

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

METKA RIHTARIČ

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

METKA RIHTARIČ

**UGOTAVLJANJE VRSTNE PRIPADNOSTI VZORCEV VRBOVCEV
IN KRČNIC S TRANSMISIJSKO INFRARDEČO SPEKTROSKOPIJO**

**IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION OF *HYPERICUM* AND
EPILOBIUM SPECIES SAMPLES BY TRANSMISSION INFRARED
SPECTROSCOPY**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Zahvala

Za pomoč pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorju prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in Meti Kokalj, mag. farm.

Še posebej se zahvaljujem celotni družini in svojemu fantu, ki so mi tekom študija vedno stali ob strani in me vzpodbujali. Prav tako se za podporo zahvaljujem tudi vsem svojim prijateljicam in prijateljem, s katerimi smo se skupaj prebijali skozi težka izpitna obdobja in zabavne trenutke študentskega življenja.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Metka Rihtarič

Ljubljana, junij 2010

KAZALO

POVZETEK.....	VI
ABSTRACT.....	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. ROD <i>EPILOBIUM</i> (VRBOVCI)	1
1.1.1. Sistematika rodu <i>Epilobium</i>	1
1.1.2. Farmakološki učinki rastlin iz rodu <i>Epilobium</i>	2
1.1.3. Kemotaksonomija vrbovcev.....	3
1.2. ROD <i>HYPERICUM</i> (KRČNICE).....	4
1.2.1. Sistematika rodu <i>Hypericum</i>	5
1.2.2. Farmakološki učinki rastlin iz rodu <i>Hypericum</i>	5
1.2.3. Kemotaksonomija krčnic.....	7
1.3. INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA.....	8
1.3.1. Osnove IR spektroskopije	8
1.3.2. Uporaba IR spektra.....	11
1.3.3. Delitev IR spektrometrov	11
1.3.4. IR spektroskopske tehnike	12
1.3.5. Predobdelava IR spektrov	15
1.4. STATISTIČNE METODE.....	20
1.4.1. Analiza variance (ANOVA).....	20
1.4.2. Metoda glavnih komponent.....	20
1.4.3. Diskriminantna analiza.....	21
2. NAMEN DELA	23
3. MATERIALI IN METODE	24
3.1. VZORCI.....	24
3.1.1. Vrbovci (rod <i>Epilobium</i>)	24
3.1.2. Krčnice (rod <i>Hypericum</i>)	24
3.2. APARATURE IN PRIPOMOČKI.....	25
3.3. NASTAVITVE PRI MERJENJU	26
3.4. OPTIMIZACIJA NAČINA MERJENJA.....	26
3.5. PRIPRAVA VZORCA IN POTEK MERITVE.....	27

3.5.1. Cel list preučevane rastline.....	27
3.5.2. Tabletk s KBr	28
3.6. IZVOZ PODATKOV IN PREDOBDELAVA SPEKTRA.....	29
3.7. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	34
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	37
4.1. VRBOVCI.....	37
4.1.1. Tehnika snemanja transmisijskih spektrov celih listov	37
4.1.2. Tehnika snemanja transmisijskih spektrov tabletk s KBr	39
4.1.3. Primerjava tehnike transmisijskih spektrov celih listov s tehniko KBr tabletk.....	42
4.2. KRČNICE	44
4.2.1. Tehnika snemanja transmisijskih spektrov celih listov	44
4.2.2. Tehnika snemanja transmisijskih spektrov tabletk s KBr	46
4.2.3. Primerjava tehnike transmisijskih spektrov celih listov s tehniko KBr tabletk.....	49
4.3. PRIMERJAVA TOČNOSTI UVRŠČANJA VRBOVCEV S TOČNOSTJO UVRŠČANJA KRČNIC.....	51
5. SKLEP	53
LITERATURA.....	54

KAZALO SLIK

Slika 1. <i>Epilobium angustifolium</i>	1
Slika 2. <i>Hypericum perforatum</i>	5
Slika 3. Struktura hiperforina.....	6
Slika 4. Vpliv hiperforina na privzem živčnih prenašalcev (serotonina).....	7
Slika 5. Spekter elektromagnetnega valovanja.	8
Slika 6. Sestava in delovanje FTIR spektrometra (prirejeno po 28).....	11
Slika 7. ATR IR.	15
Slika 8. Difuzna refleksijska tehnika.	15
Slika 9. a) Osnovni spekter; b) Prvi odvod; c) Drugi odvod.	17
Slika 10. Ločitev širokih absorpcijskih trakov na posamezne komponente pri odvajanju.	18
Slika 11. Določitev glavnih komponent v prostoru dveh spremenljivk (x_1 in x_2 sta izhodiščni spremenljivki, podatki so grafično prikazani kot točke. y_1 in y_2 sta dobljeni glavni komponenti. Dvorazsežni prostor lahko reduciramo v enorazsežnega, ki ga določa y_1).	21
Slika 12. S posameznima spremenljivkama X in Y ne moremo medsebojno ločiti skupin z zadovoljivo natančnostjo, z njuno linearno kombinacijo (diskriminantno funkcijo) pa lahko.	21
Slika 13. Spektrometer Perkin Elmer FTIR 1600.....	25
Slika 14. Spekter ozadja.....	27
Slika 15. Ahatna terilnica s pestilom.	28
Slika 16. Ročna stiskalnica KBr tablet Graseby Specac.....	28
Slika 17. a) Osnovni spekter <i>Hypericum dubium</i> 431; b) Spekter <i>Hypericum dubium</i> 431 po avtomatskem glajenju s programom Spectrum; c) spekter <i>Hypericum dubium</i> 431 po glajenju Savitzky-Golay.....	33

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I. Točnost uvrstitve v pravi rod, sekcijo in vrsto z uporabo treh različnih metod	4
Preglednica II. Delitev infrardečega območja.	9
Preglednica III. Število herbarijskih pol uporabljenih za analizo vrbovcev.	24
Preglednica IV. Število herbarijskih pol uporabljenih za analizo krčnic.....	25
Preglednica V. Merilne nastavitve na spektrometru.	26
Preglednica VI. Metode predobdelave spektra, programi in formule za izračun.	30
Preglednica VII. Razdelitev rastlin rodu <i>Epilobium</i> na testni in validacijski del.	34
Preglednica VIII. Razdelitev rastlin rodu <i>Hypericum</i> na testni in validacijski del.	35
Preglednica IX. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto po različnih metodah predobdelave IR spektrov celih listov vrbovcev.	37
Preglednica X. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto vrbovcev po različnih metodah predobdelave IR spektrov tabletk s KBr.....	39
Preglednica XI. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto po različnih metodah predobdelave IR spektrov celih listov krčnic.	44
Preglednica XII. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto krčnic po različnih metodah predobdelave IR spektrov tabletk s KBr.....	46

KAZALO GRAFOV

Graf 1. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto vrbovcev po različnih metodah predobdelave IR spektrov celih listov.	38
Graf 2. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto vrbovcev po različnih metodah predobdelave IR spektrov KBr tabletk. Prikazani so rezultati osnovnih in glajenih spektrov treh in petih meritev posamezne tabletk.	40
Graf 3. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto vrbovcev po različnih metodah predobdelave IR spektrov KBr tabletk. Prikazani so rezultati povprečij osnovnih in glajenih spektrov treh in petih meritev posamezne tabletk.	41
Graf 4. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto vrbovcev po različnih metodah predobdelave IR spektrov treh meritev KBr tabletk in njihovih povprečij.	42
Graf 5. Primerjava rezultatov neglajenih IR spektrov celega lista vrbovcev ter tabletk s tremi meritvami.	42
Graf 6. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto po različnih metodah predobdelave IR spektrov celih listov krčnic.	45
Graf 7. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto krčnic po različnih metodah predobdelave IR spektrov KBr tabletk. Prikazani so rezultati osnovnih in glajenih spektrov treh in petih meritev posamezne tabletk.	47
Graf 8. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto krčnic po različnih metodah predobdelave IR spektrov KBr tabletk. Prikazani so rezultati povprečij osnovnih in glajenih spektrov treh in petih meritev posamezne tabletk.	48
Graf 9. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto krčnic po različnih metodah predobdelave IR spektrov treh meritev KBr tabletk in njihovih povprečij.	49
Graf 10. Primerjava rezultatov neglajenih IR spektrov celega lista krčnic ter tabletk s tremi meritvami.	50
Graf 11. Primerjava rezultatov neglajenih spektrov vrbovcev in krčnic po različnih metodah predobdelave spektra pri obeh uporabljenih tehnikah – transmisijskih IR spektrih celih listov in transmisijskih IR spektrih tabletk s KBr.	52

POVZETEK

IR spektroskopija je hitra in zanesljiva metoda identifikacije spojin, ki ne zahteva dolgotrajne in zapletene priprave vzorca, zato bi bilo zelo uporabno, če bi s pomočjo IR spektra znali določiti vrsto rastline. Omenjeno metodo bi tako lahko uporabljali tudi pri kontroli kakovosti vstopnih materialov pri izdelavi pripravkov rastlinskega izvora.

S transmisijsko IR spektroskopijo smo proučevali 14 vrst vrbovcev (*Epilobium*) in 7 vrst krčnic (*Hypericum*). Rastline smo uvrščali v vrste na osnovi transmisijskih IR spektrov, posnetih s celimi listi rastlin in s tabletami, ki smo jih izdelali iz teh listov in KBr. Transmisijske IR spektre smo pred statistično analizo obdelali z različnimi metodami kot so prvi in drugi odvod, normalizacija in njen prvi odvod, prvi odvod skozi pet točk, valčna transformacija in njen prvi odvod, hitra Fourierjeva transformacija ter glajenje Savitzky-Golay. Pri uvrščanju rastlin v vrste smo proučevali tudi vpliv števila meritev (tri in pet) in povprečevanje teh meritev na točnost uvrščanja. Za statistično analizo smo najprej uporabili analizo variance za zmanjšanje števila spremenljivk, nato metodo glavnih komponent, s katero smo dodatno zmanjšali število spremenljivk in odstranili njihovo medsebojno korelacijo, ter diskriminantno analizo, s katero smo na osnovi glavnih komponent uvrščali rastline v vrste.

Na osnovi dobljenih odstotkov pravilno uvrščenih rastlin smo ugotovili, da je tehnika IR spektrov celih listov dajala slabše rezultate in je tako za ločevanje med vrstami rastlin primernejša tehnika s KBr tabletami. Boljše rezultate smo dobili tudi, če smo v statistično analizo vključili več meritev istega osebka, kot če smo te meritve povprečili. S povečanjem števila meritev s tri na pet točnosti uvrščanja nismo izboljšali. Za uspešno uvrščanje rastlin v pravo vrsto je nujno potrebna predobdelava dobljenega IR spektra. Kot najuspešnejša metoda predobdelave se je pri krčnicah izkazala normalizacija, pri vrbovih pa prvi odvod osnovnega spektra, medtem ko so ostale metode dajale slabše rezultate, ki pa so bili vseeno boljši v primerjavi z osnovnim spektrom.

Tehnika transmisijskih IR spektrov KBr tablet se je pokazala kot dokaj uspešna metoda za razlikovanje med vrstami rodu *Hypericum*, predvsem po ustrezni predobdelavi spektra kot so normalizacija in njen 1. odvod, 1. odvod skozi dve in pet točk. Za uvrščanje rastlin v vrste rodu *Epilobium* omenjena tehnika ni bila dovolj dobra, predvsem zaradi premajhnega števila rastlin v posamezni vrsti, smo pa z vsemi metodami dosegli večjo točnost uvrščanja v primerjavi z osnovnim spektrom.

ABSTRACT

Infrared spectroscopy (IR) is a fast and reliable method for the identification of various compounds. Because of the short and simple preparation of samples for IR spectroscopy, it would be very helpful, if it could be used for determination of plant species and for quality control of input material for the preparation of herbal products.

Fourteen species of the genus *Epilobium* and seven species of the genus *Hypericum* were studied by Fourier transform IR spectroscopy (FTIR). The classification of species was done based on the recorded IR spectra of the whole leaves and of the pellets made of the leave and KBr. Prior to statistical analysis the recorded IR spectra were preprocessed with various methods, such as the first and the second derivative, normalization and its first derivative, five-point stencil, wavelet transform and its first derivative, fast Fourier transform and Savitzky-Golay smoothing. The effect of the number of measurements (three and five) and the averaging of these measurements on the accuracy of the proper species classification was studied. Analysis of variance was first used to reduce the number of variables, followed by principal component analysis (PCA) to get a smaller number of uncorrelated variables. Finally, discriminant analysis was used for species classification based on the selected principal components obtained in the previous step by PCA.

Based on the percentage of the properly classified species, it can be concluded that classification of species based on the IR spectra of the KBr pellets gave better results than the classification based on the IR spectra of the whole leaves. Three measurements of the same KBr pellet should be done to get good results; five measurements did not improve the accuracy and the averaging of these values gave worse results. For the successful classification of the plant species it is necessary to preprocess the recorded spectra, particularly with normalization of the spectrum in the case of the genus *Hypericum* and to perform the first derivative of the spectrum in the case of the genus *Epilobium*.

We can conclude that FTIR spectra of the KBr pellets could be used for differentiation between species of the genus *Hypericum*, especially after normalization and its first derivative, first derivative of the original spectrum and five-point stencil. In the case of the genus *Epilobium*, FTIR did not give good results and further studies with more samples of the same species should be done to finally evaluate the potential usefulness of this method. However, with the proper preprocessing of the recorded spectra, we were able to get better results as compared to the results obtained with the original data.

SEZNAM OKRAJŠAV

OKRAJŠAVA	POMEN
ANOVA	analiza variance (<i>analysis of variance</i>)
DA	diskriminantna analiza (<i>discriminant analysis</i>)
DFT	diskretna Fourierjeva transformacija (<i>discrete Fourier transform</i>)
FFT	hitra Fourierjeva transformacija (<i>fast Fourier transform</i>)
FT	fourierjeva transformacija (<i>Fourier transform</i>)
FTIR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
GK	osnovni spektri posameznih meritev krčnic po avtomatskem glajenju s programom Spectrum
GV	osnovni spektri posameznih meritev vrbovcev po avtomatskem glajenju s programom Spectrum
IR	infrardeče (<i>infrared</i>)
NK	osnovni spektri posameznih meritev krčnic pred glajenjem
NV	osnovni spektri posameznih meritev vrbovcev pred glajenjem
PCA	metoda glavnih komponent (<i>principal component analysis</i>)
PGK	povprečne vrednosti posameznih avtomatsko glajenih spektrov krčnic
PGV	povprečne vrednosti posameznih avtomatsko glajenih spektrov vrbovcev
PNK	povprečne vrednosti posameznih spektrov krčnic
PNV	povprečne vrednosti posameznih spektrov vrbovcev

1. UVOD

1.1. ROD *EPILOBIUM* (VRBOVCI)

Rod *Epilobium* spada v družino *Onagraceae* (svetlinovke). Je največji rod te družine, saj obsega več kot 200 vrst, od katerih jih 16 lahko zasledimo tudi v Sloveniji. Ime rodu izvira iz grške besede *epi* (na) in *lobus* (strok). Rastlina ima podraslo plodnico, ki po obliki nekoliko spominja na strok. Slovensko ime vrbovec je nastalo zaradi podobnosti njegovih listov in semen z listi in semeni vrbe (1,2).

Rastline iz rodu *Epilobium* so trajnice, pogosto cvetoče že prvo leto. Višina rastlin se od vrste do vrste razlikuje, nekatere zrastejo tudi do metra in pol. Listi so celi, spodnji večinoma nasprotni, ponekod po 3 redkeje 4 v vretencih, gornji večinoma spiralasto nameščeni. Cvetovi so majhni do srednje veliki, večinoma pokončni, mladi redko kimasti. Nameščeni so v zalistju gornjih listov, redkeje v grozdastem socvetju. So štirištevni in večinoma zvezdasti, redkeje somerni. Venčni listi so srčasti, dvokrpi do globoko preklani, rožnati do vijolični ali vijolični rdeči, redkeje beli ali belkasti (Slika 1) (1,3).

1.1.1. Sistematika rodu *Epilobium*

Kraljestvo: *Plantae* (rastline)

Deblo: *Spermatophyta* (semenke)

Poddeblo: *Magnoliophytina* (kritosemenke)

Razred: *Magnoliopsida* (dvokaličnice)

Podrazred: *Rosidae*

Nadred: *Myrtales*

Red: *Myrtales* (mirtovci)

Družina: *Onagraceae* (svetlinovke)

Rod: *Epilobium* (vrbovci) (3)



Slika 1. *Epilobium angustifolium*.

Raven (1976) je rod *Epilobium* razdelil na podlagi morfoloških, palinoloških, anatomskih in citoloških znakov na osem sekcij, med katerimi največ vrst obsega sekcija *Epilobium*:

- sekcija *Epilobium*
- sekcija *Chamenerion*
- sekcija *Boisduvalia*
- sekcija *Currania*
- sekcija *Zauschneria*
- sekcija *Coryiophorum*
- sekcija *Xerolobium*
- sekcija *Crossostigma*

Za razlikovanje med vrstami vrbovcev si lahko pomagamo z morfologijo trihomov - dlačic, ki se nahajajo na površini rastlinskih organov in opravljajo različne funkcije. Pri vrbovcih so odkrili prisotnost treh vrst trihomov. Koničasti trihomi, ki nimajo žlezne aktivnosti, so prisotni pri vseh vrstah, razlikujejo se v dolžini in ukrivljenosti ter v porazdelitvi po sami rastlini. Drugi dve vrsti trihomov spadata med tope trihome in sta značilni le za določene vrste vrbovcev. Topi trihomi se delijo na trihome z žlezno aktivnostjo, ki je vidna na svežih rastlinah v obliki kapljičastega eksudata na vrhu trihoma ter na trihome brez žlezne aktivnosti. Vrste vrbovcev se lahko razlikujejo glede na vrsto in število trihomov, njihovo porazdelitev po rastlinskih organih ter po lastnostih kot sta dolžina in funkcija (4).

1.1.2. Farmakološki učinki rastlin iz rodu *Epilobium*

V tradicionalni medicini se uporabljajo pripravki iz različnih vrst vrbovcev. Uporabljajo se za zdravljenje težav s prostato, lajšanje menstrualnih in gastrointestinalnih težav. Zunanje se zaradi antiflogističnega in antiseptičnega delovanja uporabljajo za zdravljenje mikoz ter za izboljšanje celjenja ran (5).

V zdravilne namene se uporabljata predvsem zel in korenina vrbovcev, ki vsebujeta flavonoide (miricitrin, guaiaverin, kvercetin, kvercetin-3-O- β -D-glukoronid), steroide (predvsem β -sitosterol in njegove estre) ter tanine (5).

Terapevtsko pomembne spojine so predvsem polifenoli in fitosteroli. Fenolne spojine imajo značilno antioksidativno delovanje, fitosteroli pa inhibirajo membransko Na^+K^+ -ATPazo celic prostate, kar naj bi ustavilo celični metabolizem prostate in njeno rast v patoloških stanjih (6).

Z *in vitro* študijami na PZ-HPV-7 epitelnih celicah človeške prostate so dokazali, da etanolni ekstrakti *E. angustifolium*, *E. rosmarinifolium* in *E. tetragonum* inhibirajo proliferacijo teh celic. Proučevali so spojine, ki zavirajo encim 5α -reduktazo. Ta encim reducira testosteron v dihidrotestosteron, ki indirektno vpliva na izražanje genov, odgovornih za celično proliferacijo in apoptozo. Elagitanina enotein A in enotein B so identificirali kot glavni spojini, ki sta odgovorni za inhibicijo tega encima. Prav tako pa ti dve spojini inhibirata encim aromatazo, ki pretvarja testosteron v 17β -estradiol (7).

Protimikrobno delovanje vrbovcev je bilo dokazano v *in vitro* študijah, kjer so proučevali protimikrobni učinek etanolnih ekstraktov vrst *E. angustifolium*, *E. hirsutum*, *E. palustre*, *E. tetragonum* in *E. rosmarinifolium*. Vsi ekstrakti so imeli protimikrobno delovanje proti

po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam in glivam z minimalnimi inhibitornimi koncentracijami med 81 in 650 $\mu\text{g/mL}$. Najširši spekter delovanja sta imela ekstrakta iz vrst *E. angustifolium* in *E. rosmarinifolium*, ki sta edina zavirala tudi rast kvasovk (2).

S farmakološkimi študijami so dokazali tudi antioksidativni (6,8) in protivnetni učinek (inhibicija ciklooksigenaze) določenih vrst vrbovcev (8,9).

1.1.3. Kemotaksonomija vrbovcev

Kemotaksonomija pomeni uvrščanje in identifikacijo rastlin in živali na osnovi razlik in podobnosti v njihovi biokemijski sestavi. Kemotaksonomske analize temeljijo predvsem na analizi primarnih in sekundarnih metabolitov ter semantidov.

Primarni metaboliti se nahajajo v vseh organizmih, saj so del življenjsko nujnih metabolnih poti. V taksonih se nahajajo v različnih koncentracijah, razlikujejo pa se tudi po načinu skladiščenja.

