



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésmérnöki és Biomérnöki Kar

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

NIR Spektroszkópia Csoport

Oldószerekkel tisztított pollenek összehasonlító vizsgálata közeli és közép infravörös spektroszkópiával

TDK dolgozat

Készítette:

Madács Ágnes

Biomérnök MSc hallgató

Témavezető:

Dr. Gergely Szilveszter

egyetemi docens

Slezsák János

egyetemi tanársegéd

Budapest, 2022

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzések	4
2.	Irodalmi áttekintés.....	5
2.1.	Pollen	5
2.1.1.	Pollen felépítése.....	5
2.2.	Sporopollenin	7
2.2.1.	Sporopolleninről általánosan	7
2.2.2.	Sporopollenin szerkezete és összetétele	7
2.2.3.	Sporopollenin felhasználása	9
2.3.	<i>Bee pollen</i>	10
2.3.1.	<i>Bee pollen</i> -ről általánosan	10
2.3.2.	<i>Bee pollen</i> kémiai összetétele	11
2.4.	Látható fény és infravörös spektroszkópia.....	15
2.4.1.	A molekulaszpektroszkópiáról általánosan.....	15
2.4.2.	A látható fény spektrofotometria elméleti háttere	15
2.4.3.	Az infravörös spektroszkópia elméleti háttere	16
2.4.4.	Az infravörös készülékek működésének elmélete	17
2.4.5.	Az infravörös spektroszkópia szerepe a virágporok és a sporopollenin analitikájában	20
3.	Anyagok és módszerek.....	22
3.1.	Vizsgált minták	22
3.2.	Alkalmazott készülékek.....	23
3.2.1.	Diszperziós, látható és közeli infravörös tartományú (Vis-NIR) mérések	23
3.2.2.	Fourier-transzformációs közép infravörös mérések (FT-IR).....	24
3.3.	Mérés menete	25
3.3.1.	Diszperziós, látható és közeli infravörös tartományú (Vis-NIR) mérések	25
3.3.2.	Fourier-transzformációs közép infravörös mérések (FT-IR).....	25
3.4.	Adatfeldolgozáshoz használt szoftverek	26
3.5.	Spektrum-transzformációk.....	26
3.5.1.	Standard normál változó (SNV)	26
3.5.2.	Simítással kombinált deriválás	26
3.6.	Sokváltozós adatelemzések (MVDA).....	28
3.6.1.	Klaszterelemzés (CA)	28
4.	Eredmények	29
4.1.	Vis-NIR spektrumok bemutatása	29
4.1.1.	Napraforgópollenek spektrumai	31
4.1.2.	Repcepollenek spektrumai	38

4.1.3.	Napraforgó- és repcepollenek spektrumainak összehasonlítása	42
4.2.	FT-IR spektrumok bemutatása	48
4.3.	Klaszterelemzés	53
4.3.1.	Vis-NIR spektrumok klaszterelemzése	53
4.3.2.	FT-IR spektrumok klaszterelemzése	57
5.	Összefoglalás és kitekintés	61
6.	Irodalomjegyzék	63
7.	Mellékletek	68

1. Bevezetés és célkitűzések

Az utóbbi években egyre több kutatás foglalkozik a virágporcsomók (angolul *bee pollen*) vizsgálatával. Ez egy méhészeti termék, mely a pollen mellett tartalmaz némi nektárt és a méh nyálszekrécióját, mely a beporzási (vagy más szemszögből nézve a rovar táplálékgyűjtési) folyamata során keveredik a mintába összetapasztó elemként. Mivel a méhészetek képesek nagyobb mennyiségben előállítani ezt az anyagot, így jogosan merül fel az a kérdés, hogy milyen területeken alkalmazhatnánk. Több vizsgálat irányul arra, hogy mint szuperélelmiszer hogyan hasznosítható a benne rejlő tápanyag más élelmiszerek feljavítására, vagy hogyan lehetne az amúgy mintánként eléggé ingadozó összetételére egységes szabványokat teremteni, de vannak kevésbé evidens potenciáljai is a virágpornak.

Ilyen például a pollen legkülső (ún. exine) rétegét alkotó sporopollenin kinyerése. Ez egy rendkívül ellenálló biopolimer, melynek elsődleges feladata a virágok hímivarsejtjeinek védelme mindenfajta külső hatástól. Az exine összetétele és struktúrája pollenfajtánként eltér, alapvetően ez adja a mikroszkopikus fajta azonosítás alapjait is, tehát sejthető, hogy a sporopollenin esetében is inkább egy anyagtípusról, mint teljesen egyező anyagról beszélhetünk. Mindazonáltal az exine képződését irányító mechanizmusok minden növény esetében ugyanazok, így maga a termék is elsősorban csak az alkotóelemei arányában tér el és a legtöbb esetben hasonló tulajdonságokkal bír. A letisztított exineburok egyrészt alkalmazható mikrorészecskeként, mely rugalmas, pollen típusonként egységes, a felületén található funkciócsoportok pedig változatos felhasználásra adnak lehetőséget, másrészt használható mikrokapszulaként is, a felületén lévő természetes módon kialakult nanocsatornáknak köszönhetően, melyeken keresztül bejuttathatjuk a belsejébe a kívánt anyagot, melynek a biohasznosulása az emberi szervezetben így jóval nagyobb lesz.

Ezért foglalkozott nemrégiben egy magyar kutatók által írt tanulmány azzal, hogy milyen oldószeres kezelések segítségével lehet a lehető legtisztább sporopolleninburokot elérni virágporcsomókból kiindulva. Az én célom, hogy az ő munkájuk eredményeképp létrejött, extrahált mintákat megvizsgálva közeli és közép infravörös spektroszkópiával feltárjam annak lehetőségeit, hogy a gyors, roncsolásmentes mérési technológiák mennyire alkalmasak ennek a tisztítási folyamatnak a nyomon követésére.

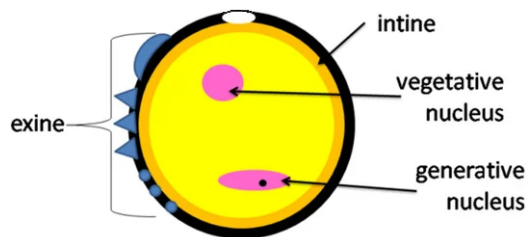
2. Irodalmi áttekintés

2.1. Pollen

2.1.1. Pollen felépítése

A pollenszemeket a nyitvatermő és zárvatermő növények állítják elő a szaporodásuk részeként, ezek feleltethetők meg a hímivarsejteknek. Alakjuk többnyire ellipszis vagy gömb formáját veszi fel, méretük pedig leggyakrabban 0,02-0,03 mm körül van, de 0,01-0,1 mm közötti tartományban bármekkora lehet a növényfajtól függően. (Bennett & Willis, 2015)

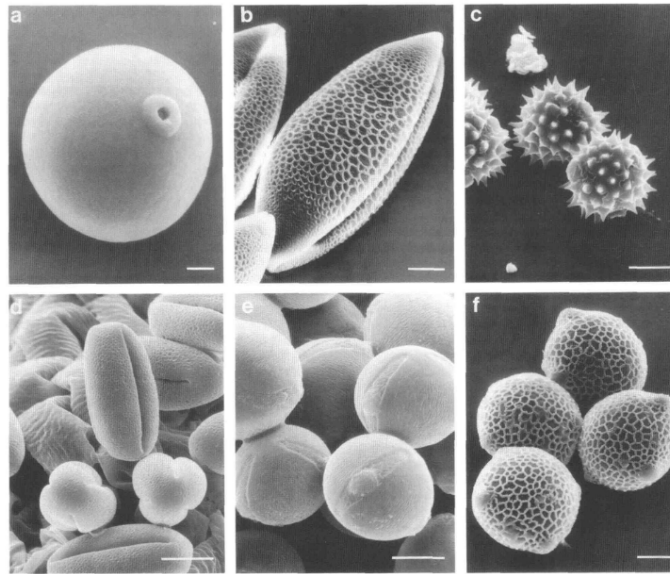
Ahogy az *1. ábra* is mutatja, kívülről befele haladva a pollen felépítését először egy külső fal, az ún. exine, majd egy belső fal, az ún. intine alkotja. Ezután következik a citoplazma, melyben két sejt található, a vegetatív vagy csősejt (*tube cell*) és a generatív sejt.



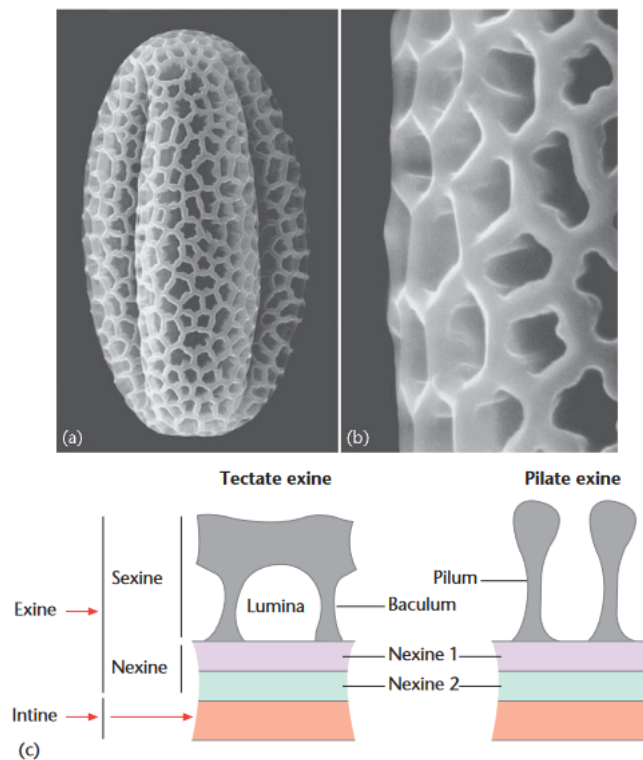
1. ábra: Pollen felépítése (Bryś et al., 2021)

Az exine változatos formákat ölt, mindig az adott növényfajra jellemző kinézettel rendelkezik, amely lehetővé teszi azok beazonosítását mikroszkópos vizsgálatok során (*2. ábra*). Fő összetevője egy sporopollenin nevű anyag, melynek pontos felépítése a mai napig nem teljesen tisztázott. Ez az egyik legellenállóbb biopolimer amit ismerünk, rendkívüli fizikai és kémiai ellenállással rendelkezik, ezzel nagy védelmet biztosítva a belsőbb részeknek. Az exine képződését a korai mikrospóra citoplazmája és az ún. tapétum sejtek (melyek szintén az exine részét képezik) biztosítják a sporopollenin szekréciója által. Ennek a külső buroknak a szerkezete (*3. ábra*) gyakran bonyolultan kidolgozott, szoborszerű, de nem borítja egységesen az egész sejtet, bizonyos régiókban nem fejlődik ki, ezzel meghatározva a csírázás helyét. Ezek a nyílások lehetnek hosszúkás barázdák, kör alakú pórusok, vagy akár ezek kombinációi is, számuk és elhelyezkedésük fontos rendszertani jellemző. Lehetővé teszik a méretnövekedést illetve csökkenést a változó nedvességtartalom függvényében. Az exine szerkezete fontos szerepet játszik a pollonizáció során a rovarokhoz, mint vektorokhoz való rögzülésben is. Széllel beporzott fajok esetén észlelhetjük, hogy kevésbé kidolgozott, a felülete simábbnak tűnik. Az exine alatt található intine egy belső fal, melyet elsősorban cellulóz és pektin alkot, szintézise a mikrospóra citoplazmájának irányítása alatt áll.

