

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA KOPAČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA KOPAČ

**RAZVOJ METODE ZA VREDNOTENJE RASTLINSKIH OLJ Z
INFRARDEČO SPEKTROSKOPIJO**

**THE DEVELOPMENT OF A METHOD FOR EVALUATION OF
VEGETABLE OILS USING INFRARED SPECTROSCOPY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Mete Kokalj, mag. farm.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Nini Kočever Glavač, mag. farm., in somentorici asist. dr. Meti Kokalj, mag. farm., za njuno izjemno vodenje in usmerjanje pri nastajanju magistrskega dela, ter za njuno dosegljivost, potrpežljivost in hitro odzivnost.

Izr. prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm., in asist. dr. Zoranu Lavriču, mag. farm., se zahvaljujem za pregled magistrskega dela.

Miha hvala, ker vedno verjameš vame in ker s tabo lahko delim vse dragocene trenutke.

Zahvaljujem se tudi vsem, ki so mi tekom študija stali ob strani in me spodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Nine Kočever Glavač, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Mete Kokalj, mag. farm.

Nataša Kopač

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Zoran Lavrič, mag. farm.

Ljubljana, 2016

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	III
KAZALO GRAFOV	IV
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
KLJUČNE BESEDE	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 Rastlinska olja.....	1
1.1.1 Vsebnost rastlinskih olj	1
1.1.2 Vpliv rastlinskih olj na zdravje.....	2
1.2 Maščobne kisline	2
1.2.1 Struktura maščobnih kislin	3
1.2.2 Trigliceridi	4
1.2.3 Vpliv maščobnih kislin na zdravje	4
1.2.4 Fizikalno-kemijske lastnosti maščobnih kislin in uporaba v farmaciji	5
1.3 Farmakopejska števila.....	6
1.3.1 Kislinsko število	6
1.3.2 Saponifikacijsko število ali število miljenja.....	7
1.3.3 Estrsko število	7
1.3.4 Hidroksilno število	8
1.3.5 Jodno število	8
1.3.6 Peroksidno število	8
1.3.7 Neumiljive snovi	9
1.4 Infrardeča spektroskopija.....	10
1.5 Obdelava podatkov	11
1.5.1 Obdelava infrardečih spektrov.....	11
1.5.2 Generiranje napovednih modelov.....	13
1.5.3 Vrednotenje napovednih modelov	14
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17

3.1	Vzorci rastlinskih olj.....	17
3.2	Reagenti	18
3.3	Izmerjene vrednosti vsebnosti maščobnih kislin in farmakopejskih števil.....	18
3.4	Infrardeča spektroskopija.....	18
3.4.1	Snemanje spektrov s tehniko oslabiljenega popolnega odboja (ATR) infrardeče spektroskopije.....	20
3.4.2	Snemanje spektrov s transmissijsko tehniko infrardeče spektroskopije	22
3.4.3	Zajeti spektri za nadaljnjo obdelavo	28
3.5	Obdelava spektrov	28
3.6	Generiranje napovednih modelov	30
3.6.1	Vrednotenje napovednih modelov	31
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
4.1	Vrednotenje napovednih modelov	32
4.1.1	Maščobne kisline	33
4.1.2	Maščobne kisline, ki so bile v oljih redko prisotne	40
4.1.3	Farmakopejska števila	44
4.2	Vrednotenje parametrov napovedne metode	52
4.2.1	Tehnika infrardeče spektroskopije.....	52
4.2.2	Ločljivost.....	53
4.2.3	Obdelava spektra	54
4.2.4	Število v modelu uporabljenih valovnih števil.....	54
5	SKLEP.....	55
6	LITERATURA	57
7	PRILOGE	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba FTIR spektrometra, prirejeno po (78).....	19
Slika 2: FTIR spektrometer Nicolet Nexus z ATR nastavkom (levo) in ATR nastavek (desno)	20
Slika 3: Tehnika oslabljenega popolnega odboja, prirejeno po (81).....	21
Slika 4: FTIR spektrometer Nicolet Nexus za transmisijsko tehniko	23
Slika 5: Nastavek z vpenjačem za NaCl ploščico za transmisijsko tehniko IR spektroskopije (levo) in vpenjač z NaCl ploščico (desno).....	23
Slika 6: Pripravljene vzorci rastlinskih olj razredčeni z diklorometanom	27

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Lastnosti nekaterih MK v rastlinskih oljih (2, 18)	4
Preglednica II: Vzorci rastlinskih olj.....	17
Preglednica III: Nastavitve pri merjenju ozadja in vzorcev rastlinskih olj z ATR IR spektroskopijo.....	22
Preglednica IV: Nastavitve pri merjenju ozadja in vzorcev rastlinskih olj s transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	27
Preglednica V: Uporabljene funkcije za obdelavo spektrov	29
Preglednica VI: Količina posamezne MK v % v vzorcih rastlinskih olj, ugotovljena s pomočjo GC-MS (76, 77).....	61
Preglednica VII: Farmakopejska števila v vzorcih rastlinskih olj, izmerjena po farmakopejskih predpisih	62
Preglednica VIII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu palmitinske kisline	64
Preglednica IX: Funkcionalne skupine v napovednem modelu linolne kisline.....	64
Preglednica X: Funkcionalne skupine v napovednem modelu α -linolenske kisline	65
Preglednica XI: Funkcionalne skupine v napovednem modelu oleinske kisline	65
Preglednica XII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu elaidinske kisline	66
Preglednica XIII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu stearinske kisline.....	67
Preglednica XIV: Funkcionalne skupine v napovednem modelu γ -linolenske kisline	68
Preglednica XV: Funkcionalne skupine v napovednem modelu vakcenske kisline	68
Preglednica XVI: Funkcionalne skupine v napovednem modelu gondojske kisline	69
Preglednica XVII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu kislinskega števila.....	69

Preglednica XVIII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu saponifikacijskega števila	69
Preglednica XIX: Funkcionalne skupine v napovednem modelu estrskega števila	70
Preglednica XX: Funkcionalne skupine v napovednem modelu hidroksilnega števila.....	70
Preglednica XXI: Funkcionalne skupine v napovednem modelu jodnega števila	70
Preglednica XXII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu peroksidnega števila	71
Preglednica XXIII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu neumiljivih snovi.....	71

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje palmitinske kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	34
Graf 2: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje linolne kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	35
Graf 3: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje α -linolenske kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	36
Graf 4: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje oleinske kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	37
Graf 5: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje elaidinske kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	38
Graf 6: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje stearinske kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	40
Graf 7: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje γ - linolenske kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	41
Graf 8: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje vakcenske kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	42
Graf 9: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje gondojske kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	43
Graf 10: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje kislinskega števila z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	45
Graf 11: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje saponifikacijskega števila z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije	46

Graf 12: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje estrskega števila z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	47
Graf 13: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje hidroksilnega števila z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	48
Graf 14: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje jodnega števila z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	49
Graf 15: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje peroksidnega števila z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	50
Graf 16: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje neumiljivih snovi z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije.....	51
Graf 17: Prikaz uporabnih klasifikacij napovednega modela glede na tehniko IR spektroskopije.....	53
Graf 18: Prikaz uporabnih klasifikacij napovednega modela glede na ločljivost	53
Graf 19: Prikaz uporabnih klasifikacij napovednega modela glede na obdelavo vhodnega spektra.....	54
Graf 20: Prikaz uporabnih klasifikacij napovednega modela glede na število v modelu uporabljenih valovnih števil	54

POVZETEK

Infrardeča spektroskopija je pomembna analizna metoda za identifikacijo spojin in nadzor kakovosti rastlinskega materiala v farmacevtski, kozmetični in prehranski industriji. Namen našega dela je bil razviti metodo za vrednotenje rastlinskih olj, s pomočjo refleksijske (ATR) in transmisijske tehnike infrardeče spektroskopije. Želeli smo dokazati primernost te metode za vrednotenje rastlinskih olj in s tem za nadzor njihove kakovosti ter da je infrardeča spektroskopija primerna alternativna metoda drugim dolgotrajnejšim postopkom za vrednotenje rastlinskih olj.

V 37 vzorcih rastlinskih olj smo ugotavljali vsebnost maščobnih kislin (palmitinska, linolna, α -linolenska, oleinska, elaidinska, stearinska, γ -linolenska, vakcenska in gondojska kislina) in vrednosti farmakopejskih števil (kislinsko, saponifikacijsko, estrsko, hidroksilno, jodno ter peroksidno število in neumiljive snovi). Za vzorce olj smo imeli na voljo vrednosti teh spremenljivk, ki so jih pridobili v predhodnih raziskavah s pomočjo farmakopejskih metod. Pri razvoju metode infrardeče spektroskopije smo se posvetili proučevanju vpliva različnih parametrov na uspešnost napovedovanja spremenljivk. Proučevali smo vpliv tehnike (ATR in transmisijska) infrardeče spektroskopije, ločljivosti (2, 4, 8 cm^{-1}), obdelave spektrov (prvi odvod, drugi odvod, SNV ter prvi in drugi odvod te funkcije ter normalizacija in prvi in drugi odvod te funkcije) ter števila uporabljenih koeficientov napovednega modela (10, 20 ali 40). Za vse kombinacije naštetih parametrov smo izvajali učno metodo, ki je iz zajetih spektrov skušala napovedati vrednosti spremenljivk. Dobljene napovedne modele smo klasificirali v odličen, zelo dober, dober in približen napovedni model ter napovedni model, ki ni dober.

Pri 9 od 16 proučevanih spremenljivk smo dobili zelo dober ali dober napovedni model. Zelo dober napovedni model smo dobili pri α -linolenski kislini, dober pa pri palmitinski, linolni in stearinski kislini ter pri kislinskem, saponifikacijskem, jodnem, hidroksilnem in peroksidnem številu. Ugotovili smo, da sta v splošnem za določanje maščobnih kislin in farmakopejskih števil v rastlinskih oljih z infrardečo spektroskopijo primerni obe tehniki, tehnika ATR pa izkazuje nekaj prednosti pred transmisijsko. Najbolj primerno je snemanje spektrov pri ločljivosti 8 cm^{-1} , z desetimi v modelu uporabljenimi valovnimi števili. Za obdelavo spektra so najbolj primerne kombinacije s prvim odvodom. Iz teh rezultatov sklepamo, da je infrardeča spektroskopija v kombinaciji z uporabljenimi statističnimi in matematičnimi metodami obetavna za vrednotenje rastlinskih olj.

ABSTRACT

Infrared spectroscopy is an important analytical method for compound identification and quality control of plant material in pharmaceutical, cosmetic and food industry. The purpose of our work was to develop a method for evaluation of vegetable oils using reflection (ATR) and transmission techniques of infrared spectroscopy. We wanted to show that the infrared spectroscopy represents a suitable alternative method to other time-consuming procedures for vegetable oils evaluation.

37 samples of vegetable oils were used to determine the content of fatty acids (palmitic acid, linoleic acid, α -linolenic acid, oleic acid, elaidic acid, stearic acid, γ -linolenic acid, vaccenic acid and gondoic acid) and the pharmacopoeial chemical values (acid, saponification, ester, hydroxyl, iodine and peroxide value and unsaponifiable matter). The values of these variables for the oil samples were obtained in the previous experimental work by pharmacopoeial methods. During the development of the infrared spectroscopy method we studied the impact of various parameters on the performance of variable value prediction. We studied the impact of technique (ATR and transmission) of infrared spectroscopy, the resolution (2, 4, 8 cm^{-1}), the processing of the spectra (first derivative, second derivative, SNV and the first and second derivative of this function, normalization and the first and second derivative this function), and the number of used coefficients of the prediction model (10, 20 or 40). Prediction models were validated using an independent set of samples. Each of the obtained prediction models was classified as excellent, very good, good, and the approximate prediction model, and a predictive model which is not good.

We obtained very good or good prediction model for 9 out of 16 studied variables. Very good predictive model was obtained for α -linolenic acid. Good prediction model was obtained for the palmitic, linoleic and stearic acid, and for the acid, saponification, iodine, hydroxyl and peroxide value. We found that both techniques are similarly suitable for the determination of the studied variables, however, ATR technique has several advantages. The best recording resolution proved to be 8 cm^{-1} and for the prediction model size, 10 coefficients yielded best results. In terms of the processing of the spectrum, first derivative function was found to be the most useful. From these results, we can conclude that the infrared spectroscopy in combination with chemometrics is promising for the evaluation of vegetable oils.

KLJUČNE BESEDE

Rastlinska olja, maščobne kisline, farmakopejska števila, infrardeča spektroskopija, regresija delnih najmanjših kvadratov (PLS).

Vegetable oils, fatty acids, pharmacopoeial chemical values, infrared spectroscopy, partial least squares (PLS).

SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Razlaga okrajšave
ALK	α -Linolenska kislina
ATR	Oslabljen popolni odboj (ang. attenuated total reflectance)
Brez	Povprečje 3 spektrov – osnovni spekter
CSV	Oblika, pri kateri so vrednosti ločene z vejico (ang. comma separated values)
CV	Koeficient variacije korena srednje kvadratne napake (ang. coefficient of variation of RMSD)
EK	Elaidinska kislina
FTIR	Spektrometer s Fourierjevo transformacijo
GC	Plinska kromatografija
GC-MS	Plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo
GK	Gondojska kislina
GLK	γ - Linolenska kislina
HDL	Lipoproteini velike gostote (ang. high density lipoproteins)
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
I _A	Kislinsko število
I _E	Estrsko število
I _I	Jodno število
I _{OH}	Hidroksilno število
I _P	Peroksidno število
IR	Infrardeča/infrardeči/infrardeče/infrardečega
I _S	Saponifikacijsko število ali število miljenja

LDL	Lipoproteini majhne gostote (ang. low density lipoproteins)
LK	Linolna kislina
MK	Maščobna kislina
ENMK	Enkrat nenasičena maščobna kislina
Nor	Normalizacija
NorOdv1	Prvi odvod normalizacije
NorOdv2	Drugi odvod normalizacije
NRMSE/NRMSD	Normaliziran koren srednje kvadratne napake (ang. normalized root mean squared error/deviation)
N _s	Neumiljive snovi
Odv1	Prvi odvod
Odv2	Drugi odvod
OK	Oleinska kislina
PK	Palmitinska kislina
PLS	Regresija delnih najmanjših kvadratov (ang. partial least squares)
VNMK	Večkrat nenasičena maščobna kislina
Povprečje_U	Povprečje vzorcev učnega seta
Povprečje_V	Povprečje vzorcev validacijskega seta
R ²	Determinacijski koeficient ali vrednost R-kvadrat (ang. coefficient of determination)
RMSE/RMSD	Koren srednje kvadratne napake (ang. root mean squared error/deviation)
SK	Stearinska kislina
SNV	Normalizacija s standardnim odklonom (ang. standard normal variate)
SNVOdv1	Prvi odvod normalizacije s standardnim odklonom
SNVOdv2	Drugi odvod normalizacije s standardnim odklonom
VK	Vakcenska kislina

1 UVOD

Rastlinska olja so zaradi svojih koristnih in raznolikih učinkov v prehranski industriji, farmaciji, kozmetiki in medicini vse bolj zaželeno in uporabljana (1, 2). Identifikacija rastlinskih olj je v kontroli kakovosti izrednega pomena za zagotavljanje njihove učinkovitosti in varnosti (3). Za vrednotenje rastlinskih olj uporabljamo številne analizne metode, kot so infrardeča (IR) spektroskopija, plinska kromatografija (GC), plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) in titracije. IR spektroskopijo v farmacevtski analitiki uporabljamo za ugotavljanje identifikacije vhodnih materialov, ki po ustrezni oceni vstopajo v proizvodni proces. Kot analizna metoda ima bistvene prednosti pred ostalimi metodami. Omogoča hiter odgovor in zato lažji nadzor ter obvladovanje procesa. Poleg tega omogoča merjenje vzorca brez predhodne obdelave, zato je enostavna, hitra, cenovno ugodna ter okolju prijazna, saj ne zahteva uporabe organskih topil (3–6).

1.1 Rastlinska olja

Rastlinska olja pridobivamo s stiskanjem in/ali ekstrakcijo s topili iz semen, plodov rastlin ali njihovih delov in jih nato lahko rafiniramo in hidrogeniramo. V kozmetiki, medicini in farmaciji uporabljamo tako deviška kot hidrogenirana in rafinirana olja. Deviško olje pridobivamo z mehanskimi postopki (s hladnim stiskanjem ali centrifugiranjem) iz vhodnih snovi določene kakovosti (7). S temi postopki v olju ohranimo največ komponent, ki so pomembne za vonj, okus in antioksidativne lastnosti. Taka olja zelo cenimo zlasti v prehrani in kozmetiki, so pa hitreje pokvarljiva oziroma oksidativno in temperaturno manj obstojna (2). Obstojnost olj povečamo s postopki hidrogeniranja in rafiniranja. Pri hidrogeniranju stabilnost olja povečamo z nasičenjem vezi v estrih nenasičenih maščobnih kislin. Poteka pri visokih temperaturah, kjer se na dvojne ogljikove vezi s pomočjo katalizatorja veže vodik. Pri rafiniranju pa želimo olje, ki je sestavljeno le iz trigliceridov, vse ostale sestavine pa odstranimo s pomočjo različnih tehnoloških postopkov (2, 7, 8).

1.1.1 Vsebnost rastlinskih olj

Rastlinska olja so sestavljena iz umiljivega in neumiljivega dela (9). Največji delež (navadno 98,5–99,5 %) predstavlja umiljivi del, ki je sestavljen pretežno iz triacilglicerolov ali trigliceridov, ki so estri glicerola in treh nasičenih ali nenasičenih maščobnih kislin. Ostale snovi umiljivega dela so proste maščobne kisline, monoacilgliceroli in diacilgliceroli, fosfolipidi, voski in sterolni estri. Preostanek rastlinskih olj (0,5–1,5 %) predstavlja

neumiljivi del. Vanj sodijo alifatski in aromatski ogljikovodiki, maščobni alkoholi, prosti steroli, fenolne spojine, vitamini (tokoferol, tokotrienol), pigmenti (karotenoidi, klorofili) in proteini (10). Trigliceridi so nosilci fizikalno-kemijskih lastnosti in učinkov rastlinskih olj, k njihovemu delovanju pa bistveno prispevajo tudi fosfolipidi in snovi neumiljivega dela (11).

1.1.2 Vpliv rastlinskih olj na zdravje

Rastlinska olja so zaradi ugodnih fizioloških, funkcionalnih in tehnoloških lastnosti pogoste sestavine kozmetike (11). Vgrajujemo jih v številne kozmetične izdelke, poleg tega pa so primerna tudi za samostojno uporabo. Imajo emolientne lastnosti, zmanjšajo transepidermalno izgubo vlage in posredno izboljšajo vlažnost kože. V splošnem imajo sestavine rastlinskih olj tudi antioksidativne, protimikrobne, protivnetne, protitumorne, regenerativne in fotoprotektivne lastnosti (11, 12).

Rastlinska olja so tudi pomemben del zdrave prehrane. Med neumiljivimi snovmi imajo koristne učinke na zdravje zlasti steroli, tako imenovani fitosteroli, in tokoferoli. Steroli znižujejo raven serumskega holesterola in posledično zmanjšujejo tveganje za razvoj kardiovaskularnih bolezni. Poleg tega imajo protivnetne, protibakterijske in antioksidativne lastnosti, ki vplivajo na manjšo pojavnost rakavih bolezni. Tokoferoli imajo antioksidativne lastnosti, saj delujejo kot lovilci radikalov in preprečujejo lipidno peroksidacijo v bioloških membranah. Na ta način organizem varujejo pred oksidativnimi poškodbami in igrajo pomembno vlogo pri preprečevanju kardiovaskularnih, nevroloških in rakavih bolezni (13).

1.2 Maščobne kisline

Maščobne kisline (MK), ki so v organizmu shranjene v obliki trigliceridov, imajo pomembno vlogo pri metabolizmu za transport in shranjevanje energije. Pomembne so kot gradniki celičnih membran ter za toplotno izolacijo in mehansko zaščito organizma. Delujejo kot regulatorji genov in prekursorji eikozanoidov (prostaglandini, tromboksani, levkotrieni), ki izvirajo iz arahidonske kisline in izzovejo številne biološke učinke pri fizioloških in patoloških stanjih organizma. Eikozanoidi uravnavajo strjevanje krvi in krvni tlak, temperaturo in ciklus budnosti, vplivajo na reproduktivne funkcije ter ob poškodbah in boleznih povzročajo vnetje, povišano temperaturo in bolečino (14, 15).

Proste MK in njihove soli delujejo kot detergenti in mila, zaradi svojih amfifilnih lastnosti lahko tvorijo micelle (14).

1.2.1 Struktura maščobnih kislin

MK so biološke molekule s karboksilno skupino (-COOH), ki je vezana na nerazvejeno alifatsko verigo. Zaradi teh strukturnih značilnosti imajo MK dvojno naravo, karboksilni konec je polaren in odvisno od medija v ionski obliki, medtem ko ima ogljikovodikova veriga nepolarne lastnosti. Večina v naravi najdenih MK vsebuje med 12 in 24 ogljikovih atomov, najpogostejše so tiste s 16 in 18 ogljikovimi atomi. V ogljikovodikovi verigi, ki je večinoma nerazvejena, so ogljikovi atomi povezani z enojnimi vezmi (nasičene MK) ali z eno ali več dvojnimi vezmi (nenasičene MK). Dvojne vezi so v naravnih MK skoraj vedno v *cis* konfiguraciji. *Cis* MK imajo v primerjavi s *trans* in nasičenimi MK nižjo termodinamsko stabilnost in nižjo temperaturo tališča (14, 15). Primeri nekaterih nasičenih in nenasičenih MK, ki se nahajajo v rastlinskih oljih, so prikazani v preglednici I. Glavni predstavnici nasičenih MK, ki se nahajata v rastlinskih oljih, sta palmitinska in stearinska kislina, ki ju organizem sam sintetizira v zadostni količini, zato ni potrebe, da jih dodatno pridobivamo s hrano. Ostale MK, prikazane v preglednici I, pa so nenasičene MK (15).

MK z eno dvojno vezjo so enkrat nenasičene ali mononenasičene MK (ENMK). Dvojna vez je običajno med ogljikoma 9 in 10 (gledano z metilnega konca) in je odgovorna za manjšo stabilnost in večjo možnost oksidacije v primerjavi z nasičenimi MK. ENMK, ki jo najpogosteje najdemo v rastlinskih oljih, je oleinska kislina, ki je ω -9 MK (14–16).

MK z dvema ali več dvojnimi vezmi imenujemo večkrat nenasičene ali polinenasičene MK (VNMK) (14–16). VNMK, kjer je prva dvojna vez locirana med 3. in 4. ogljikovim atomom, gledano z metilnega konca, se imenujejo ω -3 MK (14). VNMK, kjer je prva dvojna vez locirana med 6. in 7. ogljikovim atomom, gledano z metilnega konca, imenujemo ω -6 MK. VNMK imajo nizko temperaturo tališča in so bolj podvržene oksidativnemu kvarjenju in avtooksidaciji (oksidaciji s kisikom iz zraka) (16). Med VNMK prištevamo linolno in α -linolensko kislino, ki sta esencialni, torej ju telo ne more samo sintetizirati in sta zato nujno potrebni v človeški prehrani za normalno rast in razvoj. Iz esencialnih MK se v organizmu preko arahidonske kisline sintetizirajo eikozanoidi in so izhodne molekule za sintezo endogenih kanabinoidov. V telo jih vnašamo z rastlinskimi olji, žitaricami, oreščki in ribami (14, 15, 17).

Preglednica I: Lastnosti nekaterih MK v rastlinskih oljih (2, 18)

Maščobna kislina	Kratika	Molekulska formula	Strukturna formula	Ne/nasičena MK
Palmitinska kislina	PK	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$		Nasičena MK
Linolna kislina	LK	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$		VNMK (ω-6)
α-Linolenska kislina	ALK	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$		VNMK (ω-3)
Oleinska kislina	OK	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$		ENMK
Elaidinska kislina	EK	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$		ENMK
Stearinska kislina	SK	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$		Nasičena MK
γ-Linolenska kislina	GLK	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$		VNMK (ω-6)
Vakcenska kislina	VK	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$		ENMK
Gondojska kislina	GK	$\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2$		ENMK

1.2.2 Trigliceridi

Večina v naravi prisotnih MK je v obliki trigliceridov. Osnovna molekula trigliceridov je glicerol, ki vsebuje tri hidroksilne skupine, kamor se MK vežejo z estrsko vezjo. Ker se polarni deli MK zaestrijo, so trigliceridi nepolarne, hidrofobne molekule. Trigliceridi, ki vsebujejo pretežno nasičene MK, so pri sobni temperaturi trdni, to so trigliceridi iz živalskih tkiv in rastlinskih masel. Olja vsebujejo pretežno nenasičene MK in so navadno tekoče zmesi trigliceridov iz rastlinskih tkiv (15).

1.2.3 Vpliv maščobnih kislin na zdravje

Tveganje za razvoj kardiovaskularnih bolezni je manjše ob majhni koncentraciji LDL in veliki koncentraciji HDL holesterola. Nasičene MK povečajo koncentracijo LDL holesterola, medtem ko ga nenasičene MK zmanjšajo, in sicer VNMK bolj kot pa ENMK (19).

Glavni vir nasičenih MK so živalske maščobe ter nekatera rastlinska masla in olja (palmovo in kokosovo olje, kakavovo maslo). Ta so v prehrani v večjih količinah večinoma nezaželena, razen takrat, kadar jih uporabljamo za toplotno obdelavo hrane pri visokih temperaturah, saj so nasičene MK v primerjavi z nenasičenimi temperaturno bolj obstojne. Rastlinske maščobe praviloma vsebujejo več nenasičenih MK kot živalske in zmanjšujejo

koncentracijo celotnega plazemskega in LDL holesterola in s tem tveganje za aterosklerozo, kardiovaskularne in rakave bolezni (15, 19, 20). Tveganje za nastanek omenjenih bolezni tako dosežemo z zmanjšanim vnosom nasičenih MK in jih nadomestimo z vnosom ENMK ali VNMK, ki zvišajo HDL in znižajo celokupni ter LDL holesterol (19).

ENMK (oleinska, elaidinska, vakcenska in gondojska kislina) so prisotne zlasti v rastlinskih oljih. Med VNMK pa sodijo ω -3 (eikozapentaenojska in dokozaheksaenojska kislina, α -linolenska kislina) in ω -6 MK (linolna, γ -linolenska in arahidonska kislina). V prehrani so še posebej zaželene ω -3 MK, katerih bogati viri so ribe in ribje olje, pa tudi nekatera rastlinska olja, na primer laneno olje. ω -3 MK znižujejo tveganje za razvoj kardiovaskularnih bolezni z zmanjšanjem plazemske koncentracije trigliceridov, krvnega tlaka in srčne frekvence ter zmanjšanim sproščanjem vnetnih dejavnikov. Glavni vir ω -6 MK pa so rastlinska olja ter mleko in mlečni izdelki, ki so v sodobni prehrani še posebej pogosti. V organizmu tako vnesemo bistveno več ω -6 MK kot ω -3 MK, zato je njuno razmerje porušeno v korist ω -6 MK. ω -3 in ω -6 MK so prekurzorji eikozanoidov, ki imajo pomembno vlogo pri regulaciji vnetja. Metaboliti ω -3 MK vnetje zmanjšajo, medtem ko ga metaboliti ω -6 MK pospešujejo, zato so njihove prevelike količine lahko vzrok vnetnim boleznim (14, 17, 19).

Še bolj kot nasičene MK pa so zdravju škodljive nenasičene *trans* MK. Nastanejo z delnim hidrogeniranjem rastlinskih olj, kjer se *cis* konfiguracija dvojnih vezi v ENMK ali VNMK, pretvori v *trans* konfiguracijo. Zvišujejo tveganje za pojav kardiovaskularnih bolezni, saj zvišujejo LDL in znižujejo HDL holesterol, ter povečajo produkcijo vnetnih dejavnikov (19).

1.2.4 Fizikalno-kemijske lastnosti maščobnih kislin in uporaba v farmaciji

MK so dobro topne v organskih topilih, njihova topnost v vodi pa pada z dolžino verige. Kljub temu, da so MK z daljšimi verigami netopne v vodi, so bolj topne v razredčenih vodnih raztopinah NaOH in KOH. Pri slednji reakciji nastanejo Na⁺ in K⁺ soli MK, ki jih imenujemo mila, ta se topijo v vodi, vendar pri tem ne nastanejo prave raztopine. Molekule z dvojnimi značajem, torej z nepolarnimi in polarnimi lastnostmi, so amfifilne. V vodi se te molekule združujejo v agregate, imenovane miceli. Micelne raztopine uporabljamo kot mila, ki v vodi dispergirajo lipide (15). MK zaradi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti pogosto uporabljamo kot pomožne snovi v farmacevtskih in kozmetičnih pripravkih (14).

Uporabljamo jih predvsem za proizvodnjo emulzij, mil, ter kot vehikle z zdravilnimi učinkovinami (15).