Sekundarni metaboliti se bolj razlikujejo med vrstami, saj opravljajo življenjsko manj pomembne funkcije. Sem spadajo alkaloidi, glikozidi, aminokisliline, fenoli, terpenoidi, voski, smole in nekateri ogljikovi hidrati. Za kemotaksonomske analize so najpomembnejši fenoli (predvsem flavonoidi), ki se v rastlinah nahajajo v različnih oblikah.

Semantidi so molekule, ki nosijo informacijo. Primarni semantid je DNA, sekundarni RNA, terciarni pa proteini (10).

Pri vrbovcih so za kemotaksonomijo pomembni predvsem različni flavonoidi, ki se nahajajo v nadzemnih delih rastlin. Vsebnost flavonoidov so proučevali v 13 vrstah vrbovcev s pomočjo tekočinske kromatografije povezane z masno spektrometrijo (TSP LC-MS) ter s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti sklopljeno z UV detektorjem (LC-UV). Rezultati so pokazali opazne razlike med sekcijama *Chamaenerion* in *Epilobium*. Od vseh se najbolj loči *E. angustifolium*, *E. dodonei* pa vsebuje lastnosti obeh sekcij. Znotraj rodu *Epilobium* so težje ločevali skupini *Synstigma* in *Schyizostigma* (9).

Kemotaksonomsko analizo vrbovcev so opravljali tudi na naši fakulteti s kapilarno elektroforezo (CE), tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ter z IR spektroskopijo oslabiljenega popolnega odboja (ATR-IR). Kot najboljša metoda se je izkazala ATR-IR spektroskopija. Točnost razvrstitve v pravi rod, sekcijo in vrsto je prikazana v Preglednici I.

Preglednica I. Točnost uvrstitve v pravi rod, sekcijo in vrsto z uporabo treh različnih metod (11,12,13).

Metoda	Točnost uvrstitve v pravi rod (%)	Točnost uvrstitve v pravo sekcijo (%)	Točnost uvrstitve v pravo vrsto (%)
CE	100	84	61
HPLC	100	89	65
ATR-IR	100	96	90

1.2. ROD *HYPERICUM* (KRČNICE)

Rod krčnice (*Hypericum*) vsebuje približno 400 vrst in spada v družino krčničevk (*Hypericaceae*). Ime rodu izvira iz grške besede *hyper* (nad, preko) in *eikon* (ikona, slika). Stari Rimljani in Grki so te rastline postavljali nad slike ali kipe, saj so verjeli, da jih varujejo pred zlimi duhovi (3,14).

Krčničevke in tudi krčnice so enoletnice, zelnote trajnice ali polgrmi. Imajo cele, nasprotno nameščene liste. Cvetno odevalo je dvojno, petštevno, venec je rumen. Prašniki so številni, zrasli v snopiče. Plodnica je nadrasla, plod je glavica ali jagoda. Vratovi so tri- do petštevni. V steblih, listih in cvetovih so kanali ali votlinice, v katerih najdemo izločke žlez kot so eterična olja, maščobe, antocijani in smole (1,3).

Najbolj poznana vrsta iz rodu *Hypericum* je *Hypericum perforatum* (šentjanževka, Slika 2). Ime izhaja iz latinske besede *perforatum* (preluknjani). Listi rastline so videti preluknjani zaradi prosojnih žlez z eteričnim oljem, ki se nahajajo v notranjosti lista blizu spodnje površine. Za identifikacijo šentjanževke so pomembne tudi druge sekretorne strukture, in sicer črne žleze, ki so pomembne za kopičenje hipericina, in trije tipi sekretornih kanalčkov (tip A, B, C), ki se razlikujejo po obliki, lokalizaciji in ontogenezi. Porazdelitev prosojnih žlez in sekretornih kanalčkov se razlikuje med različnimi organi, prav tako ni nujno, da so vsi prisotni istočasno. V listih se nahajajo predvsem sferoidne prosojne žleze, v cvetnih in venčnih listih pa so prisotne podolgovate prosojne žleze (1,15,16).

1.2.1. Sistematika rodu *Hypericum*

Kraljestvo: *Plantae* (rastline)

Deblo: *Spermatophyta* (semenke)

Poddeblo: *Magnoliophytina* (kritosemenke)

Razred: *Magnoliopsida* (dvokaličnice)

Podrazred: *Rosidae*

Nadred: *Theanae*

Red: *Theales* (čajevci)

Družina: *Hypericaceae* (krčničevke)

Rod: *Hypericum* (krčnice) (3)



Slika 2. *Hypericum perforatum*.

Eden od pomembnih znakov pri klasifikaciji rodu *Hypericum* je prisotnost različnih sekretornih struktur (prosojne žleze, črne žleze in sekretorni kanalčki). Vse te strukture namreč niso prisotne v vseh vrstah tega rodu, prav tako se razlikujeta tudi njihova prisotnost in količina v posameznih rastlinskih organih (15).

1.2.2. Farmakološki učinki rastlin iz rodu *Hypericum*

Rastline iz rodu *Hypericum* se že dolgo časa uporabljajo v ljudskem zdravilstvu za zdravljenje želodčnih težav, opeklin, oteklin, vnetij, bakterijskih in virusnih okužb ter anksioznosti (17).

V zdravilne namene se uporabljajo zgornji deli cvetočih rastlin, saj ti vsebujejo največ zdravilnih učinkovin. Med farmakološko aktivnimi spojinami, ki jih najdemo v vrstah krčnic, so najpomembnejši naftodiantroni (hipericin in njegovi derivati), floroglucinolni derivati (hiperforin) in flavonoidi (1,18).

Pri nas in po celi Evropi se največ uporabljajo ekstrakti rastline *H. perforatum*. V današnjem času se največ uporablja za zdravljenje blage do srednje hude depresije. Glavni nosilec antidepresivnega delovanja je hiperforin, ki zavira ponoven privzem številnih neurotransmiterjev, kot so serotonin, noradrenalin, dopamin, glutamat, GABA (18).

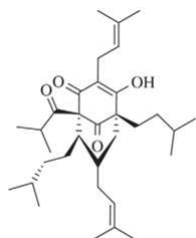
Antidepresivno delovanje šentjanževke je bilo dokazano že v številnih študijah. Med novejšimi je odprta opazovalna študija, ki je bila opravljena v Nemčiji na 1778 ambulantnih bolnikih. Študija je trajala 12 tednov, na vsake 4 tedne so opravljali kontrolne obiske. Rezultati so pokazali značilen pozitiven učinek šentjanževke na zdravljenje blage do zmerno hude depresije (19).

Dokazano je bilo tudi protivnetno, protimikrobno (bakteriostatično na večino po Gramu pozitivnih bakterij) in protivirusno (Herpes simplex virus tip 1, Friend levkemija virus...) delovanje šentjanževke (20,21).

1.2.2.1. Vpliv šentjanževke na delovanje drugih zdravil

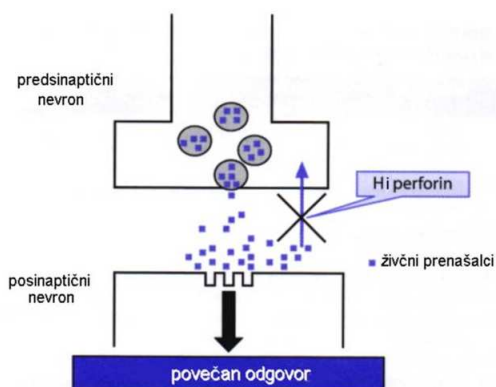
Pri uporabi šentjanževke moramo biti še posebej previdni, saj vstopa v številne farmakokinetične in farmakodinamične interakcije, hipericin v šentjanževki pa deluje tudi fototoksično.

Pripravki iz šentjanževke *in vivo* značilno spremenijo farmakokinetiko številnih zdravilnih učinkovin, kot so imunosupresivi (ciklosporin, takrolimus), oralni kontraceptivi, zdravila za bolezni srca in ožilja (digoksin, varfarin), antidepresivi (amitriptilin), antikonvulzivi, zaviralci HIV proteaze, zdravila za zdravljenje odvisnosti (metadon) in učinkovine z delovanjem na respiratorni sistem (teofilin). Do interakcij prihaja zaradi indukcije intestinalnega glikoproteina P in/ali intestinalnih ter hepatskih citokromov P450. Posledica so spremenjene plazemske koncentracije prej omenjenih učinkovin, kar lahko značilno vpliva na njihov farmakološki učinek. Za indukcijo je odgovoren predvsem hiperforin (Slika 3), vendar pa šentjanževka vsebuje tudi druge induktorje in inhibitorje citokromskega sistema, kar je lahko odvisno od vrste in tkiva, odmerka, poti vnosa, vira droge in dolgotrajnosti zdravljenja (18,22,23).



Slika 3. Struktura hiperforina.

Farmakodinamične interakcije lahko nastopijo pri sočasni uporabi šentjanževke z zaviralci privzema serotonina (fluoksetin, sertralin, paroksetin) ali z agonisti serotoninskih receptorjev (Slika 4). V takih primerih lahko pride do pojava serotoninskega sindroma (zmedenost, nemir, tremor, potenje, drgetanje, motorične motnje...), ki je posledica povišane koncentracije serotonina v plazmi (18,22).



Slika 4. Vpliv hiperforina na privzem živčnih prenašalcev (serotonina).

1.2.3. Kemotaksonomija krčnic

Pomembno vlogo pri kemotaksonomski analizi vrst iz rodu *Hypericum* imata hipericin in hiperforin. To dokazuje študija, ki je bila opravljena na 13 vrstah rodu *Hypericum* leta 2004 v Italiji. Rezultati so pokazali prisotnost hipericina v vseh analiziranih vrstah, v največji koncentraciji je bil prisoten v *H. perforatum* podvrste *angustifolium*. Hiperforin je bil pri *H. perforatum* podvrste *angustifolium* in *perforatum* prisoten v visokih koncentracijah (3,2 % in 2,8 %), pri *H. richeri*, *H. tetrapterum*, *H. montanum* in *H. hyssopifolium* v veliko manjših koncentracijah, medtem ko ga pri *H. hirsutum* in *H. androsaemum* sploh niso zasledili (24).

Kvantitativno fitokemijsko analizo šestih vrst rodu *Hypericum* (*H. perforatum*, *H. hirsutum*, *H. maculatum*, *H. tetrapterum*, *H. montanum* in *H. humifusum*) so opravljali na Fakulteti za farmacijo s pomočjo HPLC. Določali so vsebnost desetih spojin (hipericin, psevdohipericin, hiperforin, rutin, hiperozid, izokvercetin, kvercitrin, kvercetin, amentoflavon, biapigenin) v cvetovih in zelenih delih rastlin. Najvišjo vsebnost vseh spojin so izmerili v cvetovih *H. perforatum*, najvišjo vsebnost amentoflavona pa v zelenih delih *H. montanum* in *H. hirsutum*. Ugotovili so, da je hiperforin v preiskovanih rastlinah prisoten le v cvetovih *H. perforatum* (25).

Z morfološko, histokemijsko in fitokemijsko raziskavo osmih vrst rodu *Hypericum* v Italiji so ugotovili, da se posamezne vrste razlikujejo med seboj po velikosti ter obliki listov in cvetov, ter po obliki in porazdelitvi sekretornih struktur v rastlini. Raziskali so tudi lokalizacijo zbiranja nekaterih sekundarnih metabolitov v sekretornih strukturah. Rezultati so pokazali, da se hipericin kopiči v črnih žlezah cvetnih in venčnih listov, stebela, listov in prašnikov. Pri vseh vrstah je prisoten v črnih žlezah cvetnih in venčnih listov. Flavonoidi se nahajajo v enakih žlezah kot hipericin, vendar le v cvetnih in venčnih listih (24,26).

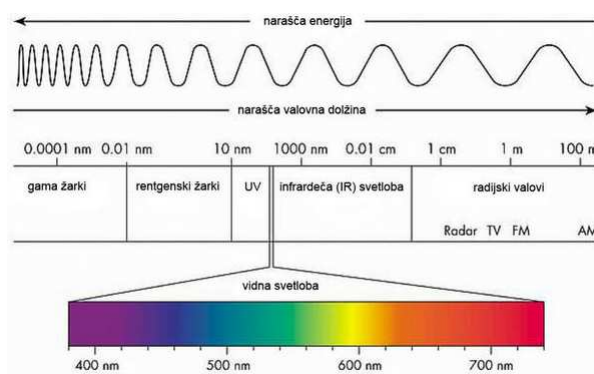
1.3. INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA

Infrardeča spektroskopija (IR) je ena pomembnejših analitskih metod, ki ima zelo širok spekter uporabe. Uporabna je predvsem za kvalitativno analitiko, v kvantitativne namene se uporablja manj zaradi relativno nizke občutljivosti. V kemiji omogoča identifikacijo različnih spojin oz. funkcionalnih skupin in s tem tudi spremljanje poteka kemijske reakcije, prav tako zaradi visoke selektivnosti omogoča razlikovanje med izomeri ter polimorfnimi modifikacijami trdnih snovi. Velika prednost te metode je, da lahko z različnimi tehnikami analiziramo trdne, tekoče in plinaste vzorce. Lahko rečemo, da je IR spektroskopija univerzalna instrumentalna metoda, saj se uporablja na različnih področjih (27,28).

1.3.1. Osnove IR spektroskopije

Spekter elektromagnetnega valovanja lahko razdelimo na področje γ žarkov, rentgenskih žarkov, ultravijolične, vidne in infrardeče svetlobe ter na področje mikrovalov in radijskih valov. Človeško oko zaznava le majhen del elektromagnetnega valovanja – vidno svetlobo, z drugimi detekcijskimi sistemi pa lahko odkrijemo valovanje tudi onkraj vidnega dela spektra elektromagnetnega valovanja (28,29).

IR območje leži v spektru elektromagnetnega valovanja (Slika 5) pri daljših valovnih dolžinah kot vidna svetloba, vendar pri krajših kot jih imajo radijski valovi (29).



Slika 5. Spekter elektromagnetnega valovanja.

Infrardeče območje obsega del elektromagnetnega valovanja v območju valovnih števil $12800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ oz. valovne dolžine $0.78 - 1000 \text{ }\mu\text{m}$. IR območje delimo na bližnje, srednje in daljno območje (Preglednica II) (29).

Preglednica II. Delitev infrardečega območja.

Območje	Valovna dolžina (μm),	Valovno število (cm^{-1})	Frekvenca (s^{-1})
Bližnje (<i>near</i>)	0,78 – 2,5	12800 – 4000	$3,8 \times 10^{14} - 1,2 \times 10^{14}$
Srednje (<i>middle</i>)	2,5 – 50	4000 – 200	$1,2 \times 10^{14} - 6,0 \times 10^{12}$
Daljnje (<i>far</i>)	50 - 1000	200 – 10	$6,0 \times 10^{12} - 3,0 \times 10^{11}$

V analitiki organskih spojin se največ uporablja srednje IR območje z valovnimi števili med 4000 in 670 cm^{-1} .

Iz Preglednice 2 je razvidno, da je valovna dolžina (λ) obratno sorazmerna s frekvenco (ν), katera pa je premo sorazmerna z energijo fotona, ki je definiran kot osnovni delec (energijski kvant) kvantiziranega elektromagnetnega polja (30).

V IR spektroskopiji se bolj kot valovna dolžina uporablja valovno število ($\tilde{\nu}$), izraženo v cm^{-1} , ki je definirano kot recipročna vrednost valovne dolžine: $\tilde{\nu} (\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda (\text{cm})}$

Valovno število je premo sorazmerno z energijo fotona ($E = h \nu$) in frekvenco ($\nu = \frac{c}{\lambda}$):

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{n \nu}{c_0} = \frac{nE}{c_0 h}$$

c_0 – hitrost svetlobe v vakuumu

n – lomni količnik

E – energija

ν – frekvenca

$\tilde{\nu}$ – valovno število

h – Planckova konstanta

c – hitrost svetlobe v mediju z lomnim količnikom n

λ – valovna dolžina (27,29)

1.3.1.1. Proces absorpcije infrardeče svetlobe

Pri IR sevanju je energija fotonov manjša kot pri X žarkih, ultravijolični in vidni svetlobi, zato pri obsevanju vzorca ne prihaja do elektronskih prehodov. Absorpcija IR sevanja je tako v večji meri omejena na molekulske vrste, kjer so majhne energijske razlike med različnimi nihajnimi in rotacijskimi stanji (31).

Vsaka molekula ne more absorbirati IR sevanja. Da se to zgodi, mora priti do spremembe dipolnega momenta kot posledica nihajnega ali rotacijskega gibanja. Le pod tem pogojem lahko elektromagnetno valovanje vstopi v interakcijo z molekulo in povzroči spremembe v amplitudi njenega gibanja. Dipolni moment je določen z velikostjo razlike med dvema nabojema in razdaljo med centroma obeh nabojev. Pri asimetričnih molekulah prihaja pri

nihanju atomov do spreminjanja dipolnega momenta, kar povzroči nastanek električnega polja, ki lahko vstopi v interakcijo z električnim poljem IR sevanja. Dvoatomske molekule z enakimi atomi (H_2 , O_2 , Cl_2) ne morejo absorbirati IR sevanja, saj so simetrične molekule in do sprememb dipolnega momenta ne prihaja (29,31).

1.3.1.2. Molekulska gibanja, ki jih povzroči IR sevanje

IR sevanje lahko povzroči več vrst molekulskih gibanj:

- **rotacijski prehodi**

Za spremembo rotacijskega stanja molekule je potrebna minimalna energija v območju 100 cm^{-1} ali manj. Rotacijski nivoji so kvantizirani, zato je absorpcija plinov v daljnem IR območju karakterizirana z diskretnimi, dobro definiranimi črtami.

- **nihajno-rotacijski prehodi**

Nihajni energijski nivoji so kvantizirani in za večino molekul energijske razlike med kvantnimi nivoji ustrezajo srednjemu IR območju. Pri teh prehodih se mora za spremembo nihajnega stanja spremeniti tudi rotacija. IR spektri plinov običajno vsebujejo številne tesno razporejene črte, saj je za vsako nihajno stanje možnih več rotacijskih stanj. V tekočinah in trdnih snoveh je rotacija omejena, zato v spektru takih vzorcev diskretne nihajno-rotacijske linije pogosto izginejo in ostanejo le razširjeni nihajni signali.

- **molekulska nihanja**

Nihanja molekul razdelimo na valenčna (*stretching vibrations*) in deformacijska nihanja (*bending vibrations*).

Pri valenčnih nihanjih gre za nihanje vzdolž vezi med dvema atomoma, kar povzroči spremembo v dolžini te vezi. To raztezanje ali krčenje je lahko simetrično ali asimetrično.

Pri deformacijskih nihanjih pride do spremembe velikosti kotov med vezmi. Gre torej za upogibanje molekule. Poznamo 4 tipe deformacijskih nihanj: *scissoring* in *rocking* sta nihanji v ravnini, *wagging* in *twisting* pa nihanji izven ravnine. Ta nihanja so mogoča le pri molekulah, ki vsebujejo več kot dva atoma in so energijsko različno zahtevna. Za spremembo dolžine vezi se porabi več energije kot za spremembo velikosti kota, zato so pri višjih valovnih številih značilnejša valenčna, pri nižjih pa deformacijska nihanja (31).

1.3.2. Uporaba IR spektra

Vsak IR spekter je karakterističen za določeno spojino tako kot je karakterističen prstni odtis pri človeku. Vsak tip vezi ima različno frekvenco nihanja, dve enaki vezi pa imata v različnih spojinah drugačno okolje. Zaradi tega dve molekuli različnih struktur ne moreta imeti enakega IR spektra.

Spekter lahko interpretiramo na dva načina:

- Identifikacija spojine s primerjavo dveh spektrov

Spekter neznanе spojine primerjamo z referenčnim spektrom, katerega struktura je poznana. Če signali obeh spektrov popolnoma sovpadajo, sta spojinu identični.

- Določitev strukture molekule

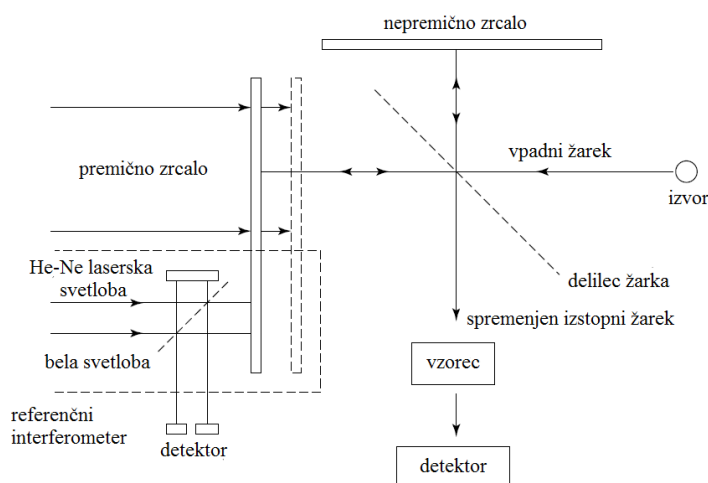
Vsak tip vezi (N-H, C-H, O-H, C-X, C=O...) absorbira v določenem območju (npr. absorpcija v območju $3000 \pm 150 \text{ cm}^{-1}$ skoraj vedno ustreza prisotnosti C-H vezi, absorpcija v območju $1715 \pm 100 \text{ cm}^{-1}$ ustreza C=O vezi v molekuli ...). Na osnovi absorpcijskih trakov v posameznih območjih določimo, katere funkcionalne skupine sestavljajo molekulo (27,29).

