

### *Zastosowania spektroskopii*

Pierwsze widma IR zostały zmierzone w 1881 r. przez Williama Abneya i Edwarda R. Festinga, którzy sugerowali, że pasma absorpcji są skorelowane z wybranymi grupami funkcyjnymi w cząsteczce. W 1905 r. William Coblenz, posługując się spektrofotometrem własnej konstrukcji, zmierzył widma IR wielu związków i na tej podstawie wykazał, że pewne ugrupowania atomów w cząsteczkach (grupy funkcyjne) absorbują promieniowanie w charakterystycznym dla nich zakresie.

Spektroskopię w zakresie MIR początkowo stosowano do identyfikacji związków organicznych. W tym samym czasie naukowcy podjęli badania dotyczące struktury związków występujących w żywności. W latach 50. i 60. wiele uwagi poświęcono badaniom widm białek (Dufour, 2009).

Zakres NIR przez długi okres nie był przedmiotem większego zainteresowania naukowców. W pierwszej połowie XX w. ukazało się kilka prac dotyczących zastosowania pomiarów w zakresie NIR do oznaczania wilgotności w powietrzu, wody w żelatynie, analizy paliw, charakterystyki polimerów i oznaczania grubości filmów polimerów. W latach 40. Barr i Harp opublikowali widma olejów roślinnych. Do roku 1970 opublikowano około 50 prac dotyczących NIR (Hindle, 2007).

Do oceny jakości żywności stosowano w tym okresie m.in. fluorescencję. Początkowo wykorzystywano wizualną ocenę emisji produktów spożywczych oświetlanych promieniowaniem z zakresu nadfioletu. Wraz z rozwojem aparatury do pomiarów fluorescencji zaczęto w badaniach żywności wykorzystywać odpowiednie widma. W opublikowanym w 1959 r. czwartym wydaniu monografii pt. *Fluorescence analysis in ultra-violet light* (Radley i Grant, 1959) autorzy przedstawili przegląd zastosowań fluorescencji opracowany na podstawie aż ponad czterystu prac opublikowanych w latach 1911–1959. Metodę tę stosowano do badania takich produktów jak: oleje i tłuszcze, masło, mleko, jaja, ryby, mięso, mąka, zboża, napoje fermentowane i cukier.

Przełomowym momentem w zastosowaniu spektroskopii NIR do analizy żywności były badania prowadzone przez Karla Norrisa w US Department of Agriculture (USDA) dotyczące oznaczania składników produktów rolnych, m.in. białka i wilgotności w zbożach (Norris, 1996). Początkowo widma były mierzone z zastosowaniem układu wykorzystującego filtry, a do ich analizy zastosowano metodę regresji wielokrotnej. Zastosowanie NIR do badania stałych, nieprzezroczystych próbek było możliwe dzięki opracowanej w latach 30. teorii Kubelki i Munka dotyczącej dyfuzyjnego rozproszenia w pomiarach transmisyjnych i odbiciowych (Hindle, 2007).

Prace Karla Norrisa zapoczątkowały intensywny rozwój zastosowań NIR w sektorze rolno-spożywczym w latach 70. i 80. (Hindle, 2007). Dużą rolę w tym

procesie odegrały metody analizy widm, rozwijane w ramach powstałej w latach 70. dyscypliny chemii analitycznej – chemometrii. Wykonywanie analiz dużej liczby danych spektroskopowych stało się możliwe dzięki rozwojowi komputerów. W latach 80. pojawiły się komercyjne przyrządy i oprogramowanie do analizy paszy. Canadian Grain Commission uznała spektroskopię NIR za oficjalną metodę analizy białka w pszenicy, a w 1982 r. metoda ta została uznana przez American Association of Cereal Chemists za oficjalną metodę analizy zbóż.

Rozwój spektroskopii NIR w drugiej połowie XX w. obrazują tytuły prac przeglądowych poświęconych tej tematyce (Blanco i Villarroya, 2002). W 1983 r. Wetzel opublikował pracę pt: *Near-infrared reflectance analysis. Sleeper among spectroscopic techniques*, w której wskazał na niewykorzystany w pełni potencjał tej techniki. Opublikowany ponad 10 lat później przez McClure'a (1994) artykuł przeglądowy nosił tytuł: *Near-infrared spectroscopy. The giant is running strong*. W artykule z 1998 r. pt: *The history of near infrared spectroscopic analysis: Past, present and future. From sleeping technique to the morning star of spectroscopy* Davies omawiał ówczesne szerokie zastosowania NIR i wskazywał na obiecujące perspektywy rozwoju tej techniki.

Oprócz zastosowań NIR zaczęły się rozwijać metody badań żywności oparte na analizie chemometrycznej widm z zakresu MIR, fluorescencji oraz UV Vis. Ta ostatnia technika, w szczególności spektroskopia w zakresie Vis, najczęściej jest łączona z NIR. Pierwsza praca przeglądowa dotycząca zastosowań fluorescencji i chemometrii została opublikowana w 2006 r. Cytowano w niej ponad sto publikacji (Christensen, Nørgaard, Bro i Engelsen, 2006).

### *Rozwój chemometrii*

Chemometria jako dyscyplina chemii analitycznej powstała w latach 70. Jej początki sięgają jednak 1969 r., w którym Jurs, Kowalski i Isenhour opublikowali w czasopiśmie *Analytical Chemistry* serię prac dotyczących zastosowania metod liniowego uczenia maszynowego do klasyfikacji widm mas o niskiej rozdzielczości (Massart i in., 1997).

Nazwa „chemometria” została po raz pierwszy użyta przez Svante'a Wolda z Umeå Universitet w Szwecji we wniosku o grant w 1971 r., a rok później w publikacji. W 1974 r. Svante Wold i Bruce Kowalski z University of Washington założyli International Chemometrics Society (S. Wold, 2015). W latach 80. powstały czasopisma *Journal of Chemometrics* (1987), *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (1986) oraz *Journal of Chemical Information and Modelling*. W tym okresie opublikowano też pierwsze książki i opracowano pierwsze oprogramowanie – ARTHUR, SIMCA i UNSCRAMBLER (Brereton, 2014).

Według definicji podanej przez Desire'a Luca Massarta (Massart i in., 1997): „Chemometria jest dyscypliną chemiczną, która stosuje metody matema-

tyczne i statystyczne oraz logikę formalną do projektowania lub wyboru optymalnych procedur pomiarowych, do uzyskiwania maksimum istotnej informacji chemicznej na podstawie analizy danych chemicznych oraz do uzyskania wiedzy o układzie chemicznym”.

Metody stosowane w chemometrii opierają się na pracach matematyków i statystyków z pierwszej połowy XX w. Powszechnie stosowana metoda analizy głównych składowych została opracowana przez Pearsona (1901) i Hotellinga (1933). Krokiem milowym w rozwoju chemometrii było wprowadzenie w latach 80. przez Svante’a Wolda i Harolda Martensa metody regresji cząstkowych najmniejszych kwadratów, opartej na wcześniejszych pracach Hermana Wolda (S. Wold, Sjöström i Eriksson, 2001). Obecnie metoda ta jest szeroko stosowana i stanowi podstawę opracowania modeli kalibracyjnych, m.in. w badaniach żywności.

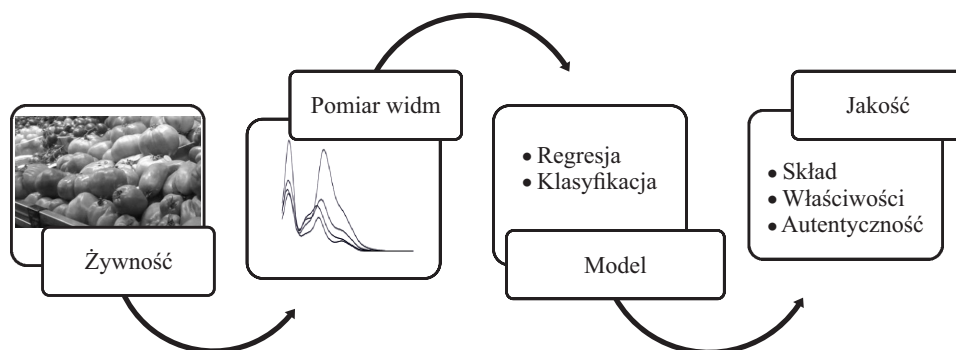
Wczesne zastosowania chemometrii dotyczyły chemii analitycznej, kalibracji na podstawie widm NIR, dekonwolucji widm UV Vis, optymalizacji rozdzielności w metodach chromatograficznych i kontroli statystycznej procesu (Brereton, 2014). Na przełomie XX i XXI w. rozwój komputerów umożliwił zastosowanie zaawansowanych metod do analiz dużej liczby danych.

Obecnie metody chemometryczne są stosowane w wielu dziedzinach: chemii analitycznej (Szymańska i in., 2015), chemii organicznej (Zalewski, 2007), do analizy danych chromatograficznych (Komsta, Heyden i Sherma, 2018), w foodomice (Skov, Honoré, Jensen, Næs i Engelsen, 2014), innych technikach „-omikach” (Richards i Holmes, 2015), w badaniach środowiska (Mas, de Juan, Tauler, Olivieri i Escandar, 2010) i towaroznawstwie (Zalewski, 1999).

## **Zastosowanie spektroskopii optycznej jako techniki odcisku palca w badaniach żywności**

Ten rodzaj zastosowań opiera się na pomiarze widma produktu, wykonywanym bezpośrednio na próbce w sposób nieniszczący. Właściwości spektralne są determinowane przez skład chemiczny i właściwości fizyczne próbki. Analiza widm z zastosowaniem metod chemometrycznych umożliwia uzyskanie ilościowych i jakościowych informacji, które służą do oceny wybranych aspektów jakości próbki. Ideę wykorzystania spektroskopii do rutynowej analizy żywności przedstawiono na rysunku 1.1. Polega ona na opracowaniu modeli kalibracyjnych, które opisują zależność między widmami a właściwościami próbki. Takie modele są wykorzystywane do oznaczania właściwości lub klasyfikacji próbek na podstawie ich widm.

Etap opracowania modeli jest pracochłonny i kosztochłonny, ale początkowa inwestycja szybko się zwraca ze względu na zalety analizy z ich zastosowa-



**Rysunek 1.1. Idea zastosowania spektroskopii optycznej do rutynowej kontroli jakości**

niem. Ponieważ widma mogą być mierzone bezpośrednio na próbce, eliminuje się etap jej przygotowania, który w tradycyjnej analizie jest często najbardziej pracochłonnym i czasochłonnym etapem procesu analitycznego. Ponadto z tym etapem wiąże się duży udział błędów. Dzięki bezpośrednim pomiarom eliminuje się zużycie odczynników chemicznych i produkcję odpadów. Znacząco skraca się czas analizy, która sprowadza się do szybkiego pomiaru widma. Pomiar ma charakter nieniszczący, umożliwia to kontrolę znacznie większej liczby próbek niż w wypadku tradycyjnych pomiarów.

Na podstawie pomiaru i analizy jednego widma można uzyskać informacje o różnych właściwościach próbki. Możliwe jest jednoczesne oznaczenie kilku analitów lub parametrów charakteryzujących produkt, podczas gdy w tradycyjnej analizie zwykle procedura pomiarowa dotyczy oznaczania pojedynczych analitów. Ze względu na prostotę pomiaru, analiza próbki może być wykonywana w miejscu jej występowania, a wynik otrzymywany jest natychmiast.

