

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**MARCEL PRIKERŽNIK**

MAGISTRSKO DELO

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



**MARCEL PRIKERŽNIK**

**RAZVOJ METODE ZA LOČEVANJE LISTOV RUKOLE IN  
GRINTA S POMOČJO INFRARDEČE SPEKTROSKOPIJE**

**THE DEVELOPMENT OF A METHOD FOR  
CLASSIFICATION OF ARUGULA AND  
GROUNDSEL LEAVES USING INFRARED SPECTROSCOPY**

**MAGISTRSKO DELO**

**ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA**

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta in somentorstvom asist. dr. Mete Kokalj.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se prof. dr. Samu Kreftu in asist. dr. Meti Kokalj za strokovno pomoč pri izdelavi magistrskega dela.*

*Hvala staršem in sestri, ker me spodbujate na moji življenjski poti.*

*Iskrena hvala dobrim prijateljem. Z vami je bil študij lepši.*

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Sama Krefta in somentorice asist. dr. Mete Kokalj.

## **Komisija:**

1. Predsednik: prof. dr. Danijel Kikelj
2. Mentor: prof. dr. Samo Kreft
3. Somentorica: asist. dr. Meta Kokalj
4. Član: izr. prof. dr. Tomaž Vovk

# VSEBINA

|                                                     |             |
|-----------------------------------------------------|-------------|
| <b>POVZETEK</b>                                     | <b>V</b>    |
| <b>ABSTRACT</b>                                     | <b>VI</b>   |
| <b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>                              | <b>VIII</b> |
| <b>1 UVOD</b>                                       | <b>1</b>    |
| 1.1 RUKOLA.....                                     | 1           |
| 1.2 GRINT.....                                      | 4           |
| 1.3 UGOTAVLJANJE ISTOVETNOSTI RASTLINSKIH DROG..... | 6           |
| 1.4 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA.....                  | 8           |
| 1.4.1 OSNOVE.....                                   | 8           |
| 1.4.2 IR SPEKTROMETER.....                          | 9           |
| 1.4.3 IR TEHNIKE SNEMANJA.....                      | 10          |
| 1.4.4 OBDELAVA IR SPEKTROV.....                     | 11          |
| 1.5 STATISTIČNE METODE.....                         | 13          |
| 1.5.1 ANALIZA VARIANCE.....                         | 13          |
| 1.5.2 METODA GLAVNIH KOMPONENT.....                 | 14          |
| 1.5.3 DISKRIMINANTNA ANALIZA.....                   | 15          |
| <b>2 NAMEN DELA</b>                                 | <b>16</b>   |
| <b>3 MATERIALI IN METODE</b>                        | <b>17</b>   |
| 3.1 VZORCI.....                                     | 17          |
| 3.1.1 VZGOJA RASTLIN.....                           | 17          |
| 3.1.2 PRIPRAVA VZORCEV.....                         | 21          |
| 3.2 IR SPEKTROFOTOMETRA IN PROGRAMSKA OPREMA.....   | 24          |
| 3.3 NASTAVITVE PRI MERJENJU.....                    | 25          |
| 3.4 IZBIRA DELA LISTA.....                          | 25          |
| 3.5 POTEK MERITVE.....                              | 25          |
| 3.5.1 ATR IR SPEKTROSKOPIJA.....                    | 25          |
| 3.5.2 PREPUSTNA IR SPEKTROSKOPIJA.....              | 27          |
| 3.6 OBDELAVA SPEKTROV.....                          | 27          |
| 3.7 OCENJEVANJE TOČNOSTI.....                       | 28          |
| 3.8 PREUČEVANJE VPLIVA SPREMENLJIVK.....            | 29          |
| 3.9 NAPAČNO PREPOZNANI VZORCI.....                  | 30          |
| <b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b>                      | <b>31</b>   |

|                                                                      |               |
|----------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>4.1 VZGOJA RASTLIN.....</b>                                       | <b>31</b>     |
| <b>4.2 REZULTATI DISKRIMINANTNE ANALIZE .....</b>                    | <b>33</b>     |
| <b>4.3 PREUČEVANJE VPLIVA SPREMENLJIVK.....</b>                      | <b>33</b>     |
| <b>4.3.1 NAČIN OCENJEVANJA TOČNOSTI.....</b>                         | <b>35</b>     |
| <b>4.3.2 LOČLJIVOST .....</b>                                        | <b>35</b>     |
| <b>4.3.3 OBDELAVE SPEKTROV.....</b>                                  | <b>36</b>     |
| <b>4.3.4 OBDELAVE SPEKTROV IN IR TEHNIKE SNEMANJA.....</b>           | <b>38</b>     |
| <b>4.3.5 PRIPRAVA VZORCEV .....</b>                                  | <b>39</b>     |
| <b>4.3.6 OBDELAVE SPEKTROV IN PRIPRAVA VZORCEV .....</b>             | <b>39</b>     |
| <b>4.3.7 LOČLJIVOSTI IN PRIPRAVE VZORCA .....</b>                    | <b>40</b>     |
| <b>4.3.8 ŠTEVILO PONOVI TEV SNEMANJA IN IR TEHNIKA SNEMANJA.....</b> | <b>41</b>     |
| <b>4.3.9 UPORABA NAVIDEZNEGA ZMANJŠANJA LOČLJIVOSTI .....</b>        | <b>42</b>     |
| <b>4.3.10 ZAKLJUČEK.....</b>                                         | <b>43</b>     |
| <b>4.4 ZMANJŠANJE ŠTEVILA SPREMENLJIVK .....</b>                     | <b>44</b>     |
| <b>4.5 NAPAČNO PREPOZNANI VZORCI .....</b>                           | <b>45</b>     |
| <br><b>5 SKLEP .....</b>                                             | <br><b>50</b> |
| <br><b>LITERATURA .....</b>                                          | <br><b>52</b> |
| <br><b>PRILOGE .....</b>                                             | <br><b>59</b> |
| <br><b>PRILOGA A: PRIMERI NEKATERIH SPEKTROV .....</b>               | <br><b>59</b> |
| <b>PRILOGA B: REZULTATI DISKRIMINANTNE ANALIZE.....</b>              | <b>63</b>     |

## KAZALO SLIK

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>SLIKA 1:</b> SISTEMATIKA NAVADNE RUKVICE IN TANKOLISTNEGA DVOREDCA .....          | 1  |
| <b>SLIKA 2:</b> NAVADNA RUKOLA.....                                                  | 1  |
| <b>SLIKA 3:</b> DIVJA RUKOLA .....                                                   | 2  |
| <b>SLIKA 4:</b> HIDROLIZA GLUKORAFANINA DO SULFORAFANA .....                         | 3  |
| <b>SLIKA 5:</b> NAVADNI GRINT .....                                                  | 4  |
| <b>SLIKA 6:</b> NECINA V GRINTU .....                                                | 5  |
| <b>SLIKA 7:</b> LISTI NAVADNEGA GRINTA, ŠENTJAKOBOVEGA GRINTA IN NAVADNE RUKOLE..... | 6  |
| <b>SLIKA 8:</b> INTERFEROMETER .....                                                 | 10 |
| <b>SLIKA 9:</b> PRIMER UPORABE METODE GLAVNIH KOMPONENT NA DVEH SPREMENLJIVKAH ..... | 14 |
| <b>SLIKA 10:</b> PRIKAZ DISKRIMINANTNE ANALIZE .....                                 | 15 |
| <b>SLIKA 11:</b> SEMENA NAVADNE RUKOLE .....                                         | 18 |
| <b>SLIKA 12:</b> PRIPRAVLJENA KORITA .....                                           | 19 |
| <b>SLIKA 13:</b> SEMENA POKRITA Z ZEMLJO .....                                       | 20 |
| <b>SLIKA 14:</b> NEKATERA SEMENA V KARTONASTIH ŠKATLAH SO ŽE VZKALILA.....           | 20 |
| <b>SLIKA 15:</b> FTIR SPEKTROMETER Z ATR NASTAVKOM .....                             | 24 |
| <b>SLIKA 16:</b> FTIR SPEKTROMETER, KI DELUJE NA PRINCIPU PREPUSTNE TEHNIKE .....    | 24 |
| <b>SLIKA 17:</b> LIST GRINTA MED MERJENJEM .....                                     | 26 |
| <b>SLIKA 18:</b> ZGORNJI DEL LISTA SMO VPELI V DRŽALO .....                          | 27 |
| <b>SLIKA 19:</b> NAHAJALIŠČE GRINTA16.....                                           | 47 |

# KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>PREGLEDNICA I:</b> IZVOR SEMEN GRINTA.....                                                                                                                                                                                                     | 17 |
| <b>PREGLEDNICA II:</b> IZVOR SEMEN RUKOLE .....                                                                                                                                                                                                   | 18 |
| <b>PREGLEDNICA III:</b> PARAMETRI ZEMLJE ZA SAJENJE .....                                                                                                                                                                                         | 19 |
| <b>PREGLEDNICA IV:</b> VZORCI GRINTA IN NJIHOV IZVOR .....                                                                                                                                                                                        | 22 |
| <b>PREGLEDNICA V:</b> VZORCI RUKOLE IN NJIHOV IZVOR.....                                                                                                                                                                                          | 23 |
| <b>PREGLEDNICA VI:</b> NASTAVITVE PRI MERJENJU.....                                                                                                                                                                                               | 25 |
| <b>PREGLEDNICA VII:</b> NAJVEČJE ŠTEVILO VALOVNIH ŠTEVIL, KI VSTOPA V METODO GLAVNIH KOMONENT IN<br>KORAK, PO KATEREM SMO ŠTEVILO SPREMENLJIVK POVEČEVALI.....                                                                                    | 28 |
| <b>PREGLEDNICA VIII:</b> KALJIVOST RUKOLE IN GRINTA V TEMI IN NA SVETLOBI .....                                                                                                                                                                   | 32 |
| <b>PREGLEDNICA IX:</b> POVPREČNA PRAVILNA UVRSTITEV V ODSOTKIH IN SO PRI POSAMEZNEM NAČINU<br>OCENJEVANJA TOČNOSTI .....                                                                                                                          | 35 |
| <b>PREGLEDNICA X:</b> POVPREČJE PRAVILNE UVRSTITVE V ODSOTKIH IN SO PRI POSAMEZNI LOČLJIVOSTI<br>MERJENJA PRI PREPUSTNI IR SPEKTROSKOPIJI .....                                                                                                   | 36 |
| <b>PREGLEDNICA XI:</b> POVPREČJE PRAVILNE UVRSTITVE V ODSOTKIH IN SO PRI POSAMEZNI LOČLJIVOSTI<br>MERJENJA PRI ATR IR SPEKTROSKOPIJI .....                                                                                                        | 36 |
| <b>PREGLEDNICA XII:</b> POVPREČJE PRAVILNE UVRSTITVE V ODSOTKIH IN SO PRI POSAMEZNIH OBDELAVAH<br>SPEKTROV .....                                                                                                                                  | 37 |
| <b>PREGLEDNICA XIII:</b> POVPREČJE PRAVILNE UVRSTITVE V ODSOTKIH IN SO V OKLEPAJU PRI POSAMEZNI<br>KOMBINACIJI OBDELAVE IN IR TEHNIKE SNEMANJA .....                                                                                              | 38 |
| <b>PREGLEDNICA XIV:</b> POVPREČJE PRAVILNE UVRSTITVE V ODSOTKIH IN SO PRI SVEŽIH TER POSUŠENIH LISTIH<br>.....                                                                                                                                    | 39 |
| <b>PREGLEDNICA XV:</b> POVPREČJE PRAVILNE UVRSTITVE V ODSOTKIH IN SO V OKLEPAJIH PRI POSAMEZNI<br>KOMBINACIJI OBDELAVE IN PRIPRAVE VZORCEV.....                                                                                                   | 40 |
| <b>PREGLEDNICA XVI:</b> POVPREČJE PRAVILNE UVRSTITVE V ODSOTKIH IN SO V OKLEPAJU PRI POSAMEZNI<br>KOMBINACIJI PRIPRAVE VZORCA IN LOČLJIVOSTI .....                                                                                                | 41 |
| <b>PREGLEDNICA XVII:</b> POVPREČJE PRAVILNE UVRSTITVE V ODSOTKIH IN SO V OKLEPAJU PRI POSAMEZNI<br>KOMBINACIJI IR TEHNIKE SNEMANJA IN ŠTEVILA PONOVIJEV SNEMANJA.....                                                                             | 41 |
| <b>PREGLEDNICA XVIII:</b> POVPREČJE PRAVILNE UVRSTITVE V ODSOTKIH IN SO PRI ATR IR TEHNIKI.....                                                                                                                                                   | 42 |
| <b>PREGLEDNICA XIX:</b> IZBOR SPREMENLJIVK, KI DAJEJO NAJBOLJŠE REZULTATE.....                                                                                                                                                                    | 44 |
| <b>PREGLEDNICA XX:</b> POVPREČJE UPORABLJENIH SPREMENLJIVK, KI JE VSTOPALO V METODO GLAVNIH<br>KOMONENT PRI POSAMEZNI TEHNIKI IN SO V OKLEPAJU. ZRAVEN JE ODSOTOK UPORABLJENIH<br>SPREMENLJIVK GLEDE NA NAJVEČJE MOŽNO ŠTEVILO SPREMENLJIVK ..... | 45 |
| <b>PREGLEDNICA XXI:</b> ŠTEVILO NAPAČNIH PREPOZNAV PRI POSAMEZNEM VZORCU GRINTA PRI NEODVISNEM<br>SETU .....                                                                                                                                      | 46 |
| <b>PREGLEDNICA XXII:</b> ŠTEVILO NAPAČNIH PREPOZNAV PRI POSAMEZNEM VZORCU RUKOLE PRI NEODVISNEM<br>SETU .....                                                                                                                                     | 48 |

## POVZETEK

Rukola je pomembna rastlina v prehrani, v zadnjem času pa se preučuje tudi njena uporaba v medicinske namene. Obliki listov rukole in grinta sta zelo podobni. Grint je strupena rastlina, ki pogosto raste med rukolo kot plevel, zato lahko pride do zamenjav, ki lahko vodijo v smrt. Infrardeča spektroskopija je analizna metoda, ki se skupaj s statističnimi metodami lahko uspešno uporablja pri ugotavljanju istovetnosti rastlinskih vzorcev. Razvili smo metodo za ločevanje listov rukole in grinta s pomočjo infrardeče spektroskopije, ki bi jo bilo smiselno vpeljati v kontrolo kakovosti v industrijo proizvodnje rukole, saj bi se s tem povečala varnost uporabnikov.

Zaradi stresa ob presajanju, neugodnih razmer ter razvoja škodljivcev smo vzgajali le 2 vzorca grinta in 4 vzorce rukole. Preostalih 21 vzorcev grinta smo poiskali v naravi, 13 vzorcev rukole pa smo kupili v trgovini. Pri snemanju spektrov smo na svežih in posušenih celih listih uporabili tehniko oslabiljenega popolnega odboja in prepustno tehniko infrardeče spektroskopije. Preizkusili smo različne nastavitve ločljivosti in izbirali različno število ponovitev snemanja. Dobljene spektre smo obdelali na več načinov. Z enosmerno analizo variance in z metodo glavnih komponent smo zmanjšali razsežnost podatkov. Z diskriminantno analizo smo ločevali vzorce rukole in grinta med seboj. Z dvosmerno analizo variance pa smo vrednotili, katere so najpomembnejše spremenljivke pri ločbi. Več napačnih prepoznav je bilo pri rastlinah, ki so po našem mnenju razvile drugačne sekundarne presnovke oziroma v drugačni koncentraciji kot preostale rastline. Prav tako je bilo večje število napačnih prepoznav pri škropljenih vzorcih rukole. Uporaba posušenih vzorcev se je izkazala za malo boljšo od svežih vzorcev, vendar zaradi dolgotrajne priprave posušenih vzorcev priporočamo uporabo svežih vzorcev. Pri višji ločljivosti je prisoten prevelik šum, tako dobimo boljše rezultate pri nižji ločljivosti. Boljše rezultate dobimo tudi, kadar povečujemo število ponovitev snemanja, kar poveča razmerje med signalom in šumom. Normalizacija s standardnim odklonom se je izkazala za najboljšo tehniko obdelave spektrov, ker odpravi premik bazne linije, ki je pri bioloških vzorcih pogost. Odvajanje je dalo najslabše rezultate, saj je bilo povečanje šuma preveliko. Tehnika oslabiljenega popolnega odboja je dala boljše rezultate od prepustne tehnike infrardeče spektroskopije, ki je pri debelih vzorcih manj primerna. Uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti ne da primerljivih rezultatov v primerjavi s spektri, ki so bili posneti pri nižji ločljivosti. Metoda vrednotenja z izpuščanjem enot ni dovolj zanesljiva, ker prihaja do lažno boljših rezultatov. Primernejše je vrednotenje z neodvisnim setom.



## **ABSTRACT**

Arugula is an important food plant. Its use is being studied for different medicinal purposes. Groundsel is poisonous plant that often grows like a weed between arugula, so there is a chance of contamination, which can lead to death. Infrared spectroscopy is an analytical method, that can be used together with statistical methods for identifying plant material. We have developed a method for separation of arugula and groundsel leaves, to the technique that is simple and could be introduced to quality control in production of arugula, as this would increase the safety of users.

Due to the stress of transplant, adverse conditions and the development of pests we raised only 2 samples of groundsel and 4 samples of arugula. The remaining 21 samples of groundsel were collected in nature, 13 samples of arugula were bought in food stores. When recording the spectra, fresh and dried whole leaves were used and techniques used were attenuated total reflectance and transmission infrared spectroscopy. Different settings for resolution and number of scans were compared. The resulting spectra were analyzed in several ways. The size reduction of data was obtained by using one-way analysis of variance and principal component analysis discriminant analysis was used to separate the samples of arugula and groundsel. With two-way analysis of variance the most important variables of the separation were identified.

Plants that, in our opinion, developed a different secondary metabolites and in different concentrations of them, were more commonly misidentified. Also the use of pesticides increase the chance for misidentification. Dried samples have shown a little better results than fresh samples. Because of long term preparation of dried samples, we recommend using fresh samples. At higher resolution there is more noise, thus better results were obtained at lower resolution. Better results are also obtained when the number of scans is increased, this increases the signal-to-noise ratio. Standard normal variate has proven to be the best pre-treatment method, due to the elimination of the base line shift, which is common in biological samples. First derivative gave the worst results, since it increases the noise. Attenuated total reflectance gave better results than transmission infrared spectroscopy technique, which is in thick samples less suitable. The use of virtual reduction of the resolution is not comparable to the spectra recorded at the same lower resolution. Leave-one-out cross validation is not reliable; it gives false better results. Validation with the independent set is more suitable.

## **KLJUČNE BESEDE**

- RUKOLA
- GRINT
- INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA
- KEMOMETRIJA

## **KEY WORDS**

- ARUGULA
- GROUNDSEL
- INFRARED SPECTROSCOPY
- CHEMOMETRICS

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

ANOVA: ANALIZA VARIANCE

ATR: OSLABLJEN POPOLNI ODBOJ

FTIR: INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA S FOURIERJEVO TRANSFORMACIJO

IR: INFRARDEČE

PA: PIROLIZIDINSKI ALKALOIDI

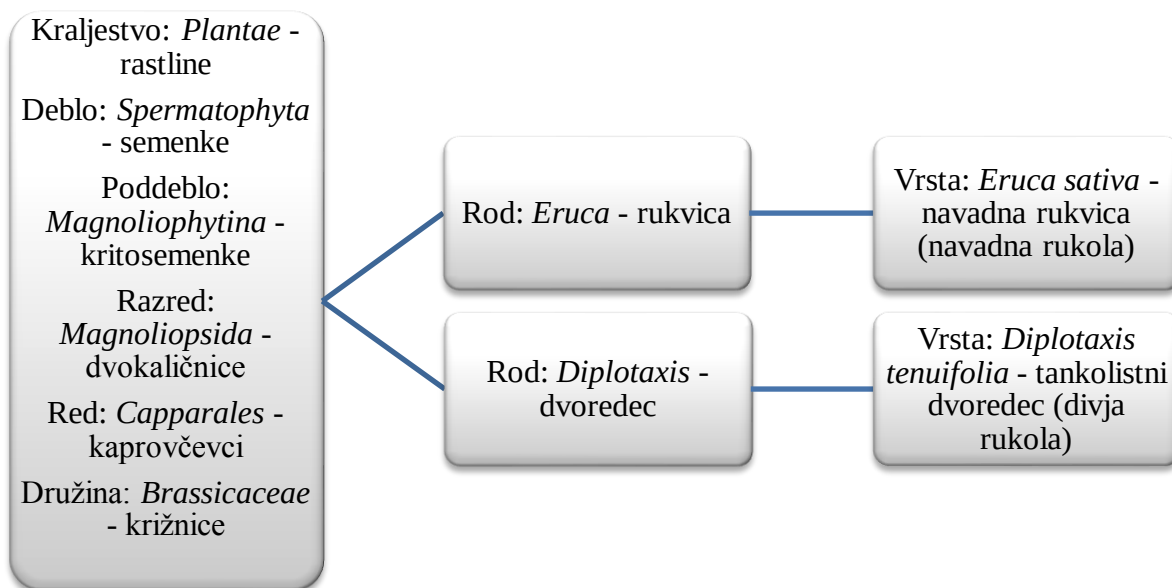
SNV: NORMALIZACIJA S STANDARDNIM ODKLONOM

SO: STANDARDNI ODKLON VZORCA

# 1 UVOD

## 1.1 RUKOLA

Rukola je skupno ime za nekatere rastline iz družine križnic, ki imajo podobno morfologijo in podoben okus. Sem spadata navadna rukvica (*Eruca sativa*) in tankolistni dvoredec (*Diplotaxis tenuifolia*). Sistematika je prikazana na Sliki 1 (1, 2).



**Slika 1:** Sistematika navadne rukvice in tankolistnega dvoredca

**Navadna rukola** je enoletnica in zraste 20 – 50 cm (Slika 2). Listi so lirasto oblikovani in pernato deljeni z bolj ali manj nazobčanim robom. Nekoliko so mesnati, večinoma gladki z značilnim vonjem. Trdota, nazobčanost in deljenost listne ploskve narašča s starostjo. Teža enega semena je 2 mg.



**Slika 2:** Navadna rukola

**Divja rukola** je eno- ali dvo-letnica in zraste do 80 cm (Slika 3). Listi so dolgi in gladki. So bolj trdi, kompaktni, trpežni, nazobčani in deljeni kot pri navadni rukoli. Seme je lažje, saj tehta le 0,2 mg (1, 2, 3).



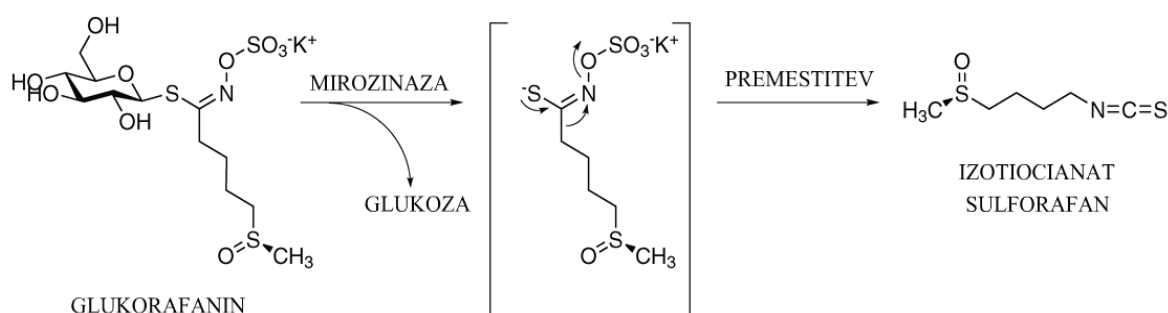
**Slika 3:** Divja rukola

Rukola je nezahtevna glede rastnih dejavnikov. Zelo dobro uspeva v zmernem podnebju, zato jo pridelujejo zgodaj spomladi in v jeseni, saj ne prenaša visokih temperatur. Optimalna temperatura za kalitev je od 20 do 25 °C, za rast pa od 16 do 24 °C. Najnižja potrebna temperatura je 5 °C. Vzkali v treh dneh. Kaljivost je okoli 85 % in se zmanjša za 15 – 20 %, če sejemo v jesensko-zimskem času. V mesecih z manjšo intenziteto sončne svetlobe je potrebno dodatno osvetljevanje v zavarovanih prostorih. Priporočljiva relativna vlažnost pri gojenju v zaprtih prostorih je 60 – 70 %. Uspeva na vseh tipih tal, ki so dobro oskrbljena s kalcijem ter so nevtralna do slabo alkalna (pH: 6,5 – 7,5). Kljub temu, da je dobro prilagojena na sušo, je za izboljšanje kakovosti in količine pridelka priporočljivo občasno zalivanje. Težave pri razvoju rukole lahko povzročijo glivični napadi, ki so najbolj izraziti v zaprtih prostorih. Liste poškodujejo tudi bolhači in listne uši, ki poleg tega prenašajo še virusne bolezni (3, 4, 5).

**Uporaba rukole** sega več tisoč let nazaj, ko so jo uporabljali za hrano, olje in krmo, pri kozmetiki, dezodorantih in v medicinske namene. Stari Grki so jo uporabljali kot afrodisiak. Verjeli so tudi, da kot obkladek vrača vid in da odpravlja kašelj pri dojenčkih (1). V Aziji iz semen rukole stiskajo olje, ki ga uporabljajo v industriji kot mazivo za stroje in za izdelavo mila. Olje in izvlečki iz listov so se izkazali uporabni tudi kot dodatki odvrtačnim sredstvom za insekte (3).

V tradicionalni medicini se uporablja kot sredstvo, ki omili vnetje, proti strjevanju krvi, za pospešitev izločanja seča, kot odvajalo, za spodbujanje teka, za pomiritev želodca, proti črevesnim krčem, pri srbečici, ozeblinah, opeklinah, koprivnici, za pospešitev rasti las, proti prehladu in hripavosti, proti oteklinam in za zmanjšanje težav pri sladkorni bolezni. Semena pa tudi proti bakterijam in pri ugrizih škorpionov (3, 5).