IR spekter se lahko uporablja tudi za določanje identitete zmesi (npr. določanje vrste rastlin), pri čemer sam spekter služi kot osnova za nadaljnjo statistično analizo.

1.3.3. Delitev IR spektrometrov

IR spektrometre delimo v dve skupini, disperzijske in Fourierjeve spektrometre (FTIR instrumenti). Slednji se v današnjem času tudi veliko več uporabljajo, saj so cenejši, hitrejši, zaradi večje intenzitete svetlobe, ki doseže detektor pa omogočajo boljše razmerje signal/šum, visoko ločljivost, zanesljivost, točnost in ponovljivost (29,31).

- Sestava in delovanje FTIR spektrometra (Slika 6)



Slika 6. Sestava in delovanje FTIR spektrometra (prirejeno po 28).

Interferometer je najpomembnejši sestavni del FTIR spektrometra. V njem valovanje iz izvora pade na delilec žarka (polprepustno zrcalo, postavljeno pod kotom 45° na vpadajoče sevanje), ki izvorni žarek razdeli v dva žarka. Eden od žarkov je usmerjen naravnost na premično zrcalo, drugi je pravokoten nanj in je usmerjen na nepremično zrcalo. Oba žarka se od zrcal spet odbijeta proti delilcu žarka. Gibanje premičnega zrcala povzroči razliko v dolžini poti, ki jo oba žarka prepotujeta. Ko se žarka po odbojih ponovno združita, pride do konstruktivne in destruktivne interference valovanj, kar je posledica različno dolge poti, ki jo prepotujeta žarka in valovne dolžine valovanja. Vzorec pri prehodu žarka hkrati absorbira energijo pri vseh valovnih dolžinah. Na detektorju tako posnamemo interferogram, ki je definiran kot graf odvisnosti intenzitete signala od časa (časovna domena), vendar nas pogosteje zanima kako se intenziteta spreminja s frekvenco (frekvenčna domena). Omenjeno pretvorbo nam omogoča matematična operacija, ki jo imenujemo Fourierjeva transformacija (FT). Interferogram se iz spektrometra prenese na računalnik, ki ga s FT razdeli na posamezne absorpcijske frekvence, s čimer dobimo spekter, ki je praktično identičen spektru dobljenem z disperzijskim spektrometrom (29). Če hočemo dobiti spekter same spojine, moramo najprej posneti spekter ozadja (*background*), katerega sestavljajo atmosferski plini, ki absorbirajo v infrardečem območju (CO_2 , vodna para). Zatem posnamemo naš vzorec, katerega spekter je sestavljen iz absorpcijskih trakov samega vzorca in ozadja. Računalnik samodejno odšteje ozadje od dobljenega spektra, tako dobimo le spekter naše spojine (29).

1.3.4. IR spektroskopske tehnike

Tehnike snemanja IR spektrov delimo na transmisijske, pri katerih IR sevanje potuje skozi vzorec, in na refleksijske, pri katerih se svetloba od vzorca odbije.

1.3.4.1. Transmisijska tehnika

Transmisijska tehnika je najstarejša in najenostavnejša IR spektroskopska tehnika. Pri prehodu žarka skozi vzorec pride do absorpcije IR sevanja pri specifičnih valovnih dolžinah. Rezultat je transmisijski spekter, ki podaja odvisnost transmitance od valovnega števila. Omenjeni spekter pa lahko pretvorimo tudi v absorpcijski spekter, kjer je podana odvisnost absorbance od valovnega števila.

Transmitanca (prepustnost) je definirana kot razmerje med intenziteto prepuščene (I) in vpadne svetlobe (I_0). Absorbanco (A) in transmitanco (T) povezuje enačba:

$$A = \log I_0 - \log I = \log (I_0/I) = \log (1/T)$$

S to tehniko je možno analizirati vzorce v vseh treh agregatnih stanjih.

Priprava vzorcev za snemanje spektra

Steklo in plastika močno absorbirata v celotnem infrardečem območju, zato se za snemanje vzorca uporabljajo ionske snovi, ki ne absorbirajo v IR območju, predvsem natrijev klorid (NaCl) in kalijev bromid (KBr). Ploščice kalijevega bromida se lahko uporabljajo v območju $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, ploščice natrijevega klorida pa v območju $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$. Slednje so zaradi nizke cene veliko bolj v uporabi.

Način priprave vzorca za snemanje je odvisen predvsem od lastnosti spojine in njenega agregatnega stanja.

- tekočine

Med ploščici natrijevega klorida oz. kalijevega bromida kanemo kapljico tekoče organske spojine. Previdno stisnemo skupaj, da se med ploščicama oblikuje tanek film tekočine in položimo v nastavek v spektrometru. Ploščice iz teh soli so lomljive in dobro topne v vodi, zato lahko na tak način snemamo spektre le organskim spojinam, ki ne vsebujejo vode. Ta metoda je bolj uporabna za kvalitativne namene (29,31).

- trdne snovi

Poznamo tri različne metode za pripravo trdnih vzorcev. Izbira posamezne metode je odvisna predvsem od lastnosti posameznega vzorca. Prva metoda vključuje mešanje fino zdrobljene trdne snovi (preiskovane spojine) z uprašenim alkalijskim halogenidom (najpogosteje KBr, ki je popolnoma transparenten v srednjem IR območju) in stiskanje te zmesi s stiskalnico pod visokim tlakom (približno 10 ton na površino tablete). Pri stiskanju pride do taljenja kalijevega bromida, ki poveže zmes skupaj. Nastane tanka tableta, debela približno 1 mm, ki jo vstavimo v nastavek v spektrometru.

Pri pripravi tablet z alkalijskimi halogenidi je potrebno upoštevati več dejavnikov. Pomembno je razmerje vzorca in alkalijskega halogenida (2-3 mg vzorca pomešamo s približno 200 mg alkalijskega halogenida), da zagotovimo primerno debelino tablete. Preveč tanka tableta je namreč krhka in problematična za rokovanje, predebela pa prepušča premalo sevanja, kar lahko močno zmanjša jakost signalov transmisijskega spektra. Potrebno je zagotoviti primerno velikost kristalov trdne snovi (preveliki delci povzročijo pretirano sipanje sevanja, zlasti pri višjih valovnih dolžinah), upoštevati pa je treba tudi higroskopskost alkalijskega halogenida, saj lahko vezana vlaga moti absorpcijo preiskovane spojine.

Druga metoda je metoda z nujolom. Pri tem trdno snov najprej zdrobimo (približno 50 mg) in jo zatem suspendiramo v dveh do treh kapljicah mineralnega olja nujola. Spekter nato posnamemo s pomočjo ploščic natrijevega klorida. Glavna omejitev te metode je, da nujol lahko zakrije vezi, ki so morebiti prisotne v vzorcu. Vezi nujola vidimo pri 2924, 1462 in 1377 cm^{-1} . Ta metoda je hitra in enostavna, kljub temu pa moramo biti pozorni na nekatere dejavnike, ki vplivajo na kvaliteto spektra. Pri izdelavi suspenzije moramo uporabiti pravo razmerje vzorca in nujola, saj pri premajhni količini vzorca signali v spektru niso vidni, pri preveliki količini pa zaradi nastanka preveč goste suspenzije ne pride do transmisije sevanja. Pomembna je tudi ustrezna velikost delcev vzorca, saj prepreči preveliko sipanje valovanja pri višjih valovnih dolžinah. Na ustrezno jakost signalov v spektru vpliva količina vzorca nanešenega med ploščici natrijevega klorida. Pri premajhni količini so signali oslabljeni, prevelika količina pa zmanjša jakost transmisije.

Tretja metoda uporabna za trdne vzorce je raztapljanje organske spojine v določenem topilu, najpogosteje tetraklorometanu (CCl_4). Spekter prav tako posnamemo s pomočjo ploščic natrijevega klorida (28,29).

- plini

Za snemanje spektrov plinov in tekočin z nizkim vreliščem so na voljo različne cilindrične celice, ki omogočajo pot žarka dolgo od nekaj cm do 10 m. Večjo pot žarka omogočajo celice z odbojno notranjo površino, saj tako naredi žarek več prehodov skozi vzorec pred izhodom iz celice (31).

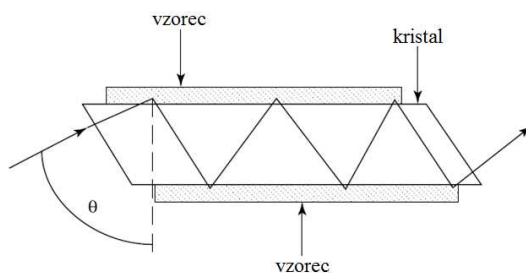
1.3.4.2. Refleksijska tehnika

Refleksijske tehnike uporabljamo za vzorce, ki jih je težko analizirati s transmisijskimi tehnikami. Delimo jih v dve skupini:

- tehnike, ki temeljijo na merjenju eksterne refleksije
- tehnike, ki temeljijo na merjenju interne refleksije (ATR-IR)

ATR IR spektroskopija

Tehnika oslabljenega popolnega odboja (attenuated total reflection) je refleksijska tehnika, ki temelji na pojavu popolnega odboja (Slika 7). Primerna je za analizo različnih snovi, predvsem tistih, ki so predebele ali premočno absorbirajo, da bi jih lahko analizirali s transmisijskimi tehnikami.



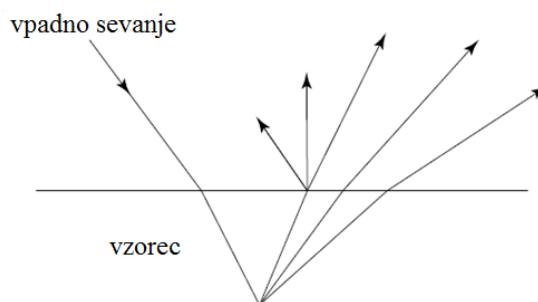
Slika 7. ATR IR.

Pri prehodu valovanja iz medija z večjo optično gostoto v medij z manjšo lahko pride do popolnega odboja (refleksije) valovanja. Do popolnega odboja pride, kadar je vpadni kot valovanja večji od kritičnega kota, ki je definiran kot funkcija lomnih količnikov dveh različnih medijev.

Osnova delovanja te tehnike temelji na tem, da kljub popolnemu odboju na meji dveh medijev (vzorca in kristala), valovanje v manjši meri prehaja pod površino redkejšega medija (vzorca). Tam lahko pride do absorpcije, kar povzroči oslabitev odbitega valovanja. Vzorec in kristal morata biti zato v tesnem stiku. Kot rezultat izmerimo razmerje jakosti odbitega in vpadnega valovanja v odvisnosti od valovne dolžine (28,31).

Difuzna refleksijska spektroskopija

Difuzna refleksijska spektroskopija temelji na principu eksterne refleksije in je primerna za analizo trdnih vzorcev (predvsem praškov). Valovanje se ob stiku s površino vzorca odbije v vseh smereh, kar imenujemo difuzni odboj (Slika 8).



Slika 8. Difuzna refleksijska tehnika.

1.3.5. Predobdelava IR spektrov

Poseben problem pri predobdelavi spektra predstavlja uvoz in izvoz podatkov spektra, posnetega na spektrometrih različnih proizvajalcev zaradi težav z združljivostjo različnih formatov podatkov. Po priporočilu Joint Committee on Atomic and Molecular Physical

Data se je sprejelo soglasje, da naj se dobljeni podatki shranijo v obliki teksta kot ASCII format (27,28).

Na voljo so številni načini in tehnike za pomoč pri kvalitativni in kvantitativni interpretaciji spektra, pri čemer nekatere omogoča že programska oprema spektrometra (28).

1.3.5.1. Zmanjševanje šuma

- **povprečenje signala**

Povprečenje signala dosežemo s ponavljajočim snemanjem in seštevanjem posameznih spektrov. Če predpostavimo, da je porazdelitev šuma naključna, se analitični signali, ki so skladni v času, ojačajo, saj jakost signala linearno raste s številom ponovitev (N). Razmerje med signalom in šumom je sorazmerno s kvadratnim korenem števila ponovitev ($\text{signal}/\text{šum} = k \sqrt{N}$).

- **glajenje**

Glajenje je matematična obdelava spektra, ki se uporablja za zmanjšanje šuma v spektru in s tem povečanje razmerja signal-šum. Spektre dobljen po glajenju je podoben spektru posnetem pri manjši ločljivosti. Na voljo so različne metode glajenja:

- »boxcar« povprečenje

Ta metoda predvideva, da je povprečna vrednost majhnega števila bližnjih točk boljši opis signala kot vsaka posamezna točka. Pri »boxcar« povprečenju preko treh točk je prva točka povprečje točk 1, 2 in 3, druga točka povprečje točk 4, 5 in 6, itd. Večje kot je število povprečenih točk, večja je stopnja glajenja, hkrati pa se zmanjša tudi ločljivost spektra.

- gibljivo (ang. moving) povprečje

Tudi pri tej metodi se vsako območje točk nadomesti z njihovo povprečno vrednostjo, vendar se v primerjavi s prejšnjo metodo zaporedna območja med seboj prekrivajo. Tako je prva točka povprečje točk 1, 2 in 3, druga točka povprečje točk 2, 3 in 4, itd. Stopnja glajenja je določena s številom povprečenih točk, vendar je popačenje spektra manjše v primerjavi s prejšnjo metodo.

- glajenje Savitzky-Golay

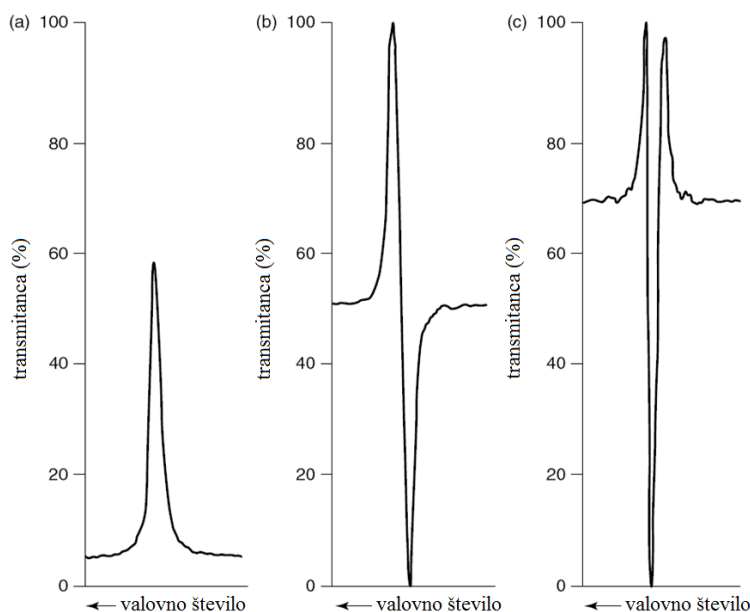
Eno od najbolj uporabljenih metod glajenja sta opisala Savitzky in Golay leta 1964 (32). Glajeni spekter s to metodo glajenja dobimo tako, da izbrano

število točk osnovnega spektra prilegamo polinomu določene stopnje z metodo najmanjših kvadratov in izračunamo vrednost v srednji točki. Določiti moramo vrsto polinoma, pri čemer se največkrat uporablja kvadratna funkcija ($ax^2 + bx + c$), število točk (npr. 5) in število zaporednih filtriranj na izbranem spektru (33).

1.3.5.2. Odvodi spektra

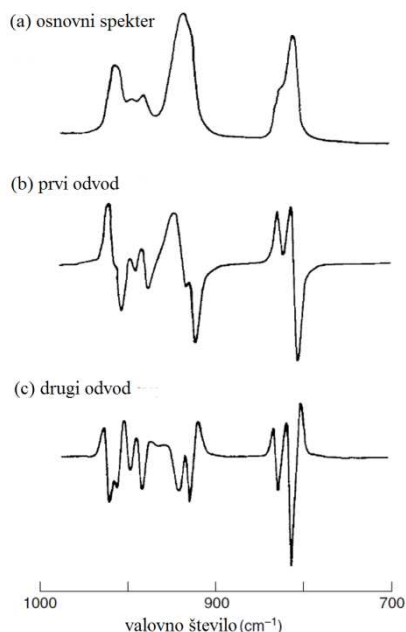
Odvode (prvi, drugi in višji) IR spektra lahko izračunamo na različne načine. Najenostavneje je računanje prvega odvoda spektra tako, da razliko dveh zaporednih vrednosti odvisne spremenljivke (transmitanca) delimo z razliko dveh zaporednih vrednosti neodvisne spremenljivke (valovno število): $\frac{\%T_2 - \%T_1}{\tilde{\nu}_2 - \tilde{\nu}_1}$. Drugi odvod pa izračunamo kot odvod prvega odvoda. Lahko pa za računanje odvodov uporabimo tudi druge algoritme, npr. izračun naklona skozi več zaporednih točk. Ustaljena praksa je, da se pred odvajanjem spektra le ta zgladi (npr. Savitzky-Golay), saj tako zmanjšamo šum, ki ga lahko odvajanje poudari, poveča. (27).

Odvodi spektrov izkazujejo določene prednosti pred osnovnim spektrom. Z njimi pogosto dosežemo izboljšano bazno linijo in ožje absorpcijske trakove, kar nam omogoča ločitev širokih absorpcijskih trakov na posamezne komponente in s tem določitev števila komponent. S prvim odvodom povečamo ločljivost, saj opazujemo spremembe v gradientu, z drugim pa dobimo negativen vrh za vsak absorpcijski trak in ramo (Slika 9).



Slika 9. a) Osnovni spekter; b) Prvi odvod; c) Drugi odvod.

Prednost odvodov je najbolj očitna pri kompleksnejših spektrih, saj pogosto omogoča ločitev absorpcijskih vrhov v širokih absorpcijskih trakovih, kar je lepo razvidno iz Slike 10.



Slika 10. Ločitev širokih absorpcijskih trakov na posamezne komponente pri odvajanju.

Pri FTIR spektrometrih je možno odvod izračunati tako, da spekter najprej pretvorimo s FT nazaj v interferogram, tega pomnožimo z določeno utežno funkcijo in rezultat pretvorimo s FT ponovno nazaj v spekter odvoda. Ta metoda je bolj občutljiva v primerjavi z enostavnim odvajanjem (28).

1.3.5.3. Normalizacija

Normalizacija se pogosto uporablja za izločitev absolutne variabilnosti med posameznimi vzorci. Izračunamo jo tako, da vsako vrednost odvisne spremenljivke delimo s konstanto določene vrednosti. Normalizacijo izvedemo tudi, ko želimo izničiti vpliv sistemske variabilnosti, ki je pogosto povezana z različno celokupno količino vzorca (npr. vpliv različnega volumna injiciranja vzorca pri HPLC) (33).

Pri IR spektroskopiji lahko z normalizacijo zmanjšamo variabilnost, ki je posledica različne dolžine poti žarka (npr. različna debelina KBr tabletke) in različne količine vzorca. Spekter lahko normaliziramo na osnovi površine pod krivuljo spektra ali pa na osnovi višine najmočnejšega vrha (33,34).

1.3.5.4. Fourierjeva transformacija

Fourierjeva transformacija (FT) je matematična operacija, ki kompleksno funkcijo realne spremenljivke ω pretvori v funkcijo neke druge spremenljivke. Pogosto se uporablja pri obdelavi signalov pri spektroskopiji (npr. IR, NMR), pri čemer iz časovno odvisne funkcije dobimo frekvenčno odvisno funkcijo.

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-2\pi i\omega t} dt = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)[\cos(\omega t) + i \sin(\omega t)] dt$$

Z inverzno FT lahko ponovno dobimo prvotno funkcijo, pri čemer se vsi podatki ohranijo.

$$f(t) = \int_{-\infty}^{\infty} F(\omega)e^{2\pi i\omega t} d\omega$$

Vsak signal, tudi % transmittance v odvisnosti od valovne dolžine, lahko zapišemo kot vsoto *sin* in *cos* valov, kontinuirano vsoto takih valov pa imenujemo tudi Fourierjev integral. S FT interferograma tako dobimo IR spekter, z inverzno FT IR spektra pa ponovno dobimo začetni interferogram.

Diskretna Fourierjeva transformacija (DFT) je posebna oblika FT, pri kateri predstavlja osnovna funkcija končno število realnih ali kompleksnih števil. Hitra Fourierjeva transformacija (Fast Fourier Transform, FFT) je učinkovit računalniški algoritem za izračun DFT in njene inverzne funkcije (28).

1.3.5.5. Valčna transformacija (wavelet transform)

Valček je matematična funkcija, ki razdeli dano funkcijo ali kontinuiran časovni signal na enostavnejše komponente konstantne oblike, ki so različnih velikosti in na različnih položajih. Valčna transformacija (WT) je zapis osnovne funkcije v obliki valčkov, majhnih valov, ki so določeni tako v času kot v frekvenci, medtem ko je FT določena le v frekvenci (35,36).