Zalety spektroskopowych technik odcisku palca sprawiają, że są one szeroko stosowane w rutynowej kontroli jakości oraz kontroli procesów produkcji żywności, a rozwijanie nowych zastosowań jest przedmiotem intensywnych badań.

## 2.4. Spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni

### Podstawy teoretyczne

Rejon bliskiej podczerwieni rozciąga się pomiędzy rejonem podstawowej podczerwieni i widzialnym, i obejmuje promieniowanie w zakresie 780–2500 nm ( $12\,820\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ). W zakresie tym obserwuje się pasma pochodzące od nadtonów i tonów kombinacyjnych drgań podstawowych występujących w zakresie MIR.

#### *Oscylator anharmoniczny*

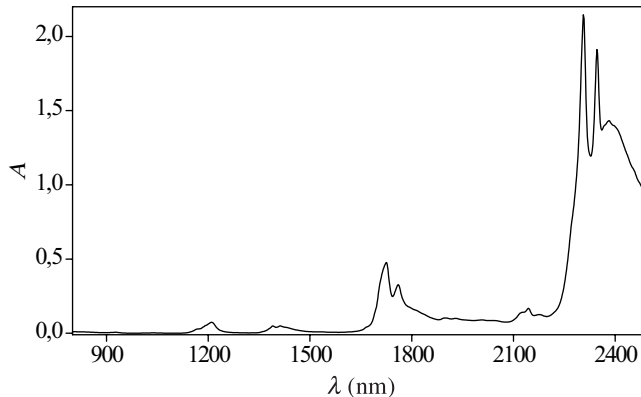
Widma w zakresie NIR są w znacznym stopniu konsekwencją dużej anharmoniczności drgających grup atomów. Warto tu przypomnieć, że w modelu oscylatora anharmonicznego energię potencjalną opisuje asymetryczna krzywa Morse'a (rysunek 2.2). Różnice energii poziomów oscylacyjnych maleją wraz ze wzrostem kwantowej liczby oscylacji  $v$ . Oprócz przejść podstawowych możliwe są nadtony, przejścia do wyższych poziomów oscylacyjnych z pominięciem poziomów pośrednich, czyli takie, w których kwantowa liczba oscylacji zmienia się o wartości różne od jeden. Prawdopodobieństwo tych przejść jest tym większe, im bardziej anharmoniczny charakter wykazuje drganie. Ponieważ dużym stopniem anharmoniczności charakteryzują się wiązania atomu wodoru z cięższymi atomami takimi jak węgiel, tlen, azot, siarka (C–H, O–H, N–H lub S–H), w widmie NIR obserwuje się głównie pasma pochodzące od drgań tych wiązań (Sileoni, Marconi i Perretti, 2015).

Pasma odpowiadające nadtonom występują przy częstościach odpowiadających wielokrotnościom częstości drgań podstawowych. Dla każdego pasma drgań podstawowych aktywnych w zakresie MIR istnieje seria pasm nadtonów (Shenk, Workman i Westerhaus, 2007). W zakresie NIR występują cztery nadtony, ale czwarty ze względu na niską intensywność jest często pomijany.

Intensywność pasm w widmie NIR jest związana z wielkością zmiany momentu dipolowego w czasie drgania oraz stopniem jego anharmoniczności. Pierwsze i wyższe nadtony charakteryzują się mniejszym prawdopodobieństwem niż drgania podstawowe, z tego względu pasma im odpowiadające mają mniejszą intensywność niż odpowiednie pasma w zakresie MIR. W zakresie NIR występują ponadto drgania kombinacyjne będące wynikiem oddziaływań drgań podstawowych występujących w wieloatomowych cząsteczkach. Ich pasma występują przy częstościach będących sumą częstości oddziałujących drgań. Dla drgań kombinacyjnych dozwolonych ze względu na anharmoniczny charakter tylko jedno z nich musi być aktywne, tzn. powodować zmianę momentu dipolowego. W rezultacie pewne drgania, które nie są aktywne w MIR, mogą występować w zakresie NIR (Sileoni i in., 2015).

### Widma w zakresie NIR

Widmo w zakresie NIR przedstawia się w postaci zależności absorbancji (lub  $\log 1/R$ ) od długości fali lub liczby falowej. Przykładowe widmo NIR dla oliwy z oliwek rafinowanej przedstawiono na rysunku 2.12.



**Rysunek 2.12. Widmo NIR oliwy z oliwek rafinowanej**

Absorpcja w zakresie NIR pochodzi od grup zawierających atom wodoru: C–H (metylowych, aromatycznych, metylenowych, metoksyłowych, karboksylowych), N–H (amidowych i aminowych, pierwszo- i drugorzędowych), O–H (w alkoholach i wodzie), S–H oraz grupy C=O. Wszystkie te grupy występują w związkach organicznych i absorbują promieniowanie w zakresie MIR (Agelet i Hurburgh, 2010; Shenk i in., 2007).

Widmo NIR dzieli się na zakres krótkofalowy (*short-wave* NIR, SW-NIR) od 780 do 1300 nm i właściwy NIR od 1300 do 2500 nm. Zakres krótkofalowy obejmuje wyższe nadtony, a powyżej 1300 nm obserwuje się pierwsze i drugie nadtony oraz drgania kombinacyjne występujące w zakresie 1900–2500 nm (Agelet i Hurburgh, 2010). Pasma w zakresie NIR są zwykle 10–100 razy mniej intensywne niż odpowiadające im pasma drgań podstawowych w zakresie MIR. Pasma absorpcji w zakresie NIR są szerokie (ich szerokość spektralna może wynosić 50–100 nm) i silnie się nakładają. Pasma występujące w długofalowym zakresie widma (niższe wartości liczb falowych) są bardziej intensywne, węższe i lepiej rozdzielone w stosunku do pasm pochodzących od odpowiednich wyższych nadtonów występujących w krótkofalowym zakresie widma (zakresie wyższych wartości liczb falowych). Charakterystyczne dla widm NIR obniżenie intensywności pasm w kierunku od długo- do krótkofalowego zakresu jest wynikiem malejącego prawdopodobieństwa występowania nadtonów wraz ze wzrastającym rzędem nadtonu (Shenk i in., 2007).

Większość związków organicznych wykazuje charakterystyczne pasma w zakresie NIR. Jednak ze względu na charakter widm NIR ich przypisanie odpowiednim związkom chemicznym i interpretowanie w sposób tak bezpośredni jak widma MIR jest znacznie trudniejsze. Widma NIR są przede wszystkim stosowane w połączeniu z analizą chemometryczną do jakościowej i ilościowej analizy żywności (Shenk i in., 2007). Oprócz informacji o chemicznych składnikach próbki, widma NIR zawierają informacje o właściwościach fizycznych. Na przykład różnice wielkości cząstek (drobin w proszku, kryształów itp.) powodują przesunięcia linii podstawowej widma. Większy rozmiar cząstek wpływa na głębszą penetrację światła i wyższe wartości absorbancji.

Mniejsza intensywność pasm NIR niż MIR jest zaletą, gdyż umożliwia bezpośrednią analizę silnie absorbujących i rozpraszających promieniowanie próbek takich jak żywność. Wybór zakresu spektralnego do analizy powinien uwzględniać właściwości promieniowania NIR oraz właściwości fizyczne i chemiczne próbki. W zakresie NIR wraz ze wzrostem długości fali wzrasta rozproszenie światła i absorbancja, natomiast zmniejsza się nakładanie pasm oraz głębokość penetracji. Pomiar składników, których pasma nie są dobrze rozdzielone od składników matrycy lub występujących w niskich stężeniach, wykonuje się zazwyczaj w długofalowym zakresie. Ze względu na intensywność absorpcji w SW-NIR stosuje się często pomiary transmitancji, natomiast we właściwym NIR pomiary dyfuzyjnego odbicia (Cen i He, 2007).

## Absorpcja grup funkcyjnych w zakresie NIR

W tabeli 2.8 przedstawiono wybrane pasma absorpcji grup zawierających wodor w zakresie NIR.

### *Węglowodory*

Dla węglowodorów alifatycznych pierwszy nadton drgań rozciągających C–H jest obserwowany w zakresie 1600–1800 nm; drugi nadton – w zakresie 1150–1210 nm, trzeci zaś – przy 880–915 nm.

Widmo NIR może służyć do badania nienasyconych węglowodorów. Mimo że pasma C=C i C≡C nie są obserwowane bezpośrednio w zakresie NIR, rozróżnienie węglowodorów nasyconych i nienasyconych jest możliwe na podstawie pasm sąsiadujących z wiązaniem nienasyconym grup C–H.

W węglowodorach aromatycznych pierwszy i drugi nadton drgań rozciągających C–H występują odpowiednio w zakresach 1600–1800 i 1100–1250 nm. Obserwuje się również serię pasm drgań kombinacyjnych w zakresach 2100–2250 i 2450–2500 nm. Podstawienie w pierścieniu wpływa na pozycję tych pasm (Stuart, 2005).

**Tabela 2.8. Charakterystyczne pasma absorpcji grup funkcyjnych zawierających wodór w zakresie NIR**

Charakterystyka	$\lambda$ (nm)
Trzeci nadton N–H rozciągające	775–850
Trzeci nadton C–H rozciągające	850–950
Drugi nadton N–H rozciągające, drugi nadton O–H rozciągające	950–1100
Drugi nadton C–H rozciągające	1100–1225
Kombinacyjne C–H rozciągające	1300–1420
Pierwszy nadton N–H rozciągające, pierwszy nadton O–H rozciągające	1400–1500
Pierwszy nadton C–H rozciągające	1650–1800
Kombinacyjne N–H rozciągające, kombinacyjne O–H rozciągające	2000–2200
Kombinacyjne C–H rozciągające	2200–2450

Źródło: na podstawie (Stuart, 2005).

### *Grupa hydroksylowa*

Alkohole i kwasy organiczne wykazują pasma kombinacyjne i nadtony drgań rozciągających O–H w zakresach 1900–2200 nm i 1400–1650 nm. Pozycja i kształt tych pasm zależy od obecności wiązań wodorowych (Stuart, 2005).

W widmie NIR wody obserwuje się pasma drgań O–H. Pasma przy 1442 nm jest typowe dla pierwszego nadtonu drgań rozciągających O–H. Pasma przy 1932 nm pochodzi od drgań kombinacyjnych O–H rozciągających i zginających.

Pomiary roztworów wodnych, trudne w zakresie MIR ze względu na nasycenie pasm, są znacznie łatwiejsze w zakresie NIR. Przy pomiarach roztworów wodnych należy uwzględnić wpływ temperatury. Przyczyną obserwowanych zmian w widmach NIR wody pod wpływem temperatury są zmiany mocy wiązań wodorowych. Ze względu na różnicę położenia pasm absorpcji wolnych i związanych grup O–H spektroskopię NIR stosuje się m.in. w badaniach wiązań wodorowych (Abo, 2007).

### *Grupa karbonylowa*

W widmach NIR pasma nadtonów grupy karbonylowej C=O powinny występować przy 1160, 1450 i 1950 nm. Nawet jeśli obserwuje się je dla niektórych związków, ze względu na niską intensywność nie wykorzystuje się ich do celów analitycznych.

