo maslo</i>	AOT	junij 2016	Gana	9
<i>Karitejevo maslo</i>	SG	-	Gana	10

3.1.2 Razmere shranjevanja

Vzorci rastlinskih olj in masel so bili izpostavljeni različnim vplivom (diagram I, str. 15), ki so bolj natančno opredeljeni v še neobjavljeni magistrski nalogi Laure Činč. Vzorcem so izmerili peroksidno, anizidinsko in kislinsko število v skladu s farmakopejskimi predpisi. Snemanja infrardečih spektrov smo izvedli sočasno z meritvami farmakopejskih števil, in sicer za posamezno časovno točko (skupno pet časovnih točk v trimesčnih intervalih v obdobju devetih mesecev) v približno dveh tednih. Skupno smo pridobili 240 različnih vzorcev. Časovni potek analiz s pripadajočim številom različnih vzorcev je prikazan v preglednici V.

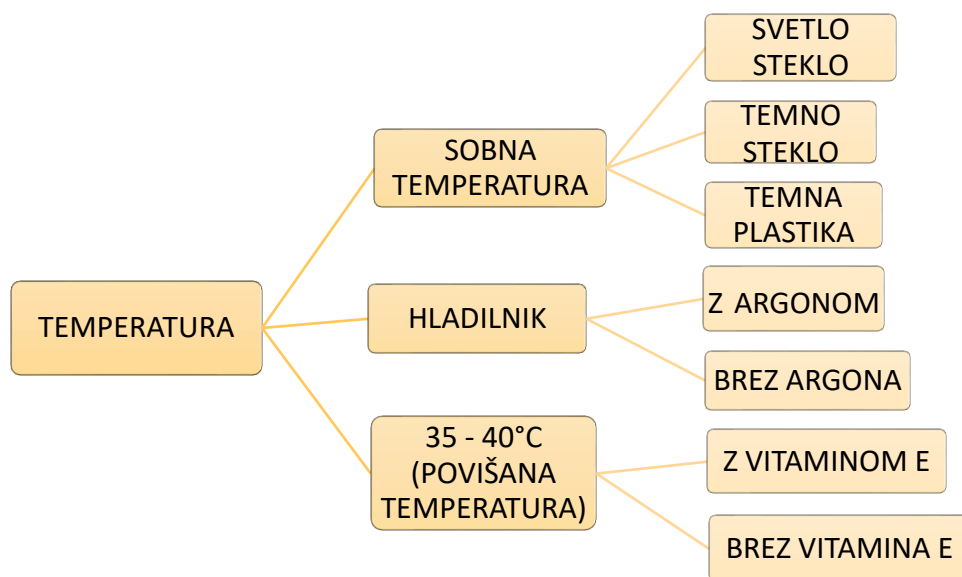


Diagram 1: Prikaz razmer shranjevanja preiskovanih vzorcev.

Preglednica V: Časovni potek meritev.

Datum meritev	Časovna točka*	Število vzorcev	Časovna točka T**	Število vzorcev	Skupno število vzorcev
30./31. 3. 2017	0	10	/	/	10
12./13. 4. 2017	/	/	T0	20	20
03./04. 7. 2017	1	50	T1	20	70
13./14. 9. 2017	2	50	T2	20	70
11.-13. 12. 2017	3	50	T3	20	70

* Časovne točke 0–3: merjenje spektrov vzorcem, shranjenim na sobni temperaturi in v hladilniku.

** Časovne točke T0–T3: merjenje spektrov vzorcem, shranjenim na povišani temperaturi.

V preglednici V so navedeni datumi meritev, oznake časovnih točk in število vzorcev, ki smo jih uporabili za meritve. Časovna točka 0 predstavlja začetno stanje rastlinskih olj in masel, zato smo spektre posneli desetim osnovnim vzorcem olj (preglednica IV). V časovnih točkah 1–3 smo posneli spektre vzorcem, ki smo jih shranjevali na sobni temperaturi in v hladilniku (diagram I). V časovni točki T0 smo prvič posneli spektre vzorcem, shranjenim na povišani temperaturi, v nadaljevanju pa so meritve teh vzorcev potekale skupaj z meritvami ostalih vzorcev.

3.2 Reagenti

Pri delu smo uporabljali le 96-odstotni etanol (Carlo Erba, Italija) za čiščenje površine IR spektrometra.

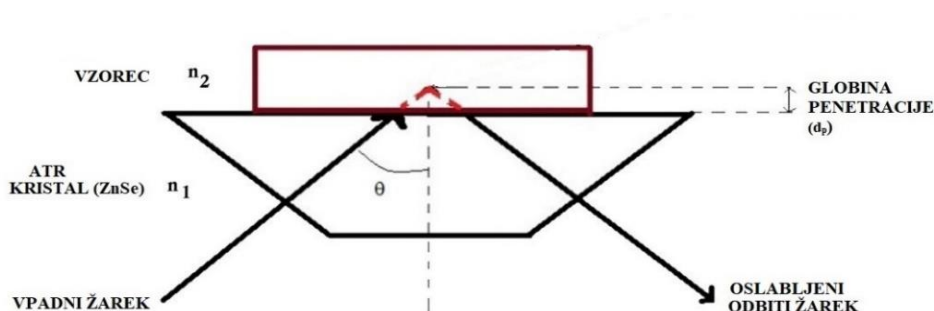
3.3 Uporaba IR spektroskopije

Snemanje IR spektrov smo izvajali na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, v laboratoriju Katedre za farmacevtsko kemijo, priprava vzorcev pa je potekala na Katedri za farmacevtsko biologijo, na oddelku farmakognozije.

3.3.1 Snemanje spektrov s tehniko oslabiljenega popolnega odboja IR spektroskopije

Za snemanje spektrov vzorcev s tehniko oslabiljenega popolnega odboja (ATR) IR spektroskopije smo uporabljali spektrometer Nicolet Nexus FTIR proizvajalca Nicolet Instrument Co, Madison, ZDA z devteriranim triglicin sulfatnim (DTGS) detektorjem. Uporabili smo ATR nastavek proizvajalca Dura SamplIR Technologies, Danbury, ZDA. Nastavek je sestavljen iz ploščice z okroglim diamantnim kristalom, premera 1 mm, na katerega smo s kapalko nanašali vzorce rastlinskih olj in masel. Nastavek vsebuje vijak, ki omogoča enakomeren pritisk vzorca ob kristal, v našem primeru pa uporaba vijaka zaradi tekoče konsistence vzorcev ni bila potrebna. Za snemanje smo uporabili program EZ OMNIC E.S.P.5.2, posamezne spektre pa smo shranili v formatu CSV (*comma separated value*) in kot dvojnik v formatu SPA (format programa OMNIC).

Tehnika oslabiljenega popolnega odboja ali ATR (*attenuated total reflectance*) je ne-destruktivna tehnika za snemanje spektra površine vzorca, ki je bodisi preveč gost ali premočno absorbira, da bi ga analizirali s standardno transmisijsko spektroskopijo. Pri ATR merimo spremembe, do katerih pride pri odboju svetlobe od vzorca. Žarek svetlobe je pod določenim kotom usmerjen proti kristalu z veliko optično gostoto. Svetloba se odbije od površine med kristalom in optično redkejšim vzorcem, ki se nahaja nad njim. V območjih IR spektra, v katerih vzorec absorbira, valovanje v stiku s površino vzorca oslabi, detektor pa zazna oslabiljeni žarek svetlobe (2, 45, 46). Delovanje tehnike oslabiljenega popolnega odboja je prikazano na sliki 1.



Slika 1: Prikaz poti IR žarka pri tehniki oslabiljenega popolnega odboja (n_1 : optično gostejša snov (diamantni kristal), n_2 : optično redkejša snov (vzorec), θ : kot vpadne svetlobe). Prirejeno po: (46).

Pri izvajanju meritev z IR spektrometrom smo definirali sledeče parametre:

Ločljivost (*resolution*)

Ločljivost določa, kakšna je najmanjša razdalja med vrhovoma, ki jih aparatura še lahko loči. Manjša vrednost pomeni večjo ločljivost. Pri večji ločljivosti se podaljša čas meritve. Če je ločljivost prevelika, lahko pride do povečanja deleža šuma. Za tekoče vzorce običajno uporabljamo ločljivosti 4 ali 8 cm^{-1} . Spektre vzorcev in ozadja je potrebno posneti pri enaki ločljivosti (47).

Število ponovitev snemanj (*number of scans*)

Število ponovitev snemanj določa, koliko posnetkov naredi aparatura med posameznim snemanjem spektra vzorca oziroma ozadja. Če izvedemo več kot eno ponovitev snemanja, je končni rezultat povprečje vseh ponovitev snemanj. Večje število ponovitev snemanj podaljša čas meritve, zmanjša šum in poveča občutljivost (zmožnost ločevanja manjših vrhov od šuma) (47).

Merilno območje (*spectral range*)

Merilno območje je v našem primeru obsegalo srednji del spektra IR svetlobe, od 4000–500 cm^{-1} . IR območje sicer obsega bližnje, srednje in daljno območje. Izbira območja je odvisna od vira svetlobe, delivca žarka in detektorja (47).

3.3.2 Meritve vzorcev rastlinskih olj in masel

Snemali smo ATR-IR spektre rastlinskih olj in masel, ki smo jih izpostavili različnim razmeram (diagram I, str. 15). Pri vzorcih rastlinskih olj predpriprava ni bila potrebna, vzorce karitejevega masla pa je bilo potrebno pred snemanjem spektrov segreti na vodni kopeli na približno 60 °C, da so se stalili oziroma utekočinili.

Pred meritvijo smo vijak najprej namestili na stran, saj za našo meritev vzorcev ni bil potreben. Nato smo diamantni kristal očistili z etanolom in počakali, da se je posušil. Nadaljevali smo s snemanjem ozadja in vzorcev z nastavitvami, prikazanimi v preglednici VI. Najprej smo posneli spekter ozadja pri določeni ločljivosti. Nato smo na kristal s plastično kapalko nanegli kapljico vzorca tako, da je prekril celoten kristal, pri tem pa smo pazili, da ni bilo prisotnih zračnih mehurčkov, ki bi lahko motili meritev. Posneli smo spekter vzorca rastlinskega olja oziroma masla, po končani meritvi pa smo spekter shranili v oblikah zapisov CSV in SPA. Po zaključeni meritvi smo kristal obrisali s papirnato brisačo ter ga

očistili z etanolom, da smo odstranili sledi vzorca pred naslednjo meritvijo. Za vsak vzorec smo izvedli po tri ponovitve snemanja pri posamezni ločljivosti (4 ter 16 cm^{-1}) z nastavitvijo 50 ponovitev snemanja, skupno torej 6 spektrov na vzorec. Po vsaki spremembi nastavitve ločljivosti smo posneli ozadje pri 50 ponovitvah snemanja. Merjenje spektrov za posamezen vzorec je trajalo približno 15 minut (tri ponovitve pri vsaki od dveh ločljivosti). Skupno smo posneli 1440 spektrov 240 različnih vzorcev.

Preglednica VI: Nastavitve parametrov pri izvajanju meritev vzorcev in ozadja z ATR-IR spektroskopijo

Parameter	Ozadje/ vzorci rastlinskih olj in masel
<i>Metoda</i>	Enojni odboj žarka
<i>Kristal</i>	Diamant
<i>Ozadje</i>	Zrak
<i>Število ponovitev snemanja</i>	50
<i>Ločljivost (cm^{-1})</i>	4, 16
<i>Merilno območje (cm^{-1})</i>	4000–500
<i>Format</i>	% transmittance
<i>Delilec žarka</i>	ZnSe
<i>Detektor</i>	DTGS KBr
<i>Apertura</i>	69

3.4 Obdelava spektrov

Pridobljene podatke, shranjene v obliki CSV, smo obdelali v programu GUI Octave 4.2.1. (v nadaljevanju Octave). Ker format CSV ni neposredno združljiv s programom Octave, smo morali datoteke v obliki CSV najprej obdelati v programu Notepad++, ki omogoča zamenjavo decimalnih vejic s pikami. Najprej smo datoteke uredili glede na ločljivost ter spektre zložili v posamezne matrike. Slednje smo v zadnjem koraku združili v dve končni datoteki, od katerih je ena vsebovala spektre ločljivosti 16 cm^{-1} , druga pa spektre ločljivosti 4 cm^{-1} . Sledila je obdelava, pri kateri smo spektre obdelali s pomočjo različnih funkcij. Za tri spektre, ki so bili posneti za vsak vzorec, smo s programom izračunali povprečje in ga uporabili kot osnovni spekter posameznega vzorca. Funkcije, ki smo jih uporabili za obdelavo povprečnih osnovnih spektrov, so bile sledeče: prvi in drugi odvod, normalizacija ter prvi in drugi odvod normalizacije, normalizacija s standardnim odklonom (SNV) ter njena prvi in drugi odvod. Rezultat v tem koraku so bili osnovni spekter ter osem obdelanih spektrov vzorcev ločljivosti 16 cm^{-1} in 4 cm^{-1} . Obdelani spektri so predstavljali set

neodvisnih spremenljivk za izdelavo napovednih modelov. Uporabljene funkcije in oznake obdelanih spektrov so navedene v preglednici VII.

Preglednica VII: Uporabljene matematične funkcije za obdelavo spektrov v programu GUI Octave 4.2.1.

