

ABSTRAKT

Tato diplomová práce poskytuje souhrnné informace o použití blízké infračervené spektroskopie pro kontrolu obsahu kyseliny olejové ve slunečnicovém semeni. Byla provedena kalibrace 110 vzorků vysoko-olejové slunečnice za použití kalibračního modelu PLS – „*Partial least squares*”. Jako referenční metoda byla použita plynová chromatografie. Na základě těchto poznatků bylo na této kalibraci změřeno a vyhodnoceno třicet vzorků slunečnicového semene s vysokým obsahem kyseliny olejové. Poslední část diplomové práce je tvořena srovnáním výsledků stanovení kyseliny olejové pomocí blízké infračervené spektroskopie a plynové chromatografie jako referenční metody, a diskusí o přesnosti těchto měření a vyhodnocení vhodnosti použití zmíněných metod.

ABSTRACT

This diploma thesis provides summary information about using of near infrared spectroscopy for monitoring of high oleic acid content in sunflower seed. The calibration for high oleic sunflower seed was performed by using calibration model PLS - „*Partial least squares*”. Gas chromatography was used as a reference method. Based on this knowledge thirty samples of high oleic sunflower seeds were measured and evaluated on this calibration. The last part of diploma thesis consist of comparison of oleic acid results measured by near infrared spectroscopy and gas chromatography used as reference method, and discussion about the measurement accuracy and evaluation of suitability of using these methods.

KLÍČOVÁ SLOVA

Slunečnicový olej, NIR spektroskopie, GC

KEYWORDS

Sunflower oil, NIR spectroscopy, GC

VYSTAVĚLOVÁ, P. *Použití spektroskopie v blízké infračervené oblasti pro charakterizaci suroviny pro výrobu slunečnicového oleje*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 53 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Ludmila Pudilová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat především RNDr. Ludmile Pudilové za odborné vedení, ochotu a pomoc při tvorbě diplomové práce. Dále pak Ing. Evě Vítové, Ph.D. za pomoc při experimentální části. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také RNDr. Alexandru Bartkovi za cenné rady při zpracování získaných výsledků.

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1 ÚVOD | 7 |
| 2 TEORETICKÁ ČÁST..... | 8 |
| 2.1 Surovina pro výrobu slunečnicového oleje | 8 |
| 2.1.1 Nutriční vlastnosti slunečnicových semen..... | 9 |
| 2.2 Charakteristika tuků a olejů..... | 10 |
| 2.2.1 Mastné kyseliny jako hlavní složka tuků a olejů | 10 |
| 2.3 Kontrola jakosti vstupních surovin..... | 11 |
| 2.4. Použité metody a experimentální techniky..... | 13 |
| 2.4.1 Plynová chromatografie | 13 |
| 2.4.2 Infračervená spektroskopie | 15 |
| 2.4.2.1 Rotační stavy molekul | 16 |
| 2.4.2.2 Vibrační stavy molekul | 17 |
| 2.4.2.3 Spektroskopie v blízké infračervené oblasti..... | 18 |
| 2.4.2.4 Kalibrace technologie NIR..... | 23 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 26 |
| 3.1 Použité vzorky | 26 |
| 3.1.1 Příprava vzorku pro plynovou chromatografii..... | 26 |
| 3.1.2 Příprava vzorku pro blízkou infračervenou spektroskopii..... | 26 |
| 3.2 Plynová chromatografie..... | 26 |
| 3.2.1 Chemikálie | 26 |
| 3.2.2 Použité metody a přístroje..... | 26 |
| 3.3 Blízká infračervená spektroskopie..... | 27 |
| 3.3.1 Použité postupy a přístroje..... | 27 |
| 3.4 Statistické zpracování výsledků..... | 28 |
| 3.4.1 Zpracování výsledků plynové chromatografie..... | 28 |
| 3.4.2 Zpracování výsledků blízké infračervené spektroskopie | 28 |
| 4 VÝSLEDKY A DISKUSE..... | 29 |
| 4.1 Plynová chromatografie..... | 29 |
| 4.1.1 Ověření přesnosti stanovení kyseliny olejové pomocí plynové chromatografie | 29 |
| 4.2 Blízká infračervená spektroskopie..... | 31 |
| 4.2.1 První kalibrační model | 32 |
| 4.2.2 Druhý kalibrační model | 36 |

| | |
|---|----|
| 4.2.3 Třetí kalibrační model | 40 |
| 4.2.4 Kalibrační model s rozlišením 0,5 nm | 42 |
| 4.3 Aplikace kalibračních modelů na reálné vzorky | 43 |
| 4.3.1 Použití prvního kalibračního modelu | 43 |
| 4.3.2 Použití druhého kalibračního modelu | 45 |
| 5 ZÁVĚR..... | 47 |
| 6 POUŽITÉ ZDROJE | 48 |
| 7 ZKRATKY | 53 |

1 ÚVOD

Rostlinné oleje představují v naší výživě důležitý zdroj více nenasycených mastných kyselin a vitaminů. V současnosti velmi rozšířenou surovinou pro výrobu rostlinných olejů je například slunečnice, *Helianthus annuus*. Slunečnicový olej má charakteristické zastoupení mastných kyselin, které jsou pro člověka nepostradatelné. Typickým znakem pro slunečnicový olej je vysoký obsah nenasycených mastných kyselin. Velmi významnou složkou je vitamin E, který je antioxidantem rozpustným v tucích. Slunečnicový olej napomáhá tělu při prevenci proti kardiovaskulárním onemocněním, zabraňuje volným radikálům poškozovat cholesterol [1].

V potravinářském průmyslu při výrobě slunečnicového oleje se začíná více prosazovat zpracování vysoko-olejové slunečnice na úkor slunečnice klasické. Vysoko-olejová slunečnice má odlišný profil mastných kyselin, kde je nejvíce zastoupena kyselina olejová. Slunečnicový olej s vyšším obsahem kyseliny olejové je lépe v potravinářství využitelný. Pro potřeby výkupu je žádoucí, aby vysoko-olejová slunečnice obsahovala dle Codex Alimentarius [2] nad 75% kyseliny olejové z celkového profilu mastných kyselin. Někteří koncoví uživatelé mají limitní hodnotu pro rozlišení dodávky vysoko-olejové slunečnice například 82%. Výsledek kontroly složení mastných kyselin příjmového slunečnicového semene musí být poskytnut za krátký čas a bez vyšších nároků na přípravu vzorku nebo samotnou analýzu. Za těchto podmínek se nabízí využití spektroskopie v blízké infračervené oblasti, NIR. Avšak aplikace spektroskopie v blízké infračervené oblasti pro kontrolu slunečnicového semene je velmi obtížná. V transmitanci je měření slunečnicového semene téměř nemožné, proto je více využívána reflektance, bohužel i ta s sebou nese mnohá úskalí. Kontrola obsahu kyseliny olejové ve slunečnicovém semeni pomocí metody NIR je tedy požadavek praxe. Je důležité znát vlastnosti daných surovin dříve, než jsou zpracovány. Minimalizuje se tím riziko ohrožení kvality finálního produktu.

Technologií NIR lze měřit vzorky všech tří skupenství, a to buď jednotlivě, nebo kontinuálně v daném časovém úseku. NIR je kalibrován na základě výsledků referenční metody, ke které není mnohdy jednoduché vztáhnout spektroskopická data s danou přesností. Procentuální zastoupení kyseliny olejové ve slunečnicovém oleji poskytuje plynová chromatografie.

Cílem této práce je ověření možnosti použití spektroskopie v blízké infračervené oblasti pro kontrolu složení mastných kyselin ve slunečnicovém semeni s využitím plynové chromatografie jako referenční metody.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Surovina pro výrobu slunečnicového oleje

Slunečnice je uznávanou rostlinou po celém světě. Latinsky je pojmenována *Helianthus annuus*. Nejprve byla pěstována pro dekorativní účely, teprve až později byly zjištěny její nutriční hodnoty. Stala se tak velmi důležitým zdrojem potravy a byla zařazena mezi zemědělské plodiny [3]. Slunečnice byla pěstována již před mnoha tisíci lety na území Spojených států. Z Ameriky byla tato plodina importována do Evropy. V Anglii se tato plodina používala v kožedělném průmyslu. V současné době slunečnice zaujala přední pozici v rámci olejnatých plodin ve světě. V České republice nepatří k plodinám s nejvyšším hospodářským významem. Jako olejnina nachází své uplatnění především v teplejších oblastech, kde je pěstování řepky rizikové. V roce 2013 se slunečnice zařadila jako čtvrtá nejvýznamnější olejnina s produkcí 36 milionů tun semen. Ukrajina, Rusko a země Evropské unie patří mezi tři největší pěstitele slunečnice. V Evropské Unii je největším producentem slunečnice Francie, Česká republika se řadí na deváté místo. Pěstování slunečnice v České republice zasahuje až do roku 1985, kdy vznikaly na Slovensku první systémy pro její produkci. Historicky největší plocha, na které se slunečnice pěstovala, byla na území České republiky v roce 2003, a to celkem 48 706 ha. V roce 2007 nastal propad pěstování tohoto druhu olejnin kvůli nízkým farmářským nákupním cenám. Pro pěstování slunečnicového semene je významným regionem kraj Jihomoravský, Středočeský a Ústecký. Například v roce 2012 bylo z celkové zaseté plochy 24,6 tisíc ha sklizeno okolo 1,3 tisíc ha odrůdy slunečnice s vyšším obsahem kyseliny olejové [3,4].

Rod slunečnice obsahuje kolem 60 převážně severoamerických druhů. Slunečnice dosahuje výšky až čtyři metry, odrůdy pěstované pro olej jsou vysoké kolem 190 cm. Kořen slunečnice má kulovitý tvar, může dosahovat do hloubky 2 až 3 metrů. Slunečnice se řadí k mohutným rostlinám, na bázi je zdřevnatělá, zbytek rostliny je však bylinného charakteru. Její květenství tvoří žlutý úbor, který obsahuje až 600 semen. Tato rostlina je náročná na teplo a vodu, s vodou však umí velmi dobře hospodařit díky mohutnému kořenovému systému [3].

V tabulce č. 1 je uvedeno zastoupení hlavních složek v 10 g slunečnicových semen. Do tuků jsou společně zahrnuty nasycené, mononenasycené a polynenasycené mastné kyseliny. Jejich jednotlivé zastoupení je zmíněno v tabulce č. 2 [5].

Tabulka 1: Obsah složek v 10 g slunečnicových semen [5]

| Název složky | Obsah [g] |
|--------------|-----------|
| Bílkoviny | 1,90 |
| Sacharidy | 2,76 |
| Tuky | 4,50 |

Tabulka 2: Zastoupení mastných kyselin v 10 g slunečnicových semen [5]

| Název | Obsah [g] |
|--------------------------------|-----------|
| Nasyčené mastné kyseliny | 0,60 |
| Mononenasycené mastné kyseliny | 1,10 |
| Polynenasycené mastné kyseliny | 2,80 |

Sklizeň slunečnicových semen nastává v České republice 40 – 45 dní po odkvětu slunečnice. Toto období je zpravidla od druhé poloviny srpna do konce září. Období sklizně ovlivňuje nejen počasí v době vegetace, ale také druh pěstované slunečnice a půdní podmínky. Semena slunečnice musí být zdravá a mít typickou barvu. Nesmí obsahovat živé škůdce. Pokud je slunečnicové semeno pěstováno ke zpracování na slunečnicový olej pro potravinářské účely, nesmí být chemicky konzervováno a nažky nesmí být plesnivé. Olejnatost semen je ovlivňována povětrnostními a půdními podmínkami, také použitou technologií pěstování. Na různých stanovištích mohou být rozdíly v získané olejnatosti i více než 10 %. Ve slunečnicovém oleji převládají nenasycené mastné kyseliny, zejména kyselina linolová a kyselina olejová. Zastoupení těchto kyselin se výrazně mění v závislosti na podmínkách prostředí. Mezi hlavní faktory patří teplota v době zrání semen, světlo a srážkové podmínky. Obsah nenasycených mastných kyselin je také ovlivněn zeměpisnou šířkou. Slunečnice pěstovaná v jižní Evropě nemá tak vysoký obsah nenasycených mastných kyselin jako slunečnice pěstovaná směrem na sever Evropy [3,4].

2.1.1 Nutriční vlastnosti slunečnicových semen

Slunečnicová semena obsahují kromě bílkovin, tuků a sacharidů, také vitaminy. Jedním z hlavních vitaminů je vitamin E, který patří do skupiny tokoferolů. Vitamin E je antioxidantem, který je rozpustný v tucích. Napomáhá tělu bránit se před záněty, artritidou a cukrovkou. Konzumace slunečnicových semen prospívá kardiovaskulárnímu systému. Nedochází k poškození cholesterolu volnými radikály [6].

Slunečnicová semena jsou zdrojem minerálních látek, jsou v nich obsaženy stopové prvky a další účinné látky. Jejich zvláštností je, že obsahují enzymový systém a nenasycené mastné kyseliny, které jsou velmi významné pro lidskou výživu. Vysoká nutriční hodnota zvýšila poptávku po slunečnicovém oleji [4].

Chemické a fytochemické rozbory slunečnicových semen odhalily přítomnost bílkovin, vlákniny a dalších živin, jako jsou vitamíny B1, B5, B6, mangan, železo a zinek. Například vitamin B6 je užitečným pro metabolické procesy snižující riziko depresí. V běžné lidské stravě nemusí být obsažen v dostatečném množství. Mangan je katalyzátorem u syntézy mastných kyselin a cholesterolu, usnadňuje metabolické procesy uhlovodanů a bílkovin [7]. Institucí Dilipkumar Pal v Indii [8] bylo prokázáno, že slunečnicová semena mají antioxidační vlastnosti.

Obsah hořčíku ve slunečnicových semenech napomáhá k regulaci činnosti nervového systému. Svou přítomností vyvažuje obsah vápníku, slouží pro blokaci kalciových kanálků na buněčných membránách. Pokud má lidský organismus nedostatek hořčíku, může docházet ke svalovým křečím a zvýšení krevního tlaku. Ve slunečnicovém oleji lze nalézt i zdroj selenu, který je velmi účinnou ochranou proti rakovině. Selen je zahrnut v aktivním místě mnoha látek lidského těla, příkladem je glutathion peroxidáza. Glutathion peroxidáza je antioxidační enzym a je přirozenou složkou lidského organismu [9].

2.2 Charakteristika tuků a olejů

Již ve starověku byly tuky a oleje využívány ve výživě, v kosmetice, v lékařství a také hojně k technickým účelům. V tomto období však nebylo ještě známo jejich přesné složení, teprve až v roce 1779 se podařilo izolovat glycerol, o tento pokrok se zasloužil Scheele. Francouzský chemik E. Chevreul je považován za zakladatele chemie tuků. Izoloval nejvýznamnější mastné kyseliny a tvrdil, že tuky a oleje jsou estery mastných kyselin a glycerolu. Další, kdo přispěl k rozvoji chemie tuků, byl H. P. Kaufmann. Zasloužil se o objev hydrogenace tuků. Naším významným chemikem, který přispěl v této oblasti, byl brněnský profesor V. Veselý, který se zabýval syntézou čistých mastných kyselin a analýzou tuků [10,11].

V minulosti se lipidy dělily do tří skupin na základě jejich konzistence. Těmito skupinami byly vosky, tuky a oleje. Dnes už se dělí oleje dle jejich chemického složení. První skupinou jsou mastné kyseliny a jejich mýdla. Druhou skupinu nazýváme homolipidy, kde najdeme vosky, tuky a oleje. Do třetí skupiny řadíme heterolipidy, sloučeniny obsahující ještě další skupiny kromě mastných kyselin a alkoholů. Poslední skupinou jsou komplexní lipidy, například lipoproteiny [11].

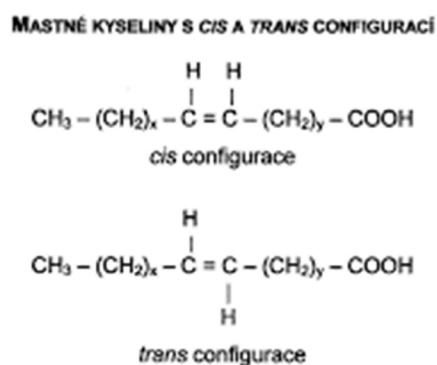
Tuky a další lipidy jsou pro člověka nezbytnou součástí stravy. Jsou zdrojem energie, zdrojem esenciálních mastných kyselin. Označení esenciální mastná kyselina znamená, že je tato kyselina nezbytná pro lidský organismus a že tento druh kyselin si není schopen lidský organismus syntetizovat sám a musí je přijímat v potravě. Nejdůležitější pro metabolismus je syntéza vyšších esenciálních mastných kyselin, jejichž prekurzory přijímáme v potravě [11,12]. Pro lidskou výživu jsou esenciální kyselina linolová C18:2 s dvojnou vazbou na 9. a 12. uhlíku a kyselina linolenová C18:3 s dvojnou vazbou na uhlíku 9., 12. a 15. Tyto kyseliny jsou prospěšné pro organismus, jsou prevencí proti ekzémům, lupence a nervovým poruchám. Kyselina linolová je známá jako omega-6 a kyselina linolenová jako omega-3. Tyto kyseliny jsou esenciálními pouze v konfiguraci *cis* [13].