### *Grupy zawierające azot*

Aminy pierwszorzędowe wykazują pasma przy 1000, 1450 i 1550 nm, odpowiadające nadtonom drgań rozciągających N–H. Trzeciorzędowe aminy nie wyka-



zują nadtonów N–H, ale charakterystyczne są dla nich pasma drgań kombinacyjnych i rozciągających w zakresie 1260–1270 nm.

Pierwszorzędowe amidy charakteryzuje występowanie pasm kombinacyjnych przy 1930–2250 nm i nadtonu drgań rozciągających N–H w zakresie 1450–1550 nm. Drugorzędowe amidy wykazują pasmo nadtonów w zakresie 1350–1550 nm i kombinacyjne w zakresie 1990–2250 nm (Stuart, 2005).

## Widma składników żywności w zakresie NIR

Główne składniki żywności: woda, lipidy, białka i węglowodany wykazują charakterystyczne pasma w zakresie NIR.

### *Woda*

Pasma absorpcji wody pochodzące od drugich i pierwszych nadtonów drgań rozciągających wiązań O–H i drgań kombinacyjnych, rozciągających i zginających O–H, występują w widmie odpowiednio przy około 970, 1400–1450 i 1920–1950 nm (Cozzolino i in., 2007). Pasma te są czułe na zmiany temperatury. Wraz ze wzrostem temperatury w zakresie od 25 do 80°C obserwuje się wzrost intensywności pasm (1400–1450 i 1920–1950 nm) i ich przesunięcie w stronę fal krótszych (Czarnik-Matusiewicz, Pilorz i Hawranek, 2005). Na charakterystykę widm wody wpływa tworzenie wiązań wodorowych, które powoduje przesunięcie pasm absorpcji w stronę fal dłuższych. W wyniku zrywania wiązań wodorowych następuje przesunięcie w kierunku fal krótszych (Shenk i in., 2007).

### *Lipidy*

Pasma absorpcji lipidów w zakresie NIR przedstawiono w tabeli 2.9. Charakterystyczna dla kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład triacylogliceroli, jest absorpcja grup C–H (1680–1760 i 2300–2350 nm), która jest wykorzystywana do oznaczania tłuszczu w produktach spożywczych.

### *Białka*

Białka wykazują charakterystyczne pasma absorpcji grupy N–H przy 1560–1670 i 2080–2220 nm. Charakterystyczne dla białek pasma absorpcji NIR przedstawiono w tabeli 2.10.

### *Węglowodany*

Węglowodany wykazują absorpcję w zakresie NIR, pochodzącą od grup C–H i O–H (tabela 2.11).

**Tabela 2.9. Charakterystyczne pasma absorpcji lipidów w zakresie NIR**

Charakterystyka	$\lambda$ (nm)
Drugi nadton C–H rozciągające grupy CH <sub>2</sub>	1208
Kombinacyjne: 2 × C–H rozciągające i C–H zginające grupy CH <sub>2</sub>	1416
Pierwszy nadton C–H rozciągające grupy CH <sub>3</sub>	1742
Pierwszy nadton C–H rozciągające grupy CH <sub>2</sub>	1760
Kombinacyjne: =C–H rozciągające i C=C rozciągające	2144
Kombinacyjne: CH <sub>2</sub> asymetryczne rozciągające i C=C rozciągające	2190
Kombinacyjne: C–H rozciągające i C–H zginające grupy CH <sub>2</sub>	2304
Kombinacyjne: C–H symetryczne rozciągające CH <sub>2</sub> i =CH <sub>2</sub> zginające	2348
Kombinacyjne: C–H rozciągające CH <sub>2</sub> i C–C rozciągające	2380

Źródło: na podstawie (Dufour, 2009).

**Tabela 2.10. Charakterystyczne pasma absorpcji białek w zakresie NIR**

Charakterystyka	$\lambda$ (nm)
Pierwszy nadton N–H rozciągające	1510
Kombinacyjne: N–H symetryczne rozciągające i amidowe I	2055
Drugi nadton N–H zginające lub	
Kombinacyjne: N–H zginające i N–H rozciągające	2060
Drugi nadton N–H zginające;	
Kombinacyjne: C–H rozciągające i C=O rozciągające;	
Kombinacyjne: C=O rozciągające i amidowe III	2180
Drugi nadton C–H zginające	2300
Drugi nadton CH <sub>2</sub> zginające	2352
Pierwszy nadton C–N–C symetryczne rozciągające	2470
Pierwszy nadton C–N–C asymetryczne rozciągające	2530

Źródło: na podstawie (Shenk i in., 2007).

**Tabela 2.11. Charakterystyczne pasma absorpcji węglowodanów w zakresie NIR**

Charakterystyka	$\lambda$ (nm)
Pierwszy nadton O–H rozciągające	1490
Pierwszy nadton C–H rozciągające	1780
Drugi nadton O–H rozciągające i C–O rozciągające	1820
Kombinacyjne: C–H rozciągające i C–H zginające	2335
Kombinacyjne: CH <sub>2</sub> symetryczne rozciągające i =CH <sub>2</sub> zginające	2347
Drugi nadton CH <sub>2</sub> zginające	2352
Kombinacyjne: C–H rozciągające i C–C rozciągające	2488

Źródło: na podstawie (Shenk i in., 2007).

### *Zastosowania spektroskopii NIR w badaniach żywności*

Spektroskopia w zakresie NIR w badaniach żywności jest stosowana przede wszystkim w połączeniu z metodami chemometrycznymi jako metoda odcisku palca. Metoda ta jest szeroko wykorzystywana w rutynowej kontroli jakości żywności, przede wszystkim do oznaczania głównych składników produktów spożywczych. Jest to również podstawowa metoda kontroli procesów produkcyjnych, umożliwiającą wdrożenie PAT w przemyśle spożywczym.

Zagadnienia dotyczące zastosowań spektroskopii w zakresie NIR w badaniach żywności zostały przedstawione w wielu pracach przeglądowych, omawiali je m.in: Agelet i Hurburgh (2010), Baeten i Dardenne (2002), Blanco i Villarroya (2002), Lohumi, Lee, Lee i Cho (2015), McClure (1994), Wetzel (1983) oraz Zalewski (2005).

## **2.5. Spektroskopia w zakresie nadfioletu i widzialnym**

### **Podstawy teoretyczne**

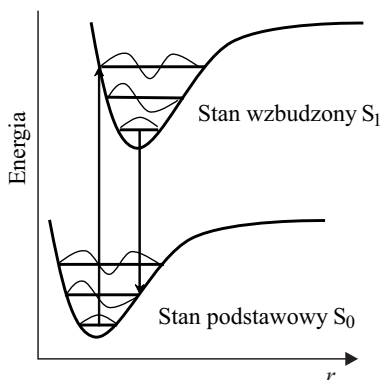
Spektroskopia absorpcyjna w zakresie UV i Vis obejmuje oddziaływania materii z promieniowaniem z zakresu 180–380 nm (UV) i 380–780 nm (Vis). Energia fotonów z tego zakresu odpowiada przejściom elektronów walencyjnych atomów i elektronów tworzących wiązania w cząsteczkach. Absorpcja promieniowania powoduje przejście elektronu z orbitalu cząsteczkowego w stanie podstawowym na nieobsadzony orbital w stanie wzbudzonym (Valeur, 2001).

### *Przejścia elektronowe*

W temperaturze pokojowej, zgodnie z rozkładem Boltzmana, większość cząsteczek znajduje się na najniższym, zerowym poziomie oscylacyjnym elektronowego stanu podstawowego. Elektronowy stan podstawowy cząsteczek związków organicznych jest zwykle stanem singletowym. Stanem singletowym atomu lub cząsteczki jest stan, w którym wypadkowy spin elektronowy  $S$  jest równy zero. Stanem trypletowym jest stan, w którym  $S = 1$ . Multipletowość odpowiednich stanów wynosi  $2S + 1$ , a więc jeden dla stanu singletowego i trzy dla stanu trypletowego. Dla dwóch elektronów stan o spinach ustawionych antyrównoległe (sparowanych) jest stanem singletowym, a stan o spinach ustawionych równoległe (niesparowanych) – stanem trypletowym.

W wyniku absorpcji fotonu następuje wzbudzenie elektronu z cząsteczkowego orbitalu wiążącego na antywiązący (Valeur, 2001). Zgodnie z przybliżeniem Borna-Oppenheimera ruch elektronów jest znacznie szybszy niż ruch jąder atomowych. Wzbudzenie elektronu zachodzi w czasie około  $10^{-15}$  s, który jest

znacznie krótszy niż czas drgań cząsteczkowych wynoszący  $10^{-12}$ – $10^{-10}$  s. Ta obserwacja stanowi podstawę reguły Francka-Conдона, zgodnie z którą przejścia elektronowe zachodzą bez zmiany położenia jąder atomowych w cząsteczce i względem otoczenia. Powstający bezpośrednio w wyniku wzbudzenia elektronowego stan nazywany jest stanem Francka-Conдона, a przejście – wertykalnym.



**Rysunek 2.13. Krzywe energii potencjalnej cząsteczki dwuatomowej w elektronowym stanie podstawowym S<sub>0</sub> i wzbudzonym S<sub>1</sub>**

Objaśnienia:  $r$  – odległość międzyjądrowa

Źródło: na podstawie (Valeur, 2001).

Na rysunku 2.13 przedstawiono diagram poziomów energetycznych w podstawowym i wzbudzonym stanie elektronowym, reprezentowany przez krzywą Morse'a, jako funkcję konfiguracji jąder (w wypadku cząsteczki dwuatomowej – odległości między jądrami atomowymi). Oprócz „czystego” przejścia elektronowego 0–0, tzn. zachodzącego między zerowymi poziomami oscylacyjnymi stanów S<sub>0</sub> i S<sub>1</sub> (oraz ewentualnie S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, ..., S<sub>n</sub>), zachodzą przejścia do różnych poziomów oscylacyjnych stanu S<sub>1</sub>, których intensywność zależy od względnej pozycji i kształtu funkcji energii potencjalnej w stanie podstawowym i wzbudzonym. Zatem zmianom energii elektronowej towarzyszą zmiany energii oscylacyjnej i rotacyjnej cząsteczki. W konsekwencji na jedno przejście elektronowe składa się wiele przejść do różnych poziomów oscylacyjnych i rotacyjnych danego wyższego stanu elektronowego. Przejścia te określają szerokość i kształt pasm w widmach absorpcji. Struktura związana z przejściami oscylacyjnymi i rotacyjnymi towarzyszącymi przejściom elektronowym ujawnia się w widmach rejestrowanych w fazie gazowej.

Dodatkowo poszerzenie pasm absorpcji w roztworach wynika z fluktuacji struktury klatki rozpuszczalnika otaczającej cząsteczkę. W efekcie w widmach

absorpcji cząsteczek w zakresie UV Vis obserwuje się szerokie pasma pozbawione struktury odpowiadające kolejnym przejściom elektronowym.

Przy zachowaniu odpowiednich warunków pomiaru absorpcją próbki opisuje prawo Lamberta-Beera (por. wzór (2.15)). Molowy współczynnik absorpcji  $\varepsilon$  określa zdolność cząsteczki do absorpcji promieniowania w określonych warunkach (rozpuszczalniku, stanie skupienia, temperaturze).