WT se uporabljajo v različne namene (npr. molekulska dinamika, *ab initio* izračuni, kvantna mehanika, obdelava signalov, prepoznavanje glasu, računalniška grafika...), pri čemer vse pogosteje nadomeščajo FT, saj WT omogoča boljše nelinearno aproksimacijo v primerjavi s FT (36).

WT je bila uporabljena tudi v IR spektroskopiji. S pomočjo WT so določali vrsto mono- ali disubstituiranih benzenov na osnovi IR spektra neznanega vzorca (35), uporabili so jih za

predobdelavo vis/NIR spektrov pri razlikovanju med vrstami čaja (37) in kot predobdelavo NIR spektrov pri določanju klorogene kisline v rastlinskih vzorcih (38).

1.4. STATISTIČNE METODE

1.4.1. Analiza variance (ANOVA)

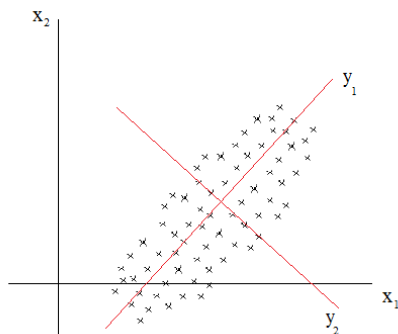
Analiza variance je statistična metoda, ki temelji na dejstvu, da varianca vsakega vzorca, vzetega iz iste populacije, predstavlja nepristransko oceno variance populacije. Bistvo analize variance je v tem, da celotno varianco vseh enot iz vseh vzorcev razstavi na komponente, iz katerih je sestavljena. To pomeni na varianco enot znotraj posameznega vzorca in na varianco med temi vzorci. S to metodo preverimo, ali obstajajo razlike med vzorci posamezne populacije (39).

1.4.2. Metoda glavnih komponent

Metoda glavnih komponent (ang. *principal component analysis*, PCA) je ena najpogosteje uporabljenih multivariantnih metod. Osnoval jo je Karl Pearson leta 1901. Je statistična metoda, ki analizira medsebojno soodvisnost spremenljivk z namenom, da se število spremenljivk zmanjša. Pri tem osnovni nabor spremenljivk preslikamo v množico novih spremenljivk, ki jih imenujemo glavne komponente.

Glavne komponente se izražajo kot linearna kombinacija osnovnih spremenljivk in ohranjajo njihovo skupno variabilnost. Urejene so od najpomembnejše do najmanj pomembne. Prva glavna komponenta je določena tako, da pojasni kar se da velik del celotne variance osnovnih spremenljivk. Druga glavna komponenta je določena tako, da je neodvisna od prve in pojasni velik del še nepojasnjene variance. Tretja glavna komponenta je določena tako, da je neodvisna od prve in druge in pojasni velik del še nepojasnjene variance, itd. (40,41)

Metoda glavnih komponent omogoča povzeti podatke s čim manjšo izgubo informacij tako, da zmanjša razsežnost podatkov, se pravi je njen cilj zmanjševanje dimenzionalnosti prostora. Na primer, če imamo dve spremenljivki, torej na osebkih merimo dve lastnosti, in te vrednosti nanašamo na x, y diagram (t.j. 2D), lahko poiščemo eno spremenljivko, ki najbolje pojasni razpršenost podatkov in je kombinacija prejšnjih dveh (x,y) (slika 11). Če imamo več spremenljivk (npr. 300), je to 300 dimenzionalni prostor. Ta metoda nam omogoča predstaviti podatke z manj spremenljivk (npr. 15), ki pa so linearna kombinacija prvih 300 spremenljivk.



Slika 11. Določitev glavnih komponent v prostoru dveh spremenljivk (x_1 in x_2 sta izhodiščni spremenljivki, podatki so grafično prikazani kot točke. y_1 in y_2 sta dobljeni glavni komponenti. Dvorazsežni prostor lahko reduciramo v enorazsežnega, ki ga določa y_1).

1.4.3. Diskriminantna analiza

Diskriminantna analiza (DA) je statistična metoda, ki omogoča uvrščanje enot v skupine. Njen cilj je poiskati linearno kombinacijo spremenljivk, da bodo vnaprej določene skupine med seboj čimbolj različne, napaka pri uvrščanju enot v skupine pa čim manjša.

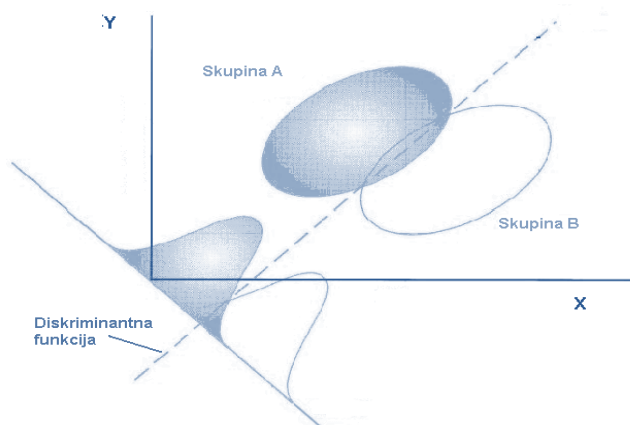
$$f = k_1 \times s_1 + k_2 \times s_2 + \dots + k_n \times s_n$$

f - diskriminantna funkcija

k_1, k_2, \dots, k_n - koeficienti funkcije

s_1, s_2, \dots, s_n - merjene spremenljivke

DA uporabljamo na primer, če želimo osebkje uvrščati v skupine na podlagi dveh spremenljivk (x, y), pri čemer z eno samo spremenljivko skupin ne moremo zadovoljivo ločiti. DA poišče linearno kombinacijo spremenljivk, s katero se skupini zadovoljivo ločita (slika 12).



Slika 12. S posameznima spremenljivkama X in Y ne moremo medsebojno ločiti skupin z zadovoljivo natančnostjo, z njuno linearno kombinacijo (diskriminantno funkcijo) pa lahko.

Kadar objekte uvrščamo v več skupin, je diskriminantnih funkcij več. Koeficiente funkcije izračunamo tako, da so si vrednosti diskriminantnih funkcij za primere iz iste skupine čim bolj podobne, za primere, ki pripadajo različnim skupinam, pa čimbolj različne.

Pri DA za izračun diskriminantne funkcije lahko uporabimo vse spremenljivke, ali pa uporabimo metodo, ki izbere le tiste spremenljivke, ki k razlikovanju med skupinami prispevajo največ (dva različna programa vgrajena v SPSS).

Funkcije se izračunajo na podlagi učnega seta meritev, za katere vemo, v katero skupino spadajo, s tako izračunanimi funkcijami pa nato v skupine uvrščamo objekte, za katere tega ne vemo. Izračunani model ponavadi bolj ustreza vzorcu iz katerega smo ga izpeljali (učni set meritev), kot pa drugim vzorcem iz iste populacije. Zato kadar model preverjamo na vzorcih, s pomočjo katerih smo model zgradili, ugotovimo višjo stopnjo zanesljivosti modela kot pri analizi naključnih vzorcev.

Točnost lahko bolje ocenimo na več načinov:

- Kadar imamo dovolj veliko populacijo vzorcev, jo razdelimo na dva dela. En del uporabimo za izračun koeficientov funkcije, z uvrščanjem vzorcev iz drugega dela pa ocenimo točnost uvrščanja.
- Bolj uporabljen način je navzkrižna validacija z izpuščanjem posameznih objektov (ang. *Leave one out*), pri kateri vsak vzorec posebej izvzamemo iz populacije vzorcev za izračun diskriminantne funkcije. Tako dobljeno funkcijo uporabimo za uvrstitev tega vzorca. Odstotek pravilno uvrščenih vzorcev je dobro merilo za zanesljivost metode (42).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ugotoviti s katero IR tehniko in s katero metodo ali kombinacijo metod predobdelave spektra dosežemo boljše točnost uvrščanja rastlinskih vzorcev v pravo vrsto.

Pri delu bomo uporabili dve različni tehniki. Najprej bomo posneli transmisijske IR spektre celih listov posameznih herbariziranih rastlin, nato pa bomo iz teh listov pripravili še tablete s KBr ter posneli njihov transmisijski IR spekter. Za snemanje spektrov bomo uporabili spektrometer Perkin Elmer FTIR 1600. Na posameznem listu in tableti s KBr bomo opravili več meritev (tri ali pet).

Spektre bomo obdelali z različnimi metodami kot so: glajenje, prvi in drugi odvod, prvi odvod skozi 5 točk, normalizacija, valčna transformacija, glajenje Savitzky-Golay, hitra Fourierjeva transformacija ter kombinacija teh metod.

Pri obdelavi podatkov bomo nato v enem primeru upoštevali vse meritve, v drugem pa njihovo povprečje, s čimer bomo ugotovili, ali število meritev vpliva na točnost uvrščanja.

Podatke bomo nato statistično obdelali. Razdelili jih bomo na dva dela, pri čemer bomo en del podatkov uporabili za določitev koeficientov funkcije, z drugim delom pa bomo ugotavljali točnost uvrščanja. S pomočjo analize varianc bomo izbrali določeno število spremenljivk, ki bodo največ prispevale k razlikovanju med vrstami. Z analizo glavnih komponent (PCA) bomo nato zmanjšali število spremenljivk in odstranili njihovo medsebojno korelacijo, z diskriminantno analizo pa na podlagi PCA komponent uvrščali osebk v vrste.

S primerjavo rezultatov različnih IR tehnik in metod predobdelave bomo poskušali ugotoviti, katera kombinacija je boljše za določitev vrste rastline na podlagi IR spektra.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

3.1.1. Vrbovci (rod *Epilobium*)

Za analizo vrst vrbovcev smo uporabili herbarijski material, ki smo ga dobili iz Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti.

Analizirali smo 75 herbarijskih pol vrbovcev, ki so pripadali štirinajstim različnim vrstam tega rodu (Preglednica III). Za vsak primerek smo vnaprej vedeli vrstno pripadnost.

Preglednica III. Število herbarijskih pol uporabljenih za analizo vrbovcev.

Vrsta	Število herbarijskih pol
<i>E. alpestre</i>	6
<i>E. alsinifolium</i>	6
<i>E. anagalidifolium</i>	5
<i>E. angustifolium</i>	2
<i>E. ciliatum</i>	6
<i>E. collinum</i>	7
<i>E. hirsutum</i>	5
<i>E. lamyi</i>	3
<i>E. montanum</i>	7
<i>E. obscurum</i>	3
<i>E. palustre</i>	6
<i>E. parviflorum</i>	7
<i>E. roseum</i>	7
<i>E. tetragonum</i>	5
Skupaj	75

3.1.2. Krčnice (rod *Hypericum*)

Za analizo vrst krčnic smo prav tako uporabili herbarijski material iz Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti. Pri obeh tehnikah smo analizirali 60 herbarijskih pol krčnic (Preglednica IV), ki so pripadale šestim različnim vrstam. Pri tehniki snemanja tabletk s KBr smo dodatno analizirali še 4 herbarijske pole, ki so pripadale podvrsti *H. perforatum*.

Preglednica IV. Število herbarijskih pol uporabljenih za analizo krčnic.

Vrsta	Število herbarijskih pol
<i>H. dubium</i>	10
<i>H. hirsutum</i>	10
<i>H. maculatum</i>	10
<i>H. montanum</i>	10
<i>H. perforatum</i>	10
<i>H. perforatum, subsp. veronense</i>	4
<i>H. tetrapterum</i>	10
Skupaj	64

3.2. APARATURE IN PRIPOMOČKI

Za snemanje spektrov smo uporabili spektrometer Perkin Elmer FTIR 1600 (Slika 13), ki deluje na principu transmisijske tehnike v srednjem IR (MIR) območju ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$). Glajenje posnetega spektra smo izvedli s programom Spectrum v.5.3.1., ki je del programske opreme spektrometra.



Slika 13. Spektrometer Perkin Elmer FTIR 1600.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programe Microsoft Office Excel 2007, Matlab 2008a in SPSS 16.0.

3.3. NASTAVITVE PRI MERJENJU

Preglednica V. Merilne nastavitve na spektrometru.

	Cel listek	Tabletka s KBr
Ozadje	zrak	zrak
Število ponovitev snemanja	5	4
Ločljivost	2 cm ⁻¹	2 cm ⁻¹
Število podatkovnih točk	1776	1776
Končni format	transmitanca	transmitanca
Detektor	devteriran triglicin sulfatni detektor (DTGS)	DTGS
Območje snemanja spektra	4000 – 450 cm ⁻¹	4000 – 450 cm ⁻¹
Delilec žarka	KBr	KBr

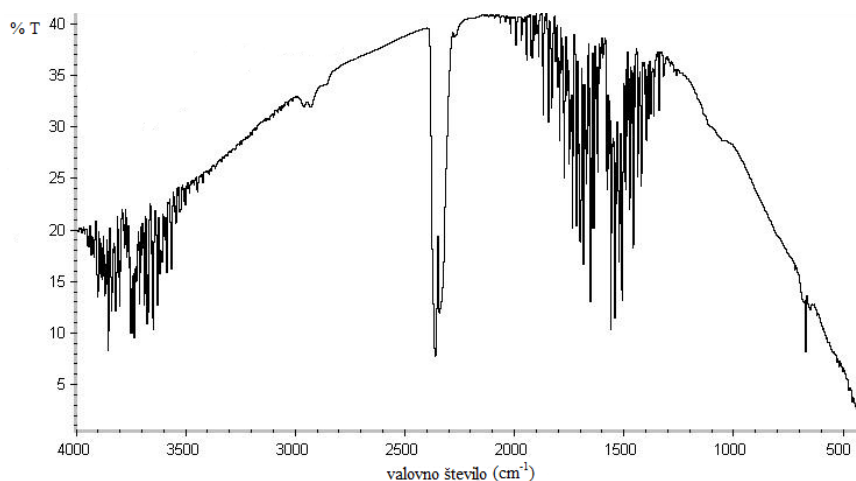
3.4. OPTIMIZACIJA NAČINA MERJENJA

Pri optimizaciji načina merjenja smo izbrali tri različne rastline, od katerih sta bili dve iste vrste (*E. alsinifolium* – pola 615, 624, *E. ciliatum* – pola 693). Pri vsaki rastlini smo pripravili po tri tabletko iz treh različnih listov. Za vsako tabletko smo potem opravili tri meritve, za vsak spekter izvedli še glajenje (smoothing) in izračunali prvi odvod osnovnega spektra ter spektra po glajenju. Na osnovi vizualne primerjave dobljenih spektrov v programu Matlab smo se odločili, da bomo za vsako rastlino izdelali po eno tabletko in posneli spekter na večih mestih, saj so bili spektri različnih tabletk iste rastline podobni. Če bi se spektri posameznih tabletk iste rastline med seboj precej razlikovali, bi se odločili za izdelavo več tabletk posamezne rastline.

V primeru *E. alsinifolium* (pola 615) smo izdelali še dodatno tabletko, kjer smo pri izdelavi uporabili večjo količino KBr (200 mg). Ker so bili v tem primeru šibkejši signali v spektru, smo se odločili, da bomo pri izdelavi tabletk vedno uporabili manjšo količino KBr (160 mg).

3.5. PRIPRAVA VZORCA IN POTEK MERITVE

Pri obeh tehnikah smo pred snemanjem vzorca posneli spekter ozadja (Slika 14), ki ga je računalnik samodejno odštel pri snemanju vzorca. Ozadje predstavljajo absorpcijski vrhi, ki so predvsem posledica prisotnega ogljikovega dioksida in vode v zraku in jih je potrebno odšteti od spektra vzorca, da dobimo dejanski spekter vzorca.



Slika 14. Spekter ozadja.

3.5.1. Cel list preučevane rastline

Glede na navodila za snemanje transmissijskih IR spektrov trdnih snovi (uvod), bi morali pri snemanju spektra uporabiti ploščice natrijevega klorida. Ker smo hoteli posneti transmissijski spekter skozi cel list, ploščice niso bile primerne za uporabo. Zaradi velikosti in neravne površine lista so ploščice padale narazen. Da bi jih obdržali skupaj, bi morali uporabiti tekočino (topilo), ki bi ploščice potegnila skupaj in s tem držala list v določenem položaju. Za ta način se nismo odločili zaradi možnih interakcij topila z listom rastline, kar bi lahko neposredno vplivalo na transmissijski IR spekter rastline. Snemanje smo zato izvedli tako, da smo cel list ustrezno pritrdili na nastavek in posneli spekter. Za posamezno rastlino smo opravili tri meritve, in sicer po eno meritev na treh različnih listih. Meritve smo opravljali na delih lista, kjer ni potekala nobena večja žila. V določenih primerih je bilo to nemogoče, saj niso bili vsi listi dovolj veliki ali celi.

Skupaj smo tako opravili 225 meritev na rastlinah iz rodu vrbovcev in 180 meritev na rastlinah iz rodu krčnic.

3.5.2. Tabletko s KBr

Liste rastlin smo pred pripravo tabletko s KBr sušili v eksikatorju nad silikagelom pri sobni temperaturi 24 ur. Z osušitvijo lista smo izboljšali njegovo drobljivost in s tem zagotovili manjšo velikost delcev po drobljenju. Manjši kot so bili delci, lažje smo dosegli homogeno porazdelitev vzorca v tableti.

Določeno maso lista ($2,5 \text{ mg} \pm 0,5 \text{ mg}$) smo zdrobili s pestilom v ahatni terilnici (Slika 15), dodali 160 mg KBr ter z mešanjem v terilnici pripravili homogeno zmes, ki smo jo nato stisnili v tabletko z ročno stiskalnico Graseby Specac pod visokim tlakom (približno 10 ton) (Slika 16). S tehtanjem KBr in lista smo zagotovili, da je bila količina tabletkne zmesi pri vseh tabletah enaka, kar je omogočilo pripravo tablet enake debeline. Na ta način smo preprečili vpliv različne debeline tablet na jakost signalov transmisijskega spektra. Vsako tabletko smo pripravljali sproti pred snemanjem ter KBr med snemanji hranili v eksikatorju, da smo omejili vpliv zračne vlage na sam spekter, saj je KBr zelo higroskopna snov. Ob daljšem izpostavljanju zraku bi zaradi vezave zračne vlage postal bolj vlažen, kar bi lahko vplivalo na spekter rastline, otežena pa bi bila tudi izdelava homogene tabletko.

Z vsako tabletko smo opravili pet meritev na različnih mestih, kar pomeni, da smo skupaj opravili 375 meritev z rastlinami iz rodu vrbovcev in 320 meritev z rastlinami iz rodu krčnic.

Na dobljenih osnovnih spektrih smo nato izvedli še metodo glajenja, ki jo omogoča programska oprema spektrometra (Spectrum v.5.3.1.). Osnovni in glajeni spekter smo zaradi lažjega izvoza podatkov shranili v obliki teksta kot ASCII format.



Slika 15. Ahatna terilnica s pestilom.



Slika 16. Ročna stiskalnica KBr tablet Graseby Specac.

3.6. IZVOZ PODATKOV IN PREDOBDELAVA SPEKTRA

Podatke osnovnih spektrov posameznih meritev smo v obliki ASCII formata prenesli v program Matlab, kjer smo jih zbrali v preglednico. Slednja je izgledala tako, da smo na levi strani imeli izpisana valovna števila, nato pa so si v desni smeri pri vsakem valovnem številu sledile vrednosti intenzitet signalov spektra, razvrščene po abecednem vrstnem redu vzorcev.

Zbrane podatke smo nato prenesli v program Excel, kjer smo izračunali prvi in drugi odvod spektra, odvod čez pet točk, normalizacijo in njen odvod. Izračunali smo tudi povprečja posameznih meritev iste rastline ($\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n}$, $n = 3$ ali 5) ter jih obravnavali na enak način kot vse meritve. Za lažjo predstavo so v Preglednici VI zbrane posamezne metode predobdelave spektra in programi, ki smo jih uporabili za njihov izračun. Pri metodah, ki smo jih računali v programu Excel, so podane tudi formule, po katerih smo računali.

V programu Matlab smo na osnovnem spektru izvedli še valčno transformacijo, ki smo ji potem v programu Excel izračunali prvi odvod. Prav tako smo na osnovnih spektrih izvedli še glajenje Savitzky-Golay ter nato izračunali prve odvode dobljenih spektrov. Za spektre glajene s to metodo smo prav tako izračunali povprečja ter njihove prve odvode.

Enako predobdelavo podatkov kot za osnovne spektre smo izvedli tudi za avtomatsko glajene spektre. Na slednjih smo v programu Matlab izračunali tudi hitro Fourierjevo transformacijo.

Predobdelavo podatkov smo tako izvajali na štirih setih podatkov posamezne tehnike:

- osnovni spektri vseh opravljenih meritev,
- povprečje osnovnih spektrov, snemanih na isti rastlini,
- avtomatsko glajeni spektri vseh opravljenih meritev,
- povprečje avtomatsko glajenih spektrov, snemanih na isti rastlini.

Na celih listih smo opravili po tri meritve za isto rastlino, pri čemer smo meritve opravljali na različnih listih posamezne rastline, tablete s KBr pa smo posneli petkrat, in sicer eno tabletko na petih različnih mestih. Za boljšo primerjavo obeh tehnik, smo celotno obdelavo podatkov pri tabletah opravili najprej za tri meritve za posamezno rastlino in njihova povprečja, zatem pa smo enak postopek ponovili še na petih meritvah in njihovih povprečjih.