2.2.1 Mastné kyseliny jako hlavní složka tuků a olejů

Celkový denní příjem tuků u člověka by měl být udržován okolo 30 % z celkového příjmu kalorií během dne a neměl by klesnout pod 20 % celkového energetického denního příjmu. Tato hodnota platí pro obsah živočišných a rostlinných tuků společně. Nejdůležitější složkou u tuků jsou mastné kyseliny, které jsou pro lidský organismus nepostradatelné. Jedná se o uhlíkaté řetězce, které jsou tvořeny čtyřmi a více uhlíky. Zakončeny jsou karboxylovou skupinou. Mastné kyseliny jsou rozděleny dle funkčních skupin na nasycené, nenasycené a

kyslíkaté. Dle charakteru řetězce je lze rozdělit na lineární, rozvětvené a cyklické. Molekulová hmotnost mastných kyselin souvisí s viskozitou těchto kyselin. Viskozita nenasyčených mastných kyselin je podstatně menší než viskozita u nasycených derivátů. S rostoucí teplotou viskozita klesá dle exponenciální závislosti [11].

Nejvíce rizikovou skupinou je příjem *trans* nenasyčených mastných kyselin. Příjem nenasyčených mastných kyselin v konfiguraci *trans* má nepříznivý vliv na srdce a cévní systém [14]. Mastné kyseliny v konfiguraci *cis* mají pozitivní vliv na lidský organismus [15]. Na obrázku č. 1 je uvedena konfigurace *cis* a *trans* mastných kyselin.



Obrázek 1: Strukturální vzorec mastných kyselin - konfigurace *cis* a *trans* [16]

Každý rostlinný olej má charakteristický profil mastných kyselin. Složení slunečnicového oleje je kombinací mononenasyčených a polynenasycených tuků s nízkým obsahem tuků nasycených. Pro slunečnicový olej je typickým znakem vysoké zastoupení kyseliny linolové a kyseliny olejové. Obsah kyseliny olejové může být ovlivněn genetickým zlepšením, tzv. speciálním pěstováním vysoko-olejové slunečnice [9]. Codex Alimentarius [2] uvádí pro vysoko-olejovou slunečnici hodnotu kyseliny olejové nad 75% z celkového množství mastných kyselin.

2.3 Kontrola jakosti vstupních surovin

V zemědělství a potravinářském průmyslu je jakost všech olejnin velmi důležitým parametrem. Ať už se jedná o vlhkost nebo olejnatost dané suroviny. Pokud je daná surovina pěstována za účelem získání speciální odrůdy, o to víc je pak její jakost sledována. Pro kontrolu garantované jakosti suroviny ve zpracovatelském provozu je nutné použít snadnou analytickou metodu, která není náročná na provedení a je dostupná. Výsledek kontroly musí být uživateli poskytnut za krátký čas. V tomto případě se nabízí použití spektroskopie v blízké infračervené oblasti, také označované jako NIR spektroskopie, Near Infrared Spectroscopy [17].

Aby bylo možné olejninu kontrolovat touto metodikou, je nutné analyzovaný materiál vhodně homogenizovat. U slunečnicového semene je nutné materiál pomlet na danou velikost. Parametry, které je možné sledovat metodikou NIR spektroskopie u slunečnicového semene, jsou například vlhkost, tuk semene, dusíkaté látky a obsah vlákniny. Ve

slunečnicových semenech lze pomocí spektroskopie v blízké infračervené oblasti také kontrolovat zastoupení mastných kyselin. Kontrola zastoupení mastných kyselin je u vysoko-olejové slunečnice zajímavá kvůli ověření typu odrůdy a z hlediska ekonomiky, zejména kvůli ceně na trhu za tento produkt [3].

Cantarelli a kol. [18] navrhli metodu pro stanovení kyseliny olejové ve slunečnicových semenech. Zanalyzovali více jak sto vzorků slunečnicových semen pomocí infračervené spektroskopie v blízké oblasti, difúzní reflektancí NIRDRS. Stanovení byla prováděna v terénu na mobilním typu přístroje a slunečnicová semena byla přečištěna na sítěch. Kalibrace byla vytvořena na kalibračním modelu PLS – „*Partial least squares*“, metoda částečných nejmenších čtverců. Jednotlivé koncentrace kyseliny olejové byly získány analýzou vzorků slunečnicových semen na plynové chromatografii s plamenově ionizačním detektorem GC-FID. Správnost a přesnost metody byla hodnocena pomocí plynové chromatografie jako referenční metody.

Další možnou metodou pro kontrolu slunečnicových semen s vysokým obsahem kyseliny olejové je stanovení indexu lomu pomocí ručního refraktometru. Tato metodika je snadná, nenáročná na provoz a její pořizovací náklady jsou velmi nízké [19].

Plynová chromatografie je rozšířenou metodou pro kvantitativní stanovení mastných kyselin. Cílem autora Honggen Zhang [20] bylo vyvinutí jednoduché derivatizační metody s použitím plynové chromatografie. Plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí GC-FID byla vyvinuta pro přímé kvantitativní stanovení kyseliny olejové a dalších mastných kyselin. Byla použita 30 m kolona s 0,32 mm vnitřním průměrem, celková doba analýzy trvala 20 minut. Tato metoda byla využita pro analýzu zmíněných komponent u USP-NF, United States Pharmacopeia, National Formulary, materiálu.

Dle změřené hodnoty indexu lomu lze klasifikovat o zařadit typ odrůdy slunečnicového semene, zda se jedná o vysoko-olejovou slunečnici nebo ne. Důležitým poznatkem je, že tato metoda nedokáže určit přesné zastoupení kyseliny olejové a přináší s sebou mnoho nepřesností. V tabulce č. 3 jsou uvedeny rozmezí hodnot indexu lomu dle Codex Alimentarius pro jednotlivé typy slunečnicového oleje. Je zřejmé, že se rozsahy indexu lomu pro jednotlivé druhy olejů překrývají, proto je tato metodika při určitých hodnotách indexu lomu velmi nepřesná [2,21].

Tabulka 3: Rozmezí indexu lomu pro jednotlivé druhy slunečnicového oleje dle Codex Alimentarius[2]

| Druh slunečnicového oleje | Zastoupení kyseliny olejové z celkového složení mastných kyselin [%] | Rozmezí hodnoty indexu lomu |
|--|--|-----------------------------|
| Slunečnicový olej | 14 – 39,4 | 1,461 – 1,468 při 40 °C |
| Slunečnicový olej se střední hodnotou kyseliny olejové | 43,1 – 71,8 | 1,461 – 1,471 při 25 °C |
| Slunečnicový olej s vyšší hodnotou kyseliny olejové | 75 – 90,7 | 1,467 – 1,471 při 25 °C |

2.4. Použité metody a experimentální techniky

2.4.1 Plynová chromatografie

Chromatografie se v současnosti řadí mezi nejvýznamnější analytické metody. Tato metoda je vhodná pro stanovení a identifikaci anorganických i organických látek. V roce 1903 byla chromatografie objevena ruským botanikem M. S. Cvetem, který na sloupci sorbentu separoval listová barviva. Tento typ chromatografie na sloupci dokázal separovat i složité přírodní látky. Avšak byl doprovázen řadou chyb a nedostatků, kvůli kterým byla sloupcová chromatografie zapomenuta. Hodně let byla daleko za chromatografií tenkovrstvou, papírovou nebo plynovou. Problém byl s používanými sorbenty, které měly malou účinnost. Průtok kolonou byl způsoben jen gravitační silou. Později se urychlily chromatografické procesy, a to použitím menších částic v koloně. Laboratorní techniky až později zvýšily zájem o sloupcovou chromatografii, která dnes patří také mezi významné analytické techniky. Oproti této metodě stojí plynová chromatografie, která je náročnější a složitější na laboratorní provedení. Plynová chromatografie je omezena těkavostí a teplotní stabilitou látek. Na druhé straně využívá velmi citlivých detektorů, které jsou schopny analyzovat i stopová množství látek. Obecně všechny metody, které mají základem postupné a opakované dělení látek mezi dvě či více fází, vychází z různých fyzikálních a chemických vlastností, jsou označovány jako chromatografické metody [22,23].

Chromatografický proces je charakterizován distribuční konstantou. Distribuční konstanta popisuje rovnovážnou distribuci složek mezi dvě fáze. Tyto fáze jsou označovány jako fáze stacionární a fáze mobilní. Mezi oběma fázemi opakovaně dochází k vytvoření rovnovážného stavu při separaci složek analytu. Příkladem je možné uvést distribuci složky *A* mezi dvě fáze. Tento proces lze popsat distribuční konstantou K_D . [24] Distribuční konstanta popisuje poměr rovnovážných koncentrací dané složky *A* ve dvou vzájemně koexistujících fázích, fázi stacionární a mobilní. Tento stav popisuje rovnice (1). Složka *A* ve stacionární fázi je označena A_{SF} a složka *A* v mobilní fázi je v rovnici označena jako A_{MF} . Hodnota distribuční (rozdělovací) konstanty nabývá různých hodnot. Pokud je přítomna látka, která je ve stacionární fázi zadržována po delší čas, retenční čas popisující tento stav dosahuje vyšších hodnot a distribuční (rozdělovací) konstanta K_D je tedy větší [25].

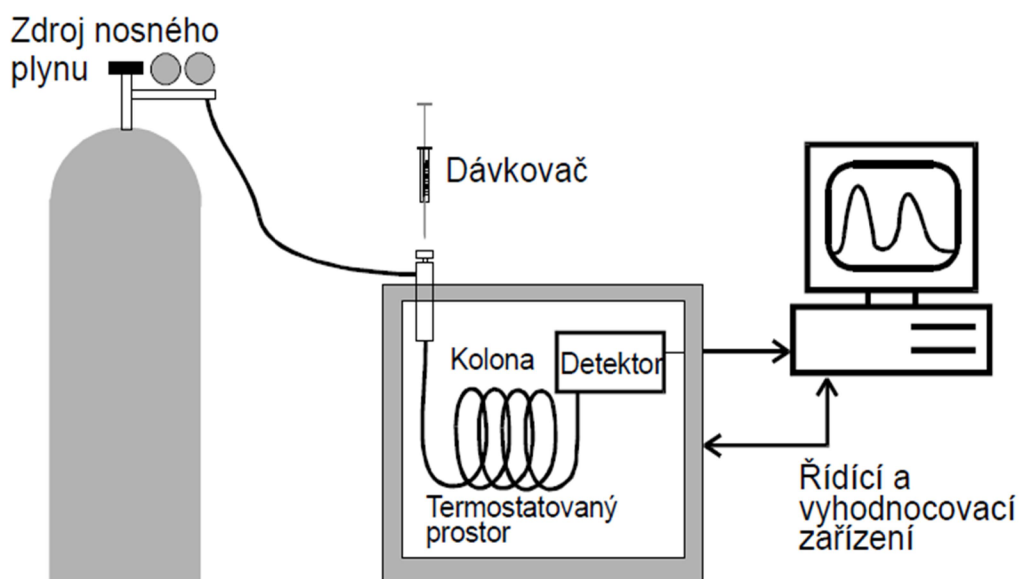
$$K_D = \frac{[A_{SF}]}{[A_{MF}]} \quad (1)$$

Každá složka, která je separována, má svůj retenční čas t_R a retenční objem V_R [24]. Jednotkou retenčního času je minuta a jednotkou retenčního objemu mililitr. Tyto dvě veličiny, které popisují separovanou složkou, spolu souvisí a jsou vyjádřeny vztahem, který je uvedený v rovnici (2):

$$V_R = t_R \cdot F_m \quad (2)$$

kde F_m je objem mobilní fáze vyjádřený v mililitrech, který za čas 1 sekundy proteče kolonou. Tato veličina má rozměr cm^3/s . Retenční čas, někdy také označován jako čas eluční, vyjadřuje dobu, která uběhne od nástřiku analyzované látky do dosažení maximální hodnoty eluční křivky. Retenční neboli eluční objem vyjadřuje objem, který projde za tuto dobu retenčního času. Dalšími veličinami, které popisují chromatografický proces, je mrtvý objem a mrtvý retenční čas. Mrtvý objem je objem od nástřiku, přes kolonu až po detektor. Mrtvý objem je zjišťován experimentálně. Mrtvý retenční čas je doba od nástřiku dané látky, která není vůbec zadržována ve stacionární fázi. Chromatogram je záznam, který nám analýza na plynovém chromatografu poskytuje. Skládá se ze dvou os, osy x a osy y. Na ose x je znázorňován čas a na ose y intenzita signálu detektoru, která je funkcí koncentrace složky v mobilní fázi [27].

V plynové chromatografii je mobilní fází plyn, který je označován jako nosný. Separované složky jsou také v plynném stavu. Pokud jde o separaci kapalných vzorků, je zvolena pro nástřik vzorků vhodná teplota, aby separovaná složka byla schopna přejít do plynné fáze. Stacionární fází v plynové chromatografii je tuhá látka nebo kapalina na zakotveném nosiči. Pokud je stacionární fází tuhá látka, jde o systém GSC, Gas-Solid Chromatography, kde je principem separace adsorpce nebo síťový efekt. V případě kapaliny na zakotveném nosiči je složka rozdělována mezi kapalnou stacionární fází a plynnou mobilní fází. Separované složky jsou unášeny nosným plynem z kolony a jsou zaznamenávány detektorem. Plynová chromatografie má kvůli použití plynu jako mobilní fáze značnou výhodu oproti jiným chromatografickým metodám. Plyn, který je v plynové chromatografii označován jako nosný, je viskózní a dobře stlačitelný. Interakce molekul v plynech jsou menší než v látkách kapalného skupenství. Mobilní fází je tedy inertní plyn a stacionární fází nejčastěji kapalina zakotvená na inertním nosiči, méně často povrchově aktivní adsorbent. V současnosti je plynová chromatografie velmi důležitou analytickou metodou v oblasti organické chemie, biochemie a chemické technologie. Své uplatnění našla i v potravinářském, chemickém a petrochemickém průmyslu. Slouží také k analýze nečistot v životním prostředí. Plynová chromatografie má vysokou rozlišovací schopnost, využívá se jí při kombinaci s hmotnostní spektrometrií nebo infračervenou spektroskopií [4,24].



Obrázek 2: Schéma plynové chromatografie [26]

Na obrázku č. 2 je zobrazeno schéma plynového chromatografu, skládá se ze zdroje nosného plynu, dávkovacího zařízení, chromatografické kolony v termostátovém prostoru. Další částí je detektor, zařízení na zpracování signálu detektoru a jeho záznam a zařízení na vyhodnocení analýzy. Nosný plyn prochází přes redukční ventil. Ve ventilu se zredukuje tlak na méně než 0,5 MPa. Dále nosný plyn prochází regulátorem tlaku, kde se nastaví požadovaný tlak vhodný pro vstup na kolonu. Vzorek se dávkuje do proudu nosného plynu a je jím unášen na chromatografickou kolonu. V koloně se jednotlivé složky zachycují na stacionární fázi a jsou vymývány nosným plynem do detektoru. Signál detektoru je zpracován a pomocí vhodného softwaru převeden na grafický záznam. Moderní plynové chromatografy jsou vybaveny automatickým dávkovačem. Z analýzy na plynovém chromatografu získáme informaci jak kvalitativní, tak i kvantitativní [25].

2.4.2 Infračervená spektroskopie

Pomocí infračervené spektroskopie lze identifikovat a charakterizovat strukturu anorganických i organických látek. Infračervená spektroskopie je analytická nedestruktivní metoda, která se zabývá studiem vibračních a rotačních přechodů v molekulách. Pokud při změně vibračních a rotačních stavů dochází i ke změně dipólového momentu molekuly, dojde k pohlcení infračerveného záření, které je charakteristické pro určitou vazbu v molekule. Intenzita absorpčních pásů je úměrná velikosti změny dipólového momentu. Pro aktivitu vibrací v infračerveném spektru je nenulová změna dipólového momentu podmínkou [26]. Infračervené záření je popisováno jako elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 0,78 – 1000 μm . Tento rozsah odpovídá oblasti vlnočtů 12800 – 10 cm^{-1} . Největší význam pro identifikaci molekul má oblast elektromagnetického spektra v rozsahu 400 – 4000 cm^{-1} . Oblast infračerveného spektra se dělí na blízkou, střední a vzdálenou. Blízká oblast využívá vlnočtů v rozsahu 12800 – 4000 cm^{-1} , střední oblast 4000 – 200 cm^{-1} a vzdálená 200 – 10 cm^{-1} .

¹. Pro kvalitativní analýzu je nevíce využívána střední infračervená oblast. Naopak pro kvantitativní analýzu je upřednostňována blízká infračervená oblast [28].

V infračervené spektroskopii je používána transmisní a reflektanční technika. U techniky transmise infračervené záření při průchodu vzorkem způsobí změnu rotačně-vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu. Transmisi lze vidět na obrázku č. 3. Druhou používanou technikou je reflektance. Je rozdělena na difúzní reflektanci, označovanou také jako DRIFT – *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*, a zeslabenou úplnou reflektanci ATR - *Attenuated Total reflectance*. U difúzní reflektance je paprsek infračerveného záření vyzářen přímo na povrch práškového vzorku. Část záření je absorbována, část odražena a část rozptýlena. Technika ATR je založena na odrazu záření na fázovém rozhraní měřeného vzorku a krystalu o vysokém indexu lomu. Techniky reflektance jsou méně časově náročné než techniky transmise. Oba typy reflektance jsou uvedeny na obrázku č. 4 [28].



Obrázek 4: Princip transmise a reflektančních technik [28]

Infračervené spektrum je grafické zobrazení funkční závislosti energie na vlnočtu dopadajícího záření. Ve spektru je pak zobrazen absorpční pás, který je definován vlnočtem absorpčního maxima, šířkou pásu a intenzitou absorpce. Energie může být vyjádřena jako absorbance nebo transmitance. Pokud se jedná o transmitanci, je absorbance popsána jako $\log 1/T$. Transmitance je popsána jako poměr intenzity záření, které prošlo vzorkem, k intenzitě záření vycházejícího ze zdroje. Pokud je absorbance při dané vlnové délce úměrná molární koncentraci, platí zde Lambert-Beerův zákon [29].