A vegetatív sejtet más néven csősejtnek is hívhatjuk, ugyanis ebből alakul ki a pollencső (*pollen tube*), amikor a pollen célba jut. Ezen keresztül képesek a hímivarsejtek eljutni a növények női ivarsejtjeihez és megtermékenyíteni azokat. Ez felelős továbbá az egyesüléshez és növekedéshez szükséges tápanyagokért is. A generatív sejtben találjuk meg a hím spermiumtagokat, melyek a megtermékenyítéshez szükségesek. (McDougal, 2015; Bedinger, 1992; Borg & Twell, 2011)



2. ábra: Az exine különböző formái (Bedinger, 1992)



3. ábra: Pollenfal szerkezete (Borg & Twell, 2011)

2.2. Sporopollenin

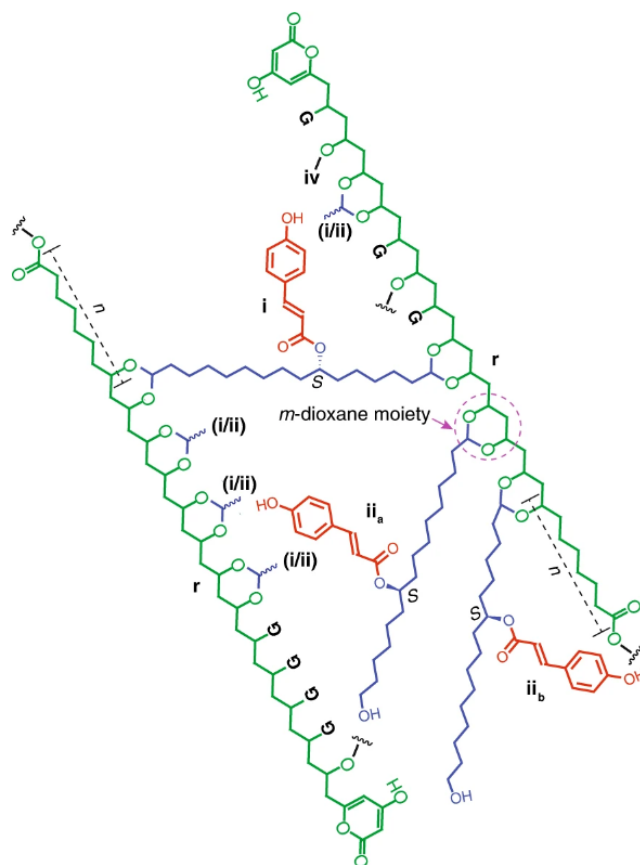
2.2.1. Sporopolleninről általánosan

A sporopollenin egy kémiaiailag rendkívül inert biopolimer, mely a szárazföldi növény spórájának illetve pollenének a külső falát alkotja, ezzel védelmet biztosítva a növényi ivarsejteknek a környezeti hatásokkal szemben. Fontos szerepe ellenére felépítésének meghatározása mindmáig kihívást okoz, de azt már tudjuk, hogy egy erősen térhálósodott szerkezetről beszélhetünk, mely akár évszázadokig képes érintetlenül fennmaradni, ugyanis a Föld felszínén található legősibb üledékes kőzetekben is találtak ép exinákat. Ez a legszilárdabb ismert növényi anyag. (Mackenzie *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2019; Wellman *et al.*, 2003)

Történelmileg már a XIX. század elejéről származnak feljegyzések a sporopollenin vizsgálatáról, de ekkor még más elnevezéseket kapott, először polleninként, majd sporoninként utaltak rá. A végleges elnevezését Zetzse és társai kutatásai során kapta a XX. században, mikor egy spóra anyagának vizsgálatából szisztematikusabb tanulmányokat készítettek. Ellenállósága olyan mértékű, hogy akár forró ecetsav-anhidrid és tömény kénsav keverékében sem hajlandó feloldódni, pedig ezen vegyszer számára a legtöbb biopolimer feloldása nem jelent gondot. Feltehetően ennek köszönhető az is, hogy szerkezetét és bioszintézisét a mai napig számtalan tanulmány kutatja és nem született még végleges konszenzus róla, habár jelentős áttöréseket értek el az idők során. Bár az exine morfológiája gyakran jelentősen eltér, de úgy tűnik, hogy a fejlődési folyamatok minden esetben hasonlóak, ami egy közös molekuláris mechanizmus konzerválódására utal. (John, 1814; Braconnot 1829; Zetzsche & Kälin, 1931; Zetzsche & Vicari, 1931; Erdtman, 1960; Fraser *et al.*, 2012; Mackenzie *et al.*, 2015)

2.2.2. Sporopollenin szerkezete és összetétele

A bizonyítékok azt mutatják, hogy egy szénből, hidrogénből és oxigénből álló erősen térhálósodott polimerről beszélünk, melynek építőelemei változatosak és összetettek. Azonosítottak egyenes és elágazó alifás láncokat, melyek között találunk telített, telítetlen és polihidroxilált is, emellett oxigénezett aromás gyűrűket és fenilpropanoid részeket is felfedeztek, a keresztkötéseket pedig bizonyítottan éterkötések és valószínűsíthetően szén-szén kötések biztosítják. A kutatások eredményei arra engednek következtetni, hogy a sporopollenin fehérjeszegény. A 4. ábra egy fenyőpollenből származó sporopollenin egy részletét mutatja. (Ahlers *et al.*, 2000; Domínguez *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2019; Mackenzie *et al.*, 2015)



4. ábra: Fenyő sporopollenin szerkezetének egy részlete (Li *et al.*, 2019)

Egy kutatás több fajta pollenből izolált sporopollenin vizsgálatát is elvégezte, és arra jutottak, hogy bár a jellemző alifás, aromás, éteres, karbonil- és karboxilcsoportok előfordulásuk tekintetében elvi egyezéseket mutatnak, de emellett jelentős különbségeket is találunk köztük. Ez azt jelenti, hogy ez a név nem egy konkrét anyagot fed, hanem inkább egymással szoros kapcsolatban álló biopolimereket képvisel, melyekben a különböző kémiai csoportok eltérő mennyiségben fordulnak elő, származástól függően. (Wilmesmeier *et al.*, 1993)

Nyilvánvalóan rendkívüli inaktivitása ellenére a sporopollenin is képes biológiai lebomlásra. Különböző baktériumok adott körülmények között meg tudják bontani a szerkezetét, és például a beporzást követően a méhek is képesek olyan enzimek kiválasztására, melyek alkalmasak ennek a folyamatnak az aktiválására. (Faegri, 1971; Stanley & Linskens, 1974; Edlund *et al.*, 2004; Ahokas, 1976)

2.2.3. Sporopollenin felhasználása

A sporopollenin izolálására számtalan módszer jött létre, melyek általában hihetetlen ellenállóságán alapszanak. Letisztításával egy üres exineburkot vagy mikrokapszulát kapunk, mely továbbra is magán hordozza az adott spóra vagy pollen jellegzetességeit. Kétféle szerepre is alkalmazhatóak. Egyfelől lehetnek mikrorészecskék, melyek rugalmasak, egységesek és többfunkciós, erősen díszített felülettel rendelkeznek. A rajtuk található fenolos, alkános, ketonos, laktonos és karbonsavas csoportjainak köszönhetően számtalan módon deriválhatóak, ezért az alkalmazásuk terén lehetőségek tárháza nyílik meg előttünk, például használhatóak szilárd hordozóként peptidszintézishez, katalízishez vagy ioncserélő kromatográfiához. A felületükön lévő fenolos csoport antioxidáns aktivitással is felruhazza őket. Másfelől használhatjuk az üres exineburkot mikrokapszulaként, melybe a felületén lévő nanoátmérőjű csatornákon keresztül visszük be a kívánt poláris vagy apoláris anyagot. Az embereken végzett *in vivo* kísérletek azt mutatják, hogy az így bevitt hatóanyag biohasznosulása lényegesen nagyobb lehet, mintha azt csak önmagában juttatnánk a szervezetbe. (Mackenzie *et al.*, 2015)

2.3. *Bee pollen*

2.3.1. *Bee pollen*-ről általánosan

Bee pollen-nek, azaz magyarul virágpornak, vagy virágporcsomónak egy méhészeti terméket nevezünk, mely a méhek által gyűjtött pollengranulátumokat jelenti. Ezeket az apró, nagyjából 7,5-8 mg-os, 1,4-4 mm átmérőjű labdácskákat a méhek tapasztják össze nektárt és saját nyálszekréciójukat használva. Enyhe elektromos mezővel vonzzák a pollenszemeket a testükre, miközben virágról virágra járnak, majd megnedvesítik, és a lábaikon lévő sörték segítségével a hátsólábukon lévő pollenkosárba tömörítik azt. A méhészek a kaptár bejáratához egy csapdát rögzítenek, így mikor a méhek hazatérnek a virágporcsomókkal, azok leesnek róluk és egy speciális gyűjtőbe kerülnek. Ezután a hosszú távú eltárolhatóság érdekében érdemes kiszárítani vagy lefagyasztani a terméket. (Prđun *et al.*, 2021; Thakur & Nanda, 2020; Bogdanov, 2016; Clark *et al.*, 2017)

A virágpor szemek rendkívül sokfélék tudnak lenni, attól függően, hogy épp milyen növényekről származik a bennük található pollen. Változatos színük, alakjuk és méretük van. Egyetlen kis szem megformáláshoz a méh akár 200 virágot is meglátogathat. Egy méhkolónia egy napi munkával nagyjából 50-250 g virágport gyűjt össze, az időjárás függvényében. Ez évi 15-40 kg pollent is jelenthet. (Komosinska-Vassev *et al.*, 2015; Zuluaga *et al.*, 2015; Bogdanov, 2016)

Csoportosítási szempontból egy virágpor lehet uniflorális vagy poliflorális, attól függően, hogy egy, vagy több növény szolgált a pollen forrásául. Emellett a minta lehet monokromatikus vagy polikromatikus. Ezt az határozza meg, hogy egy, vagy több szín található benne. Egy uniflorális minta is lehet polikromatikus, és egy poliflorális minta is lehet monokromatikus. Így előfordulhat, hogy egy, számunkra vegyesnek tűnő minta valójában azonos botanikai forrással rendelkezik, és az is lehetséges, hogy két, ránézésre teljesen egyező minta valójában két, eltérő növényfajról lett begyűjtve. Emiatt ha a valódi pollenösszetételt akarjuk megtudni, mindenképp érdemes alaposabb mikroszkopikus vizsgálatnak alávetni a mintát, mert az egyedi exine segítségével beazonosíthatóakká válnak a pollenszemcsék. (Bleha *et al.*, 2021; Modro *et al.*, 2009; Bedinger, 1992)

A virágporok színe sokféle lehet eltérő botanikai és földrajzi származásukból kifolyólag. A leggyakoribb a sárga és a narancssárga, de találkozhatunk fehértől feketéig gyakorlatilag bármilyen színnel, akár zölddel vagy lilával is. Mivel a méhekre jellemző, hogy egy adott időszakban egy fajta növényhez hűségeseek, így általában az azonos időben gyűjtött és egyazon forrásból származó szemek egyszínűnek mutatkoznak. A színt alapvetően a benne található pigmentek aránya határozza meg. A virágporok esetében elsősorban a karotinoidok (sárga, narancssárga, piros) és a flavonoidok, közülük is elsősorban az antociánok (piros, rózsaszín, lila, kék) biztosítják a színt. Ezenkívül még fontos tényező lehet az érettségi fok is, mivel az eltérő pH okozhat változást a pigmentek színekifejezésében. Összefüggést találtak a szín és az olyan benne lévő egyéb kémiai komponensek között is, mint a kalcium, a magnézium vagy a vas, továbbá a tapasztalatok azt mutatják, hogy a nagyobb nedvességtartalom fényesebb virágport eredményez. Utóbbi miatt a túlszáritás kedvezőtlen piaci hatásokat hordozhat. (Végh *et al.*, 2022; Bleha *et al.*, 2021; Filyushin *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2013; Kayacan *et al.*, 2018)