1.3 Farmakopejska števila

Evropska farmakopeja vsebuje zahteve za kontrolo kakovosti in identifikacijo rastlinskih olj, ki jih uporabljamo v farmacevtskih izdelkih. Predpisuje določanje farmakopejskih števil s titracijskimi metodami. Farmakopejska števila, ki so kislinsko, saponifikacijsko, estrsko, hidroksilno, jodno in peroksidno število, ter neumiljive snovi, določajo kakovost in stabilnost olj in so pomembne karakteristike rastlinskih olj. Vsa farmakopejska števila navajamo brez enote, razen neumiljive snovi v m/m % (5, 21–23).

Titracijske metode, ki jih uporabljamo pri določanju farmakopejskih števil, večinoma vključujejo uporabo toksičnih, kancerogenih in okolju neprijaznih topil, ki so nevarna in težko odstranljiva. Titracijske metode so zanesljive in ponovljive le, če jih izvedemo pod standardiziranimi pogoji. Poleg tega so dolgotrajne, kompleksne, zahtevajo uporabo večjih količin vzorcev in reagentov, zato so cenovno dražje (5, 21–23).

1.3.1 Kislinsko število

Kislinsko število (I_A) je merilo za količino prostih karboksilnih skupin. Definirano je kot število, ki izraža maso KOH v miligramih, potrebno za nevtralizacijo prostih MK v 1 gramu vzorca (23, 24). Kislinsko število izračunamo z enačbo 1 (23).

$$I_A = \frac{5,610 n}{m}$$

Enačba 1

m - masa preiskovanega lipida v gramih

n - volumen titranta 0,1 M KOH v mililitrih

Kislinsko število pove količino prostih MK v lipidih (oljih), ki nastanejo s hidrolizo trigliceridov med proizvodnjo in shranjevanjem olj. Proste MK nastanejo tudi pri sekundarni oksidaciji nenasičenih aldehydov ali drugih oksidativnih produktov, ki nastanejo s cepitvijo lipidnih peroksidov (22).

Sveže ali pred kratkim ekstrahirano olje vsebuje zelo malo ali nič prostih MK. Prisotnost prostih MK v oljih ali voskih je predvsem posledica hidrolize estrov, ki je lahko posledica delovanja bakterij ali katalitične razgradnje zaradi svetlobe in segrevanja (25). Že v semenih in med skladiščenjem rastlinskega materiala delujejo encimi lipaze, ki so odgovorni za hidrolizo trigliceridov do prostih MK in glicerola. Do hidrolize prihaja tudi s staranjem olja.

Količina nastalih prostih MK torej opredeljuje kakovost rastlinskega olja (26). Večje kot je kislinsko število, slabša je kakovost olja. Proste MK so tudi bolj dovzetne za avtooksidacijo, pri čemer nastanejo lipidni peroksidi – olje postane žarko. Z naraščanjem žarkosti olja naraščata tudi njegov neprijetni vonj in kisli okus (25, 27, 28).

1.3.2 Saponifikacijsko število ali število miljenja

Saponifikacijsko število (I_S) izračunamo z enačbo 2 in je definirano kot število, ki izraža maso KOH v miligramih, potrebno za nevtralizacijo prostih kislin in hidrolizo estrov v 1 gramu vzorca (23, 24). Določitev saponifikacijskega števila temelji na povratni titraciji. Z etanolno raztopino KOH hidroliziramo estrske vezi in nastanejo kalijeve soli MK. Pri povratni titraciji izvedemo slepi poskus, s katerim določimo, koliko KOH imamo na voljo za reakcijo z vzorcem in poskus, s katerim določimo preostanek KOH, ki z vzorcem ni reagiral. Reagent, s katerim analiziramo KOH, je standardna raztopina HCl (23).

$$I_S = 28,05 \frac{(n_2 - n_1)}{m} \quad \text{Enačba 2}$$

m - masa preiskovanega lipida

n_1 - volumen 0,5 M klorovodikove kisline (HCl) v ml

n_2 - volumen 0,5 M HCl v ml pri slepem poskusu

Saponifikacija je razpad estrskih vezi pri hidrolizi trigliceridov, pri čemer nastanejo soli MK (mila) in glicerol (15). Saponifikacijsko število je pomemben parameter za pripravo in izdelavo mil. Je merilo molekulske mase trigliceridov oziroma dolžine maščobnokislinskih verig. Trigliceridi z velikim saponifikacijskim številom dajejo boljšo kakovost mil kot tisti z majhnim saponifikacijskim številom. Dolga veriga MK ima majhno saponifikacijsko število, ker imajo relativno manjše število funkcionalnih karboksilnih skupin na enoto mase triglicerida v primerjavi s kratko verigo MK (5, 22, 27).

1.3.3 Estrsko število

Estrsko število (I_E) je merilo za količino MK v vzorcu, ki so vezane v estrsko vez. Definirano je kot razlika med saponifikacijskim številom (I_S) in kislinskim številom (I_A). Izraža količino KOH v miligramih, potrebno pri hidrolizi estrov v 1 gramu vzorca (23, 24). Estrsko število izračunamo z enačbo 3 (23).

$$I_E = I_S - I_A \quad \text{Enačba 3}$$

1.3.4 Hidroksilno število

Hidroksilno število (I_{OH}) je merilo za količino hidroksilnih skupin v vzorcu. Definirano je kot število, ki izraža maso KOH, potrebno za nevtralizacijo očetne kisline, nastale pri acetiliranju hidroksilnih skupin z acetanhidridom v 1 gramu vzorca (23, 24). Hidroksilno število izračunamo z enačbo 4 (23).

Hidroksilno število podaja prisotnost hidroksilnih skupin v trigliceridih in njihovo čistost. Hidroksilno število je obratno sorazmerno molekulski masi, torej zelo majhno hidroksilno število kaže, da vzorec vsebuje primesi alkoholov ali parafinov z veliko molekulsko maso (25).

$$I_{OH} = \left(28,05 \frac{n_2 - n_1}{m}\right) + I_A \quad \text{Enačba 4}$$

m - masa preiskovanega lipida v gramih

I_A - kislinsko število

n_1 - volumen 0,5 M KOH v mililitrih (ml)

n_2 - volumen 0,5 M KOH v ml, porabljen pri slepem poskusu

1.3.5 Jodno število

Jodno število (I_I) je merilo za količino nenasičenih MK v vzorcu. Definirano je kot število, ki izraža maso joda, ki se v predpisanih pogojih veže na nenasičene vezi med ogljikovimi atomi v 100 g vzorca (23, 24). Jodno število izračunamo z enačbo 5 (23).

$$I_I = 1,269 \frac{n_2 - n_1}{m} \quad \text{Enačba 5}$$

m - masa preiskovanega lipida v gramih

n_1 - volumen 0,1 M natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) v ml

n_2 - volumen 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ v ml pri slepem poskusu

Jodno število je pokazatelj stopnje nenasičenosti olj, saj več kot ima MK dvojnih vezi, bolj je nenasičena in večje je jodno število. Olja z večjim jodnim številom so bolj reaktivna in nagnjena k oksidaciji ter manj stabilna. Nasičena olja joda ne vežejo, zato je njihovo jodno število nič (5, 21, 26, 29).

1.3.6 Peroksidno število

Peroksidno število (I_P) je merilo za stopnjo avtooksidacije, ki pomeni količino nastalega peroksida v predpisanih pogojih. Definirano je kot število, ki izraža miliekvivalente kisika na 1000 g vzorca (23, 24). Peroksidno število izračunamo z enačbo 6 (23).

Določanje peroksidnega števila je eden najpomembnejših postopkov za kontrolo kakovosti in varnosti rastlinskih olj, saj je pokazatelj njihovega kvarjenja, toksičnosti in poslabšanja okusa. Z njim določamo produkte primarne oksidacije rastlinskih olj (perokside), ki so nestabilni in hitro razpadejo na sekundarne produkte oksidacije (aldehide, ketone). Oksidativni procesi, kjer pride do tvorbe lipidnih peroksidov, se pojavljajo med predelavo in shranjevanjem rastlinskih olj preko avto- in fotooksidacije (30–32). Vrednost peroksidnega števila narašča s časom shranjevanja rastlinskega olja in njegovo izpostavljenostjo zraku ter temperaturi. Čim večja je vrednost peroksidnega števila, manjša je oksidativna stabilnost olja in slabša je njegova kakovost (5, 30, 31, 33, 34).

$$I_p = 10 \frac{n_1 - n_2}{m}$$

Enačba 6

m - masa preiskovanega lipida v gramih

n_1 - volumen 0,01 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ v ml

n_2 - volumen 0,01 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ v ml pri slepem poskusu

1.3.7 Neumiljive snovi

Neumiljive snovi (N_s) predstavljajo vse produkte, ki po saponifikaciji maščob s KOH, ekstrakciji z organskimi topili in odstranitvi umiljivih snovi niso hlapne pri temperaturi 100–105 °C (23, 35). Neumiljive snovi izračunamo z enačbo 7, kjer rezultat podamo v m/m % (23).

$$N_s = \frac{100a}{m}$$

Enačba 7

m - masa preiskovanega lipida

a - ostanek po sušenju do konstantne mase

Količinska in kakovostna sestava neumiljivih snovi je odvisna od rastlinske vrste, klimatskih pogojev, postopkov pridobivanja in razmer skladiščenja rastlinskega olja (36). Neumiljive snovi v veliki meri vplivajo na organoleptične lastnosti in stabilnost rastlinskega olja, pomembne pa so tudi z vidika prehranskih vrednosti rastlinskega olja (9, 36). Ker imajo nekatera olja med seboj precej podobno maščobnokislinsko sestavo, lahko določanje neumiljivih snovi izkoriščamo za ugotavljanje primesi drugih olj (ponarejanja). Omogoča nam tudi boljše razlikovanje med rastlinskimi olji glede na njihov botanični izvor in kakovost (10, 37, 38).

1.4 Infrardeča spektroskopija

Infrardeča (IR) spektroskopija je univerzalna instrumentalna metoda, ki jo uporabljamo na različnih področjih znanosti, in sicer v kemiji, farmaciji, prehranski industriji, kmetijstvu, v industriji papirja, barv in tekstila ter v okoljski znanosti (39).

V kemiji jo uporabljamo za določevanje strukture organskih in anorganskih spojin oziroma funkcionalnih skupin. Poleg tega omogoča spremljanje poteka kemijskih reakcij in zaradi visoke selektivnosti razlikovanje med izomeri, polimorfnimi modifikacijami ter povezavami med makromolekulami in sekundarnimi strukturami. V farmaciji jo uporabljamo za identifikacijo spojin in ugotavljanje njihove čistosti, strukture, kristalne oblike (polimorfizma in psevdopolimorfizma) ter pri ugotavljanju interakcij med zdravilnimi učinkovinami in pomožnimi snovmi (40, 41). Uporabna je tako za kvalitativne kot kvantitativne namene, vendar za slednje manj zaradi nizke občutljivosti. IR spektroskopija se je izkazala kot učinkovito orodje pri proučevanju bioloških molekul, zlasti proteinov, peptidov, bioloških membran, nukleinskih kislin, živalskih tkiv, celic mikroorganizmov ter rastlin in rastlinskih materialov (39, 42, 43).

IR spektroskopijo uporabljamo za kvalitativno analizo vzorcev, saj podaja prisotnost ali odsotnost funkcionalnih skupin v vzorcih, ter za kvantitativno analizo, saj je absorpcijska energija direktno sorazmerna s koncentracijo snovi v vzorcu (44, 45). Ima številne prednosti, saj omogoča enostavno in hitro analizo, je cenovno ugodna in ne zahteva uporabe organskih topil. Analiza ne uniči vzorca in zadostuje že majhna količina (45, 46). Zaradi naštetih prednosti IR spektroskopijo vse pogosteje uporabljamo kot alternativo kemijskim analizam lipidov, ki jih izvajamo s pomočjo titracij (46). IR spektroskopija zaradi svojih prednosti vse pogosteje nadomešča tudi uporabo drugih metod za vrednotenje rastlinskih olj (GC, GC-MS, HPLC). Uporabljamo jo za ugotavljanje: ponarejanja olj, določanje oksidativne stabilnosti in farmakopejskih števil ter za ugotavljanje vsebnosti MK v rastlinskih oljih in za razvrščanje olj v skladu z njihovim geografskim in botaničnim poreklom (5, 6, 29, 30, 32, 44–57).

V študijah (47–51) so ugotavljali uspešnost IR spektroskopije za odkrivanje ponarejanja visokokakovostnega ekstra deviškega olivnega olja s cenejšimi olji (sončnično, sojino, sezamovo, koruzno, lešnikovo, palmovo olje). Ugotovili so, da so iz spektrov razvidni dodatni absorpcijski pasovi in vrhovi, ki kažejo na ponarejanje olj. IR spektroskopija se je

izkazala kot uspešna metoda pri odkrivanju ponarejanja, kar je izrednega pomena za uporabo olj v industriji ter za zdravje in varnost potrošnikov.

V študijah (5, 30, 32, 44–47, 52, 53) so ugotavljali oksidativno stabilnost rastlinskih olj. Oksidativni pogoji (izpostavljenost kisiku, povišani temperaturi, svetlobi) privedejo do razgradnje olj ter nastanka primarnih in sekundarnih produktov oksidacije. Oksidacijo najpogosteje določamo z ugotavljanjem peroksidnega števila. Pri segrevanju koruznega, gorčičnega olja in bombaževega olja so z IR spektroskopijo zaznali povečanje peroksidnega števila in s tem poslabšanje njihove kakovosti in stabilnosti.

Poleg peroksidnega števila so v študijah s pomočjo IR spektroskopije ugotavljali tudi določanje drugih farmakopejskih števil in s tem lastnosti rastlinskih olj. V koruznem in gorčičnem olju, ki so ju izpostavili visokim temperaturam in večkratnemu segrevanju, so ugotavljali jodno in saponifikacijsko število. Ugotovili so, da obe števili naraščata s povišanjem temperature, saj so bili v spektru vidni produkti oksidacije zaradi vpliva segrevanja (5, 45). Jodno število so določali tudi v drugih rastlinskih oljih, ki jih niso segrevali (olivno, palmovo in bombažovo olje) (29, 44, 45, 54). V študijah so proučevali tudi določanje kislinskega števila v različnih jedilnih oljih (32) ter v arašidovem olju (55) in hidroksilno število v sojinem olju (46, 56, 57). V vseh omenjenih študijah so ugotovili, da je IR spektroskopija primerna, učinkovita in zanesljiva metoda za določanje farmakopejskih števil v rastlinskih oljih.

IR spektroskopija omogoča tudi ugotavljanje maščobnokislinske sestave in vsebnosti drugih spojin (tokoferoli, steroli) v rastlinskih oljih (6, 44, 45). Poleg tega so jo uporabili za klasifikacijo ekstra deviškega olivnega olja, proizvedenega iz treh različnih sort in stopenj zorenja. Dokazali so, da IR spektroskopija omogoča razlikovanje med različnimi sortami in stopnjami zorenja (58), primerna pa je tudi za namene razvrščanja olj v skladu z njihovim geografskim in botaničnim poreklom (30).

1.5 Obdelava podatkov

1.5.1 Obdelava infrardečih spektrov

Pred izvedbo multivariantne numerične analize je pomembno izvesti ustrezno obdelavo IR spektrov. Ustrezna obdelava odpravi za analizo nepomembne podatke, hkrati pa ohranja zadostno količino informacij, da razkrije pomembne signale v spektru. Obdelava omogoča

tudi pridobivanje informacij ali preoblikovanje podatkov v obliko, ki je bolj primerna za nadaljnjo analizo (59).

Povprečenje

Pri ponavljajočem se snemanju in seštevanju posameznih spektrov dosežemo povprečenje signala, kar zmanjša šum. Na tak način dobimo osnovni spekter za nadaljnjo analizo. Če sklepamo, da je šum naključno porazdeljen, potem se analizni signali, ki so skladni v času, ojačajo, šum pa se zmanjša. Da je povprečenje signala učinkovito, se mora vsak posnetek začeti na istem mestu spektra, sicer se lahko nekateri signali in uporabne informacije izgubijo. Povprečenje signala je pogosto uporabljana tehnika, še posebej pri spektrometrih, ki hitro snemajo in uporabljajo Fourierjevo transformacijo, kamor spada tudi IR spektroskopija (59).

Odvajanje

Odvajanje spektrov omogoča, da podatke osnovnega spektra preoblikujemo v potencialno bolj uporabno obliko (39, 43, 59). Uporabljamo ga za odstranjevanje vpliva razpršenosti svetlobe oziroma odstranjevanje premika bazne linije (60). Predstavitev spektra s prvim odvodom je v primerjavi z izvornim spektrom boljša, saj so spremembe v naklonu bolj poudarjene. Drugi odvod pa daje za vsak absorpcijski pas negativni vrh in ramo v absorpcijskem spektru. Prednost odvodov je opazna zlasti pri kompleksnejših spektrih, ker omogoča ločitev absorpcijskih vrhov v širokih absorpcijskih pasovih na posamezne komponente. Poleg tega odvod v osnovnem spektru vrhove zoži in jih naostri. Drugi odvod ima prednost, saj ima v primerjavi s prvim odvodom več značilnosti oziroma vrhov. Poleg tega se pri drugem odvodu vrhovi pojavljajo na podobnih mestih kot v originalnem spektru, le da imajo nasprotno smer. Slabost odvajanja je, da spremeni obliko originalnih spektrov in poveča šum, čemur pa se izognemo s predhodnim povprečenjem (39, 43, 59, 60).

Normalizacija s standardnim odklonom

Normalizacijo s standardnim odklonom (ang. standard normal variate – SNV) uporabljamo za zmanjševanje vpliva velikosti delcev v snovi ter vpliva razpršenosti svetlobe. SNV sprva centrira spekter okoli vrednosti nič z odštevanjem aritmetične sredine preko vseh valovnih dolžin, nato pa vsako vrednost spektra še normalizira s standardnim odklonom celotnega spektra (60–64).

Normalizacija

Normalizacijo uporabljamo za zmanjšanje variabilnosti med vzorci. V spektru odstranjuje učinke sipanja, tako da vsak spekter približa povprečnemu spektru vzorca. Normalizacija spektra poteka na osnovi površine pod krivuljo ali višine najvišjega vrha. Pri IR spektroskopiji omogoča zmanjšanje variabilnosti med vzorci, ki je posledica različne dolžine poti žarka in različne količine vzorca, zaradi česar pričakujemo premik intenzitete signala celotnega spektra (59, 61, 65–67).

1.5.2 Generiranje napovednih modelov

Za generiranje napovednih modelov uporabljamo različne kemometrične metode. Kemometrija je področje znanosti, ki proučuje razvoj in uporabo matematičnih in statističnih metod za ugotavljanje pomembnih kemijskih informacij. Z različnimi matematičnimi in statističnimi metodami ugotavlja povezavo med eksperimentalnimi podatki ter fizikalno-kemijskimi lastnostmi vzorca. Kemometrijo uporabljamo za analizo velike količine eksperimentalnih podatkov z namenom pridobitve najboljših informacij ter za reševanje kvalitativnih in kvantitativnih analiznih problemov (59, 61, 66, 68).

Korelacija

Korelacija ugotavlja, kako močno sta dve statistični spremenljivki povezani (usklajeni) ali korelirani. Velikost linearne povezanosti spremenljivk X in Y, merjenih na istem predmetu preučevanja, predstavlja Pearsonov koeficient korelacije. Definiramo ga kot vsoto produktov standardnih odklonov obeh vrednosti spremenljivk v razmerju s stopnjami prostosti oziroma kot razmerje med kovarianco (mera linearne povezanosti med spremenljivkama) in produktom obeh standardnih odklonov (enačba 8) (59, 61, 65).

$$r_{xy} = \frac{C_{xy}}{s_X s_Y} = \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{s_X s_Y}$$

Enačba 8

r_{xy} - Pearsonov koeficient korelacije

C_{xy} - kovarianca

s_X - standardni odklon spremenljivke X

s_Y - standardni odklon spremenljivke Y

N - velikost vzorca

x_i - i-ta vrednost spremenljivke X

\bar{x} - povprečna vrednost spremenljivke X

y_i - i-ta vrednost spremenljivke Y

\bar{y} - povprečna vrednost spremenljivke Y

Regresija delnih najmanjših kvadratov

Regresija delnih najmanjših kvadratov (ang. partial least squares – PLS) je statistična metoda za napovedovanje lastnosti vzorca. Metoda PLS ugotavlja linearno povezavo med

spektralnimi podatki X in referenčnimi vrednostmi Y (spremenljivke, ki jo določamo). PLS na osnovi glavnih komponent podatke IR spektrov zapiše v podprostor, nakar poteče modeliranje, regresija X in Y podatkov, ki so zapisani v koordinatah novega merskega sistema. Regresijo uporabljamo pri analizi posameznih komponent, kadar je povezava med koncentracijo in absorbanco kompleksna ter pri analizi vzorcev z dvema ali več komponentami, kjer se signali medsebojno prekrivajo (4, 59, 61, 69–72).

1.5.3 Vrednotenje napovednih modelov

Z različnimi kombinacijami parametrov dobimo veliko število napovednih modelov. Za oceno točnosti napovednega modela uporabljamo validacijo, s katero dokažemo, da je model primeren za načrtovano uporabo. Pri eksterni validaciji (validaciji testnega niza) posnete spektre (vzorke) razdelimo na učni in validacijski set. Na učnem setu vzorcev poteka generiranje napovednih modelov, ki jih nato preizkušamo na validacijskem setu. Za zagotovitev uporabnih rezultatov moramo dobljene napovedne modele ovrednotiti, kar lahko storimo s pomočjo spodaj opisanih matematičnih funkcij (61, 63, 65).

Koren srednje kvadratne napake

Koren srednje kvadratne napake (ang. root mean squared error/deviation – RMSE/RMSD) je merilo napake, zato so zaželeno čim manjše vrednosti (73). RMSD predstavlja standardni odklon razlik med napovedanimi in izmerjenimi vrednostmi spremenljivk za vzorce. Izračunamo ga kot koren povprečne razlike med napovedanimi in izmerjenimi vrednostmi spremenljivk na vseh vzorcih, kot prikazuje enačba 9. RMSD je dober pokazatelj točnosti napovedne metode. Uporabljamo ga lahko za primerjavo napak napovedovanja različnih modelov za napovedovanje iste spremenljivke. RMSD je odvisen od vrednosti spremenljivke, zato ga ne moremo uporabiti za primerjavo točnosti modelov na različnih spremenljivkah (59, 61, 66, 74).

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2}{n}}$$

Enačba 9

y_i - i-ta vrednost odvisne spremenljivke Y (napovedane vrednosti)
 x_i - i-ta vrednost neodvisne spremenljivke X (izmerjene vrednosti)
 n - število vzorcev

Koeficient variacije korena srednje kvadratne napake

Koeficient variacije korena srednje kvadratne napake (ang. coefficient of variation of RMSD – CV) prikazuje razpršitev statističnih enot okoli aritmetične sredine njihove statistične

populacije. Je normalizacija RMSD in predstavlja količnik RMSD s povprečno vrednostjo spremenljivke, kot prikazuje enačba 10. Normalizacija odstrani odvisnost RMSD od absolutne vrednosti spremenljivke in s tem omogoči primerjavo napovednih modelov za različne spremenljivke (59, 61).

$$CV = \frac{RMSD}{\bar{y}} \quad \text{Enačba 10}$$

\bar{y} - povprečna vrednost spremenljivke (izmerjene vrednosti)

Normaliziran koren srednje kvadratne napake

Normaliziran koren srednje kvadratne napake (ang. normalized root mean squared error/deviation – NRMSE/NRMSD) je drugi način za normalizacijo RMSD. NRMSD predstavlja količnik RMSD z razponom vrednosti spremenljivke (razlika med maksimalno in minimalno vrednostjo), kot prikazuje enačba 11. NRMSD daje bolj realno napako v primerjavi s CV v primerih, ko je razpon vrednosti spremenljivk bistveno manjši od povprečne vrednosti spremenljivke (59, 61).

$$NRMSD = \frac{RMSD}{y_{max} - y_{min}} \quad \text{Enačba 11}$$

y_{max} - največja vrednost spremenljivke (izmerjene vrednosti)

y_{min} - najmanjša vrednost spremenljivke (izmerjene vrednosti)

Determinacijski koeficient

Z determinacijskim koeficientom (R^2) (ang. coefficient of determination) vrednotimo linearno povezavo, določeno z regresijsko premico med neodvisno (x_i) in odvisno spremenljivko (y_i). Je podatek, uporabljen v okviru statističnih modelov, katerih glavni namen je bodisi napovedovanje prihodnjih rezultatov ali testiranje hipotez, na osnovi drugih povezanih informacij. Kadar je R^2 enak 1, je med spremenljivkama X in Y popolna linearna povezava. Med spremenljivkama ni linearne odvisnosti, če je R^2 enak 0. Izračunamo ga z enačbo 12 (75).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (x_i - y_i)^2}{\sum_i (y_i - \bar{y})^2} \quad \text{Enačba 12}$$

x_i - i-ta vrednost neodvisne spremenljivke X (izmerjene vrednosti)

y_i - i-ta vrednost odvisne spremenljivke Y (napovedane vrednosti)

\bar{y} - povprečna vrednost odvisne spremenljivke (napovedane vrednosti)

2 NAMEN DELA

V magistrski nalogi bomo razvili metodo za vrednotenje rastlinskih olj z IR spektroskopijo. Uporabili bomo refleksijsko tehniko oslabiljenega popolnega odboja (ATR) in transmisijsko tehniko IR spektroskopije. Na 37 vzorcih rastlinskih olj bomo razvili metodo za ugotavljanje vsebnosti MK in vrednosti farmakopejskih števil, le-te bomo obravnavali kot odvisne spremenljivke. MK, ki jih bomo določali, so palmitinska, linolna, α -linolenska, oleinska, elaidinska, stearinska, γ -linolenska, vakuenska in gondojska kislina. Farmakopejska števila pa so kislinsko, saponifikacijsko, estrsko, hidroksilno, jodno ter peroksidno število in neumiljive snovi. Vhodne, neodvisne spremenljivke, na podlagi katerih bomo z metodo napovedovali omenjene parametre olj, bodo točke IR spektra.

Razvili bomo različne napovedne modele za določanje omenjenih odvisnih spremenljivk v rastlinskih oljih. Za doseganje boljših rezultatov bomo spektre obdelali z različnimi matematičnimi funkcijami, ki bodo poudarile specifične značilnosti spektra. Vrednosti, ki jih bomo skušali napovedati, smo predhodno izmerili na istem naboru vzorcev rastlinskih olj v okviru drugih magistrskih nalog s pomočjo klasičnih in kemijsko bolj kompleksnih farmakopejskih postopkov.

Ugotavljali bomo vpliv različnih parametrov na uspešnost metode. Preizkusili bomo različni tehniki snemanja vzorcev (ATR in transmisijska tehnika), spektre bomo posneli pri različnih ločljivostih (2, 4, 8 cm^{-1}). Primerjali bomo različne obdelave spektrov (prvi odvod, drugi odvod, SNV, prvi in drugi odvod SNV, normalizacija in prvi in drugi odvod normalizacije) ter opazovali vpliv števila spremenljivk (10, 20, 40), ki jih vzamemo v nadaljnje oblikovanje modela, kar predstavlja tudi število koeficientov napovednega modela. Vzorce rastlinskih olj bomo razdelili na učni in validacijski set. Na učnem setu bomo generirali napovedne modele. Glede na vse našete parametre bo učna metoda za 16 spremenljivk skupno generirala 2592 napovednih modelov. Delovanje vsakega dobljenega modela bomo nato preizkusili na validacijskem setu vzorcev. Na podlagi primerjave med napovedanimi in izmerjenimi vrednostmi posamezne spremenljivke bomo za vsak dobljeni napovedni model izračunali RMSD, CV, NRMSD in R^2 , pri čemer bomo iskali najmanjšo napako in tako ovrednotili napovedni model. Za vsako spremenljivko bomo določili tudi najprimernejše vrednosti parametrov, torej najboljšo tehniko, ločljivost, obdelavo spektra in število v modelu uporabljenih valovnih števil, ki omogočajo najboljše napovedovanje posamezne spremenljivke.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci rastlinskih olj

Za analizo smo uporabili rastlinska olja različnih proizvajalcev (preglednica II), ki so komercialno dostopna za uporabo v kozmetiki ali kot prehranska dopolnila. Proizvajalci uporabljenih rastlinskih olj: Alexmo Cosmetics (Weyhe, Nemčija); Behawe Naturprodukte (Rietberg, Nemčija); BaccaraRose (Weseler Straße, Nemčija); Caelo – Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Nemčija); Dragonspice Naturwaren, Christian Recke (Reutlingen, Nemčija); Farmalabor Srl (Canosa di Puglia, Italija); Magnolija (Gabrovka, Slovenija); Manske (Geschwister-Scholl-Straße, Nemčija); Tovarna Organika (Trzin, Slovenija).