Povprečne vrednosti smo računali z namenom, da bi ugotovili, ali število meritev znatno vpliva na rezultat uvrščanja rastline v pravo vrsto. Pri povprečenju večih meritev iste rastline se lahko del informacij zgubi, zato bi pričakovali boljše rezultate pri več posameznih meritvah.

Preglednica VI. Metode predobdelave spektra, programi in formule za izračun.

Metode	Program	Formula za izračun	Osnovni spekter	Glajeni spekter
Prvi odvod	Microsoft Office Excel	$\%T'(\tilde{\nu}) = \frac{\%T_2 - \%T_1}{\tilde{\nu}_2 - \tilde{\nu}_1}$	+	+
Drugi odvod	Microsoft Office Excel	$\%T''(\tilde{\nu}) = \frac{\%T'_2 - \%T'_1}{\tilde{\nu}_2 - \tilde{\nu}_1}$	+	+
Prvi odvod čez pet točk	Microsoft Office Excel	Slope ($T_i: T_{i+5}; \tilde{\nu}_i: \tilde{\nu}_{i+5}$)	+	+
Normalizacija	Microsoft Office Excel	$\%T^n = \frac{\%T_{\tilde{\nu}} - \%T_{\min\tilde{\nu}}}{\%T_{\max\tilde{\nu}} - \%T_{\min\tilde{\nu}}}$	+	+
Prvi odvod normalizacije	Microsoft Office Excel	$\%T^{n'}(\tilde{\nu}) = \frac{\%T_2^n - \%T_1^n}{\tilde{\nu}_2 - \tilde{\nu}_1}$	+	+
Wavelet transformacija 1	Matlab	Metodo izvede program	+	+
Prvi odvod transformacije Wavelet 1	Microsoft Office Excel	$\%T^{W1}(\tilde{\nu}) = \frac{\%T_2^{W1} - \%T_1^{W1}}{\tilde{\nu}_2 - \tilde{\nu}_1}$	+	+
Transformacija wavelet 3	Matlab	Metodo izvede program	+	+
Prvi odvod transformacije wavelet 3	Microsoft Office Excel	$\%T^{W3}(\tilde{\nu}) = \frac{\%T_2^{W3} - \%T_1^{W3}}{\tilde{\nu}_2 - \tilde{\nu}_1}$	+	+
Fourierjeva transformacija	Matlab	Metodo izvede program	-	+
Glajenje Savitzky-Golay	Matlab	Metodo izvede program	+	-
Prvi odvod glajenja Savitzky-Golay	Matlab	$\%T^{SG}(\tilde{\nu}) = \frac{\%T_2^{SG} - \%T_1^{SG}}{\tilde{\nu}_2 - \tilde{\nu}_1}$	+	-

Pred statistično analizo smo spektre obdelali z različnimi metodami, da bi ugotovili, katera najbolj pripomore k pravilni uvrstitvi rastline v vrsto.

- **Avtomatsko glajenje:** Na osnovnih spektrih smo tako že v začetku s programom Spectrum izvedli metodo glajenja (avtomatsko glajenje), da smo pri končnih rezultatih lahko primerjali, ali pri glajenju, katerega namen je odstraniti šum spektra, dejansko dobimo boljše rezultate. Zaradi tega smo se na osnovnih in glajenih spektrih lotili enakih predobdelav spektra. Avtomatsko glajenje programa Spectrum je glajenje, ki prilagodi stopnjo glajenja v določeni točki glede na razmerje med signalom in šumom v tej točki. Tako so točke na bazni liniji glajene v večji meri, medtem ko točke vrhov sploh niso.

V določenih primerih smo kombinirali po dve metodi skupaj z namenom, da bi dobili čim bolj informativne vrednosti za ločitev med vrstami.

- **Odvajanje:** Prvi in drugi odvod sta se že v veliko primerih izkazala kot uspešni metodi predobdelave spektra. Računali smo ju z namenom, da bi dobili ustrezno informacijo o signalih, ki so morebiti prikriti v širokih absorpcijskih trakovih. Glede na to, da prvi in drugi odvod za računanje vzameta dve sosednji točki, kar lahko močno izrazi oz. poveča šum, smo se odločili še za izračun prvega odvoda skozi pet točk, saj smo hoteli ugotoviti, ali pri tem dobimo bistveno drugačne rezultate.
- **Normalizacija:** Z min-max normalizacijo smo naredili linearno transformacijo osnovnih podatkov, pri čemer se je razmerje med vrednostmi osnovnih podatkov ohranilo. Za normalizacijo smo uporabili formulo: $x' = \frac{x - x_{min}}{x_{max} - x_{min}}$, pri čemer smo dobili vrednosti med 0 ($x = x_{min}$) in 1 ($x = x_{max}$). Da bi dobili čim bolj informativne vrednosti signalov, smo izračunali še prvi odvod normaliziranih podatkov.
- **FFT:** Ena od uporabljenih metod predobdelave spektra je bila tudi hitra Fourierjeva transformacija (FFT). Glede na to, da Fourierjevo transformacijo uporabi že sam spektrometer za pretvorbo interferograma v spekter, smo z uporabo te metode iz spektra dobili ponovno interferogram. Slednji je bil nekoliko spremenjen, saj smo hitro Fourierjevo transformacijo izvedli le na spektrih, ki smo jih prvotno gladili. Zanimalo nas je, kakšna je točnost uvrščanja, če v statistično obdelavo vključimo podatke interferograma. Ker nam FT poda le frekvence, ki so prisotne v signalu, ne pove pa nam nič, kdaj se je na določenem intervalu pojavila določena frekvenca,

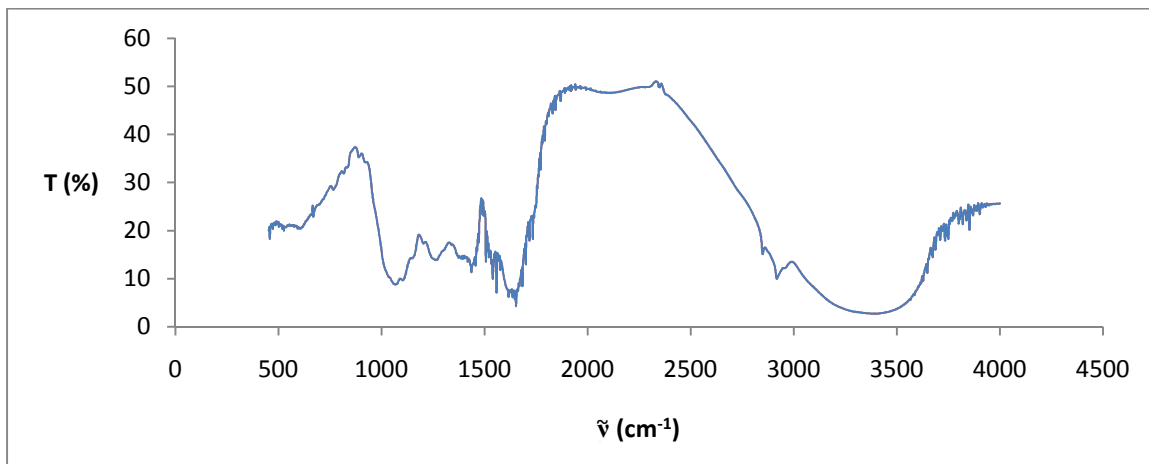
smo se odločili še za uporabo valčne transformacije, ki je FFT v določeni meri podobna, dodatno pa nam poda še čas pojava posamezne frekvence.

- **Valčna transformacija:** Valčna transformacija že nekaj časa velja kot uporabna metoda za predobdelavo različnih spektrov. V našem primeru smo uporabili diskretno valčno transformacijo (DWT), ki omogoča zmanjšanje števila spremenljivk tako, da signal spusti skozi visokofrekvenčni in nizkofrekvenčni filter, tako ga razdeli na visokofrekvenčni in nizkofrekvenčni pas. Tako se lahko znebimo visokih frekvenc, ki so značilne za šum. Nizkofrekvenčni filter odstrani vse frekvence, ki so večje od polovice najvišje frekvence v signalu, visokofrekvenčni filter pa naredi ravno obratno. Signal nato z vsako stopnjo podvzorčenja lahko razdelimo na polovico, saj s podvzorčenjem zmanjšamo frekvenco vzorčenja signala, kar ustrezno zmanjša število spremenljivk spektra. V prvi stopnji podvzorčenja tako dobimo polovico točk signala, v drugi četrtno, v tretji osmino, itd. V našem primeru smo za nadaljnjo obdelavo vzeli spekter po prvi (WT 1) ter tretji (WT 3) stopnji. Pri WT3 smo vključno z dobljenimi niskimi frekvencami upoštevali tudi visoke frekvence, ki jih nizkofrekvenčni filter odstrani, saj smo hoteli preprečiti preveliko izgubo informacij.

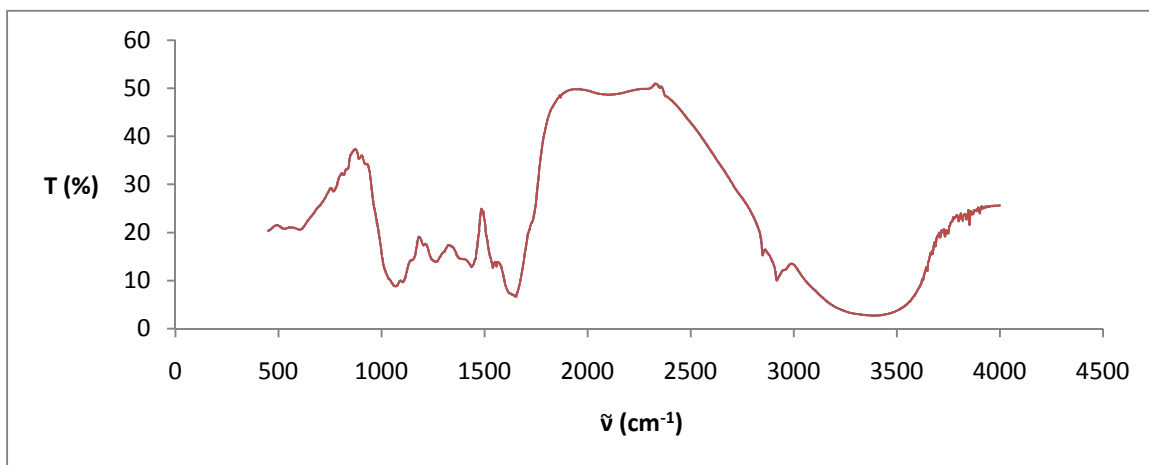
Da bi povečali ločljivost vrhov tudi po tej transformaciji, smo izračunali še prvi odvod valčne transformacije.

- **Glajenje:** Glajenje Savitzky-Golay je prav tako ena od že dobro uveljavljenih metod za odstranjevanje šuma v spektru. Ker smo v programu Spectrum spektrometra izbrali avtomatsko glajenje, smo na osnovnih spektrih v nadaljevanju izvedli še glajenje Savitzky-Golay. S primerjavo rezultatov po obeh vrstah glajenja smo hoteli ugotoviti, katera je v našem primeru ustrežnejša za odstranjevanje šuma, hkrati pa ne povzroči prevelike izgube informacij. Primerjava osnovnega spektra in spektrov dobljenih po obeh vrstah glajenja je prikazana na Sliki 17.

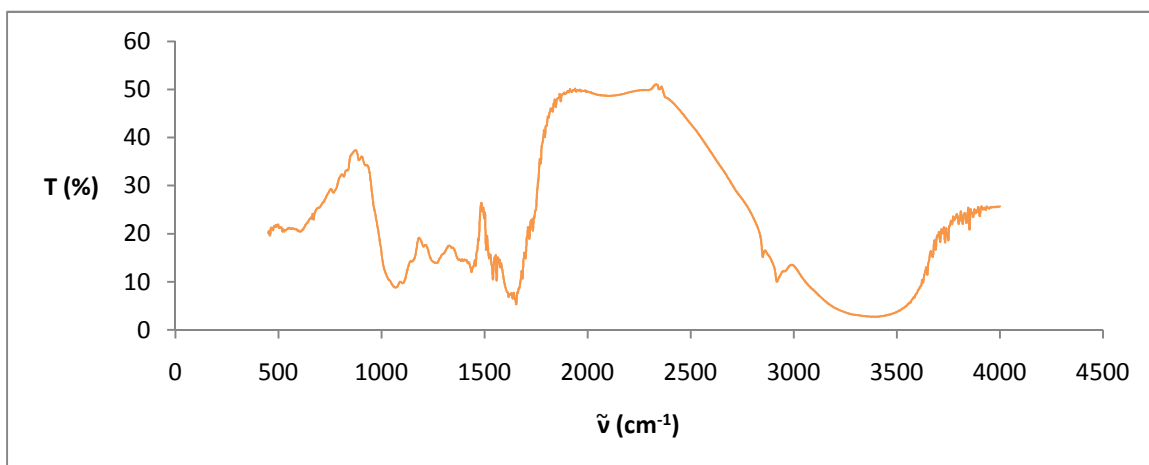
a)



b)



c)



Slika 17. a) Osnovni spekter *Hypericum dubium* 431; b) Spekter *Hypericum dubium* 431 po avtomatskem glajenju s programom Spectrum; c) spekter *Hypericum dubium* 431 po glajenju Savitzky-Golay.

3.7. STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Posamezni set podatkov smo po vseh metodah predobdelave pri obeh rodovih (*Epilobium* in *Hypericum*) razdelili na dva dela (Preglednici VII in VIII). Prvi del, ki je vključeval približno dve tretjini podatkov, je služil kot testni vzorec, drugi, s preostalo tretjino podatkov, pa kot validacijski vzorec. Podatke smo razdelili na dva dela na osnovi števila rastlin v posamezni vrsti. Na primer, za vrsto *E. alpestre* smo imeli na voljo 6 osebkov, kar pomeni da smo v testni del vključili 4 rastline, v validacijskega pa 2. V setu podatkov z vsemi meritvami smo tako imeli $4 \times n$ meritev v testnem delu in $2 \times n$ meritev v validacijskem delu, pri čemer n pomeni število meritev iste rastline (3 ali 5).

Preglednica VII. Razdelitev rastlin rodu *Epilobium* na testni in validacijski del.

VRSTA	ŠTEVILO PRIMERKOV	TESTNI VZOREC	VALIDACIJSKI VZOREC
<i>E. alpestre</i>	6	4	2
<i>E. alsinifolium</i>	6	4	2
<i>E. anagalidifolium</i>	5	4	1
<i>E. angustifolium</i>	2	1	1
<i>E. ciliatum</i>	6	4	2
<i>E. collinum</i>	7	4	3
<i>E. hirsutum</i>	5	4	1
<i>E. lamyi</i>	3	2	1
<i>E. montanum</i>	7	4	3
<i>E. obscurum</i>	3	2	1
<i>E. palustre</i>	6	4	2
<i>E. parviflorum</i>	7	4	3
<i>E. roseum</i>	7	4	3
<i>E. tetragonum</i>	5	4	1

Preglednica VIII. Razdelitev rastlin rodu *Hypericum* na testni in validacijski del.

VRSTA	ŠTEVILO PRIMERKOV	TESTNI VZOREC	VALIDACIJSKI VZOREC
<i>H. dubium</i>	10	7	3
<i>H. hirsutum</i>	10	7	3
<i>H. maculatum</i>	10	7	3
<i>H. montanum</i>	10	7	3
<i>H. perforatum</i>	10	7	3
<i>H. perforatum</i> , <i>subsp. veronense</i>	4	3	1
<i>H. tetrapterum</i>	10	7	3

Iz podatkov spektrov, ki smo jih uvrstili v testni del, smo s pomočjo analize varianc (ANOVA) izbrali približno 300 valovnih števil z najbolj informativnimi signali. Test analize variance smo izvedli v programu Matlab. Za vsa valovna števila smo izračunali faktor F , ki opiše sposobnost razlikovanja med vrstami. Definiran je kot razmerje med varianco med vrstami in varianco znotraj vrste: $F = \frac{V_{med\ vrstami}}{V_{znotraj\ vrste}}$

Varianca med vrstami nam prikaže razlike med različnimi vrstami, varianca znotraj vrste pa razlike med osebki ene vrste. Kadar je razlika med vrstami velika, je varianca med vrstami glede na varianco znotraj vrste velika, kar pomeni, da je faktor F višji. Kadar je razlika med vrstami majhna, sta oba dela variance podobna, zato je faktor F ustrezno nižji. Dobljene F vrednosti pri posameznih valovnih številih smo zato razvrstili po velikosti od največjega proti najmanjšemu ter izbrali okrog 300 valovnih števil z najvišjo F vrednostjo, pri katerih so razlike med vrstami najbolj karakteristične. Število spremenljivk smo zmanjšali na omenjeno vrednost zaradi kasnejše uporabe metode glavnih komponent. S primerjavo rezultatov točnosti uvrščanja rastlin, kjer so v metodo glavnih komponent vključili prvič 200 in drugič 1300 spremenljivk je bilo ugotovljeno, da dosežemo višjo točnost uvrščanja, če v metodo glavnih komponent vključimo manjše število najbolj informativnih spremenljivk (43). Na tak način zmanjšane sete podatkov, ki so vključevali tako testni kot tudi validacijski del rastlin, smo shranili v obliki Excelovih dokumentov, da smo jih lahko prenesli v program SPSS, kjer je potekala nadaljnja statistična obdelava.

V programu SPSS smo z metodo glavnih komponent zmanjšali število spremenljivk na 15 glavnih komponent. Za takšno število glavnih komponent smo se odločili glede na število vrst, ki smo jih imeli. Glavnih komponent mora biti najmanj toliko, kolikor je vrst, kar je v našem primeru najmanj 14 (pri vrbovcih). Pri šentjanževki smo imeli le 7 vrst, vendar smo

se zaradi lažje primerjave rezultatov obeh rodov odločili za enako število glavnih komponent.

Na osnovi izbranih glavnih komponent smo z diskriminatno analizo v programu SPSS uvrščali rastline v vrsto. Pri tem smo v procesu diskriminantne analize izbrali postopno metodo (stepwise method) ter kot kriterij izbrali verjetnost vrednosti F med 0,01 in 0,02 (stepwise DA in: 0.01/ out: 0.02).

Rezultate pravilno uvrščenih rastlin za posamezno metodo smo zaradi boljše preglednosti in lažje primerjave še grafično predstavili.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Posneti spektri so vsebovali 1776 spremenljivk. S pomočjo testa ANOVA smo od teh izbrali le okrog 300 najbolj informativnih spremenljivk. S PCA smo nato še dodatno zmanjšali število spremenljivk na 15, pri čemer smo odstranili tudi njihovo medsebojno korelacijo. Na osnovi 15 PCA komponent smo z DA uvrščali osebke v vrsto ter kot končni rezultat podali odstotek pravilno uvrščenih rastlin iz validacijskega vzorca.

Vmesni rezultati niso predstavljeni, saj je naš namen dobiti čimbolj avtomatiziran postopek, ki bi omogočal, da v program vnesemo spektralne podatke, ta pa nam določi vrsto. Pri tem nas zato ni zanimalo katera valovna števila so informativna v posameznem spektru, saj so se ta med različnimi predobdelavami spektra precej razlikovala in ni bilo mogoče najti informativnih območij, ki bi bila skupna vsem metodam predobdelave spektra. V tem poglavju so zato predstavljeni le končni rezultati (odstotki uvrstitve rastline v pravo vrsto).

4.1. VRBOVCI

4.1.1. Tehnika snemanja transmisijskih spektrov celih listov

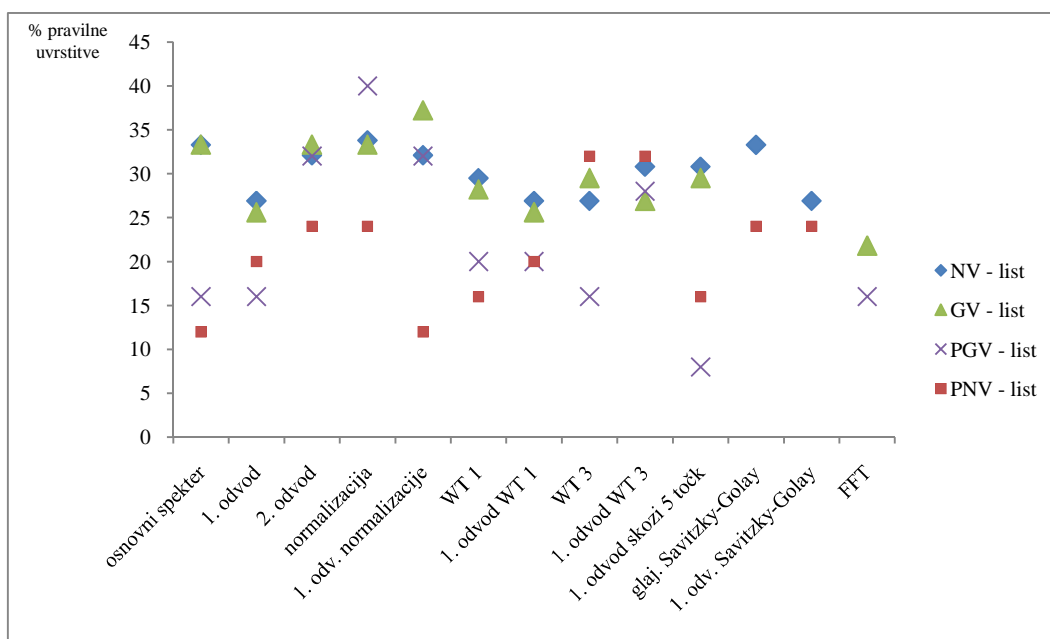
Kot končni rezultat smo primerjali odstotek pravilne uvrstitve posamezne rastline po različnih metodah predobdelave spektra (Preglednica IX).