2.4.2.1 Rotační stavy molekul

Pro popis rotace dvouatomové molekuly, která rotuje pouze kolem své osy, existuje veličina moment setrvačnosti I . Povolené přechody jsou opět mezi sousedními energetickými

hladinami. Rotační kvantové číslo je ± 1 . Žádné jiné přechody nejsou povolené. U modelu anharmonického oscilátoru se stoupající energií rozdíl mezi jednotlivými vibračními hladinami klesaly, u rotačních stavů stoupají. Pro povolené přechody v infračerveném spektru platí stejná podmínka o aktivitě jako při vibračních přechodech. V praxi se nejvíce projevují kombinace vibračně rotačních přechodů u molekul. Čistě rotační přechody jsou pro sledování ve spektru značně náročné. Je nutné zajistit spektrometry s vysokým rozlišením v mikrovlnné oblasti spektra. Čím těžší je molekula, tím nižší je její rotační konstanta B a vzdálenosti mezi rotačními pásy. Rotační konstanta je definována vztahem v rovnici (3):

$$B = \frac{h}{8\pi^2 I_c} \quad (3)$$

kde h je Planckova konstanta, I je moment setrvačnosti. V infračervené spektroskopii lze měřit látky všech tří skupenství. Látky anorganického, organického i biologického původu [30].

2.4.2.2 *Vibrační stavy molekul*

Pro popis vibrace dvouatomové molekuly slouží dvě kuličky a určité hmotnosti m_1 a m_2 . Kuličky jsou spojeny pružinou, natažením pružiny zvětšíme vzdálenost mezi kuličkami, na kuličky v tomto případě působí síla F , která vrátí kuličky do původní polohy. Kuličky získají kinetickou energii, překročí rovnovážnou polohu a tím dojde ke stlačení pružiny. Tlak pružiny bude kuličky vracet opět do rovnovážné polohy. Tyto procesy se neustále opakují a molekula začne konat vibrační pohyb. Pro popis tohoto vibračního pohybu existuje veličina frekvence, která závisí na pevnosti vazby mezi vibrujícími atomy a na jejich hmotnosti. Frekvence je dána vztahem uvedeným v rovnici (4):

$$v = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (4)$$

kde v je frekvence vibračního pohybu, k je silová konstanta a μ je redukovaná hmotnosti atomů, které vibrují. Pro výpočet redukované hmotnosti vibrujících atomů slouží vztah, který je uveden v rovnici (5):

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (5)$$

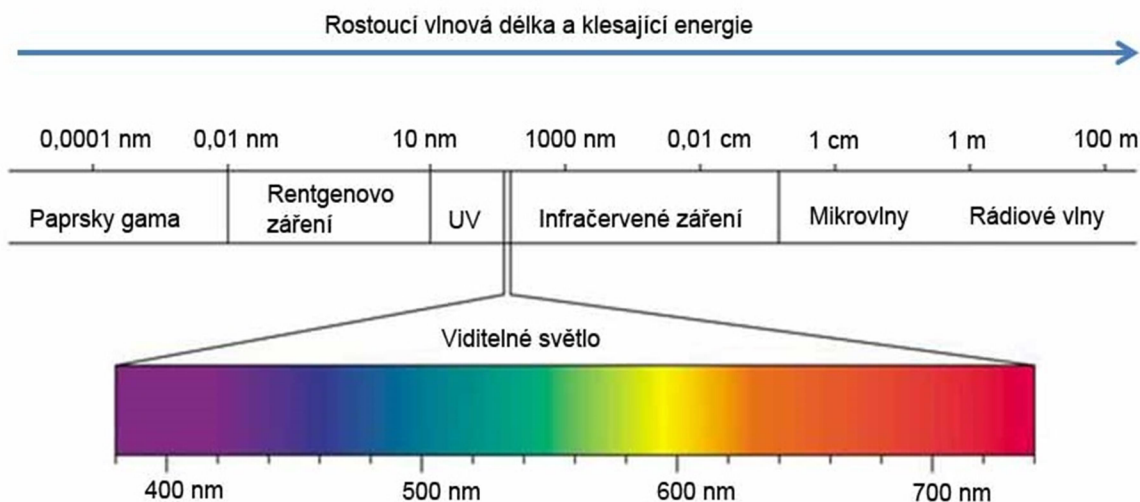
kde m_1 a m_2 jsou jednotlivé hmotnosti atomů. Molekula se může nacházet jen v určitých energetických stavech, které jsou popsány vibračním kvantovým číslem. Dle teorie kvantové mechaniky platí, že vibrační přechody spojené s absorpcí nebo emisí energie jsou možné pouze mezi sousedními energetickými hladinami. Takže změna vibračního kvantového čísla nabývá hodnot ± 1 . V reálném světě však teorie harmonického oscilátoru neplatí. Pokud budeme opět uvažovat dvouatomovou molekulu, která je spojena pružinou, nemůžeme vzdálenost mezi atomy zvětšovat do nekonečna. Po dosažení tzv. disociační energie dojde k roztržení pružiny neboli vazby. Tento proces popisuje kvantově mechanický model anharmonického oscilátoru. Potenciálová křivka nemá symetrický tvar jako u harmonického oscilátoru a vzdálenosti mezi jednotlivými vibračními stavy nejsou ekvidistantní. Přechody mezi vibračními hladinami nejsou striktně vázané pouze na přechody mezi sousedními hladinami. Jsou možné přechody energeticky náročnější. Tyto přechody jsou charakterizovány jako přechody vyšší harmonické frekvence. Tyto přechody jsou méně

pravděpodobné s rostoucí energií kvanta nutného k přechodu. Ve spektru tyto přechody vidíme jako málo intenzivní absorpční pásy. Fundamentální přechody jsou nejpravděpodobnější. Pokud vzorek například absorbuje záření v NIR oblasti, dojde tím k přechodům mezi vibračními hladinami molekul. Tyto přechody jsou označovány jako kombinační. Kombinační přechody označují současnou excitaci několika vibračních módů. Dalším typem přechodů mezi vibračními hladinami jsou tzv. overtóny. Tento přechod odpovídá excitaci daného vibračního módu do vyšší excitované vibrační hladiny. Pro kombinační přechody je typická oblast $4000 - 5300 \text{ cm}^{-1}$. Pro první overtóny je typická oblast $4600 - 7300 \text{ cm}^{-1}$, pro druhé overtóny $6000 - 10000 \text{ cm}^{-1}$ a třetí overtóny $8800 - 14500 \text{ cm}^{-1}$. Přechody fundamentální jsou charakteristické spíše pro oblast střední infračervenou spektroskopii. Kombinační přechody i overtóny nejsou tak časté a pravděpodobné jako přechody fundamentální, proto absorpce záření v NIR oblasti je řádově nižší než v MIR, a to při stejné tloušťce vzorku [31].

Polyatomová molekula se skládá z více atomů, které jsou spojeny určitými vazbami. Každý hmotný bod lze v prostoru popsat pomocí os x , y a z . Každý hmotný bod má tedy tři stupně volnosti, tzv. $3N$. Pohyb polyatomové molekuly si lze představit jako soubor vibrací jednotlivých oscilátorů skládajících molekulu. Z celkového počtu $3N$ stupňů volnosti na lineární molekulu připadá $3N - 5$, pro nelineární molekulu $3N - 6$ stupňů volnosti. Pro víceatomové molekuly a jejich aktivitu v infračervené spektroskopii je podmínkou opět nenulová změna dipólového momentu. Změna dipólového momentu souvisí se symetrií molekuly. Molekuly mohou mít tyto prvky symetrie: zrcadlovou symetrii, rovinu symetrie, osy a centrum symetrie. Pro vibrace polyatomových molekul rozlišujeme dva typy vibrací, a to valenční a deformační [31].

2.4.2.3 Spektroskopie v blízké infračervené oblasti

Spektroskopie v blízké infračervené oblasti je metodou molekulové spektroskopie, která využívá oblast spektra blízkého infračerveného záření, oblast v rozsahu vlnových délek $800 - 2500 \text{ nm}$ resp. vlnočtů $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. Hranice od sousedních oblastí není dána striktně. Oblasti se překrývají. V oblasti $12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ se nachází většina vibrací vazeb - CH, -OH, -SH, -NH. Většina aplikací kvantitativní analýzy prováděných v reflektanci se nachází v oblasti $1200 - 2500 \text{ nm}$. Pod 1200 nm jsou totiž absorpční pásy slabé, proto je nelze tak dobře měřit. Z jedné strany blízká infračervená oblast navazuje na viditelnou oblast, z druhé strany pokračuje ve střední infračervenou oblast [23]. Na obrázku č. 5 je uvedeno celé elektromagnetické spektrum.



Obrázek 5: Elektromagnetické spektrum[31]

O objev techniky NIR se zasloužil William Herschel. Využití spektroskopie v blízké infračervené oblasti se do začátku druhé světové války nepovažovala za důležitou, a to kvůli překrývání NIR pásů a jejich těžké interpretaci. Padesátá léta minulého století byla velmi významná pro infračervenou spektroskopii v blízké oblasti kvůli zjištění, že vodíkové vibrace ve vzorku jsou odpovědné za téměř všechny absorpční pásy v NIR oblasti. V dalších letech se tedy rozmohlo monitorování obsahu vody v pevných materiálech. V roce 1968 Karl Heinz Norris použil spektrometr, který měl filtry pro různé oblasti vlnových délek, a to 1680, 1940, 2100, 2180, 2230 a 2310 nm pro stanovení obsahu bílkovin, vody a tuku v obilninách, sójových bobech. O pár let později Norris [33] použil skenující monochromátor pro stanovení parametrů kvality v píceřinách, použili přístroj Cary 14, dnes nese název Varian.

V roce 1978 Shenk a kol. [34] využili NIR v terénních podmínkách na dodávkovém automobilu. Měření bylo využito hlavně ke kontrole sena. Další význam měl od roku 1983 vývoj optických vláken, který dovoluje delokalizaci měření ve vzorcích kapalného a pevného skupenství. Záření je vedeno ze zdroje pomocí optických vláken do vzorku a na detektor, kde jsou snímána NIR spektra daného vzorku.

V současné době je velmi rozšířené používání dvoupaprskových spektrometrů, které jsou schopné automaticky kompenzovat absorpci vodní páry a oxidu uhličitého ze vzduchu, kompenzuje i absorpci rozpouštědla. Infračervený spektrometr se skládá ze zdroje infračerveného záření, monochromátoru, kterým bývá nejčastěji odrazová mřížka, detektoru, který je schopen detekovat infračervené záření, posledním prvkem je registrační zařízení [31].

Mezi běžné detektory pro infračervené záření se řadí termoelektrický článek a Golayův pneumatický detektor, který je založen na principu tepelné roztažnosti plynů. Fotoelektrický detektor je také vhodným typem detektoru pro infračervené záření [35].

Pro interpretaci NIR spekter se využívá matematických a statistických metod. Pro získání kvalitativní informace u čistých analyzovaných látek je možné použít srovnání spektra

s knihovnamí NIR spekter. Tak je možné provádět identifikaci látek. Existují například knihovny spekter významných farmaceutických látek nebo spekter polymerů. NIR spektra lze tedy využít i pro kvantitativní stanovení, a to v mnoha oblastech, například v oblasti farmaceutického průmyslu, petrochemie nebo potravinářství [36]. Je nutné vhodně vybrat optimální experimentální postup a zpracování dat chemické analýzy. Molekula je schopna absorbovat elektromagnetické záření, protože stav jejího elektronového obalu se mění pomocí vibračních pohybů atomů a dochází k rotaci jako celku [30,31].

První skupinou jsou NIR spektrometry s filtry. Jedná se o přístroje, které jsou cenově méně náročné a mají menší rozměry. Principem je selekce určitých vlnových délek za pomoci přítomných filtrů. Příkladem jsou spektrometry řady Zeltex, které jsou vybaveny filtry pro rozsah měření ve 14 vlnových délkách [29].

Druhou skupinou jsou tzv. disperzní NIR přístroje, které obsahují mřížkový monochromátor. Monochromátor slouží pro rozklad nebo disperzi blízkého infračerveného záření na difrakční mřížce. Limitní faktor pro tento typ přístrojů je pomalejší čas skenování vzorku a nižší přesnost měření v jednotlivých vlnových délkách. Navzdory tomu je tento typ v zemědělství a potravinářství nejrozšířenější. Jako příklad lze uvést spektrometry od firmy FOSS nebo PERTEN [31].

Třetí skupina spektrometrů funguje na principu akusticko-optických filtrů, zkratkou AOTF. Při jejich použití dochází ke změně indexu lomu specifického krystalu pomocí ultrazvukových vln. Dojde tak k rozkladu dopadajícího polychromatického záření na jednotlivé vlnové délky s vysokou hladinou rozlišení. Poslední skupinou jsou spektrometry, které využívají Fourierovu transformaci, tzv. FT-NIR. Na vzorek je vyžáreno polychromatické záření, které je specificky frekvenčně posunuto pomocí interferometru. Tzv. interferogram, což je záznam získaný tímto typem přístroje, je nutné převést na tvar normálního absorpčního spektra. Tento převod je proveden na základě matematické operace, tzv. Fourierovy transformace. Nejčastějším typem interferometru je Michelsonův. Výhodou tohoto typu NIR přístroje oproti typu disperznímu je vyšší rychlost skenování vzorku, citlivost a přesnost měření. Nevýhodou jsou pak pořizovací náklady. Příkladem výrobců spektrometrů s Fourierovou transformací je firma Nicolet, Bruker nebo Buchi [29,31]. Spektrometr s FT-NIR je uveden na obrázku č. 6.



Obrázek 6: Spektrometr Antaris, firma Nicolet [37]

V praxi se při měření na NIR uplatňuje více vlnových délek, tudíž Lambert-Beerův zákon neplatí. Pokud světelný tok I_0 dopadá na vzorek, některé fotony vzorkem procházejí, nebo se od vzorku odrážejí nebo jsou absorbovány pomocí kovalentních vazeb vzorku, které mají funkci tzv. oscilačního můstku, který přesně zachytí frekvenci NIR záření. Absorpce je tedy na určitých frekvencích selektivní a absorbované fotony vyvolají molekulární vibrace, je poskytnuta informace o molekulárních skupinách v chemické struktuře vzorku [31].

Metoda infračervené spektroskopie v blízké oblasti je mimo jiné využívána k hodnocení kvality rostlinných výrobků. Jde o metodiku šetrnou k životnímu prostředí. Infračervená spektroskopie v blízké oblasti také slouží k monitoringu půdních charakteristik, k rozboru složení směsných vzorků, například zastoupení komponent v krmných směsích, ke kontrole zemědělského provozu. Své uplatnění najde dále ve šlechtění a odrudové oblasti, ve vědě a výzkumu v zemědělství. Jejím dalším přínosem je kontrola jakosti surovin a produktů v potravinářském a krmivářském průmyslu. Tato technika přináší užitečné informace řídicím pracovníkům ve výrobě k operativnímu rozhodování, informace o kontrole jakosti na všech stupních, kontrola vstupních surovin v zemědělství a potravinářství, v oblasti obchodu k úpravě ceny ve vazbě na kvalitu. Používáním této metody se dosáhne zvýšení efektivnosti a rychlosti prováděných rozborů. Při těchto stanoveních je kladen důraz na rychlost, přesnost a nízké jednotkové náklady. Také v České republice se používání spektroskopie v blízké infračervené oblasti za posledních pár let velmi rozšířilo. Jedná se o metodu nedestruktivní, vzorek se ani nerozkládá, ani nespotebovává, není nutné vzorek náročně připravovat. Výsledek je znám v čase pod dvě minuty a je možné simultánně měřit více parametrů. Analyzovaný materiál musí obsahovat C-H, N-H, S-H nebo O-H vazby a koncentrace látky

musí být větší než $1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Lze měřit vzorky všech tří skupenství, a to jednotlivě nebo kontinuálně ve zvoleném časovém intervalu. Pro konkrétní požadavky na měření je potřebné zvolit určité uspořádání a technické vybavení. Infračervená spektroskopie je sekundární metoda, to znamená, že přesnost se vždy musí testovat na metodu standardní, nelze očekávat, že analýza na NIR je přesnější než metoda, se kterou je srovnávána. NIR metoda se prosadila v oblasti zemědělství, potravinářství hlavně kvůli přesné a rychlé analýze vzorku, která je ekologicky nezávadná [17].

González-Martín [38] použil infračervenou spektroskopii v blízké oblasti pro kontrolu kvality slunečnicového semene. Výsledky ukazují, že analytickou metodu NIR je možné použít jako rychlou a nedestruktivní metodu pro stanovení vlhkosti, tuku a obsah kyseliny olejové ve slunečnicových semenech. Rozsahy kalibrací pro jednotlivé hodnoty byly srovnány s klasickými metodami. Rozsah hodnot pro kyselinu olejovou byl 60,0 – 93,1 %. Pomocí diskriminantu byly vybrány vlnové délky vhodné pro klasifikaci slunečnicových semen, rozdělení dle zastoupení kyseliny olejové. Model diskriminantu umožňuje klasifikovat slunečnicová semena s vysokým obsahem kyseliny olejové nebo naopak s nízkým obsahem kyseliny olejové. Chromatografické analýzy byly provedeny dle metody ISO 5590 pro stanovení metyl esterů mastných kyselin. Byly sesbírány vzorky o různém zastoupení kyseliny olejové. Vzorky s procentuálním zastoupením větším jak 75 % kyseliny olejové z celkového zastoupení mastných kyselin byly automaticky na NIR metodice transportovány do skupiny vysoko-olejové slunečnice.