Preglednica II: Vzorci rastlinskih olj

Rastlinsko olje – slovensko ime rastline	Rastlinsko olje – latinsko ime rastline	Ime proizvajalca	Interna številčna oznaka
Ameriška brusnica	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Behawe Naturprodukte	1
Ameriška brusnica	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Alexmo cosmetics	2
Ameriška brusnica	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Dragonspice Naturwaren	3
Bezeg	<i>Sambucus nigra</i>	BaccaraRose	4
Bezeg	<i>Sambucus nigra</i>	Behawe Naturprodukte	5
Boreč	<i>Borago officinalis</i>	Dragonspice Naturwaren	6
Boreč	<i>Borago officinalis</i>	Tovarna Organika	7
Boreč	<i>Borago officinalis</i>	Caelo	8
Boreč	<i>Borago officinalis</i>	Farmalabor	9
Črni ribez	<i>Ribes nigrum</i>	Dragonspice Naturwaren	10
Črni ribez	<i>Ribes nigrum</i>	Behawe Naturprodukte	11
Konoplja	<i>Cannabis sativa</i>	Dragonspice Naturwaren	12
Konoplja	<i>Cannabis sativa</i>	Tovarna Organika	13
Konoplja	<i>Cannabis sativa</i>	Manske	14
Malina	<i>Rubus idaeus</i>	Tovarna Organika	15
Malina	<i>Rubus idaeus</i>	Dragonspice Naturwaren	16
Malina	<i>Rubus idaeus</i>	Behawe Naturprodukte	17
Črna ogrščica	<i>Brassica nigra</i>	Behawe Naturprodukte	18
Oreh	<i>Juglans regia</i>	BaccaraRose	19
Oreh	<i>Juglans regia</i>	Caelo	20
Rakitovec	<i>Hippophae rhamnoides</i>	Dragonspice Naturwaren	22
Rakitovec	<i>Hippophae rhamnoides</i>	Behawe Naturprodukte	23
Svetlin	<i>Oenothera biennis</i>	Dragonspice Naturwaren	24
Svetlin	<i>Oenothera biennis</i>	Farmalabor	25
Svetlin	<i>Oenothera biennis</i>	Alexmo cosmetics	26
Svetlin	<i>Oenothera biennis</i>	Caelo	27
Šipek	<i>Rosa canina</i>	Manske	28
Šipek	<i>Rosa canina</i>	Alexmo cosmetics	30
Španska kadulja	<i>Salvia hispanica</i>	BaccaraRose	31
Španska kadulja	<i>Salvia hispanica</i>	Dragonspice Naturwaren	32
Črna kopriva	<i>Perilla frutescens</i>	BaccaraRose	34
Črna kumina	<i>Nigella sativa</i>	Caelo	35
Inkovska plukenecija	<i>Plukenetia volubilis</i>	Magnolija	36
Kivi	<i>Actinidia chinensis</i>	Dragonspice Naturwaren	37
Lan	<i>Linum usitatissimum</i>	BaccaraRose	38
Lan	<i>Linum usitatissimum</i>	Farmalabor	39
Lan	<i>Linum usitatissimum</i>	Caelo	40

Rastlinska olja smo označili z internimi številčnimi oznakami, kar nam je omogočalo lažjo analizo, označevanje in razvrščanje podatkov. Uporabili smo 37 vzorcev rastlinskih olj iz 17 različnih rastlinskih vrst in od 9 različnih proizvajalcev.

3.2 Reagenti

Reagenti, ki smo jih uporabili pri našem delu so bili: diklorometan, Panreac Quimica, (Castellar del Vallès, Španija, UN 1593, № 200-838-9); brezvodni etanol, Kefo d.o.o. (Slovenija, Lot/Batch nr. 705880314); NaCl, Carlo Erba Reagents (Chausée du Vexin, Francija, Batch nr. 0B036150B).

3.3 Izmerjene vrednosti vsebnosti maščobnih kislin in farmakopejskih števil

Podatke o maščobnokislinski sestavi rastlinskih olj smo pridobili iz magistrskih nalog avtoric Ive Horvat in Špele Perčič (priloga 1, preglednica VI). Maščobnokislinsko sestavo rastlinskih olj sta ugotavljali s pomočjo plinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo (GC-MS). V preglednici so navedene vrednosti površine pod krivuljo posamezne komponente v vzorcu v odstotkih, ki so premo sorazmerne s količino posamezne MK v vzorcu (76, 77).

Izmerjene vrednosti farmakopejskih števil v rastlinskih oljih smo dobili iz še neobjavljenih rezultatov analiz avtoric Janje Ščuka in Sare Grmek (priloga 2, preglednica VII). Avtorici sta podatke pridobili z analizami na podlagi farmakopejskih predpisov za določanje farmakopejskih števil. Evropska farmakopeja predpisuje, da vrednosti farmakopejskih števil navajamo brez enote, medtem ko neumiljive snovi podajamo v m/m %.

Vse omenjene analize so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko biologijo, in sicer na istih vzorcih rastlinskih olj, kot smo jih uporabili tudi v tej magistrski nalogi.

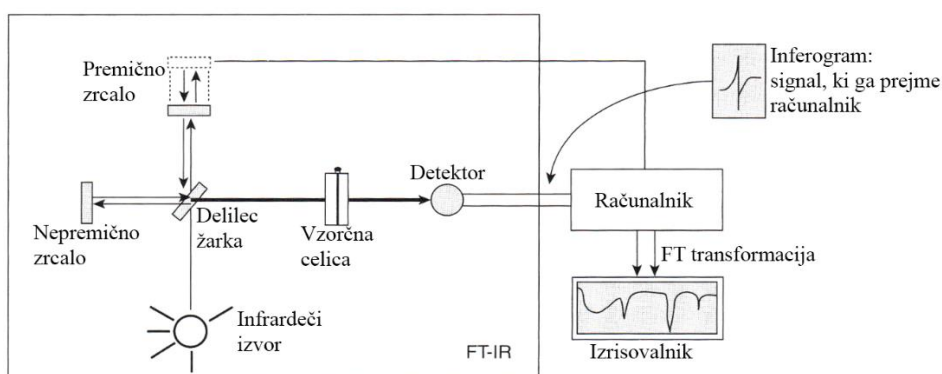
V naši magistrski nalogi smo 37 vzorcev rastlinskih olj razdelili na učni in validacijski set vzorcev. V učni set (U) smo vključili 32, v validacijski set (V) pa 5 vzorcev rastlinskih olj.

3.4 Infrardeča spektroskopija

Vzorce rastlinskih olj različnih proizvajalcev, prikazanih v preglednici II, smo merili z dvema tehnikama IR spektroskopije, in sicer z refleksijsko tehniko oslabiljenega popolnega odboja (ATR) in s transmisijsko tehniko.

Meritve so potekale na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, v obdobju med julijem in septembrom 2015. Priprava vzorcev rastlinskih olj je potekala na Katedri za farmacevtsko biologijo, medtem ko je snemanje spektrov potekalo na Katedri za farmacevtsko kemijo. Ker so rastlinska olja nestabilna in občutljiva na vplive okolja, smo se odločili, da bomo meritve pripravljenih vzorcev izvedli še isti dan. S sprotno pripravo in snemanjem vzorcev smo želeli zagotoviti zanesljive rezultate.

Za izvedbo meritev smo uporabili IR spektrometer s Fourierjevo transformacijo (FTIR) (slika 1). FTIR spektrometer uporablja interferometer za obdelavo energije, poslana vzorcu. V njem gre izvorna energija skozi delilec žarka, ki izvorni žarek razdeli na dva dela. Eden od žarkov se usmeri naravnost na nepremično zrcalo, drugi žarek, ki je pravokoten nanj, pa je usmerjen na premično zrcalo. Oba žarka se od zrcal odbijeta in potujeta proti delilcu žarka. Gibanje premičnega zrcala ustvarja razliko v dolžini poti, ki jo žarka prepotujeta. Ko se oba žarka na delilcu žarka združita, pride do konstruktivne in destruktivne interference, kar je posledica različno dolge poti, ki jo žarka prepotujeta, in valovne dolžine valovanja. Pri prehodu žarka vzorec hkrati absorbira energijo pri vseh valovnih dolžinah. Na detektorju dobimo interferogram, ki predstavlja graf odvisnosti intenzitete signala od časa. Pogosteje pa nas zanima, kako se intenziteta spreminja s frekvenco, in to pretvorbo omogoča Fourierjeva transformacija. Interferogram se iz spektrometra prenese na računalnik in tako dobimo IR spekter, ki ga lahko interpretiramo. Da dobimo spekter preiskovane substance, je potrebno sprva posneti interferogram ozadja, ki pa vsebuje atmosferske pline (CO₂ in vodno paro), ki absorbirajo v IR območju. Nato posnamemo še naš vzorec, ki je sestavljen iz absorpcijskih trakov vzorca in ozadja. Računalnik od dobljenega spektra samodejno odšteje ozadje in dobimo izključno spekter preiskovane spojine (78).



Slika 1: Zgradba FTIR spektrometra, prirjeno po (78)

Pri izvajanju meritev z IR spektrometrom smo določili naslednje parametre:

Število ponovitev snemanj (ang. number of scans) je število spektrov, ki jih instrument posname z istimi merilnimi parametri, kjer je končni spekter povprečje vseh posnetih spektrov. Večje kot je število ponovitev snemanj, boljša je občutljivost, manjši je šum in daljši je čas merjenja (79, 80).

Ločljivost (ang. resolution) napove, kakšna je najmanjša razdalja med vrhovoma, ki ju instrument še lahko loči. Podajamo jo v cm^{-1} . Za ločevanje dveh vrhov med seboj so potrebne tri podatkovne točke, torej ena za vsak vrh in ena med njima. Razdalja med podatkovnimi točkami je enaka polovici ločljivosti. Večja ločljivost daje večje število podatkov, manjša ločljivost pa daje manjše število podatkov, hkrati pa zmanjša šum in skrajša čas snemanja vzorca (79, 80).

Merilno območje (ang. spectral range) je odvisno od spektrometra in tehnike merjenja (79, 80). Delimo ga na bližnje, srednje in daljno IR območje. Za analizo organskih spojin najpogosteje uporabljamo srednje IR območje od $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ (43).

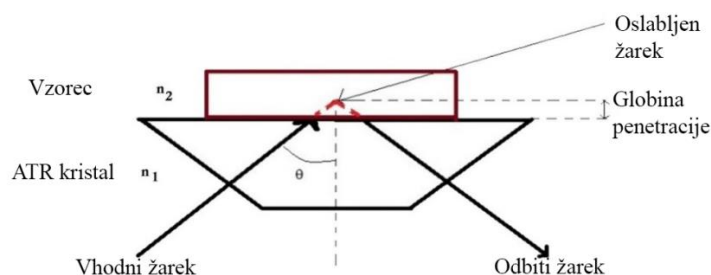
3.4.1 Snemanje spektrov s tehniko oslabljenega popolnega odboja (ATR) infrardeče spektroskopije

Pri ATR IR spektroskopiji smo za snemanje vzorcev uporabili Nicolet Nexus FTIR spektrometer z enojnim odbojem, proizvajalca Nicolet Instrument Co, Madison, ZDA z devteriranim triglicin sulfatnim (DTGS) detektorjem (slika 2). Uporabili smo ATR nastavek (slika 2 – desno) proizvajalca Dura SamPLIR Technologies, Danbury, ZDA. Nastavek vsebuje diamantni kristal okrogle oblike, premera 1 mm, kamor nanese vzorec. Ob nastavku je tudi vijak, ki zagotavlja enakomeren pritisk vzorcev ob kristal, ki pa ga v našem primeru zaradi tekoče konsistence rastlinskih olj nismo uporabili. Za snemanje smo uporabili program EZ OMNIC E.S.P.5.2, spektre pa smo shranili v formatu CSV (ang. comma separated values).



Slika 2: FTIR spektrometer Nicolet Nexus z ATR nastavkom (levo) in ATR nastavek (desno)

Tehnika oslabljenega popolnega odboja (ang. attenuated total reflectance – ATR) je refleksijska tehnika IR spektroskopije, ki temelji na odboju svetlobe od vzorca. Pri prehodu valovanja iz kristala (medija z večjo optično gostoto, n_1) v vzorec (medij z manjšo optično gostoto, n_2) pride pri vpadnih kotih, večjih od kritičnega kota (θ), do popolnega odboja (slika 3). Valovanje kljub popolnemu odboju deloma prehaja pod površino redkejšega medija (vzorca), kjer pride do absorpcije z organskimi molekulami in posledično se odbito valovanje oslabi. Rezultat je razmerje jakosti vpadnega in odbitega valovanja v odvisnosti od valovne dolžine (39, 43).



Slika 3: Tehnika oslabljenega popolnega odboja, prirejeno po (81)

Določitev optimalnih pogojev merjenja

Postopek snemanja vzorcev rastlinskih olj smo začeli z izvajanjem poskusnih meritev z olivnim, mandljevim in arganovim oljem, s katerimi smo določili optimalne pogoje za meritve. Sledila sta priprava in snemanje preiskovanih vzorcev rastlinskih olj, ki so bistveno dražja in težje dostopna. Po izvedenih meritvah pa je sledila še obdelava podatkov in spektrov. Rezultatov za poskusne vzorce nismo vključili v nadaljnjo raziskavo in obdelavo podatkov, ampak smo jih uporabili zgolj zaradi njihove lažje dostopnosti in cenovne ugodnosti z namenom ugotovitve optimalnih pogojev nadaljnega merjenja.

Že pred samim merjenjem poskusnih vzorcev smo se odločili, da bomo preiskovane vzorce snemali pri treh različnih ločljivostih 2, 4 in 8 cm^{-1} , pri čemer smo vsako meritev vzorca pri eni ločljivosti trikrat ponovili. Med meritvami poskusnih vzorcev smo ugotavljali, kdaj in kolikokrat bi bilo najbolj optimalno posneti spekter ozadja. Ker smo ugotovili, da se atmosferski plini dokaj hitro pojavljajo na samem IR spektru in nam morebiti prekrivajo pomembne informacije, smo se odločili, da ozadje posnamemo pred vsako meritvijo vzorca. S pomočjo poskusnih meritev smo določili tudi nastavitve pri merjenju ozadja in vzorcev. Pridobljene optimalne nastavitve, ki so prikazane v preglednici III, smo uporabili pri meritvah dejanskih vzorcev.

Preglednica III: Nastavitve pri merjenju ozadja in vzorcev rastlinskih olj z ATR IR spektroskopijo

Parameter	Ozadje	Vzorci rastlinskih olj
Ozadje	Zrak	Zrak
Število ponovitev snemanja	10	50
Ločljivost (cm ⁻¹)	2, 4, 8	2, 4, 8
Merilno območje (cm ⁻¹)	4000–400	4000–400
Format	% transmittance	% transmittance
Delilec žarka	ZnSe	ZnSe
Detektor	DTGS KBr	DTGS KBr
Apertura	64	64

Meritve vzorcev rastlinskih olj

Za meritve ATR IR spektroskopije smo uporabili vzorce rastlinskih olj različnih proizvajalcev, ki so prikazani v preglednici II. Potek meritve z ATR metodo IR spektroskopije je bil zelo enostaven, saj ni bila potrebna nobena predpriprava vzorca.

Pri meritvi ATR IR spektroskopije smo najprej vijak namestili na stran, saj ga pri naših meritvah tekočih vzorcev ni bilo potrebno uporabljati. Nato smo diamantni kristal očistili z etanolom in pustili, da se posuši. Sledilo je snemanje ozadja in vzorcev, pri čemer smo uporabili nastavitve, ki so prikazane v preglednici III. Najprej smo posneli spekter ozadja. Nato smo na kristal nanесли kapljico olja tako, da je bil ves kristal prekrit z oljem in da ni bilo zračnih mehurčkov. Temu je sledilo snemanje vzorca rastlinskega olja in shranjevanje spektra v obliki formata CSV. Ko smo z meritvijo zaključili, smo s pomočjo papirnatih brisač popivnali kapljico olja iz kristala in ga očistili z etanolom. Za vsak vzorec smo izvedli po tri ponovitve pri ločljivosti 2 cm⁻¹ in pri 50 ponovitvah snemanja. Pri tem smo pred vsako meritvijo vzorca posneli ozadje pri isti ločljivosti kot vzorec, vendar pri petkrat manjšem številu ponovitev snemanja. Za vsak vzorec smo postopek ponovili še pri ločljivosti 4 in 8 cm⁻¹. V primeru, da je en spekter vzorca precej odstopal od ostalih dveh, smo izvedli še eno do največ dve dodatni meritvi, da smo dobili vsaj tri primerljive spektre, ki smo jih uporabili za nadaljnjo obdelavo. Merjenje enega vzorca je trajalo približno 20 minut. Merjenju je sledila obdelava podatkov in spektrov.

3.4.2 Snemanje spektrov s transmissijsko tehniko infrardeče spektroskopije

Pri transmissijski tehniki IR spektroskopije smo za snemanje vzorcev uporabili Nicolet Nexus FTIR spektrometer (slika 4), proizvajalca Nicolet Instrument Co, Madison, ZDA z devteriranim triglicin sulfatnim (DTGS) detektorjem. Uporabili smo nastavek za transmissijsko tehniko proizvajalca SpectraTech, v katerega smo vstavili vpenjač s ploščico

iz natrijevega klorida (NaCl), velikosti $11 \times 30 \times 7$ mm (slika 5). (78). Za snemanje smo uporabili program EZ OMNIC E.S.P.5.2, spektre pa smo shranili v formatu CSV.



Slika 4: FTIR spektrometer Nicolet Nexus za transmisijsko tehniko



Slika 5: Nastavek z vpenjačem za NaCl ploščico za transmisijsko tehniko IR spektroskopije (levo) in vpenjač z NaCl ploščico (desno)

Transmisijska tehnika IR spektroskopije temelji na prehodu žarka skozi vzorec in na absorpciji IR valovanja specifične valovne dolžine. Ko žarek prehaja skozi vzorec, pride do absorpcije IR sevanja pri specifičnih valovnih dolžinah. Transmisijski spekter, ki ga dobimo, podaja odvisnost transmittance od valovnega števila in ga lahko pretvorimo v absorpcijski spekter, ki podaja odvisnost absorbance (A) od valovnega števila. Transmittanca ali prepustnost (T) je razmerje med intenziteto prepuščene svetlobe (I), ki gre skozi vzorec, in vpadne svetlobe (I_0), ki vzorec osvetljuje. Namesto transmittance lahko uporabimo absorbanco, povezuje ju enačba 13 (39, 43).

$$A = -\log T = \log_{10} \frac{1}{T} = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad \text{Enačba 13}$$

Določitev optimalnih pogojev merjenja

Postopek snemanja vzorcev rastlinskih olj smo začeli z izvajanjem poskusnih meritev z oljnim, mandljevim in arganovim oljem. Sledila je priprava in snemanje preiskovanih

vzorcev rastlinskih olj, ki smo jih redčili z diklorometanom (CH_2Cl_2). Po izvedenih meritvah je sledila še obdelava podatkov in spektrov.

Pri tej tehniki smo uporabili NaCl ploščico, na katero smo nanašali vzorec. NaCl ploščica zaradi vodotopnosti ne sme priti v stik z vodo, zato smo za njeno čiščenje uporabili nasičeno raztopino NaCl v etanolu. To raztopino smo pripravili tako, da smo 40 g NaCl, ki smo ga predhodno sušili 90 minut na $150\text{ }^\circ\text{C}$, dodali 460 g brezvodnega etanola. Sprva ploščice nismo vpenjali v vpenjač, ampak smo jo po nanosu vzorca direktno vstavljali v nastavek transmisijskega IR spektrometra. Pri tem smo si pomagali s pinceto, da z dotiki ne bi uničili nanesene kapljice olja. Med meritvami smo poskrbeli za enako usmerjenost NaCl ploščice, da morebitne nepravilnosti na ploščici ne bi vplivale na ponovljivost meritve. Vzorce smo za doseganje ponovljivosti meritev nanašali na točno določeno mesto na sredini ploščice in tako zagotovili, da je žarek resnično prehajal skozenj. Najprej smo poskusili z nerazredčenimi olji, kjer smo vzorec na ploščico NaCl nanesli s pomočjo kapalke. Ugotovili smo, da je potrebno pri tej tehniki rastlinska olja redčiti s topilom CH_2Cl_2 . Nerazredčena rastlinska olja so namreč po nanosu na NaCl ploščico polzela po njej in po nekaj minutah so se razvlekla v madež, znotraj katerega olje ni bilo enakomerno razporejeno. Poleg tega, da je olje stekalo s ploščice na aparaturu, je bilo problematično tudi to, da je žarek osvetlil različne debeline vzorca in posledično je bil spekter neprimeren.

Zaradi omenjenih težav pri nanašanju nerazredčenih vzorcev smo se odločili, da jih bomo redčili s topilom, ki bo zagotovilo primerno konsistenco vzorca za nanos na NaCl ploščico. Z redčenjem vzorcev rastlinskih olj smo želeli zagotoviti najbolj optimalno koncentracijo vzorca, to je tisto, ki bi zagotavljala enakomeren sloj vzorca na NaCl ploščici brez iztekanja in koncentracijo, ki bi dajala ponovljive spektre. Kot topilo smo izbrali diklorometan (CH_2Cl_2), ker je lahko hlapen in zagotavlja ustrezno topnost za trigliceride, olja in smole in je s tega stališča primerno topilo za rastlinska olja (82).

Odločili smo se, da pripravimo nekaj poskusnih koncentracij olj v CH_2Cl_2 , glede na znanstveno raziskavo, v kateri so rastlinska olja redčili s topilom v koncentraciji $0,2\text{ g}/10\text{ ml}$ (83). Ta koncentracija je bila vodilo za naše nadaljnje delo, ki pa smo si ga za lažjo pripravo poenostavili z volumskim odmerjanjem vzorcev rastlinskih olj. Za vsako poskusno olje posebej (olivno, mandljevo in arganovo) smo, glede na omenjeno literaturo, pripravili osnovno koncentracijo $C_1 = 0,2\text{ ml}/10\text{ ml}$, 10-krat večjo $C_2 = 2\text{ ml}/10\text{ ml}$ in 25-krat večjo od osnovne $C_3 = 5\text{ ml}/10\text{ ml}$. Najprej smo pripravili C_1 , kjer smo $0,2\text{ ml}$ mandljevega olja

odmerili z avtomatsko pipeto v steklene epruvete z zamaškom. Nato smo v digestoriju z merilno pipeto dodali 9,8 ml CH_2Cl_2 , zaprli in pretresli epruvete. Enak postopek smo ponovili še za ostale koncentracije. Zaradi toksičnosti in hlapnosti CH_2Cl_2 je delo z njim potekalo v digestoriju, z zaščitnimi rokavicami in očali. Uporabljali smo steklen laboratorijski pribor, saj CH_2Cl_2 raztaplja plastiko. Nanos vzorcev na NaCl ploščico je prav tako potekal v digestoriju. Ploščico smo položili na urno steklo in nanj začeli nanašati mandljevo olje s C_1 . Sprva smo vzorec odmerjali in nanašali z merilno pipeto po 0,1 ml in počakali, da je topilo izhlapelo in je na ploščici ostalo le še olje. Izkazalo se je, da je količina vzorca prevelika, saj je na ploščici ostal velik in neenakomeren madež olja. Nanesen vzorec se je namreč oblikoval v drobne kapljice ali pa ga je potegnilo samo v eno stran, kar ni dajalo primerljivih spektrov. Poleg tega se je nanašanje s pipeto izkazalo kot časovno zelo neučinkovito. Nato smo mandljevo olje s C_1 nanašali še s pomočjo steklene kapalke. Sprva smo nanesli po 3 kapljice vzorca, vendar smo naleteli na enak problem kot v primeru nanašanja vzorca s pipeto. Poskusili smo še z nanosom ene kapljice, ki se je takoj izkazal kot primernejši, saj je bil hiter in je dajal enakomernejši sloj vzorca. Kljub obetavnejšim rezultatom pa s ponovljivostjo spektrov še vedno nismo bili povsem zadovoljni. Odločili smo se, da bomo vzorce nanašali s kapalko in da si želimo doseči takšno koncentracijo, kjer nam bo nanos ene kapljice s kapalko dajal najboljše rezultate. Postopek smo ponovili še z mandljevim oljem z večjo koncentracijo C_2 , ki pa ni bila primerna, saj se je ustvaril debel sloj vzorca, ki je stekal s ploščice in ni zagotavljal primerljivih spektrov, zato C_3 sploh nismo preizkušali. Postopek smo ponovili še z olivnim in arganovim oljem s C_1 . Odločili smo se, da pripravimo še dve vmesni koncentraciji med C_1 in C_2 . Za vsako poskusno olje posebej smo tako pripravili še $C_4 = 0,4 \text{ ml}/10 \text{ ml}$ in $C_5 = 0,6 \text{ ml}/10 \text{ ml}$. Zopet so se pojavile težave z neenakomernim izhlapevanjem topila in neenakomernim slojem vzorca. Enak problem se je pojavljal tudi pri naslednjih dveh pripravljenih koncentracijah poskusnih rastlinskih olj, razredčenih z CH_2Cl_2 , $C_6 = 1 \text{ ml}/10 \text{ ml}$ in $C_7 = 1,5 \text{ ml}/10 \text{ ml}$.

Z opisanimi raztopinami in tehnikami smo snemali spektre vzorcev, ki pa med seboj niso bili dovolj primerljivi, zato smo nadaljevali z optimizacijo metode. Pred vsakim novim nanosom vzorca na NaCl ploščico smo to čistili z nasičeno raztopino NaCl v etanolu. Ker v tem prvem delu še vedno nikakor nismo uspeli priti do zadovoljivih rezultatov, smo sklepali, da glavni vzrok morda ni v neprimernosti koncentracij pripravljenih vzorcev. Kapljica, ki smo jo nanesli na ploščico iz NaCl, se je hitro deformirala v manjše. Sklepali smo, da je verjetno težava v tem, da so olja hidrofobna, medtem ko sta NaCl in etanol hidrofilna in je

zato površinska napetost med njima velika. Zato v nadalje NaCl ploščice med snemanjem istega vzorca rastlinskega olja nismo temeljito očistili, ampak smo olje le popivnali s papirnato brisačo. Sklepali smo, da pri tem načinu ostane na površini nekaj molekul olja, ki potem olajšajo enakomerno razporeditev kapljice na podlagi. Ta metoda se je izkazala za primernejšo, saj se je vzorec enakomerneje razporejal po ploščici. Med vsemi poskusi se je nazadnje izkazalo, da je najprimernejša koncentracija C₆.

V želji po dodatni optimizaciji smo ugotavljali, ali je bolje, da kapljico vzorca razlivamo tako, da ploščico z rokami premikamo pod različnimi koti, ali je bolje, da ploščico po nanosu vzorca pustimo v vodoravnem položaju in počakamo, da topilo izhlapi. Slednja metoda se je izkazala za bolj ponovljivo, saj z razlivanjem vzorca nismo mogli pripraviti vselej enakega sloja in posledično nismo dosegli ponovljivih meritev.

Odločili smo se, da poskusimo še z meritvami z dvema NaCl ploščicama, med katerima se je nahajal vzorec. V tem primeru smo, enako kot pri delu z eno ploščico, na spodnjo ploščico nanesli kapljico olja in nato nanjo položili še drugo ploščico in ju stisnili skupaj. Ta metoda je dajala primerljive spektre v primerjavi z metodo z eno ploščico, vendar se je izkazala kot zamudna. Pri delu z dvema ploščicama je bilo potrebno zelo paziti, da sta se dobro držali skupaj in da se zgornja ploščica glede na spodnjo ni premikala med samim vstavljanjem ploščic v aparaturo in med meritvijo. Posledično se za sistem meritev z dvema ploščicama nismo odločili.

Ugotavljali smo tudi optimalno vstavitvev NaCl ploščice v aparaturo. Ploščico smo vstavili v vpenjač, slednjega pa smo namestili v nastavek. Vpenjač je ploščici zagotavljal varnost in nepremičnost, da ta ne bi zdrsnila na armaturno ploščo in se zaradi krhkosti zlomila. Zagotavljal pa je tudi zanesljivost meritev, saj je bila ploščica v njem nepremična in je žarek potekal točno skozi obroček vpenjača, znotraj katerega je bil vzorec.

Med procesom določanja optimalnih pogojev merjenja smo ugotavljali tudi najbolj optimalne nastavitve pri merjenju. Ugotovljene optimalne nastavitve transmisijske tehnike so prikazane v preglednici IV. Meritve smo izvajali pri treh različnih ločljivostih 2, 4 in 8 cm⁻¹, pri čemer smo vsako meritev vzorca pri eni ločljivosti trikrat ponovili. Spekter ozadja smo posneli pred vsako meritvijo vzorca, saj smo na ta način zmanjšali vpliv atmosferskih plinov na spektru.

