

UNIWERSYTET EKONOMICZNY W POZNANIU

Wydział Towaroznawstwa

Katedra Technologii i Analizy Instrumentalnej

Krzysztof Wójcicki

Praca doktorska

**Zastosowanie wybranych technik spektroskopowych
do oceny jakości olejów roślinnych**

Promotor:

dr hab. Ewa Sikorska, prof. nadzw. UEP

Poznań 2013

Praca finansowana ze środków budżetowych na
naukę w latach 2010-2013 jako projekt badawczy

NCN (MNiSzW) nr NN312428239

Pani dr hab. Ewie Sikorskiej, prof. nadzw. UEP
za wszechstronną pomoc, cenne wskazówki
oraz życzliwość okazaną w trakcie
realizacji pracy składam
serdeczne podziękowania

Serdecznie dziękuję!

Wszystkim Pracownikom Katedry Technologii i Analizy Instrumentalnej
Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu

Osobne słowa podziękowania kieruję do:

Państwa Krystyny i Jerzego Justów z firmy SEMCO za możliwość współpracy i udostępnienie próbek olejów tłoczonych na zimno,

Pana Profesora Francesco Caponio z Uniwersytetu w Bari we Włoszech, za możliwość współpracy i udostępnienie próbek oliw,

Pana dr inż. Wojciecha Kozaka z Katedry Towaroznawstwa i Ekologii Produktów Przemysłowych Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu za wykonanie oznaczeń stężeń tlenu,

Pani dr hab. inż. Anny Gliszczyńskiej-Świgło z Katedry Technologii i Analizy Instrumentalnej Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu za wykonanie oznaczeń tokoferoli.

Pracę dedykuję Rodzicom

SPIS TREŚCI

Wstęp.....	9
1. Cel pracy i hipotezy badawcze	12
2. Przegląd zastosowań technik spektroskopowych w ocenie jakości olejów roślinnych.....	13
2.1. Techniki spektroskopowe	13
2.1.1 Spektroskopia oscylacyjna	13
2.1.2. Spektroskopia elektronowa.....	17
2.2. Chemometryczne metody analizy widm	20
2.2.1. Techniki bez nauczyciela.....	21
2.2.2. Techniki z nauczycielem	23
2.2.3. Walidacja modeli.....	27
2.3. Zastosowanie technik spektroskopowych i chemometrycznych w badaniach olejów roślinnych... 28	
2.3.1 Analiza składu olejów na roślinnych.....	30
2.3.2. Kontrola procesów oksydacyjnych olejów roślinnych.	34
2.3.3. Potwierdzenie autentyczności i wykrywanie zafałszowań olejów roślinnych..	45
3. Ekonomiczne i ekologiczne aspekty zastosowania metod spektroskopowych w ocenie jakości	59
4. Rynek olejów roślinnych.....	62
5. Materiał badawczy i metody badań	69
5.1. Przedmiot badań	69
5.2. Odczynniki chemiczne, aparatura i oprogramowanie	70
5.3. Oznaczanie wybranych cech fizykochemicznych próbek olejów roślinnych.....	72
5.4. Pomiar widm	77
5.5. Metody analizy widm.....	78
6. Charakterystyka widm olejów roślinnych	80
6.1. Widma olejów w zakresie podstawowej podczerwieni (MIR).....	80
6.2. Widma olejów w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR).....	85
6.3. Widma olejów w zakresie widzialnym (Vis).....	91
6.4. Widma fluorescencji olejów roślinnych.....	94
6.5. Podsumowanie.....	102
7. Badania zafałszowań oliwy z oliwek extra virgin	104
7.1. Wprowadzenie.....	104
7.2. Badanie zafałszowań oliwy extra virgin olejem słonecznikowym.....	104
7.2.1. Charakterystyka widm.....	104
7.2.2. Modele regresji mieszanin.....	108

7.3 Badanie zafałszowań oliwy extra virgin oliwą rafinowaną i deodoryzowaną.....	111
7.3.1. Charakterystyka oliw.....	111
7.3.2. Charakterystyka widm.....	112
7.3.3. Modele regresji mieszanin.....	116
7.3.4. Ilościowa analiza mieszaniny olejów na podstawie uzyskanych modeli kalibracyjnych.....	121
7.4. Podsumowanie.....	123
8. Ocena stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych.....	125
8.1. Wprowadzenie.....	125
8.2. Ocena stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych na podstawie parametrów chemicznych.....	125
8.3. Badanie stabilności oksydacyjnej olejów z zastosowaniem spektroskopii oscylacyjnej.....	127
8.4. Analiza widm oscylacyjnych.....	131
8.5. Badanie stabilności olejów z zastosowaniem spektroskopii elektronowej.....	138
8.6. Analiza widm elektronowych.....	142
8.7. Podsumowanie.....	143
9. Kontrola jakości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w czasie przechowywania.....	146
9.1 Wprowadzenie.....	146
9.2. Charakterystyka świeżego oleju rzepakowego.....	146
9.3. Ocena zmian jakości oleju rzepakowego w czasie przechowywania na podstawie parametrów chemicznych.....	148
9.4. Badanie oleju rzepakowego z zastosowaniem metod spektroskopowych.....	156
9.5. Korelacja parametrów analitycznych opisujących jakość oleju rzepakowego i widm.....	167
9.6. Podsumowanie.....	169
10. Wnioski.....	171
Literatura.....	180
Spis rysunków.....	195
Spis tabel.....	202
Streszczenie.....	204

Wykaz ważnych skrótów i symboli

D-PLS	dyskryminacyjna metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. Discriminant Partial Least Squares Regression)
FDA	czynnikowa analiza dyskryminacyjna (ang. Factorial Discriminant Analysis)
IR	spektroskopia w zakresie podczerwieni
K_{270}	współczynnik ekstynkcji przy długości fali 270 nm
K_{232}	współczynnik ekstynkcji przy długości fali 232 nm
kNN	metoda k najbliższych sąsiadów (ang. k-Nearest Neighbors)
LDA	liniowa analiza dyskryminacyjna (ang. Linear Discriminant Analysis)
LK	liczba kwasowa
LO	liczba nadtlenkowa
LV	liczba zmiennych
MIR	zakres podstawowej podczerwieni promieniowania elektromagnetycznego
MSC	multiplikatywna korekcja rozproszenia (ang. Multiplicate Scatter Correction)
NIR	zakres bliskiej podczerwieni promieniowania elektromagnetycznego
PCA	analiza głównych składowych (ang. Principal Component Analysis)
PC1	pierwsza główna składowa
PC2	druga główna składowa
PLS	regresja cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. Partial Least Squares Regression)
PCR	regresja składowych głównych (ang. Principal Component Regression)
R^2	współczynnik determinacji
RMSECV	średni kwadratowy błąd pomiaru (ang. Root Mean Square Error of Cross-Validation)
RMSEP	średni kwadratowy błąd przewidywania (ang. Root Mean Square Error of Prediction)
RMSEC	średni kwadratowy błąd kalibracji (ang. Root Mean Square Error of Calibration)
RPD	(ang. Ratio of Performance to Deviation)
SD	odchylenie standardowe
SIMCA	metoda niezależnego modelowania i analogii klas (ang. Soft Independent Modeling of Class Analogy)
UV	zakres nadfioletu promieniowania elektromagnetycznego
Vis	zakres widzialny promieniowania elektromagnetycznego
$\lambda_{em}, \lambda_{wzb}$	długości fali promieniowania emitowanego i wzbudzającego
$\Delta\lambda$	$\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{wzb}$
δ_x	błąd względny

WSTĘP

Zmiana modelu konsumpcji tłuszczów w Polsce spowodowała, że obecnie olej i margaryna pokrywają ponad 60% krajowego zapotrzebowania na tłuszcze, wobec 30% w latach 90. Obok wzrostu spożycia olejów rafinowanych w ostatnim czasie obserwuje się rosnące zainteresowanie olejami tłoczonymi na zimno i olejami typu virgin. Znaczenie tych olejów wzrasta ze względu na ich właściwości organoleptyczne, odżywcze oraz tendencje konsumentów do wyboru wyrobów mniej przetworzonych i zdrowszych. Badania epidemiologiczne wykazały istotny związek między spożywaniem oliwy z oliwek a niską zapadalnością na choroby cywilizacyjne. Spożywanie oliwy z oliwek powoduje zmniejszenie ryzyka zachorowań m.in. na choroby układu krążenia i choroby nowotworowe (Perez-Jimenez i in. 2007). Również inne oleje tłoczone na zimno mają pozytywny wpływ na zdrowie konsumentów.

Niedoceniany przez polskich konsumentów olej rzepakowy, stał się przedmiotem kampanii „Pokochaj olej rzepakowy”, której celem jest podniesienie świadomości konsumentów na temat właściwości odżywczych i zdrowotnych tego oleju oraz jego znaczenia w codziennej diecie. Olej rzepakowy, nazywany „oliwą północy”, zawiera najniższą spośród wszystkich tłuszczów zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych – niekorzystnych z punktu widzenia zdrowotnego. Ponadto cechuje się optymalnym stosunkiem kwasów omega-6 do omega-3 (2:1), co pozytywnie wpływa na pracę serca. Olej rzepakowy w porównaniu do oliwy z oliwek posiada 10-krotnie więcej kwasów omega-3 (Wroniak 2006a). Dzięki tym właściwościom uważa się, że olej otrzymany z nasion rzepaku podwójnie ulepszonego należy do najzdrowszych olejów roślinnych.

Olej słonecznikowy należy do tłuszczów bardzo dobrze rozpoznawalnych przez konsumentów. Według danych GUS, pod względem spożycia produkt ten zajmuje w naszym kraju drugie miejsce, stanowiąc około 9% konsumowanych olejów roślinnych. Najbardziej popularnym tłuszczem roślinnym w Polsce jest olej rzepakowy (około 80% udziału w rynku) natomiast oliwa z oliwek zajmuje trzecie miejsce (ok. 8%).

Wobec rosnącego popytu na tłuszcze roślinne ważnym problemem jest zapewnienie ich wysokiej jakości od momentu produkcji do czasu zakupu. Niestety niekorzystne zmiany w olejach, wywołane procesami utleniania, inicjowane są już w trakcie ich produkcji (Cichosz i Czeczot 2011). Stosowanie wysokich temperatur (np. rafinacja) wpływa na „rozpuszczalność” tlenu, a w konsekwencji na tempo utleniania oleju (Szukalska 2003). W olejach tłoczonych na zimno obecne są antyutleniacze, które hamują procesy oksydacyjne. Utlenianie olejów bogatych w wysoko nienasycone kwasy tłuszczowe (WNKT) jest jednak nieuniknione. W wyniku

zachodzących procesów oksydacyjnych powstaje wiele produktów zarówno lotnych, które obniżają cechy sensoryczne, jak i nielotnych wpływających niekorzystnie na zdrowie człowieka. Jakość olejów, która zmienia się podczas przechowywania, stała się przedmiotem zainteresowań producentów i dystrybutorów, którzy starają się zachować ich pozytywne cechy od momentu produkcji do czasu zakupu. Zrozumienie zmian zachodzących w olejach w trakcie przechowywania oraz czynników je determinujących wymaga jednak wykonania wielu pracochłonnych analiz.

Właściwości zdrowotne oraz większa stabilność olejów tłoczonych na zimno i typu virgin w porównaniu z olejami rafinowanymi, wpływają na wyższą cenę tych produktów. Stanowi to zatem pokusę dla nieuczciwych przedsiębiorców do mieszania bardziej wartościowych olejów z tańszymi, w celu uzyskania korzyści ekonomicznych (Obiedzińska i Waszkiewicz-Robak 2012). Oliwa extra virgin, która zajmuje szczególne miejsce w diecie śródziemnomorskiej, najczęściej bywa przedmiotem zafałszowań. W celu zabezpieczenia tego rodzaju produktów, ustanowiono rozporządzenie (EWG 2568/91 z 11 lipca 1991 roku), które ma zapobiegać podrabianiu oliwy extra virgin niższymi jakościowo gatunkami olejów.

Zalecane metody oceny jakości i autentyczności olejów roślinnych polegają na określeniu wybranych właściwości fizycznych lub chemicznych i porównaniu uzyskanych wartości z oficjalnie ustalonymi limitami. Oznaczenia te wymagają najczęściej znacznych nakładów finansowych związanych z zakupem odczynników i ich utylizacją. Ponadto analizy te są w wielu przypadkach czasochłonne, a do ich przeprowadzenia konieczna jest wyspecjalizowana aparatura.

Metody spektroskopowe w połączeniu z analizą chemometryczną stanowią interesującą alternatywę dla tradycyjnych oznaczeń chemicznych w ocenie autentyczności i stabilności olejów roślinnych.

Analizy z zastosowaniem metod klasyfikacyjnych wykorzystywane są m.in. w badaniu oliw z oliwek extra virgin w celu ich identyfikacji ze względu na jakość, pochodzenie botaniczne lub geograficzne.

Zastosowanie metod regresji umożliwia określenie stężenia dodatku fałszującego oraz przewidywanie parametrów fizyko-chemicznych charakteryzujących jakość olejów roślinnych.

Liczne publikacje naukowe dowodzą przydatności metod spektroskopowych w badaniu różnych aspektów jakości olejów roślinnych. Prace te ograniczają się jednak przede wszystkim do zastosowania tylko jednej, wybranej techniki pomiarowej.

Celem pracy była ocena wybranych aspektów jakości olejów roślinnych z zastosowaniem różnych technik spektroskopowych. W badaniach zastosowano techniki

spektroskopii absorpcyjnej w zakresie podstawowej i bliskiej podczerwieni, widzialnym oraz fluorescencyjne.

W pierwszych rozdziałach pracy scharakteryzowano techniki spektroskopowe i metody chemometryczne wykorzystywane do analizy widm oraz dokonano przeglądu literatury naukowej dotyczącej zastosowań spektroskopii w badaniach olejów roślinnych. Omówiono ekologiczne i ekonomiczne aspekty zastosowań technik spektroskopowych w ocenie jakości. Ponadto przedstawiono analizę światowego i polskiego rynku olejów roślinnych.

W dalszej części scharakteryzowano badane oleje oraz omówiono metody badań. W kolejnych rozdziałach przedstawiono wyniki badań własnych dotyczących charakterystyki widm olejów roślinnych, wykrywania zafałszowań oliwy z oliwek extra virgin, oceny stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych i kontroli jakości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w czasie przechowywania. Zasadniczą część pracy kończy rozdział, w którym przedstawiono wnioski z uzyskanych badań.

1. CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE

Cel pracy

Celem pracy było zastosowanie wybranych technik spektroskopowych do oceny jakości olejów roślinnych. W badaniach zastosowano techniki spektroskopii absorpcyjnej w zakresie bliskiej (NIR) i podstawowej (MIR) podczerwieni, widzialnym (Vis) oraz spektroskopię fluorescencyjną. W szczególności techniki spektroskopowe zastosowano do:

1. oceny zafałszowań oliwy extra virgin tańszymi olejami,
2. oceny stabilności oksydacyjnej wybranych olejów,
3. kontroli jakości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w czasie przechowywania.

Hipotezy badawcze

W pracy postawiono hipotezę główną:

Wybrane techniki spektroskopowe mogą zostać wykorzystane do oceny jakości olejów roślinnych.

Przy realizacji poszczególnych celów postawiono hipotezy szczegółowe:

1. A. Techniki spektroskopowe (NIR, MIR, fluorescencja) mogą zostać wykorzystane do wykrywania zafałszowań oliwy extra virgin oliwą rafinowaną i deodoryzowaną.
B. Techniki spektroskopowe (NIR, MIR, Vis, fluorescencja) mogą zostać wykorzystane do wykrywania zafałszowań oliwy extra virgin olejem słonecznikowym.
2. Techniki spektroskopowe (NIR, MIR, Vis, fluorescencja) mogą zostać wykorzystane do oceny stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych.
3. Techniki spektroskopowe (NIR, Vis, fluorescencja) mogą zostać wykorzystane do kontroli jakości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w czasie przechowywania.

2. PRZEGLĄD ZASTOSOWAŃ TECHNIK SPEKTROSKOPOWYCH W OCENIE JAKOŚCI OLEJÓW ROŚLINNYCH

2.1. Techniki spektroskopowe

W przemyśle spożywczym, w tym również tłuszczowym i olejarskim do rutynowych analiz jakości stosuje się metody chemiczne. Analizy te są przeważnie czasochłonne, kosztowne i uciążliwe. Wymagają one niejednokrotnie użycia toksycznych rozpuszczalników i odczynników. Dlatego też zauważalny jest rosnący popyt na zastąpienie tych tradycyjnie stosowanych metod analitycznych, metodami instrumentalnymi.

Do nowoczesnych technik instrumentalnych zalicza się m.in. metody spektroskopowe, które z powodzeniem wykorzystywane są w analizie jakościowej i ilościowej w różnych dziedzinach przemysłu, m.in. w: chemicznym, hutniczym, maszynowym i elektronicznym (Cygański 1993). W przemyśle spożywczym metody spektroskopowe stosowane są w badaniach surowców, półproduktów i produktów, jak również w kontroli procesów produkcyjnych (Scooter 1997). Metody spektroskopowe mogą być wykorzystywane w połączeniu z zaawansowanymi metodami rozdzielania, co umożliwia kompleksową analizę jakościową i ilościową wydzielonych składników, jak również w bezpośredniej analizie produktów. Idea zastosowania metod spektroskopowych

w bezpośredniej analizie polega na uzyskaniu widma badanego produktu zawierającego informacje o jego właściwościach fizyczno-chemicznych.

W analizie produktów spożywczych w tym również olejów, wykorzystuje się m.in. spektroskopię absorpcyjną w zakresie: nadfioletu (UV), widzialnym (Vis) w bliskiej (NIR) i podstawowej (MIR) podczerwieni, spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektroskopię emisyjną (Scooter 1997, 2001; Careri, Bianchi i Corradini 2002; Christensen i in. 2006; Sadecka i Tothova 2007; Karoui, Downey i Blecker 2010; Nielsen 2010). Zaletą metod spektroskopowych jest ich nieniszczący charakter i możliwość wykonania pomiarów bezpośrednio na próbce, a także możliwość zastosowania w badaniach różnych aspektów jakości żywności.

2.1.1 Spektroskopia oscylacyjna

Spektroskopia oscylacyjna w zakresie podczerwieni obejmuje część widma promieniowania elektromagnetycznego w zakresie między promieniowaniem widzialnym a mikrofalowym.

Jest to metoda oparta na absorpcji promieniowania podczerwonego przez oscylujące cząsteczki. Położenie pasm w widmie podczerwieni jest określane liczbami falowymi, których jednostką jest odwrotność centymetra (cm^{-1}). Rejon podczerwieni dzieli się na trzy zakresy. Bliska podczerwień (NIR) obejmuje zakres $12500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, głównie pasma odpowiadające nadtonom i drganiom kombinacyjnym. Rejon podstawowy (MIR) ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$), w którym zachodzi większość drgań rozciągających i zginających cząsteczek organicznych. Daleka podczerwień, to zakres $400\text{--}10\text{ cm}^{-1}$, dostarczający informacji odnośnie przejść rotacyjnych, drgań siatki krystalicznej i drgań szkieletowych dużych cząsteczek (Szczepaniak 2007). Intensywność pasm może być wyrażona jako transmitancja (T), przedstawiająca stosunek intensywności promieniowania przepuszczonego przez próbkę do intensywności promieniowania padającego na próbkę lub jako absorbcja (A) czyli logarytm dziesiętny odwrotności transmitancji (Silverstein, Webster i Kiemle 2007).

W spektroskopii IR próbka naświetlana jest promieniowaniem z zakresu podczerwieni. Jeśli energia promieniowania odpowiada różnicy energii pomiędzy stanem podstawowym a stanem wzbudzonym cząsteczki, wówczas foton ulega absorpcji a cząsteczka przechodzi w stan wzbudzony o wyższej energii. Widma IR ciał stałych i cieczy nazywane są widmami oscylacyjnymi, natomiast dla cząsteczek w fazie gazowej widmami oscylacyjno-rotacyjnymi.

W podczerwieni obserwuje się jedynie drgania, które powodują zmiany momentu dipolowego cząsteczki. Rozróżnia się dwa rodzaje drgań cząsteczkowych (Silverstein, Weber i Kiemle 2007). Drgania rozciągające to drgania walencyjne, zachodzące wzdłuż wiązań (odległości między atomami naprzemiennie zwiększają się i zmniejszają). Drgania deformacyjne, związane są ze zmianami kątów pomiędzy wiązaniami.

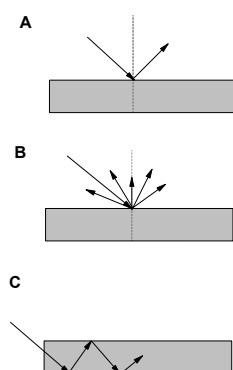
Przybliżone częstości drgań można obliczyć na podstawie równania Hooke'a, zgodnie z którym „dwa atomy i łączące je wiązanie traktuje się jako prosty oscylator harmoniczny, złożony z dwóch mas połączonych sprężyną”. Równanie wyprowadzone z prawa Hooke'a, opisujące zależność między częstością oscylacji, masami atomów i stałą siłową wiązania, przyjmuje postać (Silverstein, Weber i Kiemle 2007):

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{f}{(M_x M_y)/(M_x + M_y)}} \quad (1)$$

gdzie: $\bar{\nu}$ to częstość drgań wyrażona w liczbach falowych, c - prędkość światła (cm/s), f - stała siłowa wiązania (N/cm) zaś M_x i M_y to masy atomów X i Y [g].

Możliwość oszacowania zakresu absorpcji, w którym występują odpowiednie drgania, pozwala na zastosowanie spektroskopii IR do identyfikacji grup funkcyjnych w cząsteczce badanego związku.

W spektroskopii w podczerwieni wykorzystuje się do pomiaru próbek materiały przepuszczające promieniowanie z tego zakresu. Szkło, które nie przepuszcza promieniowania o długości poniżej 4000 cm^{-1} nie znajduje zastosowania w spektroskopii IR. Analiza w podczerwieni umożliwia badanie próbek w każdym ze stanów skupienia. Ciecze (czyste i roztwory) najczęściej analizuje się w kuwetach wykonanych z NaCl i KBr. Substancje lotne analizuje się w specjalnych, szczelnych kuwetach, zaś analizę ciał stałych wykonuje się dla próbek w postaci m.in. zawiesiny lub pastylki (Silverstein i in. 2007). Otrzymanie widm (w zakresie podstawowej podczerwieni) ciał stałych bez względu na ich grubość umożliwia technika osłabionego całkowitego odbicia (ang. Attenuated Total Reflection, ATR) (Silverstein i in. 2007). W technice tej próbka umieszczona jest bezpośrednio na kryształach, a promieniowanie pada na powierzchnię graniczną. Rozszerzeniem tej techniki jest uzyskanie wielokrotnych odbić wewnętrznych wzdłuż powierzchni próbki (Derrick, Stulik i Landry 1999) Na rysunku 1 przedstawiono kierunki odbicia wiązki promieniowania.



Rysunek 1. Kierunki odbicia wiązki w spektroskopii w podczerwieni, A- odbicie zewnętrzne, B – odbicie rozproszone, C- odbicie wewnętrzne.

Opracowano na podstawie (Derrick i in. 1999)

Analizując widma w zakresie MIR można przyporządkować charakterystyczne pasma odpowiednim drganiom grup funkcyjnych. W analizie widma w zakresie podstawowej podczerwieni zwraca się szczególną uwagę na dwa zakresy: $3700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ oraz $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$. W rejonie grup funkcyjnych ($3700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$) pojawiają się drgania rozciągające ważnych grup takich jak O-H, N-H i C=O. Brak absorpcji w zakresach przypisanych różnym grupom

funkcyjnym służy jako dowód ich nieobecności w cząsteczce. Obszar 1300-700 cm^{-1} nazywany jest obszarem daktyloskopowym lub obszarem „odcisku palca” i ma podstawowe znaczenie w identyfikacji związku. W rejonie tym występuje charakterystyczny dla danego związku układ pasm absorpcyjnych, odpowiadający złożonym drganiom rozciągającym i deformacyjnym szkieletu cząsteczki.

W zakresie 1000-635 cm^{-1} występują silne pasma pochodzące od drgań deformacyjnych wiązań C-H poza płaszczyznę cząsteczki w układach aromatycznych i w alkenach. Rejon 1500-1350 cm^{-1} odpowiada drganiom deformacyjnym w płaszczyźnie grupy metylenowej oraz metylowej. Silne pasma drgań szkieletowych, związków aromatycznych i heteroaromatycznych pojawiają się w zakresie 1600-1300 cm^{-1} . W górnej części rejonu 1800-1600 cm^{-1} obserwowane są drgania grupy karbonylowej, w dolnej zaś odpowiadające alkenom (C=C), grupie aminowej (NH_2) i grupie azometinowej (C=N). Brak absorpcji w tym zakresie wyklucza struktury zawierające grupę karbonylową. W obszarze 2000-1800 cm^{-1} występują słabe pasma przypisane nadtonom drgań deformacyjnych wiązań C-H poza płaszczyznę pierścienia aromatycznego. Zakres 2700-2000 cm^{-1} to ostre pasma sugerujące obecność wiązań potrójnych (drgania $\text{C}\equiv\text{C}$ lub $\text{C}\equiv\text{N}$). Szerokie pasma absorpcyjne przypisuje się grupie OH lub N-H. Słabe wąskie pasmo pochodzące od drgań rozciągających wiązań C-H w aldehydach, grupie metoksynowej i N-metylowej pojawia się obszarze 2800-2700 cm^{-1} . W rejonie tym, przy liczbie falowej 2850 cm^{-1} , występują nakładające się pasma przypisane drganiom rozciągającym wiązań C-H. W zakresie 3650-3200 cm^{-1} występują szerokie pasma absorpcyjne o dużej lub średniej intensywności, wskazujące na obecność grup O-H lub N-H₂. W rejonie tym widoczne jest również ostre pasmo o średniej intensywności przy liczbie falowej 3300 cm^{-1} odpowiadające grupie etylenowej (Zieliński 2000, Burns i Ciurczak 2001, Stuart 2004, Silverstein i in. 2007).

W spektroskopii w zakresie NIR w widmach występują pasma pochodzące od nadtonów i drgań kombinacyjnych w cząsteczkach. Pasma te przypisuje się drganiom nadtonu wiązań C-H, N-H i O-H (Stuart 2004). Wiązaniem dominującym w spektroskopii w zakresie bliskiej podczerwieni jest wiązanie z udziałem wodoru (Davies 1993). Wynika to z faktu, iż intensywność absorpcji wiązań zawierających atom wodoru jest znacznie większa od intensywności absorpcji innych wiązań. Dla węglowodorów alifatycznych obserwuje się pasma występujące w zakresie: 6250-5555 cm^{-1} (1600-1800 nm) pochodzące od pierwszego nadtonu drgań rozciągających, 8695-8264 cm^{-1} (1150-1210 nm) pochodzące od drugiego nadtonu drgań rozciągających C-H oraz w regionie 11363-10917 cm^{-1} (880-916 nm) pochodzące od trzeciego nadtonu drgań rozciągających C-H. Dla węglowodorów aromatycznych obserwuje się pasma pochodzące od drgań rozciągających C-H pierwszego nadtonu w zakresie 6250-5555 cm^{-1}

(1600-1800 nm). W zakresie 9090-8000 cm^{-1} (1100-1250 nm) widoczne są pasma pochodzące od drgań drugiego nadtonu. Pasma pochodzące od drgań kombinacyjnych występują w zakresach 4761-4444 cm^{-1} (2100-2250 nm) i 4081-4000 cm^{-1} (2450-2500 nm). W tabeli 1 przedstawiono powszechnie występujące pasma w zakresie bliskiej podczerwieni dla związków organicznych.

Tabela 1. Charakterystyka pasm widm w zakresie bliskiej podczerwieni dla związków organicznych

Liczba falowa (cm^{-1})	Opis
4545-4081	Kombinacyjne C-H rozciągające
5000-4545	Kombinacyjne N-H rozciągające, kombinacyjne O-H rozciągające
6060-5555	Pierwszy nadton C-H rozciągające
7142-6666	Pierwszy nadton N-H rozciągające, pierwszy nadton O-H rozciągające
7692-7042	Kombinacyjne C-H rozciągające
9090-8163	Drugi nadton C-H rozciągające
10526-9090	Drugi nadton N-H rozciągające, drugi nadton O-H rozciągające
11764-10526	Trzeci nadton C-H rozciągające
12903-11764	Trzeci nadton N-H rozciągające

Na podstawie Stuart (2004)

2.1.2. Spektroskopia elektronowa

Spektroskopia absorpcyjna UV-Vis

Spektrofotometrię UV-Vis zalicza się do najstarszych metod instrumentalnych. Analiza opiera się na pomiarze widm elektronowych powstających w trakcie przejść między stanami elektronowymi, a badanie prowadzone jest w zakresie od 10-800 nm. Zakres UV-Vis dzieli się na rejon nadfioletu dalekiego (10-200 nm), nadfioletu bliskiego (200-400 nm) i rejon widzialny (400-800 nm). Przejścia elektronowe wywołane są zmianami konfiguracji elektronowej w cząsteczkach na skutek energii jaką niesie ze sobą promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu UV-Vis. Absorpcja promieniowania z tego zakresu związana jest z przejściami elektronów wiązań walencyjnych δ i π , oraz wolnych par elektronowych n .

W wyniku przejść otrzymuje się widmo elektronowe, które charakteryzuje się szerokimi pasmami absorpcji. Pasma te położone są wzdłuż osi długości fali określonej w nanometrach.

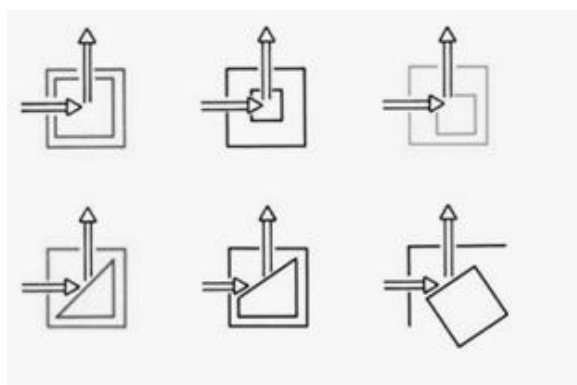
Zasada pomiaru w zakresie widzialnym sprowadza się do pomiaru stosunku natężenia promieniowania po przejściu przez próbkę (I) do natężenia promieniowania padającego na próbkę (I_0) jako funkcji długości fali.

Spektroskopia fluorescencyjna

Metody fluorescencyjne charakteryzują się wysoką czułością, dokładnością i selektywnością. Fluorescencje wykorzystuje się zarówno w oznaczeniach jakościowych jak i ilościowych. Selektywność metody wynika z faktu, iż nie wszystkie związki fluoryzują, oraz z możliwości ustalenia odpowiedniej długości fali promieniowania wzbudzającego i emitowanego.

Emisję promieniowania elektromagnetycznego przez cząsteczkę wzbudzoną w wyniku absorpcji promieniowania do wyższego stanu elektronowego określa się jako fotoluminescencję. Mechanizm przejść elektronowych decyduje o tym, czy jest to fluorescencja (emisja promieniowania związana z przejściem cząsteczki między stanami elektronowymi o tej samej multipletowości) czy fosforescencja (emisja promieniowania, której towarzyszy zmiana multipletowości) (Lakowicz 2010).

Pomiary fluorescencyjne wykonuje się dla próbek ciekłych i stałych. W zależności od stanu skupienia, stężenia oraz natury badanej próbki, stosuje się różne geometrie pomiarowe, rysunek 2 (Lakowicz 2010).



Rysunek 2. Schematy układów geometrycznych stosowanych w pomiarach fluorescencji.

Opracowano na podstawie Lakowicz (2010)

Próbki rozcieńczone mierzy się stosując „geometrię kąta prostego”, w której intensywność emisji mierzona jest pod kątem 90° w stosunku do promieniowania wzbudzającego. W przypadku pomiarów próbek o dużych stężeniach analitów, intensywność promieniowania fluorescencyjnego może być zmniejszona w wyniku zjawisk zachodzących w badanej próbce. Zjawisko takie nazywa się efektem filtra wewnętrznego i wywołane jest osłabieniem intensywności fluorescencji w wyniku absorpcji promieniowania wzbudzającego i/lub emitowanego. Zastosowanie układu odbiciowego, w którym mierzona jest intensywność fluorescencji z powierzchni próbki, na którą pada promieniowanie wzbudzające, umożliwia eliminację tego efektu (Lakowicz 2010, Sikorska 2008a).

W przeciwieństwie do technik spektroskopii absorpcyjnej fluorescencję opisują dwa rodzaje widm. Widmo emisji przedstawia intensywność emisji w funkcji długości fali przy określonej długości fali wzbudzenia. Widmo wzbudzenia przedstawia natomiast zależność intensywności emisji od długości fali promieniowania wzbudzającego przy określonej długości fali emisji (Lakowicz 2010). Jeśli intensywność emisji zostanie zarejestrowana przy różnych długościach fali wzbudzenia, otrzymuje się widma całkowitej fluorescencji (lub luminescencji) nazywane również widmami wzbudzenia-emisji (Ndou i Warner 1991). Widma całkowitej fluorescencji przedstawia się w trójwymiarowym układzie współrzędnych, w którym osie opisują długości fali wzbudzenia, emisji oraz intensywności, lub w postaci mapy konturowej, w której przedstawione są kontury łączące punkty o jednakowej intensywności fluorescencji. Pomiar całkowitej fluorescencji umożliwia uzyskanie pełnego opisu właściwości emisyjnych związku lub mieszaniny związków, natomiast widmo całkowitej fluorescencji zawiera wszystkie informacje zawarte w widmach wzbudzenia oraz emisji. Według Christiansena, Beckera i Frederkisen (2006) jeżeli założyć się, że widma wzbudzenia i emisji składników są chemicznie niezależne, wtedy widmo całkowitej fluorescencji można opisać równaniem:

$$EEM = \sum_{i=1}^n \alpha_i \times E_{wzb}^i(\lambda_{wzb}) \times E_{em}^i(\lambda_{em}) \quad (2)$$

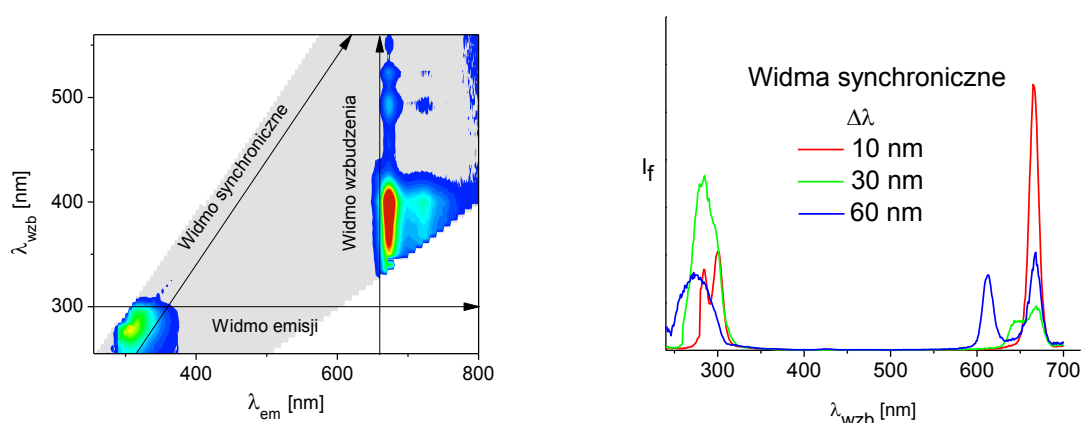
gdzie: i – dany składnik fluoryzujący, n – liczba fluoryzujących składników, α – czynnik zależny od stężenia fluoryzującego składnika, $E_{wzb}^i(\lambda_{wzb})$ – charakterystyka wzbudzenia, $E_{em}^i(\lambda_{em})$ – charakterystyka emisji składnika i .

Inną metodą badania emisji układów wieloskładnikowych jest synchroniczny pomiar fluorescencji, który pozwala zwiększyć selektywność w stosunku do klasycznych widm wzbudzenia i emisji dzięki wykorzystaniu możliwości zmian długości fali wzbudzenia i emisji (Lloyd 1971). Pomiar ten polega na zarejestrowaniu intensywności fluorescencji jako funkcji jednocześnie zmieniających się długości fali wzbudzenia i emisji, przy zachowaniu (najczęściej) stałej różnicy między nimi. Intensywność sygnału I_s przy synchronicznym pomiarze fluorescencji przedstawia równanie (Vo-Dinh 1978):

$$I_s(\lambda_{wzb}, \lambda_{em}) = KcdE_{wzb}(\lambda_{em} - \Delta\lambda)E_{em}(\lambda_{em}) \quad (3)$$

gdzie: c - stężenie fluoryzującego związku, K - stała zależna od warunków eksperymentalnych, d - długość drogi optycznej, E_{wzb} - charakterystyka wzbudzenia, E_{em} - charakterystyka emisji, λ_{wzb} , λ_{em} - długości fali promieniowania wzbudzającego oraz emitowanego, $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{wzb}$.

Istotnym elementem w pomiarach synchronicznych fluorescencji jest wybór odpowiedniej różnicy długości fali wzbudzenia i emisji, $\Delta\lambda$. Wybór tego parametru wpływa na intensywność i kształt pasm w widmie. Widma synchroniczne mierzone dla małych wartości $\Delta\lambda$ cechują się uproszczeniem i zawężeniem pasm, zaś mierzone dla dużych wartości $\Delta\lambda$ mogą zawierać więcej niż jedno pasmo. Na rysunku 3 przedstawiono przykładowe widma całkowitej fluorescencji i widma synchronicznej fluorescencji.



Rysunek 3. Mapa konturowa całkowitej fluorescencji oraz widma synchroniczne fluorescencji oliwy z oliwek extra virgin. *Na podstawie (Sikorska 2012)*

Stosując metody fluorescencyjne można badać zarówno właściwości mikro- (np. struktura białek, oddziaływania białek i tłuszczów) jak i makroskopowe produktów (Christiansen i in. 2005; Sadecka i Tothova 2007).

2.2. Chemometryczne metody analizy widm

Chemometria jest dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki i techniki wykorzystującą metody matematyczne, rachunek prawdopodobieństwa, statystykę, informatykę i teorię podejmowania decyzji do optymalizacji doświadczeń oraz otrzymania maksimum użytecznej informacji z wielowymiarowych danych pomiarowych (Mazerski 2000). Międzynarodowe

Towarzystwo Chemometryków (International Chemometrics Society) zdefiniowało chemometrię jako „naukę o zależnościach pomiędzy pomiarami wykonanymi dla danego obiektu a jego właściwościami poprzez zastosowanie metod matematycznych i statystycznych” (Hibbert i in. 2009). Paul Gemperline (2006) w książce „*Practical Guide to Chemometrics*” definiuje chemometrię jako naukę interdyscyplinarną łączącą w sobie statystykę i chemię. Mike J. Adams w książce pt: „*Chemometrics in analytical spectroscopy*” (1995) opisuje chemometrię jako techniki i operacje matematyczne służące do interpretacji danych chemicznych.

Chemometria jest szeroko wykorzystywana m.in. w farmaceutyce (El-Gindy i Hadad 2012), ochronie środowiska (Astel, Polkowska i Namieśnik 2003; Mas i in. 2010) oraz w przemyśle spożywczym (Guidetti, Beghi i Giovenzana 2012).

Do analizy danych w zależności od liczby zmiennych opisujących właściwości próbki stosuje się odpowiednie metody analizy. Kiedy liczba zmiennych jest mała, stosuje się klasyczne metody. Jeżeli liczba zmiennych objaśniających jest duża, wymagane jest zastosowanie metod wielowymiarowych (Korczyński i in. 2008). Analiza wielowymiarowa ma na celu wyodrębnienie, na drodze procedur matematycznych, istotnych informacji ukrytych w zbiorach o dużej liczbie zmiennych (Martens i Martens 2001).

W zależności od celu modelowania danych wyróżniamy analizę: jakościową i ilościową. Do analizy jakościowej (analizy cech przyjmujących dyskretne wartości) stosuje się metody klasyfikacyjne. Natomiast do analizy ilościowej (analizy cech zmieniających się w sposób ciągły) wymagane jest zastosowanie metod regresji (Stanimirova, Daszykowski i Walczak 2008a).

Modele uzyskane z zastosowaniem metod chemometrycznych mogą znaleźć zastosowanie do: określenia jakości próbki, jej świeżości, pochodzenia geograficznego i botanicznego, bądź do przewidywania cech zmieniających się w sposób ciągły (np. zawartość określonego składnika w próbce) (Martens i Martens 2001).

Widma absorpcyjne i emisyjne uzyskane dla serii próbek są typowym przykładem danych wymagających zastosowania podejścia chemometrycznego dla pełnego wykorzystania zawartej w nich informacji (Geladi 2003, Geladi i in. 2004). Do analizy widm wykorzystuje się techniki bez nauczyciela (bez nadzoru) i z nauczycielem (z nadzorem).

2.2.1. Techniki bez nauczyciela

Techniki bez nauczyciela, tzw. metody eksploracyjne, nie wymagają wiedzy *a priori* dotyczącej przynależności obiektów do danej kategorii. Mają one za zadanie w oparciu o zbiór zmiennych

objaśniających X ułatwić zidentyfikowanie grup obiektów o podobnych cechach (właściwościach) lub ujawnienie próbek znacznie różniących się od pozostałych. Przykładem technik bez nauczyciela są: analiza głównych składowych (PCA), metoda poszukiwania projekcji (PP), techniki grupowania danych i samoorganizujące się mapy Kohonena (Stanimirova, Daszykowski i Walczak 2008a).

Analiza głównych składowych (ang. Principal Component Analysis, PCA) obok analizy czynnikowej i metody segmentacji jest podstawową metodą analizy eksploracyjnej, stosowaną jako metoda wstępna pozwalająca na wykrycie struktury danych. Jej celem jest wyznaczenie nowych nieskorelowanych zmiennych (głównych składowych), które będą miały największą możliwą wariancję. Według Esbensen (2002) model z daną liczbą składowych opisuje równanie:

$$X = TP^T + E = \text{Struktura} + \text{Szum} \quad (4)$$

gdzie: X - macierz danych, T - macierz współrzędnych obiektów w przestrzeni głównych składowych, P^T – macierz zmiennych w przestrzeni głównych składowych, E - macierz błędów (Esbensen 2002).

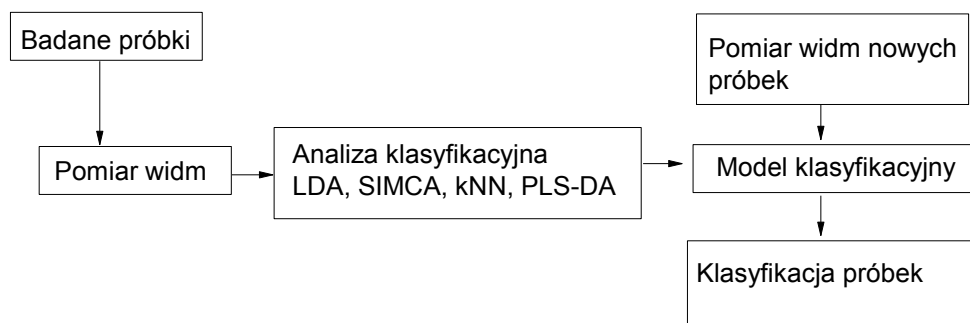
Główne składowe (PC) są liniowymi funkcjami oryginalnych zmiennych i zawierają kolejno, w porządku malejącym, informacje dotyczące struktury zmienności danych. Istnieje kilka kryteriów, według których ustala się liczbę PC. Do najczęściej stosowanych należy: kryterium wykresu osypiskowego i kryterium Kaisera (tylko czynniki, które mają wartości większe niż 1). PCA wykorzystuje się więc przede wszystkim do kompresji, modelowania i wizualizacji danych z jednoczesnym zachowaniem maksimum informacji obecnej w wielowymiarowym zestawie danych oryginalnych (Gemperline 2006; Massart i Vander Heyden 2004a, 2004b). Graficzne przedstawienie wyników analizy głównych składowych umożliwia wykrycie oraz interpretację grupowania się obiektów, ich podobieństw i różnic, oraz analizę zależności między różnymi zmiennymi. Wykres współrzędnych przedstawia relację między obiektami dla danych głównych składowych zaś wartości ładunków czynnikowych są współczynnikami korelacji między oryginalnymi zmiennymi a głównymi składowymi (Daszykowski i Walczak 2008).

2.2.2. Techniki z nauczycielem

Drugą grupę technik stanowią metody uczenia z nauczycielem, do których zalicza się techniki klasyfikacyjne/dyskryminacyjne i kalibracyjne.

Metody klasyfikacyjne/dyskryminacyjne

W metodach klasyfikacyjnych wykorzystuje się techniki mające na celu przyporządkowanie próbek do określonych klas (grup) (Koronacki i Ćwik 2005). Techniki te można podzielić na dwie kategorie: metody dyskryminacyjne oraz metody modelowania indywidualnych grup (Stanimirova, Daszykowski i Walczak 2008a). W metodach dyskryminacyjnych próbka jest zawsze przypisana do jednej z grup. W technikach modelowania indywidualnych grup model buduje się dla każdej próbki osobno. Nowa próbka może więc należeć do jednej z grup, do kilku z nich albo do żadnej. Do metod dyskryminacyjnych należą: liniowa i kwadratowa analiza dyskryminacyjna (LDA i QDA), metoda k-najbliższych sąsiadów (kNN) i dyskryminacyjna metoda cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS-DA). Przykładem metody niezależnego modelowania indywidualnych grup jest analiza SIMCA (Miller i Miller 2005; Otto 2007). Schemat analizy klasyfikacyjnej na podstawie analizy widm przedstawiono na rysunku 4.



Rysunek 4. Schemat analizy klasyfikacyjnej na podstawie analizy widm spektroskopowych.

Na podstawie Wójcicki (2013)

Liniowa analiza dyskryminacyjna (ang. Linear Discriminant Analysis, LDA) jest jedną z najczęściej wykorzystywanych metod klasyfikacyjnych (Berrueta, Alonso-Salces i Heberger 2007). Jej zadaniem jest wyznaczenie liniowej funkcji dyskryminacyjnej, która następnie

wykorzystywana jest do klasyfikacji nowych próbek do jednej z rozpatrywanych klas. W metodzie LDA zakłada się, że: rozkład obiektów w każdej grupie powinien być zbliżony do rozkładu normalnego, rozdzielenie klas powinno odbywać się liniowo, a macierze wariancji-kowariancji każdej grupy powinny być porównywalne.

Podstawą niezależnego modelowania klas (ang. Soft Independent Modeling of Class Analogy, SIMCA) są modele PCA, które w pierwszym etapie analizy tworzone są dla wszystkich obiektów. Następnie dla każdej z klas obliczany jest indywidualny model PCA, z optymalną dla niej liczbą głównych składowych określających strukturę danych. Klasyfikacji dokonuje się dwuetapowo. W drugim etapie „testującym” nowe obiekty przypisywane są do już istniejącej klasy, do której ich dopasowanie jest najlepsze. Wyniki klasyfikacji zależą od wyboru liczby głównych składowych dla modeli poszczególnych klas. W metodzie tej obiekt może być przydzielony do jednej lub kilku istniejących grup lub nie znaleźć się w żadnej z nich (Stanimirova i Walczak 2008b).

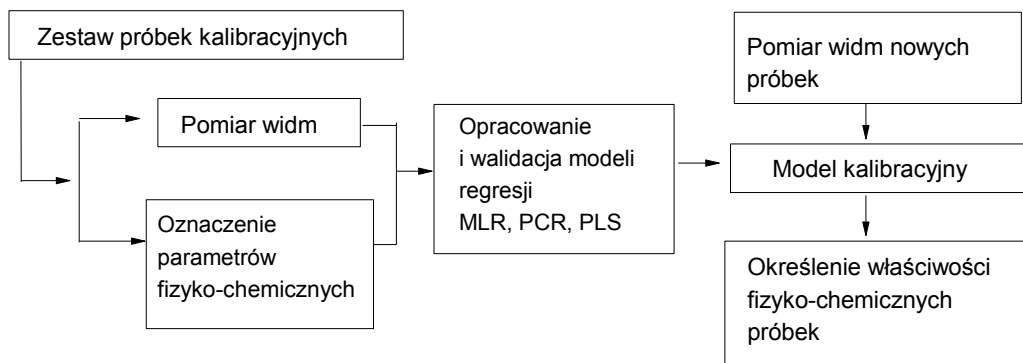
Analiza k -najbliższych sąsiadów (ang. k -Nearest Neighbors, kNN) jest kolejną metodą wykorzystywaną do klasyfikacji obiektów. Metoda polega na przypisaniu nowego obiektu do klasy, która najczęściej występuje wśród jego k sąsiadów, gdzie k jest liczbą nieparzystą (np. 1,3,5). Dla danego obiektu oblicza się odległość euklidesową między nieznanym obiektem a każdym z obiektów w zbiorze uczącym. Odległości te ułożone są od najmniejszej do największej, w celu przyporządkowania próbce jej N - najbliższych sąsiadów. Badany obiekt zaliczany jest do klasy najliczniej reprezentowanej wśród jego k - najbliższych sąsiadów. Pewne modyfikacje tej metody mogą poprawić jakość klasyfikacji, ale tylko w przypadku kiedy występują więcej niż dwie klasy (Lavine i Davidson 2006).

Kolejną metodą klasyfikacyjną jest dyskryminacyjny wariant PLS (PLS-DA). Przynależność próbek do grup określona jest przez zmienną zależną y , która może mieć postać binarną, czyli jej elementy przyjmują wartości 0 lub 1 (0 dla grupy pierwszej i 1 dla grupy drugiej) lub może być zmienną bipolarną, o elementach -1 lub 1 (-1 dla grupy pierwszej i 1 dla grupy drugiej). Po ustaleniu optymalnej liczby czynników potrzebnych do zbudowania modelu PLS można na jego podstawie przewidzieć przynależność próbek do jednej z dwóch grup (Stanimirova, Daszykowski i Walczak 2008a).

Metody regresji

Do analizy cech zmieniających się w sposób ciągły stosuje się metody regresji. Analizy regresji mają na celu uzyskanie modelu kalibracyjnego, który umożliwi ilościową ocenę

właściwości próbki, na podstawie zbioru zmiennych objaśniających. Schemat analizy regresji na podstawie widm przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Schemat analizy regresji na podstawie widm.

Na podstawie Wójcicki (2013)

Dobór próbek składających się na zestaw kalibracyjny jest jednym z ważniejszych elementów wpływających na budowę modelu kalibracyjnego. Próbki składające się na zestaw kalibracyjny powinny charakteryzować się odpowiednią reprezentatywnością oraz w miarę możliwości pokrywać całe zakresy zmienności wszystkich modelowanych parametrów. Próbki kalibracyjne można dobrać na dwa sposoby:

- 1) przygotowanie próbek o określonej charakterystyce w zależności od zaplanowanego eksperymentu,
- 2) wybór reprezentatywnych próbek z dostępnego zestawu.

Przyjmuje się, że zbiór próbek kalibracyjnych powinien zawierać więcej obiektów (70-75%) niż zbiór próbek testowych.

Wybór odpowiedniego modelu kalibracyjnego zależy m.in. od liczby zmiennych oraz od występowania lub braku korelacji między nimi. Do analizy regresji wykorzystuje się m.in. metodę: regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS), regresji składowych głównych (PCR) i wielokrotnej regresji liniowej (MLR).

Koncepcja metody opiera się na zbudowaniu liniowego modelu, który można opisać równaniem:

$$Y = XB + E \quad (5)$$

gdzie: Y – macierz zmiennych zależnych o wymiarach n (liczba obiektów) na m (liczba zmiennych), X – macierz zmiennych niezależnych (widm) o wymiarach n (liczba obiektów) na p (liczba zmiennych), B – macierz współczynników regresji o wymiarach p na m , E – składnik losowy modelu o takich samych wymiarach jak macierz Y .

Ideą regresji głównych składowych (PCR) jest stworzenie zależności między poszukiwaną właściwością próbki (np. zawartością danego komponenta) a głównymi składowymi (PCs). Analiza PCR przebiega dwuetapowo. W pierwszym etapie wyznacza się główne składowe w celu uzyskania nieskorelowanych zmiennych macierzy X . W drugim etapie analizy macierz T wykorzystywana zostaje do konstrukcji modelu MLR (Mevik i Wehrens 2007).

Zadaniem analizy regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów (ang. Partial Least Squares Regression, PLS) podobnie jak i analizy PCR jest zbudowanie modelu kalibracyjnego w oparciu o kilka ukrytych zmiennych (Naes i in. 2002). Zmienne zależne w analizie PLS są nowymi składowymi, opisanymi przez zmienne niezależne i zmienne zależne. Zbiór zmiennych niezależnych X pozwala na prognozowanie zmiennych zależnych Y . W tym celu wszystkim zmiennym X , które wykazują silne powinowactwo względem zmiennych Y nadaje się specjalną wartość (wagę). W rezultacie możliwe jest szacowanie zmiennych Y z jednoczesnym uwzględnieniem zmienności macierzy X (Martens 1989). Znane są dwa warianty modelu regresji PLS:

- 1) PLS1 – który pozwala na odszukanie korelacji między wielowymiarową macierzą danych spektroskopowych i jednowymiarową macierzą danych chemicznych lub fizykochemicznych,
- 2) PLS2 – który umożliwia analizę kilku parametrów jednocześnie, pod warunkiem, że są one wzajemnie skorelowane.

Porównując metodę regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów z metodą regresji składowych głównych można stwierdzić, że modele dla analizy PLS osiągają mniejsze błędy przewidywania dla nowych próbek i są bardziej stabilne ze względu na mniejszą liczbę czynników wykorzystanych do konstrukcji modelu. Ponadto w zależności od stopnia korelacji między zmiennymi Y stosuje się model PLS-1 lub PLS-2. Jeżeli korelacja ta będzie stosunkowo

silna, wówczas model PLS-2 może dać korzystniejsze rezultaty niż model PLS-1 (Stanimirova, Daszykowski i Walczak 2008a).

2.2.3. Walidacja modeli

Podstawowym narzędziem testowania i optymalizacji modelu jest walidacja, którą rozumie się jako ocenę zdolności predykcyjnych dla zbioru próbek, który nie był użyty do budowy modelu.

Do konstrukcji modelu i oceny jego zdolności predykcyjnych wykorzystuje się próbki podzielone na dwa zbiory: kalibracyjne i testowe. Do budowy modelu wykorzystuje się walidację krzyżową, która pozwala na wybór optymalnej liczby czynników. Metoda ta polega na tym, że próbki z zestawu kalibracyjnego (modelowego) są raz uwzględniane przy tworzeniu modelu a innym razem traktowane są jako próbki testowe. Najprostszym wariantem walidacji krzyżowej jest pełna walidacja krzyżowa, w której kolejno każda z próbek zostaje wybrana jako próbka testowa. Jakość uzyskanego modelu określa średni błąd kwadratowy walidacji (ang. Root Mean Square Error of Validation, RMSECV) wyrażony wzorem (Stanimirova, Daszykowski i Walczak 2008a):

$$RMSECV(f) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i(f))^2}{n}} \quad (6)$$

gdzie: $\hat{y}_i(f)$ to wartość zmiennej zależnej przewidzianej na podstawie modelu o f czynnikach, n – liczba obiektów

Każdy skonstruowany model kalibracyjny, dyskryminacyjny i klasyfikacyjny powinien zostać zweryfikowany i zatwierdzony. W tym celu, dostępny zbiór próbek dzieli się na modelowy i testowy. Zbiór modelowy ma służyć do skonstruowania odpowiednich reguł logicznych, zaś model testowy ma na celu oszacowanie zdolności predykcyjnych modelu. Według Stanimirovej i współautorów (2008a) duży błąd dopasowania modelu do zbioru modelowego (powyżej limitu akceptowanego) dla danego problemu kalibracyjnego, czy też duży błąd przewidywania dla próbek ze zbioru testowego świadczą o tym, że zbudowany model może być nieodpowiedni. Błąd przewidywania dla próbek ze zbioru testowego określa się obliczając średni kwadratowy błąd przewidywania (RMSEP), wyrażony wzorem:

$$RMSEP(f) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^w (y_i^{pred} - \hat{y}_i(f))^2}{w}} \quad (7)$$

gdzie: w – to liczba próbek w zbiorze testowym

2.3. Zastosowanie technik spektroskopowych i chemometrycznych w badaniach olejów roślinnych

Widma olejów w zakresie NIR, IR, UV-Vis oraz fluorescencji, w połączeniu z metodami chemometrycznymi są szeroko wykorzystywane do badania jakości olejów roślinnych (Karoui, Downey i Blecker 2010; Karoui i Blecker 2011; Gromadzka i Wardencki 2011; Rohman i Che Man 2012a; Dais i Hatzakis 2013).

Analizy z zastosowaniem metod klasyfikacyjnych: SIMCA (Gaelano i in. 2005; Guerdeniz i Ozen 2009), PLS-DA (Galtier i in. 2007), kNN (Downey, McIntyre i Davier 2002; Capote, Jimenez i Luque de Castro 2007) i LDA (Lerma-Garcia 2011a), wykorzystywane są m.in. w badaniu oliw z oliwek extra virgin w celu ich identyfikacji ze względu na jakość, pochodzenie botaniczne lub geograficzne.

Zastosowanie metod regresji: PLS (Al-Alawi, van de Voort, Sedman 2004; Inon i in. 2003; Hajimahmodi i in. 2005) oraz PCR (Gimenez i in. 2010; Mafra, Ferreira i Oliveira 2008) umożliwia określenie stężenia dodatku fałszującego oraz oznaczenie parametrów fizykochemicznych charakteryzujących jakość olejów roślinnych.

Obecnie w literaturze istnieje wiele przykładów zastosowań metod spektroskopowych wraz z chemometryczną analizą widm do oceny jakości olejów roślinnych, tabela 2.

Tabela 2. Przykłady zastosowań technik spektroskopowych w analizie olejów roślinnych

Technika	Zastosowanie	Literatura
NIR	Identyfikacja i ilościowe oznaczanie składu	Marquez, Diaz i Reguera 2005; Azizian i Kramer, 2005; Galtier i in. 2007; Dupuy i in. 2010
	Zafalszowania	Gurdeniz i Ozen 2009; Hourant i in. 2000; Ozdemir i in. 2007; Ozturk, Yalcin i Ozdemir 2010
	Pochodzenia botaniczne, geograficzne i klasyfikacja	Casale i in. 2010; Safar i in. 1994; Sato 1994; Galtier i in. 2007; Tapp, Defernez i Kemsley 2003; Yang, Irudayaraj i Paradkar 2005; Downey, McIntyre i Davier 2002
	Kontrola zmian jakości w procesie ogrzewania i przechowywania	Yidliz i in. 2002; Cox i in. 2000; Li i in. 1999; Armenta, Garrigues i Guardia 2007; Du i in. 2012; Yidliz i in. 2001; Lum i in. 2004; Azizian i Kramer 2005
MIR	Identyfikacja i ilościowe oznaczanie składu	Dupuy i in. 2010
	Zafalszowania	Lai, Kemsley i Wilson 1995; Gurdeniz i Ozen 2009; Rohman i in. 2011a, 2011b, 2012b; Oussama i in. 2012; Yang i Irudayaraj 2001; Marigheto i in., 1998; Ozen i Mauer 2002; Alam i Hamid 2007; Manaf i in. 2007; Vlachos i in. 2006
	Pochodzenie botaniczne, geograficzne i klasyfikacja	Lerma-Garcia i in. 2010, Lankmayr i in. 2004, Javidnia i in. 2013
	Kontrola zmian jakości w procesie ogrzewania i przechowywania	Allendorf, Subramanian i Rodriguez-Saona 2012; Guillen i Cabo 2002; Vlachos i in. 2006; Sinelli i in. 2007; Le Dreau 2009a; Moros i in. 2009; Pinto i in. 2010; Navarra i in. 2011; Maggio i in. 2011
UV-Vis	Identyfikacja i ilościowe oznaczanie składu	Dauqan, Sani, Abdullah 2011
	Zafalszowania	Torecilla i in. 2010; Downey i in. 2002
	Pochodzenie botaniczne i klasyfikacja	Lankmayr i in. 2004
	Kontrola zmian jakości w procesie ogrzewania i przechowywania	Sikorska i in. 2005d; Ricca i in. 2012
Fluorescencja	Identyfikacja i ilościowe oznaczanie składu	Sikorska 2008; Kyriakidis i Skarkalis 2000; Zandomenighi, Carbonaro i Caffarata 2005; Sikorska i in. 2004; Giungato, Notarnicola i Colucci 2002; Diaz i in. 2003; Sikorska 2005b, 2005c
	Zafalszowania	Poulli, Mousdis i Georgiou 2006; Sayago i in. 2007; Guimet, Ferre i Boque 2005; Kyriakidis i Skarlis 2000; Guimet i in. 2004a; Poulli, Mousdis i Georgiou 2007; Dupuy i in. 2005; Dankowska i Małecka 2009a
	Pochodzenie botaniczne, geograficzne i klasyfikacja	Sikorska i in. 2005; Dupuy i in. 2005; Guimet, Boque i Ferre 2004b
	Kontrola zmian jakości w procesie ogrzewania i przechowywania	Cheikhousman i in. 2005; Engelsen 1997; Sikorska 2008b; Poulli, Mousdis i Georgiou 2009; Tena, Garcia-Gonzalez i Aparicio 2009; Matthaus 2006

Opracowanie własne

2.3.1 Analiza składu olejów roślinnych

Składniki olejów

Oleje roślinne składają się w około 95-98% z triacylogliceroli (TAG), które są estrami zbudowanymi z trzech cząsteczek kwasów tłuszczowych (KT) i glicerolu oraz z substancji im towarzyszących. Większość kwasów tłuszczowych związana jest w cząsteczkach triacylogliceroli jednak nieznaczna część występuje również w postaci wolnych kwasów tłuszczowych. Kwasy tłuszczowe zróżnicowane są pod kątem: długości łańcucha węglowego, liczby wiązań podwójnych, konfiguracji przestrzennej wiązań (*cis-trans*) i położenia wiązań. Do substancji towarzyszących, które stanowią 2-5% składu olejów roślinnych zalicza się: alkohole, estry, związki fenolowe, sterole, tokoferole, tokotrienole i inne związki (Cert, Moreda i Perez-Camino 2000; Harwood i Aparicio 2000; Pijanowki i in. 2000). Skład oleju zależy głównie od rodzaju, jakości surowca i jego odmian, oraz warunków klimatycznych uprawy i sposobu otrzymywania (Berganza i in. 2003). Udział kwasów tłuszczowych zarówno w olejach tłoczonych na zimno jak i poddanych procesom rafinacji nie zmienia się znacząco, natomiast w wyniku odkwaszania i odbarwiania następuje zmiana udziału frakcji nieglicerydowej, która ulega zmniejszeniu. W wyniku rafinacji następuje zredukowanie frakcji niezmydlającej, np.: tokoferoli, steroli i związków polifenolowych (Kania i in.2004; Verhe i in. 2006).

Oleje roślinne są bogatym źródłem jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (JNKT) oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT) (Gunstone 2005). Do WNKT zaliczane są niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT), które nie są syntezowane przez organizm człowieka i muszą być dostarczane wraz z pożywieniem. Do kwasów tych zalicza się: kwas α -linolenowy (ALA, 18:3, n-3), kwas linolowy (LA, 18:2, n-6) oraz kwas γ -linolenowy (GLA, C18:3, n-6) (Achremowicz i Szary-Sworst 2005, Karłowicz-Bodalska i Bodalski 2007). Olejem zawierającym znaczne ilości WNKT jest olej lniany, który zawiera 15,82% kwasu LA i 56,98% kwasu ALA. Oleje roślinne charakteryzują się również dużą zawartością kwasu oleinowego (18:1, n-9). Największą zawartością kwasu oleinowego odznaczają się: olej z orzechów laskowych (85%), oliwa z oliwek (68%) i olej rzepakowy (45-55%) (Dubois i in. 2007). W przypadku WNKT ważne jest zachowanie odpowiedniej proporcji udziału kwasów tłuszczowych z rodziny n-6 do n-3. Najbardziej pożądanym jest stosunek nie większy niż 5:1, gdyż wpływa to na prawidłowość przemian metabolicznych w organizmie (Burdge 2006). Najlepszym stosunkiem tych kwasów (2:1) charakteryzuje się olej rzepakowy (Przybylski i in. 2005).

W olejach poddanych procesom rafinacji możliwa jest obecność izomerów *trans* kwasów tłuszczowych na poziomie około 1% (Gunstone 2005).

Witamina E (tokoferol) jest naturalnym przeciwutleniaczem (występującym w czterech formach: α , β , γ , δ), wykazującym zróżnicowaną aktywność przeciwutleniającą (Warner 2005, Schwartz 2008). Główną cechą charakteryzującą tokoferole jest zdolność wygaszania reaktywnych form tlenu oraz wolnych rodników. Ilość i skład tokoferoli zależy od gatunku oleju. Olej słonecznikowy zawiera znaczne ilości α -tokoferolu podczas gdy olej sojowy charakteryzuje się dużą zawartością γ i δ - tokoferolu (Warner 2005). W oleju z ogórecznika lekarskiego dominującą formą tokoferolową jest δ - tokoferol, zaś w oliwie z oliwek α -tokoferol. W wyniku procesu rafinacji następuje zredukowanie tych składników w olejach (Tasan i Demirci 2005).

W większości olejów roślinnych głównymi składnikami substancji niezmydlających są sterole, których zawartość ogółem wynosi 400-800 mg/100g w zależności od pochodzenia botanicznego oleju. W olejach roślinnych głównymi sterolami są β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol i brassikasterol (Obiedzińska i Waszkiewicz-Robak 2012). W oleju lnianym zawartość steroli wynosi około 233 mg/100g, w oliwie z oliwek 256 mg/100g, w oleju słonecznikowym 325 mg/100g zaś w oleju rzepakowym 769 mg/100g (Obiedzińska i Waszkiewicz-Robak 2012). W wyniku procesu rafinacji z oleju usunięte zostaje około 17% steroli.

Barwniki chlorofilowe i karotenoidowe występują we wszystkich olejach roślinnych w ilościach zależnych od gatunku oleju oraz od technologii ich produkcji. Karotenoidy są związkami polienowymi zbudowanymi z jednostek izoprenoidowych. Substancje te różnią się między sobą stopniem uwodornienia, występowaniem i strukturą form cyklicznych na końcach łańcucha oraz ewentualną obecnością funkcyjnych grup tlenowych (Rotkiewicz, Konopka i Tańska 2002). Główną funkcją karotenoidów jest hamowanie procesów utleniania fotosensybilizowanego poprzez dezaktywację tlenu singletowego oraz opóźnienie procesów autooksydacyjnych poprzez zmiatanie wolnych rodników (Beutner i in. 2001). Najczęściej występującymi karotenoidami w olejach roślinnych są: β -karoten, likopen, γ -karoten oraz α -karoten. Drugą grupę barwników lipidowych stanowią chlorofile. Rozróżnia się dwie formy chlorofili: chlorofil *a* (niebieskozielony) i chlorofil *b* (zielonożółty). Barwniki chlorofilowe są fotosensybilizatorami na świetle zaś w ciemności pełnią funkcję przeciwutleniającą (Beutner 2001; Lanfer-Marquez, Barros i Sinnecker 2005). Pod wpływem działania czynników zewnętrznych następuje ich rozkład. Do odbarwienia chlorofili przyczyniają się również

wodoronadtlenki. W olejach rafinowanych chlorofil występuje w śladowych ilościach lub nie ma go wcale.

Widma olejów uzyskane z zastosowaniem różnych technik spektroskopowych zawierają informacje o właściwościach fizycznych i chemicznych badanej próbki. Widma absorpcji w zakresie NIR i IR można skorelować z zawartością kwasów tłuszczowych (Azizian i Kramer 2005), widma VIS wykorzystywane są w analizie ilościowej β -karotenu i chlorofili (Dauqan, Sani i Abdullah 2011) a fluorescencja jest wynikiem emisji tokoferoli, chlorofili i związków fenolowych (Sikorska 2004).

Spektroskopia oscylacyjna

Moh i współautorzy (1999) wykorzystali widma w zakresie MIR do ilościowego oznaczenia karotenoidów w oleju palmowym. Zawartość β -karotenu oznaczona została przy wykorzystaniu chromatografii HPLC. Zmierzone widma poddano chemometrycznej analizie PLS. Dla analizowanego modelu kalibracyjnego badacze uzyskali dobrą korelację wybranego zakresu ($976-926\text{ cm}^{-1}$) i zawartości β -karotenu, o czym świadczyła wartość R^2 wynosząca 0,972. Wartość R^2 modelu walidacyjnego wynosiła 0,951 zaś błąd SEP (ang. Standard Error of Prediction) dla zestawu walidacyjnego wynosił 25,78.

Spektroskopia w zakresie MIR wraz z analizą regresji PLS, wykorzystana została przez Szydłowską-Czerniak (2007) do określenia zawartości fosfolipidów w oleju rzepakowym. Analiza PLS przeprowadzona została dla zakresu $1780-860\text{ cm}^{-1}$. Otrzymany model regresji PLS przyjmował zależność prostoliniową oraz charakteryzował się niskim średnim błędem kalibracji (SEC) na poziomie 0,77% i wysoką wartością współczynnika $R^2=0,99$.

Widma w zakresie NIR oliw z oliwek extra virgin wykorzystane zostały przez Galtiera i in. (2007) do ilościowej analizy składu kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli. Zawartość kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli wyznaczono metodą HPLC a następnie skorelowano z widmami NIR. Do chemometrycznej analizy widm badacze wykorzystali metodę PLS, dla której najlepsze modele przewidywania uzyskali w zakresie $4500-7000\text{ cm}^{-1}$ lub dla całego widma. Otrzymane modele dla większości oznaczanych kwasów tłuszczowych charakteryzowały się względnymi błędami przewidywania (REP) mniejszymi niż 10%. Dobrą korelację widm otrzymano również dla wyznaczonych triacylogliceroli z błędem REP < 10%. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość przewidywania składu kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli na podstawie opracowanego modelu regresji.

W celu zbadania korelacji między widmami w zakresie MIR i NIR a zawartością kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli wykorzystano zestaw oliw z oliwek, dla których wykonano widma w zakresie $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ dla MIR i $10000\text{-}4500\text{ cm}^{-1}$ dla NIR (Dupuy i in. 2010). Zawartość kwasów i triacylogliceroli wyznaczona została metodą chromatografii cieczowej (HPLC). Analizę przeprowadzono wykorzystując metodę PLS1 dla pełnego zakresu widm. Otrzymane modele dla MIR pięciu głównych kwasów tłuszczowych, charakteryzowały się niższym standardowym błędem przewidywania (SEP) niż modele otrzymane dla NIR. Następnie przeprowadzono analizę regresji PLS1 w celu skorelowania widm z zawartością triacylogliceroli. Uzyskane wartości błędów SEP i REP były ponownie niższe dla widm MIR, jednak wartości te były wyższe niż w modelach otrzymanych dla korelacji widm z kwasami tłuszczowymi .

Spektroskopia elektronowa

Fluorescencja olejów roślinnych jest wynikiem obecności związków z grupy chlorofili, fenoli i tokoferoli oraz innych fluoryzujących składników, stanowiących prawdopodobnie produkty utlenienia (Sikorska 2013). W zależności od stosowanych procesów produkcyjnych zawartość tych składników ulega zmianie. W widmach całkowitej i synchronicznej fluorescencji olejów roślinnych obserwuje się pasma pochodzące od emisji chlorofili, tokoferoli i związków fenolowych (Zadomeneghi i in. 2005; Diaz i in. 2003; Giungato, Notarnicola i Colucci 2002; Dupuy i in. 2005). W widmach olejów rafinowanych występują pasma pochodzące od tokoferoli natomiast pasma pochodzące od emisji chlorofili nie są obserwowane (Sikorska i in. 2005c).

Sikorska i współautorzy (2005b) wykorzystali widma synchroniczne olejów: kukurydzianego, sojowego, słonecznikowego, arachidowego oraz oliwy z oliwek do korelacji z łączną zawartością tokoferoli. Ogólną zawartość tych związków wyznaczono metodą chromatografii cieczowej HPLC. W zależności od gatunku oleju zawartość witaminy *E* jak i poszczególnych tokoferoli była różna. Do przewidywania zawartości witaminy *E* wykorzystano analizę PLS. Analizę przeprowadzono dla widm synchronicznych olejów nierozcieńczonych i rozcieńczonych w n-heksanie, zmierzonych dla $\Delta\lambda=10\text{ nm}$ z zastosowaniem różnych geometrii pomiarowych. Dla wszystkich otrzymanych modeli regresji uzyskano wysoką korelację pomiędzy widmami fluorescencji i łącznym stężeniem tokoferoli.