Pro úpravu zastoupení kyseliny olejové nebo kyseliny linolové ve slunečnicových semen existují v současné době různé šlechtitelské způsoby. Předmětem výzkumu byla infračervená spektroskopie v blízké oblasti a určení obsahu kyseliny olejové a linolové ve slunečnicových semenech. Pro kalibraci obou kyselin bylo použito 465 vzorků slunečnicových semen. Schopnost využití rychlé, nedestruktivní metody k vyhodnocení kvality semen daných odrůd je nejdůležitějším faktorem při výběru metodiky. Metyl estery mastných kyselin jsou analyzovány pomocí plynové chromatografie. Plynová chromatografie je časově náročná a drahá. Infračervená spektroskopie v blízké oblasti, reflektance NIRS či transmitance NITS, je technika rozsáhlých aplikací pro stanovení kvality v potravinách a mnoha zemědělských komoditách [39].

Sato [40] demonstroval, že NIR technologie může být použita pro analýzu koncentrace kyseliny linolové ve vzorcích odslupkovaných slunečnicových semen. Pérez-Vich a kol [41] zjistili, že lze tuto metodu aplikovat i na stanovení koncentrace kyseliny stearové, palmitové a olejové v slunečnicových semenech.

Analýza diskriminantem v infračervené spektroskopii NIR byla využita pro analýzu genotypů slunečnicových semen, konkrétněji pro analýzu kyseliny olejové a linolové. K diskriminaci genotypů byly využity dvě strategie. Jako první byla vytvořena kalibrační křivka pro vysoko-olejovou a nízkolejovou slunečnici, dále křivka pro vysoko-olejovou a střední zastoupení kyseliny olejové a třetí kalibrační křivka byla vytvořena pro střední obsah

kyseliny olejové a nízký obsah též kyseliny. Druhá strategie obnášela vytvoření jedné křivky pro všechny tři typy zastoupení kyseliny olejové. Rozsah vlnových délek pro kalibraci byl 1651-1952 nm. Diskriminant analýza dokáže zařadit slunečnicové semeno dle zastoupení kyseliny olejové. Obě strategie byly velmi podobné, první z nich dokázala lepší stanovení středního až nízkého obsahu kyseliny olejové pomocí diskriminantu v semenech. Kvantifikace mastných kyselin může být provedena plynovou chromatografií, která se řadí k časově a finančně náročnějším metodám. Na druhé straně NIR je více preferována než plynová chromatografie, protože není tak náročnou metodou na přípravu vzorku před analýzou [42].

Monferrere [44] analyzoval 150 vzorků slunečnicového semene pomocí blízké infračervené spektroskopie s difúzní reflektancí. Vzorky pocházely z Argentiny. Před analýzou byly vzorky slunečnicového semene homogenizovány. Cílem bylo rychlé stanovení slunečnicového semene v potravinářském průmyslu.

2.4.2.4 Kalibrace technologie NIR

NIR spektrum nám určují X-H vazby ve vzorku, souhrn NIR absorpčních pásů funkčních skupin určujících hlavní chemické a fyzikální vlastnosti. Každá analytická informace u změřeného vzorku je v NIR spektru zakódována a toto spektrum obsahuje řadu překrývajících se pásů. Je proto nutné mít vhodné chemometrické nástroje pro jejich rozkódování. Chemometrické metody mají základ v klasických fyzikálně-chemických zákonech. Jako základní je uváděn Lambert-Beerův zákon, který říká, že absorbance při určité vlnové délce je úměrná molární koncentraci analyzovaného materiálu. Toto tvrzení platí pouze pro opticky transparentní kapaliny, které mají definovanou tloušťku. Dráha paprsku při průchodu vzorkem je tedy konstantní. Pokud byla pro měření analyzovaného materiálu použita NIR spektroskopie, toto pravidlo neplatí. Není možné kontrolovat délku dráhy paprsků při průchodu vzorkem kvůli různým odrazům a interferencím. Proto je nutné použít pokročilé chemometrické algoritmy, alespoň pro odhad těchto sledovaných parametrů [31].

Dříve byla uplatňována regresní metoda MLR – „*Multiple linear regression*“, vícenásobná lineární regrese. Dnes jsou nejvíce uplatňovány dvě jiné regresní metody. Jednou z nich je PCR - „*Principal component regression*“, regresní analýza hlavních komponent. Druhá z těchto dvou metod je označována jako PLS - „*Partial least squares*“, metoda částečných nejmenších čtverců. Těchto metod se využívá při tvorbě kalibračního modelu. Vyhodnocují se širší spektrální úseky nebo dokonce celá NIR spektra. Není už využívána hodnota absorbance v maximu vybraného spektrálního pásu. S využitím těchto regresních metod lze nalézt vztah mezi vícedimenzionální spektrální informací a složením analyzovaného materiálu. V případě, že jsou spektrální pásy široké, využívá se první a druhé derivace. Vytvoření správného kalibračního modelu a jeho validace jsou klíčové pro spolehlivou kvantitativní analýzu pomocí NIR spektroskopie. Vytvoření validačního souboru je nutné. Slouží k prvnímu ověření kalibračních rovnic. Validační soubor s danými referenčními hodnotami je uložen mimo kalibrační soubor [17,31]. V tabulce č. 3 jsou uvedeny parametry kalibračního modelu.

Tabulka 3: Parametry kvality kalibračního modelu [31]

| Parametr | Označení |
|---------------------------------------|----------|
| Korelační koeficient kalibrace | R |
| Standardní chyba kalibrace | SEC |
| Korelační koeficient křížové validace | R_{CV} |
| Standardní chyba křížové validace | SECV |
| Standardní chyba predikce | SEP |
| Index determinace kalibrace | R^2 |

Korelační koeficient kalibrace R popisuje vztah mezi spektrometricky predikovanou veličinou, získanou příslušnou matematickou operací a standardním vzorkem s danou laboratorní hodnotou. Dalším parametrem je index determinace R^2 udává kolik procent rozptylu závislé proměnné je vysvětleno modelem a kolik je nevysvětleno. V tabulce č. 4 je uvedeno posouzení kvality kalibračního modelu dle indexu determinace. Parametr SEC uvádí celkovou chybu kalibračního modelu na základě srovnání dosažených predikcí s referenčními hodnotami. SECV odhaduje chybu predikce pro potenciální nezávislé vzorky. Z jednotlivých regresí a validačních chyb je pak vypočtena hodnota R_{CV} a SECV. SEP vyjadřuje reálnou predikční hodnotu vytvořeného kalibračního modelu. Vzorky použité pro NIR kalibraci musí být stejného nebo alespoň podobného složení jako vzorky, které budou v budoucnu na této kalibraci měřeny. Je nutné vložit do kalibrace i vzorky s jiným chemickým složením, a to v širokém rozsahu kolem zájmové oblasti. Pro vytvoření kalibrace je nutné mít rozsáhlou sadu kalibračních standardů. Tento soubor musí být dostatečně reprezentativní a měl by pokrývat celou očekávanou variabilitu sledovaných charakteristik [43].

Tabulka 4: Kategorizace získaných kalibračních modelů podle Indexu determinace [31]

| Kategorie použitelnosti modelu | Rozsah indexu determinace R^2 |
|--|---------------------------------|
| Excelentní | $> 0,90$ |
| Použitelný pro běžnou zemědělskou praxi | $0,82 - 0,90$ |
| Pouze orientační odhad sledovaného znaku | $< 0,82$ |

Možným ověřením přesnosti kalibrace je například použití kruhového testu. Přesnost kalibrace je ovlivněna mnoha faktory. Jedním z nich jsou vyhovující referenční metody, prostředí laboratoře, školení pracovníků a dokonalé pochopení technologie. U NIR přístrojů je možné přenášet kalibrace mezi sebou. Příkladem je uspořádání 79 přístrojů společnosti Foss-Tecator Infratec nebo spojení 24 přístrojů Foss-Grainspec [39]. Tyto přístrojové sítě vytvořili spolupráci s 15 dodavateli kukuřice a sóje v USA. Jsou posuzována jednotlivá měření na

základě kontrolních vzorků týdně a kruhovým testem čtvrtletně. Další vzniklou přístrojovou sítí je uspořádání přístrojů NIRSystems 6500 v rámci EU, toto uspořádání slouží pro obchod s řepkou. Zde přenos kalibrací také funguje. Kalibrace se upravují pomocí adjustace BIAS, standardizace dle různých vzorků. BIAS vyjadřuje rozdíl mezi laboratorní hodnotou a predikovanou hodnotou měřenou NIR technologií [38].

Používané referenční metody musí být přesné a mít jasně dané postupy, měření by mělo být duplicitní a do kalibrace se vkládá průměr těchto dvou stanovení. Na vytvoření kalibrace by se nemělo podílet mnoho osob, ideálně dva lidé, kteří vytvářejí kalibraci stejně pečlivě. Přístroj NIR by měl být umístěn v prostoru bez průvanu, většího kolísání teploty a vlhkosti v místnosti. Materiál by měl být plněn do kyvet paralelně, každá kyveta je měřena zvlášť. Je to vhodnější postup než materiál naplnit do jedné kyvety a stejnou kyvetu měřit dvakrát. Výsledná spektra by se měla zálohovat, v případě vyskytnutí se jakékoliv abnormality by měla být tato odlišnost zdůvodněna. Na začátku a na konci každého měření by měla být provedena kontrola monochromátoru, nastavení vlnové délky a charakteristika pozadí kvůli ověření stability přístroje [31].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité vzorky

V této diplomové práci byly použity vzorky semen vysoko-olejové slunečnice, které byly nasbírány za období od října 2015 do března 2016. Celkem bylo analyzováno 409 vzorků. Pro první kalibrační model bylo použito 214 vzorků. Druhý kalibrační model obsahoval 165 vzorků. Na vyhovující kalibrační model bylo aplikováno 30 vzorků vysoko-olejové slunečnice. Každý vzorek byl odebrán dle standardního operačního postupu do plastové vzorkovnice o objemu 250 ml. Vzorky byly takto archivovány v laboratoři.

3.1.1 Příprava vzorku pro plynovou chromatografii

Vzorek slunečnicového semene byl pomlet na mlecím zařízení Retsch ZM 200 na velikost částic 2 mm. Takto pomletý vzorek byl v extrakční patroně vyextrahován pomocí petroléru na extrakční jednotce Soxtherm (Gerhardt). Vyextrahovaný vzorek bylo nutné 20 minut vysušit v sušárně (Memmert) při 105 °C kvůli odstranění zbytkové vlhkosti. Z takto připraveného vzorku byly připraveny metylestery mastných kyselin následujícím postupem:

- Do plastové zkumavky bylo odměřeno 1,5 ml vyextrahovaného oleje
- Byl přidán KOH v metanolu o $c = 2 \text{ mol.l}^{-1}$ a heptan
- Vzorek byl ve zkumavce vytřepán
- Po deseti minutách se z vrchní vrstvy odebraly 2 ml supernatantu a přes stříkačkový filtr s pórovitostí 0,20 μm se vzorek přefiltroval do vialky, která byla vložena do autosampleru plynového chromatografu

3.1.2 Příprava vzorku pro blízkou infračervenou spektroskopii

Před analýzou se slunečnicové semeno homogenizovalo na mlecím zařízení (Retsch ZM 200) na velikost částic 2 mm.

3.2 Plynová chromatografie

3.2.1 Chemikálie

Pro přípravu vzorku na plynovou chromatografii byly použity chemikálie od společnosti VWR Chemicals, Francie. Pro extrakci tuku ze slunečnicového semene byl použit petroléter 40-60 °C. Pro přípravu metylesterů byl použit metanolickeý roztok hydroxidu draselného ($c = 2 \text{ mol.l}^{-1}$) a heptan vhodný pro plynovou chromatografii. Standard kyseliny olejové od společnosti Accu Standard.

3.2.2 Použité metody a přístroje

Pro separaci metylesterů mastných kyselin byla použita chromatografická kapilární kolona BPX70, SGE o délce 60 m a průměru 0,25 μm . V tabulce č. 5 je uveden použitý teplotní program metody pro stanovení kyseliny olejové ve slunečnicovém oleji. Objem nastříknutého vzorku byl 0,5 μl . Celková doba analýzy trvala 26 minut. Pro stanovení profilu mastných kyselin ve slunečnicovém oleji byl použit plynový chromatograf s plamenově ionizační detekcí Clarus 680 od firmy Perkin Elmer, který je uveden na obrázku č. 7.

Tabulka 5: Teplotní program plynového chromatografu

| Stupně [°C]/1 minutu | Teplota programu [°C] | Čas [min] |
|----------------------|-----------------------|-----------|
| - | 60 | 0,5 |
| 15 | 180 | 0 |
| 4 | 230 | 5 |



Obrázek 7: Plynový chromatograf Clarus 680, Perkin Elmer

3.3 Blízká infračervená spektroskopie

3.3.1 Použité postupy a přístroje

Byla změřena spektra pomletých vzorků vysoko-olejové slunečnice. Velká měřicí kyveta byla naplněna pomletým vzorkem do výše 2 cm. Byl použit přístroj XDS Rapid Analyzer Content od firmy Foss, který je zobrazen na obrázku č. 8. Tato metoda poskytuje výsledek sledovaného parametru pod dvě minuty.



Obrázek 8: XDS Analyzer Rapid Content od firmy Foss

3.4 Statistické zpracování výsledků

3.4.1 Zpracování výsledků plynové chromatografie

Pro vyhodnocení chromatogramů analyzovaných vzorků vysoko-olejové slunečnice byl použit software TotalChrom, který byl součástí plynového chromatografu. Software poskytla firma Perkin Elmer. Výsledná koncentrace kyseliny olejové, vyjádřena v procentech, byla získána z plochy píku standardu kyseliny olejové.

3.4.2 Zpracování výsledků blízké infračervené spektroskopie

Pro vyhodnocení výsledků blízké infračervené spektroskopie byl použit software ISIScan, kde byla měřena spektra jednotlivých vzorků. Pro tvorbu kalibračních modelů byl použit software WINISI. Oba softwary byly poskytnuty k přístroji od firmy FOSS. Pro vytvoření kalibrace byl použit kalibrační model MPLS - „*Modified Partial Least Squares*“, modifikovaná metoda částečných nejmenších čtverců s křížovou validací.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Hlavním cílem této práce bylo posoudit vhodnost NIR spektroskopie pro stanovení obsahu kyseliny olejové ve slunečnicových semenech.

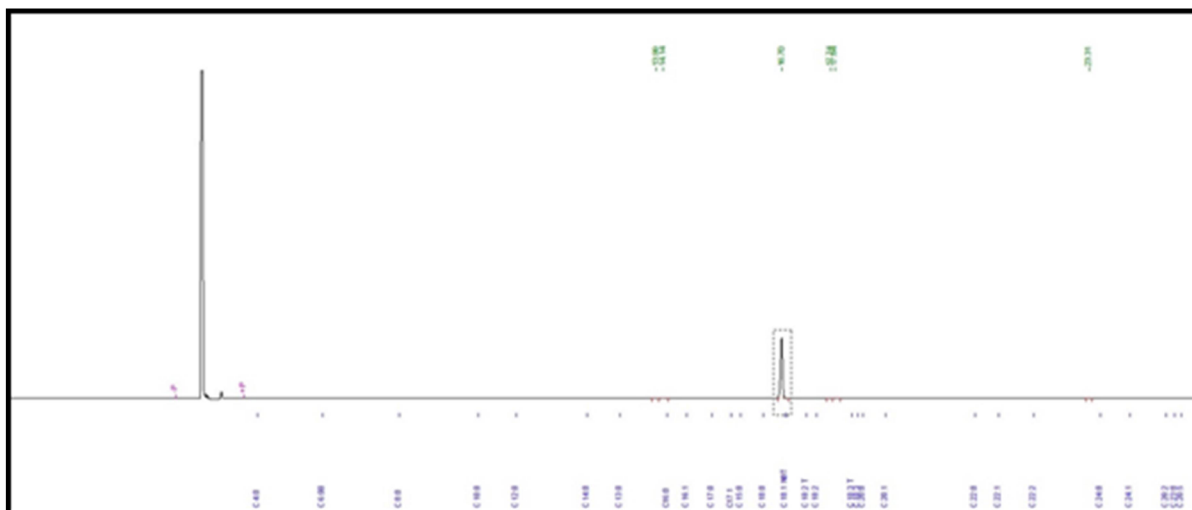
4.1 Plynová chromatografie

V této diplomové práci byla jako referenční metoda pro stanovení kyseliny olejové použita plynová chromatografie. Plynová chromatografie je oficiální, a zároveň v praxi nejpoužívanější, metoda pro stanovení mastných kyselin, uznávaná společností American Oil Chemist's Society. Tato metoda poskytuje informace o profilu mastných kyselin tuků a olejů, které jsou připraveny alkalickou esterifikací. Příprava metylester derivátů mastných kyselin se řadí k běžným postupům analýzy plynovou chromatografií. Úprava vzorku oleje před analýzou je důležitá, z mastných kyselin je nutné získat nízkomolekulární nepolární deriváty, jako jsou například zmíněné metylestery.