Preglednica IV: Nastavitve pri merjenju ozadja in vzorcev rastlinskih olj s transmisijsko tehniko IR spektroskopije

Parameter	Ozadje	Vzorci rastlinskih olj
Ozadje	Zrak	Zrak
Število ponovitev snemanja	10	50
Ločljivost (cm ⁻¹)	2, 4, 8	2, 4, 8
Merilno območje (cm ⁻¹)	4000–400	4000–400
Format	% transmittance	% transmittance
Delilec žarka	ZnSe	ZnSe
Detektor	DTGS KBr	DTGS KBr
Apertura	64	64

Meritve vzorcev rastlinskih olj

Za meritve preiskovanih vzorcev smo uporabili vzorce rastlinskih olj različnih proizvajalcev, navedene v preglednici IV, ki smo jih redčili z CH₂Cl₂. Vzorce smo si za delo pripravili tako, da smo vsako rastlinsko olje prenesli z avtomatsko pipeto (500 μl) iz prvotnega vsebnika v stekleno 5-mililitrsko bučko, ki smo jo v digestoriju z CH₂Cl₂ dopolnili do oznake, jo zaprli in pretresli. Tako pripravljene vzorce (slika 6) smo nato uporabili za snemanje spektrov s transmisijsko tehniko IR spektroskopije.



Slika 6: Pripravljene vzorce rastlinskih olj razredčeni z diklorometanom

Pred vsako meritvijo vzorcev smo posneli ozadje: NaCl ploščico. NaCl ploščico smo med meritvami različnih vzorcev rastlinskih olj očistili z nasičeno raztopino NaCl v etanolu, medtem ko smo med meritvijo istega vzorca rastlinskega olja ploščico čistili le s pomočjo papirnatih brisač. Na ploščico smo, s pomočjo kapalke, nanegli kapljico vzorca, ki smo jo po meritvi pobrisali s papirnato brisačo. Za vsak vzorec smo posneli tri ponovitve ter vsak spekter shranili v obliki formata CSV. V primeru, da je en spekter vzorca precej odstopal od ostalih dveh, kar je bila predvsem posledica različnih zgoraj opisanih dejavnikov pri meritvah, smo izvedli še eno do največ dve dodatni meritvi. Tako smo dobili vsaj tri primerljive spektre, ki smo jih uporabili za nadaljnjo obdelavo. Merjenje enega vzorca je trajalo približno 30–40 minut. Merjenju je sledila obdelava podatkov in spektrov.

3.4.3 Zajeti spektri za nadaljnjo obdelavo

Pri ATR IR spektroskopiji smo prvotno posneli 356 spektrov vzorcev rastlinskih olj, medtem ko je dajala transmisijska tehnika nekoliko slabšo ponovljivost spektrov, zato smo skupaj z dodatnimi ponovitvami posneli 373 spektrov. Transmisijska tehnika je dajala slabšo ponovljivost spektrov, saj je bil postopek snemanja vzorcev kompleksnejši v primerjavi z ATR tehniko. Pri obeh metodah smo vseh 37 vzorcev posneli pri treh različnih ločljivostih (2, 4, 8 cm^{-1}) in merjenje smo pri vsaki ločljivosti trikrat ponovili. V primeru neponovljivosti spektrov za posamezen vzorec pri določeni ločljivosti smo meritev še enkrat do največ dvakrat ponovili. Za nadaljnjo obdelavo smo obdržali tri najbolj primerljive spektre za vsako ločljivost, torej skupno 333 spektrov za vsako tehniko, kjer smo imeli za vsak vzorec 9 spektrov, torej po 3 za vsako ločljivost.

3.5 Obdelava spektrov

Zajeti podatki spektrov so bili shranjeni v formatu CSV. Izhodni format CSV uporablja zapis, ki ni direktno kompatibilen s programom GNU Octave 4.0.0 (v nadaljevanju program Octave). Iz tega razloga smo dobljene datoteke CSV najprej odprli v programu Notepad++, kjer smo za zagotovitev pravilnega vnosa podatkov decimalne vejice v zajetih podatkih zamenjali s pikami. Tako obdelane datoteke smo nato uporabili pri nadaljnji obdelavi s programom Octave.

S pomočjo programa Octave smo tri spektre vsake kombinacije povprečili in rezultat uporabili kot osnovni spekter posameznega vzorca. Za poudarjanje specifičnih značilnosti spektra smo osnovni spekter obdelali z različnimi funkcijami. Uporabljene funkcije, ki smo jih izvedli na osnovnem spektru, so bile prvi odvod, drugi odvod, normalizacija s standardnim odklonom (SNV) ter prvi in drugi odvod te funkcije ter normalizacija in prvi in drugi odvod te funkcije (primeri osnovnega in obdelanih spektrov so prikazani v prilogi 3). Uporabljene funkcije za obdelavo spektrov so prikazane v preglednici V. Osnovni spekter in preostalih 8 obdelanih spektrov, za vsak vzorec in za vsako tehniko ter ločljivost, smo uporabili kot neodvisne spremenljivke za generiranje napovednih modelov.

Preglednica V: Uporabljene funkcije za obdelavo spektrov

Matematična funkcija za obdelavo spektra	Oznaka obdelave spektra	Program	Enačba za izračun
Povprečje – osnovni spekter	Brez	GNU Octave 4.0.0.	$x_i = \frac{x_{i1} + x_{i2} + x_{i3}}{3}$
Prvi odvod	Odv1	GNU Octave 4.0.0.	$x'_i = x_{i+1} - x_i$
Drugi odvod	Odv2	GNU Octave 4.0.0.	$x''_i = x'_{i+1} - x'_i$
Normalizacija s standardnim odklonom (SNV)	SNV	GNU Octave 4.0.0.	$x_i^{SNV} = \frac{x_i - \bar{x}}{s}$
Prvi odvod SNV	SNVOdv1	GNU Octave 4.0.0.	$x_i^{SNV'} = x_{i+1}^{SNV} - x_i^{SNV}$
Drugi odvod SNV	SNVOdv2	GNU Octave 4.0.0.	$x_i^{SNV''} = x_{i+1}^{SNV'} - x_i^{SNV'}$
Normalizacija	Nor	GNU Octave 4.0.0.	$x_i^N = \frac{x_i - x_{min}}{x_{max} - x_{min}}$
Prvi odvod normalizacije	Nor1	GNU Octave 4.0.0.	$x_i^{N'} = x_{i+1}^N - x_i^N$
Drugi odvod normalizacije	Nor2	GNU Octave 4.0.0.	$x_i^{N''} = x_{i+1}^{N'} - x_i^{N'}$

Legenda:

- x_i - vrednost povprečenega spektra pri valovnem številu i (osnovni spekter)
- x_{i1}, x_{i2}, x_{i3} - vrednost spektra pri valovnem številu i pri treh zaporednih meritvah spektra
- x'_i - vrednost prvega odvoda spektra pri valovnem številu i
- x_{i+1} - vrednost osnovnega spektra pri valovnem številu $i + 1$
- x'_{i+1} - vrednost prvega odvoda pri valovnem številu $i + 1$
- x''_i - vrednost drugega odvoda spektra pri valovnem številu i
- x_i^{SNV} - vrednost SNV spektra pri valovnem številu i
- \bar{x} - povprečna vrednost spektra
- s - standardni odklon spektra
- $x_i^{SNV'}$ - vrednost prvega odvoda SNV spektra pri valovnem številu i
- x_{i+1}^{SNV} - vrednost SNV spektra pri valovnem številu $i + 1$
- $x_i^{SNV''}$ - vrednost drugega odvoda SNV spektra pri valovnem številu i
- x_i^N - vrednost normaliziranega spektra pri valovnem številu i
- x_{min} - najmanjša vrednost osnovnega spektra
- x_{max} - največja vrednost osnovnega spektra
- $x_i^{N'}$ - vrednost prvega odvoda normaliziranega spektra pri valovnem številu i
- x_{i+1}^N - vrednost normaliziranega spektra pri valovnem številu $i + 1$
- $x_i^{N'}$ - vrednost prvega odvoda normaliziranega spektra pri valovnem številu i
- $x_{i+1}^{N'}$ - vrednost prvega odvoda normaliziranega spektra pri valovnem številu $i + 1$
- $x_i^{N''}$ - vrednost drugega odvoda normaliziranega spektra pri valovnem številu i

Pri ATR tehniki smo določili mejo med 4000–500 cm^{-1} , pri transmisijski tehniki pa med 4000–600 cm^{-1} . Pri ATR spektru so bile vrednosti pri valovnih vrednostih pod 500 cm^{-1} nič, pri transmisijski pa smo upoštevali območje glede na prepustnost NaCl ploščice. Vse omenjene vhodne podatke smo uporabili za generiranje napovednih modelov.

3.6 Generiranje napovednih modelov

Iz zajetih spektrov smo želeli napovedati vsebnosti MK in vrednosti farmakopejskih števil v vzorcih rastlinskih olj. Posamezne vsebnosti MK in vrednosti farmakopejskih števil smo obravnavali kot odvisne spremenljivke. MK, ki smo jih obravnavali, so bile palmitinska, linolna, α -linolenska, oleinska, elaidinska, stearinska, γ -linolenska, vakcenska in gondojska kislina. Farmakopejska števila pa kislinsko, saponifikacijsko, estrsko, hidroksilno, jedno ter peroksidno število in neumiljive snovi.

Posamezne vzorce rastlinskih olj smo razdelili na učni in validacijski set. V učni set smo vključili 32 vzorcev, v validacijski set pa preostalih 5 vzorcev. Učni set je predstavljal množico vzorcev, s katero smo generirali napovedne modele. Validacijski set pa je predstavljal množico vzorcev, na katerem smo preizkusili dobljene napovedne modele za napovedovanje vrednosti posamezne odvisne spremenljivke.

S pomočjo programa Octave smo izvedli operacijo, ki nam je za vsako posamezno kombinacijo vseh opisanih parametrov (tehnika, ločljivost, obdelava spektra) generirala napovedne modele za ugotavljanje odvisnih spremenljivk. Pri tem smo pri izvajanju metode vpeljali še dodatni parameter – število v modelu uporabljenih valovnih števil, kar določa tudi število koeficientov modela.

Za izbiro najbolj primernih valovnih števil smo uporabili funkcijo korelacije, ki izračuna Pearsonov koeficient korelacije (enačba 8). Funkcija za izračun korelacije se v programu Octave imenuje »corr«. Vhodni podatki za funkcijo so bili različno obdelani spektri vseh vzorcev učnega seta in izmerjene vrednosti spremenljivk. Funkcija korelacije je za vsako valovno število v spektru, na podlagi vrednosti vseh spektrov in izmerjenih vrednosti odvisnih spremenljivk za vse vzorce, izračunala Pearsonove koeficiente korelacije med vsakim valovnim številom in izmerjeno vrednostjo odvisne spremenljivke. Glede na parameter števila koeficientov modela smo izbrali najboljših 10, 20 ali 40 valovnih števil, ki smo jih uporabili v nadaljnjem koraku. Pomembno je, da izberemo optimalno število koeficientov, saj njihovo premajhno število vodi v »underfitting« (v spektru ni zaznanih dovolj sprememb), medtem ko njihovo preveliko število vodi v »overfitting« (zaznajo se že premajhne spremembe – šum) (66).

V naslednjem koraku smo s pomočjo dobljenih najboljših valovnih števil izvajali metodo za izračun koeficientov napovednega modela. Uporabili smo PLS metodo, ki se v programu

Octave imenuje »plsregress«. Funkcijo smo izvajali za vsako odvisno spremenljivko posebej. Vhodni podatki funkcije so bili na podlagi Pearsonovega koeficienta izbrana valovna števila ter izmerjene vrednosti odvisnih spremenljivk. Funkcija je s pomočjo regresijske metode izračunala vrednosti koeficientov napovednega modela. Koeficiente smo nadalje uporabili za napovedovanje vrednosti odvisnih spremenljivk s pomočjo enačbe 14.

$$y = x_{v1}k_1 + x_{v2}k_2 + \dots + x_{vn}k_n \quad \text{Enačba 14}$$

y - napovedana vrednost posamezne spremenljivke

x_{vi} - vrednost spektra pri valovnem številu i

k_i - i -ti koeficient napovednega modela, ki ga je izračunala PLS metoda

n - število koeficientov napovednega modela (10, 20 ali 40)

3.6.1 Vrednotenje napovednih modelov

Delovanje vsakega dobljenega modela smo preizkusili na validacijskem setu vzorcev. Na podlagi primerjave med napovedanimi in izmerjenimi vrednostmi posamezne spremenljivke smo za vsak dobljeni napovedni model izračunali RMSD (enačba 9), CV (enačba 10), NRMSD (enačba 11) in R^2 (enačba 12), s katerimi smo ovrednotili napovedni model.

Na podlagi njihovih vrednosti smo določili najboljši napovedni model za vsako odvisno spremenljivko. Iz slednjega smo za vsako spremenljivko napovedali najboljšo tehniko, ločljivost, obdelavo spektra in število v modelu uporabljenih valovnih števil.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Vrednotenje napovednih modelov

Uspešnost dobljenih napovednih modelov smo vrednotili na podlagi vrednosti determinacijskih koeficientov (R^2). Mejne vrednosti za klasifikacijo uspešnosti modela smo opredelili s podrobno analizo 11 znanstvenih raziskav, ki so proučevale primerljive metode. V raziskavah so ugotavljali vrednosti farmakopejskih števil in/ali vsebnosti MK v rastlinskih oljih z IR spektroskopijo, pri čemer so za vrednotenje metode uporabili R^2 (29, 44–46, 51, 54, 55, 58, 84, 85).

Napovedne modele smo na podlagi analiziranih znanstvenih raziskav klasificirali glede na uspešnost v 5 različnih skupinah. Znanstveni članki navajajo, da je napovedni model **odličen** takrat, ko je R^2 nad vrednostjo 0,9995 (46, 51, 56). R^2 , ki je večji od 0,992, kaže na **zelo dober** napovedni model (45, 84). Kadar je R^2 med 0,81 in 0,99 je napovedni model **dober**. O **približnem** napovednem modelu lahko na podlagi obstoječih raziskav govorimo pri R^2 , ki je med 0,66 in 0,80. Vrednosti R^2 , ki so pod vrednostjo 0,66, kažejo na to, da napovedni model **ni dober** (44, 54, 55, 58). Dodatno nekateri avtorji navajajo, da lahko modele z vrednostmi R^2 med 0,89–0,995 smatramo kot sprejemljive (85).

Mejne vrednosti R^2 morajo veljati tako za učni kot za validacijski set vzorcev. Za vsako spremenljivko in tehniko smo izbrali najboljši napovedni model na podlagi zgoraj opisanih pravil. Pri vsaki spremenljivki smo dodatno ovrednotili vse parametre (tehniko, ločljivost, obdelavo spektra, število v modelu uporabljenih valovnih števil), ki so dajali najboljše rezultate. Ugotovili smo, da so dobljeni napovedni modeli zelo dobri, dobri in približni, nekateri pa niso dobri. Odličnih napovednih modelov zaradi strogosti pogojev nismo dobili.

Z najboljšim napovednim modelom, ki smo ga izbrali za vsako posamezno spremenljivko, smo ugotavljali tudi povezavo med v modelu uporabljenimi valovnimi števili in MK ali farmakopejskim številom (47, 50, 78).

4.1.1 Maščobne kisline

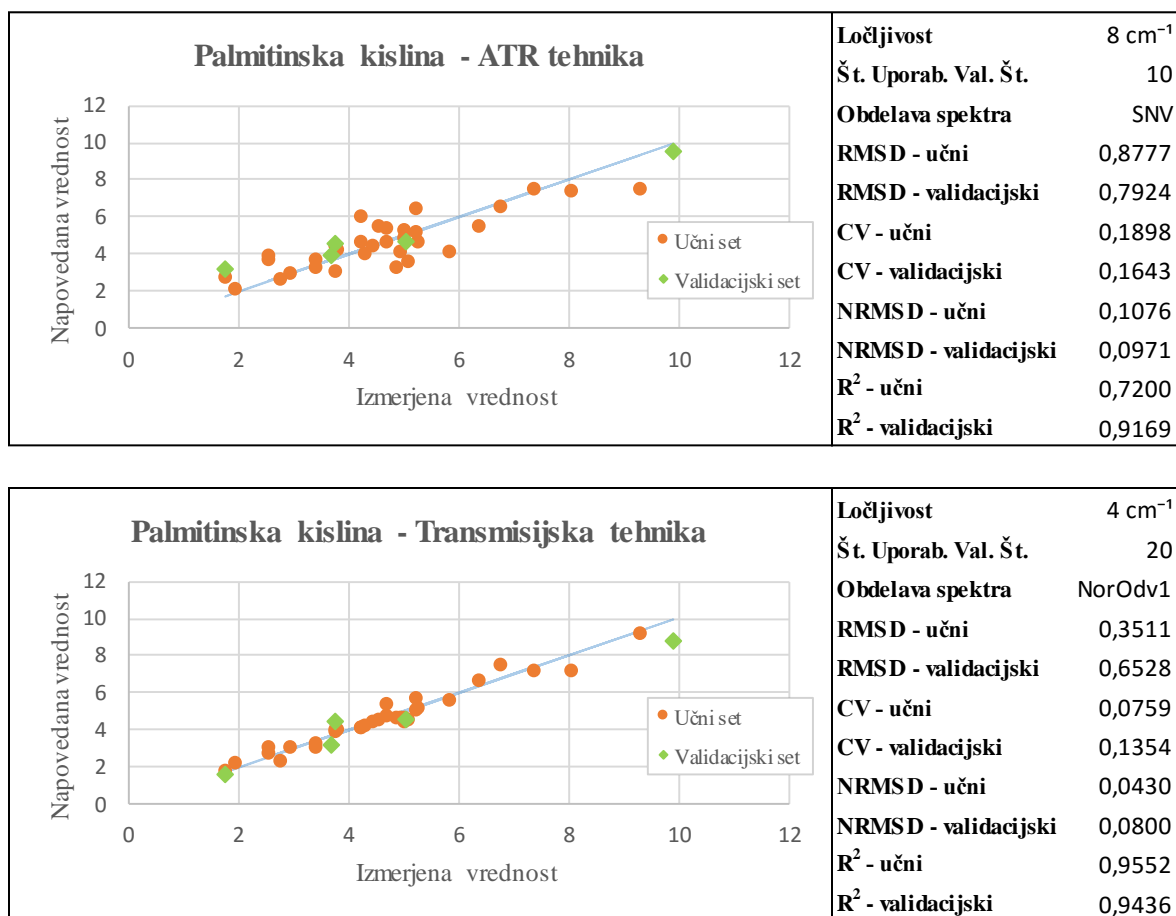
Dobljene napovedne modele smo uporabili za ugotavljanje vsebnosti MK v vzorcih rastlinskih olj. Z obema tehnikama IR spektroskopije smo dobili zelo dober napovedni model pri ugotavljanju vsebnosti α -linolenske kisline. Pri ugotavljanju vsebnosti palmitinske kisline s transmisijsko tehniko, linolne kisline z ATR in transmisijsko tehniko in stearinske kisline s transmisijsko tehniko smo dobili dober napovedni model. Približen napovedni model smo dobili pri ugotavljanju vsebnosti palmitinske, oleinske in stearinske kisline z ATR tehniko. Pri ugotavljanju vsebnosti oleinske kisline s transmisijsko tehniko ter elaidinske kisline z ATR in transmisijsko tehniko pa se je izkazalo, da napovedni model ni dober.

Palmitinska kislina

V primeru ugotavljanja vsebnosti palmitinske kisline smo pri ATR tehniki dobili približen, pri transmisijski tehniki pa dober napovedni model. Pri ATR tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 8 cm^{-1} in z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo spektra pa je najbolj primerna SNV. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9169, za učni set pa 0,7200, zato je napovedni model približen (graf 1). Pri transmisijski tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 4 cm^{-1} , z 20 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in obdelavo vhodnega spektra s prvim odvodom normalizacije. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9436, za učni set pa 0,9552 (graf 1).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost O-H (karboksilna kislina), -C=O (ester, karboksilna kislina), C-C in -C-O ter -CH_2 - skupine. Te funkcionalne skupine so prisotne v strukturi palmitinske kisline. Poleg teh pa v modelu uporabljena valovna števila pripadajo tudi funkcionalnim skupinam, ki jih v strukturi palmitinske kisline ni, to so -HC=CH- (*trans*), C=C, =C-H (*cis*, *trans*), $\text{C}\equiv\text{C}$, C-X (X = Cl, Br, I) in =CH_2 (priloga 4, preglednica VIII).

Graf 1: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje palmitinske kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije



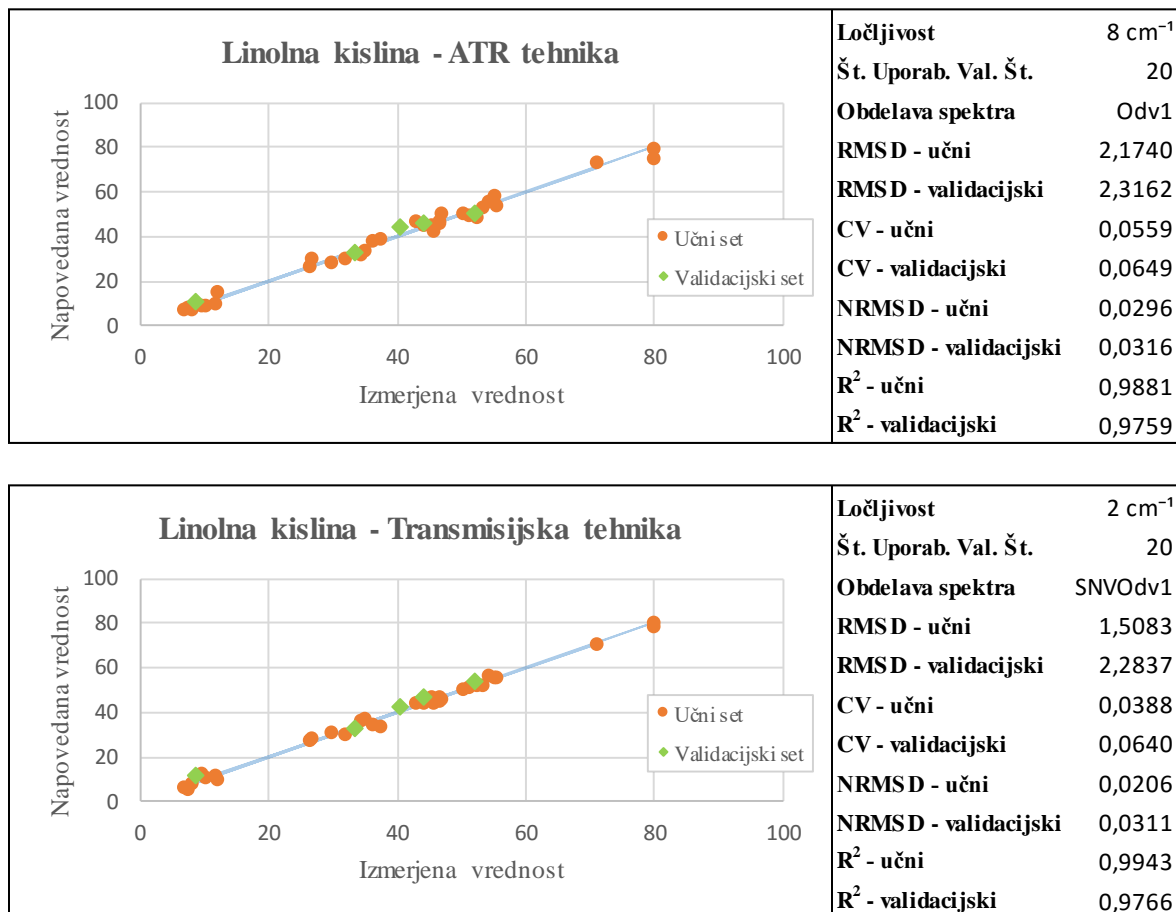
Linolna kislina

V primeru ugotavljanja vsebnosti linolne kisline smo pri obeh tehnikah IR spektroskopije dobili dober napovedni model. Pri ATR tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 8 cm⁻¹ in z 20 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in obdelavo vhodnega spektra s prvim odvodom. Pri tem napovednem modelu je R² za validacijski set znašal 0,9759, za učni set pa 0,9881 (graf 2). Pri transmisijski tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 2 cm⁻¹ in z 20 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega spektra pa je v tem primeru najprimernejši prvi odvod SNV. Pri tem napovednem modelu je R² za validacijski set znašal 0,9766, za učni set pa 0,9943 (graf 2).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost O-H (karboksilna kislina), -C=O (ester, karboksilna kislina) in -C-O, -C-H (CH₃), -HC=CH- (*cis*), C-C, C=C, ter -(CH₂)_n- skupine. Vse te funkcionalne skupine so zastopane v strukturi linolne kisline. Poleg teh pa v modelu uporabljena valovna števila kažejo še na druge funkcionalne skupine, ki jih v strukturi

linolne kisline ni, kot so C-X (X=Cl, Br, I), -HC=CH- (*trans*) in =CH₂ (priloga 4, preglednica IX).

Graf 2: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje linolne kisline z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije

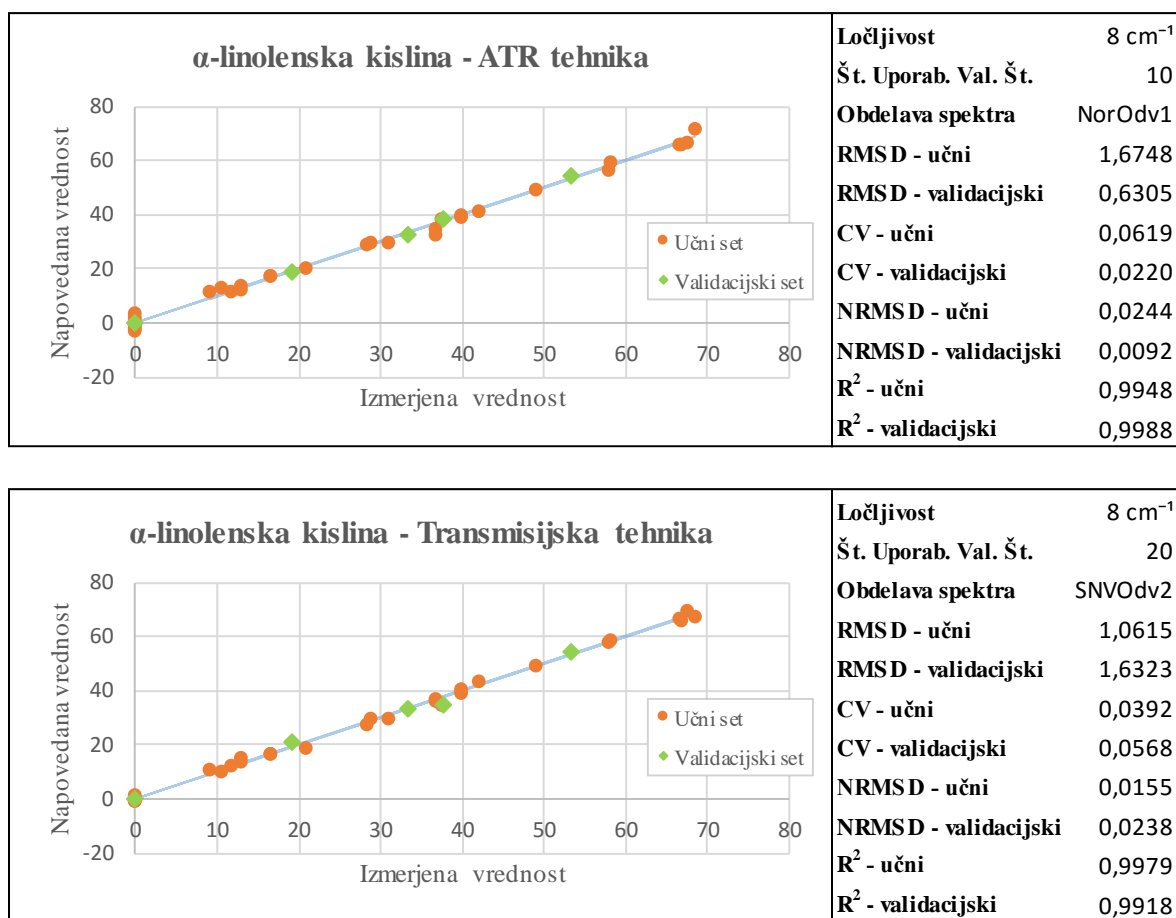


α-Linolenska kislina

V primeru ugotavljanja vsebnosti *α*-linolenske kisline smo pri obeh tehnikah IR spektroskopije dobili zelo dober napovedni model. Pri ATR tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 8 cm⁻¹, z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in obdelavo vhodnega spektra s prvim odvodom normalizacije. Pri tem napovednem modelu je R² za validacijski set znašal 0,9988, za učni set pa 0,9948 (graf 3). Pri transmissijski tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 8 cm⁻¹ in z 20 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega spektra pa je v tem primeru najprimernejši drugi odvod SNV. Pri tem napovednem modelu je R² za validacijski set znašal 0,9918, za učni set pa 0,9979 (graf 3).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost O-H (karboksilna kislina), -C-H (CH₂, CH₃), -C-H in -C-O skupine. Te funkcionalne skupine so prisotne v strukturi α -linolenske kisline. Poleg teh pa v modelu uporabljena valovna števila ustrezajo še funkcionalnima skupinama, ki ju v strukturi α -linolenske kisline ni, to sta =CH₂ in -HC=CH- (trans) (priloga 4, preglednica X).