2.3.2. *Bee pollen* kémiai összetétele

A virágporok kémiai összetétele nagyban függ botanikai és földrajzi származásuktól, így az adott összetevők értékei meglehetősen nagy tartományban mozognak. Az *I. táblázat* bemutatja, hogy több mint 100 tanulmány feldolgozása után milyen átlagos mennyiségi értékeket sikerült meghatározni az adott komponensekhez, és azok milyen tartományban mozognak, ezáltal átfogó képet adva arról, mennyire nem egységes termékről beszélünk. Az itt látható komponensek mellett fontos még megemlíteni a nedvességet, amely tartalma friss minta esetén 7-30% között található, szárítás után ideális esetben 5-9% közé esik. A virágpor pH értéke általában 3,49 és 6,33 között van, mely az antociánok által biztosított színek megjelenési tartományában van. (Thakur & Nanda, 2020; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009)

*I. táblázat: Virágpor jellemző összetétele
(GAE: gallic acid equivalent, azaz galluszsav-egyenérték)
(Thakur & Nanda., 2020)*

Komponens neve	Komponens átlagos értéke	Komponens szórási tartománya
szénhidrát	54,22%	18,50-84,25%
glükóz	13,40 g/100 g	2,77-28,49 g/100 g
fruktóz	15,26 g/100 g	4,9-33,48 g/100 g
szacharóz	4,25 g/100 g	0,05-9,02 g/100 g
fehérje	21,30%	4,50-40,70%
lipid	5,31%	0,41-13,50%
rost	8,75%	0,15-31,26%
hamu	2,91%	0,50-7,75%
kálium	4951,61 mg/kg	3,06-13366,60 mg/kg
foszfor	4157,86 mg/kg	234,40-9587,00 mg/kg
kalcium	1751,22 mg/kg	1,09-5752,19 mg/kg
magnézium	1246,99 mg/kg	44,00-4680,53 mg/kg
cink	46,97 mg/kg	0,10-105,80 mg/kg
vas	197,41 mg/kg	2,60-1180,00 mg/kg
teljes fenoltartalom	30,59 mg GAE/g	0,69-213,20 mg GAE/g

Az *I. táblázat* értékeiből látszik, hogy a szénhidráttartalom akár a virágporcsomók tömegének 2/3-át is jelentheti, de rendkívül nagy tartományban ingadozik. Mivel mértékében az összetapasztáshoz használt nektár is szerepet játszik, így a redukáló cukrok nagyobb mennyisége különbséget tesz a *bee pollen* és a növényi pollen között. A cukrok mellett még a poliszacharidokat is meg kell említeni, melyekből a sporopollenin, a cellulóz és a pektin található meg a virágporokban. Előbbi az exine, utóbbiak pedig az intine fő összetevői. (Thakur & Nanda, 2020; Li *et al.*, 2018; Carpes *et al.*, 2009)

A szénhidrátok mellett a másik nagyobb mennyiséggel rendelkező összetevőt a fehérjék jelentik, ami nem meglepő, hisz a méhek alapvetően fehérjeforrásként gyűjtik maguk számára a virágport. Az *I. táblázat* értékei itt is nagy szórást mutatnak, és külön érdekesség, hogy egyazon virágfaj uniflorális mintáit vizsgálva különböző országokban, eltérő értékeket kaptak.

Továbbá a kutatások alapján úgy tűnik, hogy párhuzam vonható a növények virágzásának évszaka és a pollen fehérjetartalma közé is, a tavaszi virágok általában nagyobb fehérjetartalmú terméket szolgáltatnak. Főleg kötött formájú aminosavakról beszélhetünk, és mindössze 10% körül található a szabadaminosav-tartalom, de ez utóbbi összetételéből mind a botanikai származásról, mind a szárítási és tárolási folyamatokról információt kaphatunk. Ez utóbbi annak köszönhető, hogy a prolintartalom változik a tárolás során, azaz jó mutatója a minta frissességének. (De-Melo & Almeida-Muradian, 2017; Liolios *et al.*, 2016; Thakur & Nanda, 2020; Domínguez-Valhondo *et al.*, 2011; Verslues & Sharma, 2010; Serra-Bonvehí *et al.*, 1997)

A lipidek a harmadik legnagyobb mennyiséggel rendelkező csoport. Legjellemzőbbek közülük a trigliceridek, a karotinoidek és a szterolok. A méheknek szükségük van zsírsavakra a szaporodásukhoz, fejlődésükhöz, táplálkozásukhoz. A linolsav, linolénsav, mirisztinsav és laurinsav baktérium- és gombaölő hatása segít, hogy a kártékony mikrobák ne tudjanak elszaporodni a költőfésűkben, ezáltal segítik a kolónia higiéniáját. Eltérések mutatkoznak itt is a különböző országokból származó, azonos fajtájú uniflorális minták tekintetében. Mindazonáltal a tanulmányok azt mutatják, hogy a zsírsavak mindenhol azonosak, csak a mennyiségük tér el botanikai és földrajzi származásuk szerint. A megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a méhek a magasabb telítetlenzsírsav-mennyiséget részesítik előnyben a pollengyűjtésüknél. (Mărgăoan *et al.*, 2014; Sattler *et al.*, 2015; De-Melo & Almeida-Muradian, 2017; Thakur & Nanda, 2020; Human & Nicolson, 2006)

A virágporcsomók ásványianyag-tartalmára hatással van a botanikai és a földrajzi származás, valamint az adott évszak is. Úgy tűnik, hogy a talajnak, melyben a növény kifejlődött, meglehetősen fontos szerepe van ebben, továbbá nem csak a pollen, de a hozzáadott nektár is befolyásolhatja a bioelemek összetételét, viszont a feldolgozás és a tárolás nem módosít ezen. Általánosságban kijelenthető, hogy a virágporokban az ásványi anyagok közül a kalcium, a réz, a kobalt, a vas, a kálium, a magnézium, a mangán, a nátrium, a foszfor és a cink fordul elő jelentősebb mennyiségben. Ritkább esetekben kimutatható a molibdén és a szelén jelenléte is. (Thakur & Nanda, 2020; Formicki *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Kostic *et al.*, 2015; De-Melo *et al.*, 2016)

A *bee pollen* víz- és zsírolható vitaminokat is tartalmaz. Megtalálhatóak benne a B-komplexek, a C- és az E-vitamin, valamint a karotinoidek, melyek az A-vitamin provitaminjai. A kutatások azt mutatják, hogy a vitamintartalmat elsősorban a botanikai

származás és a feldolgozási körülmények befolyásolják. (De-Melo & Almeida-Muradian, 2017; Thakur & Nanda, 2020)

A polifenolok minden növényben fellelhetők, mivel ezek a másodlagos anyagcseretermékek. Ilyenek például az antociánok – melyek természetes vízzoldható pigmentek, ezek felelősek a növények narancssárga, rózsaszín, lila, vörös és kék színéért, és úgy tűnik, a pollenek színezetében is fontos szerepet játszanak –, de ide sorolhatóak a flavonoidok, flavonolok, flavononok, csersavak, fenolsavak is. A különböző botanikai és földrajzi származású pollenek mind mennyiségi, mind minőségi eltérést mutatnak a fenolos vegyületek tekintetében. Azt is kimutatták, hogy ha a pollen hidegnek, vagy rossz minőségű levegőnek van kitéve, akkor erre válaszul a javul a flavonoidok bioszintézise az adott pollengenerációban. (Działo *et al.*, 2016; Mohammadrezakhani *et al.*, 2018; Rezanejad, 2012; Thakur & Nanda, 2020; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Bleha *et al.*, 2021)

2.4. Látható fény és infravörös spektroszkópia

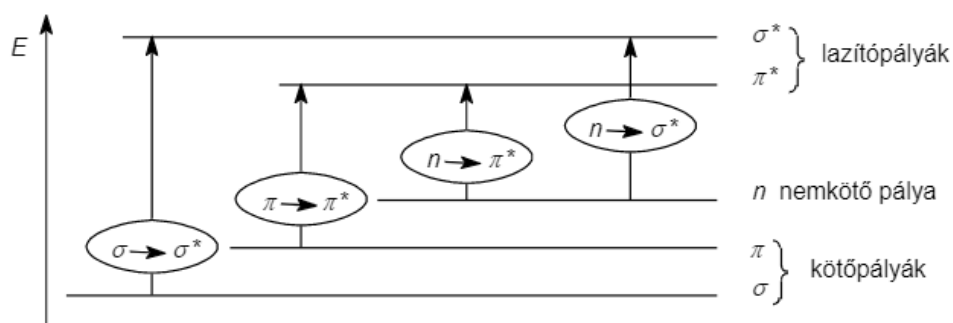
2.4.1. A molekulaspektroszkópiáról általánosan

A molekulaspektroszkópia egy, az elmúlt évtizedekben egyre inkább elterjedt közvetett, roncsolásmentes analitikai módszer. Előnyei, hogy a mintaelőkészítés nem igényel sok munkát, maga a mérés pedig gyors, vegyszermentes, környezetbarát. Mindennek köszönhetően az élelmiszerek minőségi és biztonsági méréseinek egyik elterjedt módszerévé vált. (Jing *et al.*, 2017)

Az optikai molekulaspektroszkópia a minta és az elektromágneses sugárzás kölcsönhatásai által szolgál információval a vizsgált anyag minőségi és mennyiségi tulajdonságairól. Ide sorolhatóak az általam használt módszerek, a látható fény spektrofotometria (*visible*, Vis), melynél a vizsgált tartomány hullámhossza 350-800 nm, illetve az infravörös spektroszkópia, melynek ez esetben két alcsoportjával, a közeli infravörös spektroszkópiával (*near-infrared*, NIR) és a közép infravörös spektroszkópiával (*mid-infrared*, (M)IR) végeztem méréseket. Előbbi hullámhossztartománya 800-2500 nm között található, míg utóbbié 2500-25000 nm. (Pokol, 2011; Német, 2010)

2.4.2. A látható fény spektrofotometria elméleti háttere

A látható fény spektrofotometria elméleti alapja, hogy a vizsgált molekula a látható fény adott hullámhosszú komponensét vagy komponenseit abszorbeálja, így a molekula vegyértékelektronjai gerjesztődnek, és az alapállapotban elfoglalt pályájukról (kötő vagy nem kötő) egy ugyancsak kvantált, nagyobb energiájú pályára kerülnek át (lazító pálya). A molekulák minden elektronjának eltérő a gerjesztési igénye, a különböző elektronátmenetek típusait az 5. ábra mutatja be. Azt a szerkezeti egységet, mely a molekula fényabszorpciójáért leginkább felelős, a molekula *kromofor* rendszerének nevezzük. (Tóth, 2019)

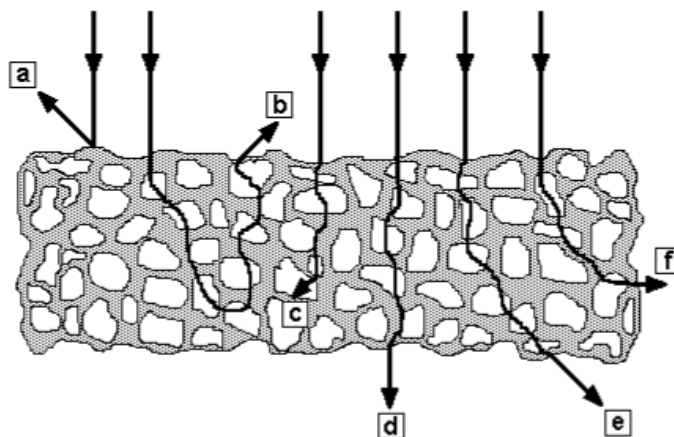


5. ábra: Az elektronátmenetek típusai (Tóth, 2019)