Obdelava spektra	Oznaka obdelanega spektra	Matematična funkcija za izračun (GUI Octave 4.2.1.)
Povprečje – osnovni spekter	Osn	$\bar{x}_i = \frac{x_{i1} + x_{i2} + x_{i3}}{3}$
Prvi odvod	Odv	$f'(x_i) = x_{i+1} - x_i$
Drugi odvod	Odv2	$f''(x_i) = x'_{i+1} - x'_i$
Normalizacija	Nor	$x_i^N = \frac{x_i - x_{min}}{x_{max} - x_{min}}$
Prvi odvod normalizacije	NorOdv	$f'(x_i^N) = x_{i+1}^N - x_i^N$
Drugi odvod normalizacije	Nor2Odv	$f''(x_i^N) = x_{i+1}^{N'} - x_i^{N'}$
Normalizacija s standardnim odklonom (SNV)	Snv	$x_i^{SNV} = \frac{x_i - \bar{x}}{std}$
Prvi odvod SNV	SnvOdv	$f'(x_i^{SNV}) = x_{i+1}^{SNV} - x_i^{SNV}$
Drugi odvod SNV	Snv2Odv	$f''(x_i^{SNV}) = x_{i+1}^{SNV'} - x_i^{SNV'}$

Uporabljene oznake:

x_i	povprečna vrednost spektra pri valovnem številu i (osnovni spekter)
x_{i1}, x_{i2}, x_{i3}	vrednost spektra pri valovnem številu i pri treh meritvah spektra za posamezni vzorec
$f'(x_i)$	vrednost prvega odvoda spektra pri valovnem številu i
x_{i+1}	vrednost osnovnega spektra pri valovnem številu i+1
$f'(x_i), x'_i$	vrednost prvega odvoda spektra pri valovnem številu i
$f''(x_i)$	vrednost drugega odvoda spektra pri valovnem številu i
x_i^N	vrednost normaliziranega spektra pri valovnem številu i
x_{min}	najmanjša vrednost (minimum) osnovnega spektra
x_{max}	največja vrednost (maksimum) osnovnega spektra
$f'(x_i^N), x_i^{N'}$	vrednost prvega odvoda normaliziranega spektra pri valovnem številu i
x_{i+1}^N	vrednost normaliziranega spektra pri valovnem številu i+1
$x_{i+1}^{N'}$	vrednost prvega odvoda normaliziranega spektra pri valovnem številu i+1
$f''(x_i^N)$	vrednost drugega odvoda normaliziranega spektra pri valovnem številu i
x_i^{SNV}	vrednost SNV spektra pri valovnem številu i
$\bar{x}$	povprečna vrednost spektra
std	standardni odklon spektra
$f'(x_i^{SNV}), x_i^{SNV'}$	vrednost prvega odvoda SNV spektra pri valovnem številu i
x_{i+1}^{SNV}	vrednost SNV spektra pri valovnem številu i+1
$f''(x_i^{SNV})$	vrednost drugega odvoda SNV spektra pri valovnem številu i
$x_{i+1}^{SNV'}$	vrednost prvega odvoda SNV spektra pri valovnem številu i+1

Povprečje spektrov

Izračunali smo povprečje treh spektrov istega vzorca in tako dobili osnovni spekter za posamezen vzorec. Na ta način smo želeli zmanjšati vpliv posamezne meritve na IR spekter posameznega vzorca. Osnovne spektre vzorcev olj in masel smo uporabili za nadaljnje obdelave.

Odводи

Odvide spektrov smo dobili tako, da smo izračunali razlike med vrednostmi transmitanc pri dveh sosednjih valovnih številih v celotnem spektru posameznega vzorca. Z uporabo odvodov lahko ločujemo vrhove, ki se v osnovnem spektru prekrivajo (48).

Normalizacija

Najprej smo s pomočjo programa izračunali minimalne in maksimalne vrednosti intenzitet posameznega spektra. Od vsake vrednosti intenzitete smo nato odšteli minimum in novo vrednost delili z razliko maksimuma in minimuma (23).

Normalizacija SNV

Pri normalizaciji SNV smo izračunali povprečno vrednost in standardni odklon vseh točk spektra, nato pa smo od vsake točke spektra odšteli povprečno vrednost in dobljeno razliko delili s standardnim odklonom (20).

3.4.1 Izbor delov IR spektra na podlagi funkcionalnih skupin

Za izdelavo modela smo potrebovali kriterije, ki bi dobro odražali spremembe v preiskovanih vzorcih olj in masel. Odločili smo se, da bomo upoštevali dele spektra, značilne za funkcionalne skupine, povezane z lastnostmi olj, ki jih ugotavljamo s farmakopejskimi števili. V povezavi s peroksidnim številom smo izbrali fragmente, ki so dovzetni za lipidno oksidacijo (dvojne vezi), ter fragmente, ki so prisotni v produktih oksidacije (hidroperoksidi in njihovi razpadni produkti). Pri kislinskem številu smo izbrali karboksilno (-COOH) skupino in njene manjše fragmente, pri anizidinskem številu pa aldehidno (-CHO) skupino in dvojne vezi. Valovna števila posameznih funkcionalnih skupin ali fragmentov, pridobljena iz različnih virov, so bila osnova za naš izbor območij spektra in so zbrana v prilogi 1, v preglednici X. Izbrana območja valovnih števil, ki smo jih uporabili pri izdelavi modelov, so navedena v prilogi 2, v preglednici XI.

3.5 Izdelava napovednih modelov

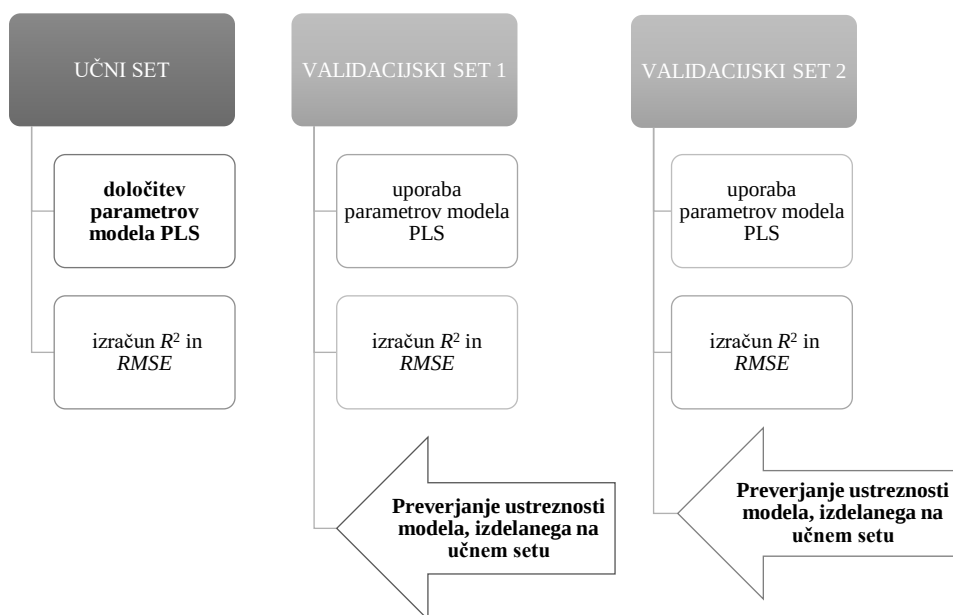
Na podlagi posnetih spektrov smo želeli izdelati napovedni model, s katerim bi ugotavljali vrednosti peroksidnega, anizidinskega in kislinskega števila novih, neodvisnih vzorcev. Vzorce smo razdelili na učni set in validacijski set 1. Na učnem setu smo zasnovali model, na validacijskem setu 1 pa smo preverili njegovo ustreznost. V učni set smo vključili spektre 154 vzorcev, ki smo jih posneli do vključno druge časovne točke (preglednica V, str. 15). Validacijski set 1 je predstavljal skupno 16 vzorcev iz prve in druge časovne točke (preglednica V, str. 15). Z izborom vzorcev za validacijski set 1 smo želeli posnemati situacijo, pri kateri začetne vzorce uporabimo za izgradnjo modela, na kasnejših pa model uporabimo. Razporeditev števila vzorcev, vključenih v učni set in validacijski set 1, je prikazana v prilogi 3, na sliki 13. Spektre vzorcev iz zadnje (tretje) časovne točke, smo uporabili kot validacijski set 2, s katerim smo želeli dodatno ovrednotiti modele. Laboratorijske meritve za validacijski set 2 smo pridobili le za peroksidno število, zato smo s pomočjo validacijskega seta 2 ugotavljali le uporabnost modelov za peroksidno število.

Najprej smo na spektrih učnega seta vzorcev izvedli devet različnih obdelav, nato pa izdelali modele za ugotavljanje vrednosti farmakopejskih števil. Od celotnega spektra smo uporabili približno polovico valovnih števil (236 za ločljivost 16 cm^{-1} in 936 za ločljivost 4 cm^{-1}). Ta smo izbrali na podlagi delov spektrov, ki smo jih pridobili iz literature (priloga 1, preglednica X, in priloga 2, preglednica XI) ter glede na največje absolutne vrednosti Pearsonovega koeficienta korelacije valovnih števil. Vrednosti Pearsonovega koeficienta smo izračunali s pomočjo korelacije med vsakim valovnim številom in posameznim farmakopejskim številom, za ugotavljanje katerega smo želeli izdelati model. Izbrali smo torej polovico spektra, ki je najbolj korelirala s posameznim farmakopejskim številom. Z uporabo učnega seta smo pridobili parametre modelov PLS, ki smo jih uporabili za ugotavljanje vrednosti farmakopejskih števil v validacijskih setih. Optimalno število latentnih faktorjev za PLS smo ugotovili s pomočjo metode z izpuščanjem posameznih vzorcev (*leave-one out*) na učnem setu. Tudi na spektrih validacijskih vzorcev smo najprej izvedli obdelave z uporabo devetih različnih funkcij. Za napovedovanje farmakopejskih števil smo uporabili vrednosti parametrov PLS, ki smo jih pridobili iz učnega seta.

Validacijski set 2 je predstavljal 70 vzorcev zadnje (tretje) časovne točke. IR spektre smo najprej obdelali z uporabo enakih obdelav kot pri učnem setu in validacijskem setu 1.

V validacijski set 2 smo vključili samo izmerjene vrednosti peroksidnega števila. Tudi s pomočjo validacijskega seta 2 smo želeli preveriti, kako dobro lahko z dobljenimi modeli ugotavljamo vrednosti peroksidnih števil pri posameznih vzorcih.

Na sliki 2 je predstavljeno zaporedje setov meritev, ki smo jih uporabili za postavitev modelov in preverjanje njihove ustreznosti za napovedovanje farmakopejskih števil. Pregled celotnega poteka izdelave modelov za ugotavljanje anizidinskega, kislinskega in peroksidnega števila prikazuje slika 3.



Slika 2: Prikaz uporabljenih setov meritev in načinov vrednotenja modelov

3.6 Vrednotenje modelov

Ustreznost modelov smo preizkusili na validacijskem setu vzorcev in jih vrednotili s pomočjo izračunanih vrednosti R^2 in $RMSE$. Determinacijski koeficient (R^2) v statistični analizi omogoča vrednotenje linearnosti med odvisno in neodvisno spremenljivko in lahko zavzame vrednosti med 0 in 1. Vrednost $R^2 = 0$ pomeni, da odvisne spremenljivke ne moremo napovedati, pri vrednost $R^2 = 1$ pa odvisno spremenljivko lahko napovemo brez napake s pomočjo neodvisne spremenljivke. Vrednosti od 0 do 1 predstavljajo delež variance odvisne spremenljivke, ki ga lahko napovemo iz neodvisne spremenljivke (49). Koren srednje kvadratne napake ($RMSE$) predstavlja odklon od pravih vrednosti, zato je za razliko od R^2 zaželeno, da so vrednosti $RMSE$ čim manjše (28). Izračune smo izvedli s pomočjo enačbe 1 (R^2) in enačbe 2 ($RMSE$).

Enačba 1:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (y_{pravi} - y_{napovedani})^2}{\sum (y_{pravi} - \bar{y}_{pravi})^2}$$

Enačba 2:

$$RMSE = \frac{1}{\sqrt{N}} \sqrt{\sum (y_{pravi} - y_{napovedani})^2}$$

Uporabljene oznake:

N	število vzorcev
y_{pravi}	vrednost izmerjenega farmakopejskega števila
$y_{napovedani}$	vrednost farmakopejskega števila, napovedana z modelom
$\bar{y}_{pravi}$	povprečje vrednosti izmerjenih farmakopejskih števil

Vrednosti $RMSE$ smo primerjali z vrednostmi standardnih odklonov referenčne metode. Referenčna metoda je bila v našem primeru farmakopejska metoda za določanje posameznega farmakopejskega števila. Za primerjavo $RMSE$ izdelanih modelov in standardnih odklonov referenčne metode smo izpeljali enačbo 3, s katero smo ti dve vrednosti povezali med seboj. $RMSE_{ref}$ predstavlja vrednost $RMSE$ referenčne metode, ki smo jo izračunali s pomočjo standardnega odklona vrednosti izmerjenih farmakopejskih števil (SD) in števila vzorcev, ki smo jim izmerili farmakopejska števila (N).