Terapevtsko pomembne sestavine v rukoli so **glukozinolati**. To so anionski žveplovi glikozidi, ki so vzrok pekočemu okusu in aromi več vrstam iz družine križnic. Osnovni gradniki so glukoza, sulfatna skupina in nesladkorna komponenta, ki je odvisna od izhodne aminokisljine. Molekule so v obliki kalijeve soli. Biološka vloga glukozinolatov je odvrčanje rastlinojedcev in patogenov od hranjenja z rastlino. Za človeka pa so pomembni zaradi zaščite pred kancerogeni, mutageni in ostalimi toksičnimi snovmi. Navadna rukola vsebuje 11 različnih glukozinolatov, divja rukola pa 14. V listih obeh vrst se v visoki koncentraciji nahaja glukorafanin (Slika 4), ki vsebuje derivat metionina kot izhodno aminokisljino. Glukozinolati so shranjeni v vakuolah; v citozolu in v posebnih specializiranih celicah pa se nahaja encim mirozinaza. Ob poškodbi celice glukozinolati pridejo v stik z mirozinazo, ki hidrolizira glukozinolat. Nastala spojina je nestabilna, zato v nevtralnem mediju pride do premestitve. Nastane izotiocianat, ki je močnega vonja in okusa. Izotiocianat, ki nastane po hidrolizi glukorafanina, imenujemo sulforafan (Slika 4). Kadar je v molekuli sulforafana na mestu sulfoksida sulfid, govorimo o erucinu (1, 6).



**Slika 4:** Hidroliza glukorafanina do sulforafana

Rukola je tudi vir vitamina C, ki je pomemben kot antioksidant pri nevtralizaciji reaktivnih kisikovih zvrsti, kofaktor encimov, pri sintezi kolagena in pri absorpciji železa iz prebavnega trakta (1, 7). 100 g rukole lahko vsebuje do 190 mg vitamina C, priporočen dnevni vnos pa je 100 mg. Poleg tega vsebuje še minerale kot so kalcij (309 mg na 100 g, kar je 31 % priporočenega dnevnega vnosa), železo (5,2 mg na 100 g, kar je 52 % priporočenega dnevnega vnosa za odrasle moške), kalij (468 mg na 100 g, kar je 23 % priporočenega dnevnega vnosa) idr. Vsebuje tudi vlaknine (0,9 g na 100 g), ki ugodno vplivajo na prebavo ter delujejo zaščitno pred boleznimi srca in ožilja (4, 8, 9).

V Kaliforniji so odkrili, da sta izotiocianata erucin in sulforafan povezana z zmanjšanjem tveganja za razvoj več tipov raka. Erucin zavira rast in delitev rakavih celic pri raku dojke.

Mehanizem je povezan z onemogočanjem delovanja mikrotubulov. Učinki so kvalitativno podobni učinkovinam za zdravljenje raka kot so taksani in vinca alkaloidi. To kaže na možen pomen sestavin rukole pri preventivi raka (10). Raziskovalci iz Savdske Arabije so raziskovali vpliv etanolnih izvlečkov rukole na izločanje želodčne kisline in na razjede na želodcu pri podganah. Odkrili so, da ekstrakti zmanjšajo izločanje želodčne kisline, delujejo zaščitno na celice in proti razjedam na želodcu. Mehanizem naj bi bil povezan z delovanjem preko prostaglandinov (11). Pri kemijsko povzročeni poškodbi jeter erucin deluje zaščitno. Dokazano je bilo njegovo zaščitno delovanje na celice jeter (12). Zaradi visoke vsebnosti antioksidantov in protivnetnih sestavin rukola dokazano deluje zaščitno tudi na ledvica (13). Italijanski raziskovalci so preučevali vpliv rukole na seve probiotikov iz družine laktobacilov. Dokazali so, da prisotnost navadne rukole v gojišču probiotikov poveča njihovo proizvodnjo fenolov in s tem antioksidativno aktivnost. Prav tako lahko prisotnost navadne rukole spremeni presnovo probiotikov, da ti začno proizvajati presnovke, ki zavirajo rast nekaterih patogenih bakterij (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*) (14).

## 1.2 GRINT

Rod grint (*Senecio*) spada v družino nebinovk (*Asteraceae*) in v red košarnic (*Asterales*). Pri delu se bomo srečevali z naslednjimi vrstami grintov: navadni grint (*Senecio vulgaris*) (Slika 5), šentjakobov grint (*Senecio jacobaea*), rukvični grint (*Senecio erucifolius*) in gozdni grint (*Senecio sylvaticus*) (2). To so enoletnice ali trajnice, običajno visoke do 0,5 metra, z rumenimi cevastimi cvetovi združenimi v košek, ki ga obdajajo obojkovi listi. Navadni grint je brez jezičastih cvetov, ostali trije pa jih imajo. Listi so travnozeleni, nekoliko mesnati in trdi. Korenina je kratka, skoraj olesenela. Cveti pozno poleti. Ena rastlina lahko vsako leto pridela do 200.000 semen, ki lahko preživijo do 20 let. V zmernih in subtropskih podnebjih so zelo razširjeni po vsem svetu na različnih tipih tal (2, 15, 16, 17).

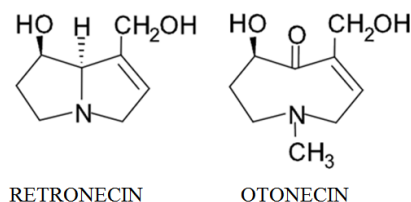


**Slika 5:** Navadni grint

V **tradicionalni medicini** se je grint uporabljal za pospešitev izločanja znoja in urina, kot odvajalo, za izzivanje izostale menstruacije, za odstranjevanje črevesnih zajedavcev, proti

skorbutu, proti slabosti, proti kašlju, pri krvavitvah iz nosu in za zmanjševanje telesne in duševne utrujenosti (15, 18, 19). Zlati grint (*Senecio aureus*) se uporablja v homeopatiji. Najpogosteje pri zaostali menstruaciji, zlasti kadar je prisoten še suh kašelj (20).

Grint vsebuje **pirolizidinske alkaloide** (PA). To so heterociklični sistemi, estri alkoholov. Ti alkoholi so poznani kot necini. Pri grintu se pojavljata dva necina, in sicer retronecin in otonecin (Slika 6) (21, 22).



**Slika 6:** Necina v grintu

PA se nahajajo tudi na primer v navadnem lapuhu, navadnem repuhu, navadnem gabezu in še nekaterih predstavnikih družin nebinovk in srhkolistnic (23). Nekateri najpogostejši PA, ki se nahajajo v grintu so senecioin, integerimin, seneciflin, jakobin, jakozin, jakolin, jakonin, jakodin, retrorzin, ridelin, spartioidin, usarsmin, senkirkin, hidroksisenkirkin, petasitenin in izatidin (15, 21, 22). PA so **toksični** za ljudi in živali. Pri akutni zastrupitvi pride najprej do bolečin v trebuhu in slabosti, ki hitro napreduje do škodljivega delovanja na jetrne celice, kar posledično vodi v hemoragično nekrozo. Pri kronični zastrupitvi pride do okvar predvsem v jetrih, pljučih in krvnih žilah, pa tudi v ledvicah, trebušni slinavki, gastrointestinalnem traktu, kostnem mozgu in možganih. Prav tako pride do nepravilnega razvoja plodu (15, 19, 21, 22). Dovzetnost za zastrupitev s PA je odvisna od spola, saj so moški lahko bolj dovzetni od žensk. Odvisna je tudi od starosti, saj so otroci, še posebej pa nerojeni, veliko bolj občutljivi kot odrasli. Nekateri dejavniki pa lahko še dodatno povečajo resnost in pojavnost jetrnih poškodb. To so bakterijske in virusne okužbe, zdravila kot so barbiturati, težke kovine kot je baker in mikotoksini kot je aflatoksin (22). Vsaj 142 vrst grinta vsebuje toksične PA, ki se nahajajo v vseh delih rastline, vendar ne povsod v enaki koncentraciji. Največja koncentracija je v cvetovih in semenih, sledijo listi in stebila, najmanjša koncentracija pa je v koreninah. PA so prisotni v rastlini ves čas, vsebnost pa se lahko ohrani še mesece po košnji. Vsebnost v rastlini je lahko vse do 2 % suhe teže (15, 22, 24, 25, 26, 27).

V literaturi je opisanih več primerov smrti goveda in konjev iz celega sveta in tudi Slovenije, ki so poginili zaradi uživanja različnih vrst grinta (17, 21, 28, 29, 30, 31, 32). Že 3 – 7 % teže živali svežega šentjakobovega grinta zaužitega skozi celotno življenje je dovolj, da povzroči smrt pri živali (33). Drugi članek omenja, da je za živino celokupni smrtni odmerek okoli 2,5 mg PA na kilogram teže živali zaužitih nekaj tednov zapored, kar pomeni približno 1,7 kg svežega šentjakobovega grinta ali 250 g navadnega grinta na dan



(24). Za konje je opisano, da 2 – 4 kg suhega šentjakobovega grinta zadostuje za smrt (22). Zastrupitev se navadno pojavi, kadar žival ne loči toksične rastline od ostalih rastlin, ker so zmešani s krmo, s slamo ali v silosu. Bolezen je običajno kronična in napreduje počasi, konča se s smrtjo čez nekaj mesecev, simptomi se navadno pojavijo 2 – 3 dni pred smrtjo (34).

Tudi pri ljudeh je že prišlo do smrti zaradi uživanja grinta. Opisanih je več primerov smrti zaradi uživanja kruha narejenega iz moke, ki je bila okužena z grintom, zaradi uživanja čaja z grintom, zaradi uporabe grinta pri kuhanju in zaradi uporabe prehranskih dopolnil, ki so vsebovala grint (19, 35). PA so še posebej problematični za nerojene otroke. Tako je znan primer, ko je nosečnica s čajem dnevno zaužila okoli 7 µg PA, kar pri njej ni povzročilo nobenih težav, je pa zaradi poškodb jeter novorojenček umrl 2 dni po rojstvu (22). Že nekaj mg PA na kilogram telesne teže dnevno zaužitih nekaj tednov zapored ali nekaj 100 mg zaužitih naenkrat je dovolj, da povzroči smrt pri dojenčku (15, 22). Posebna previdnost je potrebna tudi pri živalskih produktih kot so mleko, med in jajca pri živalih, ki so uživale grint (22, 32). Zelo nevarno pa je tudi, kadar je solata okužena z grintom. To se je zgodilo v Nemčiji leta 2009, ko so v trgovinah, ki so prodajale rukolo in mešane solate z rukolo, našli solato pomešano z grintom. V glavnem se je pojavljal navadni grint, ki raste v nasadih rukole kot plevel. Za laika je praktično nemogoče, da loči liste rukole in grinta (Slika 7).



**Slika 7:** Z leve proti desni so listi navadnega grinta, šentjakobovega grinta in navadne rukole

V raziskavi so analizirali 45 g solate, ki je vsebovala kar 2606 µg PA, kar predstavlja resno ogrožanje zdravja. Največji dnevni dovoljeni vnos PA v zdravilih naravnega izvora je na primer na Nizozemskem 1 µg na kilogram telesne teže, v Nemčiji je 1 µg, v Avstriji pa so PA popolnoma prepovedani (22, 36). Protistrup ne obstaja. Zastrupitev se zdravi z aktivnim ogljem in s podpornim zdravljenjem (37).

### 1.3 UGOTAVLJANJE ISTOVETNOSTI RASTLINSKIH DROG

Potrditve istovetnosti rastlin je ključna za zagotavljanje varnosti in kakovosti. Po Evropski farmakopeji ugotavljamo istovetnost rastlinskih drog na podlagi njihovega makroskopskega in mikroskopskega opisa. To je časovno potratna metoda, ki zahteva

posebna znanja, zaradi česar to ne more biti avtomatska metoda potrjevanje istovetnosti. Potrditev je možna tudi z analizo DNK ali z uporabo kromatografskih tehnik, ki so lahko sklopljene z masno spektroskopijo. To je zahtevno, dolgotrajno in drago, prav tako pa zahteva referenčni material in uporabo organskih topil. V zadnjem času pa je razvoj statističnih metod omogočil uporabo infrardeče (IR) spektroskopije (poglavje 1.4) tudi pri rastlinskem materialu (22, 38, 39, 40).

Tako se različne tehnike IR spektroskopije uspešno uporabljajo pri npr. kontroli kvalitete zdravil rastlinskega izvora, pri preverjanju izvora, pri razlikovanju med vrstami, pri potrjevanju istovetnosti in pri napovedovanju vsebnosti določenih sestavin. Pri tem so dobljeni IR spektri pogosto obdelani z različnimi tehnikami obdelave spektrov (poglavje 1.4.4) in sklopljeni s kemometričnimi statističnimi metodami (poglavje 1.5).

S pomočjo IR spektroskopije v srednjem območju so uspešno ločevali vrste kavovca (*Coffea arabica* in *Coffea canephora*). Z IR spektroskopijo v bližnjem območju so razvili hitro metodo potrjevanja istovetnosti za posušene in zmlete korenine škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea*). V več študijah so s pomočjo IR spektroskopije preučevali eterična olja: razlikovali so med različnimi kemotipi bazilike in razlikovali med različnimi rodovi (npr. *Origanum*, *Salvia*, *Thymus*, *Lavandula*). IR spektroskopija se je pri preučevanju eteričnih olj izkazala za zelo dobro zamenjavo s plinsko kromatografijo, saj lahko hlapne substance določijo kar v sami drogi. V različnih pripravkih iz listov čajevca so določevali vsebnost kofeina, epigalokatehin galata in epikatehina ter napovedovali antioksidativno kapaciteto. Prav tako so določevali alkaloid piperin v zmletem belem in črnem popru, celem zelenem popru in poprovem balzamu. V koreninah golostebelnega sladkega korena so določevali vsebnost glicirizinske kisline. V treh komercialnih makovih nasadih pa so določevali istovetnost in vsebnost opijevih alkaloidov. IR spektroskopija so uspešno uporabili pri določevanju geografskega porekla rastlin pri gozdnem koren, ginsengu, pri eteričnem olju sivke, pri gobi svetlikava pološčenka in drugih (41).

Tudi na Fakulteti za farmacijo je bilo na to temo opravljenih več raziskav. V dveh raziskavi so s tremi različnimi IR tehnikami uspešno uvrščali v vrsto osebke rodov vrbovcev in krčnic, ki so si med seboj zelo podobni (42, 43, 44, 45). V tretji raziskavi so s pomočjo IR spektroskopije napovedovali fitokemijske lastnosti lubja jelke in listov vinske trte (46). V četrti raziskavi so določali rastlinske vrste v čajni mešanici. Z

enokomponentnimi čaji so razvili model, v katerega so uspešno uvrščali nove vzorce čajnih mešanic (38, 47).

## **1.4 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA**

Infrardeča (IR) spektroskopija je analizna metoda, ki se na osnovi interakcij molekul z infrardečim delom elektromagnetnega valovanja uporablja pri določanje strukture molekul (48). Je ena najpomembnejših analiznih tehnik, saj lahko z njo analiziramo praktično vsak vzorec v katerem koli agregatnem stanju (49). To je posledica dejstva, da skoraj vsaka zvrst s kovalentnimi vezmi absorbira različne frekvence elektromagnetnega valovanja v območju IR svetlobe (50). Prednosti metode so hitrost, enostavnost, mala količina vzorca, ohranitev vzorca, nizka cena, možnost avtomatizacije in izogibanje organskih topil (38, 51). V farmaciji se tradicionalno uporablja pri npr. določanju istovetnosti in vsebnosti zdravilnih učinkovin, za določanje nečistot, pri kontroli kakovosti ovojnine, pri študiju stabilnosti zdravilnih učinkovin, pri spremljanju poteka kemijskih reakcij, za razlikovanje med izomeri, pri določanju spojin pri kromatografiji, za določanje vlage v učinkovinah, za analizo velikosti delcev, pri preiskovanju mikrobiološke neoporečnosti sterilnih farmacevtskih oblik in pri testiranju trdnosti tablet (49, 52). V zadnjem času pa se vse bolj uporablja pri različnih bioloških vzorcih pri študiji lipidov, proteinov in nukleinskih kislin, pri odkrivanju zgodnjih sprememb v tkivih (npr. pri diagnozi raka materničnega vratu), v klinični kemiji pri analizi krvi in urina, pri rastlinah pri analizi kvalitete živalske hrane, sadja, zelenjave in medu, pri odkrivanju ponaredkov v zdravilih rastlinskega izvora, ter za razlikovanje med vrstami pri glivah, bakterijah in rastlinah (38, 49, 51).

### **1.4.1 Osnove**

Spekter elektromagnetnega valovanja obsega zelo širok interval valovnih dolžin. Po naraščajoči valovni dolžini si sledijo gama žarki z valovno dolžino  $10^{-13}$  m, rentgenski žarki, ultravijolična, vidna in infrardeča svetloba, mikrovalovi in radijski valovi z valovno dolžino več sto metrov. IR svetloba zajema območje z valovnimi dolžinami od 0,78 do 1000  $\mu\text{m}$ . S stališča aplikacije in aparatur lahko IR sevanje razdelimo na bližnje, srednje in daljno območje (52, 53). Pogosteje kot valovna dolžina se uporablja valovno število v enoti  $\text{cm}^{-1}$ . To je število valov v dolžini enega centimetra. Prednost te količine je njena linearna povezanost z energijo. Povezava je prikazana v Enačbi 1:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} = \frac{E}{h c} \quad [1],$$

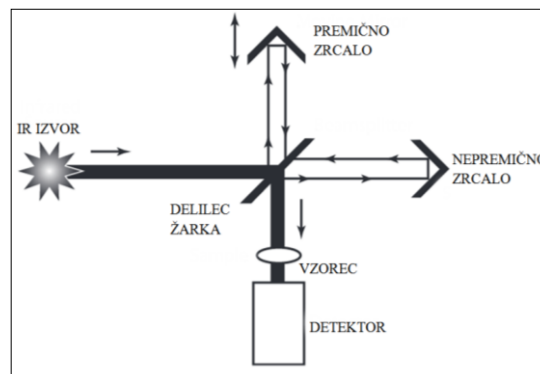
kjer je:  $\bar{\nu}$  – valovno število;  $\lambda$  – valovna dolžina;  $\nu$  – frekvenca;  $c$  – hitrost svetlobe ( $3,00 \times 10^{10}$  cm/s);  $E$  – energija;  $h$  – Planckova konstanta ( $6,626 \times 10^{-34}$  J s) (49, 53).

Da molekula absorbira IR sevanje, mora priti do spremembe dipolnega momenta (53). Dipolni moment je definiran kot produkt velikosti naboja in razdalje med dvema centroma naboja (52). Le takrat lahko izmenično električno polje vstopi v stik z molekulo, absorbira sevanje in prenese energijo, posledično pa pride do spremembe največjega odklona gibanja molekule (53). Vse zvrsti absorbirajo IR sevanje, edina izjema so molekule z dvema enakima atomoma ( $O_2$ ,  $N_2$ ,  $Cl_2$ ) ter simetrični alkeni in alkini (50, 53). Molekula absorbira sevanje le takrat, ko je frekvenca IR sevanja enaka enemu od osnovnih nihanj molekule. Takrat se spremeni največji odklon gibanja le v enem majhnem delu molekule, medtem ko je ostali del molekule nespremenjen. Vsaka absorbirana frekvenca ustreza specifičnemu nihanju dela molekule. Nihanja vključujejo spremembe v dolžini vezi (valenčna nihanja) ali v kotu vezi (deformacijska nihanja) (49). Zaradi velikega števila absorpcij je razlaga spektra lahko zelo zahtevna (54). V spektru, posnetem v srednjem območju, vidimo osnovna nihanja, medtem ko v bližnjem območju vidimo nadtone, ki so do 100-krat manj intenzivni kot osnovni signali in jih težje prepoznamo (39). Območje med 3600 in 1200  $cm^{-1}$  imenujemo območje funkcionalnih skupin, saj lahko iz položaja, oblike in intenzitete signala v tem območju sklepamo na prisotnost določene funkcionalne skupine. Območje med 1200 in 600  $cm^{-1}$  imenujemo območje prstnega odtisa, saj ima vsaka organska spojina v tem območju značilen vzorec signala, zato je to območje primerno za potrjevanje istovetnosti snovi (52).

#### 1.4.2 IR spektrometer

Instrument, ki določa absorpcijski spekter preiskovane snovi, imenujemo IR spektrometer ali spektrofotometer. Poznamo dve vrsti spektrometrov: disperzijski spektrometri in spektrometri, ki delujejo na podlagi Fourierjeve transformacije – FTIR (50). Slednji so danes pogostejši zaradi številnih prednosti: večja hitrost snemanja, zanesljivost, ugodnejše razmerje signal/šum, visoka ločljivost, točnost, ponovljivost, priročnost in nižja cena (50, 53, 55). FTIR spektrometer uporablja interferometer (Slika 8, naslednja stran). Valovanje potuje od izvora do delilca žarka, ki razdeli žarek na dva dela. En del potuje do premičnega zrcala, en del pa do nepremičnega zrcala. Žarka se odbijeta od zrcal in se združita v delilcu

žarka. Zaradi premičnega zrcala sta žarka prepotovala različno razdaljo. Ločljivost je določena z obratno vrednostjo razlike poti, ki jo žarka prepotujeta in ima isto enoto kot valovno število ( $\text{cm}^{-1}$ ). Pri združitvi žarkov pride do interference. Interferenčni vzorec imenujemo interferogram. Svetloba nato potuje do vzorca, kjer se del energije



**Slika 8:** Interferometer

absorbira, nekaj pa prepusti. Prepuščen del potuje do detektorja, ki posname informacijo o vsaki valovni dolžini v izbranem IR območju sočasno. Dobljeni interferogram je graf intenzitete v odvisnosti od časa. S Fourierjevo transformacijo dobimo graf intenzitete v odvisnosti od frekvence. Med vsako točko spektra spektrometer sam doda eno točko. S tem se izboljša oblika krivulje spektra. Ostri deli spektra postanejo bolj gladki in bolj podobni tipičnim vrhovom. S tem se ne poveča resnična ločljivost, ki je odvisna od posnetih točk (49, 50, 55, 56).

Abscisna os na dobljenem spektru je običajno prikazana z valovnimi števili v enoti  $\text{cm}^{-1}$  (Enačba 1). Na ordinatni osi pa lahko intenziteto prikazujemo z različnimi količinami. Prepustnost (transmitanca) je definirana kot razmerje med intenziteto prepuščene in vpadne svetlobe. Lahko je prikazana tudi v odstotkih. Povezave za prepustnost, odstotek prepustnosti in absorbanco so prikazane v Enačbah 2, 3, 4:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad [2], \quad \% T = \frac{I}{I_0} \times 100 \% \quad [3], \quad A = -\log_{10} T = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad [4],$$

kjer je:  $T$  – prepustnost;  $I$  – intenziteta vpadne svetlobe;  $I_0$  – intenziteta prepuščene svetlobe;  $\% T$  – odstotek prepustnosti;  $A$  – absorbanca (53, 55).

### 1.4.3 IR tehnike snemanja

**Prepustne** temeljijo na absorpciji IR sevanja pri enkratnem prehodu žarka skozi vzorec. Detektor je postavljen v premici z izvorom sevanja, tako ne pride do zaznave razpršenega in odbitega sevanja. Analiza je možna v vseh agregatnih stanjih, pri čemer je za snemanje trdnih vzorcev običajno potrebna predpriprava. Vzorec pripravimo v obliki raztopin ali suspenzij v parafinskem olju, tankih filmov ali pa vzorec zmešamo s KBr in stisnemo v tabletko. Prepustne tehnike so manj primerne za kvantitativno delo (39, 49, 52).

**Odbojne** tehnike temeljijo na odboju IR sevanja, pri čemer pride do absorpcije dela sevanja. Primer je tehnika oslabljenega popolnega odboja (ATR), ki temelji na principu popolnega odboja. Pri prehodu iz optično gostejšega (kristal) v optično redkejši medij (vzorec) pride pri vpadnih kotih večjih od kritičnega kota do popolnega odboja. Preden se žarek odbije, prodre za del valovne dolžine globoko v vzorec, ki selektivno absorbira IR sevanje. Pri tem žarek pri absorbiranih valovnih dolžinah izgubi energijo, kar vidimo na izmerjenem spektru.

Pri ATR tehniki ne pride do uničenja vzorca. Primerna je za analizo površin preiskovanih snovi, pri katerih predpriprava ni potrebna. Uporabna je pri vzorcih, ki premočno absorbirajo ali pa so predebili, da bi jih analizirali s prepustno tehniko. Primerna je tudi za analizo biološkega materiala (39, 49, 52). V predhodni raziskavi je bilo ugotovljeno, da je za najboljše rezultate pri uvrščanju rastlin v rastlinske vrste pomembna pravilna izbira tehnike snemanja, pri čemer je potrebno upoštevati morfološke in kemotaksonomske značilnosti rastlin. Prepustna tehnika se je najbolje izkazala pri ločevanju sorodnih vrst, ki se najbolj razlikujejo v notranjosti listnih ploskev. Odbojna tehnika ATR pa je dala najboljše rezultate pri tistih sorodnih vrstah, kjer se glavne razlike nahajajo na površini listne ploskve (39).

#### **1.4.4 Obdelava IR spektrov**

Kadar s pomočjo IR spektroskopije preiskujemo biološke vzorce z veliko spojinami, dobimo zelo zapletene spektre. Pomembne informacije so lahko skrite v prekrivajočih in majhnih trakovih, torej v naklonih spektra. Takrat si lahko pomagamo s tehnikami obdelave spektrov, ki odstranijo nepomembne informacije ali šum in razkrijejo pomembne signale v spektru, kar olajša nadaljnjo statistično obdelavo. Zelo pomembna je pravilna izbira obdelave spektrov ali kombinacije več različnih obdelav. (44, 57).

**Povprečenje** je tehnika, pri kateri povprečimo več ponovitev merjenja. S tem se signali okrepijo, razmerje med signalom in šumom pa poveča (58). Izbrano število ponovitev merjenja lahko določimo na spektrometru, ki izvede meritve na istem mestu istega vzorca in nam poda povprečen spekter več merjenj. Lahko pa ponavljamo meritve tudi na več različnih točkah vzorca in potem sami izračunamo povprečje meritev.

Tudi z **glajenjem** lahko zmanjšamo šum v spektru. Po glajenju postane izvorni spekter podoben spektru, posnetem pri manjši ločljivosti. S tem se lahko informacije skrite v

majhnih spremembah naklonov in prekrivajočih trakovih izgubijo. Poznamo več načinov glajenja. Primer glajenja je, da izračunamo povprečje  $n$  sosednjih točk in dobimo prvo novo točko, nato se za korak  $n$  pomaknemo naprej po spektru in iz povprečja naslednjih  $n$  sosednjih točk dobimo drugo novo točko, itd (44, 45, 49).