Mivel az elektron gerjesztéséhez szükséges energia nagyobb, mint a rezgési és a forgási energia, így az elektron-energia színeképére minden esetben szuperponálódik a rezgési és rotációs színek is. (Tóth, 2019)

2.4.3. Az infravörös spektroszkópia elméleti háttere

Az infravörös spektroszkópia a rezgési spektroszkópia egy formája. A mérés során besugározzuk a mintát az infravörös sugárzás tartományában, melynek hullámhossza 0,78-1000 μm , hullámszáma 10-12 500 cm^{-1} közé esik és három nagy részre bontható, a közeli infravörös tartományra (4000-12500 cm^{-1}), a közepes (vagy ún. analitikai) infravörös tartományra (300-4000 cm^{-1}) és a távoli infravörös tartományra (*far-infrared*, FIR) (10-300 cm^{-1}). Miközben a molekulák rezgési és forgási állapotai gerjesztődnek, a fotonok egy része visszaverődhet (reflexió), elnyelődhet (abszorpció) vagy áthaladhat (transzmisszió) a vizsgált mintán, esetleg egyéb útvonalakat járhat be (6. ábra). A mérések során a visszaverődő vagy az áthaladó fényt detektálhatjuk, és ez szolgáltat nekünk információkat. A spektrum a molekulák kötéseinek eltérő hullámhosszoknál való fényabszorpciójának az eredménye. (Gergely, 2005; Német, 2010)



6. ábra: A fény és az anyag egymással való kölcsönhatásai
a: spekuláris reflexió, b: diffúz reflexió, c: abszorpció, d: transzmisszió, e: inflexió, f: diszperzió (Gergely, 2005)

A molekulák rezgéseit modellezhetjük a klasszikus rugó-, vagy a kvantummechanikai modellel. Előbbinél a kétatomos molekulák esetében a kötések alaprezgéseit harmonikus rezgést végző rugókkal modellezhetjük, ezek viselkedését a Hooke-törvény írja le. Többatomos molekuláknál ezt ideális esetben úgy lehet elképzelni, mint független, kétatomos harmonikus oszcillátorok sorozatát. A rezgési módok száma $3N-6$, amennyiben N a molekula atomjainak számát jelöli. Ezekhez egy-egy önálló potenciális energiagörbét tudunk rendelni.

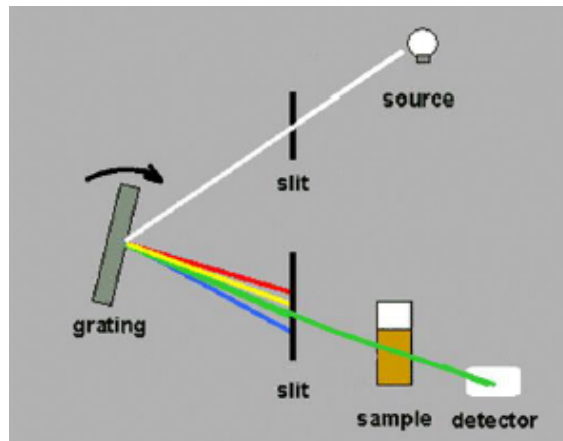
Ezzel szemben a kvantummechanikai modell kimondja, hogy a molekulák rezgési energiaszintjeinek száma véges, azaz az energiák folytonos eloszlása helyett itt diszkrét energiaszintekről beszélünk, melyek egyenlő távolságra vannak egymástól. Az energia növekedésével a potenciálgörbe torzul, mivel az atomok elektronfelhője a Coulomb-taszítás miatt határt szab az atomok közeledésének, illetve nyújtás esetén a kötés el is szakadhat. E torzulás eredménye, hogy az energiaszintek is egyre közelebb kerülnek egymáshoz. Ha egy rezgési mód energiaállapota alapállapotról az első szintre lép, azt alaprezgésnek nevezzük, de abban az esetben, ha átmenet nélkül 2. vagy 3. szintre lép, akkor első vagy második felhangról beszélhetünk. A kombinációs sáv akkor jön létre, ha alapállapotból két eltérő energiaszintre történik az átmenet. Bár a spektroszkópiai kiválasztási szabályok alapján a felhangok és kombinációk megjelenése tiltott, mégis megjelennek a spektrumban az anharmonicitás és a Fermi-rezonancia miatt. Az alaprezgések vizsgálatával a távoli és a közép infravörös spektroszkópia foglalkozik, míg a közeli infravörös tartományban a felhangokat és a kombinációs rezgéseket tanulmányozhatjuk. (Gergely, 2005)

Az analitikai infravörös tartomány a vegyérték- és deformációs rezgések tartománya, mely két részre osztható fel. Az $1500\text{--}300\text{ cm}^{-1}$ az ujjlenyomat-tartomány, mely mindig az adott vegyületre jellemző és egyedi, míg a $4000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ a vegyértékrezgések tartománya. Ez a tartomány a vegyületekben található csoportokra karakterisztikus. (Német, 2010)

2.4.4. Az infravörös készülékek működésének elmélete

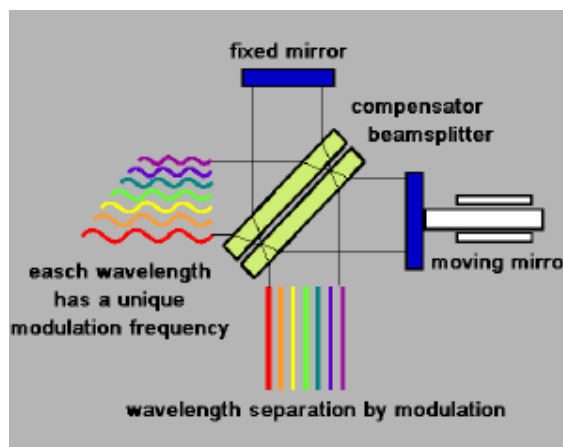
Az optikai spektrométerek általában tartalmazzanak egy fényforrást, egy optikai elemet, egy mintateret, egy detektort és egy jelfeldolgozó egységet. Az infravörös spektroszkópiában használt készülékek nagy hasonlóságot mutatnak a látható tartományok műszereihez. Optikai működési elvük alapján két nagy csoportjuk a diszperzív infravörös spektrométerek és a Fourier-transzformációs (*Fourier transform*, FT) infravörös spektrométerek. (Német, 2010)

A diszperziós készülékek működési elve (7. ábra) nagyjából azonos a látható és az ibolyántúli (*ultraviolet*, UV) tartományban mérő spektrofotométerekéhez, legfontosabb elemük egy mozgatható diffrakciós rács, amely a polikromatikus fényt felbontja, és különböző irányokba küldi el a kapott monokromatikus fényeket. (Slezsák, 2017)



7. ábra: Diszperziós készülék működési elve (Andersen et al., 2013)

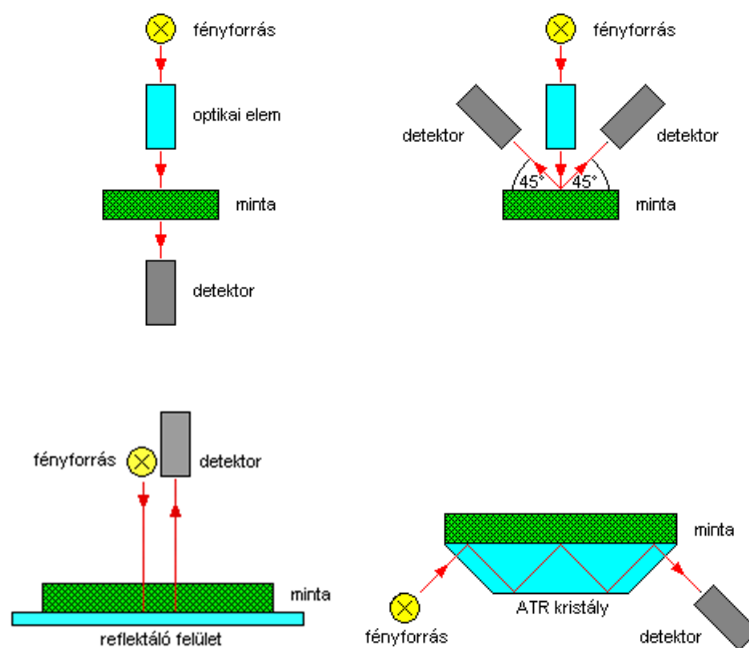
A Fourier-transzformációs spektrométerek (8. ábra) esetében általában egy Michelson-interferométert alkalmaznak, mely többek között egy álló és egy mozgó tükröt is tartalmaz. Működési elve, hogy a benne található fényosztó (*beamsplitter*) két sugárra bontja a fényt, melyek az álló és a mozgó tükrökről visszaverődve és ismét egyesülve interferenciával jellemezhetőek, ami a tükrök fényosztótól való optikai úthosszainak különbségeiből származik. A detektor itt interferogramot rögzít, melyet a jelfeldolgozó egység alakít át Fourier-transzformációval egy, a hullámszám függvényében ábrázolt spektrummá. (Slezsák, 2017)



8. ábra: A Fourier-transzformációs készülékekben leginkább elterjedt Michelson-interferométer működési elve (Stark & Luchter, 2017)

A fényforrás a látható és a közeli infravörös tartományban általában volfrámizzó, míg az analitikai tartományban a króm-nikkel ellenállásizzó, a Nernst-izzó, a *Globalar* izzó és a szabályozható lézer az elterjedt. Detektoroknál a közeli infravörös tartományban sokszor kétfélét használunk, az alacsonyabb hullámhosszoknál a szilícium (Si) jellemző, míg magasabbaknál az ólom-szulfid (PbS) vagy az indium-gallium-arzenid (InGaAs) terjedt el. A közép infravörös tartományban leggyakrabban deuterált triglicil-szulfát (DTGS) detektort alkalmaznak. (Pokol, 2011; Német, 2010)

A mérési elrendezés alapján beszélhetünk transzmissziós, reflexiós, transzreflexiós és csillapított reflexiós készülékekről (9. ábra). Méréseim esetében a diffúz reflexiót és a csillapított teljes reflexiót alkalmaztam, így a továbbiakban ezek működését részletezem. (Slezsák, 2017)



9. ábra: A transzmissziós (balra fent), a reflexiós (jobbra fent), a transzreflexiós (balra lent), illetve a csillapított teljes reflexiós (jobbra lent) mérési elrendezés (Gergely, 2005)

A diffúz reflexiós elrendezés átlátszatlan, erősen zavaros vagy túl nagy abszorpciós képességű minták esetében hasznos. A fény merőlegesen érkezik a minta felületére, majd onnan minden irányba visszaverődik. A detektor akkor tudja a visszavert fény legnagyobb hányadát mérni, ha azt a beeső fénysugárhoz képest 45°-ban helyezzük el. Fontos megemlíteni, hogy a mintát érő fény penetrációs képessége csak néhány tized milliméteres nagyságrendbe esik, így az ilyen mérési módszerrel kapott információk csak a minta legkülső, felszíni rétegéből származnak. A reflektancia értéke egyenlő a mintáról visszavert fény intenzitásának és egy nem abszorbeáló standard referencia felületről (pl. fehér kerámia, BaSO_4 , Al_2O_3 , MgO) visszavert fény intenzitásának hányadosával. A reflektancia negatív tízes alapú logaritmusával megfeleltethető az abszorbanciának. (Gergely, 2005; Slezsák, 2017)