Graf 3: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje α -linolenske kisline z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije



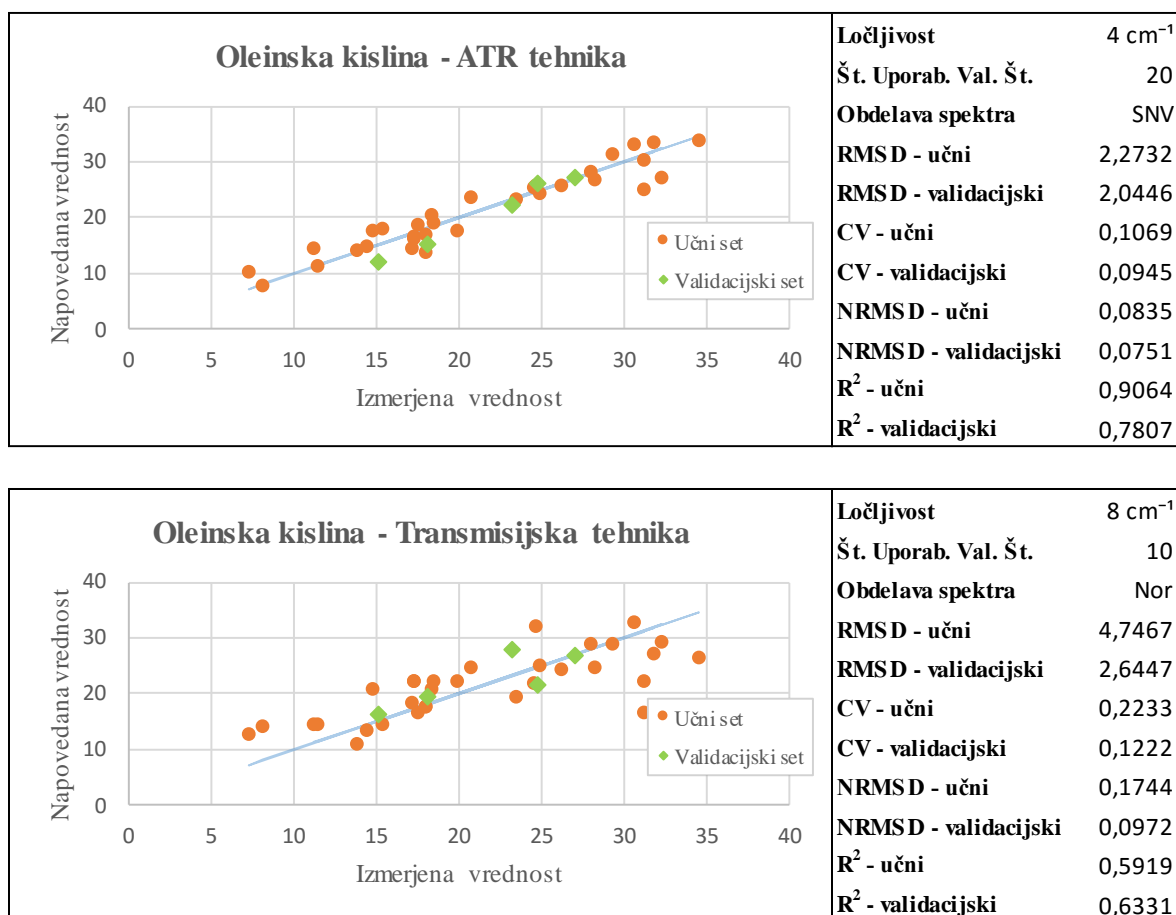
Oleinska kislina

V primeru ugotavljanja vsebnosti oleinske kisline smo pri ATR tehniki IR spektroskopije dobili približen napovedni model, medtem ko smo pri transmissijski tehniki ugotovili, da napovedni model ni dober. Pri ATR tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 4 cm⁻¹, z 20 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in obdelavo vhodnega spektra s SNV. Pri tem napovednem modelu je R² za validacijski set znašal 0,7807, za učni set pa 0,9064 (graf 4). Pri transmissijski tehniki najboljši napovedni model ni dober in smo ga dobili z ločljivostjo 8 cm⁻¹ in z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo

vhodnega spektra pa je bila v tem primeru najprimernejša normalizacija. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,6331, za učni set pa 0,5919 (graf 4).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost O-H (karboksilna kislina), C-C, C-O in –C=O (ester, karboksilna kislina), -C-O, $-(CH_2)_n-$, -HC=CH- (*cis*), =C-H (*cis*) skupine. Te funkcionalne skupine so prisotne v strukturi oleinske kisline. Poleg teh pa v modelu uporabljena valovna števila ustrezajo še funkcionalnim skupinam, ki jih v strukturi oleinske kisline ni, to so $C\equiv C$, C-X (X = Cl, Br, I), -HC=CH- (*trans*) in =C-H (*trans*) (priloga 4, preglednica XI).

Graf 4: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje oleinske kisline z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije



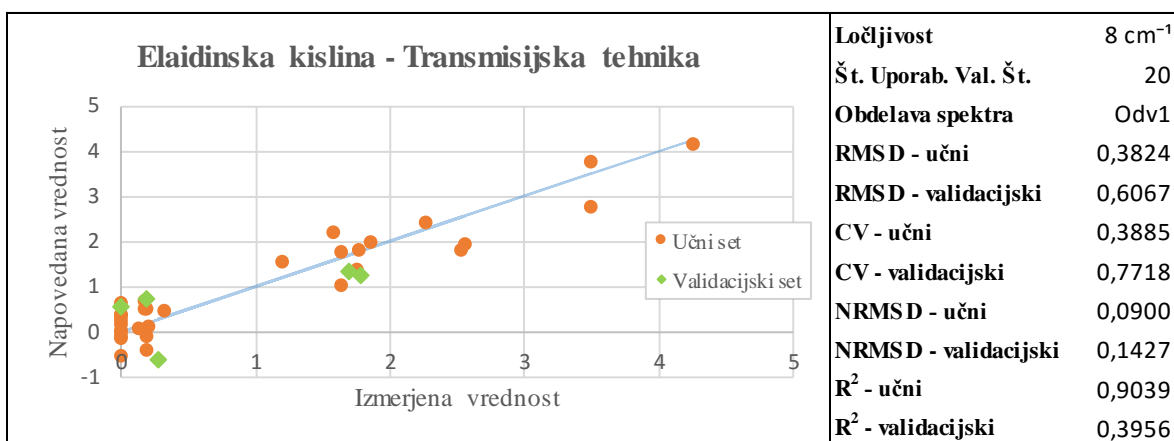
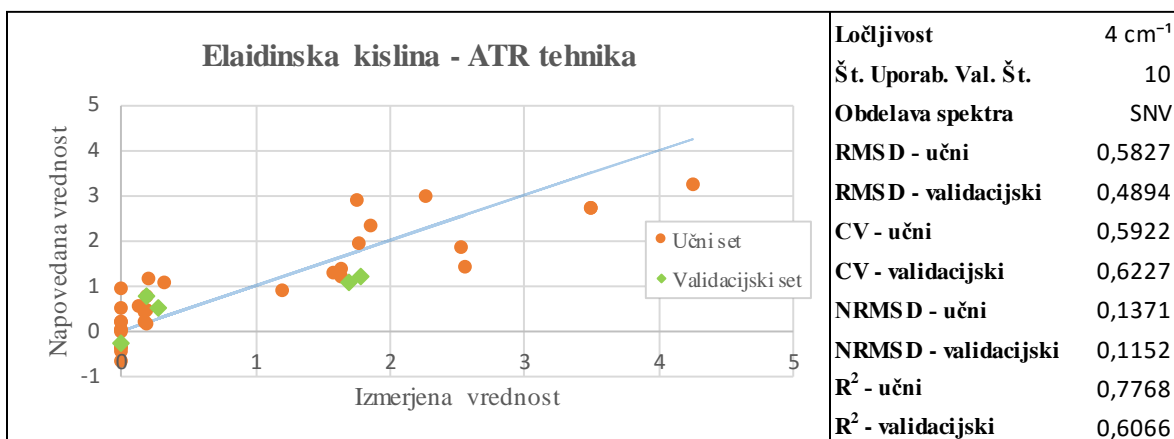
Elaidinska kislina

V primeru ugotavljanja vsebnosti elaidinske kisline smo pri obeh tehnikah IR spektroskopije ugotovili, da napovedni model ni dober. Pri ATR tehniki najboljši napovedni model ni dober in smo ga dobili pri ločljivosti 4 cm⁻¹ in z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili ter

obdelavo vhodnega spektra s SNV. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,6066 in 0,7768 za učni set (graf 5). Pri transmissijski tehniki najboljši napovedni model ni dober in smo ga dobili pri ločljivosti 8 cm^{-1} in z 20 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo spektra pa je bil v tem primeru najprimernejši prvi odvod. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,3956, za učni set pa 0,9039 (graf 5).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost O-H (karboksilna kislina), C-O in -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O, -C-O, $\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-C-H (CH}_2\text{)}$, $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$, O-H, C-C in -HC=CH- (cis) skupine. Te funkcionalne skupine so prisotne v strukturi elaidinske kisline. Poleg tega pa v modelu uporabljena valovna števila kažejo še na funkcionalne skupine, ki jih v strukturi elaidinske kisline ni, to so =CH_2 , $\text{C}\equiv\text{C}$, HC=CH- (trans) in C-X (X=Cl, Br, I) (priloga 4, preglednica XII).

Graf 5: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje elaidinske kisline z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije

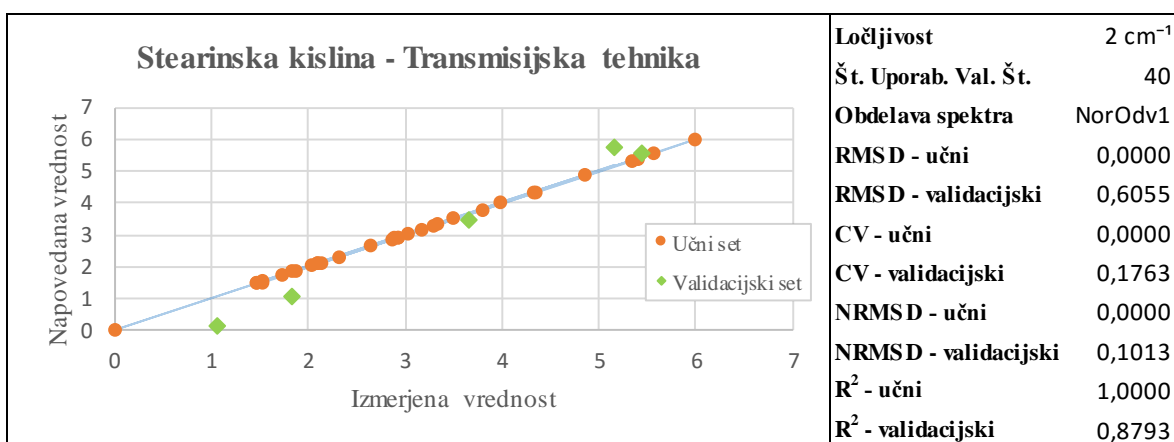
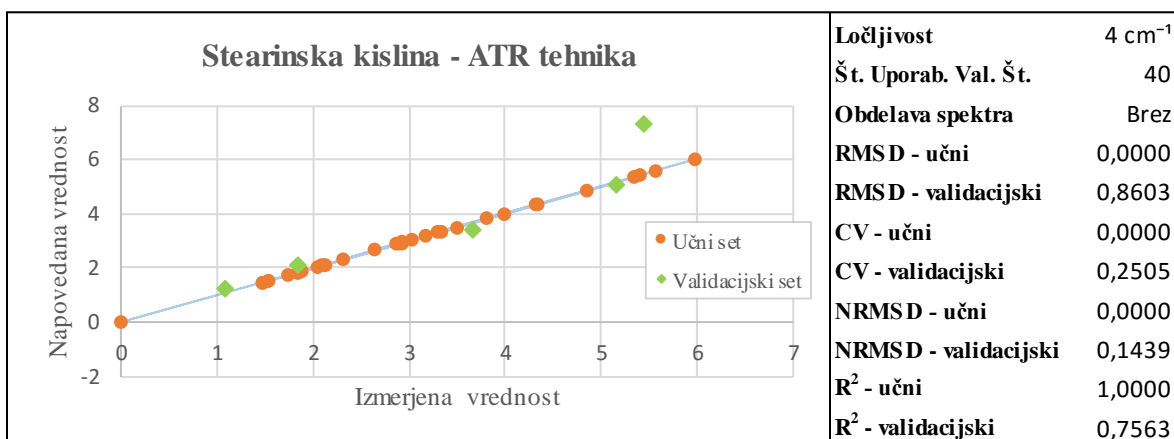


Stearinska kislina

V primeru ugotavljanja vsebnosti stearinske kisline smo pri ATR tehniki IR spektroskopije ugotovili približen napovedni model, medtem ko smo pri transmisijski tehniki dobili dober napovedni model. Pri ATR tehniki smo približen napovedni model dobili pri ločljivosti 4 cm^{-1} in 40 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, kjer pa se je kot najprimernejši izkazal vhodni spekter, brez obdelave (osnovni spekter). Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,7563 in 1,0000 za učni set (graf 6). Pri transmisijski tehniki je najboljši napovedni model dober in smo ga dobili pri ločljivosti 2 cm^{-1} , s 40 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in obdelavo vhodnega spektra s prvim odvodom normalizacije. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,8793, za učni set pa 1,0000 (graf 6). Ker se pri obeh tehnikah uporablja 40 valovnih števil, v povezavi z majhnim številom vzorcev, ki so bili vključeni v raziskavo, je iz obeh grafov razviden pojav pretiranega prilagajanja modelu (ang. »overfitting«). Pri ATR tehniki opazimo tudi pojav, ko le eden izmed vzorcev validacijskega seta močno odstopa od premice (ang. »outlier«), zato je napaka validacijskega seta bistveno večja, kot bi sicer bila. Glede na to, da je iz grafov razvidno delno ujemanje, sklepamo, da bi z uporabo večjega števila vzorcev lahko dobili obetavnejše rezultate.

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O (aldehid, keton), -C-H , O-H (karboksilna kislina), -C-H (CH_2 , CH_3) in C-C skupine. Te funkcionalne skupine so prisotne v strukturi stearinske kisline. Poleg tega pa v modelu uporabljena valovna števila kažejo še na funkcionalne skupine, ki jih v strukturi stearinske kisline ni, to so =CH_2 , C=C , -HC=CH- (*cis*, *trans*),) in C-X ($\text{X} = \text{Cl, Br, I}$) (priloga 4, preglednica XIII).

Graf 6: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje stearinske kisline z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije



4.1.2 Maščobne kisline, ki so bile v oljih redko prisotne

Napovedni model smo uporabili tudi za ugotavljanje vsebnosti MK, ki so bile v oljih redko prisotne. Med slednje spadajo γ -linolenska, vakcenska in gondojska kislina, njihova vsebnost je bila različna od nič le pri manjšem številu vzorcev rastlinskih olj. Za te MK smo težko generirali model na danih meritvah, zato se je za te tri MK izkazalo, da napovedni model ni dober. Čeprav R² v naslednjih primerih nakazuje na dober ali približni napovedni model, ta klasifikacija ni primerna in teh podatkov ne moremo upoštevati kot uporabnih. V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno uporabiti večje število vzorcev rastlinskih olj s temi MK, da bi lahko potrdili ustreznost dobljenih napovednih modelov.

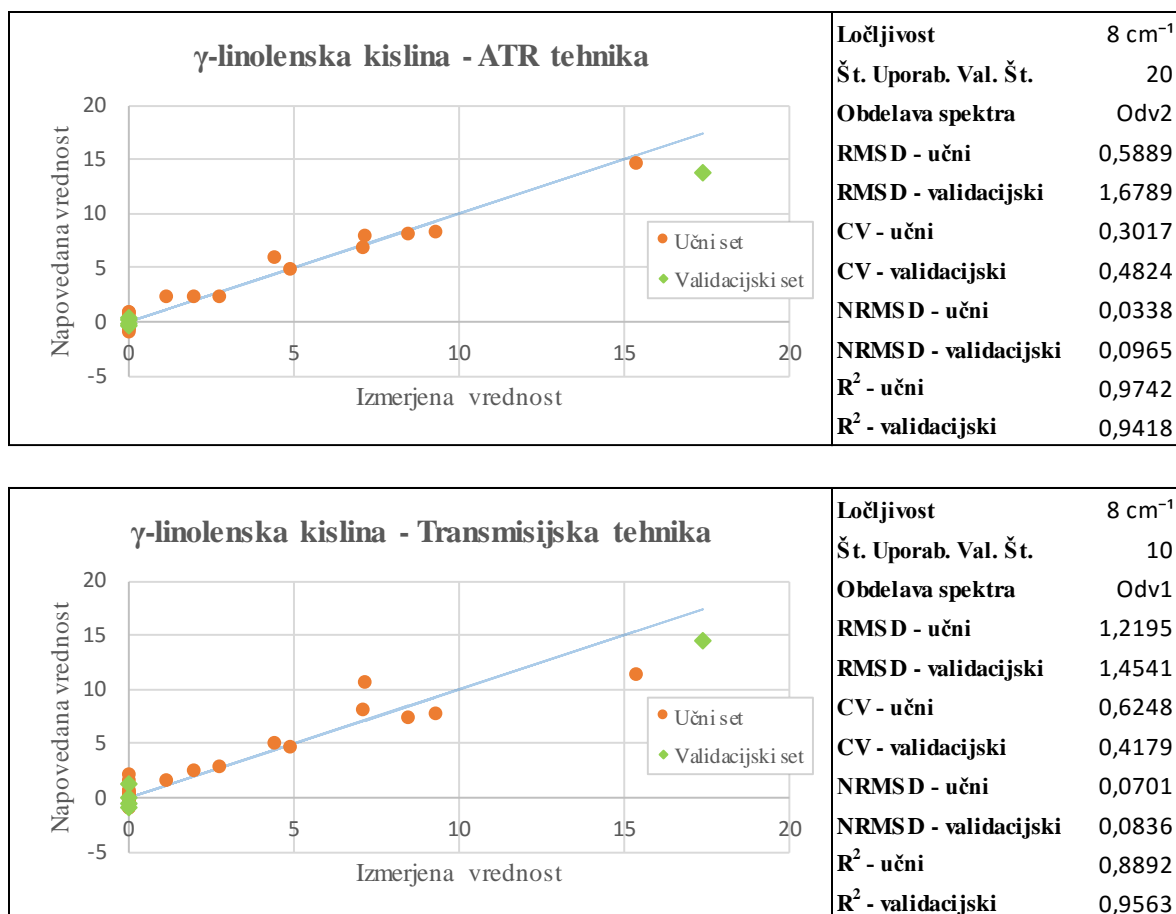
γ -Linolenska kislina

V primeru ugotavljanja vsebnosti γ -linolenske kisline smo pri obeh tehnikah IR spektroskopije ugotovili, da napovedni model ni dober. Pri ATR tehniki najboljši dobljeni napovedni model ni dober, dobili smo ga pri ločljivosti 8 cm⁻¹, z 20 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in obdelavo vhodnega spektra z drugim odvodom. Pri tem napovednem

modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9418, za učni set pa 0,9742 (graf 7). Pri transmissijski tehniki najboljši napovedni model ni dober in smo ga dobili pri ločljivosti 8 cm^{-1} in z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega spektra pa je bil v tem primeru najprimernejši prvi odvod. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9563, za učni set pa 0,8892 (graf 7).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost -C-O , C-O , C-C in -C=O (ester, karboksilna kislina), O-H in $\text{-CH}_2\text{-}$, -HC=CH- (*cis*), =C-H (*cis*) in -C-H (CH_2 , CH_3) skupine. Te funkcionalne skupine so prisotne v strukturi γ -linolenske kisline. Poleg tega pa v modelu uporabljena valovna števila kažejo še na funkcionalni skupini, ki ju v strukturi γ -linolenske kisline ni, to sta -HC=CH- (*trans*) in =C-H (*trans*) (priloga 4, preglednica XIV).

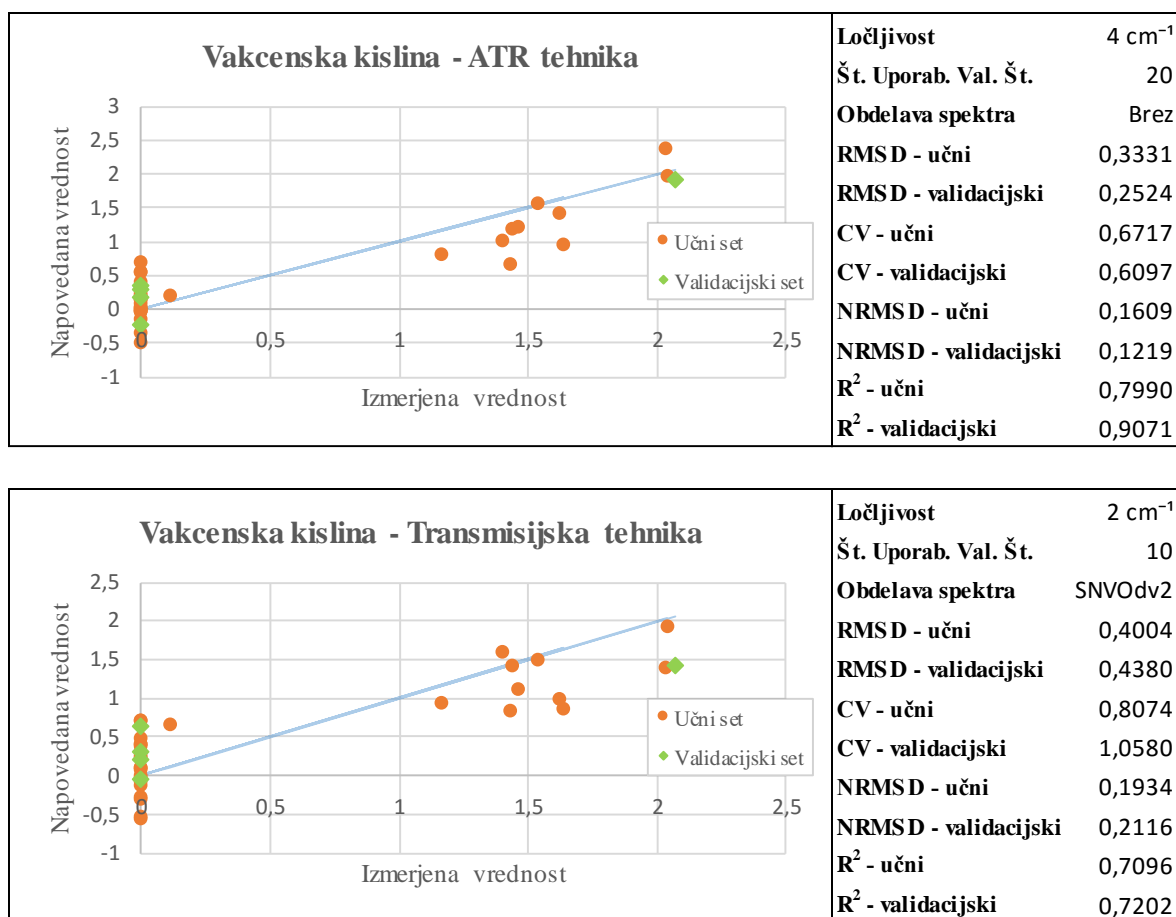
Graf 7: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje γ -linolenske kisline z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije



Vakcenska kislina

V primeru ugotavljanja vsebnosti vakcenske kisline smo pri obeh tehnikah IR spektroskopije ugotovili, da napovedni model ni dober. Pri ATR tehniki najboljši napovedni model ni dober, dobili smo ga pri ločljivosti 4 cm^{-1} , z 20 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in z osnovnim spektrom, brez obdelave. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9071 in 0,7990 za učni set (graf 8). Pri transmissijsko tehniki najboljši napovedni model ni dober, dobili smo ga pri ločljivosti 2 cm^{-1} in z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega spektra pa je bil v tem primeru najprimernejši drugi odvod SNV. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,7202, za učni set pa 0,7096 (graf 8).

Graf 8: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje vakcenske kisline z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije



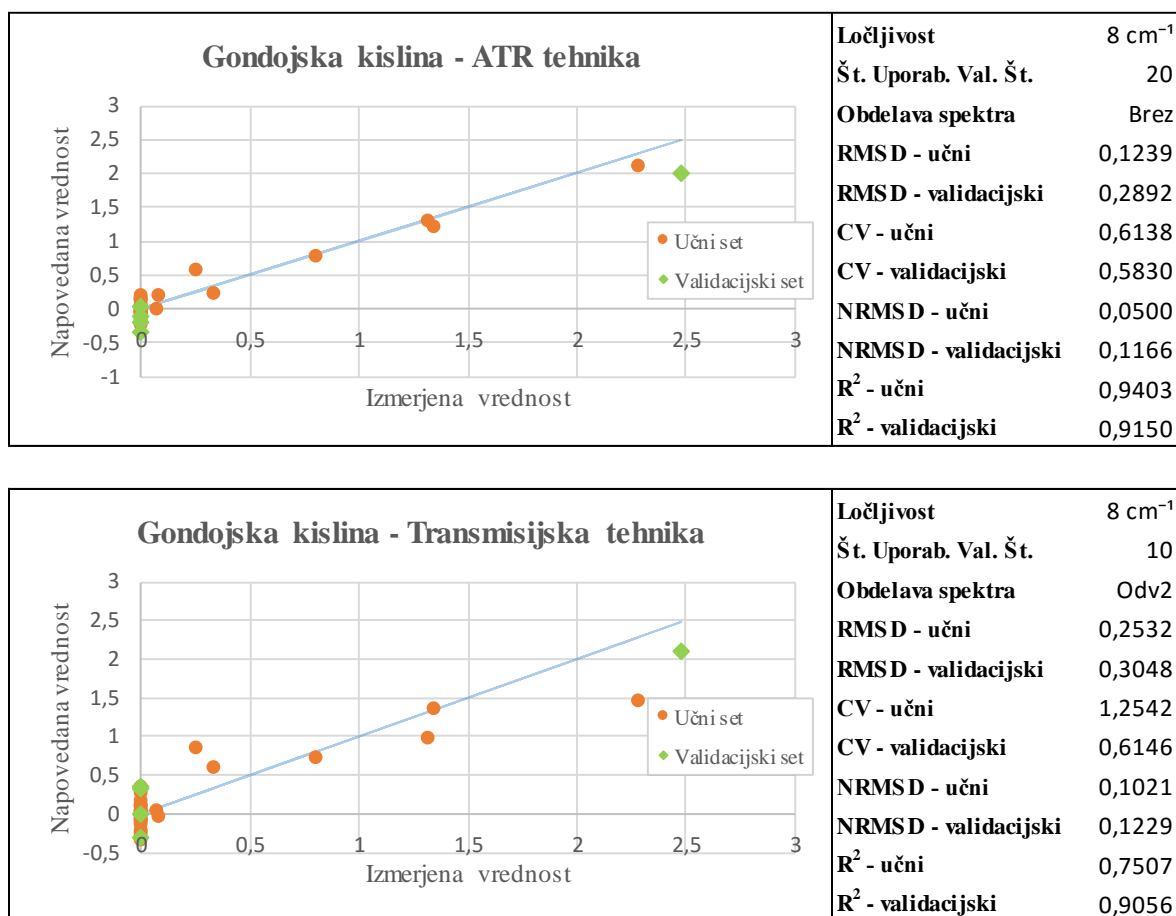
Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost $-C-O$, $C-O$ in $-C=O$ (ester, karboksilna kislina), $O-H$ (karboksilna kislina), $-CH_2-$, $C=O$ (keton) skupine. Te funkcionalne skupine so prisotne v strukturi vakcenske kisline. Poleg teh pa v modelu uporabljena valovna števila

ustrezajo še funkcionalni skupini $C\equiv C$, ki je v strukturi vakuenske kisline ni (priloga 4, preglednica XV).

Gondojska kislina

V primeru ugotavljanja vsebnosti vakuenske kisline smo pri obeh tehnikah IR spektroskopije ugotovili, da napovedni model ni dober. Pri ATR tehniki najboljši napovedni model ni dober, dobili smo ga pri ločljivosti 8 cm^{-1} , z 20 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in vhodnim spektrom, brez obdelave. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9150, za učni set pa 0,9403 (graf 9). Pri transmissijsko tehniki najboljši napovedni model ni dober, dobili smo ga pri ločljivosti 8 cm^{-1} in z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega spektra pa je bil v tem primeru najprimernejši drugi odvod. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9056 in 0,7507 za učni set (graf 9).

Graf 9: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje gondojske kisline z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije



Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost $-C-O$ in $C-O$ (ester, karboksilna kislina), $-CH_2-$, $O-H$ (karboksilna kislina), $-C-H$ (CH_3), $C-C$, $=C-H$ (*cis*) skupine. Te funkcionalne skupine so prisotne v strukturi gondojske kisline. Poleg teh pa v modelu uporabljena valovna števila kažejo še na funkcionalni skupini $=CH_2$ in $=C-H$ (*trans*), ki ju v strukturi gondojske kisline ni (priloga 4, preglednica XVI).