Na podstawie przeglądu literatury można wnioskować, iż możliwa jest korelacja między widmami otrzymanymi przy użyciu różnych technik spektroskopowych a składem chemicznym olejów roślinnych. Wykorzystując analizę regresji PLS można otrzymać model kalibracyjny,

który po odpowiedniej walidacji może być wykorzystany do ilościowych oznaczeń odpowiednich związków na podstawie pomiarów widm.

2.3.2. Kontrola procesów oksydacyjnych olejów roślinnych

Procesy utleniania

Oleje roślinne podczas przechowywania poddawane są działaniu wielu czynników, powodujących niekorzystne zmiany fizyczne i chemiczne. Pod wpływem działania tych czynników dochodzi do znaczących procesów destrukcyjnych pogarszających jakość tych produktów (Budzyńska-Topolowska i Ziemiański 1992). Zakres przemian oksydacyjnych w olejach roślinnych zależy od obecności związków o charakterze pro-utleniającym, czynników zewnętrznych (temperatury, dostępu tlenu i światła) oraz rodzaju opakowania (Prescha i in. 2008). Utlenianie, doprowadza do zmian sensorycznych (powstawania nieprzyjemnego smaku i zapachu) i strat wartości żywieniowej (rozkład NNKT i witamin rozpuszczalnych w tłuszczach) (Cichosz i Czczot 2011). Utlenione tłuszcze mogą także oddziaływać na produkt prowadząc do zdegradowania w nim m.in. ryboflawiny lub kwasu askorbinowego (Maszewska i Krygier 2006). Utlenianie zachodzić może zarówno pod wpływem światła na drodze autooksydacji lub utleniania fotosensybilizowanego (Drozdowski 2007).

Światło może zainicjować utlenianie tlenem singletowym o wyjątkowo wysokiej reaktywności, 1450 razy większej niż tlen tripletowy, w konsekwencji prowadząc do szybszych procesów fotoutleniania w porównaniu z autoutlenianiami (Tańska i Rotkiewicz 2003). Proces taki nazywany jest fotosensybilizowanym utlenianiem i obejmuje reakcję nienasyconego kwasu tłuszczowego (NKT) z tlenem w obecności światła i sensybilizatora (Mińkowski 2008). Sensybilizator przekształca tlen w bardziej aktywny stan singletowy, który reaguje z podwójnym wiązaniem NKT, przyłączając się do węgla i tworząc wodoronadtlenek alkilowy o konfiguracji trans (Drozdowski 1996).

W olejach przechowywanych w świetle dziennym obserwuje się intensywne zmniejszenie zawartości związków z grupy chlorofilu i tokoferoli (Sikorska 2008a, Caponio i in. 2005). Chlorofil i produkty jego rozkładu feofityna i feofibrydy, w obecności tlenu atmosferycznego i światła pełnią rolę fotosensybilizatorów tlenu singletowego 1O_2 .

W ciemności głównym procesem zachodzącym w olejach roślinnych jest autooksydacja. Autooksydacja tłuszczów polega na przyłączeniu tlenu z powietrza przez nienasycone kwasy tłuszczowe (Hawrysh 1990). Utlenianiu ulegają zarówno kwasy tłuszczowe uwolnione na skutek

hydrolizy, jak i te wchodzące w skład triacylogliceroli (Drozdowski 1996). Proces autooksydacji tłuszczów jest wolnorodnikową reakcją przebiegającą w trzech etapach: (1) inicjacja podczas, której tworzą się wolne rodniki, (2) propagacja w wyniku, której powstają rodniki nadtlenkowe, (3) terminacja, czyli zakończenie reakcji i tworzenie nierodnikowych produktów (Kamal-Eldin i Yanishlieva 2002).

Powstające w wyniku utleniania wodoronadtlenki są nietrwałymi produktami i łatwo ulegają dalszym przemianom. Pierwszym etapem degradacji wodoronadtlenków jest rozpad wiązania między dwoma atomami tlenu. W wyniku tej reakcji powstają rodniki alkoksyłowe i hydroksyłowe. Następnie w rodniku aloksyłowym rozerwaniu ulega wiązanie między dwoma węglami po obu stronach rodnika (Nawar 1996). W wyniku reakcji rodnika alkoksyłowego z innymi rodnikami i nowymi cząsteczkami substratu tłuszczowego powstają m.in. aldehydy, ketony, węglowodory, związki hydroksyłowe oraz związki cykliczne dimerów i polimerów (Budzyńska-Topolowska i Ziemiański 1992).

Oksydatywno-termiczny rozpad nienasyconych kwasów tłuszczowych, prowadzący do powstawania dimerów, trimerów i tetrametrów z grupami polarnymi jest wynikiem ogrzewania tłuszczów w wysokich temperaturach (Drozdowski 1996).

Produkty przemian oksydacyjnych powodują zmiany sensoryczne tłuszczów oraz negatywnie wpływają na zdrowie organizmu ludzkiego (Billek 2000).

Przechowywane produkty spożywcze łatwo ulegają niekorzystnym zmianom chemicznym i fizycznym, co powoduje konieczność zapewnienia im odpowiedniej i skutecznej ochrony. Zastosowanie właściwego opakowania (np. puszki metalowe lub butelki z ciemnego szkła) może ograniczyć dostęp tlenu i światła, przedłużając trwałość oleju. Oleje roślinne rozlewane są w opakowania kartonowe, w puszki metalowe, w pojemniki z tworzyw sztucznych i szklanych (Kanavouras 2006). Niestety, standardowe opakowania olejów tj. butelki z tworzyw sztucznych nie stanowią skutecznej ochrony przed czynnikami zewnętrznymi (Tańska i Rotkiewicz 2003). Opakowania szklane i metalowe, według niektórych autorów (Karakasides i Tsimis 2002) są rozwiązaniem korzystniejszym niż opakowania z tworzyw sztucznych, ponieważ nie powodują przenikania do oleju np. niespolimeryzowanych cząsteczek i innych substancji użytych do ich wytworzenia: plastyfikatorów, emulgatorów, wypełniaczy itp. Wykorzystanie opakowań metalowych i Tetra-brik przedłuża dobrą jakość olejów poprzez ograniczenie dostępu światła (Mendez i Falque 2007). Na podstawie przeglądu piśmiennictwa można stwierdzić iż oleje roślinne powinny być przechowywane w opakowaniach szklanych. To właśnie w nich utrzymywały najdłużej swoje prawidłowe właściwości fizyczne i chemiczne. W opakowaniach

z tworzyw sztucznych dochodziło do największych strat jakościowych (Caponio 2005; Smyk 2008; Mishra i Sharma 2011; Ullah, Hussain i Sofail 2011; Rababah i in. 2011).

W celu pełnego zrozumienia zmian zachodzących w czasie przechowywania oraz czynników je determinujących wykonuje się wiele oznaczeń. Metody klasyczne, opierające się na dwóch rodzajach testów: normalnych i przyspieszonych, wykorzystywane są do oceny stopnia zaawansowania procesów utleniania. W teście normalnym badany olej przechowywany jest w warunkach zbliżonych do warunków sklepowych lub domowych i badany jest okresowo. Testy przyspieszone polegają na przyspieszonym utlenianiu próbki w wyniku stosowania podwyższonej temperatury, zwiększenia powierzchni kontaktu z tlenem i przez naświetlanie promieniowaniem UV (Szukalska 2003). Jakość olejów poddanych procesom oksydacyjnym określa się m.in. poprzez oznaczenie parametrów chemicznych, m.in. liczby nadtlenkowej (LO), liczby kwasowej (LK), liczby anizydynowej (LA), wyznaczenie wskaźnika Totox, liczby jodowej (LJ) oraz wykorzystując ocenę sensoryczną (Górnaś i in. 2005; Wroniak i in. 2006a, 2006b; Viekari i Kousaftakis 2007; Tańska i in. 2011).

Długi czas oznaczeń oraz koszty związane z zakupem odczynników i aparatury badawczej oraz wykonaniem analiz, stanowią przyczynę poszukiwań nowoczesnych technik instrumentalnych pozwalających ocenić jakość olejów. W analizie stosuje się między innymi metody chromatograficzne (Smith, King i Min 2007; Miraliakbari i in. 2008) oraz metody spektroskopowe: MIR (Russin, van de Voort i Sedman 2003, 2004; Moros i in. 2009; Lerma-Garcia i in. 2011a) NIR (Marquez i in. 2005; Ogutcu 2012), NMR (Guillen i Ruiz 2006), UV-Vis (Grigoriadou i Tsimidou 2006; Baixauli i in. 2002) i fluorescencję (Ammari i in. 2012a; Ammari i in. 2012b).

Spektroskopia oscylacyjna

Guillen i Cabo (2002) monitorowali zmiany zachodzące w olejach roślinnych (szafranowym, słonecznikowym, rzepakowym i oliwie z oliwek) poddanych testowi termostatowemu w temperaturze 70°C przez okres 14 dni bez dostępu światła. Procesy oksydacyjne monitorowane były przy pomocy widm w zakresie MIR (4000-500 cm⁻¹). Okresowo (co drugi dzień) oznaczano metodami konwencjonalnymi liczbę nadtlenkową (LO) i anizydynową (LA). Tempo zmian oksydacyjnych było zróżnicowane, najwolniejsze dla oliwy z oliwek, a najszybsze w oleju szafranowym. Liczba anizydynowa w porównaniu do liczby nadtlenkowej zwiększała się wolniej, ale bez przerwy nawet po dwóch tygodniach trwania eksperymentu. Następnie Autorzy porównali wyznaczone parametry chemiczne ze zmianami zachodzącymi w widmach.

Analizując widma MIR zauważono wzrost intensywności pasma przy liczbie falowej 3470 cm^{-1} pochodzącego od nadtonów wiązań $\text{C}=\text{O}$, co świadczy o zachodzących procesach oksydacyjnych. Powstałe pasmo w pobliżu 1728 cm^{-1} jest wynikiem przejścia pierwotnych produktów utleniania we wtórne. Pasma te pokrywa się z pasmem pochodzącym od grupy estrowej (1746 cm^{-1}) powodując spadek jego intensywności.

Widma w zakresie MIR z transformacją Fouriera wykorzystano do kontroli jakości oleju kukurydzianego, poddanego procesom ogrzewania i fotoutleniania w zakresie nadfioletu UV. Badania podzielono na dwa etapy. W pierwszym olej ogrzewany był w temperaturach: 165 i 245°C przez 30 minut. Następnie analizowano widma podczerwieni w zakresie 2962 - 2854 cm^{-1} , w których zaobserwowano wzrost intensywności niektórych pasm w stosunku do oleju świeżego. Pasma pochodzące od drgań grupy $\text{C}=\text{O}$, z maksimum przy liczbie falowej około 1746 cm^{-1} uległo rozszerzeniu w olejach poddanych działaniu wysokich temperatur. W drugim etapie olej kukurydziany wystawiony był przez 3 godziny na działanie promieniowania UV a następnie ogrzewany przez 30 min w temp. 270°C . Pasma przy liczbie falowej 3009 cm^{-1} na skutek działania promieniowania zmniejszało swoją intensywność w funkcji czasu. Znaczący spadek intensywności odnotowano dla próbki zarówno naświetlanej jak i ogrzewanej, co spowodowane było degradacją wiązania podwójnego *cis*-olefinowego pod wpływem zachodzących procesów oksydacyjnych (Vlachos i in. 2006).

Świeżość oliwy z oliwek była przedmiotem badań Sinelli i in. (2007), którzy wykorzystali chemometryczną analizę widm w zakresie MIR do kontroli jakości przechowywanych próbek olejów. Analizowano cztery zestawy próbek: w pierwszym trzydzieści pięć próbek zbadano w przeciągu miesiąca, były to oleje świeże, w drugim szesnaście próbek przechowywano przez rok z dostępem światła, w trzecim próbki przechowywane były przez rok bez dostępu światła (szesnaście próbek) zaś w czwartym dwadzieścia cztery próbki przechowywane były w ciemności przez dwa lata. Eksperyment prowadzony był w temperaturze 17 - 25°C . Autorzy kontrolowali zmiany zachodzące w olejach metodami klasycznymi, poprzez oznaczanie: kwasowości i liczby nadtlenkowej oraz przy użyciu parametrów K_{232} i K_{270} oznaczanych spektrofotometrycznie. Wszystkie świeże oliwy spełniały wymagania Norm Europejskich. Jednak po zakończeniu eksperymentu, niezależnie od wariantu prowadzonych badań, parametry określające jakość oliw z oliwek zostały przekroczone. Na podstawie zmierzonych widm przeprowadzono wstępną analizę PCA oraz analizy klasyfikacyjne przy wykorzystaniu metod: PLS-DA, LDA i SIMCA. W widmach ATR-MIR widoczne były zmiany w stosunku do widm oliw świeżych. Analiza wstępna widm przeprowadzona została na podstawie metody PCA, drugiej pochodnej widm dla regionu 4000 - 550 cm^{-1} . Widoczne było rozmieszczenie próbek

wzdłuż pierwszej głównej składowej (PC1), która opisywała 89% całkowitej zmienności. Oliwy świeże scharakteryzowane były przez ujemne wartości PC1, pozostałe oleje przez dodatnie. Ponadto na podstawie drugiej głównej składowej, opisującej 5% zmienności, udało się odróżnić próbki przechowywane na świetle przez 12 miesięcy od próbek przechowywanych w ciemności przez rok lub dwa lata. Na podstawie analizy regresji PLS-DA (dla wszystkich czterech wariantów przechowywania) dla drugiej pochodnej widm w zakresie $4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$, poprawnie sklasyfikowano próbki świeże i przechowywane. Pierwszy i drugi czynnik otrzymanego modelu analizy LDA, opisywał ponad 90% całkowitej zmienności. Wykorzystując walidację krzyżową udało się sklasyfikować ze 100% poprawnością oleje świeże i wystawione na działanie światła. Dla olejów przechowywanych w ciemności klasyfikacja była na poziomie 75% i 92% odpowiednio dla oliw przechowywanych przez 12 i 24 miesiące. Dla analizy przeprowadzonej metodą SIMCA uzyskano prawidłową klasyfikację na poziomie 78% dla modelu składającego się z 4 zestawów i 100% dla modelu skomponowanego z trzech zestawów (oleje świeże, przechowywane na świetle i w ciemności).

Według Le Dreau i in. (2009b) spektroskopia absorpcyjna w zakresie MIR z transformacją Fouriera jest jedną z najbardziej odpowiednich technik wykorzystywanych do jakościowej kontroli olejów jadalnych. Spektroskopia MIR zastosowana została do kontroli procesów starzenia różnych gatunków olejów roślinnych: rzepakowego, orzechowego, słonecznikowego, winogronowego, sojowego, z orzechów laskowych i rzepakowego rafinowanego. Oleje termostatowane były w temperaturze 130°C przez pięć godzin z dostępem i bez dostępu tlenu. Widma wykonano w zakresie $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. W widmach olejów, w których zastosowano dodatek argonu nie odnotowano różnic w kształcie pasm, natomiast w olejach, w których znajdowało się powietrze różnice były zauważalne. W wyniku zachodzących procesów oksydacyjnych, intensywność pasma przy liczbie falowej 3008 cm^{-1} uległa zmniejszeniu. Ponadto pasmo przy liczbie falowej 3473 cm^{-1} nałożyło się na pasmo przy liczbie falowej 3464 cm^{-1} . Utworzone pasmo przypisano pierwotnym produktom utlenienia. Zachodzące procesy oksydacyjne spowodowały również powstanie nowego pasma przy liczbie falowej 3535 cm^{-1} na skutek przejścia pierwotnych produktów utlenienia we wtórne. Jak wykazali Autorzy widma w podczerwieni mogą być z powodzeniem wykorzystywane do śledzenia zmian zachodzących w olejach roślinnych różnego pochodzenia botanicznego.

Olej słonecznikowy badany przez Morosa i in. (2009) został poddany działaniu wysokich temperatur: 147 , 171 i 189°C przez okres trzydziestu dwóch godzin, w czterech sesjach po osiem godzin. Dla badanych próbek wykonano widma w zakresie MIR, wykorzystując technikę osłabionego odbicia (ATR). Do analizy chemometrycznej zastosowano analizę regresji PLS.

Zmiany w widmie podczerwieni oleju słonecznikowego poddanego ogrzewaniu przez trzydzieści dwie godziny w stosunku do oleju świeżego odnotowano dla rejonów: 3500, 1700, 1300-1200, 1050-800 i 575 cm^{-1} , co spowodowane było zmianami w jego składzie chemicznym. Analizę PLS przeprowadzono dla widm ATR-MIR w całym zakresie spektralnym, wyłączając region 2402-1801 cm^{-1} , w którym występowały zakłócenia. Analizę cząstkowych najmniejszych kwadratów, PLS, wykorzystano do korelacji widm MIR z czasem lub temperaturą ogrzewania. Dla obu otrzymanych modeli uzyskano dobrą korelację widm z parametrami określającymi warunki eksperymentu, o czym świadczyły wartości R^2 wynoszące 0.995 dla czasu i 0.994 dla temperatury ogrzewania. Obliczone błędy pomiaru w obu modelach były niskie.

Nową metodę kontroli zmian zachodzących w olejach zaprezentowali w swojej pracy Pinto i in. (2010). Innowacja ta polegała na podgrzewaniu próbek olejów (słonecznikowego, rzepakowego i oliwy z oliwek) bezpośrednio na kryształach ATR i wykonaniu widma w zakresie podstawowej podczerwieni. Oleje ogrzewane były w temperaturach 130, 150 i 170°C przez 60 minut. Pasma z maksimum przy liczbach falowych: 3008, 985, 970 i 710 cm^{-1} wykorzystano do monitorowania izomeryzacji *cis-trans*. Pasma przy liczbie falowej 3539 cm^{-1} informowało o tworzeniu wodoronadtlenków, zaś pasma przy 1732 i 1699 cm^{-1} pochodziły od wtórnych produktów utlenienia. Olej słonecznikowy okazał się najmniej stabilny, najbardziej trwały okazał się olej rzepakowy.

Navarra i in. (2011) przeprowadzili eksperyment mający na celu porównanie zmian oksydacyjnych w oliwach extra virgin poddanych działaniu trzech różnych zakresów temperatur. Próbkę olejów przechowywane były w temp. 30, 60 i 90°C bez dostępu światła przez trzydzieści pięć dni. Widma MIR w zakresie 4000–400 cm^{-1} wykonano dla próbek świeżych i poddanych testom termostatowym. Analizując widma oliw ogrzewanych w najwyższej temperaturze zauważono zmiany w widmie w rejonie 3470-3530 cm^{-1} . Zmiany te charakteryzowały się zwiększeniem intensywności pasma przy liczbie falowej 3250 cm^{-1} oraz zmniejszeniem przy 3468 cm^{-1} . W pozostałych dwóch testach (30 i 60°C) zaobserwowano podobne zjawisko, jednak intensywność pasm była mniejsza.

Metody spektroskopowe: MIR i VIS wraz z analizą regresji PLS zastosowano do badania oliw z oliwek poddanych działaniu wysokiej temperatury (Maggio i in. 2011). Próbkę podgrzewano w temperaturze 180°C przez 30, 60, 90, 120, 150 i 180 minut. Następnie wyznaczono parametry fizyko-chemiczne: liczbę nadtlenkową (LO) i parametry K_{232} i K_{270} w celu monitorowania zmian zachodzących podczas ogrzewania. Widma podstawowej podczerwieni wykonano stosując technikę ATR dla regionu 4000-700 cm^{-1} . Wykorzystując do analizy regresji PLS cały zakres spektralny MIR Autorzy nie wykazali żadnych znaczących

korelacji między czasem ogrzewania a zmianami w widmach. Dla regionu 1296-912 cm^{-1} (w którym widoczne były zmiany w widmie wywołane procesami oksydacyjnymi) uzyskano dobrą korelację o czym świadczyła wartość parametru $R^2=0,939$. Widma VIS wykonano w zakresie 33000-9000 cm^{-1} . Przeprowadzona analiza regresji PLS wykazała korelację między widmami a czasem ogrzewania, dla której wartość parametru R^2 była na poziomie 0,997.

Porównaniem widm w zakresie NIR i MIR do oceny jakości olejów przeznaczonych do głębokiego smażenia zajęli się Du in. (2012). Do badań wykorzystano oleje sojowe, które posłużyły do smażenia potraw w temperaturach 120-200°C, w czasie od 2 do 20 min, w zależności od przygotowywanego dania. Olej w trakcie smażenia pobierany był do analiz co 3-10 minut. Widma tłuszczów zostały wykonane w zakresie 4000-400 cm^{-1} dla MIR i 10000-4000 cm^{-1} dla NIR. Następnie wykorzystując metodę PLS skorelowano widma z parametrami wyznaczonymi doświadczalnie: liczbą nadtlenkową (LO) i zawartością wolnych kwasów tłuszczowych (FFA). W obu zakresach Autorzy uzyskali korelacje dla wartości liczby nadtlenkowej oraz widm absorpcji, o czym świadczyły wartości parametrów $R^2= 0,893$ i $0,953$ odpowiednio dla widm w MIR i NIR. Również dla zawartości wolnych kwasów tłuszczowych otrzymano wysokie wartości korelacji tego parametru i analizowanych widm, wynoszące $0,954$ dla MIR i $0,948$ dla NIR.

Yildiz, Wehling i Cuppet (2001) wykorzystali widma NIR do monitorowania stopnia zaawansowania procesów oksydacyjnych w oleju sojowym. Liczba nadtlenkowa (LO), liczba anizydynowa (LA) oraz zawartość skoniugowanych dienów (SD) zostały oznaczone ilościowo. Następnie przeprowadzona została analiza regresji PLS pierwszej i drugiej pochodnej widm. Autorzy uzyskali najlepsze rezultaty dla modelu (przewidywania) w zakresie 2200-1100 nm dla pierwszej pochodnej widm. Otrzymane modele charakteryzowały się dobrą korelacją widm i oznaczonych parametrów. Wartości parametrów R^2 dla LO, LA i SD wynosiły odpowiednio $0,99$, $0,88$ i $0,95$.

W roku 2002 Ci sami Autorzy (Yildiz, Wehling i Cuppet 2002) przeprowadzili analizę regresji PLS w celu skorelowania liczby nadtlenkowej z widmami NIR oleju kukurydzianego i sojowego. Zakres liczby nadtlenkowej dla oleju kukurydzianego, który uzyskali, wynosił 1,40-22,29 (meq O_2/kg) zaś dla oleju sojowego 0,30-23,45 (meq O_2/kg). Otrzymane modele kalibracji i przewidywania oparte na analizie PLS pierwszej pochodnej widm charakteryzowały się wysokimi wartościami R^2 na poziomie 0,987-0,996. Średni błąd przewidywania (SEP) wynosił dla oleju kukurydzianego 0,75 (meq O_2/kg) a dla oleju sojowego 0,72 (meq O_2/kg). Ponadto w widmach obu gatunków olejów Autorzy zaobserwowali zmiany w kształcie pasma przy długości fali 2068 nm.

Lum, Wheeling i Cuppett (2007) wykorzystali analizę PLS do zbudowania modelu łączącego zmiany w widmach NIR ze zmianami zawartości wolnych kwasów tłuszczowych i związków polarnych w olejach sojowych. Z kolei Armenta i współautorzy (2007) z powodzeniem stosowali analizę PLS do korelacji widm w zakresie NIR ze zmianami hydrolitycznymi i oksydacyjnymi zachodzącymi w oliwie z oliwek i w oleju słonecznikowym.

Spektroskopia elektronowa

Zmiany właściwości oliwy z oliwek w czasie przechowywania z zastosowaniem techniki spektroskopii absorpcyjnej w UV-Vis badała Sikorska i in. (2005d). Próbki oliwy podzielono na trzy grupy w zależności od odpowiednich warunków przechowywania. Do pierwszej grupy przyporządkowano oliwę w butelkach ze szkła bezbarwnego, przechowywaną bez dostępu światła, natomiast do drugiej oliwę w butelkach ze szkła o zabarwieniu zielonym, wystawioną na działanie światła. W trzeciej grupie znalazła się oliwa w butelkach ze szkła bezbarwnego, eksponowana na światło. Szkło bezbarwne przepuszczało promieniowanie świetlne w zakresie charakterystycznym dla absorpcji karotenoidów i chlorofili, natomiast szkło o barwie zielonej nie przepuszczało promieniowania o długości fali poniżej 500 nm. Warunki oświetleniowe symulowały warunki sklepowe. Wszystkie oliwy przechowywane były przez okres 12 miesięcy. W widmie absorpcji oliwy z oliwek rozpuszczonej w n-heksanie, zaobserwowano pasmo w zakresie 450-520 nm, pochodzące od barwników karotenoidowych. Pasma to pokrywało się z pasmem absorpcji chlorofilu. W zakresie 650-700 nm występowało charakterystyczne pasmo pochodzące wyłącznie od związków chlorofilowych. Dla próbek przechowywanych bez dostępu światła nie zaobserwowano istotnych zmian w widmach absorpcji. Zasadnicze różnice w widmie zauważono w próbkach przechowywanych w warunkach ekspozycji na światło. Szybki zanik absorpcji chlorofilu odnotowano dla oliw z oliwek przechowywanych w butelkach ze szkła bezbarwnego. Ponadto zanikowi absorpcji chlorofilu towarzyszyło pojawienie się nowego pasma z maksimum przy długości fali 320 nm, pochodzącego prawdopodobnie od produktów jego rozkładu. Również w paśmie pochodzącym od związków karotenoidowych zaobserwowano spadek absorpcji.

Ricca i współautorzy (2012) badali zmiany zachodzące w sycylijskich oliwach z oliwek extra virgin, przechowywanych przez 35 dni w temperaturze 30, 60 i 90°C bez dostępu światła. W widmie w zakresie UV-Vis (400-750 nm) zespół badawczy zaobserwował pasma pochodzące od barwników chlorofilowych i karotenoidowych. Pod wpływem ogrzewania nastąpił spadek absorpcji tych związków. Zmiany te w zależności od temperatury przebiegały jednak w różnym

stopniu. W temperaturze 30°C β -karoten uległ rozkładowi w mniej niż 10% wartości początkowej. Znaczny spadek absorpcji tego barwnika odnotowano dla temperatur: 60 i 90°C wynoszący ponad 80% wartości początkowej. Podobne zjawisko dotyczyło chlorofilu, których rozpad przebiegł znacznie szybciej w temperaturze powyżej 60°C. Autorzy zaobserwowali również wzrost intensywności pasma z maksimum przy długości fali 700 nm, co przypisano powstającym produktom utlenienia.

Zmiany właściwości tłuszczów roślinnych w trakcie przechowywania badali Cheikhousman i in. (2005). Zespół badawczy przeprowadził test przyspieszony w temperaturze 170°C w czasie trzech godzin. Zmiany w widmach zostały skorelowane z parametrami, określającymi jakość badanych próbek, oznaczonymi z zastosowaniem innych metod. Widma fluorescencji oliw z oliwek extra virgin wykonano w zakresie emisji 330-450 nm w celu monitorowania zmian w związkach polifenolowych i witaminie E. Podczas ogrzewania badacze zaobserwowali zmniejszenie intensywności pasma z maksimum przy długości fali 330 nm, które przypisane było emisji polifenoli i witaminy E. Pasma emisji przy długości fali 450 nm zostało skorelowane z zawartością wodoronadtlenków występujących w oleju. Następnie Autorzy przeprowadzili analizę regresji PLS, w której widma fluorescencji stanowiły zbiór zmiennych niezależnych X , zaś zbiór zmiennych zależnych Y stanowiły oznaczone wartości: witaminy E i wodoronadtlenków. Dla analizowanych modeli otrzymano stosunkowo wysokie wartości parametru R^2 świadczące o dobrej korelacji widm z oznaczonymi parametrami chemicznymi, określającymi jakość oliw.

Spektroskopię emisyjną do monitorowania zmian zachodzących w oliwach z oliwek zastosowała Sikorska i in. (2008b). Próbkę oliwy z oliwek extra virgin przechowywane były przez okres 10 miesięcy, w butelkach bezbarwnych oraz zielonych, wystawionych i nie wystawionych na działanie światła. Procesy oksydacyjne kontrolowano przy zastosowaniu widm całkowitej i synchronicznej fluorescencji. Analizując widma całkowitej fluorescencji olejów przechowywanych zaobserwowano spadek intensywności pasm pochodzących od chlorofilu, tokoferoli i związków fenolowych, w zależności od warunków przechowywania. Dla próbek przechowywanych w ciemności zmiany te były niewielkie. W próbkach eksponowanych na działanie światła odnotowano szybszy spadek intensywności odpowiednich pasm oraz pojawienie się pasma emisji z maksimum wzbudzenia i emisji odpowiednio przy długościach fali około 300 i 400 nm, które nie występowało w świeżej oliwie z oliwek. W widmach synchronicznych fluorescencji również nastąpiło zmniejszenie intensywności pasm emisji tokoferoli i chlorofilu w stopniu zależnym od warunków przechowywania. Ponadto w widmach synchronicznych dla $\Delta\lambda=60$ nm, zaobserwowano pojawienie się nowego pasma fluorescencji

przy długości fali 316 nm, dla próbek wystawionych na działanie światła, niezależnie od rodzaju opakowania. W celu określenia zależności między widmami badanych olejów a parametrami określającymi jakość badanych próbek, przeprowadzono analizę regresji metodą PLS. Dla wszystkich otrzymanych modeli uzyskano znaczne korelacje między widmami fluorescencji a parametrami chemicznymi. Ponadto na podstawie chemometrycznej analizy parametrów analitycznych i widm synchronicznych fluorescencji wykazano zróżnicowany przebieg procesów utlenienia oliwy przechowywanej w różnych warunkach.

Poulli i współautorzy (2009) wykorzystali widma synchronicznej i całkowitej fluorescencji wraz z analizą głównych składowych (PCA) do kontroli stabilności oksydacyjnej różnych gatunków oliw z oliwek: extra virgin, virgin i z wytlóków. Badane oliwy z oliwek zostały poddane działaniu promieniowania UV oraz temperatury (80°C) przez okres 12 godzin. Zmiany zachodzące podczas przechowywania monitorowane były poprzez oznaczenie parametrów fizyko-chemicznych, tj. liczby nadtlenkowej i liczby anizydynowej. Parametry te wykorzystane zostały do korelacji z otrzymanymi widmami. Widma synchroniczne zostały zmierzone w zakresie 250-720 nm dla $\Delta\lambda$ od 20 do 120 nm. Analizując widma synchroniczne fluorescencji olejów Autorzy wykazali, że we wszystkich gatunkach oliwy z oliwek występują pasma w zakresie 550-700 nm pochodzące od emisji grup chlorofilowych. Pasma te były najbardziej intensywne dla oliw z oliwek extra virgin zaś najmniej intensywne dla oliw z wytlóków. W oliwach z oliwek extra virgin obserwowane było pasmo w zakresie 300-330 nm, którego intensywność malała wraz ze wzrostem czasu przechowywania. Pasma w zakresie 350-550 nm w odróżnieniu do poprzedniego, zwiększało intensywność podczas ogrzewania. Oliwy z oliwek (typu virgin) posiadały pasmo w rejonie 300-370 nm, którego intensywność malała podczas przechowywania i pasmo w przedziale 370-550 nm, którego intensywność wzrastała. Dla oliw z wytlóków obserwowano pasmo w zakresie 350-550 nm, które systematycznie malało, a po szóstej godzinie ogrzewania nastąpił niewielki wzrost intensywności. Otrzymane widma całkowitej fluorescencji dostarczyły również informacje na temat zmian wywołanych procesami oksydacyjnymi w oliwach. Zastosowana analiza głównych składowych, PCA, umożliwiła nie tylko rozróżnienie poszczególnych gatunków oliw, ale również pozwoliła na przypisanie próbkom odpowiednich czasów przechowywania.

Wpływ wysokiej temperatury na jakość oliwy z oliwek była przedmiotem badań Teny i współautorów (2009). Próbkę tłuszczów ogrzewane były w temperaturze 190°C przez 94 godziny (po osiem godzin dziennie). W widmach synchronicznych fluorescencji w zakresie 390-630 nm zaobserwowano iż intensywność pasma w przedziale 290-400 nm ulega stopniowemu zmniejszeniu podczas ogrzewania. Ponadto pasmo z maksimum w zakresie 350-360 nm uległo

przesunięciu do około 420-440 nm. Zmiany w widmach, jak wykazali Autorzy, spowodowane były rozkładem tokoferoli i fenoli oraz tworzeniem wtórnych produktów utlenienia.

Procesy termooksydacyjne zachodzące w olejach roślinnych podczas smażenia wywołują szereg zmian w ich składzie chemicznym co wpływa na jakość oleju i produktów na nim smażonych (Matthäus 2006). Trwałość oliwy z oliwek wykorzystanej do smażenia w temperaturze 190°C badali Tena, Aparicio i Garcia-Gonzalez (2012). Zmiany zachodzące w tłuszczu kontrolowano przy pomocy widm wzbudzenia-emisji wykonanych w zakresach: $\lambda_{wzb} = 250\text{--}298$ nm i $\lambda_{em} = 300\text{--}700$ nm. Ponadto przeprowadzono analizę tych widm metodą równoległej analizy czynnikowej (PARAFAC). Metoda ta umożliwiła analizę ukrytej struktury widma, która pozwoliła określić profile wzbudzenia i emisji dla poszczególnych składników oraz ich względny udział. Optymalny model uzyskano dla trzech czynników. We wszystkich modelach widoczne było pasmo przy długości fali 675 nm pochodzące od emisji chlorofilu. Pierwszy składnik charakteryzował się pasmem emisji z maksimum przy około 525 nm przypisanym produktom utlenienia. Pasma to było nieobecne w emisji drugiego składnika zaś w emisji trzeciego, jego intensywność była niższa. Emisja drugiego składnika charakteryzowała się długofalowym pasmem w zakresie 650-700 nm, które odpowiadało emisji chlorofilu. W składniku trzecim pojawiło się charakterystyczne pasmo z maksimum przy długości fali 350 nm, które było nieobecne w pozostałych dwóch składnikach, a które przypisuje się emisji tokoferolu i związkom fenolowym. Porównanie widm emisyjnych odpowiednich związków wraz z profilami emisji pozwoliło na rozdzielenie emisji tych związków, a następnie na ich porównanie z wynikiem przeprowadzonej analizy chemicznej składu oleju.

Na podstawie przeglądu bibliograficznego można stwierdzić, że metody spektroskopowe mogą zostać wykorzystane do kontroli zmian właściwości olejów roślinnych w wyniku utleniania. Zmiany intensywności w poszczególnych pasmach charakterystycznych dla odpowiednich związków, oraz pojawianie się nowych pasm stanowi wskaźnik przemian zachodzących w produkcie. Zmiany te, jak wynika z literatury, skorelowane są ilościowo z parametrami analitycznymi opisującymi jakość olejów. Chemometryczna analiza widm spektroskopowych ujawniła różny przebieg utlenienia olejów w zależności od rodzaju opakowania i warunków przechowywania.

2.3.3. Potwierdzenie autentyczności i wykrywanie zafalszowań olejów roślinnych

Problem zafalszowań olejów roślinnych

Zgodnie z ustawodawstwem polskim (Dz. U. z 2006 r.) za zafalszowany środek spożywczy uważa się taki, którego skład lub inne właściwości zmieniono, a o których konsument nie został poinformowany. Termin ten określa również te środki spożywcze, w których wprowadzone zmiany mają na celu ukrycie rzeczywistego składu lub innych właściwości.

Zafalszowaniu może podlegać większość produktów spożywczych, w tym napoje alkoholowe, soki owocowe i ich koncentraty, produkty mięsne i mleczarskie, tłuszcze, oleje roślinne i wiele innych. Najczęstszą przyczyną fałszerstw jest chęć zysku, wzrost konkurencyjności cenowej danego produktu, a także chęć ukrycia niedostatecznej jakości czy błędów w trakcie procesu technologicznego (Targoński 2005). Obecnie jakość artykułów spożywczych kontrolują służby nadzoru sanitarnego i instytucje naukowo-badawcze (Sawicki 2009). W Polsce takim organem jest Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych, utworzona na mocy ustawy z dnia 21 grudnia 2000 roku (Dz.U. z 2001 r.) a funkcjonująca od 1 stycznia 2003 roku. Z nieuczciwymi producentami walczą także Państwowa Inspekcja Sanitarna, Inspekcja Handlowa, Sanepid oraz Urząd Ochrony Konkurencji i Konsumentów.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost spożycia olejów jadalnych tłoczonych na zimno. Przyczynia się do tego pogląd, że oleje te są uważane za bardziej „naturalne” niż te poddane procesom przetwórczym takim jak: ekstrakcja rozpuszczalnikiem, bielenie, neutralizacja, dezodoryzacja i rafinacja. Przeważnie wydajność procesu tłoczenia oleju jest mniejsza niż podczas produkcji olejów rafinowanych, a ponadto wymagania surowcowe są wyższe, aby zapewnić im odpowiednią trwałość. Stąd i wyższa cena takich olejów. Produkty te stały się, więc celem dla nieuczciwych przedsiębiorców, którzy mieszają je z tańszymi olejami aby uzyskać korzyści ekonomiczne (Obiedzińska i Waszkiewicz-Robak 2012).

Szczególne miejsce wśród olejów roślinnych w Europie zajmuje oliwa z oliwek extra virgin. Posiada ona najwyższą jakość spośród olejów produkowanych z owoców oliwek, jest również najdroższa i często fałszowana. Przedmiot zafalszowań stanowią również oliwy uzyskiwane z wybranych odmian oliwek lub produkowane w wybranych regionach, objęte „chronioną nazwą pochodzenia” (ang. *Protected Designation of Origin*, PDO). W stosunku do różnych rodzajów oliwy ustanowiono w Unii Europejskiej bardzo dokładne specyfikacje jakościowe w rozporządzeniu Komisji EWG 2568/91 z 11 lipca 1991 roku, zmienione

rozporządzeniem 1989/2003, w celu zabezpieczenia produkcji oliwy wysokiej jakości, zapobiegania jej podrabianiu niższymi jakościowo gatunkami i ochrony producentów oliwy w krajach członkowskich wspólnoty (Włochy, Hiszpania, Portugalia, Francja i Grecja). Według Obiedzińskiej i Waszkiewicz-Robak (2012) podobne rozwiązania powinny dotyczyć olejów tłoczonych na zimno, w celu zapewnienia konsumenta o ich pochodzeniu, składzie i zgodności z deklaracjami prozdrowotnymi.

W przypadku olejów jadalnych i tłuszczów mamy zazwyczaj do czynienia przede wszystkim z dwoma rodzajami zafałszowań:

- zafałszowanie ekonomiczne (związane z dodatkiem tańszego oleju do produktu wysokiej wartości),
- podrabianie miejsca geograficznego pochodzenia produktu.

Tradycyjne metody oceny jakości i autentyczności olejów roślinnych polegają na określeniu wybranych właściwości fizycznych lub chemicznych i porównaniu uzyskanych wartości z oficjalnie ustalonymi limitami. Metody te jednak nie umożliwiają wykrycia wszystkich rodzajów zafałszowań. Z tego względu opracowanie metod wykrywania zafałszowań i oceny autentyczności tłuszczów roślinnych jest przedmiotem intensywnych badań. Stosuje się w tym celu m.in. metody chemiczne i instrumentalne (Arvanitoyannis i Vlachos 2007). Do instrumentalnych metod wykrywania zafałszowań wykorzystuje się techniki chromatograficzne (Aparicio i Aparicio-Ruiz 2000; Lerma-Garcia i in. 2011b; Bosque-Sendra i in. 2012), spektrometryczne MS (Catharino i in. 2005; Lay i in. 2006; Lerma-Garcia i in. 2008) oraz spektroskopowe: NMR (Vigli i in. 2003; Garcia-Gonzalez i in. 2004; Dais i Spyros 2007), NIR (Hourant i in. 2000; Ozdemir i in. 2007; Ozturk i in. 2010), IR (Ozen i Mauer 2002; Alam i Hamid 2007; Manaf i in. 2007), UV-Vis (Torrecilla i in. 2010; Downey, McIntyre i Davier 2002) oraz fluorescencję (Kyriakidis i Skarlis 2000; Guimet i in. 2004a; Sikorska 2012). Metody spektroskopowe z powodzeniem wykorzystywane są m.in. do określania geograficznego pochodzenia oliw, identyfikacji botanicznego pochodzenia olejów i wykrywania zafałszowań (Rabiei i Enferadi 2012).

Spektroskopia oscylacyjna

Tay i in. (2002) udowodnili, że widma olejów w zakresie MIR, zmierzone używając techniki ATR mogą być stosowane w badaniu autentyczności oliwy z oliwek. Autorzy przeprowadzili eksperyment mający na celu wykrycie dodatku oleju słonecznikowego w oliwie extra virgin.

W obszarze daktyloskopowym widoczne były różnice między badanymi próbkami, objawiające się różną intensywnością i kształtem pasm. Do klasyfikacji wykorzystano analizę dyskryminacyjną (DA) dla regionu 3100–2800 cm^{-1} oraz 1800–900 cm^{-1} . Wykorzystując otrzymany model sklasyfikowano próbki ze 100% dokładnością. Ponadto możliwe było wykrycie zafałszowania już na poziomie 20 ml/dm^3 . Do analizy regresji zastosowano metodę PLS, dla której uzyskano dobrą korelację widm i składu mieszanin olejów o czym świadczyła wartość parametru $R^2 = 0,996$.

Dodatek oleju słonecznikowego, sojowego, sezamowego i kukurydzianego do oliwy extra virgin był przedmiotem badań Vlachos i in. (2006). Analizując widma MIR olejów w zakresie 4000-400 cm^{-1} stwierdzono, że przesunięte pasmo przy liczbie falowej 3009 cm^{-1} pochodzące od drgań rozciągających wiązania C-H alkenów, świadczy o zafałszowaniu oliwy, dla której pasmo to pojawia się przy liczbie falowej 3006 cm^{-1} . Różnice w widmach spowodowane są wyższą zawartością kwasu oleinowego w oliwie z oliwek. Limity detekcji dla mieszanin oliwy z olejem kukurydzianym lub sezamowym wyniosły 9%, zaś dla mieszanin oliwy z olejem słonecznikowym i sojowym 6%.

Gurdeniz i Ozen (2009) wykorzystali spektroskopię absorpcyjną w zakresie MIR do wykrywania i przewidywania zawartości dodatku fałszującego w oliwie z oliwek. Do wstępnej analizy widm zastosowano metodę PCA. Analizę klasyfikacyjną przeprowadzono z zastosowaniem metod: SIMCA i PLS-DA. Uzyskano 5% limity detekcji dla oliw z dodatkiem oleju bawełnianego lub rzepakowego lub kukurydziano-słonecznikowego. Analizę regresji PLS przeprowadzono dla widm podstawowej podczerwieni i dla stężeń próbek w zakresie 2-20% v/v. Zawartość dodatku fałszującego w badanych mieszaninach oznaczono z błędami 1,04, 1,32 i 1,4 % odpowiednio dla oliwy z olejem: kukurydziano-słonecznikowym, bawełnianym i rzepakowym. Ponadto stosując metodę PLS-DA wykazano możliwość wykrywania zafałszowania niezależnie od rodzaju dodanego oleju z limitem detekcji wynoszącym 10%.

Oleje: rzepakowy, z orzecha laskowego, słonecznikowy o wysokiej zawartości kwasu oleinowego, słonecznikowy o wysokiej zawartości kwasu linolenowego i oliwa z wycisków posłużyły do zafałszowania oliwy extra virgin (Maggio i in. 2010). Mieszaniny olejów przygotowano w stężeniach: 40, 30, 20, 10 i 5% (v/v) oleju fałszującego. Dla analizowanych modeli PLS otrzymano dobrą korelację widm w zakresie MIR i składu mieszanin. Wartość parametru R^2 wynosiła 0,94, 0,99, 0,93, 0,97 i 0,96 odpowiednio dla mieszaniny oliwy extra virgin z olejem słonecznikowym o wysokiej zawartości kwasu oleinowego, z rzepakowym, z orzechów laskowych, z wycisków i ze słonecznikowym zawierającym wysoką zawartość kwasu linolenowego. Względny błąd przewidywania (ang. relative error of prediction) mieścił

się w przedziale 1,13-20,8 % i był najniższy dla mieszaniny oliwy extra virgin z olejem rzepakowym a najwyższy dla mieszaniny z olejem słonecznikowym o wysokiej zawartości kwasu oleinowego.

Lerma Garcia i in. (2010) wykorzystali widma MIR wraz z chemometryczną analizą do badania autentyczności oliwy z oliwek oraz do klasyfikacji olejów ze względu na ich gatunek. Do badań wykorzystano oliwę z oliwek extra virgin, olej słonecznikowy, kukurydziany, sojowy i z orzecha laskowego. Do klasyfikacji badanych próbek Autorzy wykorzystali metodę LDA. Analizę ilościową przeprowadzono przy zastosowaniu metody regresji MLR. Dla wszystkich otrzymanych modeli uzyskano 2% limity detekcji.

Oliwa z oliwek bywa fałszowana poprzez dodatek oleju palmowego (Rohman i Che Man 2010). Mieszaniny przygotowano w stężeniu 1-50% (v/v) a następnie zmierzono widma w zakresie 4000-650 cm^{-1} . Niewielkie różnice w kształcie pasma zauważono przy liczbie falowej 1402 cm^{-1} pochodzącego od drgań zginających =C-H oraz w paśmie przy liczbie falowej 1030 cm^{-1} pochodzącego od drgań rozciągających C-O. Obszar daktyloskopowy 1500-1000 cm^{-1} posłużył do analizy chemometrycznej z wykorzystaniem metod PLS, PCR i DA. Metody regresji posłużyły do określenia zawartości dodatku fałszującego w oryginalnej oliwie. Otrzymane modele charakteryzowały się wysoką wartością parametru R^2 i niskim błędem RMSECV. Na podstawie metody klasyfikacyjnej pogrupowano bezbłędnie próbki na oliwy zafałszowane i nie oryginalne.

Zafałszowanie olejów roślinnych tańszymi olejami badali Rohman i in. (2011a), którzy wykorzystując widma MIR i metody analizy dyskryminacyjnej (DA) oraz regresji PLS udowodnili, że spektroskopia w zakresie MIR może służyć do oceny jakości oleju kokosowego typu virgin i wykrywania zafałszowania innymi olejami. Do badań Autorzy wykorzystali olej kokosowy, słonecznikowy i kukurydziany. Widma zostały wykonane w zakresie 4000–650 cm^{-1} . Najistotniejsze różnice pomiędzy widmami badanych olejów widoczne były dla regionu 3008 cm^{-1} oraz w obszarze tzw. „odcisku palca” (1500–650 cm^{-1}). Przy liczbie falowej 3008 cm^{-1} tylko w oleju kokosowym nie było widoczne pasmo. Ponadto w przedziale 1120-1098 cm^{-1} olej kokosowy posiadał tylko jedno maksimum zaś olej słonecznikowy i kukurydziany aż dwa. Różnice te posłużyły do wykrywania zafałszowań i klasyfikacji wykorzystując przy tym analizę dyskryminacyjną (DA), dla której uzyskano niski błąd klasyfikacji, co oznaczało, że wszystkie próbki zostały prawidłowo przypisane do odpowiednich grup. Stosując analizę PLS uzyskano dobrą korelację widm i składu mieszanin olejów.

Rohman i in. (2011b) wykorzystali spektroskopię w zakresie MIR w połączeniu z kalibracją wielowymiarową do analizy dwuskładnikowej mieszaniny tranu i oleju

kukurydzianego. Widma olejów: tranu i kukurydzianego oraz ich mieszanin wykonano w zakresie 4000–650 cm^{-1} używając techniki HATR. Analiza regionu daktyloskopowego pozwoliła Autorom stwierdzić, że olej z wątroby dorsza posiada pasmo przy liczbie falowej 1397 cm^{-1} wywołane drganiami rozciągającymi wiązania C-O. W związku z tym wybrano do analizy ilościowej zakres 1480-1375 cm^{-1} . Do analizy chemometrycznej zastosowano metodę PLS oraz PCR. Dla obu analizowanych modeli (PLS i PCR) uzyskano dobrą korelację wybranego zakresu (1480-1375 cm^{-1}) i składu mieszanin, o czym świadczyła wartość R^2 bliska 1 i niski błąd RMSECV.

Chemometryczną analizę widm podstawowej podczerwieni zastosowali w swojej pracy Rohman i Che Man (2012b), którzy analizowali dodatek oleju z otrąb ryżowych do oliwy z oliwek typu extra virgin. Otrzymane widma olejów były zbliżone kształtem, jednak przy liczbach falowych 3007 cm^{-1} i 1117 cm^{-1} zaobserwowano różnice w położeniu pasm, które wykorzystano do dalszych badań. Do analizy wstępnej wykorzystano metodę PCA. Dwie pierwsze główne składowe opisały 88% zmienności macierzy kalibracyjnej, z czego pierwsza główna składowa (PC1) opisywała 72% zmienności a druga (PC2) 16%. Klasyfikacji dokonano stosując analizę dyskryminacyjną (DA) dla zakresów 1200-900 cm^{-1} i 3020-3000 cm^{-1} . Na podstawie otrzymanych modeli pogrupowano oliwę na: oryginalną i poddaną fałszerstwu, ze 100% poprawnością. Do ilościowego przewidywania dodatku fałszującego wykorzystano analizy regresji: PLS i PCR. Dla analizy cząstkowych najmniejszych kwadratów wartość parametru R^2 wynosiła 0,993, zaś dla analizy regresji głównych składowych wartość ta była równa 0,999. Błędy RMSEP i RMSEC były wyższe dla analizy PLS i wynosiły odpowiednio 1,34% i 2,15%. Dla analizy PCR błędy te wynosiły 0,38% dla RMSEP i 1,8% dla RMSEC.

Ocena autentyczności oliwy z oliwek extra virgin była przedmiotem zainteresowań Poiana i współautorów (2012). Do badań przygotowano mieszaniny oliwy z olejem słonecznikowym w proporcjach od 5-50% (v/v). Następnie wykonano widma w zakresie 4000-500 cm^{-1} . Pasma przy liczbie falowej 3011 cm^{-1} pochodzące od drgań rozciągających C-H wykorzystano do korelacji między absorbancją przy danej liczbie falowej a procentowym dodatkiem oleju fałszującego, uzyskując wartość parametru R^2 na poziomie 0,95. Wraz ze wzrostem stężenia oleju słonecznikowego w oliwie, zaobserwowano wzrost absorbancji pasma przy liczbie falowej 1753 cm^{-1} . Autorzy stwierdzili iż pasma przy liczbach falowych 1303 cm^{-1} i 1270 cm^{-1} oraz w przedziałach 1100-1000 cm^{-1} i 900-800 cm^{-1} , również mogą być wykorzystywane do przewidywania stopnia zafałszowania.

Możliwość zastosowania spektroskopii MIR do wykrywania zafałszowań olejów roślinnych badali Zhang i współautorzy (2012). Oleje: kukurydziany, orzechowy, rzepakowy

i sojowy zostały zafałszowane poprzez dodatek zużytego oleju do smażenia. Analiza skupień została wykorzystana do klasyfikacji olejów ze względu na proporcje w jakich został dodany olej fałszujący. Następnie przeprowadzono analizę dyskryminacyjną, dla której uzyskano limity detekcji na poziomie 6,6%, 7,2%, 5,5% i 3,6%, odpowiednio dla oleju kukurydzianego, orzechowego, rzepakowego i sojowego.

De la Mata i współautorzy (2012) przeprowadzili eksperyment mający na celu zastosowanie spektroskopii w zakresie MIR do badania autentyczności oliwy z oliwek. Do analiz wykorzystano sto jedenaście próbek olejów zakupionych w Hiszpanii, Meksyku i Stanach Zjednoczonych oraz we Włoszech i Francji. Czterdzieści jeden próbek stanowiły oleje roślinne (rzepakowe, kukurydziane, lniane, z winogron, z orzecha, szafranowy, sezamowy, sojowy, słonecznikowy i wysokooleinowy olej słonecznikowy) pozostałe siedemdziesiąt oliwy z oliwek (extra virgin, z wytlóków i rafinowane). Widma olejów wykonano w technice ATR dla zakresu 3800-600 cm^{-1} . Do analizy chemometrycznej wykorzystano region 3588-650 cm^{-1} z pominięciem zakresu od 1870 do 2350 cm^{-1} ze względu na brak charakterystycznych pasm w tym przedziale. Do analizy podobieństw i różnic między badanymi olejami wykorzystano hierarchiczną analizę skupień (HCA), której wyniki przedstawiono w postaci dendrogramu. Zaobserwowano wyraźny podział na trzy grupy: oleje szafranowe, oliwy i pozostałe oleje. W grupie oliw znalazły się jednak cztery próbki nie będące oliwą, były to dwa oleje orzechowe, jeden szafranowy i jeden słonecznikowy wysokooleinowy. Przyporządkowanie to, jak stwierdzili Autorzy, wynikało ze zbliżonych właściwości fizyko-chemicznych tych olejów do oliw z oliwek. Do wstępnej analizy wykorzystano metodę PCA. Dwie pierwsze główne składowe opisały 97,63% zmienności macierzy kalibracyjnej i umożliwiły efektywne pogrupowanie próbek w zależności od rodzaju oleju. Analizując otrzymany model zauważono, iż wszystkie oliwy z oliwek scharakteryzowane są przez ujemne wartości PC1, zaś pozostałe oleje przez dodatnie. Model klasyfikacyjny powstał z wykorzystaniem analizy PLS-DA. Do zestawu kalibracyjnego wykorzystano dziewięćdziesiąt cztery próbki, pozostałe siedemnaście posłużyło do walidacji modelu. Wszystkie próbki zostały poprawnie sklasyfikowane. Następnie Autorzy przygotowali mieszaniny oliw z oliwek z poszczególnymi olejami. Analiza eksploracyjna PCA pozwoliła na wykrycie struktury danych, w których trzy pierwsze główne składowe opisały 97,95% zmienności macierzy kalibracyjnej. Mieszaniny, które zawierały niskie zawartości oliwy scharakteryzowane były przez dodatnie wartości PC1. Ujemne wartości PC1 posiadały mieszaniny, w których zawartość oliw była wyższa niż 50%. Kolejnym krokiem było przeprowadzenie analizy klasyfikacyjnej z zastosowaniem analizy PLS-DA. Mieszaniny podzielono na dwie grupy: zawierające więcej i mniej niż 50% oliwy. Do kalibracji modelu

wykorzystano sześćdziesiąt pięć próbek, tylko jedna próbka została niepoprawnie sklasyfikowana. Ostatnim etapem badań była analiza regresji PLS, która posłużyła do ilościowej analizy mieszaniny olejów roślinnych na podstawie zmierzonych widm. W modelu dla stężenia oliwy powyżej 70% (v/v) uzyskano względnie wysoką wartość współczynnika korelacji (0,734), ale jednocześnie wysoką wartość błędu RMSECV wynoszącą 14,39%.

Spektroskopia w zakresie MIR wraz z chemometryczną analizą danych zastosowana została do wykrywania i ilościowego przewidywania dodatku fałszującego do oleju z awokado (Quiñones-Islas i in. 2013). Dodatkiem fałszującym były oleje rzepakowy, słonecznikowy i sojowy, które posłużyły do otrzymania mieszanin z olejem z awokado (2–50% v/v). Widma podczerwieni wykonano w zakresie 4000-550 cm^{-1} . Metoda SIMCA posłużyła do klasyfikacji olejów. Wszystkie badane próbki zostały poprawnie sklasyfikowane. Stosując analizę PLS wykazano możliwość wykrycia zafałszowania z limitem detekcji na poziomie 2%.

Olej kameliowy (Camellia oil) nazywany też olejem herbacianym, to produkt stosowany w kulturze azjatyckiej od wielu tysięcy lat. Ze względu na swoje właściwości stał się celem zafałszowań (Wang i in. 2006). Autorzy w swojej pracy wykonali widma w zakresie MIR i NIR. Do analizy wykorzystano region 1132-885 cm^{-1} dla MIR i 6200-5400 cm^{-1} dla NIR. Do wstępnej analizy widm zastosowano metodę PCA. Analizując otrzymane modele, zaobserwowano niewielkie różnice pomiędzy próbkami. Różnice te wynikały z większej zawartości kwasu oleinowego w oleju kameliowym oraz z większej zawartości kwasu linolenowego w oleju sojowym, który posłużył do fałszerstwa. Analizę klasyfikacyjną przeprowadzono z zastosowaniem metody SIMCA, uzyskując poprawą klasyfikację olejów. Do określenia zawartości oleju kameliowego w mieszaninach z olejem sojowym zastosowano analizę regresji PLS. Wartości parametru R^2 wynosiły odpowiednio 0,994 dla modelu otrzymanego dla widm w zakresie MIR oraz 0,992 dla modelu otrzymanego dla widm w zakresie NIR. Obliczono również błąd RMSECV, którego wartość wynosiła 0,85% dla MIR i 1,79% dla NIR.

Francuskie oliwy z oliwek extra virgin pochodzące z RDO (ang. Registered Destination Origin) badali Dupuy i in. (2010). Osiem gatunków oliw zbadano pod kątem pochodzenia geograficznego, wykorzystując do tego spektroskopię w NIR i MIR. Widma NIR wykonano dla zakresu 4500-1000 cm^{-1} a widma MIR wykorzystując technikę ATR dla 4000-600 cm^{-1} . W analizie widm w zakresie MIR wykluczono rejon 2650-1900 cm^{-1} . Zawartość kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli, została wyznaczona z wykorzystaniem metod chromatograficznych (GC i HPLC), a następnie skorelowana z widmami w zakresie NIR i MIR. Model kalibracyjny zawierał dwieście siedemdziesiąt pięć próbek a model przewidywania sto trzydzieści siedem. Otrzymany model dla widm w zakresie MIR, zarówno dla kwasów

tłuszczowych jak i triacylogliceroli, charakteryzował się niższymi wartościami SEP (ang. Standard Error of Prediction) niż model otrzymany dla widm w zakresie NIR. Następnie przeprowadzono analizę PLS-DA, która posłużyła do klasyfikacji oliw ze względu na pochodzenie geograficzne. Jak wynikało z badań model otrzymany dla zakresu MIR lepiej sklasyfikował próbki niż model dla zakresu NIR.

Galtier i in. (2007) zastosowali spektroskopię w zakresie NIR w badaniu autentyczności oliwy z oliwek. Sto dwadzieścia pięć próbek oliw, pochodzących z pięciu regionów geograficznych Francji, objęte było „chronioną nazwą pochodzenia”. Widma NIR wykonane dla zakresu 10000-4500 cm^{-1} były zbliżone kształtem dla wszystkich oliw. W celu zbadania korelacji między widmami w zakresie NIR a zawartością kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli wykorzystano analizę regresji PLS. Zawartość kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli wyznaczono metodą chromatografii. Najlepsze wyniki otrzymano dla danych z przedziału 7500-4500 cm^{-1} lub dla całego widma. Kolejnym etapem pracy było wykorzystanie analizy PCA, która dostarczyła informacje o grupowaniu próbek w zależności od pochodzenia geograficznego. Stosując metodę PLS-DA, przeprowadzono klasyfikację próbek. Wykorzystując do analizy całe widmo, prawidłowo sklasyfikowano oliwy ze względu na pochodzenie.

Widma w zakresie NIR pięciuset dwudziestu pięciu mieszanin oliwy extra virgin z olejami innych gatunków (sojowym, słonecznikowym, kukurydzianym, z orzechów włoskich lub laskowych) zmierzono w zakresie 1200-4000 cm^{-1} . Przed wykonaniem analiz chemometrycznych, widma poddane zostały korekcji MSC (ang. Multiplicative Signal Correction). Do pogrupowania próbek w zależności od gatunku zastosowano analizę PCA. Dla mieszanin opracowano pięć modeli regresji PLS, w zależności od użytego do fałszerstwa oleju. Dla otrzymanych modeli uzyskano limity detekcji na poziomie 0,57, 1,32, 0,96, 0,56 i 0,57% (v/v) odpowiednio dla oleju kukurydzianego, słonecznikowego, sojowego, z orzechów włoskich i laskowych. Dodatkowo na podstawie modelu PCA pogrupowano nieznanne mieszaniny oliwy z substancjami fałszującymi z prawie 100% zgodnością (Christy 2004).

Delgadillo i współautorzy (2012) udowodnili, że spektroskopia NIR w połączeniu z analizą chemometryczną: PCA i PLS1, może być wykorzystywana do wykrywania zafałszowań oliwy z oliwek oraz do przewidywania składu procentowego mieszanin olejów. Mieszaniny oliwy extra virgin z olejami: słonecznikowym, sojowym, kukurydzianym i oliwą rafinowaną, przygotowano przez dodanie od 5 do 95 ml oleju fałszującego. Następnie przygotowano po osiem próbek dla każdej mieszaniny, które posłużyły jako zestaw testowy. Widma zostały zmierzone w zakresie 10000-4500 cm^{-1} . Do analizy PCA wykorzystano widma po korekcji SNV (ang. Standard Normal Variate) z przedziału 6100-4500 cm^{-1} . Analiza PCA badanych próbek

ujawniła grupowanie wzdłuż osi PC1 w zależności od gatunku oleju znajdującego się w mieszaninie. Mieszaniny, które zawierały większe stężenia oliwy w składzie, scharakteryzowane były przez dodatnie wartości PC1 zaś pozostałe próbki przez ujemne. Na podstawie analizy wykresu ładunków dla PC1 stwierdzono, że pasma przy liczbie falowej 4596, 4668, 4704, 5880 i 6024 cm^{-1} są skorelowane z zawartością oliwy w mieszaninie. Do dalszej analizy zastosowano metodę regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS), dla której uzyskano limity detekcji na poziomie 2%.

Sztuczne sieci neuronowe i analiza regresji logistycznej w połączeniu z bliską podczerwienią zostały skutecznie wykorzystane do rozróżnienia oliw z oliwek typu virgin pochodzących z sąsiadujących ze sobą regionów Hiszpanii (Bertrand i in. 2000).

Zafałszowanie oliwy extra virgin oliwą z wytlóków było przedmiotem badań Yang-a i in. (2001). W tym celu Autorzy wykorzystali metody spektroskopowe: MIR, NIR i Ramana. Stężenie oliwy z wytlóków w mieszaninie z oliwą extra virgin wynosiło od 0% do 100% w przedziałach 5%. Do analizy chemometrycznej zastosowano metodę regresji PLS, dla której uzyskano dobrą korelację widm i składu mieszanin olejów o czym świadczyła wartość parametru R^2 modelu przewidywania wynosząca odpowiednio 0,990, 0,990 i 0,997 dla MIR, NIR i Ramana. Najniższy błąd przewidywania (SEP) wynosił 1,72% dla widm Raman, dla widm w zakresie MIR i NIR błąd ten przyjmował wartości 6,51% i 3,27%.

Klasyfikacją oliw z oliwek extra virgin, olejów roślinnych (kukurydzianych, orzechowych, rzepakowych, sojowych, szafranowych i kokosowych) i tłuszczów zwierzęcych (olej z wątroby dorsza, masło i smalec) zajęli się Yang, Irudayaraj i Paradkar (2005). Widma MIR olejów zostały wykonane w zakresie 4000-400 cm^{-1} stosując technikę ATR. Widma NIR wykonano dla zakresu 8000-800 cm^{-1} zaś dla spektroskopii Ramana z transformacją Fouriera w przedziale 3700-400 cm^{-1} . Wstępną analizę przeprowadzono przy zastosowaniu metody PCA. Do klasyfikacji wykorzystano dwie metody: LDA i CVA (ang. Canonical Variate Analysis). Najskuteczniejszą dokładność klasyfikacji we wszystkich metodach spektroskopowych otrzymano stosując analizę CVA. Dla widm MIR wynosiła ona 98%, dla Ramana 94% zaś dla NIR 93%.

Dwieście osiemdziesiąt mieszanin oliwy z oliwek z olejem kukurydzianym (n=70), sojowym (n=70), słonecznikowym (n=70) i z orzecha laskowego (n=70), zostało przygotowanych i zmierzonych w zakresie 12000-4550 cm^{-1} . Następnie przeprowadzono analizę klasyfikacyjną przy użyciu analizy PLS-DA oraz ilościowe oznaczenie składu mieszanin z wykorzystaniem metody PLS. Próbki olejów zostały poprawnie sklasyfikowane otrzymując

dokładność klasyfikacji na poziomie 96,7-100%. W analizie ilościowej średni błąd przewidywania wyniósł mniej niż 1,05% (Kasemsumran i in. 2005).

Analiza PLS i PCA w połączeniu ze spektroskopią w NIR, zostały wykorzystane m.in. do określenia zafałszowań oliwy z oliwek olejami kukurydzianym i słonecznikowym. Stopień zafałszowania został określony na podstawie analizy PLS pierwszej pochodnej widm w obszarze 1108-2200 nm. Prawidłowy wynik uzyskano dla 98% próbek, a prognozowanie rodzaju zafałszowań zostało wykonane z 75% zgodnością. Ten sam zespół badaczy, wykorzystał podobną procedurę do badania zafałszowań oliwy extra virgin olejem słonecznikowym, rzepakowym i sojowym. Wyniki tych badań dowodzą że w przedziale 5-100% zafałszowania uzyskano względne odchylenie standardowe wewnętrznej kalibracji krzyżowej równe 0,9% i względne odchylenie standardowe zewnętrznej kalibracji krzyżowej na poziomie 2,77% (Armenta i in. 2010).

Spektroskopię w zakresie NIR, MIR i UV-Vis do klasyfikacji olejów z pestek dyni, zastosowali Lankmayr i in. (2004). Celem badań była analiza widm różnych olejów z pestek dyni wraz z ich oceną sensoryczną i analizą chemometryczną. Autorzy przeprowadzili analizę klasyfikacyjną stosując metodę LDA dla najbardziej popularnych austriackich olejów z pestek dyni. Pomiarów wykonano w zakresach: 3074–1001 cm^{-1} dla MIR, 1001-3074 cm^{-1} dla NIR i 250-700 nm dla UV-Vis. Analizując widma MIR ustalono, że dla badanych olejów występuje ważny region w przedziale 2320-2390 cm^{-1} , w którym pasma dwóch dobrych jakościowo olejów różniły się od tych słabej jakości. Widma MIR olejów, które spełniały kryteria jakościowe charakteryzowały się wyższą intensywnością pasma przy liczbie falowej 2358 cm^{-1} niż przy liczbie falowej 2337 cm^{-1} . Podobną zależność zaobserwowano w widmie UV-Vis, gdzie intensywność pasma w zakresie 578-602 nm pozwoliła rozróżnić oleje lepszej jakości. Proporcje te były podstawą do klasyfikacji olejów. Analiza chemometryczna polegała na utworzeniu modelu, który pozwolił na pogrupowanie olejów na dwie lub trzy grupy w zależności od jakości sensorycznej ocenionej przez panel ekspertów. Opracowane modele pozwoliły przewidzieć kategorię dotychczas niesklasyfikowanych próbek oleju. Pierwszy model dotyczył podziału na dwie grupy, oleje zostawały przyjęte jako dopuszczalne lub niedopuszczalne. W modelu tym udało się poprawnie sklasyfikować wszystkie próbki na podstawie widm z zakresu UV-Vis i NIR. Dla widm z zakresu MIR stosując ten model sklasyfikowano poprawnie próbki w 98,8%. Drugi model dotyczył trzech kategorii: oleje spełniające wszystkie wymagania jakościowe, oleje dobre jakościowo i takie, które były nieakceptowalne. Na podstawie tego modelu, niezależnie od zastosowanej techniki pomiarowej, wszystkie próbki zostały poprawnie przydzielone do swojej klasy.

Analiza PLS-DA, FDA i kNN zostały wykorzystane do badania greckich oliw z oliwek. Widma olejów zostały wykonane w zakresie widzialnym (750-400 nm) i w bliskiej podczerwieni (2498-1100 nm). Do badań wykorzystano ponadto rejon 2498-400 nm, który był połączeniem zakresu Vis i NIR. Najlepsze rezultaty klasyfikacji otrzymano dla modelu przy wykorzystaniu analizy FDA dla „połączonych” widm, uzyskując przyporządkowanie próbek do odpowiednich grup na poziomie 93,9% (Downey, McIntyre i Davier 2002).

Oznaczanie absorbancji w nadfiolecie (w celu wyznaczenia parametrów K_{232} i K_{270}) jest jedną z podstawowych metod klasyfikacji i oceny jakości oliw z oliwek. Próbki oliw z oliwek typu: extra virgin, rafinowanych, z wytlóków z oliwek, oraz olejów roślinnych: sojowego, słonecznikowego i rzepakowego jak również sporządzone przy ich wykorzystaniu mieszaniny analizowano metodą spektrofotometrycznych pomiarów absorpcji w UV (Dankowska 2009b). Otrzymane widma różniły się między sobą w całym zakresie pomiarowym a w szczególności przy długościach fal 232 i 270 nm, co związane było ze zwiększoną zawartością skoniugowanych dienów i trienów.

Zastosowanie zakresu UV w przedziale 310-320 nm do analizy mieszanin oliwy z oliwą gorszej jakości pozwala na wykrycie dodatku oliwy rafinowanej do oliwy z oliwek extra virgin z pierwszego tłoczenia na poziomie 5%. Badanie widm absorpcji w rejonie 315 nm umożliwiło rozróżnienie oliwy ekstra virgin, rafinowanej oliwy z oliwek, oliwy z wytlóków i olejów z nasion (Dankowska, 2009b).

Spektrofluorymetria jest kolejną metodą wykorzystywaną do różnicowania olejów oraz do wykrywania ich ewentualnych zafałszowań.

Scott i in. (2003) wykorzystali widma całkowitej luminescencji czterech różnych gatunków olejów: oliwy z oliwek extra virgin, oliwy z oliwek, słonecznikowego i rzepakowego. Widma nierozcieńczonych olejów zmierzono w zakresie $\lambda_{wzb} = 400-720$ nm w 10 nm odstępach, zaś zakres emisji wynosił 400-720 nm w 5 nm odstępach. Do klasyfikacji olejów wykorzystano analizę sztucznych sieci neuronowych (ANN, ang. Adaptive Network Algorithms), na podstawie której sklasyfikowano próbki ze 100% zgodnością.

Zwiększenie selektywności metod fluorescencyjnych można uzyskać przez wykonanie synchronicznego pomiaru widm fluorescencji. Metoda ta została zastosowana w pracy Sikorskiej i in. (2003). Widma synchroniczne fluorescencji olejów: rzepakowego tłoczonego na zimno i rafinowanego, sojowego, kukurydzianego, lnianego i oliwy z oliwek, wykonano w zakresie 250-700 nm dla wartości $\Delta\lambda=10, 20, 30, 40, 50$ i 60 nm. Autorzy stwierdzili, że w pomiarach

synchronicznych fluorescencji kluczowym elementem jest wybór odpowiedniej różnicy między długościami fali emisji i wzbudzenia ($\Delta\lambda$), dla jakiej rejestrowane jest widmo.

W literaturze dotyczącej wykrywania zafałszowań olejów można spotkać się z zastosowaniem pomiaru całkowitej fluorescencji, polegającej na rejestracji widm emisyjnych przy różnych długościach fali promieniowania wzbudzającego. Guimet i współautorzy (2004b) zastosowali hierarchiczną analizę skupień (ang. Hierarchical Agglomerative Clustering) do analizy widm całkowitej fluorescencji hiszpańskich oliw z oliwek: virgin, rafinowanej i z wytlóków. Widma wykonano wykorzystując fluorescencję wzbudzenia-emisji w zakresie $\lambda_{\text{wzb}} = 300\text{--}400$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 400\text{--}600$ nm.

Widma całkowitej luminescencji i synchronicznej fluorescencji zostały wykorzystane w odniesieniu do olejów roślinnych różnego pochodzenia botanicznego (Sikorska 2005a). Do badań wykorzystano oleje: sojowy, słonecznikowy, rzepakowy, arachidowy, winogronowy, lniany, kukurydziany i oliwę z oliwek. W widmach całkowitej luminescencji olejów rozcieńczonych w n-heksanie zaobserwowano intensywne pasmo przy długości 290 nm dla wzbudzenia i 320 nm dla emisji, związane z występowaniem tokoferoli. Niektóre oleje charakteryzowały się występowaniem pasma przy $\lambda_{\text{wzb}} = 405$ nm i $\lambda_{\text{em}} = 670$ nm, które pochodziło od grup chlorofilowych. W zakresie pośrednim, dla niektórych olejów, ujawniały się pasma pochodzące od niezidentyfikowanych związków. Również w widmach synchronicznych fluorescencji zaobserwowano pasma pochodzące od chlorofili, tokoferoli i związków nieznanych. Pomiary widm synchronicznych wykonano dla wartości $\Delta\lambda = 10, 30$ i 60 nm w geometrii kąta prostego. Niezależnie od wartości parametru $\Delta\lambda$ zaobserwowano grupowanie olejów. Klasyfikacji olejów dokonano na podstawie analiz: k-najbliższych sąsiadów i liniowej analizy dyskryminacyjnej. Błąd klasyfikacji w metodzie kNN zależny był od wartości parametru k , dla k w zakresie 1-4 przyjmował niskie wartości, zaś dla wyższych wartości k , wzrastał. Metodę LDA zastosowano do analizy intensywności fluorescencji przy sześciu, wybranych na podstawie widm synchronicznych par, długości fali wzbudzenia i emisji. Dla wszystkich analizowanych modeli około 99% próbek zostało poprawnie sklasyfikowanych. Najmniejszy błąd klasyfikacji otrzymano dla widm zmierzonych dla $\Delta\lambda = 30$ nm. Autorzy na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzili, że nie tylko pomiar widm, ale również punktowy pomiar intensywności fluorescencji przy odpowiednich długościach fali umożliwia poprawną klasyfikację olejów.