A csillapított teljes reflexió (*attenuated total reflectance*, ATR) egy olyan reflexiós technika, mely kifejezetten az analitikai tartományban való mérést segíti elő. Mivel az IR esetében a méréshez már nagyobb hullámhosszú, azaz kisebb frekvenciájú sugárzást használunk, így az nehezebben hatol át a mintán. Az ehhez szükséges mintavastagság olyan

minimális, ami jelentős nehézségeket jelentett a mintaelőkészítések során, ezért ennek leegyszerűsítése céljából jött létre az ATR vagy más néven belső reflexiós technika, aminek az alapja a teljes visszaverődés jelensége, mely akkor jön létre, ha a sugárnyaláb beesési szöge nagyobb a teljes visszaverődés határszögénél. Ekkor a sugár visszaverődik a határfelületről, de előtte még egy kissé behatol a másik közegbe. Ez teszi lehetővé, hogy a közeg a sugárzás egy részét abszorbeálja, tehát a visszavert sugárzás már információt hordoz a közeg anyagi és minőségi összetételére vonatkozóan. Az ATR egység legfontosabb része egy, az infravörös sugárzás számára átlátszó kristály (pl. gyémánt, cink-szelenid, germánium). A sugárzás a kristály egyik végén lép be merőlegesen a felületére, mely úgy van kialakítva, hogy az egyáltalán ne verje vissza, majd végighalad a kristályban úgy, hogy a kristály felületére felvitt minta határfelületéről egyszer vagy többször is visszaverődjön (9. ábra). A behatolás mélysége (ami mikrométeres nagyságrendbe esik) függ a sugárzás hullámhosszától, a sugárnyaláb beesési szögétől, illetve a kristály és a minta törésmutatójától. (Pokol, 2011; PerkinElmer, 2005)

2.4.5. Az infravörös spektroszkópia szerepe a virágporok és a sporopollenin analitikájában

Az utóbbi 20 évben egyre több tanulmány foglalkozott a mézek és virágporok kutatásával. Törekvések vannak egységes szabályrendszerek kiépítésére a virágporok új piacán, amire szükség is van, mivel hiába veszünk meg két különböző márkájú virágport és állítjuk, hogy ugyanarról a termékről beszélünk, akár szélsőségesen eltérő tápanyagösszetételt is tapasztalhatunk. (Végh *et al.*, 2022; Campos *et al.*, 2008)

A *bee pollen* vizsgálatának fő céljai az eredetiség, a biztonságosság és a tápérték megbecslése. A vizsgálatuk bonyolult, mert a pontos összetételmeghatározások időigényesek, a folyamatok közben instabil vegyületek jöhetnek létre, ráadásul a legtöbb analitikai vizsgálat csak néhány analitra korlátozódik. Ezért merülhet fel a minták gyors, roncsolásmentes vizsgálatának igénye, melyet kielégíthet a látható és az infravörös spektroszkópia használata. Néhány tanulmány már készült azzal kapcsolatban, hogy a spektroszkópiai módszerek alkalmasak lehetnek-e a virágporok egyszerűbb és gyorsabb minősítésére, és az eredmények egyelőre ígéretesnek mutatkoznak, de magyar kutatások a témakörben még nem nagyon vannak. (Bleha *et al.*, 2021; Zeghoud *et al.*, 2021; Prđun *et al.*, 2021; Kasprzyk *et al.*, 2018)

A sporopollenin vizsgálata már régebbre visszanyúló tudományos alapokkal rendelkezik, melyben többször megjelenik az infravörös spektroszkópia használata is. Az FT-IR spektroszkópiát például alkalmazták a különböző botanikai eltérésű pollenekből származó

tisztított exinék összehasonlítására, melyből azt a megállapítást nyerték, hogy a származás alapján a pontos összetétel eltérhet. Mások (hozzánk hasonlóan) tisztítási folyamatokat próbáltak nyomon követni ezzel a technológiával, míg a mi munkák alapjául szolgáló tanulmány inkább elvetette ezt a vizsgálati módszert, így joggal vetődik fel az a kérdés, hogy valójában mennyire hatásosan alkalmazható a közép infravörös spektroszkópia ezen a területen. A Vis-NIR spektroszkópia használata nem túl elterjedt ebben a szegmensben, így nagy reményeket fűzök ahhoz, hogy a kutatócsoportban végzett diszperziós méréseim eredményei is érdekes információkat hordoznak majd e tekintetben. A kutatásom alapjául szolgáló cikkben vizsgálták a rezgési spektroszkópia egyéb lehetőségeit is egy Raman készülékkel, az eredményeket pedig ígéretesnek ítélték. (Wilmesmeier *et al.*, 1993; Hegedűs *et al.*, 2021; Ageitos, 2021)

3. Anyagok és módszerek

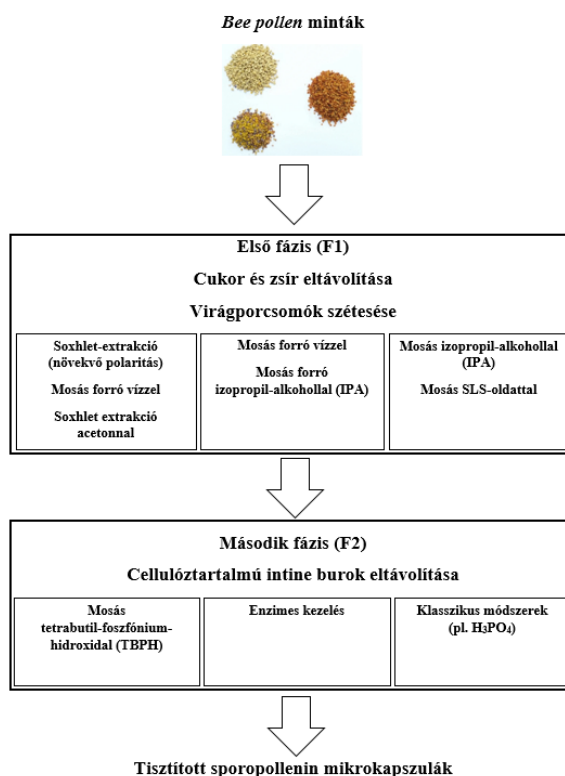
3.1. Vizsgált minták

Mintáim egy másik kutatásból származnak (Hegedűs *et al.*, 2021), melynek elsődleges célja a sporopollenin kinyerése volt különböző származású virágporcsomókból. Ennek érdekében többféle oldószeres kezelésnek vetették alá anyagaikat, mely által lehetőségem nyílt olyan mintákat vizsgálni, melyek a kémiai kioldás különböző fázisaiban járnak.

A különböző virágporcsomók származási helyei és pollenösszetételük a következők:

- fehérvári napraforgó: 93% napraforgó, egyéb (zömében kukorica) 7%;
- szigetközi repce: 100% repce (erősen szárított, kemény pollencsomók, sérült pollenszemcsék).

A minták kezelése két szakaszra volt bontható, első lépésként a vízdoldható szénhidrátokat és lipideket próbálták kimosni, majd ezután a cellulózban gazdag intine lebontására törekedtek. A kezelési folyamatok különböző lépéseit a 10. ábra mutatja be. A vizsgált anyagaim között van, ami csak az első fázison esett túl (vagy még azon se teljesen), és olyan is, amely mindkét fázison végig ment, de a kapott minták nem fedik a korábbi tanulmány összes módszerét. A méréseimben részt vett mintákat a II. táblázat mutatja be, amiben a kezelési eljárások színei megegyeznek a később bemutatandó, róluk készült spektrumok színeivel.



10. ábra: Minták kezelésének lépései a kapcsolódó tanulmány (Hegedűs *et al.*, 2021) alapján

II. táblázat: Az általam mért minták csoportosítása pollenfajta és kezelési eljárás alapján

	Pollenminták	
	Napraforgó	Repce
Kezelési eljárások	forró víz	forró víz
	hideg víz	hideg víz
	hideg NaLaSH + hideg IPA	hideg NaLaSH + hideg IPA
	Soxhlet + Cellosolve	Soxhlet + Cellosolve
	H ₃ PO ₄	H ₃ PO ₄
		hideg víz + hideg IPA forró víz + forró IPA

Az alábbiakban a II. táblázatban látható kezelési eljárásokat mutatom be.

- **forró víz:** A minta csak forró vízzel (90-100 °C) lett kezelve.
- **hideg víz:** A minta csak szobahőmérsékletű vízzel lett kezelve.
- **hideg NaLaSH + hideg IPA:** A minta 10%-os, szobahőmérsékletű SLS-oldattal (a minták feliratain „NaLaSH”, azaz nátrium-lauril-szulfát szerepel) és szobahőmérsékletű izopropil-alkohollal (IPA) lett kezelve. (F1)
- **Soxhlet + Cellosolve:** Soxhlet-extrakció növekvő polaritású anyagokkal (kloroform, izopropil-alkohol és metanol), majd mosás forró vízzel, és utána Soxhlet-extrakció acetonnal. Ezután Cellosolve™-val (2-etoxietanol) kezelés. (F2)
- **H₃PO₄:** Soxhlet-extrakcióval tisztított pollen 85%-os szobahőmérsékletű foszfor-savban kevertetése 5 napig. (F2)
- **hideg víz + hideg IPA:** Szobahőmérsékletű vízzel, majd IPA-val kezelték a mintákat. (F1)
- **forró víz + forró IPA:** Forró (90-100 °C) vízzel, majd forró (80 °C) IPA-val kezelték a mintákat. (F1)

3.2. Alkalmazott készülékek

3.2.1. Diszperziós, látható és közeli infravörös tartományú (Vis-NIR) mérések

A Vis-NIR spektrumokat a következő készülékkel és beállításokkal rögzítettem:

- spektrofotométer (11. ábra) *NIRSystems 6500**
- mintakezelő egység (11. ábra) *Rapid Content Analyzer (RCA)**
- mintatartó *Mini Sample Cup (NR-7078)**
+ szűkítő gyűrű (6 mm belső átmérő)
- optikai elrendezés *diszperziós (DS)*
- működési mód *reflexiós*

- hullámhosszválasztó elem *billegő, konkáv, holografikus rács*
 - fényforrás *volfrám-halogén izzó*
 - referencia *kerámia*
 - mérési hullámhossztartomány *400-1098 nm (Vis) / 1100-2498 nm (NIR)*
 - detektorok *Si (Vis) / PbS (NIR), 4-4 db*
 - lépésköz *2 nm*
 - spektrum adatpontjainak száma *350 (Vis) / 700 (NIR)*
 - alminták száma *3*
 - spektrumok száma almintánként *32*
 - készüléket vezérlő szoftver *Vision 3.20**
- * FOSS NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA*



*11. ábra: A diszperziós (DS), Vis-NIR tartományú mérésekhez használt NIRSystems 6500 készülék Rapid Content Analyzer (RCA) mintakezelő feltétellel
(katalógusfotó: www.foss.dk)*