W klasycznej teorii absorpcji promieniowania cząsteczka jest rozpatrywana jako oscylujący dipol, którego siła oscylatora  $f$  jest bezpośrednio związana z całą pasmą absorpcji:

$$f = 2303 \frac{mc^2}{N_a \pi e^2 n} \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} = \frac{4,32 \cdot 10^{-9}}{n} \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu}, \quad (2.24)$$

gdzie:

- $m$  i  $e$  – masa i ładunek elektronu,
- $c$  – prędkość światła,
- $n$  – współczynnik załamania światła,
- $\bar{\nu}$  – liczba falowa (w  $\text{cm}^{-1}$ ).

Wielkość  $f$  jest bezwymiarowa i znormalizowana do 1. Dla przejść wzbronionych wartości  $f$  są nie większe niż  $\sim 10^{-3}$  i odpowiadają wartościom  $\varepsilon$  rzędu  $10^2$  lub mniejszym. Dla przejść dozwolonych wartości  $f$  i  $\varepsilon$  są znacznie wyższe. Dla niektórych przejść  $f$  jest bliskie 1, co odpowiada wartościom  $\varepsilon$  rzędu  $10^5$ .

Na gruncie mechaniki kwantowej przejście między dwoma stanami opisuje moment przejścia. Na tej podstawie zostały określone podstawowe reguły wyboru dla przejść elektronowych. Wzbronione są przejścia elektronowe między stanami o różnej multipletowości. Dozwolone są natomiast przejścia między stanami o tej samej multipletowości. Mimo tej reguły przejścia singlet-tryplet są obserwowane, ze względu na sprzężenie spin-orbita, ale charakteryzują się niską intensywnością.

Przejścia elektronowe mogą być wzbronione ze względu na symetrię. Również te przejścia są obserwowane ze względu na tzw. sprzężenie wibronowe, ale charakteryzują się małą intensywnością i ich pasma posiadają strukturę oscylacyjną.

### *Rodzaje przejść elektronowych*

W cząsteczkach związków organicznych elektrony tworzące wiązania znajdują się na orbitalach cząsteczkowych, powstałych z odpowiednich orbitali atomowych (Valeur, 2001). Orbitale cząsteczkowe (wiązania) typu  $\sigma$  tworzone są

Absorpcja jest mierzona jednocześnie w całym zakresie spektralnym, a czas pomiaru, gdy otwarta jest przesłona, jest bardzo krótki. Dzięki krótkiemu czasowi ekspozycji na promieniowanie próbka i odnośnik mogą być umieszczone bezpośrednio za źródłem. Rozdzielczość zależy od liczby diod w szeregu i ich charakterystyki. Taki sposób pomiaru umożliwia badanie próbek w ruchu, w rotujących kuwetach lub przemieszczających się np. na linii produkcyjnej. Przyrządy te nie zawierają ruchomych części, są stabilne i odporne. Spektrofotometry wielokanałowe mogą mieć także konfigurację przyrządów dwuwiazkowych (Steiner, 2005).

Spektrofotometry z nieruchomą siatką dyfrakcyjną i szeregiem fotodiod w roli detektora stanowią tańszą konfigurację w stosunku do spektrofotometrów skanujących. Dużą zaletą takiego układu jest możliwość miniaturyzacji (Xie i in., 2016).

### **Spektrofotometry LED**

Spektrofotometry ze źródłami w postaci diod emitujących promieniowanie (*light-emitting diode*, LED) pracują przy wybranych długościach fali. Nie mają ruchomych części. Ze względu na zastosowanie źródeł LED emitujących promieniowanie w postaci wąskich pasm przy wybranych, dyskretnych długościach fali w tych przyrządach nie ma potrzeby stosowania selektora długości fali w postaci monochromatorów lub filtrów. Filtry interferencyjne mogą być stosowane w celu ograniczenia szerokości spektralnej wiązki. Zaletą jest możliwość miniaturyzacji i duża stabilność źródeł promieniowania (Steiner, 2005). Przyrządy mają kompaktową budowę i są przeznaczone do określonych zastosowań, ponieważ umożliwiają pomiary tylko przy kilku wybranych długościach fali. Dostępna jest ograniczona liczba diod LED (Xie i in., 2016).

### **Spektrofotometry z laserami diodowymi**

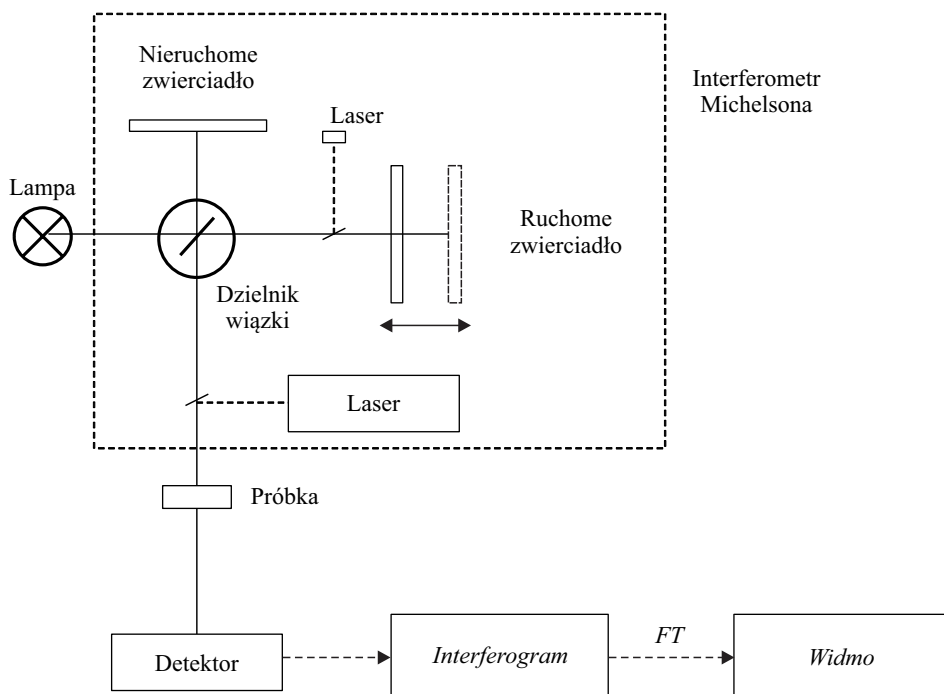
Spektrofotometry z laserami diodowymi jako źródłem promieniowania umożliwiają uzyskanie bardzo wąskiej wiązki promieniowania o znacznie wyższej intensywności w porównaniu z innymi spektrofotometrami. Tego rodzaju przyrządy nie są jednak powszechnie stosowane.

### **Spektrofotometry z transformacją Fouriera (FT)**

Spektrofotometry z transformacją Fouriera są stosowane do pomiarów w zakresie MIR i NIR (Agelet i Hurburgh, 2010). Pomiary w spektrofotometrach FT dokonywane są nie w domenie częstości, jak w przyrządach dyspersyjnych, a w domenie czasu. Bezpośrednim wynikiem pomiaru jest tzw. interferogram,

który przedstawia intensywność sygnału jako funkcję czasu, w przeciwieństwie do przyrządów dyspersyjnych, na których mierzone jest bezpośrednio widmo jako funkcja częstotliwości.

Schemat spektrofotometru FT MIR przedstawiono na rysunku 3.14. W spektrofotometrach z transformacją Fouriera pracujących w zakresie podczerwieni wykorzystuje się interferometr Michelsona. Promieniowanie podczerwone przez dzielnik wiązki jest dzielone na dwie wiązki o jednakowej intensywności. Dzielnik wiązki powinien odbijać około 90% promieniowania i nie wykazywać absorpcji w zakresie pomiarowym. Jedna z wiązek odbijana jest od nieruchomego zwierciadła, druga od zwierciadła ruchomego, którego ruch jest kontrolowany precyzyjnie, zwykle przez laser helowo-neonowy. Odbite wiązki ulegają interferencji. Różnica dróg optycznych wiązek, zależna od położenia ruchomego zwierciadła, prowadzi do różnego stopnia interferencji. Wiązka interferencyjna, po przejściu przez próbkę, dochodzi do detektora, który mierzy intensywność sygnału jako funkcję przesuwu zwierciadła lub funkcję czasu (pomiar w domenie czasu). Rejestrowany sygnał nazywa się interferogramem i zawiera informacje dla wszystkich długości fali mierzonego promieniowania. Z zastosowaniem



**Rysunek 3.14. Schemat spektrofotometru FT MIR**

Źródło: na podstawie (Kealey i Haines, 2006).

funkcji tzw. szybkiej transformaty Fouriera (*fast Fourier transform*, FFT) interferogram zostaje przekształcony w widmo (Agelet i Hurburgh, 2010).

Widmo badanej substancji otrzymuje się przez zarejestrowanie dwóch interferogramów: bez próbki w drodze optycznej oraz z próbką. Próbka absorbująca promieniowanie osłabia intensywność wiązki. Na kolejnym etapie interferogramy te są przekształcane osobno w widmo. Następnie oblicza się stosunek widma zarejestrowanego w obecności próbki do widma otrzymanego dla tła lub odnośnika. Stosunek ten zależy jedynie od absorpcji promieniowania przez próbkę. Jedno przejście promieniowania przez próbkę pozwala na rejestrację widma w całym zakresie spektralnym.

Spektrofotometry FT MIR charakteryzują się wieloma zaletami w porównaniu z tradycyjnymi przyrządami, ze względu na zastosowanie w nich interferometru. Jedną z zalet jest jednoczesna detekcja wszystkich częstotliwości promieniowania, co pozwala na skrócenie czasu pomiaru i uzyskanie lepszego stosunku sygnału do szumu. Jest to tzw. korzyść Fellgetta (zysk multipleksowy). Jedno przejście promieniowania przez próbkę pozwala na rejestrację widma w całym zakresie spektralnym. W zależności od rozdzielczości spektralnej i odpowiedzi detektora, czas rejestracji jednego widma może wynosić od 0,01 do 1 s. Umożliwia to akumulację wielu skanów dla uzyskania odpowiedniego stosunku sygnału do szumu.

Kolejna zaleta – tzw. korzyść Jacquinota (zysk przepustowości) – wynika z braku szczelin ograniczających wiązkę promieniowania, dzięki czemu większa jest zdolność przepustowa układu optycznego i do detektora dociera znacznie więcej promieniowania niż w przyrządach dyspersyjnych. Pozwala to na uzyskanie lepszego stosunku sygnału do szumu.

Ważną zaletą wynikającą z zasady pomiaru jest wyjątkowa dokładność ustalenia częstotliwości – lepsza niż  $0,01\text{ cm}^{-1}$ . Jest to tzw. korzyść Connes (zysk rejestracji). Rozdzielczość spektralna zależy od klasy przyrządu. W spektrofotometrach do rutynowych pomiarów wynosi około  $1\text{ cm}^{-1}$ , w przyrządach badawczych może osiągać nawet do  $0,001\text{ cm}^{-1}$ . Dodatkową zaletą przyrządów jest możliwość wyboru rozdzielczości spektralnej.

Przekształcenia matematyczne obejmujące odjęcie tła i uśrednienie wielokrotnego skanowania pozwalają na uzyskanie dokładniejszych widm. Do zalet przyrządów FT MIR w porównaniu z dyspersyjnymi należą również: prosta budowa oraz brak problemów wynikających z rozproszenia światła.

