

# ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII OSCYLACYJNEJ W ANALIZIE FITOZWIĄZKÓW I SUBSTANCJI ODŻYWCZYCH W PRODUKTACH NATURALNYCH I SPOŻYWCZYCH

## APPLYING VIBRATIONAL SPECTROSCOPY IN AN ANALYSIS OF PHYTOCHEMICALS AND NUTRIENTS IN NATURAL AND FOOD PRODUCTS

**Sylwester Mazurek\*, Roman Szostak\***

*Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego,  
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*

*\*e-mail: sylwester.mazurek@uwr.edu.pl, roman.szostak@uwr.edu.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Analiza fitozwiązków

2. Spektroskopia oscylacyjna

2.1. Techniki pomiarowe w zakresie podczerwieni

2.2. Spektroskopia Ramana

3. Techniki chemometryczne – eksploracyjna analiza danych

4. Przykłady zastosowań technik spektroskopowych

4.1. Klasyfikacja materiału roślinnego

4.2. Analiza ilościowa substancji aktywnych i składników odżywczych

4.2.1. Schemat analizy

4.2.2. Przykłady oznaczeń ilościowych

4.2.3. Analizy produktów spożywczych

4.3. Techniki obrazowania

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr hab. Sylwester Mazurek**, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w roku 1999. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 2004, w tym samym roku podjął pracę na Wydziale Chemii UWr w zespole badawczym prof. dr hab. J.P. Hawranka. W latach 2005-2007 odbył staż naukowy w National Institute of Chemistry w Ljubljanie, Słowenia, w grupie prof. Jure Zupana, a w latach 2010-2013 kierował laboratorium mikrospektroskopii IR w Department of Plant Molecular Biology, University of Lausanne, Szwajcaria. W roku 2018 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na zastosowaniu technik spektroskopii oscylacyjnej w diagnostyce medycznej, badaniach substancji aktywnych w materiale roślinnym, analizie produktów spożywczych i leczniczych.



<https://orcid.org/0000-0002-8096-5229>

**Prof. dr hab. Roman Szostak**, absolwent Uniwersytetu Wrocławskiego. Pracę doktorską przygotował pod opieką prof. dr hab. J.P. Hawranka. W roku 2013 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych, a w roku 2021 tytuł profesora. Jego aktywność naukowa obejmuje badania oddziaływań międzycząsteczkowych i struktury cząsteczek z wykorzystaniem spektroskopii oscylacyjnej i technik obliczeniowych, poszukiwanie zależności między strukturą a reaktywnością amidów i karbenów, analizę ilościową substancji aktywnych w lekach i ziołach oraz składników odżywczych w żywności na bazie widm Ramana i IR, a także diagnostykę chorób z użyciem spektroskopii oscylacyjnej.



<https://orcid.org/0000-0002-5436-7284>

---

**ABSTRACT**

The prevalence of lifestyle diseases and trends related to healthy eating contribute to the constant search for chemical compounds with specific biological activity. Studies are conducted on plants and substances of natural origin that have been used in medicine for millennia. Techniques of vibrational spectroscopy are an underrated group of methods enabling direct analysis of plant raw material and food in their native forms. The presented examples of Arabidopsis tissues, various species and hybrids of poplar and Cistus herb classification, as well as quantitative analyses of active compounds in plant material and pharmaceutical products and determination of physicochemical parameters of common food (i.e. milk, yoghurts, pasta and flour), demonstrate the possibility of using vibrational spectroscopy for comprehensive analysis of samples of natural origin. Typical measurement techniques and chemometric methods are briefly described in this paper. The scheme of quantitative analysis based on vibrational spectra is shown and the impact of selected experimental parameters on the accuracy of the obtained results is discussed. The imaging techniques used to analyse the changes in plant tissue structures caused by genetic mutations were also presented.

**Keywords:** vibrational spectroscopy, chemometrics, qualitative analysis, quantitative analysis, classification

**Słowa kluczowe:** spektroskopia oscylacyjna, chemometria, analiza jakościowa, analiza ilościowa, klasyfikacja

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ANN	– sztuczne sieci neuronowe
AOAC	– Association of Official Analytical Chemists
API	– aktywny składnik farmaceutyczny
ATR	– spektroskopia całkowitego osłabionego odbicia
CA	– analiza skupień
CLS	– metoda klasycznych najmniejszych kwadratów
CV	– walidacja krzyżowa
DA	– analiza dyskryminacyjna
DRIFTS	– technika odbicia rozproszonego w podczerwieni
FT	– transformata Fouriera
ILS	– metoda odwrotnych najmniejszych kwadratów
ISO	– International Organization for Standardization
IR	– spektroskopia w podczerwieni
LC/MS	– chromatografia cieczowa/spektrometria mas
LOO	– walidacja z pominięciem jednej próbki
LNO	– walidacja z pominięciem $n$ próbek
MIR	– średnia podczerwień
MSC	– multiplikatywna korekta rozproszenia
NIR	– bliska podczerwień
PAT	– technologia analizy procesu
PC	– główna składowa
PCA	– analiza głównych składowych
PCR	– regresja głównych składowych
PLS	– regresja cząstkowych najmniejszych kwadratów
R	– współczynnik korelacji liniowej
$R_{CV}$	– współczynnik korelacji liniowej walidacji krzyżowej
RMSE	– średni błąd kwadratowy
RSEP	– względny standardowy błąd przewidywania
$RSEP_{KAL}$	– RSEP oznaczeń próbek kalibracyjnych
$RSEP_{WAL}$	– RSEP oznaczeń próbek walidacyjnych
SAL	– całkowita zawartość salicylanów
S/N	– stosunek sygnału do szumu
SNV	– normalizacja przy użyciu odchylenia standardowego
SOM	– mapy samoorganizujące się
TEM	– transmisyjna mikroskopia elektronowa
TFL	– całkowita zawartość flawonoidów
TPC	– całkowita zawartość polifenoli
WT	– roślina typu dzikiego

## WPROWADZENIE

Powszechność chorób cywilizacyjnych oraz trendy związane ze zdrowym odżywianiem przyczyniają się do ciągłego poszukiwania związków chemicznych o określonej aktywności biologicznej. Kontynuowane są studia nad roślinami i substancjami pochodzenia naturalnego, często stosowanymi w leczeniu od tysięcy lat. Niedocenianą grupą metod umożliwiającą bezpośrednią analizę surowców roślinnych i żywności w natywnej postaci są techniki spektroskopii oscylacyjnej. Przedstawione przykłady klasyfikacji tkanek rzodkiewnika, różnych gatunków i hybryd topoli oraz ziela czystka, jak również analizy ilościowe substancji aktywnych w materiale roślinnym, diosminy w tabletkach oraz oznaczenia parametrów fizykochemicznych popularnych produktów spożywczych, mleka, jogurtów, makaronów i mąk, demonstrować możliwości zastosowania spektroskopii oscylacyjnej do kompleksowego badania próbek pochodzenia naturalnego. Opisano krótko typowe techniki pomiarowe i stosowane metody chemometryczne. Podano schemat postępowania w toku analizy ilościowej prowadzonej na bazie widm oscylacyjnych i omówiono wpływ wybranych parametrów pomiarowych na dokładność otrzymywanych wyników. Przedstawiono również zastosowanie technik obrazowania chemicznego w analizie zmian struktur tkankowych roślin wywołanych mutacjami genetycznymi.

### 1. ANALIZA FITOZWIĄZKÓW

Rośliny stanowią podstawowe źródło pokarmu człowieka. Są ważnym surowcem dla wielu gałęzi gospodarki, dostarczają substancji stosowanych w leczeniu i profilaktyce chorób. Fitozwiązki (ang. *phytochemicals*), roślinne związki aktywne, to szeroka grupa substancji chemicznych, stanowiących wtórne produkty przemiany materii. Są wykorzystywane przez rośliny do walki przeciwko grzybom, bakteriom, infekcjom wirusowym, chronią je przed insektami oraz zwierzętami roślinożernymi [1, 2]. Substancje te są również wykorzystywane przez rośliny do wabięcia owadów, a także jako substancje sygnałowe do kontaktu z symbiontami. Najważniejszymi grupami fitozwiązków są polifenole, flawonoidy, antocyjany, alkaloidy, terpeny, fitoestrogeny, karotenoidy, limonoidy, fitosterole oraz błonnik. Wiele z nich wykazuje działanie przeciwutleniające, zmniejszając ryzyko chorób cywilizacyjnych powiązanych z uszkodzeniami oksydacyjnymi [3]. Ze względu na korzystny wpływ na zdrowie i funkcjonowanie organizmu ludzkiego, od lat prowadzone są intensywne badania nad fitozwiązkami, ulepszane są procedury ich pozyskiwania i izolacji z materiału roślinnego, poszukuje się nowych źródeł tych związków [4].

Większość standardowych analiz związków biologicznie czynnych w materiale roślinnym oraz substancji odżywczych w produktach spożywczych pochodzenia naturalnego opiera się na analizie ekstraktów z wykorzystaniem metod spektrofotome-

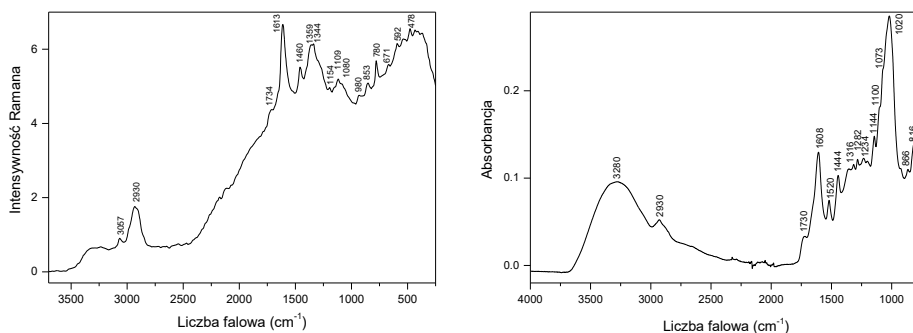
trycznych i chromatograficznych w połączeniu z różnorodnymi technikami detekcji [5, 6]. Metody te stanowią również podstawę oficjalnych protokołów analiz, m.in. farmakopei krajowych i międzynarodowych, standardów ISO, czy zaleceń organizacji skupiających chemików analityków (np. AOAC). Ze względu na złożony skład chemiczny próbek naturalnych oznaczenie ilościowe określonej substancji chemicznej, bądź wybranych grup związków, wymaga wielu operacji, co jest czasochłonne i kosztowne. Analizę poprzedza izolacja oznaczanego składnika z badanego materiału. Na tym etapie mogą pojawić się kłopoty związane z rozpuszczalnością próbki oraz wymyciem innych związków rozpuszczalnych w użytych rozpuszczalnikach, co może oznaczać konieczność rozdzielania otrzymanej mieszaniny. Proces ekstrakcji bądź trawienia enzymatycznego zrywa wiązania łączące substancję aktywną z matrycą komórkową, może także wpłynąć na strukturę ekstrahowanego związku. To powoduje, że właściwości jak i aktywność biologiczna związku wyizolowanego i obecnego w wyjściowym materiale badawczym mogą się różnić. Istotną kwestią jest rodzaj wiązań łączących fitozwiązków ze strukturami komórkowymi, determinujący potencjalny sposób uwolnienia badanej substancji z matrycy. O ile niektóre fitozwiązki, np. terpeny czy olejki eteryczne, są gromadzone w stanie wolnym wprost w tkankach wydzielniczych roślin to w przypadku flawonoidów większość z nich występuje w postaci glikozydów, głównie O-glikozydów [2]. Stosowane procedury izolacji zmieniają się w zależności od rodzaju badanej matrycy, np. gatunku roślin, rodzaju tkanki, obecności w niej innych substancji chemicznych. Część fitozwiązków obecnych w matrycy może być trudna do wyekstrahowania przy zastosowaniu typowych rozpuszczalników. W badaniach fitozwiązków kontrola wydajności ekstrakcji, wydaje się być często niedostateczna. Identyfikacja wyizolowanej substancji i określenie jej stężenia w ekstrakcie wymaga użycia wzorca, lub odpowiednich baz danych, co w przypadku modyfikacji strukturalnych, będących efektem np. trawienia enzymatycznego, może nie dawać satysfakcjonujących wyników analiz.