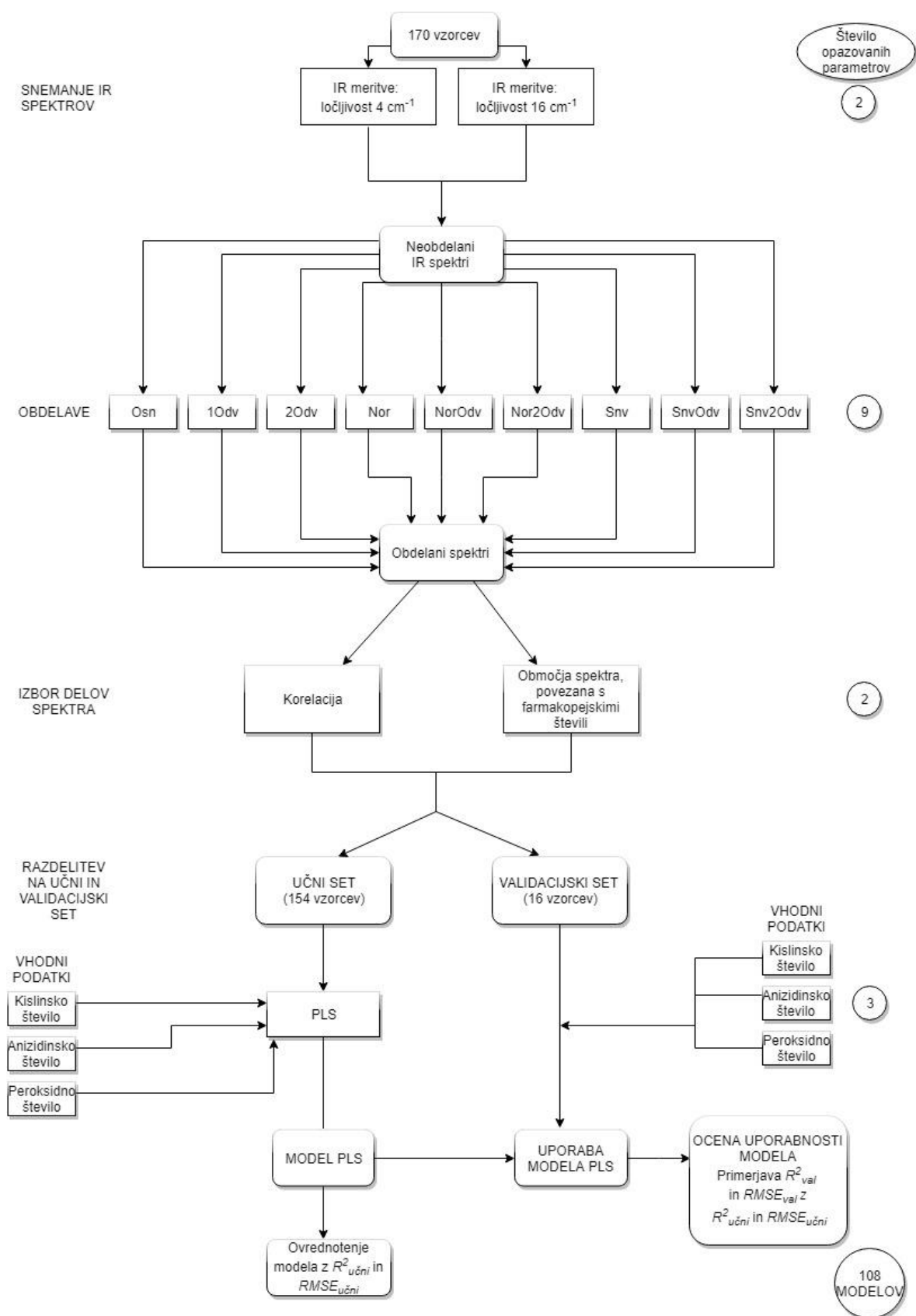
Enačba 3:

$$RMSE_{ref} = \sqrt{\frac{\sum (SD)^2}{N}}$$

Modele, ki smo jih izdelali z metodo PLS, smo razvrstili v naslednje skupine glede na vrednosti R^2 :

- najboljši modeli: $R^2 > 0,90$
- dobri modeli: $0,8-0,9$
- slabši modeli: $0,60-0,8$
- slabi modeli: $R^2 < 0,60$

Modelov, ki so ustrezali zadnjemu kriteriju (slabi modeli), nismo obravnavali. Pri najboljših, dobrih in slabših modelih glede na vrednosti R^2 učnega seta ($R^2_{učni}$) smo pregledali tudi vrednosti R^2 validacijskih setov (R^2_{val}). Nato smo na podlagi največjih vrednosti $R^2_{učni}$ in R^2_{val} ter najmanjših vrednosti $RMSE$ učnega seta ($RMSE_{učni}$) in validacijskega seta ($RMSE_{val}$) izbrali najboljše modele za kislinsko, anizidinsko in peroksidno število.



Slika 3: Pregled poteka izdelave modelov za ugotavljanje anizidinskega, kislinskega in peroksidnega števila.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Najboljši modeli za napovedovanje farmakopejskih števil

V preglednici VIII je prikazano število modelov, ki so ustrezali postavljenim kriterijem glede na vrednosti R^2 . Skupno smo dobili 54 najboljših modelov, od tega je bilo kar 42 modelov iz učnega seta. Iz preglednice je torej razvidno, da so bili rezultati validacijskega seta 1 precej slabi, saj smo kar 72 slabih modelov dobili iz validacijskega seta 1, poleg tega pa je bilo v validacijskem setu 1 le dvanajst najboljših modelov. Izračunane vrednosti R^2 in $RMSE$ za vse obravnavane modele so navedene v prilogi 4, v preglednici XII.

Preglednica VIII: Število modelov, ki so ustrezali postavljenim kriterijem glede na vrednosti R^2 .

Kriterij	Število modelov ($R^2_{učni}$)	Število modelov (R^2_{val})	Skupno
najboljši modeli	42	12	54
dobri modeli	7	0	7
slabši modeli	56	24	80
slabi modeli	3	72	75
SKUPNO	108	108	216

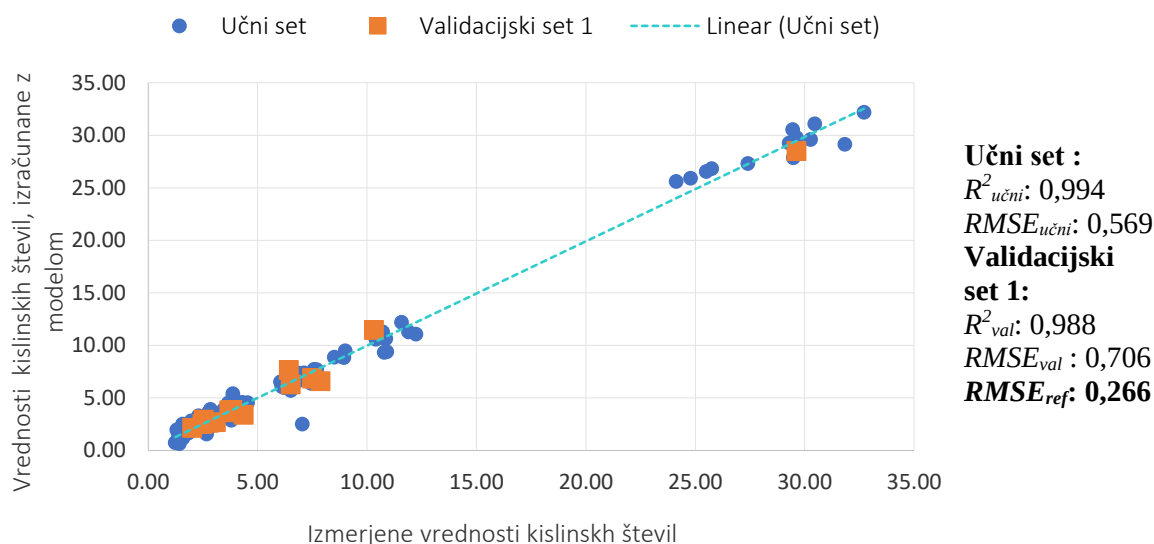
Za učni set, validacijski set 1 (VAL1) ter validacijski set 2 (VAL2) smo izračunali $RMSE$ referenčnih metod ($RMSE_{ref}$), ki so prikazani v preglednici IX. Ugotovili smo, da so bili $RMSE_{ref}$ učnega seta najmanjši, povečali pa so se v obeh validacijskih setih, najbolj izrazito v validacijskem setu 2. Standardni odklon referenčnih analiz farmakopejskih števil učnega seta je bila torej najmanjša, pri validacijskih setih pa se je povečala. Na podlagi $RMSE_{ref}$ referenčne metode validacijskih setov ne moremo pričakovati, da bodo naši modeli farmakopejska števila ugotavljali bolj natančno kot referenčna metoda. Na validacijskih setih smo pogosto dobili manjše vrednosti R^2_{val} in večje vrednosti $RMSE_{val}$ v primerjavi z vrednostmi učnega seta, kar bi lahko bilo tudi posledica večjih vrednosti $RMSE_{ref}$ pri validacijskih setih.

Preglednica IX: Vrednosti $RMSE$ referenčnih metod za določanje peroksidnega, anizidinskega in kislinskega števila ($RMSE_{ref}$) v učnem setu in v validacijskih setih 1 in 2

Set meritev	Kislinsko Število ($RMSE_{ref}$)	Anizidinsko Število ($RMSE_{ref}$)	Peroksidno Število ($RMSE_{ref}$)
učni set	0,26644	1,27322	0,62295
VAL1	0,34765	1,45737	1,15649
VAL2	/	/	5,50988

4.1.1 Kislinsko število

Najboljši model za kislinsko število (slika 4) smo dobili pri ločljivosti 16 cm^{-1} , pri uporabljeni obdelavi SNV in izboru valovnih števil s korelacijo na podlagi Pearsonovega koeficienta. Pri tem smo pri učnem in validacijskem setu 1 dobili vrednosti $R^2 > 0,90$ ($R^2_{učni} = 0,994$; $R^2_{val} = 0,988$). Vrednosti $RMSE$ učnega (0,569) in validacijskega seta 1 (0,706) sta bili večji od vrednosti $RMSE$ referenčne metode (0,226). Standardni odkloni so bili pri meritvah validacijskega seta 1 večji kot pri učnem setu, zato so povečane vrednosti $RMSE$ za validacijski set 1 pričakovane. Pri referenčni metodi za določanje kislinskega števila so bili standardni odkloni vrednosti izmerjenih števil najmanjši (0,266) v primerjavi s standardnimi odkloni meritev pri metodah za določanje anizidinskega števila (1,27) in peroksidnega števila (0,623). Predstavljeni model je najboljši tudi v primerjavi z modeli za peroksidno in anizidinsko število, kar lahko med drugim pripišemo manjšim standardnim napakam pri referenčni analizi kislinskega števila.



Slika 4: Najboljši model za napovedovanje kislinskih števil. Uporabljeni parametri: ločljivost 16 cm^{-1} , obdelava SNV, izbor valovnih števil s korelacijo na podlagi Pearsonovega koeficienta.

Pri reakciji ugotavljanja kislinskega števila kalijev hidroksid reagira s karboksilnimi ($-\text{COOH}$) skupinami prostih maščobnih kislin, ki so se odcepile iz trigliceridov (50). Proste karboksilne skupine imajo v IR območju dobro definiran pas absorpcije (22). Najverjetneje smo izbrali ustrezna območja spektra, s katerimi smo uspeli zajeti potrebne informacije, ključne za ugotavljanje vrednosti kislinskega števila. Rezultati se skladajo z ugotovitvami Nataše Kopač, ki je v magistrski nalogi dobila najboljši napovedni model z uporabo valovnih

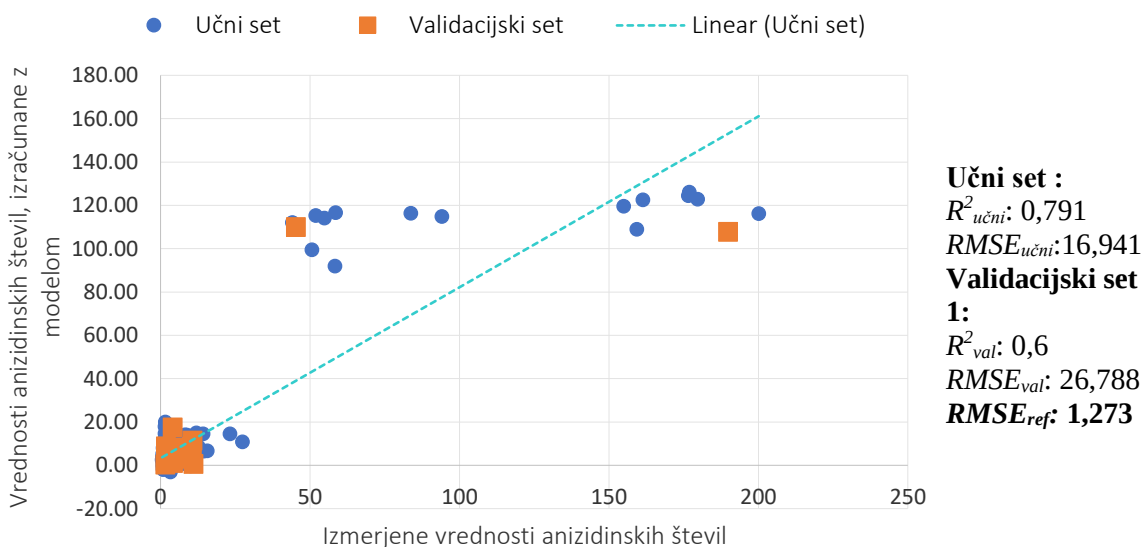
števil, značilnih za absorpcijo fragmenta C=O estrskega dela karboksilne skupine in C=O skupine (52).