Spektrofotometry FT NIR działają na podobnej zasadzie jak FT MIR (Sablinskas, 2003). Umożliwiają uzyskanie znacznie wyższej rozdzielczości spektralnej niż w spektrofotometrach dyspersyjnych. Typowo na przyrządach FT NIR uzyskuje się rozdzielczość  $8\text{--}16\text{ cm}^{-1}$ , a na przyrządach dyspersyjnych wynosi ona około  $50\text{ cm}^{-1}$  przy liczbie falowej około  $10\,000\text{ cm}^{-1}$ . Z drugiej strony uważa się, że spektrofotometry dyspersyjne NIR charakteryzują się lepszą powtarzalnością pomiarów absorbancji w porównaniu z FT NIR (Abo, 2007).



### 3.3.2. Elementy budowy spektrofotometrów absorpcyjnych

#### Źródła promieniowania

Idealne źródła promieniowania powinny się charakteryzować emisją w odpowiednio szerokim zakresie spektralnym, stałą intensywnością, niskim poziomem szumów i długoterminową stabilnością. Rzeczywiste źródła światła zwykle nie spełniają tych warunków (Owen, 2000). W praktyce na pracę źródła promieniowania może wpływać wiele czynników, m.in. zmiany temperatury i niestabilność systemu zasilania (Xie i in., 2016).

Stabilność światła emitowanego przez źródło jest krytycznym czynnikiem pracy spektrofotometru. Zanim dokona się pomiarów próbki, wykonywana jest kalibracja obejmująca pomiar przy wyłączonym dopływie światła do detektora oraz pomiar widma odnośnika. Absorbancja  $A$  wyznaczana jest według wzoru:

$$A = -\log \left( \frac{I_{\text{próbka}} - I_{\text{prąd ciemny}}}{I_{\text{odnośnik}} - I_{\text{prąd ciemny}}} \right), \quad (3.8)$$

gdzie:

- $I_{\text{próbka}}$  – intensywność promieniowania odbitego lub przepuszczonego przez próbkę,
- $I_{\text{prąd ciemny}}$  – sygnał z detektora przy wyłączonym dopływie światła,
- $I_{\text{odnośnik}}$  – intensywność promieniowania odbitego lub przepuszczonego przez odnośnik.

Pomiar widma odnośnika powinien być wykonywany w takich samych warunkach, w jakich wykonuje się pomiary próbek.

W przyrządach wykorzystuje się źródła termiczne i nietermiczne. Do źródeł termicznych zalicza się włókno Nernsta, lampy wolframowo-halogenowe lub lampy wolframowe. Do zalet lamp wolframowo-halogenowych należą szeroki zakres emisji obejmujący promieniowanie Vis i NIR oraz niska cena. Wadami są: emitowanie dużej ilości ciepła, które może niekorzystnie działać na próbkę, ograniczony czas życia, możliwość zmian intensywności emisji w czasie i jej zależność od długości fali (Agelet i Hurburgh, 2010).

Źródła nietermiczne obejmują m.in.: lampy wyładowcze, diody emitujące światło (LED) oraz lasery tradycyjne i diodowe. Źródła te są bardziej wydajne, emitują promieniowanie w węższym zakresie i mogą być regulowane elektronicznie.

Diody emitujące światło mają wiele zalet: długi czas życia, nie są czułe na wibracje, nie emitują ciepła. Emitują promieniowanie w określonym zakresie.

Jeśli wymagany jest szerszy zakres długości fali, można wykorzystać kilka diod wraz z filtrami interferencyjnymi wąskopasmowymi, jednak takie rozwiązanie zwiększa koszty przyrządu. Ponadto dość szerokie pasma emitowane przez LED w zakresie około 30–50 nm wokół podstawowej długości fali mogą wymagać zastosowania monochromatora (Xie i in., 2016). Źródła te w ostatnich latach są udoskonalane, np. w niektórych przyrządach komercyjnych możliwe jest łatwe przełączanie źródła LED w zależności od aplikacji. Są dobrym źródłem w miniaturowych, przenośnych przyrządach do zastosowań poza laboratorium (Agelet i Hurburgh, 2010).

Najbardziej nowoczesnymi źródłami są przestrajalne lasery diodowe. Lasery te są znacznie mniejsze i tańsze od tradycyjnych, zapewniają świetną rozdzielczość spektralną, jaśniejsze światło i niższy poziom szumów w porównaniu z lampami halogenowymi (Agelet i Hurburgh, 2010).

Jednym z podstawowych kryteriów wyboru źródła światła jest zakres spektralny wymagany do pomiarów. W tabeli 3.2 przedstawiono zakresy emisji wybranych źródeł promieniowania.

**Tabela 3.2. Źródła promieniowania o widmie ciągłym stosowane w spektroskopii absorpcyjnej**

Źródło	Zakres długości fali (nm)	Zastosowania
Lampa ksenonowa	250–600	UV Vis
Lampa wodorowa i deuterowa	160–380	UV
Lampa wolframowo-halogenowa	240–2500	Vis NIR
Lampa wolframowa	350–2200	Vis NIR
Włókno Nernsta	400–20 000	MIR
Globar	1200–40 000	MIR

Źródło: na podstawie (Skoog i in., 2007).

W zakresie MIR jako źródła promieniowania stosuje się włókno Nernsta. Jest to podgrzewane ceramiczne włókno zawierające tlenki pierwiastków ziem rzadkich – ceru, cyrkonu, toru i itru. Innym źródłem stosowanym w MIR jest Globar, pręt wykonany z węgla krzemu (SiC).

W zakresie NIR powszechnie stosowane są lampy wolframowo-halogenowe. Nowe źródła promieniowania obejmują diody emitujące światło (LED) i lasery diodowe. Wybór źródła światła w NIR uzależniony jest m.in. od stosowanej metody pomiaru próbki. Konfiguracja i intensywność oświetlenia próbki powinny być dostosowane do metody pomiaru. W wypadku pomiarów odbicia i in-teraktancji długość drogi optycznej jest krótsza niż w pomiarach transmitancji i można stosować promieniowanie o mniejszej intensywności. Wystarczające są lampy o mocy 20–150 W (Xie i in., 2016).

W zakresie UV i Vis wykorzystywane się dwie lampy: łukowe lampy deuterowe, emitujące promieniowanie w zakresie UV, i lampy wolframowe lub halogenowe, emitujące w zakresie Vis. Automatyczny selektor przełącza odpowiednią dla danego zakresu lampę lub próbka jest naświetlana jednocześnie światłem z obu źródeł, połączonym w jedną wiązkę (Owen, 2000).

Łukowe lampy deuterowe charakteryzują się emisją promieniowania w zakresie 180–350 nm. Szum związany z emisją tych lamp często jest czynnikiem limitującym szum całego przyrządu. Ich intensywność w czasie eksploatacji częściowo się obniża. Połwkowy czas życia, w którym intensywność lampy spada do połowy wartości intensywności początkowej, wynosi około 1000 godzin (Owen, 2000; Sablinskas, 2003).

Lampy wolframowo-halogenowe charakteryzują się dobrą intensywnością emisji w zakresie widzialnym i NIR oraz w części zakresu UV, a także niskim poziomem szumu, małym dryftem i dłuższym czasem połwkowym życia wynoszącym około 10 000 godzin.

Dla całego zakresu UV Vis można stosować łukową lampę ksenonową emitującą promieniowanie w zakresie 175–1000 nm. Jednak ta emisja charakteryzuje się wysokim poziomem szumów. Z tego powodu jej zastosowanie ogranicza się do metody dyfuzyjnego odbicia, gdzie podstawowe znaczenie ma wysoka intensywność promieniowania. Do wybranych aplikacji w zakresie UV Vis możliwe jest zastosowanie przestrajalnych laserów (Owen, 2000).

## Detektory

Detektory przekształcają sygnał optyczny w postaci promieniowania w sygnał elektryczny (Agelet i Hurburgh, 2010). Sygnał jest wzmacniany i przekształcany w cyfrowy, który dalej może być przetwarzany przez komputer. Detektory powinny charakteryzować się liniową funkcją odpowiedzi w szerokim zakresie, wysoką czułością i niskim poziomem szumów.

Efektywny detektor powinien się charakteryzować liniową zależnością między intensywnością promieniowania a sygnałem w całym dynamicznym zakresie pracy, tzn. od minimalnego wykrywalnego sygnału do maksimum przed osiągnięciem nasycenia. Mierzona liniowość zależy od charakterystyki detektora, a także od innych czynników, m.in. liczby bitów przetwornika analogowo-cyfrowego, niewielkich nieprawidłowości geometrii itp. (Xie i in., 2016).

Detektory i wzmacniacze są uznawane za najczęstsze źródła losowego szumu w przyrządzie. Szum ten w większości spektrofotometrów komercyjnych jest redukowany poprzez uśrednianie kilku widm danej próbki.

Zależnie od liczby dostępnych kanałów wyróżnia się detektory jedno- i wielokanałowe. Przy zastosowaniu detektorów jednokanałowych pomiar widma

## 4.5. Metody klasyfikacyjne

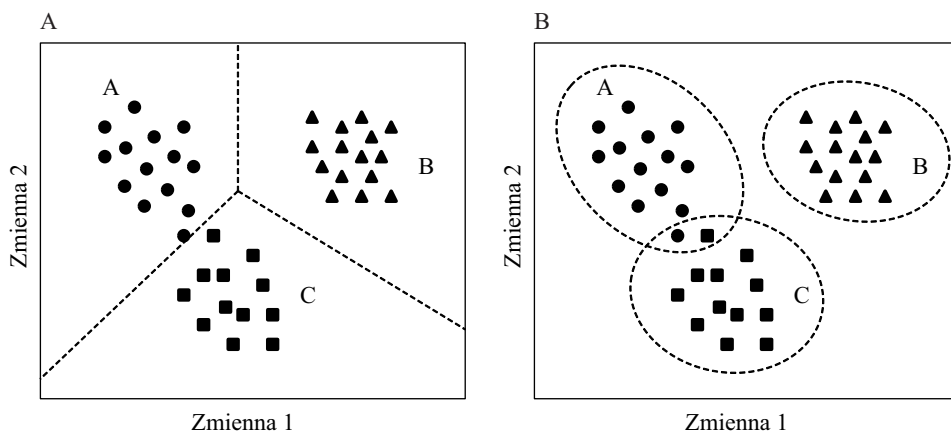
Metody klasyfikacyjne nazywane są również metodami rozpoznawania wzorców z nauczycielem. Metody te znajdują szerokie zastosowania w badaniach żywności, zwłaszcza w badaniach jej autentyczności, np. pochodzenia geograficznego, wytwarzania z zastosowaniem określonych procesów technologicznych, warunków uprawy lub hodowli itp.

Klasyfikacja polega na przypisaniu próbki do jednej lub kilku grup na podstawie podobieństwa jej cech do cech próbek należących do danej grupy. W interpretacji geometrycznej klasyfikacja odpowiada identyfikacji regionu w hiperprzestrzeni zmiennych odpowiadającego różnym klasom (Bevilacqua i in., 2013). Klasa lub grupa oznacza zbiór obiektów o podobnej charakterystyce. Definicja klasy zależy od rozwiązywanego problemu i celu analizy. W odróżnieniu od metod eksploracyjnych, w metodach klasyfikacyjnych klasy są zdefiniowane *a priori* i informacja o przynależności obiektu do określonej grupy jest wykorzystywana w procesie opracowania modelu klasyfikacyjnego.

Model klasyfikacyjny opisuje matematyczną zależność pomiędzy zmiennymi zależnymi (np. widmami) a jakościową zmienną niezależną – określającą przynależność próbki do danej grupy. Na podstawie opracowanego modelu możliwe jest określenie przynależności próbki do określonej grupy na podstawie jej cech (Ballabio i Todeschini, 2009).