**Normalizacija s standardnim odklonom** (SNV) najprej osredini spekter okoli vrednosti nič, tako da odšteje aritmetično sredino spektra preko vseh valovnih števil. Nato pa vsako vrednost spektra še normalizira s standardnim odklonom celotnega spektra. Izračunamo je po Enačbi 5, pri tem pa si pomagamo z izračunom aritmetične sredine spektra (Enačba 6) in standardnega odklona vzorca (SO) (Enačba 7). Standardni odklon vzorca je pomemben opisni parameter in predstavlja razpršenost podatkov okoli aritmetične sredine.

$$X_i^* = \frac{X_i - \bar{X}}{SO} \quad [5], \quad \bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad [6], \quad SO = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad [7],$$

kjer je:  $X_i^*$  – normalizirana vrednost v  $i$ -ti točki;  $X_i$  – izvorna vrednost spektra;  $\bar{X}$  – aritmetična sredina celotnega spektra;  $SO$  – standardni odklon spektra;  $n$  – število točk spektra.

Normalizacija se je izkazala za zelo uporabno, kadar pričakujemo premik bazne linije, ki je lahko posledica različno dolgih poti žarka skozi vzorec ali lokalnega spreminjanja koncentracije snovi, kar je pri bioloških vzorcih pričakovano (44, 45, 49, 59, 60).

**Odvajanje** poveča ločljivost v primerjavi z izvirnim spektrom. Spremembe v naklonu so poudarjene, posledično postanejo veliki prekrivajoči in majhni trakovi v izvirnem spektru bolj vidni. Slabost odvajanja je, da lahko poveča šum. Temu se izognemo s predhodno uporabo tehnike, ki zmanjša šum, kot je na primer povprečenje. V predhodnih raziskavah se je odvajanje izkazalo za zelo uporabno tehniko obdelave spektrov pri uvrščanju rastlinskih vzorcev v pravilno vrsto. Prvi odvod izračunamo z Enačbo 8:

$$X_i' = \frac{X_{i+1} - X_i}{Y_{i+1} - Y_i} \quad [8],$$

kjer je:  $X_i'$  – vrednost prvega odvoda v  $i$ -ti točki;  $X_i$  in  $X_{i+1}$  – sosednji abscisni vrednosti izvirnega spektra;  $Y_i$  in  $Y_{i+1}$  – sosednji ordinatni vrednosti izvirnega spektra (43, 44, 49).

## 1.5 STATISTIČNE METODE

Kemometrija je disciplina v kemiji, ki s statističnimi metodami analizira ogromno količino eksperimentalnih podatkov z namenom pridobitve najboljše možne informacije in s tem zmanjšanja števila spremenljivk. Razvoj kemometrije je močno povezan z razvojem računalništva. S tem se je uporaba IR spektroskopije lahko razširila na analizo kompleksnih vzorcev kot je rastlinski material (51, 61).

### 1.5.1 Analiza variance

Analiza variance (ANOVA) je glavna metoda za analiziranje podatkov eksperimentov, katerih cilj je primerjava aritmetičnih sredin dveh ali več skupin. Uporabnost ANOVE je zelo široka, od preprostih testov, do zapletenih modelov, katerih rešitev je odvisna od zmogljivosti računalnikov. Za doseg ciljev eksperimenta pa vedno uporabimo najpreprostejši model (60). ANOVA temelji na dejstvu, da razpršenost vsakega vzorca, vzetega iz iste populacije, predstavlja nepristransko oceno razpršenosti populacije. Celotno razpršenost vseh enot iz vseh vzorcev razstavimo na komponente, iz katerih je sestavljena, to je na razpršenost enot v vsaki posamezni skupini in na razpršenost med temi skupinami. Ničelna domneva trdi, da vsi vzorci izhajajo iz populacije z enakimi povprečji (Enačba 9) in da razpršenost med skupinami ni večja od razpršenosti znotraj teh skupin (62).

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots \quad [9],$$

kjer je:  $H_0$  – ničelna domneva;  $\mu_1, \mu_2, \mu_3 \dots$  – aritmetične sredine vzorcev.

Če dobljena vrednost  $F$  presega kritično vrednost, zavrnemo ničelno domnevo in sprejmemo sklep, da pri izbranem tveganju vzorci izhajajo iz različnih populacij (62). Večja vrednost  $F$  pomeni večjo verjetnost, da vzorci izhajajo iz različnih populacij (43).

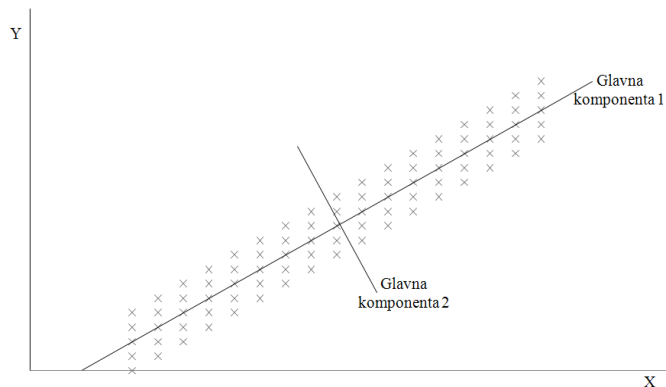
Enosmerno ANOVO uporabimo, kadar imamo eno numerično spremenljivko, ki je normalno porazdeljena, in eno neodvisno spremenljivko, ki je opisna (atributivna) in nam razdeli vzorec na več kot dve podskupini (63). Kadar primerjamo aritmetični sredini le dveh skupin, govorimo o posebnem primeru enosmerne ANOVE – **testu  $t$**  (60). Povezava med vrednostnima  $F$  in  $t$  je  $F=t^2$  (62). O dvosmerni ANOVI govorimo, ko imamo dve opisni spremenljivki. ANOVA spada med univariantne statistične metode, saj ugotavljamo zvezo med eno neodvisno in eno odvisno spremenljivko. V predhodni raziskavi so ugotovili, da je uporaba ANOVE za zmanjšanje števila spremenljivk smiselna pri uvrščanju v rastlinske vrste. Pogosto pa je nova spremenljivka, ki je kombinacija prvotnih,



bolj informativna. Takrat uporabimo multivariantne metode, ki hkrati delujejo na več spremenljivkah. Primera sta metoda glavnih komponent in diskriminantna analiza (43, 51).

### 1.5.2 Metoda glavnih komponent

Pri obdelavi podatkov se pogosto srečujemo z zelo veliko spremenljivkami, ki jih težko obvladujemo. Takrat si lahko pomagamo z metodo glavnih komponent (64). Z metodo zmanjšamo razsežnost podatkov, pri tem pa poizkušamo izgubiti čim manj informacij (65, 66). Glavnih komponent je toliko, kolikor je osnovnih spremenljivk (67). Ko izračunamo prvo komponento, ki opiše največ razpršenosti, poiščemo drugo komponento, ki je neodvisna od prve in opiše največ preostale razpršenosti. Postopek lahko ponavljamo do zadnje komponente, da dobimo komponente, ki so urejene po padajoči zajeti razpršenosti (65, 67). Pri nadaljnji obdelavi podatkov uporabimo nekaj prvih komponent, ki pojasnjujejo čim večji del razpršenosti analiziranih podatkov (običajno vsaj 80 % skupne razpršenosti) (63, 65). Slika 9 prikazuje primer v dvorazsežnem prostoru z izhodiščnima spremenljivkama  $X$  in  $Y$ , ki jima pripišemo dve glavni komponenti. Glavna komponenta 1 opisuje večino razpršenosti, tako da lahko Glavno komponento 2 zavržemo, ne da bi izgubili pomembne informacije.



**Slika 9:** Primer uporabe metode glavnih komponent na dveh spremenljivkah

V predhodni raziskavi, kjer so s pomočjo IR spektroskopije uvrščali vzorce v rastlinske vrste, so dobili najboljše rezultate, ko so pred uporabo metode glavnih komponent z ANOVO zmanjšali število spremenljivk iz začetnih 3500 na 1300 ali 200. To kaže na občutljivost metode glavnih komponent na prisotnost številnih medsebojno povezanih spremenljivk brez informacijske vrednosti (43). V drugi raziskavi, kjer so določali rastlinske vrste v čajni mešanici rastlinskih drog, so to potrdili. Preučevali so tudi vpliv različnega števila spremenljivk in števila glavnih komponent na odstotek pravilne razvrstitve. Z večanjem uporabljenih spremenljivk odstotek pravilne razvrstitve raste, saj vsebujejo glavne komponente uporabne informacije, ki so bile predhodno izbrane z ANOVO. Ko se število uporabljenih spremenljivk približuje izbranemu največjemu številu

glavnih komponent, začne padati odstotek pravilne razvrstitve, saj so vključeni tudi podatki brez prave informacijske vrednosti. Ko pa število uporabljenih spremenljivk preseže izbrano število glavnih komponent, začne odstotek pravilne razvrstitve spet rasti, saj so v glavnih komponentah povezane spremenljivke z visoko informacijsko vrednostjo. To kaže na zahtevnost izbire ustreznih nastavitev (38).

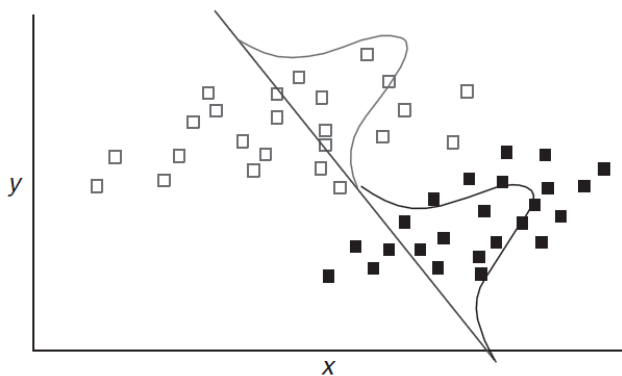
### 1.5.3 Diskriminantna analiza

Z diskriminantno analizo uvrščamo posamezne enote v skupine. Pri tem lahko pojasnujemo razlike med skupinami, lahko pa tudi uvrščamo neznane enote v vnaprej dane skupine. To naredimo s tako linearno kombinacijo merjenih spremenljivk, da bo maksimalno ločila skupine in da bo napaka pri uvrščanju enot v skupine najmanjša (68, 69). V splošnem lahko diskriminantno funkcijo opišemo z Enačbo 10:

$$D = k_1s_1 + k_2s_2 + \dots + k_ns_n \quad [10],$$

kjer je:  $D$  – vrednost diskriminantne funkcije;  $k_1, k_2, \dots, k_n$  – koeficienti diskriminantne funkcije (uteži);  $s_1, s_2, \dots, s_n$  – merjene spremenljivke.

Na Sliki 10 je prikaz diskriminantne analize na dveh skupinah in na dveh spremenljivkah. Brez diskriminantne analize je ločitev enot v skupine samo z odvisno opisno spremenljivko  $X$  ali  $Y$  slaba, z linearno kombinacijo spremenljivk  $X$  in  $Y$  pa dobimo novo os, diskriminantno funkcijo, kjer je ločitev boljša (68). Ločitev med skupinami je najboljša, kadar je razpršenost med skupinami največja in hkrati razpršenost znotraj skupine najmanjša (65).



**Slika 10:** Prikaz diskriminantne analize

**Točnost** (pravilnost) uvrstitve pogosto ocenjujemo na dva načina. V prvem gre za navzkrižno vrednotenje z izpuščanjem enot (*ang.* leave-one-out), pri kateri uporabimo za izračun diskriminantne funkcije vse enote razen ene, nato pa uvrščamo to izpuščeno enoto z dobljeno diskriminantno funkcijo. Ta postopek ponovimo za vse enote. Drugi način je vrednotenje z neodvisnim setom, ko del enot uporabimo za izračun funkcije, z drugim delom enot pa preverjamo točnost uvrščanja (68, 70). Predhodno se je vrednotenje z izpuščanjem enot izkazala za neobjektivno, saj so bili dobljeni rezultati boljši od vrednotenja z neodvisnim setom (43).

## 2 NAMEN DELA

V magistrski nalogi bomo razvili metodo za ločevanje listov rukole in grinta s pomočjo infrardeče spektroskopije. Vzgojili bomo več vrst rukole in grinta ter ocenili uspešnost vzgoje rastlin.

Pri razvoju metode bomo ovrednotili več spremenljivk glede na njihov doprinos k uspešnosti ločevanja. Zanimalo nas bo, ali je uspešnost odvisna od priprave vzorca: sveži ali posušeni listi. Uporabili bomo IR tehniki snemanja oslabiljenega popolnega odboja in prepustno tehniko. Pri tem bomo pri obeh tehnikah spreminjali nastavitve. Raziskali bomo, kako vpliva na uspešnost ločitve različno število ponovitev snemanja spektra in ločljivost snemanja. Dobljene spektre bomo obdelali s povprečenjem, prvim odvodom, z normalizacijo s standardnim odklonom in s kombinacijo obdelav. S spektri z največjo ločljivostjo bomo na dva načina naredili še navidezno zmanjšanje ločljivosti.

Dobljene podatke bomo obdelali s statističnimi metodami. Z enosmerno analizo variance bomo razvrstili valovna števila od najbolj informativnih do najmanj informativnih. Nato bomo po koraku povečevali število valovnih števil, ki bodo vstopala v metodo glavnih komponent. Glavne komponente bomo uporabili v diskriminantni analizi, s pomočjo katere bomo ločevali vzorce rukole in grinta. Točnost ločevanja bomo ocenili na dva načina: z navzkrižnim vrednotenjem z izpuščanjem enot in z vrednotenjem z neodvisnim setom.

S pomočjo dvosmerne analize variance bomo ugotavljali vpliv proučevanih spremenljivk in njihovih kombinacij na sposobnost modela za ločevanje med listi rukole in grinta. Za spremenljivke, pri katerih bomo ugotovili vpliv na odstotek pravilne uvrstitve, bomo ta vpliv nadalje preučevali.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 VZORCI

#### 3.1.1 Vzgoja rastlin

Vzorci smo želeli pripraviti z vzgojo lastnih rastlin. To smo naredili v dveh serijah, ki sta trajali od marca do avgusta 2014. Uporabili smo 16 različnih vzorcev semen grinta: 6 vzorcev navadnega grinta (*Senecio vulgaris*), 3 šentjakobovega grinta (*Senecio jacobaea*), 5 rukvičnega grinta (*Senecio erucifolius*) in 2 vzorca gozdnega grinta (*Senecio sylvaticus*). Za vzgojitev rukole smo uporabili semena, ki smo jih kupili v različnih trgovinah. Uporabili smo 4 različne vzorce semen navadne rukole (*Eruca sativa*) in 3 vzorce semen divje rukole (*Diplotaxis tenuifolia*). Izvor oziroma proizvajalec semen, številka serije in datum prejetja semen oziroma datum uporabnosti je prikazan v Preglednici I in II.

**Preglednica I:** Izvor semen grinta

| Zaporedna številka | Vrsta                      | Izvor                                                  | Številka serije  | Datum prejetja semen |
|--------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------|------------------|----------------------|
| 1                  | <i>Senecio vulgaris</i>    | Herbarijska pola Katja Vendramin; Miren, Slovenija     | /                | 7. 2013              |
| 2                  | <i>Senecio erucifolius</i> | Univerzitetni botanični vrt; Brno, Češka               | /                | 10. 9. 2012          |
| 3                  | <i>Senecio vulgaris</i>    | Univerzitetni botanični vrt; Brno, Češka               | /                | 10. 9. 2012          |
| 4                  | <i>Senecio jacobaea</i>    | Univerzitetni botanični vrt; Vácrátót, Madžarska       | 212.<br>251/2012 | 18. 9. 2012          |
| 5                  | <i>Senecio erucifolius</i> | Arboretum Chèvreloup; Pariz, Francija                  | 02-162           | 25. 9. 2012          |
| 6                  | <i>Senecio erucifolius</i> | Arboretum Chèvreloup; Pariz, Francija                  | 09-175           | 25. 9. 2012          |
| 7                  | <i>Senecio vulgaris</i>    | Arboretum Chèvreloup; Pariz, Francija                  | 05-52            | 25. 9. 2012          |
| 8                  | <i>Senecio vulgaris</i>    | Arboretum Chèvreloup; Pariz, Francija                  | 11-210           | 25. 9. 2012          |
| 9                  | <i>Senecio erucifolius</i> | Arboretum Chèvreloup; Pariz, Francija                  | 05-147           | 25. 9. 2012          |
| 10                 | <i>Senecio sylvaticus</i>  | Arboretum Chèvreloup; Pariz, Francija                  | 10-123           | 25. 9. 2012          |
| 11                 | <i>Senecio jacobaea</i>    | Arboretum Chèvreloup; Pariz, Francija                  | 10-32            | 25. 9. 2012          |
| 12                 | <i>Senecio jacobaea</i>    | Kraljevski botanični vrt Kew; London, Velika Britanija | 0066949          | 23. 10. 2012         |

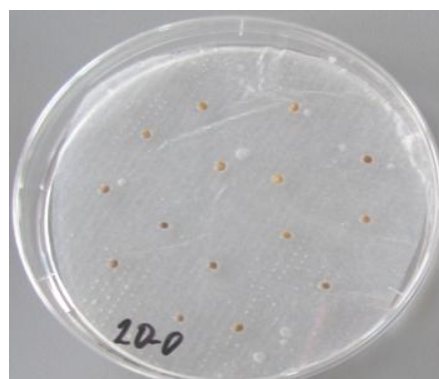
|    |                            |                                                           |         |                 |
|----|----------------------------|-----------------------------------------------------------|---------|-----------------|
| 13 | <i>Senecio sylvaticus</i>  | Kraljevski botanični vrt Kew;<br>London, Velika Britanija | 0066994 | 23. 10.<br>2012 |
| 14 | <i>Senecio erucifolius</i> | Kraljevski botanični vrt Kew;<br>London, Velika Britanija | 0064875 | 23. 10.<br>2012 |
| 15 | <i>Senecio vulgaris</i>    | Kraljevski botanični vrt Kew;<br>London, Velika Britanija | 0063339 | 23. 10.<br>2012 |
| 16 | <i>Senecio vulgaris</i>    | Samosevno v gredi; Ljubljana,<br>Slovenija                | /       | 8. 2012         |

**Preglednica II:** Izvor semen rukole

| Zaporedna številka | Vrsta                        | Proizvajalec                             | Številka serije         | Datum uporabnosti |
|--------------------|------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|-------------------|
| 17                 | <i>Eruca sativa</i>          | Valentin, Semenarna Ljubljana; Slovenija | R1298/361-RC            | 15. 10. 2015      |
| 18                 | <i>Eruca sativa</i>          | Semenarna Ljubljana; Slovenija           | S1164/323-SC            | 15. 10. 2016      |
| 19                 | <i>Eruca sativa</i>          | Euro seme; Italija                       | RU00001IST<br>UT3621    | 12. 2016          |
| 20                 | <i>Eruca sativa</i>          | VMS; Italija                             | RU00001IST<br>XT3418    | 12. 2017          |
| 21                 | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> | Bio Compagnia delle Sementi; Italija     | Z00112                  | 12. 2017          |
| 22                 | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> | VMS; Italija                             | RU00005IST<br>KT0434SZO | 12. 2017          |
| 23                 | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> | Royal Seeds; Italija                     | T186 GERM.90            | 12. 2015          |

Kadar je v magistrski nalogi govora o vodi, gre za navadno vodo pri sobni temperaturi, ki smo jo točili iz pipe.

V **prvi seriji** smo po okoli 15 semen vsakega vzorca dali v označeno plastično petrijevko, ki je bila na spodnji strani obložena z vodo ovlaženimi papirnatimi brisačami (Slika 11). Pri semenih grinta, ki izvirajo iz Velike Britanije, smo dali le po 7 semen, ker je bilo teh semen zelo malo. Z vsakim vzorcem smo napolnili po dve petrijevki, tako smo dobili skupno 46 petrijev.



**Slika 11:** Semena navadne rukole

Nato smo polovico petrijevk postavili v omaro in na ta način semena zaščitili pred svetlobo. S tem smo želeli posnemati pogoje semen, zakopanih v zemlji. Polovico petrijevk pa smo pustili na mizi ob oknu, nezaščiteno pred svetlobo. Kalitev smo vsakodnevno spremljali in občasno z vodo navlažili filtrirni papir.

Vsako posamezno petrijevko iz omare smo prestavili k ostalim na svetlobo, ko so začela semena v tej petrijevki kaliti. Ko je rastlinica dosegla zgornji vrh petrijevke, smo jo presadili v korito. Uporabili smo cvetlična korita velika približno 80×20×10 cm, ki smo jih postavili na ustrezne podstavke. Korita smo do dveh tretjin napolnili z zemljo, ki smo jo dobro zalili z vodo. Zemlja je bila kupljena v trgovini in je bila pridobljena iz naslednjih sestavin: bela šota, črna šota, kompost iz zelenja, humus iz lubja, lesna vlakna in gnojilo NPK. V navodilih je bilo navedeno, da je primerna za vse rastline, razen za močvirnate rastline. Vrednosti ostalih parametrov, ki so bile navedene na embalaži, je prikazana v Preglednici III.

#### **Preglednica III:** Parametri zemlje za sajenje

| Parameter                              | Vrednost        |
|----------------------------------------|-----------------|
| Dušik – N                              | 200 – 500 mg/L  |
| Fosfat – P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 200 – 500 mg/L  |
| Kalijev oksid – K <sub>2</sub> O       | 300 – 1000 mg/L |
| pH vrednost (CaCl <sub>2</sub> )       | 5,5 – 6,5       |
| Sol (KCl)                              | < 3 g/L         |

Iz vsake posamezne petrijevke smo v korita presadili dvakrat po tri rastline približno 1 cm globoko, ki so bile v koritu med seboj oddaljene po 4 cm, razdalja med rastlinami iz druge petrijevke je bila 6 cm, razdalja od stene korita je bila 3 cm zgoraj in spodaj, od strani pa 5 cm. Rastline iz različnih petrijevk pa smo še dodatno razmejili s svaljki iz papirnatih brisač. Polovico korit smo postavili na zunanjo okensko polico, polovico pa na notranjo okensko polico (Slika 12).



**Slika 12:** Pripravljena korita

Rastline smo vsakodnevno spremljali in jih zalivali približno na tri dni, tiste na zunanji okenski polici pa občasno pogosteje. Po dveh tednih nekateri vzorci niso začeli kaliti, zato smo polovico semen v posamezni petrijevki pokrili z navlaženo zemljo (Slika 13) in dali kaliti še dodatna semena v nove petrijevke. Nova semena smo dali kaliti tudi zaradi odmiranja že presajenih rastlin v koritih. Tudi sedaj nekatera semena niso začela kaliti. Večina tistih, ki so vzkalila in smo jih presadili v korito, pa je odmrla. Domnevali smo, da je do tega prišlo zaradi stresa ob presajanju tako majhnih rastlin ali zaradi neustrezne zemlje v koritih.



**Slika 13:** Semena pokrita z zemljo

Pri **drugi seriji** vzgoje rastlin smo zamenjali metodo, ki je omogočala lažje presajanje rastlin in tako zmanjšala vpliv stresa na rastline, zamenjali smo tudi vrsto zemlje. Uporabili smo prazne kartonaste škatle za jajca, ki smo jih napolnili z novo zemljo (»Substrat za setev in pikiranje«, proizvajalca Cvetal), ki smo jo še navlažili. V navodilih piše, da je zemlja idealna za zdrav in hiter začetni razvoj rastlin. V sestavi je navedeno, da je izdelana iz presejanih specialnih šot. pH zemlje je bil 5,5 – 6,5. Drugih podatkov o zemlji ni bilo navedenih. V vsako vdolbinico smo na vrh zemlje dali po eno seme in nato potresli z malo zemlje. Tako smo v eno kartonasto škatlo dali po 10 semen istega vzorca, v primerih kjer je bila kaljivost v prvi seriji zelo slaba in smo imeli dovolj semen, pa po 20 ali 30 semen. Škatle smo z zunanje strani obložili s plastično vrečko, prav tako pa smo z njimi škatle tudi narahlo prekrili, da smo preprečili prehitro izhlapevanje vode. Vse škatle so bile postavljene na mizi na notranji strani ob oknu (Slika 14).



**Slika 14:** Nekatera semena v kartonastih škatlah so že vzkalila



Rastline smo presadili, ko so dosegle velikost okoli 5 cm. Presadili smo jih tako, da smo z žlico zajeli še okoliško zemljo. Na tak način smo zmanjšali stres ob presaditvi. Presadili smo jih v nova korita z enako razporeditvijo rastlin, kot je bila v prvi seriji. Uporabljena zemlja pa je bila druga. Do polovice korita smo nasuli zemljo (»Univerzalni biosubstrat«, proizvajalca Cvetal), pridelano iz kakovostne bele in črne šote z dodatkom dolomita. Navedeni pH zemlje je bil 5,5 – 6,8. Drugih podatkov o zemlji ni bilo navedenih. Na to zemljo pa smo nasuli še nekaj centimetrov zemlje, ki smo jo predhodno uporabili že v kartonskih škatlah. Nato smo zemljo navlažili in vanjo posadili rastline. Spet smo polovico korit dali na notranjo stran okna, polovico korit pa smo imeli čez dan na zunanji strani okna, ponoči pa na notranji strani. Rastline smo vsakodnevno opazovali in po potrebi zalivali.

### **3.1.2 Priprava vzorcev**

Ko je rastlina razvila vsaj 4 liste, velike vsaj 3 cm, smo liste obrali. S prvo polovico listov smo še isti dan opravili meritve pri obeh IR spektroskopskih tehnikah, drugo polovico pa smo dali posušiti. Sušili smo tako, da smo liste dali med 2 filtrirna papirja, nanju pa naložili za približno 5 kg knjig. Filtrirni papir smo nato zamenjali še dva- do tri-krat. Liste smo na ta način sušili vsaj 10 dni pri sobni temperaturi. Preden smo še s suhimi listi opravili meritve pri obeh IR spektroskopskih tehnikah, smo liste dodatno sušili v eksikatorju nad silikagelom vsaj 24 ur pri sobni temperaturi.

Kljub spremembi metode vzgoje rastlin je bila uspešnost vzgojitve rastlin zelo slaba. Zaradi tega smo vzorce dobili še drugje. Grinte smo poiskali v naravnem okolju. Rastlino smo izruvali s korenino vred in preverili njeno istovetnost s pomočjo rastlinskega ključa (2, 71). Nato smo jo dali v posodo z vodo, da je korenina rastline imela dostop do vode. Rastlini smo obrali liste in postopali isto, kot je opisano že zgoraj.