Preglednica IX. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto po različnih metodah predobdelave IR spektrov celih listov vrbovcev.

Metoda predobdelave podatkov	Odstotek uvrstitve v pravo vrsto			
	NV	PNV	GV	PGV
osnovni spekter	33	12	33	16
prvi odvod	27	20	26	16
drugi odvod	32	24	33	32
normalizacija	34	24	33	40
prvi odvod normalizacije	32	12	37	32
WT 1	30	16	28	20
prvi odvod WT 1	27	20	26	20
WT 3	27	32	30	16
prvi odvod WT 3	31	32	27	28
prvi odvod skozi 5 točk	31	16	30	8
glajenje Savitzky-Golay	33	24	-	-
prvi odvod Savitzky-Golay	27	24	-	-
FFT	-	-	22	16

NV - osnovni spektri posameznih meritev pred glajenjem; PNV – povprečne vrednosti posameznih meritev; GV – osnovni spektri posameznih meritev po avtomatskem glajenju; PGV – povprečne vrednosti posameznih glajenih meritev

Iz Preglednice IX je zaradi velikega števila podatkov težko razbrati ali predobdelava spektra ter število meritev vplivata na končni rezultat uvrstitve osebkov v pravo vrsto, zato smo rezultate še grafično predstavili.



Graf 1. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto vrbovcev po različnih metodah predobdelave IR spektrov celih listov.

Iz Grafa 1 je razvidno, da sta seta podatkov s tremi meritvami za posamezno rastlino (NV in GV) v splošnem dajala boljše rezultate kot seta podatkov povprečij teh meritev (PGV in PNV). Čeprav to ne drži pri vseh metodah predobdelave (nekateri rezultati so pri povprečjih enaki ali celo boljši), lahko sklepamo, da je za boljše uvrstitve v pravo vrsto potrebnih več meritev za posamezen vzorec. S tem, ko v statistično analizo vključimo tri spektre istega vzorca pa pridobimo tudi informacijo o variabilnosti znotraj posameznega osebkov (rastline). Pri povprečenju se lahko določene informacije izgubijo, kar pa je lahko bistvenega pomena za ločitev med vrstami.

S primerjavo rezultatov osnovnih in avtomatsko glajenih spektrov ne moremo z gotovostjo trditi, kateri dajejo boljše rezultate. Glede na to, da z glajenjem odstranimo šum v spektru, bi pri glajenih spektrih v splošnem pričakovali boljše rezultate, vendar se ta hipoteza v našem primeru ni potrdila. Med rezultati obeh, osnovnih in avtomatsko glajenih spektrov, ni bistvene razlike, ki bi potrdila smiselnost glajenja. Odstotek pravilne uvrstitve je tako pri nekaterih metodah predobdelave boljši pri osnovnih spektrih, pri drugih metodah predobdelave pa pri avtomatsko glajenih spektrih. Glajenje Savitzky-Golay je bilo uspešno le v setu podatkov s povprečji meritev, medtem ko pri posameznih meritvah s to vrsto glajenja prav tako nismo dosegli izboljšanja.

Iz samega grafa tudi ne moremo določiti, katera metoda predobdelave je najboljša. Nobena od uporabljenih metod ne daje bistveno boljših rezultatov od drugih metod, prav tako so rezultati predobdelav primerljivi z dobljenimi rezultati pri osnovnem spektru.

4.1.2. Tehnika snemanja transmisijskih spektrov tabletk s KBr

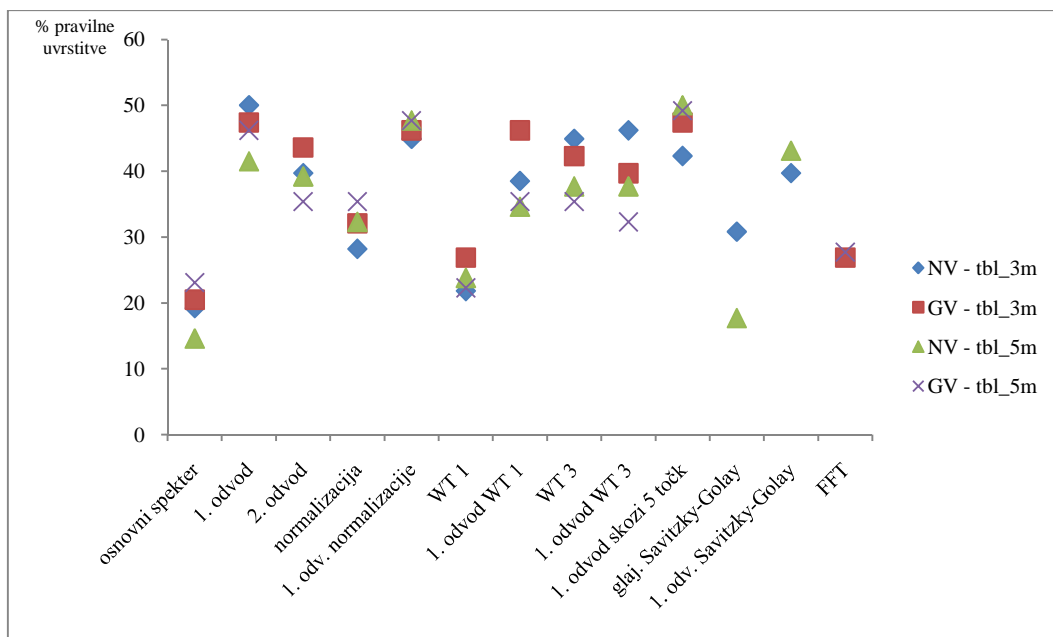
Pri tej tehniki smo izvedli celotno obdelavo podatkov treh (tbl_3m) in petih (tbl_5m) meritev posamezne tabletk in njihovih povprečij, saj smo hoteli ugotoviti, ali je večje število meritev pogoj za boljše uvrščanje v pravo vrsto. Rezultati so prikazani v Preglednici X.

Preglednica X. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto vrbovcev po različnih metodah predobdelave IR spektrov tabletk s KBr.

Metoda predobdelave spektra	Odstotek uvrstitve v pravo vrsto							
	NV - tbl_3m	PNV - tbl_3m	GV - tbl_3m	PGV - tbl_3m	NV - tbl_5m	PNV - tbl_5m	GV - tbl_5m	PGV - tbl_5m
osnovni spekter	19	16	21	24	15	13	23	25
prvi odvod	50	20	47	20	42	33	46	29
drugi odvod	40	36	44	32	39	54	35	38
normalizacija	28	12	32	24	32	29	35	13
prvi odvod normalizacije	45	12	46	36	48	38	48	17
WT 1	22	12	27	12	24	29*	22	33*
prvi odvod WT 1	39	40	46	32	35	42	35	46
WT 3	45	48	42	36	38	46	35	42
prvi odvod WT 3	46	40	40	48	38	50	32	42
prvi odvod skozi 5 točk	42	28	47	28	50	25	49	33
glajenje Savitzky-Golay	31	24	-	-	18	25	-	-
prvi odvod Savitzky-Golay	40	16	-	-	43	25	-	-
FFT	-	-	27	32	-	-	28	29

* uporabljene nastavitve pri DA: stpw DA in: 0.04/ out: 0.06, pri ostalih pa stpw DA in: 0.01/ out: 0.02

NV - osnovni spektri posameznih meritev pred glajenjem; PNV – povprečne vrednosti posameznih neglajenih meritev;
 GV – osnovni spektri posameznih meritev po avtomatskem glajenju; PGV – povprečne vrednosti posameznih glajenih meritev;
 tbl_3m – obdelava treh posameznih meritev; tbl_5m – obdelava petih posameznih meritev



Graf 2. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto vrbovcev po različnih metodah predobdelave IR spektrov KBr tablet. Prikazani so rezultati osnovnih in glajenih spektrov treh in petih meritev posamezne tablete.

V Grafu 2 smo primerjali rezultate obdelave treh in petih meritev posamezne tablete, da bi ugotovili, ali je pri tej tehniki za boljšo uvrstitev pomembno tudi število meritev, ki jih opravimo na posamezni tabletki. Glede na to, da so rezultati pri treh in petih meritvah za posamezno tabletko primerljivi, ne moremo reči, da več kot tri meritve posamezne tablete dajejo tudi boljše rezultate pravilne uvrstitve.

Opazimo lahko, da avtomatsko glajenje, ki smo ga izvedli s programom Spectrum, bistveno ne vpliva na rezultate v primerjavi z neglajenimi spektri (primerjava GV in NV). Če primerjamo avtomatsko glajenje z glajenjem Savitzky-Golay, lahko ugotovimo, da slednje daje nekoliko boljše rezultate, v obeh primerih pa je odstotek pravilno uvrščenih osebkov višji kot pri osnovnem spektru.

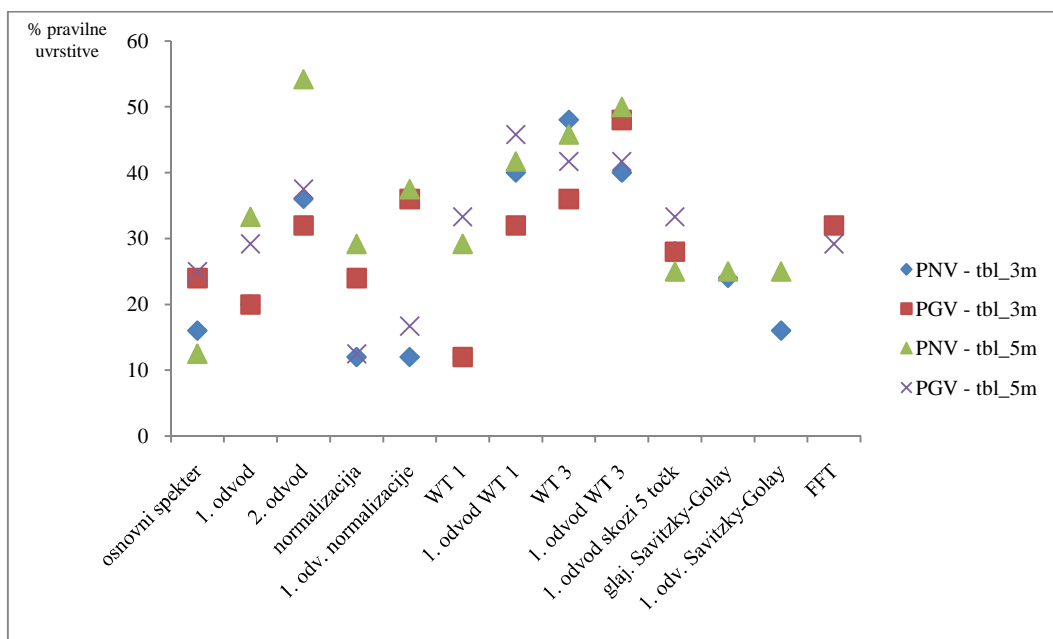
Iz Grafa 2 lahko razberemo tudi, da kakršnakoli predobdelava osnovnega spektra pripomore k boljši uvrstitvi v pravo vrsto. To potrjujejo rezultati, ki so najnižji pri osnovnih podatkih spektra. Kot najmanj uspešna metoda predobdelave spektra se je v tem primeru izkazala valčna transformacija WT 1, saj je pri vseh setih podatkov najmanj izboljšala rezultate v primerjavi z osnovnim spektrom. Metode, kot so prvi in drugi odvod osnovnega spektra, normalizacija, WT 3 so v tem primeru bistveno izboljšale rezultate v primerjavi z osnovnim spektrom.

Nadpovprečno točnost uvrščanja smo dosegli s pomočjo prvega odvoda. Iz Grafa 2 je namreč razvidno, da so največje točnosti uvrščanja dosežene pri prvem odvodu osnovnega

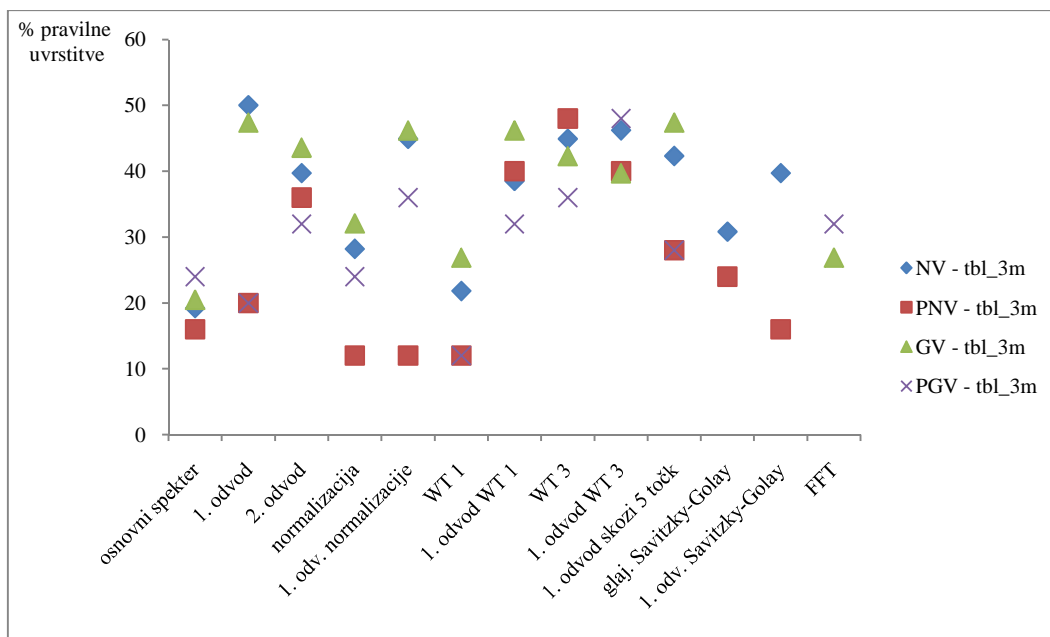
spektra, prvem odvodu skozi pet točk, prvem odvodu normaliziranega spektra ter prvem odvodu spektra glajenega z metodo Savitzky-Golay.

Kljub temu, da v Grafu 2 ni bilo signifikantne razlike med rezultati treh in petih meritev, smo v Grafu 3 prikazali povprečja teh meritev. Izkazalo se je, da je odstotek pravilne uvrstitve rastlin pri povprečnih vrednostih meritev v splošnem nekoliko nižji v primerjavi z več meritvami na tabletko. Še bolj nazorno je to prikazano v Grafu 4, kjer je prikazana primerjava rezultatov za tri meritve in povprečja. Rezultati povprečij so v veliki večini nižji tako pri osnovnih kot pri glajenih spektrih. Vzrok so lahko določene variance znotraj osebka oz. vrste, ki se izgubijo pri povprečenju meritev, zato je za obdelavo podatkov boljše imeti več meritev posamezne tabletko. Pri tem pa je treba upoštevati, da večje število meritev na tabletko ne pomeni vedno tudi boljših rezultatov, saj so rezultati za tri in pet meritev primerljivi (Graf 2).

Rezultati po različnih metodah predobdelave so tudi pri povprečnih vrednostih v splošnem boljši od osnovnih podatkov spektra, kar nam dodatno potrjuje smiselnost uporabe različnih metod predobdelave spektra.



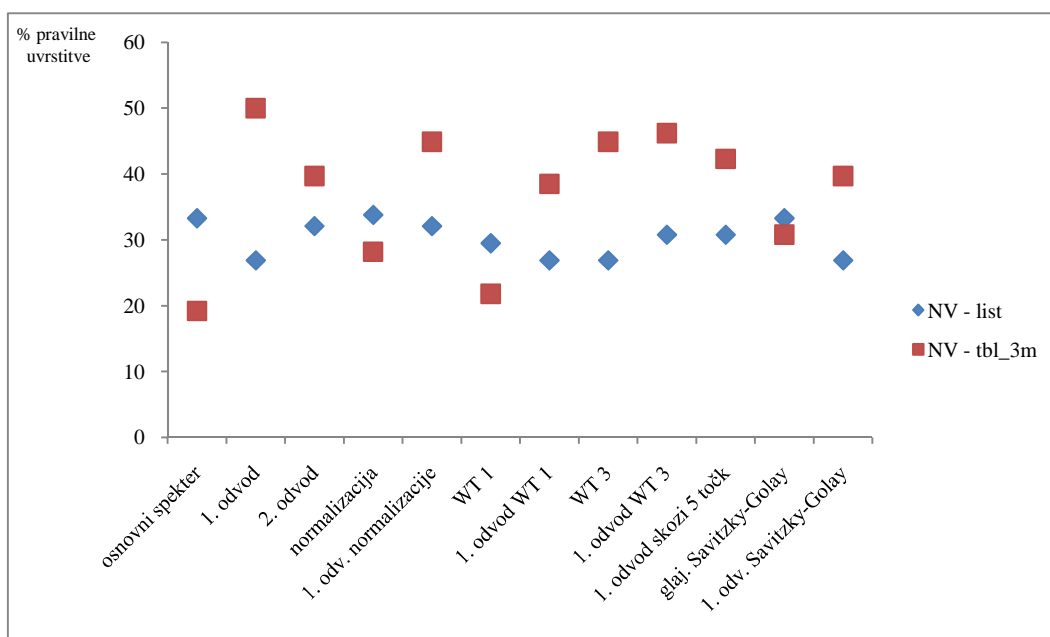
Graf 3. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto vrbovcev po različnih metodah predobdelave IR spektrov KBr tabletk. Prikazani so rezultati povprečij osnovnih in glajenih spektrov treh in petih meritev posamezne tabletko.



Graf 4. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto vrbovcev po različnih metodah predobdelave IR spektrov treh meritev KBr tabletk in njihovih povprečij.

4.1.3. Primerjava tehnike transmisijskih spektrov celih listov s tehniko KBr tabletk

Za konec smo primerjali še rezultate neglajenih spektrov obeh uporabljenih tehnik, da bi ugotovili, ali se kljub slabim rezultatom pri obeh tehnikah, katera izmed njiju izkaže za boljše. V Graf 5 smo zato vključili rezultate neglajenih IR spektrov celih listov ter tabletk s tremi meritvami za posamezno tabletko. Ker smo že ugotovili, da so seti podatkov s povprečnimi vrednostmi dajali slabše rezultate, jih v ta graf primerjave obeh tehnik nismo vključili.



Graf 5. Primerjava rezultatov neglajenih IR spektrov celega lista vrbovcev ter tabletk s tremi meritvami.

Iz Grafa 5 je razvidno, da je tehnika, pri kateri smo snemali IR spektre tablet s KBr v splošnem dajala boljše rezultate v primerjavi s tehniko snemanja IR spektra celega lista. Obstajajo sicer določene izjeme predobdelav spektra, pri katerih so rezultati uvrščanja boljši pri celem listu (osnovni spekter, normalizacija, WT1, glajenje Savitzky-Golay), vendar je gledano na celotno populacijo rezultatov tehnika s KBr tabletkami boljša. Prav tako se v tem grafu pri tabletkah dobro vidi izboljšanje rezultatov z uporabljenimi metodami predobdelave spektra, medtem ko pri spektrih celega lista ni bistvene razlike med rezultati osnovnega in predobdelanih spektrov.

Ena od večjih pomanjkljivosti pri našem delu je bilo zagotovo premajhno in različno število rastlin za posamezno vrsto. Za statistično obdelavo in vrednotenje to ni ravno primerno, saj je za posamezno skupino priporočljivo imeti čim večji vzorec (v našem primeru več rastlin za posamezno vrsto), pri čemer bi naj bili vzorci enakih velikosti - enako število posameznih enot (rastlin) v vzorcu (vrsti). Pri vrbovcih tako še posebej izstopa vrsta *E. angustifolium*, pri kateri smo imeli na voljo le dve rastlini. Omenjeno vrsto smo zato v setih podatkov s povprečnimi vrednostmi posameznih meritev izpustili, saj bi pri delitvi rastlin v testni in validacijski del v vsakem imeli le po en osebek. Prav tako pa smo tudi pri drugih vrstah imeli majhne vzorce (po 3, 5 osebkov, do največ 7 osebkov na vrsto), zato so bili slabi rezultati uvrščanja v določeni meri tudi pričakovani. Ne bi bilo namreč racionalno pričakovati dobrih rezultatov modelov za uvrščanje, ki so bili postavljeni na podlagi podatkov iz dveh, treh osebkov, pri čemer smo ločevali kar med 14 vrstami. Zato smo se bolj kot na visoko točnost uvrščanja osredotočili predvsem na proučevanje vpliva metod predobdelave spektra na točnost uvrščanja.