4.1.3 Farmakopejska števila

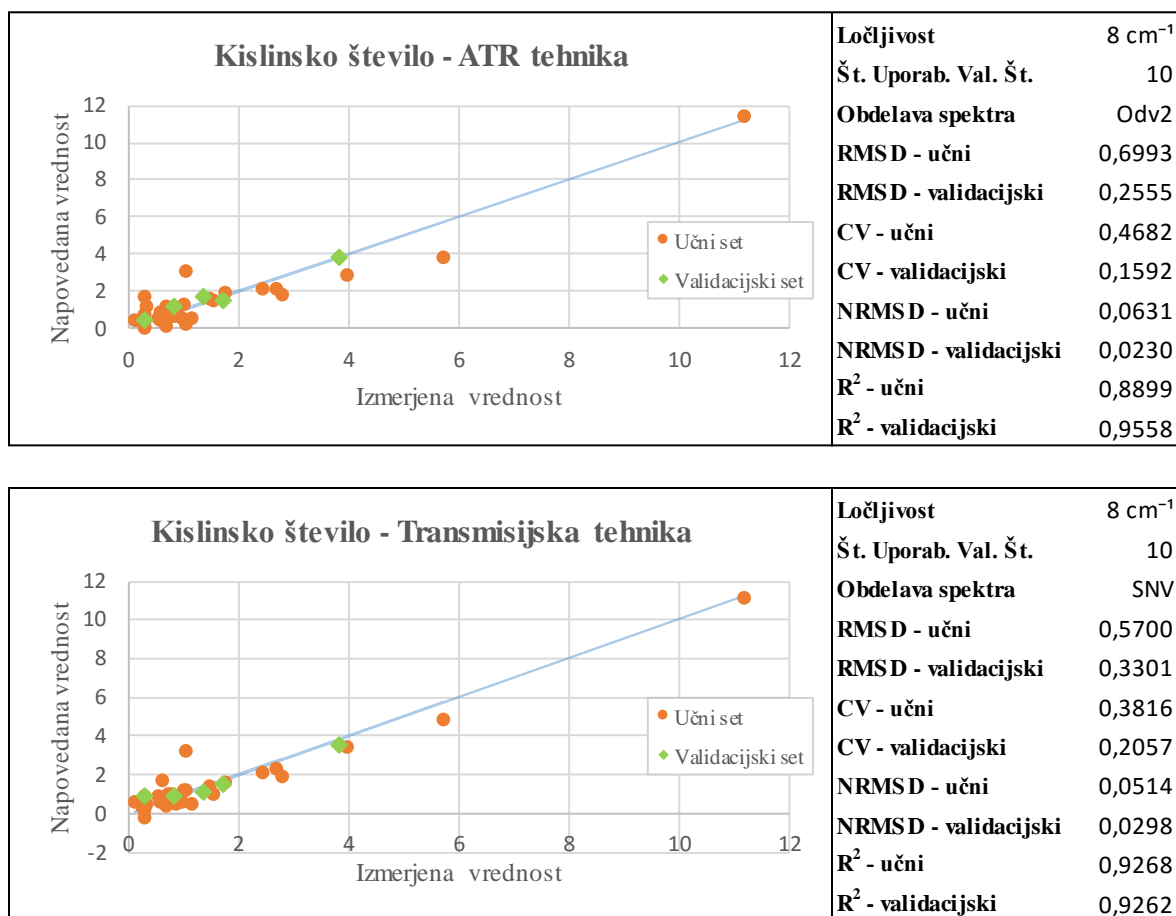
Farmakopejska števila, katerih vrednosti smo ugotavljali, so bila kislinsko, saponifikacijsko, estrsko, hidroksilno, jodno ter peroksidno število in neumiljive snovi. Ugotovili smo, da je napovedni model dober v primeru ugotavljanja vrednosti kislinskega in jodnega števila z obema tehnikama IR spektroskopije, hidroksilnega in peroksidnega števila z ATR tehniko ter saponifikacijskega števila s transmisijsko tehniko. Približen napovedni model smo dobili pri ugotavljanju vrednosti estrskega in hidroksilnega števila s transmisijsko tehniko. V primeru ugotavljanja vrednosti neumiljivih snovi z obema tehnikama IR spektroskopije, peroksidnega števila s transmisijsko tehniko ter saponifikacijskega in estrskega števila z ATR tehniko pa se je izkazalo, da napovedni model ni dober.

Kislinsko število

V primeru ugotavljanja vrednosti kislinskega števila smo pri obeh tehnikah IR spektroskopije v najboljšem primeru dobili dober napovedni model. Pri ATR tehniko smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 8 cm^{-1} in z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega spektra pa je bil v tem primeru najbolj primeren drugi odvod. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9558, za učni set pa 0,8899 (graf 10). Pri transmisijski tehniko smo najboljši napovedni model dobili z enako ločljivostjo in številom valovnih števil kot pri ATR tehniko, za obdelavo vhodnega spektra pa se je v tem primeru kot najboljša funkcija izkazala SNV. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9262, za učni set pa 0,9268 (graf 10).

Najboljši napovedni model pri obeh tehnikah IR spektroskopije uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost $-C=O$ (ester, karboksilna kislina) in $C=O$ skupine. Prisotnost teh funkcionalnih skupin se sklada z definicijo kislinskega števila, ki predstavlja merilo za količino prostih karboksilnih skupin v trigliceridih (priloga 4, preglednica XVII).

Graf 10: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje kislinskega števila z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije



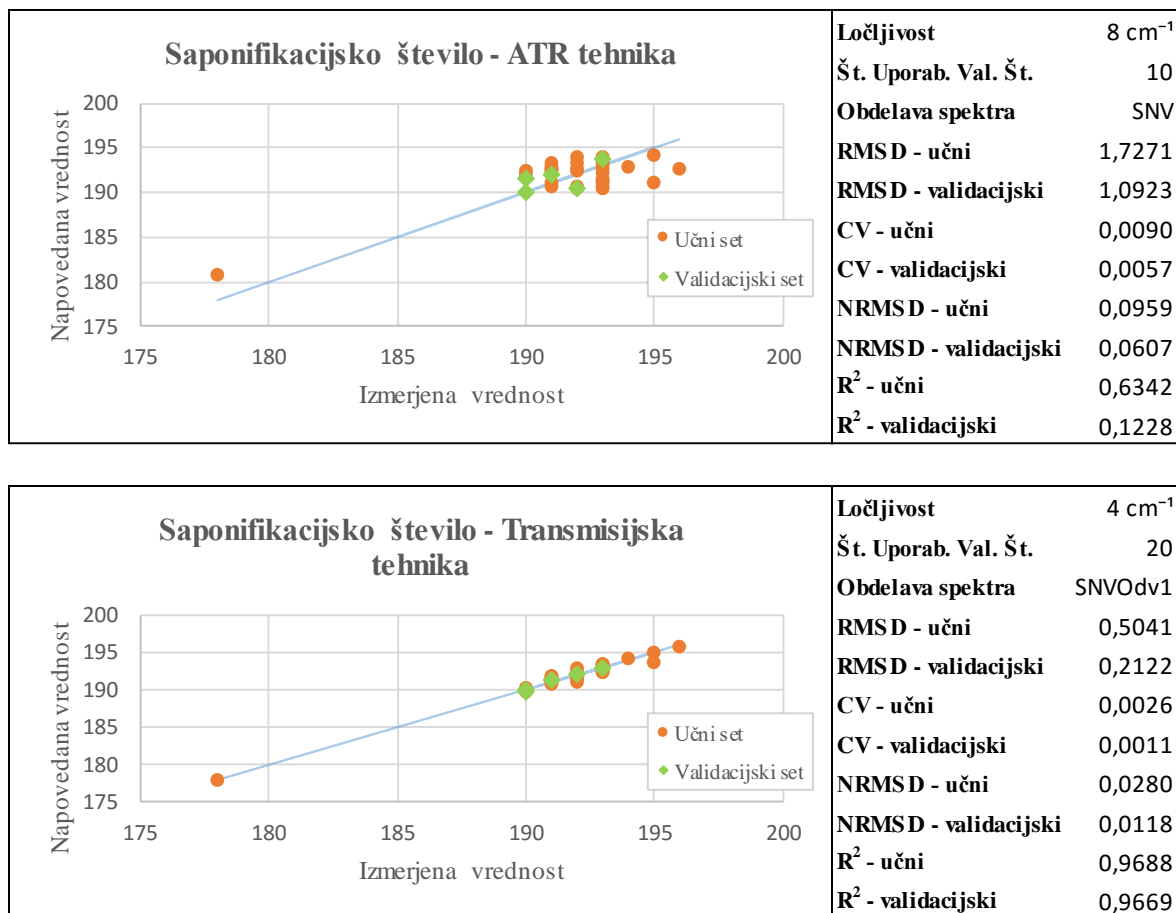
Saponifikacijsko število

Pri ugotavljanju vrednosti saponifikacijskega števila smo pri ATR tehniki IR spektroskopije ugotovili, da napovedni model ni dober, medtem ko smo pri transmisijski tehniki dobili dober napovedni model. Pri ATR tehniki najboljši napovedni model ni dober in smo ga dobili pri ločljivosti 8 cm⁻¹ in z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega spektra pa je bila v tem primeru najprimernejša SNV. Pri tem napovednem modelu je R² za validacijski set znašal 0,1228, za učni set pa 0,6342 (graf 11). Transmisijska tehnika izkazuje najboljši dober napovedni model pri ločljivosti 4 cm⁻¹, z 20 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in obdelavo vhodnega spektra s prvim odvodom SNV. Pri tem napovednem modelu je R² za validacijski set znašal 0,9669 in 0,9688 za učni set (graf 11).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost C-O skupine znotraj estrov in karboksilnih kislin, ter -C-O, O-H, O-H (karboksilna kislina) funkcionalne skupine. Vse omenjene funkcionalne skupine se skladajo z definicijo saponifikacijskega števila, ki je merilo za

prisotnost prostih karboksilnih kislin in estrov. Poleg teh funkcionalnih skupin pa so v modelu uporabljena tudi valovna števila, ki ustrezajo -CH₂- in -C-H- (CH₂, CH₃), C-C, C≡C funkcionalnim skupinam (priloga 4, preglednica XVIII).

Graf 11: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje saponifikacijskega števila z ATR in transmisijsko tehniko IR spektroskopije

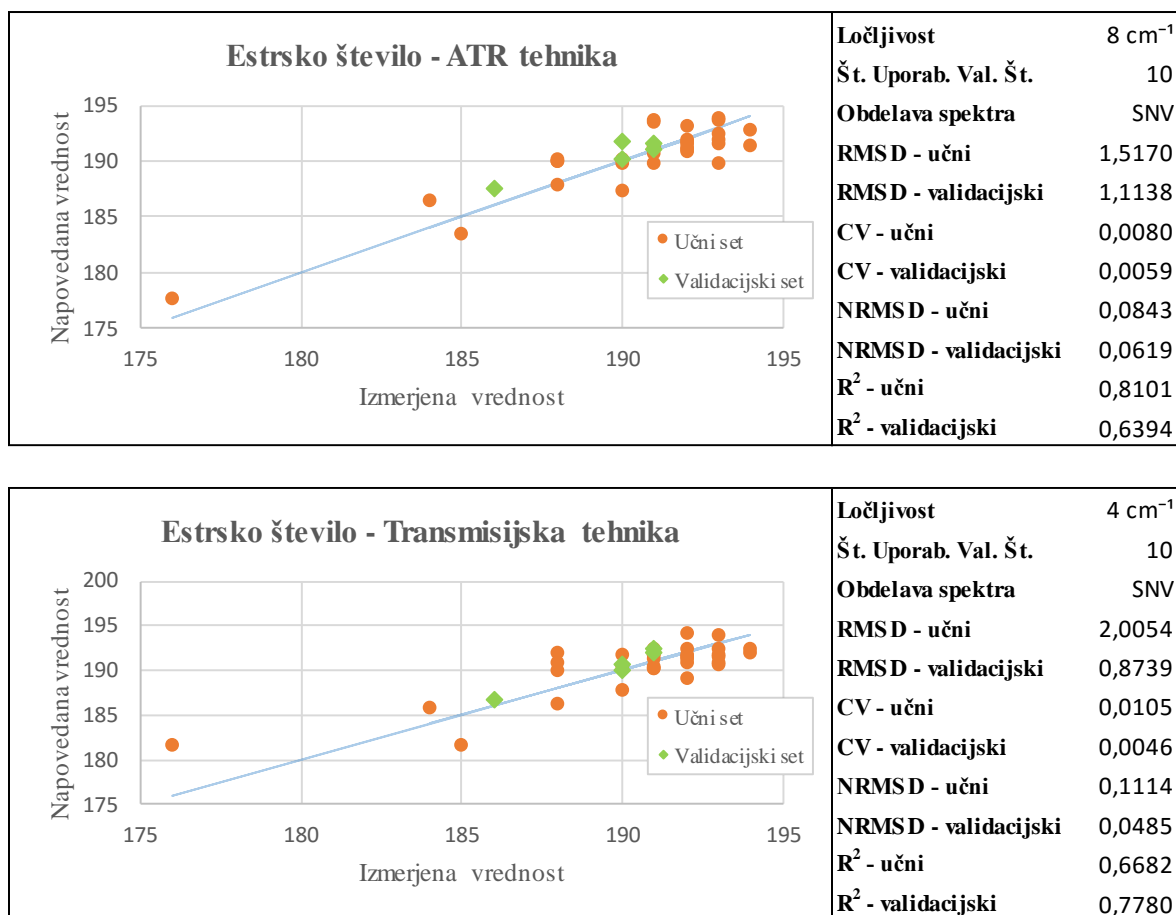


Estrsko število

Pri ugotavljanju vrednosti estrskega števila smo pri ATR tehniki IR spektroskopije ugotovili, da napovedni model ni dober, medtem ko smo pri transmisijski tehniki dobili približen napovedni model. Pri ATR tehniki najboljši možni napovedni model ni dober in smo ga dobili pri ločljivosti 8 cm⁻¹, z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in obdelavo vhodnega spektra s SNV. Pri tem napovednem modelu je R² za validacijski set znašal 0,6394, za učni set pa 0,8101 (graf 12). Pri transmisijski tehniki pa smo dobili približen napovedni model. Dobili smo ga pri ločljivosti 4 cm⁻¹, z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega spektra pa je bila tudi v tem primeru najprimernejša SNV. Pri tem napovednem modelu je R² za validacijski set znašal 0,7780, ter 0,6682 za učni set (graf 12).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost estrskih skupin ($-C=O$ in $-C-O$), kar se sklada z definicijo estrskega števila, ki je merilo za količino estrov v vzorcu trigliceridov. Poleg tega pa so v modelu uporabljena tudi valovna števila, ki ustrezajo $-C-H-$ (CH_2), $O-H$, $C-C$, $-CH_2$ in $=CH_2$ funkcionalnim skupinam (priloga 4, preglednica XIX).

Graf 12: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje estrskega števila z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije



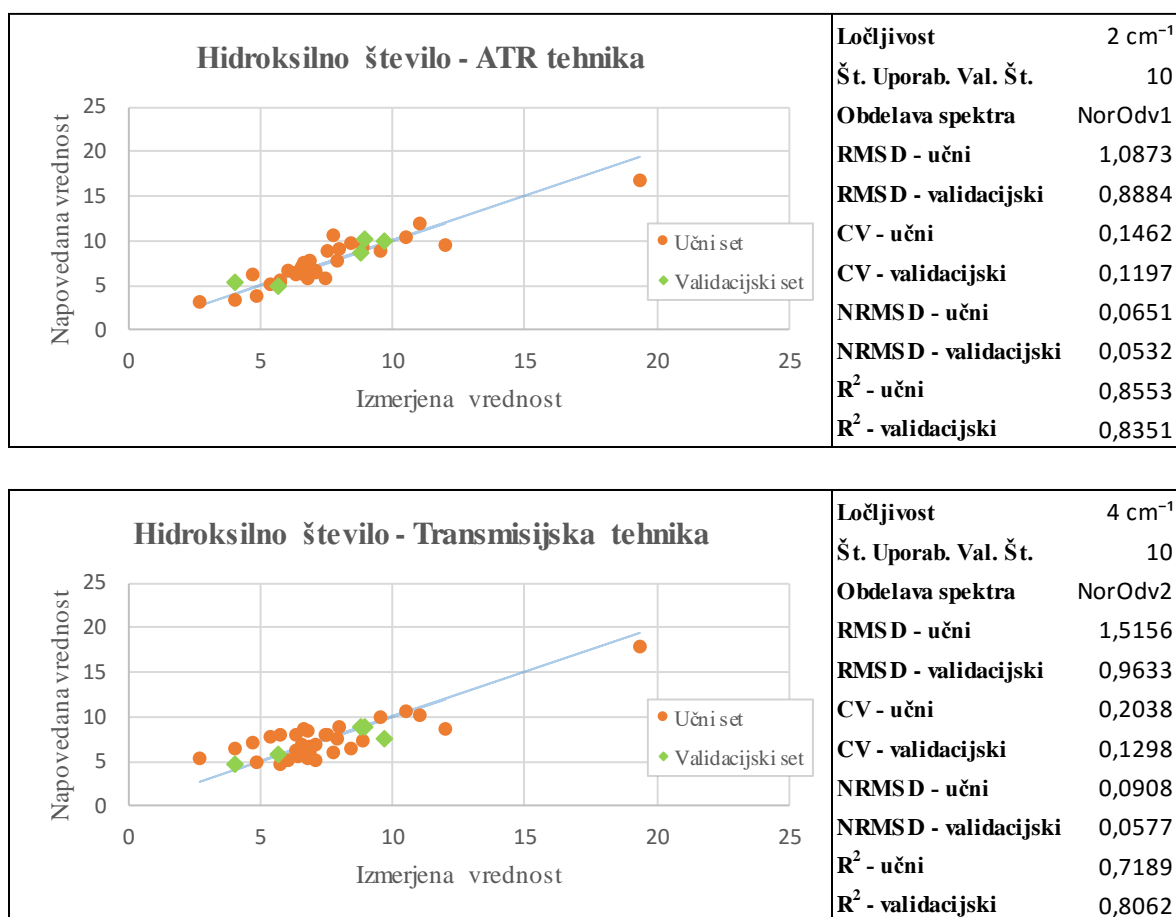
Hidroksilno število

V primeru ugotavljanja vrednosti hidroksilnega števila smo pri ATR tehniki dobili dober napovedni model, medtem ko smo pri transmissijski tehniki dobili približen napovedni model. Pri ATR tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 2 cm⁻¹, z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in obdelavo vhodnega spektra s prvim odvodom normalizacije. Pri tem napovednem modelu je R² za validacijski set znašal 0,8351, za učni set pa 0,8553 (graf 13). Pri transmissijski tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 4 cm⁻¹ in z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega

spektra pa je bil v tem primeru najprimernejši drugi odvod normalizacije. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,8062, ter 0,7189 za učni set (graf 13).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost hidroksilnih skupin (O-H). To se sklada z definicijo hidroksilnega števila, ki je merilo za količino hidroksilnih skupin v vzorcu. Poleg tega pa so v modelu uporabljena tudi valovna števila, ki ustrezajo -C=O, -C-H- (CH₂), =C-H (*cis*, *trans*), -C=O, -HC=CH-, C≡C, C-X (X = Cl, Br, I), C-C in -(CH₂)_n funkcionalnim skupinam (priloga 4, preglednica XX).

Graf 13: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje hidroksilnega števila z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije



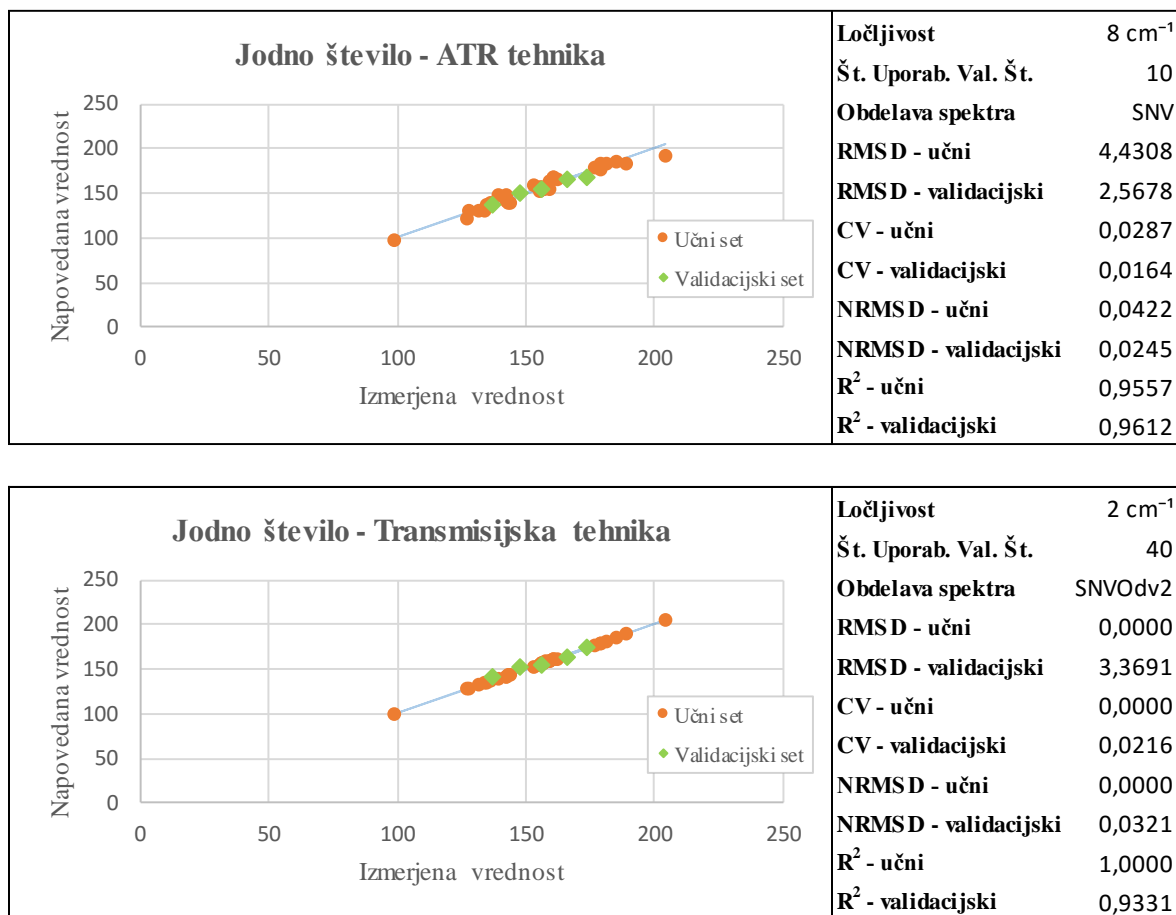
Jodno število

V primeru ugotavljanja vrednosti jodnega števila smo pri obeh tehnikah IR spektroskopije dobili dober napovedni model. Pri ATR tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 8 cm⁻¹, z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in obdelavo vhodnega spektra s SNV. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9612 in 0,9557

za učni set (graf 14). Pri transmisijijski tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 2 cm^{-1} in s 40 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega spektra pa je bil v tem primeru najprimernejši drugi odvod SNV. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9331, za učni set pa 1,0000 (graf 14).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost dvojnih vezi ($-\text{HC}=\text{CH}-$ in $=\text{C}-\text{H}$ (*cis*, *trans*)). To se sklada z definicijo jodnega števila, ki je merilo za količino nenasičenih MK v vzorcu. Poleg tega pa so v modelu uporabljena tudi valovna števila, ki ponazarjajo C-H- (CH_2 , CH_3), $=\text{C}-\text{H}$ (*cis*, *trans*) O-H, C-C, $-\text{HC}=\text{CH}-$ (*cis*), C-X (X = Cl, Br, I) in $-(\text{CH}_2)_n$ funkcionalne skupine (priloga 4, preglednica XXI).

Graf 14: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje jodnega števila z ATR in transmisijijsko tehniko IR spektroskopije



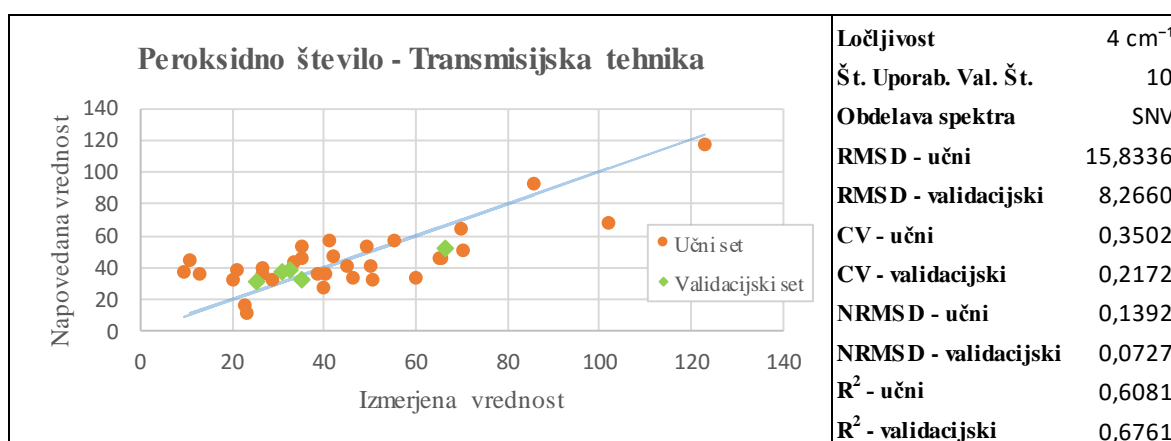
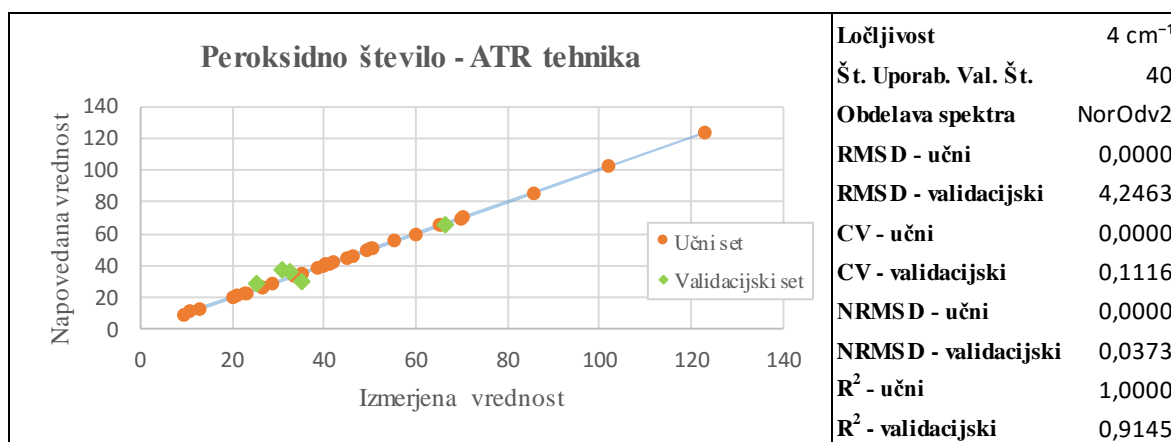
Peroksidno število

V primeru ugotavljanja vrednosti peroksidnega števila smo pri ATR tehniki dobili dober napovedni model, medtem ko smo ugotovili, da pri transmisijijski tehniki napovedni model

ni dober. Pri ATR tehniki smo najboljši napovedni model dobili pri ločljivosti 4 cm^{-1} in s 40 v modelu uporabljenimi valovnimi števili ter obdelavo vhodnega spektra z drugim odvodom normalizacije. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,9145, za učni set pa 1,0000 (graf 15). Pri transmissijski tehniki najboljši napovedni model ni dober in smo ga dobili pri ločljivosti 4 cm^{-1} , z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili, za obdelavo vhodnega spektra pa je bila v tem primeru najprimernejša SNV. Pri tem napovednem modelu je R^2 za validacijski set znašal 0,6761 in 0,6081 za učni set (graf 15).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost karbonilne ($\text{C}=\text{O}$) skupine aldehydov in ketonov. Slednje se sklada z definicijo peroksidnega števila, s katerim določamo produkte oksidacije maščobnih kislin (aldehidi, ketoni, lipidni peroksidi). Poleg tega pa so v modelu uporabljena tudi valovna števila, ki ponazarjajo $-\text{HC}=\text{CH}-$, $-\text{C}=\text{O}$ in $\text{C}-\text{O}$ (ester, karboksilna skupina), $-\text{C}-\text{H}$ (CH_2), $-\text{HC}=\text{CH}-$ (*cis*), $-\text{C}-\text{H}$ (CH_3), $\text{O}-\text{H}$, $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}-\text{X}$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$), $\text{C}\equiv\text{C}$ in $=\text{CH}_2$ funkcionalne skupine (priloga 4, preglednica XXII).