Dupuy i in. (2005) wykazali, że na podstawie analizy widm synchronicznych fluorescencji możliwe jest odróżnienie oliw z oliwek o zarejestrowanych nazwach pochodzenia (RDO) produkowanych w pięciu różnych regionach Francji. Widma wykonano w zakresie 250-700 nm,

ze stałą różnicą między długością fali wzbudzenia i emisji, wynoszącą 30 nm. Analiza regresji PLS pozwoliła rozróżnić poszczególne gatunki oliw ze satysfakcjonującym wynikiem, zaś analiza współczynników regresji dostarczyła informacji o korelacji RDO ze składem olejów, który różnił się w zależności od pochodzenia oliwy.

Poulli, Mousdis i Georgiou (2007) zastosowali pomiar synchroniczny fluorescencji i metodę regresji PLS do określenia zawartości zafałszowań oliwy z oliwek z innymi gatunkami olejów roślinnych. Widma zostały wykonane w zakresie 720-250 nm dla $\Delta\lambda$ od 20 do 120 nm. Otrzymane limity detekcji dla oliwy z wyłocznym, oleju kukurydzianego, słonecznikowego, sojowego, rzepakowego oraz z orzecha włoskiego wynosiły odpowiednio: 2,6, 3,8, 4,3, 4,2, 3,6, i 13,8% (v/v). Poziom dodatku oleju roślinnego w oliwie z oliwek możliwy do zidentyfikowania tą metodą zależy m.in. od zastosowanej różnicy między długością fali wzbudzenia i emisji. W badaniach prowadzonych przez Poulli, Mousdis i Georgiou (2006), w przypadku zafałszowania oliwy olejem słonecznikowym stosując tę samą metodę, uzyskano limity detekcji na poziomie 3,6% lub 3,8%, przy pomiarach dla różnicy między długością fali wzbudzenia i emisji, wynoszącą odpowiednio 20 nm i 80 nm.

Analizę mieszanin oleju słonecznikowego i oliwy z oliwek extra virgin, przeprowadzono w celu określenia składu procentowego mieszaniny olejów roślinnych na podstawie zmierzonych widm synchronicznych fluorescencji (Sikorska 2007a). Widma synchroniczne fluorescencji zmierzono dla $\Delta\lambda = 10$ nm, w geometrii odbiciowej, dla nierozcieńczonych próbek oliwy i oleju słonecznikowego oraz dla mieszaniny oliwy z dodatkiem oleju w zakresie 10-90% (v/v). W widmach zaobserwowano iż pasmo przypisane emisji chlorofili wykazuje znacznie większą intensywność w widmach oliwy z oliwek. Pasma pochodzące od tokoferoli wykazują podobną intensywność w widmach obu olejów. Dla widm mieszanin olejów przeprowadzono analizę regresji PLS1. Pierwsza główna składowa (PC1) opisywała 87% całkowitej zmienności i była ujemnie skorelowana z pasmem emisji chlorofili i dodatnio skorelowana z pasmem emisji tokoferoli. Druga główna składowa (PC2) wyjaśniała 6% całkowitej zmienności i była dodatnio skorelowana z pasmem emisji w pośrednim zakresie 550-350 nm. PC3 i PC4 skorelowane były dodatnio z pasmem emisji tokoferoli. Analizując wykres ładunków stwierdzono, że różne emitujące składniki wpływają na rozpatrywany przez Autorów model. Przeprowadzono zatem analizy PLS, dla różnych zakresów spektralnych. Dla wszystkich otrzymanych modeli uzyskano dobrą korelację widm i składu mieszanin. Najlepsze wyniki uzyskano, analizując widma w całym zakresie lub uwzględniając jednocześnie zakresy emisji chlorofili i tokoferoli.

Zafałszowania oliwy extra virgin badały Dankowska i Małecka (2009a). Stosując pomiar fluorescencji z równoczesną analizą regresji liniowej i wielorakiej (MLR) udowodniły,

że fluorescencja może służyć do oceny jakości oliwy extra virgin i wykrywania zafałszowania innymi olejami. Widma synchroniczne zostały zmierzone w zakresie 700-240 nm dla $\Delta\lambda = 10, 30, 60$ i 80 nm. Wąskie pasmo przy około 300 nm dla $\Delta\lambda = 10$ nm związane było z występowaniem tokoferoli, natomiast długofalowe pasmo z maksimum przy 665 nm z emitowaniem związków chlorofilu. Analiza chemometryczna przeprowadzona została dla poszczególnych $\Delta\lambda$. Najniższe limity detekcji uzyskano dla wykrywania zafałszowań na podstawie widm synchronicznych fluorescencji $\Delta\lambda = 10$ i 30 nm, odpowiednio $8,9\%$ i $8,4$.

3. EKONOMICZNE I EKOLOGICZNE ASPEKTY ZASTOSOWAŃ METOD SPEKTROSKOPOWYCH W OCENIE JAKOŚCI

W XXI wieku poszukiwane są nowe metody analityczne, pozwalające na tańsze i szybsze pomiary, dające się zautomatyzować oraz spełniające kryteria bezpieczeństwa dla analityka i środowiska naturalnego. Metodami spełniającymi powyższe kryteria są techniki spektroskopowe, przynoszące pozytywne efekty ekonomiczne i ekologiczne. Metody te mogą być wykorzystywane na każdym etapie produkcji: od identyfikacji i kontroli jakości surowców, przez kontrolę procesu aż do badania jakości wyrobu gotowego.

Wdrażając metody spektroskopowe jako nowe technologie trzeba mieć na uwadze ich wady i zalety. Przeprowadzona analiza zalet i wad obrazuje korzyści i obawy płynące z zastosowania metod spektroskopowych, tabela 3.

Tabela 3. Analiza korzyści i zagrożeń zastosowania technik spektroskopowych w kontroli jakości

<p>Mocne strony:</p> <ul style="list-style-type: none"> - szeroki zakres zastosowań - szybkość wykonywania oznaczeń - niski koszt wykonania oznaczeń - redukcja ilości szkodliwych odczynników i rozpuszczalników analitycznych - brak kosztów związanych z utylizacją odczynników - ograniczenie powierzchni magazynowej - eliminacja kosztów związanych z wyprodukowaniem serii o nieodpowiedniej jakości - nieniszczący charakter - możliwość oznaczenia kilku parametrów w jednym cyklu - bezpośredni pomiar bez konieczności przygotowania próbek - możliwość analizy <i>in situ</i> (eliminacja kosztów transportu i przechowywania) - miniaturyzacja aparatury umożliwiająca zastosowanie w terenie. 	<p>Słabe strony:</p> <ul style="list-style-type: none"> - znaczna początkowa inwestycja kapitałowa - czas wdrożenia metody (budowa biblioteki widm, opracowanie metody, a następnie jej walidacja i rejestracja) - brak kompatybilności między dostawcami aparatury pomiarowej - brak osób z doświadczeniem w zakresie stosowania spektroskopii i metod chemometrycznych - stosunkowo krótki okres gwarancyjny - koszty serwisu - brak normalizacji metod - problemy związane z transferem modeli kalibracyjnych
<p>Szanse:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pełna kompatybilność między dostawcami - dostępność bibliotek widm i opracowanych modeli kalibracyjnych - poszerzenie zakresu zastosowań - normalizacja metod 	<p>Zagrożenia:</p> <ul style="list-style-type: none"> - zgłoszenie upadłości przez dostawcę aparatury - brak serwisowania starszych modeli aparatury - brak wykwalifikowanego serwisu

Opracowanie własne

Z przeprowadzonej analizy wynika, że wdrożenie nowych technologii w postaci metod spektroskopowych przynosi więcej korzyści niż zagrożeń. Dlatego też metody te są coraz częściej wykorzystywane w różnych dziedzinach nauki i przemysłu. Techniki spektroskopowe mogą być wykorzystywane jako szybkie i nieinwazyjne metody pozwalające na oznaczenie kilku parametrów w jednym cyklu produkcyjnym. Miniaturyzacja sprzętu pozwala na przeprowadzenie analizy w miejscu występowania próbki (analiza *in situ*) co eliminuje koszty związane z koniecznością jej transportu i przechowywania. Bezpośrednie wykonanie pomiaru na próbce ogranicza koszty związane z zakupem odczynników oraz ich utylizacją, dlatego metody spektroskopowe spełniają wymagania stawiane metodom analitycznym w myśl koncepcji „zielonej chemii” przyjaznej środowisku (Keith, Gron i Young 2007).

Dzięki swoim zaletom metody spektroskopowe wraz z chemometryczną analizą danych wykorzystuje się w analizie procesu. Wprowadzona przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków koncepcja PAT (Process Analytical Technology) pozwala na zrozumienie i kontrolowanie całego procesu wytwarzania. Zgodnie z tym założeniem, metody spektroskopowe mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym w następujących obszarach/sektorach (Reh 2008):

- w kontroli surowców,
- na etapie procesu produkcyjnego w trybie *on-line* (bezpośrednio z linii produkcyjnej) lub *off-line* (poza linią produkcyjną),
- w laboratorium analitycznym do badania produktów pośrednich lub końcowych,
- do badania wyrobu końcowego i jego przechowywania.

Wprowadzenie technik spektroskopowych na wymienionych obszarach przemysłu spożywczego może przynieść wymierne korzyści w postaci (Reh 2008):

- poprawy jakości produktów,
- skrócenia czasu pomiędzy cyklami produkcyjnymi,
- ograniczenia ilości odpadów,
- zwiększenia zdolności produkcyjnej,
- lepszego wykorzystania energii i zasobów,
- skrócenia czasu przechowywania surowców i wyrobów gotowych.

Metody spektroskopowe po raz pierwszy zostały wykorzystane w przemyśle spożywczym w drugiej połowie XX wieku. Tradycyjną metodę Kjeldahla, wykorzystywaną do oznaczania białka w pszenicy, zastąpiono spektroskopią w zakresie bliskiej podczerwieni. W 1995 roku

oszacowano, że metoda ta pozwoliła zaoszczędzić 2 500 000\$ oraz pozwoliła na uniknięcie wytworzenia 47 ton odpadów rocznie (Stark 1996).

O dużym potencjale bliskiej podczerwieni do oznaczania białek, wilgoci i zawartości oleju w nasionach roślin oleistych pisali von Rosenberg i in. (2000). Autorzy opracowali prototyp spektrofotometru do bliskiej podczerwieni, który okazał się szybkim narzędziem kontroli jakości podczas zbioru, co pozwoliło rolnikom na znaczną oszczędność czasu. Obecnie spektroskopia w zakresie NIR dzięki szybkiej i nieinwazyjnej analizie, wykorzystywana jest w analizie *in situ* do badania owoców i warzyw podczas ich wzrostu i w trakcie zbiorów (Blanco i Villarroya 2002).

Spektroskopia (NIR) znalazła swoje zastosowanie również w przemyśle paliwowym, gdzie wykorzystywana jest m.in. do sterowania procesami w rafineriach. Zastosowanie spektroskopii w zakresie bliskiej podczerwieni pozwoliło zwiększyć rentowność przedsiębiorstwa i zminimalizować produkcję odpadów (Buttner 1997). Kowalyk (www.provan.ca) wymienia wymierne korzyści ekonomiczne płynące z wprowadzenia metod spektroskopowych (NIR) w przemyśle paliwowym. Zastosowanie widm w zakresie NIR pozwoliło rafinerii na bezpośrednią analizę w miejscu wydobycia, oszczędzając 150 000\$ miesięcznie.

O pozytywnych aspektach wprowadzenia metod spektroskopowych (NIR i NMR) w kontroli procesów w Dow Chemical w 1998 pisała Seasholtz (1999). Według Autorki zastosowanie metod spektroskopowych wraz z chemometryczną analizą danych przyczyniło się do sporych oszczędności przedsiębiorstwa. Korzyści ekonomiczne związane były z lepszą kontrolą przebiegu procesu, oszczędnością czasu podczas kontroli jakości surowców, osiągnięciem wyższych stóp produkcyjnych oraz z szybszą analizą produkowanych zanieczyszczeń. Według Cogdilla i in. (2007) wprowadzenie koncepcji PAT oraz *lean manufacturing* w fabryce farmaceutycznej średnich rozmiarów pozwoliło zwiększyć jej dochody o około 6%.

Dzięki swoim zaletom metody spektroskopowe mogą stanowić atrakcyjną metodę rutynowej kontroli produktów i procesów, przynosząc wiele wymiernych ekonomicznych i ekologicznych korzyści w różnych gałęziach przemysłu.

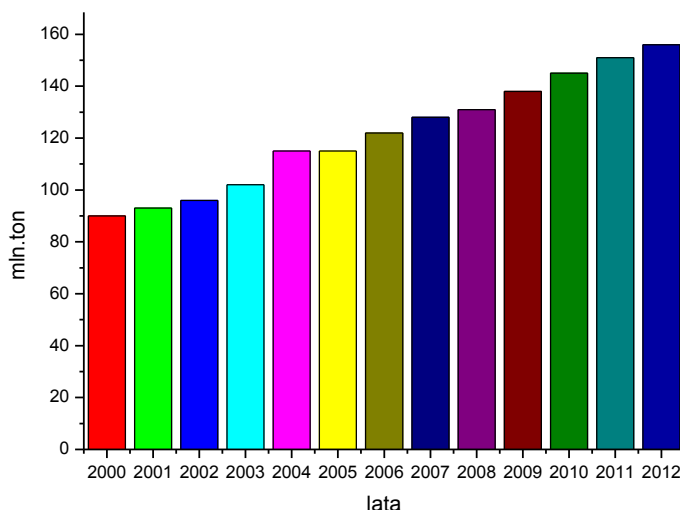
4. RYNEK OLEJÓW ROŚLINNYCH

Na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku motorem napędowym rozwoju produkcji olejów roślinnych był popyt ze strony państw rozwiniętych, głównie Unii Europejskiej, Stanów Zjednoczonych oraz Japonii. Przełom XX i XXI wieku, to silny wzrost popytu ze strony państw rozwijających się, a w szczególności Chin i Indii (Boczar, tom IX).

Według statystyk FAO rynek roślin oleistych obejmuje ponad 20 gatunków roślin. Ten globalny rynek zdominowany został przez cztery rośliny: soję, palmę oleistą, rzepak i słonecznik. Grupa tych czterech roślin określana jest mianem wielkiej czwórki i jest ona odpowiedzialna w głównej mierze za wzrost produkcji i obrotów olejami roślinnymi na światowym rynku (Boczar, tom IX).

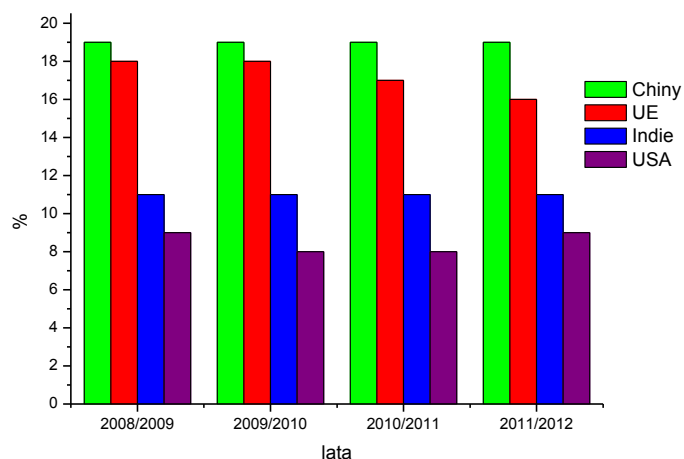
Wzrost popytu na oleje roślinne przyczynił się do dynamicznego rozwoju handlu zarówno w krajach rozwijających się, jak i rozwiniętych. Handel tymi produktami stał się drugą grupą po zbożach, pod względem wartości handlu, ze średnioroczną wartością równą 51 mld USD za lata 1995-2000 (www.faostat.fao.org).

Konsumpcja olejów roślinnych w ostatnich 12 latach wzrosła z 88,942 mln ton w 2000 roku do 155,95 mln ton w 2012, rysunek 6 (fas.usda.gov).



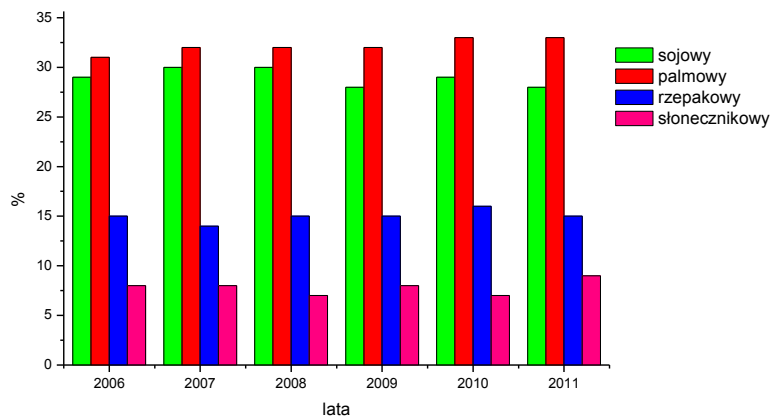
Rysunek 6. Konsumpcja olejów roślinnych (kokosowego, bawełnianego, oliwy z oliwek, palmowego, arachidowego, rzepakowego, sojowego i słonecznikowego) w latach 2000-2012
Opracowanie własne na podstawie <http://www.fas.usda.gov> i Wójcicki (2012)

Największy udział w globalnym spożyciu olejów roślinnych w latach 2008-2012 mają Chiny, Unia Europejska, Indie oraz Stany Zjednoczone, rysunek 7.



Rysunek 7. Procentowy udział w globalnym spożyciu olejów (kokosowego, bawełnianego, oliwy z oliwek, palmowego, arachidowego, rzepakowego, sojowego i słonecznikowego) w 2011 roku
Opracowanie własne na podstawie (FAO/FAPRI/USDA 2011).

Najwięcej na świecie konsumuje się oleju palmowego (33% udziału w rynku), sojowego (28%), rzepakowego (15%) oraz słonecznikowego (9%). Charakterystykę konsumpcji „wielkiej czwórki” w latach 2006-2011 przedstawiono na rysunku 8.

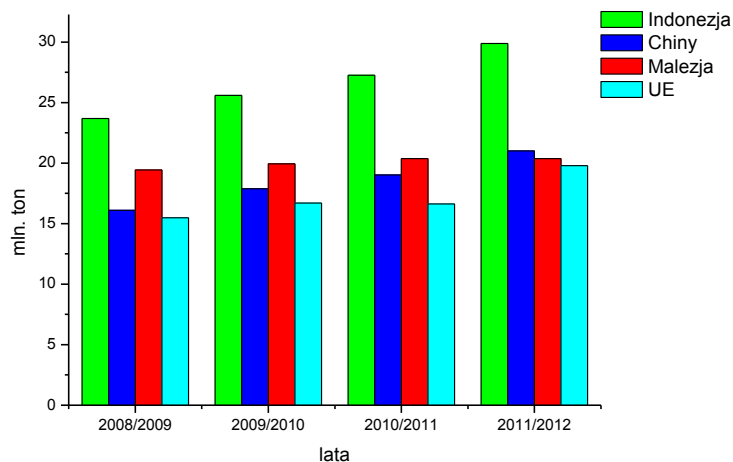


Rysunek 8. Konsumpcja „wielkiej czwórki” w latach 2006-2011

Opracowanie własne na podstawie <http://www.soystats.com> i Wójcicki (2012)

Na przełomie lat 2011/2012 zostało wyprodukowanych ok. 51 mln ton oleju palmowego, czyli o 6% więcej, niż w poprzednim sezonie (2010/2011), 43 mln ton oleju sojowego (+2%), 24 mln ton oleju rzepakowego (+3%) oraz 16 mln ton oleju słonecznikowego (+23%). Kolejne miejsca pod względem wielkości produkcji zajmują: olej bawełniany, arachidowy, kokosowy oraz oliwa z oliwek. Według danych z roku 2011/12 największymi producentami

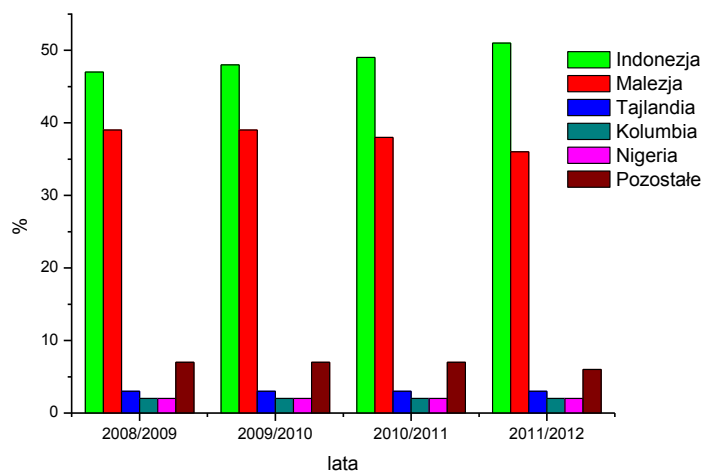
olejów roślinnych są: Indonezja (30 mln ton), Chiny (22 mln ton), Malezja (21 mln ton) i Unia Europejska (16 mln ton). Produkcję olejów roślinnych w latach 2008-2012 przedstawiono na rysunku 9.



Rysunek 9. Produkcja olejów roślinnych ((kokosowego, bawełnianego, oliwy z oliwek, palmowego, arachidowego, rzepakowego, sojowego i słonecznikowego) w latach 2008-2012

Opracowanie własne na podstawie www.fas.usda.gov

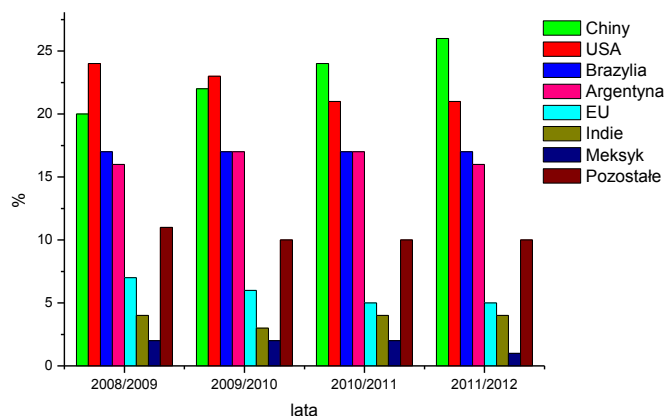
W światowej produkcji oleju palmowego liczą się przede wszystkim Indonezja i Malezja. Państwa te na przełomie lat 2008/09 wyprodukowały łącznie 37759 tysięcy ton tego oleju zaś w latach 2011/12 aż 44100 tysięcy ton. Na rysunku 10 przedstawiono udział procentowy w produkcji oleju palmowego poszczególnych państw w latach 2008-2012.



Rysunek 10. Procentowy udział w globalnej produkcji oleju palmowego w latach 2008-2012

Opracowanie własne na podstawie www.fas.usda.gov

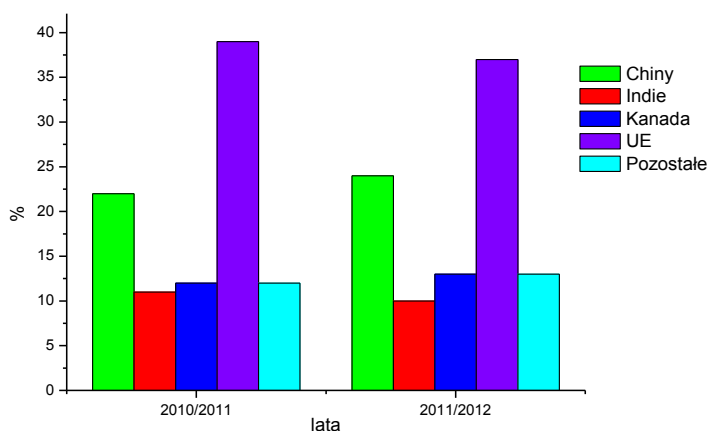
W uzyskiwaniu oleju sojowego czołowe miejsce od roku 2010 zajmują Chiny, które w latach 2011/2012 wytworzyły około 11 mln ton (26% udziału w rynku) oleju sojowego. Drugie miejsce zajmują Stany Zjednoczone z produkcją na poziomie ok. 9 mln ton (21% udziału w rynku), a kolejne: Brazylia 7 mln ton (17% udziału w rynku) i Argentyna (16% udziału w rynku). Unia Europejska zajmuje 5 miejsce z produkcją na poziomie 2 mln ton (5% udziału w rynku), rysunek 11.



Rysunek 11. Procentowy udział w globalnej produkcji oleju sojowego w latach 2008-2012

Opracowanie własne na podstawie <http://www.fas.usda.gov>

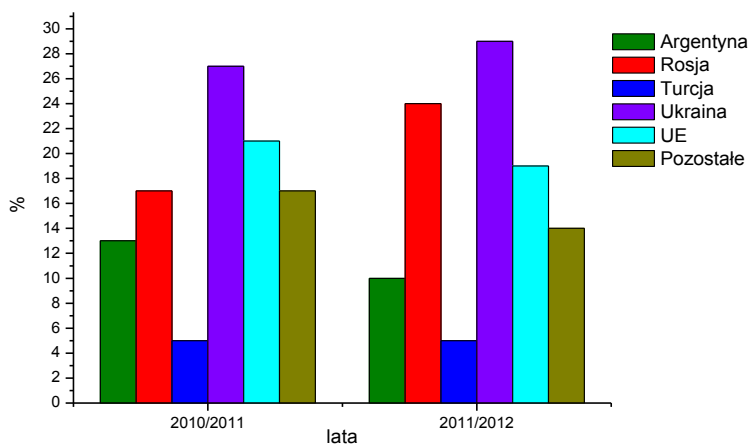
Olej rzepakowy zawdzięcza swoją dobrą pozycję m.in. Unii Europejskiej która jest jego zarówno największym producentem (ok. 39% udziału w rynku w latach 2011/12) jak i konsumentem. Chiny, Indie, Kanada i Japonia posiadają odpowiednio ok. 24, 10, 13 i 4 % udziału w rynku (stan w latach 2011/12), rysunek 12.



Rysunek 12. Procentowy udział w globalnej produkcji oleju rzepakowego w latach 2010-2012

Opracowanie własne na podstawie <http://www.fas.usda.gov>

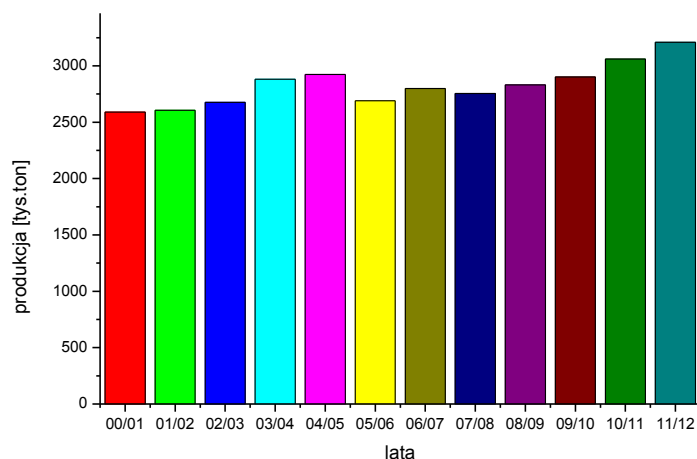
Rynek oleju słonecznikowego zdominowany został przez Ukrainę, która w roku 2011/12 wyprodukowała 4347 tysięcy ton tego oleju co stanowiło 29% udziału w rynku. Na kolejnej pozycji plasuje się Rosja 24%, zaś trzecie miejsce należy obecnie do UE z udziałem w rynku na poziomie 19%. Poza Europą najwięcej oleju słonecznikowego uzyskuje się w Argentynie (rysunek 13).



Rysunek 13. Procentowy udział w globalnej produkcji oleju słonecznikowego w latach 2010-2012 roku.

Opracowanie własne na podstawie <http://www.fas.usda.gov>

Oliwa z oliwek jako cenny olej roślinny jest znana i używana na całym świecie. Wyniki badań naukowych potwierdzają jej korzystny wpływ na zdrowie, szczególnie ludności zamieszkującej tereny położone nad Morzem Śródziemnym. To właśnie w tym rejonie znajduje się 98% wszystkich drzew oliwnych uprawianych na świecie. Produkcja oliwy z oliwek, jak również jej konsumpcja, jest największa w państwach basenu Morza Śródziemnego, tj. w: Hiszpanii, Włoszech, Grecji, Francji, Portugalii, a także: Turcji, Tunezji, Maroku, Syrii i Algerii (Wroniak i Maszewska 2011). Najwięcej oliwy produkuje się w Krajach Unii Europejskiej (75%). Aż 97% udziału produkcji w UE należy do: Hiszpanii, Włoch i Grecji. Kolejne pod tym względem są kraje Bliskiego Wschodu, takie jak: Turcja, Syria, Liban i Izrael oraz Kraje Północnej Afryki: Tunezja, Algeria, Maroko, Libia i Egipt (Wroniak i Maszewska 2011). Światowa konsumpcja oliwy z oliwek wzrosła z 2590,5 (tys.ton) w latach 2000-2001 do 3210 (ton) w latach 2011-2012. Na rysunku 14 przedstawiono zmiany w konsumpcji oliwy z oliwek w latach 2000-2012.



Rysunek 14. Zmiany w konsumpcji oliwy z oliwek w latach 2000-2012.

Opracowanie własne na podstawie <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>

Rynek olejów roślinnych w Polsce

W okresie od 1990-2003 spożycie tłuszczów roślinnych w przeliczeniu na 1 mieszkańca Polski zwiększyło się ponad 2-krotnie (z 7,6 kg w 1990 r. do 19,5 kg w 2002 r. i 17,6 kg w 2003 r.), natomiast tłuszczów zwierzęcych obniżyło się o jedną trzecią (z 16,0 kg do 11,3 kg i 11,6 kg). Tym samym nastąpiła trwała zmiana modelu konsumpcji tłuszczów w Polsce, w wyniku której oleje i margaryny pokrywają ok. 60% krajowego popytu na tłuszcze, wobec około 30% na początku lat dziewięćdziesiątych (Rosiak, 2005).

Według GUS, w 2010 roku miesięczne spożycie tłuszczów ogółem w gospodarstwach domowych wyniosło 1,33 kg w przeliczeniu na osobę, co oznacza, iż konsumpcja pozostała relatywnie stabilna wobec analogicznego okresu w 2008 roku (1,39 kg/os.). Nastąpił natomiast nieduży wzrost znaczenia tłuszczów roślinnych kosztem zwierzęcych. Ostatecznie w okresie pierwszych sześciu miesięcy 2010 roku udział tłuszczów roślinnych stanowił 68% ogólnego spożycia tłuszczów wobec 67% w roku 2009 (Roczniki Statystyczne Rolnictwa 2009, 2011).

Według Panelu Handlu Detalicznego Nielsena, Polacy dokonując zakupu oleju wybierają głównie olej rzepakowy (dwie z trzech sprzedanych butelek), popularna oliwa z oliwek ma 14% udział wartościowy w sprzedaży zaś reszta rynku przypada na pozostały asortyment. Cały rynek olejów i oliw w okresie od kwietnia 2010 r. do marca 2011 r. wykazał obroty w wysokości 947,5 mln zł, z czego 166 mln litrów stanowiła sprzedaż tłuszczów płynnych. Rynek ten zanotował minimalny wzrost – ilościowo o 1,7%, wartościowo o 1% (Poradnik Handlowca 2011).

Oleje należą do produktów kupowanych na zapas. Najlepiej sprzedają się w hiper- i supermarketach (46% udziału w strukturze sprzedaży), gdzie często organizowane są promocje tego produktu, rysunek 9. Na duże sklepy spożywcze przypada 14% sprzedaży oleju, natomiast na średnie i małe sklepy odpowiednio - 23% i 17% (Poradnik Handlowca 2011).

W roku 2012 eksport olejów roślinnych z Polski na rynki zagraniczne wynosił około 200 tysięcy ton o wartości prawie 200 mln euro wobec 180 tysięcy ton o wartości 185 mln euro w roku 2011. Największy udział w sprzedaży przypadł olejowi rzepakowemu (87% wolumenu oraz 88% wartości) i olejowi słonecznikowemu (9% udział). Eksport pozostałych olejów kształtował się na niskim poziomie. Największymi odbiorcami polskiego oleju rzepakowego były Czechy (45%), Holandia (13%), Austria i Szwajcaria (po 11%) oraz Niemcy (około 11%) (FAMMU/FAPA 2013).

Wartość importu olejów roślinnych do Polski w roku 2012 wynosiła ok. 520 mln euro i była o 3% większa w stosunku do roku ubiegłego. Największy udział w imporcie przypadł olejowi palmowemu (39% wartości), kolejny był olej rzepakowy (20%), słonecznikowy (17%), sojowy (12%), kokosowy (6%) i oliwa z oliwek (5%) (FAMMU/FAPA 2013).

Mimo ustabilizowania się poziomu spożycia olejów roślinnych w gospodarstwach domowych i spadku spożycia margaryn, rynek olejów roślinnych wciąż dysponuje ogromnym potencjałem. Produkcja tłuszczów jadalnych, będzie się rozwijała, głównie dzięki rosnącemu zapotrzebowaniu cukiernictwa, gastronomii i sektora HoReCa. Równie pozytywnie na spożywanie olejów roślinnych wpływają aktualne trendy zdrowego odżywiania.

5. MATERIAŁ BADAWCZY I METODY BADAŃ

5.1. Przedmiot badań

Przedmiotem badań były oleje roślinne tłoczone na zimno i rafinowane, produkcji krajowej i pochodzące z importu:

- dwie oliwy z oliwek typu extra virgin (EVO1, EVO2) włoskiego pochodzenia,
- dwie oliwy z wytlóków oliwek (OW1, OW2) włoskiego pochodzenia,
- dwie oliwy rafinowane (RO1-RO2) włoskiego pochodzenia,
- oliwa deodoryzowana (DO) włoskiego pochodzenia,
- oliwa extra virgin (EVO) włoskiego pochodzenia,
- oliwa rafinowana (RO) włoskiego pochodzenia,
- trzy oleje rzepakowe tłoczone na zimno (R1, R2, R3) polskiego pochodzenia,
- dwa oleje słonecznikowe tłoczone na zimno (S1, S2) polskiego pochodzenia,
- dwa oleje rzepakowe rafinowane (RR1, RR2) polskiego pochodzenia,
- jeden olej słonecznikowy rafinowany (SR1) polskiego pochodzenia.

Charakterystykę widm olejów roślinnych przedstawiono na przykładzie różnych ich gatunków. Do badań wykorzystano oliwy: extra virgin (EVO1 i EVO2), z wytlóków (OW1, OW2) i rafinowane (RO1 i RO2), oraz oleje: rzepakowe tłoczone na zimno (R1 i R2), rzepakowe rafinowane (RR1 i RR2), słonecznikowy tłoczony na zimno (S1) i słonecznikowy rafinowany (SR1).

W badaniu zafalszowań wykorzystano oliwy: EVO1, EVO, DO i RO oraz olej słonecznikowy (S2).

Próbki do badań zafalszowań oliwy (EVO1) olejem słonecznikowym (S2) przygotowano z dwudziestu jeden mieszanin o objętości 10 cm³ każda. Stężenia mieszanin wynosiły od 0% do 50% w odstępach co 2,5%.

Do wykrywania zafalszowania oliwy extra virgin innymi gatunkami oliw wykorzystano oliwę EVO, która stanowiła mieszaninę z czterdziestu różnych oliw extra virgin wytłoczonych w latach 2005-2009. Oliwa RO była mieszaniną dwudziestu siedem oliw rafinowanych pochodzących z produkcji w latach 2005-2009. Oliwę DO tworzyły mieszaniny sześciu oliw deodoryzowanych, powstałych w latach 2006-2009. Do analizy przygotowano zestaw mieszanin składający się z: oliwy extra virgin i oliwy deodoryzowanej oraz oliwy extra virgin

i oliwy rafinowanej. Stężenia mieszanin wynosiły 2,5-75 g/100g w odstępach co 2,5 g. Próbki do badań otrzymano od prof. Caponio (Dipartimento di Biologia e Chimica Agro-Forestale ed Ambientale, Università degli Studi di Bari), we współpracy z którym przeprowadzono badania.

Badanie stabilności oksydacyjnej olejów prowadzono stosując test termostatowy w temperaturze 60°C przez okres 15 dni bez dostępu światła. Próbki olejów: EVO1, EVO2, OW1, OW2, RO1, RO2, R1, R2, RR1, RR2, S1 i SR1 o objętości 40 ml umieszczano w szklanych naczyniach o średnicy 7 cm. Co trzeci dzień oceniano jakość olejów poprzez oznaczenie: liczby nadtlenkowej (LO) i liczby kwasowej (LK). Ponadto wykonano pomiary spektrofotometryczne w zakresie: bliskiej (NIR) i podstawowej (IR) podczerwieni oraz w zakresie widzialnym (Vis). Zmierzono również widma synchroniczne fluorescencji dla $\Delta\lambda = 10$ nm.

Wykorzystany w teście przechowalniczym olej rzepakowy tłoczony na zimno (R3) został wytłoczony w czerwcu 2012 roku, w Szamotułach przez firmę SEMCO. Próbki świeżo wytłoczonego oleju rzepakowego (R3) podzielono na trzy grupy, przechowywane w odpowiednich warunkach: (1) oleje w butelkach ze szkła bezbarwnego, przechowywane bez dostępu światła, oznaczone symbolem RD, (2) oleje w butelkach ze szkła bezbarwnego eksponowane na światło, oznaczone symbolem RL, (3) oleje w butelkach ze szkła o barwie zielonej, eksponowane na światło, oznaczone symbolem RG. Objętość butelki wynosiła 250 cm³, natomiast oleju 200 cm³. Olej przechowywany był przez okres sześciu miesięcy (od czerwca do grudnia 2012 roku). Warunki oświetleniowe były zbliżone do warunków sklepowych. Natężenie światła było na poziomie 2500 lux, średnia temperatura wynosiła 18°C zimą i 26°C latem. Co miesiąc pobierano próbki do badań (po jednej butelce) oraz wyznaczano parametry analityczne: liczbę nadtlenkową, kwasową, K₂₃₂, K₂₇₀ oraz zawartość tlenu (w oleju i fazie nadpowierzchniowej), tokoferoli i karotenoidów. Ponadto dla badanych próbek wykonano pomiary widm w zakresie Vis i NIR oraz fluorescencyjnych.

Dla świeżego oleju rzepakowego przeprowadzono analizę kwasów tłuszczowych wykorzystując chromatografię gazową.

5.2. Odczynniki chemiczne, aparatura i oprogramowanie

Do oznaczeń parametrów chemicznych wykorzystano następujące odczynniki:

- chloroform, cz.d.a., P.P.H. Stanlab Sp. J.
- etanol, 96% cz.d.a, P.P.H. Stanlab Sp. J.

- fenoloftaleina, r-r 1% cz.d.a., Chempur
- kwas octowy, 99,9% cz.d.a., P.P.H. Stanlab Sp. J. lub POCH
- metanol, cz.d.a., P.P.H. Stanlab Sp. J.
- skrobia, cz.d.a., POCH
- tiosiarczan sodu, 0.1 mol/l, Chempur
- jodek potasu, cz.d.a., Chempur lub AKTYN
- n-heksan, cz.d.a., Chempur

W badaniach wykorzystane zostały przyrządy do których posiadano bezpośredni dostęp i umiejętności obsługi:

- Spektrofluorymetr Fluorolog 3-11, Jobin Yvon-Spex
- Spektrofotometr UV VIS NIR Cary 5E, Varian
- Spektrofotometr UV-Vis Spectronic Genesys 6 , Milton Roy
- Spektrofotometr SPECTRUM 100 FT-IR, Perkin-Elmer
- Spektrometr MPA\FT-NIR, Buker
- Chromatograf cieczowy typ 600 (wyposażony w detektor fluorescencyjny 474 oraz detektor typu fotodiodowego 996) ,Waters
- OxySense 325i

W pracy wykorzystano również specjalistyczne oprogramowanie do prezentacji i analizy danych

- Origin 8 firmy OriginLab
- Unscrambler 9.7 firmy CAMO

5.3. Oznaczanie wybranych cech fizykochemicznych próbek olejów roślinnych

Oznaczanie liczby nadtlenkowej

Liczbę nadtlenkową w badanych olejach roślinnych oznaczono na podstawie Normy PN-ISO 3960:1996 *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczanie liczby nadtlenkowej* (PN-ISO 3960:1996). Według powyższej normy liczba nadtlenkowa zdefiniowana jest jako „ilość substancji w próbce, które utleniają jodek potasu w opisanych warunkach oznaczenia, wyrażona jako milirównoważniki aktywnego tlenu w kilogramie”. Próbkę odważano z dokładnością do 0,001 g do kolby stożkowej ze szlifem. Masa próbki była zmieniana w zależności od spodziewanej liczby nadtlenkowej:

- dla liczby nadtlenkowej 0-12, masa próbki wynosiła 3,0 g
- dla liczby nadtlenkowej 12-20, masa próbki wynosiła 1,5 g
- dla liczby nadtlenkowej powyżej 20, masa próbki wynosiła około 1,0 g.

Do przygotowanej naważki dodawano przy użyciu pipet automatycznych 15 cm³ kwasu octowego, 10 cm³ chloroformu oraz 1 cm³ nasyconego roztworu jodku potasu. Kolbę zamykano korkiem ze szlifem, mieszano przez 1 minutę i odstawiano do szafki na 5 minut bez dostępu światła. Po tym czasie do kolby dodawano 75 cm³ wody destylowanej i kilka kropel 2% roztworu skrobi. Całość po wymieszaniu miareczkowano roztworem tiosiarczanu sodu. Jeśli spodziewana liczba nadtlenkowa była niższa niż 12, miano tiosiarczanu sodu wynosiło 0,002 M, jeżeli spodziewany wynik był wyższy niż 12, używano 0,01 M roztwór tiosiarczanu sodu. W celu sprawdzenia czystości odczynników przeprowadzono pomiar próby ślepej. Wartość liczby nadtlenkowej [meqO₂/kg] dla badanych próbek obliczano ze wzoru:

$$LO = \frac{(V_1 - V_0) \times T \times 1000}{m} [\text{meqO}_2/\text{kg}] \quad (8)$$

gdzie:

V₁ – objętość roztworu tiosiarczanu użytego do miareczkowania próbki właściwej [cm³],

V₀ – objętość roztworu tiosiarczanu użytego do miareczkowania próbki ślepej [cm³],

T – miano roztworu tiosiarczanu użytego do miareczkowania [mol/dm³],

m – masa próbki [g].

Oznaczanie liczby kwasowej

Liczba kwasowa w badanych olejach roślinnych została oznaczona na podstawie Normy PN-ISO 660:1998 *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości* (PN-ISO 660:1998). Według powyższej normy liczba kwasowa zdefiniowana jest jako „liczba miligramów wodorotlenku potasu potrzebna do zneutralizowania wolnych kwasów tłuszczowych zawartych w 1 g tłuszczu”. Do kolby stożkowej odważano około 1 g oleju z dokładnością do 0,0001 g, następnie dodawano przy użyciu pipety automatycznej 5 cm³ 96% alkoholu etylowego i kilka kropel fenoloftaleiny. Roztwór miareczkowano 0,01 M alkoholowym roztworem wodoronadtlenku potasu (KOH). W celu sprawdzenia czystości odczynników wykonano pomiar próby ślepej. Wartości liczby kwasowej [mg KOH/g] dla badanych próbek obliczano ze wzoru:

$$LK = \frac{56,11 \times (V_1 - V_0) \times 0,01}{m} \text{ [mg KOH/g]} \quad (9)$$

gdzie:

56,11 – ilość mg KOH zawarta w 1 cm³ 1M roztworu,

0,01 – miano roztworu KOH użytego do miareczkowania,

V₁ – objętość 0,01M roztworu KOH zużytego do miareczkowania próbki właściwej [cm³],

V₀ – objętość 0,01M roztworu KOH zużytego do miareczkowania próbki ślepej [cm³],

m – masa próbki [g].

Oznaczanie ekstynkcji właściwej w świetle UV

Oznaczenie polegało na pomiarze absorbancji próbek w zakresie UV (190-320 nm). Pomiar dokonywano punktowo przy wybranych długościach fali w oparciu o wytyczne normy PN-EN ISO 3656:2002 *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce – Oznaczanie absorbancji w nadfiolecie wyrażonej jako ekstynkcja właściwa w świetle UV*. Do kolbek miarowych o pojemności 10 cm³ odważano z dokładnością do 0,001 g próbki o masie 0,1 g. Następnie kolbki miarowe były uzupełniane do kreski n-heksanem i mieszane. Tak przygotowane roztwory wykorzystano do pomiaru absorbancji przy określonych długościach fal: 232 i 270nm. Do pomiaru wykorzystano kuwety kwarcowe o długości drogi optycznej 10 mm. Ekstynkcję właściwą $K_{1cm}^{1\%}(\lambda)$ obliczano według wzoru:

$$K_{1cm}^{1\%}(\lambda) = \frac{A(\lambda)}{w} \quad (10)$$

gdzie:

$A(\lambda)$ – absorbancja przy danej długości fali,

w – stężenie próbki w roztworze do badań [$\text{g}/100 \text{ cm}^3$]

Oznaczanie zawartości tokoferoli metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Ogólną zawartość tokoferoli w badanych olejach (jako sumę α -, ($\beta+\gamma$)- i δ -tokoferolu) oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (Gliszczyńska-Świągło i Sikorska 2004). Badane oleje rozpuszczono w 2-propanolu. Stężenie oleju w próbkach wynosiło, w zależności od oleju, od 0,0400 do 0,0100 g/cm^3 . Do analizy tokoferoli wykorzystano wysokosprawny chromatograf cieczowy typ 600 wyposażony w detektor fluorescencyjny 474 oraz detektor typu fotodiodowego 996 firmy Waters (Milford, MA, USA). Do rozdzielania tokoferoli zastosowano kolumnę Symmetry C_{18} ($150 \text{ mm} \times 3,9 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) wraz z prekolumną $\mu\text{Bondapak } C_{18}$ firmy Waters. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i metanolu w stosunku 1:1 (v/v) o prędkości przepływu $1 \text{ cm}^3/\text{min}$. Objętość dozowanej próbki wynosiła $20 \mu\text{l}$. Detekcja tokoferoli odbywała się za pomocą detektora fluorescencyjnego przy długości fali emisji 325 nm po wzbudzeniu długością fali 295 nm . Identyfikacja tokoferoli odbywała się na podstawie porównania czasów retencji rozdzielonych związków z czasami retencji wzorców tokoferoli. Obecność tokoferoli potwierdzono na podstawie widma absorpcji uzyskanego za pomocą detektora typu fotodiodowego. Zawartość poszczególnych tokoferoli wyznaczono na podstawie wielkości pola pod powierzchnią piku metodą kalibracji bezwzględnej (wzorca zewnętrznego).

Oznaczanie zawartości karotenoidów metodą spektrofotometryczną

Ilościowe oznaczenie zawartości karotenoidów w olejach roślinnych polegało na pomiarze absorbancji w kuwecie kwarcowej przy długości fali 450 nm . Próbkę do analizy rozcieńczono w n-heksanie. Stężenie karotenoidów obliczono według wzoru:

$$c = \frac{A}{\varepsilon \times L} \text{ [mol/dm}^3\text{]} \quad (11)$$

gdzie:

A - absorbancja,

ε - molowy współczynnik absorpcji wyznaczony przy długości fali 450 nm, dla karotenoidów wynosi $\varepsilon = 138730 \text{ [dm}^3\text{/cm} \times \text{mol]}$

L - długość drogi optycznej.

Obliczone stężenie wyrażone w mol/dm³ przeliczano na mg/dm³ wykorzystując masę cząsteczkową β -karotenu ($M_{cz} = 536,86 \text{ g/mol}$). Dla każdej próbki wykonano oznaczenie w trzech powtórzeniach.

Analiza kwasów tłuszczowych

Dla świeżego oleju rzepakowego (R3) przeprowadzono analizę kwasów tłuszczowych wykorzystując chromatografię gazową. Badanie przeprowadzono w Centralnym Laboratorium Agrekologicznym w Lublinie wykorzystując chromatografię gazową zgodnie z procedurą CLA/GC/3b/2011 wersja 2 z dnia 01.02.2011

Oznaczanie zawartości tlenu

Pomiary stężenia tlenu w fazie nadpowierzchniowej olejów oraz tlenu rozpuszczonego w olejach wykonano przy użyciu systemu OxySense[®] 325i, pozwalającego na nieinwazyjny pomiar zawartości tlenu w atmosferze opakowań oraz cieczach (Norma ASTM F2714-08) (rysunek 15). Pomiaru na zasadzie optycznej dokonuje się przez ścianę opakowania (rysunek 15 A). Stężenie tlenu jest określone na podstawie czasu życia fluorescencji wskaźnika tlenu zawierającego kompleks chlorku rutenu i tri(4,7-bifenylo-1,10-fenantroliny). Związek ten wykazuje fluorescencję po wzbudzeniu światłem niebieskim, w zakresie 400-500 nm, emitowanym np. przez diodę LED. W atmosferze pozbawionej tlenu wykazuje fluorescencję światła czerwonego z maksimum przy 600 nm, która w obecności tlenu jest selektywnie wygaszana, przy czym stopień wygaszania wzrasta wraz ze wzrostem stężenia tlenu.

Kompleks rutenu jest zamknięty w matrycy polimerowej w postaci wskaźników OxyDot[®], co zapewnia mu odporność na czynniki zewnętrzne np. rozpuszczalniki i ochronę zapakowanego

produkt przez bezpośrednim kontaktem z solą rutenu. Wskaźniki OxyDot® charakteryzują dużą odpornością na wysoką temperaturę (mogą być poddawane nawet sterylizacji), na ich działanie nie wpływa zmiana pH ani obecność innych gazów towarzyszących tlenowi. Dzięki temu możliwe są powtarzalne pomiary zawartości tlenu, a same wskaźniki mogą być wykorzystywane wielokrotnie (o ile nie nastąpi ich mechaniczne uszkodzenie).

Przed właściwymi pomiarami stężenia tlenu w butelkach, za pomocą przezroczystego silikonu zostały w nich umieszczone trwale wspomniane wskaźniki OxyDot®, po dwie sztuki w każdej butelce. Wskaźnik przeznaczony do pomiarów stężenia tlenu gazowego został umiejscowiony w połowie wysokości przewidzianej wolnej przestrzeni (headspace), natomiast wskaźnik przewidziany do pomiarów stężenia tlenu rozpuszczonego w oleju został umieszczony w połowie przewidzianej wysokości wypełnienia olejem, rysunek 15 B. Następnie każdy ze wskaźników został oddzielnie skalibrowany z wykorzystaniem gazu obojętnego (azotu 5.0) oraz powietrza, które były wprowadzane do butelki przez specjalną nakrętkę wyposażoną w zawory doprowadzający i odprowadzający odpowiedni gaz kalibracyjny. Właściwe pomiary tlenu przeprowadzono w temperaturze 22°C po napełnieniu butelek określoną objętością oleju (200 cm). W tym celu do butelek przykładano pod kątem prostym do ich powierzchni końcówkę pomiarową EasAlign™ wyposażoną w element emitujący światło i jednocześnie rejestrujący fluorescencję oraz czujnik temperatury. W celu zapewnienia większej precyzji i powtarzalności wyników, końcówkę pomiarową EasAlign™ umieszczono w statywie zapewniającym jej stabilne położenie pod kątem prostym w stosunku do wskaźników OxyDot® znajdujących się we wnętrzu butelek. Wszystkie pomiary były powtarzane 10-krotnie, a wyniki stanowią ich średnią.



Rysunek 15. Oznaczanie zawartości tlenu. (A) Zasada pomiaru stężenia tlenu systemem OxySense. (B) umiejscowienie wskaźników. Na podstawie www.oxysence.com

5.4. Pomiar widm

Zakres bliskiej podczerwieni

Pomiar widm w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR) wykonano na spektrofotometrze MPA\FT-NIR firmy Bruker, w świetle przechodzącym (badane oleje umieszczane były w szklanych fiolkach o długości drogi optycznej 8 mm). Widma mierzono w zakresie 12500 – 4000 cm^{-1} , pomiary wykonywane były w temperaturze 30°C. Każde widmo stanowiło średnią 16 interferogramów. Rozdzielczość wynosiła 4 cm^{-1} . Widma przedstawiano jako zależność absorbancji od liczby falowej.

Zakres podstawowej podczerwieni

Pomiar widm w zakresie podstawowej podczerwieni (MIR) przeprowadzono na spektrofotometrze Spectrum 100 FT-IR z wykorzystaniem techniki całkowitego osłabionego odbicia (ATR). Widma mierzono w zakresie 4000–400 cm^{-1} . Każde widmo stanowiło średnią 16 interferogramów. Rozdzielczość wynosiła 4 cm^{-1} . Widma przedstawiano jako zależność absorbancji od liczby falowej.

Zakres widzialny

Pomiar widm absorpcji w zakresie widzialnym (Vis) dokonano przy użyciu spektrofotometru Genesys™ 6 firmy Milton Roy. Badane roztwory olejów umieszczano w kuwetach kwarcowych o długości drogi optycznej równej 1 cm. Po przeprowadzeniu kalibracji przyrządu w aparacie umieszczono kuwety z badanym roztworem oleju. Pomiary widm absorbancji wykonano w zakresie 350-750 nm.

Fluorescencja

Pomiar widm synchronicznych fluorescencji wykonano za pomocą spektrofluorymetru Fluorolog 3-11, firmy Jobin Yvon-Spex. Pomiary wykonano w kuwetach kwarcowych, w geometrii odbiciowej (*front face*) dokonując trzech powtórzeń. Przy pomiarze widm całkowitej fluorescencji zakres długości fali wzbudzenia wynosił 250-500 nm, a zakres długości fali emisji 260-700 nm. Przy pomiarze widm synchronicznych fluorescencji zakres długości fali

wzbudzenia wynosił od 280 do 700 nm, przy różnicy długości fali emisji i wzbudzenia wynoszącej $\Delta\lambda = 10, 30$ i 60 nm. Szerokość szczelin monochromatorów wzbudzeniowego i emisyjnego wynosiła 2 nm, a czas integracji $0,1$ s.

5.5. Metody analizy widm

W pierwszym etapie analizy z zastosowaniem metod spektroskopowych dokonuje się identyfikacji pochodzenia poszczególnych pasm w widmach oraz określenia podobieństw i różnic w widmach badanych próbek.

Analiza głównych składowych (PCA) wykorzystana została jako metoda wstępna pozwalająca na wykrycie struktury danych. Celem tej metody jest wyznaczenie nowych nieskorelowanych zmiennych (głównych składowych), które będą miały największą możliwą wariancję.

Do analiz ilościowych zastosowane zostały metody regresji. Celem tych metod jest uzyskanie modelu kalibracyjnego, który umożliwi korelację informacji zawartych w widmach oraz jednej lub kilku właściwości próbki. Do analizy wykorzystano metody regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS) oraz regresji składowych głównych (PCR).

W badaniu zafałszowań zbior zmiennych niezależnych X stanowiły widma, zaś zbiór zmiennych zależnych Y stanowiła procentowa zawartość tańszego oleju w mieszaninach. Do budowy modeli zastosowano różne zakresy widm oraz różne ich przekształcenia: multiplikatywną korekcję rozproszenia (ang. Multiplicative Scatter Correction, MSC), pierwszą i drugą pochodną oraz wygładzenie.

Dla próbek poddanych testom przechowalniczym przeprowadzono analizę PLS, w której zbiór zmiennych niezależnych X stanowiły widma zaś zbiór zmiennych zależnych Y stanowiły, oznaczone metodami klasycznymi, parametry chemiczne.

Ponadto do analizy widm w zakresie NIR i MIR wykorzystano wielowymiarową metodę dekonwolucji krzywych (ang. Multivariate Curve Resolution, MCR) do wyodrębnienia widm czystych składników, pojawiających się w trakcie zachodzących procesów utleniania. W metodzie tej macierz danych R przedstawia się w formie dwóch mniejszych macierzy C i S^T . Macierz C jest macierzą profili stężenia każdego modelowanego składnika, natomiast macierz S odpowiada czystemu widmu tych składników (Le Dreau i in. 2009b).

Walidację otrzymanych modeli kalibracyjnych przeprowadzono, wykorzystując m.in. średni kwadratowy błąd walidacji krzyżowej (RMSECV) oraz błąd względny (δ_x). Im niższa

wartość tych wskaźników tym lepsze dopasowanie modelu. Błąd względny obliczano na podstawie wzoru:

$$\delta_x = \frac{RMSECV}{Y} \times 100\% \quad (12)$$

gdzie: *RMSECV*- średni kwadratory błąd walidacji krzyżowej, *Y*- wartość średnia zmiennej *Y*

Ponadto jakość modelu oceniano poprzez obliczenie wartości RPD (ang. Ratio of Performance to Denation). Wartości $RPD < 3$ wskazują na słabą jakość modelu kalibracyjnych, $RPD > 3$ wskazują, że model może być wykorzystany do badań przesiewowych (screening), $RPD > 8$ wskazują na bardzo dobrą zdolność przewidywania modelu (Huang i in. 2001). Wartość RPD obliczano na podstawie wzoru:

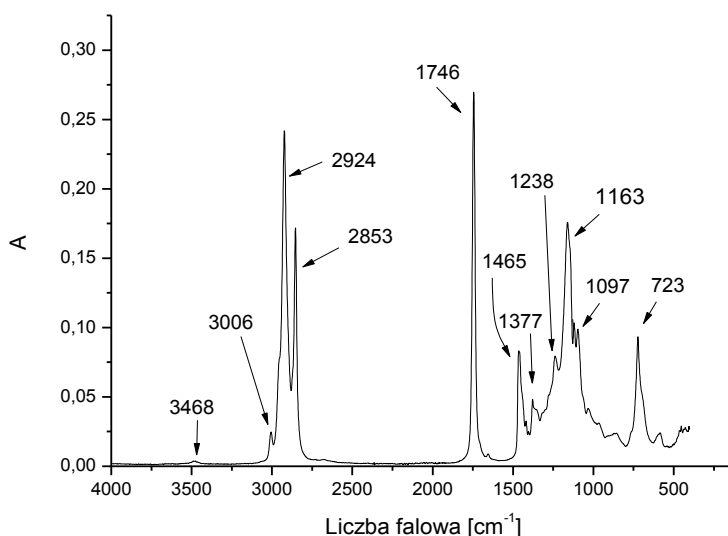
$$RPD = \frac{SD}{SECV} \quad (13)$$

gdzie: *SD*- odchylenie standardowe zmiennej *Y*, *SECV* – błąd standardowy walidacji krzyżowej (ang. Standard Error of Cross Validation).

6. CHARAKTERYSTYKA WIDM OLEJÓW ROŚLINNYCH

6.1. Widma olejów w zakresie podstawowej podczerwieni (MIR)

Na rysunku 16 przedstawiono widmo oliwy z oliwek extra virgin (EVO1) wykonane w zakresie podstawowej podczerwieni.



Rysunek 16. Widmo absorpcji w zakresie MIR oliwy extra virgin (EVO1).
Na podstawie Wójcicki (2012)

Drgania pierwszego nadtonu wiązania $\text{C}=\text{O}$ występującego w estrach, widoczne są w zakresie $3440\text{--}3520\text{ cm}^{-1}$. Przy liczbie falowej 3006 cm^{-1} obecne jest pasmo pochodzące od drgań rozciągających wiązania (*cis*) $\text{C}-\text{H}$. W zakresie $2989\text{--}2881\text{ cm}^{-1}$ obserwowane są pasma pochodzące od drgań rozciągających wiązania $\text{C}-\text{H}$ z maksimum absorpcji przy liczbach falowych 2924 cm^{-1} i 2853 cm^{-1} (Gulien i Cabo 1997). Intensywne pasmo pochodzące od drgań $\text{C}=\text{O}$, charakterystyczne dla estrów widoczne jest przy liczbie falowej 1746 cm^{-1} . Przy liczbie falowej 1465 cm^{-1} obecne jest pasmo pochodzące od drgań zginających wiązania $\text{C}-\text{H}$ grupy alkenylowej. W zakresie $1382\text{--}1371\text{ cm}^{-1}$ pojawia się pasmo o średniej intensywności, pochodzące od drgań zginających wiązania $\text{C}-\text{H}$ grupy metylowej (Lerma-Garcia i in. 2010). Niektórzy Autorzy przypisują pasma występujące przy liczbie falowej 1238 cm^{-1} do grupy drgań zginających poza płaszczyznę, należących do metylenu (Safar i in. 1994). Intensywne pasmo z maksimum absorpcji przy liczbie falowej 1163 cm^{-1} zostaje przypisane drganiom rozciągającym wiązania $\text{C}-\text{O}$. W zakresie $1106\text{--}1072\text{ cm}^{-1}$ obecne jest średnio intensywne pasmo, pochodzące od drgań rozciągających wiązania $\text{C}-\text{O}$.

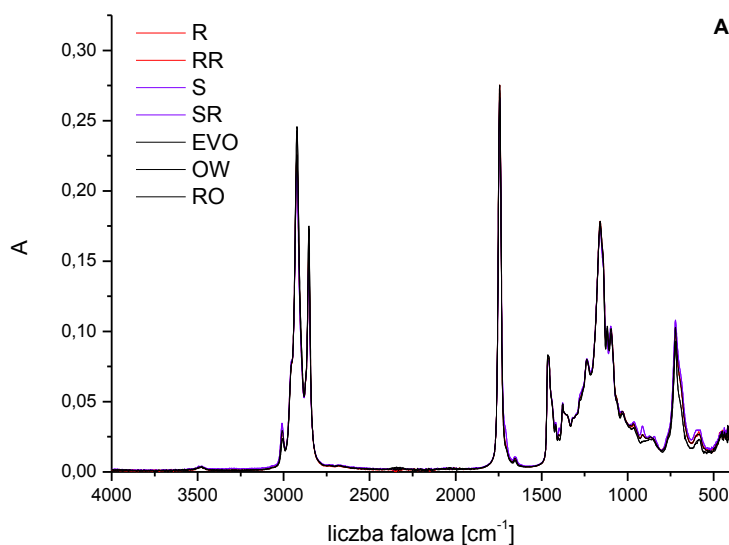
Pasma, które pojawiają się dla niektórych olejów przy liczbie falowej 914 cm^{-1} związane są z drganiami zginającymi *cis* grupy olefinowej (Van de Voort, Ismail i Sedman 1995) oraz grup winylowych (Wolf i Miwa 1965). Pasma z maksimum przy liczbie falowej 723 cm^{-1} pochodzą od drgań kołyszących wiązania $-(\text{CH}_2)_n-$ lub zginających (poza płaszczyznę cząsteczki) wiązania $-\text{HC}=\text{CH}-$. W tabeli 4 przedstawiono charakterystykę pasm występujących w widmach MIR olejów: położenie i intensywność pasm oraz ich pochodzenie.

Tabela 4. Charakterystyka pasm w widmach olejów roślinnych w zakresie podstawowej podczerwieni

Zakres pasma [cm^{-1}]	Grupa funkcyjna	Maksimum absorpcji [cm^{-1}]	Rodzaj drgań	Intensywność
3440-3520	$-\text{C}=\text{O}$ (ester)	3468	Nadton	Mała
3029-2989	$=\text{C}-\text{H}$ (trans)	3025	Rozciągające	Bardzo mała
	$=\text{C}-\text{H}$ (cis)	3006	Rozciągające	Średnia
2989-2946	$-\text{C}-\text{H}$ (CH_3)	2953	Rozciągające (asymetryczne)	Średnia
2946-2881	$-\text{C}-\text{H}$ (CH_2)	2924	Rozciągające (asymetryczne)	Bardzo duża
2881-2782	$-\text{C}-\text{H}$ (CH_2)	2853	Rozciągające (symetryczne)	Bardzo duża
1795-1677	$-\text{C}=\text{O}$ (ester)	1746 lub 1743	Rozciągające	Bardzo duża
	$-\text{C}=\text{O}$ (kwas)	1711	Rozciągające	Bardzo mała
1486-1446	$-\text{C}-\text{H}$ (CH_2)	1465	Zginające (nożycowe)	Średnia
1446-1425	$-\text{C}-\text{H}$ (CH_3)	1450	Zginające (asymetryczne)	
1425-1409	$=\text{C}-\text{H}$ (cis)	1417	Zginające (wahadłowe)	Mała
1409-1396	$=\text{C}-\text{H}$	1400	Zginające	Mała
1396-1382	$=\text{C}-\text{H}$	1390	Zginające	
1382-1371	$-\text{C}-\text{H}$ (CH_3)	1377	Zginające (symetryczne)	Średnia
1371-1330	$\text{O}-\text{H}$	1359	Zginające (kołyszące)	
1330-1290	nie przypisane	1319	Zginające	Bardzo mała
1290-1211	$-\text{C}-\text{O}$	1238	Rozciągające	Średnia
	$-\text{CH}_2-$		Zginające	
1211-1147	$-\text{C}-\text{O}$	1163	Rozciągające	Duża
1147-1128	$-\text{C}-\text{O}$	1138	Rozciągające	
1128-1106	$-\text{C}-\text{O}$	1118	Rozciągające	Średnia
1106-1072	$-\text{C}-\text{O}$	1097	Rozciągające	Średnia
1072-1043	$-\text{C}-\text{O}$		Rozciągające	
1043-1006	$-\text{C}-\text{O}$	1033	Rozciągające	Bardzo mała
1006-929	$-\text{HC}=\text{CH}-$ (trans)	968	Zginające (poza płaszczyznę)	Mała
929-885	$-\text{HC}=\text{CH}-$ (cis)	914	Zginające (poza płaszczyznę)	Bardzo mała
885-802	$=\text{CH}_2$	850	Wahadłowe	
802-754	$-\text{C}-\text{H}$		Zginające (poza płaszczyznę)	
754-701	$-(\text{CH}_2)_n-$	723	Kołyszące	Średnia
	$-\text{HC}=\text{CH}-$ (cis)		Zginające (poza płaszczyznę)	
701-640	$\text{C}-\text{C}$	685	Zginające (poza płaszczyznę)	
	$\text{O}-\text{H}$	650	Zginające (poza płaszczyznę)	

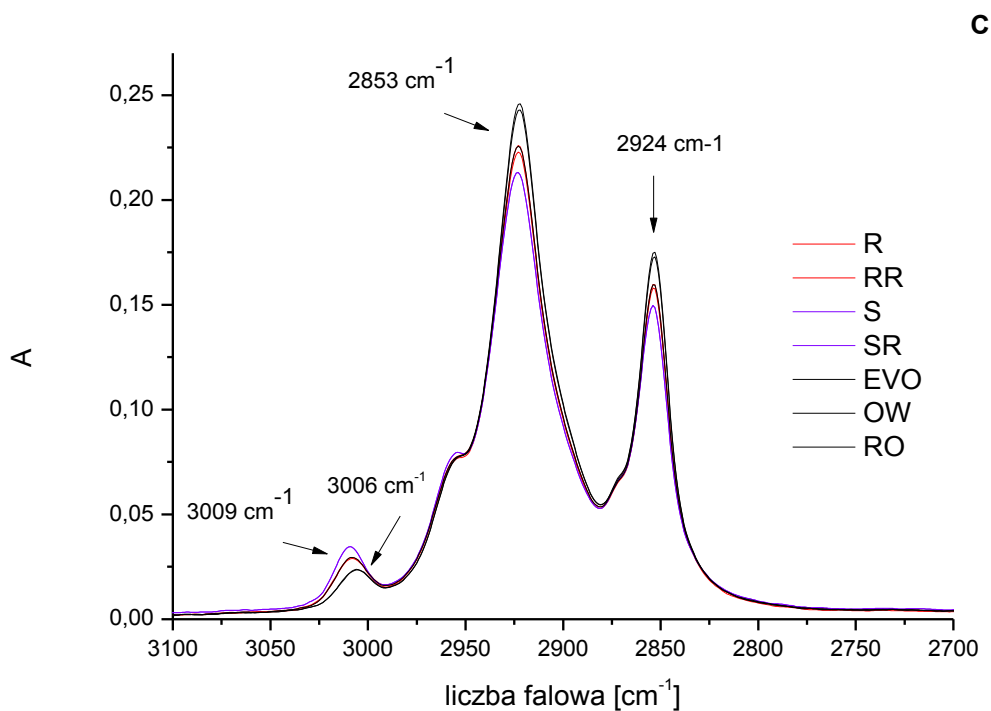
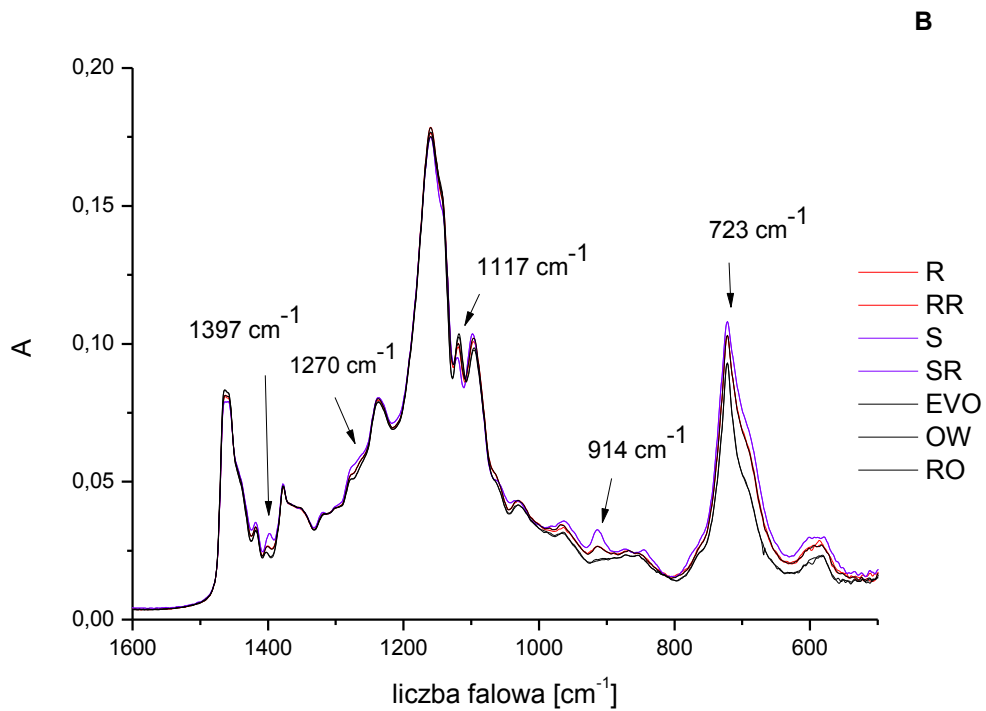
Opracowano na podstawie Guillen i Cabo (1998); Silverstein, Bassler i Morrill (1991); Lerma-Garcia i in. (2010), Vlachos i in. (2006).

Widma w zakresie podstawowej podczerwieni wykonano dla olejów: rzepakowego rafinowanego (RR1) i tłoczonego na zimno (R1), słonecznikowego rafinowanego (SR1) i tłoczonego na zimno (S1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wyłoków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1), rysunek 17 A. Widma dla danego gatunku oleju są do siebie podobne i praktycznie nierozróżnialne. Analizując widma zróżnicowanych gatunków olejów można dostrzec różnice w intensywności pasm, spowodowane różną zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych (najwyższa w oleju słonecznikowym) (Rotkiewicz i in. 2002). W obszarze $1500\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ widoczne są różnice między badanymi próbkami, objawiające się różną intensywnością i kształtem pasm, rysunek 17 B. Oleje rzepakowe i słonecznikowe posiadają pasmo przy liczbach falowych 1397 cm^{-1} oraz 914 cm^{-1} , które nie jest obecne w oliwach z oliwek. W olejach słonecznikowych i rzepakowych można również zaobserwować pasmo przy liczbie falowej 3009 cm^{-1} , natomiast w oliwach z oliwek pasmo to występuje przy liczbie falowej 3006 cm^{-1} , rysunek 17 C. Intensywność pasm z maksimum absorpcji przy liczbach falowych 2853 cm^{-1} i 2924 cm^{-1} jest różna w zależności od gatunku oleju. W oliwach pasma te są najbardziej intensywne, oleje rzepakowe cechują się mniejszą intensywnością omawianych pasm, natomiast najmniejszą intensywność pasm wykazują oleje słonecznikowe.