Wśród metod klasyfikacji wyróżnia się metody dyskryminacyjne i modelowania klas. Ich ideę przedstawiono na rysunku 4.17.

W metodach dyskryminacyjnych kryterium klasyfikacji stanowią różnice między próbkami należącymi do różnych grup. Cała hiperprzestrzeń jest dzielona



**Rysunek 4.17. Różnica między metodami klasyfikacyjnymi: A – metody dyskryminacyjne i B – metody modelowania klas**

Źródło: na podstawie (Bevilacqua i in., 2013).

na na pewną liczbę obszarów odpowiadającą liczbie grup. Próbka jest przypisywana do odpowiedniej grupy na podstawie jej cech. Jeśli stosowane są metody dyskryminacyjne, każda z nowych próbek zostaje przypisana do jednej ze zdefiniowanych klas.

Metody modelowania klas opierają się na modelowaniu podobieństwa między obiektami należącymi do tej samej grupy. Odpowiada to określeniu w wielowymiarowej przestrzeni granicy oddzielającej część obejmującą daną klasę. Jeśli próbka znajduje się w tym obszarze, jest uznawana za należącą do danej klasy; w przeciwnym razie nie jest uznawana za jej członka. Każda klasa jest modelowana niezależnie. Część hiperprzestrzeni może odpowiadać więcej niż jednej klasie lub też żadnej z klas. W wyniku analizy próbka może być przypisana tylko do jednej klasy, do więcej niż jednej albo nie być przypisana do żadnej. Zaletą metod modelowania klas jest możliwość zidentyfikowania próbek, które nie należą do żadnej z badanych grup, a zatem mogą należeć do klas, które nie były uwzględniane przy tworzeniu modelu. Ponadto, ponieważ klasy są modelowane niezależnie, możliwe jest uzupełnienie istniejącego modelu o nową grupę, bez konieczności ponownych obliczeń dla klas już uwzględnionych w analizie. Metody modelowania klas są szczególnie przydatne w badaniach autentyczności żywności.

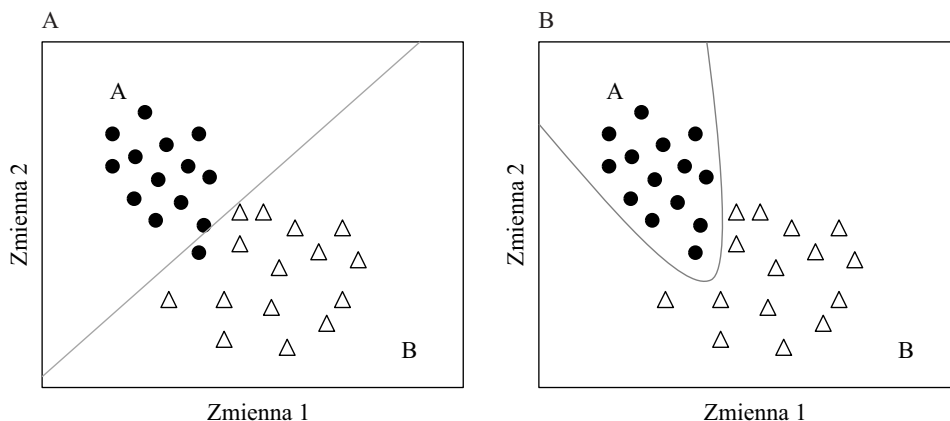
Inny podział metod klasyfikacyjnych opiera się na postaci matematycznej funkcji stanowiącej regułę klasyfikacyjną. Wyróżnia się metody liniowe i nieliniowe. W metodach liniowych reguły klasyfikacyjne prowadzą do wyznaczenia granicy decyzyjnej, która jest liniową funkcją oryginalnych zmiennych (linia w dwuwymiarowej przestrzeni; płaszczyzna w trójwymiarowej lub hiperpłaszczyzna w wyższych wymiarach). Reguły klasyfikacyjne dla metod nieliniowych wyznaczają bardziej złożone hiperpowierzchnie rozdzielające regiony odpowiadające różnym grupom. Metody nieliniowe dzieli się w zależności od rodzaju nieliniowości (np. na kwadratowe, wielomianowe itd.).

Metody klasyfikacyjne dzieli się ponadto na probabilistyczne i oparte na miarach odległości. Metody probabilistyczne opierają się na założeniach prawdopodobieństwa wystąpienia określonego rozkładu danych. Wyróżnia się wśród nich metody parametryczne i nieparametryczne. W metodach opartych na miarach odległości wyznacza się odległości między obiektami lub obiektami i modelami.

#### 4.5.1. Analiza dyskryminacyjna

Liniowa analiza dyskryminacyjna (*linear discriminant analysis*, LDA) została opracowana przez Fishera (1936). Metoda ta jest pierwszą opisaną w literaturze metodą klasyfikacji i powszechnie stosowaną ze względu na swoją prostotę i uniwersalność (Bevilacqua i in., 2013).

Metoda LDA jest techniką liniową (rysunek 4.18.A). Granice decyzyjne oddzielające klasy w wielowymiarowej przestrzeni zmiennych są hiperpłaszczyznami.



**Rysunek 4.18. Analiza dyskryminacyjna: A – liniowa analiza dyskryminacyjna; B – kwadratowa analiza dyskryminacyjna**

Źródło: na podstawie (Marini, 2010).

Liniowa analiza dyskryminacyjna polega na wyznaczeniu liniowej funkcji dyskryminacyjnej, będącej kombinacją oryginalnych zmiennych. Funkcja ta maksymalizuje stosunek zmienności między klasami i minimalizuje stosunek zmienności wewnątrz klas.

Jest to metoda parametryczna, opiera się na kilku założeniach: dla każdej grupy dane mają wielowymiarowy normalny rozkład, macierze wariancji/kowariancji dla różnych grup są porównywalne, grupy próbek powinny być liniowo separowalne, liczba próbek przewyższa liczbę zmiennych. Uważa się, że stosunek liczby próbek do liczby zmiennych powinien wynosić co najmniej 3 (Bevilacqua i in., 2013). Metoda LDA nie jest odpowiednia do analizy skorelowanych danych. Ze względu na ograniczenia dotyczące liczby próbek i zmiennych, przy analizie danych spektralnych stosuje się metody wyboru lub redukcji zmiennych, np. połączenie metody PCA i LDA.

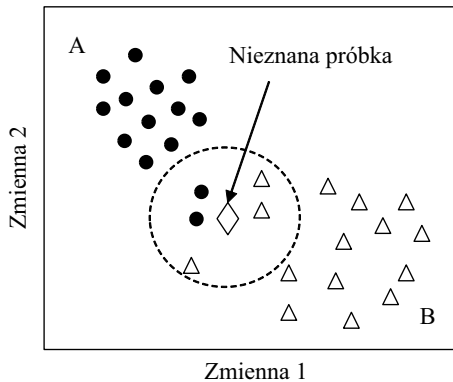
Metoda LDA może być rozpatrywana jako podobna do PCA metoda redukcji, w której wyznaczana jest hiperprzestrzeń, na którą dokonuje się projekcji punktów z przestrzeni o wyższym wymiarze. Jednakże w metodzie PCA w przestrzeni wybierany jest kierunek, który zachowuje maksymalnie strukturę danych, natomiast w metodzie LDA wybierany jest kierunek umożliwiający najlepszą separację klas. Zmienne otrzymywane w metodzie LDA, nazywane zmiennymi kanonicznymi, stanowią liniową kombinacją zmiennych wyjściowych.

Kwadratowa analiza dyskryminacyjna (*quadratic discriminant analysis*, QDA) jest rodzajem analizy dyskryminacyjnej, w której granice oddzielające poszczególne grupy są funkcjami kwadratowymi (rysunek 4.18.B). Jest ona mniej restrykcyjna niż LDA w odniesieniu do rozkładów obiektów w przestrzeni, ale wymagania dotyczące stosunku liczby próbek do liczby zmiennych są tu jeszcze bardziej restrykcyjne (Berrueta, Alonso-Salces i Héberger, 2007).

#### 4.5.2. Metoda najbliższych sąsiadów

Metoda  $k$  najbliższych sąsiadów (*k-nearest neighbors*,  $k$ NN) jest nieparametryczną metodą klasyfikacyjną (Marini, 2010). Oznacza to, że postać funkcji rozkładu prawdopodobieństwa nie jest zakładana *a priori*. W szczególności, w fazie modelowania dla każdej próbki jest wykorzystywana tylko lokalna informacja niesiona przez  $k$  najbliższych próbek.

Ideę metody  $k$ NN przedstawiono na rysunku 4.19.



**Rysunek 4.19. Metoda  $k$ -najbliższych sąsiadów,  $k = 5$**

Źródło: na podstawie (Marini, 2010).

Metoda ta polega na wyznaczeniu odległości między nieznanym obiektem a każdym obiektem w zbiorze uczącym. Odległość w hiperprzestrzeni jest definiowana zwykle jako odległość euklidesowa, ale stosuje się także inne miary, np. odległość manhattańską. Obiekty badane są przyporządkowane do odpowiednich klas na podstawie określenia ich odległości od  $k$  najbliższych sąsiadów. W najprostszym wariantcie badany obiekt jest uznawany za należący do klasy, do której przynależy większość  $k$  obiektów położonych w jego najbliższym sąsiedztwie. W przykładzie przedstawionym na rysunku 4.19, ponieważ spośród pięciu najbliższych sąsiadów nieznanej próbki dwie należą do klasy A, trzy zaś do klasy B, próbka zostaje przypisana do klasy B.

Optymalna wartość  $k$  wybierana jest na podstawie wyznaczonej zdolności przewidywania modeli dla różnych jej wartości. Najczęściej wybierane są małe wartości  $k$ , od 3 do 5, zwykle liczby nieparzyste. W celu uniknięcia efektów związanych z różnymi skalami zmiennych wymagane jest przekształcenie danych wyjściowych. Metoda ta może zostać wykorzystana również do analizy danych zredukowanych metodą PCA.

Metoda  $k$ NN charakteryzuje się kilkoma zaletami. Największą jest możliwość jej stosowania do większości danych. Nie jest tu wymagany określony stosunek liczby próbek do zmiennych. Jest stosunkowo prosta, nie wymaga skomplikowanego aparatu matematycznego, a pozwala uzyskać wyniki porównywalne z innymi, bardziej skomplikowanymi metodami lub lepsze od nich. Nie wymaga wstępnych założeń statystycznych, jak np. rozkład normalny próby, jej efektywność nie zależy od przestrzennego rozkładu klas. Może być wykorzystywana w sytuacji gdy liczba próbek jest niewielka oraz gdy występuje grupowanie wewnątrz klas.

Z drugiej strony metoda ma ograniczenia podobne do metody LDA. Nie jest odpowiednia dla analizy próbek, dla których występują duże różnice w liczebności poszczególnych klas. W takiej sytuacji można wykorzystać różne modyfikacje metody. Klasy zawierające większą liczbę próbek dominują w przypisywaniu przynależności nowym próbkom. Ten problem częściowo rozwiązuje wprowadzenie ważonych czynników, takich jak odległość między nieznaną próbką a jej najbliższym sąsiadem. Ponieważ metoda opiera się na wyznaczeniu odległości, problemem jest obecność szumów w postaci nieistotnych lub błędnie skalowanych zmiennych. Dlatego przy stosowaniu metody  $k$ NN rekomendowany jest staranny wybór zmiennych i sposobu ich przekształcania.