Liste rukole smo kupili v trgovinah, ki so prodajale že pripravljene zavoјčke rukole. Tudi tu je sledil postopek, ki je enak zgornjemu. V Preglednici IV in V so naštetih uporabljeni vzorci in njihov izvor.



**Preglednica IV:** Vzorci grinta, ki so bili uporabljeni pri analizi na IR spektrofotometrih, in njihov izvor. V zadnjem stolpcu je opisano, če kateri vzorec ni bil uporabljen pri vseh analizah (ATR – tehnika oslavljenega popolnega odboja; T – prepustna tehnika; sv – sveži listi; su – posušeni listi). To se je zgodilo zaradi okvare obeh IR spektrofotometrov.

| Vzorec  | Vrsta              | Izvor                                                                                                       | Manjkajoče analize |
|---------|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Grint1  | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Jadranska ulica, Ljubljana, Slovenija                                                              |                    |
| Grint2  | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Jadranska ulica, Ljubljana, Slovenija                                                              | T: sv, su; ATR: su |
| Grint3  | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Trnovo, Ljubljana, Slovenija                                                                       |                    |
| Grint4  | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Trnovo, Ljubljana, Slovenija                                                                       | T: sv              |
| Grint5  | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Trnovo, Ljubljana, Slovenija                                                                       | T: sv, su; ATR: su |
| Grint6  | <i>S. vulgaris</i> | Vzgojeno (1. serija – notranje korito); seme iz Kraljevskega botaničnega vrta Kew, London, Velika Britanija |                    |
| Grint7  | <i>S. jacobaea</i> | Vzgojeno (1. serija – notranje korito); seme iz Arboretuma Chèvreloup, Pariz, Francija                      |                    |
| Grint8  | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Jadranska ulica, Ljubljana, Slovenija                                                              |                    |
| Grint9  | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Jadranska ulica, Ljubljana, Slovenija                                                              |                    |
| Grint10 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Tržaška cesta, Ljubljana, Slovenija                                                                |                    |
| Grint11 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Gunduličeva ulica, Ljubljana, Slovenija                                                            |                    |
| Grint12 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Gerbičeva ulica, Ljubljana, Slovenija                                                              |                    |
| Grint13 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Jamova cesta, Ljubljana, Slovenija                                                                 |                    |
| Grint14 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Jadranska ulica, Ljubljana, Slovenija                                                              |                    |
| Grint15 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Vidmarjeva ulica, Ljubljana, Slovenija                                                             |                    |
| Grint16 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Barjanska cesta, Ljubljana, Slovenija                                                              |                    |
| Grint17 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Toscanijev park, Ljubljana, Slovenija                                                              |                    |
| Grint18 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Langusova ulica, Ljubljana, Slovenija                                                              |                    |
| Grint19 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Tržaška cesta, Ljubljana, Slovenija                                                                |                    |
| Grint20 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Finžgarjeva ulica, Ljubljana, Slovenija                                                            |                    |
| Grint21 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Barjanska cesta, Ljubljana, Slovenija                                                              |                    |
| Grint22 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Mirje, Ljubljana, Slovenija                                                                        |                    |
| Grint23 | <i>S. vulgaris</i> | Nabrano; Lepi pot, Ljubljana, Slovenija                                                                     | ATR: su            |

**Preglednica V:** Vzorci rukole, ki so bili uporabljeni pri analizi na IR spektrofotometrih, in njihov izvor. Na embalaži rukole, ki je bila kupljena v trgovini, vrsta ni bila navedeno, po vsej verjetnosti pa je šlo za vrsto *Eruca sativa*. V zadnjem stolpcu je opisano, če kateri vzorec ni bil uporabljen pri vseh analizah (ATR – tehnika oslabiljenega popolnega odboja; su – posušeni listi). To se je zgodilo zaradi okvare obeh IR spektrofotometrov.

| Vzorec   | Vrsta            | Izvor                                                                                  | Manjkajoče analize |
|----------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Rukola1  | Rukola           | Kupljeno; Mercator, Ljubljana, Slovenija                                               |                    |
| Rukola2  | Rukola           | Kupljeno; Mercator, Ljubljana, Slovenija                                               |                    |
| Rukola3  | <i>E. sativa</i> | Vzgojeno (2. serija – notranje korito); seme: Semenarna Ljubljana, Slovenija           |                    |
| Rukola4  | Rukola           | Kupljeno; Interspar, Ljubljana, Slovenija                                              |                    |
| Rukola5  | Rukola           | Kupljeno; Interspar, Ljubljana, Slovenija                                              |                    |
| Rukola6  | Rukola           | Kupljeno; Interspar, Ljubljana, Slovenija                                              |                    |
| Rukola7  | Rukola           | Kupljeno; Hofer, Ljubljana, Slovenija                                                  |                    |
| Rukola8  | <i>E. sativa</i> | Vzgojeno (2. serija – notranje korito); seme: Valentin, Semenarna Ljubljana, Slovenija |                    |
| Rukola9  | <i>E. sativa</i> | Vzgojeno (2. serija – zunanje korito); seme: Euro seme, Italija                        |                    |
| Rukola10 | <i>E. sativa</i> | Vzgojeno (2. serija – notranje korito); seme: VMS, Italija                             |                    |
| Rukola11 | Rukola           | Kupljeno; E. Leclerc, Ljubljana, Slovenija                                             |                    |
| Rukola12 | Rukola           | Kupljeno; E. Leclerc, Ljubljana, Slovenija                                             |                    |
| Rukola13 | Rukola           | Kupljeno; Eurospin, Ljubljana, Slovenija                                               | ATR: su            |
| Rukola14 | Rukola           | Kupljeno; Eurospin, Ljubljana, Slovenija                                               | ATR: su            |
| Rukola15 | Rukola           | Kupljeno; Tuš, Ljubljana, Slovenija                                                    | ATR: su            |
| Rukola16 | Rukola           | Kupljeno; Plodine, Medulin, Hrvaška                                                    | ATR: su            |
| Rukola17 | Rukola           | Kupljeno; Spar, Celovec, Avstrija                                                      | ATR: su            |

### 3.2 IR SPEKTROFOTOMETRA IN PROGRAMSKA OPREMA

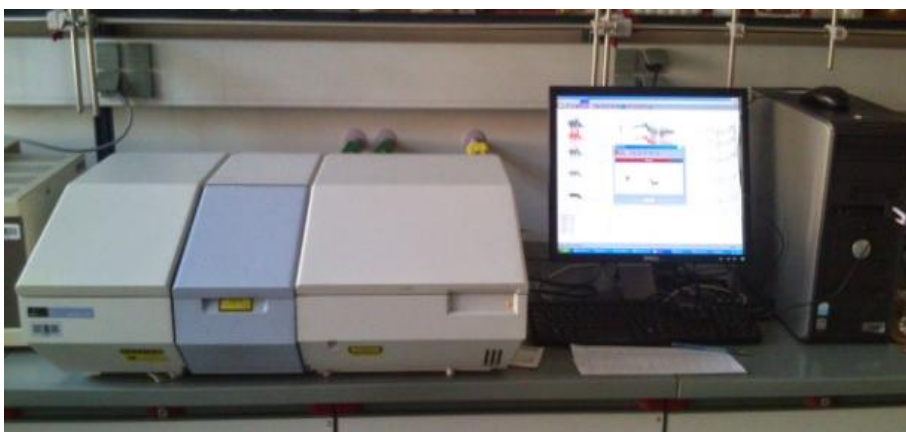
Pri merjenju smo uporabili dva IR spektrofotometra:

- Nicolet Nexus FTIR spektrometer (proizvajalec: Nicolet Instrument Co, Madison, ZDA) z devteriranim triglicin sulfatnim (DTGS) detektorjem. Uporabili smo merilni nastavek ATR (proizvajalec: Dura SamplIR Technologies, Danbury, ZDA), ki ima diamant premera 1 mm in vijak, ki zagotavlja enakomeren pritisk vseh vzorcev na kristal (Slika 15). Za snemanje smo uporabili program EZ OMNIC, spektre pa smo shranili v formatu CSV.



**Slika 15:** FTIR spektrometer z ATR nastavkom

- Perkin Elmer FTIR Spectrum BX II z devteriranimi triglicin sulfatnim (DTGS) detektorjem, ki deluje na principu prepustne tehnike (Slika 16). Uporabili smo držalo za vzorce s KBr tabletko. Za snemanje smo uporabili program Spectrum v5.3.1, spektre pa smo shranili v formatu ASCII.



**Slika 16:** FTIR spektrometer, ki deluje na principu prepustne tehnike

Za obdelavo podatkov smo uporabili programa Matlab R2012b in Microsoft Office Excel 2007 in Microsoft Office Word 2007.

### 3.3 NASTAVITVE PRI MERJENJU

Nastavitve, ki so bile uporabljene pri obeh tehnikah merjenja so prikazane v Preglednici VI. V magistrski nalogi pod izrazom ločljivost uporabljam resnično ločljivost, število točk na spektru pa predstavlja vsoto izvornih in dodanih točk spektra.

**Preglednica VI:** Nastavitve pri merjenju

| Parameter                             | ATR IR spektroskopija |      |      | Prepustna IR spektroskopija |      |
|---------------------------------------|-----------------------|------|------|-----------------------------|------|
| Ozadje                                | zrak                  |      |      | zrak                        |      |
| Število ponovitev snemanja            | 3, 10, 60             |      |      | 3, 10, 60                   |      |
| Ločljivost [ $\text{cm}^{-1}$ ]       | 1                     | 2    | 4    | 1,00                        | 2,00 |
| Število podatkovnih točk              | 7054                  | 3527 | 1764 | 7201                        | 3601 |
| Območje snemanja [ $\text{cm}^{-1}$ ] | 4000 – 600            |      |      | 4000 – 400                  |      |
| Format                                | % prepustnosti        |      |      | % prepustnosti              |      |
| Delilec žarka                         | ZnSe                  |      |      | KBr                         |      |
| Detektor                              | DTGS KBr              |      |      | DTGS                        |      |

### 3.4 IZBIRA DELA LISTA

Nekaj posušenih listov rukole in grinta smo posneli na različnih mestih površine lista, da bi videli, kje dobimo spekter z vrhovi, ki imajo največji odstotek prepustnosti. To smo posneli s prepustno IR spektroskopijo pri ločljivosti  $1 \text{ cm}^{-1}$ . Ugotovili smo, da so najboljši rezultati, kadar je točka meritve pri koncu roba listne ploskve, kjer je list najdlje oddaljen od stebela. Pri ATR IR spektroskopiji dobljeni spekter ni odvisen od točke snemanja.

### 3.5 POTEK MERITVE

Meritve so bile izvedene na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo v obdobju od junija do oktobra 2014. V Prilogi A na koncu magistrske naloge so predstavljeni nekateri spektri svežih oziroma posušenih vzorcev rukole in grinta, posneti pri različnih nastavitvah ločljivost in števila ponovitev snemanja pri obeh načinih merjenja. Na koncu sta dodana spektra ozadja.

#### 3.5.1 ATR IR spektroskopija

Diamantni kristal in vijak na spektrometru smo pred vsako meritvijo očistili z etanolom in počakali, da se posuši. Nato smo zavrteli vijak v smeri urinega kazalca do prvega klika ter

posneli spekter ozadja, ki vsebuje atmosferske pline, ki absorbirajo v IR območju ( $\text{CO}_2$ , voda). Po posnetem ozadju smo sprostili vijak in na kristal dali vzorec rastline: sveži ali suhi list grinta oziroma rukole. List smo predhodno narahlo obrisali s suho papirnato brisačo. Mesto meritve smo izbrali na tak način, da smo se izognili večjim žilam. List smo obrnili z zgornjo listno ploskvijo proti kristalu, tako da je žarek spektrometra najprej prišel v stik z zgornjo ploskvijo. Vijak smo zopet zavrteli do prvega klika in počakali 1 minuto, preden smo začeli s snemanjem spektra (Slika 17). Pri pritisku vijaka ob kristal pride do poškodb celic lista, zato je dobro počakati, da se vzpostavi



**Slika 17:** List grinta med merjenjem

ново ravnotežje snovi, kar se zgodi po 1 minuti. Ko je bil spekter posnet, smo ga shranili. Kristal in del vijaka, ki je bil v stiku z vzorcem, smo počistili z etanolom in počakali, da se posuši. Nato smo na istem vzorcu pri istih nastavitvah in na enak način, vendar na drugem mestu, izvedli še dve meritvi. Po tri ponovitve smo izvedli pri vseh treh ločljivostih in pri vseh treh številih ponovitev snemanja. Najprej smo posneli spekter ozadja pri posamezni ločljivosti in pri največjem številu ponovitev snemanja (to je 60), nato smo izvedli meritve pri tej isti ločljivosti in pri vseh treh številih ponovitev snemanja. To smo ponovili še za ostali dve ločljivosti. Kadar je bil spekter zelo drugačen od pričakovanega, ko je najverjetneje prišlo do napake na IR spektrometru ali slabe namestitve vzorca na kristalu ali zaradi drugih neznanih vzrokov, smo meritev ponavljali, dokler nismo dobili treh približno podobnih spektrov. To se je zgodilo redko. Želeli smo posneti vsaj 20 vzorcev vsake skupine, kar pa ni bilo mogoče zaradi premajhnega števila različnih vzorcev rukole in zaradi okvare spektrometra. Tako smo posneli 23 svežih vzorcev grinta, 17 svežih vzorcev rukole, 20 posušenih vzorcev grinta in 12 posušenih vzorcev rukole. Na koncu smo dobili 1944 spektrov ( $72 \text{ vzorcev} \times 3 \text{ ločljivosti} \times 3 \text{ števila ponovitev snemanja} \times 3 \text{ ponovitve}$ ). Merjenje enega vzorca je trajala okoli 90 minut.

Podatki so bili v formatu CSV, ki ga program Matlab ne podpira. Zato smo najprej CSV datoteke odprli v programu Microsoft Office Word 2003, kjer smo vse vejice zamenjali s pikami in datoteko shranili kot Golo besedilo. Te datoteke smo nato uvozili v program Matlab.

### 3.5.2 Prepustna IR spektroskopija

Izvedli smo meritev ozadja pri posamezni ločljivosti. Odrezali smo zgornji del lista in ga vpeli v držalo (Slika 18), ki smo ga vstavili v spektrometer. Zgornji del listne ploskve je bil obrnjen proti izvoru IR žarka. S pomočjo zrcala smo dali listek v tak položaj, da je žarek potekal skozi vrh listka, do največ okoli 1 cm proti notranjosti listne ploskve. Posneli smo meritve pri vseh treh različnih številih ponovitev snemanja, vsako meritev na drugem mestu na listu. Nato smo celoten postopek ponovili še za drugo ločljivost. Kadar je bil na spektru največji odstotek prepustnosti nižji od 5 %, smo meritev ponovili. To se je zgodilo redko. Tudi tu smo želeli posneti 20 vzorcev vsake skupine, kar pa zaradi istih vzrokov kot pri ATR IR spektroskopiji ni bilo mogoče. Posneli smo 20 svežih vzorcev grinta, 17 svežih vzorcev rukole, 21 posušenih vzorcev grinta in 17 posušenih vzorcev rukole. Na koncu smo dobili 1350 spektrov ( $75 \text{ vzorcev} \times 2 \text{ ločljivosti} \times 3 \text{ števila ponovitev snemanja} \times 3 \text{ ponovitve}$ ). Meritev enega vzorca je trajala okoli 120 minut. Podatke, ki so bili v formatu ASCII, smo uvozili v program Matlab.



**Slika 18:** Zgornji del lista smo vpeli v držalo

### 3.6 OBDELAVA SPEKTROV

Pred statistično obdelavo podatkov smo najprej obdelali spektre. Povprečenje smo izvedli tako, da smo iz treh ponovitev meritve izračunali aritmetično sredino pri vsakem valovnem številu. Čisto vse nadaljnje obdelave spektrov izhajajo iz takšnega povprečenega spektra. Prvi odvod smo izračunali po Enačbi 8. Normalizacijo SNV smo izračunali po Enačbi 5. Uporabili smo tudi sestavljeno obdelavo, pri kateri smo normaliziran spekter (Enačba 5) nato še odvajali (Enačba 8).

Na dva načina smo naredili še navidezno zmanjšanje ločljivosti. Uporabili smo podatke posnete pri ločljivosti  $1 \text{ cm}^{-1}$  in jim zmanjšali ločljivost na  $4 \text{ cm}^{-1}$ . S prvim načinom smo to naredili tako, da smo vzeli vrednost pri vsakem četrtem valovnem številu. Z drugim načinom pa tako, da smo iz spektrov vzeli vrednosti sosednjih štirih valovnih števil in jim izračunali aritmetično sredino ter se po koraku štiri pomikali po spektru. Na obeh tako

dobljenih spektrih smo nato izračunali še prvi odvod, normalizacijo in odvod normaliziranega spektra.

### 3.7 OCENJEVANJE TOČNOSTI

Točnost smo ocenili na dva načina. Z **navzkrižnim vrednotenjem z izpuščanjem enot** (*ang.* leave-one-out) uporabimo za izračun modela vse enote razen ene, nato pa uvrščamo to izpuščeno enoto v skupine z dobljeno diskriminantno funkcijo. Ta postopek ponovimo za vse enote. Enote v našem primeru predstavljajo vzorci rukole oziroma grinta.

Program je najprej naredil enosmerno ANOVO za eno opisno spremenljivko (vrsta), kar je v tem primeru kar test  $t$ , za vsako valovno število posebej, za vse vzorce rukole in grinta, razen za izpuščenega. Dobljene  $F$  vrednosti je razvrstil od največje do najmanjše. Del valovnih števil (spremenljivk) z največjimi vrednostmi  $F$  je šel v drugi del analize, to število spremenljivk smo povečevali po korakih, odvisnih od ločljivosti (Preglednica VII).

**Preglednica VII:** Največje število valovnih števil, ki vstopa v metodo glavnih komponent in korak, po katerem smo število spremenljivk povečevali

| Ločljivost [ $\text{cm}^{-1}$ ] | Največje število valovnih števil, ki vstopa v metodo glavnih komponent | Korak |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1                               | 1600                                                                   | 20    |
| 2                               | 800                                                                    | 10    |
| 4                               | 400                                                                    | 10    |

Napisali smo program, ki je za vsak korak najprej izvedel metodo glavnih komponent, nato pa z dobljenimi glavnimi komponentami še diskriminantno analizo. Diskriminantno analizo smo izvedli na največ toliko spremenljivkah, kot je bilo število vseh osebkov, minus število skupin, minus ena. Zatem je z dobljenim modelom uvrščal izpuščeni vzorec. To je ponovil tolikokrat, kolikor je bilo vseh vzorcev. Kot rezultat smo dobili število pravilno uvrščenih vzorcev pri posameznem koraku. Model, s katerimi smo dobili največ pravilno uvrščenih vzorcev, smo uporabili v neodvisnem setu. Kadar je bilo pri več korakih isto število pravilno uvrščenih vzorcev, smo vzeli tisti korak, kjer sta tudi pri sosednjih korakih bili števili pravilno uvrščenih vzorcev večji. To je namreč pomenilo, da



je v tistem območju metoda bolj robustna. Če je slednjih primerov bilo več, smo izbrali tistega, ki uporabi manj spremenljivk, ker je to računsko manj zahtevno.

V drugem delu smo z **neodvisnim setom** del enot uporabili za izračun modela, z drugim delom enot pa smo preverjali točnost uvrščanja. Za izračun modela smo vselej uporabili vse vzorce grinta, razen petih, s katerimi smo nato preverjali točnost uvrščanja. Za izračun funkcije smo uporabili tudi vse vzorce rukole razen petih, v primeru meritev posušenih vzorcev rukole, ki smo jih posneli z ATR IR spektroskopijo, pa smo uporabili vse rukole razen štirih, saj je v tej skupini bilo skupaj le 12 vzorcev rukole.

Za vsak niz podatkov je program povsem naključno razvrstil vzorce v skupino za izračun modela in v skupino za preverjanje točnosti uvrščanja. Model je naredil na podlagi rezultatov iz navzkrižnega vrednotenja z izpuščanjem enot. Kot rezultat smo dobili število pravilno uvrščenih vzorcev in za vsak posamezen vzorec iz skupine za preverjanje ali je bil pravilno uvrščen.

### 3.8 PREUČEVANJE VPLIVA SPREMENLJIVK

Rezultate, ki smo jih dobili pri obeh načinih za ocenjevanje točnosti, smo zložili v novo tabelo, kjer je vsaka vrstica predstavljala en niz meritev. Vsakemu nizu smo pripisali odstotek pravilne uvrstitve in ga opredelili z naslednjimi spremenljivkami: način ocenjevanja točnosti (navzkrižno vrednotenje z izpuščanjem enot ali neodvisni set), število ponovitev snemanja (3, 10 ali 60), ločljivost ( $1, 2$  ali  $4\text{ cm}^{-1}$ ), obdelava spektrov (povprečenje, prvi odvod, normalizacija ali sestavljena obdelava), priprava vzorca (sveži ali posušeni), IR spektroskopska tehnika snemanja (ATR ali prepustna) in uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti (da ali ne). Nato smo z dvosmerno ANOVO izračunali vrednosti  $F$  in ugotavljali, katere izmed spremenljivk oziroma njihove kombinacije vplivajo na odstotek pravilne uvrstitve. Zaradi velikega števila spremenljivk bi bilo nemogoče zgolj z enosmerno ANOVO ugotoviti, če kakšna kombinacija daje boljše rezultate, zato smo si pomagali z dvosmerno ANOVO. Ničelna domneva trdi, da vsi vzorci izhajajo iz iste populacije. Če je dobljena vrednost  $F$  presegala kritično vrednost, smo zavrnili ničelno hipotezo o enakosti in sprejeli sklep, da pri tveganju 5 % vzorci izhajajo iz različnih populacij, kar pomeni da spremenljivka ali kombinacija spremenljivk vpliva na ločitev med rukolo in grintom in s tem na odstotek pravilne uvrstitve. Za spremenljivke, pri katerih smo ugotovili vpliv na odstotek pravilne uvrstitve, smo ta vpliv nadalje preučevali. To smo naredili s primerjavo odstotka pravilne uvrstitve v vrsto pri posameznih



nastavitvah. Višji odstotek pravilne uvrstitve v vrsto je pomenil, da so te nastavitve boljše. Izračunali smo tudi standardni odklon (Enačba 7), ki je mera za razpršenost podatkov. Nižji kot je bil standardni odklon, nižja je bila razpršenost in posledično boljša je bila izbrana nastavitvev.

### **3.9 NAPAČNO PREPOZNANI VZORCI**

Na koncu smo pogledali, koliko je bilo napačnih prepoznav vzorcev. Izračunali smo, kolikokrat je bil posamezen vzorec napačno prepoznan. Preverili smo, če pri katerem vzorcu številu napačnih prepoznav izstopa in poskušali poiskati razloge za to.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 VZGOJA RASTLIN

V prvi seriji vzgoje rastlin smo preverili tudi kaljivost semen. V Preglednici VIII (na naslednji strani) je prikazana uspešnost kaljivosti semen v odstotkih po 14 dnevih. Kot je že opisano v poglavju 3.1.1, smo polovico semen dali na svetlobo, polovico pa smo za nekaj dni zaščitili pred svetlobo.

Kot lahko vidimo iz Preglednice VIII vpliv svetlobe na povprečno kaljivost pri **grintu** nima bistvenega vpliva. Pri grintih je povprečna kaljivost pri obeh pogojih malo nad 50 %. Povprečna kaljivost med samimi vzorci semen pa se zelo razlikuje in je med 0 in 93 %, standardni odklon pa je kar 33 %. Težko trdimo, da vpliva na kaljivost sama vrsta grinta, saj ta npr. pri semenih različnega izvora pri *Senecio vulgaris* znaša med 10 in 93 %. Po vsej verjetnosti pa vpliva sam izvor semena, ki je opisan v Preglednici I, kjer se zaporedne številke ujemajo z zaporednimi številkami v Preglednici VIII. To je najbolj opazno pri semenih, ki smo jih dobili iz Velike Britanije, ki so v tabeli pod številkami od 12 do 15. Vidimo, da je tam kaljivost od 86 do 93 %, kljub temu da gre za semena štirih različnih vrst. Med samim pregledom semen smo opazili, da se razlikujejo med seboj glede na to, od kje smo jih dobili. Nekatera so bila pomešana z ostalim rastlinskim drobirjem, kar je še oteževalo delo pri vzgoji rastlin (npr. semena pridobljena iz Češke, pod številkama 2 in 3). Glede na dobro kaljivost nekaterih semen, lahko sklepamo, da so bili pogoji za kaljenje ustrezni. Do slabe kaljivosti pri drugih semenih pa je najverjetneje prišlo zaradi slabega semenskega materiala. Nekatera semena so bila že nekaj let stara in ne vemo, kako so bila shranjena, preden smo jih dobili mi. Vse kaže na to, da so tista semena delno ali v celoti nekaljiva.

Pri **rukoli** je bila kaljivost semen zelo dobra. To je bilo pričakovano, saj so bila kupljena semena namenjena domači vzgoji rastlin, kjer si različni proizvajalci prizadevajo vzgojiti čim bolj kaljiva semena. Pri divji rukoli je bil odstotek kaljivosti nekoliko nižji kot pri navadni rukoli. Seme divje rukole je 10 krat lažje od semena navadne rukole in tako vsebuje tudi manj hranil. Kaljivost je v povprečju za 9 % boljša pri semenih, ki so bila nekaj časa v temi. To je predvsem zaradi divje rukole številka 22, ko je kaljivost na svetlobi kar za 55 % nižji od kaljivosti v temi.