Zanimivo je, da smo v primerjavi z rezultati pregledanih raziskav (preglednica III, str. 10) dosegli večje vrednosti $R^2_{učni}$ (0,994 v primerjavi z 0,88 in 0,87). Pri tem je bila vrednost našega $RMSE_{učni}$ (0,569) nekoliko večja od vrednosti iz drugih raziskav (0,31; 0,33; 0,03). Na validacijskem setu smo dobili zelo dober rezultat R^2_{val} (0,988) v primerjavi z vrednostmi R^2_{val} dveh drugih študij (0,79; 0,86). Tudi na validacijskem setu je bila vrednost $RMSE_{val}$ (0,706) večja kot v dveh drugih študijah (0,46; 0,55).

Model za ugotavljanje kislinskega števila je od proučevanih modelov najbolj obetaven za uporabo.

4.1.2 Anizidinsko število

Najboljši model učnega seta (slika 5) smo dobili z uporabo ločljivosti 4 cm^{-1} , obdelavo drugi odvod SNV, pri izbiri valovnih števil na podlagi korelacije. Pri tem smo za učni set izračunali precej majhno vrednost $R^2_{učni}$ (0,791) in velik $RMSE_{učni}$ (16,941), zato model po naših kriterijih spada med slabše. Vrednost $RMSE_{ref}$ učnega seta je znašala 1,273. Na validacijskem setu se je model obnesel še slabše kot na učnem setu ($R^2_{val} = 0,6$; $RMSE_{val} = 26,788$).



Slika 5: Najboljši model za napovedovanje anizidinskih števil. Uporabljeni parametri: ločljivosti 4 cm^{-1} , obdelava drugi odvod SNV, izbor valovnih števil s korelacijo na podlagi Pearsonovega koeficienta.

Pri vseh modelih za napovedovanje anizidinskega števila so bile vrednosti *RMSE* večje od 16,00, kar je zelo slab rezultat. Poleg tega je tudi oblika grafa odvisnosti napovedanih vrednosti anizidinskega števila od izmerjenih vrednosti nenavadna, saj je zgostitev vrednosti v začetnem delu veliko večja kot v končnem delu. Vzrok za to je verjetno dejstvo, da v začetnih vzorcih pričakujemo majhne količine sekundarnih produktov oksidacije (6).

S kemijsko metodo določanja anizidinskega števila merimo vsebnost 2-alkenalov, 2,4-dienalov in v manjši meri vsebnost nasičenih aldehydov (16). V IR spektrih je dobro definiran fragment aldehydne skupine C-H med 2900 in 2700 cm^{-1} in aldehydne skupine C=O v okolici 1721 cm^{-1} . V območju absorpcije aldehydne skupine C-H absorbirajo tudi CH_2 skupine maščobnih kislin, ki prekrijejo signal aldehydne skupine. Podoben pojav opazimo tudi v območju absorpcije fragmenta aldehydne skupine C=O, kjer se pojavi absorpcijski pas estrske skupine trigliceridov in povzroči manj jasen signal fragmenta C=O (16). Prekrivanje absorpcijskih pasov bi lahko predstavljalo enega od vzrokov za slabše ugotavljanje anizidinskih števil z našim modelom.

Ker smo v učnem setu dobili *RMSE_{učni}* (16,941), na validacijskem pa povečano vrednost *RMSE_{val}* (26,788), lahko tudi sklepamo, da je prišlo do pojava pretiranega prilagajanja modela. Podoben pojav so opazili pri raziskavah kvantifikacije koruznega in sončničnega olja, dodanega olivnemu olju, kjer so na validacijskem setu izračunali velik *RMSEP* (2,34 % v/v) v primerjavi z *RMSEC* učnega (kalibracijskega) seta (0,019 % v/v) (38). Ker smo na modelu učnega seta izračunali parametre PLS, ki očitno niso bili značilni za celotno populacijo vzorcev, smo na validacijskem setu dobili slabše rezultate. Morda bi se lahko temu pojavu izognili z uporabo večjega števila vzorcev (53).

Opazili smo, da so bile izmerjene laboratorijske vrednosti anizidinskih števil v zadnjih setih meritev zelo velike. To bi lahko predstavljalo vzrok za slabše ugotovljene vrednosti anizidinskih števil. Che Man je v svoji študiji napovedovanja vrednosti anizidinskih števil izpostavil, da se je njihov model izkazal kot uspešen v primeru, ko so bile izmerjene vrednosti manjše od 17. Pri večjih vrednostih se je zmanjšala natančnost napovedi (16). Tudi v našem primeru bi lahko prišlo do podobnega pojava, saj so bile nekatere izmerjene vrednosti celo večje od 150.

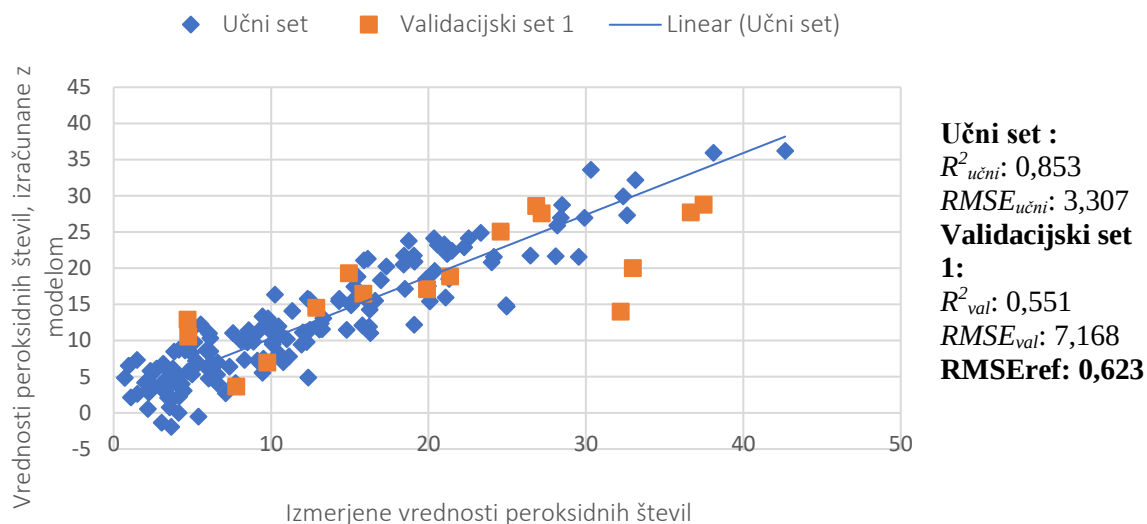
V bližnjem območju IR spektra ugotavljanje anizidinskega števila ni bilo tako uspešno, saj v tem območju karbonilne skupine nimajo absorpcijskih pasov (31). V srednjem območju

IR spektra (MIR) imajo karbonilne skupine značilne absorpcijske pasove, zato bi v našem primeru morda pričakovali boljšo napovedno vrednost modela. V primerjavi z modelom, ki ga je izračunal Yildiz z uporabo prvega odvoda ($R^2_{učni} = 0,924$; $R^2_{validacijski} = 0,881$), so naše vrednosti R^2 v učnem in validacijskem setu manjše ($R^2_{učni} = 0,791$, $R^2_{val} = 0,6$) (31). Glede na naš rezultat ne moremo potrditi, da je uporaba srednjega območja IR spektra boljša izbira za določanje anizidinskega števila.

Potrebno je izpostaviti dejstvo, da je pri eksperimentalnem določanju anizidinskega števila prišlo do napake v postopku, kar smo ugotovili šele po zaključku našega dela. Izračunani modeli za ugotavljanje anizidinskega števila so zato neuporabni, iz rezultatov pa ne moremo pridobiti jasnih zaključkov. Za razvoj metode za ugotavljanje anizidinskega števila bi morali izvesti novo raziskavo s pravilno izvedbo postopka za določanje anizidinskega števila.

4.1.3 Peroksidno število

Najboljši model za napovedovanje peroksidnega števila (slika 6) smo dobili z uporabo ločljivosti 4 cm^{-1} , pri uporabljeni normalizaciji in izborom valovnih števil s korelacijo. Za model smo izračunali vrednost učnega seta $R^2_{učni}$ (0,853), $RMSE_{učni}$ pa je znašal 3,307, kar je več v primerjavi z $RMSE_{ref}$ učnega seta (0,622). Za validacijski set 1 smo izračunali R^2_{val} (0,551), $RMSE$ pa je bil v primerjavi z vrednostjo učnega seta (3,307) povečan (7,168). Rezultati so v primerjavi z vrednostmi iz literature (preglednica III, str. 10) slabši. Vrednosti $RMSE$ naših modelov za napovedovanje peroksidnih števil so bile precej večje kot v podobnih raziskavah, kjer so bili $RMSE$ za učni (kalibracijski) in za validacijski set manjši od 1 (preglednica III).



Slika 6: Najboljši model za napovedovanje vrednosti peroksidnih števil. Uporabljeni parametri: ločljivosti 4 cm^{-1} , obdelava z normalizacijo, izbor valovnih števil s korelacijo na podlagi Pearsonovega koeficienta.

Pri titrimetričnem določanju peroksidnega števila je možnost eksperimentalnih napak precejšnja. Pri reakciji lahko pride do adicije joda na dvojne vezi, poleg tega pa lahko kisik povzroči sproščanje jodidnih ionov iz kalijevega jodida (KI). Oba pojava lahko prispevata k napačnemu določanju peroksidnega števila. Metoda se slabše obnese tudi pri določanju manjših vrednosti peroksidnih števil zaradi nejasnega preskoka barve v končni točki titracije, zaradi česar je lahko metoda tudi precej subjektivna (6). Zaradi teh dejavnikov bi lahko prišlo do napak v eksperimentalnem delu določanja peroksidnega števila. Vpliv omenjenih dejavnikov na določanje končne točke titracije bi lahko zmanjšali z uporabo potenciometrične metode.

Pri iskanju valovnih števil, pri katerih absorbirajo peroksidi, v literaturi nismo našli podatka za pomemben fragment pri določanju peroksidnega števila, in sicer C-O-O-C-(O-O-H). To bi lahko vplivalo na slabšo zanesljivost ugotavljanja peroksidnih števil. Možno je tudi, da je prišlo do dodatnih kemijskih sprememb, ki vplivajo na spekter in posledično otežijo ugotavljanje peroksidnega števila z uporabljeno metodo.

Peroksidno število odraža količino prisotnih hidroperoksidov v vzorcu, zato sprva pričakujemo povečanje vrednosti peroksidnih števil, nato pa se vrednosti pričnejo zmanjševati zaradi nastanka sekundarnih produktov oksidacije. Nastanek in razpad hidroperoksidov v različnih rastlinskih oljih poteka z različno hitrostjo (15), zato je kljub pričakovanemu zmanjšanju vrednosti peroksidnih števil ugotavljanje trenutne vrednosti z

metodo IR zahtevno. Če je hitrost nastanka peroksidov večja od hitrosti nastanka sekundarnih produktov oksidacije, peroksidno število sovпада s stopnjo žarkosti olja. Če pa je hitrost razpada peroksidov v sekundarne produkte večja od hitrosti nastanka peroksidov, dobimo manjše vrednosti peroksidnih števil kljub temu, da je olje oksidirano (13, 54). Peroksidi so zelo nestabilni, kar še dodatno poveča kompleksnost sprememb v vzorcih olj in masel (7). Iz tega sklepamo, da je naš model za napovedovanje peroksidnih števil slabše ponazoril dejansko stanje v validacijskem setu.

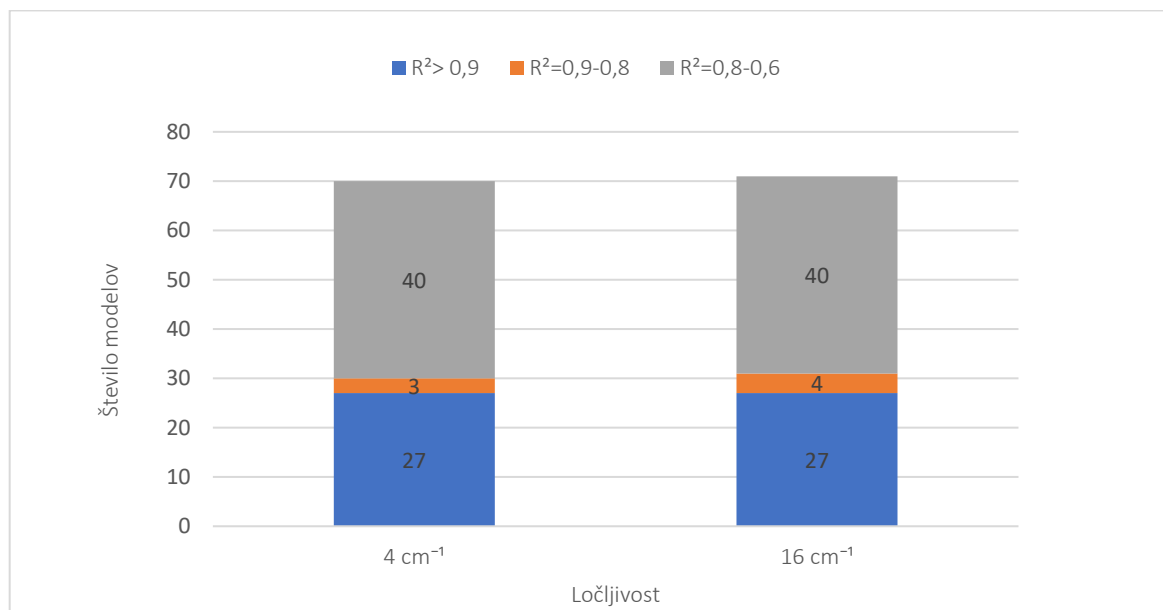
Za ugotavljanje peroksidnega števila smo poleg validacijskega seta 1 uporabili tudi validacijski set 2 iz zadnje, 3. časovne točke (preglednica V, str. 15). S tem smo želeli dodatno preveriti uporabnost naših modelov, vendar so bili rezultati zelo slabi in večinoma neuporabni. Vsi izračunani R^2_{val} so bili manjši od 0,6, $RMSE_{val}$ pa zelo veliki. To smo pripisali eksperimentalni napaki referenčne metode, zaradi katere je bila vrednost $RMSE_{ref}$ v primerjavi z učnim setom (0,623) precej visoka, saj je znašala kar 5,509. Standardne deviacije meritev so bile v povprečju višje od meritev učnega seta, poleg tega pa je bilo območje koncentracij izven območja učnega seta. Zato je razumljivo, da smo z modeli, izračunanimi na učnem setu vzorcev slabše ugotovili vrednosti peroksidnih števil v validacijskem setu 2.