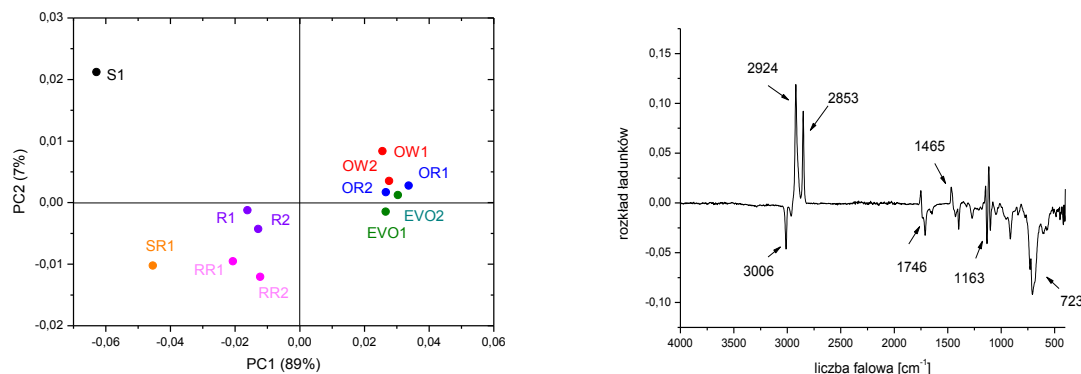
Rysunek 17. Widma absorpcji w zakresie MIR olejów: rzepakowego (R1), rzepakowego rafinowanego (RR1), słonecznikowego tłoczonego na zimno (S1), słonecznikowego rafinowanego (SR1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wyłoków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1). Rysunek **A** – widma dla całego zakresu MIR, rysunek **B** – widma dla zakresu $1600\text{-}550\text{ cm}^{-1}$, rysunek **C** – widma dla zakresu $3100\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$. Oleje nierozcieńczone.

Na podstawie badań własnych



cd. Rysunku 17. Widma absorpcji w zakresie MIR olejów: rzepakowego (R1), rzepakowego rafinowanego (RR1), słonecznikowego tłoczonego na zimno (S1), słonecznikowego rafinowanego (SR1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wytlóków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1). Rysunek A – widma dla całego zakresu MIR, rysunek B – widma dla zakresu $1600\text{-}550\text{ cm}^{-1}$, rysunek C – widma dla zakresu $3100\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$. Na podstawie badań własnych

W celu porównania widm w zakresie MIR badanych olejów przeprowadzono analizę PCA widm w zakresie 4000-400 cm^{-1} . Wyniki analizy PCA przedstawiono na rysunku 18. Dla badanych olejów dwie pierwsze główne składowe opisują 96% całkowitej wariancji zestawu pierwotnych danych, przy czym PC1 uwzględnia 89% całkowitej wariancji a PC2 7%.



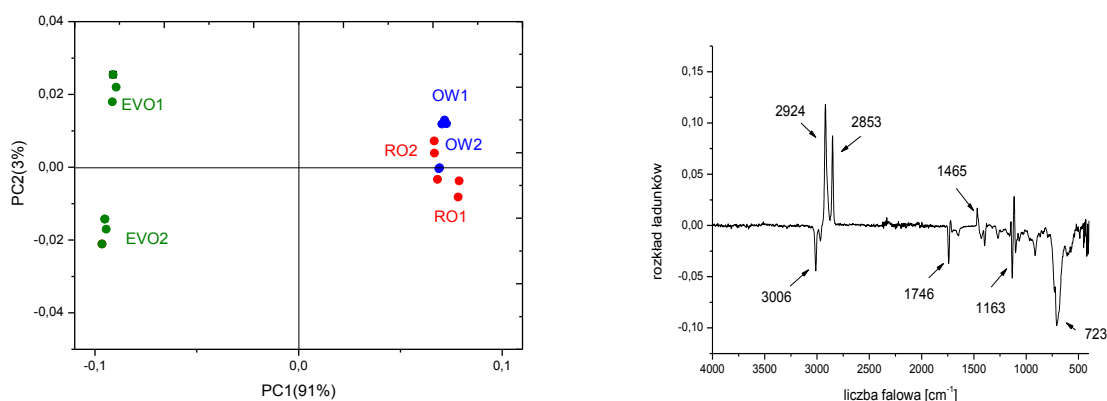
Rysunek 18. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm MIR w zakresie 4000-400 cm^{-1} . Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2;

Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla pierwszej głównej składowej PC1. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wytlóków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2, rzepakowy tłoczony na zimno R1 i R2, rzepakowy rafinowany RR1 i RR2, słonecznikowy tłoczony na zimno S1, słonecznikowy rafinowany SR1.

Na podstawie badań własnych

Pierwsza główna składowa PC1 różnicuje badane oleje roślinne na trzy grupy. Do pierwszej grupy należą oliwy: extra virgin, rafinowane i z wytlóków. W drugiej grupie znajdują się oleje rzepakowe: tłoczone na zimno i rafinowane. W trzeciej – oleje słonecznikowe (tłoczone na zimno i rafinowane). Takie rozmieszczenie próbek związane jest ze składem kwasów tłuszczowych w poszczególnych gatunkach olejów. W oliwie z oliwek zawartość kwasu linolowego (C18:2) wynosi 3,5-21 (mg/kg) podczas gdy w oleju rzepakowym i słonecznikowym odpowiednio 16-24,8 (mg/kg) i 48,2-74,2 (mg/kg). Również zawartość kwasu α -linolenowego (C18:3) jest najniższa w oliwie z oliwek (3,5-21 mg/kg), najwyższa zaś w oleju słonecznikowym (48,2-74,2 mg/kg). W oleju rzepakowym zawartość tego kwasu mieści się w przedziale 16-24,8 mg/kg. Oliwa z oliwek zawiera natomiast najwięcej kwasu oleinowego (55-83 mg/kg). Olej rzepakowy charakteryzuje się zbliżoną zawartością na poziomie 52-67 mg/kg. W oleju słonecznikowym zawartość tego kwasu jest najniższa (14-38 mg/kg) (Pinto i in. 2010). Na podstawie analizy wykresu ładunku można stwierdzić, że PC1 skorelowana jest ujemnie z pasmami związanymi z występowaniem drgań wiązań (*cis*) =C–H (3006 cm^{-1}), –C=O (1746 cm^{-1}), –C–O (1163 cm^{-1}) i (*cis*) –HC=CH– (723 cm^{-1}) oraz dodatnio skorelowana z pasmami drgań grupy –C–H (2924, 2853, 1465 cm^{-1}).

W celu zbadania możliwości rozróżnienia widm poszczególnych gatunków oliwy z oliwek, przeprowadzono analizę PCA z pominięciem pozostałych gatunków olejów. Do analizy wykorzystano cały zakres widma ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$). Wyniki analizy przedstawiono na rysunku 19. Dla badanych oliw dwie pierwsze główne składowe opisują 94% całkowitej wariancji zestawu pierwotnych danych, przy czym PC1 uwzględnia 91% całkowitej wariancji a PC2 3%. Podobnie jak w poprzedniej analizie pierwsza główna składowa PC1 różnicuje oliwy extra virgin oraz z wyłoków i rafinowane. Na podstawie analizy wykresu ładunków można stwierdzić, że PC1 jest ujemnie skorelowana z pasmami związanymi z występowaniem drgań =C-H (3006 cm^{-1}), -C=O (1746 cm^{-1}), -C-O (1163 cm^{-1}) i CH_2 (723 cm^{-1}) oraz dodatnio skorelowana z wiązaniem -C-H ($2924, 2853, 1465\text{ cm}^{-1}$). Na podstawie analizy PCA dla całego zakresu spektralnego nie było możliwe rozróżnienie oliw z wyłoków od oliw rafinowanych.



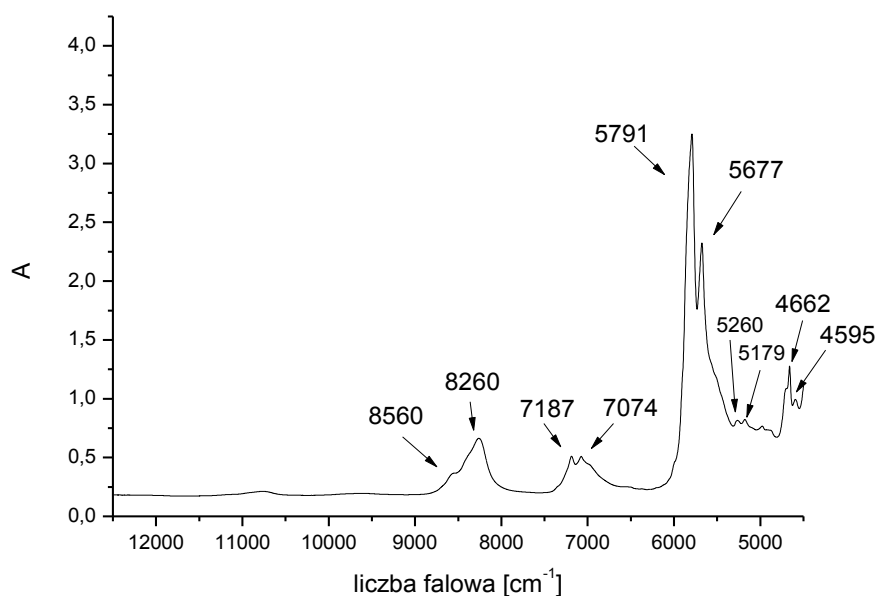
Rysunek 19. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm MIR w zakresie $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla pierwszej głównej składowej PC1. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2.

Na podstawie badań własnych

6.2. Widma olejów w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR)

W widmach oliwy z oliwek w zakresie NIR obserwuje się kilka charakterystycznych pasm absorpcji, rysunek 20. Pasma występujące przy 8560 cm^{-1} i 8260 cm^{-1} pochodzą od drugiego nadtonu drgań rozciągających C-H. Pasma z maksimum absorpcji przy liczbie falowej 7187 cm^{-1} i 7074 cm^{-1} pochodzą od drgań rozciągających 2C-H i deformacyjnych C-H. Pasma przy 5791 cm^{-1} i 5677 cm^{-1} pochodzą od pierwszego nadtonu drgań rozciągających C-H grup metylowej, metylenowej i etylenowej. Pasma przy liczbach falowych 5260 i 5179 cm^{-1} pochodzą od drugiego nadtonu drgań rozciągających C=O. Pasma przy liczbie falowej 4707 cm^{-1} wywołane jest drganiami rozciągającymi C-H i C-O. Pasma przy liczbie falowej 4662

i 4595 cm^{-1} pochodzą od drgań rozciągających grupy $-\text{HC}=\text{CH}-$ (Hourant i in. 2000, Christy i in. 2004, Sinelli i in. 2010). W tabeli 5. przedstawiono charakterystykę pasm w widmach olejów roślinnych w zakresie bliskiej podczerwieni.



Rysunek 20. Widmo absorpcji w zakresie NIR oliwy extra virgin (EVO1). Na podstawie badań własnych

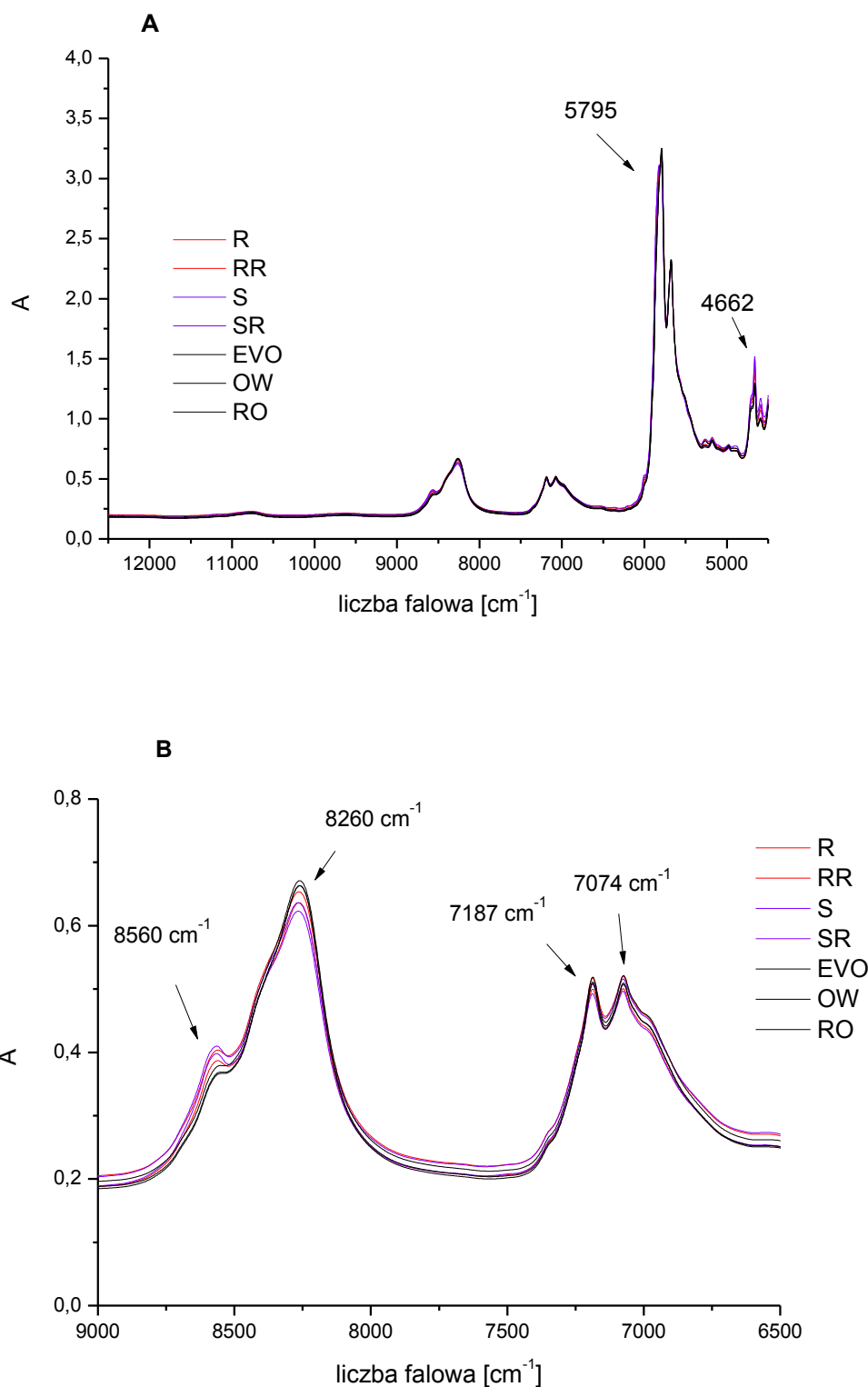
Tabela 5. Charakterystyka pasm w widmach olejów roślinnych w zakresie bliskiej podczerwieni

Maksimum absorpcji [cm^{-1}]	Grupa funkcyjna	Rodzaj drgań	Intensywność
8560	CH_3-	C-H Rozciągające, drugi nadton	Mała
8260	$-\text{CH}_2-$	C-H Rozciągające, drugi nadton	Średnia
7187	CH_3-	2C-H rozciągające i C-H deformacyjne	Średnia
7074	$-\text{CH}_2-$	2C-H rozciągające i C-H deformacyjne	Średnia
6010	cis $\text{R}_1\text{CH}=\text{CHR}_2\text{CH}_3-$	cis CH	
5791	$-\text{CH}_2-$	C-H pierwszy nadton	Duża
5677	$-\text{CH}_2-$	C-H pierwszy nadton	Duża
5260	C=O	Drugi nadton	Mała
5179	C=O	Drugi nadton, estry	Mała
4707	$-\text{COOR}$	C-H rozciągające i C=O rozciągające	
4662	$-\text{HC}=\text{CH}-$	C-H rozciągające i C=C rozciągające	Średnia
4595	$-\text{HC}=\text{CH}-$	=C-H asymetryczne rozciągające i C=C rozciągające	Mała

Na podstawie Christy i in. 2004

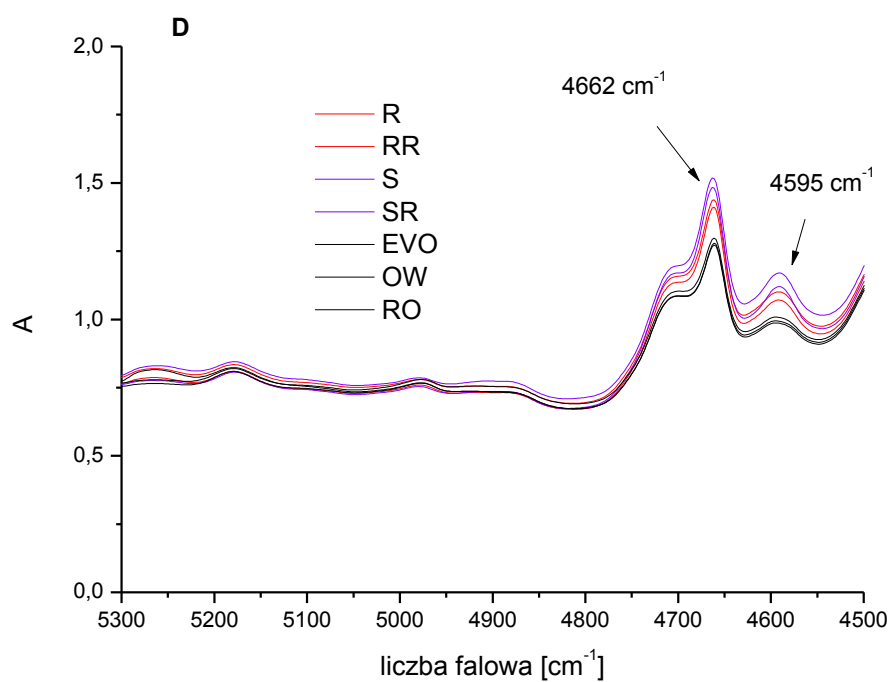
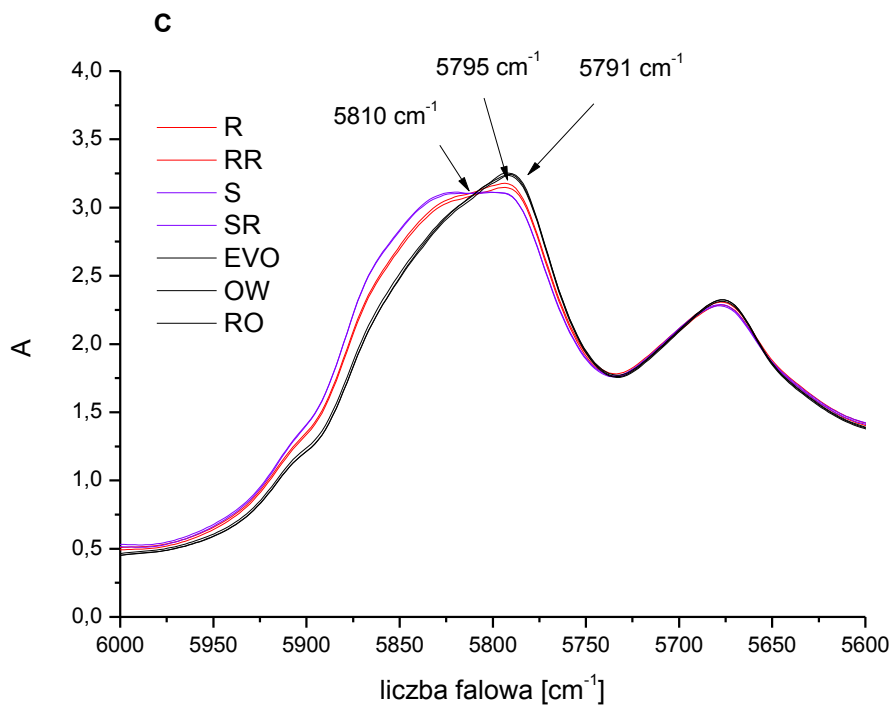
Widma w zakresie bliskiej podczerwieni wykonano dla olejów: rzepakowego rafinowanego (RR1) i tłoczonego na zimno (R1), słonecznikowego rafinowanego (SR1) i tłoczonego na zimno (S1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wyłoków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1), rysunek 21 A. Uzyskane widma dla danego gatunku oleju są do siebie podobne i praktycznie nierozróżnialne. Analizując widma różnych gatunków olejów można

dostrzec ich odmienny kształt, co spowodowane jest różnym składem kwasów tłuszczowych o czym wspomniano podczas interpretacji widm w zakresie MIR. W obszarze 9000-6500 cm^{-1} widoczne są różnice między badanymi próbkami, objawiające się różną intensywnością i kształtem pasm (rysunek 21 B). Oleje rzepakowe i słonecznikowe posiadają bardziej intensywne pasmo przy liczbie falowej 8560 cm^{-1} niż oliwy z oliwek. Pasmo z maksimum absorpcji przy liczbie falowej 8260 cm^{-1} jest natomiast bardziej intensywne w oliwach z oliwek niż w olejach słonecznikowych i rzepakowych. Intensywność pasm z maksimum absorpcji przy liczbach falowych 7187 cm^{-1} i 7074 cm^{-1} jest różna w zależności od gatunku oleju. W oliwach i olejach tłoczonych na zimno: rzepakowym i słonecznikowym pasma te są bardziej intensywne niż w olejach rafinowanych. W zakresie 6000-5730 cm^{-1} występuje pasmo, o różnym kształcie i intensywności w zależności od gatunku oleju, rysunek 21 C. W oliwach z oliwek pasmo to posiada maksimum absorpcji przy liczbie falowej 5791 cm^{-1} i jest najbardziej intensywne. W olejach rzepakowych pasmo to ma mniejszą intensywność, a jego maksimum absorpcji położone jest przy liczbie falowej 5795 cm^{-1} . Najmniejszą intensywnością charakteryzowało się pasmo dla olejów słonecznikowych z maksimum absorpcji przy liczbie falowej 5810 cm^{-1} . W analizie widm w zakresie NIR ważny jest również zakres 5300-4500 cm^{-1} , w którym występują pasma z maksimum absorpcji przy liczbach falowych 4662 cm^{-1} i 4595 cm^{-1} , rysunek 21 D. Najmniejszą intensywnością omawianych pasm charakteryzują się oliwy z oliwek, największą zaś oleje słonecznikowe.



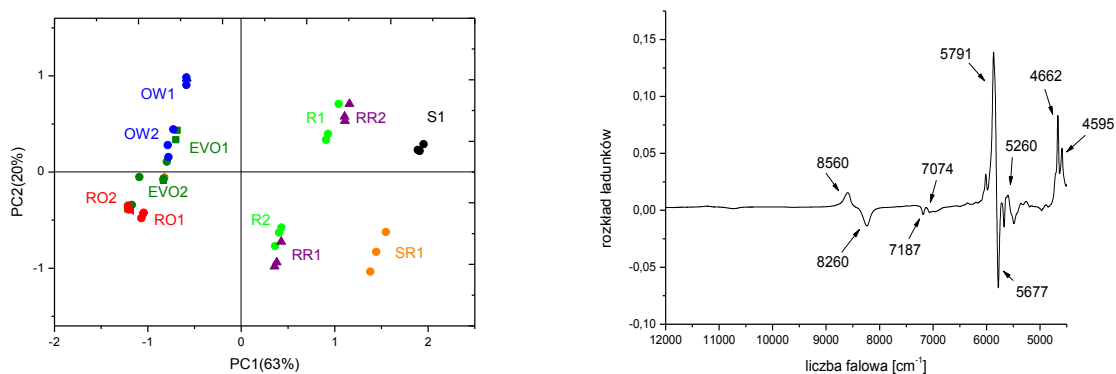
Rysunek 21. Widma absorpcji w zakresie NIR olejów: rzepakowego (R1), rzepakowego rafinowanego (RR1), słonecznikowego tłoczonego na zimno (S1), słonecznikowego rafinowanego (SR1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wytlóków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1). **(A)** – widma dla całego zakresu spektralnego, **(B)** – widma dla zakresu 9000-6500 cm^{-1} , **(C)** – widma dla zakresu 6000-5600 cm^{-1} , **(D)** – widma dla zakresu 5300-4500 cm^{-1} .

Na podstawie badań własnych



Cd. Rysunku 21. Widma absorpcji w zakresie NIR olejów: rzepakowego (R1), rzepakowego rafinowanego (RR1), słonecznikowego tłoczonego na zimno (S1), słonecznikowego rafinowanego (SR1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wyłoków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1). **(A)** – widma dla całego zakresu spektralnego, **(B)** – widma dla zakresu 9000-6500 cm^{-1} , **(C)** – widma dla zakresu 6000-5600 cm^{-1} , **(D)**- widma dla zakresu 5300-4500 cm^{-1} .
Oleje nierozcieńczone. Na podstawie badań własnych

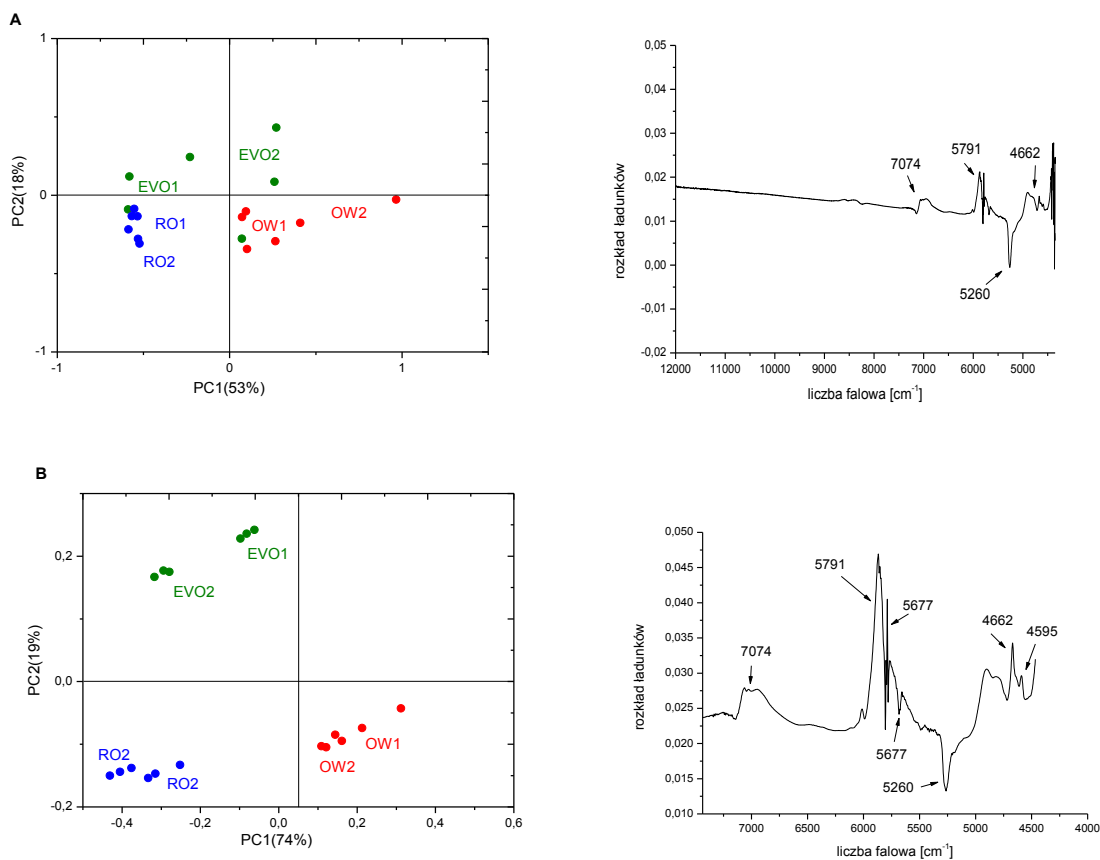
Na rysunku 22 przedstawiono wyniki analizy PCA dla widm absorpcji w zakresie NIR (12500-4000 cm^{-1}). Pierwsza i druga główna składowa wyjaśniają odpowiednio 63 i 20% całkowitej zmienności. PC1 wyjaśnia zmienność związaną z gatunkiem oleju. Oliwy z oliwek charakteryzują się ujemnymi wartościami PC1 zaś pozostałe oleje dodatnimi. Takie rozmieszczenie próbek związane jest z zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych o czym wspomniano podczas interpretacji wyników analizy PCA widm w zakresie MIR. Na podstawie analizy wykresu ładunku można stwierdzić, że PC1 skorelowana jest dodatnio z pasmami przy liczbach falowych: 8560, 7074, 5791, 5260, 4662 i 4595 cm^{-1} oraz ujemnie z pasmami przy liczbach falowych: 8260, 7187 i 5677 cm^{-1} . Na podstawie przeprowadzonej analizy PCA nie obserwuje się zróżnicowania pomiędzy badanymi oliwami z oliwek.



Rysunek 22. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR). Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla dwóch pierwszych głównych składowych PC1 i PC2. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2, rzepakowy tłoczony na zimno R1 i R2, rzepakowy rafinowany RR1 i RR2, słonecznikowy tłoczony na zimno S1, słonecznikowy rafinowany SR1. *Na podstawie badań własnych*

Kolejna analiza PCA miała na celu rozróżnienie widm poszczególnych gatunków oliw. Analizę przeprowadzono pomijając oleje słonecznikowe i rzepakowe. Do analizy wykorzystano cały zakres widma (12500–4000 cm^{-1}). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 23. Dla badanych oliw dwie pierwsze główne składowe opisują 71% całkowitej wariancji zestawu pierwotnych danych, przy czym PC1 uwzględnia 53% całkowitej wariancji a PC2 18%. Analiza PCA dla całego zakresu spektralnego nie ujawniła grupowania oliw z oliwek w zależności od zastosowanego procesu technologicznego. Na podstawie rozkładu ładunków wybrano obszar (7436-4466 cm^{-1}), który posłużył do opracowania nowego modelu PCA, w którym PC1 była dodatnio skorelowana z pasmami przy liczbach falowych: 7074, 5791, 5677, 4662 i 4595 cm^{-1} oraz ujemnie skorelowana z pasmem przy liczbie falowej 5677 i 5260 cm^{-1} . Dwie pierwsze

główne składowe dla analizy PCA zakresu 7436-4466 cm^{-1} opisały 93% całkowitej zmienności danych. PC1 oddziela oliwy z wyłoków od oliw rafinowanych, natomiast PC2 różnicuje oliwy extra virgin od oliw z wyłoków i rafinowanych.



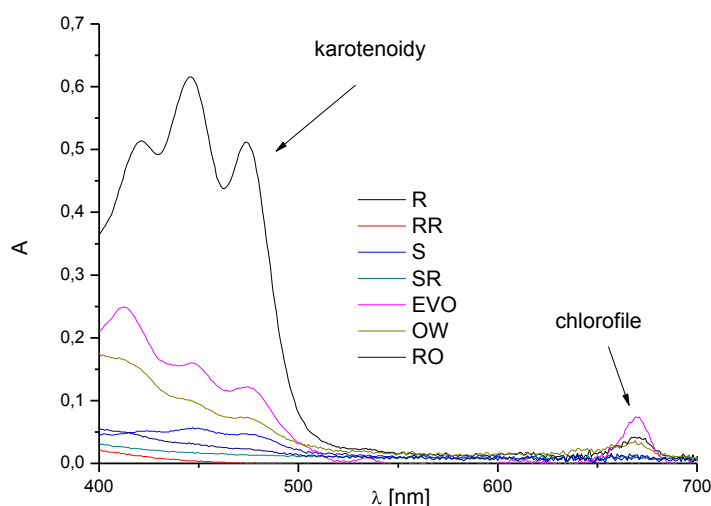
Rysunek 23. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie NIR. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla pierwszej głównej składowej PC1; (A) wyniki analizy PCA dla zakresu 12500-4000 cm^{-1} , (B) wyniki analizy PCA dla zakresu 7436-4466 cm^{-1} . Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2. *Na podstawie badań własnych*

6.3. Widma olejów w zakresie widzialnym (Vis)

W widmach olejów w zakresie widzialnym (Vis) występują pasma charakterystyczne dla barwników karotenoidowych (w zakresie długości fali 450-520 nm) i chlorofilowych. Maksimum absorpcji dla chlorofilu *a* wynosi około 430 i 663 nm, natomiast chlorofilu *b* około 455 i 645 nm. Ponadto w olejach występują pasma z maksimum przy długościach fal 666 nm i 654 nm pochodzące odpowiednio od feofityny *a* i *b* (Ward i in.1994).

Na rysunku 24 przedstawiono widma absorpcji oleju rzepakowego (tłoczonego na zimno i rafinowanego), słonecznikowego (tłoczonego na zimno i rafinowanego) oraz oliw z oliwek: extra virgin, z wyłoków i rafinowanej. W widmach absorpcji w zakresie widzialnym obserwuje

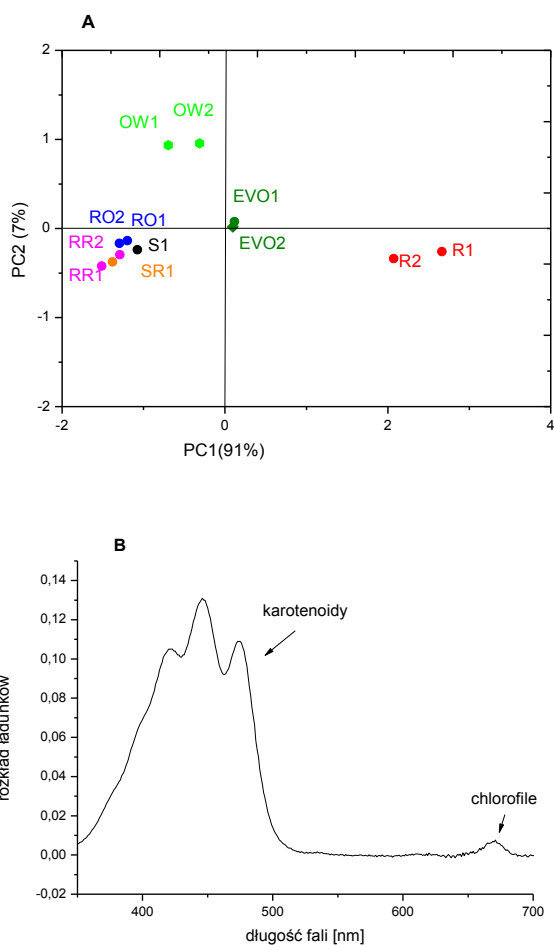
się wyraźne różnice w zależności od technologii otrzymywania oleju. W widmach olejów rafinowanych nie odnotowano obecności pasm pochodzących od barwników karotenoidowych i chlorofilowych, które zostają usunięte w trakcie produkcji. Najbardziej intensywne pasmo w zakresie absorpcji barwników karotenoidowych obecne jest w oleju rzepakowym, następnie w oliwach z oliwek (extra virgin i z wycieków) oraz w oleju słonecznikowym. Intensywność tych pasm odpowiada zawartości karotenoidów występujących w olejach (w oleju rzepakowym 20-50 ppm, w oliwie z oliwek 1-6 ppm) (Rotkiewicz i in. 2002). Oliwy z oliwek (EVO i OW) w porównaniu z pozostałymi olejami, charakteryzują się wyższą zawartością barwników chlorofilowych, wśród których dominuje feofityna *a* (ok. 35 ppm). Analizując widma w zakresie Vis można dostrzec, że badane oliwy, charakteryzowały się większą intensywnością pasma z maksimum absorpcji przy długości fali ok. 666 nm, niż pozostałe oleje. Wskazuje to na większą zawartość chlorofili w oliwach z oliwek, co jest zgodne z danymi przedstawionymi w pracy Rotkiewicz i in. 2002 oraz Giulani, Cerretani i Cichelli 2013.



Rysunek 24. Widma absorpcji w zakresie widzialnym (Vis) oleju rzepakowego tłoczonego na zimno (R1), rzepakowego rafinowanego (RR1), słonecznikowego tłoczonego na zimno (S1), słonecznikowego rafinowanego (SR1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wycieków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1). Oleje nierozcieńczone. Na podstawie badań własnych

Wyniki analizy głównych składowych w zakresie widzialnym (350-750 nm) przedstawiono na rysunku 25. Dla badanych olejów dwie pierwsze główne składowe opisują 98% całkowitej wariancji zestawu pierwotnych danych, przy czym PC1 wyjaśnia 91% całkowitej wariancji a PC2 7%. Składowa PC1 różnicuje badane oleje roślinne na dwie grupy: (1) oleje rzepakowe tłoczone na zimno i oliwy z oliwek extra virgin, scharakteryzowane przez dodatnie wartości PC1, (2) oleje: rzepakowe rafinowane i słonecznikowe (tłoczone na zimno i

rafinowane) oraz oliwy z wyłoków i rafinowane, scharakteryzowane przez ujemne wartości PC1. Takie rozmieszczenie próbek związane jest m.in. ze sposobem otrzymywania oleju. Oleje EVO i R (nie poddane obróbce wstępnej) charakteryzują się większą zawartością barwników w stosunku do oleju słonecznikowego tłoczonego na zimno, którego barwa jest jaśniejsza. W przypadku olejów poddanych procesom rafinacji stwierdza się najmniejszą zawartość tych związków.

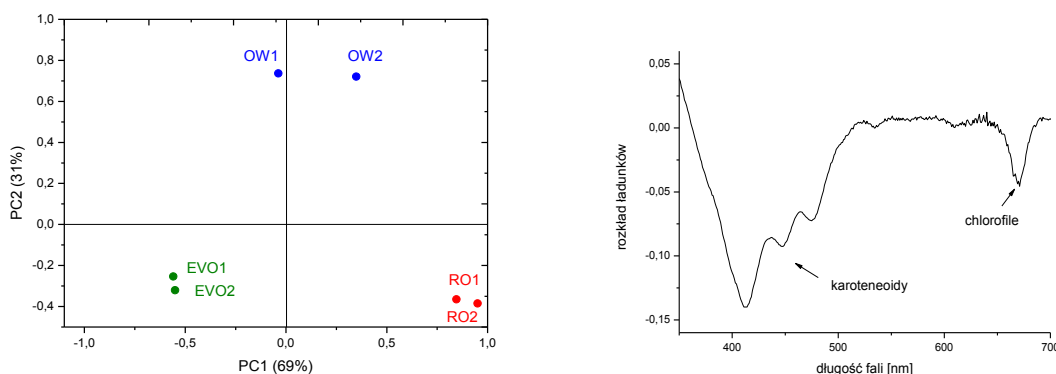


Rysunek 25. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie 350-750 nm. **(A)** – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; **(B)** - wykres ładunków czynnikowych dla pierwszej głównej składowej PC1. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2, rzepakowy tłoczony na zimno R1 i R2, rzepakowy rafinowany RR1 i RR2, słonecznikowy tłoczony na zimno S1, słonecznikowy rafinowany SR1.

Na podstawie badań własnych

W celu porównania widm poszczególnych oliw z oliwek, przeprowadzono analizę głównych składowych z pominięciem pozostałych gatunków olejów, rysunek 26. Do analizy wykorzystano cały zakres widma (350-750 nm). Do opisanego 100% całkowitej zmienności

danych wymagane były dwie główne składowe. Rozmieszczenie próbek względem osi wyznaczonej przez PC1 jest skorelowane z zawartością karotenoidów i chlorofili w badanych olejach. Pierwsza główna składowa opisuje 69% całkowitej zmienności i jest ujemnie skorelowana z pasmem emisji karotenoidów i chlorofili. Składowa PC2 opisująca 31% całkowitej zmienności pozwala na rozróżnienie oliw z wyłoków od oliw rafinowanych i extra virgin.



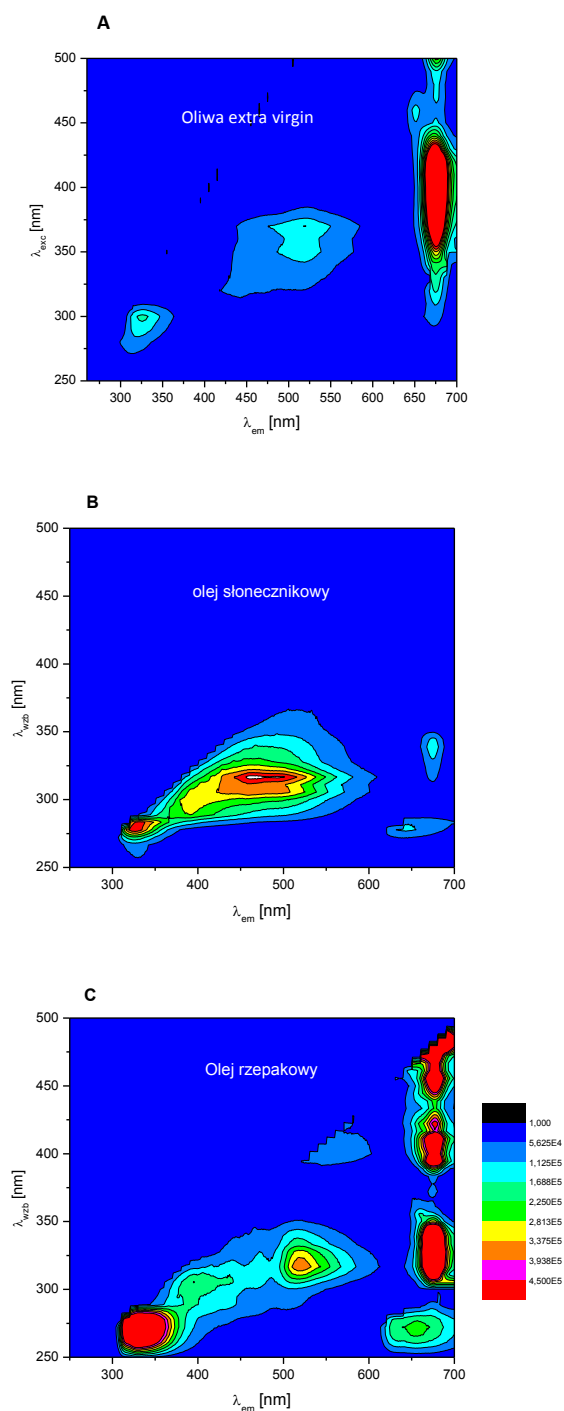
Rysunek 26. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie 350-750 nm. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla pierwszej głównej składowej PC1. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2.

Na podstawie badań własnych

6.4. Widma fluorescencji olejów roślinnych

Na podstawie analizy widm całkowitej fluorescencji olejów roślinnych różnego pochodzenia botanicznego, można wskazać cechy wspólne dla tych produktów, wskazujące na występowanie pewnych charakterystycznych fluoryzujących składników, rysunek 27. Występujące w widmie całkowitej fluorescencji intensywne pasmo z zakresu wzbudzenia 250-320 nm i emisji 300-350 nm pochodzi od emisji tokoferoli. Niewielkie różnice w położeniu maksimum pasma mogą wynikać z obecności różnych grup tokoferoli w różnych olejach roślinnych. Długofalowe pasma emisji z zakresu 660-700 nm pochodzą od emisji chlorofili i feofityn. W widmach oliwy extra virgin i oleju rzepakowego obserwuje się długofalowe pasmo emisji w zakresie 660-700 nm, ze wzbudzeniem 350-500 nm. W oleju słonecznikowym pasmo to występuje w śladowych ilościach. Ponadto w badanych olejach występują pasma w pośrednim zakresie. Dla oleju rzepakowego obecne są dwa pasma z maksimum wzbudzenia/emisji przy około 350/400 nm i 380/520 nm. Dla oleju słonecznikowego obserwuje się szerokie pasmo

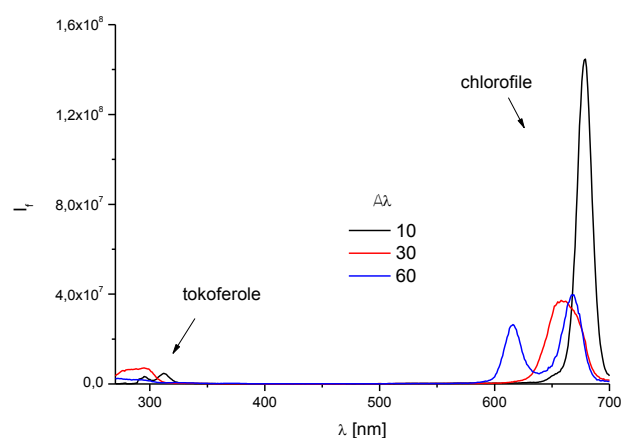
z maksimum wzbudzenia/emisji około 360/475 nm. W oliwie z oliwek pasmo to ma mniejszą intensywność a jego maksimum występuje przy długości fali wzbudzenia 360 nm i emisji 510 nm.



Rysunek 27. Mapy konturowe całkowitej fluorescencji nierozcieńczonych olejów roślinnych w geometrii odbiciowej. **(A)** oliwa EVO1, **(B)** olej słonecznikowy S1, **(C)** olej rzepakowy R1.
Na podstawie Wójcicki i Sikorska (2010)

Inną metodą badania fluorescencji olejów, zawierających kilka emitujących składników jest pomiar widm synchronicznych. W pomiarze widma ważny jest wybór odpowiedniej różnicy między długością fali emisji i wzbudzenia tzw. $\Delta\lambda$. Wraz ze wzrostem $\Delta\lambda$ zwiększa się szerokość spektralna pasm krótkofalowych oraz następuje przesunięcie pasm w stronę fal krótszych wraz ze wzrostem ich intensywności, rysunek 28. Parametr $\Delta\lambda$ określa zakres nakładania się pasm absorpcji i emisji fluoryzujących związków.

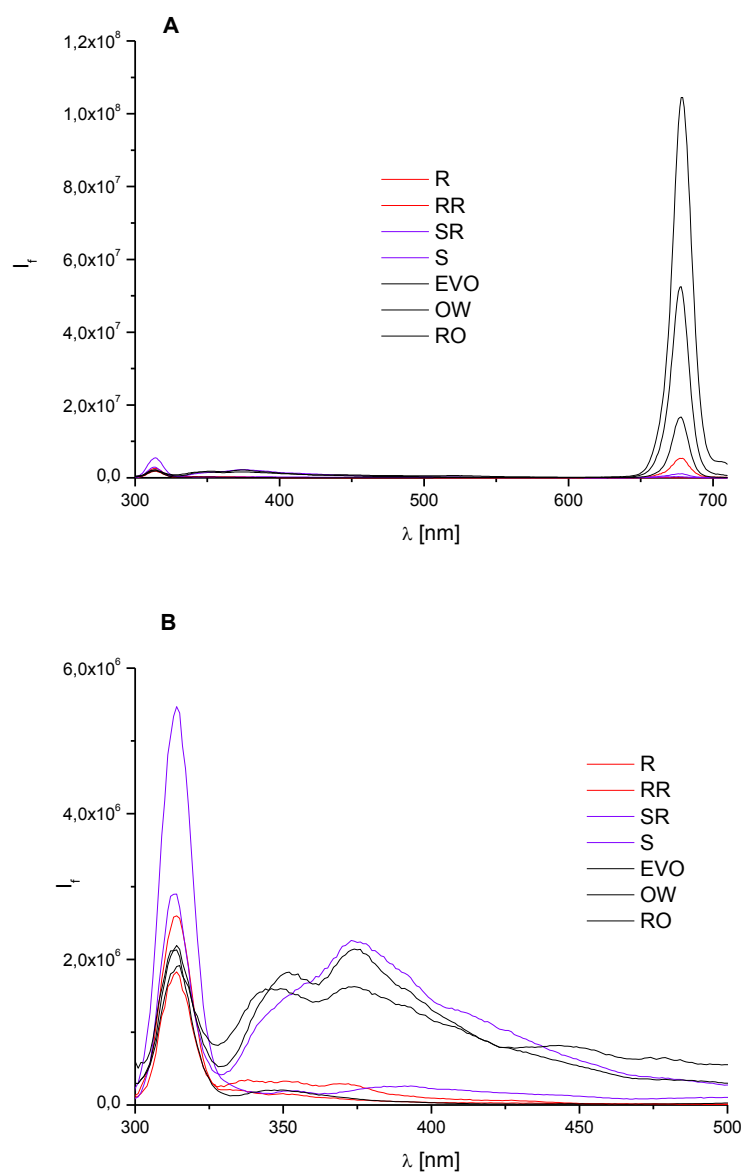
W widmach synchronicznych pasmo z maksimum przy 301 nm emitowane jest przez związki z grupy tokoferoli, natomiast długofalowe pasmo z maksimum przy 666 nm emitowane jest przez takie barwniki jak: chlorofil i feofityna (Sikorska 2008a).



Rysunek 28. Widma synchroniczne fluorescencji nierozcieńczonej oliwy extra virgin (EVO1) zmierzone dla $\Delta\lambda = 10, 30, 60$ nm, geometria odbiciowa.
Na podstawie Wójcicki i Sikorska (2010)

Widma synchroniczne fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) olejów: rzepakowego rafinowanego (RR1) i tłoczonego na zimno (R1), słonecznikowego rafinowanego (SR1) i tłoczonego na zimno (S1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wyłoków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1), przedstawiono na rysunku 29 A. W zakresie 300-320 nm widoczne są różnice w intensywności pasma emisji w zależności od gatunku oleju, rysunek 29 B. Oleje słonecznikowe charakteryzują się największą intensywnością tego pasma, pozostałe oleje wykazują niższą intensywność. Pasma w pośrednim zakresie (350-500 nm) widoczne jest w oliwie z wyłoków i rafinowanej oraz w oleju słonecznikowym rafinowanym. W pozostałych olejach pasmo to jest mniej intensywne. Pasma z maksimum przy długości fali 666 nm jest szczególnie charakterystyczne dla oliw z oliwek, a w szczególności oliwy extra virgin, dla której przyjmuje największą intensywność. Oleje tłoczone na zimno: słonecznikowy i rzepakowy, wykazują emisję przy tej długości fali, jednak intensywność pasma jest znacznie mniejsza niż w przypadku oliw z oliwek.

Oleje rafinowane (słonecznikowy i rzepakowy) nie posiadają pasma emisji z maksimum przy długości fali 666 nm.



Rysunek 29. Widma synchroniczne ($\Delta\lambda = 10$ nm) olejów: oliwa extra virgin EVO, oliwa z wyłoków OW1, oliwa rafinowana RO1, rzepakowy tłoczony na zimno R1, rzepakowy rafinowany RR1, słonecznikowy tłoczony na zimno S1, słonecznikowy rafinowany SR1. **(A)** – widma dla całego zakresu spektralnego, **(B)** – widma dla zakresu 300-500 nm. Oleje nierozcieńczone.

Na podstawie badań własnych.

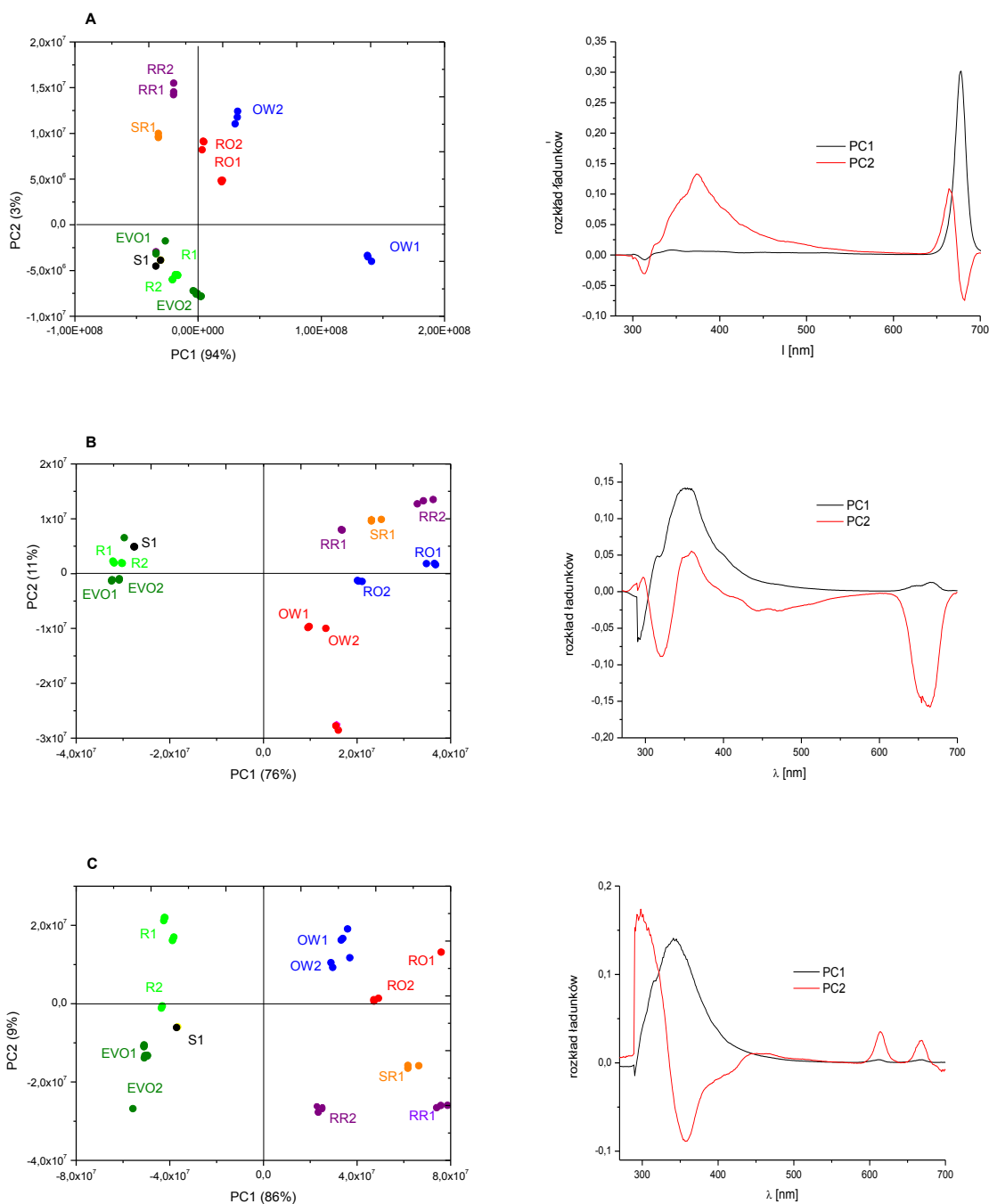
Analizę PCA przeprowadzono dla widm synchronicznych ($\Delta\lambda = 10, 30, 60$ nm) próbek olejów nierozcieńczonych zmierzonych w geometrii odbiciowej (*front face*).

Wyniki analizy PCA widm synchronicznych fluorescencji (dla $\Delta\lambda = 10$ nm) przedstawione na rysunku 30 A, wskazują na możliwość rozróżnienia olejów przez dwie pierwsze główne składowe. Oliwy z wyłoków i rafinowane wykazują dodatnie wartości PC1 a pozostałe oleje

charakteryzują się ujemnymi wartościami PC1. Na podstawie analizy wykresu ładunku można stwierdzić, że PC1, która opisuje 94% całkowitej zmienności, jest negatywnie skorelowana z pasmem emisji tokoferoli i pozytywnie skorelowana z pasmem emisji chlorofili. PC2 wyjaśniająca odpowiednio 3% zmienności jest pozytywnie skorelowana w pasmem emisji w pośrednim zakresie 350-550 nm i negatywnie skorelowana z pasmem emisji w długofalowym i krótkofalowym zakresie widma.

Wyniki analizy PCA widm synchronicznych fluorescencji zmierzonych dla $\Delta\lambda=30$ nm badanych olejów zostały przedstawione na rysunku 30 B. Składowa PC1 opisuje 76% całkowitej zmienności danych wyjściowych zaś PC2 11%. PC1 wyraźnie różnicuje oleje na dwie grupy: (1) oleje tłoczone na zimno (2) oleje otrzymane innymi metodami. Oleje tłoczone na zimno (EVO, R i S) scharakteryzowane są przez ujemne wartości PC1, pozostałe oleje przez dodanie. Składowa PC1 skorelowana jest ujemnie z pasmem z maksimum emisji przy długości fali około 290 nm i dodatnio z pasmem emisji chlorofili oraz z pasmem w pośrednim zakresie (320-400 nm). W przypadku PC2 istotne jest pasmo (ujemnie skorelowane), odpowiadające pasmu emisji chlorofili i w pośrednim zakresie widma.

Wyniki analizy PCA widm synchronicznych fluorescencji olejów zmierzonych dla $\Delta\lambda=60$ nm zostały przedstawione na rysunku 30 C. Składowa PC1 opisuje 86% całkowitej zmienności danych wyjściowych zaś PC2 9%. Analiza PCA tych widm ujawnia grupowanie próbek w zależności od zastosowanej technologii wytwarzania. Próbki olejów rozróżniane są na podstawie PC1, która jest dodatnio skorelowana z zakresem odpowiadającym pasmu emisji w zakresie 310-300 nm. Oleje: EVO, R i S, scharakteryzowane są przez ujemne wartości PC1, pozostałe oleje przez dodatnie. Druga główna składowa jest ujemnie skorelowana z zakresem około 350-450 nm i dodatnio z pasmami w zakresie około 290-350 nm oraz odpowiadającym pasmu emisji chlorofili.



Rysunek 30. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm synchronicznych fluorescencji dla: (A) $\Delta\lambda=10$ nm, (B) $\Delta\lambda=30$ nm, (C) $\Delta\lambda=60$ nm. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel- wykres ładunków czynnikowych dla dwóch głównych składowych PC1 i PC2. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2, rzepakowy tłoczony na zimno R1 i R2, rzepakowy rafinowany RR1 i RR2, słonecznikowy tłoczony na zimno S1, słonecznikowy rafinowany SR1

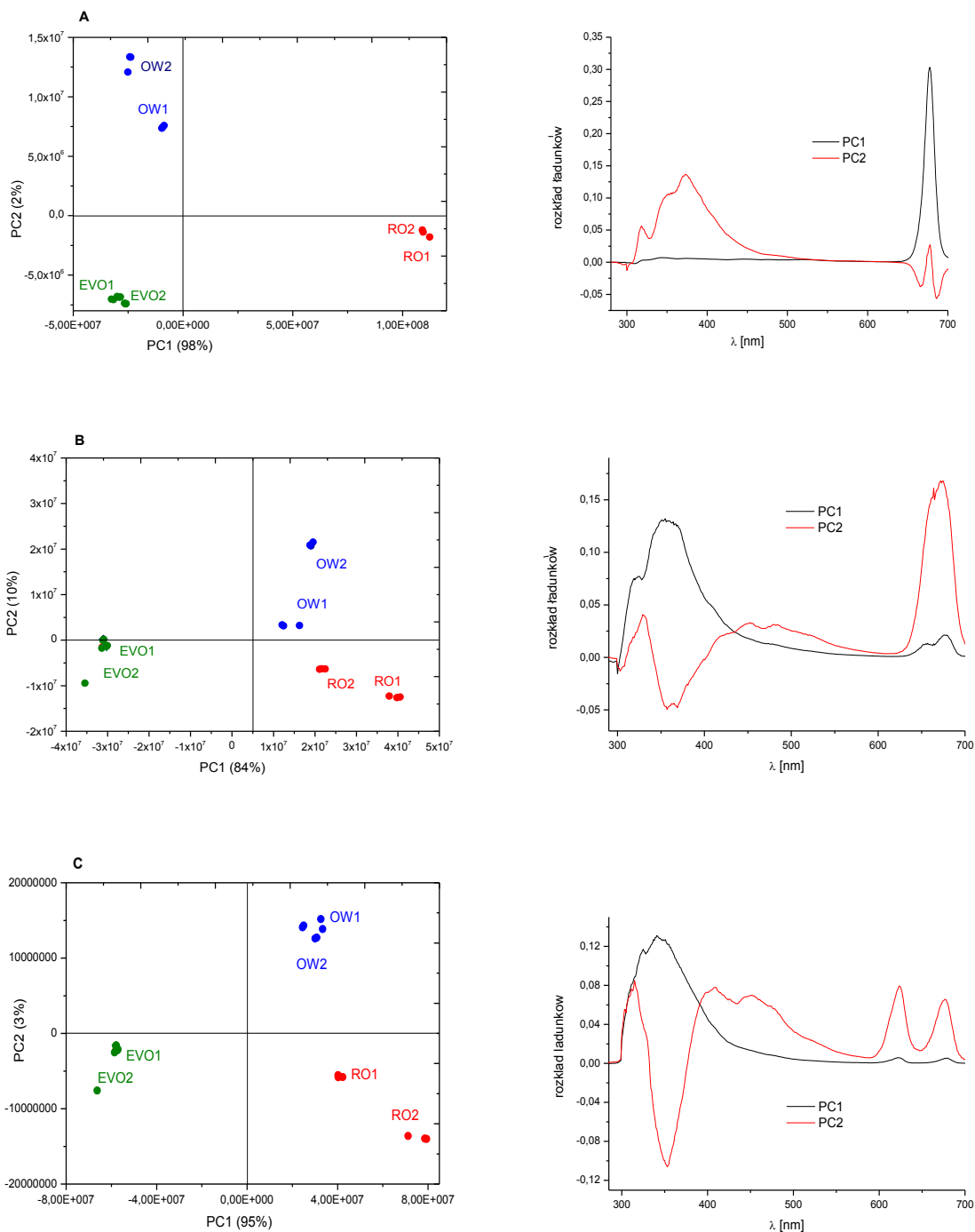
Na podstawie badań własnych.

W celu zbadania możliwości rozróżnienia widm poszczególnych gatunków oliwy z oliwek, przeprowadzono analizę PCA z pominięciem pozostałych gatunków olejów. Do analizy wykorzystano cały zakres widma (280-710 nm).

Na rysunku 31 A, przedstawiono wyniki analizy PCA widm synchronicznych oliw zmierzonych przy $\Delta\lambda=10$ nm. W układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe obserwuje się wyraźne grupowanie próbek oliw w zależności od gatunku. PC1 i PC2 opisują 99% całkowitej zmienności danych. Składowa PC1 skorelowana jest dodatnio z zakresem odpowiadającym pasmu emisji chlorofili i różnicuje oliwy rafinowane (scharakteryzowane przez dodatnie wartości PC1) od oliw extra virgin i z wycieków. W przypadku PC2 istotne jest pasmo w pośrednim zakresie (skorelowane dodatnio) i w mniejszym stopniu pasmo pochodzące od emisji chlorofili (skorelowane ujemnie). PC2 pozwala na rozróżnienie oliw z wycieków (dodatnie wartości PC2) od pozostałych oliw (ujemne wartości PC2).

Wyniki analizy PCA widm różnych gatunków oliwy z oliwek dla $\Delta\lambda=30$ nm przedstawiono na rysunku 31 B. Dla badanych oliw dwie pierwsze główne składowe opisują 94% całkowitej wariancji zestawu pierwotnych danych, przy czym PC1 uwzględnia 84% całkowitej wariancji a PC2 10%. Składowa PC1 skorelowana jest dodatnio z zakresem odpowiadającym pasmu emisji w zakresie 310-410 nm i w niewielkim stopniu z zakresem odpowiadającym pasmu emisji chlorofili. PC1 różnicuje próbki na oliwy extra virgin (scharakteryzowane przez ujemne wartości PC1) i pozostałe oliwy (scharakteryzowane przez dodatnie wartości PC1). Składowa PC2 skorelowana jest ujemnie z pasmem w zakresie 320-400 nm i dodatnio z zakresem odpowiadającym pasmu emisji tokoferoli i chlorofili. PC2 pozwala na rozróżnienie oliw z wycieków (dodatnie wartości PC2) od pozostałych oliw (ujemne wartości PC2).

Wyniki analizy PCA dla widm synchronicznych (zmierzonych przy $\Delta\lambda=60$ nm) przedstawione na rysunku 31 C, ujawniają grupowanie próbek, zależnie od rodzaju oliwy. Składowa PC1 opisująca 95% całkowitej zmienności danych grupuje próbki na oliwy extra virgin (ujemne wartości PC1) i pozostałe oliwy (dodatnie wartości PC1). Składowa PC2 (3%) grupuje próbki na oliwy z wycieków (dodatnie wartości PC2) i pozostałe oliwy (ujemne wartości PC2). Na podstawie wykresu ładunków można stwierdzić, że PC1 jest dodatnio skorelowana z pasmem w zakresie 310-410 nm, natomiast PC2 jest ujemnie skorelowana z pasmem w zakresie 320-400 nm oraz dodatnio z pasmem emisji chlorofili.



Rysunek 31. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm synchronicznych fluorescencji dla: **(A)** $\Delta\lambda=10$ nm, **(B)** $\Delta\lambda=30$ nm, **(C)** $\Delta\lambda=60$ nm. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla dwóch głównych składowych PC1 i PC2. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wytlóków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2. *Na podstawie badań własnych*

Dla widm synchronicznych niezależnie od wartości parametru $\Delta\lambda$ obserwuje się grupowanie olejów różnych gatunków w układzie współrzędnych wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe. Składowe te opisują dla wszystkich analizowanych modeli nie mniej niż 88% całkowitej zmienności danych.

6.5. Podsumowanie

Widma uzyskane z zastosowaniem różnych technik spektroskopowych zawierają informacje o składnikach chemicznych olejów. Widma w zakresie NIR i MIR to pasma pochodzące głównie od kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli. Pasma w zakresie Vis przypisuje się absorpcji barwników karotenoidowych i chlorofilowych. Fluorescencja olejów jest wynikiem obecności związków z grupy tokoferoli, chlorofili, fenoli i pozostałych fluoryzujących składników.

Widma w zakresie NIR i MIR tych samych gatunków olejów rafinowanych i tłoczonych na zimno są praktycznie nierozróżnialne. Widma różnych gatunków olejów mimo podobieństw wykazują odmienny kształt i intensywność niektórych pasm.

W zakresie MIR istotne różnice w widmach różnych gatunków olejów występowały w pasmach charakterystycznych dla drgań związanych z wiązaniami podwójnymi C=C w konfiguracji *cis*: 3006, 1397, 914 i 723 cm^{-1} , oraz dla drań C-H grupy –C-H (-CH₂)- przy liczbach falowych: 2853 i 2924 cm^{-1} .

W widmach w zakresie NIR charakterystyczne różnice dla różnych olejów występowały w pasmach charakterystycznych dla drgań związanych z pierwszym nadtonem C-H przy liczbach falowych: 5791, 5810, oraz dla drgań grupy –HC=CH- przy liczbach falowych: 4662 i 4595 cm^{-1} .

Zawartość barwników karotenoidowych i chlorofilowych oraz tokoferoli w olejach roślinnych zależy od gatunku oleju, jakości surowca i zastosowanych procesów technologicznych podczas jego produkcji. Widma absorpcji w zakresie Vis oraz widma synchroniczne fluorescencji, wykazywały znaczące różnice w kształcie pasm w zależności od składu i stopnia przetworzenia oleju. W widmach w zakresie Vis olejów rafinowanych nie odnotowano obecności pasm pochodzących od barwników karotenoidowych i chlorofilowych, które są usuwane w trakcie procesów produkcyjnych. W olejach tłoczonych na zimno intensywność pasma absorpcji barwników karotenoidowych i chlorofilowych była uzależniona od rodzaju oleju.

W widmach fluorescencji wszystkich olejów występowały pasma emisji tokoferoli. Ponadto w olejach występowały inne fluoryzujące składniki (m.in. chlorofile), których obecność

była uzależniona od rodzaju oleju i sposobu jego otrzymywania.

7. BADANIA ZAFALSZOWAŃ OLIWY EXTRA VIRGIN

7.1. Wprowadzenie

Oliwa z oliwek typu extra virgin należy do najwyższej kategorii oliw w związku z tym jest również i najdroższa. Zafalszowanie jej przez dodanie oleju tańszego lub niższej jakości (np. oleju słonecznikowego lub rafinowanej oliwy z oliwek) powoduje, że konsument otrzymuje produkt niepełnowartościowy, w cenie produktu o wyższej jakości. Opracowanie metod wykrywania zafalszowań oliwy jest przedmiotem intensywnych badań, które omówiono w części literaturowej.

Obecnie w literaturze istnieje wiele przykładów zastosowań metod spektroskopowych w badaniu zafalszowań oliwy extra virgin olejem słonecznikowym, przedstawiono je w rozdziale 2.3.3. części literaturowej. Większość tych prac ogranicza się jednak do zastosowania jednej techniki pomiarowej.

Celem pierwszego etapu badań było porównanie metod spektroskopowych w zakresie bliskiej i podstawowej podczerwieni oraz fluorescencyjnych do badania zafalszowań oliwy extra virgin olejem słonecznikowym.

Aktualny stan wiedzy dotyczący zafalszowań oliwy z oliwek oliwą rafinowaną bądź deodoryzowaną jest stosunkowo niewielki, dlatego w drugim etapie badań podjęto próbę określenia składu procentowego mieszanin olejów (EVO z oliwą RO lub DO) na podstawie pomiarów widm absorpcyjnych (w zakresie Vis, MIR i NIR) i emisyjnych.

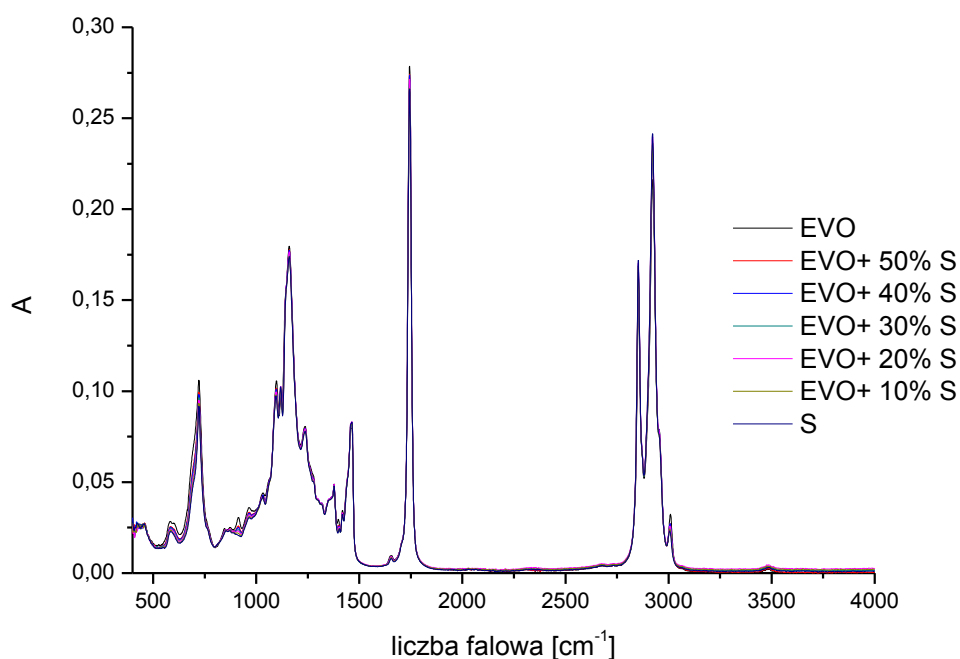
7.2. Badanie zafalszowań oliwy extra virgin olejem słonecznikowym

7.2.1. Charakterystyka widm

Zakres podstawowej podczerwieni

Widma w zakresie MIR oliwy extra virgin i oleju słonecznikowego oraz ich mieszanin przedstawiono na rysunku 32. Widma oliwy i oleju słonecznikowego są do siebie podobne, jednak w niektórych rejonach można dostrzec różnice w kształcie pasm, które zostały omówione szczegółowo w rozdziale dotyczącym charakterystyki widm olejów roślinnych. Wraz ze

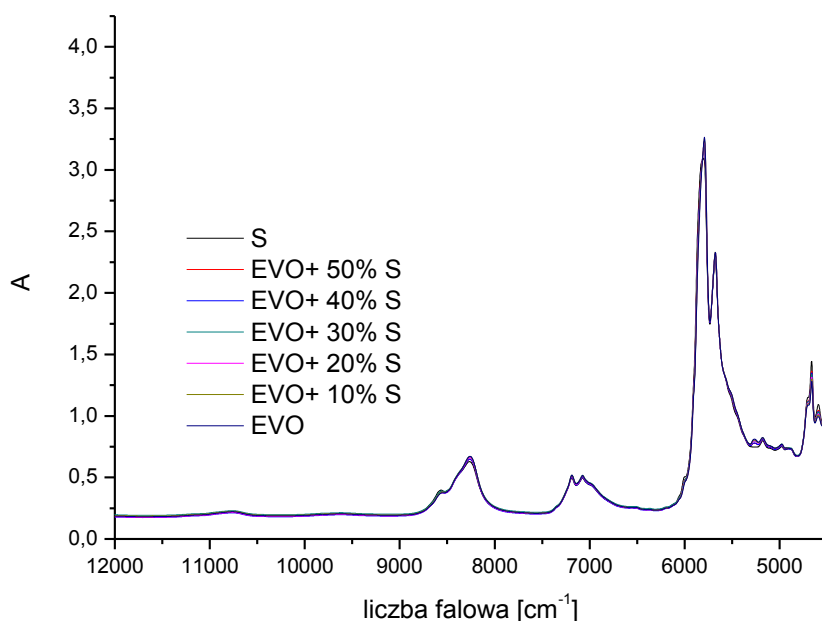
wzrostem stężenia oleju słonecznikowego w mieszaninie obserwuje się wzrost intensywności pasm w zakresie 1500-500 cm^{-1} .