Wyodrębnienie kolejnych składników z tej samej próbki wiąże się zwykle z koniecznością powtórzenia procesu, z zastosowaniem innych rozpuszczalników. Wymusza również zmiany procedury identyfikacji i oznaczania ilościowego substancji. Stąd, przeprowadzenie kompleksowej analizy badanego materiału lub też wyznaczenie szeregu parametrów fizykochemicznych związanych ze składem chemicznym próbki, oznacza konieczność użycia różnych zestawów odczynników i urządzeń pomiarowych. Takie analizy wymagają dużych ilości materiału, są drogie i czasochłonne. Nie bez znaczenia jest kwestia użycia znacznych objętości rozpuszczalników oraz konieczność ich utylizacji. Niedocenianą alternatywą dla analiz z użyciem metod ekstrakcyjnych są techniki spektroskopowe, a zwłaszcza spektroskopia oscylacyjna.

## 2. SPEKTROSKOPIA OSCYLACYJNA

Spektroskopia oscylacyjna jest jednym z podstawowych narzędzi analitycznych wykorzystywanych do badania struktury związków chemicznych [7-9]. Widma w zakresie podczerwieni (IR) i Ramana dostarczają informacji o obecności grup funkcyjnych i fragmentów cząsteczek, pozwalając na identyfikację substancji i analizę jakościową badanego układu [10]. Dodatkowo, wprost proporcjonalna zależność pomiędzy ilością promieniowania zaabsorbowanego (spektroskopia IR) i rozproszonego (Raman) przez próbkę, której miarami są absorpcja i intensywność promieniowania rozproszonego, a stężeniem drgających oscylatorów znajduje zastosowanie w analizie ilościowej, pozwalając oznaczyć skład złożonych układów wieloskładnikowych.

Techniki spektroskopii oscylacyjnej umożliwiają rejestrację widm dla różnych rodzajów próbek, tj. gazów, ciał stałych, cieczy, zawiesin, emulsji i filmów. Przy pomocy dedykowanych akcesoriów i układów optycznych możliwe są nieinwazyjne pomiary widm w skali w makro i mikro, co pozwala dobrać dla badanego materiału odpowiednią technikę pomiarową. Widma oscylacyjne rejestruje się szybko, czas pomiaru nie przekracza zwykle kilku minut. W sprzyjających warunkach widma otrzymywane są w czasie rzeczywistym, dzięki czemu techniki te znajdują zastosowanie w monitoringu procesów wytwórczych i analitycznych. Widma oscylacyjne umożliwiają badania zarówno surowców, jak i gotowych produktów, dzięki swoim zaletom spektroskopia oscylacyjna znajduje zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, chemicznym, kosmetycznym i spożywczym [11, 12].



Rysunek 1. Widma Ramana (strona lewa) i ATR (strona prawa) suszonych kłączy pięciornika kurzego ziela  
Figure 1. Raman (left) and ATR spectra (right) of dried tormentil rhizomes

Próbki pochodzenia naturalnego charakteryzują się bogatym składem chemicznym, co przekłada się na złożoność ich widm oscylacyjnych. Widmom ramanowskim tego typu układów często towarzyszy wysokie tło fluorescencyjne, które w skrajnych przypadkach może uniemożliwić analizę. Na Rys. 1 przedstawiono widma Ramana i ATR wysuszonych kłączy pięciornika kurzego ziela, tradycyjnie stosowanego w objawowym leczeniu łagodnych biegunek oraz stanów zapalnych błony śluzowej jamy ustnej. Obecność celulozy, jako materiału budulcowego tkanek roślinnych, oraz hemicelulozy

i pektyn, stanowiących strukturalne substancje podporowe, przekłada się na występowanie pasm drgań fragmentów polisacharydów w widmach. W szczególności widma w zakresie podczerwieni charakteryzują się silną absorpcją w zakresie 900-1200  $\text{cm}^{-1}$ , z charakterystycznymi pasmami przy około 1020, 1073 i 1100  $\text{cm}^{-1}$ , związanymi z drganiami  $\nu(\text{C}-\text{O})$  i  $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$  szkieletów polisacharydowych. Obecność dużej liczby bogatych w grupy hydroksylowe jednostek cukrowych znajduje odbicie w widmach IR w postaci szerokiego pasma w zakresie 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$ , z maksimum przy około 3280  $\text{cm}^{-1}$ . Woda i pozostałe związki obecne w badanym materiale roślinnym, zawierające w swojej strukturze grupy OH, m.in. lipidy i białka, również dają wkład widmowy w tym zakresie. W widmie ramanowskim intensywność drgań rozciągających O-H grup hydroksylowych jest stosunkowo niewielka. Widoczne w widmie Ramana pasmo przy około 3060  $\text{cm}^{-1}$ , to pasmo drgań  $\nu(\text{CH})$  fragmentów aromatycznych związków polifenolowych. Pasma przy 2930  $\text{cm}^{-1}$  występujące w obu widmach pięciornika (Rys. 1) pochodzą od drgań  $\nu(\text{CH})$  grup alifatycznych polifenoli i węglowodanów. O obecności estrów kwasów tłuszczowych oraz pektyn świadczy pasmo  $\nu(\text{C}=\text{O})$  z maksimum przy około 1730  $\text{cm}^{-1}$ . W zakresie 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$  w widmach dominują udziały związków polifenolowych oraz białek. Intensywne pasmo z maksimum przy 1613  $\text{cm}^{-1}$  w widmie Ramana i maksimum przy 1608  $\text{cm}^{-1}$  w widmie IR pochodzi od drgań pierścienia aromatycznego  $\nu(\text{C}=\text{C})$  związków polifenolowych, a zauważalne poszerzenie pasma, przy około 1650  $\text{cm}^{-1}$ , wynika z wkładu drgań amidowych białek. Obecność związków polifenolowych może być potwierdzona występowaniem w widmie Ramana pięciornika pasma z maksimum przy 1359  $\text{cm}^{-1}$ , przypisywanego drganiom zginającym fenolowych grup OH, oraz w obszarze deformacyjnych drgań szkieletowych C-C-O i C-C-C, z charakterystycznym pasmem przy 780  $\text{cm}^{-1}$ . W zakresie 1300-1460  $\text{cm}^{-1}$ , w obu widmach, można zauważyć liczne udziały wynikające z nakładania się pasm drgań  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  lipidów i białek oraz związków aromatycznych. Spośród substancji obecnych w kłączach, ważnym składnikiem zapasowym jest skrobia. W widmach oscylacyjnych jej najbardziej charakterystyczne pasmo, pochodzące od drgań deformacyjnych pierścieni cukrowych, jest widoczne przy 478  $\text{cm}^{-1}$ .

W zależności od rodzaju tkanki i typu badanego materiału roślinnego, można oczekiwać dodatkowych pasm wynikających z obecności specyficznych grup związków chemicznych, np. chlorofili i karotenoidów w liściach, czy antocyjanów w owocach.

## 2.1. TECHNIKI POMIAROWE W ZAKRESIE PODCZERWIENI

Spektroskopia w podczerwieni IR jest jedną z najważniejszych metod eksperymentalnych wykorzystywanych do identyfikacji i określania składu próbek w różnych stanach skupienia. Zmieniając geometrię układu pomiarowego, np. poprzez użycie przystawek umieszczanych na drodze wiązki promieniowania można uzyskać



szereg trybów pomiarowych. Coraz powszechniej stosowane są techniki osłabionego całkowitego odbicia wewnętrznego i odbicia rozproszonego, które wypierają popularne niegdyś pomiary transmisyjne.

### 2.1.1. Technika transmisyjna

W spektroskopii transmisyjnej wiązka promieniowania przechodzi przez próbkę. Detektor rejestruje intensywności wiązki padającej na próbkę ( $I_0$ ) i intensywność wiązki promieniowania opuszczającej próbkę ( $I$ ). Widma zapisuje się w skali transmitancji

$$T = I / I_0, \quad (1)$$

lub absorbancji:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I}. \quad (2)$$

Absorbancja zależy liniowo od stężenia substancji absorbujących:

$$A = \varepsilon l c, \quad (3)$$

$\varepsilon$  to molowy współczynnik absorpcji,  $l$  - grubość warstwy próbki,  $c$  - stężenie substancji absorbującej. Równanie (3) umożliwia bezpośrednie zastosowanie widm IR do oznaczeń ilościowych. W zakresie średniej podczerwieni wiele próbek absorbuje promieniowanie zbyt silnie. Prawidłowy pomiar jest możliwy po rozcieńczeniu próbki materiałem nieabsorbującym, np. KBr, lub po zmniejszeniu grubości warstwy absorbującej.

### 2.1.2. Technika ATR

Coraz częściej stosowaną metodą pomiaru widm IR jest technika osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia ATR (ang. *Attenuated Total Reflectance*). W metodzie tej rejestruje się widmo substancji umieszczonej na materiale o dużej wartości współczynnika załamania światła. Efekt całkowitego wewnętrznego odbicia uzyskuje się, gdy promieniowanie podczerwone skierowane na powierzchnię graniczną pada od strony ośrodka o dużym współczynniku załamania światła  $n_1$  na próbkę o współczynniku załamania  $n_2$  ( $n_1 > n_2$ ), pod kątem większym od kąta granicznego  $\theta_{gr}$  dla całkowitego odbicia:

$$\theta_{gr} = \arcsin n_2/n_1. \quad (4)$$

Technika ATR daje widma próbek mających bezpośredni kontakt z kryształem ATR. Głębokość penetracji próbki  $d_p$  przez falę elektromagnetyczną o długości fali  $\lambda$  padającej pod kątem  $\theta$  przybliża zależność:

$$d_p = \frac{\lambda/n_1}{2\pi \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}}. \quad (5)$$

Metoda ATR pozwala bez konieczności wcześniejszego przygotowania próbek rejestrować widma substancji stałych, filmów, tkanek, cieczy, roztworów i emulsji. Podobnie jak w technice transmisyjnej widma ATR zapisuje się w skali absorbancji.

### 2.1.2. Technika DRIFTS

Spektroskopia odbicia rozproszonego w podczerwieni DRIFTS (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*) jest techniką stosowaną głównie do badania substancji stałych w zakresie średniej i bliskiej podczerwieni. Widmo DRIFTS otrzymuje się rejestrując promieniowanie rozproszone dyfuzyjnie przez próbkę o grubości wyraźnie większej od długości fali promieniowania. Wartością mierzoną jest refleksja  $R$ :

$$R = \frac{I}{I_0}, \quad (6)$$

$I$  oznacza intensywność promieniowania rozproszonego przez próbkę, a  $I_0$  to intensywność promieniowania padającego. Proporcjonalne do stężenia są wartości funkcji Kubelki-Munka [13]:

$$F = \frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{K}{S} = \frac{2.303\epsilon c}{S}, \quad (7)$$

$K$  to współczynnik absorpcji,  $S$  to współczynnik rozproszenia, a  $\epsilon$  to molowy współczynnik absorpcji próbki,  $c$  - stężenie substancji.