V študijah peroksidnega števila na kokosovem (32) in orehovem (33) olju so uporabo FTIR spektroskopije opredelili kot potencialno zamenjavo za kemijsko določanje peroksidnega števila. Naši rezultati niso bili dovolj dobri, da bi lahko to potrdili. Kljub slabšim rezultatom parametrov za vrednotenje modelov v primerjavi s podatki iz literature, je grafični prikaz rezultatov boljši kot pri anizidinskem številu. Vrednosti so razporejene bolj enakomerno, tudi pri validacijskem setu vzorcev v sredinskem delu premice (izmerjene vrednosti 13–30 meq/kg) opazimo precejšnje prilagajanje premici.

4.2 Vrednotenje parametrov

4.2.1 Ločljivost

Pri primerjavi ločljivosti 4 cm^{-1} in 16 cm^{-1} (slika 7) smo ugotovili, da ni bilo večjih razlik v številu obravnavanih modelov, ki smo jih dobili pri posamezni ločljivosti. V območju R^2 od $0,9$ – $0,8$ smo dobili pri ločljivosti 16 cm^{-1} en model več kot pri ločljivosti 4 cm^{-1} . Glede na majhno razliko v številu modelov pri posamezni ločljivosti ne moremo z gotovostjo potrditi, da z izbiro ločljivosti 4 ali 16 cm^{-1} bistveno pripomoremo k številu uporabnih modelov.



Slika 7: Primerjava števila uporabnih modelov med ločljivostma 4 cm^{-1} in 16 cm^{-1} .

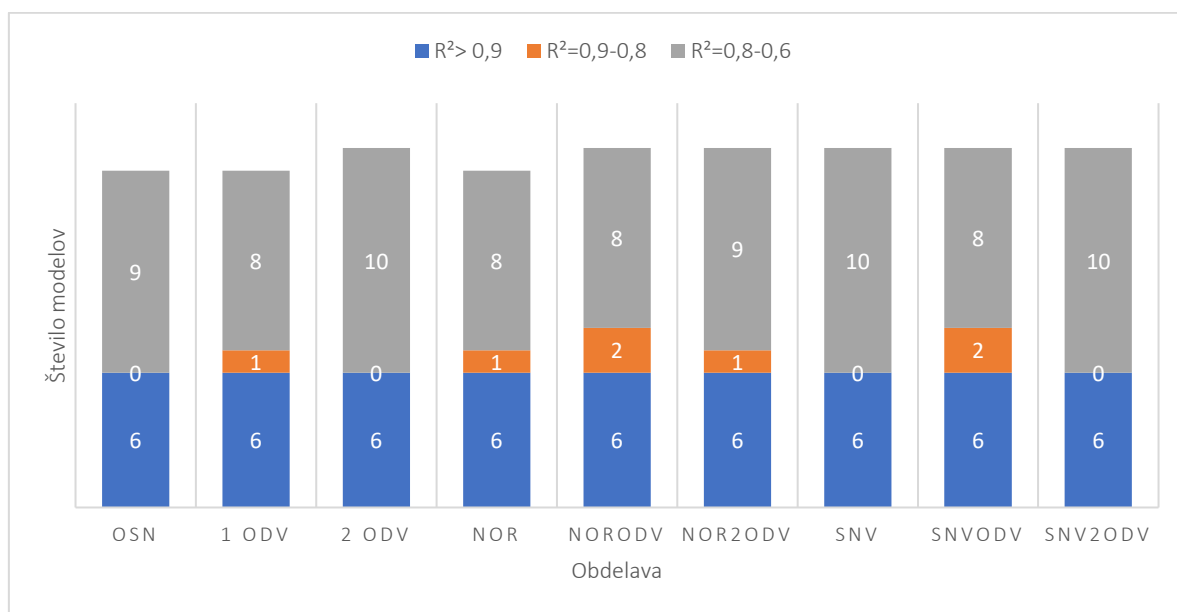
V študiji uporabe različnih obdelav na spektrih vzorcev rastlinskih listov so ugotovili, da so spektri rastlinskega materiala, posneti pri večji ločljivosti, bolj informativni, kljub večjim prekrivanjem vrhov (55). V magistrski nalogi Nataše Kopač so prišli do nasprotnega zaključka, saj so najboljše rezultate dobili z uporabo najmanjše ločljivosti (8 cm^{-1}). Sklepali so, da je pri manjši ločljivosti količina odvečnih informacij iz spektra zmanjšana, kar omogoča boljšo napovedno moč modela (52). Izbira ločljivosti za snemanje spektrov vzorcev rastlinskih olj in masel je očitno kompleksna odločitev. Kljub podaljšanemu času analize je morda smiselno posneti spektre pri večji in manjši ločljivosti ter nato primerjati rezultate.

Za boljše razumevanje vpliva ločljivosti na število uporabnih modelov bi bilo potrebno nadaljnje raziskovanje ter uporaba večjega števila vzorcev.

4.2.2 Obdelave spektrov

Skupni prikaz števila modelov pri obeh ločljivostih

Želeli smo ovrednotiti vpliv obdelave spektrov na število uporabnih modelov za ugotavljanje izbranih farmakopejskih števil pri večji (4 cm^{-1}) in manjši (16 cm^{-1}) ločljivosti, kar prikazuje slika 8. Število najboljših modelov je bilo enako za vseh devet uporabljenih funkcij. Ugotovili smo, da smo največje število modelov v območju R^2 1–0,8 dobili z uporabo funkcij odvod normalizacije in odvod SNV (osem modelov). Z uporabo drugega odvoda normalizacije, normalizacije in prvega odvoda smo v omenjenem območju dobili sedem modelov. Na podlagi rezultatov lahko ugotovimo, da je bil pozitiven vpliv obdelav na uporabnost modelov majhen. Pričakovano je bil rezultat najslabši pri uporabljenem osnovnem spektru.

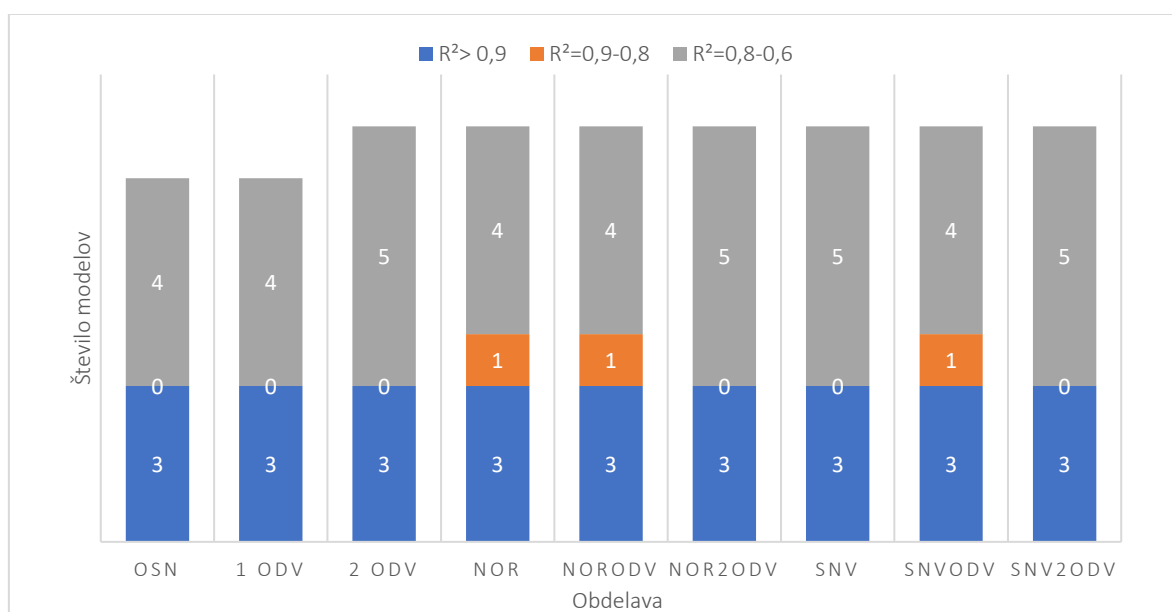


Slika 8: Število modelov glede na vrednosti R^2 , ki smo jih dobili pri posamezni obdelavi spektrov pri obeh ločljivostih skupaj.

Pri uporabi večje ločljivosti (4 cm^{-1}) lahko v IR spektrih bolje ločimo ožje vrhove kot pri uporabi manjše ločljivosti (16 cm^{-1}) (47). V magistrski nalogi Janke Straus so ugotovili, da je težko opredeliti, ali je boljša izbira večje ali manjše ločljivosti. Uporaba manjše ločljivosti je sicer hitrejša, vendar je za boljše ločevanje med posameznimi vrhovi potrebna uporaba obdelav na posnetih spektrih (56). Pri uporabi večje ločljivosti se obenem tudi poveča delež šuma (47). Z obdelavami želimo odstraniti nepomembne signale (šum) in ojačati ali odkriti signale, pomembne za analizo.

Prikaz števila modelov pri ločljivosti 4 cm⁻¹

Število modelov z vrednostmi R^2 , večjimi od 0,9, je bilo pri ločljivosti 4 cm⁻¹ enako pri vseh obdelavah (slika 9). Pri normalizaciji, odvodu normalizacije in odvodu normalizacije SNV smo dobili po en model z vrednostmi R^2 0,9–0,8. Skupno smo najmanj modelov, ki so ustrezali postavljenim kriterijem dobili pri uporabi odvoda in pri osnovnih spektrih vzorcev. Rezultati so med posameznimi obdelavami pri ločljivosti 4 cm⁻¹ primerljivi, nekoliko slabši so le pri uporabi osnovnega spektra ter pri uporabi prvega odvoda.

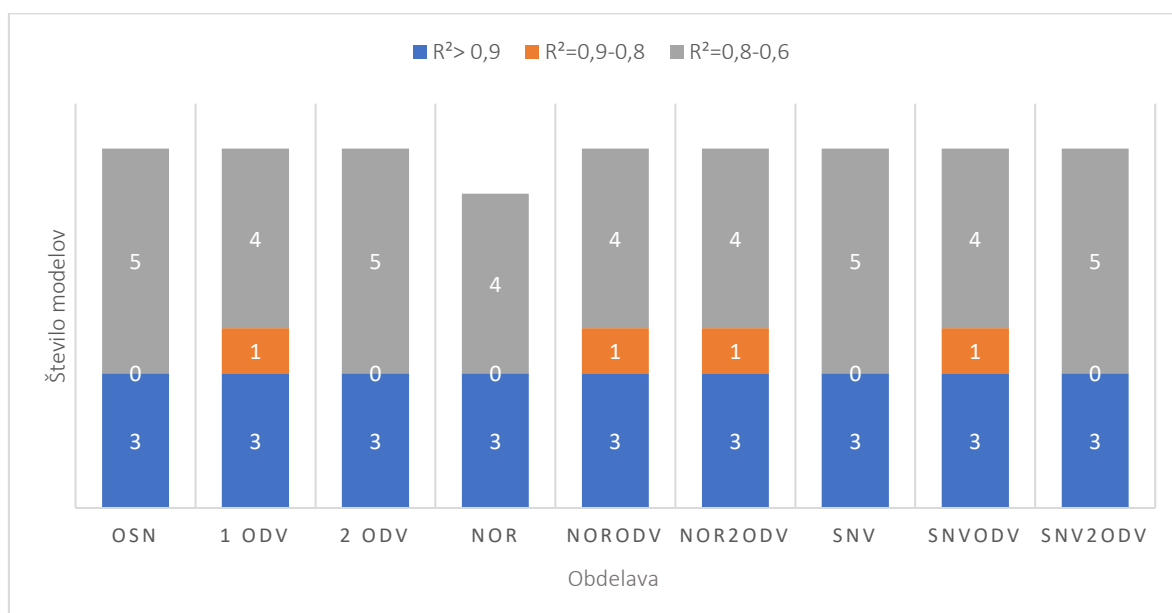


Slika 9: Število modelov glede na vrednosti R^2 , ki smo jih dobili pri posamezni obdelavi spektrov pri ločljivosti 4 cm⁻¹.

Pri večji ločljivosti pričakujemo več šuma, katerega vpliv lahko zmanjšamo z uporabo različnih obdelav (47, 55). Ker smo pri uporabi obdelav (razen prvi odvod) v primerjavi z osnovnim spektrom pri ločljivosti 4 cm⁻¹ dobili nekaj uporabnih modelov več, bi lahko to pripisali pozitivnemu vplivu obdelav na zmanjšanje šuma.