Rysunek 32. Porównanie widm oliwy z oliwek extra virgin (EVO1), oleju słonecznikowego (S3) i mieszanin oliwy extra virgin z olejem słonecznikowym (dodatek oleju fałszującego na poziomie 10,20,30,40 i 50%) w zakresie podstawowej podczerwieni (MIR). *Na podstawie badań własnych*

Zakres bliskiej podczerwieni (NIR)

Widma w zakresie bliskiej podczerwieni oleju słonecznikowego i oliwy z oliwek extra virgin oraz ich mieszanin, przedstawiono na rysunku 33. Wraz ze wzrostem stężenia oleju słonecznikowego w mieszaninach obserwuje się wzrost intensywności pasm w zakresach: 8865-8042 cm^{-1} , 7270-6870 cm^{-1} i 6256-4500 cm^{-1} .

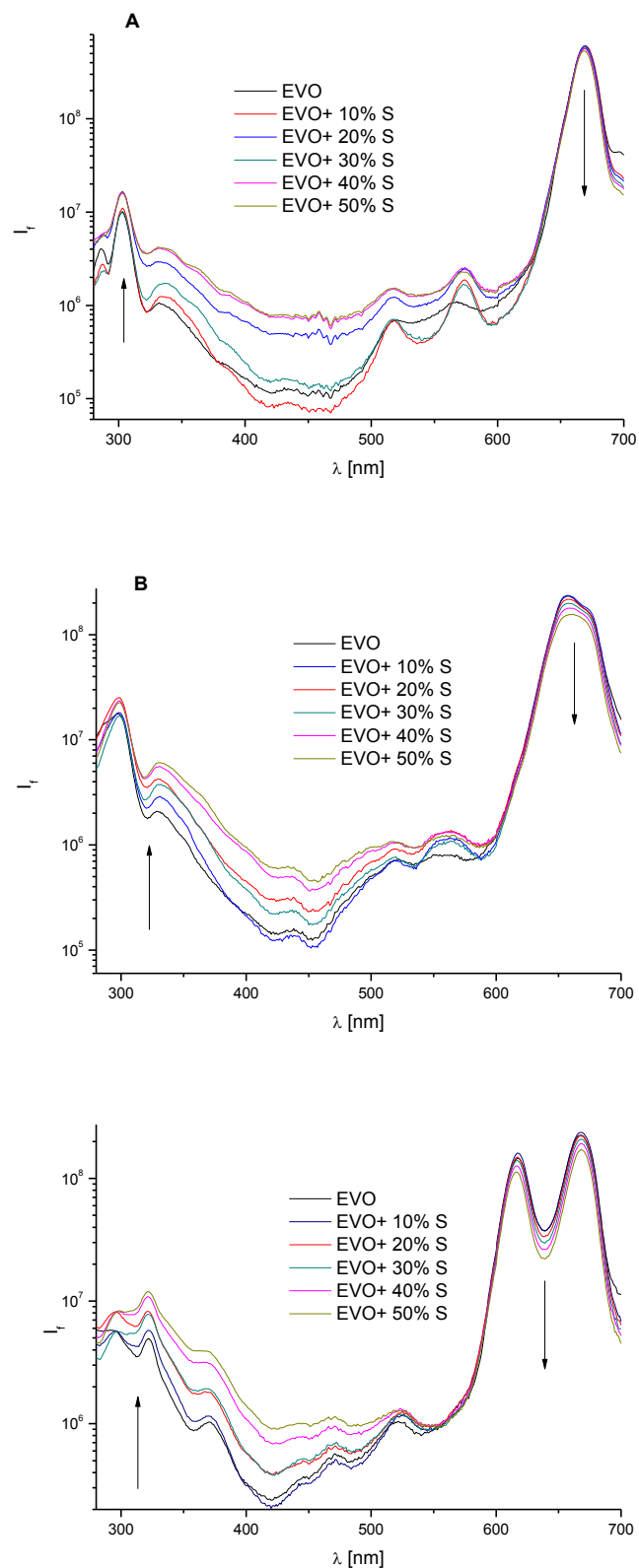


Rysunek 33. Porównanie widm oliwy z oliwek extra virgin (EVO1), oleju słonecznikowego (S3) i mieszanin oliwy extra virgin z olejem słonecznikowym (dodatek oleju fałszującego na poziomie 10,20,30,40 i 50%) w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR). *Na podstawie badań własnych*

Widma fluorescencji

Widma synchroniczne fluorescencji mieszanin oliwy extra virgin (EVO1) z olejem słonecznikowym (S3) zmierzone dla $\Delta\lambda=10, 30$ i 60 nm w geometrii odbiciowej, przedstawiono na rysunku 34. Widma przedstawiono w skali logarytmicznej.

W widmach można zaobserwować zmiany intensywności pasm w zależności od stężenia dodatku fałszującego w mieszaninie z oliwą z oliwek. W zakresie emisji tokoferoli (300-350 nm) obserwuje się wzrost intensywności pasma wraz ze wzrostem stężenia oleju słonecznikowego w mieszaninie. Odwrotną zależność odnotowano dla pasma odpowiadającego emisji chlorofili (600-700 nm). Również w pośrednim zakresie widma obserwuje się wzrost intensywności pasm wraz ze wzrostem stężenia oleju słonecznikowego w mieszaninie z oliwą z oliwek.



Rysunek 34. Widma synchroniczne fluorescencji oliwy z oliwek extra virgin (EVO1) i mieszanin oliwy extra virgin z olejem słonecznikowym (dodatek oleju fałszującego na poziomie 10,20,30,40 i 50%). **(A)** widma synchroniczne dla $\Delta\lambda=10$ nm, **(B)** widma synchroniczne dla $\Delta\lambda=30$ nm, **(C)** widma synchroniczne dla $\Delta\lambda=60$ nm. Oleje nierozcieńczone, geometria odbiciowa. Na podstawie badań własnych

7.2.2. Modele regresji mieszanin

Analiza PLS i PCR widm w zakresie podstawowej podczerwieni

W celu zbadania możliwości określenia stężenia dodatku oleju słonecznikowego w mieszaninie z oliwą z oliwek na podstawie zmierzonych widm, przeprowadzono analizę regresji PLS i PCR.

Wyniki przeprowadzonych analiz regresji przedstawiono w tabeli 6. Dla modeli PLS widm w całym zmierzonym zakresie spektralnym ($4000-400\text{ cm}^{-1}$), bez zastosowania wstępnego przekształcenia widm, uzyskano dobrą korelację widm i poziomu zafałszowania. Analiza wybranych zakresów widm poprawiła otrzymane wyniki.

Zastosowanie przekształceń widm wpłynęło na poprawę wyników regresji. W większości przypadków najlepsze rezultaty otrzymano po korekcji rozproszenia MSC (ang. *Multiplicate Scatter Correction, MSC*) lub po zastosowaniu metody MSC dla pierwszej pochodnej widm. Najlepszy model PLS, z jedną zmienną, otrzymano dla przekształcenia MSC wraz z pierwszą pochodną dla zakresu widma $1500-900\text{ cm}^{-1}$ (zakres daktyloskopowy). Wartość RPD dla tego modelu wynosiła 12, co wskazuje na bardzo dobrą zdolność przewidywania stopnia zafałszowania.

Modele otrzymane dla analizy PCR charakteryzowały się zbliżonymi parametrami, w porównaniu z modelami otrzymanymi dla analizy PLS. Najlepszy model PCR otrzymano dla przekształcenia MSC wraz z pierwszą pochodną dla zakresu widma zwanego obszarem daktyloskopowym ($1500-900\text{ cm}^{-1}$). Uzyskany model również cechował się bardzo dobrymi parametrami (RPD= 11,1).

Dla wszystkich analizowanych modeli uzyskano bardzo dobrą korelację widm w zakresie podstawowej podczerwieni (MIR) i składu procentowego mieszaniny.

Tabela 6. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm w zakresie MIR i składu mieszanin oliwy z oliwek z olejem słonecznikowym

Zakres widma [cm ⁻¹]	Przekształcenie widm	PLS					PCR				
		LV	R ²	RMSECV [%]	SECV [%]	RPD	LV	R ²	RMSECV [%]	SECV [%]	RPD
4000-400	---	1	0,99	1,6	1,6	9,7	1	0,99	1,7	1,7	9,1
	MSC	1	0,96	3,3	3,4	4,7	2	0,98	2,4	2,4	6,5
	MSC+1 pochodna	1	0,93	4,1	4,2	3,8	1	0,92	4,5	4,6	3,4
	MSC+2 pochodna	5	0,68	8,7	9,0	1,8	2	0,86	10,5	10,7	1,4
1500-900	---	2	0,99	1,6	1,6	9,7	2	0,98	2	2	7,8
	MSC	1	0,99	1,6	1,7	9,7	1	0,99	1,7	1,7	9,1
	MSC+1 pochodna	1	0,99	1,3	1,4	12	1	0,99	1,3	1,4	11,1
	MSC+2 pochodna	2	0,98	1,9	1,9	8,2	2	0,99	1,7	1,7	9,1
1500-500	---	1	0,98	2,1	2,2	7,4	1	0,98	2,2	2,2	7,1
	MSC	1	0,99	1,8	1,9	8,6	1	0,99	1,8	1,9	8,2
	MSC+1 pochodna	1	0,99	1,4	1,4	11	1	0,99	1,4	1,4	11,1
	MSC+2 pochodna	2	0,94	3,9	4	4	3	0,92	4,4	4,5	3,4
1905-1592	---	2	0,99	1,6	1,7	9,7	2	0,99	1,6	1,7	9,1
	MSC	2	0,99	1,3	1,3	11,9	2	0,99	1,3	1,4	11,1
	MSC+1 pochodna	3	0,94	3,8	3,9	4	1	0,91	4,6	4,7	3,3
	MSC+2 pochodna	1	0,90	5,1	5,2	3	1	0,90	5,1	5,3	2,9
4000-2501	---	2	0,98	2,1	2,1	7,4	2	0,98	2,1	2,2	7,1
	MSC	1	0,98	2,2	2,3	7	1	0,98	2,2	2,3	6,7
	MSC+1 pochodna	1	0,99	1,7	1,7	9	1	0,99	1,7	1,7	9,1
	MSC+2 pochodna	2	0,92	4,6	4,7	3,4	1	0,89	5,3	5,4	2,9

Na podstawie badań własnych

Analiza PLS i PCR widm w zakresie bliskiej podczerwieni

W tabeli 7 przedstawiono wyniki analiz regresji widm w zakresie NIR. Dla wszystkich modeli uzyskano znaczące korelacje dla składu procentowego mieszanin oraz widm absorpcji w zakresie NIR. Analizy regresji przeprowadzono zarówno dla całego zakresu widma (12500-4410 cm⁻¹) jak również dla wybranych jego części. Wybór zakresu 6150-4500 cm⁻¹ poprawił rezultaty przeprowadzonej analizy dla całego zakresu. Nieco słabsze dopasowanie uzyskano natomiast dla analizy widma w rejonie 9009-6410 cm⁻¹.

Najlepsze rezultaty dla analizy PLS otrzymano stosując przekształcenie MSC i analizując widma w całym zakresie lub uwzględniając rejon 6150-4500 cm⁻¹.

Najlepsze dopasowanie dla analizy PCR uzyskano również wybierając zakres 6150-4500 cm⁻¹, jednak w tym przypadku zastosowano przekształcenie MSC wraz z pierwszą pochodną.

Modele uzyskane dla analizy regresji PLS i PCR widm w zakresie NIR charakteryzowały się słabszym dopasowaniem niż odpowiednie modele dla widm w zakresie MIR. Najwyższa wartość błędu RPD dla analizy PLS wynosiła 8,6 (dla widm w zakresie NIR) podczas gdy dla modelu w zakresie MIR wartość RPD (dla najlepszego modelu) wynosiła 12.

Tabela 7. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm w zakresie NIR i składu mieszanin oliwy z oliwek z olejem słonecznikowym

Zakres widma [cm ⁻¹]	Przekształcenie widm	PLS					PCR				
		LV	R ²	RMSECV [%]	SECV [%]	RPD	LV	R ²	RMSECV [%]	SECV [%]	RPD
12500-4410	---	2	0,98	2,3	2,4	6,7	2	0,98	2,4	2,5	6,5
	MSC	1	0,99	1,8	1,9	8,6	1	0,99	1,9	1,9	8,2
	MSC+1 pochodna	1	0,98	2,1	2,1	7,4	1	0,98	2,1	2,1	7,4
	MSC+2 pochodna	1	0,83	6,5	6,6	2,4	10	0,72	8,3	8,5	1,9
6150-4500	---	2	0,98	1,9	1,9	8,2	2	0,98	1,9	1,9	8,2
	MSC	1	0,99	1,8	1,9	8,6	1	0,99	1,8	1,9	8,6
	MSC+1 pochodna	1	0,99	1,8	1,8	8,6	1	0,99	1,8	1,8	8,6
	MSC+2 pochodna	5	0,95	3,4	3,5	4,6	8	0,88	5,7	5,7	2,7
9009-6410	---	3	0,98	2,4	2,5	6,5	4	0,98	2,0	2,1	7,8
	MSC	1	0,97	2,5	2,5	6,2	2	0,98	2	2,1	7,8
	MSC+1 pochodna	1	0,98	2	2	7,8	1	0,98	2	2,1	7,8
	MSC+2 pochodna	4	0,91	4,8	4,9	3,2	5	0,88	5,4	5,5	2,9

Na podstawie badań własnych

Analiza PLS i PCR widm synchronicznych fluorescencji

Dla widm synchronicznych fluorescencji (zmierzonych dla $\Delta\lambda=10, 30$ i 60 nm) mieszanin oliwy z oliwek i oleju słonecznikowego przeprowadzono analizę regresji metodą PLS i PCR. Wyniki z przeprowadzonych analiz regresji przedstawiono w tabeli 8.

Dla widm synchronicznych fluorescencji dla $\Delta\lambda=10$ nm najlepsze rezultaty, zarówno dla analizy PLS jak i PCR, otrzymano analizując środkową część widma (320-500 nm) bez konieczności jego przekształcenia. Ponadto po zastosowaniu przekształcenia widma dla tego samego zakresu przy pomocy drugiej pochodnej uzyskano gorsze wyniki.

Analizę widm synchronicznych fluorescencji dla $\Delta\lambda=30$ i 60 nm przeprowadzono dla widm bez wstępnego przekształcenia matematycznego oraz po przekształceniu przy zastosowaniu pierwszej pochodnej. Przekształcenie przy wykorzystaniu drugiej pochodnej zostało celowo pominięte, gdyż nie poprawiało uzyskanych wyników.

Analizując modele otrzymane dla widm synchronicznych fluorescencji dla $\Delta\lambda=30$ nm można stwierdzić, że najlepsze rezultaty, zarówno dla analizy PLS jak i PCR, otrzymano analizując zakres charakterystyczny dla emisji chlorofili (500-700 nm).

Dla widm synchronicznych fluorescencji zmierzonych przy $\Delta\lambda=60$ nm uzyskano wysokie korelacje pomiędzy widmami a stopniem zafałszowania oleju. Najlepszy rezultat dla analizy PLS otrzymano, analizując widma w całym zakresie spektralnym (bez konieczności ich przekształcania). Najlepsze dopasowanie modelu PCR uzyskano dla zakresu emisji chlorofili

bądź uwzględniając zakres pośredni (320-500 nm). Otrzymany model miał nieco gorsze dopasowanie niż model uzyskany dla analiz regresji PLS.

Dla wszystkich opracowanych modeli uzyskano dobrą korelację między zmierzonymi widmami synchronicznymi fluorescencji a stopniem zafalszowania oleju.

Tabela 8. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=10, 30$ i 60 nm) i składu mieszanin oliwy z oliwek z olejem słonecznikowym

$\Delta\lambda$	Zakres widma [nm]	Przekształcenie widm	PLS					PCR				
			LV	R ²	RMSECV [%]	SECV [%]	RPD	LV	R ²	RMSECV [%]	SECV [%]	RPD
10	280-700	---	4	0,98	2,3	2,4	6,7	4	0,98	2,4	2,4	6,5
		1 pochodna	3	0,97	2,6	2,6	6,0	3	0,97	2,6	2,7	5,7
		2 pochodna	2	0,90	5,2	5,4	3,0	7	0,88	5,4	5,5	2,8
	280-320	---	7	0,96	3,0	3,1	5,2	4	0,88	5,5	5,6	2,8
		1 pochodna	3	0,88	5,5	5,5	2,8	2	0,86	6,0	6,1	2,5
		2 pochodna	3	0,44	12,0	12,1	1,3	7	0,40	12,4	12,5	1,2
	320-500	---	2	0,98	2,1	2,2	7,4	2	0,98	2,1	2,2	7,1
		1 pochodna	2	0,96	3,3	3,4	4,7	2	0,95	3,3	3,4	4,6
		2 pochodna	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	500-700	---	4	0,98	2,2	2,3	7,1	5	0,97	2,5	2,5	6,2
		1 pochodna	3	0,98	2,2	2,3	7,1	3	0,98	2,3	2,4	6,5
		2 pochodna	2	0,89	5,3	5,4	2,9	7	0,88	5,4	5,5	2,8
30	280-700	---	3	0,98	2,2	2,3	7,1	3	0,97	2,3	2,3	6,7
		1 pochodna	2	0,97	2,5	2,6	6,2	2	0,97	2,6	2,6	6,0
	280-320	---	3	0,90	5,0	5,1	3,1	4	0,92	4,5	4,6	3,4
		1 pochodna	3	0,91	4,7	4,8	3,3	4	0,89	5,3	5,4	2,9
	320-500	---	3	0,98	2,2	2,3	7,1	3	0,98	2,2	2,3	7,1
		1 pochodna	1	0,98	2,4	2,4	6,5	1	0,97	2,5	2,5	6,2
	500-700	---	2	0,98	1,9	2,0	8,2	2	0,97	2,6	2,7	6,0
		1 pochodna	2	0,98	1,9	2,0	8,2	3	0,98	2,0	2,1	7,8
60	280-700	---	3	0,99	1,6	1,7	9,7	2	0,97	2,6	2,7	6,0
		1 pochodna	3	0,96	3,1	3,2	5,0	3	0,94	3,8	3,8	4,1
	280-320	---	2	0,94	3,8	3,9	4,1	2	0,94	3,8	3,9	4,1
		1 pochodna	1	0,94	3,9	4,0	4,0	1	0,94	3,9	4,0	4,0
	320-500	---	4	0,97	2,5	2,6	6,2	5	0,98	2,4	2,4	6,5
		1 pochodna	2	0,96	3,3	3,4	4,7	2	0,96	3,3	3,3	4,7
	500-700	---	2	0,98	2,1	2,2	7,4	2	0,98	2,4	2,4	6,5
		1 pochodna	3	0,96	3,1	3,2	5,0	3	0,94	3,8	3,9	4,1

Na podstawie niepublikowanych badań własnych

7.3 Badanie zafalszowań oliwy extra virgin oliwą rafinowaną i deodoryzowaną

7.3.1. Charakterystyka oliw

W tej części pracy wykorzystano do badań oliwy: extra virgin (EVO), deodoryzowane (DO) i rafinowane (RO). Oliwa EVO stanowiła mieszaninę z czterdziestu oliw extra virgin. Oliwa RO była mieszaniną dwudziestu siedem oliw rafinowanych, zaś oliwa DO składała się z sześciu oliw deodoryzowanych. Właściwości oliw wykorzystanych w tym rozdziale zostały szczegółowo opisane w pracy Caponio i in. (2011). W tabeli 9 przedstawiono średnie wartości oznaczonych parametrów chemicznych dla badanych próbek olejów. Wartości liczby nadtlenkowej mieściły

się w granicach od 1,9-18 meqO₂/kg i były najwyższe w oliwie dezodoryzowanej. Również zawartość pierwotnych produktów utlenienia, o których informuje współczynnik absorpcji K₂₃₂ był najwyższy w oliwie DO. W oliwie extra virgin i rafinowanej wartości te były niższe. W oliwie RO zawartość wtórnych produktów utlenienia wynosiła 0,714 i była wyższa niż w pozostałych oliwach, dla których współczynnik absorpcji K₂₇₀ przyjmował wartości 0,120 i 0,67 (odpowiednio dla EVO i DO). Ilość wolnych kwasów tłuszczowych była niewielka we wszystkich oliwach i wynosiła 0,67, 0,54 i 0,29 g/100g, odpowiednio dla oliwy EVO, DO i RO. Zawartość związków polarnych była wyższa w oliwach RO (4,75 g/100g) i DO (4,48 g/100g) w porównaniu z oliwą EVO (2,40 g/100g). Oligopolimery triacylogliceroli nie były obecne w oliwie EVO, natomiast w oliwie RO i DO ich zawartość wynosiła odpowiednio 0,31 i 0,05 g/100g.

Tabela 9. Średnie wartości parametrów chemicznych zestawów oliw: EVO, DO i RO

	EVO	DO	RO
Wolne kwasy tłuszczowe [g/100g]	0,67	0,54	0,29
Liczba nadtlenkowa [meq O ₂ /kg]	3,8	18	1,9
K ₂₃₂	1,310	2,445	1,729
K ₂₇₀	0,120	0,167	0,714
Związki polarne [g/100g]	2,40	4,38	4,75
Oligopolimery triacylogliceroli) [g/100g]	0,00	0,05	0,31
Utlenione triacyloglicerole) [g/100g]	0,26	1,36	0,76
Diacyloglicerole) [g/100g]	1,20	2,07	3,03
Stigmastadieny) [g/100g]	0,00	0,10	5,17

Na podstawie Caponio i in. (2011)

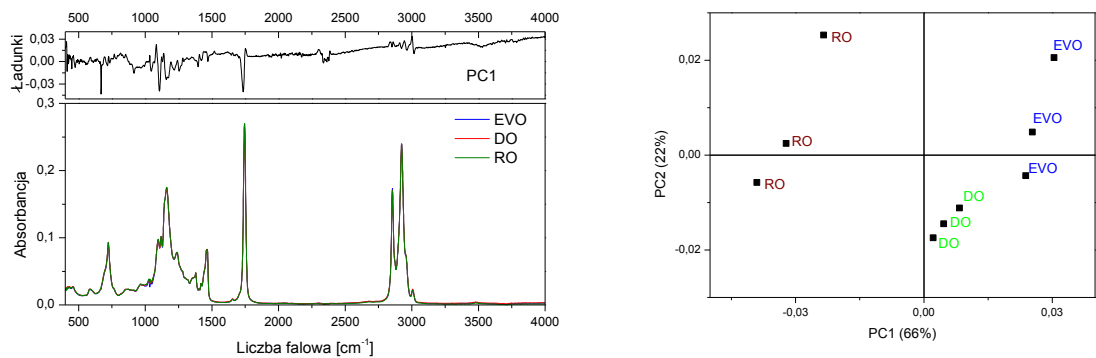
7.3.2. Charakterystyka widm

Zakres podstawowej podczerwieni (MIR)

Widma badanych oliw w zakresie MIR przedstawiono na rysunku 35 A. Widma oliw EVO, DO i RO nie wykazują zauważalnych różnic.

W celu rozróżnienia poszczególnych oliw, przeprowadzona została analiza PCA. Do analizy PCA wykorzystano po trzy widma dla każdego oleju roślinnego. Dla badanych olejów dwie pierwsze główne składowe opisują 88% całkowitej wariancji zestawu pierwotnych danych, PC1 uwzględnia 66% całkowitej wariancji a PC2 22%, rysunek 35 B. Składowa PC1 różnicuje oleje na DO i EVO (scharakteryzowaną przez dodanie wartości PC1) oraz na RO

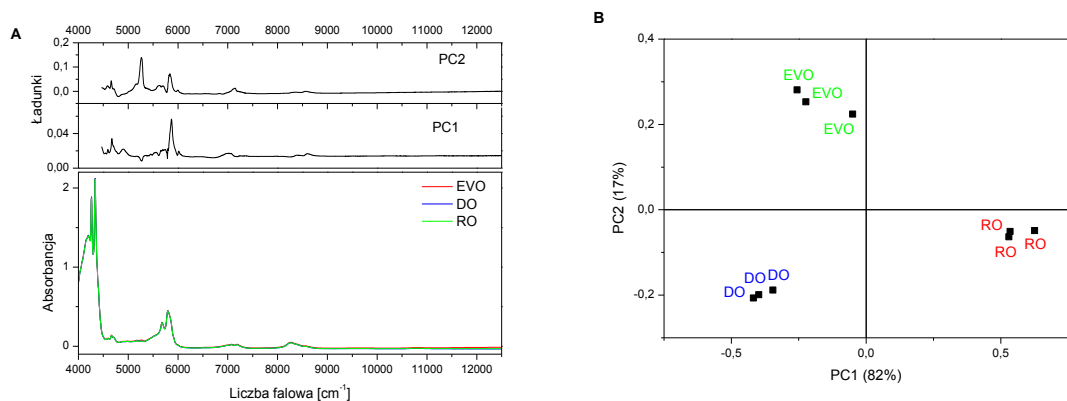
(scharakteryzowaną przez ujemne wartości PC1). Składowa PC2 różnicuje natomiast EVO i RO (scharakteryzowane przez dodanie wartości PC2) od DO (scharakteryzowanej przez ujemne wartości PC2).



Rysunek 35. (A) Widma absorpcji w zakresie MIR oliw z oliwek: extra virgin (EVO), deodoryzowanej (DO) i rafinowanej (RO). (B) Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie MIR. Oleje: EVO- oliwa extra virgin, RO- oliwa rafinowana, DO- oliwa deodoryzowana. *Na podstawie badań własnych*

Zakres bliskiej podczerwieni (NIR)

Widma oliw EVO, DO i RO w zakresie bliskiej podczerwieni są również wizualnie nierozróżnialne, co przedstawiono na rysunku 36 A.



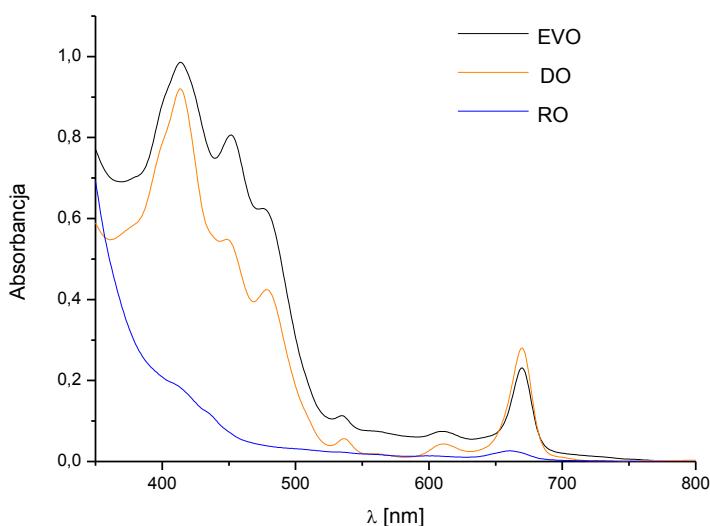
Rysunek 36. (A) Widma absorpcji w zakresie NIR oliw z oliwek: extra virgin (EVO), deodoryzowanej (DO) i rafinowanej (RO). (B) Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie NIR. Oleje: EVO- oliwa extra virgin, RO- oliwa rafinowana, DO- oliwa deodoryzowana. *Na podstawie badań własnych*

Na rysunku 36 B przedstawiono wyniki analizy PCA dla widm absorpcji w zakresie NIR (12500-4000 cm^{-1}). Pierwsza i druga główna składowa wyjaśniają odpowiednio 82% i 17% całkowitej zmienności. Oliwy rafinowane charakteryzują się dodatnimi wartościami PC1 zaś

pozostałe oleje ujemnymi. Na podstawie PC2 można różnicować EVO (dodatnie wartości PC2) od pozostałych gatunków oliw (ujemne wartości PC2).

Zakres widzialny (Vis)

Widma EVO i DO charakteryzują się podobną intensywnością pasm pochodzących od absorpcji chlorofili i feofityn, natomiast intensywność pasm pochodzących od karotenoidów jest niższa w DO. Widmo absorpcji RO charakteryzuje się występowaniem tylko śladowych ilości pasm pochodzących od absorpcji barwników, ponieważ zostały one usunięte w procesie rafinacji, rysunek 37.

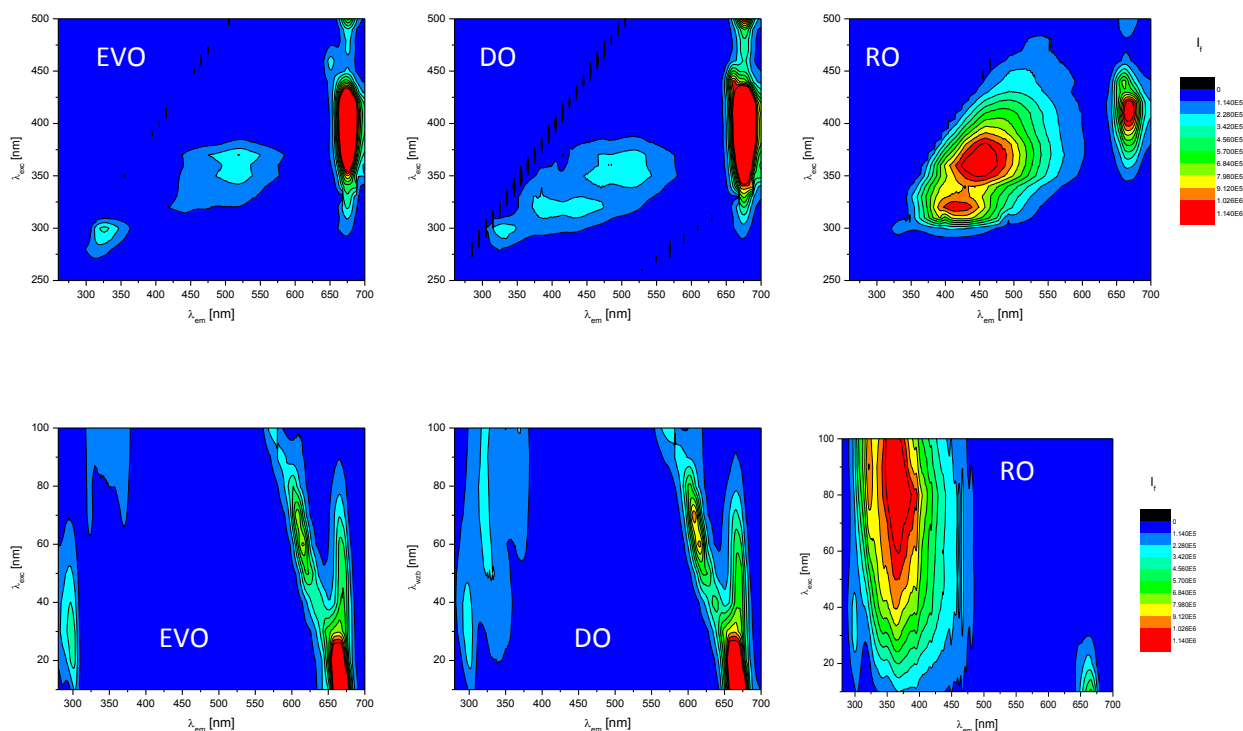


Rysunek 37. Widma absorpcji w zakresie widzialnym (Vis) oliwy extra virgin (EVO), deodoryzowanej (DO) i rafinowanej (RO). *Na podstawie badań własnych*

Widma fluorescencji

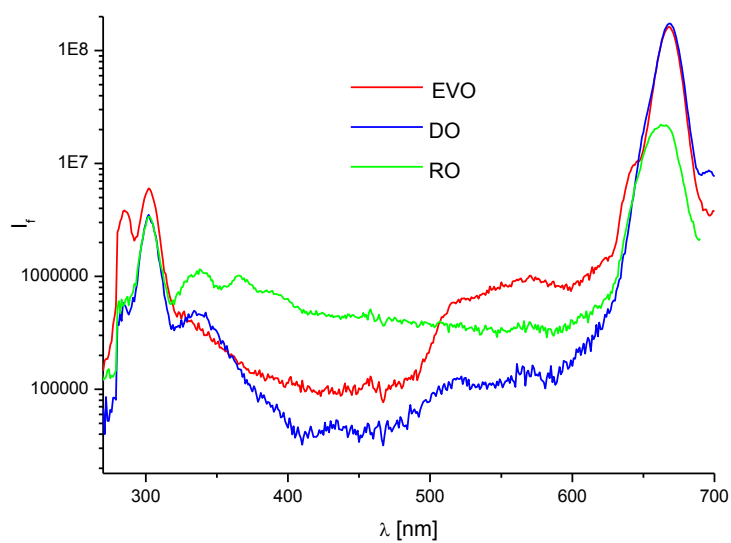
Widma całkowitej fluorescencji i widma synchroniczne całkowitej fluorescencji oliw EVO, DO i RO przedstawiono na rysunku 38. Widma zmierzono w geometrii odbiciowej. Najbardziej wyraźne różnice pomiędzy widmami badanych oliw obserwuje się w pośrednim zakresie widma. W widmach EVO widoczne jest jedno pasmo w zakresie długości fali wzbudzenia 320-390 nm i długości fali emisji 440-580 nm. W widmie DO obserwuje się dodatkowe pasmo w zakresie długości fali wzbudzenia 310-330 nm i długości fali emisji 370-490 nm. W oliwie RO widoczne są natomiast dwa intensywne pasma w pośrednim zakresie.

Widma synchroniczne całkowitej fluorescencji badanych oliw przedstawiono na rysunku 38. W widmach emisji oliwy EVO widoczne są pasma ze wzbudzeniem: poniżej 310 nm (pochodzące od emisji tokoferoli), 310-350 nm, 350-380 nm i powyżej 550 nm (przypisane emisji chlorofili i feofityn). W widmach emisji DO widoczne są pasma w zakresie 320-370 nm, natomiast RO charakteryzują się relatywnie słabym pasmem w zakresie 290-320 nm oraz dwoma intensywnymi pasmami przy długości fali 500 nm i powyżej 550 nm.



Rysunek 38. Mapy konturowe widm całkowitej fluorescencji dla $\Delta\lambda=10-100$ nm (górny panel) i widm synchronicznych całkowitej fluorescencji (dolny panel) oliwy extra virgin, deodoryzowanej i rafinowanej, geometria odbicia, oleje nierozcieńczone. *Na podstawie badań własnych*

Widma synchroniczne fluorescencji dla $\Delta\lambda=10$ nm przedstawiono na rysunku 39. Z powodu różnic wynikających z intensywności pasm, widma synchroniczne fluorescencji zostały przedstawione w skali logarytmicznej. Pasma odpowiadające emisji tokoferoli (301 nm) ma największą intensywność dla oliwy EVO, zaś dla oliw DO i RO intensywność ta jest mniejsza. Dla EVO poniżej 300 nm występuje dodatkowe pasmo odpowiadające emisji związków fenolowych. Pasma odpowiadające emisji barwników z grupy chlorofili (666nm) mają zbliżoną intensywność dla oliwy EVO i DO, dla oliwy RO intensywność ta jest niższa. W zakresie 320-500 nm można zaobserwować różnice w kształcie pasm w zależności od gatunku oliwy. Dla oliwy RO intensywność pasm w tym zakresie jest najwyższa, zaś dla DO, najniższa. Przebieg widma dla oliwy EVO jest zbliżony do przebiegu widma oliwy DO.



Rysunek 39. Widma synchroniczne fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) oliwy extra virgin (EVO), oliwy deodoryzowanej (DO) i oliwy rafinowanej (RO), oleje nierozcieńczone, geometria odbiciowa, skala logarytmiczna.
Na podstawie badań własnych

7.3.3. Modele regresji mieszanin

Analiza PLS i PCR widm w zakresie podstawowej podczerwieni

Wyniki analiz regresji dla widm w zakresie MIR przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm w zakresie MIR i składu mieszanin oliwy extra virgin z oliwą rafinowaną i deodoryzowaną

Zakres widma [cm ⁻¹]	Przekształcenie widma	PLS				PCR			
		LV	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD	LV	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD
4000-400	---	4	0,957	4,8	4,5	4	0,924	6,4	3,3
	MSC	4	0,963	4,5	4,8	4	0,916	6,8	3,2
	MSC+1 pochodna	2	0,926	6,3	3,4	3	0,910	7,0	3,0
	MSC+2 pochodna	4	0,915	6,8	3,2	9	0,884	7,9	2,7
1500-900	---	4	0,982	3,1	6,9	6	0,980	3,3	6,5
	MSC	3	0,983	3,0	7,2	8	0,962	4,8	4,4
	MSC+1 pochodna	3	0,985	2,9	7,4	3	0,981	3,2	6,7
	MSC+2 pochodna	1	0,968	4,2	5,1	2	0,965	4,4	4,9
1500-500	---	5	0,973	3,8	5,7	7	0,963	4,5	4,8
	MSC	3	0,983	3,0	7,2	3	0,966	4,3	4,9
	MSC+1 pochodna	4	0,970	4,0	5,4	4	0,960	4,7	4,6
	MSC+2 pochodna	4	0,948	5,3	4,1	5	0,915	6,8	3,1
1905-1592	---	5	0,927	6,3	3,4	7	0,919	6,6	3,5
	MSC	5	0,938	5,8	3,7	5	0,918	6,7	3,2
	MSC+1 pochodna	3	0,945	5,5	3,9	4	0,948	5,3	4,1
	MSC+2 pochodna	3	0,943	5,6	3,8	3	0,938	5,8	3,7
4000-2501	---	6	0,980	3,3	6,5	6	0,966	4,3	5,0
	MSC	6	0,985	2,9	7,4	6	0,969	4,1	5,2
	MSC+1 pochodna	1	0,931	6,1	3,5	2	0,940	5,7	3,7
	MSC+2 pochodna	2	0,932	6,0	3,6	3	0,936	5,9	3,6

Na podstawie badań własnych

Dla wszystkich analizowanych modeli uzyskano dobrą korelację widm w zakresie MIR i składu procentowego mieszanin oliw.

Dla modeli PLS widm w całym zakresie spektralnym 4000-400 cm⁻¹, bez wykorzystania przekształcenia widma, uzyskano dobrą korelację widm i składu mieszanin oliw. Lepsze wyniki otrzymano wykorzystując do analiz tylko wybrane zakresy widma. Jedynym wyjątkiem był model otrzymany dla zakresu 1905-1592 cm⁻¹. Model dla tego zakresu charakteryzował się gorszymi wynikami niż otrzymany model dla całego zakresu widma. Zastosowanie przekształceń widm wpłynęło na wyniki regresji. W większości przypadków najlepsze rezultaty otrzymano dla przekształcenia MSC lub przekształcenia MSC wraz z pierwszą pochodną. Najlepszy model PLS, z trzema zmiennymi otrzymano dla przekształcenia MSC wraz z pierwszą pochodną dla zakresu 1500-900 cm⁻¹ (tzw. zakres daktyloskopowy). Modele otrzymane z zastosowaniem metody PCR charakteryzowały się gorszymi parametrami i wymagały zastosowania większej lub tej samej liczby zmiennych w porównaniu z modelami otrzymanymi dla analizy PLS. Najlepszy model PCR otrzymano dla przekształcenia MSC wraz z pierwszą pochodną zakresu daktyloskopowego (1500-900 cm⁻¹). Wartość RPD dla najlepszego modelu PLS wynosiła 7,4 a dla modelu PCR 6,7, oznacza to, że uzyskane modele charakteryzują się dobrą zdolnością przewidywania zafałszowania.

Analiza PLS i PCR widm w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR)

Wyniki analiz regresji dla widm w zakresie NIR przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm absorpcji w zakresie NIR i składu mieszanin oliwy z oliwek extra virgin z oliwą rafinowaną i deodoryzowaną

Zakres widma [cm ⁻¹]	Przekształcenie widm	PLS				PCR			
		LV	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD	LV	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD
12 500-4000	---	8	0,971	4,0	5,4	12	0,973	3,8	5,5
	MSC	6	0,967	4,2	5,1	10	0,968	4,1	5,1
	MSC+1 pochodna	4	0,960	4,7	4,6	4	0,954	5,0	4,3
	MSC+2 pochodna	5	0,968	4,1	5,1	9	0,960	4,7	4,6
6150-4500	---	7	0,967	4,2	5,1	8	0,958	4,7	4,5
	MSC	6	0,977	3,5	6,1	7	0,962	4,5	4,8
	MSC+1 pochodna	5	0,972	3,9	5,5	6	0,979	3,4	6,3
	MSC+2 pochodna	3	0,960	4,6	4,6	5	0,953	5,0	4,2
4500-4000	---	6	0,974	3,7	5,7	7	0,955	4,9	4,3
	MSC	5	0,969	4,1	5,2	6	0,962	4,5	4,7
	MSC+1 pochodna	6	0,962	4,5	4,7	7	0,940	5,7	3,8
	MSC+2 pochodna	6	0,941	5,6	3,8	13	0,945	5,4	3,9
9009-6410	---	6	0,960	4,7	4,6	7	0,956	4,9	4,4
	MSC	6	0,957	4,8	4,5	6	0,950	5,2	4,1
	MSC+1 pochodna	4	0,941	5,6	3,8	5	0,932	6,0	3,5
	MSC+2 pochodna	5	0,896	7,5	2,8	6	0,851	9,0	2,4

Na podstawie badań własnych

Dla wszystkich otrzymanych modeli uzyskano znaczące korelacje składu procentowego mieszanin oraz widm absorpcji w zakresie NIR. Analizy regresji przeprowadzono zarówno dla całego zakresu widma (12500-4410 cm⁻¹) jak również dla wybranych jego części. Wybór zakresu 6150-4500 cm⁻¹ poprawił rezultaty przeprowadzonej analizy dla całego zakresu. Najlepsze rezultaty dla przeprowadzonej analizy PLS otrzymano stosując przekształcenie MSC i analizując widma w rejonie 6150-4500 cm⁻¹. Najlepsze dopasowanie dla analizy PCR uzyskano również wybierając zakres 6150-4500 cm⁻¹, jednak w tym przypadku zastosowano przekształcenie MSC wraz z pierwszą pochodną.

Najwyższą wartość RPD otrzymano dla modelu analizy regresji PLS widma w zakresie 6150-4500 cm⁻¹. Model ten charakteryzował się również najniższą wartością błędu RMSECV.

Analiza PLS i PCR widm w zakresie widzialnym (Vis)

Wyniki analiz regresji widm w zakresie widzialnym, które są stosunkowo proste i dotyczą pasm pochodzących od karotenoidów i chlorofili, przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm w zakresie Vis i składu mieszanin oliwy extra virgin z oliwą rafinowaną i deodoryzowaną

Zakres widma [nm]	Przekształcenie widm	PLS				PCR			
		LV	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD	LV	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD
350-710	---	6	0,971	4,0	5,4	3	0,930	6,1	3,5
	MSC	2	0,971	4,0	5,4	2	0,971	4,0	5,4
	MSC+1 pochodna	3	0,960	4,7	4,6	4	0,968	4,1	5,1
	MSC+2 pochodna	4	0,968	4,1	5,1	4	0,969	4,1	5,2
350-550	---	6	0,980	3,3	6,5	7	0,982	3,1	6,7
	MSC	2	0,970	4,0	5,2	2	0,970	4,1	5,2
	MSC+1 pochodna	2	0,951	5,1	4,1	2	0,947	5,3	4,0
	MSC+2 pochodna	4	0,969	4,1	5,2	4	0,970	4,0	5,4
600-710	---	6	0,979	3,4	6,3	6	0,979	3,4	6,3
	MSC	6	0,975	3,7	5,8	7	0,981	3,2	6,5
	MSC+1 pochodna	4	0,973	3,8	5,7	5	0,978	3,4	6,3
	MSC+2 pochodna	3	0,959	4,7	4,5	5	0,978	3,5	6,1

Na podstawie badań własnych

Otrzymane modele regresji dla widm w zakresie widzialnym charakteryzowały się dobrą korelacją widm i składu mieszanin oliw. Analiza zakresu 350-550 nm lub 600-710 nm pozwoliła uzyskać najlepsze dopasowanie. Nieco gorsze wyniki uzyskano dla analiz uwzględniając cały zakres widma (350-710 nm). Wstępne przekształcenie widm, nie poprawiło otrzymanych rezultatów. Najlepszy model PLS, z sześcioma zmiennymi, otrzymano dla zakresu 350-550 nm. Najlepsze dopasowanie dla przeprowadzonej analizy regresji PCR uzyskano również dla tego zakresu, bez konieczności stosowania przekształceń matematycznych. Wartości współczynników R² i niskie błędy RMSECV wskazują na dobrą korelację widm w zakresie Vis i stężenia dodatku oliwy.

Analiza PLS i PCR widm synchronicznych fluorescencji

Widma synchroniczne fluorescencji zmierzone dla $\Delta\lambda=10$ nm, zostały wykorzystane do zbudowania modeli regresji w celu określenia składu procentowego mieszanin olejów roślinnych. Wyniki z przeprowadzonych analiz regresji PLS i PCR przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) i składu mieszanin oliwy extra virgin z oliwą rafinowaną i deodoryzowaną

Zakres widma [nm]	Przekształcenie widm	PLS				PCR			
		LV	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD	LV	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD
280-690	---	5	0,986	2,7	8,0	5	0,982	3,1	6,9
	1 pochodna	5	0,988	2,6	8,3	4	0,973	3,9	5,5
	2 pochodna	4	0,951	5,2	4,1	4	0,945	5,4	3,8
280-320	---	4	0,886	7,8	2,7	4	0,882	8,0	2,7
	1 pochodna	3	0,898	7,4	2,9	4	0,901	7,3	2,9
	2 pochodna	3	0,833	9,5	2,2	3	0,835	9,4	2,2
320-500	---	4	0,879	8,1	2,6	7	0,885	7,9	2,7
	1 pochodna	4	0,875	8,2	2,6	9	0,889	7,7	2,8
	2 pochodna	7	0,648	13,8	1,5	7	0,532	15,9	1,3
500-690	---	5	0,988	2,5	8,9	5	0,988	2,5	8,6
	1 pochodna	5	0,989	2,4	8,6	4	0,975	3,7	5,8
	2 pochodna	4	0,952	5,1	4,2	4	0,948	5,3	4,0

Na podstawie badań własnych

Uzyskane modele regresji (PLS i PCR) dla całego zakresu spektralnego charakteryzowały się wysokimi wartościami parametrów R² i niskimi błędami RMSECV.

Nieznaczną poprawę parametrów regresji otrzymano kiedy analizowano rejon 500-690 nm, charakterystyczny dla emisji feofityn. Najlepszy model regresji PLS otrzymano właśnie dla tego zakresu stosując przekształcenie widma przy pomocy pierwszej pochodnej. Nieco gorsze wyniki, w porównaniu do modeli otrzymanych dla całego zakresu, uzyskano dla analizy z uwzględnieniem emisji dla zakresu 280-320 nm i 320-500 nm.

Najlepsze dopasowanie dla modelu PCR również otrzymano dla całego badanego zakresu (500-690 nm). Otrzymany model miał nieco gorsze dopasowanie niż model uzyskany dla analizy regresji PLS.

Analiza PLS i PCR połączonych zakresów widm

Wyniki analizy regresji dla połączonych widm ze wszystkich badanych zakresów (IR, NIR, Vis i fluorescencji) oraz kombinacji zakresów: MIR i NIR, NIR i Vis, Vis i fluorescencja oraz MIR i fluorescencji, przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 14. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR dla połączonych zakresów i składu mieszanin oliwy extra virgin z oliwą rafinowaną i deodoryzowaną.

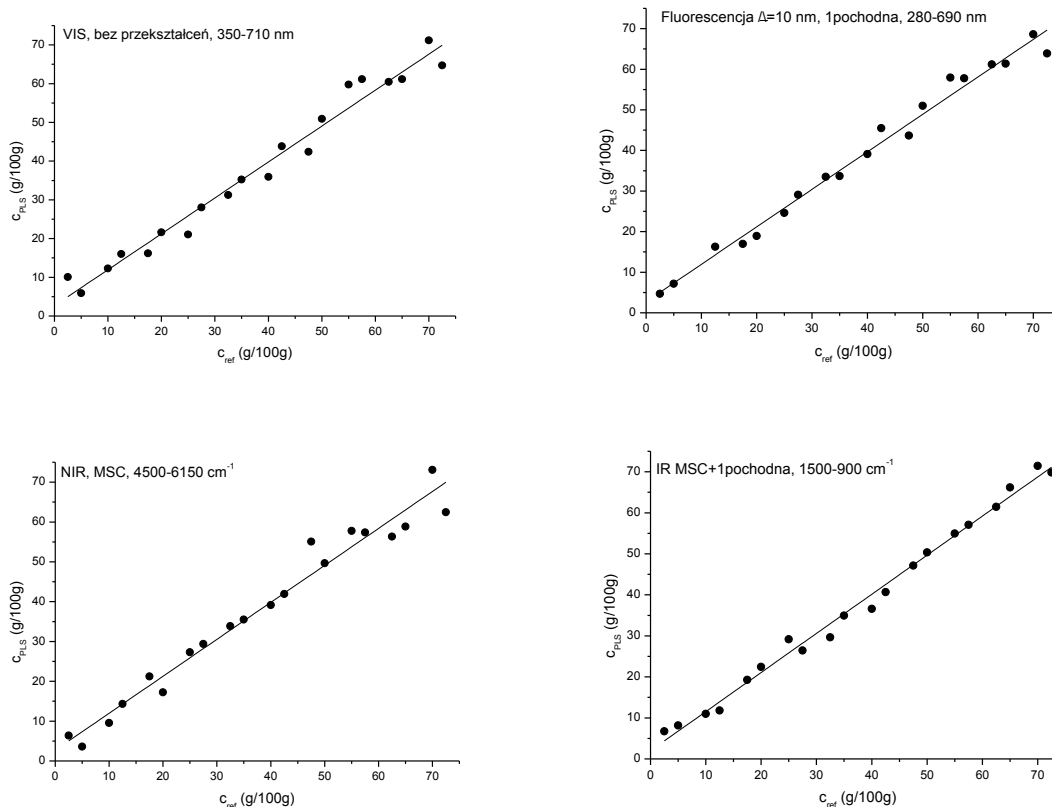
Zakres widma	PLS				PCR			
	LV	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD	LV	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD
MIR + NIR (cały zakres)	5	0,974	3,7	5,8	6	0,951	5,2	4,1
MIR + NIR (wybrany zakres)	6	0,972	3,9	5,5	6	0,974	3,7	5,8
NIR + Vis (cały zakres)	3	0,972	3,9	5,5	3	0,973	3,8	5,7
NIR + Vis (wybrany zakres)	3	0,976	3,6	6,0	3	0,976	3,6	6,0
Vis + Fluorescencja (cały zakres)	4	0,957	4,8	4,5	4	0,959	4,7	4,6
Vis + Fluorescencja (wybrany zakres)	2	0,963	5,2	4,1	4	0,966	4,3	5,0
MIR + Fluorescencja (cały zakres)	5	0,967	4,2	5,1	7	0,965	4,3	5,0
MIR + Fluorescencja (wybrany zakres)	5	0,963	4,4	4,9	6	0,964	4,4	4,9
MIR + NIR + Vis + FL (cały zakres)	2	0,949	5,3	4,1	3	0,959	4,7	4,6
MIR + NIR + Vis + FL (wybrany zakres)	2	0,956	4,9	4,4	3	0,967	4,2	5,1

Wybrany zakres: IR (1500-900 cm⁻¹), NIR (6150-4500 cm⁻¹), Vis (350-500 nm), FL (500-690 nm). *Na podstawie badań własnych*

Dla wszystkich modeli regresji otrzymano wysoką korelację pomiędzy widmami a składem procentowym mieszanin oliw. Jednak parametry modeli kalibracyjnych były gorsze niż dla analizy pojedynczych zakresów. Najlepszy model PLS uzyskano dla połączonego zakresu NIR i Vis. Model ten charakteryzował się wysoką wartością współczynnika R² (0,976) i niskim błędem RMSECV (3,6). Wartość RPD na poziomie 6,0 informowała, że model ten ma dobrą zdolność przewidywania stopnia zafałszowania.

7.3.4. Ilościowa analiza mieszaniny olejów na podstawie uzyskanych modeli kalibracyjnych

Uzyskane modele regresji PLS i PCR, o najlepszym dopasowaniu, wykorzystane zostały do przewidywania stopnia zafałszowania oliwy z zestawu próbek testowych. Zestaw ten składał się z 20 próbek, których widma poddano tym samym przekształceniom matematycznym jak widma w zestawie kalibracyjnym. Na rysunku 40 przedstawiono zależność rzeczywistego składu mieszanin olejów i wyznaczonego na podstawie modeli regresji PLS dla próbek zestawu testowego.



Rysunek 40. Wyniki analizy regresji metodą PLS widm w zakresie Vis, NIR i MIR oraz widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm), zależność rzeczywistego składu mieszanin olejów i wyznaczonego na podstawie modelu regresji dla próbek testowych. *Na podstawie badań własnych*

Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 15. Średni kwadratowy błąd przewidywania (RMSEP) mieścił się w granicach 2,1-3,9 g/100g co odpowiada błędowi względnemu na poziomie 5,8-11,6%. Jakość modeli oceniono również na podstawie wartości RPD, które dla wszystkich otrzymanych modeli mieściły się w granicach 5,5-10,2 co wskazuje na dobrą zdolność przewidywania wartości zafałszowania. Najlepsze dopasowanie otrzymano dla przeprowadzonej analizy PLS widm w zakresie podstawowej podczerwieni (MIR). Modele dla widm w zakresie widzialnym (Vis) charakteryzowały się wyższymi błędami RMSECV i niższymi RPD. Najsłabsze dopasowanie otrzymano dla modelu w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR) po przekształceniu MSC.

Tabela 15. Wyniki przewidywania składu mieszanin olejów na podstawie modeli kalibracyjnych PLS i PCR dla widm w zakresie Vis, NIR i MIR oraz widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) i rzeczywistego składu mieszanin oliw.

Zakres widma	Przekształcenie widm	R ²	RMSECV [g/100g]	RPD
MIR PLS 1500-900 cm ⁻¹	MSC+1 pochodna	0,990	2,1	10,2
MIR PCR 1500-900 cm ⁻¹	MSC+1 pochodna	0,987	2,5	8,6
NIR PLS 6150-4500 cm ⁻¹	MSC	0,967	3,9	5,5
NIR PCR 6150-4500 cm ⁻¹	MSC+1 pochodna	0,984	2,7	8,0
VIS PLS 350-550 nm	---	0,972	3,6	6,0
VIS PCR 350-550 nm	---	0,974	3,5	6,1
FL PLS 280-690 nm	1 pochodna	0,981	2,9	7,4
FL PLS 500-690 nm	1 pochodna	0,981	2,9	7,4
FL PCR 500-690 nm	---	0,979	3,0	7,2

FL – widma synchroniczne fluorescencji zmierzone przy ($\Delta\lambda=10$ nm),
Na podstawie badań własnych

7.4. Podsumowanie

Przeprowadzone badania miały na celu określenie przydatności wybranych metod spektroskopowych do wykrywania zafałszowań oliwy z oliwek extra virgin. Analizę widm mieszanin oliwy z oliwek extra virgin z dodatkiem oleju słonecznikowego bądź oliwy rafinowanej lub deodoryzowanej przeprowadzono z zastosowaniem metod regresji PLS i PCR.

W pierwszym etapie pracy badano mieszaniny oliwy extra virgin z olejem słonecznikowym. Najlepsze rezultaty analiz regresji PLS otrzymano dla widm w zakresie MIR (po przekształceniu MSC i obliczeniu pierwszej pochodnej) uwzględniając część widma 1500-900 cm⁻¹. Uzyskany model kalibracyjny PLS charakteryzował się wysoką wartością RPD równą 12, co wskazuje na bardzo dobrą zdolność przewidywania składu procentowego mieszaniny. Dla widm w zakresie NIR najlepsze modele charakteryzowały się wartością RPD równą 8,6.

Modele regresji PLS dla widm synchronicznych fluorescencji zmierzonych przy $\Delta\lambda= 10$, 30 i 60 nm, również charakteryzowały się dobrą zdolnością przewidywania składu mieszanin oliw. Najlepszy model kalibracyjny PLS otrzymano dla widm synchronicznych zmierzonych dla $\Delta\lambda=60$ nm ($R^2= 0,99$, RPD= 9,7). Modele otrzymane z zastosowaniem metody regresji PCR charakteryzowały się podobnymi lub nieco niższymi wartościami RPD i wyższymi RMSECV i SECV niż modele otrzymane z zastosowaniem regresji PLS.

W drugim etapie pracy badano zafałszowania oliwy EVO (stanowiącą mieszaninę z czterdziestu oliw extra virgin) oliwą DO (mieszanina sześciu oliw deodoryzowanych) i oliwą RO (mieszanina dwudziestu siedmiu oliw rafinowanych).

Najlepsze rezultaty z analiz regresji PLS i PCR otrzymano dla widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda= 10$ nm). Model kalibracyjny charakteryzował się wysoką wartością RPD równą 8,6.

Dla widm w zakresie MIR najlepszy model PLS uzyskano po przekształceniu MSC i obliczeniu pierwszej pochodnej, dla zakresu widma $1500-900\text{ cm}^{-1}$. Model ten charakteryzował się wartościami $R^2=0,985$ i $RPD=7,4$.

Dla najlepszego modelu kalibracyjnego PLS dla widm w zakresie NIR wartość RPD wynosiła 6,1 a $R^2=0,977$.

Najlepszy model PLS dla widm w zakresie Vis otrzymano dla zakresu 350-550 nm. Wartość współczynnika R^2 (0,980) i RPD (6,5), wskazywała na dobrą zdolność przewidywania składu mieszaniny.

Modele otrzymane metodą PCR charakteryzowały się podobnym poziomem dopasowania jak modele otrzymane dla metody PLS. Łączna analiza widm otrzymanych z zastosowaniem różnych technik spektroskopowych nie wpłynęła na poprawę uzyskanych wyników.

W wyniku walidacji modeli kalibracyjnych na podstawie oznaczeń dla zestawu testowego składającego się z dwudziestu mieszanin oliw otrzymano następujące wyniki (R^2 i RPD) dla analiz PLS: MIR (0,99 i 10,2), NIR (0,967 i 5,5), Vis (0,972 i 6,0) i fluorescencja, $\Delta\lambda= 10$ nm (0,981 i 7,4). Zbliżone parametry uzyskano dla oznaczeń z zastosowaniem modeli kalibracyjnych PCR.

8. OCENA STABILNOŚCI OKSYDACYJNEJ OLEJÓW ROŚLINNYCH

8.1. Wprowadzenie

Jakość olejów roślinnych w wyniku zachodzących procesów utleniania (Morello, Motilva i Romero 2004). Oleje roślinne charakteryzują się zróżnicowaną odpornością na utlenianie.

W związku z coraz większą dostępnością i konsumpcją olejów tłoczonych na zimno różnych gatunków, przeprowadzono badania mające na celu porównanie stabilności oksydacyjnej oliw, olejów rzepakowych i słonecznikowych, tłoczonych na zimno i rafinowanych.

W analizie, oprócz konwencjonalnych metod oceny jakości olejów, wykorzystano techniki spektroskopowe w zakresie MIR, NIR i Vis oraz spektroskopię fluorescencyjną.

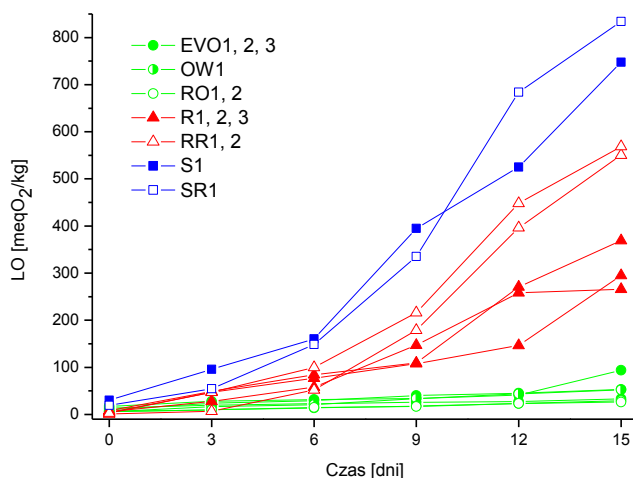
8.2. Ocena stabilności oksydacyjnej olejów na podstawie parametrów chemicznych

Stabilność oksydacyjna olejów została oceniona na podstawie wyników testu termostatowego. Test termostatowy należy do najczęściej stosowanych testów przyspieszonych, ponieważ daje wyniki w krótkim czasie (Skolimowska, Skolimowski i Wędzisz 2009). Eksperyment polegał na przechowywaniu próbek olejów w termostacie w temperaturze 60°C, w otwartych szerokich naczyniach i okresowym (co trzy dni) oznaczaniu zmian wartości LO i LK. Całkowity czas badania wynosił 15 dni. Do badań wybrano oleje tłoczone na zimno i rafinowane: słonecznikowe, rzepakowe i oliwy z oliwek. Oleje te charakteryzują się różnym składem kwasów tłuszczowych i różnorodną zawartością antyoksydantów, a więc ich podatność na utlenianie jest odmienna.

Wartości liczby nadtlenkowej dla świeżych olejów rzepakowych i oliw z oliwek mieściły się w granicach 1,13 – 15 meq O₂/kg. Dopuszczalne wartości LO (<15 meq O₂/kg dla olejów tłoczonych na zimno i < 10 meq O₂/kg dla olejów rafinowanych) (Codex Alimentarius, PN-ISO 3960:1996) zostały przekroczone w oleju słonecznikowym tłoczonym na zimno (30,1 meq O₂/kg) i w oleju słonecznikowym rafinowanym (19,4 meq O₂/kg).

Na rysunku 41 przedstawiono zmiany liczby nadtlenkowej. W teście termostatowym oliwy z oliwek charakteryzowały się najwyższą stabilnością oksydacyjną. Oleje rzepakowe były mniej stabilne. Największy przyrost pierwotnych produktów utleniania obserwowano w olejach słonecznikowych. Zmiany wartości liczby nadtlenkowej badanych olejów były podobne do

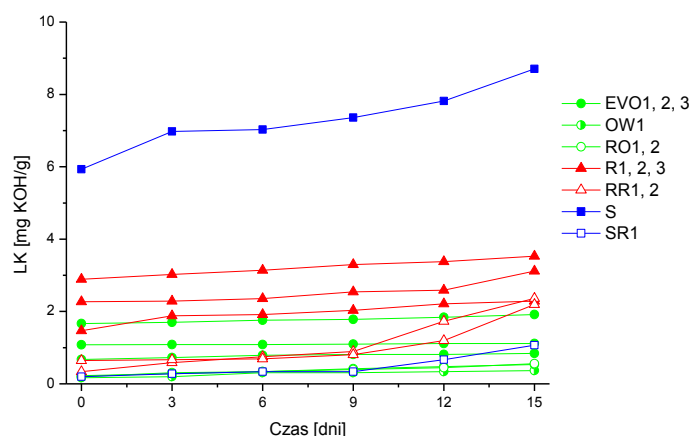
prezentowanych w pracach: Koski i in. (2002, 2003); Górnaś i in. (2005); Nissiotis i Tasioula-Margari (2002); Wroniak, Kwiatkowska i Krygier (2006a).



Rysunek 41. Zmiany liczby nadtlenkowej dla oliw: extra virgin (EVO1 i EVO2), z wytlóków (OW1 i OW2) i rafinowanych (RO1 i RO2), olejów rzepakowych: tłoczonych na zimno (R1 i R2) i rafinowanych (RR1 i RR2) oraz oleju słonecznikowego: tłoczonego na zimno (S1) i rafinowanego (SR1) w teście termostatowym (60°C).

Na podstawie badań własnych

Wartości liczby kwasowej (LK), określającej ilość wolnych kwasów tłuszczowych dla olejów świeżych (spełniających wymagania norm) wynosiły od 0,16 do 2,8 mg KOH/g. Oznacza to, że oleje te spełniały wymagania jakościowe (Codex Alimentarius, PN-ISO 660:1998). Dopuszczalne wartości LK (<4,0 mg KOH/g dla olejów tłoczonych na zimno i <0,6 mg KOH/g dla olejów rafinowanych) zostały przekroczone w oleju słonecznikowym tłoczonym na zimno (5,9 mg KOH/g). Dla pozostałych olejów uzyskano zbliżony zakres LK do tych, które podają Tynek i in. (2012), Wroniak i współautorzy (2006a, 2006b). Najniższą wartość LK posiadała oliwa OW1, zaś najwyższą wspomniany olej słonecznikowy (S1). Zmiany liczby kwasowej w teście termostatowym dla badanych olejów były niewielkie i nawet w piętnastym dniu nie przekraczały dopuszczalnych wartości (z wyjątkiem oleju S1), rysunek 42.

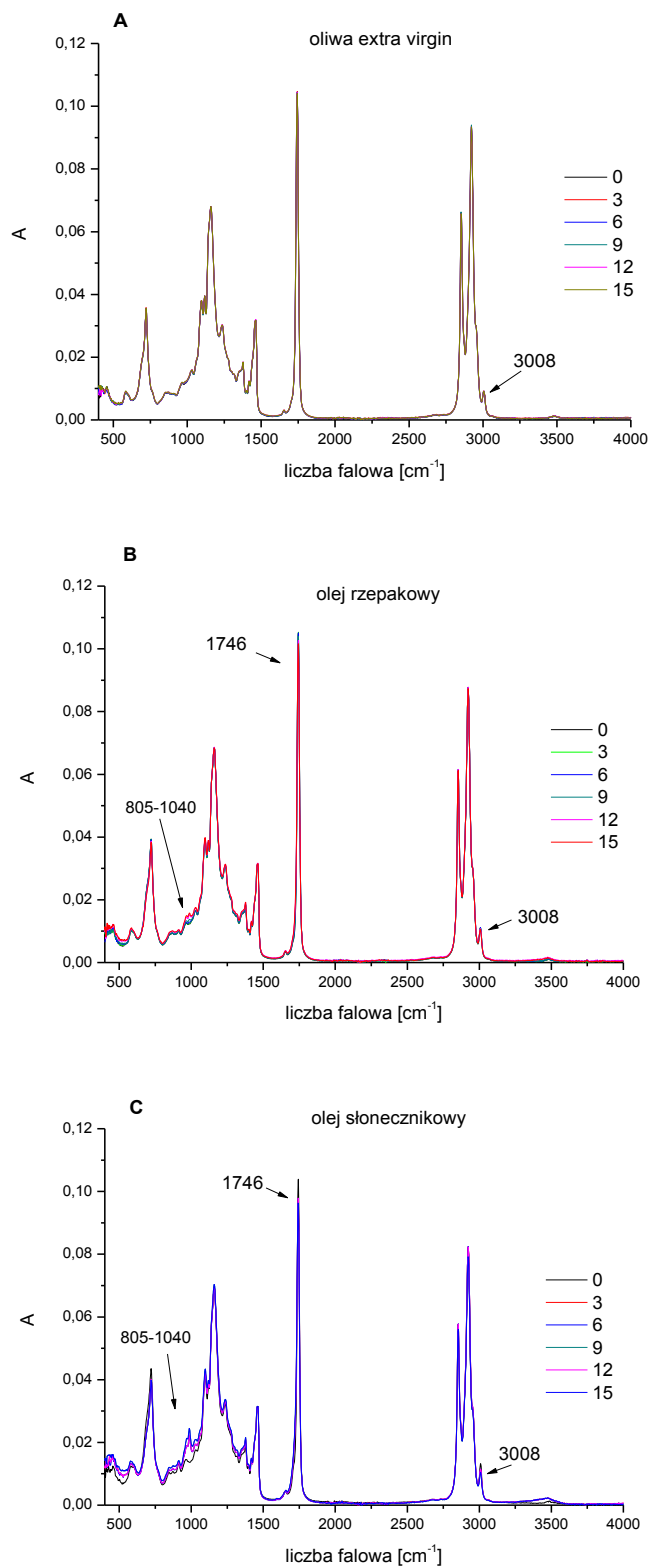


Rysunek 42. Zmiany liczby kwasowej (LK) dla oliw: extra virgin (EVO 1, 2 i 3), z wycłoków (OW1) i rafinowanych (RO1 i RO2), olejów rzepakowych: tłoczonych na zimno (R1 i R2) i rafinowanych (RR1 i RR2) oraz oleju słonecznikowego: tłoczzonego na zimno (S1) i rafinowanego (SR1) w teście termostatowym (60°C).
Na podstawie badań własnych

8.3. Badanie stabilności oksydacyjnej olejów z zastosowaniem spektroskopii oscylacyjnej

Na rysunku 43 przedstawiono widma absorpcji w zakresie podstawowej podczerwieni wybranych olejów świeżych i poddanych testowi. W widmach ogrzewanej oliwy z oliwek extra virgin (rysunek 43 A) obserwuje się niewielką zmianę intensywności pasma przy liczbie falowej 3008 cm^{-1} w stosunku do widm oliwy świeżej. Analiza widm oleju rzepakowego (rysunek 43 B) ujawniła zmiany w widmach pod wpływem ogrzewania. Wraz ze wzrostem czasu ogrzewania następuje niewielki wzrost intensywności pasma absorpcji z maksimum przy liczbie falowej około 988 cm^{-1} . Ponadto pasma z maksimum przy liczbie falowej 1746 cm^{-1} i 3008 cm^{-1} zmniejszają swoją intensywność pod wpływem ogrzewania. Podobną zależność zaobserwowano dla oleju słonecznikowego, jednak w tym przypadku zmiany te były większe niż w oleju rzepakowym. W ogrzewanym oleju słonecznikowym obserwuje się również zmiany w całym obszarze daktyloskopowym ($1500\text{--}650\text{ cm}^{-1}$), rysunek 43 C.

Podobne zmiany w widmach w zakresie MIR ogrzewanych olejów prezentowali w swoich pracach m.in. Le Dreau (i in. 2009b), Moros i in. (2009), Gulien i Cabo (2002), Muik i in. (2007). Autorzy przypisali zmiany w paśmie w zakresie $975\text{--}988\text{ cm}^{-1}$ wtórnym produktom utlenienia takim jak aldehydy i ketony. Spadek intensywności pasma przy liczbie falowej 1746 cm^{-1} jest wynikiem przejścia pierwotnych produktów utlenienia we wtórne. Autorzy odnotowali, że w wyniku zachodzących procesów oksydacyjnych następuje spadek intensywności pasma z maksimum absorpcji przy liczbie falowej 3008 cm^{-1} co wynika z rozpadu podwójnych wiązań *cis*.

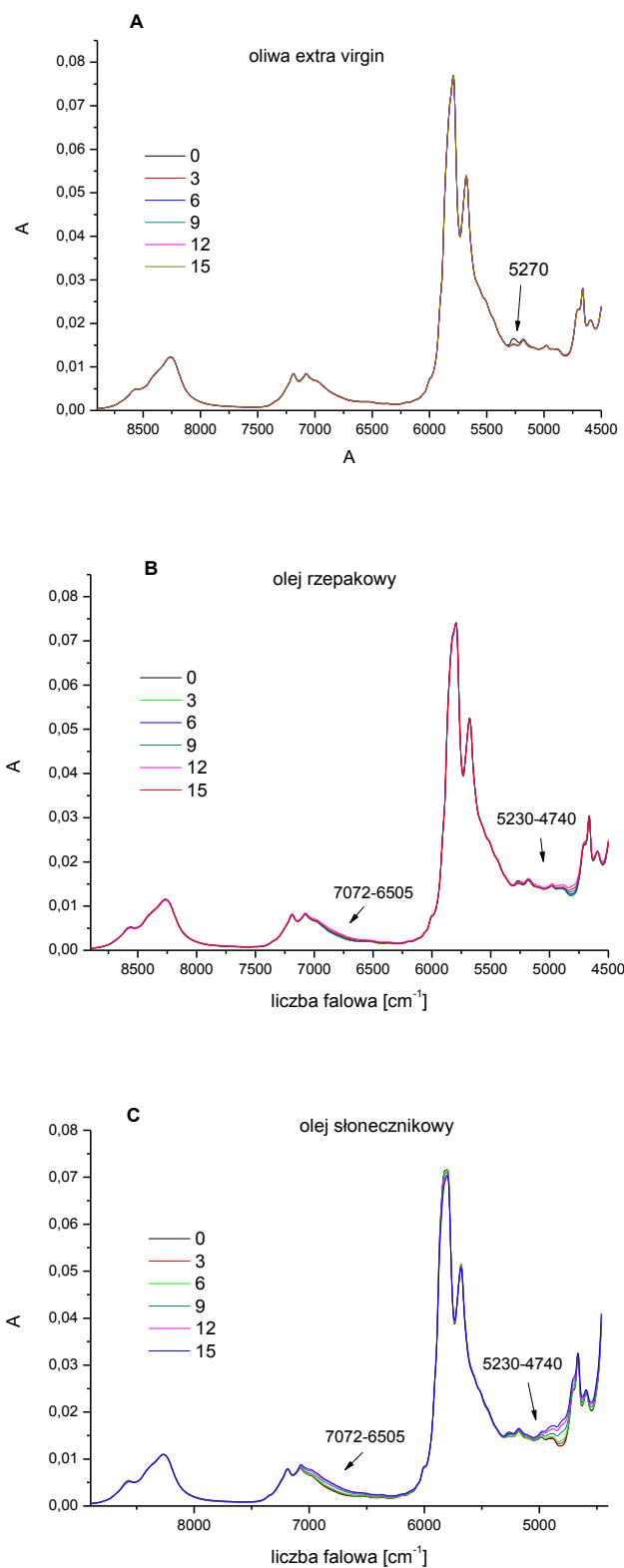


Rysunek 43. Widma absorpcji w zakresie MIR olejów świeżych i poddanych testowi termostatowemu (60°C) przez okres 3, 6, 9, 12 i 15 dni. (A) oliwa z oliwek EVO1, (B) olej rzepakowy R1, (C) olej słonecznikowy S1.