Graf 15: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje peroksidnega števila z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije

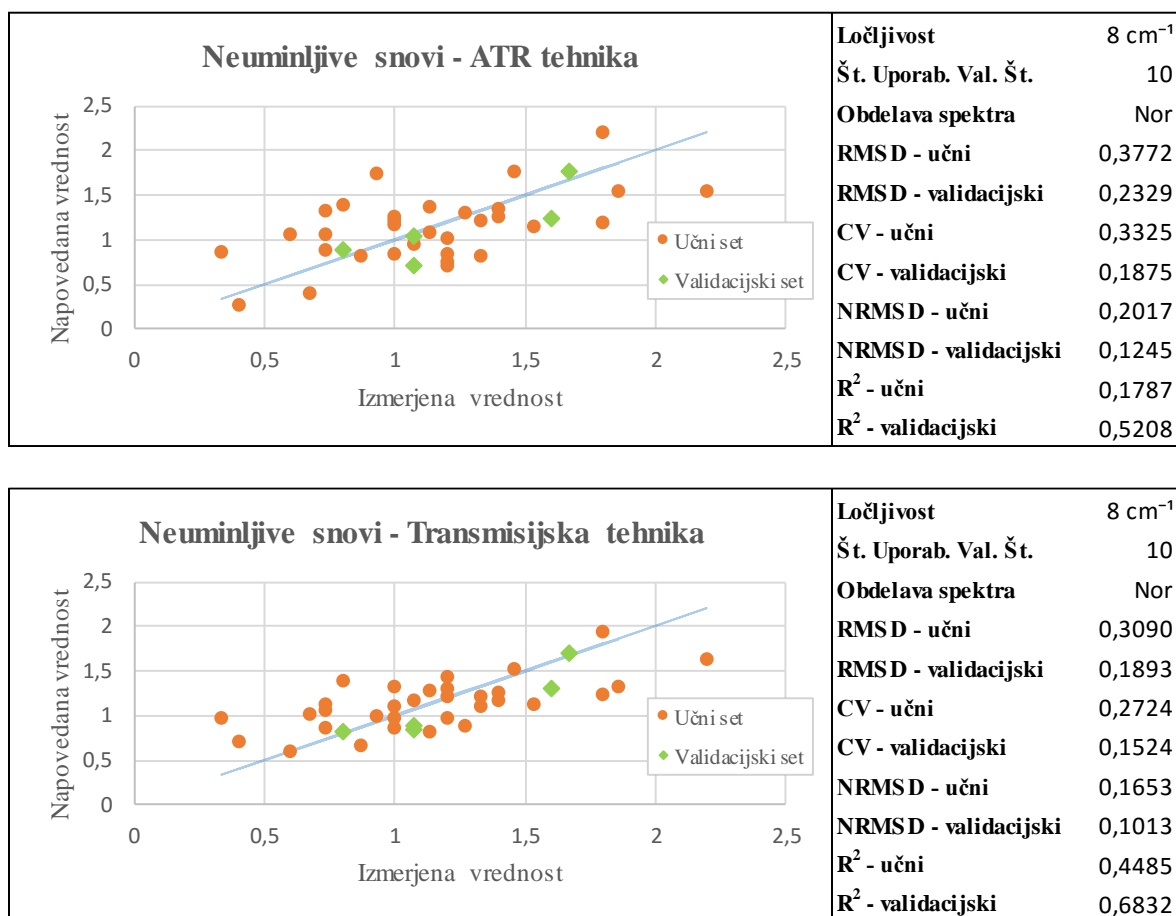


Neumiljive snovi

V primeru ugotavljanja vsebnosti neumiljivih snovi smo ugotovili, da pri nobeni tehniki IR spektroskopije nismo dobili uporabnih napovednih modelov. Pri ATR in transmissijski tehniki najboljši napovedni model ni dober in smo ga v obeh primerih dobili pri ločljivosti 8 cm^{-1} , z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili in z obdelavo vhodnega spektra z normalizacijo. Pri tem napovednem modelu je R^2 pri ATR tehniki za validacijski set znašal 0,5208, za učni set pa 0,1787 (graf 16). Pri transmissijski tehniki je R^2 za validacijski set znašal 0,6832, za učni set pa 0,4485 (graf 16).

Najboljši napovedni model, pri obeh tehnikah IR spektroskopije, uporablja valovna števila, ki v vzorcih rastlinskih olj kažejo na prisotnost $\text{C}=\text{O}$ (ester, karboksilna kislina), $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}=\text{O}$ (aldehid, keton), $\text{C}-\text{H}$, $\text{O}-\text{H}$ (karboksilna kislina), $=\text{C}-\text{H}$ (*cis*, *trans*), $-\text{C}-\text{H}$ (CH_2 , CH_3) in $\text{C}=\text{O}$ funkcionalnih skupin. V neumiljivi del spadajo zelo različne spojine, zato za nobeno od naštetih funkcionalnih skupin ne moremo trditi, da v tej frakciji ni zastopana (priloga 4, preglednica XXIII).

Graf 16: Prikaz rezultatov najboljšega modela za določanje neumiljivih snovi z ATR in transmissijsko tehniko IR spektroskopije



4.2 Vrednotenje parametrov napovedne metode

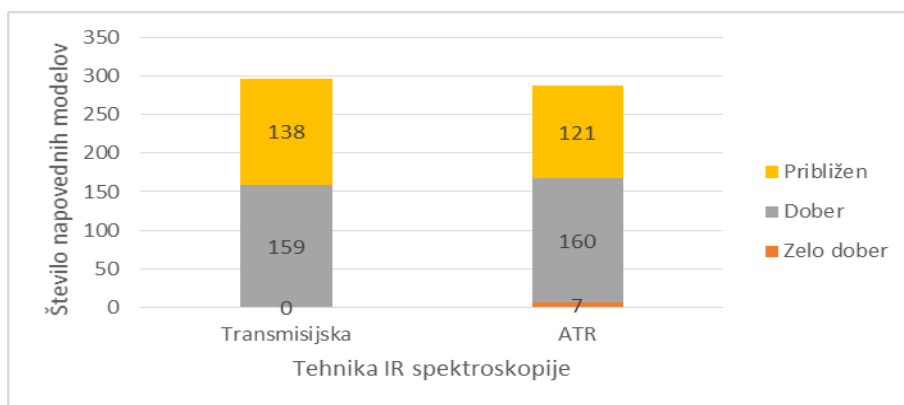
Za 16 proučevanih spremenljivk smo skupno dobili 2592 napovednih modelov, ki smo jih glede na vrednosti R^2 klasificirali v 5 skupin. Ovrednotili smo 4 parametre, in sicer tehniko IR spektroskopije (ATR in transmisijska tehnika), ločljivost (2, 4, 8 cm^{-1}), obdelavo vhodnega spektra (osnovni spekter, prvi odvod, drugi odvod, SNV, prvi odvod SNV, drugi odvod SNV, normalizacija ter prvi in drugi odvod normalizacije) in število v modelu uporabljenih valovnih števil (10, 20, 40). V splošnem smo, glede na znanstvene raziskave, vrednosti R^2 , večje od 0,66, opredelili kot sprejemljive, vrednosti R^2 , manjše od 0,66, pa smo opredelili kot nesprejemljive (85). V tem poglavju smo se osredotočili na napovedne modele, ki predstavljajo sprejemljive vrednosti R^2 glede na učni in validacijski set vzorcev.

Glede na klasifikacijo smo ugotovili, da je od skupno 2592 napovednih modelov, 585 uporabnih in 2007 neuporabnih. Uporabni napovedni modeli imajo sprejemljive vrednosti R^2 , te so večje od 0,66 za učni in validacijski set vzorcev. Znotraj 585 uporabnih napovednih modelov ni nobenega odličnega, 7 je zelo dobrih, 319 dobrih in 259 je približnih napovednih modelov.

4.2.1 Tehnika infrardeče spektroskopije

V splošnem smo ugotovili, da sta tehniki IR spektroskopije med seboj primerljivi, kar prikazuje graf 17. Vse zelo dobre napovedne modele smo dobili z ATR tehniko. To je s stališča snemanja spektrov vzorcev rastlinskih olj dobro, saj je ATR tehnika v primerjavi s transmisijsko enostavnejša in hitrejša. Pri snemanju vzorcev rastlinskih olj z ATR tehniko ne potrebujemo nobene predpriprave vzorca, saj je dovolj kapljica olja, ki prekrije kristal, izognemo pa se tudi uporabi topil. Za transmisijsko tehniko je potrebna predpriprava vzorca, ki ga nanašamo na NaCl ploščico, zato moramo zagotoviti takšno konsistenco vzorca, ki s ploščice ne odteka in je hkrati dovolj transparenten. Takšno konsistenco zagotovimo z redčenjem rastlinskih olj s topili. Le v nekaj primerih (palmitinska in stearinska kislina ter estrsko in saponifikacijsko število) je transmisijska tehnika v primerjavi z ATR dala boljše rezultate. Obe tehniki IR spektroskopije sta glede na rezultate medsebojno primerljivi, vendar pa je ATR tehnika v splošnem primernejša za določanje proučevanih spremenljivk v rastlinskih oljih, zlasti z vidika enostavnosti in hitrosti izvedbe.

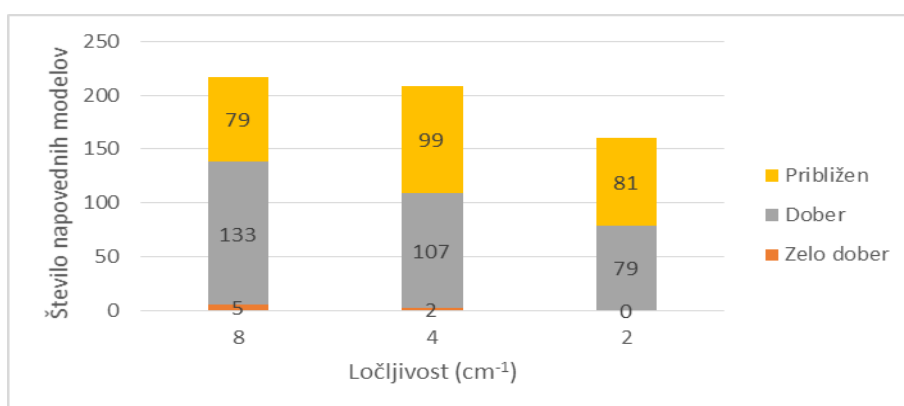
Graf 17: Prikaz uporabnih klasifikacij napovednega modela glede na tehniko IR spektroskopije



4.2.2 Ločljivost

Izmed treh izbranih ločljivosti (2, 4, 8 cm^{-1}), pri katerih smo snemali spektre vzorcev rastlinskih olj, se je v splošnem izkazalo, da so rezultati najboljše pri najmanjši ločljivosti, ki je 8 cm^{-1} , kar je razvidno iz grafa 18. Pri najmanjši ločljivosti smo dobili najboljše modele, kar kaže na to, da spekter vsebuje dovolj informacij. Pri višji ločljivosti (2 in 4 cm^{-1}) smo dobili slabše rezultate, kar nakazuje na to, da višja ločljivost v spekter vnese podrobnosti, ki na uporabljen napovedni model slabše vplivajo. Manjša ločljivost daje manjše število točk v spektru in tudi skrajša čas snemanja vzorcev in s tem zagotavlja hitrejšo snemanje vzorcev. Manjše število točk privede tudi do bolj zglajenega spektra. Rezultati kažejo, da na takšnih spektrih uporabljen napovedni model bolj učinkovito najde relevantna napovedna valovna števila, saj so napake v splošnem pri uporabi nižje ločljivosti nižje.

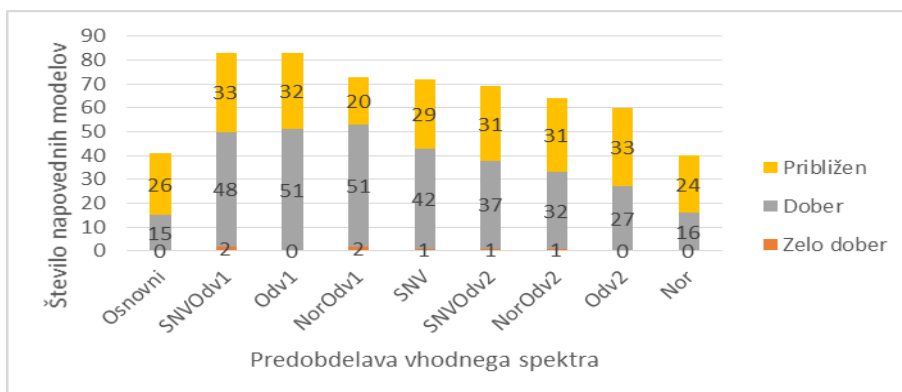
Graf 18: Prikaz uporabnih klasifikacij napovednega modela glede na ločljivost



4.2.3 Obdelava spektra

Za obdelavo osnovnega spektra sta se prvi odvod in prvi odvod SNV izkazala kot najboljša za uporabljen napovedni model, kot je prikazano na grafu 19. Nekoliko slabši, vendar še vedno dober rezultat daje tudi prvi odvod normalizacije. Iz tega sklepamo, da se v splošnem kot najboljša obdelava osnovnega spektra izkaže prvi odvod. Odvod poudari spremembe v naklonu, zato osnovni spekter pretvori v potencialno uporabnejšo obliko.

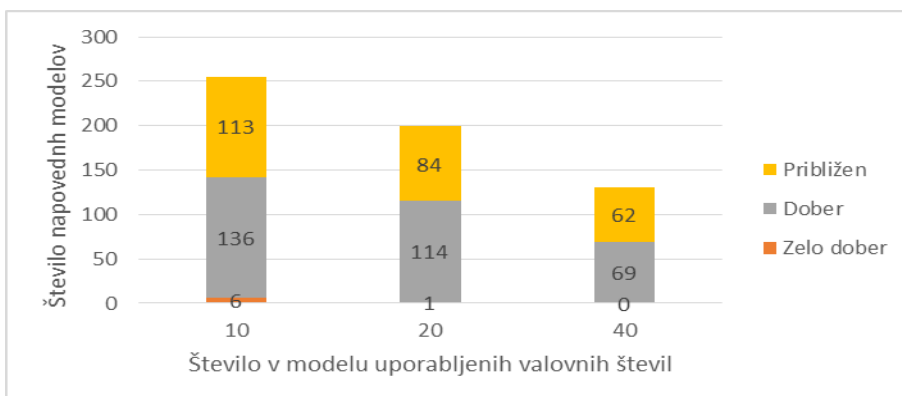
Graf 19: Prikaz uporabnih klasifikacij napovednega modela glede na obdelavo vhodnega spektra



4.2.4 Število v modelu uporabljenih valovnih števil

Glede števila v modelu uporabljenih valovnih števil (10, 20, 40) smo ugotovili, da daje najmanjša vrednost 10 valovnih števil najboljše rezultate, kar prikazuje graf 20. V primeru 40 v modelu uporabljenih valovnih števil lahko pride do pojava pretiranega prilagajanja modelu (ang. »overfitting«). Iz tega sklepamo, da dodatno število koeficientov v splošnem ne izboljša modela in da v večini primerov zadostuje že 10 v modelu uporabljenih valovnih števil.

Graf 20: Prikaz uporabnih klasifikacij napovednega modela glede na število v modelu uporabljenih valovnih števil



5 SKLEP

V magistrski nalogi smo razvijali metodo za vrednotenje rastlinskih olj z IR spektroskopijo. Generirali smo napovedne modele za ugotavljanje vsebnosti MK in vrednosti farmakopejskih števil v rastlinskih oljih. MK, ki smo jih ugotavljali, so bile palmitinska, linolna, α -linolenska, oleinska, elaidinska, stearinska, γ -linolenska, vakcenska in gondojska kislina. Farmakopejska števila pa kislinsko, saponifikacijsko, estrsko, hidroksilno, jedno ter peroksidno število in neumljive snovi.

Pri razvoju učne metode smo uporabili vrednosti spremenljivk, ki smo jih dobili iz že opravljenega raziskovalnega dela, kjer so za ugotavljanje MK in farmakopejskih števil uporabili kompleksnejše kemijske postopke na istem naboru rastlinskih olj, kot smo jih uporabili pri našem delu. Za določanje MK so uporabili GC-MS, za določanje farmakopejskih števil pa farmakopejske metode, ki temeljijo predvsem na titracijah. Te metode so v primerjavi z IR spektroskopijo dolgotrajnejše, bolj zapletene, zahtevajo večjo natančnost analitika, večjo količino vzorca in uporabo topil, ki so okolju večinoma neprijazna in težko odstranljiva. Zaradi teh pomanjkljivosti je uporabnost IR spektroskopije v analitiki vse bolj zaželeno.

Kot vhod v učno metodo smo uporabili osnovne in z različnimi obdelavnimi matematičnimi funkcijami obdelane spektre. Za 16 proučevanih spremenljivk smo skupno dobili 2592 napovednih modelov, ki smo jih glede na vrednosti R^2 klasificirali v eno od definiranih 5 skupin: odličen, zelo dober, dober in približen napovedni model ter napovedni model, ki ni dober. Od skupno 2592 napovednih modelov je bilo 585 uporabnih in 2007 neuporabnih napovednih modelov. Ugotovili smo, da odličnih napovednih modelov zaradi strogosti pogojev naša metoda ni dala. Zelo dobrih napovednih modelov je bilo 7, 319 dobrih in 259 približnih napovednih modelov.

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da sta tehniki IR spektroskopije za vrednotenje rastlinskih olj medsebojno primerljivi. Kljub temu pa se je ATR tehnika v primerjavi s transmisijsko pokazala za nekoliko bolj primerno, saj je dala vse napovedne modele, ki so spadali v kategorijo zelo dobrih. Poleg tega se je tudi med samo meritvijo vzorcev izkazala kot hitrejša in enostavnejša, saj zanjo ni bila potrebna predpriprava vzorcev z organskimi topili.

Pri vrednotenju uporabljene ločljivosti IR spektroskopije smo ugotovili, da najboljše rezultate daje najnižja, ki znaša 8 cm^{-1} . Sklepamo lahko, da ta ločljivost vsebuje dovolj informacij za napovedovanje odvisnih spremenljivk. Višja ločljivost namreč v spekter vnese prevelike podrobnosti, ki na dobljene napovedne modele v večini primerov slabše vplivajo. Dodatne prednosti manjše ločljivosti so tudi, da je manj občutljiva na šum, daje manjše število točk v spektru, kar daje bolj zglajen spekter in skrajša čas snemanja vzorcev.

Obdelava spektrov se je izkazala kot zelo pomembna. Ugotovili smo, da obdelava spektrov s prvim odvodom in prvim odvodom SNV močno izboljšata dobljene napovedne modele. Dobre rezultate je pokazal tudi prvi odvod normalizacije. Ugotovili smo, da je v splošnem prvi odvod najboljša funkcija za obdelavo spektra. Odvod poudari spremembe spektra, kar omogoča generiranje boljših napovednih modelov.

Glede števila uporabljenih neodvisnih spremenljivk v napovednem modelu smo ugotovili, da daje najmanjša vrednost 10 valovnih števil najboljše napovedne modele. Večja vrednost valovnih števil, ki daje tudi dodatno število koeficientov, v splošnem ne izboljša modela, saj smo pri 40 valovnih številih opazili pojav pretiranega prilagajanja modelu (ang. »overfitting«).

V splošnem sta za določanje MK in farmakopejskih števil v rastlinskih oljih z IR spektroskopijo primerni obe tehniki, vendar pa ATR tehnika izkazuje nekaj prednosti pred transmisijsko. Najbolj primerno je snemanje spektrov pri ločljivosti 8 cm^{-1} , z 10 v modelu uporabljenimi valovnimi števili. Za obdelavo spektra je najbolj primeren prvi odvod. Ta kombinacija je tvorila najboljši možni napovedni model za večino spremenljivk.

Uporabljena metoda se je izkazala kot obetavna, saj smo pri 9 od 16 proučevanih spremenljivk dobili zelo dober ali dober napovedni model. Ugotovili smo, da je napovedni model zelo dober pri α -linolenski kislini, dober pa pri palmitinski, linolni in stearinski kislini ter pri kislinskem, saponifikacijskem, jodnem, hidroksilnem in peroksidnem številu. Iz teh rezultatov sklepamo, da je IR spektroskopija v kombinaciji z uporabljenimi statističnimi in matematičnimi metodami obetavna za vrednotenje rastlinskih olj. Za zagotovitev praktično uporabnih napovednih modelov za napovedovanje obravnavanih spremenljivk bi bilo v nadaljevanju potrebno izvesti raziskavo na večjem številu vzorcev rastlinskih olj.

6 LITERATURA

1. Vermaak I, Kamatou GPP, Komane-Mofokeng B in sod.: African seed oils of commercial importance - Cosmetic applications. *South African J. Bot.* 2011; 77, 4: 920–933.
2. Zielińska A, Nowak I: Fatty acids in vegetable oils and their importance in cosmetic industry. *Chemik* 2014; 68, 2: 103–110.
3. Kokalj M, Štih K, Kreft S: Herbal tea identification using mid-infrared spectroscopy. *Planta Med.* 2014; 80, 12: 1023–8.
4. Luypaert J, Massart DL, Vander Heyden Y: Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. *Talanta* 2007; 72, 3: 865–83.
5. Zahir E, Saeed R, Hameed MA in sod.: Study of physicochemical properties of edible oil and evaluation of frying oil quality by Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spectroscopy. *Arab. J. Chem.* 2014; 1–7.
6. Dong W, Zhang Y, Zhang B in sod.: Rapid prediction of fatty acid composition of vegetable oil by Raman spectroscopy coupled with least squares support vector machines. *J. Raman Spectrosc.* 2013; 44, 12: 1739–1745.
7. Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske Pripomočke: Formularium Slovenicum 3.0 Slovenski dodatek k evropski farmakopeji, 3. izd., Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke, Ljubljana, 2011: 91–92.
8. Belkacemi K, Boulmerka A, Arul J in sod.: Hydrogenation of Vegetable Oils with Minimum trans and Saturated Fatty Acid Formation Over a New Generation of Pd-catalyst. *Top. Catal.* 2006; 37, 2–4: 113–120.
9. Dhara R, Bhattacharyya DK, Ghosh M: Analysis of Sterol and Other Components Present in Unsaponifiable Matters of Mahua, Sal and Mango Kernel Oil. *J. Oleo Sci.* 2010; 59, 4: 169–176.
10. Lerma García MJ: Characterization and Authentication of Olive and Other Vegetable Oils, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012: 1 – 8.
11. Kočevar Glavač N, Janeš D, Lumpert M in sod.: Sodobna kozmetika: sestavine naravnega izvora, 1. izd., Velenje: Širimo dobro besedo, Ljubljana, 2015: 52–55.
12. Badea G, Lăcătușu I, Badea N in sod.: Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. *Ind. Crops Prod.* 2015; 67: 18–24.
13. Zarrouk W, Carrasco-Pancorbo A, Zarrouk M in sod.: Multi-component analysis (sterols, tocopherols and triterpenic dialcohols) of the unsaponifiable fraction of vegetable oils by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–ion trap mass spectrometry. *Talanta* 2009; 80, 2: 924–934.
14. Rustan AC, Dreven CA: Fatty Acids: Structures and Properties, *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2005: 1–7.
15. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 208 – 223.
16. Christie W: Gas Chromatography and Lipids: A practical guide, British Library Cataloguing, Scotland, 1989: 5 – 23.
17. Calder PC: Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur. J. Pharmacol.* 2011; 668 Suppl: 50–8.
18. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Dostopano: 27-mar-2016].
19. Michas G, Micha R, Zampelas A: Dietary fats and cardiovascular disease: putting together the pieces of a complicated puzzle. *Atherosclerosis* 2014; 234, 2: 320–8.
20. Russo GL: Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem. Pharmacol.* 2009; 77, 6: 937–46.

21. Neagu A-A, Nița I, Botez E in sod.: A physico-chemical study for some edible oils properties. *Analele Univ. „Ovidius“ Constanta - Ser. Chim.* 2013; 24, 2: 121–126.
22. Skiera C, Steliopoulos P, Kuballa T in sod.: Determination of free fatty acids in pharmaceutical lipids by ¹H NMR and comparison with the classical acid value. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014; 93: 43–50.
23. Care ED for the Q of M and H: *European Pharmacopoeia 8th Edition, 8th izd., Council of Europe, Strasbourg, 2014: 155–157.*
24. <http://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/farmaceutski#v>. [Dostopano: 03-sep-2015].
25. Kasture DA V.: *Pharmaceutical Analysis Vol. - I, 7, Pragati Books Pvt. Ltd., 2008: 116 – 120.*
26. Drozg B: *Značilnosti olja v lanenem semenu (Linum usitatissimum L .). Diplomsko delo. Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Maribor, 2010.*
27. <http://goo.gl/7UUIz2>. [Dostopano: 01-feb-2016].
28. Allen JC, Hamilton RJ: *Rancidity in foods, 3. izd., Blackie Academic & Professional, London, 1994: 290.*
29. Che Man YB, Setiowaty G, Voort FR: Determination of iodine value of palm oil by fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999; 76, 6: 693–699.
30. Pizarro C, Esteban-Díez I, Rodríguez-Tecedor S in sod.: Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application of the stepwise orthogonalisation of predictors to mid-infrared spectra. *Food Control* 2013; 34, 1: 158–167.
31. Yang Y, Li Q, Yu X in sod.: A novel method for determining peroxide value of edible oils using electrical conductivity. *Food Control* 2014; 39: 198–203.
32. Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M: Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007; 596, 2: 330–7.
33. van de Voort FR, Ismail AA, Sedman J in sod.: The determination of peroxide value by fourier transform infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1994; 71, 9: 921–926.
34. Li H, van de Voort FR, Ismail AA in sod.: Determination of peroxide value by fourier transform near-infrared spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2000; 77, 2: 137–142.
35. Fontanel D: *Unsaponifiable Matter in Plant Seed Oils, Springer, Berlin, 2013: 2, 13–62.*
36. Alonso-Salces RM, Héberger K, Holland MV in sod.: Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes, *Food Chemistry*, 118, 4, 2010: 956–965.
37. Abidi S.: *Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. J. Chromatogr. A* 2001; 935, 1–2: 173–201.
38. Tranchida PQ, Salivo S, Franchina FA in sod.: Qualitative and quantitative analysis of the unsaponifiable fraction of vegetable oils by using comprehensive 2D GC with dual MS/FID detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013; 405, 13: 4655–4663.
39. Barbara S: *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications, Chichester: J. Wiley&Sons, Sydney, 2004: 1 – 55, 137 – 174.*
40. Nürnberg E, Surmann P: *IR und NIR Spektroskopie, Springer-Verlag, 1991: 182 – 200.*
41. Smith L: *Aplied Infrared Spectroscopy, John Wiley&Sons, New York, 1979: 1 – 6, 84 – 97.*
42. Kalinkova GN: *Infrared spectroscopy in pharmacy. Vib. Spectrosc.* 1999; 19, 2: 307–320.
43. Günzler H, Gremlich H-U: *IR spectroscopy: An introduction, Wiley-VCH GmbH, Weinheim, 2002: 1 – 6, 37 – 142.*
44. Uncu O, Ozen B: Prediction of various chemical parameters of olive oils with Fourier transform infrared spectroscopy. *LWT - Food Sci. Technol.* 2015; 63, 2: 978–984.
45. Talpur MY, Kara H, Sherazi STH in sod.: Application of multivariate chemometric techniques for simultaneous determination of five parameters of cottonseed oil by single

- bounce attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Talanta* 2014; 129: 473–80.
46. Godoy SC, Ferrão MF, Gerbase AE: Determination of the Hydroxyl Value of Soybean Polyol by Attenuated Total Reflectance/Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2007; 84, 6: 503–508.
 47. Vlachos N, Skopelitis Y, Psaroudaki M in sod.: Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Anal. Chim. Acta* 2006; 573–574: 459–65.
 48. Ozen BF, Mauer LJ: Detection of Hazelnut Oil Adulteration Using FT-IR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50, 14: 3898–3901.
 49. Ozen BF, Weiss I, Mauer LJ: Dietary supplement oil classification and detection of adulteration using Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51, 20: 5871–6.
 50. Lerma-García MJ, Ramis-Ramos G, Herrero-Martínez JM in sod.: Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* 2010; 118, 1: 78–83.
 51. Rohman A, Man YBC: Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Res. Int.* 2010; 43, 3: 886–892.
 52. Lerma-García MJ, Simó-Alfonso EF, Bendini A in sod.: Rapid evaluation of oxidised fatty acid concentration in virgin olive oil using Fourier-transform infrared spectroscopy and multiple linear regression. *Food Chem.* 2011; 124, 2: 679–684.
 53. Allendorf M, Subramanian A, Rodriguez-Saona L: Application of a Handheld Portable Mid-Infrared Sensor for Monitoring Oil Oxidative Stability. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2011; 89, 1: 79–88.
 54. Che Man Y., Setiowaty G: Multivariate calibration of Fourier transform infrared spectra in determining iodine value of palm oil products. *Food Chem.* 1999; 67, 2: 193–198.
 55. Rao Y, Xiang B, Zhou X in sod.: Quantitative and qualitative determination of acid value of peanut oil using near-infrared spectrometry. *J. Food Eng.* 2009; 93, 2: 249–252.
 56. Chalasani SRK, Dewasthale S, Hablot E in sod.: A Spectroscopic Method for Hydroxyl Value Determination of Polyols. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 2013; 90, 12: 1787–1793.
 57. Ferrão MF, Godoy SC, Gerbase AE in sod.: Non-destructive method for determination of hydroxyl value of soybean polyol by LS-SVM using HATR/FT-IR. *Anal. Chim. Acta* 2007; 595, 1–2: 114–9.
 58. Gouvinhas I, de Almeida JMMM, Carvalho T in sod.: Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Food Chem.* 2015; 174: 226–232.
 59. Adams MJ: *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, 2. izd., Department of Applied Chemistry, RMIT University, Melbourne, Victoria, Australia, 2004: 1–6, 203–209.
 60. Jakovac A: *Napovedovanje lastnosti papirja iz spektrometričnih podatkov s strojnim učenjem*. Diplomsko delo. Fakulteta za računalništvo in informatiko, Ljubljana, 2011.
 61. Varmuza Kurt, Peter F: *Introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics*, Boca Raton, New York, 2009: 1–3, 36–40, 108–119, 150–168.
 62. Jørgensen A: Clustering excipient near infrared spectra using different chemometric methods, Seminar summary. Department of pharmacy, University of Helsinki, 2000: 1 – 11.
 63. Martens H, Naes T: *Multivariate calibration*, John Wiley&Sons, Chichester, 1989: 250–272.
 64. Barnes RJ, Dhanoa MS, Lister SJ: Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Appl. Spectrosc.* 1989; 43, 5: 772–777.
 65. Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC in sod.: *Handbook of Chemometrics and*