Przygotowanie próbki do pomiarów w bliskiej podczerwieni sprowadza się do jej rozdrobnienia. W średniej podczerwieni próbki pochłaniają promieniowanie zbyt silnie. W tym zakresie pomiary ilościowe prowadzi się zwykle dla kilkuprocentowych mieszanin badanej substancji w KBr [14].

## 2.2. SPEKTROSKOPIA RAMANA

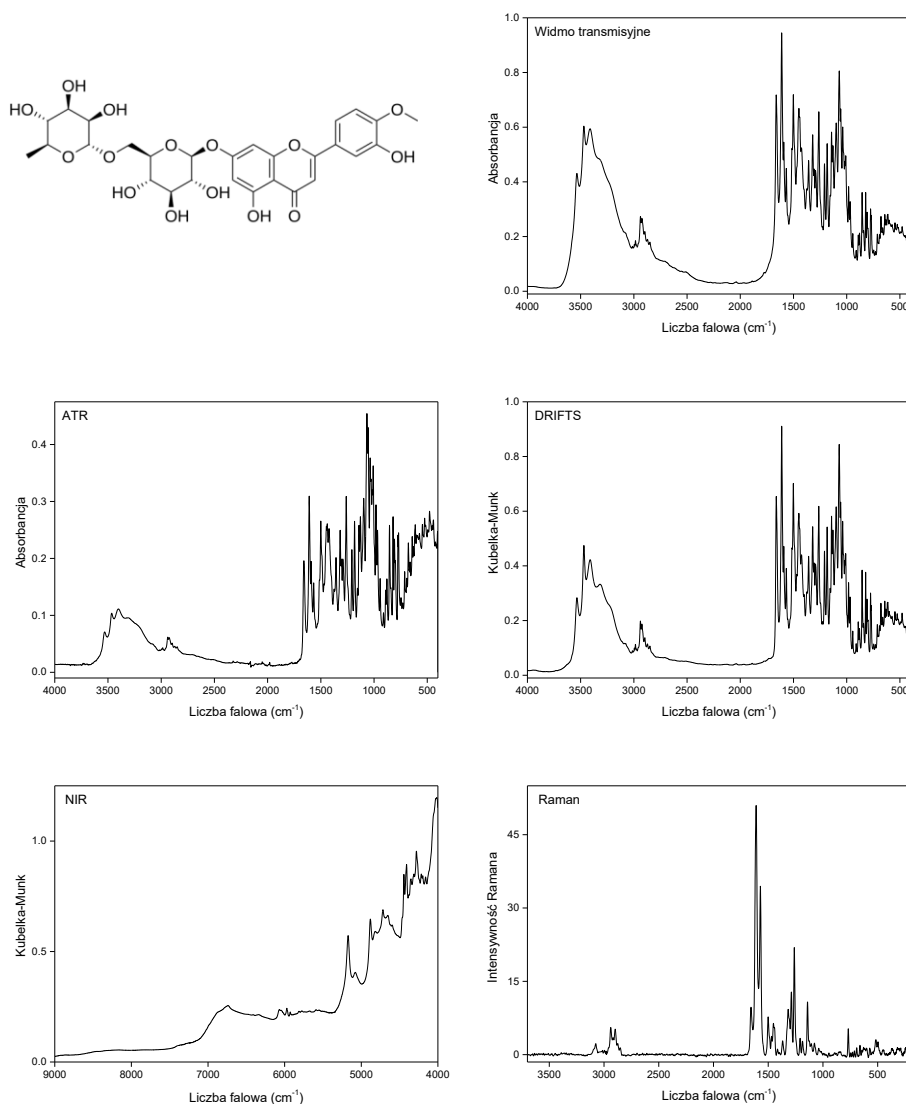
W spektroskopii Ramana rejestrowana jest intensywność promieniowania rozproszonego nieelastycznie przez próbkę. Prawdopodobieństwo tego procesu jest niewielkie, rzędu  $10^{-6}$ , dlatego jako źródła promieniowania wzbudzającego stosowane są lasery emitujące promieniowanie monochromatyczne o dużej mocy [15, 16]. Podobnie jak widmo IR, widmo Ramana składa się z pasm odpowiadających drganiom cząsteczek. W analizie ilościowej z zastosowaniem techniki ramanowskiej wykorzystuje się wprost proporcjonalną zależność pomiędzy intensywnością promieniowania rozproszonego ( $I_R$ ) a stężeniem substancji ( $c$ ):

$$I_R = k I_0 c. \quad (8)$$

Współczynnik  $k$  reprezentuje zarówno cechy próbki jak i warunki aparaturowe,  $I_0$  to intensywność wiązki wzbudzającej.

Typowym materiałem badawczym w przypadku analiz chromatograficznych i spektroskopowych próbek pochodzenia naturalnego są ekstrakty. Tymczasem techniki spektroskopii oscylacyjnej dają możliwość rejestracji widm próbek w ich natywnej

postaci (Rys. 2), bez konieczności izolacji badanych składników. Dodatkowo, w połączeniu z technikami obrazowania chemicznego, spektroskopia oscylacyjna stanowi doskonałe źródło informacji o rozmieszczeniu analizowanych związków chemicznych w badanych próbkach, co pozwala na analizę wpływu wybranych czynników na funkcjonowanie i fizjologię roślin, a w przypadku składników odżywczych



Rysunek 2. Wzór strukturalny diosminy i jej widma: transmisyjne IR, ATR, DRIFTS, NIR i FT Ramana  
 Figure 2. Structural formula of diosmin and its spectra: IR, ATR, DRIFTS, NIR and FT Raman

lub fitozwiązków umożliwia znalezienie tych części roślin i tkanek, w których stężenie substancji jest najwyższe, co ułatwia selekcję surowca dla przemysłu [17-19].

Przenośne spektrometry pozwalają na pomiary w terenie, co znajduje zastosowanie w ocenie dojrzewania owoców, monitoringu zapotrzebowania na wodę i związki mineralne czy analizie pozostałości po środkach ochrony roślin [20-23].

## 2. TECHNIKI CHEMOMETRYCZNE – EKSPLORACYJNA ANALIZA DANYCH

Bogaty skład chemiczny próbek pochodzenia naturalnego znajduje odzwierciedlenie w złożoności rejestrowanych widm oscylacyjnych. W widmach IR i Ramana pasma drgań substancji o podobnej strukturze i zbliżonych energiach oscylacji nakładają się co utrudnia interpretację uzyskanych wyników i powoduje potrzebę wsparcia analiz przy użyciu technik chemometrycznych. Odseparowanie zmienności widmowej charakterystycznej dla badanej substancji od udziałów pochodzących od pozostałych składników układu może znaleźć zastosowanie zarówno w klasyfikacji badanego materiału, jego analizie jakościowej jak i umożliwić analizę ilościową wybranych związków [24].

Opracowanie modeli chemometrycznych poprzedzone jest utworzeniem macierzy danych  $X$  o wymiarach  $m \times n$ , zawierającej dla każdego z  $m$  analizowanych obiektów  $n$  wartości cech (deskryptorów), w przypadku widm oscylacyjnych wartości np. absorbancji lub intensywności rozproszenia ramanowskiego przy każdej liczbie falowej. W celu zminimalizowania wpływu części błędów pomiarowych dane poddaje się wstępnym modyfikacjom, które mogą obejmować korektę linii bazowej, skalowanie lub różniczkowanie widm. Popularne są procedury MSC i SNV korygujące zarówno zniekształcenia addytywne jak i multiplikatywne występujące w widmach [25].

Eksploacyjna analiza danych umożliwia wykrycie podobieństw i różnic między próbkami, pozwala na identyfikację skupień i systematycznych trendów. Pokazuje, które zmienne wnoszą istotny wkład do opisu badanego układu oraz umożliwia wykrycie próbek nietypowych (tzw. *outliers*) obecnych w analizowanym zestawie. Metody eksploracyjne opierają się na wykorzystaniu technik projekcji, co pozwala na redukcję wymiaru danych, który dla technik spektroskopowych jest szczególnie duży. Metody projekcyjne tworzą nową niskowymiarową przestrzeń reprezentacji danych, której osiami są najbardziej istotne zmienne [26].

Klasyfikację próbek na bazie widm można przeprowadzić wykorzystując analizę głównych składowych (*principal component analysis*, PCA), analizę skupień (*cluster analysis*, CA) i samoorganizujące się mapy (*self-organizing maps*, SOM), które umożliwiają identyfikację zmienności spektralnej pochodzącej od różnych grup związków chemicznych [27]. Połączenie danych spektralnych z informacją o przynależności analizowanych obiektów do określonych grup lub klas pozwala na opracowanie modeli dyskryminacyjnych (*discriminant analysis*, DA). Natomiast uwzględ-

dnienie wyników analiz referencyjnych umożliwia budowę modeli ilościowych dla wybranych składników lub parametrów. Najczęściej wykorzystywane są w tym celu regresja cząstkowych najmniejszych kwadratów (*partial least squares regression*, PLS) i sztuczne sieci neuronowe (*artificial neural networks*, ANN), rzadziej stosuje się regresję głównych składowych (*principal component regression*, PCR) [28].

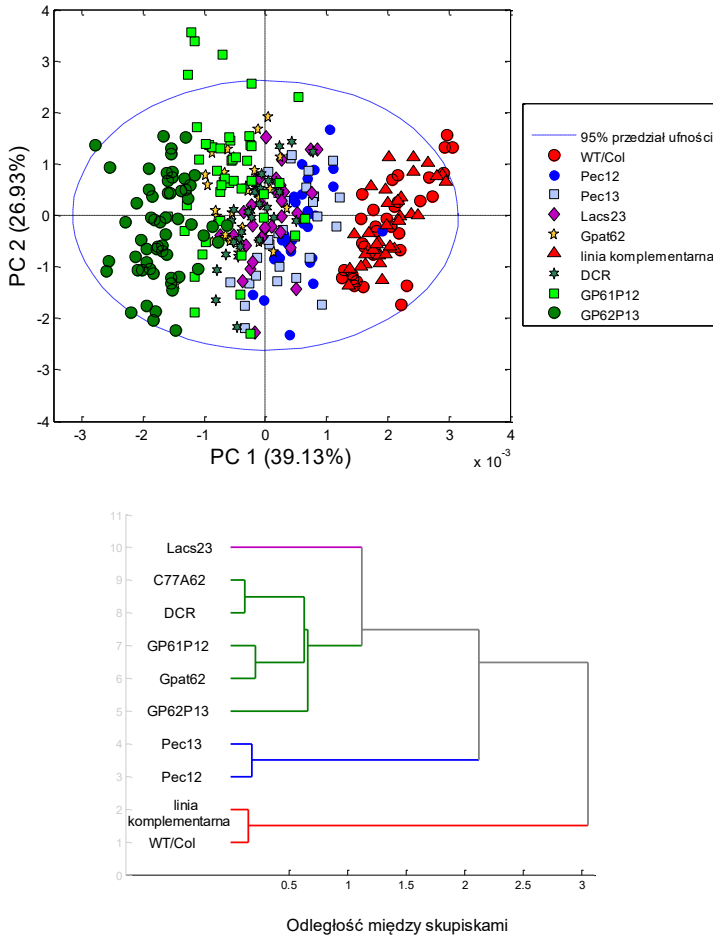
## 4. PRZYKŁADY ZASTOSOWAŃ TECHNIK SPEKTROSKOPOWYCH