**Preglednica VIII:** Kaljivost rukole in grinta v temi in na svetlobi

| Zaporedna številka              | Vrsta                        | Kaljivost v temi [%] | Kaljivost na svetlobi [%] | Povprečna kaljivost [%] |
|---------------------------------|------------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------|
| 1                               | <i>Senecio vulgaris</i>      | 47                   | 7                         | 27                      |
| 2                               | <i>Senecio erucifolius</i>   | 0                    | 0                         | 0                       |
| 3                               | <i>Senecio vulgaris</i>      | 13                   | 7                         | 10                      |
| 4                               | <i>Senecio jacobaea</i>      | 25                   | 27                        | 26                      |
| 5                               | <i>Senecio erucifolius</i>   | 7                    | 0                         | 4                       |
| 6                               | <i>Senecio erucifolius</i>   | 38                   | 44                        | 41                      |
| 7                               | <i>Senecio vulgaris</i>      | 53                   | 73                        | 63                      |
| 8                               | <i>Senecio vulgaris</i>      | 80                   | 75                        | 78                      |
| 9                               | <i>Senecio erucifolius</i>   | 31                   | 35                        | 33                      |
| 10                              | <i>Senecio sylvaticus</i>    | 67                   | 69                        | 68                      |
| 11                              | <i>Senecio jacobaea</i>      | 56                   | 50                        | 53                      |
| 12                              | <i>Senecio jacobaea</i>      | 86                   | 100                       | 93                      |
| 13                              | <i>Senecio sylvaticus</i>    | 86                   | 100                       | 93                      |
| 14                              | <i>Senecio erucifolius</i>   | 86                   | 86                        | 86                      |
| 15                              | <i>Senecio vulgaris</i>      | 100                  | 86                        | 93                      |
| 16                              | <i>Senecio vulgaris</i>      | 73                   | 60                        | 67                      |
| <b>Povprečje</b>                |                              | <b>53</b>            | <b>51</b>                 | <b>52</b>               |
| <b>Standardni odklon vzorca</b> |                              | <b>31</b>            | <b>35</b>                 | <b>33</b>               |
| 17                              | <i>Eruca sativa</i>          | 100                  | 100                       | 100                     |
| 18                              | <i>Eruca sativa</i>          | 100                  | 100                       | 100                     |
| 19                              | <i>Eruca sativa</i>          | 93                   | 93                        | 93                      |
| 20                              | <i>Eruca sativa</i>          | 100                  | 100                       | 100                     |
| 21                              | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> | 100                  | 88                        | 94                      |
| 22                              | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> | 93                   | 38                        | 67                      |
| 23                              | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> | 93                   | 94                        | 94                      |
| <b>Povprečje</b>                |                              | <b>97</b>            | <b>88</b>                 | <b>93</b>               |
| <b>Standardni odklon vzorca</b> |                              | <b>4</b>             | <b>22</b>                 | <b>12</b>               |

Večina rastlin, ki je vzkalila, in smo jih presadili, je odmrla. Za nadaljnje analize smo lahko uporabili le 2 primerka grinta in 4 primerke rukole (Preglednici IV in V).

Do tega je lahko prišlo zaradi prevelikega stresa ob presajanju. Sicer smo v drugi seriji zamenjali metodo, ki bi naj ta problem odpravila, a še vedno je morda bil šok na rastline prevelik. Lahko da je prišlo do neustrezne oskrbe rastlin, kljub temu da smo stanje rastlin

vsakodnevno preverjali in skrbeli, da so ustrezno zalita, da niso predolgo izpostavljena direktnemu soncu ali nočnemu mrazu. Možno je tudi, da smo uporabili neustrezno zemljo. pH zemlje v prvi in drugi seriji je bil 5,5 – 6,5. V literaturi pa smo zasledili, da rukola najbolje uspeva pri pogojih, kjer je pH zemlje 6,5 – 7,5. Priporočljiva relativna vlažnost pri gojenju v zaprtih prostorih je za rukolo od 60 – 70 %, kar pa v prostorih mikroskopirnice in v pisarnah, kjer so bila korita z rastlinami, nismo uspeli doseči. Polovica rastlin je bila zunaj, kjer se najnižja temperatura nikoli ni niti približala 5 °C, kolikor rukola najmanj potrebuje za rast. Kljub temu je večina rastlin odmrla. Na mladih rastlinicah smo opazili listne uši, kar je prav tako možen dejavnik slabega uspeha rastlin.

V prihodnje bi bilo dobro dobiti kvalitetna, nova semena grinta, ki bi imela kaljivost podobno semenom, ki so bila iz Velike Britanije. Uspešnost pri vzgoji bo verjetno boljša, če bodo rastline vzgojene brez presejevanje. Prostor naj bo rastlinjak z ustrezno visoko vlažnostjo in primerno temperaturo, ali vrt z ustrezno osvetljenostjo. Zemlja pa naj bo rahlo alkalna, kakor je navedeno v literaturi. Priporočljiva bi bila tudi termična obdelava tal ali razkuževanje tal pred setvijo.

## **4.2 REZULTATI DISKRIMINANTNE ANALIZE**

Za vsako meritev smo si zapisali odstotek pravilne uvrstitve pri neodvisnem setu, vzorce grintov in rukol, ki so bile napačno uvrščene pri neodvisnem setu, število spremenljivk, ki je vstopalo v metodo glavnih komponent pri katerih smo dobili najboljše rezultate in povprečje pravilne uvrstitve pri vrednotenju z izpuščanjem enot. V Prilogi B na koncu magistrske naloge so 4 preglednice, ki prikazujejo te podatke za vsako kombinacijo IR tehnike snemanja in priprave vzorca: Preglednica B1 prikazuje podatke za sveže liste posnete s prepustno IR tehniko, Preglednica B2 prikazuje podatke za posušene liste posnete s prepustno IR tehniko, Preglednica B3 prikazuje podatke za sveže liste posnete z ATR IR tehniko in preglednica B4 prikazuje podatke za posušene liste posnete z ATR IR tehniko.

## **4.3 PREUČEVANJE VPLIVA SPREMENLJIVK**

Kot je opisano v poglavju 3.8, smo z dvosmerno ANOVO preučevali ali posamezne spremenljivke in njihove kombinacije vplivajo na uspešnost ločevanja med rukolo in grintom. Kadar je bila izračunana vrednost  $F$  večja od kritične vrednosti  $F$ , smo z manj kot 5 % tveganjem sprejeli sklep, da ta spremenljivka ali kombinacija dveh spremenljivk vpliva na uspešnost ločevanja.

To se je zgodilo pri naslednjih posameznih spremenljivkah:

- način ocenjevanja točnosti ( $p = 0$ );
- ločljivost ( $p = 0,0001$ );
- obdelava spektrov ( $p = 0$ );
- priprava vzorcev ( $p = 0,0001$ );
- uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti ( $p = 0,000001$ ).

V oklepaju je vrednost  $p$ , ki nam pove, kolikšna je verjetnost napačne zavrnitve ničelne hipoteze.

Uspešnost ločevanja pa ni odvisna od:

- števila ponovitev snemanja ( $p = 0,0556$ );
- IR tehnike snemanja ( $p = 0,7805$ ).

Z dvosmerno ANOVO smo dobili rezultate, da je uspešnost ločevanja odvisna tudi od medsebojnega vplivanja pri naslednjih kombinacijah spremenljivk:

- obdelave spektrov in IR tehnike snemanja ( $p = 0,0094$ );
- obdelave spektrov in priprave vzorcev ( $p = 0,0017$ );
- ločljivosti in priprave vzorcev ( $p = 0,002$ );
- števila ponovitev snemanja in IR tehnike snemanja ( $p = 0,0025$ ).

Med ostalimi kombinacijami spremenljivk ni statistično značilne interakcije ( $p > 0,05$ ).

V nadaljevanju bomo za posamezne spremenljivke ali njihove kombinacije, pri katerih se je pojavila statistično značilna interakcija, pokazali, kako vplivajo na uspešnost ločevanja med rukolo in grintom.

#### 4.3.1 Način ocenjevanja točnosti

Točnost smo ocenili z navzkrižnim vrednotenjem z izpuščanjem enot (*ang.* leave-one-out) in z neodvisnim setom. Izračunali smo povprečje pravilne uvrstitve in standardni odklon vzorca (SO) pri posameznem načinu ocenjevanja točnosti (Preglednica IX).

**Preglednica IX:** Povprečna pravilna uvrstitev v odstotkih in SO pri posameznem načinu ocenjevanja točnosti

| Način ocenjevanja točnosti     | Povprečje pravilne uvrstitve [%] | Standardni odklon vzorca [%] |
|--------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Vrednotenje z izpuščanjem enot | 84                               | 10                           |
| Neodvisni set                  | 71                               | 18                           |

Boljši rezultat dobimo pri metodi vrednotenja z izpuščanjem enot. Kot so ugotovili že v predhodni raziskavi (42, 43) ta metoda ni dovolj zanesljiva, kajti dobimo lažno boljšo točnost uvrščanja kot pri uvrščanju z neodvisnim setom. Nižji SO kaže tudi na manjšo razpršenost podatkov pri vrednotenju z izpuščanjem enot. Rezultati nakazujejo na neobjektivnost te metode.

V nadaljevanju bom pri analizi drugih spremenljivk upošteval le podatke pridobljene z vrednotenjem z izpuščanjem enot, saj ta metoda uvršča vse enote in gre vselej za isto populacijo. Pri vrednotenju z neodvisnim setom pa je program vsakič povsem naključno razvrstil enote v skupino za izračun modela in v skupino za preverjanje točnosti uvrščanja, tako se tudi populacije med seboj razlikujejo.

#### 4.3.2 Ločljivost

Z ATR IR spektroskopijo smo spektre posneli pri ločljivosti 1, 2 in 4 cm<sup>-1</sup>, s prepustno IR spektroskopijo pa pri 1 in 2 cm<sup>-1</sup>. Preglednica X nam kaže povprečje pravilne uvrstitve in njen SO dobljen pri metodi z izpuščanjem enot pri prepustni IR spektroskopiji, v Preglednici XI pa pri ATR IR spektroskopiji.

**Preglednica X:** Povprečje pravilne uvrstitve v odstotkih in SO pri posamezni ločljivosti merjenja pri prepustni IR spektroskopiji

| Ločljivost         | Povprečje pravilne uvrstitve [%] | Standardni odklon vzorca [%] |
|--------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 1 cm <sup>-1</sup> | 83                               | 10                           |
| 2 cm <sup>-1</sup> | 84                               | 12                           |

**Preglednica XI:** Povprečje pravilne uvrstitve v odstotkih in SO pri posamezni ločljivosti merjenja pri ATR IR spektroskopiji

| Ločljivost         | Povprečje pravilne uvrstitve [%] | Standardni odklon vzorca [%] |
|--------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 1 cm <sup>-1</sup> | 76                               | 9                            |
| 2 cm <sup>-1</sup> | 87                               | 11                           |
| 4 cm <sup>-1</sup> | 93                               | 8                            |

Povprečje pravilne uvrstitve s padanjem ločljivosti raste. Pri prepustni IR spektroskopiji to sicer ni izrazito, saj se povprečje pravilne uvrstitve razlikuje le za 1 %. Pri ATR IR spektroskopiji je naraščanje povprečja pravilne uvrstitve s padanjem ločljivosti bolj izrazito in znaša pri najnižji uporabljeni ločljivosti 93 %. Ob tem je tudi razpršenost podatkov pri najnižji ločljivosti najmanjša.

Spektri, posneti pri višji ločljivosti, vsebujejo bolj podrobne informacije, ki pa lahko zmanjšajo pomembnost vrhov, ki se med rukolo in grintom razlikujejo in so za nas pomembni. Prav tako je pri višji ločljivosti bolj izrazit šum, ki lahko prekrije pomembne informacije. Tako pri nižji ločljivosti dobimo bolj uporabne spektre.

Prednost snemanja pri nižji ločljivosti je še večja hitrost snemanja, kar je še posebej izrazito pri prepustni IR spektroskopiji, kjer meritve v povprečju trajajo dlje kot pri ATR IR spektroskopiji.

#### 4.3.3 Obdelave spektrov

Po posnetju vzorcev smo spektre na različne načine obdelali. Statistična analiza je pokazala, da ima sama uporaba različnih tehnik obdelav spektrov pomemben vpliv na

uspešnost ločevanja. Uporabili smo 4 različne obdelave. Njihovo povprečje pravilne uvrstitve in SO je prikazana v Preglednici XII.

**Preglednica XII:** Povprečje pravilne uvrstitve v odstotkih in SO pri posameznih obdelavah spektrov: P – povprečenje; P-ODV – povprečenje in nato prvi odvod; P-SNV – povprečenje in nato normalizacija s standardnim odklonom; P-SNV-ODV – povprečenje in nato normalizacija s standardnim odklonom in nato prvi odvod

| Obdelave spektrov | Povprečje pravilne uvrstitve [%] | Standardni odklon vzorca [%] |
|-------------------|----------------------------------|------------------------------|
| P                 | 86                               | 9                            |
| P-ODV             | 80                               | 12                           |
| P-SNV             | 89                               | 9                            |
| P-SNV-ODV         | 83                               | 13                           |

Povprečenje okrepi signal, razmerje med signalom in šumom pa poveča. Prvi odvod se je predhodno izkazal za uporabno tehniko pri uvrščanju rastlinskih vzorcev v pravilno vrsto (44, 45). Mi tega nismo potrdili, saj je pravilna uvrstitev pri spektrih, ki so bili po povprečenju še odvajani, slabša od tistih, ki niso bili odvajani. Podobno je z razpršenostjo enot, ki je po odvajanju narasla. Tudi pri spektrih, na katerih smo po normalizaciji izvedli še prvi odvod, se je povprečje pravilne uvrstitve zmanjšalo, razpršenost pa povečala. Odvajanje poveča ločljivost v primerjavi z izvirnim spektrom, hkrati pa lahko poveča šum. Kljub temu da smo predhodno uporabili povprečenje, ki zmanjša šum, smo dobili slabše rezultate. To je morda povezano tudi s tem, da smo dobili boljšo pravilno uvrstitev pri spektrih, posnetih z nižjo ločljivostjo (poglavje 4.3.2.)

Normalizacija s standardnim odklonom se je pri bioloških vzorcih do sedaj izkazala za zelo uporabno. To smo mi potrdili, saj je pravilna uvrstitev pri spektrih, ki so bili po povprečenju normalizirani, boljša od tistih, ki niso bili normalizirani. Razpršenost enot je ostala ista. Kadar pride do lokalnega spreminjanja koncentracije snovi, kar je pričakovati pri listih, pride do premika bazne linije. Ta vpliv pa odstranimo, če uporabimo normalizacijo.



#### 4.3.4 Obdelave spektrov in IR tehnike snemanja

Kombinacija različne obdelave spektrov z IR tehniko snemanja statistično značilno vpliva na uspešnost ločitve. Povprečje pravilne uvrstitve in SO za različne kombinacije je prikazan v Preglednici XIII.

**Preglednica XIII:** Povprečje pravilne uvrstitve v odstotkih in SO v oklepaju pri posamezni kombinaciji obdelave in IR tehnike snemanja: P – povprečenje; P-ODV – povprečenje in nato prvi odvod; P-SNV – povprečenje in nato normalizacija s standardnim odklonom; P-SNV-ODV – povprečenje in nato normalizacija s standardnim odklonom in nato prvi odvod

| Obdelave<br>spektrov | IR tehnika snemanja |         |
|----------------------|---------------------|---------|
|                      | Prepustna           | ATR     |
| P                    | 82 (8)              | 88 (9)  |
| P-ODV                | 80 (12)             | 80 (11) |
| P-SNV                | 88 (9)              | 91 (9)  |
| P-SNV-ODV            | 84 (13)             | 83 (13) |

Kot smo ugotovili že v poglavju 4.3.3, dobimo najslabše rezultate pri odvajanih spektrih. To pri ATR IR tehniki snemanja velja za spektre, ki smo jih po povprečenju le odvajali in tudi za tiste, ki smo jih pred odvajanjem še normalizirali. Tudi pri prepustni tehniki je odvajanje poslabšalo odstotek pravilne uvrstitve. Pri spektrih, ki smo jih pred tem še normalizirali, pa smo dobili malo boljše rezultate kot pri le povprečenih spektrih. Razpršenost podatkov se je kljub temu povečala. Pri najboljših dveh obdelavah, tj. pri povprečenju in pri obdelavi z normalizacijo, dobimo boljše rezultate pri ATR IR tehniki. Odvajanje ima močnejši vpliv na poslabšanje rezultatov pri ATR IR tehniki kot pri prepustni tehniki.

ATR IR tehnika je uporabna pri bolj debelih vzorcih ali vzorcih, ki premočno absorbirajo. Prednost v našem primeru je tudi ta, da lahko izberemo lokacijo za posnetje spektra kjerkoli na listu, paziti moramo le, da se izognemo večjim žilam. Pri prepustni tehniki smo morali listek namestiti v držalo tako, da je žarek potoval skozi vrh lista, do največ okoli 1 cm proti notranjosti listne ploskve (Slika 22). V nasprotnem primeru je listek premočno absorbiral in smo kot rezultat dobili le šum. Prednost ATR IR spektroskopije je, da

snemanje praviloma poteka hitreje kot pri prepustni IR spektroskopiji. Kljub vsemu pa je pri ATR IR tehniki priporočljivo počakati 1 minuto pred merjenjem. Ob privitju vijaka ob kristal pride do poškodb celic lista, zato je treba počakati, da se vzpostavi novo ravnotežje snovi. Slabost pri ATR IR spektroskopiji je čiščenje po vsaki meritvi, ki pa traja le nekaj sekund. Prepustno tehniko pa bi bilo verjetno enostavneje vpeljati v proizvodnjo, kjer bi bilo potrebno analizirati vsak posamezen listek.

#### 4.3.5 Priprava vzorcev

Listi posamezne rastline so bili posneti sveži pri obeh IR tehnikah, del listov pa smo posušili in jih posneli posušene. V Preglednici XIV je prikaz povprečja pravilne uvrstitve in njen SO pri svežih oziroma posušenih listih.

**Preglednica XIV:** Povprečje pravilne uvrstitve v odstotkih in SO pri svežih ter posušenih listih

| Priprava vzorcev | Povprečje pravilne uvrstitve [%] | Standardni odklon vzorca [%] |
|------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Sveži listi      | 81                               | 11                           |
| Posušeni listi   | 86                               | 9                            |

Povprečje pravilne uvrstitve je boljše pri posušenih listih, kjer je tudi razpršenost podatkov manjša. To smo tudi pričakovali, saj vrhovi, ki pripadajo vodi, zakrijejo vrhove, ki so pomembni za ločitev med rukolo in grintom. Kakorkoli, tudi pri svežih listih povprečje pravilne uvrstitve ne zaostaja dosti za povprečjem pravilne uvrstitve pri posušenih listih. Slabost posušenih listov je njena dolga priprava vzorcev, saj potrebujemo za pripravo takih vzorcev vsaj 10 dni. S tem je uporaba posušenih listov manj praktična pri kontroli rukole takoj po žetvi, saj bi morali predolgo čakati pred sprostitvijo posamezne serije rukole na trg.

#### 4.3.6 Obdelave spektrov in priprava vzorcev

Obdelava spektrov in priprava vzorcev tudi skupaj vplivata na uspešnost ločevanja. Povprečje pravilne uvrstitve in SO za posamezno kombinacijo je prikazan v Preglednici XV.

**Preglednica XV:** Povprečje pravilne uvrstitve v odstotkih in SO v oklepajih pri posamezni kombinaciji obdelave in priprave vzorcev: P – povprečenje; P-ODV – povprečenje in nato prvi odvod; P-SNV – povprečenje in nato normalizacija s standardnim odklonom; P-SNV-ODV – povprečenje in nato normalizacija s standardnim odklonom in nato prvi odvod

| Obdelave<br>spektrov | Priprava vzorcev |                |
|----------------------|------------------|----------------|
|                      | Sveži listi      | Posušeni listi |
| P                    | 83 (9)           | 88 (9)         |
| P-ODV                | 77 (13)          | 83 (9)         |
| P-SNV                | 88 (10)          | 91 (8)         |
| P-SNV-ODV            | 77 (12)          | 89 (11)        |

Kakor je ugotovljeno že zgoraj, je tudi tu prvi odvod poslabšal povprečje pravilne uvrstitve, normalizacija s standardnim odklonom pa ga je povečala. Pri posušenih listih so bili rezultati na spektrih, na katerih smo po normalizaciji naredili še prvi odvod, boljši od spektrov, ki so bili le povprečeni. Očitno je pri teh spektrih bil vpliv normalizacije bolj ugoden in vpliv prvega odvajanja manj škodljiv, kar je skupno prineslo boljše rezultate od spektrov, ki so bili samo povprečeni. Kljub temu pa se je razpršenost podatkov povečala. Še vedno pa so ti rezultati slabši od tistih, kjer smo po povprečenju naredili le normalizacijo. Tega pri svežih listih ni bilo, saj je tam povprečje pravilne uvrstitve pri odvajanih spektrih enako, ne glede na to ali smo predhodno izvedli normalizacijo ali je nismo. Tudi tukaj so vsi rezultati boljši pri posušenih listih, kot pri svežih listih. Najboljše povprečje pravilne uvrstitve in hkrati najmanjšo razpršenost podatkov smo tako dobili pri posušenih listih, ki smo jih po povprečenju še normalizirali. Tudi sveži listi pri enakih pogojih ne zaostajajo dosti. To je pomembno, kadar upoštevamo prednosti in slabosti posamezne priprave vzorcev (hitrost, boljša pravilna uvrstitev).

#### 4.3.7 Ločljivosti in priprave vzorca

Kombinacija ločljivosti in priprave vzorca ima statistično značilno interakcijo. Povprečje pravilne uvrstitve in SO je za posamezno kombinacijo prikazan v Preglednici XVI.

**Preglednica XVI:** Povprečje pravilne uvrstitve v odstotkih in SO v oklepaju pri posamezni kombinaciji priprave vzorca in ločljivosti

| Priprava<br>vzorcev | Ločljivost [ $\text{cm}^{-1}$ ] |         |        |
|---------------------|---------------------------------|---------|--------|
|                     | 1                               | 2       | 4      |
| Sveži listi         | 77 (11)                         | 80 (12) | 93 (7) |
| Posušeni listi      | 82 (9)                          | 91 (7)  | 93 (9) |

Povprečje pravilne uvrstitve s padanjem ločljivosti raste, kar smo že predhodno ugotovili. Ločljivost ima pri svežih listih večji vpliv, saj tam odstotek pravilne uvrstitve z večanjem ločljivosti pada hitreje kot pri posušeni listih. V povprečju so tudi rezultati pri posušeni listih boljši, kot pri svežih. Največja razlika je pri srednji ločljivosti. Vendar je najvišji odstotek pravilne uvrstitve pri najmanjši ločljivosti pri obeh pripravah vzorcev enak. Ne le to, tudi razpršenost je pri najnižji ločljivosti pri svežih listih nižja. To pomeni, da smo dobili najboljše rezultate pri svežih listih, posnetih pri ločljivosti  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.3.8 Število ponovitev snemanja in IR tehnika snemanja

Čeprav tako število ponovitev snemanja kot tudi IR tehnika snemanja ne vplivata na ločbo med rukolo in grintom, pa na to vpliva njuna kombinacija. Povprečje pravilne uvrstitve in SO je za posamezno kombinacijo prikazan v Preglednici XVII.

**Preglednica XVII:** Povprečje pravilne uvrstitve v odstotkih in SO v oklepaju pri posamezni kombinaciji IR tehnike snemanja in števila ponovitev snemanja

| IR tehnika<br>snemanja | Število ponovitev snemanja |         |         |
|------------------------|----------------------------|---------|---------|
|                        | 3                          | 10      | 60      |
| Prepustna              | 83 (12)                    | 82 (10) | 85 (11) |
| ATR                    | 82 (13)                    | 85 (10) | 88 (11) |

Iz Preglednice XVII lahko vidimo, da pri ATR IR tehniki povprečje pravilne uvrstitve narašča s povečevanjem števila ponovitev snemanja. Podobno dobimo pri prepustni IR tehniki najboljši rezultat pri največjem številu ponovitev snemanja, čeprav je povprečje pravilne uvrstitve pri 10 ponovitvah snemanja slabše kot pri 3 ponovitvah snemanja. Torej

ima večanje število ponovitev snemanja pri ATR IR tehniki bolj izrazit pozitiven vpliv kot pri prepustni IR tehniki.

#### 4.3.9 Uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti

Spektrom, posnetim pri ločljivosti  $1\text{ cm}^{-1}$ , smo zmanjšali ločljivost na  $4\text{ cm}^{-1}$ . Zanimalo nas je, ali so rezultati, pridobljeni z navideznim zmanjšanjem ločljivosti, primerljivi s tistimi, ki so bili dejansko posneti pri tej ločljivosti. Uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti bi bila koristna, kadar bi nas zanimali rezultati tako pri višji kot pri nižji ločljivosti skupaj.

Primerjavo smo naredili pri spektrih, ki so bili posneti z ATR IR tehniko, saj pri prepustni tehniki nismo imeli posnetih spektrov pri ločljivosti  $4\text{ cm}^{-1}$ . Ločljivost smo zmanjšali na dva načina. Pri prvem načinu smo vzeli vrednosti pri vsakem četrtem valovnem številu. Pri drugem načinu pa smo vzeli vrednosti sosednjih štirih valovnih števil in jim izračunali aritmetično sredino ter se po koraku štiri pomikali po spektru. Dobljena vrednost  $F$  je bila večja od kritične, tako da smo zavrnilni ničelno hipotezo o enakosti in sprejeli alternativno, da uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti vpliva na ločbo med rukolo in grintom. Povprečje pravilne uvrstitve in SO je za posamezno vrsto navideznega zmanjšanja ločljivosti prikazan v Preglednici XVIII.

**Preglednica XVIII:** Povprečje pravilne uvrstitve v odstotkih in SO pri ATR IR tehniki

| Uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti | Povprečje pravilne uvrstitve [%] | Standardni odklon vzorca [%] |
|--------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| NE: Izmerjeni podatki                      | 93                               | 8                            |
| DA: Vsako četrto valovno število           | 78                               | 10                           |
| DA: Povprečje štirih valovnih števil       | 82                               | 9                            |

Iz Preglednice XVIII razberemo, da ne dobimo primerljivih rezultatov, kadar uporabimo navidezno zmanjšanje ločljivosti in kadar ga ne. Najboljši rezultat dobimo, kadar ne uporabimo navideznega zmanjšanja ločljivosti. Rezultat je v obeh primerih boljši za več kot 10 %. To pomeni, da uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti ni primerna za nadomestitev merjenja pri nižji ločljivosti.

Kadar spektru navidezno zmanjšamo ločljivost tako, da povprečimo štiri sosednja valovna števila, dobimo za 4 % boljši rezultat kot če navidezno zmanjšamo ločljivost tako, da

uporabimo vsako četrto valovno število. Pri oblikovanju novega spektra pri povprečju štirih valovnih števil uporabimo vse točke izvirnega spektra, saj iz njih izračunamo nove povprečne vrednosti. Pri spektru, kjer uporabimo vsako četrto valovno število, pa 75 % izvornih točk takoj izgubimo. Kljub temu je razlika premajhna, da bi lahko trdili, da je izbira povprečja štirih valovnih števil statistično boljša od zmanjšanja ločljivosti, kjer izberemo vsako četrto valovno število. Kakor pada povprečje pravilne uvrstitve, tako tudi počasi narašča razpršenost podatkov.