Prav tako smo nekaj koristnih informacij verjetno izgubili z metodo glavnih komponent in diskriminantno analizo. Z metodo glavnih komponent smo število naših spremenljivk zmanjšali na 15 glavnih komponent. Čeprav omenjena metoda poskuša povzeti podatke s čim manjšo izgubo informacij, je do slednje vseeno v manjši meri prišlo. Da bi ugotovili, ali število glavnih komponent vpliva na končni rezultat, smo tako po koncu naše statistične obdelave s 15 glavnimi komponentami še v nekaj primerih v diskriminantno analizo vključili 30 glavnih komponent. Odstotek pravilne uvrstitve rastlin se je v vseh primerih povečal, kar pomeni, da večje število glavnih komponent lahko zviša odstotek pravilno uvrščenih rastlin.

4.2. KRČNICE

Tudi pri krčnicah smo kot končni rezultat primerjali odstotek uvrstitve posamezne rastline v pravo vrsto po različnih metodah predobdelave spektra. Rezultate smo primerjali pri vsaki tehniki posebej in nato izvedli še primerjavo rezultatov med obema uporabljenima tehnikama.

4.2.1. Tehnika snemanja transmisijskih spektrov celih listov

Pri tej tehniki smo dobili rezultate, ki so predstavljeni v Preglednici XI. Omenjena preglednica vključuje rezultate za osnovne spektre vseh meritev pred glajenjem (NK), povprečne vrednosti meritev (PNK), osnovne spektre vseh meritev po avtomatskem glajenju s programom Spectrum (GK) ter povprečne vrednosti glajenih meritev (PGK).

Preglednica XI. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto po različnih metodah predobdelave IR spektrov celih listov krčnic.

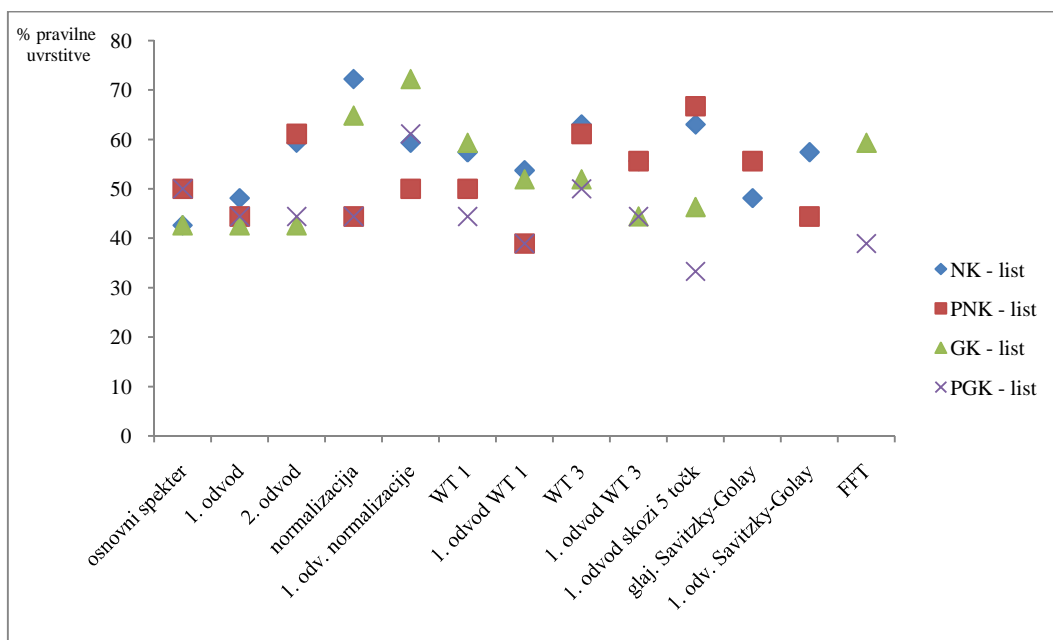
Metoda predobdelave spektra	Odstotek uvrstitve v pravo vrsto			
	NK	PNK	GK	PGK
osnovni spekter	43	50	43	50
prvi odvod	48	44	43	44
drugi odvod	59	61	43	44
normalizacija	72	44	65	44
prvi odvod normalizacije	59	50	72	61
WT 1	57	50	59	44
prvi odvod WT 1	54	39	52	39
WT 3	63	61	52	50
prvi odvod WT 3	56	56	44	44
prvi odvod skozi 5 točk	63	67	46	33
glajenje Savitzky-Golay	48	56	-	-
prvi odvod Savitzky-Golay	57	44	-	-
FFT	-	-	59	39

NK - osnovni spektri posameznih meritev pred glajenjem; PNK – povprečne vrednosti posameznih meritev; GK – osnovni spektri posameznih meritev po avtomatskem glajenju; PGK – povprečne vrednosti posameznih glajenih meritev

Rezultate smo predstavili tudi grafično na enak način kot pri vrbovcih (Graf 6).

Iz Grafa 6 je razvidno, da se odstotek pravilne uvrstitve tako pri osnovnem spektru ter skoraj pri vseh metodah predobdelave IR spektra nahaja nad 40 %, najboljši rezultat pa presega 70 %. Večji odstotek pravilne uvrstitve je bil dosežen tako pri treh meritvah lista posamezne rastline, kot tudi pri povprečjih teh meritev. Slednja so tudi v tem primeru dajala nekoliko slabše rezultate v primerjavi s posameznimi meritvami lista, vendar pa

razlika ni tako očitna. Prav tako je kar nekaj primerov, kjer so povprečja dajala celo boljše rezultate.



Graf 6. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto po različnih metodah predobdelave IR spektrov celih listov krčnic.

S primerjavo neglajenih (NK) in glajenih (GK) IR spektrov krčnic lahko opazimo, da dajejo glajeni spektri pri enakih metodah predobdelave v glavnem nekoliko slabše rezultate. Iz tega bi lahko sklepali, da uporaba avtomatskega glajenja, ki ga omogoča programska oprema uporabljenega spektrometra, v našem primeru ni smiselna. Vzrok bi lahko bil v tem, da pri glajenju ne odstranimo samo šuma, ampak izgubimo tudi manjše signale, ki nosijo pomembno informacijo o vrsti posamezne rastline. Bolj primeren način odstranjevanja šuma je glajenje Savitzky-Golay, ki v tem primeru daje nekoliko boljše rezultate v primerjavi z osnovnim spektrom.

Smiselno je narediti tudi druge predobdelave osnovnega spektra, saj nam te omogočajo doseči večji odstotek pravilne uvrstitve. Izmed uporabljenih metod predobdelave spektra sicer ni nobene, ki bi pri vseh setih podatkov značilno izboljšala rezultate, so pa določene metode, ki v veliki meri izboljšajo odstotek pravilne uvrstitve pri vsaj enem setu podatkov. Pri setih podatkov z večimi meritvami se kot najboljša metoda predobdelave pri neglajenih spektrih izkaže normalizacija (uvrstitve v pravilno vrsto se je izboljšala za skoraj 30 % v primerjavi z osnovnim spektrom), pri glajenih spektrih pa prvi odvod omenjene metode.

S primerjavo različnih prvih odvodov (1. odvod osnovnega spektra in normaliziranega spektra, 1. odvod WT1, WT3, glajenja Savitzky-Golay ter 1. odvod skozi 5 točk) lahko

opazimo, da so kombinacije dveh metod predobdelave spektra smiselne. Točnost uvrščanja je pri kombinacijah metod večja v primerjavi s prvim odvodom osnovnega spektra.

Iz doslej ugotovljenih dejstev lahko povzamemo, da je za večjo točnost uvrščanja rastlin rodu krčnic v pravo vrsto pri tej tehniki potrebno upoštevati vse tri posnete transmisijske IR spektre listov posamezne rastline, pri čemer jih je pred statistično analizo priporočljivo normalizirati.

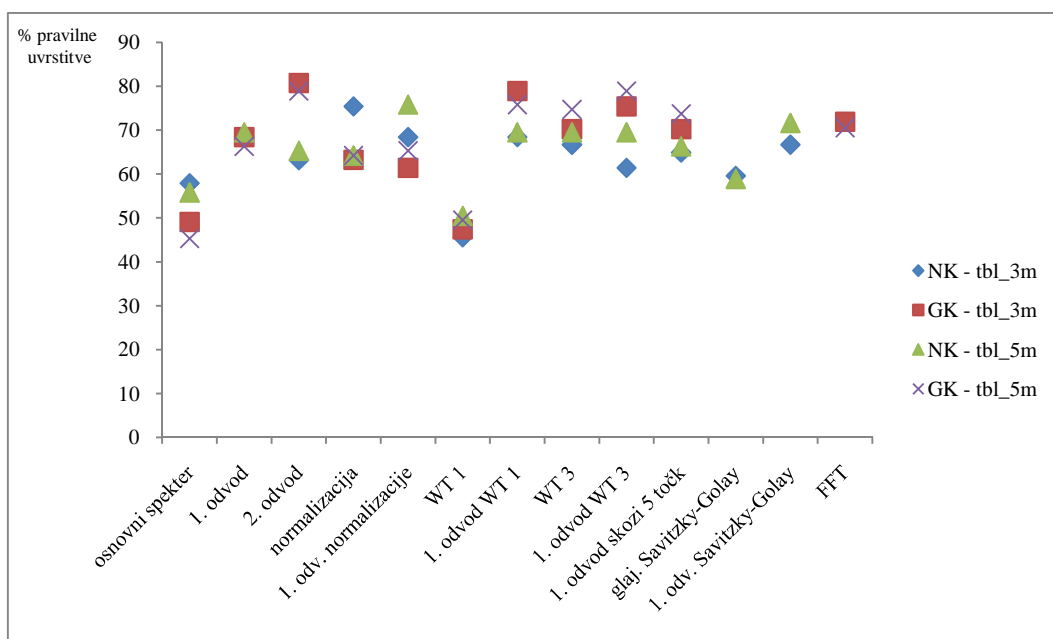
4.2.2. Tehnika snemanja transmisijskih spektrov tabletk s KBr

Tabletke, ki smo jih izdelali iz listov krčnic smo statistično obdelali enako kot spektre tabletk vrbovcev, kar pomeni, da smo tudi v tem primeru naredili celotno statistično obdelavo podatkov še na petih meritvah posamezne tabletk in njihovih povprečjih. Rezultati so prikazani v Preglednici XII.

Preglednica XII. Odstotek uvrstitve v pravo vrsto krčnic po različnih metodah predobdelave IR spektrov tabletk s KBr.

Metoda predobdelave spektra	Odstotek uvrstitve v pravo vrsto							
	NK - tbl_3m	PNK - tbl_3m	GK - tbl_3m	PGK - tbl_3m	NK - tbl_5m	PNK - tbl_5m	GK - tbl_5m	PGK - tbl_5m
osnovni spekter	58	58	49	53	56	47	45	58
prvi odvod	68	63	68	68	70	68	66	63
drugi odvod	63	74	81	68	65	84	79	74
normalizacija	75	84	63	68	64	74	64	63
prvi odvod normalizacije	68	74	61	68	76	79	65	68
WT 1	46	63	47	37	51	53	50	47
prvi odvod WT 1	68	58	79	74	70	58	76	58
WT 3	67	58	70	68	70	79	75	79
prvi odvod WT 3	61	53	75	79	70	58	79	74
prvi odvod skozi 5 točk	65	68	70	74	66	74	74	58
glajenje Savitzky-Golay	60	53	-	-	59	42	-	-
prvi odvod Savitzky-Golay	67	74	-	-	72	68	-	-
FFT	-	-	72	63	-	-	71	68

NK - osnovni spektri posameznih meritev pred glajenjem; PNK – povprečne vrednosti posameznih neglajenih meritev; GK – osnovni spektri posameznih meritev po avtomatskem glajenju; PGK – povprečne vrednosti posameznih glajenih meritev; tbl_3m – obdelava treh posameznih meritev; tbl_5m – obdelava petih posameznih meritev



Graf 7. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto krčnic po različnih metodah predobdelave IR spektrov KBr tabletk. Prikazani so rezultati osnovnih in glajenih spektrov treh in petih meritev posamezne tabletk.

S primerjavo rezultatov treh in petih meritev na tabletko (npr. NK-tbl_3m in NK-tbl_5m) lahko iz Grafa 7 razberemo, da rezultati pri petih meritvah niso bistveno boljši v primerjavi s tremi meritvami, iz česar lahko sklepamo, da z večanjem števila meritev ne dosežemo tudi znatno boljših rezultatov.

V primerjavi s tehniko snemanja spektra celega lista je bilo v tem primeru avtomatsko glajenje spektra nekoliko uspešnejše, saj so glajeni spektri dajali za nekaj odstotkov boljše rezultate v primerjavi z neglajenimi (NK-tbl_3m vs. GK-tbl_3m). V povezavi z ostalimi rezultati ne moremo trditi, da je omenjeno glajenje ena od pomembnejših metod predobdelave spektra za doseg čim boljšega uvrščanja rastlin v pravo vrsto.

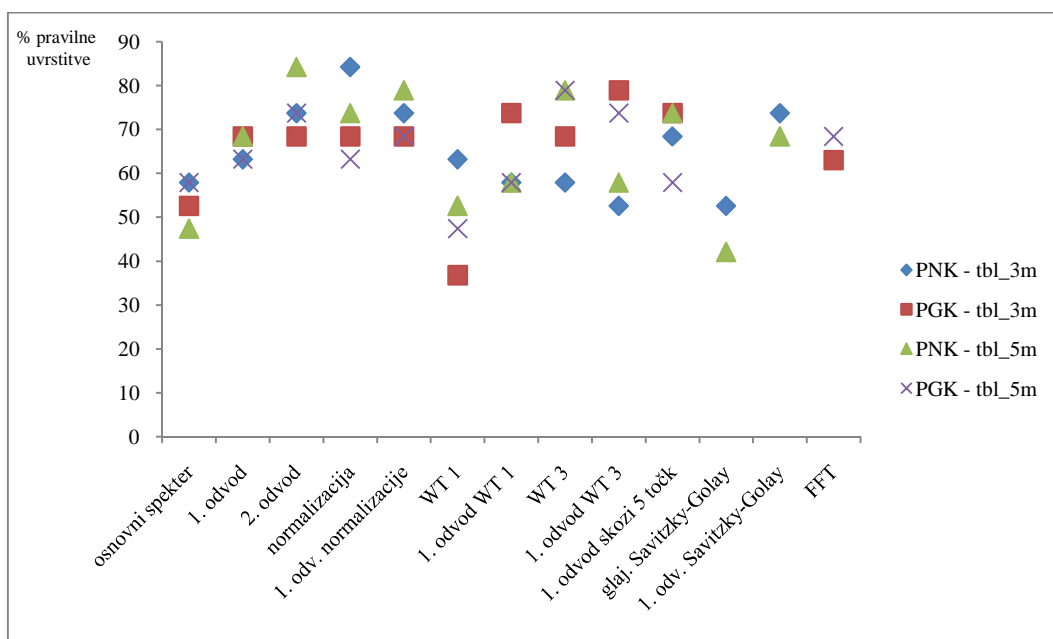
Razvidno je, da določene metode predobdelave dajejo veliko boljše rezultate v primerjavi z osnovnimi spektri. Pri treh meritvah posamezne tabletko so neglajeni spektri dajali najboljše rezultate po normalizaciji, pri podatkih s petimi meritvami za posamezno tabletko pa smo najvišjo pravilno uvrstitev dosegli s prvim odvodom normaliziranega spektra. Omenjeni metodi sta se že pri snemanju spektrov celega lista izkazali za uspešni, zato lahko sklepamo, da je za boljšo ločitev med vrstami rodu *Hypericum* spektre smiselno normalizirati in po normalizaciji izračunati prvi odvod. Metoda, ki se pri tej tehniki ni izkazala za uspešno je WT 1, pri kateri smo v treh od prikazanih štirih setov podatkov dobili slabše rezultate v primerjavi z osnovnim spektrom. Pri glajenih spektrih pa je najuspešnejša metoda predobdelave spektra drugi odvod spektra.

Rezultati prvega odvoda osnovnega spektra in kombinacij prvega odvoda z drugimi metodami predobdelave se v tem primeru bistveno ne razlikujejo, vendar so vsi dajali boljše rezultate v primerjavi z osnovnim spektrom.

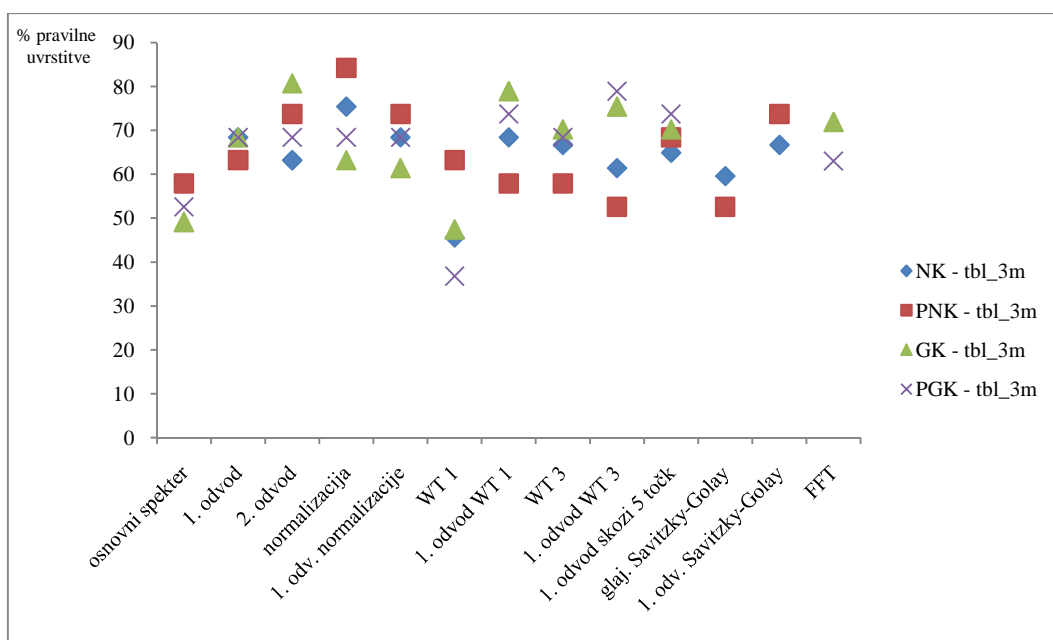
Da se rezultati setov podatkov s tremi in petimi meritvami na posamezno tableto le malo razlikujejo in da z WT 1 ne dosežemo izboljšanja rezultatov osnovnega spektra, je vidno tudi iz Grafa 8, v katerem smo primerjali rezultate setov podatkov povprečij meritev.

Smiselnost glajenja v tem primeru težko opredelimo, saj v približno polovici primerov glajeni spektri dajejo boljše rezultate v primerjavi z neglajenimi, v drugi polovici primerov pa enake ali slabše rezultate.

Če se osredotočimo na vpliv povprečenja meritev na rezultate, vidimo, da tudi v tem primeru dajejo povprečja za spoznanje slabše rezultate z nekaj izjemami. Med slednjimi najbolj izstopa visoka vrednost pravilno uvrščenih krčnic pri neglajenih spektrih s tremi (PNK – tbl_3m; normalizacija) ter petimi meritvami na tabletko (PNK – tbl_5m; drugi odvod), saj ta vrednost predstavlja naš najboljši rezultat pri uvrščanju rastlin v pravo vrsto (84 %).



Graf 8. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto krčnic po različnih metodah predobdelave IR spektrov KBr tabletk. Prikazani so rezultati povprečij osnovnih in glajenih spektrov treh in petih meritev posamezne tabletko.



Graf 9. Primerjava odstotkov uvrstitve v pravo vrsto krčnic po različnih metodah predobdelave IR spektrov treh meritev KBr tabletk in njihovih povprečij.