Prikaz števila modelov pri ločljivosti 16 cm^{-1}

Na sliki 10 je prikazano število modelov, ki smo jih dobili z uporabo različnih obdelav pri ločljivosti 16 cm^{-1} . Pri uporabljenih funkcijah odvod in osnovni spekter smo v primerjavi z ločljivostjo 4 cm^{-1} dobili po en model več. Pri obdelavi normalizacija smo opazili nasproten pojav, saj je bilo število modelov za enega manjše kot pri ločljivosti 4 cm^{-1} . Pri obdelavah drugi odvod normalizacije in odvod smo dobili po en model več z vrednostmi R^2 med 0,9 in 0,8 kot pri ločljivosti 4 cm^{-1} .

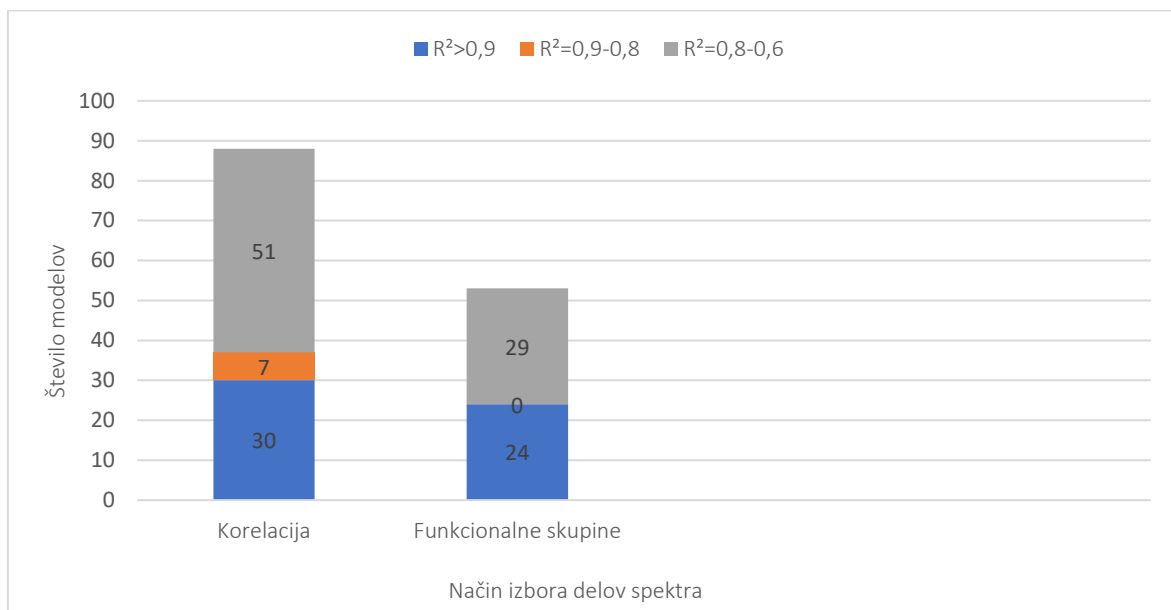


Slika 10: Število modelov glede na vrednosti R^2 , ki smo jih dobili pri posamezni obdelavi spektrov pri ločljivosti 16 cm^{-1} .

Najmanj uporabnih modelov smo dobili pri uporabi normalizacije. Na podlagi rezultatov ne moremo zaključiti, da so uporabljene obdelave pri ločljivosti 16 cm^{-1} boljše od osnovnega spektra. Pri manjši ločljivosti pričakujemo manj šuma kot pri večji, zato je razumljivo, da z uporabo obdelav ne dosežemo večjega izboljšanja rezultatov.

4.2.3 Primerjava načinov izbora valovnih števil

Na sliki 11 je prikazano število modelov, ki smo jih dobili pri izboru delov spektra s korelacijo ter pri izboru delov spektra na podlagi funkcionalnih skupin. Pri izboru valovnih števil s korelacijo je bilo skupno število modelov z $R^2 > 0,6$ večje (88 modelov) kot pri načinu izbora glede na funkcionalne skupine (53 modelov). Pri tem smo skupno dobili 30 modelov z R^2 , večjim od 0,9, in sedem modelov z R^2 med 0,9 in 0,8 (dobri modeli), kar je v primerjavi z izbiro valovnih števil glede na funkcionalne skupine v obeh primerih boljši rezultat (24 najboljših in nič dobrih modelov). Iz tega lahko zaključimo, da je bila uporaba korelacije za izbiro valovnih števil boljša izbira kot izbor delov spektra glede na funkcionalne skupine.



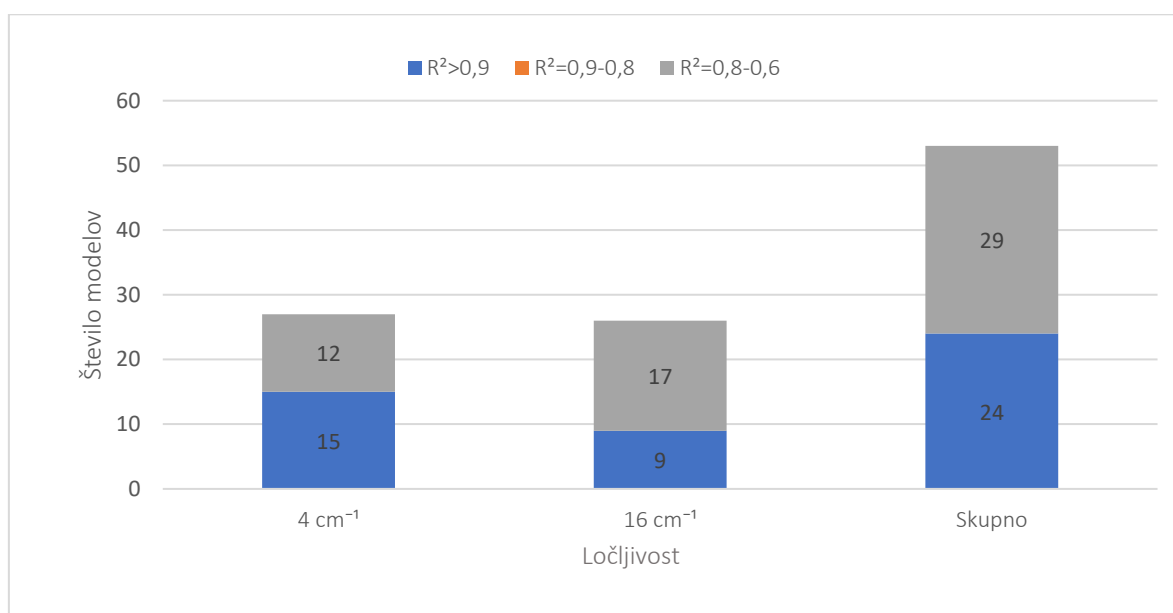
Slika 11: Prikaz števila modelov, ki smo jih dobili z uporabo izbora delov spektra s korelacijo in glede na funkcionalne skupine.

Pri izboru valovnih števil glede na funkcionalne skupine smo uporabili večja območja spektra, v katerih absorbirajo značilne funkcionalne skupine in fragmenti, in ne posameznih valovnih števil. Poleg tega smo za vsa tri farmakopejska števila izbrali enako območje spektra, v katerega smo vključili dele spektra, značilne za posamezno število. Izbrano območje je torej vsebovalo informacije o funkcionalnih skupinah za vsa tri farmakopejska števila hkrati. V literaturi zasledimo, da so pogosto po grafičnem pregledu spektrov izbirali manjša območja IR spektra ali posamezne vrhove, ki so ustrezali značilnim funkcionalnim skupinam (14, 15, 37). Ker se območja spektra med seboj prekrivajo, je to lahko vzrok za slabše povezovanje farmakopejskega števila z izbranim območjem in posledično slabše modele za ugotavljanje števil.

Pri izboru valovnih števil s korelacijo smo za vsako valovno število posebej izračunali Pearsonov koeficient korelacije s spremenljivko, ki smo jo želeli določati (kislinsko, anizidinsko, peroksidno število). Za izdelavo modela smo torej uporabili valovna števila, pri katerih je bila korelacija največja, bodisi pozitivna ali negativna. Izkazalo se je, da je takšen način izbora delov spektra smiseln, saj smo tako skupno dobili kar 35 uporabnih modelov več kot pri izboru spektra na podlagi funkcionalnih skupin. Izračun korelacije očitno omogoča večjo selektivnost pri izboru ustreznih delov spektra kot uporaba podatkov o valovnih številih za posamezne funkcionalne skupine. Zaradi kompleksnosti izračunov s programsko opremo ne moremo navesti konkretnih območij spektra, ki so najbolj korelirala s posameznim farmakopejskim številom.

4.2.4 Izbor delov spektra na podlagi funkcionalnih skupin

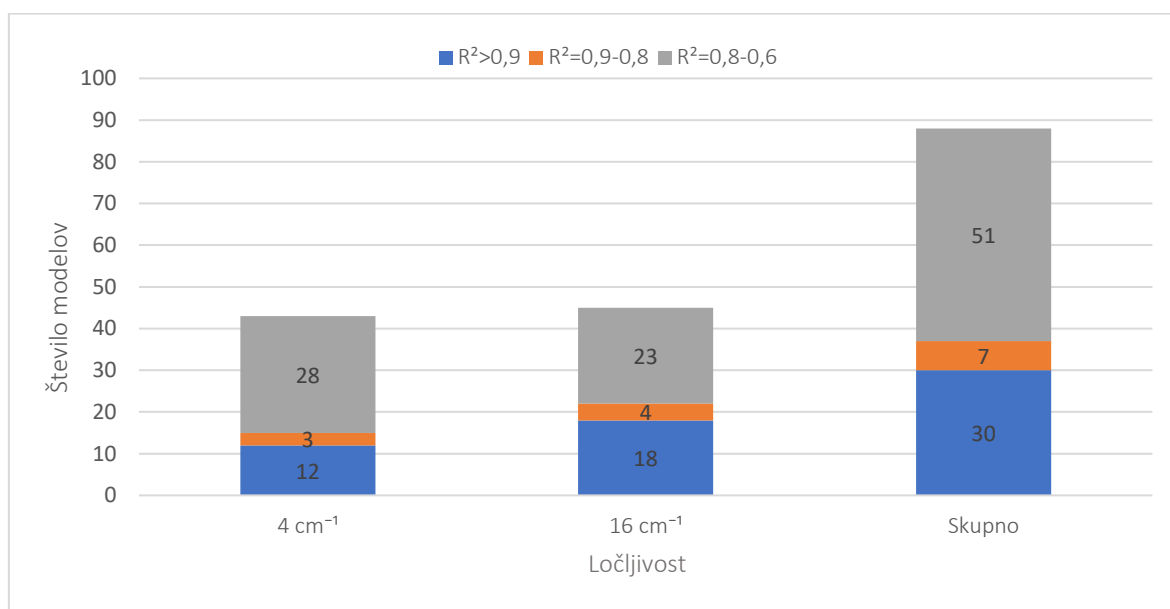
Pri izboru delov spektra na podlagi funkcionalnih skupin smo pri ločljivosti 4 cm^{-1} dobili 28 modelov, pri ločljivosti 16 cm^{-1} pa 26 modelov, ki so ustrezali postavljenim kriterijem ($R^2 > 0,6$). Pri ločljivosti 4 cm^{-1} smo dobili šest najboljših modelov več kot pri ločljivosti 16 cm^{-1} . Skupno smo z izborom delov spektra na podlagi funkcionalnih skupin dobili 53 modelov, od tega 24 najboljših (slika 12).



Slika 12: Število modelov, ki smo jih dobili z izborom delov spektra na podlagi funkcionalnih skupin pri obeh ločljivostih.

4.2.5 Izbor delov spektra na podlagi korelacije

Z izborom delov spektra na podlagi korelacije smo pri ločljivosti 4 cm^{-1} v primerjavi z ločljivostjo 16 cm^{-1} dobili šest modelov z $R^2 < 0,9$ manj (slika 12). Skupno smo dobili 30 najboljših modelov ($R^2 > 0,9$), sedem dobrih modelov ($R^2\ 0,9\text{--}0,8$) in 51 slabših modelov ($R^2\ 0,8\text{--}0,6$).



Slika 12: Število modelov, ki smo jih dobili z izborom delov spektra s korelacijo pri obeh ločljivostih.

5 SKLEP

V magistrski nalogi smo raziskovali metodo za ugotavljanje kislinskega, anizidinskega in peroksidnega števila v petih vzorcih rastlinskih olj in enem vzorcu masla različnih proizvajalcev. Pri tem smo uporabili metodo ATR-IR spektroskopije v povezavi z regresijo delnih najmanjših kvadratov ter vrednosti farmakopejskih števil, ki jih je določala Laura Činč v še neobjavljeni magistrski nalogi. Analizo vzorcev smo izvajali v časovnem obdobju devetih mesecev, pri čemer smo želeli zajeti čim več podatkov, da bi bila napovedna vrednost izračunanih modelov čim večja. Podatke smo razdelili na učni in validacijski set. Na učnem setu smo izračunali parametre modelov, ki smo jih uporabili na validacijskem setu, modele pa smo med seboj primerjali in vrednotili s pomočjo vrednosti R^2 in $RMSE$. Izračunane modele smo razdelili glede na vrednosti R^2 v štiri skupine: najboljši, dobri, slabši in slabi.

Ugotovili smo, da bi lahko z uporabo ATR-IR spektroskopije s pomočjo metode PLS učinkovito ugotavljali vrednosti kislinskih števil, saj smo v tem primeru dobili zelo dober model ($R^2 = 0,994$; $RMSE = 0,569$) tudi v primerjavi s predhodno opravljenimi študijami. Pri tem smo uporabili ločljivost 16 cm^{-1} , obdelavo SNV in izbor delov spektra na podlagi korelacije. Območje spektra, ki ga opredeljuje kislinsko število, je dobro definirano, poleg tega pa so bile tudi vrednosti $RMSE_{ref}$ referenčne metode za določanje kislinskega števila precej majhne.