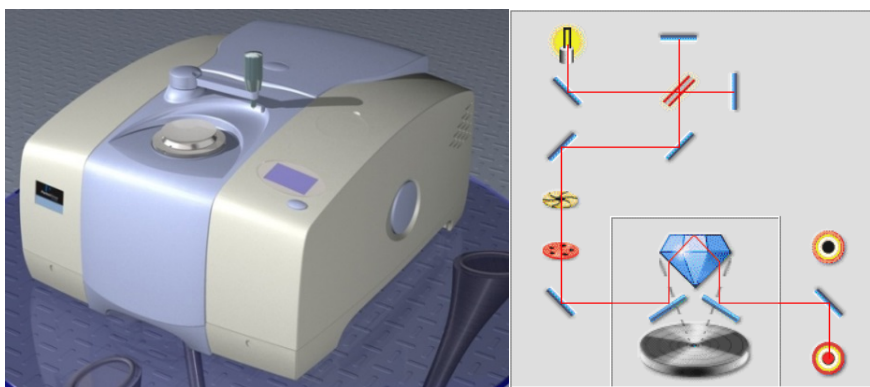
3.2.2. Fourier-transzformációs közép infravörös mérések (FT-IR)

Az FT-IR spektrumokat a következő készülékkel és beállításokkal rögzítettem:

- Spektrofotométer (12/a ábra) *Spectrum 400 **
- Mintakezelő egység (12/b ábra) *Universal ATR (UATR) Sampling Accessory * +
Single Bounce Flat Top Plate (1×) * +
Composite Diamond/ZnSe Crystal **
- Mintatartó *—*
- Elektromágneses tartomány *közép- (analitikai) infravörös ((M)IR)*
- Mérési elv (12/b ábra) *Fourier-transzformációs (FT)*
- Mérési elrendezés *csillapított teljes reflexió (ATR)*
- Fényforrás *védjegyzett, közép- és távoli IR tartományban
sugárzó, hosszú életű fényforrás túlmelegedés
elleni stabilizációval*

- Referencia *levegő*
- Hullámhosszválasztó elem *Michelson-interferométer*
- Detektor *deuterált triglicil-szulfát (DTGS), 1 db*
- Mérési hullámszámtartomány *4000-650 cm^{-1}*
- Lépésköz *4 cm^{-1}*
- Spektrum adatpontjainak száma *3351*
- Letapogatások száma (scan) *4*
- Betöltések száma *3*
- Műszert vezérlő szoftver *Spectrum 6.3.2 **

** PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA*



12. ábra: A Fourier-transzformációs (FT) (MIIR mérésekhez használt Spectrum 400 készülék Universal ATR (UATR) mintakezelő feltétellel (balra), valamint az így kapott optikai elrendezés vázlata (jobbra)

3.3. Mérés menete

3.3.1. Diszperziós, látható és közeli infravörös tartományú (Vis-NIR) mérések

A méréshez előkészítettem egy mintatartót, melynek az alján kvarcablak található, és egy szűkítő gyűrűt, mivel nem minden mintából állt rendelkezésemre nagy mennyiség, és fontos hogy a mérés során a vizsgált anyag teljesen kitöltse a rendelkezésre álló teret. A szemcsék közötti hézagok csökkentésének érdekében a minta betöltése után minden alkalommal óvatosan az asztalhoz ütöttem a mintatartót, illetve ha szükséges volt, dörzsmozsárral előporítottam a mintát. Minden mérés előtt, még a párhuzamosak között is, elvégeztem a referencia (háttér) spektrum felvételt, majd behelyeztem a mintatartót a megfelelő helyre. A fedél lecsukás után elindítottam a mérést, melyből három párhuzamosat végeztem mintánként.

3.3.2. Fourier-transzformációs közép infravörös mérések (FT-IR)

Minden mérés megkezdése előtt az első lépés a kristály megtisztítása volt, majd az ún. *contamination check* funkció lefuttatása, mely ellenőrizte a kristály tisztaságát, és felvette a háttérét. Ezután a mintámat felhelyeztem a kristályra, majd a készüléken található nyomókarral

100 N erőt kifejtve rápréseltem, hogy a minta és a kristály között a lehető legszorosabb érintkezés jöjjön létre. A program 4 letapogatást végzett, majd a nyomást megszüntettem és letisztítottam a kristály felületét. Minden mintából 3 párhuzamos mérést végeztem.

3.4. Adatfeldolgozáshoz használt szoftverek

A spektrumok felvétele és kiértékelése az alábbi programcsomagok segítségével történt:

- *Vision*[®] 3.20 (FOSS NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA);
- *Spectrum* 6.3.2 (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA);
- *The Unscrambler*[®] X 10.4 (CAMO Software AS, Oslo, Norvégia);
- *Microsoft*[®] *Excel* 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA);
- *Statistica* 14.0.0.15 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

3.5. Spektrum-transzformációk

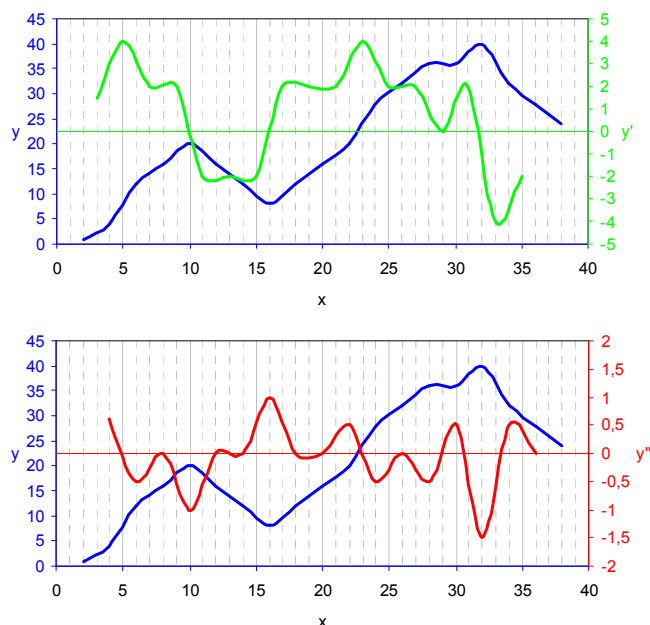
A spektroszkópiában a spektrumok értékelésekor elengedhetetlenek a matematikai előkezelésre szolgáló (más néven függvény-transzformációs) módszerek, melyek célja a jelpontosság javítása, amit a spektrumban keletkező finom, leginkább zajeredetű változások kiszűrésével érünk el, ezzel növelve a mintára vonatkozó információtartalmat. Szerepük kiemelten fontos biológiai, élelmiszeripari minták esetében, mivel ezek komplex, összetett spektrummal rendelkeznek. (Szigeti, 2013)

3.5.1. Standard normál változó (SNV)

Az egyik leggyakrabban alkalmazott transzformáció a standard normál változó (*standard normal variate*, SNV), melyet általában a fényszóródási hatások okozta alapvonal-eltolódások kiküszöbölésére használnak a NIR spektroszkópiában. Ez gyakorlatilag a spektrumadatok standardizálása, azaz egy adott spektrum eredeti adatpontjaiból kivonjuk azok átlagát és a különbséget az adott spektrum empirikus szórásával osztjuk el, így az egyedileg transzformált spektrumok szórása azonos lesz, átlagos értékük pedig 0. (Barnes, 1989)

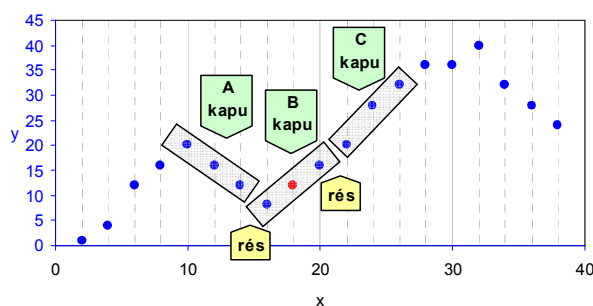
3.5.2. Simítással kombinált deriválás

A simítással kombinált deriválást a spektrumok finom változásainak kiemelésére, a részben átfedő csúcsok, csúcsvállak elkülönítésére alkalmazzuk. Legtöbbször a spektrum második deriváltjait számítják ki, mivel ez alkalmasabb a különbségek kiemelésére, mint az első derivált. Az eredeti spektrum csúcsai a második derivált spektrumban völgyként jelennek meg, emellett pedig az inflexiós pontok is jól láthatóvá válnak a deriválás hatására (13. ábra). Emiatt értelemszerűen a deriváláskor a zaj is felerősödik, ezért a harmad- vagy magasabb rendű deriváltak alkalmazása nem terjedt el.



13. ábra: Az alapspektrum (—) és első deriváltja (—) (fent), illetve az alapspektrum (—) és második deriváltja (—) (lent) (Gergely, 2005)

A deriválás során simítással való kombinálás szükséges, ehhez két fogalmat szükséges megismernünk: a kapu (*segment*) az átlagolt adatpontok számát, a rés (*gap*) pedig a két kapu között elhelyezkedő pontok számát jelenti. A második derivált számítása során az első lépésben három kapu kijelölése történik meg a spektrum elején (A, B és C kapuk), ezután kapunként kiszámításra kerülnek az abszorbanciaértékek átlagai (A , B és C). Az így kapott átlagok felhasználásával az $A-2B+C$ összefüggésből számított eredmény lesz hozzárendelve a B kapu középső pontjához. Ezt követően a teljes szekvencia (három kapu és két rés) egy adatponttal eltolódik, és a szoftver újra elvégzi a számítást, majd ez egészen az utolsó pontig folytatja (14. ábra). A deriváláshoz hasonlóan a simítás paramétereinek meghatározása is fontos, mert egy bizonyos méretű simítóablak felett előfordulhat, hogy a hasznos információt hordozó csúcsokat is elimináljuk a spektrumokból. (Gergely, 2005)



14. ábra: Második derivált számítása 3 adatpontos kapu és 0 adatpontos rés esetén (Gergely, 2005)

3.6. Sokváltozós adatelemzések (MVDA)

A spektrofotométerek nagyszámú adatot képesek generálni már egyetlen minta mérése során is, több mérés (akár párhuzamosak) esetén ez komoly adatbázissá duzzadhat, melyek kezelésében nyújtanak segítséget a sokváltozós adatelemzés (*multivariate data analysis*, MVDA) különböző módszerei. Segítenek feltárni a rejtett struktúrákat, felfedni a mintázatokat, vagy épp kiszűrni az ezekből kilógó (*outlier*) adatokat.

3.6.1. Klaszterelemzés (CA)

A klaszterelemzés (*cluster analysis*, CA) egy nem felügyelt sokváltozós adatelemzési módszer, melynek célja a teljes minta egyedeit homogén csoportokba rendezni. Az algoritmus egyelemű klaszterekből indul ki, majd minden lépésnél a két legközelebb lévő klasztert összevonva csökkenti a klaszterek számát, egészen addig, míg már csak egyetlen egy marad. Ez a módszer alkalmas a megfigyelési egységek és a változók közötti összefüggések vizsgálatára is, grafikus megjelenítésére az ún. dendrogramot alkalmazzuk.