### 4.1. KLASYFIKACJA MATERIAŁU ROŚLINNEGO

Rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*, L.), ze względu na krótki cykl życiowy i najmniejszy wśród roślin naczyniowych genom, jest w genetyce i biologii molekularnej gatunkiem modelowym. Wykorzystując technikę mikroskopii FTIR w badaniach tkankowych stwierdzono, że różne związki chemiczne obecne w płatkach rzodkiewnika są rozmieszczone w obrębie tkanki w charakterystyczny sposób. Obserwacja ta pozwoliła na wykorzystanie obrazowania IR do śledzenia zmian składu kutykuli spowodowanych nadekspresją lub modyfikacją genów zaangażowanych w proces biosyntezy kutyny [29]. Analiza profilu polimerowego tkanek z zastosowaniem technik LC/MS wymaga gramowych ilości materiału, co w przypadku płatków jest niezwykle trudne do realizacji. Dodatkowo, mutacje genów odpowiedzialnych za biosyntezę polimerów kutyny, mogą wpływać na procesy związane z formowaniem kwiatostanu. W przypadku silnych fenotypów, mutanty charakteryzują się bardzo ubogim kwiatostanem, któremu towarzyszy karłowatość, wadliwy rozwój pędów i fuzja narządów (*organ fusion*), co uniemożliwia przeprowadzenie klasycznych analiz chemicznych. Widma IR płatków pozwoliły odróżnić rośliny typu dzikiego (*wild type*, WT) od roślin należących do różnych rodzin mutacji kutyn (*lacs2*, *pec1* i *pec2*, *gpat6* i *cyp77*). Najbardziej charakterystyczne zmiany w widmach płatków zaobserwowano w postaci zmiany położenia pasm drgań rozciągających  $\nu(\text{C}=\text{O})$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{H})$  i  $\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{H})$ . Wynikają one głównie ze zmieniającej się zawartości  $\omega$ -dihydroksykwasów tłuszczowych, w szczególności kwasu 10,16-dihydroksyheksadekainowego.

W przypadku mutacji o silnym fenotypie zaobserwowano również bardzo istotne zmniejszenie intensywności wspomnianych pasm w widmach IR w porównaniu do widm dla WT, co wskazywało na zmiany gęstości i grubości warstwy kutyny. Różnice w morfologii kutykuli pomiędzy badanymi genotypami zostały potwierdzone obrazowaniem przy użyciu mikroskopii elektronowej (TEM). Informacje uzyskane z widm transmisyjnych płatków w zakresie MIR były zgodne z danymi LC/MS dla polimerów kutyny wyekstrahowanych z kwiatów. Potwierdzają one propagację zmian chemicznych w składzie kutykuli w różnych tkankach rzodkiewnika w obrębie badanych mutacji [29, 30]. Na podstawie zarejestrowanych widm płatków WT i mutantów opracowano model PCA. Wykresy obiektów w przestrzeni PC1/PC2 pokazały wyraźne grupowanie próbek należących do różnych mutacji, a analiza skupień na bazie zakresów

charakterystycznych dla estrów alifatycznych kwasów tłuszczowych, tj. obejmujących drgania  $\nu(\text{C-H})$  i  $\nu(\text{C=O})$ , umożliwiła klasyfikację mutacji ze względu na podobieństwo zmian w warstwach kutyny (Rys. 3). Przeprowadzone badania potwierdziły, że mikrospektroskopia IR umożliwia prowadzenie unikalnych analiz chemicznych dla tkanek roślinnych bądź ich fragmentów, dla których użycie innych technik badawczych jest utrudnione.



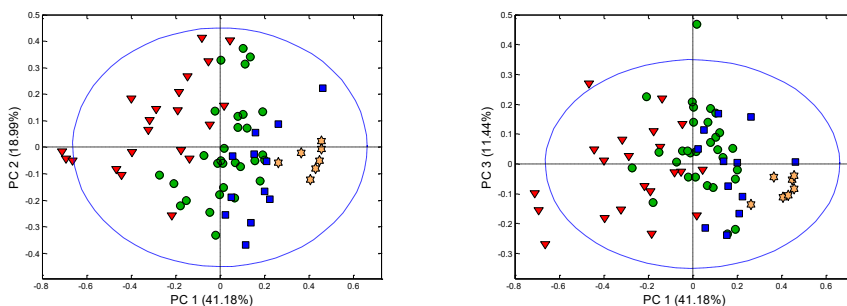
Rysunek 3. Wykres obiektów PCA dla widm IR płatków mutantów rzodkiewnika oraz dendrogram dla spektrotypów

Figure 3. PC scores plots for IR spectra of *Arabidopsis* mutants' petals and dendrogram for spectrotypes

Szczególnie ważną z punktu widzenia potencjalnych zastosowań jest klasyfikacja materiału roślinnego ze względu na zawartość substancji aktywnych. W przypadku preparatów leczniczych otrzymywanych na bazie surowców roślinnych wymagana jest standaryzacja materiału pochodzącego z różnych upraw bądź siedlisk,

różniącego się zawartością substancji aktywnych. Podobnych procedur wymaga produkcja kosmetyków czy produktów spożywczych. Oznacza to konieczność rozwijania szybkich metod analitycznych, pozwalających oznaczać ilościowo wybrane grupy związków chemicznych bez konieczności ich ekstrakcji z matrycy roślinnej.

Przykładem zastosowania technik spektroskopowych do klasyfikacji materiału roślinnego była analiza próbek kory i liści różnych gatunków i hybryd topoli, stanowiących źródło salicylanów i flawonoidów [31]. Kora i liście wierzbowatych (*Salicaceae*) od tysięcy lat są wykorzystywane do leczenia infekcji i stanów zapalnych.



Rysunek 4. Wykres obiektów PCA dla widm ATR próbek liści topoli: zawartość salicylanów do 3% - kolor czerwony, do 6% - zielony, do 9% - niebieski, powyżej 9% - pomarańczowy

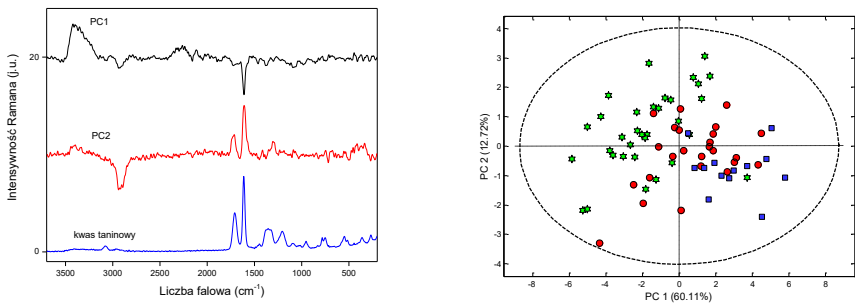
Figure 4. PC scores plots for ATR spectra of poplar leaves: salicylate content up to 3% - red, up to 6% - green, up to 9% - blue, above 9% - orange

Zawartość substancji aktywnych w surowcu ściśle wiąże się z przynależnością gatunkową, jak również zajmowanym przez roślinę siedliskiem oraz sposobem przetwarzania i przechowywania materiału. Wykorzystując wykresy obiektów PCA, modelu zbudowanego na bazie widm ATR wysuszonych i zmielonych liści, na płaszczyźnie PC1/PC2 uzyskano wyraźny rozdział próbek o zróżnicowanej zawartości salicylanów (Rys. 4). Dzięki zastosowaniu technik spektroskopowych można wykonać wstępne analizy przetwarzanego surowca i dostosować parametry procesu technologicznego w trakcie wytwarzania leku. Jak wspomniano, połączenie metod spektroskopowych i chemometrycznej analizy danych umożliwia przeprowadzanie badań przesiewowych (skriningu) materiału roślinnego pod kątem zawartości pożądanych związków aktywnych, a tym samym optymalizację źródeł surowca.

Możliwość identyfikacji próbek na podstawie widm oscylacyjnych pokazano dla suchego ziele czystka szarego (*Cistus × incanus*, L.), rośliny leczniczej pochodzenia śródziemnomorskiego [32]. Dzięki właściwościom przeciwzapalnym i przeciwutleniającym od czasów starożytnych ziele czystka jest stosowane w medycynie, a charakterystyczny bukiet zapachowy wykorzystuje się w perfumerii i kosmetyce. Aktywność biologiczna ziele czystka jest związana z obecnością flawonoidów i garbników, m.in. pochodnych flawonoli (myrycetyny, kwercetyny i kemferolu) oraz ich

glikozydów (mirycytriny, kwercytriny, hiperozydu, tylozydu), proantocyjanidyny oraz hydrolizowanych garbników. Za prozdrowotne walory surowca odpowiadają również kwasy fenolowe, w tym kwas galusowy, *p*-kumarowy, chlorogenowy oraz kwas elagowy.

Wykorzystując widma IR, NIR i Ramana wysuszonych i zmielonych liści czystka szarego pochodzących z Turcji i Albanii, zbudowano modele PCA. Wykazano, że na bazie widm ramanowskich, w których pasma drgań rozciągających C=C związków aromatycznych charakteryzują się dużą intensywnością, łatwo można wyodrębnić zmienność widmową związaną z obecnością polifenolowych substancji aktywnych.



Rysunek 5. PCA dla widm Ramana ziela czystka szarego: strona lewa – przebiegi dwóch pierwszych głównych składowych i widmo kwasu taniinowego, strona prawa – wykres obiektów PC1/PC2; zawartość TF < 30 mg ME/s.m. – kolor zielony, w zakresie 30-40 ME/s.m. – kolor czerwony, TF > 40 ME/s.m. – kolor niebieski

Figure 5. PCA for Raman spectra of cistus herb: left side - loadings of the first two PCs and spectrum of tannic acid, right side - plot of PC1/PC2 scores; TF content < 30 mg ME/d.w. – green, in the range of 30-40 ME/d.w. – red color, TF > 40 ME/d.w. – blue color

Kombinacja pierwszej i drugiej głównej składowej umożliwiła separację badanego materiału roślinnego według zawartości flawonoidów, co przedstawiono na Rys 5. Analiza danych widmowych z wykorzystaniem narzędzi chemometrycznych pozwala także określić pochodzenie próbek roślinnych, co jest istotne w przypadku kontroli autentyczności produktów i wykryć obecność domieszek. W badanym zestawie próbek kraj pochodzenia zadeklarowano tylko dla części materiału roślinnego. Niemniej, na bazie położenia obiektów na płaszczyźnie PC1/PC2, można było z dużym prawdopodobieństwem określić pochodzenie próbek, dla których brakowało deklaracji, zarówno na podstawie danych IR jak i ramanowskich. O przypisaniu próbek do konkretnej lokalizacji decydowała nie tyle zawartość substancji aktywnych, co pełny skład chemiczny materiału roślinnego, uwzględniający zmienność zawartości składników budulcowych (celulozy, hemiceluloz, pektyn) oraz substancji odżywczych.