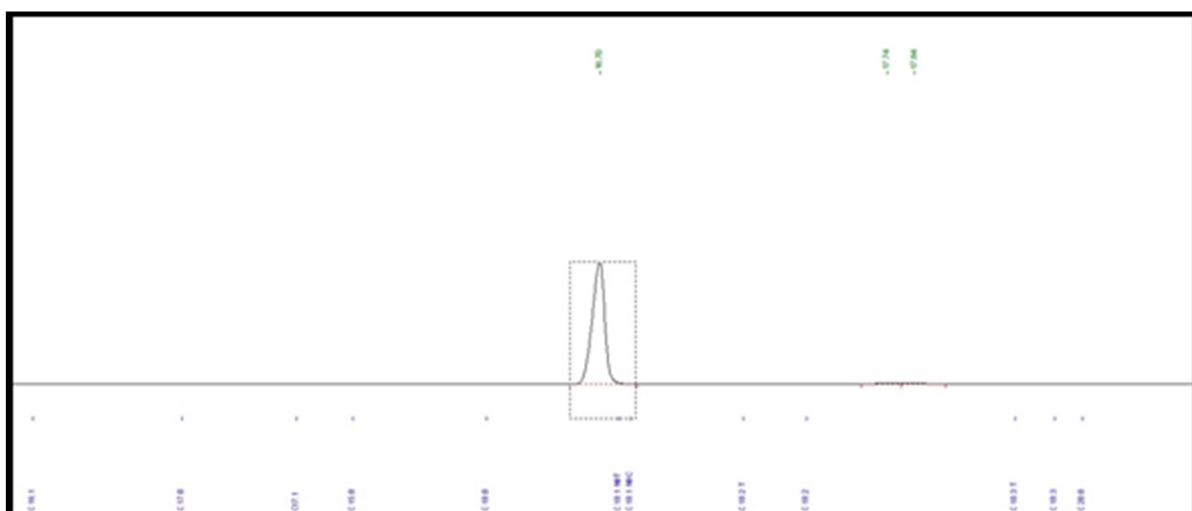
Stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií však má z hlediska praktického využití některé nevýhody, je to především poměrně zdlouhavá příprava vzorku a vysoká spotřeba chemikálií; NIR spektroskopie by tak mohla být v praxi použitelná jako její jednoduchá a rychlá náhrada. NIR spektroskopie je metoda nedestruktivní, nevyžaduje náročnou přípravu vzorku, je šetrná k životnímu prostředí, jednoduchá a rychlá (výsledek je znám v čase pod dvě min.).

4.1.1 Ověření přesnosti stanovení kyseliny olejové pomocí plynové chromatografie

Pro zjištění retenčního času kyseliny olejové byl nastříknut její standard. Tento standard je od firmy Accu Standard, koncentrace komponenty $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v heptanu. Standard kyseliny olejové byl analyzován při stejných podmínkách jako reálné vzorky (viz kapitola 3.2.2). Na obrázku č. 9 je zobrazen chromatogram, kde je separován standard kyseliny olejové v retenčním čase 16,7 minut. Na chromatogramu je pík kyseliny olejové označen šrafováním. Na obrázku č. 10 je zobrazen zvětšený chromatogram s označenou kyselinou olejovou. Na základě retenčního času kyseliny olejové ve standardu byla identifikována tato kyselina v reálných vzorcích.



Obrázek 9: Chromatogram standardu kyseliny olejové



Obrázek 10: Zvětšený chromatogram standardu kyseliny olejové

Standard kyseliny olejové byl analyzován celkem pětkrát s relativní směrodatnou odchylkou 0,2%. Jednotlivá stanovení jsou uvedena v tabulce č. 6. Je jasné, že pomocí plynové chromatografie lze dosáhnout vysoké přesnosti stanovení kyseliny olejové.

Tabulka 6: Ověření přesnosti stanovení kyseliny olejové plynovou chromatografií

| Stanovení | Obsah kyseliny olejové ve standardu [%] |
|-----------------------------------|---|
| 1. | 97,3 |
| 2. | 97,0 |
| 3. | 97,0 |
| 4. | 96,7 |
| 5. | 96,9 |
| 6. | 97,1 |
| Relativní směrodatná odchylka [%] | 0,2 |

4.2 Blízká infračervená spektroskopie

Pro rychlou kontrolu obsahu kyseliny olejové ve vysoko-olejové slunečnici byla v rámci této práce testována metoda blízké infračervené spektroskopie, která je nenáročná na přípravu vzorku před samotnou analýzou. Je ale nutno podotknout, že slunečnice je materiálem touto technikou obtížně měřitelným díky obsahu slupek v mletém vzorku, přestože jsou homogenizovány na velikost částic 2 mm. Tyto slupky jsou téměř černé a absorbují infračervené záření a značně analýzu znesnadňují. Vzorky byly měřeny v rozmezí vlnových délek 800 – 2500 nm s rozlišením 2 nm. Tato hodnota rozlišení byla přednastavena na základě zkušeností výrobce pro vyhlazení spektra. Maximální možné rozlišení vlnových délek je 0,5 nm.

Nejprve bylo nutné přístroj nakalibrovat pro potřeby stanovení přímo obsahu kyseliny olejové ve vzorcích, postup kalibrace tvoří podstatnou část experimentů této práce. K tomuto účelu byl použit postup uvedený v kapitole 2.4.2.4 a kalibrační model MPLS (viz kapitola 3.4.2) s využitím softwaru, který je přímo součástí přístroje.

Na tomto místě je potřeba zmínit, že vytváření modelů pro NIR je založeno na metodě pokus-omyl, neexistuje zde žádné pravidlo. Veškeré parametry kalibračních modelů byly zvoleny na základě praktických zkušeností.

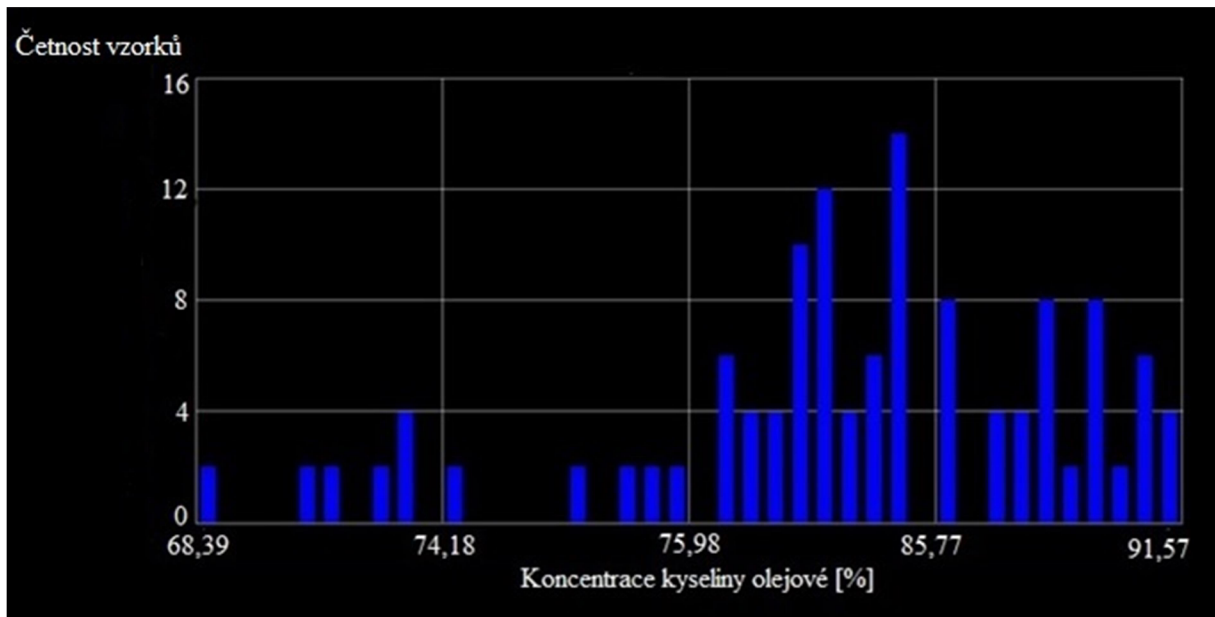
Pro usnadnění orientace ve výsledcích a v postupu optimalizace kalibračních postupů je v tabulce č. 7 uveden seznam sledovaných parametrů kvality kalibračního modelu, jejich význam a optimální hodnota.

Tabulka 7: Přehled sledovaných parametrů kvality kalibračního modelu

| Parametr | Popis | Optimální hodnota |
|----------|--|-------------------|
| GH | Střední vzdálenost od střední hodnoty kalibračního souboru | - |
| SEC | Celková chyba kalibračního modelu | ≈ 0 |
| RSQ | Korelační koeficient kalibrace | ≈ 1 |
| SECV | Standardní chyba křížové validace | ≈ 0 |
| SEP | Standardní chyba predikce | ≈ 0 |
| BIAS | Rozdíl mezi laboratorní hodnotou a predikovanou hodnotou NIR | ≈ 0 |
| „slope“ | Sklon kalibrační (validační) křivky | ≈ 1 |

4.2.1 První kalibrační model

Z prvních naměřených vzorků (celkem 214) byl vytvořen jeden soubor. Tyto vzorky byly vybrány pro tvorbu prvního kalibračního modelu. Výsledky měření jednotlivých vzorků v prvním kalibračním modelu jsou uvedeny na obrázku č. 11. Na tomto obrázku je uveden histogram, který znázorňuje četnost vzorků při určitých obsazích kyseliny olejové. Na ose x je koncentrace kyseliny olejové uvedená v procentech, na ose y je uvedena četnost vzorků použitých v prvním kalibračním modelu. Z obrázku je jasně patrné, že nejvíce je zastoupena oblast kolem 85% kyseliny olejové.



Obrázek 11: Obsah kyseliny olejové ve vzorcích (první kalibrační model)

Pro vytvoření kalibračního modelu bylo nutné nastavit parametry matematického zpracování, tyto informace jsou uvedeny na obrázku č. 12. V kalibračním modelu byl použit jeden konstituent. Z modelu nebyly vymazány žádné vzorky. Bylo zvoleno 13 faktorů, abychom viděli průběh statistického zpracování. Pokud je zvolen nepřiměřený počet faktorů, může dojít k tzv. overfittingu, (tzv. přeučení modelu, tj. model je příliš přizpůsoben kalibračním datům), což vede k horší přesnosti později měřených dat. Počet křížových validačních skupin je v našem případě 7. Defaultně bývají nastaveny čtyři skupiny křížové validace kvůli rychlosti procesu kalkulace. Kritická hodnota GH je rovna 10. GH hodnota popisuje vzdálenost od střední hodnoty kalibračního souboru. Pokud je některý vzorek nad mezí $GH = 10$, je automaticky označen jako „outlier“, tj. odlehlý výsledek. Použitý matematický algoritmus SNDV „*Standard normal variety detrend*“ byl použit pro vyhlazení spektra. Tvar a rozložení hodnot v kalibraci je velmi důležitým parametrem.

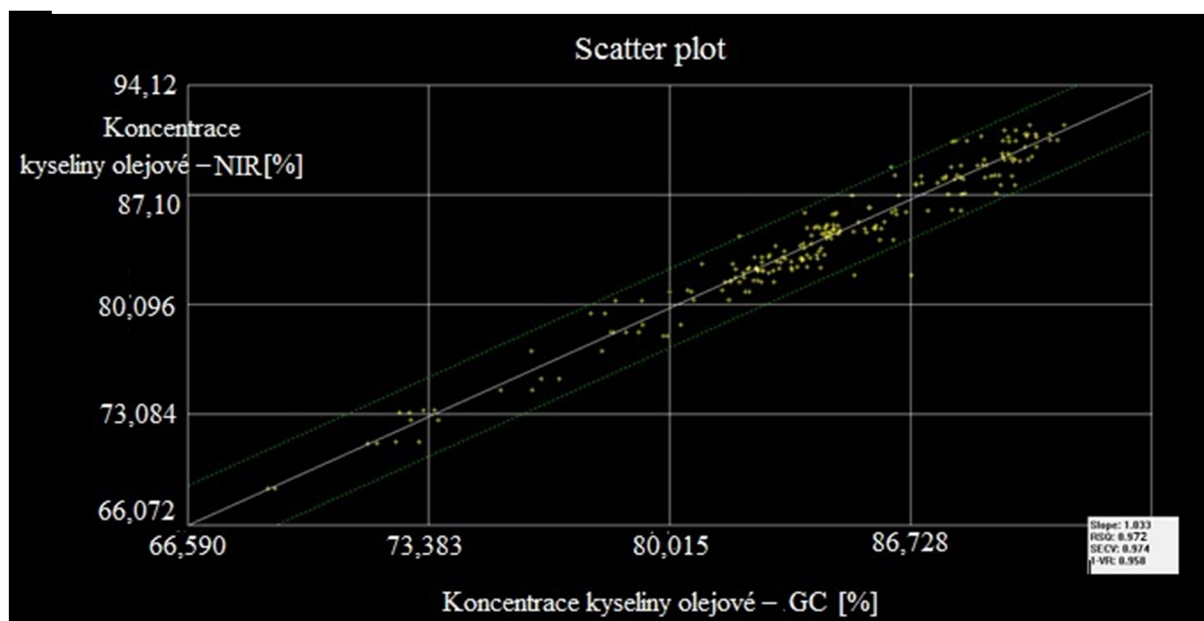
| | | | |
|--|-----|--|--|
| Constituents | 1 | Pause Data... | <input checked="" type="radio"/> Until user presses continue |
| Selected samples to delete | 0 | | <input type="radio"/> For a period of seconds <input type="text" value="5"/> |
| Maximum number of terms (13) | 13 | Math Treatment | 1,4,4,1 |
| Cross validation | 7 | Scatter | SNV and Detrend |
| Number of outlier elimination passes | 2 | Wavelengths | 173 |
| Missing data value | 0 | <input type="text" value="Wavelengths and Math Treatment..."/> | |
| Critical 'T' outlier value | 3.5 | <input checked="" type="checkbox"/> Downweight outliers | |
| Critical 'GH' outlier value | 10 | <input type="checkbox"/> Check for duplicate samples in scatter plot | |
| Critical 'X' outlier value | 10 | <input checked="" type="radio"/> Normal cross validation display | |
| <input type="checkbox"/> Enable changing number of terms before regression | | <input type="radio"/> Full cross validation display | |
| Select outlier types | | | |

Obrázek 12: Matematické zpracování prvního kalibračního modelu

Po zadání parametrů matematického zpracování pro kalibrační model do softwaru bylo provedeno statistické vyhodnocení tohoto použitého kalibračního modelu. Statistické vyhodnocení je uvedeno na obrázku č. 13. Rozsah koncentrací kyseliny olejové byl 68,39 – 91,57% (viz obrázek č. 11). Průměrná hodnota koncentrace kyseliny olejové je 84,22%. Hodnota SEC – standardní chyba kalibrace by měla být co nejbližší k nule. V našem případě je tato hodnota rovna 0,795. Hodnota RSQ – korelační koeficient kalibrace je roven 0,972. V ideálním případě by tato hodnota měla být rovna 1. Hodnota SECV – standardní chyba křížové validace je rovna 0,974. Tato hodnota by měla být opět co nejnižší. Na obrázku č. 14 je zobrazen graf regrese kalibračního souboru. Regrese popisuje vztah mezi laboratorními hodnotami, které jsou na ose x, a predikovanými hodnotami, které jsou na ose y. Na ose x jsou znázorněny hodnoty koncentrace kyseliny olejové naměřené plynovou chromatografií a na ose y totéž naměřené NIR spektroskopií.

| | | | | | | | |
|-------------------|---|---------------------|---------------|-------|-------|--------------------|-------|
| Input File | HOSO_2015.cal | REP File | None | | | | |
| Validation File | None | Equation File | hoso_2015.eqa | | | | |
| Math Treatment | 1, 4, 4, 1 | Number of variables | 173 | | | | |
| Scatter Corrected | SNV and Detrend | Downweight outliers | Yes | | | | |
| Constituent | CA | Number of samples | 214 | | | | |
| Cross validation | By groups, no pre-sort, form groups by cycling, ignore duplicates | | | | | | |
| Mean | 84.220 | Range | 68.39 - 91.57 | | | | |
| | SEC | RSQ | F | SECV | I-VR | Standard deviation | 4.747 |
| 1 | 4.253 | 0.197 | 53.39 | 4.271 | 0.184 | | |
| 2 | 3.289 | 0.520 | 143.47 | 3.349 | 0.498 | | |
| 3 | 1.911 | 0.838 | 414.96 | 2.139 | 0.795 | | |
| 4 | 1.544 | 0.894 | 112.59 | 1.625 | 0.882 | | |
| 5 | 1.234 | 0.932 | 119.48 | 1.295 | 0.925 | | |
| 6 | 1.145 | 0.942 | 34.35 | 1.222 | 0.933 | | |
| 7 | 1.073 | 0.949 | 29.65 | 1.182 | 0.937 | | |
| 8 | 1.039 | 0.952 | 14.66 | 1.128 | 0.943 | | |
| 9 | 0.921 | 0.962 | 57.33 | 1.065 | 0.949 | | |
| 10 | 0.886 | 0.965 | 17.22 | 1.059 | 0.950 | | |
| 11 | 0.867 | 0.967 | 9.99 | 1.032 | 0.952 | | |
| 12 | 0.828 | 0.970 | 20.61 | 0.998 | 0.955 | | |
| 13 | 0.795 | 0.972 | 18.15 | 0.974 | 0.958 | | |