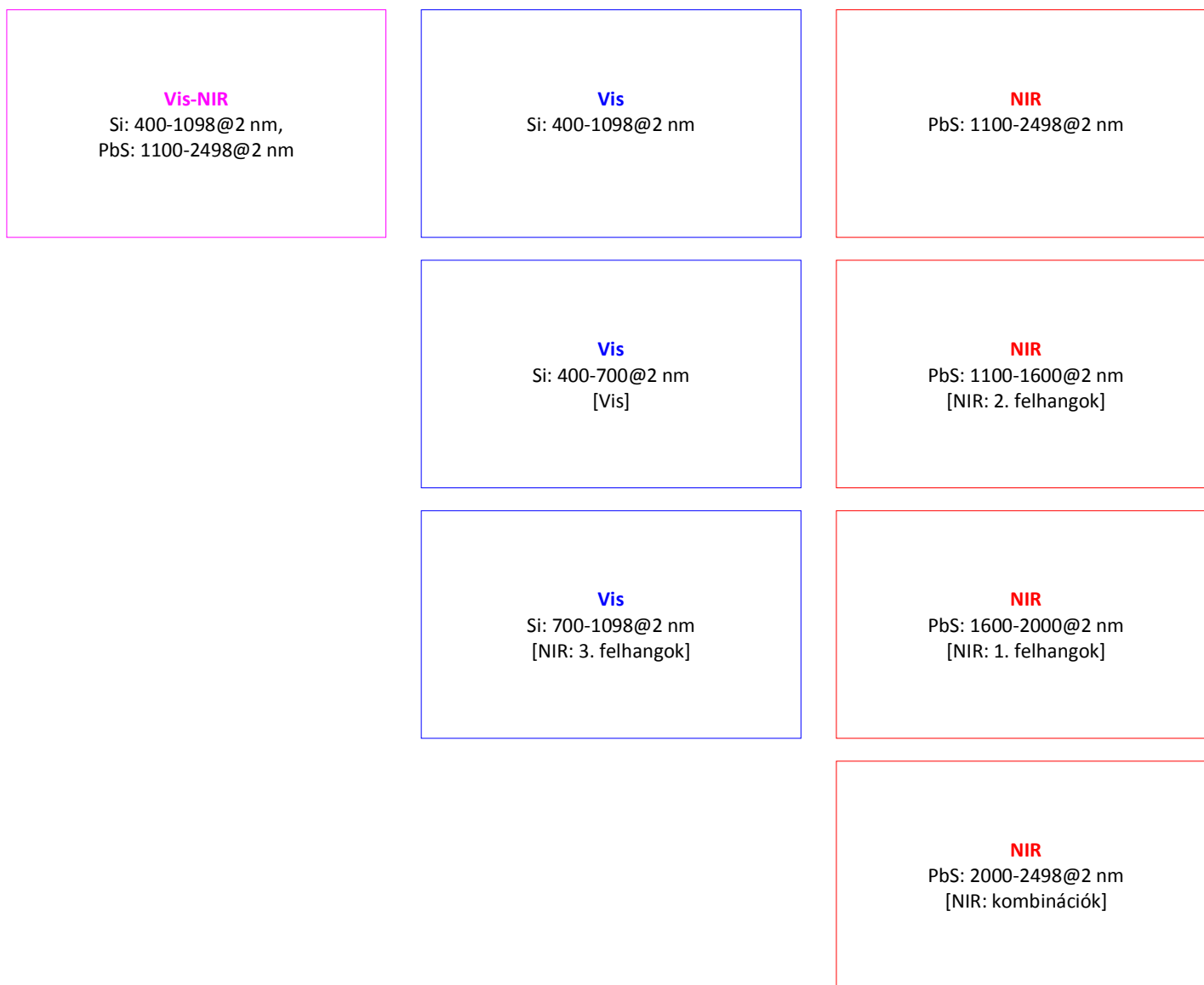
A klaszterelemzéshez mindig meg kell határozni, hogy mit értünk távolságon/hasonlóságon, illetve hogy milyen döntési függvényt használunk a csoportok szétválasztásához. Vizsgálataimhoz a négyzetes euklideszi távolságot illetve a Pearson-féle korrelációs együtthatót alkalmaztam. Előbbi a spektrumok egymástól való geometriai távolságának vizsgálatára jó inkább (például az alapvonal-eltolódásokról ad több információt), míg utóbbi a spektrumok alakbeli eltérésére koncentrálnak (amely a mintázatot megváltoztató csúcsok megjelenéséből és/vagy eltűnéséből fakad). A csoporttávolságok meghatározására az egyszerű lánc (*single/simple linkage*) és Ward módszerét választottam. Előbbi a csoportok legközelebbi elemeinek távolságát veszi figyelembe, míg utóbbi azon számított távolság, amely biztosítja, hogy az egyesített csoport csoporton belüli eltérésnégyzete minimális legyen. (Dalmadi *et al.*, 2007)

4. Eredmények

4.1. Vis-NIR spektrumok bemutatása

A következőkben a diszperziós készülékkel készített Vis-NIR spektrumokat mutatom be. Szemléltetésükhöz legtöbbször a 15. ábrán látható logikai sémát fogom alkalmazni, mely az első sorában először a teljes mérési tartományt mutatja (400-2500 nm) **ciklámen keretben**, majd azt az eszköz két detektortípusa alapján szétválasztja. A **kék keretes** ábrák a szilícium (Si) detektor által 400-1100 nm között mért eredményeket mutatják be. Legfelül a teljes tartomány látható, míg alatta két részre válik, először a 400-800 nm közötti (túlnyomórészt) látható tartományt, majd a 800-1100 nm közötti, már a NIR tartományhoz tartozó részt láthatjuk közelebbről. Míg előbbinél leginkább a minták színeinek hatásai érvényesülnek, addig utóbbi esetében a harmadik felhangokhoz tartozó elnyelési sávokat észlelhetjük. A **piros keretet** az ólom-szulfid (PbS) detektorral mért tartományok kaptak. Legfelül itt is a teljes egész látható 1100-2500 nm-ig, majd alatta három részre lett osztva ez a szakasz. 1100-1600 nm között a második, 1600-2000 nm között pedig az első felhangok észlelhetőek. A 2000-2500 nm a kombinációs rezgésekhez tartozó hullámhosszokat fedi. A Si detektort néha a Vis tartományt mérő detektornak, míg a PbS detektort a NIR tartományt mérő detektornak szokták megfeleltetni (ahogy az előzőekben bemutatott hullámhossztartomány definíciók is általánosságban értendők, mivel kötéstípusonként egyik-másik rezgés a többségtől eltérő régióban jelenik meg), a továbbiak során magam is fogom alkalmazni ezeket a megnevezéseket.

Az elemzést először a napraforgópollenek spektrumaival kezdem, ezeken bemutatva a különböző matematikai előkezelések hatásait, majd ezután a repcepollenek eredményeit vizsgálom meg. Miután ismertettem az összes mért eredményt, a két pollen összehasonlítását is elvégzem, megnézve, hogy mennyire reagáltak hasonlóan egy-egy kezelési módra, illetve itt térek majd ki a minták színeinek hatására a Vis tartományban.



15. ábra: A *Si* és *PbS* detektorokkal mért Vis-NIR spektrumok bemutatásának logikai sémája

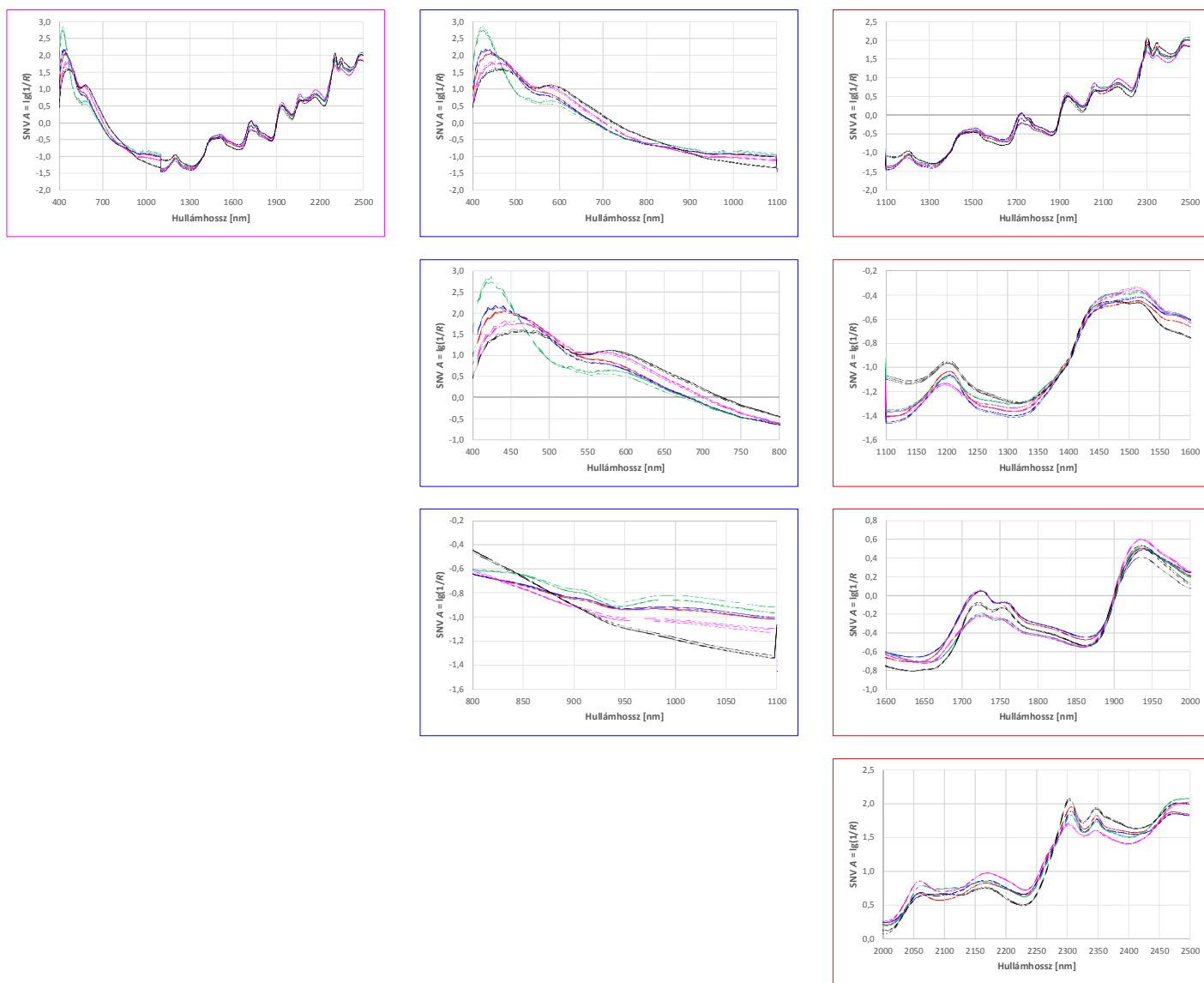
4.1.1. Napraforgópollenek spektrumai

A 16. ábrán az előbb már ismertetett elrendezés szerint láthatóak a napraforgópollenek kezeletlen (ún. „as is”, „ahogy van” – azaz matematikai előkezelés nélküli) spektrumai. A különböző oldószeres eljárásokon átesett minták spektrumai eltérő színeket kaptak a könnyebb megkülönböztethetőség érdekében. Az már első ránézésre is jól látható, hogy a három párhuzamos mérés Vis-NIR spektrumai mindenütt szinte teljesen egyszerre futnak, nincs köztük jelentősen kiugró. Emellett megfigyelhetjük azt is, hogy a különböző minták spektrumai között elég nagy alapvonal-eltolódást észlelhetünk. Ennek a jelenségnek az a magyarázata a NIR tartományban, hogy a nagyobb szemcseméretű minták jobban szórják a fényt, így kevesebb foton jut be a fény beesési merőlegeséhez 45° -ban elhelyezkedő PbS detektorokba, ami látens módon abszorbancianövekedést eredményez. Mivel a minták között volt finom por állagú is, és olyan is, melyet el kellett dörzsözni a porításhoz, így nem meglepő, hogy ezen a téren különbségeket tapasztalunk. Míg a foszforsavval kezelt minták esetében a spektrumok a Si detektornál a legnagyobb jelet adják, addig a PbS detektornál fokozatosan legalulra kerülnek. Ez azért van, mert a minta finom por állagú – és ezáltal a NIR tartományban kisebb jelet ad, mint a durvább szemcsék –, de a színe a többiekhez képest erőteljesebb barna, és ez kiemelkedő abszorbanciához vezetett a Vis régióban. Ahogy a hullámhossz növekedtével spektrumai fokozatosan a legkisebb intenzitásúvá válnak, megfigyelhetjük, hogy a látható tartomány hatásai milyen hosszan kihathatnak a közeli infravörös tartományra is.