Metoda  $k$ NN dostarcza niewiele informacji na temat struktury klas oraz względnej ważności poszczególnych zmiennych w klasyfikacji. Ponadto nie daje możliwości graficznej prezentacji wyników, a w wypadku dużej liczby próbek obliczenia są dość długotrwałe.

### 4.5.3. Analiza dyskryminacyjna metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów

Metody klasyfikacyjne można interpretować jako metody mające na celu znalezienie zależności między wielowymiarowym zbiorem zmiennych niezależnych  $X$  a zbiorem jakościowych zmiennych zależnych  $Y$ . Do rozwiązania problemów klasyfikacyjnych można zatem stosować metody regresji. Na takim założeniu opiera się analiza dyskryminacyjna metodą cząstkowych najmniejszych kwadratów (*partial least squares-discriminant analysis*, PLS DA) (Barker i Rayens, 2003).



przeciwniej stronie owocu w stosunku do lampy. Taki układ umożliwił połączenie systemów sortujących na podstawie zawartości ekstraktu i barwy. W badaniach dużych owoców stosuje się źródła światła o dużej mocy, np. dla arbuźów stosowane są lampy halogenowe o mocy 32 100 W (Saranwong i Kawano, 2006). Problemem przy zastosowaniu lamp o wysokiej mocy jest wydzielanie znacznych ilości ciepła, które mogą uszkodzić badane produkty.

Obecnie projektowane, komercyjne linie sortujące umożliwiają podział owoców i warzyw na odpowiednie kategorie oraz ich pakowanie. Na podstawie pomiarów spektroskopowych sortowanie odbywa się według różnych kryteriów, m.in.: zawartości ekstraktu, cukru i suchej masy, twardości, obecności defektów wewnętrznych itp. (Xie i in., 2016). Zastosowanie automatycznych systemów usprawnia proces sortowania i pakowania oraz umożliwia zwiększenie konkurencyjności poprzez wytwarzanie produktów o wyższej, stałej jakości.

### **Autentyczność owoców i warzyw**

Badania autentyczności warzyw i owoców obejmują identyfikację odmian, sposobu uprawy i pochodzenia geograficznego.

Schmutzler i Huck (2014) zastosowali spektroskopię NIR do badania pochodzenia geograficznego jabłek. Badano 160 jabłek *Golden Delicious* pochodzących z 16 różnych upraw w południowym Tyrolu we Włoszech oraz 235 jabłek *Golden Delicious* pochodzących z dwudziestu państw, z różnych kontynentów. Wyboru próbek, w szczególności jabłek z badanego regionu Włoch, dokonano w sposób kontrolowany, tak aby zminimalizować inne czynniki zmienności. Mniej ścisła była kontrola próbek z pozostałych regionów, próbki mogły się różnić dojrzałością, warunkami przechowywania itp. Analiza PCA zastosowana do widm NIR owoców uzyskanych metodą skanowania powierzchni wykazała różnicowanie jabłek z regionów alpejskich i pozostałych. Ponadto analiza PCA przeprowadzona dla jabłek pochodzących wyłącznie z rejonów alpejskich wykazała zróżnicowanie zależnie od miejsca uprawy. Stwierdzono podobieństwo i grupowanie widm jabłek pochodzących z różnych sadów leżących w tej samej dolinie. W pewnym zakresie możliwe było odróżnienie jabłek uprawianych w trzech różnych alpejskich dolinach. Różnicowanie to było lepsze dla owoców pochodzących z bardziej odległych dolin. Badania dotyczyły jabłek zebranych w jednym sezonie. Mimo że wyniki są interesujące, według autorów należy wziąć pod uwagę, że różnice sezonowe i odmian mogą w większym stopniu wpływać na zróżnicowanie właściwości niż miejsce uprawy.

Amodio, Ceglie, Chaudhry, Piazzolla i Colelli (2017) spektroskopię NIR zastosowali do klasyfikacji truskawek ze względu na system uprawy. Na podstawie widm odbiciowych zmierzonych dla całych owoców ( $n = 219$ ) z zastosowaniem

metody PLS DA uzyskano poprawną klasyfikację (98% dla zbioru testowego) truskawek pochodzących z upraw konwencjonalnych i dwóch upraw organicznych różniących się sposobem nawożenia.

## Ocena jakości przetworów owocowych i warzywnych

Metody spektroskopowe stosuje się do kontroli jakości przetworów owocowych i warzywnych. Badania obejmują oznaczanie składników, właściwości przeciwutleniających, sensorycznych oraz ocenę autentyczności.

### *Składniki i właściwości*

Z zastosowaniem spektroskopii NIR oznaczano m.in. zawartość cukrów – sacharozy, glukozy i fruktozy – w sokach jabłkowych i pomarańczowych (Rodriguez-Saona, Fry, McLaughlin i Calvey, 2001) oraz w syropach (Henn, Schwab i Huck, 2016).

L. F. Leopold, N. Leopold, Diehl i Socaciu (2012) zastosowali spektroskopię FT MIR i metodę PLS do oznaczania pojemności przeciwutleniającej soków z różnych owoców ( $n = 23$ ). Uzyskany model PLS charakteryzował się współczynnikiem korelacji  $R = 0,97$ .

Ayvaz i współautorzy (2016) oznaczali parametry jakościowe soków pomidorowych z zastosowaniem przenośnego spektrofotometru FT MIR. Uzyskane modele kalibracyjne PLS dla składników chemicznych (glukozy, fruktozy, cukrów redukujących, ekstraktu, pH) i parametrów opisujących teksturę dla zbioru testowego charakteryzowały się współczynnikami korelacji  $R > 0,82$ .

Prowadzone są badania nad zastosowaniem metod fluorescencyjnych do oceny jakości soków. W badaniach soków jabłkowych otrzymanych z owoców o różnym stopniu dojrzałości wykazano korelację fluorescencji i wybranych parametrów jakościowych (Seiden, Bro, Poll i Munck, 1996). Z zastosowaniem spektroskopii fluorescencyjnej oznaczano właściwości przeciwutleniające przetworów owocowych i warzywnych. Badano m.in. zawartość przeciwutleniaczy i pojemność przeciwutleniającą komercyjnych soków jabłkowych ( $n = 30$ ) z zastosowaniem różnych technik pomiarów widm fluorescencji (Włodarska, Pawlak-Lemańska, Khmelinskii i Sikorska, 2016, 2017a, 2017b). Wykazano, że pomiar widm synchronicznych fluorescencji może być wykorzystany jako metoda przesiewowa, umożliwiająca odróżnianie soków jabłkowych o niskiej i wysokiej aktywności przeciwutleniającej (Włodarska i in., 2017b). W tabeli 6.1 przedstawiono charakterystykę modeli PLS dla oznaczania całkowitej zawartości związków fenolowych, flawonoidów i pojemności przeciwutleniającej na podstawie widm synchronicznych fluorescencji.

**Tabela 6.1. Modele PLS do oznaczania całkowitej zawartości polifenoli (TPC), flawonoidów (TFC) i całkowitej pojemności przeciwutleniającej (TAC) soków jabłkowych na podstawie widm synchronicznych fluorescencji,  $n = 30$**

Model	LZ	Kalibracja		Walidacja		RPD
		$R^2$	RMSEC*	$R^2$	RMSECV*	
<i>TPC</i>						
uTSF	9	0,970	68,9	0,740	208,7	1,9
SF, $\Delta\lambda = 80$ nm	11	0,968	70,7	0,766	198,0	2,0
<i>TFC</i>						
uTSF	3	0,901	21,4	0,846	27,6	2,5
SF, $\Delta\lambda = 110$ nm	2	0,888	22,8	0,870	25,3	2,7
<i>TAC</i>						
uTSF	9	0,962	0,73	0,708	2,11	1,8
SF $\Delta\lambda = 70$ nm	11	0,976	0,59	0,787	1,80	2,1

\*Wartości RMSEC i RMSECV są podane w oryginalnych jednostkach oznaczanych parametrów: mg GAE  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dla TPC, mg CE  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dla TFC oraz mM dla TAC.

Objaśnienia: LZ – liczba zmiennych, uTSF – całkowite widma synchroniczne fluorescencji w postaci macierzy, SF – widma synchroniczne fluorescencji.

Źródło: na podstawie (Włodarska i in., 2017b).

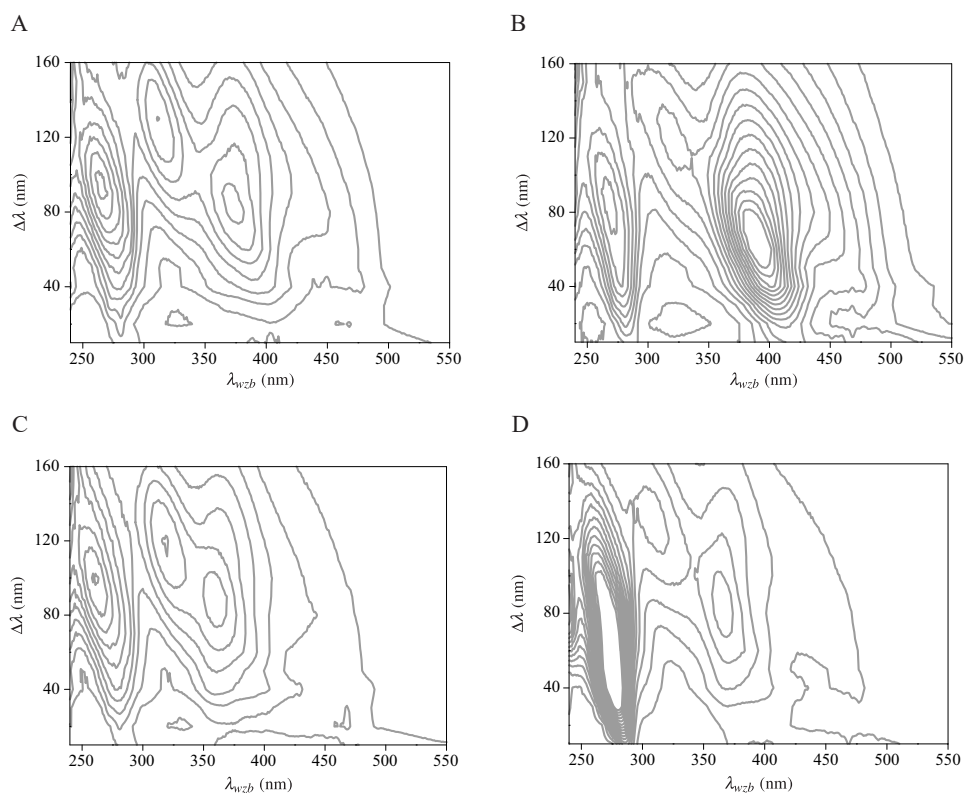
Spektroskopię fluorescencyjną oraz MIR zastosowano do oznaczania właściwości przeciwutleniających przecieru pomidorowego (Orzeł, Stanimirova, Czarnik-Matusiewicz i Daszykowski, 2015). Modele otrzymane na podstawie analizy całkowitych widm fluorescencji charakteryzowały się względnymi błędami: dla oznaczania pojemności przeciwutleniającej – 14,21%, dla całkowitej zawartości związków polifenolowych – 10,78%. Błędy dla modeli kalibracyjnych otrzymanych na podstawie widm MIR wynosiły: dla pojemności przeciwutleniającej – 17,15%, dla całkowitej zawartości związków polifenolowych – 5,36%.