#### **4.3.10 Zaključek**

S preučevanjem vpliva spremenljivk smo izbrali tisto kombinacijo spremenljivk, ki najbolje ločuje med rukolo in grintom. Zbrani so v Preglednici XIX. V prvem koraku je pomembna priprava vzorca. Posušeni listi so se sicer v povprečju izkazali za nekoliko boljše, a je njihova slabost dolgotrajna priprava vzorec. Poleg tega z merjenjem pri nizki ločljivosti dobimo enako dobre rezultate s posušenimi in svežimi listi. Zaradi tega svetujemo uporabo svežih listov, ki so le malenkost slabši, so pa takoj na voljo in s tem bolj praktični. IR tehnika snemanja naj bo ATR, saj je primernejša pri debelih rastlinskih vzorcih, poleg tega je tudi hitra. Spektrometer naj bo nastavljen na 60 ponovitev snemanj in na ločljivost  $4\text{ cm}^{-1}$ . Spektri pri nižji ločljivosti vsebujejo najbolj uporabne informacije, hkrati pa se izognemo prevelikemu šumu. Čas snemanja treh ponovitev enega vzorca pri navedenih nastavitvah, skupaj s snemanjem ozadja, čakanjem 1 minuto pred snemanjem in čiščenjem, traja okoli 8 minut. Po posnetju priporočamo povprečenje spektrov, posnetih na treh različnih mestih vzorca, in nato izvedbo normalizacije s standardnim odklonom v programu Matlab. Ta kombinacija obdelave spektrov se je izkazala za daleč najboljšo pri bioloških vzorcih, kjer pričakujemo premik bazne linije. Uporabo navideznega zmanjšanja ločljivosti odsvetujemo, saj z izmerjenimi spektri dobimo boljše rezultate kot z izračunanimi spektri. Ocenjevanje točnosti naj bo z neodvisnim setom, saj je ta metoda bolj zanesljiva. Z naštetim izborom kombinacije spremenljivk dobimo pravilno uvrstitev 90 %.

**Preglednica XIX:** Izbor spremenljivk, ki dajejo najboljše rezultate

| Spremenljivka                              | Naš izbor                                                |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Priprava vzorca                            | Sveži vzorci                                             |
| IR tehnika snemanja                        | ATR                                                      |
| Število ponovitev snemanja                 | 60                                                       |
| Ločljivost [ $\text{cm}^{-1}$ ]            | 4                                                        |
| Obdelava spektrov                          | Povprečenje in nato normalizacija s standardnim odklonom |
| Način ocenjevanja točnosti                 | Neodvisni set                                            |
| Uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti | Ne                                                       |

#### 4.4 ZMANJŠANJE ŠTEVILA SPREMENLJIVK

Enosmerna ANOVA se je predhodno izkazala za uporabno pri zmanjšanju števila spremenljivk pri uvrščanju v rastlinske vrste (43, 51). Pri vsakem rezultatu smo si zapisali število spremenljivk, ki je vstopalo v metodo glavnih komponent. V Preglednici XX je prikazano povprečje uporabljenih spremenljivk, njen SO in odstotek glede na največje možno število spremenljivk (Preglednica VI) za vse izmerjene spektre. Število spremenljivk smo povečevali po koraku 10 oziroma 20, zato so vrednosti povprečja in SO zaokroženi na 10.

**Preglednica XX:** Povprečje uporabljenih spremenljivk, ki je vstopalo v metodo glavnih komponent pri posamezni tehniki in SO v oklepaju. Zraven je odstotek uporabljenih spremenljivk glede na največje možno število spremenljivk

| IR tehnika<br>snemanja | Ločljivost 1 cm <sup>-1</sup> |    | Ločljivost 2 cm <sup>-1</sup> |    | Ločljivost 4 cm <sup>-1</sup> |    |
|------------------------|-------------------------------|----|-------------------------------|----|-------------------------------|----|
|                        | Povprečje (SO)                | %  | Povprečje (SO)                | %  | Povprečje (SO)                | %  |
| Prepustna              | 640 (500)                     | 40 | 340 (270)                     | 42 | /                             | /  |
| ATR                    | 780 (580)                     | 49 | 270 (250)                     | 33 | 160 (110)                     | 39 |
| <b>Skupaj</b>          | 710 (540)                     | 44 | 300 (260)                     | 38 | 160 (400)                     | 39 |

Iz Preglednice XX lahko vidimo, da je največji odstotek povprečja uporabljenih spremenljivk pri največji ločljivosti. Pri vseh kombinacijah je bilo povprečje uporabljenih spremenljivk manjše od polovice največ možnih uporabljenih spremenljivk. Velik standardni odklon vzorca kaže na veliko razpršenost podatkov, kar pomeni, da je število uporabljenih spremenljivk zelo nihalo.

Rezultati kažejo na pomembnost uporabe ANOVE za zmanjšanje števila spremenljivk, saj s tem odstranimo spremenljivke brez informacijske vrednosti. Zaradi velike razpršenosti števila uporabljenih spremenljivk pa težko zaključimo, koliko je idealno število uporabljenih spremenljivk.

#### 4.5 NAPAČNO PREPOZNANI VZORCI

Z neodvisnim setom smo del vzorcev uporabili za izračun modela, z drugim delom enot pa smo preverjali točnost uvrščanja. Program je povsem naključno razvrstil vzorce v skupino za izračun modela in v skupino za preverjanje točnosti uvrščanja. To je naredil za vsak niz podatkov posebej. Kot rezultat smo dobili tudi število in imena vzorcev, ki so bili napačno uvrščeni. Zanimalo nas je, kakšna so odstopanja pri posameznem vzorcu glede na povprečno število napačnih prepoznav. Kot je prikazano v Preglednicah XXI in XXIII smo za vsak vzorec rukole in grinta izračunali, kolikokrat je bil posamezen vzorec napačno prepoznan na 100 meritev.



**Preglednica XXI:** Število napačnih prepoznav pri posameznem vzorcu **grinta** pri neodvisnem setu. V zadnjem stolpcu je prikazan količnik med številom napačnih prepoznav in številom vseh meritev, ki je zaradi lažje primerjave pomnožen s 100.

| <b>Vzorec</b>            | <b>Št. napačnih prepoznav</b> | <b>Št. vseh meritev</b> | <b>Odstotek napačnih prepoznav</b> |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Grint1                   | 9                             | 216                     | 4                                  |
| Grint2                   | 1                             | 60                      | 2                                  |
| Grint3                   | 9                             | 216                     | 4                                  |
| Grint4                   | 9                             | 168                     | 5                                  |
| Grint5                   | 1                             | 60                      | 2                                  |
| Grint6                   | 18                            | 216                     | 8                                  |
| Grint7                   | 20                            | 216                     | 9                                  |
| Grint8                   | 9                             | 216                     | 4                                  |
| Grint9                   | 12                            | 216                     | 6                                  |
| Grint10                  | 13                            | 216                     | 6                                  |
| Grint11                  | 16                            | 216                     | 7                                  |
| Grint12                  | 14                            | 216                     | 6                                  |
| Grint13                  | 9                             | 216                     | 4                                  |
| Grint14                  | 17                            | 216                     | 8                                  |
| Grint15                  | 13                            | 216                     | 6                                  |
| Grint16                  | 23                            | 216                     | 11                                 |
| Grint17                  | 8                             | 216                     | 4                                  |
| Grint18                  | 5                             | 216                     | 2                                  |
| Grint19                  | 9                             | 216                     | 4                                  |
| Grint20                  | 19                            | 216                     | 9                                  |
| Grint21                  | 4                             | 216                     | 2                                  |
| Grint22                  | 9                             | 216                     | 4                                  |
| Grint23                  | 4                             | 168                     | 2                                  |
| <b>Povprečje grintov</b> | <b>11</b>                     | <b>198</b>              | <b>5</b>                           |

Kot lahko vidimo iz Preglednice XXI, je v povprečju 5 napačnih prepoznav grintov na 100 meritev. Pri 10 vzorcih je število napačnih prepoznav nad povprečjem. Za vsak vzorec, ki je izstopal, smo poskušali najti razlog. Najbolj izstopa vzorec Grint16, kjer je bilo na 100 meritev kar 11 napačnih prepoznav. Ta vzorec je bil nabran v odtočnem kanalu na cestišču zelo prometne ceste (Slika 19). V kanal se je nabrala zemlja in tako so bili ustvarjeni pogoji za uspešno rast rastline. Rastlina je bila izpostavljena velikemu onesnaženju motornih vozil, ki so vozili zelo blizu rastišča. To je verjetno vplivalo na razvoj rastline, ki je razvila drugačne sekundarne presnovke oziroma so ti v drugačni koncentraciji v primerjavi z ostalimi vzorci, ki niso bili tako neposredno izpostavljeni prometu. Posledično so bili tudi IR spektri listov drugačni.



**Slika 19:** Nahajališče Grinta16

Tudi vzorca Grint6 in Grint7 sta imela nadpovprečno število napačnih prepoznav. To sta hkrati tudi edina vzorca, ki smo jih uspeli sami vzgojiti. Zaradi drugačnih razmer kot v naravi, saj rastlini nista rabili tekmovati z drugimi rastlinami, imeli sta dovolj prostora, domnevno ugodne pogoje za rast, sta tudi ta vzorca verjetno razvila drugačne sekundarne presnovke oziroma v drugačni koncentraciji v primerjavi z drugimi vzorci. Rastlini sta bili tudi manjši od vzorcev, ki so bili nabrani v naravi in zaradi tega morda ne do konca razviti. Poleg tega je vzorec Grint7 edini testirani, ki ne spada v vrsto navadni grint, temveč gre za šentjakobov grint.

Za ostale vzorce nismo našli razlogov, ki bi lahko bili vzrok nadpovprečno velikemu številu napačnih prepoznav. Pri tem še enkrat poudarimo, da je program povsem naključno vsakič izbral vzorce za skupino za preverjanje točnosti. Lahko se je zgodilo, da je kak vzorec bil nadpovprečno velikokrat izbran v to skupino, kar hkrati daje večjo možnost, da je bil napačno uvrščen.

V Preglednici XXII je prikazano za vzorce **rukole**, kolikokrat je bil posamezen vzorec napačno prepoznan na 100 meritev.

**Preglednica XXII:** Število napačnih prepoznav pri posameznem vzorcu rukole pri neodvisnem setu. V zadnjem stolpcu je prikazan količnik med številom napačnih prepoznav in številom vseh meritev, ki je zaradi lažje primerjave pomnožen s 100.

| <b>Vzorec</b>          | <b>Št. napačnih prepoznav</b> | <b>Št. vseh meritev</b> | <b>Odstotek napačnih prepoznav</b> |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Rukola1                | 7                             | 216                     | 3                                  |
| Rukola2                | 15                            | 216                     | 7                                  |
| Rukola3                | 43                            | 216                     | 20                                 |
| Rukola4                | 20                            | 216                     | 9                                  |
| Rukola5                | 30                            | 216                     | 14                                 |
| Rukola6                | 22                            | 216                     | 10                                 |
| Rukola7                | 19                            | 216                     | 9                                  |
| Rukola8                | 26                            | 216                     | 12                                 |
| Rukola9                | 27                            | 216                     | 13                                 |
| Rukola10               | 25                            | 216                     | 12                                 |
| Rukola11               | 35                            | 216                     | 16                                 |
| Rukola12               | 24                            | 216                     | 11                                 |
| Rukola13               | 13                            | 156                     | 8                                  |
| Rukola14               | 7                             | 156                     | 4                                  |
| Rukola15               | 9                             | 156                     | 6                                  |
| Rukola16               | 15                            | 156                     | 10                                 |
| Rukola17               | 7                             | 156                     | 4                                  |
| <b>Povprečje rukol</b> | <b>20</b>                     | <b>198</b>              | <b>10</b>                          |

V povprečju je bilo pri rukoli napačnih prepoznav na 100 meritev kar dvakrat toliko kot pri grintu, kar je lahko posledica tega, da je bil delež rukol manjši od deleža grintov in je bil tako algoritem bolj prilagojen pravilnemu prepoznavanju grintov. Pri 7 vzorcih rukole je bilo število napačnih prepoznav nad povprečjem rukole. To je najbolj izrazito vidno pri vzgojenih rukolah, ki so se slabše uvrščale od kupljenih (Rukola3, Rukola8, Rukola 9, Rukola10). Razlog gre iskati v istih stvareh kot pri grintu: pomanjkanje tekmovanja z

drugimi rastlinami in domnevno ugodni pogoji za rast. Rastline so bile prav tako manjše od vzorcev, ki smo jih kupili v trgovinah.

Rukola<sup>4</sup> in Rukola<sup>15</sup> sta edina vzorca, na embalaži katerih je izrecno pisalo, da je rukola oprana. Hkrati sta bili Rukola<sup>2</sup> in Rukola<sup>6</sup> edina vzorca, za katere je bilo navedeno, da prihajata iz ekološke pridelave. Kaj natančno to pomeni, pa ni bilo navedeno. Iz Preglednice XXII lahko vidimo, da število napačnih prepoznav na 100 meritev za navedene štiri vzorce ne presega povprečja. To lahko nakazuje, da pranje rukole oziroma neuporaba škropiv med proizvodnjo ugodno vpliva na razlikovanje med rukolo in grintom. IR spektri, ki jih dobimo na rukoli na katerih so sledovi škropiv, prekrivajo in skrijejo resnične IR spektre rastline. Vsekakor bi bilo potrebno to domnevo nadalje testirati na večjem vzorcu, da bi lahko to potrdili.

Za ostale vzorce nismo našli razlogov, ki bi lahko bili vzrok nadpovprečno velikemu številu napačnih prepoznav.

## 5 SKLEP

V magistrski nalogi smo razvili metodo za ločevanje listov rukole in grinta s pomočjo IR spektroskopije.

Prisotnost svetlobe na kalitev semen rukole in grinta nima vpliva. Pri grintu je bila kaljivost slaba (52 %) zaradi starih, nerodovitnih semen. Pri rukoli je bila kaljivost zelo dobra (93 %). Le 13 % vzorcev grintov in 58 % vzorcev rukol je doseglo zadostno velikost, da smo z njimi lahko opravili nadaljnje meritve. Rastline so verjetno odmrle zaradi stresa ob presajanju, premajhne vlažnosti, razvoja listnih uši in neustrezne zemlje. V nadalje priporočamo vzgojo rastlin brez presajanja, v rastlinjaku z nadzorovanimi pogoji (vlažnost, temperatura, osvetlitev), pH zemlje naj bo 7,0, zemlja pa naj bo predhodno termično obdelana ali razkužena. Zaradi neuspeha pri vzgoji smo dodatne vzorce grinta poiskali v naravnem okolju, vzorce rukole pa smo kupili v trgovinah. Vzorcev vrst divje rukole nismo dobili nikjer, zato v prihodnje priporočamo vzgojo vzorcev še te vrste, saj gre za drugi rod kot je vrsta navadna rukola.

Število spremenljivk smo zmanjšali z enosmerno ANOVO, kar se je izkazalo za zelo uporabno. Na tak način smo izbrali spremenljivke z večjo informacijsko vrednostjo za ločevanje med skupinama. Idealnega števila uporabljenih spremenljivk pa nismo mogli določiti, saj se je to število med posameznimi analizami precej razlikovalo.

Povprečje napačnih prepoznav pri grintih je bilo 5 %, pri rukoli pa 10 %. Slabši rezultati so bili pri rastlinah, ki so po našem mnenju zaradi okoljskih razmer razvila drugačne sekundarne presnovke oziroma v drugačni koncentraciji kot pa preostale rastline. Pri rukoli so se boljši rezultati pojavili pri vzorcih, ki so bili predhodno oprani oziroma niso bili podvrženi uporabi škropiv. V prihodnje odsvetujemo uporabo škropiv pri vzgoji vzorcev. Prav tako bi bilo dobro razmisliti o pranju vzorcev pred snemanjem. Svetujemo izvedbo raziskave, kjer bi se to preučilo.

S prepustno IR spektroskopijo dobimo najboljše rezultate, kadar je točka meritve pri koncu roba listne ploskve, kjer je list najtanjši. Pri ATR IR spektroskopiji izbira točke meritve na listu nima vpliva.

Z dvosmerno ANOVO smo poiskali posamezne spremenljivke in njihove kombinacije, ki vplivajo na uspešnost ločevanja med listi rukole in grinta. Primerjali smo dve metodi vrednotenja, pri čemer smo ugotovili, da metoda z izpuščanjem enot ni dovolj zanesljiva,

ker prihaja do lažno boljših rezultatov. Primernejše je vrednotenje z neodvisnim setom. IR spektre smo posneli pri različnih ločljivostih. Pri višji ločljivosti snemanja je prisoten večji šum, ki prekrije pomembne informacije v spektru. Tako smo dobili boljše rezultate pri nižji ločljivosti, ta zahteva tudi manjši čas snemanja. Spektre smo obdelali na različne načine. Najboljše rezultate dobimo pri spektrih, ki smo jih po povprečenju normalizirali s standardnim odklonom (89 %), kar odstrani premik bazne linije. Sledijo spektri, ki so bili le povprečeni (86 %), s povprečenjem povečamo razmerje med signalom in šumom. Odvajanje pa je premočno povečalo šum, zato smo dobili tu najslabše rezultate (80 % po predhodnem povprečenju ter 83 % po predhodnem povprečenju in normalizaciji s standardnim odklonom). Odvajanje je imelo močnejši vpliv na poslabšanje rezultatov pri ATR IR tehniki kot pri prepustni tehniki. V povprečju pa je ATR IR tehnika (85 %) dala boljše rezultate od prepustne IR tehnike (83 %). Hkrati pa bi bilo prepustno IR tehniko lažje vpeljati v proizvodnjo v kontrolo listov rukole nad tekočim trakom. Pri primerjavi posušenih in svežih vzorcev smo dobili primerljive rezultate. Posušeni vzorci so dali le nekoliko boljše rezultate (86 %) od svežih vzorcev (81 %). V kombinaciji priprave vzorca in obdelave spektrov pa smo dobili najboljše rezultate pri posušenih listih, pri katerih smo dobljene spektre po povprečenju še normalizirali s standardnim odklonom. Zaradi dolgotrajne priprave posušenih vzorcev pa za rutinsko analizo priporočamo uporabo svežih vzorcev. Tako samo število ponovitev snemanja kot izbira IR tehnike snemanja ne vplivata na ločbo med rukolo in grintom, ima pa vpliv njuna kombinacija. Najboljše rezultate dobimo pri ATR IR tehniki in pri 60 ponovitvah snemanja (88 %). Uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti ne da primerljive rezultate v primerjavi s spektri, ki so bili posneti pri nižji ločljivosti, zato jo odsvetujemo.

IR spektroskopija je primerna metoda za ločevanje med listi rukole in grinta. Pri tem je pomembna pravilna izbira spremenljivk in ustrezna statistična analiza podatkov. Pokazali smo, da lahko za neznani vzorec v nekaj minutah ugotovimo ali je rukola ali grint. Z našim delom smo nakazali, da bi bila mogoča vpeljava IR spektroskopije v kontrolo kakovosti pri proizvodnji rukole. S tem bi se povečala varnost uporabnikov.

## LITERATURA:

1. Hall MKD, Jobling JJ, Rogers GS: Some Perspectives on Rocket as s Vegetable Crop: A Review, Veg Crop Res Bull 2012; 76: 21-41.
2. Martinčič A, Wraber T, Jogan N, Ravnik V, Podobnik A, Turk B, Vreš B: Mala flora Slovenije, Tretja izdaja, Tehniška založba Slovenije, 1999, 392-3, 540-76.
3. Dovč M: Primerjava rasti in razvoja rukvice rodu *Eruca* in *Diplotaxis*. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2007: 5, 8-10, 11, 13-4, 36.
4. Puš T: Gojenje navadne rukvice (*Eruca sativa* Mill.) in tankolistnega dvoredca (*Diplotaxis tenuifolia* DC) v lončkih. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2007: 3, 7, 14.
5. Bradač T: Gojenje navadne rukvice (*Eruca sativa* Mill.) na plavajočem sistemu z različnimi mineralnimi substrati. Diplomsko delo. Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2009: 5, 13-5.
6. Janeš D: Glukozinolati. Predavanje pri predmetu Farmakognozija I, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana.
7. Gobec S: Vitamini. Predavanje pri predmetu Prehranska dopolnila, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana.
8. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: Referenčne vrednosti za vnos vitaminov in mineralov – tabelarična priporočila za otroke, mladostnike, odrasle in starejše. [http://www.ivz.si/prehrana?pi=5&\\_5\\_Filename=attName.png&\\_5\\_MediaId=7162&\\_5\\_AutoResize=false&pl=8-5.3](http://www.ivz.si/prehrana?pi=5&_5_Filename=attName.png&_5_MediaId=7162&_5_AutoResize=false&pl=8-5.3). Dostopano: 16. 12. 2014.
9. Kreft S: Ogljikovi hidrati. Predavanje pri predmetu Prehranska dopolnila, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana.
10. Azarenko O, Jordan MA, Wilson L: Erucin, the Major Isothiocyanate in Arugula (*Eruca sativa*), Inhibits Proliferation of MCF7 Tumor Cells by Suppressing Microtubule Dynamics. Plos One 2014; 9(6): 1-9.

11. Alqasoumi S, Al-Sohaibani M, Al-Howiriny T, Al-Yahya M, Rafatullah S: Rocket »*Eruca sativa*«: A salad herb with potential gastric anti-ulcer activity. World J Gastroenterol 2009; 15: 1958-1965.
12. Arora R, Bhushan S, Kumar R, Mannan R, Kaur P, et al.: Hepatic Dysfunction Induced by 7, 12-Dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene and Its Obviation with Erucin Using Enzymatic and Histological Changes as Indicators. Plos One 2014; 9(11): 1-12.
13. Sahar YAO, Doha AM, Thanaa EH, Reham SHE, Souria MD, Prevention of renal dysfunction by nutraceuticals prepared from oil rich plant foods. Asian Pac J Trop Biomed 2014; 4: 618-627.
14. Fratianni F, Pepe S, Cardinale F, Granese T, Cozzolino A, Coppola R, Nazzaro F: *Eruca sativa* Might Influence the Growth, Survival under Simulated Gastrointestinal Conditions and Some Biological Features of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* Strains. Int J Mol Sci 2014; 15: 17790-17805.
15. Furtado Rahde A: Senecio Vulgaris L. <http://www.inchem.org/documents/pims/plant/senecio.htm> Dostopano: 3. 1. 2015.
16. The Agriculture and Food Development Authority: Ragwort. <http://www.teagasc.ie/horticulture/advisory/vegetable/ragwort.asp> Dostopano: 3. 1. 2015.
17. Department for Environment Food and Rural Affairs: Code of Practice on How to Prevent the Spread of Ragwort. [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/69264/pb9840-cop-ragwort.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/69264/pb9840-cop-ragwort.pdf) Dostopano: 3. 1. 2015.
18. Plants For a Future: Senecio vulgaris – L. <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Senecio+vulgaris> Dostopano: 3. 1. 2015.
19. Neuman MG, Steenkamp V: Toxicity Profile of Pyrrolizidine Alkaloid-Containing Medicinal Plants. Intl J Biomed Pharma Sci 2009; 3: 104-108.
20. Kent JT: Senecio Aureus. <http://hpathy.com/e-books/lectures-on-homeopathic-materia-medica/senecio-aureus-2/> Dostopano: 27. 1. 2015.



21. Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW: Pyrrolizidine Alkaloids – Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. *Drug Metab Rev* 2004; 36: 1-55.
22. Wiedenfeld H: Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. *Food Addit Contam* 2011; 28: 282-292.
23. Kreft S: Narava nima vselej prav <http://www.kvarkadabra.net/article.php/Narava-nima-vselej-prav> Dostopano: 4. 1. 2015.
24. Stegelmeier BL: Pyrrolizidine Alkaloid-Containing Toxic Plants (*Senecio*, *Crotalaria*, *Cynoglossum*, *Amsinckia*, *Heliotropium* and *Echium* spp.). *Vet Clin N Am – Food A* 2011; 27: 419-28.
25. Brown MS, Molyneux RJ: Effects of Water and Mineral Nutrient Deficiencies on Pyrrolizidine Alkaloid Content of *Senecio vulgaris* Flowers. *J Sci Food Agric* 1996; 70: 209-11.
26. California Animal Health & Food Safety: Poisonous Plant Threats to Cattle and Horses: Tansy Ragwort, Common Groundsel and Fiddleneck. <http://www.cahfs.ucdavis.edu/local-assets/pdfs/PoisonousPlantThreatsFAQ.pdf> Dostopano: 3. 1. 2015.
27. Hartmann T, Zimmer M: Organ-specific Distribution and Accumulation of Pyrrolizidine Alkaloids during the Life History of two Annual *Senecio* Species. *J Plant Physiol* 1986; 122: 67-80.
28. Vos JH, Geerts AA, Borgers JW, Mars MH, Muskens JA, van Wuijckhuise-Sjouke LA: *Senecio jacobaea*: deceiving beauty – *Senecio jacobaea* poisoning. *Tijdschr Diergeneesk* 2002; 127: 753-6.
29. Canadian Biodiversity Information Facility: *Senecio jacobaea*. <http://www.cbif.gc.ca/eng/species-bank/canadian-poisonous-plants-information-system/all-plants-scientific-name/senecio-jacobaea/?id=1370403267004> Dostopano: 3. 1. 2015.
30. Gava A, Barros CSL: *Senecio* spp. Poisoning of Horses in Southern Brazil. *Pesq Vet Bras* 1997; 17: 36-40.