## 4.2. ANALIZA ILOŚCIOWA SUBSTANCJI ATYWNYCH I SKŁADNIKÓW ODŻYWCZYCH

Jak wspomniano we wstępie, podstawowym zastosowaniem spektroskopii oscylacyjnej jest analiza strukturalna związków chemicznych. Proporcjonalność rejestrowanych sygnałów w widmach oscylacyjnych do stężenia substancji obecnych w badanym układzie umożliwia wykorzystanie widm IR i Ramana do analiz ilościowych. W przypadku próbek pochodzenia naturalnego dane spektroskopowe wykorzystuje się najczęściej do oznaczania stężeń grup związków chemicznych [31, 32]. Niemniej, w korzystnych warunkach i przy zastosowaniu odpowiednich narzędzi matematycznych, możliwe jest również wyznaczenie zawartości pojedynczych substancji, nawet wówczas, gdy ich stężenia nie przekraczają ułamków procentów wagowych [33].

Współczesne urządzenia pomiarowe generują ogromne zbiory danych, stąd analiza ilościowa bazująca na danych spektroskopowych wymaga użycia technik modelowania wielowymiarowego. Przy pomocy algorytmów chemometrycznych można oznaczyć ilościowo wiele składników obecnych w próbkach pochodzenia naturalnego i wyznaczyć parametry, których wartości są skorelowane ze składem próbek. Czynnikiem wpływającym na jakość oznaczeń ilościowych na bazie danych spektroskopowych są jednorodność próbki, parametry zarejestrowanego widma, zawartość badanego składnika oraz dokładność analiz referencyjnych.

### 4.2.1. Schemat analizy

Analiza ilościowa z wykorzystaniem danych spektroskopowych polega na budowie modelu kalibracyjnego definiującego zależność pomiędzy informacjami zawartymi w widmach a stężeniami analizowanych składników, zgodnie z ogólną zależnością  $Y = f(X)$ , gdzie  $Y$  reprezentuje macierz modelowanych parametrów, a  $X$  to macierz danych widmowych [34]. Do konstrukcji modelu można wykorzystać szereg metod, poczynając od zależności liniowych pomiędzy stężeniem a absorbcją lub intensywnością promieniowania rozproszonego, przy wybranych liczbach falowych, co pozwala otrzymać krzywe kalibracyjne. Ten sposób postępowania, w którym stężenie każdego z oznaczanych składników wyznacza się na podstawie danych widmowych przy wybranej liczbie falowej, jest określany mianem analizy przy użyciu jednej zmiennej. Pozwala on na przeprowadzenie oznaczeń prostych układów, dla których pasma analizowanych substancji są dobrze wyodrębnione. W przypadku analizy próbek naturalnych, tylko w nielicznych przypadkach możliwe jest oznaczenie wybranych związków przy użyciu tej metody.

Układy zawierające wiele różnych substancji, często o podobnej budowie, analizowane są przy wykorzystaniu metody klasycznych najmniejszych kwadratów (*classical least squares*, CLS), odwrotnych najmniejszych kwadratów (*inverse least squares*, ILS), sieci ANN i technik wykorzystujących transformacje danych doświadczalnych, z których najważniejszą jest metoda częściowych najmniejszych kwa-

dratów PLS. We wszystkich tych technikach modele kalibracyjne budowane są w oparciu o znaczne fragmenty widm, składające się z setek a nawet tysięcy punktów. Dla każdego oznaczanego składnika tworzy się krzywą przewidywania, pokazującą zależność stężenia wyznaczonego z modelu od stężenia znanego.

Do przeprowadzenia kalibracji wykorzystuje się zwykle od około 2/3 do około 4/5 dostępnych próbek, pozostałe tworzą zestaw walidacyjny. Dla obu zestawów wyznaczone są parametry pozwalające ocenić jakość opracowanego modelu poczynając od współczynników korelacji ( $R$ ) i determinacji ( $R^2$ ), które charakteryzują siłę związku pomiędzy zmiennymi niezależnymi i zależnymi. Rysowane są wykresy reszt modelu i błędów względnych oznaczeń, co pozwala zauważyć próbki odstające. Próbki te łatwiej zidentyfikować metodą walidacji krzyżowej. Polega ona na sukcesywnym wyłączeniu kolejnych próbek z zestawu kalibracyjnego, budowie modeli bez ich udziału, a następnie kwantyfikacji pominiętych próbek na bazie tych modeli. W kolejnym kroku próbki wracają do zestawu kalibracyjnego. Miarą uzyskiwaną w tym postępowaniu jest współczynnik korelacji walidacji krzyżowej ( $R_{CV}$ ), czyli współczynnik korelacji dla wektora o elementach tak wyznaczonych i wektora znanych wartości. Im jego wartość jest bliższa jedności, tym opracowany model jest bardziej odporny (tzw. krzepkość modelu, *robustness*). Zwyczajowo, dla zestawów kalibracyjnych o liczebności nieprzekraczającej 30 wykonuje się walidację metodą odrzuc jedną próbkę LOO (*leave-one-out*). Dla liczniejszych zestawów kalibracyjnych stosuje się technikę LNO (*leave-n-out*, gdzie  $n = 2, 3$ , etc.).

Często podawanymi syntetycznymi miarami jakości dopasowania są średni błąd kwadratowy (*root-mean-square error*, RMSE):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i^A - C_i)^2}{n}}, \quad (8)$$

gdzie  $C_i^A$  oznacza znane stężenie substancji,  $C_i$  to wartość wyznaczona na podstawie modelu, a  $n$  jest liczebnością serii lub wyrażany w procentach względny standardowy błąd przewidywania (*relative standard error of prediction*, RSEP):

$$RSEP(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i^A - C_i)^2}{\sum_{i=1}^n C_i^A{}^2}} \times 100. \quad (9)$$

Błędy te obliczane są zarówno dla zestawu walidacyjnych ( $RSEP_{WAL}$ ) jak i kalibracyjnego ( $RSEP_{KAL}$ ). Powinny one być porównywalne i dostatecznie małe.

Różnice w jakości modeli kalibracyjnych i wartości błędów oznaczeń obrazują wyniki uzyskane na bazie widm ATR modelowego zestawu  $n=39$  próbek zawierających ponad 80% diosminy oraz sól sodową karboksymetylocelulozy, alkohol poliwinylowy i stearynian magnezu. Parametry modeli pozwalających oznaczyć diosminę zostały przedstawione w Tabeli 1. Krzywą kalibracyjną wyznaczoną przy wykorzystaniu absorbancji pasma drgań  $\nu(C=O)$  o maksimum przy  $1661 \text{ cm}^{-1}$  oraz krzywe przewidywania otrzymane metodami CLS i PLS a także błędy oznaczeń pokazuje Rys. 6.

Techniki chemometryczne dostarczają wielu użytecznych narzędzi diagnostycznych, które umożliwiają detekcję punktów odbiegających, sprawdzenie kompatybilności serii kalibracyjnych i próbek oznaczanych oraz kontrolę liczby czynników, uwzględnianych przy budowie modelu by uniknąć „przeuczenia modelu”

Tabela 1. Parametry modeli kalibracyjnych dla diosminy

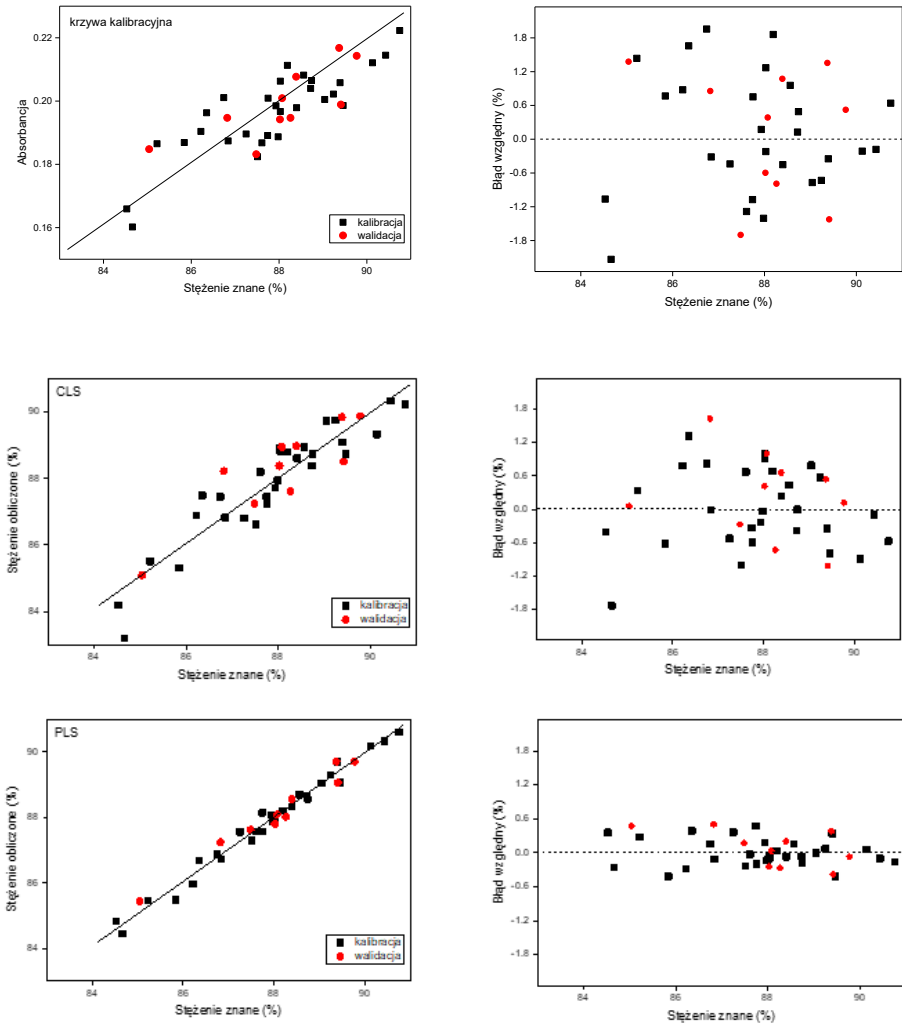
Table 1. Parameters of calibration models for diosmin determination

Parametr	Metoda		
	Krzywa kalibracyjna	CLS	PLS
$R_{KAL}$	0.846	0.931	0.991
$R_{WAL}$	0.768	0.878	0.983
$R_{CV}$	0.815	0.905	0.949
$RSEP_{KAL}(\%)$	1.09	0.70	0.24
$RSEP_{WAL}(\%)$	1.09	0.78	0.31
$RMSE_{KAL}(g)$	9.6	6.1	2.1
$RMSE_{WAL}(g)$	9.6	6.9	2.7
$n_{KAL}$	29	29	29
$n_{WAL}$	10	10	10

(*overfitting*). Zaletą chemometrii jest możliwość wykorzystania wielu sposobów normalizacji i korekcji danych oraz metod selekcji zmiennych, mogących istotnie wpłynąć jakość modeli opracowywanych na bazie danych spektroskopowych. Finalnie, przy użyciu modelu o zweryfikowanej jakości, przeprowadza się oznaczenia modelowanego składnika lub parametru wykorzystując widmo analizowanej próbki.