Obrázek 13: Výsledky statistického vyhodnocení prvního kalibračního modelu

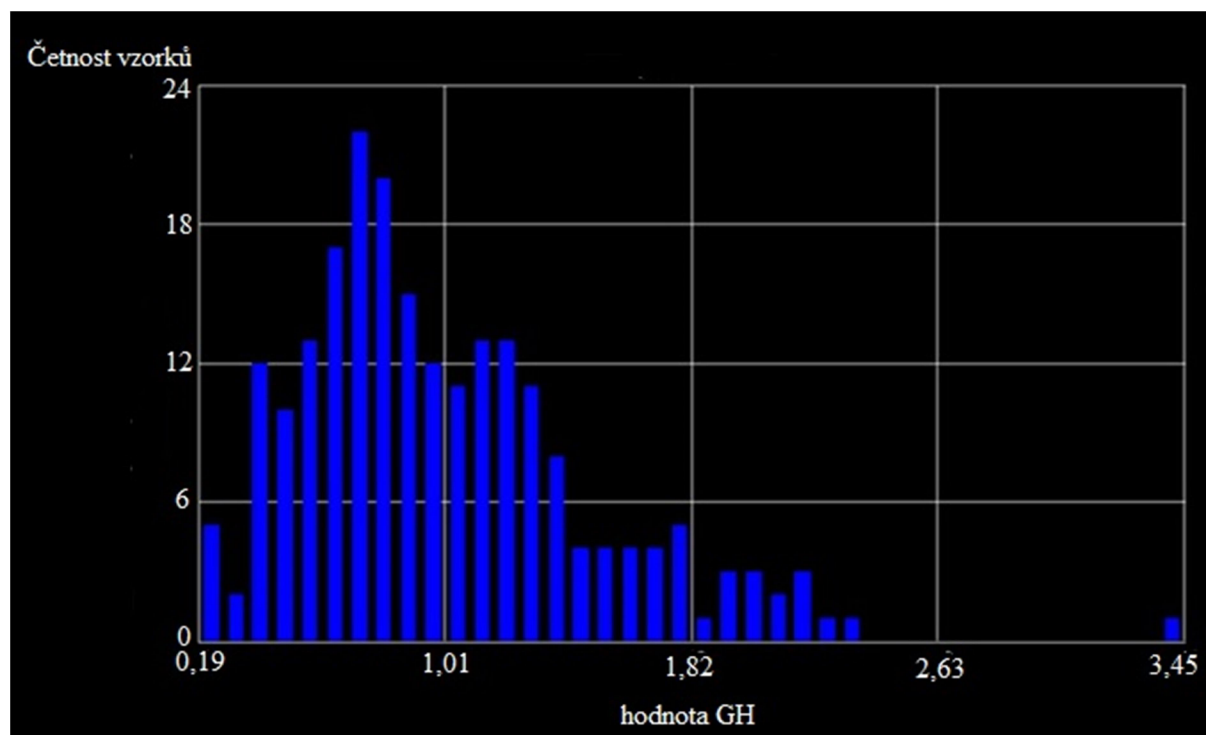


Obrázek 14: Srovnání obsahu kyseliny olejové naměřené metodou GC a NIR (1. kalibrační model)

První kalibrační model nás svými predikčními vlastnostmi (vzhledem k získaným hodnotám SEC, RSQ a SECV) neuspokojil. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli pro vytvoření nového kalibračního modelu.

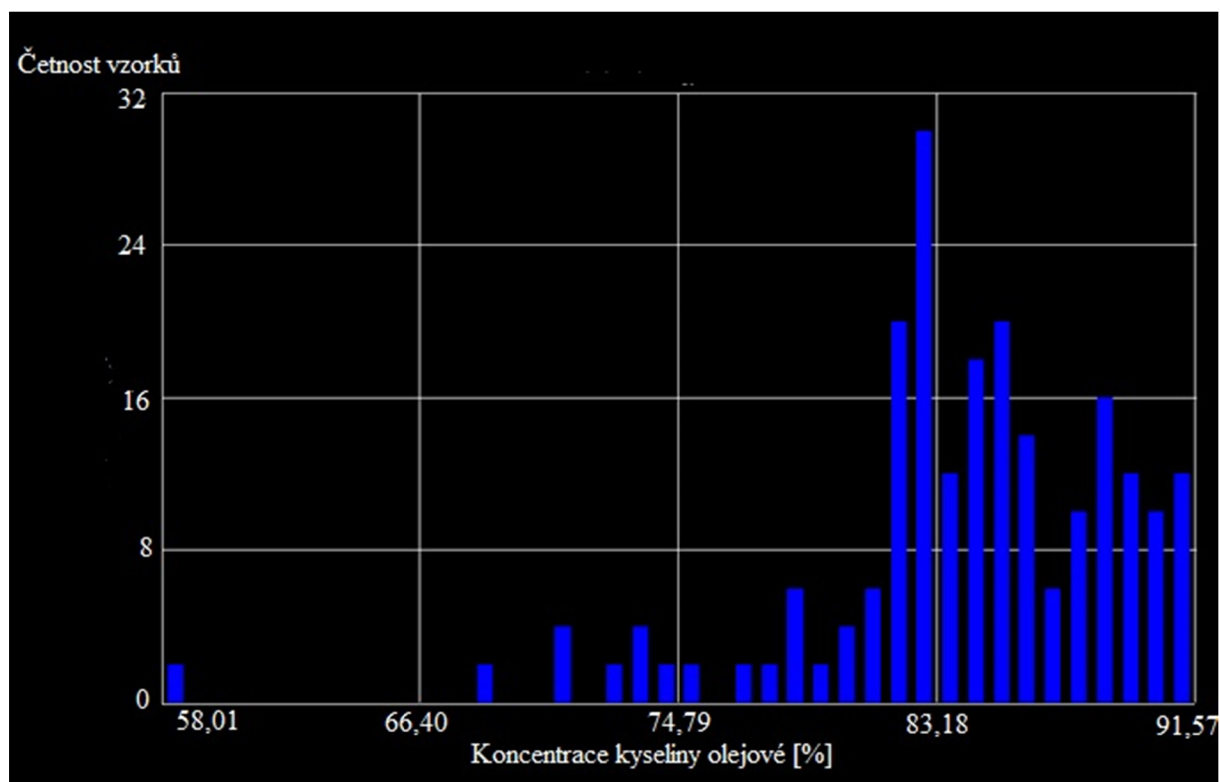
4.2.2 Druhý kalibrační model

Ze všech dosud naměřených dat byl vytvořen další soubor. Pomocí H-statistiky byla zkontrolována spektrální konzistentnost vytvořeného souboru, viz obrázek č. 15. Mez $GH=3$ je velmi přísné kritérium, v našem případě tuto mez překračuje pouze jeden vzorek a to minimálně s hodnotou 3,45. Po spektrální stránce je soubor v pořádku.



Obrázek 15: Kontrola spektrální konzistentnosti druhého kalibračního souboru pomocí H-statistiky

Nově vytvořený soubor obsahoval celkem 165 vzorků vysoko-olejové slunečnice v rozsahu koncentrací 58,01 – 91,57%. Průměrná hodnota koncentrace kyseliny olejové byla 83,89%. Rozsah koncentrací kyseliny olejové a jejich četnost vidíme na obrázku č. 16. Nejvíce byla zastoupena oblast 83% kyseliny olejové. Na histogramu (obrázek č. 16) je zřetelně patrná málo resp. vůbec pokrytá oblast obsahu 58 – 75% kyseliny olejové, což je logické, poněvadž požadovaná hodnota pro vysoko-olejovou slunečnici je min. 75% [2]. Vzorky pod touto hodnotou nelze označit jako vysoko-olejová slunečnice, tyto vzorky byly pravděpodobně zákazníkem špatně označeny. Pro zpřesnění výsledků by bylo vhodné zahrnout do kalibračních modelů i vzorky s nižším obsahem kyseliny olejové, tyto vzorky však zatím nebyly k dispozici v dostatečném množství.



Obrázek 16: Obsah kyseliny olejové ve vzorcích (druhý kalibrační model)

Vytvořený soubor byl seříděn vzestupně dle koncentrace kyseliny olejové. Pro ověření funkčnosti druhého kalibračního modelu byl vytvořen soubor validační. Do validačního souboru byl zařazen každý čtvrtý vzorek. Kalibrační soubor je tedy tvořen 75% z celkového počtu vzorků a validační soubor 25%. Pro matematické zpracování kalibračního souboru bylo zvoleno 16 faktorů, aby byl patrný průběh statistického zpracování. Kalibrační soubor obsahoval jeden konstituent. Počet křížových validačních skupin je u tohoto kalibračního souboru 25. Kritická hodnota $GH=10$. Použitý matematický algoritmus je stejný jako v prvním případě, SNDV „*Standard normal variety detrend*“.

Po nastavení parametrů matematického zpracování bylo provedeno statistické vyhodnocení celého kalibračního modelu, které je uvedeno na obrázku č. 17. Jak již bylo zmíněno, rozsah koncentrací kyseliny olejové byl 58,01 – 91,57%. Pro získání optimálních hodnot kalibračního souboru byl zvolen faktor 10. Hodnota $SEC=0,877$. Hodnota $RSQ=0,974$. Hodnota $SECV=1,194$.

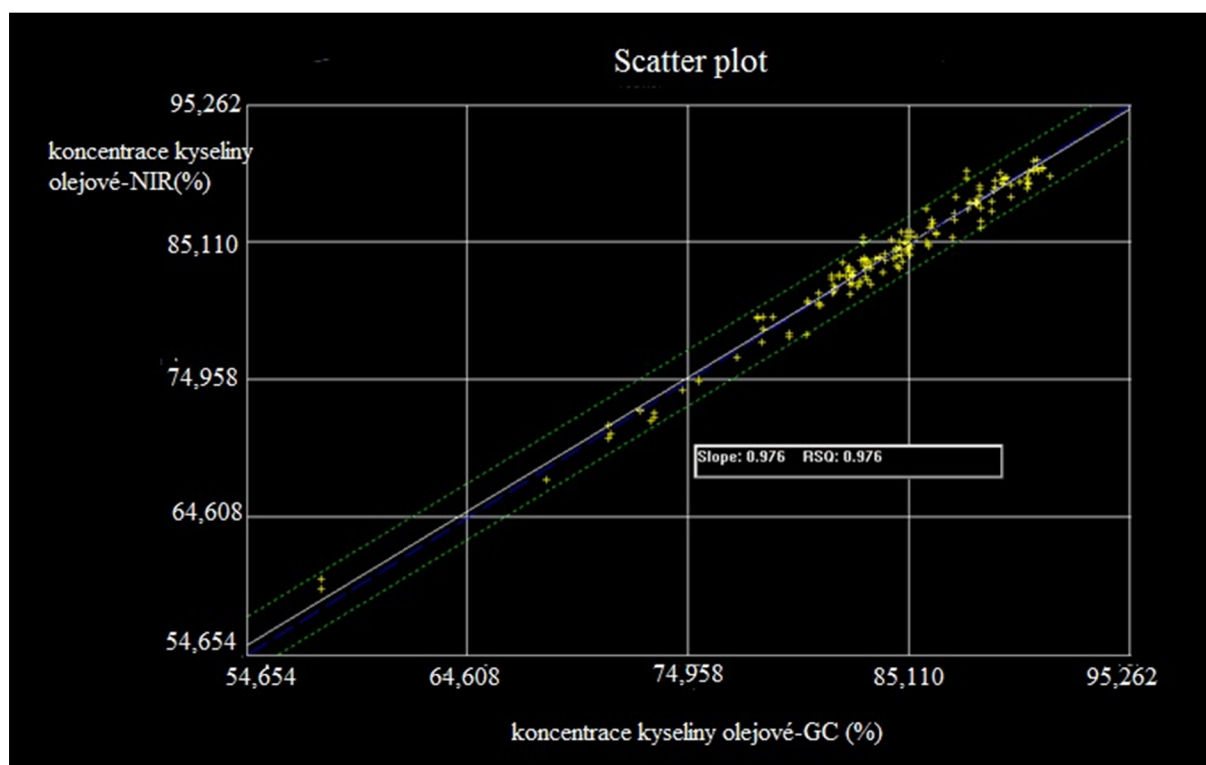
| | | | | | | | |
|-------------------|-----------------|---------------------|---------------|-------|-------|--------------------|-------|
| Input File | acal.cal | REP File | None | | | | |
| Validation File | None | Equation File | alba.eqa | | | | |
| Math Treatment | 2, 5, 5, 1 | Number of variables | 256 | | | | |
| Scatter Corrected | SNV and Detrend | Downweight outliers | No | | | | |
| Constituent | CA | number of samples | 165 | | | | |
| Mean | 83.887 | Range | 58.01 - 91.57 | | | | |
| | SEC | HSQ | F | SECV | T-W | Standard deviation | 5.451 |
| 1 | 3.060 | 0.685 | 357.55 | 3.195 | 0.655 | | |
| 2 | 1.890 | 0.880 | 265.14 | 2.064 | 0.856 | | |
| 3 | 1.401 | 0.934 | 134.01 | 1.514 | 0.923 | | |
| 4 | 1.332 | 0.940 | 18.05 | 1.454 | 0.929 | | |
| 5 | 1.212 | 0.951 | 34.27 | 1.365 | 0.937 | | |
| 6 | 1.172 | 0.954 | 11.87 | 1.345 | 0.939 | | |
| 7 | 1.014 | 0.965 | 54.06 | 1.281 | 0.945 | | |
| 8 | 0.980 | 0.968 | 12.25 | 1.263 | 0.946 | | |
| 9 | 0.926 | 0.971 | 19.85 | 1.220 | 0.950 | | |
| 10 | 0.877 | 0.974 | 18.54 | 1.194 | 0.952 | | |
| 11 | 0.860 | 0.975 | 7.31 | 1.197 | 0.952 | | |
| 12 | 0.801 | 0.978 | 24.18 | 1.198 | 0.952 | | |
| 13 | 0.740 | 0.982 | 27.26 | 1.230 | 0.949 | | |
| 14 | 0.699 | 0.984 | 19.22 | 1.261 | 0.946 | | |
| 15 | 0.643 | 0.986 | 28.35 | 1.291 | 0.944 | | |
| 16 | 0.623 | 0.987 | 10.88 | 1.331 | 0.940 | | |

Obrázek 17: Výsledky statistického vyhodnocení druhého kalibračního modelu

Bylo nutno provést statistické vyhodnocení samostatně i pro kalibrační soubor, i pro validační. Na obrázku č. 18 je uvedeno statistické vyhodnocení kalibračního souboru s jedním konstituentem. Hodnota SEP, která podává informaci o standardní chybě predikce, je rovna 0,848. Hodnota SEP popisuje reálnou predikční hodnotu reálného kalibračního modelu. Průměrná koncentrace kyseliny olejové je 83,887%. V ideálním případě má být hodnota „slope” rovna 1 a hodnota BIAS 0. Hodnota RSQ je rovna 0,976. Na obrázku č. 19 je zobrazen graf regrese kalibračního souboru. Na ose x jsou zobrazeny hodnoty koncentrace kyseliny olejové měřené plynovou chromatografií, na ose y koncentrace kyseliny olejové měřené pomocí NIR.

| | | | |
|-----------|---------------|----------------------|-------------|
| CA vs. CA | | | |
| SEP: | 0.848 | Number of Samples: | 165 |
| Means: | 83.887 83.887 | Standard Deviations: | 5.451 5.385 |
| Bias: | -0.000 | Bias Limit: | 0.716 |
| SEP[C]: | 0.850 | SEP[C] Limit: | 1.552 |
| Slope: | 1.000 | RSQ: | 0.976 |

Obrázek 18: Statistické vyhodnocení kalibračního souboru (2. kalibrační model)

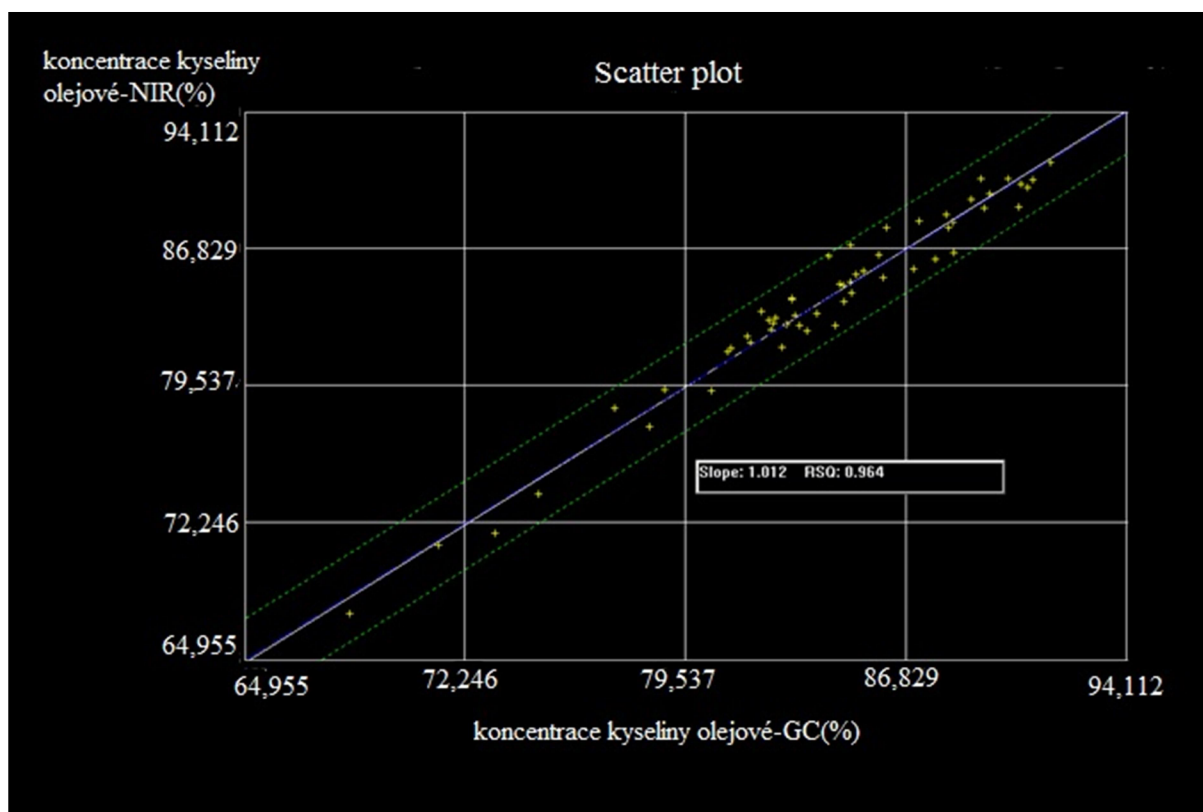


Obrázek 19: Srovnání obsahu kyseliny olejové naměřené metodou GC a NIR (2. kalibrační model – kalibrační soubor)