31. Dimande AFP, Botha CJ, Prozesky L, Bekker L, Rösemann GM, Labuschagne L, Retief E: The toxicity of *Senecio inaequidens* DC. Jl S Afr vet Ass 2007; 78: 121-9.
32. Jakovac Strajn B, Mohorko M, Vengušt A, Ujčič Vrhovnik I: Pirolizidinski alkaloidi. [http://www.kgzs-ms.si/users\\_slike/metkab/ZED10/ZEDP07-Jakovac-.doc](http://www.kgzs-ms.si/users_slike/metkab/ZED10/ZEDP07-Jakovac-.doc) Dostopano: 4. 1. 2015.
33. Clallam County Noxious Weed Control Program: Noxious Weeds in Clallam County - Tansy Ragwort (*Senecio jacobaea*). [http://www.clallam.net/weed/documents/tansyragwort\\_long.pdf](http://www.clallam.net/weed/documents/tansyragwort_long.pdf) Dostopano: 3. 1. 2015.
34. Aldrich Markham S: Common Groundsel *Senecio vulgaris* L. [http://www.spokanecounty.org/data/weedboard/pdf/CommonGroundsel\\_info.pdf](http://www.spokanecounty.org/data/weedboard/pdf/CommonGroundsel_info.pdf) Dostopano: 3. 1. 2015.
35. Selzer G, Parker RGF: *Senecio* poisoning Exhibiting as Chiari's Syndrome – A Report on Twelve Cases. Am J Pathol 1951; 27: 885-907.
36. Das grüne Lexikon Hortipendium: Gemeines Kreuzkraut. [http://www.hortipendium.de/Gemeines\\_Kreuzkraut#Eine\\_Giftpflanze](http://www.hortipendium.de/Gemeines_Kreuzkraut#Eine_Giftpflanze) Dostopano: 4. 1. 2015.
37. Toxicology Data Network: Pyrrolizidine. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+4300> Dostopano: 4. 1. 2015.
38. Kokalj M, Štih K, Kreft S: Herbal Tea Identification Using Mid-Infrared Spectroscopy. Planta Med, 2014; 80: 1023-8.
39. Kokalj M, Kolar J, Trafela T, Kreft S: Differences Among Epilobium and Hypericum Species Revealed by four IR Spectroscopy Modes: Transmission, KBr Tablet, Diffuse Reflectance and ATR. Phytochem Anal 2011; 22: 541-6.
40. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care: European Pharmacopoeia, 5th Edition, Council of Europe, Strasbourg, 2004: 572-3.
41. Gad HA, El-Ahmady SH, Abou-Shoer MI, Al-Azizi MA: Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review. Phytochem Anal 2013; 24: 14-6.

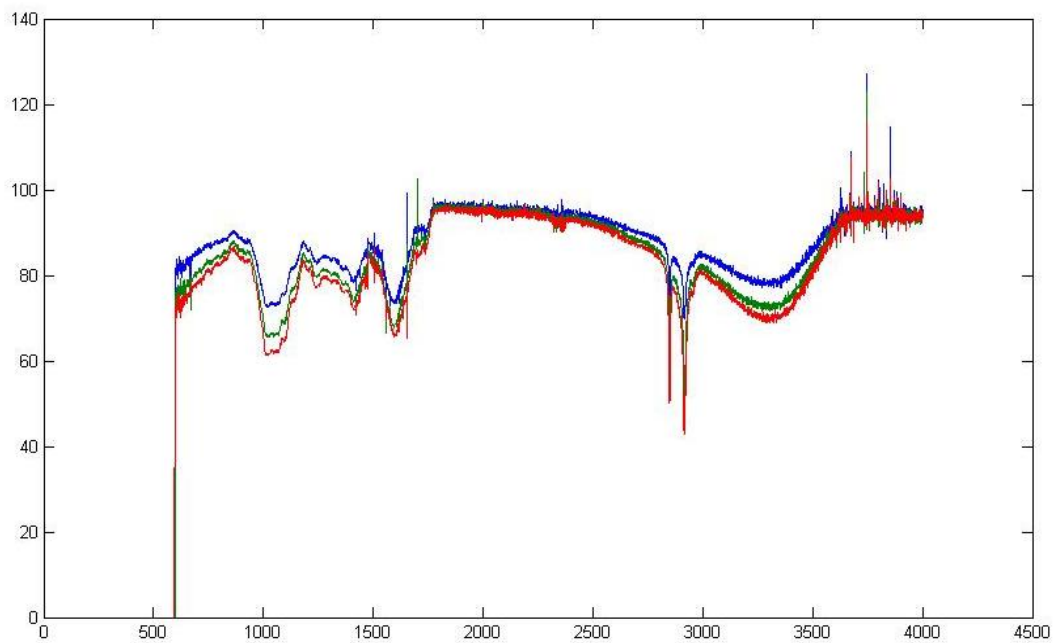
42. Omahen Bratuša J: Ugotavljanje vrstne pripadnosti vzorcev iz rodov *Hypericum* in *Epilobium* z infrardečo spektroskopijo. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009.
43. Kokalj M, Strgulc Krajšek S, Omahen Bratuša J, Kreft S: Comparison and improvement of commonly applied statistical approaches for identification of plant species from IR spectra. J Chemometrics 2010; 24: 611-6.
44. Kokalj M, Rihtarič M, Kreft S: Commonly applied smoothing of IR spectra showed unappropriate for the identification of plant leaf samples. Chemometr Intell Lab Syst 2011; 108: 154-61.
45. Rihtarič M: Ugotavljanje vrstne pripadnosti vzorcev vrbovcev in krčnic s transmisijsko infrardečo spektroskopijo. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
46. Pišek L: Uporaba infrardeče spektroskopije za ugotavljanje fitokemijskih lastnosti jelke in listov vinske trte. Diplomaska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
47. Štih K: Razvoj metode za prepoznavanje rastlinskih drog z infrardečo spektroskopijo. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2014.
48. Obreza A, Šmid - Korbar J, Humar M, et al.: Farmacevtski terminološki slovar, Založba ZRC, Ljubljana, 2013.
49. Stuart B: Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, Wiley, Chichester, 2004: 1-36, 51-5, 137-63, 168-74.
50. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS: Introduction to Spectroscopy, Third Edition, Thomson Learning, Washington, 2001: 13-24.
51. Kokalj M: Identifikacija rastlinskih vrst s pomočjo infrardeče spektroskopije. Doktorska disertacija. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 1-17.
52. Meyers RA, Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, New York, 2000: 10815-36.
53. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR: Principles of Instrumental Analysis, Sixth Edition, Thomson Higher Education, Belmont, 2007: 134-5, 157-8, 430-52.

54. Trček P, Erjavec L, Trček B, Zdovc J: Spektroskopija. [http://projekti.gimvic.org/2009/2a/spektroskopija/index\\_teorija\\_3.html](http://projekti.gimvic.org/2009/2a/spektroskopija/index_teorija_3.html) Dostopano 18. 11. 2014.
55. Thermo Nicolet: FT-IR vs. Dispersive Infrared. [http://www.thermo.com.cn/resources/200802/productpdf\\_21615.pdf](http://www.thermo.com.cn/resources/200802/productpdf_21615.pdf) Dostopano: 19. 11. 2014.
56. Omnic User's Guide, Version 7.3, Thermo Electron Corporation, Madison WI, 2006, 181.
57. Sunderam J, Kandala CV, Govindarajan KN, Subbiah J: Sensing of Moisture Content of In-Shell Peanuts by NIR Reflectance Spectroscopy. *Journal of Sensor Technology* 2012; 2: 1-7.
58. Drongelen vW: Signal Processing for Neuroscientists: An Introduction to the Analysis of Physiological Signals, First Edition, Academic Press, Amsterdam, 2008: 55.
59. Jakovac A: Napovedovanje lastnosti papirja iz spektrometričnih podatkov s strojnim učenjem. Diplomsko delo. Fakulteta za računalništvo in informatiko, Ljubljana, 2011: 20-1.
60. Adamič Š: Temelji biostatistike, 2. izdaja, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani – Inštitut za biomedicinsko informatiko, Ljubljana, 1995: 80-81, 92-93.
61. Otto M: Chemometrics, 2nd Edition, Wiley-VCG Verlag, Weinheim, 2007: 1-2.
62. Bolton S, Bon C: Pharmaceutical Statistics Practical and Clinical Applications, Fourth Edition, Marcel Dekker, New York, 2004: 215-6.
63. Termania – prosto dostopni spletni slovarski portal. <http://www.termania.net/slovarji/terminoloski-slovar-vzgoje-in-izobrazevanja/3474669/enosmerna-analiza-variance---anova?query=ANOVA> Dostopano: 1. 4. 2015
64. Anderson TW: An Introduction to Multivariate Statistical Analysis, Third Edition, John Wiley & Sons, New Jersey, 2003: 459-46.
65. Kovačič M: On-line slovarček statističnih pojmov. <http://www.ljudmila.org/matej/statistika/mva.html> Dostopano: 6. 11. 2014.

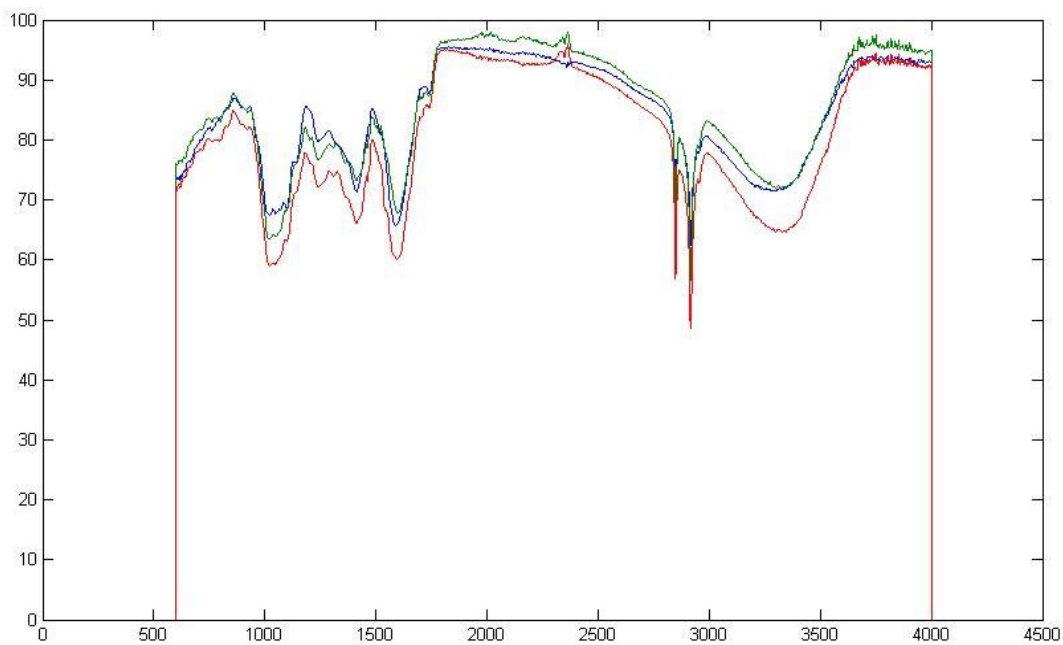
66. Batagelj V: Metoda glavnih komponent. <http://vlado.fmf.uni-lj.si/vlado/podstat/Mva/PCA.pdf> Dostopano: 6. 11. 2014.
67. Košmelj K: Metoda glavnih komponent: osnove in primer. *Acta agriculturae Slovenica*, 2007; 89: 159-60.
68. Burns RP, Burns R: *Business Research Methods and Statistics Using SPSS*, SAGE Publications Ltd, London, 2008: 589-602.
69. Batagelj V: Diskriminantna analiza. <http://vlado.fmf.uni-lj.si/vlado/podstat/Mva/DA.pdf> Dostopano: 10.11.2014.
70. Hair Jr JF, Anderson RE, Tatham RE: *Multivariate Data Analysis with Readings*, Second Edition, Indianapolis, 1987: 295-336.
71. Dietmar A, Golte-Bechtle M: Kaj neki tu cveti?, *Narava, Kranj*, 2004: 188-91.

## PRILOGE

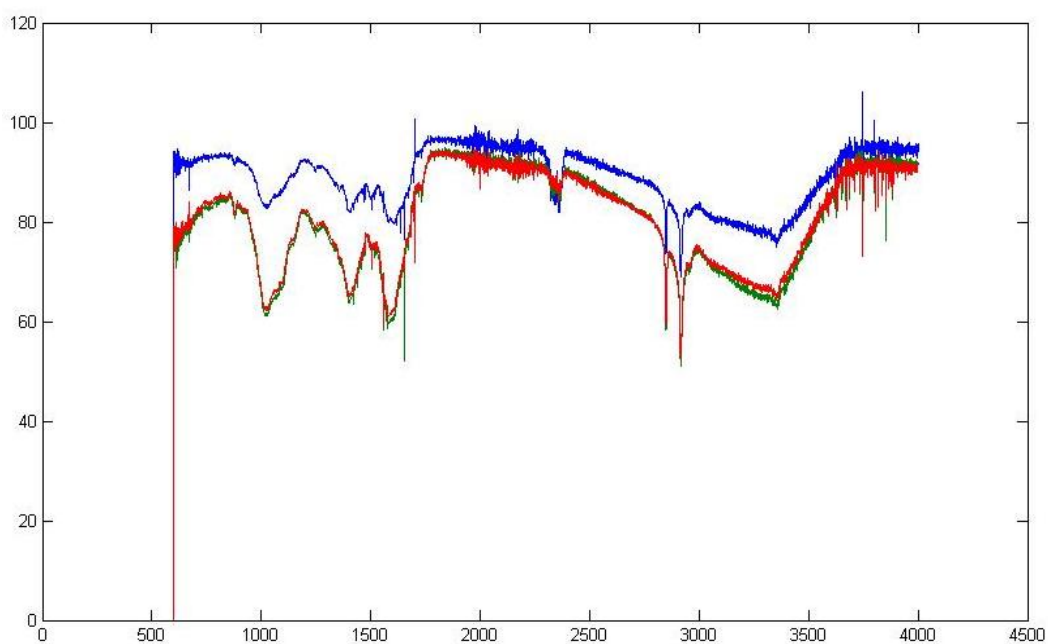
### PRILOGA A: Primeri nekaterih spektrov



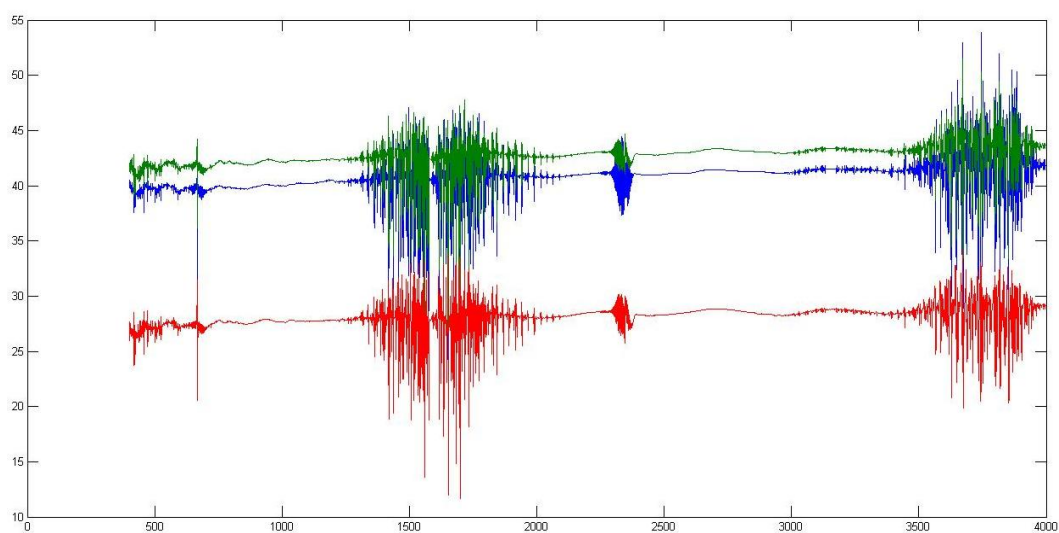
**Graf 1:** Posušen vzorec Rukole9, posnet z ATR IR spektroskopijo na treh različnih mestih pri ločljivosti  $1\text{ cm}^{-1}$  in pri 60 ponovitvah snemanja



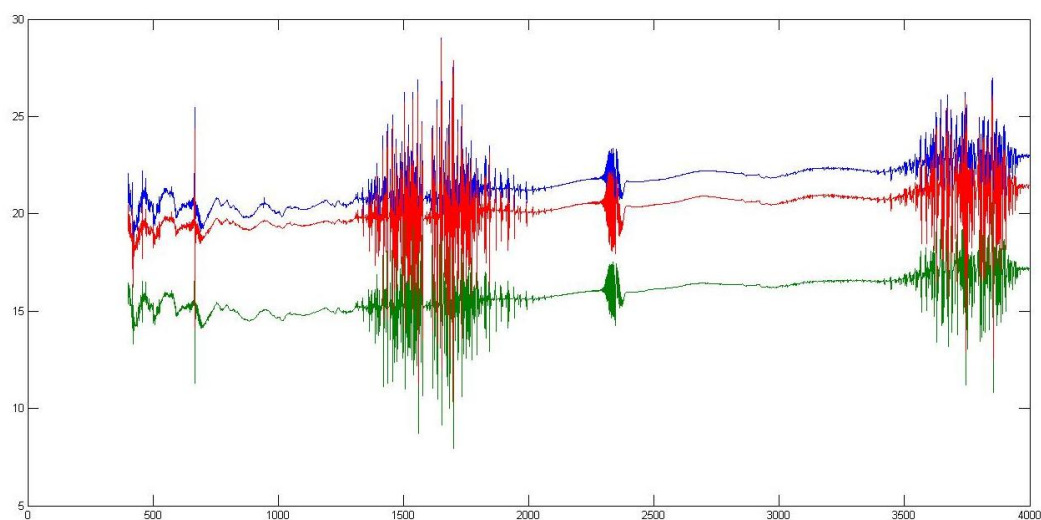
**Graf 2:** Posušen vzorec Rukole9, posnet z ATR IR spektroskopijo na treh različnih mestih pri ločljivosti  $4\text{ cm}^{-1}$  in pri 60 ponovitvah snemanja



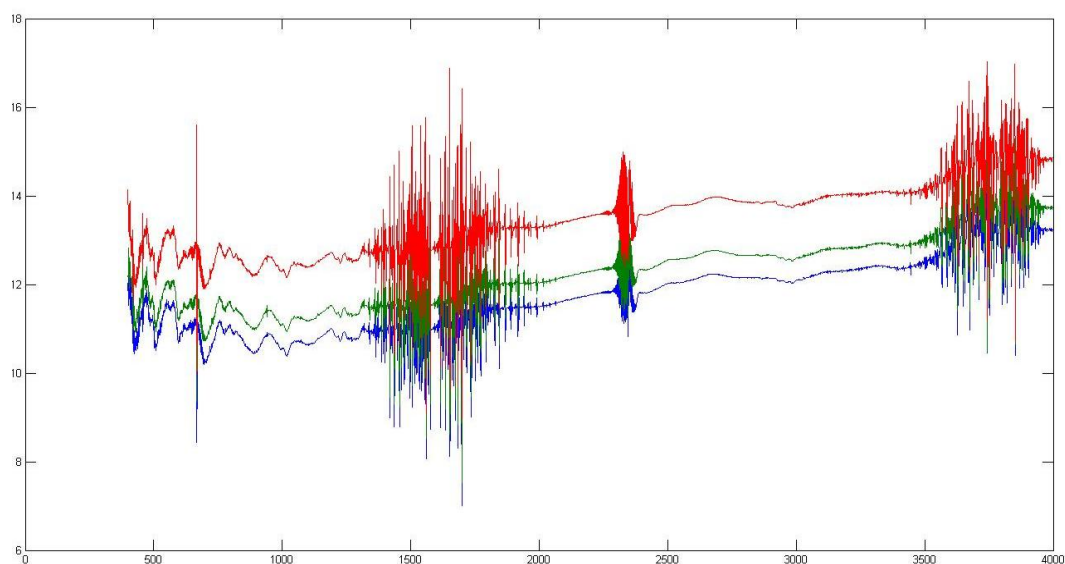
**Graf 3:** Posušen vzorec Grinta3, posnet z ATR IR spektroskopijo na treh različnih mestih pri ločljivosti 1 cm<sup>-1</sup> in pri 60 ponovitvah snemanja



**Graf 4:** Sveži vzorec Grinta3, posnet s prepustno IR spektroskopijo na treh različnih mestih pri ločljivosti 1 cm<sup>-1</sup> in pri 60 ponovitvah snemanja

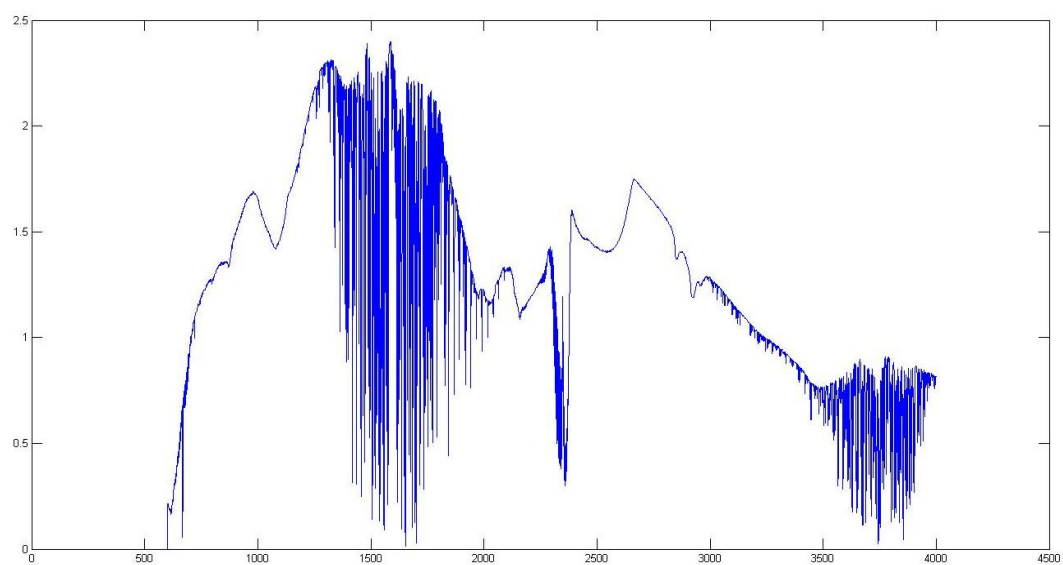


**Graf 5:** Sveži vzorec Rukole9, posnet s prepustno IR spektroskopijo na treh različnih mestih pri ločljivosti  $1\text{ cm}^{-1}$  in pri 60 ponovitvah snemanja

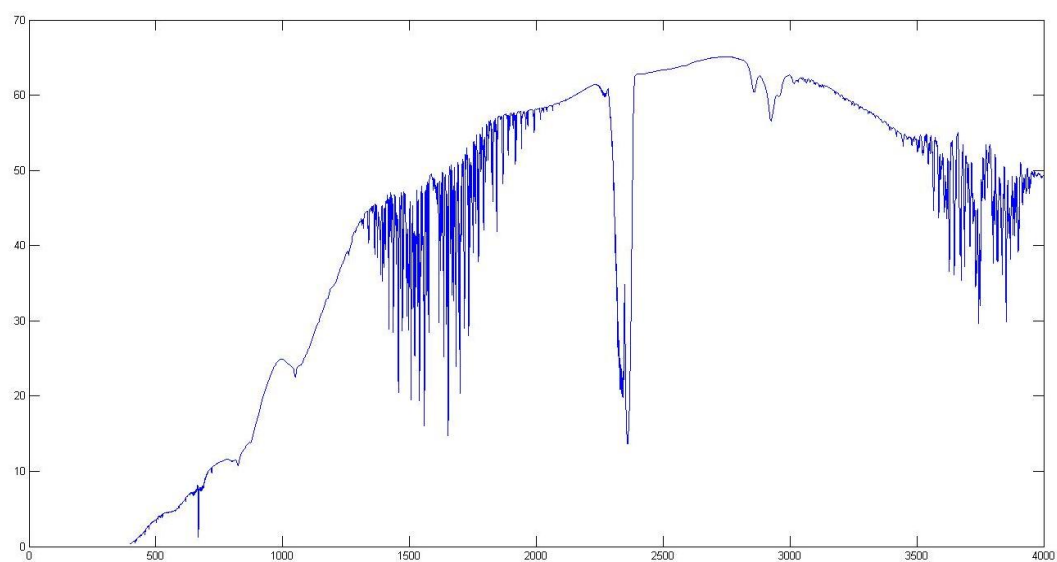


**Graf 6:** Suhi vzorec Rukole9, posnet s prepustno IR spektroskopijo na treh različnih mestih pri ločljivosti  $1\text{ cm}^{-1}$  in pri 60 ponovitvah snemanja





**Graf 7:** Ozadje posneto z ATR IR spektroskopijo pri ločljivosti 1 cm<sup>-1</sup> in pri 60 ponovitvah snemanja



**Graf 8:** Ozadje posneto s prepustno IR spektroskopijo pri ločljivosti 1 cm<sup>-1</sup> in pri 60 ponovitvah snemanja

## PRILOGA B: Rezultati diskriminantne analize

V prvem stolpcu so napisane nastavitve pri merjenju: R – ločljivost [ $\text{cm}^{-1}$ ]; S – število ponovitev snemanja. Zraven je pripisana uporabljena obdelava spektrov: P – povprečenje; P-ODV – povprečenje in nato prvi odvod; P-SNV – povprečenje in nato normalizacija s standardnim odklonom; P-SNV-ODV – povprečenje in nato normalizacija s standardnim odklonom in nato prvi odvod. Kadar smo uporabili navidezno zmanjšanje ločljivosti je to pripisano na koncu: Izr: vsak4 – nov spekter smo izračunali tako, da smo vzeli vrednosti pri vsakem četrtem valovnem številu; Izr: povp4 – nov spekter smo izračunali tako, da smo vzeli vrednosti sosednjih štirih valovnih števil in jim izračunali aritmetično sredino ter se po koraku štiri pomikali po spektru. Zaporedne številke napačnih grintov oziroma rukol pri neodvisnem setu se ujemajo z zaporedno številko iz Preglednice III in IV.