Analiza ilościowa składników układów złożonych na bazie danych spektroskopowych wymaga odpowiedniego planu badań. Bogate widma z wieloma nachodzącymi na siebie pasmami i zniekształcenia aparaturowe wymuszają budowę modeli kalibracyjnych w oparciu większą liczbę próbek w porównaniu na przykład do analiz ilościowych przeprowadzanych metodami chromatograficznymi. Jest to szczególnie ważne w przypadku modelowania składników, których w badanym układzie jest niewiele. W przypadku analiz ilościowych układów wieloskładnikowych relatywnie prostych, o znanym składzie, np. produktów leczniczych, szczególny nacisk kładzie się na zachowanie ortogonalności zawartości składników mieszanin kalibracyjnych. Dzięki temu możliwe staje się użycie metody najmniejszych kwadratów w wersji CLS lub ILS. Ten sposób postępowania znajduje zastosowanie przy odtwarzaniu składu preparatów leczniczych w warunkach laboratoryjnych i opracowaniu procedur oznaczania stężeń substancji czynnej API (*active pharmaceutical ingredient*). Metoda PLS pozwala przeprowadzić analizę zawartości API zarówno w pojedynczych produktach handlowych [35-38], jak również w preparatach o zbliżonym składzie masy tabletkowej, zawierających tę samą substancję czynną [39-42]. Ze względu na zazwyczaj wysokie, od kilku do kilkudziesięciu procent, stężenie API lekach, różne techniki spektroskopii oscylacyjnej mogą z powodzeniem znaleźć zastosowanie w badaniach ilościowych. Niemniej, największy potencjał analityczny wydaje się mieć technika ramanowska, po-

mimo zwykle niższego stosunku sygnału do szumu S/N w porównaniu z widmami NIR i IR. Znane są przykłady oznaczeń na bazie widm ramanowskich substancji aktywnych w preparatach handlowych, w których zawartość API stanowiła mniej niż 0,05% masy układu [43, 44].



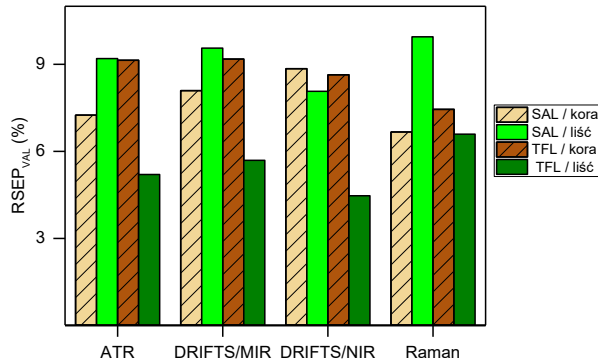
Rysunek 6. Modelowanie zawartości diosminy na bazie widm ATR: strona lewa - krzywa kalibracyjna, krzywe regresji dla modeli CLS i PLS, strona prawa - błędy względne  
 Figure 6. Determination of diosmin content based on ATR spectra: left panel - calibration curve, and prediction curves for CLS and PLS models; right panel - relative errors

Nieco inaczej wygląda schemat analizy ilościowej substancji w produktach naturalnych i roślinnych. Charakter tych układów sprawia, że w warunkach laboratoryjnych nie można odtworzyć ich składu. Dodatkowo, wiele interesujących składników, np. substancji aktywnych, jest mieszaniną związków o zbliżonej budowie. Analiza ilościowa sprowadza się więc do oznaczenia nie pojedynczej formy substancji, lecz całej grupy związków o podobnej strukturze. Dlatego, w przypadku analiz materiału pochodzenia naturalnego metody oficjalne pozwalają oznaczyć stężenie grupy związków, a wynik podawany jest w przeliczeniu na związek bazowy [45]. Analizy ilościowe produktów naturalnych w oparciu o widma oscylacyjne polegają na konstrukcji modeli kalibracyjnych, z wykorzystaniem macierzy zmiennych zależnych  $Y$  zawierającej wyniki analiz referencyjnych, przeprowadzanych dla badanych substancji wg dedykowanych procedur analitycznych. Niedogodnością może być fakt, że oficjalne metody analizy często bazują na wynikach oznaczeń substancji wyekstrahowanych z matrycy naturalnej przy pomocy określonych rozpuszczalników. Jak już wspomnieliśmy, nie zawsze kontrolowany jest poziom wycięcia badanej grupy związków, dodatkowo niektóre ze stosowanych metod charakteryzuje niedostateczna precyzja. Oznacza to, że błędy oznaczeń referencyjnych znajdują wprost odzwierciedlenie w wynikach otrzymywanych w oparciu o modele chemometryczne psując ich jakość.

Dokładna znajomość składu badanego układu ma również tę zaletę, że może posłużyć do monitorowania procesów produkcji oraz analiz wyrobów gotowych [46, 47]. Dzięki temu, techniki spektroskopii oscylacyjnej znalazły zastosowanie jako narzędzia kontroli i analizy procesów wytwórczych (*process analytical technology*, PAT) w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym [48].

#### 4.2.2. Przykłady oznaczeń ilościowych

We wspomnianych wcześniej analizach spektroskopowych 185 próbek kory i liści topoli [31], przeprowadzono modelowanie zawartości salicylanów i flawonoidów. Na bazie widm ATR, DRIFTS, NIR i Ramana oraz analiz referencyjnych zbudowano modele PLS. Otrzymano je optymalizując zakresy widmowe dla każdej z technik i rodzaju badanego materiału roślinnego. W przypadku salicylanów, których stężenia zmieniały się w granicach 0,6-8,1% dla kory i 0,5-10,0% dla liści, modele kalibracyjne charakteryzowały się wartościami współczynników korelacji w zakresie 0,984-0,991, a parametry  $R_{CV}$  dla walidacji krzyżowej mieściły się w przedziale 0,891-0,982. Błędy RSEP oznaczeń salicylanów w próbkach kalibracyjnych i walidacyjnych zawierały się w granicach 6,0-9,9%, przy czym dla kory błędy te były o ok. 2% niższe niż błędy oznaczeń salicylanów w liściach. Drugą grupą substancji aktywnych oznaczanych w analizowanym materiale roślinnym były flawonoidy, których stężenia mieściły się w zakresie 0,1-0,5% oraz 0,4-1,8%, odpowiednio dla kory i liści. Mimo niższej, w porównaniu do salicylanów, zawartości TFL w badanych próbkach, możliwe było opracowanie wiarygodnych modeli kalibracyjnych. Oznaczenia ilościowe flawonoidów w korze obarczone były błędami RSEP 7,0-9,2%. Dla liści błędy te mieściły się w przedziale 3,4-6,5% (Rys. 7).



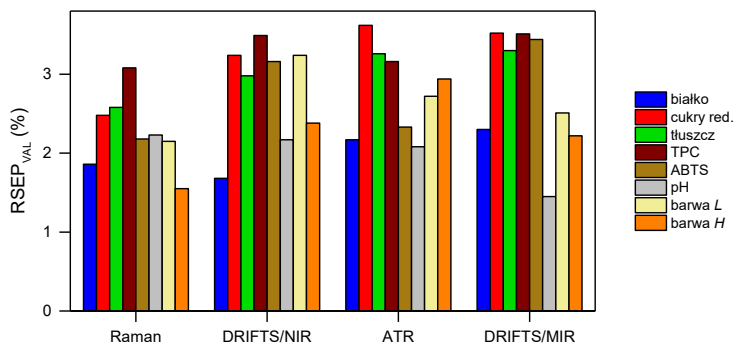
Rysunek 7. Wartości błędów  $RSEP_{VAL}$  oznaczeń całkowitej zawartości salicylanów (SAL) i flawonoidów (TFL) w korze i liściach topoli na bazie danych spektroskopowych

Figure 7.  $RSEP_{VAL}$  error values of total salicylates (SAL) and flavonoids (TFL) determinations in poplar bark and leaves based on spectroscopic data

Każda z użytych technik spektroskopii oscylacyjnej pozwoliła oznaczyć zawartość salicylanów i flawonoidów w sproszkowanych próbkach kory i liści bez konieczności ekstrakcji substancji aktywnych z materiału roślinnego.

Analiza całkowitej zawartości polifenoli (TPC), TFL oraz aktywności przeciwutleniającej FRAP dla ziela czystka szarego dała jeszcze lepsze wyniki [32]. W suszonym materiale stężenie TPC zmieniało się w zakresie 36,4-69,8 mg GAE/g, TFL od 16,8 do 53,5 mg ME/g, a aktywność FRAP oznaczono w przedziale 16,9-48,5 mM GAE/g. Na podstawie widm zmielonych próbek i wyników analiz referencyjnych opracowano modele kalibracyjne techniką PLS. Najlepszą zdolnością prognostyczną charakteryzowały się te otrzymane na bazie widm Ramana. Błędy RSEP oznaczeń trzech analizowanych parametrów dla próbek walidacyjnych wyniosły 2,7%, 2,9% i 5,4%, podczas gdy dla modeli zbudowanych na bazie widm MIR i NIR błędy te były prawie dwa razy większe. Na uwagę zasługuje fakt uzyskania wyższych wartości parametru  $R_{CV}$  dla modeli dedykowanych oznaczeniom TFL (0,915-0,966) w porównaniu do wartości parametru przy modelowaniu całkowitej zawartości polifenoli (0,826-0,842).

Możliwość równoczesnej analizy składników odżywczych i wybranych parametrów fizykochemicznych próbek pyłku pszczelego w oparciu o widma oscylacyjne pokazano w pracy Węglińskiej i innych [49]. Optymalizując zakresy widm IR, NIR i Ramana zbudowano modele kalibracyjne umożliwiające oznaczenie zawartości białka, cukrów redukujących, tłuszczu i polifenoli, a także aktywności przeciwutleniającej, pH oraz parametrów barwy. W przypadku analiz składników odżywczych błędy oznaczeń próbek walidacyjnych mieściły się w granicach 1,7-2,3% dla białka, 2,5-3,6% dla cukrów i 2,6-3,6% dla tłuszczu, przy czym najniższe błędy RSEP zanotowano dla modeli opracowanych na bazie widm ramanowskich.



Rysunek 8. Wartości błędów  $RSEP_{WAL}$  oznaczeń ilościowych parametrów fizykochemicznych pyłków pszczoelich na bazie danych spektroskopowych

Figure 8.  $RSEP_{WAL}$  error values for quantitative determination of physicochemical parameters of bee pollen based on spectroscopic data

Pomimo stosunkowo niewielkiej zawartości związków polifenolowych, uzyskano niskie błędy oznaczeń, w granicach 3,1-3,5%. Wartość aktywności przeciwutleniającej ABTS pyłków silnie korelowała z zawartością TPC, a wyznaczone błędy  $RSEP_{WAL}$  były niższe niż dla oznaczeń polifenoli i mieściły się w zakresie 2,2-3,4%. W pracy tej przedstawiono również możliwość modelowania przy użyciu danych widmowych wartości pH ( $RSEP_{WAL}=1,5-2,2\%$ ) oraz parametrów barwy *L* i *H* ( $RSEP_{WAL}=1,6-3,2\%$ ) badanych próbek, co potwierdza wysoki potencjał spektroskopii oscylacyjnej w analizie złożonych układów naturalnych. Warto wspomnieć, że dla jednej próbki, czas potrzebny do oznaczenia 8 analizowanych parametrów, w oparciu o każde z jej widm oscylacyjnych, był blisko sto razy krótszy od czasu potrzebnego do wykonania analiz referencyjnych. Zestawienie błędów oznaczeń ilościowych na bazie różnych technik pokazano na Rys. 8.

Przedstawiony w pracy tok postępowania bazujący na chemometrycznej analizie danych spektroskopowych daje możliwość wyznaczenia szeregu parametrów próbki na podstawie pojedynczego widma. Co ważne, tego typu procedura nie wymaga rozpuszczenia próbki i ekstrakcji oznaczanych składników co, jak wspomnieliśmy, wielokrotnie skraca czas analizy i eliminuje konieczność użycia odczynników chemicznych.