Stejné statistické vyhodnocení bylo provedeno samostatně pro validační soubor, který je zobrazen na obrázku č. 20. Hodnota SEP je rovna 0,947. Hodnota slope=0,953 a hodnota BIAS=-0,013. Korelační koeficient RSQ validačního souboru je roven 0,964. Na obrázku č. 21 je zobrazen graf validačního souboru. Na ose x jsou zobrazeny hodnoty koncentrace kyseliny olejové naměřeny plynovou chromatografií, na ose y totéž pomocí NIR technologií.

| Predict Constituents Statistics | | | |
|---------------------------------|---------------|----------------------|-------------|
| CA vs. CA | | | |
| SEP: | 0.947 | Number of Samples: | 55 |
| Means: | 84.141 84.154 | Standard Deviations: | 4.896 5.044 |
| Bias: | -0.013 | Bias Limit: | 0.716 |
| SEP(C): | 0.956 | SEP(C) Limit: | 1.552 |
| Slope: | 0.953 | RSQ: | 0.964 |

Obrázek 20: Statistické vyhodnocení validačního souboru – 2. kalibrační model



Obrázek 21: Srovnání obsahu kyseliny olejové naměřené metodou GC a NIR (2. kalibrační model – validační soubor)

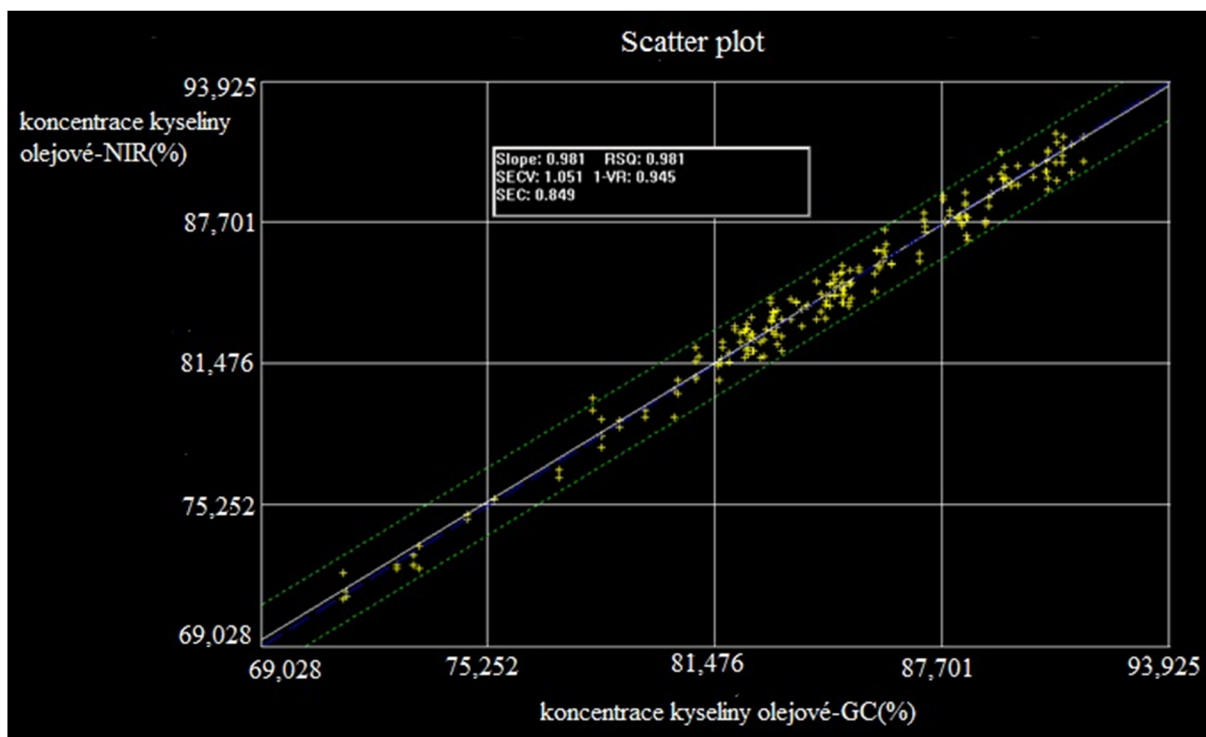
Druhý kalibrační model má rozsah koncentrace kyseliny olejové od 58,01 do 91,57%. Vzhledem k malému zastoupení vzorků s obsahem do 75% kyseliny olejové byly tyto vzorky vyloučeny a kalibrační model byl přepočítán.

4.2.3 Třetí kalibrační model

Třetí kalibrační model vytvořen přepočítáním druhého kalibračního souboru po smazání čtyř hodnot z oblasti nízké koncentrace kyseliny olejové. Validační soubor zůstal zachován. Matematické zpracování zůstalo stejné. Na obrázku č. 22 je uvedeno statistické vyhodnocení celého kalibračního souboru po přepočítání. Průměrná hodnota koncentrace kyseliny olejové byla 84,335%. Rozsah koncentrací kyseliny olejové byl 71,25 – 91,57%. Byl zvolen faktor 12 pro získání optimalizace hodnot kalibračního souboru. Hodnota SEC je rovna 0,759, hodnota RSQ je rovna 0,971 a SECV je 1,017. Dle hodnot lze vidět, že došlo k mírnému, však nevýznamnému zlepšení. Na obrázku č. 23 je zobrazen graf kalibračního souboru po přepočítání. Na ose x hodnoty koncentrace kyseliny olejové pro plynovou chromatografii a na ose y pro NIR.

| | | | | | |
|-------------------|-----------------|-------|--------|---------------------|--------------------------|
| Input File | sortalba.cal | | | REP File | None |
| Validation File | None | | | Equation File | high.eqa |
| Math Treatment | 2, 5, 5, 1 | | | Number of variables | 256 |
| Scatter Corrected | SNV and Detrend | | | Downweight outliers | No |
| Constituent | CA | | | Number of samples | 216 |
| Mean | 84.335 | | Range | 71.25 - 91.57 | Standard deviation 4.477 |
| | SEC | RSQ | F | SECV | 1-VR |
| 1 | 2.746 | 0.624 | 357.27 | 2.842 | 0.596 |
| 2 | 1.894 | 0.821 | 236.83 | 1.996 | 0.801 |
| 3 | 1.368 | 0.907 | 196.16 | 1.439 | 0.896 |
| 4 | 1.260 | 0.921 | 38.94 | 1.352 | 0.908 |
| 5 | 1.176 | 0.931 | 32.21 | 1.272 | 0.919 |
| 6 | 1.101 | 0.940 | 30.68 | 1.222 | 0.925 |
| 7 | 1.023 | 0.948 | 34.15 | 1.176 | 0.931 |
| 8 | 0.926 | 0.957 | 46.94 | 1.110 | 0.938 |
| 9 | 0.882 | 0.961 | 22.01 | 1.073 | 0.942 |
| 10 | 0.823 | 0.966 | 31.42 | 1.033 | 0.947 |
| 11 | 0.800 | 0.968 | 12.98 | 1.025 | 0.947 |
| 12 | 0.759 | 0.971 | 23.72 | 1.017 | 0.948 |
| 13 | 0.729 | 0.973 | 17.98 | 1.024 | 0.947 |
| 14 | 0.700 | 0.976 | 18.52 | 1.037 | 0.946 |
| 15 | 0.668 | 0.978 | 20.73 | 1.006 | 0.943 |
| 16 | 0.636 | 0.980 | 21.30 | 1.073 | 0.942 |

Obrázek 22: Statistické vyhodnocení třetího kalibračního souboru

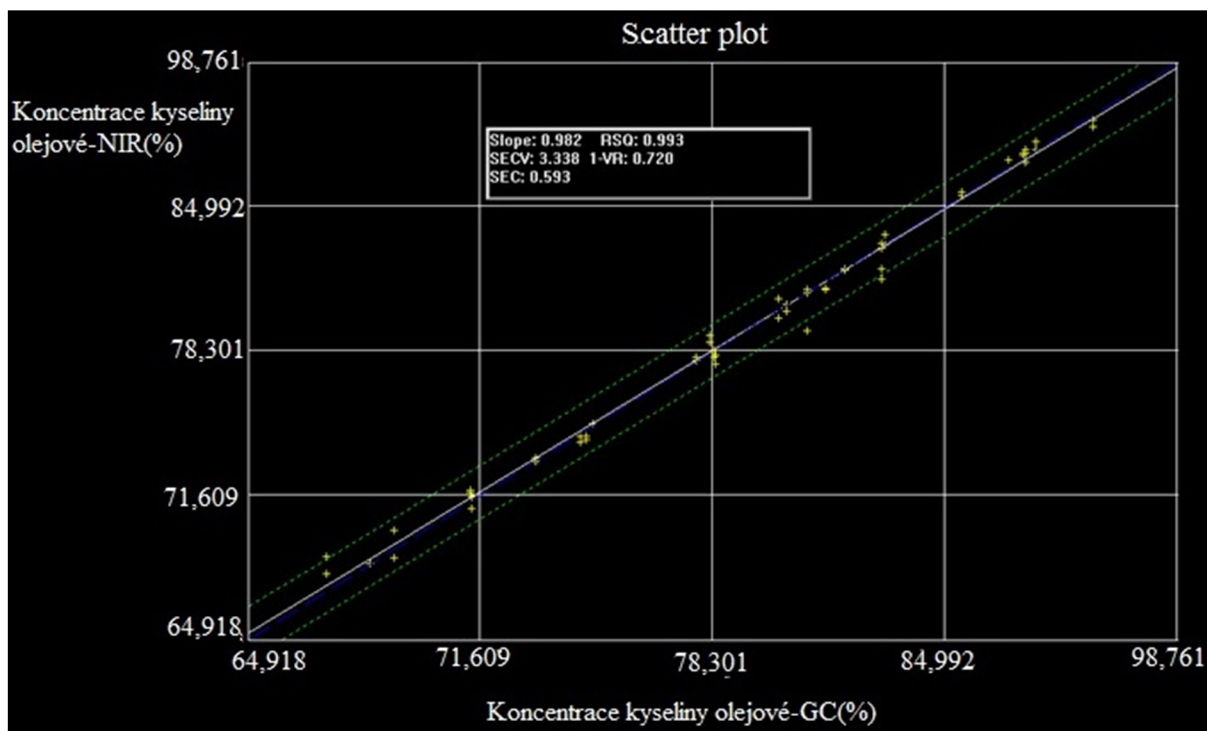


Obrázek 23: Srovnání obsahu kyseliny olejové naměřené metodou GC a NIR (3. kalibrační model – kalibrační soubor)

Při tvorbě výše uvedených tří kalibračních modelů bylo nastaveno výrobcem rozlišení 2 nm. Na malém souboru dat byl vyzkoušen i model s maximálně možným rozlišením vlnových délek.

4.2.4 Kalibrační model s rozlišením 0,5 nm

Na malém souboru dat (50 vzorků) byl vyzkoušen i model, vytvořený ze spekter, naměřených při maximálním rozlišení přístroje (0.5nm). Na obrázku č. 24 lze vidět graf tohoto kalibračního modelu. Na ose x jsou zobrazeny hodnoty koncentrace kyseliny olejové plynovou chromatografií, na ose y totéž pro NIR. Hodnota $RSQ=0,993$. $SEC=0,593$. Z uvedených hodnot je na první pohled patrné, že bychom s tímto rozlišením dosáhli lepších výsledků. Do použitého kalibračního souboru bude nutné zahrnout více vzorků vysokoolejové slunečnice, aby mohl být aplikovatelný v praxi. Toto bude náplní dalších navazujících experimentů.



Obrázek 24: Graf kalibračního souboru s rozlišením 0,5 nm

4.3 Aplikace kalibračních modelů na reálné vzorky

Modely byly aplikovány na vzorky vysoko-olejové slunečnice s předpokládaným obsahem nad 75 % kyseliny olejové. Měření bylo provedeno celkem na 30 vzorcích během března a dubna 2016. U těchto 30 vzorků byl současně prováděn monitoring obsahu kyseliny olejové plynovou chromatografií. Postupy NIR i GC analýzy včetně přípravy vzorků jsou uvedeny v experimentální části práce. Veškerá měření vzorků byla provedena dvakrát.

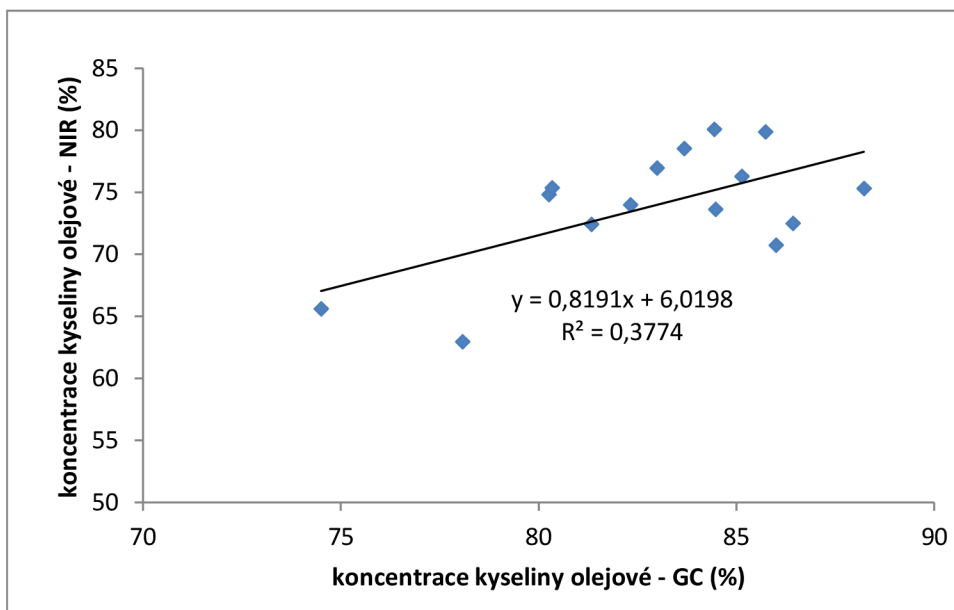
4.3.1 Použití prvního kalibračního modelu

Nejprve byla provedena aplikace prvního kalibračního modelu na 15 vzorků vysoko-olejové slunečnice. V tabulce č. 8 je zobrazeno srovnání zjištěného obsahu kyseliny olejové metodou NIR a plynovou chromatografií.

Tabulka 8: Výsledky stanovení kyseliny olejové metodou NIR a plynovou chromatografií – 1. kalibrační model

| vzorek | NIR [%] | | průměr | GC [%] | | průměr | NIR-GC [%] |
|--------|---------|-------|--------|--------|-------|--------|------------|
| | 1 | 2 | | 1 | 2 | | |
| 1 | 77,05 | 76,87 | 76,96 | 83,29 | 82,69 | 82,99 | -6,03 |
| 2 | 72,16 | 72,67 | 72,415 | 81,36 | 81,29 | 81,33 | -8,91 |
| 3 | 78,61 | 78,48 | 78,545 | 83,64 | 83,71 | 83,68 | -5,13 |
| 4 | 75,8 | 74,85 | 75,325 | 88,19 | 88,25 | 88,22 | -12,90 |
| 5 | 62,74 | 63,18 | 62,96 | 78,06 | 78,07 | 78,07 | -15,11 |
| 6 | 65,6 | 65,62 | 65,61 | 74,45 | 74,55 | 74,50 | -8,89 |
| 7 | 73,92 | 74,08 | 74 | 82,31 | 82,33 | 82,32 | -8,32 |
| 8 | 75,16 | 74,51 | 74,835 | 80,14 | 80,37 | 80,26 | -5,42 |
| 9 | 75,42 | 75,32 | 75,37 | 80,33 | 80,35 | 80,34 | -4,97 |
| 10 | 79,61 | 80,55 | 80,08 | 84,52 | 84,35 | 84,44 | -4,36 |
| 11 | 70,45 | 71,05 | 70,75 | 85,96 | 86,03 | 86,00 | -15,25 |
| 12 | 73,53 | 73,72 | 73,625 | 84,46 | 84,47 | 84,47 | -10,84 |
| 13 | 76,35 | 76,24 | 76,295 | 85,12 | 85,13 | 85,13 | -8,83 |
| 14 | 72,78 | 72,22 | 72,5 | 86,49 | 86,37 | 86,43 | -13,93 |
| 15 | 79,57 | 80,19 | 79,88 | 85,73 | 85,73 | 85,73 | -5,85 |

Rozdíl mezi stanovením pomocí NIR a plynovou chromatografií se pohybuje v rozmezí -15,25 až -4,36%. Z těchto výsledků je patrné, že mezi výsledky získanými oběma metodami je značný rozdíl, který se pravidelně neopakuje. Tato chyba může být způsobena nedostatečným množstvím vzorků v určitých hodnotách kyseliny olejové nebo zkreslením výsledků získaných NIR spektroskopii kvůli obsahu pomletých slupek v měřeném vzorku. Podobný závěr vyplývá i z grafu na obrázku č. 23, kde je zobrazena lineární regrese výsledků měření získaných oběma metodami. Z hodnoty korelačního koeficientu 0,3774 je jasné, že nemá smysl měnit v kalibračním modelu hodnotu BIAS.