Preglednica B1: Prepustna IR tehnika na svežih listih

| Nastavitve pri merjenju, obdelava spektrov, uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti | Pravilna uvrstitev pri neodvisnem setu [%] | Zaporedna številka napačnega grinta pri neodvisnem setu | Zaporedna številka napačne rukole pri neodvisnem setu | Število spremenljivk, ki je vstopalo v metodo glavnih komponent | Povprečje pravilne uvrstitve pri vrednotenju z izpuščanjem enot [%] |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| R: 1, S: 3, P                                                                          | 50                                         | 6, 9                                                    | 3, 5, 11                                              | 1240                                                            | 93                                                                  |
| R: 1, S: 10, P                                                                         | 70                                         | 7, 10                                                   | 16                                                    | 260                                                             | 85                                                                  |
| R: 1, S: 60, P                                                                         | 80                                         | 16                                                      | 11                                                    | 120                                                             | 67                                                                  |
| R: 2, S: 3, P                                                                          | 60                                         | 17                                                      | 6, 10, 12                                             | 580                                                             | 81                                                                  |
| R: 2, S: 10, P                                                                         | 90                                         | 10                                                      |                                                       | 510                                                             | 89                                                                  |

|                                |     |             |                 |      |    |
|--------------------------------|-----|-------------|-----------------|------|----|
| R: 2, S: 60, P                 | 60  | 9, 21       | 7, 13           | 620  | 70 |
| R: 1, S: 3, P-ODV              | 50  | 15, 20, 22  | 2, 11           | 60   | 59 |
| R: 1, S: 10, P-ODV             | 60  | 11, 15, 20  | 8               | 580  | 67 |
| R: 1, S: 60, P-ODV             | 30  | 19, 20, 22  | 3, 4, 6, 11     | 500  | 81 |
| R: 2, S: 3, P-ODV              | 80  | 20          | 8               | 20   | 89 |
| R: 2, S: 10, P-ODV             | 60  | 6, 20       | 3, 12           | 40   | 63 |
| R: 2, S: 60, P-ODV             | 70  | 15          | 1, 16           | 440  | 70 |
| R: 1, S: 3, P-SNV              | 70  | 6, 7        | 4               | 1220 | 96 |
| R: 1, S: 10, P-SNV             | 80  | 3, 7        |                 | 1220 | 81 |
| R: 1, S: 60, P-SNV             | 50  | 11, 15, 16  | 2, 17           | 1520 | 93 |
| R: 2, S: 3, P-SNV              | 50  | 1, 17, 20   | 6, 11           | 50   | 67 |
| R: 2, S: 10, P-SNV             | 100 |             |                 | 680  | 89 |
| R: 2, S: 60, P-SNV             | 70  | 17          | 5, 6            | 160  | 81 |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV          | 60  | 6, 7, 9, 10 |                 | 560  | 85 |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV         | 90  |             | 17              | 1540 | 81 |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV         | 80  | 20          | 10              | 820  | 67 |
| R: 2, S: 3, P-SNV-ODV          | 60  | 21          | 14, 15, 16      | 40   | 67 |
| R: 2, S: 10, P-SNV-ODV         | 70  | 20          | 2, 3            | 560  | 63 |
| R: 2, S: 60, P-SNV-ODV         | 30  | 15, 18      | 5, 6, 8, 10, 11 | 730  | 85 |
| R: 1, S: 3, P, Izr: vsak4      | 50  | 6           | 3, 4, 5, 11     | 370  | 96 |
| R: 1, S: 10, P, Izr: vsak4     | 80  | 7, 10       |                 | 300  | 89 |
| R: 1, S: 60, P, Izr: vsak4     | 70  | 16          | 5, 11           | 370  | 81 |
| R: 1, S: 3, P-ODV, Izr: vsak4  | 50  | 6, 20       | 4, 6, 12        | 360  | 89 |
| R: 1, S: 10, P-ODV, Izr: vsak4 | 70  | 6, 15       | 8               | 270  | 78 |

|                                    |    |            |              |     |    |
|------------------------------------|----|------------|--------------|-----|----|
| R: 1, S: 60, P-ODV, Izr: vsak4     | 60 | 10, 15     | 8, 13        | 260 | 81 |
| R: 1, S: 3, P-SNV, Izr: vsak4      | 80 | 14         | 9            | 240 | 74 |
| R: 1, S: 10, P-SNV, Izr: vsak4     | 70 | 11, 15     | 3            | 160 | 93 |
| R: 1, S: 60, P-SNV, Izr: vsak4     | 80 |            | 3, 5         | 310 | 74 |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV, Izr: vsak4  | 40 | 7, 23      | 3, 4, 12, 15 | 170 | 78 |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV, Izr: vsak4 | 70 | 16         | 2, 12        | 340 | 74 |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV, Izr: vsak4 | 60 | 1, 19, 20  | 11           | 150 | 81 |
| R: 1, S: 3, P, Izr: povp4          | 60 | 11         | 6, 10, 17    | 40  | 70 |
| R: 1, S: 10, P, Izr: povp4         | 80 | 13         | 6            | 70  | 93 |
| R: 1, S: 60, P, Izr: povp4         | 70 | 6, 9       | 13           | 160 | 67 |
| R: 1, S: 3, P-ODV, Izr: povp4      | 70 | 6, 7, 10   |              | 130 | 85 |
| R: 1, S: 10, P-ODV, Izr: povp4     | 70 | 1, 14      | 5            | 320 | 74 |
| R: 1, S: 60, P-ODV, Izr: povp4     | 70 | 20         | 7, 10        | 70  | 70 |
| R: 1, S: 3, P-SNV, Izr: povp4      | 80 |            | 9, 15        | 40  | 81 |
| R: 1, S: 10, P-SNV, Izr: povp4     | 70 | 7          | 6, 10        | 300 | 81 |
| R: 1, S: 60, P-SNV, Izr: povp4     | 70 | 6          | 3, 7         | 350 | 78 |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV, Izr: povp4  | 40 | 13, 15, 22 | 5, 8, 10     | 40  | 81 |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV, Izr: povp4 | 50 | 6, 11, 23  | 5, 12        | 100 | 93 |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV, Izr: povp4 | 70 | 6, 20      | 3            | 160 | 93 |

Preglednica B2: Prepustna IR tehnika na posušenih listih

| Nastavitve pri merjenju, obdelava spektrov, uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti | Pravilna uvrstitev pri neodvisnem setu [%] | Zaporedna številka napačnega grinta pri neodvisnem setu | Zaporedna številka napačne rukole pri neodvisnem setu | Število spremenljivk, ki je vstopalo v metodo glavnih komponent | Povprečje pravilne uvrstitve pri vrednotenju z izpuščanjem enot [%] |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| R: 1, S: 3, P                                                                          | 80                                         | 16                                                      | 12                                                    | 300                                                             | 75                                                                  |
| R: 1, S: 10, P                                                                         | 40                                         | 6, 14                                                   | 8, 19, 15, 16                                         | 140                                                             | 79                                                                  |
| R: 1, S: 60, P                                                                         | 60                                         | 4, 6, 16, 19                                            |                                                       | 60                                                              | 89                                                                  |
| R: 2, S: 3, P                                                                          | 100                                        |                                                         |                                                       | 690                                                             | 89                                                                  |
| R: 2, S: 10, P                                                                         | 60                                         | 14, 15                                                  | 7, 13                                                 | 200                                                             | 86                                                                  |
| R: 2, S: 60, P                                                                         | 50                                         | 14, 15, 22                                              | 3, 6                                                  | 80                                                              | 86                                                                  |
| R: 1, S: 3, P-ODV                                                                      | 60                                         |                                                         | 3, 4, 5, 11                                           | 260                                                             | 79                                                                  |
| R: 1, S: 10, P-ODV                                                                     | 70                                         |                                                         | 4, 5, 11                                              | 920                                                             | 82                                                                  |
| R: 1, S: 60, P-ODV                                                                     | 70                                         | 20, 22                                                  | 11                                                    | 400                                                             | 93                                                                  |
| R: 2, S: 3, P-ODV                                                                      | 70                                         | 14, 15                                                  | 16                                                    | 130                                                             | 96                                                                  |
| R: 2, S: 10, P-ODV                                                                     | 90                                         | 11                                                      |                                                       | 650                                                             | 86                                                                  |
| R: 2, S: 60, P-ODV                                                                     | 60                                         | 9, 14, 15, 20                                           |                                                       | 390                                                             | 89                                                                  |
| R: 1, S: 3, P-SNV                                                                      | 70                                         | 13                                                      | 5, 7                                                  | 80                                                              | 86                                                                  |
| R: 1, S: 10, P-SNV                                                                     | 90                                         |                                                         | 16                                                    | 1180                                                            | 82                                                                  |
| R: 1, S: 60, P-SNV                                                                     | 90                                         |                                                         | 9                                                     | 1300                                                            | 93                                                                  |
| R: 2, S: 3, P-SNV                                                                      | 90                                         |                                                         | 16                                                    | 310                                                             | 96                                                                  |
| R: 2, S: 10, P-SNV                                                                     | 100                                        |                                                         |                                                       | 720                                                             | 96                                                                  |
| R: 2, S: 60, P-SNV                                                                     | 70                                         | 14, 22                                                  | 5                                                     | 200                                                             | 96                                                                  |

|                                    |     |           |               |     |     |
|------------------------------------|-----|-----------|---------------|-----|-----|
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV              | 70  | 14        | 1, 11         | 600 | 93  |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV             | 60  | 6, 8, 12  | 10            | 60  | 86  |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV             | 80  | 16        | 11            | 420 | 100 |
| R: 2, S: 3, P-SNV-ODV              | 90  |           | 16            | 140 | 82  |
| R: 2, S: 10, P-SNV-ODV             | 90  |           | 3             | 50  | 100 |
| R: 2, S: 60, P-SNV-ODV             | 100 |           |               | 40  | 100 |
| R: 1, S: 3, P, Izr: vsak4          | 90  |           | 11            | 100 | 71  |
| R: 1, S: 10, P, Izr: vsak4         | 80  |           | 11, 15        | 80  | 68  |
| R: 1, S: 60, P, Izr: vsak4         | 50  | 4         | 7, 12, 13, 15 | 130 | 93  |
| R: 1, S: 3, P-ODV, Izr: vsak4      | 100 |           |               | 250 | 86  |
| R: 1, S: 10, P-ODV, Izr: vsak4     | 60  | 11, 12    | 1, 13         | 350 | 82  |
| R: 1, S: 60, P-ODV, Izr: vsak4     | 80  | 11, 21    |               | 380 | 89  |
| R: 1, S: 3, P-SNV, Izr: vsak4      | 80  | 17        | 5             | 300 | 82  |
| R: 1, S: 10, P-SNV, Izr: vsak4     | 70  | 12, 14    | 3             | 380 | 89  |
| R: 1, S: 60, P-SNV, Izr: vsak4     | 100 |           |               | 390 | 86  |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV, Izr: vsak4  | 60  | 11        | 3, 9, 15      | 60  | 93  |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV, Izr: vsak4 | 70  | 7, 16     | 2             | 20  | 89  |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV, Izr: vsak4 | 60  | 1         | 11, 12, 16    | 90  | 100 |
| R: 1, S: 3, P, Izr: povp4          | 80  | 12, 13    |               | 20  | 93  |
| R: 1, S: 10, P, Izr: povp4         | 70  | 11        | 16, 17        | 230 | 82  |
| R: 1, S: 60, P, Izr: povp4         | 30  | 7, 13, 14 | 1, 8, 9, 11   | 280 | 89  |
| R: 1, S: 3, P-ODV, Izr: povp4      | 60  | 9         | 11, 15, 16    | 230 | 89  |
| R: 1, S: 10, P-ODV, Izr: povp4     | 80  | 12        | 11            | 280 | 82  |
| R: 1, S: 60, P-ODV, Izr: povp4     | 100 |           |               | 80  | 79  |

|                                    |     |        |   |     |    |
|------------------------------------|-----|--------|---|-----|----|
| R: 1, S: 3, P-SNV, Izr: povp4      | 90  |        | 9 | 290 | 93 |
| R: 1, S: 10, P-SNV, Izr: povp4     | 100 |        |   | 380 | 89 |
| R: 1, S: 60, P-SNV, Izr: povp4     | 80  | 14, 19 |   | 200 | 89 |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV, Izr: povp4  | 100 |        |   | 310 | 89 |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV, Izr: povp4 | 80  | 11, 12 |   | 320 | 89 |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV, Izr: povp4 | 90  | 11     |   | 120 | 96 |

Preglednica B3: ATR IR tehnika na svežih listih

| Nastavitve pri merjenju, obdelava spektrov, uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti | Pravilna uvrstitev pri neodvisnem setu [%] | Zaporedna številka napačnega grinta pri neodvisnem setu | Zaporedna številka napačne rukole pri neodvisnem setu | Število spremenljivk, ki je vstopalo v metodo glavnih komponent | Povprečje pravilne uvrstitve pri vrednotenju z izpuščanjem enot [%] |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| R: 1, S: 3, P                                                                          | 70                                         | 4                                                       | 3, 4                                                  | 1580                                                            | 77                                                                  |
| R: 1, S: 10, P                                                                         | 100                                        |                                                         |                                                       | 1220                                                            | 77                                                                  |
| R: 1, S: 60, P                                                                         | 100                                        |                                                         |                                                       | 1260                                                            | 83                                                                  |
| R: 2, S: 3, P                                                                          | 80                                         | 3                                                       | 10                                                    | 630                                                             | 80                                                                  |
| R: 2, S: 10, P                                                                         | 80                                         | 3, 16                                                   |                                                       | 700                                                             | 90                                                                  |
| R: 2, S: 60, P                                                                         | 80                                         | 7                                                       | 12                                                    | 370                                                             | 77                                                                  |
| R: 4, S: 3, P                                                                          | 90                                         |                                                         | 11                                                    | 330                                                             | 93                                                                  |
| R: 4, S: 10, P                                                                         | 90                                         |                                                         | 8                                                     | 170                                                             | 83                                                                  |
| R: 4, S: 60, P                                                                         | 90                                         | 16                                                      |                                                       | 310                                                             | 100                                                                 |
| R: 1, S: 3, P-ODV                                                                      | 70                                         |                                                         | 3, 4, 14                                              | 300                                                             | 60                                                                  |
| R: 1, S: 10, P-ODV                                                                     | 40                                         | 6, 23                                                   | 1, 2, 12, 16                                          | 120                                                             | 80                                                                  |
| R: 1, S: 60, P-ODV                                                                     | 60                                         | 8, 14                                                   | 8, 10                                                 | 60                                                              | 80                                                                  |
| R: 2, S: 3, P-ODV                                                                      | 50                                         | 20                                                      | 6, 10, 12                                             | 60                                                              | 57                                                                  |
| R: 2, S: 10, P-ODV                                                                     | 40                                         | 16, 22                                                  | 3, 5, 7, 14                                           | 60                                                              | 90                                                                  |
| R: 2, S: 60, P-ODV                                                                     | 60                                         | 14                                                      | 8, 9, 11                                              | 50                                                              | 80                                                                  |
| R: 4, S: 3, P-ODV                                                                      | 50                                         | 16, 21                                                  | 3, 9, 13                                              | 100                                                             | 87                                                                  |
| R: 4, S: 10, P-ODV                                                                     | 90                                         | 1                                                       |                                                       | 100                                                             | 90                                                                  |
| R: 4, S: 60, P-ODV                                                                     | 90                                         |                                                         | 11                                                    | 80                                                              | 100                                                                 |



|                                |     |               |                  |      |     |
|--------------------------------|-----|---------------|------------------|------|-----|
| R: 1, S: 3, P-SNV              | 100 |               |                  | 1040 | 73  |
| R: 1, S: 10, P-SNV             | 50  | 5, 10         | 5, 6, 9          | 280  | 77  |
| R: 1, S: 60, P-SNV             | 90  |               | 3                | 1460 | 87  |
| R: 2, S: 3, P-SNV              | 80  |               | 6, 11            | 650  | 97  |
| R: 2, S: 10, P-SNV             | 90  |               | 13               | 780  | 93  |
| R: 2, S: 60, P-SNV             | 100 |               |                  | 200  | 100 |
| R: 4, S: 3, P-SNV              | 100 |               |                  | 150  | 93  |
| R: 4, S: 10, P-SNV             | 90  |               | 5                | 60   | 100 |
| R: 4, S: 60, P-SNV             | 90  |               | 11               | 160  | 93  |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV          | 70  | 15            | 12, 14           | 220  | 73  |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV         | 30  | 4, 12         | 4, 8, 13, 14, 17 | 580  | 60  |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV         | 60  |               | 2, 7, 12, 13     | 1380 | 67  |
| R: 2, S: 3, P-SNV-ODV          | 60  | 9             | 5, 9, 13         | 20   | 70  |
| R: 2, S: 10, P-SNV-ODV         | 50  | 13            | 2, 4, 7, 12      | 50   | 77  |
| R: 2, S: 60, P-SNV-ODV         | 70  | 7             | 12, 16           | 20   | 90  |
| R: 4, S: 3, P-SNV-ODV          | 90  |               | 9                | 40   | 80  |
| R: 4, S: 10, P-SNV-ODV         | 80  |               | 9, 10            | 30   | 93  |
| R: 4, S: 60, P-SNV-ODV         | 90  |               | 13               | 50   | 100 |
| R: 1, S: 3, P, Izr: vsak4      | 80  | 20            | 13               | 390  | 80  |
| R: 1, S: 10, P, Izr: vsak4     | 80  | 17            | 10               | 100  | 67  |
| R: 1, S: 60, P, Izr: vsak4     | 80  | 20            | 4                | 190  | 93  |
| R: 1, S: 3, P-ODV, Izr: vsak4  | 50  | 8, 14, 15, 23 | 10               | 100  | 80  |
| R: 1, S: 10, P-ODV, Izr: vsak4 | 70  |               | 7, 8             | 60   | 47  |
| R: 1, S: 60, P-ODV, Izr: vsak4 | 70  |               | 8, 10, 11        | 180  | 73  |

|                                    |    |          |                 |     |    |
|------------------------------------|----|----------|-----------------|-----|----|
| R: 1, S: 3, P-SNV, Izr: vsak4      | 70 | 10       | 3, 16           | 100 | 80 |
| R: 1, S: 10, P-SNV, Izr: vsak4     | 70 | 7        | 5, 11           | 280 | 80 |
| R: 1, S: 60, P-SNV, Izr: vsak4     | 70 | 8        | 3, 17           | 220 | 90 |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV, Izr: vsak4  | 60 | 7, 12    | 8, 11           | 270 | 80 |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV, Izr: vsak4 | 60 | 20       | 6, 9, 14        | 50  | 90 |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV, Izr: vsak4 | 80 | 7        | 8               | 250 | 80 |
| R: 1, S: 3, P, Izr: povp4          | 70 | 12       | 3, 15           | 260 | 80 |
| R: 1, S: 10, P, Izr: povp4         | 90 | 12       |                 | 140 | 90 |
| R: 1, S: 60, P, Izr: povp4         | 90 |          | 3               | 60  | 93 |
| R: 1, S: 3, P-ODV, Izr: povp4      | 60 | 8        | 1, 4, 16        | 20  | 67 |
| R: 1, S: 10, P-ODV, Izr: povp4     | 40 | 4        | 4, 6, 7, 10, 12 | 40  | 93 |
| R: 1, S: 60, P-ODV, Izr: povp4     | 70 | 8        | 3, 12           | 180 | 80 |
| R: 1, S: 3, P-SNV, Izr: povp4      | 80 | 9        | 4               | 280 | 90 |
| R: 1, S: 10, P-SNV, Izr: povp4     | 70 | 7        | 3, 6            | 120 | 90 |
| R: 1, S: 60, P-SNV, Izr: povp4     | 50 | 4, 8, 11 | 9, 11           | 70  | 77 |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV, Izr: povp4  | 80 |          | 3, 17           | 60  | 83 |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV, Izr: povp4 | 50 | 1, 18    | 6, 10, 11       | 150 | 70 |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV, Izr: povp4 | 80 | 2        | 14              | 120 | 93 |

Preglednica B4: ATR IR tehnika na posušenih listih

| Nastavitve pri merjenju, obdelava spektrov, uporaba navideznega zmanjšanja ločljivosti | Pravilna uvrstitev pri neodvisnem setu [%] | Zaporedna številka napačnega grinta pri neodvisnem setu | Zaporedna številka napačne rukole pri neodvisnem setu | Število spremenljivk, ki je vstopalo v metodo glavnih komponent | Povprečje pravilne uvrstitve pri vrednotenju z izpuščanjem enot [%] |
|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| R: 1, S: 3, P                                                                          | 56                                         | 15, 16, 17                                              | 3                                                     | 40                                                              | 91                                                                  |
| R: 1, S: 10, P                                                                         | 78                                         | 10, 11                                                  |                                                       | 80                                                              | 78                                                                  |
| R: 1, S: 60, P                                                                         | 78                                         | 7, 19                                                   |                                                       | 1240                                                            | 74                                                                  |
| R: 2, S: 3, P                                                                          | 78                                         | 3                                                       | 9                                                     | 260                                                             | 100                                                                 |
| R: 2, S: 10, P                                                                         | 100                                        |                                                         |                                                       | 600                                                             | 96                                                                  |
| R: 2, S: 60, P                                                                         | 89                                         | 8                                                       |                                                       | 140                                                             | 100                                                                 |
| R: 4, S: 3, P                                                                          | 78                                         |                                                         | 2, 9                                                  | 40                                                              | 91                                                                  |
| R: 4, S: 10, P                                                                         | 89                                         | 10                                                      |                                                       | 120                                                             | 87                                                                  |
| R: 4, S: 60, P                                                                         | 67                                         | 13                                                      | 2, 12                                                 | 380                                                             | 100                                                                 |
| R: 1, S: 3, P-ODV                                                                      | 56                                         | 10, 12                                                  | 2, 5                                                  | 1240                                                            | 78                                                                  |
| R: 1, S: 10, P-ODV                                                                     | 67                                         |                                                         | 4, 6, 7                                               | 1200                                                            | 70                                                                  |
| R: 1, S: 60, P-ODV                                                                     | 56                                         |                                                         | 2, 5, 7, 9                                            | 260                                                             | 74                                                                  |
| R: 2, S: 3, P-ODV                                                                      | 78                                         |                                                         | 5, 9                                                  | 70                                                              | 91                                                                  |
| R: 2, S: 10, P-ODV                                                                     | 89                                         |                                                         | 9                                                     | 120                                                             | 74                                                                  |
| R: 2, S: 60, P-ODV                                                                     | 78                                         |                                                         | 3, 9                                                  | 100                                                             | 87                                                                  |
| R: 4, S: 3, P-ODV                                                                      | 67                                         | 14                                                      | 2, 7                                                  | 190                                                             | 70                                                                  |
| R: 4, S: 10, P-ODV                                                                     | 100                                        |                                                         |                                                       | 270                                                             | 87                                                                  |
| R: 4, S: 60, P-ODV                                                                     | 89                                         |                                                         | 8                                                     | 110                                                             | 91                                                                  |

|                                |     |             |            |      |     |
|--------------------------------|-----|-------------|------------|------|-----|
| R: 1, S: 3, P-SNV              | 67  | 4           | 8, 12      | 1560 | 70  |
| R: 1, S: 10, P-SNV             | 56  | 9, 10, 16   | 9          | 1480 | 83  |
| R: 1, S: 60, P-SNV             | 67  | 3           | 3, 10      | 1100 | 91  |
| R: 2, S: 3, P-SNV              | 78  | 13          | 3          | 140  | 91  |
| R: 2, S: 10, P-SNV             | 78  | 20, 22      |            | 640  | 91  |
| R: 2, S: 60, P-SNV             | 100 |             |            | 350  | 100 |
| R: 4, S: 3, P-SNV              | 67  |             | 3, 9, 10   | 240  | 96  |
| R: 4, S: 10, P-SNV             | 89  |             | 10         | 380  | 100 |
| R: 4, S: 60, P-SNV             | 89  | 16          |            | 190  | 96  |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV          | 44  | 1, 18       | 5, 6, 8    | 60   | 65  |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV         | 33  | 3, 6        | 3, 4, 5, 7 | 720  | 87  |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV         | 56  | 9, 11       | 5, 9       | 160  | 74  |
| R: 2, S: 3, P-SNV-ODV          | 56  | 3, 12       | 3, 10      | 100  | 96  |
| R: 2, S: 10, P-SNV-ODV         | 78  |             | 3, 8       | 190  | 78  |
| R: 2, S: 60, P-SNV-ODV         | 100 |             |            | 100  | 83  |
| R: 4, S: 3, P-SNV-ODV          | 89  |             | 3          | 60   | 100 |
| R: 4, S: 10, P-SNV-ODV         | 89  |             | 8          | 100  | 100 |
| R: 4, S: 60, P-SNV-ODV         | 100 |             |            | 70   | 96  |
| R: 1, S: 3, P, Izr: vsak4      | 22  | 1, 4, 7, 19 | 4, 5, 6    | 40   | 65  |
| R: 1, S: 10, P, Izr: vsak4     | 44  | 9, 10, 19   | 9, 10      | 340  | 70  |
| R: 1, S: 60, P, Izr: vsak4     | 89  |             | 3          | 310  | 87  |
| R: 1, S: 3, P-ODV, Izr: vsak4  | 56  | 4, 16, 19   | 8          | 230  | 74  |
| R: 1, S: 10, P-ODV, Izr: vsak4 | 67  |             | 6, 9, 11   | 250  | 65  |
| R: 1, S: 60, P-ODV, Izr: vsak4 | 67  | 12          | 3, 12      | 20   | 83  |

|                                    |     |            |             |     |    |
|------------------------------------|-----|------------|-------------|-----|----|
| R: 1, S: 3, P-SNV, Izr: vsak4      | 56  | 16, 19     | 1, 3        | 130 | 87 |
| R: 1, S: 10, P-SNV, Izr: vsak4     | 44  | 3, 11      | 5, 6, 12    | 60  | 87 |
| R: 1, S: 60, P-SNV, Izr: vsak4     | 89  |            | 3           | 350 | 87 |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV, Izr: vsak4  | 44  | 6          | 3, 7, 8, 11 | 70  | 74 |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV, Izr: vsak4 | 78  |            | 11, 12      | 220 | 83 |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV, Izr: vsak4 | 56  | 1, 18      | 8, 11       | 100 | 78 |
| R: 1, S: 3, P, Izr: povp4          | 44  | 13, 15, 17 | 7           | 30  | 74 |
| R: 1, S: 10, P, Izr: povp4         | 78  | 16, 18     |             | 20  | 70 |
| R: 1, S: 60, P, Izr: povp4         | 89  |            | 10          | 170 | 83 |
| R: 1, S: 3, P-ODV, Izr: povp4      | 44  | 8          | 4, 5, 8, 11 | 250 | 78 |
| R: 1, S: 10, P-ODV, Izr: povp4     | 67  |            | 2, 5, 9     | 200 | 87 |
| R: 1, S: 60, P-ODV, Izr: povp4     | 56  |            | 2, 5, 8, 10 | 210 | 83 |
| R: 1, S: 3, P-SNV, Izr: povp4      | 56  | 7, 9       | 4, 10       | 40  | 78 |
| R: 1, S: 10, P-SNV, Izr: povp4     | 89  | 7          |             | 280 | 91 |
| R: 1, S: 60, P-SNV, Izr: povp4     | 100 |            |             | 290 | 91 |
| R: 1, S: 3, P-SNV-ODV, Izr: povp4  | 56  | 12, 14, 22 | 7           | 60  | 65 |
| R: 1, S: 10, P-SNV-ODV, Izr: povp4 | 56  | 3, 16      | 3, 7        | 150 | 83 |
| R: 1, S: 60, P-SNV-ODV, Izr: povp4 | 67  | 17         | 3, 12       | 120 | 87 |