### 4.2.3. Analiza produktów spożywczych

Opisana powyżej procedura może znaleźć zastosowanie w analizie produktów spożywczych. Wykorzystanie danych widmowych w znaczący sposób przyspiesza oznaczanie zawartości składników odżywczych i wybranych cech fizykochemicznych, w szczególności, gdy wyznaczenie pojedynczego parametru przy użyciu standardowo stosowanych protokołów jest procesem żmudnym lub kosztownym. Powszechnie stoso-

wane metody oznaczania wilgotności w mąkach, zalecane przez American Association of Cereal Chemists (AACC), polegają na suszeniu próbki w temp. 105 °C, do uzyskania stałej masy, co zajmuje około 3 godzin. Wyznaczenie zawartości popiołu wiąże się z analizą spaleniwą w temp. 550°C. Na bazie widm Ramana próbek mąki, uzyskanych z przemiału 15 różnych odmian pszenicy, oraz wyników analiz referencyjnych opracowano modele PLS umożliwiające oznaczenie wilgotności, a także zawartości popiołu, azotu, węgla, siarki i tlenu [50]. W przypadku dwóch pierwszych parametrów błąd RSEP dla próbek walidacyjnych był na poziomie 2,1 i 1,7%, podczas gdy modelowanie składu pierwiastkowego dało błędy równe 0,1 i 0,3% dla C i O oraz 1,1 i 3,3% dla N i S. Wszystkie powyższe oznaczenia przeprowadzono na bazie pojedynczego widma próbki, którego czas rejestracji nie przekraczał 5 min.

W innych badaniach spektroskopię oscylacyjną zastosowano do analiz wilgotności makaronów, jednego z podstawowych parametrów determinujących jakość gotowych produktów [51]. Widma ATR, NIR i Ramana zhomogenizowanych próbek posłużyły do konstrukcji modeli kalibracyjnych. Na ich podstawie wyznaczono wilgotność z błędem w granicach 2.1-5.7%. Najniższe wartości uzyskano dla modelu opracowanego z wykorzystaniem widm ATR.

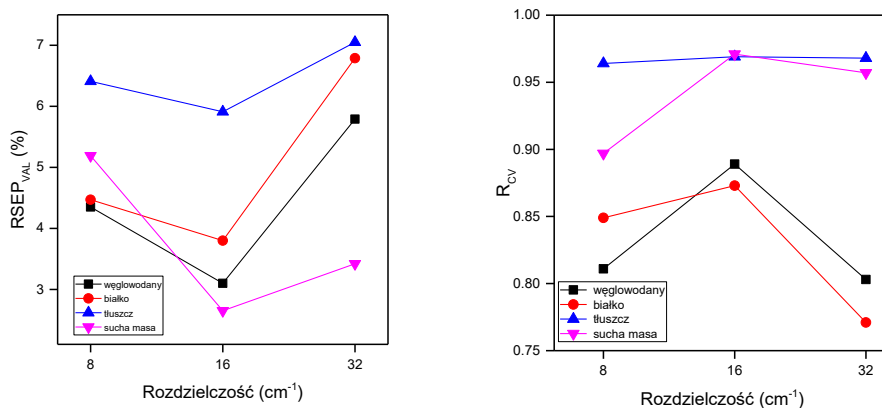
Techniki spektroskopowe są szczególnie użyteczne, gdy oznaczenie interesującego parametru przy użyciu standardowych technik analitycznych jest procesem długotrwałym i kłopotliwym. Przykładem takich analiz są oznaczenia zawartości glutenu w mąkach, realizowane przy pomocy uciążliwej techniki wymywania lub testów immunologicznych ELISA. Jako alternatywę, pokazano zastosowanie spektroskopii IR, NIR i Ramana [52]. Na bazie widm oscylacyjnych opracowano modele PLS, pozwalające oznaczyć gluten z dokładnością 3-5%.

Techniki spektroskopowe zastosowano również do analizy mleka i jogurtów. Oznaczenia zawartości tłuszczu, białka i laktozy w jogurtach naturalnych przeprowadzono na bazie widm ramanowskich z dokładnością 2-4% oraz widm ATR z błędem 1-5% [53]. Podobne oznaczenia dla mleka były obarczone błędami w zakresie 2-6% i 2-3% [54]. Omówione badania sugerują silny wpływ jednorodności badanego materiału i wielkości obszaru próbkowania na jakość analiz.

Czynnikami wpływającymi na atrakcyjność technik spektroskopowych w zastosowaniach analitycznych są łatwość i prostota pomiaru. Jakość modeli kalibracyjnych i uzyskanych na ich podstawie oznaczeń ilościowych zależy od stosunku sygnału do szumu (S/N) dla rejestrowanych widm. O ile widma ATR i NIR charakteryzują się na ogół wysokimi wartościami parametru S/N, to widma DRIFTS w zakresie MIR i widma Ramana są najczęściej gorszej jakości. Poprawę stosunku sygnału do szumu można uzyskać poprzez wydłużenie czasu rejestracji widm, co nie jest pożądane w razie konieczności analizy wielu próbek. Pogorszenie rozdzielczości mierzonych widm pozwala, przy tym samym czasie zapisu, uzyskać polepszenie parametru S/N, w tym przypadku trzeba się jednak liczyć ze stratą informacji możliwych do uzyskania z tak zarejestrowanych widm [55, 56].



Wpływ rozdzielczości widm na jakość oznaczeń ilościowych składników odżywczych sprawdzono badając próbki mleka krowiego [54]. Dla serii zhomogenizowanych mieszanin próbek mleka zbudowano modele kalibracyjne na bazie widm FT Ramana otrzymanych z rozdzielczością 8, 16 i 32  $\text{cm}^{-1}$ , akumulując tę samą liczbę interferogramów.



Rysunek 9. Wykresy parametrów  $RSEP_{VAL}$  i  $R_{CV}$  modelowania PLS zawartości składników odżywczych w mleku krowim na bazie widm Ramana

Figure 9. Plotted  $RSEP_{VAL}$  and  $R_{CV}$  parameters for PLS modelling of nutrients' content in cow's milk based on Raman spectra

Modele PLS zbudowane na bazie widm zarejestrowanych z rozdzielczością 16  $\text{cm}^{-1}$  charakteryzowały się najniższymi wartościami błędów RSEP i najwyższymi wartościami współczynnika  $R_{CV}$ .

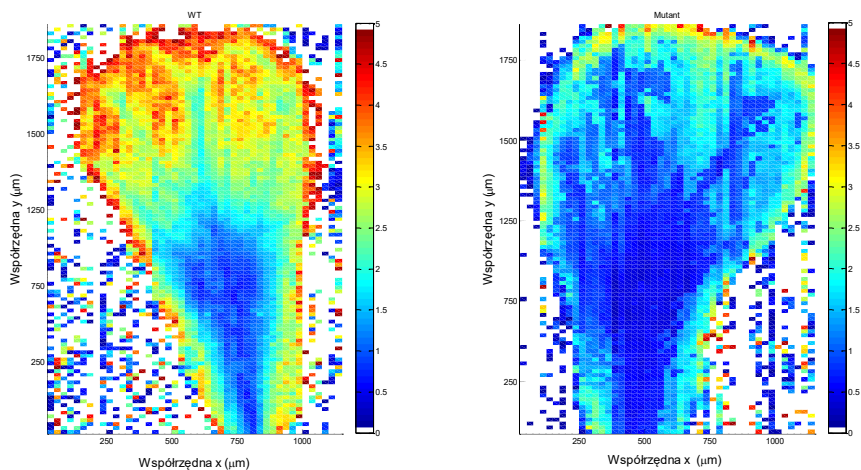
Błędy  $RSEP_{VAL}$  dla oznaczeń węglowodanów, białka, tłuszczu i suchej masy wyniosły odpowiednio 3,1, 3,8, 5,9 i 2,6%. Polepszenie rozdzielczości do 8  $\text{cm}^{-1}$  powinno wiązać się z pojawieniem się dodatkowych informacji. Niemniej tak otrzymane widma charakteryzowały się niższym stosunkiem S/N w porównaniu z widmami zarejestrowanymi z rozdzielczością 16  $\text{cm}^{-1}$ . Zwiększony poziom szumu spowodował pogorszenie zdolności prognostycznej opracowanych na ich podstawie modeli kalibracyjnych. Widma zapisane z rozdzielczością 32  $\text{cm}^{-1}$  były mniej zaszumione lecz zbyt rzadkie próbkowanie wiązało się z częściową utratą informacji. W konsekwencji, opracowane modele kalibracyjne charakteryzowały się podwyższonymi wartościami błędów RSEP, które dla zestawów walidacyjnych wyniosły 5,8, 6,8, 7,0 i 3,4%. Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 9.

Widma charakteryzujące się wysokim stosunkiem sygnału do szumu pozwalają uzyskać oznaczenia ilościowe obarczone małymi błędami także dla próbek naturalnych. Rozdzielczość z jaką rejestrowane są widma wydaje się mieć mniejsze znaczenie [57, 58]. Jest to szczególnie istotne w przypadku użycia spektrometrów przenośnych, o gorszych parametrach optycznych i elektronicznych.

### 4.3. TECHNIKI OBRAZOWANIA

Ważnym obszarem zastosowań spektroskopii oscylacyjnej w analizie fitozwiązków w roślinach jest obrazowanie chemiczne. Możliwość szybkiej rejestracji widm IR i Ramana w połączeniu z mikroskopią optyczną znajduje szerokie zastosowanie w analizie tkanek roślinnych, umożliwiając porównanie informacji strukturalnych ze składem chemicznym badanego fragmentu próbki. W technikach obrazowania dane pomiarowe są umieszczane w wielowymiarowej macierzy, tzw. *hyper-cube*. Zawiera ona widma skanowanej powierzchni zarejestrowane w punktach o współrzędnych  $(x,y)$ . Wyświetlając intensywność sygnału w widmie przy wybranej liczbie falowej dla każdego punktu powierzchni uzyskuje się mapę. Liczba możliwych do uzyskania map odpowiada długości wektora liczb falowych i często jest liczona w tysiącach. W praktyce, wiele map jest do siebie bardzo podobnych i nie wszystkie mają wartość analityczną. Konfokalna mikroskopia ramanowska pozwala dodatkowo uzyskać mapy dla współrzędnej  $z$ , pokazując przekrój poprzeczny badanej próbki [59].

We wspomnianej w paragrafie 4.1 pracy dotyczącej analizy tkanek mutantów kutyny rzodkiewnika [29] opisano rejestrację zestawów widm IR pozwalających na obrazowanie płatków wybranych przedstawicieli roślin genetycznie zmutowanych oraz typu WT. W celu zwiększenia zdolności rozdzielczej, analizy wykonano na bazie drugich pochodnych widm transmisyjnych obliczonych metodą Savitzkiego-Golaya przy użyciu przedziałów 15-punktowych i wielomianu stopnia 3-go. Niezwykłym odkryciem było stwierdzenie nierównocennego rozmieszczenia substancji chemicznych w obrębie badanych tkanek. Dla każdej z podstawowych grup związków wchodzących w ich skład, tj. estrów alifatycznych kwasów tłuszczowych, białek, celulozy, hemiceluloz i pektyn otrzymano charakterystyczne mapy absorpcji, przy czym mapy dla poszczególnych drgań przypisanych danej grupie związków miały taki sam wzór. Podobieństwa pomiędzy tymi mapami a mapami otrzymanymi dla innych drgań umożliwiły dokładniejsze przypisanie pasm w widmach IR, w szczególności tych, których przypisania literaturowe były niejednoznaczne. Wykorzystując podobieństwo map otrzymanych dla drgań  $\nu(\text{C=O})$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{C-H})$ ,  $\nu_{\text{s}}(\text{C-H})$  i  $\delta(\text{C-H})$  potwierdzono, że dla mutantów kutyny, dla których grubość warstwy polimerowej w płatkach była znacząco zredukowana w stosunku do roślin WT, obserwuje się zachowanie charakterystycznego, niejednorodnego rozmieszczenia biopolimeru w obrębie tkanki.