Pri laboratorijskih meritvah anizidinskih števil je prišlo do napake v postopku, zato so naši modeli za ugotavljanje anizidinskih števil neuporabni. Pri meritvah je bila napačno izvedena meritev za slepi vzorec, česar ni bilo mogoče naknadno popraviti. Za ovrednotenje uporabnosti IR spektroskopije v kombinaciji s PLS za ugotavljanje anizidinskih števil bi bilo potrebno izvesti novo raziskavo s pravilno izvedbo laboratorijskega dela.

Za ugotavljanje peroksidnega števila z našo metodo nismo dobili zadovoljivih rezultatov. Najverjetneje je prišlo do prekrivanja absorpcijskih pasov funkcionalnih skupin, ki jih sicer določamo s peroksidnim številom, z drugimi funkcionalnimi skupinami. Pri ugotavljanju peroksidnega števila nismo bili tako uspešni, kar bi lahko bila posledica kompleksnosti sprememb v rastlinskih oljih in maslih. Nestabilnost peroksidov in slabša definiranost funkcionalnih skupin v IR spektrih bi lahko povzročila slabše rezultate. Sklepamo, da so bili modeli validacijskega seta slabši zaradi kombinacije naštetih vzrokov.

Pri izbiri ločljivosti v splošnem nismo mogli potrditi, da je katera od izbranih ločljivosti boljša. Tudi v povezavi z drugimi proučevanimi parametri (obdelava, način izbora delov spektra) razlike niso bile velike, zato bi bile potrebne nadaljnje raziskave.

Pri izboru valovnih števil na podlagi korelacije smo dobili več uporabnih modelov v primerjavi z izborom glede na funkcionalne skupine, povezane s preiskovanimi farmakopejskimi števili. Zaključimo lahko, da je način izbire valovnih števil na podlagi korelacije boljši od izbire valovnih števil na podlagi funkcionalnih skupin. Morda je bil naš način izbire valovnih števil manj primeren, saj smo hkrati uporabili valovna števila, značilna za kislinsko, anizidinsko in peroksidno število. Potrebno bi bilo preveriti, ali bi bili rezultati boljši, če bi uporabili ožja območja IR spektra za posamezno farmakopejsko število.

Z uporabo različnih obdelav smo zelo malo izboljšali modele, nekoliko boljše rezultate smo dobili le pri večji ločljivosti (4 cm^{-1}). Pri večji ločljivosti je povečana tudi količina prisotnega šuma, s primerno uporabo obdelav pa lahko ta vpliv zmanjšamo in izboljšamo rezultate. Z večjim številom vzorcev in izračunanih modelov bi verjetno dobili še boljši vpogled na vpliv obdelav na uporabnost modelov.

Uporaba kemijskih metod za določanje kislinskega in peroksidnega števila zahteva uporabo več zdravju škodljivih reagentov in je bolj podvržena eksperimentalnim napakam pri izvedbi. Pri določanju anizidinskega števila je potrebna ustrezna priprava vzorcev ter rokovanje z reagenti. V nasprotju s tem pri ATR-IR spektroskopiji reagenti niso potrebni, analiza pa je zelo hitra in enostavna, zato predstavlja velik potencial na področju ocenjevanja stopnje oksidacije rastlinskih olj in masel z ugotavljanjem farmakopejskih števil. Za preizkušanje realne uporabne vrednosti naše metode bi potrebovali dodatne raziskave, v katere bi vključili več vzorcev. Poleg tega bi bila potrebna tudi boljša časovna usklajenost laboratorijskih meritev in snemanja spektrov na istih vzorcih.

6 LITERATURA

1. DE SANTANA FB, GONTIJO LC, MITSUTAKE H, MAZIVILA SJ, DE SOUZA LM, BORGES NETO W. Non-destructive fraud detection in rosehip oil by MIR spectroscopy and chemometrics. *Food Chem* 2016;**209**:228–233.
2. GÜNZLER H, GREMLICH H-U. *IR Spectroscopy: An Introduction*. V: Wileyvch. Cambridge: Wiley-VCH, 2002, 347.
3. BU D. Chemometric Analysis for Spectroscopy Bridging the Gap between the State and Measurement of a Chemical System.
[http://www.camo.com/downloads/resources/application_notes/Chemometric Analysis for Spectroscopy.pdf](http://www.camo.com/downloads/resources/application_notes/Chemometric_Analysis_for_Spectroscopy.pdf) (dostopano 9 mar 2018).
4. COZZOLINO D. Near Infrared Spectroscopy in Natural Products Analysis. *Planta Med* 2009;**75**:746–756.
5. KOČEVAR GLAVAČ N, JANEŠ D, LUMPERT M, STOJILKOVSKI K, KOKALJ M, ET. AL. Sodobna kozmetika : sestavine naravnega izvora. Velenje: Širimo dobro besedo, 2015, 77, 93, 102, 116, 121, 137.
6. C. AKOH CASIMIR BMD. Chemistry of Lipid Oxidation. V: *FOOD LIPIDS Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2008, 157, 299, 387–396, 390, 399.
7. WASOWICZ E, GRAMZA A, HES M idr. Oxidation of lipids in food. *J Food Nutr Sci* 2004;**13**:87–100.
8. SATTAR A, DEMAN JM, ALEXANDER JC. Effect of wavelength on light induced quality deterioration of edible oils and fats. *Can Inst Food Sci Technol J* 1976;**9**:108–113.
9. CHOE E, MIN DB. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2006;**5**:169–186.
10. GRASAS, JULIO. Determination of some inorganic metals in edible vegetable oils by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). 2008;**59**:239–244.
11. PRESCHA A, GRAJZER M, DEDYK M, GRAJETA H. The Antioxidant Activity and Oxidative Stability of Cold-Pressed Oils. *J Am Oil Chem Soc* 2014;**91**:1291–1301.
12. OBREZA A, HUMAR M, ŠMID-KORBAR J idr. *Farmacevtski terminološki slovar*. Založba ZRC, 2013
13. MILLER M. Oxidation of food grade oils. *Plant Food Res*.
[https://www.oilsfats.org.nz/documents/Oxidation 101.pdf](https://www.oilsfats.org.nz/documents/Oxidation%20101.pdf) (dostopano 19 mar 2018).
14. WÓJCICKI K, KHMELINSKII I, SIKORSKI M, SIKORSKA E. Near and mid infrared spectroscopy and multivariate data analysis in studies of oxidation of edible oils. *Food Chem* 2015;**187**:416–423.
15. GUILLÉN MD, CABO N. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chem* 2002;**77**:503–510.
16. CHE MAN YB, SETIOWATY G. Determination of anisidine value in thermally oxidized palm olein by fourier transform infrared spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 1999;**76**:243–247.
17. JIANG X, LI S, XIANG G idr. Determination of the acid values of edible oils via FTIR spectroscopy based on the OH stretching band. *Food Chem* 2016;**212**:585–589.
18. STUART BH. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Chichester, West Sussex: Wiley, 2004, 51–56.

19. LEE LC, LIONG C-Y, JEMAIN AA. A contemporary review on Data Preprocessing (DP) practice strategy in ATR-FTIR spectrum. *Chemom Intell Lab Syst* 2017;**163**:64–75.
20. LUNA AS, DA SILVA AP, FERRÉ J, BOQUÉ R. Classification of edible oils and modeling of their physico-chemical properties by chemometric methods using mid-IR spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2013;**100**:109–114.
21. ROBINSON W. J, SKELLY FRAME M. E, FRAME II M. G. Undergraduate instrumental analysis. New York: Marcel Dekker, 2005, 235–236.
22. HUANG J, ROMERO-TORRES S, MOSHGBAR M. Practical Considerations in Data Pre-treatment for NIR and Raman Spectroscopy. *Am. Pharm. Rev.* 2010.<http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/116330-Practical-Considerations-in-Data-Pre-treatment-for-NIR-and-Raman-Spectroscopy/> (dostopano 19 mar 2018).
23. GAUTAM R, VANGA S, ARIESE F, UMAPATHY S. Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy. V: Gautam et al. *EPJ Techniques and Instrumentation*. Bangalore, Indija: Springer, 2011
24. ROHMAN A, ARIANI R. Authentication of Nigella sativa seed oil in binary and ternary mixtures with corn oil and soybean oil using FTIR spectroscopy coupled with partial least square. *ScientificWorldJournal* 2013;**2013**:740,142.
25. CRAMER III RD. Partial Least Squares (PLS): Its strengths and limitations. *Perspect Drug Discov Des* 1993;**1**:26–278.
26. Coefficient of Determination (R-Squared) - MATLAB & Simulink. <https://www.mathworks.com/help/stats/coefficient-of-determination-r-squared.html?requestedDomain=true&nocookie=true> (dostopano 19 mar 2018).
27. DHANANI A, LEE SY, PHOTHILIMTHANA P, PARDOS Z, PHOTHILIMTHANA PM. A Comparison of Error Metrics for Learning Model Parameters in Bayesian Knowledge Tracing. V: Technical Report No. UCB/EECS-2014-131. Berkeley, 2014
28. SALKIND N. Encyclopedia of Research Design. 2455 Teller Road, Thousand Oaks California 91320 United States: SAGE Publications, Inc., 2010, 1287–1288.
29. ANSCOMBE FJ. Graphs in Statistical Analysis. *Am Stat* 1973;**27**:17–21.
30. VOORT FR, ISMAIL AA, SEDMAN J, EMO G. Monitoring the oxidation of edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 1994;**71**:243–253.
31. YILDIZ G, WEHLING RL, CUPPETT SL. Method for determining oxidation of vegetable oils by near-infrared spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 2001;**78**:495–502.
32. MARINA AM. Quantitative Analysis of Peroxide Value in Virgin Coconut Oil by ATRFTIR Spectroscopy. *Open Conf Proc J* 2013;**4**:53–56.
33. LIANG P, CHEN C, ZHAO S idr. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Oxidation and Peroxide Value Evaluation in Virgin Walnut Oil. *J Spectrosc* 2013;**2013**:1–5.
34. VLACHOS N, SKOPELITIS Y, PSAROUDAKI M, KONSTANTINIDOU V, CHATZILAZAROU A, TEGOU E. Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Anal Chim Acta* 2006;**573–574**:459–465.
35. MAHBOUBIFAR M, YOUSEFINEJAD S, ALIZADEH M, HEMMATEENEJAD B. Prediction of the acid value, peroxide value and the percentage of some fatty acids in edible oils during long heating time by chemometrics analysis of FTIR-ATR spectra. *J Iran Chem Soc* 2016;**13**:2291–2299.
36. QU H, OU D, CHENG Y. Background correction in near-infrared spectra of plant extracts by orthogonal signal correction. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005;**6**:838–843.

37. DUBOIS J, VAN DE VOORT FR, SEDMAN J, ISMAIL AA, RAMASWAMY HR. Quantitative Fourier Transform Infrared Analysis for Anisidine Value and Aldehydes in Thermally Stressed Oils. *JAACS, J Am Oil Chem Soc* 1996;**73**:787–794.
38. ROHMAN A, CHE MAN YB. Quantification and Classification of Corn and Sunflower Oils as Adulterants in Olive Oil Using Chemometrics and FTIR Spectra. *Sci World J* 2012;**2012**:1–6.
39. M OBEIDAT S, KHANFAR M, OBEIDAT W. Classification of edible oils and uncovering adulteration of virgin olive oil using FTIR with the aid of chemometrics. *Aust J Basic Appl Sci* 2009;**3**:2048–2053.
40. VASCONCELOS M, COELHO L, BARROS A, DE ALMEIDA JMMM. Study of adulteration of extra virgin olive oil with peanut oil using FTIR spectroscopy and chemometrics. V: *Cogent Food & Agriculture*. Porto, Portugalska: Cogent, 2015
41. POIANA M-A, ALEXA E, MUNTEANU M-F, GLIGOR R, MOIGRADEAN D, MATEESCU C. Use of ATR-FTIR spectroscopy to detect the changes in extra virgin olive oil by adulteration with soybean oil and high temperature heat treatment. *Open Chem* 2015;**13**. doi:10.1515/chem-2015-0110
42. DE LA MATA P, DOMINGUEZ-VIDAL A, BOSQUE-SENDRA JM, RUIZ-MEDINA A, CUADROS-RODRÍGUEZ L, AYORA-CAÑADA MJ. Olive oil assessment in edible oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics. *Food Control* 2012;**23**:449–455.
43. JOVIĆ O, JOVIĆ A. FTIR-ATR adulteration study of hempseed oil of different geographic origins. *J Chemom* 2017;**31**:2938.
44. QUIÑONES-ISLAS N, MEZA-MÁRQUEZ OG, OSORIO-REVILLA G, GALLARDO-VELAZQUEZ T. Detection of adulterants in avocado oil by Mid-FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Food Res Int* 2013;**51**:148–154.
45. FTIR Sample Techniques: Attenuated Total Reflection (ATR). <https://www.thermofisher.com/si/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-tec> (dostopano 19 mar 2018).
46. ATITAR MF, BELHADJ H, DILLERT R, BAHNEM DW. The Relevance of ATR-FTIR Spectroscopy in Semiconductor Photocatalysis. V: *Emerging Pollutants in the Environment - Current and Further Implications*. InTech, 2015 doi:10.5772/60887
47. THERMO ELECTRON CORPORATION. *Omnice User's Guide, Version 7.3*. 2006
48. Intro. to Signal Processing: Differentiation. <https://terpconnect.umd.edu/~toh/spectrum/Differentiation.html#Matlab> (dostopano 19 mar 2018).
49. Statistics Dictionary. StatTrek.com. http://stattrek.com/statistics/dictionary.aspx?definition=coefficient_of_determination (dostopano 19 mar 2018).
50. KOCZON P, GRUCZYNSKA E, KOWALSKI B. Changes in the Acid Value of Butter During Storage at Different Temperatures as Assessed by Standard Methods or by FT-IR Spectroscopy. *Am J Food Technol* 2008;**3**:154–163.
51. MUIK B, LENDL B, MOLINA-DÍAZ A, AYORA-CAÑADA MJ. Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. *Chem Phys Lipids* 2005;**134**:173–182.
52. KOPAČ N. Razvoj metode za vrednotenje rastlinskih olj z infrardečo spektroskopijo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2016, 53.