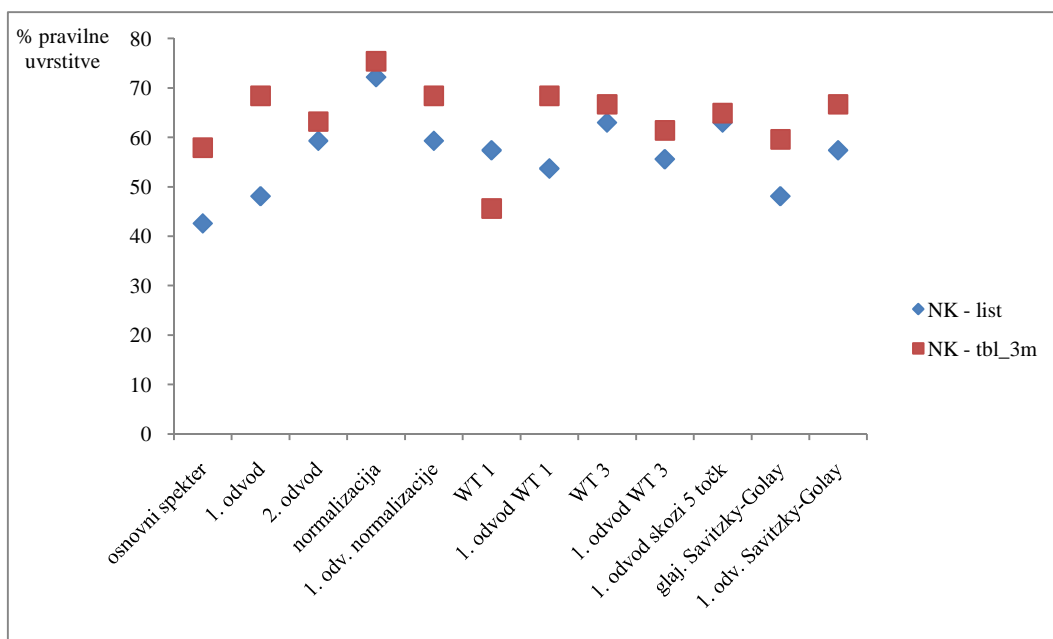
V Grafu 9 smo zaradi boljše preglednosti združili seta podatkov s tremi meritvami na tabletko (NK in GK) ter seta podatkov s povprečji teh meritev (PNK in PGK). Tako je iz tega grafa še bolj razvidno, da so povprečja osnovnih spektrov v večini primerov dajala slabše rezultate ter katere metode predobdelave so se izkazale za bolj in katere za manj uspešne. Gledano na rezultate vseh štirih setov podatkov WT 1 pri naši tehniki ni smiselna. Vzrok je verjetno prevelika izguba informacij, saj kot je že razloženo v poglavju Izvoz podatkov in predobdelava spektra, ta stopnja valčne transformacije vsebuje le še polovico točk celotnega spektra. Višjo točnost uvrščanja pa smo dosegli z njenim prvim odvodom, kar nam v določeni meri nakazuje smiselnost uporabe prvega odvoda v kombinaciji z drugimi metodami. Prav tako nismo bistveno izboljšali rezultatov z glajenjem Savitzky-Golay. Ostale metode so v splošnem dajale vse boljše rezultate v primerjavi z osnovnim spektrom.

4.2.3. Primerjava tehnike transmisijskih spektrov celih listov s tehniko KBr tabletk

Točnost uvrščanja obeh uporabljenih tehnik, transmisijskih IR spektrov celih listov in transmisijskih IR spektrov tabletk s KBr, smo primerjali v Grafu 10. Primerjali smo le neglajene spektre treh meritev na posamezno rastlino. Razvidno je, da smo s tehniko snemanja transmisijskih IR spektrov tabletk s KBr dosegli višjo točnost uvrščanja pri vseh metodah predobdelave spektra, z izjemo WT 1. S tehniko KBr tabletk smo rezultate, ki

smo jih dobili pri transmisijskih IR spektrih celega lista krčnic, še izboljšali, saj se rezultati v veliki večini nahajajo v območju med 50 in 80 %.

Pri obeh tehnikah nismo dosegli bistveno višje točnosti uvrščanja z glajenjem Savitzky-Golay. Omenjena metoda se tudi pri drugih setih podatkov ni izkazala za preveč uspešno, prav tako tudi avtomatsko glajenje spektra v splošnem ni pripomoglo k boljšim rezultatom. Smo pa opazili manjšo razliko med točnostjo uvrščanja po obeh metodah glajenja spektra, in sicer smo z glajenjem Savitzky-Golay dosegli nekoliko višje rezultate v primerjavi z avtomatskim glajenjem programa Spectrum. To je lahko posledica samega principa delovanja glajenja. Iz Slike 17 je razvidno, da je stopnja glajenja pri avtomatskem glajenju večja kot pri glajenju Savitzky-Golay. Pri tem se lahko izgubijo določeni manjši signali, ki nosijo pomembno informacijo za ločitev med vrstami. Ker je moč glajenja Savitzky-Golay manjša, je tudi izguba informacij manjša, kar posledično lahko vodi do višje točnosti uvrščanja. Z glajenjem tako ne odstanimo samo šuma, ampak verjetno tudi nekatere informativne signale, zato je boljše za uvrščanje rastlin uporabiti osnovne spektre in jih obdelati z drugimi uspešnejšimi metodami.



Graf 10. Primerjava rezultatov neglajenih IR spektrov celega lista krčnic ter tabletk s tremi meritvami.

Pri vseh setih podatkov smo višjo točnost uvrščanja v primerjavi z osnovnim spektrom dosegli s prvim odvodom, bodisi čez dve točki ali čez pet točk. Prav tako smo točnost uvrščanja izboljšali s kombinacijami metod predobdelave spektra, pri katerih smo v drugem koraku izračunali prvi odvod dobljenih podatkov (normalizacija, valčna

transformacija). Iz tega lahko prvi odvod označimo za metodo, ki je uspešna in zato priporočljiva za predobdelavo spektra pri uvrščanju rastlin v vrste.

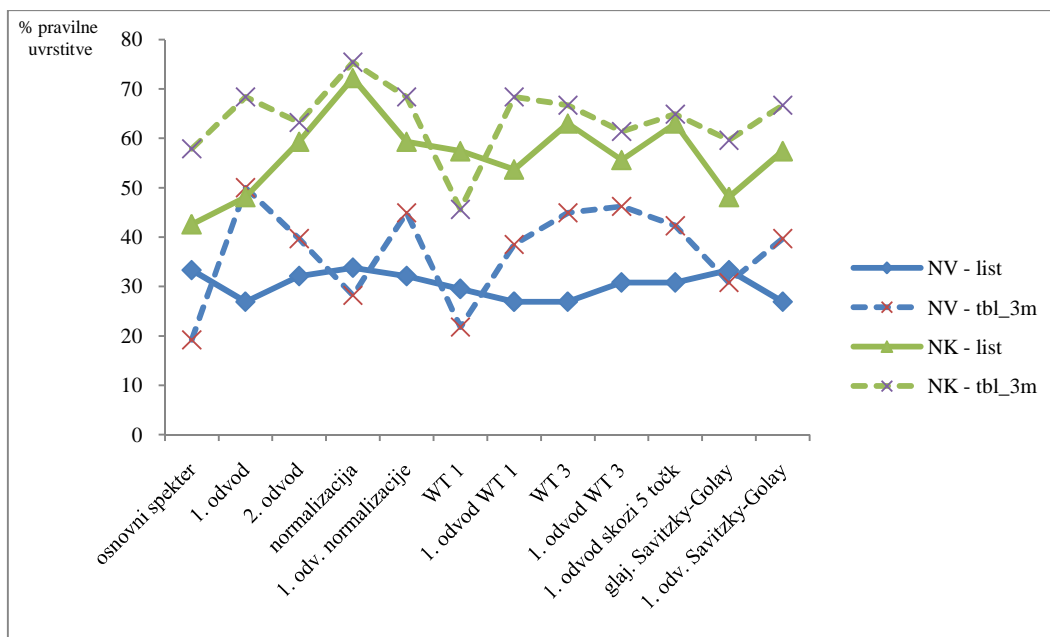
Zaključimo lahko, da je za uvrščanje rastlin rodu *Hypericum* najuspešnejša tehnika snemanja transmisijskih IR spektrov KBr tabletk, pri čemer za uvrščanje rastline v vrsto uporabimo tri meritve posamezne tabletk. Spektre je za doseganje boljših rezultatov priporočljivo obdelati z metodami, kot so prvi odvod, normalizacija in njen prvi odvod ter prvi odvod čez pet točk.

4.3. PRIMERJAVA TOČNOSTI UVRŠČANJA VRBOVCEV S TOČNOSTJO UVRŠČANJA KRČNIC

Za konec smo v Grafu 11 primerjali še rezultate vrbovcev in krčnic, pridobljenih z obema tehnikama. Za obe tehniki smo v graf vključili le neglajene spektre treh meritev posamezne rastline. Iz tega grafa je dobro razvidno, da smo pri krčnicah (NK – list in NK – tbl_3m) z obema tehnikama dosegli bistveno višjo točnost uvrščanja v primerjavi z vrbovci (NV – list in NV- tbl_3m), ter da je pri posameznem rodu tehnika snemanja transmisijskih IR spektrov tabletk s KBr boljša v primerjavi s tehniko snemanja transmisijskih IR spektrov celih listov.

K večji točnosti uvrščanja krčnic so v določeni meri pripomogli tudi večji vzorci rastlin za posamezno vrsto. Pri krčnicah smo imeli za posamezno vrsto po 10 predstavnikov, le pri *H. perforatum subsp. veronense* smo imeli samo 4. Vse skupine, razen omenjene, so bile tako enake velikosti, kar je veliko boljše za statistično vrednotenje v primerjavi z vrbovci, kjer smo imeli manj predstavnikov za posamezno vrsto, prav tako pa se je število predstavnikov od vrste do vrste razlikovalo.

Pomemben dejavnik za razlikovanje med vrstami je tudi sama zgradba listov rastlin posameznega rodu. Vrbovci imajo na površini listov dlačice, zato jih je lažje razlikovati z ATR-IR spektroskopijo, ki analizira vzorce na površini. Za krčnice pa je značilno, da imajo žleze v notranjosti lista, zato je primernejša transmisijska IR spektroskopija, pri kateri žarek potuje skozi vzorec.



Graf 11. Primerjava rezultatov neglajenih spektrov vrbovcev in krčnic po različnih metodah predobdelave spektra pri obeh uporabljenih tehnikah – transmisijskih IR spektrih celih listov in transmisijskih IR spektrih tabletk s KBr.

Iz Grafa 11 lahko tudi razberemo smiselnost uporabe posamezne predobdelave spektra. Pri vseh metodah predobdelave spektra, z izjemo normalizacije, so rezultati v vseh primerih, razen NV- list, boljši v primerjavi z osnovnim spektrom. Omenjena tehnika (NV – list) je dajala tudi najslabše rezultate. Pri tej tehniki različne metode v splošnem ne izboljšajo točnosti uvrščanja vrbovcev v pravo vrsto glede na osnovni spekter. Edina metoda, ki pri obeh rodovih in obeh tehnikah izboljša točnost uvrščanja je normalizacija. Omenjena metoda je posebno učinkovita pri krčnicah, saj z njo dosežemo bistveno boljše rezultate v primerjavi z rezultati osnovnega spektra. Od ostalih metod velja izpostaviti tudi prvi odvod osnovnega spektra, s katerim prav tako izboljšamo točnost uvrščanja v pravo vrsto, še posebej pri tabletkah s KBr ter prvi odvod s predhodnim glajenjem Savitzky-Golay ali WT 1. Prav tako med uspešne metode lahko štejemo tudi prvi odvod skozi pet točk.

Najmanjše izboljšanje rezultatov v vseh primerih dosežemo z valčno transformacijo prve stopnje (WT 1) in samo z glajenjem Savitzky-Golay.

Za uvrščanje rastlin v pravo vrsto sta tako na osnovi ugotovljenih dejstev najprimernejši metodi za predobdelavo spektra normalizacija in prvi odvod spektra.

5. SKLEP

V diplomski nalogi smo proučevali uspešnost transmisijske IR spektroskopije pri uvrščanju vrbovcev in krčnic v pravo vrsto z uporabo dveh različnih tehnik. Večjo točnost uvrščanja rastlin v pravo vrsto smo pri obeh rodovih dosegli s tehniko, pri kateri smo merili transmisijske IR spektre izdelanih KBr tabletk.

Spektre smo pred statistično analizo obdelali z različnimi metodami. Z njimi pri transmisijskih IR spektrih listov vrbovcev nismo dosegli izboljšanja točnosti uvrščanja v primerjavi z osnovnim spektrom, medtem ko se je pri tabletkah vrbovcev kot najuspešnejši izkazal prvi odvod osnovnega spektra. Pri krčnicah smo z vsemi uporabljenimi metodami pri obeh tehnikah izboljšali točnost uvrščanja osnovnega spektra, najučinkovitejša med njimi pa je bila normalizacija.

Pri obeh tehnikah smo ugotovili, da je za višjo točnost uvrščanja potrebnih več meritev posameznega osebka (v naših primerih tri), kljub temu pa večanje števila meritev (na pet) ne pomeni tudi vedno večje točnosti uvrščanja.

Točnost uvrščanja je bila pri krčnicah veliko boljša kot pri vrbovcih. Vzrok za slabo uvrščanje vrbovcev je bilo majhno število osebkov pri posamezni vrsti. Modeli uvrščanja so bili tako postavljeni na osnovi dveh, treh osebkov, zato ne bi bilo racionalno pričakovati dobrih rezultatov uvrščanja, saj smo ločevali kar med 14 vrstami. Celoten proces uvrščanja vrbovcev v vrsto bi bilo zato smiselno ponoviti z večimi predstavniki za posamezno vrsto. Drug razlog za slabšo točnost uvrščanja pri vrbovcih je verjetno v sami zgradbi in sestavi listov posamezne rastline. Krčnice imajo v notranjosti listov žleze, ki vsebujejo različne snovi, na osnovi katerih lahko razlikujemo med vrstami. Z optimizacijo celotnega procesa uvrščanja rastlin (npr. večje število glavnih komponent) bi verjetno lahko pri krčnicah točnost uvrščanja še izboljšali.

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da transmisijska IR spektroskopija ni dovolj primerna metoda za razlikovanje med vrstami vrbovcev. Primerna pa je za razlikovanje med vrstami krčnic, predvsem po ustrezni predobdelavi (normalizacija, prvi odvod normalizacije, prvi odvod čez dve in pet točk) posnetih IR spektrov KBr tabletk. To je do določene mere tudi posledica kakovostnejšega seta podatkov pri krčnicah in manjšega števila vrst (7 vrst) v primerjavi z vrbovci (14 vrst).

LITERATURA

1. Prijatelj N: Farmakognozija, rastlinske droge, DZS, Ljubljana, 2003; 65: 86-87.
2. Battinelli L, Tita B, Evandri M, Mazzanti G: Antimicrobial Activity of *Epilobium spp.* Extracts. *Il farmaco* 2001; 56: 345-348.
3. Martinčič A, Wraber T, Jogan N, Ravnik V, Podobnik A, Turk B, Vreš B: Mala flora Slovenije, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, 1999: 38-44, 289-291, 357-359.
4. Strgulc Krajšek S, Dermastia M, Jogan N: Determination Key for Central European *Epilobium* Species Based on Trichome Morphology. *Bot Helv* 2006; 116: 169-178.
5. Vitali F, Fonte G, Saija A, Tita B: Inhibition of Intestinal Motility and Secretion by Extracts of *Epilobium spp.* in Mice. *J Ethnopharmacol* 2006; 107: 342-348.
6. Toth B, Blazics B, Kery A: Polyphenol Composition and Antioxidant Capacity of *Epilobium* Species. *J Pharmaceut Biomed* 2009; 49: 26-31.
7. Ducrey B, Marston A, Gohring S, Hartmann R W, Hostettmann K: Inhibition of 5 α -reductase and Aromatase by the Ellagitannins Oenothein A and Oenothein B from *Epilobium* Species. *Planta Med* 1997; 63(2): 111-114.
8. Hevesi BT, Houghton PJ, Habtemariam S, Kery A: Antioxidant and Antiinflammatory Effect of *Epilobium parviflorum* Schreb. *Phytother res* 2009; 23(5): 719-724.
9. Ducrey B, Wolfender J, Marston A, Hostettmann K: Analysis of Flavonol Glycosides of Thirteen *Epilobium* Species (Onagraceae) by LC-UV and Thermospray LC-MS. *Phytochemistry* 1995; 38: 129-137.
10. Stace C A, *Plant Taxonomy and Biosystematics*, Second edition, Cambridge University Press, 1989: 86-89.
11. Obradovič M: Razlikovanje vrst vrbovcev (*Epilobium*) na podlagi fitokemijske analize s kapilarno elektroforezo. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, 2004.
12. Vitanc M: Optimizacija HPLC metode za kemotaksonomsko analizo vrbovcev. Diplomaska naloga. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2005.

13. Buh P: Razlikovanje vrst vrbovcev (*Epilobium*) s pomočjo IR spektroskopije. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, 2006.
14. Miller A L: St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): Clinical Effects on Depression and Other Conditions. *Altern Med Rev* 1998; 3(1): 18-26.
15. Ciccarelli D, Cesare Andreucci A, Pagni A: Translucent Glands and Secretory Canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): Morphological, Anatomical and Histochemical Studies During the Course of Ontogenesis. *Ann Bot-London* 2001; 88: 637-644.
16. Potoglu Erkara I, Tokur S: Morphological and Anatomical Investigations on Some *Hypericum* L. Species Growing Naturally in and Around Eskisehir. *Trakya University Journal of Science* 2004; 5(2): 97-105.
17. Galati EM, Contartese G, Miceli N, Taviano MF, Sdrafkakis V, Couladis M, Tzakou O, Lanuzza F: Antiinflammatory and Antioxidant Activity of *Hypericum rumeliacum* Boiss. subsp. *apollinis* (Boiss. & Heldr.) Robson & Strid Methanol Extract. *Phytother Res* 2008; 22(6): 766-771.
18. Borrelli F, Izzo A: Herb-Drug Interactions With St John's Wort (*Hypericum perforatum*): An Update on Clinical Observations. *The AAPS Journal* 2009; 11: 710-727.
19. Melzer J, Brignoli R, Keck M, Saller R: A *Hypericum* Extract in the Treatment of Depressive Symptoms in Outpatients: An Open Study. *Forsch Komplementmed* 2010; 17: 7-14.
20. Savikin K, Dobrić S, Tadić V, Zdunić G: Antiinflammatory Activity of Ethanol Extracts of *Hypericum perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. richeri* Vill. and *H. androsaemum* L. in Rats. *Phytother Res* 2007; 21(2): 176-180.
21. Jacobson J M, Feinman L, Liebes L, Ostrow N, Koslowski V, Tobia A, Cabana B E, Lee D-H, Spritzler J, Prince A M: Pharmacokinetics, Safety and Antiviral Effects of Hypericin, a Derivative of St. John's Wort Plant, in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Antimicrob Agents Ch* 2001; 45(2): 517-524.
22. Frlan R, Sollner Dolenc M: Induktorji citokromov P450. *Farm vestn* 2007; 58: 92-96.

23. Kac J, Mlinarič A: Pomembne interakcije nekaterih zdravilnih rastlin z zdravili. Zdravstveni vestnik 2004; 73: 667-67.
24. Maggi F, Ferretti G, Poceschi N, Menghini L, Ricciutelli M: Morphological, Histochemical and Phytochemical Investigation of the Genus *Hypericum* of the Central Italy. Fitoterapia 2004; 75: 702-711.
25. Umek A, Kreft S, Kartnig T, Heydel B: Quantitative Phytochemical Analyses of Six *Hypericum* Species Growing in Slovenia. Planta Med 1999; 65: 388-390.
26. Soelberg J, Bolt Jorgensen L, Jäger A: Hyperforin Accumulates in the Translucent Glands of *Hypericum perforatum*. Ann Bot-London 2007; 99: 1097-1100.
27. Günzler H, Gremlich H: IR Spectroscopy, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002: 1-6, 81-142.
28. Stuart B: Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, Wiley, Chichester, 2004: 1-56.
29. Pavia D, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J: Introduction to Spectroscopy, 4th Edition, Brooks/Cole, Cengage Learning, 2009: 15-31.
30. Oštir K: Daljinsko zaznavanje, Založba ZRC, Ljubljana, 2006: 205.
31. Skoog D, Holler J, Nieman T: Principles of Instrumental Analysis, 5th Edition, Harcourt Brace & Company, Florida, 1998: 380-428.
32. Savitzky A, Golay M: Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. Anal Chem 1964; 36(8): 1627-1639.
33. Adams M J: Chemometrics in Analytical Spectroscopy, The Royal Society of Chemistry 1995: 34-47.
34. http://www.knowitall.com/literature/application_notes/an-search-strat-1.pdf, dostopano 24.4.2010.
35. Bos M, Vrieling J A M: The Wavelet Transform for Pre-processing IR spectra in the Identification of Mono- and Di-substituted Benzenes. Chemometr Intell Lab 1994; 23: 115-122.

36. Addison P S: The Illustrated Wavelet Transform Handbook, Institute of Physics Publishing, Bristol, 2002: 6-141.
37. He Y, Li X, Deng X: Discrimination of Varieties of Tea Using Near Infrared Spectroscopy by Principal Component Analysis and BP Model. J Food Eng 2007; 79: 1238-1242.
38. Shao X, Zhuang Y: Determination of Chlorogenic Acid in Plant Samples by Using Near-Infrared Spectrum with Wavelet Transform Preprocessing. Anal Sci 2004; 20: 451-454.
39. Adamič Š: Temelji biostatistike, Partizanska knjiga, TOZD, Ljubljana, 1980: 93-97.
40. Košmelj K: Metoda glavnih komponent: osnove in primer. Acta agriculturae Slovenica 2007; 89(1): 159-172.
41. <http://www.ljudmila.org/matej/statistika/mva.html>, dostopano 30.04.2010.
42. Hair Jr J F, Anderson R E, Tatham R E: Multivariate Data Analysis with Readings, 2nd Edition, ZDA, 1987: 295-336.
43. Omahen Bratuša J: Ugotavljanje vrstne pripadnosti vzorcev iz rodov *Hypericum* in *Epilobium* z infrardečo spektroskopijo. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, 2009.