Rysunek 10. Obrazowanie chemiczne: względne mapy absorpcji białko/lipidy dla płatków rzodkiewnika rośliny kontrolnej (WT) i mutacji lacs2-3. Skala kolorystyczna reprezentuje stosunek wartości drugich pochodnych widm IR dla pasm  $1733\text{ cm}^{-1}$  i  $1658\text{ cm}^{-1}$

Figure 10. Chemical imaging: relative protein/lipid maps for Arabidopsis petals of wild-type plant and the lacs2-3 mutation. Colorbar represents ratio of the second derivative values of IR spectra for bands  $1733\text{ cm}^{-1}$  and  $1658\text{ cm}^{-1}$

Jedną z zalet technik obrazowania jest możliwość uzyskania tzw. map względnych otrzymywanych w wyniku operacji matematycznych wykonywanych dla map tej samej próbki uzyskanych dla różnych drgań. Pozwalają one przedstawić zależności pomiędzy różnymi grupami związków chemicznych i śledzić zmiany dla wielu substancji jednocześnie, znacząco ułatwiając interpretację danych. Porównanie map względnych uzyskanych dla mutantów kutyny i typu WT uzmysławia skalę zmian chemicznych w tkance, które są następstwem mutacji, wygaszenia lub nadekspresji wybranych genów regulujących biosyntezę kutyny. Przykład map względnych, pokazujących stosunek zawartości białka do lipidów dla tkanki rośliny kontrolnej i mutantu lacs23 przedstawiono na Rys. 10.

Techniki obrazowania ramanowskiego i podczerwonego, łącząc obrazy mikroskopowe z informacjami spektroskopowymi, tworzą unikalne narzędzia wspomagające badania materiału roślinnego oraz produktów pochodzenia naturalnego. Obrazowanie znajduje coraz powszechniejsze zastosowanie w analizach tkanek roślinnych, umożliwiając analizy strukturalne tkanek, biopolimerów oraz substancji biologicznie czynnych [60-64].

## UWAGI KOŃCOWE

Spektroskopia oscylacyjna w połączeniu z metodami chemometrycznymi pozwala wykonać szczegółowe analizy materiału roślinnego, produktów naturalnych i spożywczych. Ważną zaletą metod wykorzystujących widma IR i Ramana jest możliwość przeprowadzania oznaczeń dla próbek w ich natywnej postaci bez konieczności ekstrakcji oznaczanych substancji. Dostępne techniki pomiarowe pozwalają na pomiar widm różnorodnych próbek, umożliwiając też badania *in vivo*. Nowe możliwości stwarza spektroskopowe obrazowanie chemiczne, które pozwala na analizy strukturalne tkanek. Dostarczając informacji o rozmieszczeniu przestrzennym badanych związków umożliwia śledzenie procesów biosyntezy ważnych z punktu widzenia fizjologii roślin, jak również zmian chorobowych.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy, L. Jimenez, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 727.
- [2] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouysegou, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 586.
- [3] C.J. Dillard, J.B. German, *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 1744.
- [4] I. Ignat, I. Volf, V.I. Popa, *Food Chem.*, 2011, **126**, 1821.
- [5] R. Tsao, Z.Y. Deng, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 2004, **812**, 85.
- [6] M. Butnariu, C.Z. Coradini, *Chem. Cent. J.*, 2012, **6**. doi:10.1186/1752-153x-6-35
- [7] Spektroskopia oscylacyjna. Od teorii do praktyki (red. K Małek), PWN, Warszawa, 2016.
- [8] *Infrared and Raman spectroscopy: Methods and Applications* (ed. B. Schrader), Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [9] *Modern techniques in applied molecular spectroscopy* (ed. F.M. Mirabella), J. Wiley & Sons, New York, 1998.
- [10] *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (eds. J. Chalmers, P. Griffiths), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2002.
- [11] S. Lohumi, S. Lee, H. Lee, B.K. Cho, *Trends Food Sci. Technol.*, 2015, **46**, 85.
- [12] C. Gendrin, Y. Roggo, C. Collet, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **48**, 53.
- [13] P.J. Brimmer, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, 1988, **42**, 242.
- [14] T. Czaja, S. Mazurek, R. Szostak, *Talanta*, 2016, **161**, 655.
- [15] H. Wikstrom, I.R. Lewis, L.S. Taylor, *Appl. Spectrosc.*, 2005, **59**, 934.
- [16] D. Yang, Y. Ying, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2011, **46**, 539.
- [17] M. Baranska, H. Schulz, E. Joubert, M. Manley, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 7716.
- [18] H. Schulz, M. Barańska, *Vib. Spectrosc.*, 2007, **43**, 13.
- [19] K.B. Bec, J. Grabska, G.K. Bonn, M. Popp, C.W. Huck, *Front. Plant Sci.*, 2020, **11**, doi:10.3389/fpls.2020.01226
- [20] R. Deidda, P.Y. Sacre, M. Clavaud, L. Coic, H. Avohou, P. Hubert, E. Ziemons, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2019, **114**, 251.
- [21] D.P. Aykas, A. Menevseoglu, *Food Control*, 2021, **121**, doi:10.1016/j.foodcont.2020.107670
- [22] C.K. Pezzei, S.A. Schonbichler, C.G. Kirchler, J. Schmelzer, S. Hussain, V.A. Huck-Pezzei, M. Popp, J. Krolitzek, G.K. Bonn, C.W. Huck, *Talanta*, 2017, **169**, 70.
- [23] H. Yaman, D.P. Aykas, R. Jimenez-Flores, L.E. Rodriguez-Saona, *J. Dairy Sci.*, 2022, **105**, 40.
- [24] S. Bureau, D. Cozzolino, C.J. Clark, *Postharvest Biol. Technol.*, 2019, **148**, 1.

- [25] A. Rinnan, F. van den Berg, S.B. Engelsen, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2009, **28**, 1201.
- [26] M.L. Vigni, C. Durante, M. Cocchi, *Exploratory Data Analysis, w Chemometrics in Food Chemistry* (ed. F. Marini), Elsevier, Amsterdam, 2013.
- [27] M. Otto, *Chemometrics*, Wiley-Vch, New York, 1999.
- [28] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
- [29] S. Mazurek, A. Mucciolo, B.M. Humbel, C. Nawrath, *Plant J.*, 2013, **74**, 880.
- [30] S. Mazurek, I. Garroum, J. Daraspe, D. De Bellis, V. Olsson, A. Mucciolo, M.A. Butenko, B.M. Humbel, C. Nawrath, *Plant Physiol.*, 2017, **173**, 1146.
- [31] S. Mazurek, M. Włodarczyk, S. Pielorz, P. Okinczyc, P.M. Kus, G. Długosz, D. Vidal-Yanez, R. Szostak, *Molecules*, 2022, **27**, doi:10.3390/molecules27123954.
- [32] S. Pielorz, I. Fecka, K. Bernacka, S. Mazurek, *Molecules*, 2022, **28**, doi:10.3390/molecules28010161.
- [33] S. Mazurek, I. Fecka, M. Węglińska, R. Szostak, *Talanta*, 2018, **189**, 308.
- [34] R. Kramer, *Chemometric techniques for quantitative analysis*, Marcel Dekker, New York, 1998.
- [35] R. Szostak, S. Mazurek, *Analyst*, 2002, **127**, 144-148.
- [36] R. Szostak, S. Mazurek, *Drug Test. Anal.*, 2013, **5**, 126.
- [37] S. Mazurek, R. Szostak, *Vib. Spectrosc.*, 2016, **83**, 1.
- [38] S. Mazurek, R. Szostak, *Vib. Spectrosc.*, 2017, **93**, 57.
- [39] S. Mazurek, R. Szostak, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **48**, 814.
- [40] S. Mazurek, R. Szostak, *Vib. Spectrosc.*, 2011, **57**, 157.
- [41] S. Mazurek, R. Szostak, *Food Chem.*, 2011, **125**, 1051.
- [42] S. Pielorz, M. Weglinska, S. Mazurek, R. Szostak, *Molecules*, 2022, **27**, doi:10.3390/molecules27238276
- [43] S. Mazurek, K. Pichlak, R. Szostak, *Processes*, 2021, **9**, doi:10.3390/pr9010008.
- [44] B.Y. Li, A. Calvet, Y. Casamayou-Boucau, C. Morris, A.G. Ryder, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 3419.
- [45] Willow Bark (*Salicis cortex*) Monograph, *European Pharmacopoeia*, 10th ed., Council of Europe, Strasbourg, 2020.
- [46] T. Vankeirsbilck, A. Vercauteren, W. Baeyens, G. Van der Weken, F. Verpoort, G. Vergote, J.P. Remon, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2002, **21**, 869.
- [47] K.A. Esmonde-White, M. Cuellar, C. Uerpmann, B. Lenain, I.R. Lewis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 637.
- [48] T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J.P. Remon, C. Vervaet, *Int. J. Pharm.*, 2011, **417**, 32.
- [49] M. Węglińska, R. Szostak, A. Kita, A. Nemś, S. Mazurek, *Talanta*, 2020, **212**, 8.
- [50] T. Czaja, A. Sobota, R. Szostak, *Foods*, 2020, **9**, doi:10.3390/foods9030280
- [51] T. Czaja, E. Kuzawinska, A. Sobota, R. Szostak, *Talanta*, 2018, **178**, 294.
- [52] T. Czaja, S. Mazurek, R. Szostak, *Food Chem.*, 2016, **211**, 560.
- [53] T. Czaja, M. Baranowska, S. Mazurek, R. Szostak, *Spectrochim. Acta A*, 2018, **196**, 413.
- [54] S. Mazurek, R. Szostak, T. Czaja, A. Zachwieja, *Talanta*, 2015, **138**, 285.
- [55] B.K. Hart, P.R. Griffiths, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34**, 1337.
- [56] B.K. Hart, R.J. Berry, P.R. Griffiths, *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34**, 1346.
- [57] B.T. Bowie, D.B. Chase, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, 2000, **54**, 164A.
- [58] B.T. Bowie, D.B. Chase, P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, 2000, **54**, 200A.
- [59] N. Gierlinger, M. Schwanninger, *Plant Physiol*, 2006, **140**, 1246.
- [60] R. Baranski, M. Baranska, H. Schulz, *Planta*, 2005, **222**, 448.
- [61] H. Schulz, M. Barańska, R. Barański, *Biopolymers*, 2005, **77**, 212-221.

- [62] M. Szymanska-Chargot, M. Chylinska, P.M. Pieczywek, P. Rosch, M. Schmitt, J. Popp, A. Zdunek, *Planta*, 2016, **243**, 935.
- [63] A. Saletnik, B. Saletnik, C. Puchalski, *Molecules*, 2021, **26**, doi:10.3390/molecules26061537
- [64] P. Bock, M. Felhofer, K. Mayer, N. Gierlinger, *Front. Plant Sci.*, 2021, **12**, doi:10.3389/fpls.2021.793330.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 kwietnia 2023 r.