- Qualimetrics: Part A, Library of Congress Cataloging in Publication Data, 1997: 1–18, 171 – 180, 273–274, 494.
66. Nicolaï BM, Beullens K, Bobelyn E in sod.: Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biol. Technol.* 2007; 46, 2: 99–118.
 67. Rihtarič M: Ugotavljanje vrstne pripadnosti vzorcev vrbovcev in krčnic s transmisijsko infrardečo spektroskopijo. Diplomsko naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
 68. Zupan J: Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov. Ljubljana, Kemijski inštitut; Inštitut Nove revije Zavod za humanistiko, 2009.
 69. Pasquini C: Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *J. Braz. Chem. Soc.* 2003; 14, 2: 198–219.
 70. Smola N: Kvalitativna in kvantitativna analiza oksitetraciklina dihidrata z metodo bližnje infrardeče spektroskopije in korelacija med spektralnimi področji. Doktorska disertacija. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2000.
 71. Šporar E: Razvoj modela za določanje velikosti delcev hidroksipropilmetilceluloze s spektroskopijo bližnjega infrardečega območja. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
 72. Mikolič K: Priprava in vrednotenje kristalov klaritromicina. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.
 73. Pugelj M: Napovedovanje strukturiranih vrednosti z metodo najbližjih sosedov. Diplomsko delo. Fakulteta za računalništvo in informatiko, Ljubljana, 2010.
 74. Mentaschi L, Besio G, Cassola F in sod.: Problems in RMSE-based wave model validations. *Ocean Model.* 2013; 72: 53–58.
 75. Korenjak A: Regresijska analiza. Diplomsko delo. Fakulteta za naravoslovje in informatiko, Maribor, 2010.
 76. Horvat I: Maščobnokislinska sestava rastlinskih olj z α -linolensko kislino in njihova antioksidativna aktivnost. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.
 77. Perčič Š: Maščobnokislinska sestava in antioksidativno delovanje izbranih rastlinskih olj. Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2015.
 78. Pavia D, Lampman G, Kriz G in sod.: *Spectroscopy*, 4th izd., Department of chemistry, Western Washington University, Bellingham, Washington, 2010: 15 – 104.
 79. Program OMNIC 5.2, Beginner's guide to FT-IR. Nicolet Instrument Corp.: 1992-2000.
 80. Program OMNIC 5.2, ATR sampling techniques. Nicolet Instrument Corp.: 1992-2000.
 81. Atitar MF, Belhadj H, Dillert R in sod.: Emerging Pollutants in the Environment - Current and Further Implications, M. L. Larramendy in S. Soloneski, Ur. *InTech*, 2015: 201 – 227.
 82. Wan PJ, Wakelyn PJ: *Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils*, The American Oil Chemists Society, 1997: 353.
 83. <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40380>. [Dostopano: 15-apr-2016].
 84. Bonnie Yen Ping T, Nurul Ain H, Hoong Seng S: Determination of Hydroxyl Value of Palm-Based Polyols By Partial Least Squares Algorithm Using Nir Spectroscopy. *J. Oil Palm Res.* 2011; 23: 1172–1177.
 85. Kuligowski J, Carrión D, Quintás G in sod.: Direct determination of polymerised triacylglycerides in deep-frying vegetable oil by near infrared spectroscopy using Partial Least Squares regression. *Food Chem.* 2012; 131, 1: 353–359.

7 PRILOGE

Priloga 1

Preglednica VI: Količina posamezne MK v % v vzorcih rastlinskih olj, ugotovljena s pomočjo GC-MS (76, 77)

Vzorec rastlinskega olja	Interna št. oznaka	U set ali V set	PK	LK	ALK	OK	EK	SK	GLK	VK	GK
Ameriška brusnica	1	U	3,76	26,73	36,65	31,21	0,18	1,47	0	0	0
Ameriška brusnica	2	U	4,21	26,33	36,64	31,18	0,17	1,47	0	0	0
Ameriška brusnica	3	V	3,77	33,26	33,25	24,75	1,78	1,84	0	0	0
Bezeg	4	U	5,08	34,83	42,11	14,38	1,76	1,84	0	0	0
Bezeg	5	U	4,92	36,22	39,75	15,35	1,63	2,13	0	0	0
Boreč	6	U	7,38	46,5	0	30,6	0,17	5,34	8,44	0	1,31
Boreč	7	U	6,77	46,5	0	32,3	0,18	5,4	7,14	0	1,34
Boreč	8	U	8,03	42,9	0	24,7	0	5,98	15,4	0,11	2,28
Boreč	9	V	9,9	40,5	0	23,2	0,27	5,16	17,4	0	2,48
Črni ribez	10	U	5,83	45,4	12,9	20,8	0	3,34	9,28	1,62	0,8
Črni ribez	11	U	4,45	51,2	16,6	17,2	0	1,88	7,08	1,46	0,25
Konoplja	12	U	5,01	44,07	16,62	28,26	2,53	3,3	0	0	0
Konoplja	13	U	4,3	54,15	20,75	14,74	1,63	3,18	1,12	0	0
Konoplja	14	V	5,03	52,2	19,22	18,07	1,69	3,66	0	0	0
Malina	15	U	1,93	45,77	30,9	17,32	2,55	1,53	0	0	0
Malina	16	U	1,76	50,17	28,18	18,06	0,31	1,52	0	0	0
Malina	17	V	1,74	44,03	37,79	15,18	0,19	1,07	0	0	0
Črna ogrščica	18	U	2,53	10,22	11,72	28	2,27	1,74	0	0	0
Oreh	19	U	5,27	52,47	12,98	24,61	1,75	2,92	0	0	0
Oreh	20	U	5,21	55,5	8,98	19,96	4,25	3,02	0	0	0
Rakitovec	22	U	6,38	31,99	28,77	26,22	3,5	2,86	0	0	0
Rakitovec	23	U	5,02	46,79	10,58	31,8	0	5,57	0	0	0
Svetlin	24	U	4,7	71	0	17,3	0	2,93	2,73	1,43	0
Svetlin	25	U	5,23	53,2	0	34,5	0,18	4,34	2	0	0,33
Svetlin	26	U	4,69	79,9	0	7,28	0	2,1	4,88	1,16	0
Svetlin	27	U	4,24	80	0	8,08	1,19	2,09	4,39	0	0
Šipek	28	U	2,95	34,19	39,97	18,32	1,86	2,64	0	0	0
Šipek	30	U	2,75	37,26	37,55	18,53	1,57	2,31	0	0	0
Španska kadulja	31	U	4,86	12,1	66,6	11,2	0	3,8	0	1,4	0
Španska kadulja	32	U	4,54	11,6	66,7	11,4	0	4,32	0	1,54	0
Črna kopriva	34	U	3,75	6,63	67,5	18	0	2,04	0	2,04	0
Črna kumina	35	U	9,29	55,1	0	29,3	3,49	0	0	2,03	0,08
Inkovska plukenecija	36	U	2,55	29,7	49	13,8	0	3,5	0	1,44	0
Kivi	37	U	3,41	7,45	68,5	17,5	0,12	2,89	0	0	0,07
Lan	38	U	3,4	9,55	58	24,9	0,2	3,99	0	0	0
Lan	39	U	3,78	8,1	58,1	23,5	0	4,86	0	1,64	0
Lan	40	V	3,67	8,46	53,3	27	0	5,44	0	2,07	0
Povprečje			4,65	38,43	27,29	21,31	0,96	3,07	2,16	0,48	0,24
Povprečje_U			4,62	38,86	27,06	21,26	0,98	3,01	1,95	0,50	0,20
Povprečje_V			4,82	35,69	28,71	21,64	0,79	3,43	3,48	0,41	0,50

Legenda:

PK	Palmitinska kislina
LK	Linolna kislina
ALK	α -Linolenska kislina
OK	Oleinska kislina

EK	Elaidinska kislina
SK	Stearinska kislina
GLK	γ -Linolenska kislina
VK	Vakcenska kislina
GK	Gondojska kislina

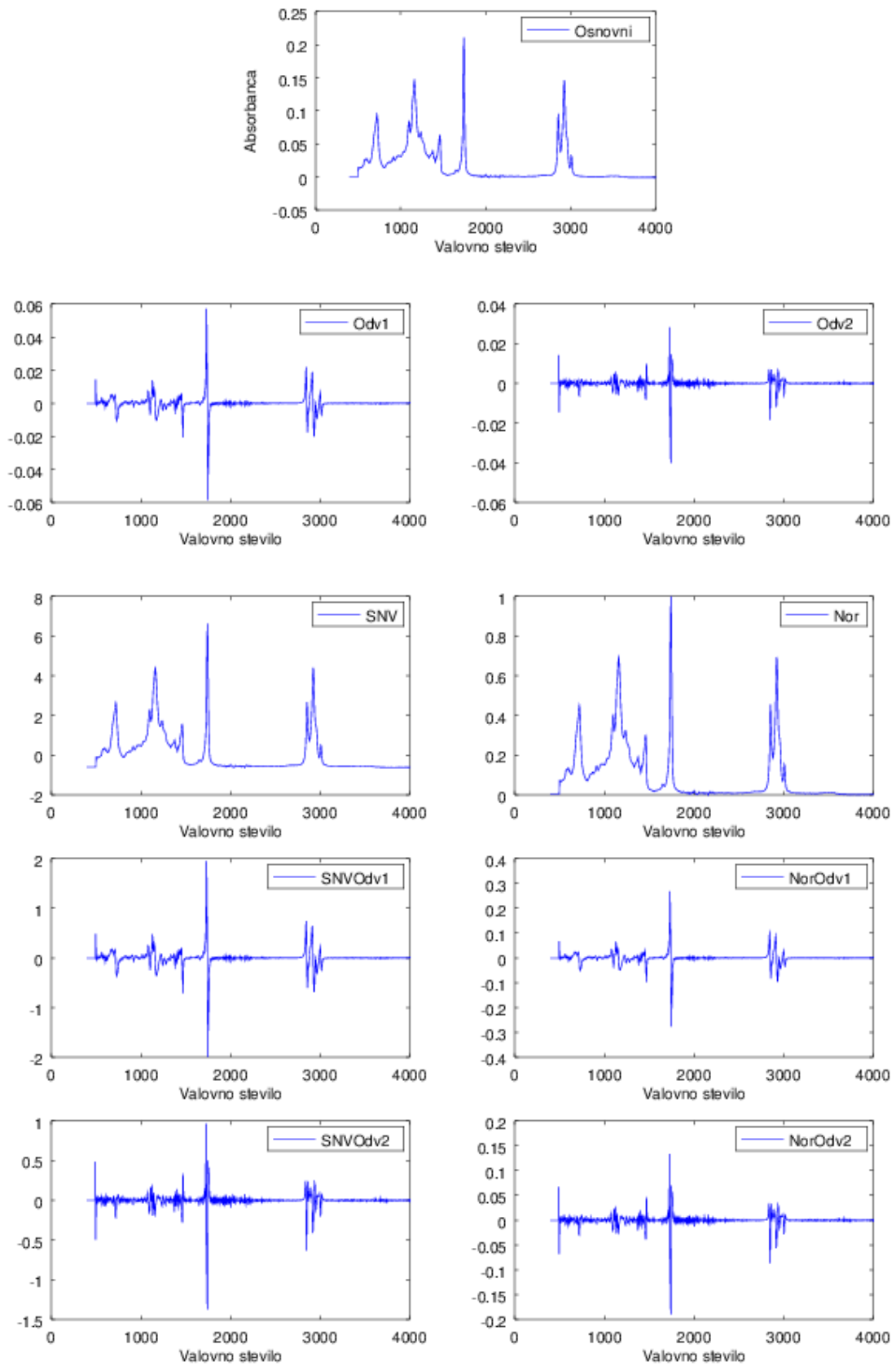
Priloga 2

Preglednica VII: Farmakopejska števila v vzorcih rastlinskih olj, izmerjena po farmakopejskih predpisih

Vzorec rastlinskega olja	Interna št. oznaka	U set ali V set	I _A	I _S	I _E	I _{OH}	I _I	I _P	N _S
Ameriška brusnica	1	U	0,813	191	190	7,55	158	45	1,8
Ameriška brusnica	2	U	0,729	191	190	6,79	156	65	1,86
Ameriška brusnica	3	V	0,813	191	190	8,95	156	35,3	1,6
Bezeg	4	U	3,97	192	188	9,54	161	42,2	1,4
Bezeg	5	U	1,04	193	192	7,08	159	50,7	1,33
Boreč	6	U	0,281	191	191	4,01	128	65,4	1
Boreč	7	U	0,281	192	192	6,77	136	70,5	1,13
Boreč	8	U	0,281	193	193	7,93	135	26,6	0,6
Boreč	9	V	0,309	190	190	5,64	137	32,4	1,07
Črni ribez	10	U	2,78	191	188	8,85	157	49,4	1,4
Črni ribez	11	U	1,77	190	188	12	162	13,1	1,27
Konoplja	12	U	0,954	193	192	7,44	144	28,8	0,87
Konoplja	13	U	1,46	192	191	5,4	153	50,3	0,73
Konoplja	14	V	1,35	192	191	8,78	148	25,5	0,8
Malina	15	U	1,04	191	190	7,77	159	85,8	1,8
Malina	16	U	5,74	190	184	19,4	156	35,2	1,46
Malina	17	V	3,84	190	186	9,69	166	66,4	1,67
Črna ogrščica	18	U	1,54	178	176	6,42	99	35,2	1,2
Oreh	19	U	1,01	195	194	6,36	142	33,5	0,67
Oreh	20	U	0,112	193	193	6,86	143	21,2	0,4
Rakitovec	22	U	2,69	191	188	6,64	139	46,3	2,2
Rakitovec	23	U	0,673	193	192	5,77	134	102	1,07
Svetlin	24	U	0,281	191	191	6,34	142	41	1,13
Svetlin	25	U	0,309	193	193	4,73	132	59,9	0,73
Svetlin	26	U	0,346	193	193	11	157	38,4	1,33
Svetlin	27	U	0,252	193	193	6,55	155	10,8	1,2
Šipek	28	U	0,589	192	191	6,63	161	20,4	1,2
Šipek	30	U	0,589	193	192	8,01	155	55,4	1
Španska kadulja	31	U	0,776	195	194	6,84	181	22,9	1
Španska kadulja	32	U	0,617	194	193	2,7	179	23	0,73
Črna kopriva	34	U	2,43	193	191	8,46	185	69,8	0,8
Črna kumina	35	U	11,2	196	185	10,5	127	123	0,93
Inkovska plukenecija	36	U	0,552	193	192	7,05	189	40,5	0,33
Kivi	37	U	0,87	192	191	4,83	204	39,7	1,53
Lan	38	U	0,673	193	192	5,76	177	9,29	1,2
Lan	39	U	1,15	192	191	6,03	179	26,7	1
Lan	40	V	1,71	193	191	4,04	174	30,7	1,07
Povprečje			1,51	191,86	190,32	7,44	154,73	44,25	1,15
Povprečje_U			1,49	191,97	190,44	7,44	154,50	45,22	1,13
Povprečje_V			1,60	191,20	189,60	7,42	156,20	38,06	1,24

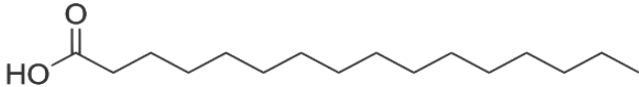
Legenda:		I _{OH}	Hidroksilno število
I _A	Kislinsko število	I _I	Jodno število
I _S	Saponifikacijsko število	I _P	Peroksidno število
I _E	Estrsko število	N _S	Neumiljive snovi

Priloga 3: Osnovni spekter in obdelani spektri vzorca maline (vzorec št. 16), posnet z ATR tehniko IR spektroskopije pri ločljivosti 8 cm^{-1}

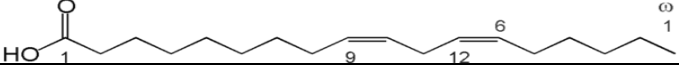


Priloga 4

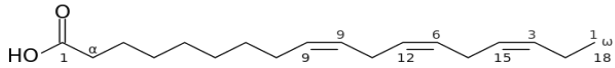
Preglednica VIII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu palmitinske kisline

Palmitinska kislina	
	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (<i>trans</i>), =C-H (<i>cis</i>)	2997, 3001, 3005
-HC=CH- (<i>trans</i>), C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	991, 995, 999 1003
=CH ₂ , C-O, C-C	806, 876, 879
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
-HC=CH-(<i>trans</i>), C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	968, 999, 1001, 1003
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1011, 1111, 1113, 1138, 1140, 1142
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1657, 1658
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1267
=CH ₂ , C-O, C-C	812
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (<i>trans</i>), =C-H (<i>cis</i>)	2993
C=C	1616, 1618
C≡C	2036
C-O, C-C, O-H	1356
C-X (X = Cl, Br, I)	623

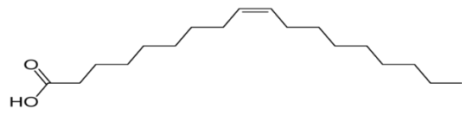
Preglednica IX: Funkcionalne skupine v napovednem modelu linolne kisline

Linolna kislina	
	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
C-O, C-C, -C-H (CH ₃)	1304, 1315, 1373, 1377, 1396
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1053, 1057, 1061, 1065, 1076, 1119
-(CH ₂) _n -, -HC=CH- (<i>cis</i>), C-O, C-C, C-X (X=Cl, Br, I)	725, 729
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1273
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H (CH ₃)	2951, 2962, 2966
-HC=CH- (<i>trans</i>), C-O, C-C	953
-C-H, C-O, C-C	787, 791
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₃)	2950, 2952, 2954, 2956, 2958, 2968, 2970, 2972
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1068, 1070, 1132, 1134
C-O, C-C, -C-H(CH ₂)	1464
C-O, C-C	1307, 1309
=CH ₂ , C-O, C-C	866
-C-H, C-O, C-C	793
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2869, 2875
C-O, C-C, O-H	1367

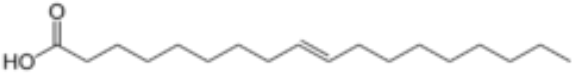
Preglednica X: Funkcionalne skupine v napovednem modelu α -linolenske kisline

α-linolenska kislina	
	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
-HC=CH- (<i>trans</i>), C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	968, 999, 1001
C=C	1618
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1113, 1138, 1140, 1142
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1657, 1658
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
-C-H, C-O, C-C, =CH ₂	802, 791, 795
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₃)	2954, 2966, 2970, 2981
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2877, 2881
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina)	2723
=CH ₂ , C-O, C-C	864, 868
C-O, C-C, -C-H(CH ₂)	1462
C-O, C-C, -C-H(CH ₃)	1373
C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1300
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina)	2735
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1049, 1053, 1068
=CH ₂ , C-O, C-C	876

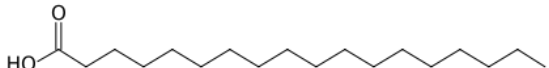
Preglednica XI: Funkcionalne skupine v napovednem modelu oleinske kisline

Oleinska kislina	
	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1099, 1101, 1103, 1105, 1115, 1117, 1118, 1120
-(CH ₂) _n -, -HC=CH- (<i>cis</i>), C-O, C-C, C-X (X=Cl, Br, I)	727, 729, 731, 733, 735, 737, 739
C-O, C-C	1398, 1400
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (<i>trans</i>), =C-H (<i>cis</i>)	3010, 3008
C≡C	2279
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2927
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1747, 1751
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina)	3032, 3035, 3039, 3043
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (<i>trans</i>), =C-H (<i>cis</i>)	3020, 3024, 3028

Preglednica XII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu elaidinske kisline

Elaidinska kislina	
	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1772, 1774
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina)	3047, 3049, 3051
=CH ₂ , C-O, C-C	812
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1261, 1265, 1263, 1267
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
C≡C	2229, 2249, 2341
C-O, C-C, -C-H(CH ₂)	1462
-(CH ₂) _n -, -HC=CH- (<i>cis</i>), C-O, C-C, C-X (X=Cl, Br, I)	717, 721
-HC=CH- (<i>trans</i>), C-O, C-C	957, 960, 964, 972, 976
C-X (X = Cl, Br, I)	633
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina)	2576, 2611, 2700, 3390
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1146
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (<i>trans</i>), =C-H (<i>cis</i>)	3012
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2870, 2873

Preglednica XIII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu stearinske kisline

Stearinska kislina	
	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O(keton), C=O(aldehyd)	1664, 1666, 1691, 1693, 1695, 1697, 1699, 1701, 1703, 1705, 1707, 1709, 1711, 1712, 1714, 1716, 1718, 1724, 1720, 1722, 1726, 1728
C=C =CH ₂ , C-O, C-C	1612, 1614, 1616, 810, 812, 814, 816, 818, 820, 822, 825, 829, 831
-C-H, C-O, C-C, C-X (X = Cl, Br, I)	777, 779, 785
C-X (X = Cl, Br, I)	548
C-O, C-C	1518
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (<i>trans</i>), =C-H (<i>cis</i>)	2997, 2998, 2999, 3013, 3014
C-O, C-C	1322, 1323, 1326, 1327, 1328
C-O, C-C, -C-H(CH ₃)	1372, 1427, 1428, 1429
C-O, C-C, -C-H(CH ₂)	1469, 1477, 1482
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2788, 2817-2820, 2823, 2824, 2826, 2928, 2929
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1083
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1159, 1210
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₃)	2970, 2971
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina)	3124
C=C	1643
O-H, C-H	3452
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1689, 1690, 1692, 1693
-HC=CH- (<i>cis</i>), C-O, C-C	919

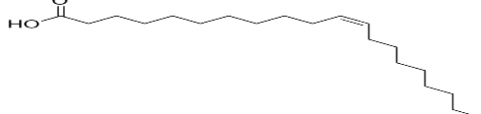
Preglednica XIV: Funkcionalne skupine v napovednem modelu γ -linolenske kisline

γ-linolenska kislina	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1142, 1146, 1153, 1157, 1161, 1227, 1238, 1242, 1246, 1250, 1254, 1257
C-O, C-C, -C-H(CH ₂)	1462
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₃)	2951, 2985
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1751, 1755
C-O, C-C	1304
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (<i>cis</i> , <i>trans</i>), -C-H(CH ₃)	2989
-HC=CH- (<i>trans</i>), C-O, C-C	980
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1149, 1153, 1157, 1169, 1218, 1230, 1234, 1238
C-O, C-C, O-H	1335, 1354

Preglednica XV: Funkcionalne skupine v napovednem modelu vakcenske kisline

Vakcenska kislina	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1144, 1145, 1147, 1149
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂ , CH ₃)	2839, 2862, 2864, 2866, 2868, 2869, 2871, 2933, 2935, 2937, 2939, 2941, 2943, 2947, 2949, 2950
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1121
C≡C	2288, 2294, 2295, 2301, 2359, 2384
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina)	3046, 3289
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O(keton)	1712

Preglednica XVI: Funkcionalne skupine v napovednem modelu gondojske kisline

Gondojska kislina	
	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1161, 1165, 1169, 1173, 1238, 1242, 1246, 1250, 1254
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₃)	2970, 2974
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1103, 1107, 1111
C-O, C-C, -C-H(CH ₃)	1435, 1439, 1443
=CH ₂ , C-O, C-C	876, 879
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (<i>trans</i>), =C-H (<i>cis</i>)	3005
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1153, 1157, 1161, 1211, 1227, 1238, 1254, 1273
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1142, 1146

Preglednica XVII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu kislinskega števila

Kislinsko število	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O (keton)	1709, 1713
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1651, 1655, 1659, 1662, 1666, 1674, 1693, 1697
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O (keton), C=O (aldehid)	1701, 1705, 1709, 1713, 1716, 1720
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1659, 1662, 1666, 1670

Preglednica XVIII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu saponifikacijskega števila

Saponifikacijsko število	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1173, 1176, 1180, 1184, 1188, 1192, 1238, 1242
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1092
O-H, C-H	3437
Transmisijska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1190, 1192, 1215, 1217, 1223, 1242, 1244
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₃)	2954, 2972
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2856, 2869, 2879, 2881, 2883
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (<i>trans</i>), =C-H (<i>cis</i>)	2993
C-O, C-C	1321, 1400, 1410
C≡C	1953
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1093

Preglednica XIX: Funkcionalne skupine v napovednem modelu estrskega števila

Estrsko število	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
-C-O, -CH ₂ -, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1153, 1157, 1169, 1173, 1176
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1095, 1130, 1138
=CH ₂ , C-O, C-C	814, 818
Transmisijaska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1743, 1753, 1755, 1757
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2846, 2848, 2898, 2900, 2902

Preglednica XX: Funkcionalne skupine v napovednem modelu hidroksilnega števila

Hidroksilno število	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
C=C	1635
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina)	2741, 3061, 3081
C≡C	2065, 2165
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O(keton), C=O(aldehyd)	1716, 1738
-(CH ₂) _n -, -HC=CH- (cis), C-O, C-C, C-X (X=Cl, Br, I)	740
C-X (X=Cl, Br, I)	572
Transmisijaska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (trans), =C-H (cis)	3006
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1057, 1111, 1113
C-O, C-C, -C-H(CH ₃)	1375
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2812, 2817, 2823, 2862, 2873

Preglednica XXI: Funkcionalne skupine v napovednem modelu jednega števila

Jodno število	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2862, 2908, 2912, 2916, 2920, 2931, 2935
C-C, O-H, C-O, C-C, C-X (X=Cl, Br, I)	683, 687
-(CH ₂) _n -, -HC=CH- (cis), C-O, C-C, C-X (X = Cl, Br, I)	729
Transmisijaska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm ⁻¹)
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (trans), =C-H (cis)	2998-3004, 3009-3016, 3021-3027
C-O, C-C, -C-H(CH ₂)	1468, 1469
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2838-2842, 2874-2876
C-O, C-C, -C-H(CH ₃)	1378, 1379
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₃)	2962-2964
C-O, C-C	1392

Preglednica XXII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu peroksidnega števila

Peroksidno število	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O (keton)	1701, 1705, 1707, 1709, 1711
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1658, 1660, 1664
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O (aldehid)	1728, 1736
-HC=CH- (cis), C-O, C-C	906, 910, 920
C≡C	1980, 2106, 2272, 2276
O-H, C-H	3535, 3635, 3799, 3801, 3824
C-O, C-C, -C-H(CH ₂)	1466
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina)	2509, 2609, 3041, 3157, 3269, 3334, 3396
C-X (X=Cl, Br, I)	625
C-O, C-C, -C-H(CH ₂), -C-H(CH ₃)	1446
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂)	2856, 2879, 2927
-C-O, C-O, C-C, C-O (ester, karboksilna kislina)	1055, 1095
=CH ₂ , C-O, C-C	822
C=C	1647
C-O, C-C	1531
Transmisijaska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O (keton), C=O (aldehid)	1705, 1707, 1709, 1711, 1712, 1714, 1716, 1718

Preglednica XXIII: Funkcionalne skupine v napovednem modelu neumiljivih snovi

Neumiljive snovi	
ATR tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina)	1747
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₃)	2985, 2970, 2974, 2981
O-H, C-H	3440, 3510
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), =C-H (<i>trans</i>), =C-H (<i>cis</i>)	3001, 3005
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O (aldehid)	1732
Transmisijaska tehnika	
Funkcionalne skupine	Valovna števila (cm⁻¹)
C=O, -C=O (ester, karboksilna kislina), C=O (aldehid), C=O (keton)	1720, 1724, 1728, 1732, 1736
O-H, C-H, O-H (karboksilna kislina), -C-H(CH ₂ , CH ₃)	2935, 2939, 2943, 2947, 2951