Na podstawie badań własnych

Zakres bliskiej podczerwieni (NIR)

Widma w zakresie bliskiej podczerwieni wybranych olejów świeżych i poddanych testowi termostatowemu (60°C) przedstawiono na rysunku 44. W widmach oliwy z oliwek (rysunek 44 A) obserwuje się niewielkie zmiany w stosunku do widm oliwy świeżej. Zmiany te dotyczą pasma z maksimum absorpcji przy liczbie falowej 5270 cm⁻¹, którego intensywność maleje wraz ze wzrostem czasu ogrzewania. W oleju rzepakowym obserwuje wzrost intensywności pasm w zakresach: 7072-605 cm⁻¹ i 5230-4740 cm⁻¹ zależnie od czasu przechowywania, rysunek 44 B. Podobna sytuacja ma miejsce w widmach oleju słonecznikowego, dla którego zmiany te są jeszcze bardziej wyraźne, co świadczy o bardziej zaawansowanych procesach utleniania, rysunek 44 C.



Rysunek 44. Widma absorpcji w zakresie NIR olejów świeżych i poddanych testowi termostatowemu (60°C) przez okres 3, 6, 9, 12 i 15 dni. **(A)** oliwa z oliwek EVO1, **(B)** olej rzepakowy R1, **(C)** olej słonecznikowy S1.
Na podstawie badań własnych

8.4. Analiza widm oscylacyjnych

Analiza MCR

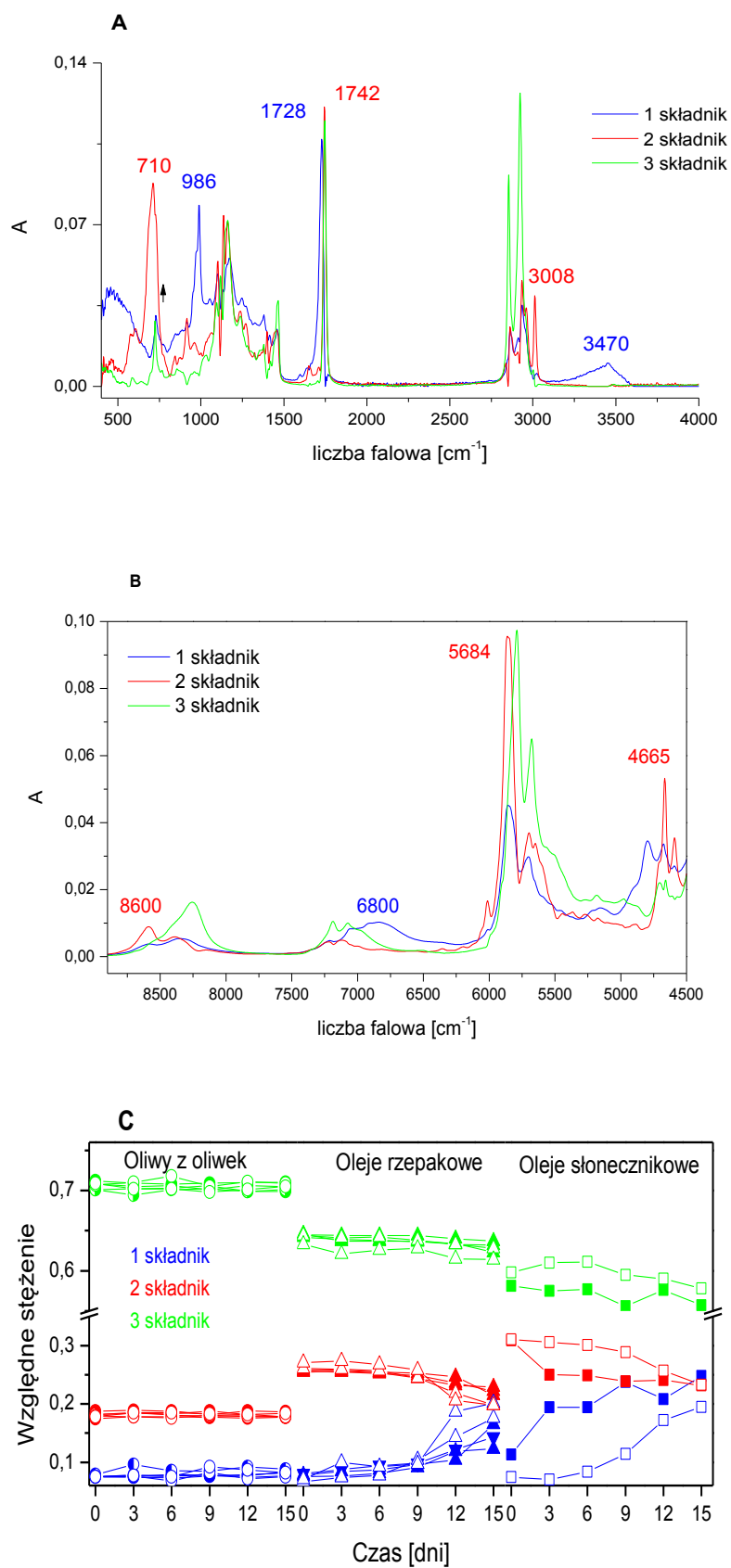
Do analizy widm w zakresie MIR i NIR zastosowano wielowymiarową metodę dekonwolucji krzywych MCR (ang. Multivariate Curve Resolution), która umożliwia estymację widm czystych składników oraz ich względnych stężeń. Analizę przeprowadzono dla połączonych zakresów NIR i MIR. W wyniku analizy widm wyodrębniono trzy komponenty dla których widma oraz wartości względnych stężeń pokazano na rysunku 45.

W przypadku oliw z oliwek stężenie poszczególnych komponentów pozostaje niemal stałe lub zmienia się nieznacznie w ciągu całego okresu utleniania. Dla olejów rzepakowych i słonecznikowych obserwuje się zmiany stężeń w czasie ogrzewania, rysunek 45 C.

Stężenie pierwszego komponentu dla olejów rzepakowych i słonecznikowych wzrasta podczas ogrzewania. W widmie pierwszego składnika występują pasma charakterystyczne dla (powstawania) nadtlenków, co widoczne jest w zakresie MIR przy liczbie falowej 3470 cm^{-1} (Le Dreau i in 2009b). Ponadto obserwuje się przesunięcie pasma grupy karbonylowej, którego maksimum występuje przy liczbie falowej 1728 cm^{-1} , co wskazuje na powstawanie nienasyconego ketonu lub aldehydu (Muik i in. 2007). Pasma przy liczbie falowej 986 cm^{-1} pochodzi od skoniugowanych wiązań *cis-trans* i *trans-trans*. W zakresie NIR cechą charakterystyczną dla tego składnika jest szerokie pasmo przy liczbie falowej 6880 cm^{-1} (Holman, Nickell i Privett 1958).

Stężenie drugiego składnika jest najniższe dla oliw z oliwek, wyższe dla olejów rzepakowych i najwyższe dla olejów słonecznikowych. W czasie ogrzewania w olejach rzepakowych i słonecznikowych stężenie tego składnika zmniejsza się. Widmo tego składnika w zakresie MIR jest charakterystyczne dla struktury nienasyconej. Obserwuje się w nim pasmo podwójnego wiązania C=C *cis* przy liczbach falowych 710 i 3008 cm^{-1} (Muik i in. 2007). W widmie w zakresie NIR tego składnika występują pasma pochodzące od drgań C-H wiązania *cis* (6010 cm^{-1}) i drgań rozciągających =CH i C=O (4665 cm^{-1}).

Stężenie trzeciego składnika jest najwyższe dla oliw z oliwek, niższe dla olejów rzepakowych i najniższe dla olejów słonecznikowych. Spektralne właściwości tego komponentu odpowiadają widmu struktur nasyconych występujących w olejach. Stężenie tego składnika ulega niewielkiemu obniżeniu w czasie ogrzewania.



Rysunek 45. Wyniki analizy MCR. **(A)** zakres podstawowej podczerwieni, **(B)** zakres bliskiej podczerwieni, **(C)** względne stężenia poszczególnych składników. *Na podstawie badań własnych*

Dla badanych olejów przeprowadzono analizę metodą klasycznej regresji liniowej dla wartości względnych stężeń składników, wyznaczonych metodą MCR i liczby nadtlenkowej, rysunek 46.

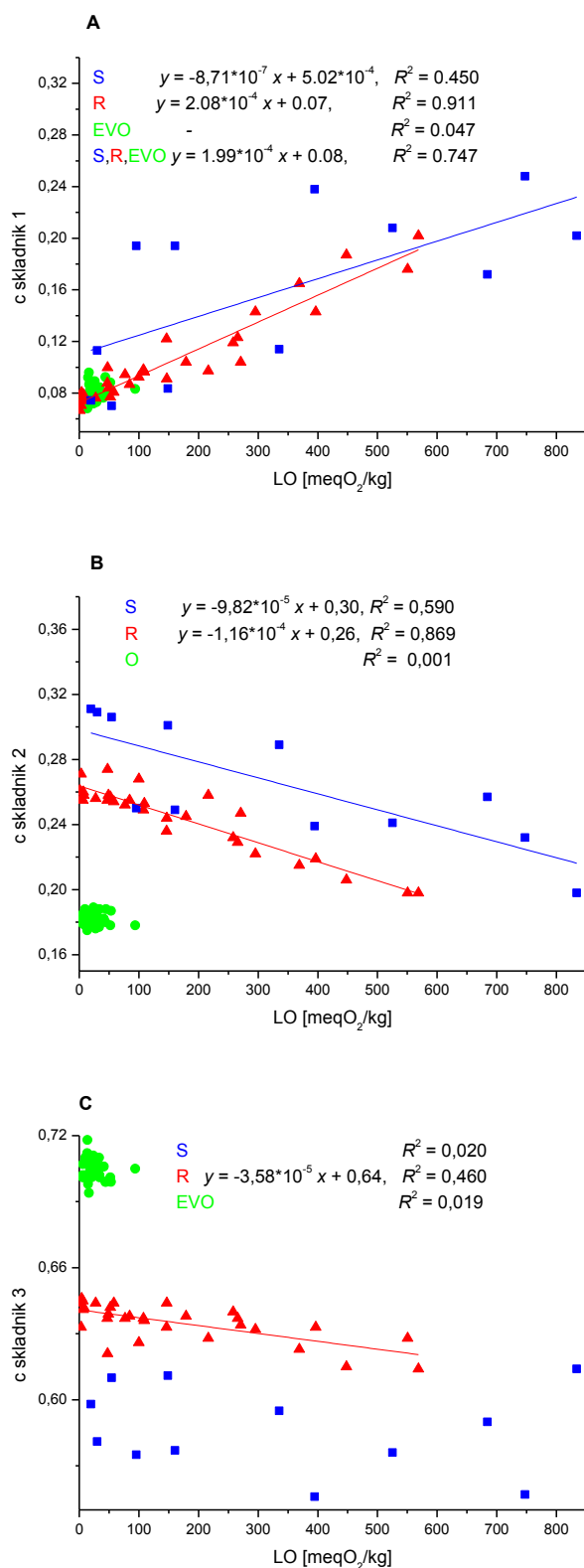
Dla oliw z oliwek nie uzyskano dla żadnego ze składników istotnych zależności między stężeniami a liczbą nadtlenkową.

Dla olejów rzepakowych uzyskano znaczącą zależność między stężeniem pierwszego (produkty utleniania) i drugiego komponentu (struktury nienasycone) a liczbą nadtlenkową. Wartości współczynników determinacji wynosiły odpowiednio dla pierwszego i drugiego komponentu $R^2 = 0,911$ i $R^2 = 0,869$. Wraz ze wzrostem liczby nadtlenkowej wzrastało stężenie komponentu i malało stężenie komponentu drugiego. Dla trzeciego składnika nie uzyskano znaczącej zależności. W olejach słonecznikowych zależność dla stężenia pierwszego komponentu z LO była na niskim poziomie ($R^2 = 0,450$). Dla drugiego składnika uzyskano prostoliniową zależność, a wartość R^2 wynosiła 0,590. Dla trzeciego komponentu nie stwierdzono zależności.

Dla wszystkich olejów łącznie otrzymano istotną relację jedynie między stężeniem pierwszego składnika a liczbą nadtlenkową. Wartość współczynnika determinacji R^2 wynosiła 0,747.

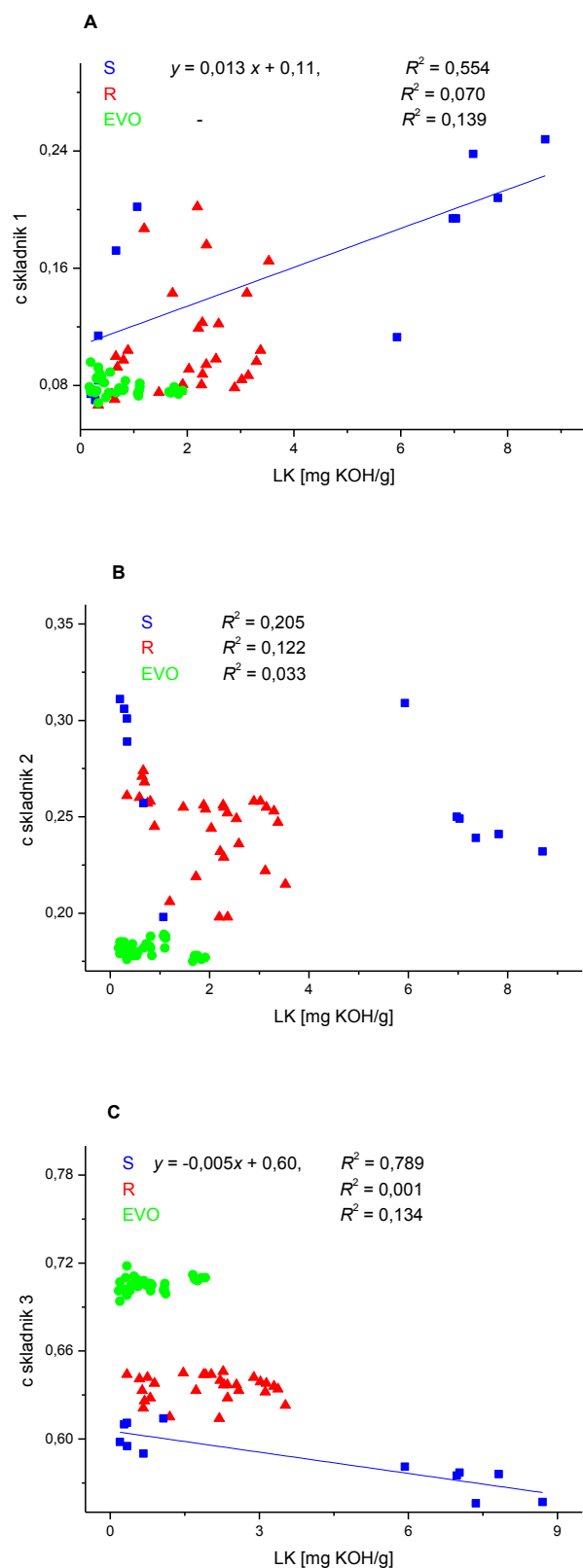
W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę regresji dla wartości względnych stężeń składników i liczby kwasowej, rysunek 47.

Dla olejów rzepakowych i oliw nie stwierdzono znaczących zależności dla żadnego ze składników z liczbą kwasową. Dla olejów słonecznikowych stwierdzono zależność dla stężeń pierwszego ($R^2 = 0,554$) i drugiego ($R^2 = 0,789$) składnika i liczby kwasowej. Wydaje się jednak, że zależność ta opisuje różnice między olejami słonecznikowymi, a nie zmiany zachodzące w wyniku utleniania.



Rysunek 46. Zależność między względnymi stężeniami składników 1, 2 i 3 a liczbami nadtlenkowymi dla olejów słonecznikowych ($n=12$), rzepakowych ($n=30$) i oliw ($n=36$); **(A)** składnik 1, **(B)** składnik 2, **(C)** składnik 3.

Na podstawie badań własnych



Rysunek 47. Zależność między względnymi stężeniami składników 1, 2 i 3 a liczbami kwasowymi dla olejów słonecznikowych ($n=12$), rzepakowych ($n=30$) i oliw ($n=36$); **(A)** składnik 1, **(B)** składnik 2, **(C)** składnik 3.

Na podstawie badań własnych

Analiza PLS widm w zakresie podczerwieni (NIR i MIR)

Wyniki regresji PLS dla widm olejów poddanych testowi termostatowemu w zakresie MIR i NIR i liczby nadtlenkowej, przedstawiono w tabeli 16. Wszystkie modele otrzymano dla widm po wstępnym przekształceniu z zastosowaniem metody korekcji rozproszenia (MSC).

Tabela 16. Wyniki analizy regresji PLS widm w zakresie NIR i MIR olejów ogrzewanych i liczby nadtlenkowej

Model	LV	R ²	RMSECV [meq O ₂ /kg]	SECV [meq O ₂ /kg]	RPD
Oliwy z oliwek, n=36 Średnia±SD: 27±17, Zakres: 5.9-53.2 [meq O ₂ /kg]					
NIR	6	0,98	2,6	2,7	6,3
MIR	8	0,68	9,8	9,9	1,7
NIR + MIR	9	0,69	9,5	9,7	1,8
Oleje rzepakowe, n=30 Średnia±SD: 163 ±166, Zakres: 1,1-568 [meq O ₂ /kg]					
NIR	3	0,94	39,5	40,2	4,1
MIR	1	0,90	53,4	54,4	3,0
NIR + MIR	2	0,94	41	41,6	4,0
Oleje słonecznikowe, n=12 Średnia±SD: 335±298, Zakres: 19-834 [meq O ₂ /kg]					
NIR	2	0,98	42,0	43,9	6,8
MIR	3	0,49	212,8	222,2	1,3
NIR + MIR	4	0,95	70,9	74	4,0
Wszystkie oleje, n=78 Średnia±SD: 127 ±188, Zakres: 1.1-834 [meq O ₂ /kg]					
NIR	3	0,97	32,7	32,9	3,8
MIR	5	0,71	98,3	98,8	1,3
NIR+MIR	5	0,95	40,3	41	3,1

Na podstawie badań własnych

Wszystkie modele regresji PLS dla widm w zakresie NIR charakteryzowały się lepszymi parametrami niż odpowiednie modele dla widm w zakresie MIR i dla połączonych zakresów NIR i MIR. Najniższe parametry R² i RPD uzyskano dla modeli w zakresie MIR.

Dla olejów rzepakowych modele dla widm w zakresie NIR i MIR i połączonych zakresów odznaczały się dobrym dopasowaniem.

Dla olejów słonecznikowych najlepszy model PLS otrzymano dla widm w zakresie NIR. Wartość RPD dla tego modelu wynosiła 6,8 co wskazuje na bardzo dobrą zdolność przewidywania wartości liczby nadtlenkowej. Dla modelu MIR nie uzyskano korelacji z liczbą nadtlenkową. Połączenie obu zakresów pozwoliło na otrzymanie modelu, którego wartość RPD wynosiła 4,0.

Uzyskane modele dla wszystkich olejów łącznie, charakteryzowały się dobrą korelacją pomiędzy widmami w podczerwieni a liczbą nadtlenkową. Wartość R^2 dla modelu regresji PLS widm w zakresie NIR wynosiła 0,970. Wartość RPD dla tego modelu była równa 3,8. Model dla widm w zakresie MIR miał nieco gorsze dopasowanie. Dla połączonych zakresów (NIR i MIR) uzyskano dobrą korelację ($R^2 = 0,954$ i $RPD = 3,1$).

W tabeli 17 przedstawiono wyniki analizy PLS dla widm wszystkich ogrzewanych olejów w zakresie NIR i MIR (po przekształceniu MSC) dla liczby kwasowej.

Tabela 17. Wyniki analizy regresji PLS widm w zakresie NIR i MIR olejów ogrzewanych i liczby kwasowej

Model	LV	R^2	RMSECV [mg KOH/g]	SEC [mg KOH/g]	RPD
Oliwy z oliwek, n=36 Średnia \pm SD: 0,78 \pm 0,54, Range:0,2-1,9 [mg KOH/g]					
NIR	5	0,80	0,24	0,24	2,2
MIR	5	0,67	0,31	0,32	1,6
NIR + MIR	4	0,73	0,28	0,29	1,8
Oleje rzepakowe, n=30 Średnia \pm SD: 1,96 \pm 0,96, Range:0,3-3,5 [mg KOH/g]					
NIR	6	0,94	0,23	0,24	4,0
MIR	10	0,79	0,44	0,44	2,2
NIR + MIR	9	0,89	0,32	0,32	2,9
Oleje słonecznikowe, n=12 Średnia \pm SD: 3,9 \pm 3,6, Range:0,2-8,7 [mg KOH/g]					
NIR	3	0,98	0,53	0,54	6,7
MIR	6	0,45	2,8	2,8	1,3
NIR + MIR	8	0,74	1,9	1,9	1,9
Wszystkie oleje, n=78 Średnia \pm SD: 1,7 \pm 1,88, Range:0,2-8,7 [mg KOH/g]					
NIR	5	0,97	0,32	0,32	5,9
MIR	6	0,94	0,47	0,47	4,0
NIR+MIR	7	0,96	0,36	0,36	5,2

Na podstawie badań własnych

Dla większości analizowanych modeli stwierdzono dobrą korelację widm z liczbą kwasową. Najlepszy model regresji PLS otrzymano dla widm w zakresie NIR oleju słonecznikowego. Model ten charakteryzował się błędem RPD 6,7 co wskazuje na dobrą zdolność przewidywania wartości liczby kwasowej. Dla analizy wszystkich olejów łącznie najlepszy model otrzymano dla widm w zakresie MIR. Wartość RPD dla tego modelu wynosiła 4,0 co oznacza dobrą zdolność przewidywania liczby kwasowej. Model dla połączonych zakresów NIR i MIR charakteryzował się dobrym dopasowaniem o czym świadczy wartości RPD równa 5,2.

8.5. Badanie stabilności olejów z zastosowaniem spektroskopii elektronowej

Zakres widzialny (Vis)

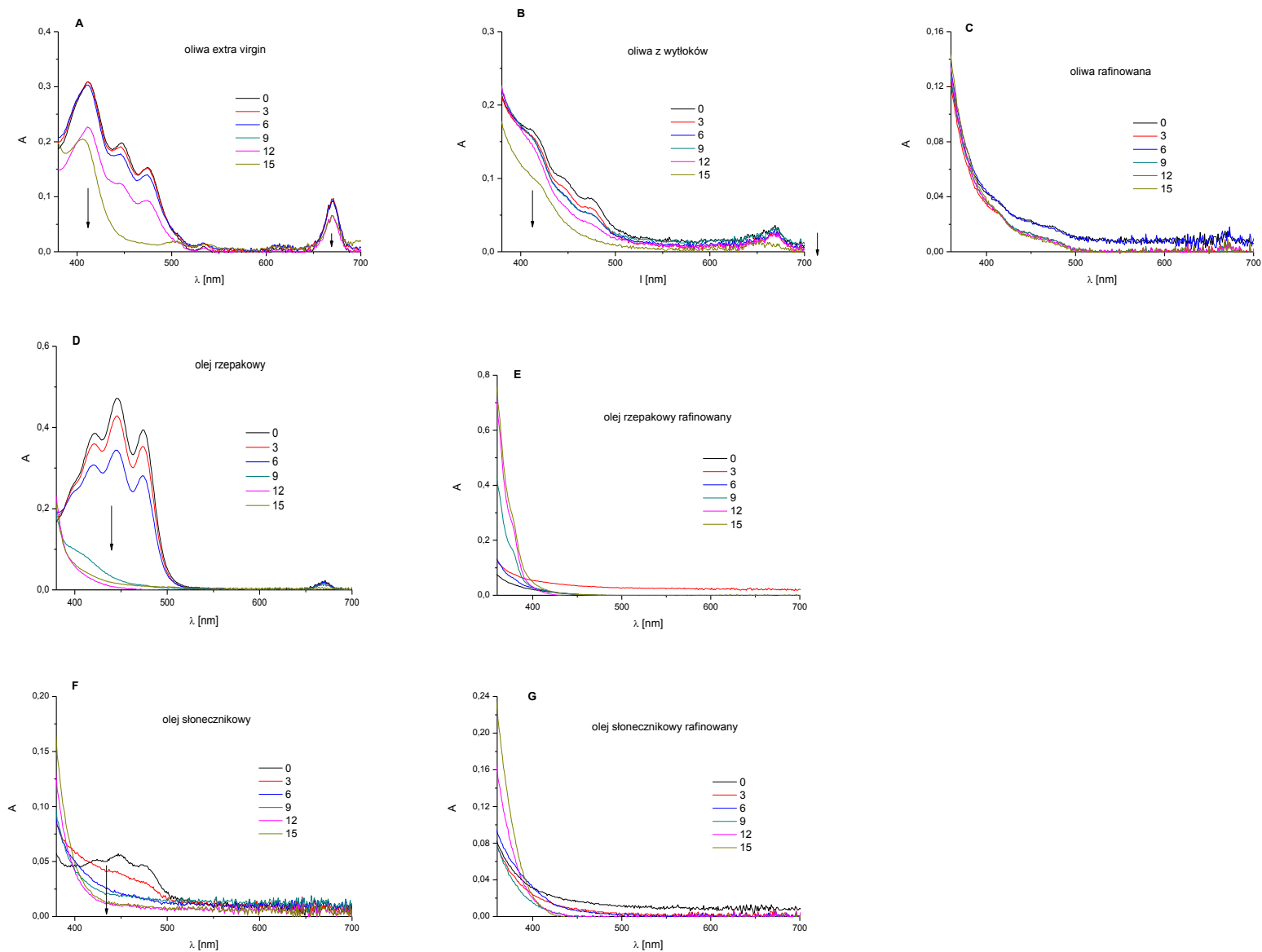
W wyniku przechowywania olejów roślinnych następuje zmniejszenie intensywności pasm pochodzących od chlorofili i karotenoidów. Na rysunku 48 przedstawiono przykładowe widma absorpcji w zakresie widzialnym olejów poddanych testowi termostatowemu.

W widmach oliw z oliwek zawartość obu barwników maleje w trakcie ogrzewania. Zanik absorpcji dla barwników karotenoidowych i chlorofilowych przebiega jednak w różnym tempie. Podobne zmiany dla oliw z oliwek obserwowali Ricca i in. (2012). W widmach oliwy extra virgin można zauważyć, iż po piętnastu dniach ogrzewania pasmo pochodzące od absorpcji karotenoidów prawie całkowicie zanika, natomiast pasmo pochodzące od absorpcji chlorofili ulega niewielkim zmianom. Podobna zależność obserwowana jest w oliwie z wyłoków.

Dla oleju rzepakowego tłoczonego na zimno obserwuje się systematyczny spadek intensywności pasm pochodzących od barwników karotenoidowych. Po sześciu dniach ogrzewania pasmo to ulega prawie całkowitemu zanikowi, rysunek 48.

Barwniki karotenoidowe występujące w oleju słonecznikowym, uległy rozkładowi w trakcie zachodzących procesów oksydacyjnych. Już w trzecim dniu ogrzewania odnotowano znaczną redukcję tych związków.

W olejach rafinowanych (RO, RR i SR) nie obserwuje się pasm pochodzących od absorpcji barwników, co związane jest działaniem wysokich temperatur podczas produkcji oleju.



Rysunek 48. Widma absorpcji w zakresie Vis: **(A)** oliwy z oliwek extra virgin EVO1, **(B)** oliwy z wyłoków OW1, **(C)** oliwy rafinowanej RO1, **(D)** oleju rzepakowego tłoczony na zimno R1, **(E)** oleju rzepakowego rafinowanego RR1, **(F)** oleju słonecznikowego tłoczony na zimno S1, **(G)** oleju słonecznikowego rafinowanego SR1. Oleje świeże i ogrzewane przez okres 3, 6, 9, 12 i 15 dni w temperaturze 60°C. Oleje nierozcieńczone. *Na podstawie badań własnych*

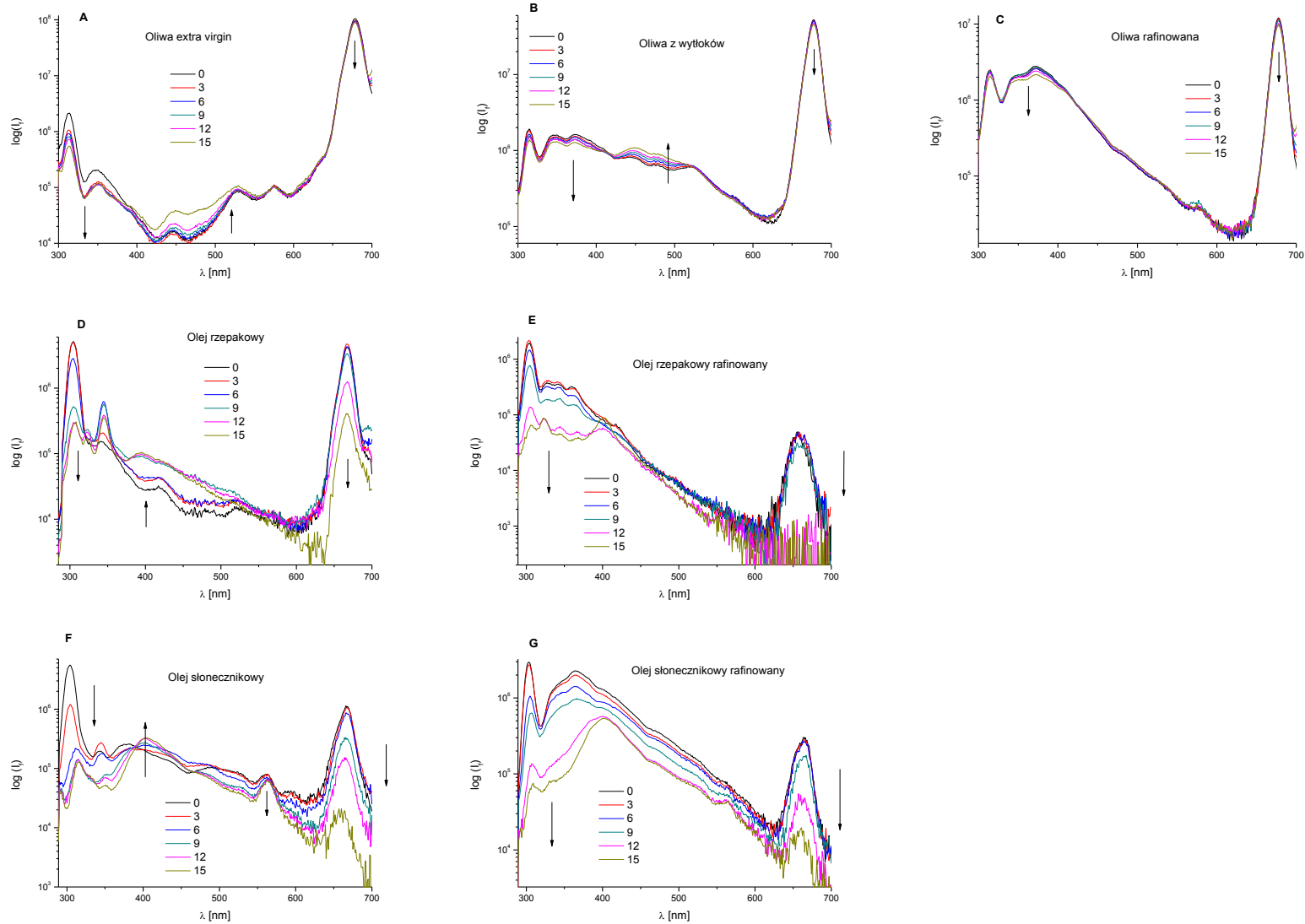
Widma synchroniczne fluorescencji

Widma synchroniczne fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) olejów świeżych i poddanych testowi termostatowemu (60°C) przez okres 3, 6, 9, 12 i 15 dni, przedstawiono na rysunku 49.

W widmach oliwy z oliwek extra virgin można zaobserwować systematyczny spadek intensywności pasm odpowiadających emisji tokoferoli i chlorofili (Cheikhousman i in. 2005). Zmiany intensywności pasm w krótkofalowym zakresie były większe w porównaniu ze zmianami w pasmach w zakresie długofalowym. Ponadto obserwuje się wzrost intensywności pasma w pośrednim zakresie (400-500 nm), które prawdopodobnie pochodzi od produktów rozkładu barwników chlorofilowych. W widmach oliwy z wytlóków podobnie jak w oliwie EVO wskutek ogrzewania następuje zmniejszenie intensywności pasm emisji tokoferoli i chlorofili. Pasma w zakresie 400-500 nm pochodzące od produktów utleniania, zwiększa swoją intensywność w trakcie ogrzewania. Podobne zjawisko obserwowali w swojej pracy Poulli, Mousdis i Georgiou (2009). W oliwie rafinowanej odnotowano spadek intensywności pasm w zakresie 300-450 nm i z maksimum przy długości fali 666 nm.

Widma świeżego oleju rzepakowego charakteryzowały się najwyższą intensywnością pasm charakterystycznych dla emisji tokoferoli, które w wyniku ogrzewania uległy znacznej redukcji. W przeciwieństwie do oliw z oliwek, w widmach oleju rzepakowego (w dwunastym dniu ogrzewania) obserwuje się znaczny spadek intensywności pasma emisji pochodzącego od chlorofili. Pasma pochodzące od tokoferoli już w dziewiątym dniu ogrzewania wyraźnie zmniejszyły swoją intensywność. W pośrednim zakresie widma (400-500 nm) następuje wzrost intensywności pasma pochodzącego od produktów utleniania. W rzepakowym oleju rafinowanym odnotowano spadek intensywności pasm w całym zakresie (280-700 nm). Największe zmiany, w stosunku do widm oleju świeżego, zaobserwowano w dwunastym i piętnastym dniu ogrzewania.

Wskutek ogrzewania oleju słonecznikowego (S1) następuje rozkład barwników chlorofilowych i tokoferoli. Zmiany te widoczne są w widmach fluorescencji oleju słonecznikowego co objawia się spadkiem intensywności odpowiednich dla tych związków pasm. W zakresie krótkofalowym już w trzecim dniu ogrzewania nastąpiły znaczne zmiany w stosunku do widm oleju świeżego. Podobne zjawisko odnotowano w długofalowym zakresie widma. W pośrednim zakresie widma (400-450 nm) pojawia się nowe pasmo pochodzące od produktów utleniania. W oleju SR w wyniku ogrzewania następuje zmniejszenie intensywności pasm w całym zmierzonym zakresie spektralnym



Rysunek 49. Widma synchroniczne fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) olejów świeżych i poddanych testowi termostatowemu (60°C) przez okres 3, 6, 9, 12 i 15 dni. (A) Oliwa z oliwek extra virgin EVO1, (B) oliwa z wyłoków OW1, (C) oliwa rafinowana RO1, (D) olej rzepakowy tłoczony na zimno R1, (E) olej rzepakowy rafinowany RR1, (F) olej słonecznikowy tłoczony na zimno S1, (G) olej słonecznikowy rafinowany SR1. Skala logarytmiczna fluorescencji. *Na podstawie badań własnych*

8.6. Analiza widm elektronowych

Analiza PLS widm w zakresie Vis i fluorescencji

Wyniki analiz regresji PLS widm elektronowych i liczby nadtlenkowej przedstawiono w tabeli 18.

Tabela 18. Wyniki analizy regresji PLS dla widm elektronowych (Vis i fluorescencja) olejów ogrzewanych i liczby nadtlenkowej

Model	LV	R ²	RMSECV [meq O ₂ /kg]	SECV [meq O ₂ /kg]	RPD
Oliwy z oliwek, n=36					
Średnia±SD: 27±17, Zakres: 5.9-53.2 [meq O ₂ /kg]					
Vis	5	0,60	11,2	11,2	1,5
Fluorescencja Δλ=10 nm	10	0,73	8,9	9,0	1,9
Oleje rzepakowe, n=30					
Średnia±SD: 163 ±166, Zakres: 1.1-568 [meq O ₂ /kg]					
Vis	3	0,87	53,3	54,4	3,0
Fluorescencja Δλ=10 nm	8	0,70	92,2	93,8	1,8
Oleje słonecznikowe, n=12					
Średnia±SD: 335±298, Zakres: 19-834 [meq O ₂ /kg]					
Vis	5	0,75	147	153	2,0
Fluorescencja Δλ=10 nm	3	0,92	88,3	92	3,2
Wszystkie oleje, n=78					
Średnia±SD: 127 ±188, Zakres: 1.1-834 [meq O ₂ /kg]					
Vis	7	0,64	110	111	1,7
Fluorescencja Δλ=10 nm	6	0,60	120	121	1,5

Na podstawie badań własnych

Dla większości analizowanych modeli regresji PLS uzyskano korelacją widm z liczbą nadtlenkową. Najlepszy model PLS otrzymano dla widm synchronicznych fluorescencji (Δλ=10 nm) oleju słonecznikowego. Model ten cechował się wartością współczynnika R² równą 0,92 oraz RPD równą 3,2 co wskazuje na zadowalającą zdolność przewidywania wartości liczby nadtlenkowej. Najlepsze dopasowanie dla widm absorpcji w zakresie widzialnym otrzymano dla olejów rzepakowych. Wartość RPD dla tego modelu wynosiła 3,0 a współczynnika R² wynosiła 0,87.

W tabeli 19 przedstawiono wyniki analizy regresji PLS dla widm elektronowych ogrzewanych olejów i liczby kwasowej.

Tabela 19. Wyniki analizy regresji PLS dla widm elektronowych (Vis i fluorescencja) olejów ogrzewanych i liczby kwasowej

Model	LV	R ²	RMSECV [mg KOH/g]	SECV [mg KOH/g]	RPD
Oliwy z oliwek, n=36					
Średnia ±SD: 0,78±0,54, Range:0,2-1,9 [mg KOH/g]					
Vis	8	0,91	0,16	0,16	3,4
Fluorescencja	5	0,62	0,34	0,34	1,6
Oleje rzepakowe, n=30					
Średnia ±SD: 1,96±0,96, Range:0,3-3,5 [mg KOH/g]					
Vis	6	0,95	0,21	0,21	4,6
Fluorescencja	10	0,65	0,58	0,58	1,6
Oleje słonecznikowe, n=12					
Średnia ±SD: 3,9±3,6, Range:0,2-8,7 [mg KOH/g]					
Vis	2	0,87	1,4	1,4	2,6
Fluorescencja	5	0,82	1,6	1,6	2,2
Wszystkie oleje, n=78					
Średnia ±SD: 1,7±1,88, Range:0,2-8,7 [mg KOH/g]					
Vis	10	0,72	0,99	0,99	1,9
Fluorescencja	3	0,25	1,6	1,6	1,2

Na podstawie badań własnych

Przeprowadzona analiza regresji metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS) dla ogrzewanych olejów i liczby kwasowej wykazała dla większości modeli dobrą korelację pomiędzy widmami a wyznaczonym parametrem. Dla widm synchronicznych fluorescencji (zmierzonych przy $\Delta\lambda=10$ nm) wszystkich olejów, nie uzyskano korelacji z liczbą kwasową, zaś najlepszy model otrzymano dla oleju słonecznikowego. Otrzymany model cechował się wartością współczynnika R² na poziomie 0,92 oraz błędem RPD= 2,2. Najlepszy model PLS dla widm w zakresie Vis uzyskano dla olejów rzepakowych. Wartość RPD tego modelu wynosił 4,6 co oznacza, że model ten ma dobrą zdolność przewidywania wartości LK.

8.7. Podsumowanie

W czasie ogrzewania w wyniku zachodzących procesów utleniania następują zmiany właściwości olejów roślinnych prowadzące do pogorszenia ich jakości. Zmiany te zależne są od gatunku oleju, jego składu chemicznego i sposobu otrzymywania.

Stabilność olejów została oceniona na podstawie wyniku testu termostatowego. Próbkę przechowywane były przez okres piętnastu dni w temperaturze 60°C bez dostępu światła. Co trzeci dzień oznaczano wartości liczby nadtlenkowej i kwasowej. Na podstawie zmian LO stwierdzono, że najmniej stabilny jest olej słonecznikowy rafinowany i tłoczony na zimno.

Oleje rzepakowe utleniały się wolniej, przy czym stabilność rafinowanych olejów rzepakowych była mniejsza. Oliwy z oliwek charakteryzowały się większą stabilnością oksydacyjną niż pozostałe oleje. Podobne zjawisko zaobserwowali w swojej pracy Krygier, Domian i Drąbka (1995). Oliwa z oliwek ze względu na skład kwasów tłuszczowych i antyoksydantów (związki fenolowe 100-300 mg/kg, tokoferole 100-250 mg/kg, fosfolipidy 40-135 mg/kg), odznacza się wysoką odpornością na utlenianie. Olej rzepakowy bogaty w kwas linolenowy n-3 (7-10%) jest mniej stabilny niż oliwa z oliwek. Najbardziej podatny na procesy oksydacyjne jest olej słonecznikowy, który zawiera duże ilości kwasu linolowego (63%) i linolenowego (0,2%). Niższa stabilność olejów rzepakowych rafinowanych może być skutkiem obniżenia zawartości antyoksydantów (karotenoidów, tokoferoli, steroli i fosfolipidów) pod wpływem działania wysokich temperatur w trakcie produkcji oleju.

Zmiany wartości liczby kwasowej, określającej ilość wolnych kwasów tłuszczowych, w trakcie trwania całego eksperymentu były niewielkie i nawet w piętnastym dniu ogrzewania nie przekraczały dopuszczalnych wartości. Jedyne wyjątek stanowił olej słonecznikowy tłoczony na zimno, dla którego wartości LK zostały przekroczone już w próbce świeżej.

W widmach oscylacyjnych w zakresie MIR i NIR ogrzewanych olejów widoczne były niewielkie zmiany intensywności pasm w stosunku do widm olejów świeżych. Zmiany w widmach w zakresie MIR przypisano powstawaniu wtórnych produktów utlenienia takich jak aldehydy i ketony. Zmiany te były skorelowane z pasmem w rejonie 985-988 cm^{-1} , którego intensywność wzrastała w czasie utleniania. Spadek intensywności pasma przy liczbie falowej 1746 cm^{-1} był wynikiem przejścia pierwotnych produktów utleniania we wtórne, zaś obniżenie intensywności pasma z maksimum absorpcji przy liczbie falowej 3008 cm^{-1} wynikało z rozpadu podwójnego wiązania *cis*. W widmach w zakresie NIR w rejonach 7072-605 cm^{-1} oraz 5230-4740 cm^{-1} , zaobserwowano wzrost intensywności pasm w czasie utleniania. W oliwach z oliwek w wyniku utleniania zmniejszała się intensywność pasma z maksimum absorpcji przy liczbie falowej 5270 cm^{-1} .

Do analizy widm oscylacyjnych zastosowano metodę dekonwolucji krzywych (MCR). Wyodrębniono widma i określono względne stężenia trzech składników, których charakterystyka spektralna odpowiadała: produktom utlenienia (składnik 1), strukturom nienasyconym (składnik 2) oraz nasyconym (składnik 3). Na podstawie klasycznej analizy regresji dla wartości względnych stężeń składników i liczby nadtlenkowej lub kwasowej stwierdzono, że olej rzepakowy wykazuje proporcjonalną zależność składnika 1 i liczby nadtlenkowej ($R^2 = 0,911$) oraz odwrotnie proporcjonalną zależność składnika 2 i liczby

nadtlenkowej ($R^2= 0,869$). Dla liczb kwasowych nie stwierdzono istotnych korelacji ze stężeniem składników.

Widma elektronowe pozwoliły otrzymać informacje m.in. o barwnikach obecnych w badanych olejach. W zależności od gatunku oleju i sposobu jego otrzymywania, zaobserwowano różne tempo zmian zachodzących procesów oksydacyjnych. W widmach w zakresie Vis obserwowano zmniejszenie intensywności pasm pochodzących od absorpcji chlorofili i karotenoidów. W widmach synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) widoczny był spadek intensywności pasm pochodzących od tokoferoli i chlorofili. Ponadto w widmach tych zaobserwowano wzrost intensywności pasma w pośrednim zakresie, wywołany produktami utleniania.

Na podstawie analizy regresji PLS wykazano korelacje widm z liczbą nadtlenkową i kwasową lepsze dla widm oscylacyjnych niż dla widm elektronowych. Najlepszy model kalibracyjny dla przewidywania liczby nadtlenkowej i kwasowej, dla wszystkich badanych próbek olejów otrzymano dla widm w zakresie NIR ($R^2= 0,970$, RPD= 3,8). Dla przewidywania liczby kwasowej dla wszystkich olejów najlepszy model otrzymano również dla widm w zakresie NIR ($R^2= 0,970$, RPD= 5,9).

9. KONTROLA JAKOŚCI OLEJU RZEPAKOWEGO TŁOCZONEGO NA ZIMNO W CZASIE PRZECHOWYWANIA

9.1. Wprowadzenie

Podczas przechowywania w wyniku zachodzących procesów utleniania następują zmiany właściwości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno prowadzące do pogorszenia jego jakości. Zakres przemian oksydacyjnych zależy od obecności związków o charakterze pro-utleniającym, czynników zewnętrznych (temperatury, dostępu tlenu i światła) oraz rodzaju opakowania (Prescha i in. 2008).

Utlenianie zachodzić może na drodze utleniania lub pod wpływem światła na drodze utleniania fotosensybilizowanego. W ciemności głównym procesem zachodzącym w olejach roślinnych jest autooksydacja. Działanie światła prowadzi do szybszych procesów fotoutleniania niż autoutleniania (Sikorska 2008a, Caponio i in. 2005).

Badania przedstawione w tym rozdziale miały na celu ocenę zmian zachodzących w oleju rzepakowym tłoczonym na zimno (R3) w czasie przechowywania w warunkach ekspozycji na światło i w ciemności.

Obok tradycyjnych metod do badań zastosowano techniki spektroskopii absorpcyjnej w zakresie NIR i Vis oraz spektroskopię fluorescencyjną.

9.2. Charakterystyka świeżego oleju rzepakowego

Dla próbki świeżej oleju rzepakowego wartości liczby nadtlenkowej i kwasowej spełniały wymagania norm (PN-ISO 660:1998 i PN-ISO 3960:1996). Liczba nadtlenkowa (LO) świeżego oleju rzepakowego wynosiła 1,8 meq O₂/kg. Zbliżony zakres wartości LO w oleju rzepakowym tłoczonym na zimno podają Wroniak i in. (2006), Cichocz i Czeczot (2011). Wartość liczby kwasowej (LK), dla świeżego oleju rzepakowego wynosiła 0,76 mg KOH/g. Świeży olej rzepakowy tłoczony na zimno charakteryzował się wysoką zawartością witaminy E (tokoferoli) wynoszącą 684 mg/kg. Stężenie barwników karotenoidowych wynosiło 6,0 mg/L. Badany olej rzepakowy charakteryzował się dużą zawartością kwasu oleinowego (18:1, n-9) na poziomie 60,5% co jest charakterystyczne dla tego gatunku oleju. Procentowy udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w badanej próbce przedstawiono w tabeli 20.

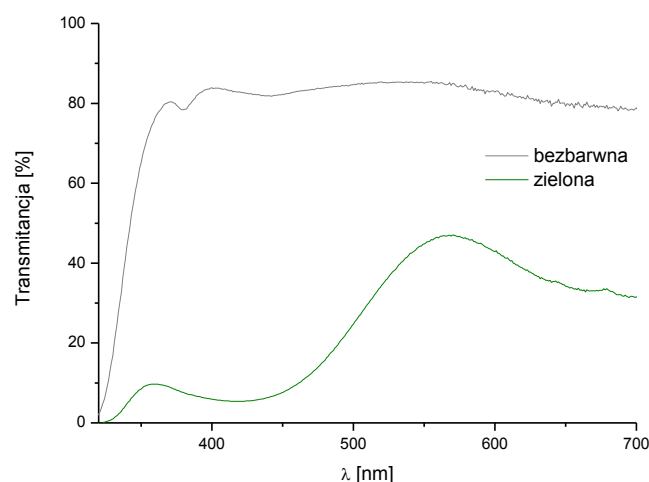
Tabela 20. Skład kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym (R3).

Nazwa	Wynik [%]
Kwas tetradekanowy (mirystynowy)	0,06 ± 0,02
Kwas heksadekanowy (palmitynowy)	4,66 ± 0,28
Kwas heptadekanowy (margarynowy)	0,16
Kwas oktadekanowy (stearynowy)	0,62 ± 0,07
Kwas cis-9-oktadekenowy (oleinowy)	60,52 ± 1,96
Kwas trans-9-oktadecenowy (elaidynowy)	
Kwas (Z,Z)-9,12-oktadekadienowy (linolowy)	20,84 ± 0,25
Kwas (E,E)-9,12-oktadekadienowy (linolelaidonowy)	
Kwas (Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienowy (α -linolenowy)	10,16 ± 0,75
Kwas eikozanowy (arachidowy)	0,62
Kwas cis-5-eikozenowy (arachidynowy)	1,93 ± 0,20
Kwas dokozanowy (behenowy)	0,23
Kwas (Z,Z,Z)-11,14,17-eikozatrienowy	0,10
Nasycone kwasy tłuszczowe	6,34
Mononienasycone kwasy tłuszczowe	62,55
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe	31,09
Suma kwasów: α-linolenowego i eikozapentaenowego	10,16
Suma kwasów: γ-linolenowego i arachidowego	20,84

Na podstawie badań własnych

Olej rzepakowy tłoczony na zimno przechowywano w trzech wariantach: (1) w ciemności, (2) w zielonych butelkach eksponowanych na światło, (3) w bezbarwnych butelkach eksponowanych na światło. Widma transmisji butelek wykorzystanych do przechowywania oleju przedstawiono na rysunku 50. Szkło bezbarwne przepuszcza promieniowanie w całym zakresie widzialnym. Transmitancja szkła o barwie zielonej jest zależna od zakresu spektralnego: bardzo niska w zakresie poniżej 500 nm, w zakresie powyżej 500 nm wnosi 30-40 %, rysunek 50.

Dla świeżego oleju umieszczonego w zamkniętych butelkach zawartość tlenu zmierzona w fazie nadpowierzchniowej wynosiła 20,9% natomiast w oleju kształtowała się na poziomie 7094 ppb



Rysunek 50. Widma transmisji butelek ze szkła bezbarwnego i zielonego. Na podstawie badań własnych

9.3. Ocena zmian jakości oleju rzepakowego w czasie przechowywania na podstawie parametrów analitycznych

W tabeli 21 przedstawiono parametry analityczne charakteryzujące jakość świeżego oleju rzepakowego oraz zmiany zachodzące w trakcie jego przechowywania.

Tabela 21. Zmiany właściwości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w czasie przechowywania w różnych warunkach.

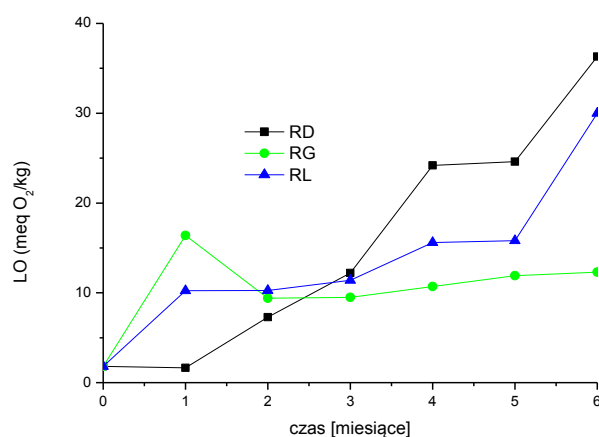
Olej	LO (meq O ₂ /kg)	LK (mg KOH/g)	K ₂₃₂ * (%)	K ₂₇₀ * (%)	O ₂ - f.n. (%)	O ₂ - olej (ppb)	Karotenoidy* (mg/L)	Tokoferole (mg/kg)
R0	1,80±0,05	0,76±0,01	2,30 ± 0,01	0,40 ± 0,01	20,9 ± 0,1	7094 ± 241	6,0 ± 0,5	684±20
RD1	1,60±0,02	0,84±0,01	2,10 ± 0,01	0,20 ± 0,01	20,7 ± 0,1	6514 ± 23	6,4±0,5	685±5
RD2	7,30±0,06	0,84±0,04	3,20 ± 0,01	0,30 ± 0,01	5,3 ± 0,3	101 ± 11	5,8±0,5	653±2
RD3	12,0±0,5	0,70±0,05	3,70 ± 0,01	0,30 ± 0,01	5,4 ± 0,4	110 ± 10	5,6±0,5	634±9
RD4	24,2±0,7	0,77±0,03	9,00 ± 0,01	0,50 ± 0,01	11,7 ± 0,1	132 ± 18	5,3±0,5	564±7
RD5	24,6±0,1	0,80±0,04	5,10 ± 0,01	0,40 ± 0,01	4,4 ± 0,1	180 ± 17	5,4±0,5	621±3
RD6	36,3±0,3	0,78±0,02	6,80 ± 0,01	0,50 ± 0,01	11,6 ± 0,1	161 ± 17	4,9±0,5	529±5
R0	1,8±0,08	0,76±0,01	2,30 ± 0,01	0,40 ± 0,01	20,9 ± 0,1	7094 ± 241	6,0±0,5	684±20
RG1	16,4±0,1	0,72±0,03	2,60 ± 0,01	0,40 ± 0,01	6,4 ± 1	674 ± 94	5,8±0,5	566±0
RG2	9,4±0,1	0,72±0,02	2,60 ± 0,01	0,50 ± 0,01	3,6 ± 0,6	744 ± 89	5,7±0,5	593±4
RG3	9,5±0,1	0,75±0,04	3,40 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,2 ± 0,4	98 ± 61	5,8±0,5	598±5
RG4	10,7±0,8	0,83±0,02	2,90 ± 0,01	0,50 ± 0,01	1,4 ± 0,8	457 ± 95	5,7±0,5	592±3
RG5	11,9±0,6	0,83±0,02	3,10 ± 0,01	0,50 ± 0,01	1,2± 0,2	407 ± 93	5,8±0,5	579±6
RG6	12,3±0,1	0,83±0,08	6,20 ± 0,01	0,60 ± 0,01	4,1 ± 0,5	529 ± 232	5,1±0,5	419±3
R0	1,8±0,2	0,76±0,01	2,30 ± 0,01	0,40 ± 0,01	20,9 ± 0	7094 ± 241	6,0±0,5	684±20
RL1	10,2±0,1	0,72±0,01	2,50 ± 0,01	0,40 ± 0,01	2,4 ± 0,1	139 ± 9	6,2±0,5	555±4
RL2	10,2±0,2	0,74±0,02	2,60 ± 0,01	0,40 ± 0,01	1,4± 0,1	353 ± 11	5,9±0,5	540±7
RL3	11,4±2	0,78±0,01	3,30 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,5 ± 0,1	333 ± 18	6,3±0,5	554±2
RL4	15,6±0,2	0,85±0,02	7,70 ± 0,01	0,60 ± 0,01	16,9 ± 0,1	1366 ± 19	4,2±0,5	250±1
RL5	15,8±0,5	0,86±0,01	3,30 ± 0,01	0,50 ± 0,01	1,1 ± 0,1	922 ± 29	5,8±0,5	536±5
RL6	30±0,3	0,92±0,05	3,70 ± 0,01	0,50 ± 0,01	2,4 ± 0,1	1106 ± 54	5,6±0,5	481±8

Karotenoidy* - stężenie karotenoidów w przeliczeniu na β-karoten / K₂₃₂* i K₂₇₀* - Wartości specyficznych współczynników absorpcji K / O₂-f.n.: zawartość tlenu w fazie nadpowierzchniowej oleju / O₂ - olej: zawartość tlenu w oleju. Na podstawie badań własnych

Liczba nadtlenkowa

Na rysunku 51 przedstawiono zmiany liczby nadtlenkowej w zależności od warunków przechowywania.

Zmiany wartości liczby nadtlenkowej zależne były od czasu i warunków przechowywania. W oleju eksponowanym na światło, niezależnie od zastosowanego opakowania, dopuszczalne limity (<5 meq O₂/kg) zostały przekroczone już w pierwszym miesiącu przechowywania. Natomiast w oleju rzepakowym przechowywanym w ciemności dopuszczalna wartość została przekroczona w drugim miesiącu przechowywania. W oleju rzepakowym przechowywanym w ciemności zaobserwowano po sześciu miesiącach przechowywania najwyższą zawartość pierwotnych produktów utlenienia, jednakże w początkowym etapie przechowywania (1 i 2 miesiąc) wartości LO były niższe niż dla próbek eksponowanych na światło. Najmniej pierwotnych produktów utlenienia odnotowano w oleju rzepakowym przechowywanym w zielonej butelce eksponowanej na działanie światła.

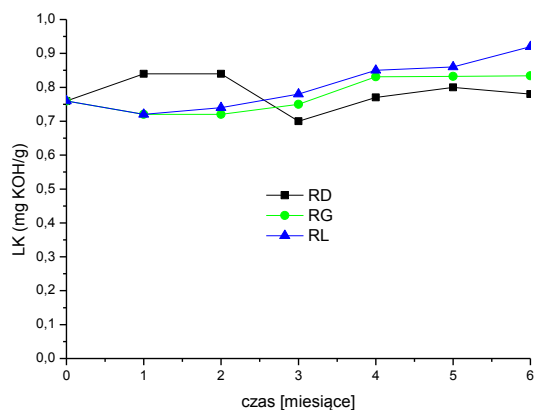


Rysunek 51. Zmiany liczby nadtlenkowej w oleju rzepakowym przechowywanym przez 6 miesięcy w różnych warunkach; olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowany na światło, oraz olej rzepakowy (RD) w butelce przechowywany w ciemności. *Na podstawie badań własnych*

Liczba kwasowa

Na rysunku 52 przedstawiono zmiany liczby kwasowej dla oleju rzepakowego przechowywanego w różnych warunkach. Zmiany liczby kwasowej były niewielkie i nawet po sześciu miesiącach przechowywania nie przekraczały dopuszczalnych wartości. Największymi wartościami liczby kwasowej, po sześciu miesiącach przechowywania,

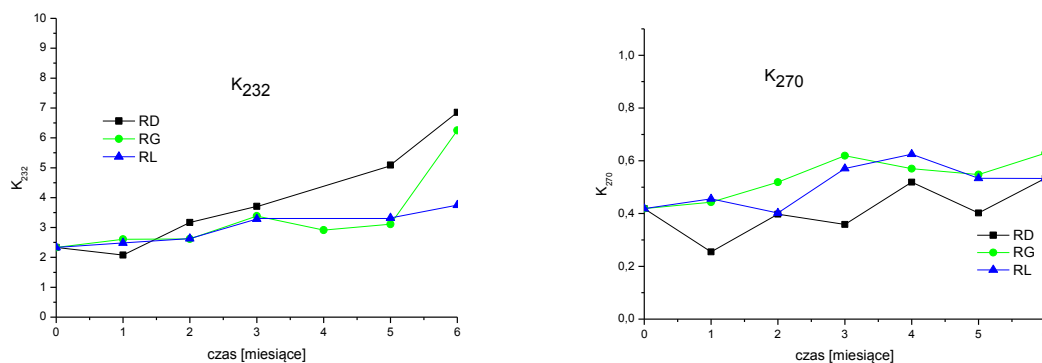
charakteryzował się olej w butelce bezbarwnej ekspozowanej na światło. Najmniejsze wartości (po sześciu miesiącach przechowywania) otrzymano dla oleju rzepakowego przechowywanego w ciemności.



Rysunek 52. Zmiany liczby kwasowej w oleju rzepakowym przechowywanym przez 6 miesięcy w różnych warunkach; olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce ekspozowany na światło, oraz olej rzepakowy (RD) przechowywany w ciemności. *Na podstawie badań własnych*

Współczynniki absorpcji K_{232} i K_{270}

Na rysunku 53 przedstawiono wartości współczynników absorpcji K_{232} i K_{270} , świadczących o obecności pierwotnych i wtórnych produktów utleniania w badanym oleju rzepakowym.



Rysunek 53. Zmiany wartości parametru K_{232} (lewy panel) i K_{270} (prawy panel) dla oleju rzepakowego przechowywanego w czasie i w różnych warunkach; olej w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce ekspozowany na światło, oraz olej (RD) przechowywany w ciemności. *Na podstawie badań własnych*

Zmiany zachodzące w oleju rzepakowym przechowywanym przez okres sześciu miesięcy, wykazały wzrost wartości współczynników absorpcji K_{232} w czasie przechowywania. Najniższą wartością parametru K_{232} charakteryzowała się próbka świeża, najwyższą zaś próbka przechowywana przez okres sześciu miesięcy w ciemności. Zmiany

współczynników absorpcji K_{232} miały podobny przebieg dla olejów eksponowanych na światło w butelkach bezbarwnych i zielonych. Przyrost wartości K_{232} od drugiego miesiąca przechowywania był wyższy dla oleju przechowywanego w ciemności niż dla próbek poddanych działaniu światła.

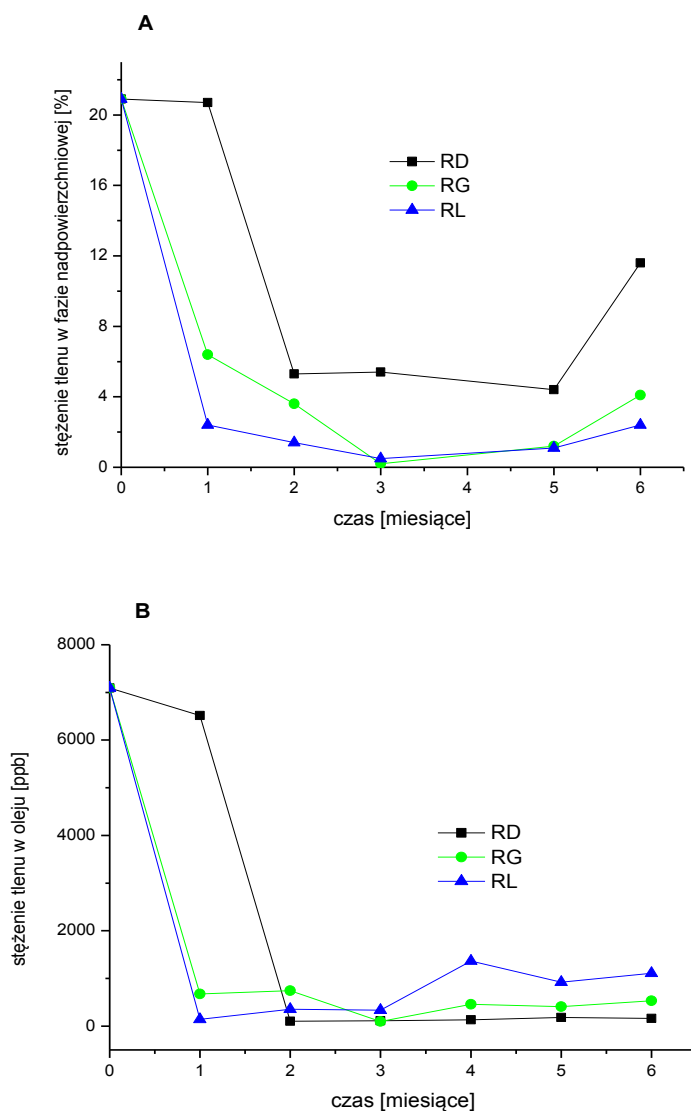
Wartości współczynnika K_{270} informujące o ilości wtórnych produktów utlenienia wykazały dla badanych próbek oleju rzepakowego niewielkie zmiany w czasie przechowywania. Większy przyrost wtórnych produktów utlenienia obserwowano w oleju eksponowanym na światło w porównaniu z olejem przechowywanym w ciemności.

Zawartość tlenu

W czasie przechowywania zawartość tlenu w butelkach nad powierzchnią oleju oraz w oleju (O_2) ulegała zmianie w zależności od warunków przechowywania, rysunek 54.

Największy spadek zawartości tlenu w fazie nadpowierzchniowej odnotowano dla próbek oleju przechowywanego w butelce bezbarwnej, eksponowanej na światło. Przebieg krzywej (tlenu w fazie nadpowierzchniowej) dla oleju przechowywanego w zielonej butelce, eksponowanej na działanie światła był zbliżony do przebiegu krzywej dla próbek przechowywanych w butelkach bezbarwnych, eksponowanych na światło. Najmniejszy spadek zawartości tlenu zaobserwowano w oleju przechowywanym w ciemności.

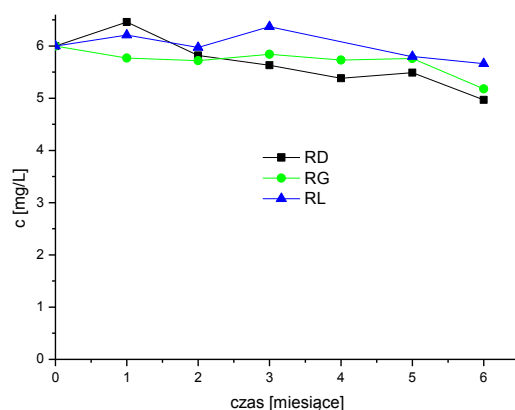
W oleju przechowywanym w ciemności (RD) obserwuje się wolniejszy spadek tlenu w oleju (O_2) niż w oleju eksponowanym na działanie światła (RG i RL). Po dwóch miesiącach przechowywania zawartość tlenu w oleju RD była niższa niż w oleju RG i RL. Tendencja ta utrzymuje się przez cały okres eksperymentu. Najszybszy spadek zawartości tlenu zaobserwowano w oleju przechowywanym w butelce bezbarwnej, eksponowanej na działanie światła. Od trzeciego miesiąca przechowywania obserwuje się wyższą zawartość tlenu w oleju RL w porównaniu z pozostałymi olejami. Przebieg krzywej (dla tlenu w oleju) dla oleju przechowywanego w zielonej butelce, eksponowanej na działanie światła był zbliżony do przebiegu krzywej dla próbek przechowywanych w butelkach bezbarwnych, eksponowanych na światło.



Rysunek 54. Zmiany zawartości tlenu w fazie nadpowierzchniowej oleju (A) oraz zmiany zawartości tlenu w oleju (B). Olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowany na światło oraz olej rzepakowy (RD) przechowywany w ciemności. *Na podstawie badań własnych.*

Karotenoidy

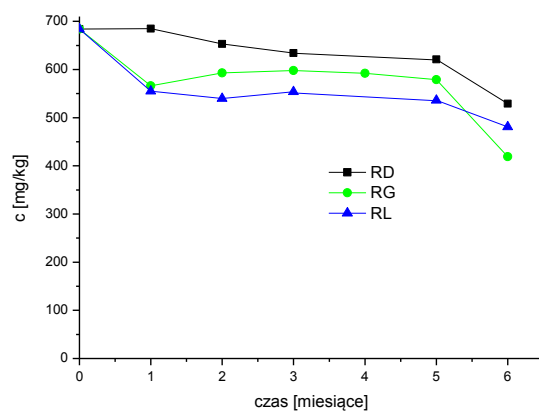
Zmiany stężenia barwników karotenoidowych (w przeliczeniu na β -karoten) w oleju rzepakowym w czasie przechowywania w różnych warunkach przedstawiono na rysunku 55. W trakcie przechowywania zawartość karotenoidów ulegała niewielkim zmianom. Zmiany te były podobne dla próbek przechowywanych w różnych warunkach.



Rysunek 55. Zmiany zawartości barwników karotenoidowych w próbkach oleju rzepakowego Olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowany na światło oraz olej rzepakowy (RD) przechowywany w ciemności. *Na podstawie badań własnych*

Tokoferole

Na rysunku 56 przedstawiono zmiany w czasie przechowywania ogólnej zawartości tokoferoli w olejach oznaczone metodą chromatografii cieczowej.



Rysunek 56. Zmiany zawartości tokoferoli w próbkach oleju rzepakowego Olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowany na światło oraz olej rzepakowy (RD) przechowywany w ciemności. *Na podstawie badań własnych*

W trakcie przechowywania oleju zaobserwowano zmiany zawartości tokoferoli w zależności od warunków przechowywania. Olej przechowywany w ciemności charakteryzował się wyższą ich zawartością w porównaniu z olejem eksponowanym na światło. Najniższe stężenie tokoferoli obserwowano w oleju w butelkach bezbarwnych. Jedynie w szóstym miesiącu najmniejsze stężenie oznaczono dla oleju w butelce zielonej.

Korelacja parametrów analitycznych opisujących jakość olejów

W celu określenia zależności między parametrami analitycznymi opisującymi jakość wszystkich przechowywanych próbek oleju wyznaczono współczynniki korelacji Pearsona, tabela 22.

Na podstawie analizy korelacji wykazano, że liczba nadtlenkowa jest dodatnio skorelowana ze współczynnikiem absorpcji K_{232} . Obydwa parametry wskazują na przyrost pierwotnych produktów utlenienia. Ujemna korelacja LO z zawartością tlenu w oleju, zawartością karotenoidów i tokoferoli oznacza, że wraz ze wzrostem stężenia pierwotnych produktów utlenienia zmniejsza się zawartość tlenu O_2 , karotenoidów i tokoferoli w olejach. Wartości współczynników Pearsona wskazywały ujemną korelację K_{232} i K_{270} z zawartością karotenoidów i tokoferoli. Ponadto parametr K_{270} był dodatnio skorelowany z parametrem K_{232} . Zawartość tlenu w fazie nadpowierzchniowej (tlen w f.n.) była dodatnio skorelowana z zawartością tlenu w oleju. Dla liczby kwasowej nie otrzymano istotnych korelacji z wyznaczonymi parametrami chemicznymi.

Tabela 22. Współczynniki korelacji Pearsona dla parametrów analitycznych dla wszystkich przechowywanych olejów rzepakowych (RD, RG, RL), n= 18.

	LO	LK	K_{232}	K_{270}	Tlen w f.n.	Tlen w oleju	Karotenoidy	Tokoferole
LO	1	0,262	0,647**	0,348	-0,322	-0,593**	-0,553**	-0,456*
LK	0,262	1	0,211	0,224	-0,051	-0,022	-0,245	-0,372
K_{232}	0,647**	0,211	1	0,447*	0,057	-0,391	-0,805**	-0,614**
K_{270}	0,348	0,224	0,447*	1	-0,396	-0,445*	-0,501*	-0,669**
Headspace	-0,322	-0,051	0,057	-0,396	1	0,851**	-0,065	0,224
O_2	-0,593**	-0,022	-0,391	-0,445*	0,851**	1	0,346	0,469*
Karotenoidy	-0,553**	-0,245	-0,805**	-0,501*	-0,065	0,346	1	0,749**
Tokoferole	-0,456*	-0,372	-0,614**	-0,669**	0,224	0,469*	0,749**	1

** Korelacja jest istotna na poziomie 0.01 (dwustronnie).

* Korelacja jest istotna na poziomie 0.05 (dwustronnie).

Kolorem niebieskim zaznaczono współczynniki dla których otrzymano istotną korelację (0,01 lub 0,05).