Obrázek 25: Srovnání (korelace) obsahu kyseliny olejové naměřené metodou GC a NIR – 1. kalibrační model

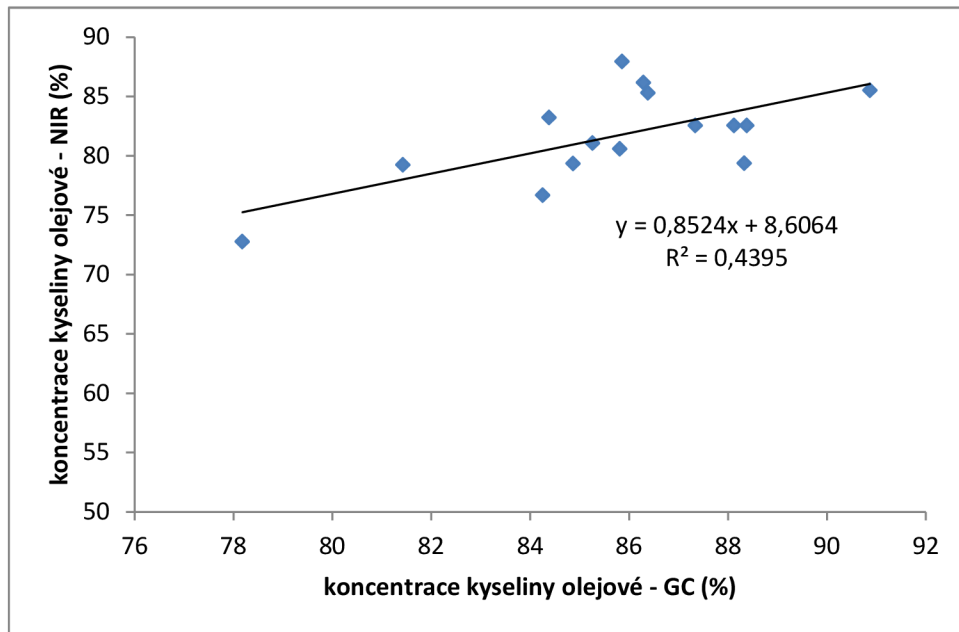
4.3.2 Použití druhého kalibračního modelu

Poté byla provedena aplikace druhého kalibračního modelu na dalších 15 vzorců vysoko-olejové slunečnice. V tabulce č. 9 je zobrazeno srovnání zjištěného obsahu kyseliny olejové metodou NIR a plynovou chromatografií.

Tabulka 9: Výsledky stanovení kyseliny olejové metodou NIR a plynovou chromatografií – 2. kalibrační model

| vzorek | NIR [%] | | průměr | GC [%] | | průměr | NIR-GC [%] |
|--------|---------|-------|--------|--------|-------|--------|------------|
| | 1 | 2 | | 1 | 2 | | |
| 1 | 82,83 | 82,3 | 82,57 | 88,15 | 88,61 | 88,38 | -5,81 |
| 2 | 85,2 | 85,84 | 85,52 | 90,69 | 91,05 | 90,87 | -5,35 |
| 3 | 79,18 | 79,6 | 79,39 | 88,33 | 88,32 | 88,33 | -8,94 |
| 4 | 82,16 | 82,95 | 82,56 | 88,12 | 88,12 | 88,12 | -5,56 |
| 5 | 79,36 | 79,38 | 79,37 | 84,86 | 84,87 | 84,87 | -5,5 |
| 6 | 80,01 | 81,2 | 80,61 | 85,8 | 85,81 | 85,81 | -5,21 |
| 7 | 83,47 | 83 | 83,24 | 84,36 | 84,4 | 84,38 | -1,15 |
| 8 | 81,46 | 80,68 | 81,07 | 85,16 | 85,36 | 85,26 | -4,19 |
| 9 | 86,35 | 86 | 86,175 | 86,3 | 86,28 | 86,29 | -0,12 |
| 10 | 76,17 | 77,2 | 76,69 | 84,29 | 84,2 | 84,25 | -7,56 |
| 11 | 88,2 | 87,68 | 87,94 | 85,89 | 85,83 | 85,86 | 2,08 |
| 12 | 85,26 | 85,38 | 85,32 | 86,32 | 86,43 | 86,38 | -1,10 |
| 13 | 82,59 | 82,55 | 82,57 | 87,37 | 87,31 | 87,34 | -4,77 |
| 14 | 72,56 | 72,98 | 72,77 | 78,16 | 78,19 | 78,18 | -5,41 |
| 15 | 79,12 | 79,36 | 79,24 | 81,23 | 81,62 | 81,425 | -2,19 |

Rozdíl mezi oběma metodami se pohybuje v rozmezí -8,94 až +2,08%. Z tabulky č. 9 je zřejmé, že druhý kalibrační model je vhodnější pro měření koncentrace kyseliny olejové v reálných vzorcích, ale ne plně vyhovující. Na obrázku č. 26 je zobrazena lineární regrese výsledků měření získaných oběma metodami. Korelační koeficient má hodnotu 0,4395, ani v tomto případě nemá smysl měnit hodnotu BIAS, stejně jako u prvního kalibračního modelu.



Obrázek 26: Srovnání (korelace) obsahu kyseliny olejové naměřené metodou GC a NIR - 2. kalibrační model

Na třetí kalibrační model nebyly aplikovány žádné vzorky. Hodnoty jeho statistického vyhodnocení byly téměř shodné s druhým kalibračním modelem.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo posoudit vhodnost NIR spektroskopie pro jednoduché a rychlé orientační stanovení obsahu kyseliny olejové ve slunečnicových semenech. Jako přesná referenční metoda byla použita plynová chromatografie. Jako modelová matrice pro testování a kalibraci NIR spektroskopické metody byly použity vzorky semen vysoko-olejové slunečnice.

Blízká infračervená spektroskopie patří mezi složitější metody. Sám jeden ze zakladatelů Karl Norris se o této metodě kdysi vyjádřil: „*NIR spectroscopy is a God's garbage bin.*” Tato technika vyžaduje poměrně vysoké vstupní investiční náklady. Vytvoření funkčního kalibračního modelu vyžaduje mnoho práce a kvalifikovanou obsluhu.

Na druhé straně je NIR spektroskopie metoda nedestruktivní, nevyžaduje náročnou přípravu vzorku, je šetrná k životnímu prostředí, jednoduchá a rychlá. Dosažená přesnost je mnohdy srovnatelná s referenčními metodami. Je ideální metodou pro oblasti, kde je rychlost stanovení prioritou. Své uplatnění tedy nachází zejména v potravinářském a krmivářském průmyslu při kontrole jakosti vstupních surovin, meziproduktů a produktů.

V této diplomové práci byly prezentovány celkem tři kalibrační modely testované metody. Ani jeden není schopen konkurovat přesností stanovení referenční metodě. Avšak pro rychlou kategorizaci analyzovaného materiálu pro potřeby výkupu, vzhledem k výše uvedeným výhodám, jsou prezentované kalibrační modely plně dostačující. S postupem času lze kalibrační soubory rozšiřovat a jednotlivé modely zpřesňovat.

Navzdory zmíněným nedostatkům lze konstatovat, že metoda blízké infračervené spektroskopie poskytuje rychlé a dostatečně přesné výsledky stanovení obsahu kyseliny olejové a může být v praxi použita pro kategorizaci slunečnicového semene.

6 POUŽITÉ ZDROJE

1. National Sunflower Association. *National Sunflower Association* [online]. US [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.sunflowerlsa.com/about/>
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Codex Alimentarius: International Food Standards*. 1999.
3. MÁLEK, Božetěch, Jiří ANDR, Miroslav JURSIK, Petr ŠKARPA, Karel ŘÍHA, Jan KAZDA a Rostislav RICHTER. *Slunečnice: Technologie pěstování*. První. České Budějovice: Kurent, s.r.o., 2003. ISBN 978-80-87111-41-3.
4. DERCO, DRSC, doc. Ing. Mikuláš. *Technologie pěstování slunečnice na olej*. Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství: MZVŽ ČSR, 1982.
5. Kalorické tabulky. *Kalorické tabulky* [online]. [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <http://www.kaloricketabulky.cz/slunecnicova-seminka/>
6. *Vše o tucích typu omega-3*. Praha: PRAGMA, 2013. ISBN 978-80-7205-886-X.
7. Slunečnicové semínko pro naše zdraví. *Www.celostnimediceina.cz* [online]. 2004 [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: <http://www.celostnimediceina.cz/>
8. PAL, Dilipkumar. *Sunflower (Helianthus annuus L.) Seeds in Health and Nutrition* [online]. [cit. 2016-04-24]. DOI: 10.1016/B978-0-12-375688-6.10130-6. ISBN 10.1016/B978-0-12-375688-6.10130-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123756886101306>
9. Oilseedssf International, LTD. *Www.oilseedssf.com* [online]. San Francisco, 2016 [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: <http://oilseedssf.com/>
10. POKORNÝ, J. *Chemie tuků a jiných lipidů: Učební text VŠCHT*. Praha: SNTL, 1966.
11. ČMOLÍK, Jiří, Václav KLOZAR a Jaroslav LIST. *Technologie tuků*. První. Praha: SNTL, 1986.
12. Genetika-biologie. *Genetika-biologie* [online]. Mudr. Antonín Šípek, jr., 2010 [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <http://genetika-biologie.cz/genetika-mitochondrii>

13. MOUREK, J. *Mastné kyseliny Omega-3: Zdraví a vývoj*. 2. rozšířené. Praha: TRITON, 2009. ISBN 978-80-7387-310-3.
14. Sportvital.cz. *Sportvital.cz* [online]. CMS LARS VIVO, 2010 [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <http://www.sportvital.cz/zdravi/vyziva-a-zdravi/slozky-nasi-stravy/tuky/trans-nasycene-tuky/>
15. PubChem: Open Chemistry Database. *PubChem: Open Chemistry Database* [online]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD20894, USA, 1999 [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445639#section=Top>
16. *Účinky polynenasycených mastných kyselin na imunitní systém* [online]. Brno, 2006 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/106838/prif_b/BAKALARSKAPRACE.pdf. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita.
17. MÍKA, Václav, Alois KOHOUTEK a Pavel NERUŠIL. *Spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR): výběr praktických aplikací v zemědělství*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2008. ISBN 978-80-87011-53-9.
18. CANTARELLI, Miguel A., Israel G. FUNES, Eduardo J. MARCHEVSKY a José M. CAMIÑA. *Determination of oleic acid in sunflower seeds by infrared spectroscopy and multivariate calibration method* [online]. [cit. 2016-04-24]. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.07.004. ISBN 10.1016/j.talanta.2009.07.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914009005724>
19. Index of Refraction of Vegetable Oil. *Index of Refraction of Vegetable Oil* [online]. TingTingLuo, 2006 [cit. 2016-04-24]. Dostupné z: <http://hypertextbook.com/facts/2006/TingTingLuo.shtml>
20. ZHANG, Honggen, Zhenyu WANG, Oscar LIU, Israel German FUNES a José Manuel CAMIÑA. *Development and validation of a GC-FID method for quantitative analysis of oleic acid and related fatty acids* [online]. [cit. 2016-05-05]. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.01.005. ISBN 10.1016/j.jpha.2015.01.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915000179>
21. SIMMS, Henry S. *Determination of Refractive Indices of Oils*. DOI: 10.1021/ie50138a024. ISBN 10.1021/ie50138a024. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie50138a024>

22. CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: Učební texty pro pracovníky ÚKZÚZ*. 1. Praha: SNTL, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
23. MIKEŠ, O. *Laboratorní chromatografické metody*. Praha: SNTL, 1980.
24. HOLZBECHER, Z. a J. CHURÁČEK. *Analytická chemie*. 1. Praha: SNTL, 1987.
25. SMOLKOVÁ, E., V. PACÁKOVÁ a L. FELTL. *Plynová chromatografie - I.: Teoretické základy*. Dotisk skripta pro posluchače přírodovědecké fakulty. Praha: Tiskárna RUK, 1976.
26. *Analytická chemie: Chromatografie* [online]. In: . s. 11 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: http://chemie.ocikvideni.cz/ZS/11_chromatografie.pdf
27. KOTRLÝ, S. a J. CHURÁČEK. *Analytická chemie: Určeno pro posl. VŠCHT v Pardubicích*. 1. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická: SNTL, 1983.
28. *INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE – KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ*. Olomouc: Katedra analytické chemie, 2014.
29. NĚMCOVÁ, I., L. ČERMÁKOVÁ a P. RYCHLOVSKÝ. *Spektrometrické analytické metody I*. 2. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0776-X.
30. *Near Infrared diffuse reflectance/transmittance spectroscopy: Proceedings of the International NIR/NIT Conference*. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1987. ISBN 963-05-4625-6.
31. DVOŘÁČEK, V., A. PROHASKOVÁ a L. ŠTOČKOVÁ. *Efektivní využití blízké infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro hodnocení technologických vlastností pšenice: Metodika pro praxi*. Praha, 2014. ISBN 978-80-7427-151-9.
32. *Lab Guide* [online]. 2014 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://labguide.cz/fluorochromy/>
33. NORRIS, K. H. a R. F. BARNES. *Infrared Reflectance Analysis of Nutritive Value of Feedstuffs*. First. Utah, 1976.

34. SHENK, J. S. a M. O. WESTERHAUSE. *Infrared reflectance analysis of forages*. 1978, , 242-244.
35. HURBURGH, Ch. R. *Performance of a network of whole grain NIR unit for coarse rains*. 8th. 1997.
36. GRÁFOVÁ, M. *Spektrometrie v blízké infračervené oblasti*. Praha, VŠCHT.
37. *Nicolet: NIR spektrometry* [online]. Praha: Maxell [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.nicoletcz.cz/>
38. GONZÁLEZ-MARTÍN, I., V. VILLAESCUSA-GARCÍA, F. LÓPEZ-GONZÁLEZ, C. OIZ-JIMÉNEZ, I. A. LOBOS-ORTEGA, B. GORDILLO a J. M. HERNÁNDEZ-HIERRO. *Control of quality and silo storage of sunflower seeds using near infrared technology* [online]. [cit. 2016-05-05]. DOI: 10.3989/gya.096312. ISBN 10.3989/gya.096312. Dostupné z: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/1404/1400>
39. VELASCO, L., B. PERÉZ-VICH a J. M. FERNANDÉZ-MARTINÉZ. *Crop quality and utilization: Nondestructive Screening for Oleic and Linoleic Acid in Single Sunflower Achenes by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy*. Spain: Crop Sci., 1999.
40. SATO, T., Y. TAKAHATA a T. NODA. *Nondestructive determination of fatty acid composition of husked sunflower seeds by near-infrared spectroscopy*. J. Am. Oil. Chem. Soc., 1995.
41. PÉREZ-VICH, B., L. VELASCO a J. M. FERNANDÉZ-MARINÉZ. *Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy*. J. Am. Oil. Chem. Soc., 1998.
42. GRUNVALD, Anna Karolina, Claudio Guilherme Portela DE CARVALHO, Rodrigo Santos LEITE, José Marcos Gontijo MANDARINO, Juliana Leite GONÇALVES, Carlos Alberto DE BASTOS ANDRADE a Carlos Alberto SCAPIM. *Discriminant Analysis of Sunflower Seeds for Fatty Acid Composition Using NIR Spectroscopy* [online]. [cit. 2016-05-05]. DOI: 10.1007/s11746-011-2003-9. ISBN 10.1007/s11746-011-2003-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11746-011-2003-9>
43. *Krmiva, obiloviny a mlýnské výrobky: Směrnice pro aplikaci blízké infračervené spektrometrie*. Praha, 2014.

44. MONFERRERE, Gastón Lancelle, Silvana Mariela AZCARATE, Miguel Ángel CANTARELLI, Israel German FUNES a José Manuel CAMIÑA. *Chemometric Characterization of Sunflower Seeds* [online]. [cit. 2016-05-05]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02881.x. ISBN 10.1111/j.1750-3841.2012.02881.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2012.02881.x>

7 ZKRATKY

| | |
|--------|--|
| AOTF | Akustické optické filtry |
| ATR | Attenuation Total Reflectance |
| DRIFT | Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy |
| FT-NIR | Blízká infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací |
| GC-FID | Plynová chromatografie s plamenově ionizační detekcí |
| GLC | Gas Liquid Chromatography |
| GSC | Gas Solid Chromatography |
| HOSO | High oleic sunflower oil |
| MLR | Multiple linear regression |
| MPLS | Modified Partial Least squares |
| NIR | Near infrared |
| NIRS | Blízká infračervená spektroskopie |
| NIRDRS | Blízká infračervená spektroskopie s difúzní reflektancí |
| NIRT | Blízká infračervená spektroskopie s transmitancí |
| PCR | Principal component regression |
| PLS | Partial Least Squares |
| RSQ | Korelační koeficient kalibračního souboru |
| SEC | Standardní chyba kalibrace |
| SECV | Standardní chyba křížové validace |
| SEP | Standardní chyba predikce |