Trivittayasil i współautorzy (2016) wykazali korelację całkowitych widm fluorescencji i ogólnej charakterystyki sensorycznej soku pomidorowego.

### *Autentyczność*

W badaniach autentyczności produktów owocowych i warzywnych stosuje się różne techniki spektroskopowe.

Sok pomarańczowy jest najbardziej popularnym i najczęściej spożywanym sokiem owocowym, i bywa przedmiotem zafałszowań. Jednym ze sposobów fałszowania jest dodanie cukrów lub soków z innych owoców. Ammari, Redjda i Rutledge (2015) do badania zafałszowania soku pomarańczowego sokiem grejpfrutowym wykorzystali fluorescencję. Zastosowanie metody analizy niez-



**Rysunek 6.1. Całkowite widma synchroniczne fluorescencji soków jabłkowych: A – odtworzony z koncentratu; B – odtworzony z koncentratu z dodatkiem miąższu; C – bezpośredni, pasteryzowany; D – bezpośredni, świeżo wyciskany**

Źródło: na podstawie (Włodarska i in., 2018).

leżnych komponentów (*independent component analysis*, ICA) do całkowitych widm fluorescencji pozwoliło na oznaczenie zawartości dodatku fałszującego w mieszaninach soków na poziomie 1%.

Ellis i współautorzy (2016) zastosowali spektroskopię FT MIR do wykrywania zafałszowań soku pomarańczowego roztworami cukrów: glukozy, fruktozy i sacharozy lub ich mieszaniną. Zakres stężeń odpowiadał zawartości tych cukrów w świeżo wyciśniętym soku. Do klasyfikacji zastosowano metodę PC DFA (*principal components discriminant function analysis*). Zawartość zafałszowań w soku oznaczano metodą PLS i uzyskano typowy błąd przewidywania dla próbek testowych równy 1,7%.

W badaniach autentyczności soków jabłkowych zastosowano spektroskopię w zakresie UV (Chang i in., 2016) i NIR (León, Kelly i Downey, 2005) oraz fluorescencję (Poryvkina, Tsvetkova i Sobolev, 2014; Włodarska, Khmelinskii i Sikorska, 2018). Dostępne w handlu soki jabłkowe z różnych kategorii

wykazują różnice właściwości fluorescencyjnych, które są wynikiem różnej zawartości związków polifenolowych oraz produktów reakcji nieenzymatycznego brązowienia. Na rysunku 6.1 przedstawiono przykładowe całkowite widma synchroniczne fluorescencji soku odtwarzanego z koncentratu, soku z koncentratu z dodatkiem miąższu oraz soków bezpośrednich pasteryzowanego i świeżo wyciskanego. Fluorescencję zastosowano do klasyfikacji soków handlowych z różnych kategorii (Poryvkina i in., 2014) i do odróżniania soków bezpośrednich od odtworzonych z koncentratu (Włodarska i in., 2018).

Spektroskopię NIR i MIR zastosowano do rozróżniania soków jabłkowych otrzymanych z odmian: *Bramley*, *Elstar*, *Golden Delicious* i *Jonagold* oraz soków poddanych obróbce termicznej (Reid, Woodcock, O'Donnell, Kelly i Downey, 2005). Rozróżnienie soków jabłkowych poddanych obróbce termicznej jest możliwe także z zastosowaniem spektroskopii fluorescencyjnej (Zhu, Ji, Eum i Zude, 2009).

### 6.3. Zboża i produkty zbożowe

Zboża zajmują specjalne miejsce wśród produktów rolnych ze względu na ich znaczenie w żywieniu człowieka i możliwości przetwarzania na różnorodne produkty końcowe. Do zbóż najważniejszych w skali globalnej zaliczane są: kukurydza, pszenica, ryż i jęczmień.

W badaniach zbóż i produktów ich przetwarzania stosuje się przede wszystkim spektroskopię w zakresie NIR. Pierwsze zastosowania spektroskopii NIR rozwinięte w latach sześćdziesiątych przez Karla Norrisa dotyczyły oznaczania wilgotności i białka w pszenicy (Massie i Norris, 1965).

Obecnie spektroskopia NIR jest stosowana w kontroli jakości zbóż na etapach uprawy, przetwarzania i handlu. Do najważniejszych zastosowań należy oznaczanie w zbożach wilgotności, białka, skrobi i oleju. Metoda ta jest stosowana również do oceny właściwości fizycznych, parametrów technologicznych oraz oceny bezpieczeństwa zdrowotnego, m.in. wykrywania skażenia zbóż pleśnią. Przedmiotem badań są zarówno pojedyncze ziarna, jak i większe próbki zbóż (Fox i Manley, 2014; Pojić i Mastilović, 2013).

Spektroskopia NIR jest oficjalną metodą analizy zbóż i nasion uznawaną przez American Association of Cereal Chemists (1999) i American Oil Chemists' Society (2017a). Metody oceny jakości zbóż z zastosowaniem NIR są przedmiotem norm międzynarodowych i polskich (International Organization for Standardization, 2017; Polski Komitet Normalizacyjny, 2017).

Zastosowania spektroskopii NIR w badaniach zbóż i produktów zbożowych w pracach przeglądowych przedstawili m.in.: Agelet i Hurburgh (2014), Fox i Manley (2014) oraz Pojić i Mastilović (2013).

## Uprawa zbóż

Spektroskopię NIR wykorzystuje się do selekcji ziarna do uprawy. W tym celu stosuje się przyrządy do pomiarów pojedynczych ziaren, co umożliwia ocenę jakości materiału w sposób nieniszczący. Analiza taka wraz z mechanicznym sortowaniem służy do uzyskiwania jednorodnych partii o wysokiej czystości, charakteryzujących się wysoką jakością i wartością ekonomiczną.

Najczęściej oznacza się zawartość białka, twardość ziaren i barwę. Na etapie uprawy przydatne są też bardziej zaawansowane aplikacje, jak analiza składu białek (Pojić i Mastilović, 2013). Celem analiz może być oddzielenie ziaren uszkodzonych z różnymi defektami od ziaren charakteryzujących się wysoką zawartością wybranych składników lub odróżnienie ziaren różnych odmian (Agelet i Hurburgh, 2014).

Analiza pojedynczych ziaren lub nasion pozwala naukowcom przewidzieć cechy przyszłych roślin i ich następnych pokoleń, umożliwia zachowanie kompetencyjnej charakterystyki oraz uzyskanie wysokiej wydajności zbiorów lub odporności roślin (Khakimov, Bak i Engelsen, 2014).

## Kontrola procesu przemiału zbóż

W procesie produkcji mąki głównym czynnikiem decydującym o rentowności jest optymalizacja zużycia surowca oraz wydajności procesu poprzez dokładną kontrolę surowca oraz jakości produktu końcowego. Uważa się, że zastosowanie spektroskopii NIR stało się przełomem w rutynowej kontroli jakości zbóż.

Kontrola jakości w czasie przemiału zboża obejmuje m.in. oznaczanie białka, wilgotności i popiołu. Stosowane są w tym celu systemy *on-line* oparte na spektroskopii NIR. Instalacja analizatora na linii produkcyjnej umożliwia bieżące pomiary gotowej mąki, bezpośrednio po przejściu przez końcowe sito. Na podstawie uzyskanych wyników można określić optymalny dobór ziarna i warunków przemiału. Ciągła kontrola umożliwia uzyskanie mąki odpowiadającej specyfikacji, o jednolitej jakości.

W obrocie zbożem szeroko stosowane są analizatory Infratec™ firmy FOSS (Hillerød, Dania) (FOSS, 2014). Umożliwiają one zarówno analizę całego ziarna, jak i mąki. Możliwość zastosowania jednego przyrządu do analizy próbek w różnej postaci upraszcza kontrolę jakości. Modele kalibracyjne wykorzystywane w tych przyrządach są oparte na sztucznych sieciach neuronowych – najbardziej uniwersalny jest oparty na bazie zawierającej około 50 000 zestawów danych. Tak rozbudowane modele kalibracyjne zapewniają stabilność pomiarów, dokładność wyników analitycznych oraz możliwość transferu kalibracji.

Przyrządy NIR stosowane w branży młynarskiej umożliwiają jednoczesne oznaczanie z dużą dokładnością takich wyróżników jakościowych jak: białko, wilgotność, skrobia, olej, liczba sedymentacyjna Zeleny'ego, gluten, gęstość w stanie zsypanym, barwa i inne. Dostępne są komercyjne kalibracje do oznaczania wielu parametrów analitycznych w różnych gatunkach zbóż, m.in. w: pszenicy, pszenicy durum, jęczmieniu, owsie, życie, pszenżycie (oznaczanie białka, wilgotności i innych wyróżników), rzepaku (oznaczanie wilgotności i oleju), kukurydzy i soi (oznaczanie białka, wilgotności, oleju, skrobi), ryżu niełuskany, brązowym i białym (oznaczanie białka i wilgotności) (FOSS, 2014).

## Ocena jakości mąki

Główne zastosowania praktyczne spektroskopii NIR w ocenie jakości mąki dotyczą oznaczeń jej podstawowych składników.

Wilgotność mąki stanowi jej ważną charakterystykę jakościową i wskaźnik wartości ekonomicznej. Zawartość wody w mące decyduje o jej wartości wypiekowej oraz trwałości. Jako górną dopuszczalną granicę ustalono zawartość 15% wody we wszystkich typach mąk, z wyjątkiem kruszki (15,3%). Wilgotność powinna być kontrolowana w czasie produkcji, pakowania i magazynowania. Ze względu na to, że wiele innych parametrów jest korygowanych na podstawie zawartości suchej masy, oznaczenie wilgotności stanowi podstawę dalszych analiz. Tradycyjnie wilgotność mąki jest określona jako strata wagi w czasie suszenia w standardowej temperaturze i określonym czasie (zazwyczaj 130°C przez 60 min). W rutynowej analizie wilgotność oznacza się z zastosowaniem spektroskopii NIR.

Białka występujące w ziarnie zbóż i mące (przeciętnie ok. 10%) są składnikiem decydującym o wartości odżywczej mąki i miernikiem jej wartości technologicznej. Zawartość białka w mące zależy od jego zawartości w surowcu oraz od wydajności ekstrakcji. Jest jednym z podstawowych parametrów określających przydatność mąki do końcowych zastosowań i elementem specyfikacji prawie każdej mąki. Tradycyjnie zawartość białka jest oznaczana metodą Kjeldahla lub Dumasa, jednak w rutynowej kontroli stosuje się metodę spektroskopii NIR (Shi i Yu, 2017). Oprócz całkowitej zawartości białka metodami spektroskopowymi oznacza się gluten. Wykazano przydatność do tego celu spektroskopii NIR (Albanell, Miñarro i Carrasco, 2012; J. Chen, Zhu i Zhao, 2017) oraz fluorescencji (Ahmad, Nache i Hitzmann, 2017).

Podstawowym składnikiem energetycznym mąki jest skrobia, stanowiąca mieszaninę amylopektyny i amylozy. Do ich oznaczania stosuje się spektroskopię NIR (Fox i Manley, 2014).

Spektroskopia NIR stosowana jest też do badania technologicznej jakości zbóż i mąki. Przykładem tego rodzaju zastosowań są badania dotyczące prze-