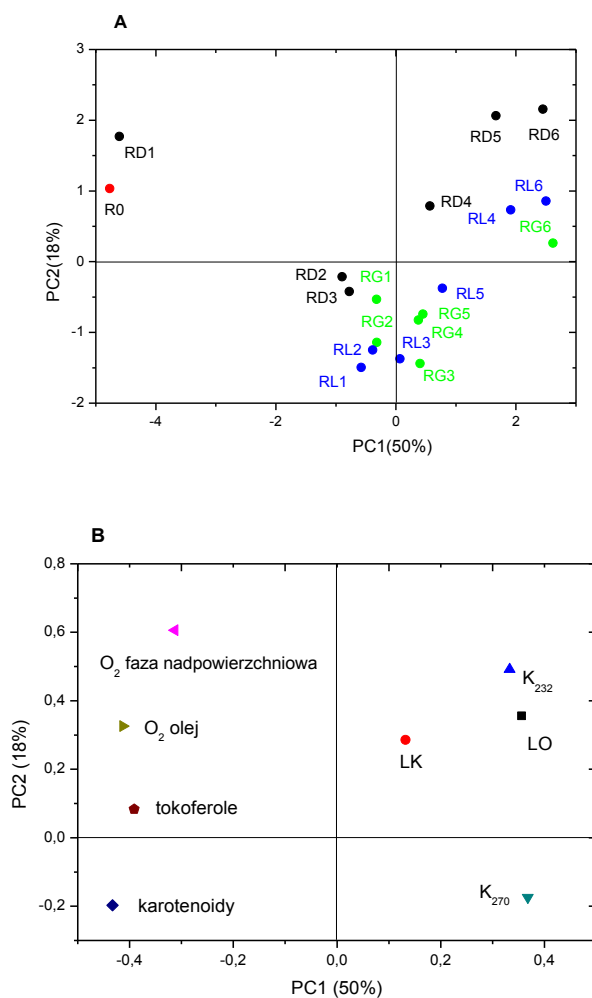
Na podstawie badań własnych

Analiza PCA dla parametrów analitycznych

Na rysunku 57 przedstawiono wyniki analizy głównych składowych dla oznaczonych parametrów analitycznych. Widoczne jest rozmieszczenie próbek w zależności od warunków przechowywania.

Pierwsza i druga główna składowa (PC1 i PC2) opisują 68% całkowitej zmienności, przy czym PC1 opisuje 50% całkowitej zmienności a PC2 18%. PC1 związana jest z czasem

przechowywania. Druga główna składowa związana jest z warunkami przechowywania. Zmiany oksydacyjne w próbkach przechowywanego oleju rzepakowego bez dostępu światła ograniczają się przede wszystkim do powstawania pierwotnych produktów utleniania. W próbkach eksponowanych na światło powstają zarówno pierwotne jak i wtórne produkty utleniania.



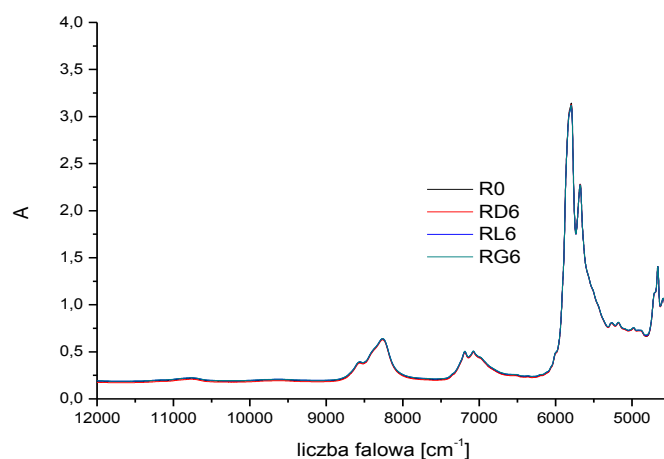
Rysunek 57. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) parametrów analitycznych. **(A)** – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; **(B)** – wykres ładunków czynnikowych dla dwóch pierwszych głównych składowych PC1 i PC2.

Na podstawie badań własnych

9.4. Badania oleju rzepakowego z zastosowaniem metod spektroskopowych

Widma absorpcji w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR)

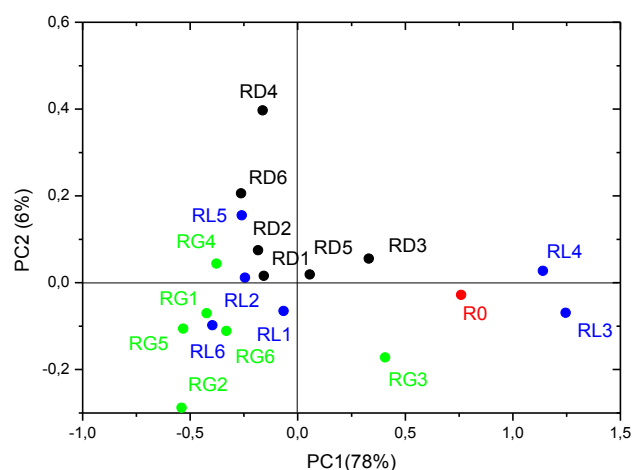
W widmach oleju rzepakowego w zakresie NIR, niezależnie od warunków przechowywania, nie zaobserwowano istotnych zmian w stosunku do widma oleju świeżego. Widma, które są praktycznie nierozróżnialne, przedstawiono na rysunku 58.



Rysunek 58. Widma absorpcji w zakresie NIR oleju rzepakowego tłoczonego na zimno, świeżego i po 6 miesiącach przechowywania w różnych warunkach: (R0) olej rzepakowy świeży, (RL6) olej rzepakowy w butelce ze szkła bezbarwnego, eksponowany na światło, (RG6) olej rzepakowy w butelce ze szkła zielonego, eksponowany na światło (RD6) olej rzepakowy w butelce ze szkła bezbarwnego, w ciemności.

Na podstawie badań własnych.

Wyniki analizy PCA widm w zakresie NIR przedstawiono na rysunku 59. Pierwsza główna składowa wyjaśnia 78% całkowitej zmienności danych, druga główna składowa 6%. Rozmieszczenie próbek na płaszczyźnie wyznaczonej przez dwie pierwsze główne składowe nie wykazuje systematycznej zależności od czasu lub warunków przechowywania.

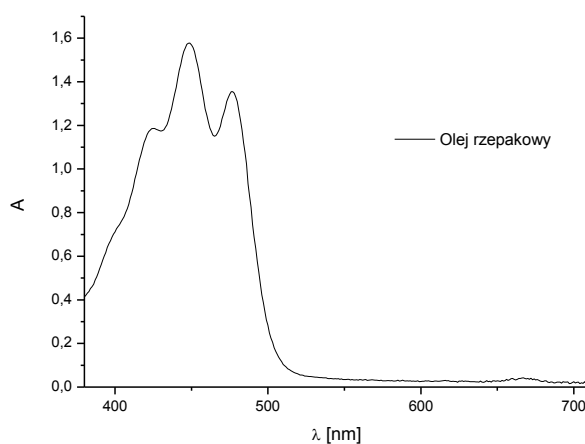


Rysunek 59. Wyniki analizy PCA widm w zakresie bliskiej podczerwieni. Olej rzepakowy przechowywany przez 6 miesięcy w różnych warunkach; olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce ekspozowanej na światło, oraz olej rzepakowy (RD) w butelce przechowywanej w ciemności.

Na podstawie badań własnych

Widma absorpcji w zakresie widzialnym (Vis)

Widmo absorpcji świeżego oleju rzepakowego tłoczonego na zimno przedstawiono na rysunku 60.

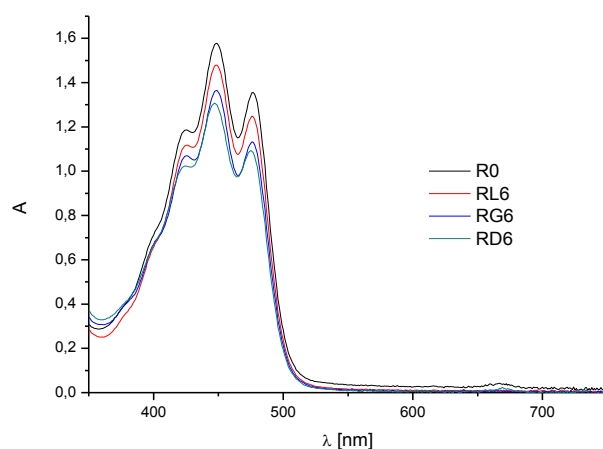


Rysunek 60. Widmo absorpcji w zakresie Vis świeżego oleju rzepakowego tłoczonego na zimno.

Na podstawie badań własnych

W zależności od warunków przechowywania i rodzaju opakowania obserwuje się zmiany w widmach absorpcji polegające na zmniejszeniu intensywności pasm pochodzących

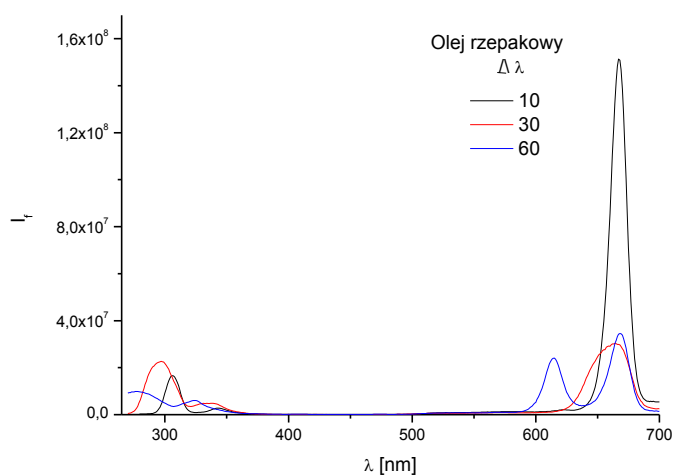
od absorpcji karotenoidów. Podobną zależność zaobserwowano w paśmie pochodzącym od emisji chlorofilu, rysunek 61.



Rysunek 61. Zmiany w widmach absorpcji Vis oleju rzepakowego tłoczonego na zimno świeżego i po 6 miesiącach przechowywania w różnych warunkach: (R0) olej świeży, (RD6) olej rzepakowy w butelkach ze szkła bezbarwnego, przechowywany w ciemności, (RG6) olej rzepakowy w butelkach ze szkła zielonego, eksponowany na światło, (RL6) olej rzepakowy w butelkach ze szkła bezbarwnego, eksponowany na światło
Na podstawie badań własnych

Widma fluorescencji

Widma synchroniczne fluorescencji świeżego oleju rzepakowego zmierzone dla wartości $\Delta\lambda= 10, 30$ i 60 nm, przedstawiono na rysunku 62.

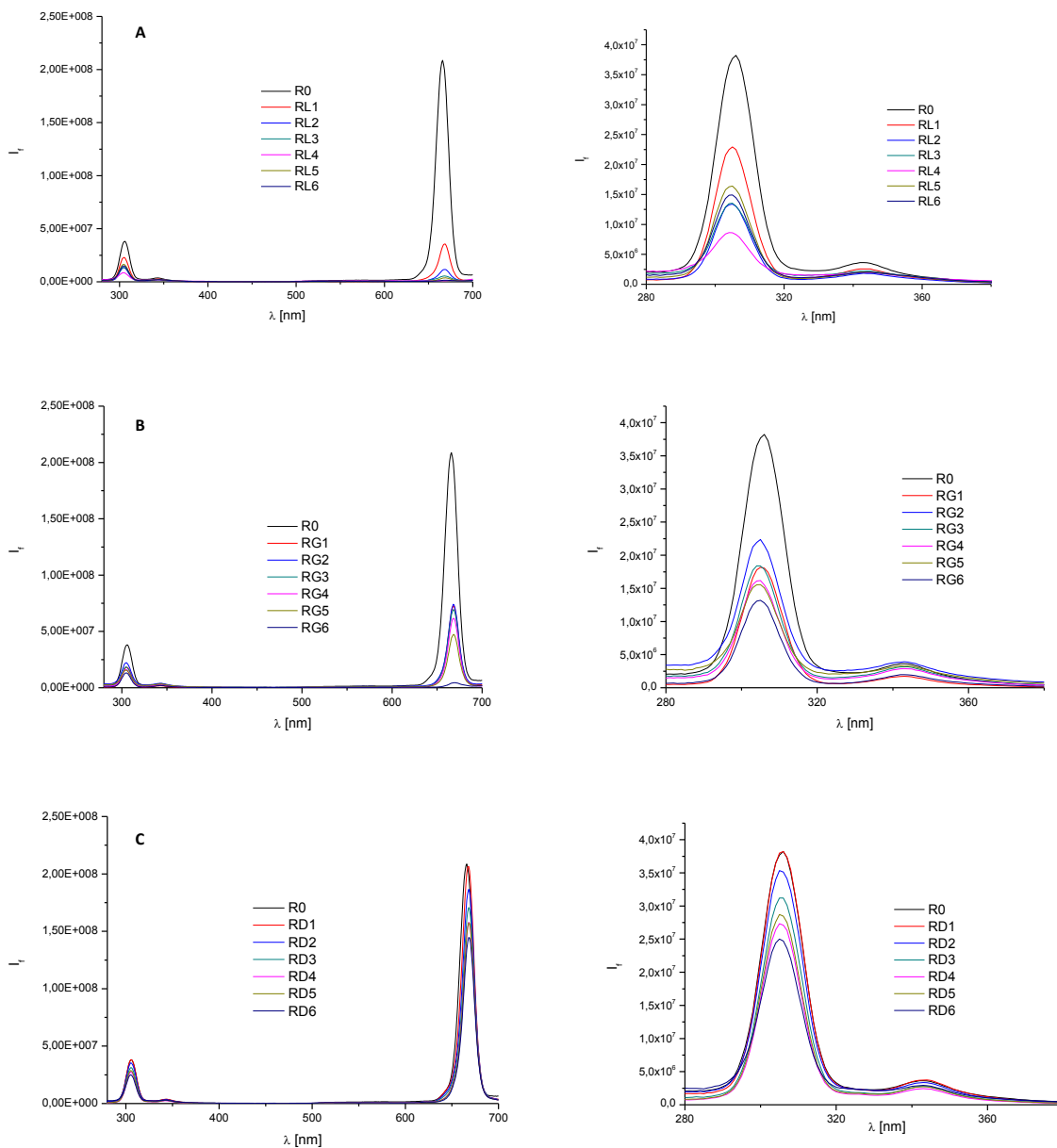


Rysunek 62. Widma synchroniczne fluorescencji oleju rzepakowego tłoczonego na zimno zmierzone dla $\Delta\lambda= 10, 30$ i 60 nm. *Na podstawie badań własnych*

Widma oleju rzepakowego dla wartości $\Delta\lambda=10$ nm charakteryzowały się występowaniem trzech pasm o różnej intensywności emisji. Pasma z maksimum przy długościach fali 307 nm i 666 nm pochodzą odpowiednio od emisji tokoferoli i chlorofili. Ponadto w widmach synchronicznych obserwuje się mało intensywne pasmo w zakresie 330-360 nm, rysunek 62. Widma synchroniczne fluorescencji dla $\Delta\lambda=30$ nm oleju rzepakowego charakteryzowały się wyższą intensywnością pasm emisji niż widma zmierzone przy $\Delta\lambda=10$ nm. Widma synchroniczne oleju rzepakowego zmierzone dla $\Delta\lambda=60$ nm charakteryzowały się występowaniem czterech pasm emisji z maksimum przy długości fali około 307, 330, 606 i 666 nm.

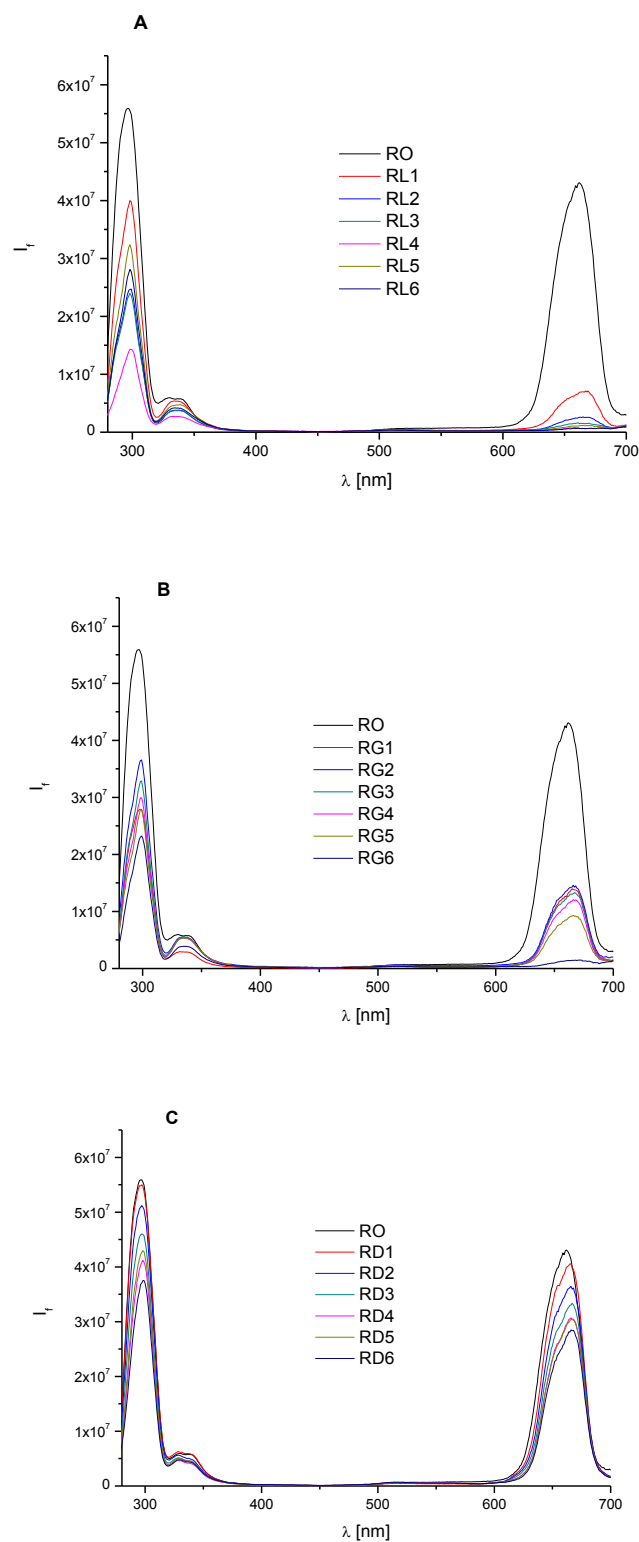
W wyniku przechowywania oleju rzepakowego tłoczonego na zimno obserwuje się zmniejszenie intensywności pasm emisji tokoferoli i chlorofili w stopniu zależnym od warunków przechowywania, rysunek 63. Największe zmiany dla olejów ekspozycyjnych na światło, odnotowano dla przedziału czasowego od zerowego miesiąca (świeża próbka) do pierwszego miesiąca przechowywania. W dalszych miesiącach zmiany w widmach były już mniejsze. Intensywność pasm pochodzących od emisji tokoferoli i chlorofili były największa w próbkach przechowywanych w ciemności, następnie w próbkach przechowywanych w zielonych butelkach, ekspozycyjnych na światło. Największe zmiany w intensywności pasm zaobserwowano w olejach przechowywanych w bezbarwnych butelkach, ekspozycyjnych na światło.

Podobne zmiany w czasie przechowywania obserwowano w widmach synchronicznych fluorescencji zmierzonych dla $\Delta\lambda=30$ i 60 nm, rysunek 64 i 65. Ponadto w widmach tych obserwowano pasma fluorescencji w zakresie pośrednim, z maksimum przy długości fali około 345 nm ($\Delta\lambda=30$ nm) i 324 nm ($\Delta\lambda=60$ nm). Intensywność tego pasma wzrastała wyraźnie w czasie przechowywania dla próbek ekspozycyjnych na działanie światła.



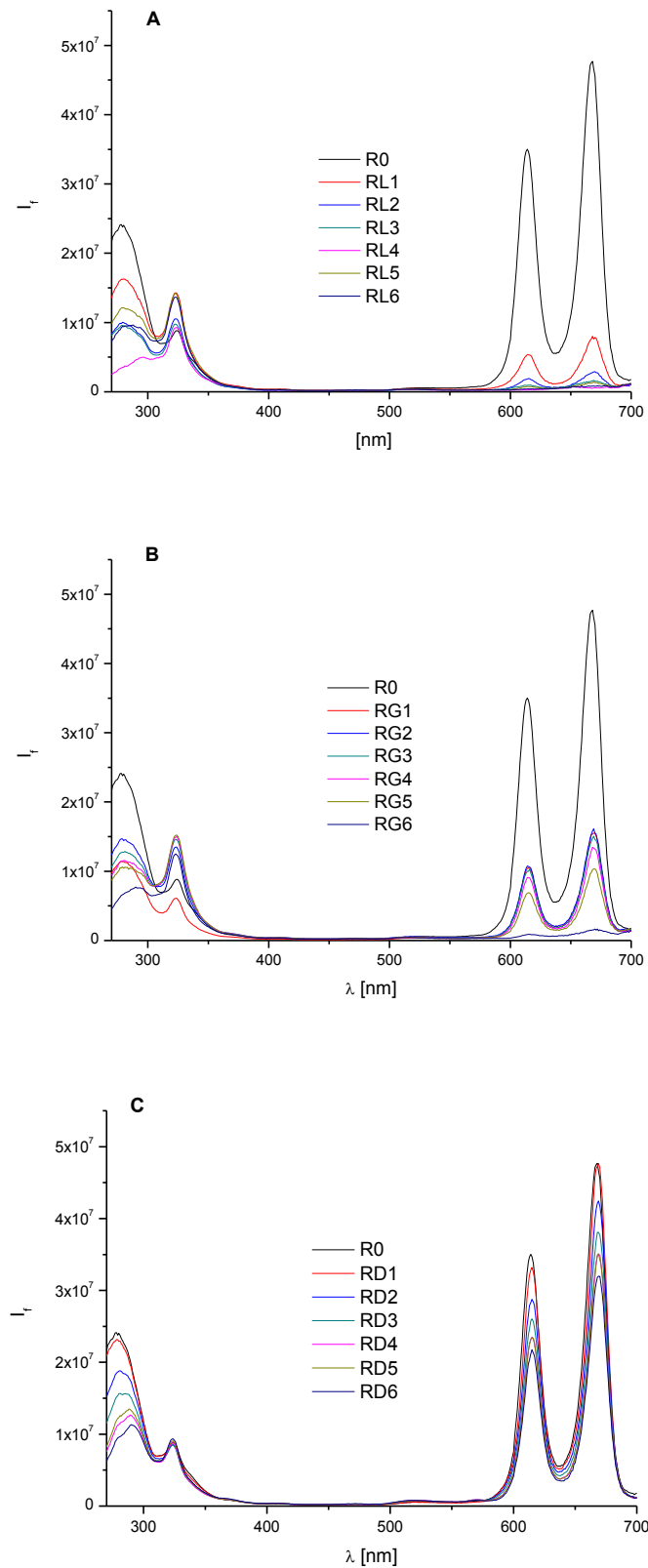
Rysunek 63. Zmiany w widmach synchronicznych fluorescencji oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w kolejnych miesiącach przechowywania. Lewy – widma dla całego zakresu spektralnego; Prawy panel – zakres 280-380 nm. **(A)** butelka bezbarwna eksponowana na światło, **(B)** butelka zielona eksponowana na światło, **(C)** butelka bezbarwna w ciemności. Próbki nierozcieńczone dla $\Delta\lambda = 10$ nm.

Na podstawie badań własnych



Rysunek 64. Zmiany w widmach synchronicznych fluorescencji oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w kolejnych miesiącach przechowywania. **(A)** butelka bezbarwna ekspozycja na światło, **(B)** butelka zielona ekspozycja na światło, **(C)** butelka bezbarwna w ciemności. Próbki nierozcieńczone dla $\Delta\lambda=30$ nm.

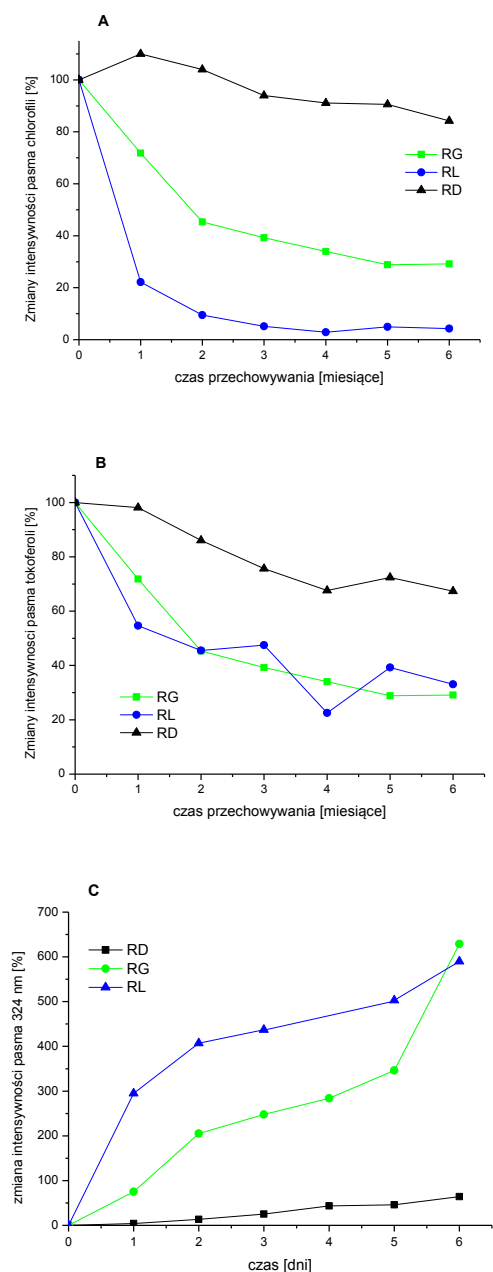
Na podstawie badań własnych



Rysunek 65. Zmiany w widmach synchronicznych fluorescencji oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w kolejnych miesiącach przechowywania. **(A)** butelka bezbarwna eksponowana na światło, **(B)** butelka zielona eksponowana na światło, **(C)** butelka bezbarwna w ciemności. Próbki nierozcieńczone dla $\Delta\lambda=60$ nm.

Na podstawie badań własnych

Na podstawie pomiarów widm synchronicznych fluorescencji dla próbek oleju rzepakowego dokonano odczytu zmian intensywności fluorescencji poszczególnych pasm. Zmiany intensywności odczytano z widma $\Delta\lambda=10$ nm przy długości fali $\lambda=306$ nm, przy której tokoferole wykazywały maksimum emisji i przy długości fali $\lambda=666$ nm dla maksimum emisji chlorofili. Ponadto z widm $\Delta\lambda=60$ nm odczytano zmiany intensywności pasma przy długości fali $\lambda=324$ nm. Zmiany intensywności pasm wyrażone w procentach przedstawiono na rysunku 66.



Rysunek 66. Zmiany intensywności chlorofili (A), tokoferoli (B), i pasma przy długości fali 324 nm (C) w próbkach oleju rzepakowego przechowywanego w różnych warunkach. Zmiany wyrażone w procentach.

Na podstawie badań własnych

W przypadku barwników chlorofilowych największe zmiany intensywności pasm stwierdzono dla próbek oleju rzepakowego przechowywanych bezbarwnej butelce wystawionej na działanie światła. Najmniejsze zmiany odnotowano natomiast w próbkach przechowywanych bez dostępu światła. Zmiany w butelkach zielonych miały charakter pośredni. Bardzo szybki rozkład chlorofili w warunkach ekspozycji na działanie światła, związany jest z jego udziałem w fotosensybilizowanej reakcji utleniania tłuszczów. Chlorofile, wykazując działanie pro-utleniające, umożliwiają energetyczną przemianę tlenu tripletowego ($^3\text{O}_2$) do postaci singletowej ($^1\text{O}_2$), inicjując utlenianie kwasów tłuszczowych (Rotkiewicz 2002).

W przypadku tokoferoli obserwowano małe zmiany intensywności pasma (do około 70%) dla próbek oleju rzepakowego przechowywanego bez dostępu światła. Większymi zmianami odznaczały się próbki oleju ekspozowane na światło. Różnice pomiędzy próbkami przechowywanymi na świetle w butelce zielonej i w butelce bezbarwnej były niewielkie. Oznacza to, że proces fotoutleniania zachodzi znacznie szybciej od autooksydacji, co ma wpływ na większy rozkład tokoferoli w próbkach wystawionych na działanie światła (Caponio i in. 2005).

Przy długości fali $\lambda = 324$ nm obserwuje się wzrost intensywności pasma niezależnie od wariantu przechowywania. W oleju ekspozowanym na działanie światła wzrost ten jest większy niż dla próbek przechowywanych w ciemności. Największe zmiany intensywności zaobserwowano w butelkach bezbarwnych ekspozowanych na światło, najmniejsze w butelkach przechowywanych w ciemności. Zmiany te wynikają z powstawania produktów utleniania.

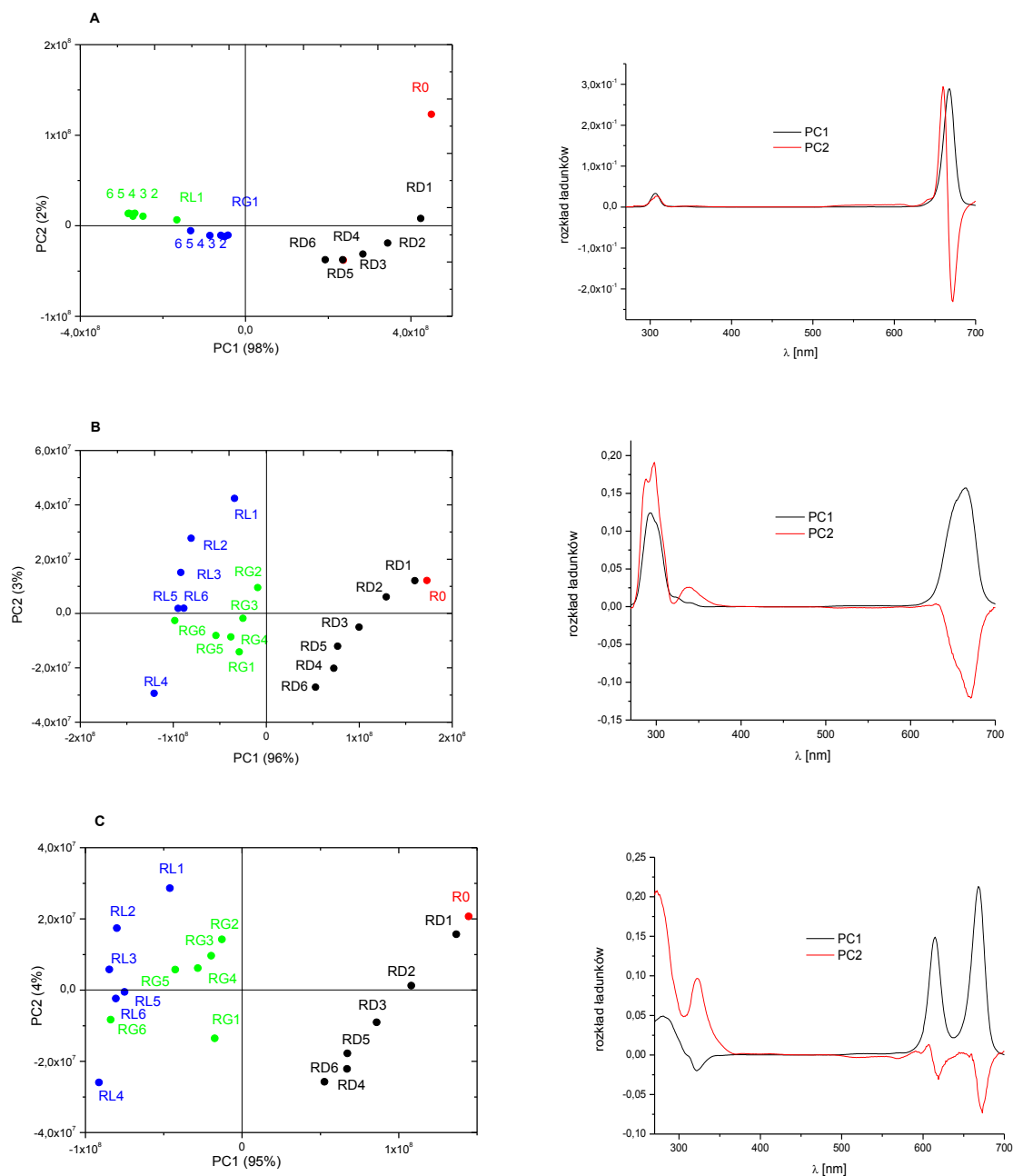
Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, iż najmniejsze zmiany intensywności pasm pochodzących od barwników chlorofilowych i tokoferoli wykazują próbki oleju przechowywane bez dostępu światła. Największe zmiany intensywności zaszły natomiast w próbkach ekspozowanych na światło w butelce ze szkła bezbarwnego.

Analiza PCA widm synchronicznych fluorescencji przechowywanego oleju rzepakowego

W celu analizy zmian fluorescencji dla wszystkich przechowywanych próbek przeprowadzono analizę głównych składowych (PCA) dla widm synchronicznych fluorescencji zmierzonych dla $\lambda = 10, 30$ i 60 nm, rysunek 67.

Wyniki analizy PCA widm synchronicznych fluorescencji zmierzonych przy $\Delta\lambda=10$ nm dla oleju rzepakowego przechowywanego w różnych warunkach, przedstawiono na rysunku 67 A. Pierwsza i druga główna składowa (PC1 i PC2) opisują 100% całkowitej zmienności, przy czym PC1 opisuje 98% całkowitej zmienności a PC2 2%. Próbkę oleju świeżego charakteryzowały się najwyższą wartością PC1 i PC2. PC1 różnicuje próbki ze względu na czas i warunki przechowywania. Na podstawie rozkładu ładunków można stwierdzić, że PC1 jest dodatnio skorelowana z pasmem pochodzącym od emisji tokoferoli i chlorofili. PC2, które różnicuje olej świeży od przechowywanego, jest dodatnio skorelowane z pasmem emisji chlorofili i z pasmem z maksimum emisji przy długości fali 660 nm oraz ujemnie z pasmem przy długości fali 670 nm.

Na rysunkach 67 B i C przedstawiono wyniki analizy PCA dla widm synchronicznych fluorescencji zmierzonych przy $\Delta\lambda=30$ i 60 nm. Również dla tych przypadków obserwuje się grupowanie próbek olejów w zależności od warunków przechowywania oraz rozmieszczenie w ramach danej grupy zależne od czasu przechowywania.



Rysunek 67. Wyniki analizy głównych składowych widm synchronicznych fluorescencji zmierzonych przy $\Delta\lambda=10$ (A), 30 (B) i 60 nm (C) dla oleju rzepakowego przechowywanego w różnych warunkach. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2. RD – olej rzepakowy przechowywany w ciemności, RG – olej rzepakowy przechowywany w zielonej butelce ekspozycyjnej na światło, RL – olej rzepakowy przechowywany w bezbarwnej butelce ekspozycyjnej na światło. Prawy panel – wykres ładunków czynnikowych dla PC1 i PC2. *Na podstawie badań własnych*

9.5. Korelacja parametrów analitycznych opisujących jakość oleju rzepakowego i widm

W celu określenia zależności między widmami oleju rzepakowego tłoczonego na zimno a wyznaczonymi parametrami analitycznymi określającymi jego jakość, przeprowadzono analizę regresji PLS. Zmienną X stanowiły odpowiednie widma, natomiast zmienną Y stanowiły parametry chemiczne: liczba kwasowa, liczba nadtlenkowa, współczynniki absorpcji K_{232} i K_{270} oraz zawartość tlenu w fazie nadpowierzchniowej i w oleju. Dla widm synchronicznych zmierzonych przy $\Delta\lambda=10, 30$ i 60 nm, zbadano również korelację widm z ogólną zawartością tokoferoli.

Analiza PLS widm w zakresie bliskiej podczerwieni

Wyniki analizy regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS) dla widm w zakresie MIR oleju rzepakowego, przechowywanego w różnych warunkach i parametrów analitycznych, przedstawiono w tabeli 23. Dla większości analizowanych modeli nie stwierdzono korelacji widm w zakresie NIR z wyznaczonymi parametrami chemicznymi. Istotne zależności uzyskano jedynie dla współczynnika absorpcji K_{232} , ale model kalibracyjny charakteryzował się niską wartością R^2 i RPD.

Najlepszy model PLS otrzymano dla parametru K_{232} .

Tabela 23. Wyniki analizy regresji PLS widm w zakresie NIR oleju rzepakowego i liczby nadtlenkowej, kwasowej, współczynników absorpcji K_{270} i K_{232} oraz zawartości tlenu

Olej	Parametry chemiczne	Zakres widma [cm ⁻¹]	PLS					
			LV	R ²	RMSECV	SECV	δ_x [%]	RPD
Olej rzepakowy	Liczba nadtlenkowa	12487-4510	---	---	---	---	---	---
		8423-6115	---	---	---	---	---	
		6115-4510	--	---	---	---	---	
	Liczba kwasowa	12487-4510	---	---	---	---	---	---
		8423-6115	---	---	---	---	---	
		6115-4510	---	---	---	---	---	
	K_{270}	12487-4510	---	---	---	---	---	---
		8423-6115	5	---	---	---	---	
		6115-4510	---	---	---	---	---	
	K_{232}	12487-4510	3	0,66	1,20	1,21	30	1,7
		8423-6115	4	0,52	1,43	1,47	35	1,4
		6115-4510	3	0,50	1,46	1,46	36,5	1,4
Tlen w fazie nadpowierzchniowej lub w oleju	12487-4510	---	---	---	---	---	---	
	8423-6115	---	---	---	---	---		
	6115-4510	---	---	---	---	---		

W tabeli przedstawiono charakterystykę modeli kalibracyjnych dla których otrzymano $R^2 \geq 0,5$
Na podstawie badań własnych

Analiza PLS widm w zakresie widzialnym (Vis)

Wyniki analizy regresji PLS widm w zakresie Vis oleju rzepakowego przechowywanego w różnych warunkach i parametrów analitycznych, przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 24. Wyniki analizy regresji PLS widm w zakresie Vis oleju rzepakowego i liczby nadtlenkowej, kwasowej, parametrów K_{270} i K_{232} oraz zawartości tlenu

Olej	Parametry chemiczne	Zakres widma [nm]	PLS					
			LV	R ²	RMSECV	SECY	δ _x [%]	RPD
Olej rzepakowy	Liczba nadtlenkowa	350-750	--	---	---	---	---	---
		350-550	--	---	---	---	---	---
		600-750	--	---	---	---	---	---
	Liczba kwasowa	350-750	--	---	---	---	---	---
		350-550	--	---	---	---	---	---
		600-750	--	---	---	---	---	---
	K_{270}	350-750	4	0,56	0,07	0,07	14,5	1,4
		350-550	5	0,59	0,06	0,06	12,5	1,7
		600-750	--	---	---	---	---	---
	K_{232}	350-750	2	0,62	1,3	1,4	8,4	1,5
		350-550	2	0,62	1,3	1,4	8,4	1,5
		600-750	--	---	---	---	---	---
	Tlen w fazie nadpowierzchniowej	350-750	---	---	---	---	---	---
		350-550	---	---	---	---	---	---
		600-750	---	---	---	---	---	---
	Tlen w oleju	350-750	---	---	---	---	---	---
		350-550	---	---	---	---	---	---
		600-750	---	---	---	---	---	---

W tabeli przedstawiono charakterystykę modeli kalibracyjnych dla których otrzymano $R^2 \geq 0,5$
Na podstawie badań własnych

Otrzymane modele charakteryzowały się niskimi wartościami R^2 i RPD. Najlepsze modele uzyskano dla współczynników absorpcji K_{270} i K_{232} . Nie stwierdzono korelacji widm absorpcji z wartościami liczby kwasowej i z tlenem w oleju.

Analiza PLS widm synchronicznych fluorescencji

W tabeli 25 przedstawiono wyniki analizy regresji PLS dla widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda = 10, 30, 60$ nm) oleju rzepakowego i parametrów analitycznych.

Najlepsze modele kalibracyjne otrzymano dla przewidywania całkowitej zawartości tokoferoli. Spośród tych modeli najlepszymi parametrami charakteryzował się model dla widm synchronicznych, zmierzonych dla $\Delta\lambda = 30$ nm. Dla widm synchronicznych zmierzonych przy $\Delta\lambda = 30$ nm uzyskano stosunkowo dobre dopasowanie z parametrem K_{270} . Wartość

parametru K_{232} udało się skorelować z widmami synchronicznymi zmierzonymi przy $\Delta\lambda=60$ nm. Dla LO, LK i tlenu w oleju nie stwierdzono znaczących korelacji.

Tabela 25. Wyniki analizy regresji metodą PLS widm synchronicznych fluorescencji oraz wartości wyznaczonych parametrów chemicznych uzyskanych dla oleju rzepakowego.

	Parametry chemiczne	Zakres widma [nm]	PLS					
			LV	R ²	RMSEP	SEP	δ_x [%]	RPD
$\Delta\lambda=10$ nm	LO	270-700	---	---	---	---	---	---
	LK	270-700	---	---	---	---	---	---
	K_{232}	270-700	---	---	---	---	---	---
	K_{270}	270-700	---	---	---	---	---	---
	Tlen w f.n.	270-700	2	0,55	4,4	4,5	---	1,7
	Tlen w oleju	270-700	---	---	---	---	---	---
	Tokoferole	270-400	1	0,60	43,2	44	7,5	2,3
$\Delta\lambda=30$ nm	LO	270-700	5	0,54	6,2	6,3	43	1,5
	LK	270-700	---	---	---	---	---	---
	K_{232}	270-700	---	---	---	---	---	---
	K_{270}	270-700	5	0,67	0,06	0,06	12,2	1,6
	Tlen w f.n.	270-700	---	---	---	---	---	---
	Tlen w oleju	270-700	---	---	---	---	---	---
	Tokoferole	270-400	10	0,82	43,2	44	7,5	2,3
$\Delta\lambda=60$ nm	LO	270-700	---	---	---	---	---	---
	LK	270-700	8	0,52	0,04	0,05	5	2,5
	K_{232}	270-700	4	0,60	1,3	1,3	32,5	1,5
	K_{270}	270-700	6	0,61	0,06	0,06	12,2	1,6
	Tlen w f.n.	270-700	10	0,51	4,8	4,9	---	1,6
	Tlen w oleju	270-700	---	---	---	---	---	---
	Tokoferole	270-400	8	0,74	51,6	53	8,9	2,0

W tabeli przedstawiono charakterystykę modeli kalibracyjnych dla których otrzymano $R^2 \geq 0,5$
Na podstawie badań własnych

9.6. Podsumowanie

W zależności od warunków przechowywania i barwy opakowania obserwuje się różny zakres przemian oksydacyjnych.

Badania przeprowadzone w tym rozdziale miały na celu ocenę zmian zachodzących w oleju rzepakowym tłoczonym na zimno w czasie przechowywania w różnych warunkach. Badany olej przechowywano przez okres sześciu miesięcy w butelkach zielonych i bezbarwnych eksponowanych na światło oraz w ciemności.

W próbkach przechowywanych na świetle stwierdzono większe zaawansowanie procesów utleniania objawiające się powstawaniem zarówno pierwotnych jak i wtórnych

produktów utlenienia. Próbki przechowywane w ciemności charakteryzowały się wyższym stężeniem pierwotnych produktów utlenienia.

Wraz ze wzrostem stężenia pierwotnych produktów utlenienia (LO i K_{232}), zmniejszała się zawartość karotenoidów i tokoferoli. Próbki przechowywane w ciemności charakteryzowały się najwyższą zawartością tokoferoli. Największy spadek ich stężenia odnotowano w oleju przechowywanym w zielonych butelkach eksponowanym na światło.

W trakcie przechowywania zmieniała się również zawartość tlenu w fazie nadpowierzchniowej i w oleju. Dla próbek przechowywanych w ciemności zmiany zawartości tlenu zachodziły wolniej niż w próbkach poddanych działaniu światła.

Na podstawie analizy korelacji stwierdzono, że istnieją zależności między liczbą nadtlenkową a współczynnikiem absorpcji K_{232} , co związane jest z przyrostem pierwotnych produktów utlenienia. Ponadto odnotowano ujemną korelację liczby nadtlenkowej z zawartością: karotenoidów, tokoferoli i tlenu w oleju. Zależność ta wskazywała, że w wyniku przyrostu pierwotnych produktów utlenienia następowało utlenienie karotenoidów i tokoferoli, oraz zmniejszenie zawartości tlenu w oleju. Dla liczby kwasowej nie otrzymano istotnych korelacji z wyznaczonymi parametrami chemicznymi.

W widmach w zakresie NIR oleju przechowywanego w różnych warunkach nie odnotowano zauważalnych różnic, wskazujących na zachodzące w oleju procesy utleniania. Wynika to z faktu, że zawartość głównych składników obecnych w oleju nie zmieniała się w czasie przechowywania.

Zmiany zależne od czasu i warunków przechowywania obserwowano w widmach elektronowych. Szczególnie przydatne okazały się widma synchroniczne fluorescencji, w których obserwowano zmniejszenie intensywności pasm emisji tokoferoli i chlorofili oraz wzrost intensywności pasma pochodzącego od produktów procesów utleniania. Zakres tych zmian był najmniejszy dla próbek przechowywanych w ciemności. Największe zmiany widoczne były w oleju przechowywanym w bezbarwnych butelkach eksponowanych na światło.

Na podstawie analizy regresji PLS widm oscylacyjnych i elektronowych, uzyskano słabe ilościowe korelacje widm i parametrów analitycznych. Najlepszy model otrzymano dla widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=30$ nm) i zawartości tokoferoli. Wartość R^2 otrzymanego modelu wynosiła 0,82, a RPD 2,3.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że ochrona przed światłem wpływa korzystnie na jakość oleju, ale efekt ochrony butelki zielonej jest ograniczony.

10. WNIOSKI

Celem rozprawy doktorskiej była ocena różnych aspektów jakości olejów roślinnych z zastosowaniem wybranych technik spektroskopowych.

Z przeprowadzonych badań oraz studiów literaturowych wynika, że metody spektroskopowe są szeroko wykorzystywane w badaniach olejów roślinnych. Techniki te wykorzystuje się m.in. do określenia składu olejów, wykrywania zafałszowań i identyfikacji pochodzenia geograficznego oraz do kontroli procesów oksydacyjnych zachodzących podczas przechowywania. W literaturze naukowej liczba prac, w których porównuje się możliwości różnych technik analitycznych w analizie olejów roślinnych jest jednak ograniczona.

W pracy postawiono hipotezę główną, że wybrane techniki spektroskopowe mogą zostać wykorzystane do oceny jakości olejów roślinnych.

Analiza widm olejów roślinnych

Pierwszy etap badań dotyczył pomiarów i analizy widm świeżych olejów roślinnych z zastosowaniem różnych technik spektroskopowych. Do badań wybrano oleje roślinne tłoczone na zimno oraz rafinowane (m.in. rzepakowy, oliwę z oliwek i słonecznikowy). Widma olejów uzyskane z zastosowaniem różnych technik spektroskopowych zawierały informacje o właściwościach chemicznych badanych próbek olejów.

W widmach w zakresie podczerwieni (NIR i MIR) widoczne były pasma pochodzące od kwasów tłuszczowych i triacylogliceroli. Widma w zakresie NIR i MIR dla danego gatunku oleju były do siebie podobne i praktycznie nierozróżnialne. W widmach odmiennych gatunków olejów można było zaobserwować charakterystyczne różnice w kształcie, położeniu i intensywności pasm. Różnice te związane są ściśle ze składem oleju, a w szczególności z zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych. Oleje słonecznikowe w porównaniu z olejami rzepakowymi i oliwami z oliwek charakteryzują się najwyższą zawartością tych kwasów. Analizując widma w zakresie $1600-550\text{ cm}^{-1}$ zaobserwowano, że oleje słonecznikowe odznaczały się najwyższą intensywnością pasm występujących w tym zakresie. Oliwy z oliwek w porównaniu z olejami rzepakowymi i słonecznikowymi cechują się wysoką zawartością kwasu oleinowego. W olejach słonecznikowych zawartość tego kwasu jest najniższa. Analiza pasm w zakresie $3100-2700\text{ cm}^{-1}$ ujawniła bezpośredni związek z zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych. Oliwy z oliwek w omawianym zakresie charakteryzowały się najwyższą intensywnością pasm, natomiast oleje słonecznikowe

najniższą. W widmach w zakresie NIR również odnotowano pasma, które przypisać można do danego gatunku oleju. Dla oliw z oliwek charakterystyczne było intensywne pasmo z maksimum przy liczbie falowej 5795 cm^{-1} . W pozostałych gatunkach olejów pasmo to ulegało przesunięciu, a jego intensywność była najmniejsza w olejach słonecznikowych. Wysoka zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w olejach słonecznikowych wpływa natomiast na kształt pasma w zakresie $5300\text{--}4500\text{ cm}^{-1}$. Pasma w tym zakresie są najbardziej intensywne właśnie dla tego gatunku oleju, a najmniej intensywne w oliwach z oliwek.

Widma absorpcji w zakresie widzialnym (Vis) to przede wszystkim pasma pochodzące od absorpcji barwników karotenoidowych i chlorofilowych. Zawartość tych związków zależy od jakości surowca, jego gatunku i technologii otrzymywania oleju. Otrzymane widma w zakresie Vis umożliwiły wizualną identyfikację olejów. W widmach olejów poddanych procesom rafinacji nie były obecne pasma absorpcji pochodzące od barwników, które zostały usunięte pod wpływem działania wysokich temperatur. Oleje rzepakowe posiadają najwyższą zawartość karotenoidów w porównaniu z olejami słonecznikowymi i oliwami z oliwek. Oliwy z oliwek cechują się natomiast wyższą zawartością chlorofili niż pozostałe gatunki badanych olejów. Różnice te można było zaobserwować w kształcie pasm. Widma olejów rzepakowych tłoczonych na zimno charakteryzowały się najwyższą absorpcją pasm pochodzących od barwników karotenoidowych. Pasma przy liczbie falowej ok. 666 nm przypisane absorpcji chlorofili było najbardziej intensywne w oliwach extra virgin.

Fluorescencja olejów była wynikiem obecności związków z grupy tokoferoli, chlorofili, fenoli i pozostałych fluoryzujących składników. W widmach synchronicznych wszystkich badanych olejów obserwowano pasmo pochodzące od tokoferoli, którego intensywność zależy od gatunku oleju. Ponadto w niektórych olejach widoczne było pasmo w pośrednim zakresie widma ($350\text{--}500\text{ nm}$). Pasma przy długości fali 666 nm jest szczególnie charakterystyczne dla oliw z oliwek extra virgin, dla których przyjmuje największą intensywność. Oleje rafinowane (słonecznikowy i rzepakowy) nie posiadają pasma emisji przy tej długości fali.

Na podstawie przeprowadzonych analiz PCA zaobserwowano charakterystyczne rozmieszczenie próbek. Dla widm oscylacyjnych próbki rozróżniane były na podstawie zawartości kwasów tłuszczowych. Dla widm elektronowych obserwuje się grupowanie próbek w zależności od gatunku oleju (składu chemicznego) i stopnia przetworzenia.

Zafałszowania oliwy extra virgin olejami gorszej jakości

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono badania mające na celu określenie przydatności wybranych technik spektroskopowych do badań zafałszowań oliwy z oliwek. W tym celu badano mieszaniny oliwy extra virgin z olejem słonecznikowym oraz oliwy extra virgin z oliwą rafinowaną lub deodoryzowaną.

W pierwszym etapie badano zafałszowania oliwy extra virgin olejem słonecznikowym, wykorzystując widma w zakresie NIR, MIR i fluorescencji.

Widma w zakresie MIR i NIR oliwy extra virgin i oleju słonecznikowego oraz ich mieszanin były do siebie podobne, jednak w niektórych zakresach można było dostrzec odmienny kształt pasm związany ze składem olejów.

W widmach fluorescencji badanych mieszanin (EVO+S) występowały pasma charakterystyczne dla danego gatunku oleju. Analiza widm synchronicznych fluorescencji mieszaniny oliwy z olejem słonecznikowym dla $\Delta\lambda = 10, 30$ i 60 nm, pozwoliła zaobserwować zmiany wywołane zwiększeniem stężenia oleju fałszującego. Dodatek oleju słonecznikowego wpływał na wzrost intensywności pasma pochodzącego od tokoferoli. Odwrotną zależność zaobserwowano w pasmach pochodzących od chlorofili, dla których intensywność zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia oleju słonecznikowego w mieszaninie z oliwą extra virgin.

Analizę widm mieszanin oliwy extra virgin z tańszym olejem słonecznikowym przeprowadzono z zastosowaniem metod regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS) i regresji głównych składowych (PCR). Najlepsze rezultaty otrzymano dla widm w zakresie MIR. Uzyskany model kalibracyjny cechował się wysoką wartością RPD równą 12. Najlepszy model PLS dla widm w zakresie NIR charakteryzował się wartością RPD równą 8,6. Dla widm synchronicznych fluorescencji najlepsze dopasowanie otrzymano dla $\Delta\lambda = 60$ nm. Model ten cechował się wysoką wartością R^2 równą 0,99 i RPD równą 9,7.

W drugim etapie badano zafałszowania oliwy extra virgin oliwami gorszej jakości. Do analiz wykorzystano spektroskopię absorpcyjną w zakresie NIR, MIR i Vis oraz fluorescencje.

Wizualne rozróżnienie widm oscylacyjnych oliwy extra virgin, oliwy rafinowanej i deodoryzowanej nie było możliwe. W celu zróżnicowania badanych oliw przeprowadzono analizę PCA, na podstawie której skutecznie pogrupowano oleje ze względu na stopień przetworzenia.

W widmach Vis oliwy extra virgin, oliwy rafinowanej i deodoryzowanej widoczne były różnice w intensywności pasm pochodzących od poszczególnych barwników, co umożliwiło ich prostą identyfikację.

W widmach całkowitej i synchronicznej fluorescencji obecne były pasma charakterystyczne dla danego gatunku oliwy, pochodzące od emisji tokoferoli, chlorofili i innych emitujących składników.

Analizę widm mieszanin oliwy extra virgin z oliwą deodoryzowaną i rafinowaną przeprowadzono z zastosowaniem metod regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS) i regresji głównych składowych (PCR). Najlepszy model PLS otrzymano dla widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda = 10$ nm), dla którego wartość R^2 była równa 0,99 a RPD równa 8,6. Najlepszy model kalibracyjny PLS dla widm oscylacyjnych uzyskano dla widm w zakresie MIR. Model ten charakteryzował się wartością R^2 równą 0,985 i RPD równą 7,4. Dla widm w zakresie NIR wartość R^2 i RPD były równe 0,97 i 6,1. Najlepszy model kalibracyjny dla widm w zakresie Vis cechował się dobrym dopasowaniem o czym świadczyła wartość R^2 równa 0,980 i RPD równe 6,5. Dla połączonych zakresów widm mieszanin oliwy extra virgin z oliwą deodoryzowaną lub rafinowaną uzyskano wysokie korelacje pomiędzy widmami a składem procentowym mieszanin oliw. Uzyskane parametry modeli były jednak gorsze niż podczas analizy poszczególnych zakresów.

Wykazano, że na podstawie przeprowadzonych analiz regresji możliwe jest ilościowe określenie dodatku fałszującego w oliwie z oliwek extra virgin. Zastosowanie przekształceń widm (korekcji rozproszenia i/lub obliczenie pochodnych) oraz wybór charakterystycznych zakresów absorpcji lub emisji, wpłynęło pozytywnie na jakość otrzymanych modeli. Modele otrzymane metodą PCR charakteryzowały się podobnym poziomem dopasowania jak modele otrzymane metodą PLS.

Postawiona w pracy hipoteza szczegółowa, że wybrane techniki spektroskopowe mogą zostać wykorzystane do wykrywania zafałszowań oliwy extra virgin tańszymi olejami, została pozytywnie zweryfikowana.

Stabilność oksydacyjna

W następnym etapie badań techniki spektroskopowe posłużyły do badania procesów utleniania olejów. Próbkę olejów ogrzewano przez okres 15 dni w temperaturze 60°C bez dostępu światła. Co trzeci dzień oceniano jakość oleju przez oznaczenie metodami klasycznymi parametrów chemicznych (liczby nadtlenkowej i kwasowej). W wyniku

działania wysokich temperatur zaobserwowano intensywny wzrost wartości liczby nadtlenkowej. Tempo zmian było zależne od gatunku oleju i stopnia jego przetworzenia. Najbardziej odporne na procesy utleniania były oliwy z oliwek, które cechują się dużą zawartością antyoksydantów (związków fenolowych, tokoferoli i fosfolipidów) oraz dobrą proporcją nienasyconych kwasów tłuszczowych. Oleje rzepakowe z powodu znacznych ilości kwasu linolenowego n-3 (7-10%) były mniej stabilne niż oliwy. Najwyższe wartości LO zaobserwowano w olejach słonecznikowych, które charakteryzują się znaczną ilością podatnego na utlenianie kwasu linolowego (63%) i linolenowego (0,2%). Oleje rzepakowe poddane procesom rafinacji były mniej stabilne niż oleje tłoczone na zimno. Wartości liczby kwasowej w trakcie całego eksperymentu nie ulegały znacznym zmianom. Jedynie w oleju słonecznikowym (S1) odnotowano zawyżony poziom wolnych kwasów tłuszczowych już w świeżej próbce.

Spektroskopia oscylacyjna posłużyła do monitorowania zmian zachodzących w olejach. W widmach w zakresie MIR i NIR widoczne były różnice w kształcie i intensywności pasm, świadczące o postępujących procesach utleniania. Do analizy widm w zakresie MIR i NIR wykorzystano analizę wielowymiarowej dekonwolucji krzywych MCR, na podstawie której wyodrębniono widma czystych składników oraz określono ich względne stężenia. W oliwach z oliwek przez cały okres utleniania nie odnotowano zmian stężeń poszczególnych składników. W olejach rzepakowych i słonecznikowych stężenie pierwszego komponentu, o charakterystyce spektralnej produktów utleniania, wzrastało wraz z postępem procesów oksydacyjnych. Stężenie drugiego komponentu, o charakterystyce struktury nienasyconej malało w czasie. Trzeci składnik (struktury nienasycone) zmniejszał swoje stężenia w niewielkim stopniu w trakcie zachodzących procesów oksydacyjnych. Dla badanych olejów przeprowadzono analizę metodą klasycznej regresji liniowej dla wartości względnych stężeń i liczby nadtlenkowej lub kwasowej. Dla olejów rzepakowych uzyskano dobrą korelację pierwszego i drugiego komponentu z liczbą nadtlenkową. Dla trzeciego składnika nie uzyskano korelacji z liczbą nadtlenkową. Dla oleju słonecznikowego uzyskano słabe korelacje z pierwszym i drugim składnikiem. Oliwy z oliwek nie wykazały korelacji liczby nadtlenkowej ze stężeniem poszczególnych komponentów. Przeprowadzone korelacje względnych stężeń składników z liczbą kwasową nie wykazały zależności dla olejów rzepakowych i oliw. Dla olejów słonecznikowych stwierdzono zależność tylko pierwszego komponentu z LK, co wynikało z różnic między olejami słonecznikowymi, a nie ze zmianami zachodzącymi w czasie utleniania. Otrzymane wyniki analizy MCR wskazują, że metoda ta

mogłaby zostać wykorzystana do określania stabilności oksydacyjnej olejów wyłącznie na podstawie pomiaru i analizy widm oscylacyjnych.

Zastosowanie spektroskopii elektronowej umożliwiło wizualizację zmian zachodzących w olejach podczas ich utleniania. W widmach absorpcji olejów tłoczonych na zimno w zakresie Vis obserwuje się spadek intensywności pasm pochodzących od barwników karotenoidowych. W piętnastym dniu ogrzewania pasmo to uległo prawie całkowitej redukcji. Pasma pochodzące od absorpcji chlorofili również zmniejszało swoją intensywność (jednak zmiany te były niewielkie).

W widmach synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) olejów zachodzą charakterystyczne zmiany w czasie ogrzewania, zależne od gatunku oleju i sposobu jego otrzymywania. W widmach olejów tłoczonych na zimno: EVO, OW, R i S obserwowano spadek intensywności pasm pochodzących od tokoferoli i chlorofili oraz wzrost intensywności pasma w pośrednim zakresie widma, wywołany produktami rozkładu barwników chlorofilowych lub/i produktami utleniania. W czasie ogrzewania olejów rafinowanych w wyniku zachodzących procesów utleniania następował spadek intensywności pasm zarówno w zakresie krótkofalowym jak i długofalowym.

Zastosowana analiza regresji PLS widm oscylacyjnych i elektronowych, wykazała istotne korelacje widm z liczbą nadtlenkową i kwasową. Najlepszy model kalibracyjny dla liczby kwasowej i nadtlenkowej, dla wszystkich badanych olejów, uzyskano dla zakresu NIR ($R^2= 0,977$ i RPD= 3,8). Najlepszy model przewidywania liczby kwasowej i nadtlenkowej również otrzymano dla widm w zakresie NIR ($R^2= 0,970$ i RPD= 5,9).

Na podstawie przeprowadzonych badań zweryfikowano pozytywnie postawioną hipotezę szczegółową, dotyczącą wykorzystania technik spektroskopowych do oceny stabilności oksydacyjnej olejów roślinnych.

Badanie zmian właściwości oleju podczas przechowywania

W ostatnim etapie pracy wykorzystano techniki spektroskopowe (Vis, NIR i fluorescencję) do kontroli jakości oleju rzepakowego w czasie przechowywania. Olej rzepakowy przechowywany był w butelkach bezbarwnych i zielonych eksponowanych na światło oraz w ciemności.

Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń chemicznych, wykazano różne zaawansowanie procesów utleniania w zależności od rodzaju opakowania. Próbki oleju rzepakowego przechowywanego w ciemności charakteryzowały się największą liczbą

nadtlenkową, co związane było z powstawaniem pierwotnych produktów utlenienia. Mniejsze zmiany wartości LO odnotowano w olejach eksponowanych na światło. Zmiany liczby kwasowej w przeprowadzonym teście dla wszystkich próbek były niewielkie i nawet po sześciu miesiącach przechowywania nie przekraczały dopuszczalnych wartości.

Niezależnie od warunków przechowywania obserwowano wzrost pierwotnych i wtórnych produktów utlenienia, o czym informowały wartości specyficznych współczynników absorpcji (K_{232} i K_{270}). Próbki przechowywane w ciemności charakteryzowały się wyższymi wartościami parametru K_{232} w stosunku do próbek eksponowanych na światło. Z badań tych wynikało, że olej rzepakowy przechowywany w ciemności zawierał głównie pierwotne produkty utlenienia, natomiast w eksponowanych na światło procesy utlenienia były bardziej zaawansowane.

W przechowywanym oleju zmieniała się również zawartość barwników karotenoidowych oraz tokoferoli. Związki te działają przeciwutleniająco, a ich zmiany zależne były od warunków przechowywania. W wyniku fotosensybilizacji dochodzi do szybszych procesów fotoutleniania niż autoutleniania co widoczne jest w próbkach eksponowanych na światło. Rozkład tokoferoli był najszybszy w oleju przechowywanym w bezbarwnej butelce wystawionej na działanie promieniowania świetlnego. Najmniejsze zmiany obserwowano natomiast w oleju przechowywanym w ciemności.

W trakcie przechowywania zmieniała się zawartość tlenu w fazie nadpowierzchniowej i w oleju. Największy spadek zawartości tlenu w butelce odnotowano dla próbek oleju przechowywanego w butelce bezbarwnej, eksponowanego na światło. Dla tego samego oleju zaobserwowano po sześciu miesiącach przechowywania najwyższe stężenie tlenu O_2 (w oleju). Było to prawdopodobnie efektem uwalniania tlenu we wtórnych procesach utleniania. W próbkach przechowywanych w ciemności zmiany zawartości tlenu (w fazie nadpowierzchniowej i w oleju) zachodziły wolniej niż w próbkach poddanych działaniu światła.

Na podstawie analizy korelacji wykazano, że liczba nadtlenkowa jest dodatnio skorelowana ze współczynnikiem absorpcji K_{232} , co wskazuje na przyrost pierwotnych produktów utlenienia. Ujemna korelacja LO z zawartością tlenu w oleju (O_2), zawartością karotenoidów i tokoferoli oznaczała, że wraz ze wzrostem stężenia pierwotnych produktów utlenienia następowała konsumpcja tlenku w oleju, oraz utlenianie karotenoidów i tokoferoli. Dla liczby kwasowej nie otrzymano istotnych korelacji z wyznaczonymi parametrami chemicznymi.

Wyniki analizy PCA ujawniły różny zakres zmian oksydacyjnych dla próbek przechowywanych w ciemności i eksponowanych na światło. Natomiast nie odnotowano wyraźnego wpływu barwy butelki.

W widmach w zakresie bliskiej podczerwieni oleju rzepakowego przechowywanego w różnych warunkach nie odnotowano systematycznych zmian w zależności od czasu i warunków przechowywania. Spektroskopia w zakresie NIR charakteryzowała się mniejszą czułością i ograniczała się przede wszystkim do głównych składników oleju (kwasów tłuszczowych i tracylogliceroli), których zawartość nie zmieniała się w czasie przechowywania.

Zastosowanie spektroskopii w zakresie widzialnym, pozwoliło otrzymać informacje o barwnikach obecnych w przechowywanym oleju rzepakowym. W zależności od warunków przechowywania i rodzaju opakowania obserwowano zmiany w widmach absorpcji polegające na zmniejszeniu intensywności pasm pochodzących od absorpcji karotenoidów.

W widmach synchronicznych fluorescencji oleju obserwowano charakterystyczne zmiany w czasie przechowywania, zależne od warunków przechowywania. Intensywność pasm pochodzących od emisji tokoferoli i chlorofili zmniejszała się w stopniu zależnym od warunków przechowywania. Największe zmiany w intensywności pasm zaobserwowano w oleju przechowywanym w bezbarwnych butelkach, eksponowanych na światło. Najmniejsze w oleju przechowywanym w ciemności. Przy długości fali $\lambda = 324$ nm (dla widm synchronicznych fluorescencji przy $\Delta\lambda = 60$ nm) odnotowano wzrost intensywności pasma, wynikający z powstawania produktów utleniania. W oleju eksponowanym na światło wzrost ten był większy niż dla próbek przechowywanych w ciemności.

Na podstawie przeprowadzonej analizy PCA widm synchronicznych fluorescencji stwierdzono systematyczne zmiany w czasie oraz grupowanie próbek w zależności od warunków przechowywania. Najmniejszy zakres zmian obserwowano dla oleju przechowywanego w ciemności, największy – na świetle w bezbarwnych butelkach.

Przeprowadzona analiza regresji PLS widm absorpcyjnych (MIR i Vis) i fluorescencji nie wykazała, dla większości modeli, korelacji oznaczonych parametrów i analizowanych widm. Jediną stosunkowo dobrą zależność otrzymano dla widm synchronicznych fluorescencji zmierzonych przy $\Delta\lambda = 30$ i 60 nm i zawartości tokoferoli. Otrzymany model kalibracyjny charakteryzował się stosunkowo wysokimi wartościami $R^2 = 0,82$ dla $\Delta\lambda = 30$ nm i 0,74 dla $\Delta\lambda = 60$ nm. Otrzymane wartości RPD były jednak niskie i wynosiły odpowiednio 2,3 i 2,0 dla widm synchronicznych zmierzonych przy $\Delta\lambda = 30$ i 60 nm.

Postawiona w pracy hipoteza szczegółowa dotycząca wykorzystania technik spektroskopowych (NIR, Vis i fluorescencyjnej) do kontroli jakości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w czasie przechowywania, została częściowo pozytywnie zweryfikowana.

Na podstawie wyników uzyskanych z niniejszej pracy można stwierdzić, że każda z zastosowanych technik charakteryzuje się określonymi zaletami oraz posiada pewne ograniczenia. Spektroskopia w zakresie NIR charakteryzuje się niższą czułością i ogranicza swoje zastosowanie do analizy głównych składników. Bardziej specyficzne widma uzyskuje się w zakresie podstawowej podczerwieni. Wykorzystanie spektroskopii w zakresie widzialnym umożliwia uzyskanie informacji o związkach, które nie są widoczne w widmach w zakresie podczerwieni, oraz pozwala na rozróżnienie badanego produktu (m.in. ze względu na technologię otrzymywania) w obrębie tej samej klasy/gatunku. Fluorescencja natomiast jest metodą najbardziej czułą, jednak ogranicza się tylko i wyłącznie do analizy związków emitujących.

Wybór odpowiedniej techniki determinuje cel badań. Zastosowanie jednocześnie kilku technik dostarcza kompleksowych informacji o właściwościach badanego produktu. Na podstawie wyników przedstawionych w pracy można stwierdzić, że techniki spektroskopowe mogą stanowić wszechstronne narzędzie badawcze, pozwalające na ocenę różnych aspektów jakości olejów. Techniki spektroskopowe w zależności od problemu analitycznego mogą zastępować tradycyjne metody lub stanowić ich uzupełnienie.

Postawiona w pracy hipoteza główna, że wybrane techniki spektroskopowe mogą zostać wykorzystane do oceny jakości olejów roślinnych została pozytywnie zweryfikowana.

Literatura

1. Achremowicz K., Szary-Sworst K., 2005, *Wielonienasycone kwasy tłuszczowe czynnikiem poprawy stanu zdrowia człowieka*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 3, 23-55.
2. Adams M.J., *Chemometrics in analytical spectroscopy*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004.
3. Al-Alawi A., van de Voort F.R., Sedman J., 2004, *New FTIR method for the determination of FFA in oils*. Journal of the American oil Chemist's Society, 81, 441-446.
4. Alam MA, Hamid SF, 2007, *Application of FTIR spectroscopy in the assessment of olive oil adulteration*. Journal of Applied Sciences Research, 73,102–108.
5. Allendorf M., Subramanian A., Rodriguez-Saona L., 2012, *Application of a handheld portable mid-infrared sensor for monitoring oil oxidative stability*. Journal of the American Oils Chemists Society, 89, 79-88.
6. Ammari F., Cordella C. B. Y., Boughanmi N., Rutledge D. N., 2012a, *Independent components analysis applied to 3D-front-face fluorescence spectra of edible oils to study the antioxidant effect of Nigella sativa L. extract on the thermal stability of heated oils*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 113, 32-42.
7. Ammari F., Jouan-Rimbaud-Bouveresse D., Boughanmi N., Routledge D. N., 2012b, *Study of the heat stability of sunflower oil enriched in natural antioxidants by different analytical techniques and front-face fluorescence spectroscopy combined with Independent Components Analysis*. Talanta, 99, 323-9.
8. Aparicio R., Aparicio-Ruiz R., 2000, *Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques – A review*. Journal of Chromatography A, 881, 93–104.
9. Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M., 2007, *Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 596, 330-337.
10. Armenta S., Moros J., Garrigues S., de la Guardia Cirugeda M., 2010, *Determination of olive oil parameters by near infrared spectrometry*. [w:] Preedy V.R., Watson R.R. (eds.), *Olives and olive oil in health and disease prevention*. Elsevier, UK, USA, 533-542.
11. Arvanitoyannis I. S., Vlachos A., 2007, *Implementation of physicochemical and sensory analysis in conjunction with multivariate analysis towards assessing olive oil authentication/adulteration*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47, 441-98.
12. Astel A., Polkowska Ż., Namieśnik J., *Zastosowanie technik chemometrycznych w analityce i monitoringu środowiskowym*. [w:] Zuba D., *Chemometria metody i zastosowania*. Kraków 2003
13. ASTM F 2714-08, Standard test method for oxygen headspace analysis of packages using fluorescent decay.
14. Azizian H., Kramer J.K.G., 2005, *A rapid method for the quantification of fatty acids in fats and oil with emphasis on trans fatty acids using Fourier transform near infrared spectroscopy (FT-NIR)*, Lipids, 40, 855-867.
15. Baixauli R., Salvador A., Fiszman S.M., Calvo C., 2002, *Effect of oil degradation during frying on the color of fried, battered squid rings*. Journal of Oil & Fat Industries, 79(11), 1127-1131.
16. Berganza B.E., Moran A.W., Rodriguez G., Coto N.M., Santamaria M., Bressani R., 2003, *Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth*. Plant Foods for Human Nutrition, 58, 1-6.
17. Berrueta L. A., Alonso-Salces R. M., Heberger K., 2007, *Supervised pattern recognition in food analysis*. Journal of Chromatography A, 1158, 196-214.
18. Bertrand E., Blanco M., Coello J., Iturriaga H., MasPOCH S., Montoliu I., 2000, *Near infrared spectrometry and pattern recognition as screening methods for the authentication of virgin olive oils of very close geographical origins*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 8, 45–52.