53. BABYAK MA. What You See May Not Be What You Get: A Brief, Nontechnical Introduction to Overfitting in Regression-Type Models. *Psychosom Med* 2004;**66**:411–421.
54. STANSBY M. Determination of Peroxide Values for Rancidity in Fish Oils. *Ind Eng Chem Anal Ed* 1941;**13**:627–631.
55. KOKALJ M, RIHTARIČ M, KREFT S. Commonly applied smoothing of IR spectra showed inappropriate for the identification of plant leaf samples. *Chemom Intell Lab Syst* 2011;**108**:154–161.
56. KOKALJ LADAN M, STRAUS J, TAVČAR BENKOVIĆ E, KREFT S. FT-IR-based method for rutin, quercetin and quercitrin quantification in different buckwheat (*Fagopyrum*) species. *Sci Rep* 2017;**7**:7226.
57. COATES J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. V: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006, 11.
58. DIEM M. Modern vibrational spectroscopy and micro-spectroscopy : theory, instrumentation, and biomedical applications. Wiley, 2015, 397–398.
59. Fourier Transform Infrared Spectroscopy.
[http://www.mcpf.ust.hk/technology/Fourier Transform Infra-Red spectroscopy \(FTIR\).html](http://www.mcpf.ust.hk/technology/Fourier%20Transform%20Infra-Red%20spectroscopy%20(FTIR).html) (dostopano 25 maj 2018).
60. YILDIRIM G. Effect of storage time on olive oil quality. Izmir, Turčija: The Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology, 2009, 24.

7 PRILOGE

Priloga 1

Preglednica X: Pregled izbranih funkcionalnih skupin z valovnimi števili.

PEROKSIDNO ŠTEVILO	
Funkcionalna skupina ali fragment	Valovno število [cm ⁻¹]
1,2-cis-CH	680 ^a
1,2-trans-CH	970 ^a
C-O-O-C	890–820 ^b
C=C	1640–1660 ^c
C-C	1000 ^a
CH ₂	2930, 2850, 1470, 720, 1300, 1305 ^a
C-O-O-C-(O-O-H) - peroksid	<i>Podatka nismo našli</i>
-OOH/-OH(razpadni produkti peroksidov)	3400–3700 ^e
KISLINSKO ŠTEVILO	
Funkcionalna skupina ali fragment	Valovno število [cm ⁻¹]
CH ₂ -COOH	1725–1700 ^a
C-H	3000 (alkani) ^a , 3125–3010 (alkeni) ^a
C-C	1000 ^a
C=O	1760 ^c , 1740–1680 ^a
COH	1440–1396 ^a
C-O	1315–1200, 1325–1280 ^a
O-H	960–875, 3200–2500 (višje harmonske frekvence, ang. <i>overtones</i>) ^a
C-OH	1440–1396 ^a
COOH	1705 ^a
Dolgoverižne maščobne kisline (> 12 C atomov)	1350-1180* ^a
ANIZIDINSKO ŠTEVILO	
Funkcionalna skupina ali fragment	Valovno število [cm ⁻¹]
R ₂ -CH ₂ -CHO	1740–1720, 2850, 2750 ^a

R-CH=CH-CHO	1705–1685 ^a
CH=CH ₂	905–915, 985–995 ^d
R-O-H	3400 ^c
1,2-cis-CH	680 ^a
1,2-trans-CH	970 ^a
C-H (alkeni)	3125-3010 ^a
C=C	1680–1620 ^a , 1640–1660 ^c
R-CH ₃	2880–2970 ^c
C=O	1740–1720 ^a
C-H	2900–2800, 2775–2695 ^a
H-C=O	1410–1380 ^a

*več enakomernih pasov (t. i. *progression bands*). Odvisno od števila *trans* CH₂ skupin.

^a Günzler H, Gremlich H-U: *IR spectroscopy - An Introduction*,: 177 - 179, 185 - 186, 211-214, 216 – 217 (2).

^b Coates J: *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*, Encyclopedia of Analytical Chemistry (57).

^c Diem M: *Modern Vibrational Spectroscopy and Micro-Spectroscopy: Theory, Instrumentation and Biomedical Applications* (58).

^d *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (59).

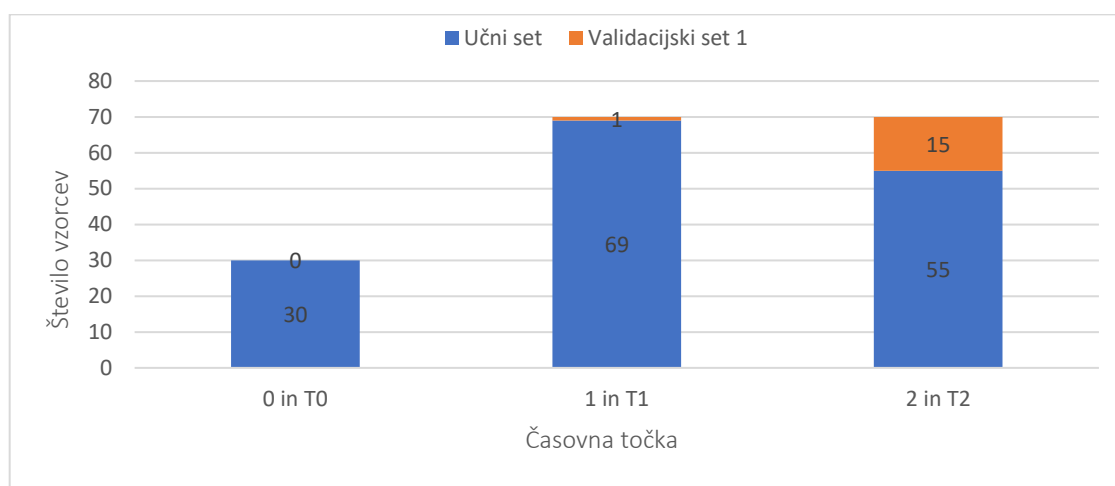
^e Yildirim G., *Effect of storage time on olive Oil quality* (60).

Priloga 2

Preglednica XI: Izbrana območja valovnih števil, ki smo jih uporabili za izdelavo modelov.

Izbrana območja valovnih števil [cm⁻¹]
670–730
820–1010
1180–1470
1620–1760
2500–3200
3400–3700

Priloga 3



Slika 13: Številčna razporeditev vzorcev učnega seta in validacijskega seta 1 po časovnih točkah.

Priloga 4

Preglednica XII: Izračunani R^2 in RMSE za posamezen model pri izbrani ločljivosti na učnem setu (UČNI 4/UČNI 16) in validacijskem setu 1 (VAL 4/VAL 16) pri izboru delov spektra s korelacijo ali glede na funkcionalne skupine za posamezno farmakopejsko število.

UČNI 4				UČNI 16				VAL 4				VAL 16			
peroksidno število				peroksidno število				peroksidno število				peroksidno število			
Korelacija	R^2	RMSE		Korelacija	R^2	RMSE		Korelacija	R^2	RMSE		Korelacija	R^2	RMSE	
0,853	3,307	NOR	ODV	0,867	3,155	ODV	SNV 2 ODV	0,551	7,168	NOR	SNV 2 ODV	0,478	7,731	2 ODV	2 ODV
0,802	3,842	SNV ODV	NOR ODV	0,863	3,202	NOR 2 ODV	SNV 2 ODV	0,377	8,443	SNV	SNV ODV	0,459	7,865	NOR	ODV
0,801	3,854	NOR ODV	NOR 2 ODV	0,847	3,382	NOR ODV	NOR ODV	-0,243	11,927	SNV ODV	ODV	0,453	7,910	OSN	SNV 2 ODV
0,737	4,425	SNV	SNV 2 ODV	0,826	3,605	SNV ODV	SNV ODV	-0,257	11,995	SNV ODV	NOR 2 ODV	0,433	8,056	SNV 2 ODV	NOR ODV
0,703	4,708	SNV 2 ODV	2 ODV	0,763	4,206	SNV 2 ODV	2 ODV	-0,264	12,027	SNV 2 ODV	2 ODV	0,353	8,603	NOR 2 ODV	NOR
0,690	4,809	NOR 2 ODV	SNV ODV	0,746	4,357	2 ODV	ODV	-0,272	12,064	2 ODV	NOR ODV	0,296	8,978	SNV	NOR 2 ODV
0,687	4,832	2 ODV	SNV	0,697	4,752	SNV	SNV	-0,343	12,396	NOR 2 ODV	SNV	0,194	9,603	ODV	SNV ODV
0,450	6,403	ODV	OSN	0,680	4,889	NOR	OSN	-0,352	12,438	OSN	NOR	0,090	10,203	NOR ODV	OSN
0,226	7,598	OSN	NOR	0,668	4,974	OSN	NOR	-0,390	12,612	ODV	OSN	0,042	10,468	SNV ODV	SNV
anizidinsko število				anizidinsko število				anizidinsko število				anizidinsko število			
0,791	16,947	NOR 2 ODV	SNV 2 ODV	0,776	17,569	NOR 2 ODV	NOR	0,671	25,909	NOR ODV	SNV ODV	0,667	26,070	SNV ODV	SNV ODV
0,789	17,056	SNV 2 ODV	SNV ODV	0,775	17,612	NOR ODV	SNV	0,668	25,999	ODV	NOR 2 ODV	0,666	26,084	NOR 2 ODV	NOR ODV
0,784	17,231	2 ODV	NOR ODV	0,775	17,616	SNV 2 ODV	NOR ODV	0,668	26,009	SNV ODV	2 ODV	0,666	26,087	SNV 2 ODV	2 ODV
0,780	17,388	SNV ODV	NOR 2 ODV	0,774	17,649	SNV ODV	SNV ODV	0,667	26,063	SNV	SNV 2 ODV	0,666	26,091	NOR ODV	SNV 2 ODV
0,765	17,998	NOR ODV	SNV	0,772	17,721	SNV	SNV	0,663	26,193	NOR	ODV	0,666	26,107	ODV	NOR 2 ODV
0,764	18,023	NOR	ODV	0,770	17,792	NOR	ODV	0,662	26,257	OSN	NOR ODV	0,665	26,147	2 ODV	ODV
0,761	18,127	SNV	NOR	0,767	17,909	2 ODV	OSN	0,653	26,607	SNV 2 ODV	NOR	0,663	26,192	SNV	SNV
0,757	18,309	ODV	2 ODV	0,764	18,034	ODV	SNV 2 ODV	0,648	26,788	NOR 2 ODV	SNV	0,661	26,288	NOR	NOR
0,753	18,439	OSN	OSN	0,759	18,223	OSN	2 ODV	0,642	27,028	2 ODV	OSN	0,661	26,308	OSN	OSN
kislininsko število				kislininsko število				kislininsko število				kislininsko število			
1,000	0,130	2 ODV	SNV 2 ODV	0,994	0,569	SNV	SNV	0,944	1,516	OSN	ODV	0,988	0,706	SNV	ODV
0,999	0,170	NOR ODV	NOR 2 ODV	0,993	0,620	NOR 2 ODV	NOR	0,936	1,620	NOR	SNV 2 ODV	0,969	1,127	SNV 2 ODV	2 ODV
0,998	0,325	ODV	2 ODV	0,993	0,651	SNV 2 ODV	NOR 2 ODV	0,933	1,662	SNV	2 ODV	0,968	1,141	NOR 2 ODV	SNV 2 ODV
0,998	0,361	SNV ODV	ODV	0,984	0,966	NOR	OSN	0,851	2,473	SNV ODV	NOR 2 ODV	0,958	1,320	SNV	SNV
0,996	0,479	SNV 2 ODV	SNV ODV	0,981	1,049	OSN	2 ODV	0,847	2,504	SNV ODV	SNV	0,955	1,360	NOR	SNV ODV
0,996	0,486	NOR 2 ODV	OSN	0,978	1,114	ODV	OSN	0,841	2,559	ODV	SNV ODV	0,953	1,385	ODV	NOR
0,989	0,788	OSN	SNV	0,978	1,126	2 ODV	SNV	0,623	3,937	SNV 2 ODV	NOR ODV	0,951	1,426	2 ODV	OSN
0,984	0,969	SNV	NOR	0,975	1,184	NOR ODV	SNV 2 ODV	0,616	3,971	NOR 2 ODV	NOR	0,936	1,618	NOR ODV	NOR ODV
0,983	0,983	NOR	NOR ODV	0,973	1,246	SNV ODV	SNV ODV	0,612	3,992	2 ODV	OSN	0,930	1,696	SNV ODV	NOR 2 ODV

Legenda:

	$R^2 > 0,9$
	$R^2 = 0,8-0,9$
	$R^2 = 0,6-0,8$
	$R^2 < 0,6$