19. Beutner S., Bloedorn B., Frixel S., Hernandez-Blanco I., Hoffman T., Martin H-D., Mayer B., Noack P., Ruck Ch., Schmidt M., Schülke I., Sell S., Ernst H., Haremza S., Seybold G., Sies H., Stahl W., Walsh R., 2001, *Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorant and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and idigoids. The role of β -carotene in antioxidant functions*. Journal of the Science of Food Agriculture, 81, 559-568.
20. Billek G., 2000, *Health aspects of thermoxidized oils and fats*. European Journal of Lipid Science and Technology, 102, 587–593.
21. Blanco M., Villarroya I., 2002, *NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool*. Trends in analytical chemistry, 21, 240-250.
22. Boczar P., *Niektóre aspekty światowego rynku olejów roślinnych w latach 1961-2005*” Roczniki Naukowe, tom XI, zeszyt 4.
23. Bosque-Sendra J.M., Cuadros-Rodríguez L., Ruiz-Samblás C., Paulina de la Mata A., 2012, *Combining chromatography and chemometrics for the characterization and authentication of fats and oils from triacylglycerol compositional data—A review*. Analytica Chimica Acta, 724, 1– 11.
24. Budzyńska-Topolowska J., Ziemiański S., 1992, *Zmiany zachodzące w tłuszczach i ich wpływ na wartość odżywczą*. Żywnienie Człowieka i Metabolizm, 19, 95–96.
25. Burdge G.C., 2006, *Metabolism of α -linolenic acid in humans*. Prostaglandis Leukotrienes Essential Fatty Acids, 75, 161-168.
26. Burns D.A., Ciurczak E.W., *Handbook of near-infrared analysis, Second Edition*. Revised and Expanded, Marcel Dekker Inc, New York, 2001.
27. Buttner G, 1997, *The use of NIR analysis for refineries*. Process control and quality, 9, 197-203.
28. Caponio F., Bilancia M.T., Pasqualone A., Sikorska E., Gomes T., 2005, *Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage*. European Food Research and Technology, 221, 92-98.
29. Caponio F., Summo C., Bilancia M. T., Paradiso V. M., Sikorska E., Gomes T. ,2011, *High performance size-exclusion chromatography analysis of polar compounds applied to refined, mild deodorized, extra virgin olive oils and their blends: An approach to their differentiation*. LWT. Food Science and Technology, 44, 1726-1730.
30. Capote F. P., Jiménez J. R., Luque de Castro M. D., 2007, *Sequential (step-by-step) detection, identification and quantitation of extra virgin olive oil adulteration by chemometric treatment of chromatographic profiles*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388, 1859–1865.
31. Careri M., Bianchi F., Corradini C., 2002, *Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis*. Journal of Chromatography A., 970, 3-64.
32. Casale M., Casolino C., Olivieri P., Forina M., 2010, *The potential of coupling information using three analytical techniques for identifying the geographical origin of Liguria extra virgin olive oil*. Food Chemistry, 118, 163-170.
33. Catharino R. R., Haddad R., Cabrini L. G., Cunha I. B. S., Sawaya A. C. H. F., Eberlin M. N., 2005, *Characterization of vegetable oils by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting: Classification, quality, adulteration, and aging*. Analytical Chemistry 77, 7429–7433.
34. Cert A., Moreda W., Pérez-Camino M. C., 2000, *Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils*. Journal of Chromatography A, 881, 131–148.
35. Cheikhousman R., Zude M., Bouveresse D. J., Leger C. L., Rutledge D. N., Birlouez-Aragon I., 2005, *Fluorescence spectroscopy for monitoring deterioration of extra virgin olive oil during heating*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 382, 1438-43.
36. Christensen J., Norgaard L., Bro R., Engelsen S.B., 2006, *Multivariate autofluorescence of intact food systems*. Chemical Reviews, 106, 1979-1994.

37. Christy A.A., Kasemsumran S., DU Y., Ozaki Y., 2004, *The detection and quantification of adulteration in olive oil by near-infrared spectroscopy and chemometrics*. Analytical Sciences, 20, 935-940.
38. Christiansen J., Becker E.M., Frederkisen C.S., 2006, *Fluorescence spectroscopy an PARAFAC in the analysis of yogurt*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 46, 133-147.
39. Cichosz G., Czczot H., 2011, *Stabilność oksydacyjna tłuszczów jadalnych – konsekwencje zdrowotne*. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, XLIV, 50-60
40. Cogdill R.P., Knight T.P., Anderson C.A., Drennen III J.K., 2007, *The financial returns on investments in process analytical technology and lean manufacturing: Benchmarks and case study*. Journal of Pharmaceutical Innovation, 2, 38-50.
41. Cox R., Lebrasseur J., Michiels E., Buijs H., Li H., van de Voort F.R., Ismail A.A., Sedman J., 2000, *Determination of iodine value with a Fourier transform-near infrared based global calibration using disposable vials: An international collaborative study*. Journal of the American Oil Chemists Society, 77, 1229-1234.
42. Cygański A., *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*. Wydawnictwo naukowo-techniczne Warszawa 1993.
43. Dais P., Spyros A., 2007, *³¹P NMR spectroscopy in the quality control and authentication of extra- virgin olive oil: A review of recent progress*. Magnetic Resonance in Chemistry, 45, 367–377.
44. Dais P., Hatzakis E., 2013, *Analytica Chimica Acta*, article in press.
45. Dankowska A., Małecka M., 2009a, *Application of synchronous fluorescence spectroscopy for determination of extra virgin olive oil adulteration*. European Journal of Lipid Science and Technology, 111, 1233-1239.
46. Dankowska A., 2009b, *Wykrywanie zafalszowań oliwy z oliwek*, praca doktorska.
47. Dankowska A., Małecka M., Kowalewski W., 2013, *Zastosowanie fluorymetrii synchronicznej do wykrywania zafalszowania oliwy z oliwek wybranymi olejami z nasion*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2, 106-115.
48. Daszykowski M., Walczak B., *Analiza czynników głównych i inne metody eksploracji danych*. [w:] Zuba D., Parczewski A., *Chemometria w analityce*. IES, Kraków, 2008,
49. Dauqan E., Sani H.A., Abdullah A., 2011, *Vitamin E and beta carotene composition in four different vegetable oils*. American Journal of Applied Sciences, 8, 407-412.
50. Davies A.M.C., *Introduction to NIR Spectroscopy*, Norwich Near Infrared Consultancy, Norwich 1993.
51. De La Mata P., Dominguez-Vidal A., Bosque-Sendra J. M., Ruiz-Medina A., Cuadros-Rodriguez L., Ayora-Canada M. J., 2012, *Olive oil assessment in edible oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics*. Food Control, 23, 449-455.
52. Delgadillo I., Barros A., Nunes A., 2012, *Quality evaluation of olives, olive pomace and olive oil by infrared spectroscopy*. [in:] Olive oil – constituents, quality, health properties and bioconversions, Dimitrios B. (ed), Croatia 2012.
53. Derrick M.R., Stulik D., Landry J.M., *Infrared spectroscopy in conservation science, scientific tools for conservation*. The Getty Conservation Institute, USA, 1999.
54. Diaz T.G., Meras I.D., Correa C.A., Roldan B., Caceres M.I.R., 2003, *Simultaneous fluorometric determination of chlorophylls a and b and pheophytins a and b in olive oil by partial least-squares calibration*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6934-6940.
55. Downey G., McIntyre P., Davier A. N., 2002, *Detecting and quantifying sunflower oil adulteration in extra virgin olive oils from the eastern Mediterranean by visible and Near-Infrared spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 5520–5525.

56. Drozdowski B., *Lipidy*. [w:] Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. Praca zbiorowa pod redakcją Sikorskiego Z.E., WNT Warszawa, 1996
57. Drozdowski B., *Lipidy - Charakterystyka ogólna tłuszczów jadalnych*. [w:] Chemia żywności, sacharydy, lipidy, białka. Wydawnictwo V, Red. Sikorski Z.E., WNT, Warszawa, 2007, 73-164.
58. Dubois V., Breton S., Linder M., Fanni J., Parmentier M., 2007, *Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential*. European Journal of Lipid Science and Technology, 109, 710-732.
59. Dupuy N., Le Dreau Y., Ollivier D., Artaud J., Pinatel C., Kister J., 2005, *Origin of French virgin olive oil registered designation of origins predicted by chemometric. Analysis of synchronous excitation-emission fluorescence spectra*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 9361-9368,
60. Dupuy N., Galtier O., Ollivier D., Vanloot P., Artaud J., 2010, *Comparison between NIR, MIR, concatenated NIR and MIR analysis and hierarchical PLS model. Application to virgin olive oil analysis*. Analytica Chimica Acta, 666, 23-31.
61. Du R., Lai Z., Xiao Z., Shen Y., Wang X., Huang Y., 2012, *Evaluation of the quality of deep frying oils with Fourier transform near-infrared and mid-infrared spectroscopy*. Journal of Food and Science, 77, 261-266.
62. Dziennik Ustaw z 2006 r. Nr 171, poz. 1225.
63. Dziennik Ustaw z 2001 r. Nr 5 poz.44 .
64. El-Gindy A., Hadad G.M., 2012, *Chemometrics in pharmaceutical analysis: an introduction, review, and future perspectives*. Journal of AOAC International, 3, 609-623.
65. Esbensen K.H., 2002, *Multivariate data analysis – in practice, 5 edition*. CAMO Process AS, Oslo.
66. FAMMU/ FAPA, march 2013, Oilseeds:World Markets and Trade, United States Department of Agriculture.
67. FAO/FAPRI/USDA – Agricultural Commodity Markets Outlook 2011-2020 a comparative analysis, September 2011.
68. Galtier O., Dupuy N., Le Dreau Y., Ollivier D., Pinatel C., Kister J., Artaud J., 2007, *Geographic origins and compositions of virgin olive oils determined by chemometric analysis of NIR spectra*. Analytica Chimica Acta, 595, 136-144.
69. Garcia-Gonzalez D.L., Mannina L., D’Imperio M., Segre A.L., Aparicio R., 2004, *Using ¹H and ¹³C NMR techniques and artificial neural networks to detect the adulteration of olive oil with hazelnut oil*. European Food Research and Technology, 219, 545–548.
70. Geladi P., 2003, *Chemometrics in spectroscopy Part 1. Classical Chemometrics*. Spectrochimica Acta Part B, 58, 767-782.
71. Geladi P., Sethon B., Nystrom J., Lillhonga T., Lestander T., Burger J., 2004, *Chemometrics in spectroscopy Part 2. Examples*. Spectrochimica Acta Part B, 59, 1347–1357.
72. Gemperline P., *Practical guide to chemometrics*, Taylor & Francis, London, 2006.
73. Gimenez M.J., Piston F., Martin A., Atienza S.G., 2010, *Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication*. Food Chemistry, 118, 482–487.
74. Giuliani A., Cerretani L., Cichelli A., 2013, *Chlorophylls in olive and in olive oil: chemistry and occurrences*. Critical Reviews in food Science and Nutrition, 51, 678-690.
75. Giungato P., Notarnicola L., Colucci L., 2002, *Evaluation of fluorescence spectroscopy potential in edible oil analysis*. [in:] R. Zielinski (Ed.), *Current trends in commodity science*. Poznań University of Economics.

76. Gliszczyńska-Świgło A., Sikorska E., 2004, *Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible oils*. Journal of Chromatography A, 1048, 195-198.
77. Grigoriadou D., Tsimidou M. Z., 2006, *Quality control and storage studies of virgin olive oil: Exploiting UV spectrophotometry potential*. European Journal of Lipid Science and Technology, 108, 61–69.
78. Gromadzka J., Wardencki W., 2011, *Trends in edible vegetable oils analysis. Part B. Application of different analytical techniques*. Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences, 61, 89-99.
79. Górnaś P., Siger A., Nogala-Kałużka M., Polewski K., 2005, *Porównanie zmian oksydacyjnych i efektywności wiązania wolnych rodników w trakcie przechowywania olejów roślinnych tłoczonych na zimno oraz ich rafinowanych odpowiedników*. ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2, 41-51.
80. Guidetti R., Beghi R., Giovenzana V., 2012, *Chemometrics in food technology*. Chemometrics in Practical Applications, Kurt Varmuza (Ed.), InTech.
81. Guillen M.D., Cabo N., 1997, *Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 75, 1-11.
82. Guillen M.D., Cabo N., 2002, *Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils*. Food Chemistry, 77, 503–510.
83. Guillen M.D., Ruiz A., 2006, *Study by means of H-1 nuclear magnetic resonance of the oxidation process undergone by edible oils different natures submitted to microwave action*. Food Chemistry, 96, 665-674.
84. Guimet F., Ferre J., Boque R., Rius F.X., 2004a, *Application of unfold principal component analysis and parallel factor analysis to the exploratory analysis of olive oils by means of excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy*. Analytica Chimica Acta, 515, 75-85.
85. Guimet F., Boque R., Ferre J., 2004b, *Cluster analysis applied to the exploratory analysis of commercial Spanish olive oils by means of excitation-emission fluorescence spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 6673-6679.
86. Guimet F., Ferre J. Boque R., 2005, *Rapid detection of olive–pomace oil adulteration in extra virgin olive oils from the protected denomination of origin “Siurana” using excitation–emission fluorescence spectroscopy and three-way methods of analysis*. Analytica Chimica Acta, 544, 143-152.
87. Gunstone F.D., *Vegetable Oils*. [in:] Bailey’s Industrial Oil and Fat Products, vol 1. Edible Oil and Fat Products: Chemistry, Properties, and Health Effects, Ed. Shahidi F., Eds. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2005, 213-267.
88. Gurdeniz G., Ozen B., 2009, *Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data*. Food Chemistry, 116, 519-525.
89. Hajimahmoodi M., Vander Heyden Y., Sadeghi N., Jannat B., Oveisi M. R., Shahbazian S., 2005, *Gas-chromatographic fatty-acid fingerprints and partial least squares modeling as a basis for the simultaneous determination of edible oil mixtures*. Talanta, 66, 1108–1116.
90. Harwood J.L., Aparicio R., 2000, *Handbook of olive oil: analysis and properties*, Wydawnictwo Aspen, 29-45.
91. Hawrysh Z.J., 1990, *Stability of canola* chapter 7 .in Shahidy(ed), Canola and reposed Produktion, Chemistry, NY.
92. Hibbert B.D., Minkkinen P., Faber N.M., Wise B.M., 2009, *IUPAC project: A glossary of concepts and terms in chemometrics*. Analytica Chimica Acta, 642, 3-5.

93. Holman R.T., Nickell C., Privett O.S., 1958, *Detection and measurement of hydroperoxides by near infrared spectrophotometry*. The Journal of the American Oil Chemists' Society, 35, 422-425.
94. Hourant P., Baeten V., Morales M. T., Meurens M., Aparicio R., 2000, *Oil and fat classification by selected bands of near infrared spectroscopy*. Applied Spectroscopy, 54, 1168–1174.
95. Huang Y., Rogers T.M., Wenz M.A., Cavinato A.G., Mayes D.M., Bledsoe G.E., Rasco B.A., 2001, *Detection of sodium chloride in cured Salmon Roe by SW-NIR spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4161-4167.
96. Inon F.A. , GarriguesJ.M. , Garrigues S., Molina A., de la Guardia M., 2003, *Selection of calibration set samples in determination of olive oil acidity by partial least squares–attenuated total reflectance–Fourier transform infrared spectroscopy*. Analytica Chimica Acta, 489, 59–75.
97. Javidnia K., Parish M., Karimi S., Hemmateenejad B., 2013, *Discrimination of edible oils and fats by combination of mulivariate pattern recognition and FT-IR spectroscopy: A comparative study between different modeling methods*. Spectrochimica Actra Part A- Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 104, 175-181.
98. Kanavouras A., Hernandez-Munoz P., Coutelieris F.A., 2006, *Packaging of olive oil: quality issues and shelf life prediction*. Food Reviews International, 22, 381-404.
99. Kania M., Michalak M., Gogolewski M., Hoffmann A., 2004, *Antioxidative potential of substances contained in cold pressed soybean oil and after each phase of refining process*. ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 3, 113-121.
100. Kamal-Eldin A., Yanishlieva N.V., 2002, *N-3 fatty acids for human nutrition: stability considerations*. European Journal of Lipid Science and Technology, 104, 825-836.
101. Karakasides N.G., Tsimis D.A., 2002, *How the choice of container affects olive oil quality – a review*. Packaging Technology and Science, 15, 147-154.
102. Karłowicz-Bodalska K., Bodalski T., 2007, *Nienasycone kwasy tłuszczowe, ich właściwości biologiczne i znaczenie w leczeniu*. Postępy Fitoterapii, 1, 46-56.
103. Karoui R., Downey G., Blecker C., 2010, *Mid-infrared spectroscopy coupled with chemometrics: a tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships- A review*. Chemical Reviews, 110, 6144-6168.
104. Karoui R., Blecker Ch., 2011, *Fluorescence spectroscopy measurement for quality assessment of food systems—A Review*. Food and Bioprocess Technology, 4, 364-386.
105. Kasemsumran S., Kang , N., Christy A., Ozaki Y., 2005, *Partial least squares processing of near-infrared spectra for discrimination and quantification of adulterated olive oils*. Spectroscopy Letters, 38, 839 – 851.
106. Keith L. H., Gron L. U., Young J. L., 2007, *Green analytical methodologies*. Chemical Reviews, 107, 2695-2708.
107. Korcz W., Góralczyk K., Czaja K., Struciński P., Hernik A., Snopczyński T., Ludwicki J.K., *Zastosowanie metod statystycznych w badaniach chemicznych*, ROCZN. PZH 2008, 59, NR 2, 117-129
108. Koronacki J., Ćwik J., *Statystyczne systemy uczące się*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2005.
109. Koski A., Psomiadou E., Tsimidou M., Hopia A., Kefalas P., Wähälä K., Heinonen M., 2002, *Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil*. European Food Research Technology, 214, 294-298.
110. Koski A., Pekkarinen S., Hopia A., Wahala K., Heinonen M., 2003, *Processing of rapeseed oil: effects on sinaptic acid derivative content and oxidative stability*. European Food Research Technology, 217, 110-114.

111. Krygier K., Domian K., Drąbka D., 1995, *Porównanie jakości i trwałości olejów rzepakowych: tłoczonego na zimno i na gorąco oraz rafinowanego*. *Rośliny oleiste – Oilseed Crops*, XVI, 301-306.
112. Kyriakidis N.B., Skarkalis P., 2000, *Fluorescence spectra measurement of olive oil and other vegetable oils*. *Journal of AOAC International*, 83, 1435-1439.
113. Lai Y.W., Kemsley E.K., Wilson R.H., 1995, *Quantitative analysis of potential adulterants of extra Virgin olive oil using infrared spectroscopy*. *Food Chemistry*, 53, 95–98.
114. Lakowicz J.R., 2010, *Principles of fluorescence spectroscopy*. Third edition.
115. Lanfer-Marquez U.M., Barros R.M.C., Sinnecker P., 2005, *Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives*. *Food Research International*, 38, 885-891.
116. Lankmayr E., Mocak J., Serdt K., Balla B., Wenzl T., Bandoniene D., Gfrerer M., Wagne S., 2004, *Chemometrical classification of pumpkin seed oils using UV–Vis, NIR and FTIR spectra*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61, 95–106.
117. Lavine B.K., Davidson C.E., *Classification and pattern recognition, [w:] Practical guide to chemometrics second edition*. (edited by Gemperline P.), CRC Press, Boca Raton, 2006.
118. Lay J. O., Liyanage R., Durham, B., Brooks J., 2006, *Rapid characterization of edible oils by direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis using triacylglycerols*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 952–958
119. Le Dreau Y., Dupuy N., Artaud J., Ollivier D., Kister J., 2009a, *Infrared study of aging of edible oils by oxidative spectroscopic index and MCR-ALS chemometric method*. *Talanta*, 77, 1748-56.
120. Le Dreau Y., Dupuy N., Gaydou V., Joachim J., Kister J., 2009b, *Study of jojoba oil aging by FTIR*. *Analytica Chimica Acta* 642, 163-170.
121. Lerma-García M.J., Ramis-Ramos G., Herrero-Martínez J.M., Simó-Alfonso E.F., 2008, *Classification of vegetable oils according to their botanical origin using sterol profiles established by direct infusion mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 973–978.
122. Lerma-García M. J., Ramis-Ramos G., Herrero-Martínez J. M., Simo-Alfonso E. F., 2010, *Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy*. *Food Chemistry*, 118, 78-83.
123. Lerma-García M.J., Simo-Alfonso E.F., Bendini A., Cerretani L., 2011a, *Rapid evaluation of oxidised fatty acid concentration in virgin olive oil using Fourier-transform infrared spectroscopy and multiple linear regression*. *Food Chemistry*, 124, 679–684
124. Lerma-García M.J., Lusardi R., Chiavaro E., Cerretani L., Bendini A., Ramis-Ramos G., Simó-Alfonso E.F., 2011b, *Use of triacylglycerol profiles established by high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection to predict the botanical origin of vegetable oils*. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7521-7527.
125. Li H., van de Voort F.R., Sedman J., Ismail A.A., 1999, *Rapid determination of cis and trans contents, iodine value, and saponification number of edible oils by Fourier transform near-infrared spectroscopy*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76, 491-497.
126. Lloyd J.B.F., 1971, *Synchronized excitation of fluorescence emission spectra*. *Nature (London) Physics and Science*, 231, 64-65.
127. Lum Ng, C., Wheeling, R.L., Cuppett, S.L., 2007, *Method for determining frying oil degradation by near-infrared spectroscopy*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 593-597.
128. Mafra I., Ferreira I., Oliveira M., 2008, *Food authentication by PCR-based methods*. *European Food Research and Technology*, 227(3), 649–665.

129. Maggio R. M., Cerretani L., Chiavaro E., Kaufman T. S., Bendini A., 2010, *A novel chemometric strategy for the estimation of extra virgin olive oil adulteration with edible oils*. Food Control, 21, 890-895.
130. Maggio R. M., Valli E., Bendini A., Gomez-Caravaca A. M., Toschi T. G., Cerretani L., 2011, *A spectroscopic and chemometric study of virgin olive oils subjected to thermal stress*. Food Chemistry, 127, 216-221.
131. Manaf MA, Che Man YB, Hamid NSA, Ismail A, Syahariza Z.A., 2007, *Analysis of adulteration of virgin coconut oil by palm kernel olein using Fourier transform infrared spectroscopy*. Journal Food Lipids, 14, 111–121.
132. Marigheto N.A., Kemsley E.K., Defenez M., Wilson R.H., 1998, *A comparison of mid-infrared and Raman spectroscopies for the authentication of edible oils*. Journal of the American Oil Chemists Society, 75, 987-992.
133. Martens H., *Multivariate calibration*. John Wiley & Sons, UK, 1989
134. Martens H., Martens M., *Multivariate analysis of quality: An introduction*. John Wiley & Sons Ltd, UK, 2001.
135. Marquez A.J., Diaz A.M., Reguera M.I.P., 2005, *Using optical NIR sensor for on-line virgin olive oils characterization*. Sensors and Actuators B: Chemical, 107, 64-68.
136. Mas S., Juan Anna, Tauler R., Olivieri C.A., Escandar G.M., 2010, *Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review*. Talanta 80, 1052-1067.
137. Massart D.L., Vander Heyden Y., 2004, *From tables to visuals: principal component analysis, part 1, LC-GC Europe*, 17, 586-591.
138. Massart D.L., Vander Heyden Y., 2004b, *From tables to visuals: principal component analysis, part 2. LC-GC Europe*, 18, 84-89.
139. Maszewska, M., Krygier, K., 2006, *Ocena tłuszczów i olejów wykorzystywanych do smażenia potraw*. [w:] Mitek, M. Słowiński, M. (red.), *Wybrane zagadnienia z technologii żywności*, Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 471-484
140. Mazerski J., *Podstawy chemometrii*. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, 2000.
141. Matthäus, B., 2006, *Utilization of high-oleic rapeseed oil for deep-fat frying of French fries compared to other commonly used edible oils*. European Journal of Lipid Science and Technology, 108, 200–211.
142. Mendez A.I., Falque E., 2007, *Effect of storage time and container type on the quality of extra-virgin olive oil*. Food Control, 18, 521-529.
143. Mevik B-H., Wehrens R., 2007, *The pls Package: Principal Component and Partial Least Squares Regression in R*. Journal of Statistical Software, 18, 1-24.
144. Miller, J.N, Miller, J.C, 2005, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 5th ed.* Pearson Education, Harlow.
145. Mińskowski K., *Studia nad stabilnością oksydacyjną olejów roślinnych bogatych w polienowe kwasy tłuszczowe o budowie trienowej, rozprawa habilitacyjna*. Warszawa 2008.
146. Miraliakbari H., Shahidi F., 2008, *Oxidative stability of tree nut oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 4751-4759.
147. Mishra R., Sharma H.K., 2011, *Effect of packaging materials on the storage stability of physically refined rice bran oil and its blends*. African Journal of Food Science, 5, 676-685.
148. Moh M.H., Che Man Y.B., Badlishah B.S., Jinap S., Saad M.S., Abdullas W.J.W., 1999, *Quantitative analysis of palm carotene using fourier transform infrared and near infrared spectroscopy*. Journal of the American Oil Chemists Society, 76, 249-254.
149. Morello J.R., Motilva M.J., Romero M.P., 2004, *Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction*. Food Chemistry, 86, 357-364.

150. Moros J., Roth M., Garrigues S., Guardia M. D. L., 2009, *Preliminary studies about thermal degradation of edible oils through attenuated total reflectance mid-infrared spectrometry*. Food Chemistry, 114, 1529-1536.
151. Muik B., Lendl B., Molina-Diaz A., Valcarcel M., Ayora-Canada M.J., 2007, *Two-dimensional correlation spectroscopy and multivariate curve resolution for the study of lipid oxidation in edible oils monitored by FTIR and FT-Raman spectroscopy*. Analytica Chimica Acta, 593, 54-67.
152. Naes T., Isaksson T., Fearn T., Davies T., A, *User friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR Publications, Chichester, 2002.
153. Nawar W.W., 1996, *Lipids in Food Chemistry, 3rd edition*. (ed. Marcel Dekker), Inc., New York, 225–319.
154. Navarra G., Cannas M., D'amico M., Giacomazza D., MiliTello V., Vaccaro L., Leone M., 2011, *Thermal oxidative process in extra-virgin olive oils studied by FTIR, rheology and time-resolved luminescence*. Food Chemistry, 126, 1226-1231.
155. Ndou T., Warner I.M., 1991, *Applications of multidimensional absorption and luminescence spectroscopies in analytical chemistry*. Chemical Reviews, 91, 493-507.
156. Nielsen S.S., *Food Analysis. Laboratory Manual. Second Edition*, Springer, New York, 2010.
157. Nissiotis M., Tasioula-Margari M., 2002, *Changes in antioxidant concentration of virgin olive oil during thermal oxidation*. Food Chemistry, 77, 371-376.
158. Obiedzińska A., Waszkiewicz-Robak B., 2012, *Oleje tłoczone na zimno jako żywność funkcjonalna*. ŻYWNOŚĆ Nauka Technologia Jakość, 1, 27-44.
159. Ogutcu M., Aydeniz B., Buyukcan M.B., Yilmaz E., 2012, *Determining frying oil degradation by near infrared spectroscopy using chemometric techniques*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 89, 1823–1830.
160. Otto M., *Chemometrics*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
161. Oussama A., Elabadi F., Platikanov S., Kzaiber F., Tauler R., 2012, *Detection of olive oil adulteration using FT-IR spectroscopy and PLS with variable importance of projection (VIP) scores*. Journal of the American Oil Chemists Society, 89, 1807-1812.
162. Ozdemir D., Oztürk B., 2007, *Near infrared spectroscopic determination of olive oil adulteration with sunflower and corn oil*. Journal of Food and Drug Analysis, 15, 40–47.
163. Ozen Banu F., Mauer L.J., 2002, *Detection of Hazelnut oil adulteration using FT-IR spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3898–3901.
164. Oztürk B., Yalçın A., Ozdemir D., 2010, *Determination of olive oil adulteration with vegetable oils by near infrared spectroscopy coupled with multivariate calibration*, Journal of Near Infrared Spectroscopy, 18, 191-201.
165. Pereira A.F.C., Pontes M.J.C., Neto F.F.G., Santos S.R.B., Galvao R.K.H., Araujo M.C.U., 2008, *NIR spectrometric determination of quality parameters in vegetable oils using iPLS and variable selection*. Food Research International, 41, 341-348.
166. Perez-Jimenez F., Ruano J., Perez-Martinez P., Lopez-Segura F., Lopez-Miranda J., 2007, *The influence of olive oil on human health: Not a question of fat alone*. Molecular Nutrition & Food Research, 51, 1199-1208.
167. Pijanowski E., Dłużewski M., Dłużewska A., Jarczyk A., *Ogólna technologia żywności, wyd. VII*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2000.
168. Pinto R. C., Locquet N., Eveleigh L., Rutledge D. N., 2010, *Preliminary studies on the mid-infrared analysis of edible oils by direct heating on an ATR diamond crystal*. Food Chemistry, 120, 1170-1177.
169. PN-ISO 3960:1996, *Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby nadtlenkowej*.

170. PN-ISO 660:1998, Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości.
171. PN-EN ISO 3656:2002, Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie absorpcji w nadfiolecie wyrażonej jako ekstynkcja właściwa w świetle UV.
172. Poiana M.A., Mousdis G., Alexa E., Moigradean D., Negrea M., Mateescu C., 2012, *Application of FT-IR spectroscopy to assess the olive oil adulteration*. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 18, 277-282.
173. Poradnik Handlowca, *Raport: Rynek tłuszczów roślinnych i produktów zbożowych*, 08.2011,
174. Poulli K., Mousdis G., Georgiou C., 2006, *Synchronous fluorescence spectroscopy for quantitative determination for virgin olive oil adulteration with sunflower oil*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386, 1571-1575.
175. Poulli K., Mousdis G., Georgiou C., 2007, *Rapid synchronous fluorescence method for virgin olive oil adulteration assessment*. Food Chemistry, 105, 369-375.
176. Poulli K.I., Mousdis G. A., Georgiou C. A., 2009, *Monitoring olive oil oxidation under thermal and UV stress through synchronous fluorescence spectroscopy and classical assays*. Food Chemistry, 117, 499-503.
177. Prescha A., Siger A., Lorenc-Kukuła K., Biernat J., Nogala-Kałużka M., Szopa J., 2008, *Badania nad składem i podatnością na utlenianie oleju z nasion lnu modyfikowanego genetycznie*. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 3, 286-292
178. Przybylski R., Mag T., Eskin N.A.M., McDonald B.E., *Canola oil*. [in:] Bailey's Industrial Oil and Fat Products, vol 2. Edible Oil and Fat Products: Edible Oils, Ed. Shahidi F., Eds. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005, 61-122.
179. Quinones-Islas N., Meza-Marquez O.G., Osorio-Revilla G., Gallardo-Velazquez T., 2013, *Detection of adulterants in avocado oil by Mid-FTIR spectroscopy and multivariate analysis*. Food Research International, 51, 148-154.
180. Rababah T.M., Feng H., Yang W., Eriefej K., Al-Omush M., 2011, *Effects of type of packaging material on physicochemical and sensory properties of olive oil*. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 4, 66-72.
181. Rabiei Z., Enferadi S.T., 2012, *Traceability of origin and authenticity of olive oil* [in:] Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions, Boskou D. [ed.], InTech, Croatia 2012, 163-184.
182. Reh C., *An overview of nondestructive sensor technology in practice: The user's view*. [w:] Nondestructive Testing of Food Quality (eds J. Irudayaraj and C. Reh), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2008.
183. Ricca M., Fodera V., Vetri V., Buscatino G., Montalbano M., Leone M., 2012, *Oxidation processes in sicilian olive oils investigated by a combination of optical and EPR spectroscopy*. Journal of Food Science, 77, 1084-1089.
184. Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2009, Warszawa
185. Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2011. Warszawa
186. Rohman A., Che Man Y. B., 2010. *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil*. Food Research International, 43, 886-892.
187. Rohman A., Che Man Y.B., 2011a, *The use of Fourier transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy for detection and quantification of adulteration in virgin coconut oil*. Food Chemistry, 129, 583-588.
188. Romana A., Che Man Y.B., Ismail A., Puziah H., 2011b, *FTIR spectroscopy combined with multivariate calibration for analysis of cod liver oil in binary mixture with corn oil*. International Food Research Journal, 18, 757-761.

189. Rohman A., Che Man Y.B., 2012a, *Application of Fourier transform infrared spectroscopy for authentication of functional food oils*, Applied Spectroscopy Reviews, 47, 1–13.
190. Rohman A., Che Man Y. B., 2012b, *The chemometrics approach applied to FTIR spectral data for the analysis of rice bran oil in extra virgin olive oil*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 110, 129-134.
191. Rosiak E., 2005, *Przemysł tłuszczowy – rośliny oleiste*. Seria Polska wieś w Europie, Warszawa
192. Rotkiewicz D., Konopka I., Tańska M., 2002, *Barwniki karotenoidowe i chlorofilowe olejów roślinnych oraz ich funkcje*. Rośliny Oleiste, Tom XXIII, 561-579.
193. Rozporządzenie Komisji (EWG) NR 2568/91 z dnia 11 lipca 1991 r. w sprawie właściwości oliwy z oliwek i oliwy z wyłoczyn oliwek oraz w sprawie odpowiednich metod analizy (Dz.U. L 248 z 5.9.1991, str. 1)
194. Russin T.A., van de Voort F.R., Sedman J., 2003, *Novel method for rapid monitoring of lipid oxidation by FTIR Spectroscopy using disposable IR cards*. Journal of the American Oil Chemists Society, 80, 635-641.
195. Russin T.A., van de Voort F.R., Sedman J., 2004, *Rapid determination of oxidative stability of edible oils by FTIR spectroscopy using disposable IR cards*, Journal of the American Oil Chemists Society, 81, 111-116.
196. Sadecka J., Tothova J., 2007, *Fluorescence spectroscopy and chemometrics in the food classification - a review*. Czech Journal of Food Sciences, 25, 159-173.
197. Safar M., Bertrand D., Robert P., Devaux M F., Genot C., 1994, *Characterization of edible oils, butters and margarines by Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance*. Journal of American Oil Chemists Society, 71, 371-377.
198. Sato T., 1994, *Application of principal component analysis on near-infrared spectroscopic data of vegetable oils for their classification*. Journal of American Oil Chemists Society, 71, 293 – 298.
199. Sawicki W., 2009, *Falszowanie żywności od czasów starożytnych do dziś*. Przemysł spożywczy, 63, 2-6.
200. Sayago A., Garcia-Gonzalez D.L., Morales M.T., Aparicio R., 2007, *Detection of the presence of refined hazelnut oil in refined olive oil by fluorescence spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 22, 2068-2071.
201. Schwartz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A-M., 2008, *Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats*. Journal of Food Composition and Analysis, 21, 152-161.
202. Scott M., James D., Ali Z., O'Hare W.T., Rowell F.J., 2003, *Total luminescence spectroscopy with pattern recognition and classification of edible oils*. Analyst, 128, 966-973.
203. Scotter C.N.G., 1997, *Non-destructive spectroscopic techniques for the measurement of food quality*, Trends in Food Science and Technology, vol. 8, s. 285-292.
204. Seasholtz M.B., 1999, *Making money with chemometrics*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 45, 55–63
205. Silverstein R.M., Bassler G.C., Morrill T.C., 1991, *Spectrophotometric identification of organic compounds*, 5th edn. Wiley, New York, USA.
206. Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J., *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, Wydawnictwo PWN, Warszawa, 2007.
207. Sinelli N., Cosio M.S., Gigliotti C., Casiraghi E., 2007, *Preliminary study on application of mid infrared spectroscopy for the evaluation of the virgin olive oil "freshness"*. Analytica Chimica Acta, 598, 128-34.

208. Sikorska E., Romaniuk A., Khmeliński I.V., Sikorski M., Koziół J., 2003, *Characterization of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy*. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 12, 108-112.
209. Sikorska E., Górecki T., Khmelinski I.V., Sikorski M., Koziół J., *Application of fluorescence in food analysis*, [in:] Focusing New century- commodity trade environment (red. Rong W., Changju Y., Min J., Jianghua L., Xuzhe F., Liqin L., Jiajie L., Zhenwang K., Song C., Yan Z.), China Agriculture Press, Beijing, 2004, 172-176.
210. Sikorska E., Górecki T., Khmelinski I.V., Sikorski M., Koziół J., 2005a, *Classification of edible oils using synchronous scanning fluorescence spectroscopy*. Food Chemistry, 89, 217-225
211. Sikorska E., Gliszczyńska-Świgło A., Khmelinski I., Sikorski M., 2005b, *Synchronous fluorescence spectroscopy of edible vegetable oils. Quantification of tocopherols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 6988-6994.
212. Sikorska E., Gliszczyńska-Świgło A., Khmelinskii I.V., Kalarus K., Nowacka G., Sikorski M., 2005c, *Front face fluorescence of vegetable oils*. [in:] Current trends in commodity science (red. Zieliński R.) 1208-1213.
213. Sikorska E., Khmelinskii V., Kalarus K., Nowacka G., Sikorski M., Caponio F., Bilancia M.T., Pasqualone A., 2005d, *Application of UV-Vis absorption spectroscopy to monitoring changes in virgin olive oil during storage*. Annals of the Polish Chemical Society, PTCh Poznań II, 156-159.
214. Sikorska E., 2007, *Quantitative analysis of mixtures of edible oils using front face synchronous scanning fluorescence spectroscopy and partial least squares regression*. [in:] Current Trends in Commodity Science, red. Zieliński R., Wieczorek D., 971-976. The Poznań University of Economics, Publishing House, Poznań.
215. Sikorska E., 2008a, *Metody fluorescencyjne w badaniach żywności*. Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu.
216. Sikorska E., Khmelinskii V., Sikorski M., Caponio F., Bilancia M.T., Pasqualone A., Gomes T., 2008b, *Fluorescence spectroscopy in monitoring of extra virgin olive oil during storage*. International Journal of Food Science and Technology, 43, 52-61.
217. Sikorska E., Khmelinski I., Sikorski M., 2012, *Analysis of olive oils by fluorescence spectroscopy: Methods and applications*. [in:] Olive Oil – Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions, edited by Dimitrios B., InTech, Croatia, 63-88.
218. Sikorska E., *Metody fluorescencyjne w ocenie jakości żywności*, 2013, Zeszyty Naukowe, 234, 59-76.
219. Skolimowska U., Skolimowski J., Wędzisz A., 2009, *Badanie właściwości przeciwutleniających 1,2,3,4-tetrahydro-2,2,4,7 tetrametylochinoliny (THTMQ)*. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, XLII, 1111-1116.
220. Smith S.A., King R.E., Min D.B., 2007, *Oxidative and thermal stability of genetically modified high oleic sunflower oil*. Food Chemistry, 102, 1208-1213.
221. Smyk B., 2008, *Wpływ tlenu i przezroczystości opakowania na jakość oleju z ogórecznika – badania modelowe*. Towaroznawcze problemy Jakości 4, 86-98.
222. Stanimirova I., Daszykowski M., Walczak B., *Metody uczenia z nadzorem – kalibracja, dyskryminacja i klasyfikacja* [w:] D. Zuba, A. Parczewski, Chemometria w analityce, IES, Kraków, 2008a
223. Stanimirova I., Walczak B., 2008b, *Classification of data with missing elements and outliers*. Talanta, 76, 602-609.
224. Stark E, in A.M.C. Davies, P. Williams (Editors), *Near infrared spectroscopy: The future waves*. NIR Publications, Chichester, UK, 1996.

225. Stuart B., *Infrared Spectroscopy fundamentals and applications*. Analytical Techniques in the Sciences, Wiley 2004.
226. Szukalska E., 2003, *Wybrane zagadnienia utleniania tłuszczów*. *Tłuszcze Jadalne*, 38, 42-61.
227. Szczepaniak W., 2007, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, wyd. V, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
228. Szydłowska-Czeraniak A., 2007, *MIR spectroscopy and partial least-squares regression for determination of phospholipids in rapeseed oils at a various stages of technological process*. *Food Chemistry*, 105, 1179-1187.
229. Szydłowska-Czeraniak, 2013, *Rapeseed and its products- source of bioactive compounds: A review of their characteristics and analysis*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 307-330.
230. Tańska M., Rotkiewicz D., 2003, *Stopień przemiany lipidów wybranych olejów roślinnych i konsumpcyjnych nasion oleistych*. *Tłuszcze Jadalne*, 38, 147-155.
231. Tańska M., Rotkiewicz D., Ambrosewicz M., 2011, *Porównanie trwałości tłoczonych na zimno olejów lnianego i rzepakowego*. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, XLIV, 521-527.
232. Tapp H. S., Defernez M., Kemsley E. K., 2003, *FTIR spectroscopy and multivariate analysis can distinguish the geographic origin of extra virgin olive oils*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 51, 6110–6115.
233. Targoński Z., Stój A., 2005, *Zafalszowania żywności i metody ich wykrywania*. *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 4, 30-40.
234. Tasan M., Demirci M., 2005, *Total and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining*. *European Food Research and Technology*, 220, 251-254.
235. Tay A., Singh R.K., Krishnan S.S., Gore J.P., 2002, *Authentication of olive oil adulterated with vegetable oils using fourier transform infrared spectroscopy*. *LWT - Food Science and Technology*, 35, 99-103.
236. Tena N., Garcia-Gonzalez D.L., Aparicio R., 2009, *Evaluation of virgin olive oil thermal deterioration by fluorescence spectroscopy*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10505-10511.
237. Tena N., Aparicio R. Garcia-Gonzalez D.L., 2012, *Chemical changes of thermoxidized virgin olive oil determined by excitation–emission fluorescence spectroscopy (EEFS)*. *Food Research International*, 45, 103-108.
238. Torrecilla J.S., Rojo E., Dominguez J.C., Rodriguez F., 2010, *A novel method to quantify the adulteration of extra virgin olive oil with low-grade olive oils by UV–Vis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1679-1684.
239. Tynek M., Pawłowicz R., Gromaczka J., Tylingo R., Wardencki W., Karlovits G., 2012, *Virgin rapeseed oils obtained from different rape varieties by cold pressed method – their characteristics, properties, and differences*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 357-366.
240. Ullah S., Hussain A., Sofail M., 2011, *Effect of packing materials on storage stability of sunflower oil*, *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 44(3), 92-94
241. Van de Voort F.R., Ismail A.A., Sedman J., 1995, *A rapid, automated method for the determination of cis and trans content of fats and oils by Fourier transform infrared spectroscopy*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 873-880.
242. Verhe R., Verleyen T., van Hoed V., de Greyt W., 2006, *Influence of refining of vegetable oils on minor components*. *Journal of Oil Palm Research. Special Issue*, 168-179.
243. Viehari S.A., Koutsaftakis A., 2007, *Effect of processing methods and commercial storage conditions on the extra virgin olive oil quality indexes*. *Grasas Aceites*, 58, 237-242.

244. Vigli G., Philippidis A., Spyros A., Dais P., 2003, *Classification of edible oils by employing 31P and 1H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 5715–5722.
245. Vlachos N., Skopelitis Y., Psaroudaki M., Konstantinidou V., Chatzilazarou A., Tegou E., 2006, *Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils*. Analytica Chimica Acta, 28, 573-574.
246. von Rosenberg C.W., Abbate A., Drake J., Mayes D.M., 2000, *A nagged near-infrared spectrometer for the real-time measurement of grains during harvest*. Spectroscopy 15, 34-39.
247. Vo-Dinh T., 1978, *Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry*. Analytical Chemistry, 50, 396-401.
248. Wang L., Lee F., Wang X., He Y., 2006, *Feasibility study of quantifying and discriminating soybean oil adulteration in camellia oils by attenuated total reflectance MIR and fiber optic diffuse reflectance NIR*. Food Chemistry, 95, 529-536.
249. Warner K., 2005, *Effects on the flavor and oxidative stability of stripped soybean and sunflower oils with added pure tocopherols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 9906–9910.
250. Ward K., Scarth R., Daun J.K., Thorsteinson C.T., 1994, *Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrophotometry to measure chlorophyll in canola seed and oil*. Journal of the American Oil Chemists Society, 71, 931-934.
251. Wolf I.A., Miwa T.K., 1965, *Effect of unusual acids on selected seed oil analysis*. Journal of the American Oil Chemists Society, 42, 208-215.
252. Wroniak M., Kwiatkowska M., Krygier K., 2006a, *Charakterystyka wybranych olejów tłoczonych na zimno*. ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2, 46–58.
253. Wroniak M., Łukasik D., Maszewska M., 2006b, *Porównanie stabilności oksydacyjnej wybranych olejów tłoczonych na zimno z olejami rafinowanymi*. ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 1, 214-221.
254. Wroniak M., Maszewska M., 2011, *Oliwa z oliwek w diecie śródziemnomorskiej*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 5, 26-36.
255. Wójcicki K., Sikorska E., 2010, *Charakterystyka fluorescencji olejów roślinnych tłoczonych na zimno*, XIV Ogólnopolskie Sympozjum Spektroskopowe „Zastosowanie metod spektroskopowych w badaniu materiałów i związków chemicznych” - Poznań : Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu (UAM), 78.
256. Wójcicki K., 2012, *Niektóre aspekty światowego rynku olejów roślinnych na przełomie XX / XXI wieku*, Młodzi Naukowcy dla polskiej nauki Część VI, 145-152.
257. Wójcicki K., 2013, *Ocena jakości olejów roślinnych z wykorzystaniem metod spektroskopii w podczerwieni*, Zeszyty Naukowe 234, 76-88.
258. www.fas.usda.gov/oilseeds_arc.asp
259. Yang H., Irudayaraj J., 2001, *Comparison of near-infrared, Fourier transform-infrared, and Fourier transform-Raman methods for determining olive pomace oil adulteration in extra virgin olive oil*. Journal of the American Oil Chemists Society, 78, 889-895.
260. Yang H., Irudayaraj J., Paradkar M., 2005, *Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy*. Food Chemistry, 93, 25-32.
261. Yildiz G., Wehling R.L., Cuppet S.L., 2001, *Method for determining oxidation of vegetable oils by near-infrared spectroscopy*. Journal of the American Oil Chemists Society, 78, 495-502.
262. Yildiz G., Wehling R.L., Cuppet S.L., 2002, *Monitoring PV in corn and soybean oils by NIR spectroscopy*. Journal of the American Oil Chemists Society, 79, 1085-1089.
263. Zandomenighi M., Carbonaro L., Caffarata C., 2005, *Fluorescence of vegetable oils: Olive oils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 759-766.

264. Zhang Q., Liu C., Sun Z., Hu X., Shen Q., Wu J., 2012, *Authentication of edible vegetable oils adulterated with used frying oil by Fourier transform infrared spectroscopy*. Food Chemistry, 132, 1607-1613.
265. Zieliński W., *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*. WNT, Warszawa 1996.
266. www.faostat.fao.org (dostęp 10.04.2012, godz. 10:00)
267. www.oxysene.com (dostęp 24.09.2013, godz. 22:32).
268. <http://www.provan.ca/data/public/PhysicalPropertiesAnalysis-63431-1.pdf> (dostęp 10.07.2013, godz. 13:26).

Spis rysunków:

Rysunek 1. Kierunki odbicia wiązki w spektroskopii w podczerwieni, A- odbicie zewnętrzne, B – odbicie rozproszone, C- odbicie wewnętrzne	15
Rysunek 2. Schematy układów geometrycznych stosowanych w pomiarach fluorescencji.....	18
Rysunek 3. Mapa konturowa całkowitej fluorescencji oraz widma synchroniczne fluorescencji oliwy z oliwek extra virgin.....	20
Rysunek 4. Schemat analizy klasyfikacyjnej na podstawie analizy widm spektroskopowych.....	23
Rysunek 5. Schemat analizy regresji na podstawie widm.....	25
Rysunek 6. Konsumpcja olejów roślinnych (kokosowego, bawełnianego, oliwy z oliwek, palmowego, arachidowego, rzepakowego, sojowego i słonecznikowego) w latach 2000-2012.....	62
Rysunek 7. Procentowy udział w globalnym spożyciu olejów (kokosowego, bawełnianego, oliwy z oliwek, palmowego, arachidowego, rzepakowego, sojowego i słonecznikowego) w 2011 roku.....	63
Rysunek 8. Konsumpcja „wielkiej czwórki” w latach 2006-2011.....	63
Rysunek 9. Produkcja olejów roślinnych ((kokosowego, bawełnianego, oliwy z oliwek, palmowego, arachidowego, rzepakowego, sojowego i słonecznikowego) w latach 2008-2012...	64
Rysunek 10. Procentowy udział w globalnej produkcji oleju palmowego w latach 2008-2012....	64
Rysunek 10. Procentowy udział w globalnej produkcji oleju sojowego w latach 2008-2012.....	65
Rysunek 12. Procentowy udział w globalnej produkcji oleju rzepakowego w latach 2010-2012...	65
Rysunek 13. Procentowy udział w globalnej produkcji oleju słonecznikowego w latach 2010-2012.....	66
Rysunek 14. Zmiany w konsumpcji oliwy z oliwek w latach 2000-2012.....	67
Rysunek 15. Oznaczanie zawartości tlenu. (A) Zasada pomiaru stężenia tlenu systemem OxySence. (B) umiejscowienie wskaźników.....	76
Rysunek 16. Widmo absorpcji w zakresie MIR oliwy extra virgin (EVO1).....	80
Rysunek 17. Widma absorpcji w zakresie MIR olejów: rzepakowego (R1), rzepakowego rafinowanego (RR1), słonecznikowego tłoczonego na zimno (S1), słonecznikowego rafinowanego (SR1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wytlóków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1). Rysunek A – widma dla całego zakresu spektralnego, rysunek B – widma dla zakresu 1600-550 cm ⁻¹ , rysunek C– widma dla zakresu 3100-2700 cm ⁻¹ . Oleje	

nierozcieńczone.....	82
Rysunek 18. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm MIR w zakresie 4000-400 cm^{-1} . Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla pierwszej głównej składowej PC1. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2, rzepakowy tłoczony na zimno R1 i R2, rzepakowy rafinowany RR1 i RR2, słonecznikowy tłoczony na zimno S1, słonecznikowy rafinowany SR1...	84
Rysunek 19. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm MIR w zakresie 4000-400 cm^{-1} . Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla pierwszej głównej składowej PC1. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2.....	85
Rysunek 20. Widmo absorpcji w zakresie NIR oliwy extra virgin (EVO1).....	86
Rysunek 21. Widma absorpcji w zakresie NIR olejów: rzepakowego (R1), rzepakowego rafinowanego (RR1), słonecznikowego tłoczonego na zimno (S1), słonecznikowego rafinowanego (SR1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wyłoków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1). (A) – widma dla całego zakresu spektralnego, (B) – widma dla zakresu 9000-6500 cm^{-1} , (C) – widma dla zakresu 6000-5600 cm^{-1} , (D) - widma dla zakresu 5300-4500 cm^{-1}	88
Rysunek 22. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR). Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla dwóch pierwszych głównych składowych PC1 i PC2. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2, rzepakowy tłoczony na zimno R1 i R2, rzepakowy rafinowany RR1 i RR2, słonecznikowy tłoczony na zimno S1, słonecznikowy rafinowany SR1.....	90
Rysunek 23. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie NIR. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla pierwszej głównej składowej PC1; (A) wyniki analizy PCA dla zakresu 12500-4000 cm^{-1} , (B) wyniki analizy PCA dla zakresu 7436-4466 cm^{-1} . Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2.....	91
Rysunek 24. Widma absorpcji w zakresie widzialnym (Vis) oleju rzepakowego tłoczonego na zimno (R1), rzepakowego rafinowanego (RR1), słonecznikowego tłoczonego na zimno (S1), słonecznikowego rafinowanego (SR1), oliwy extra virgin (EVO1), oliwy z wyłoków (OW1) i oliwy rafinowanej (RO1). Oleje nierozcieńczone.....	92
Rysunek 25. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie 350-750 nm. (A) – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; (B) - wykres ładunków czynnikowych dla pierwszej głównej składowej PC1. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2, rzepakowy tłoczony na zimno R1 i R2, rzepakowy rafinowany RR1 i RR2,	

słonecznikowy tłoczony na zimno S1, słonecznikowy rafinowany SR1.....	93
Rysunek 26. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie 350-750 nm. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla pierwszej głównej składowej PC1. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2.....	94
Rysunek 27. Mapy konturowe całkowitej fluorescencji nierozcieńczonych olejów roślinnych w geometrii odbiciowej. (A) oliwa EVO1, (B) olej słonecznikowy S1, (C) olej rzepakowy R1.....	95
Rysunek 28. Widma synchroniczne fluorescencji nierozcieńczonej oliwy extra virgin (EVO1) zmierzone dla $\Delta\lambda = 10, 30, 60$ nm, geometria odbiciowa.....	96
Rysunek 29. Widma synchroniczne ($\Delta\lambda= 10$ nm) olejów: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2, rzepakowy tłoczony na zimno R1 i R2, rzepakowy rafinowany RR1 i RR2, słonecznikowy tłoczony na zimno S1, słonecznikowy rafinowany SR1. (A)– widma dla całego zakresu spektralnego, (B) – widma dla zakresu 300-500 nm. Oleje nierozcieńczone.....	97
Rysunek 30. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm synchronicznych fluorescencji dla: (A) $\Delta\lambda=10$ nm, (B) $\Delta\lambda=30$ nm, (C) $\Delta\lambda=60$ nm. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel- wykres ładunków czynnikowych dla dwóch głównych składowych PC1 i PC2. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2, rzepakowy tłoczony na zimno R1 i R2, rzepakowy rafinowany RR1 i RR2, słonecznikowy tłoczony na zimno S1, słonecznikowy rafinowany SR1.....	99
Rysunek 31. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm synchronicznych fluorescencji dla: (A) $\Delta\lambda=10$ nm, (B) $\Delta\lambda=30$ nm, (C) $\Delta\lambda=60$ nm. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2; Prawy panel wykres ładunków czynnikowych dla dwóch głównych składowych PC1 i PC2. Oleje: oliwa extra virgin EVO1 i EVO2, oliwa z wyłoków OW1 i OW2, oliwa rafinowana RO1 i RO2.....	101
Rysunek 32. Porównanie widm oliwy z oliwek extra virgin (EVO1), oleju słonecznikowego (S3) i mieszanin oliwy extra virgin z olejem słonecznikowym (dodatek oleju fałszującego na poziomie 10,20,30,40 i 50%) w zakresie podstawowej podczerwieni (MIR).....	105
Rysunek 33. Porównanie widm oliwy z oliwek extra virgin (EVO1), oleju słonecznikowego (S3) i mieszanin oliwy extra virgin z olejem słonecznikowym (dodatek oleju fałszującego na poziomie 10,20,30,40 i 50%) w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR).....	106
Rysunek 34. Widma synchroniczne fluorescencji oliwy z oliwek extra virgin (EVO1) i mieszanin oliwy extra virgin z olejem słonecznikowym (dodatek oleju fałszującego na poziomie 10,20,30,40 i 50%). (A) widma synchroniczne dla $\Delta\lambda= 10$ nm, (B) widma synchroniczne dla $\Delta\lambda= 30$ nm, (C) widma synchroniczne dla $\Delta\lambda= 60$ nm. Oleje nierozcieńczone, geometria odbiciowa.....	107

Rysunek 35. (A) Widma absorpcji w zakresie MIR oliw z oliwek: extra virgin (EVO), deodoryzowanej (DO) i rafinowanej (RO). (B) Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie MIR. Oleje: EVO- oliwa extra virgin, RO- oliwa rafinowana, DO- oliwa deodoryzowana.....	113
Rysunek 36. (A) Widma absorpcji w zakresie NIR oliw z oliwek: extra virgin (EVO), deodoryzowanej (DO) i rafinowanej (RO). (B) Wyniki analizy głównych składowych (PCA) widm w zakresie NIR. Oleje: EVO- oliwa extra virgin, RO- oliwa rafinowana, DO- oliwa deodoryzowana.....	113
Rysunek 37. Widma absorpcji w zakresie widzialnym (Vis) oliwy extra virgin (EVO), deodoryzowanej (DO) i rafinowanej (RO).....	114
Rysunek 38 Mapy konturowe widm całkowitej fluorescencji dla $\Delta\lambda=10-100$ nm (górny panel) i widm synchronicznych całkowitej fluorescencji (dolny panel) oliwy extra virgin, deodoryzowanej i rafinowanej, geometria odbicia, oleje nierozcieńczone.....	116
Rysunek 39. Widma synchroniczne fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) oliwy extra virgin (EVO), oliwy deodoryzowanej (DO) i oliwy rafinowanej (RO), oleje nierozcieńczone, geometria odbiciowa, skala logarytmiczna.....	116
Rysunek 40. Wyniki analizy regresji metodą PLS widm w zakresie Vis, NIR i MIR oraz widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm), zależność rzeczywistego składu mieszanin olejów i wyznaczonego na podstawie modelu regresji.....	122
Rysunek 41. Zmiany liczby nadtlenkowej dla oliw: extra virgin (EVO1 i EVO2), z wytlóków (OW1 i OW2) i rafinowanych (RO1 i RO2), olejów rzepakowych: tłoczonych na zimno (R1 i R2) i rafinowanych (RR1 i RR2) oraz oleju słonecznikowego: tłoczonego na zimno (S1) i rafinowanego (SR1) w teście termostatowym (60°C).....	126
Rysunek 42. Zmiany liczby kwasowej (LK) dla oliw: extra virgin (EVO 1, 2 i 3), z wytlóków (OW1) i rafinowanych (RO1 i RO2), olejów rzepakowych: tłoczonych na zimno (R1 i R2) i rafinowanych (RR1 i RR2) oraz oleju słonecznikowego: tłoczonego na zimno (S1) i rafinowanego (SR1) w teście termostatowym (60°C).....	127
Rysunek 43. Widma absorpcji w zakresie MIR olejów świeżych i poddanych testowi termostatowemu (60°C) przez okres 3, 6, 9, 12 i 15 dni. (A) oliwa z oliwek EVO1, (B) olej rzepakowy R1, (C) olej słonecznikowy S1.....	128
Rysunek 44. Widma absorpcji w zakresie NIR olejów świeżych i poddanych testowi termostatowemu (60°C) przez okres 3, 6, 9, 12 i 15 dni. (A) oliwa z oliwek EVO1, (B) olej rzepakowy R1, (C) olej słonecznikowy S1.....	130
Rysunek 45. Wyniki analizy MCR. (A) zakres podstawowej podczerwieni, (B) zakres bliskiej podczerwieni, (C) względne stężenia poszczególnych składników.....	132
Rysunek 46. Zależność między względnymi stężeniami składników 1, 2 i 3 a liczbami	

nadtlenkowymi dla olejów słonecznikowych (n=12), rzepakowych (n=30) i oliw (n=36); (A) składnik 1, (B) składnik 2, (C) składnik 3.....	134
Rysunek 47. Zależność między względnymi stężeniami składników 1, 2 i 3 a liczbami kwasowymi dla olejów słonecznikowych (n=12), rzepakowych (n=30) i oliw (n=36); (A) składnik 1, (B) składnik 2, (C) składnik 3.....	135
Rysunek 48. Widma absorpcji w zakresie Vis: (A) oliwy z oliwek extra virgin EVO1, (B) oliwy z wytlóków OW1, (C) oliwy rafinowanej RO1, (D) oleju rzepakowego tłoczonego na zimno R1, (E) oleju rzepakowego rafinowanego RR1, (F) oleju słonecznikowego tłoczonego na zimno S1, (G) oleju słonecznikowego rafinowanego SR1. Oleje świeże i ogrzewane przez okres 3, 6, 9, 12 i 15 dni w temperaturze 60°C. Oleje nierozcieńczone.....	139
Rysunek 49. Widma synchroniczne fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) olejów świeżych i poddanych testowi termostatowemu (60°C) przez okres 3, 6, 9, 12 i 15 dni. (A) Oliwa z oliwek extra virgin EVO1, (B) oliwa z wytlóków OW1, (C) oliwa rafinowana RO1, (D) olej rzepakowy tłoczony na zimno R1, (E) olej rzepakowy rafinowany RR1, (F) olej słonecznikowy tłoczony na zimno S1, (G) olej słonecznikowy rafinowany SR1. Skala logarytmiczna fluorescencji.....	141
Rysunek 50. Widma transmisji butelek ze szkła bezbarwnego i zielonego.....	148
Rysunek 51. Zmiany liczby nadtlenkowej w oleju rzepakowym przechowywanym przez 6 miesięcy w różnych warunkach; olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowany na światło, oraz olej rzepakowy (RD) w butelce przechowywanej w ciemności....	149
Rysunek. 52. Zmiany liczby kwasowej w oleju rzepakowym przechowywanym przez 6 miesięcy w różnych warunkach; olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowany na światło, oraz olej rzepakowy (RD) w butelce przechowywanej w ciemności....	150
Rysunek 53. Zmiany wartości parametru K_{232} (lewy panel) i K_{270} (prawy panel) dla oleju rzepakowego przechowywanego w czasie i w różnych warunkach; olej w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowany na światło, oraz olej (RD) w butelce przechowywany w ciemności.....	150
Rysunek 54. Zmiany zawartości tlenu w fazie nadpowierzchniowej oleju (A) oraz zmiany zawartości tlenu w oleju (B). Olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowany na światło, oraz olej rzepakowy (RD) w butelce przechowywany w ciemności....	152
Rysunek 55. Zmiany zawartości barwników karotenoidowych w próbkach oleju rzepakowego Olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowany na światło, oraz olej rzepakowy (RD) w butelce przechowywany w ciemności.....	153
Rysunek 56. Zmiany zawartości tokoferoli w próbkach oleju rzepakowego. Olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowany na światło, oraz olej rzepakowy (RD) w butelce przechowywany w ciemności.....	153
Rysunek 57. Wyniki analizy głównych składowych (PCA) parametrów analitycznych. (A) – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne	

składowe PC1 i PC2; (B) – wykres ładunków czynnikowych dla dwóch pierwszych głównych składowych PC1 i PC2.....	155
Rysunek 58. Widma absorpcji w zakresie NIR oleju rzepakowego tłoczonego na zimno, świeżego i po 6 miesiącach przechowywania w różnych warunkach: (R0) olej rzepakowy świeży, (RL6) olej rzepakowy w butelce ze szkła bezbarwnego, eksponowany na światło, (RG6) olej rzepakowy w butelce ze szkła zielonego, eksponowany na światło (RD6) olej rzepakowy w butelce ze szkła bezbarwnego, w ciemności.....	156
Rysunek 59. Wyniki analizy PCA widm w zakresie bliskiej podczerwieni. Olej rzepakowy przechowywany przez 6 miesięcy w różnych warunkach; olej rzepakowy w bezbarwnej (RL) i zielonej (RG) butelce eksponowanej na światło, oraz olej rzepakowy (RD) w butelce przechowywanej w ciemności.....	157
Rysunek 60. Widmo absorpcji w zakresie Vis świeżego oleju rzepakowego tłoczonego na zimno.....	157
Rysunek 61. Zmiany w widmach absorpcji Vis oleju rzepakowego tłoczonego na zimno świeżego i po 6 miesiącach przechowywania w różnych warunkach: (R0) olej świeży, (RD6) olej rzepakowy w butelkach ze szkła bezbarwnego, przechowywany w ciemności, (RG6) olej rzepakowy w butelkach ze szkła zielonego, eksponowany na światło, (RL6) olej rzepakowy w butelkach ze szkła bezbarwnego, eksponowany na światło.....	158
Rysunek 62. Widma synchroniczne fluorescencji oleju rzepakowego tłoczonego na zimno zmierzone dla $\Delta\lambda = 10, 30$ i 60 nm.....	158
Rysunek 63. Zmiany w widmach synchronicznych fluorescencji oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w kolejnych miesiącach przechowywania. Lewy – widma dla całego zakresu spektralnego; Prawy panel – zakres 280-380 nm. (A) butelka bezbarwna eksponowana na światło, (B) butelka zielona eksponowana na światło, (C) butelka bezbarwna w ciemności. Próbkki nierozcieńczone dla $\Delta\lambda = 10$ nm.....	160
Rysunek 64. Zmiany w widmach synchronicznych fluorescencji oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w kolejnych miesiącach przechowywania. (A) butelka bezbarwna eksponowana na światło, (B) butelka zielona eksponowana na światło, (C) butelka bezbarwna w ciemności. Próbkki nierozcieńczone dla $\Delta\lambda = 30$ nm.....	161
Rysunek 65. Zmiany w widmach synchronicznych fluorescencji oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w kolejnych miesiącach przechowywania. (A) butelka bezbarwna eksponowana na światło, (B) butelka zielona eksponowana na światło, (C) butelka bezbarwna w ciemności. Próbkki nierozcieńczone dla $\Delta\lambda = 60$ nm.....	162
Rysunek 66. Zmiany intensywności chlorofili (A) , tokoferoli (B) , i pasma przy długości fali 324 nm (C) w próbkach oleju rzepakowego przechowywanego w różnych warunkach, dla $\Delta\lambda = 10$ nm. Zmiany wyrażone w procentach.....	163
Rysunek 67. Wyniki analizy głównych składowych widm synchronicznych fluorescencji zmierzonych przy $\Delta\lambda = 10$ (A) , 30 (B) i 60 nm (C) dla oleju rzepakowego przechowywanego w	

różnych warunkach. Lewy panel – wykres współrzędnych czynnikowych w układzie wyznaczonym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2. RD – olej rzepakowy przechowywany w ciemności, RG – olej rzepakowy przechowywany w zielonej butelce eksponowanej na światło, RL – olej rzepakowy przechowywany w bezbarwnej butelce eksponowanej na światło. Prawy panel – wykres ładunków czynnikowych dla PC1i PC2..... 166

Spis tabel:

Tabela 1. Charakterystyka pasm w widmach w zakresie bliskiej podczerwieni dla związków organicznych.....	17
Tabela 2. Przykłady zastosowań technik spektroskopowych w analizie olejów roślinnych...	29
Tabela 3. Analiza korzyści i zagrożeń zastosowania technik spektroskopowych w kontroli jakości.....	59
Tabela 4. Charakterystyka pasm w widmach olejów roślinnych w zakresie podstawowej podczerwieni.....	81
Tabela 5. Charakterystyka pasm w widmach olejów roślinnych w zakresie bliskiej podczerwieni.....	86
Tabela 6. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm w zakresie MIR i składu mieszanin oliwy z oliwek z olejem słonecznikowym.....	109
Tabela 7. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm w zakresie NIR i składu mieszanin oliwy z oliwek z olejem słonecznikowym.....	110
Tabela 8. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=10, 30$ i 60 nm) i składu mieszanin oliwy z oliwek z olejem słonecznikowym.....	111
Tabela 9. Średnie wartości parametrów chemicznych zestawów oliw: EVO, DO i RO.....	112
Tabela 10. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm w zakresie MIR i składu mieszanin oliwy extra virgin z oliwą rafinowaną i deodoryzowaną.....	117
Tabela 11. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm absorpcji w zakresie NIR i składu mieszanin oliwy z oliwek extra virgin z oliwą rafinowaną i deodoryzowaną.....	118
Tabela 12. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm w zakresie Vis i składu mieszanin oliwy extra virgin z oliwą rafinowaną i deodoryzowaną.....	119
Tabela 13. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) i składu mieszanin oliwy extra virgin z oliwą rafinowaną i deodoryzowaną.....	120
Tabela 14. Wyniki analizy regresji metodą PLS i PCR widm dla połączonych zakresów i składu mieszanin oliwy extra virgin z oliwą rafinowaną i deodoryzowaną.....	121
Tabela 15. Wyniki przewidywania składu mieszanin olejów na podstawie modeli kalibracyjnych PLS i PCR dla widm w zakresie Vis, NIR i MIR oraz widm synchronicznych fluorescencji ($\Delta\lambda=10$ nm) i rzeczywistego składu mieszanin oliw.....	123
Tabela 16. Wyniki analizy regresji PLS widm w zakresie NIR i MIR olejów ogrzewanych i liczby nadtlenkowej.....	136
	202

Tabela 17. Wyniki analizy regresji PLS widm w zakresie NIR i MIR olejów ogrzewanych i liczby kwasowej.....	137
Tabela 18. Wyniki analizy regresji PLS dla widm elektronowych (Vis i fluorescencja) olejów ogrzewanych i liczby nadtlenkowej.....	142
Tabela 19. Wyniki analizy regresji PLS dla widm elektronowych (Vis i fluorescencja) olejów ogrzewanych i liczby kwasowej.....	143
Tabela 20. Skład kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym (R3).....	147
Tabela 21. Zmiany właściwości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w czasie przechowywania w różnych warunkach.....	148
Tabela 22. Współczynniki korelacji Pearsona dla parametrów analitycznych dla wszystkich przechowywanych olejów rzepakowych (RD, RG, RL).....	154
Tabela 23. Wyniki analizy regresji PLS widm w zakresie NIR oleju rzepakowego i liczby nadtlenkowej, kwasowej, parametrów K_{270} i K_{232} oraz zawartości tlenu.....	167
Tabela 24. Wyniki analizy regresji PLS widm w zakresie Vis oleju rzepakowego i liczby nadtlenkowej, kwasowej, parametrów K_{270} i K_{232} oraz zawartości tlenu.....	168
Tabela 25. Wyniki analizy regresji metodą PLS widm synchronicznych fluorescencji oraz wartości wyznaczonych parametrów chemicznych uzyskanych dla oleju rzepakowego.....	169

Streszczenie

Celem rozprawy doktorskiej była ocena różnych aspektów jakości olejów roślinnych z zastosowaniem wybranych technik spektroskopowych.

Do badań wybrano oleje roślinne tłoczone na zimno oraz rafinowane (rzepakowy, oliwę z oliwek i słonecznikowy). Do pomiarów widm zastosowano techniki spektroskopii absorpcyjnej w zakresie bliskiej (NIR) i podstawowej (IR) podczerwieni, widzialnym (Vis) oraz spektroskopię fluorescencyjną. Badania dotyczyły zafalszowań oliwy z oliwek *extra virgin* oliwami gorszej jakości i olejem słonecznikowym, oceny stabilności oksydacyjnej olejów rzepakowego, słonecznikowego i oliwy oraz kontroli jakości oleju rzepakowego tłoczonego na zimno w czasie przechowywania.

Widma wszystkich świeżych olejów wykazywały pewne wspólne cechy, jednakże w widmach olejów poszczególnych gatunków lub, dla danego gatunku, otrzymanych z zastosowaniem różnych technologii (tłoczenie na zimno, rafinacja) występowały charakterystyczne różnice wynikające z różnego składu chemicznego.

Techniki spektroskopowe wykorzystano w badaniu zafalszowań oliwy z oliwek *extra virgin*. Analizę widm mieszanin oliwy *extra virgin* z dodatkiem oleju słonecznikowego oraz oliwy *extra virgin* z dodatkiem oliwy rafinowanej lub deodoryzowanej przeprowadzono z zastosowaniem metod regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS) i regresji głównych składowych (PCR). Wykazano, że na podstawie analizy widm uzyskanych z zastosowaniem każdej z wybranych technik spektroskopowych (Vis, NIR, MIR, fluorescencja) możliwe jest ilościowe określenie dodatku fałszującego do oryginalnej oliwy.

Techniki spektroskopowe (Vis, NIR, MIR, fluorescencja) wykorzystano w badaniach procesu utleniania olejów. Dla wybranych olejów rzepakowych, słonecznikowych oraz oliwy, poddanych utlenianiu w teście termostatowym, w temperaturze 60°, oznaczono wartości liczb nadtlenkowych i kwasowych. Spośród badanych olejów największą stabilnością charakteryzowały się oliwy z oliwek, mniejszą oleje rzepakowe, najmniej stabilne były oleje słonecznikowe. W widmach, we wszystkich badanych zakresach spektralnych obserwowano charakterystyczne zmiany będące efektem przemian chemicznych w czasie utleniania. Na podstawie analizy regresji PLS dla wszystkich badanych olejów najlepszy model kalibracyjny dla przewidywania liczby nadtlenkowej i kwasowej uzyskano dla zakresu NIR.

Techniki spektroskopowe (Vis, NIR i fluorescencja) zastosowano do kontroli jakości oleju rzepakowego w czasie przechowywania. Próbkę świeżo wytłoczonego oleju rzepakowego przechowywano przez okres sześciu miesięcy, w butelkach szklanych bezbarwnych i o barwie zielonej, w warunkach ekspozycji na światło oraz w ciemności. Na podstawie analizy parametrów analitycznych wykazano, że istotny wpływ na zaawansowanie procesów utleniania ma ekspozycja olejów na światło, natomiast funkcja ochronna butelki o barwie zielonej jest ograniczona. W widmach w zakresie Vis i fluorescencji zaobserwowano zmiany wynikające z zachodzących procesów oksydacyjnych natomiast zmian nie obserwowano w widmach w zakresie NIR.

Techniki spektroskopowe połączone z chemometryczną analizą uzyskanych widm mogą być stosowane jako alternatywne lub komplementarne w stosunku do tradycyjnych technik wykorzystywanych w ocenie jakości olejów.