Az egyik matematikai előkezelés, a normálás (SNV), az alapvonalbeli eltérések eliminálására – de legalábbis nagymértékű csökkentésére – szolgál, hogy a spektrumok jobban összevethetővé váljanak. A 17. ábra az SNV matematikai kezelésen átesett Vis-NIR spektrumokat mutatja be, ahol a két detektortípus által mért tartományra külön-külön lett alkalmazva a normálás (ez okozza 1100 nm-nél a hirtelen változást). Erre azért van szükség, mert a látható tartományban jóval intenzívebb csúcsokat találhatunk, mint a NIR esetén, így ha együtt kezeljük őket, az torzulásokhoz vezethet. Talán a 400-800 nm-es szakaszon – ahol az addig mindenkinél kisebb jelet adó **hideg NaLaSH + hideg IPA** minták spektrumai hirtelen a legkiugróbb értéket mutatják –, illetve a PbS detektor tartományában – ahol az eddig külön futó spektrumok hirtelen szinte egy vonalban futnak – észlelhető leginkább az SNV hatása. Első ránézésre úgy tűnhet, mintha a spektrumok ennél a detektornál nem is mutatnának szinte különbséget, de az egyes szakaszokat külön megvizsgálva láthatjuk, hogy azért vannak eltérések, ha nem is olyan szembetűnők.



16. ábra: **Napraforgópollenek** **Si** és **PbS** detektorokkal mért, matematikai kezelés nélküi (ún. „as is”) Vis-NIR spektrumai
(hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)

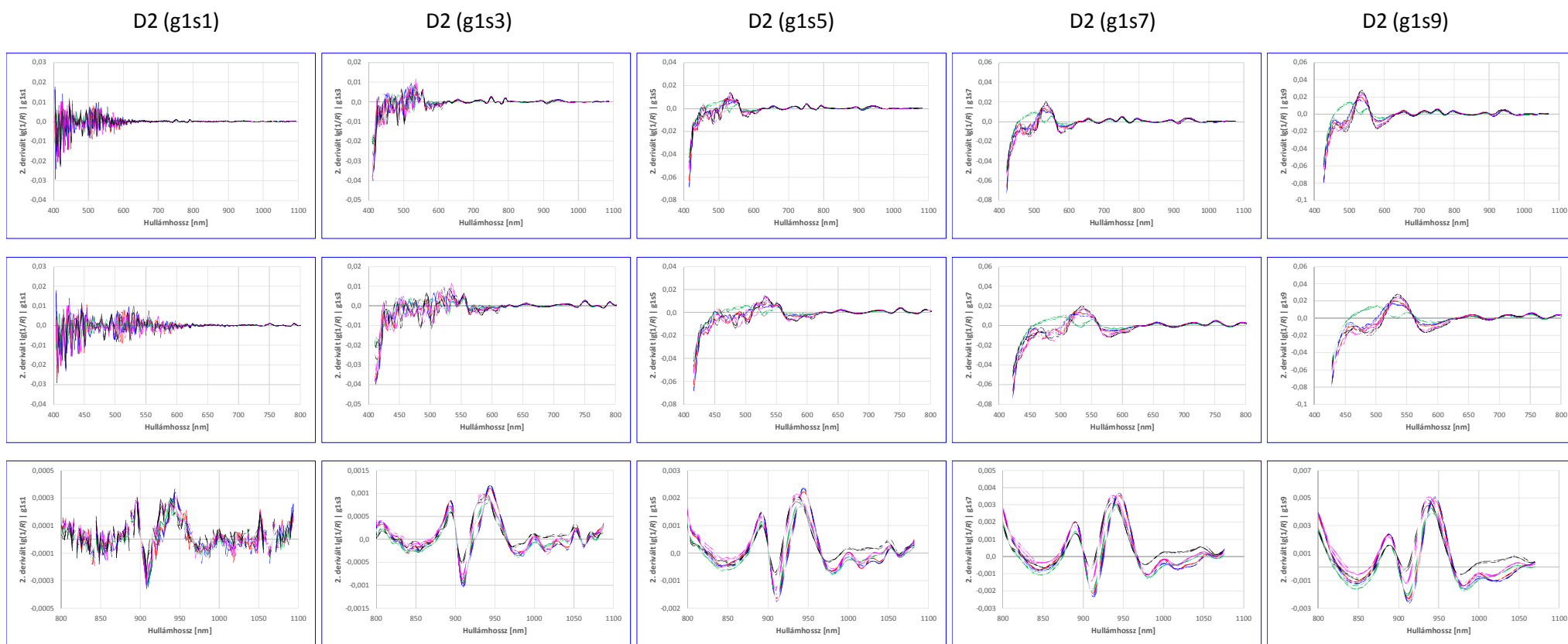


17. ábra: Napraforgópollenek Si és PbS detektorokkal mért, SNV matematikai kezelésen átesett Vis-NIR spektrumai
(hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)

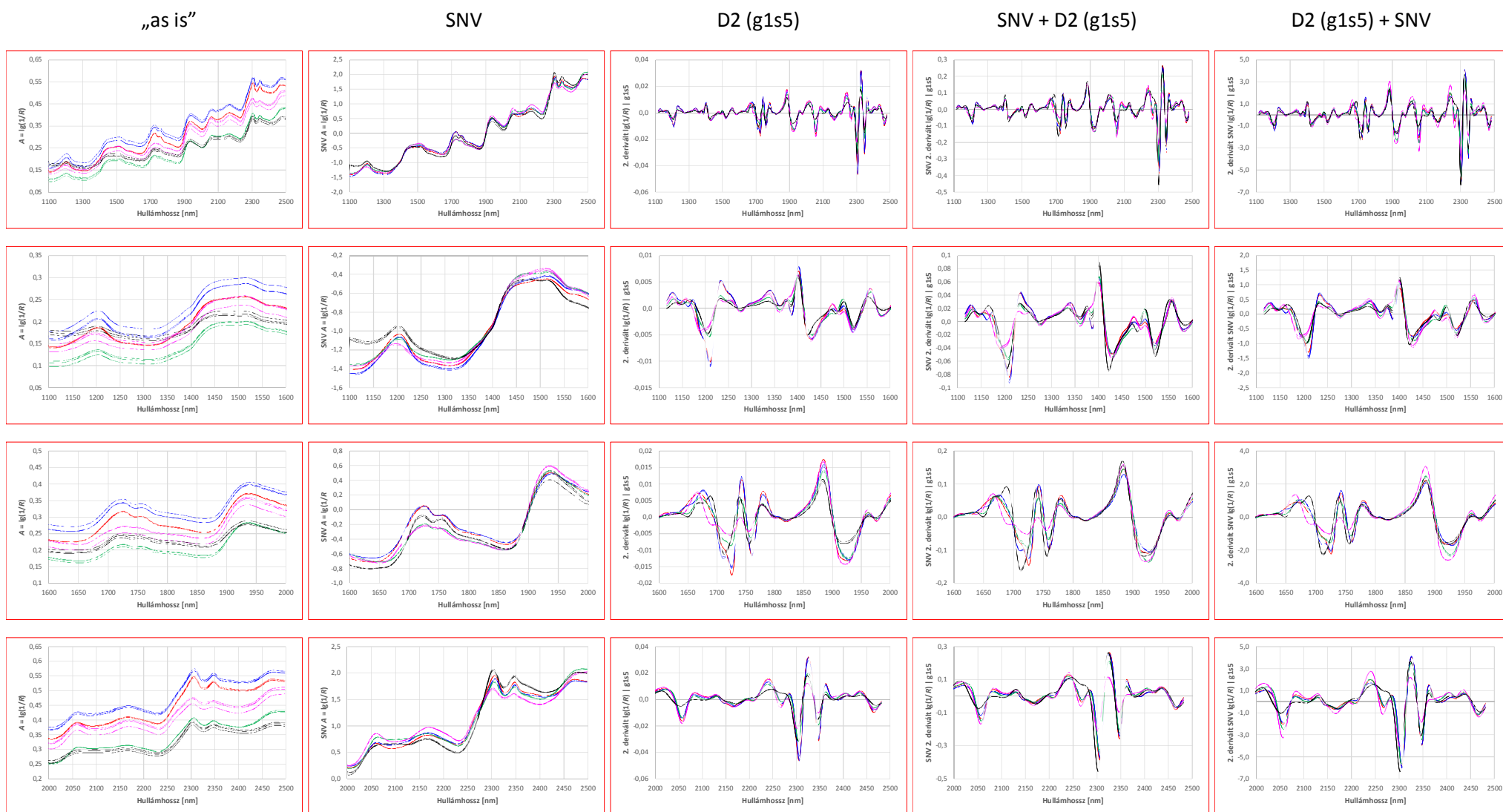
A következőkben a 18. ábrán, mely a PbS detektorral mért Vis-NIR spektrumokat, és azok kiemelt hullámhossztartományait tartalmazza, a simítással kombinált deriválás hatásait mutatom be. Míg a rés (*gap*) értéke végig változatlanul 1 adatpont, addig a kapu (*segment*) értéke oszlopról oszlopra egyre nagyobb (1, 3, 5, 7 és 9 adatpont). Minél nagyobb *segment* értékkel rendelkezik az adott deriválás, annál kisebb a zaj. Ez leginkább a 400-600 nm közötti szakaszokon látszik, de a hatás a teljes spektrumon szembetűnő, ha ráközelítünk a részletekre. Mindemellett nem szabad arról sem elfeledkezni, hogy ha túl nagy kapukat állítunk be, az ahhoz vezethet, hogy olyan csúcsok szűnnek meg számunkra (azaz simulnak bele az alapvonalba), melyek amúgy fontos tartalommal rendelkeznek. Ez leginkább talán a 800-1100 nm-es tartományt bemutató ábrákon tűnhet fel, ahol a *gls5*-ig inkább tisztul a kép, viszont a *gls7* és *gls9*-es oszlopnál már 1000 nm fölött mintha elvesznének hullámok. Emiatt szoktunk általában „arany középútként” a *gls5* beállítással dolgozni a simítással kombinált második deriváltaknál. A különböző *gap-segment* beállításokat a PbS detektorra az I. melléklet / 1. ábrája tartalmazza, ugyanígy a *gls5* beállítással kombinált második derivál alkalmazása a teljes spektrumon is a mellékletben található (I. melléklet / 2. ábra).

A második derivált alkalmazásának legnagyobb haszna az asszignálásnál van, hisz ez a matematikai előkezelés tisztább, erőteljesebb, jobban elváló csúcsokat ad nekünk, melyeket így könnyebb beazonosítani. Ehhez a folyamathoz a NIR tartományban a 19. ábra nyújtja a legnagyobb segítséget, ugyanis itt egyszerre láthatjuk az „as is”, azaz kezeletlen spektrumokat, majd az SNV, illetve a második derivált *gls5* simítási beállításának hatásait, majd ennek a két technikának a két félé keresztezését. Egyik esetben az SNV-t hajtottuk végre először, és utána a deriválást, a másik esetben pedig fordítva, a deriválás történt meg hamarabb, majd ezt követte a normálás. A tapasztalat azt mutatja, hogy a kettő elég hasonló eredményt ad, de talán az utóbbi egy kicsit jobb, összhangban azzal, amit kemometrikus berkekben jobban preferálnak: először zajszűrés (a simításoknak köszönhetően), majd normálás.

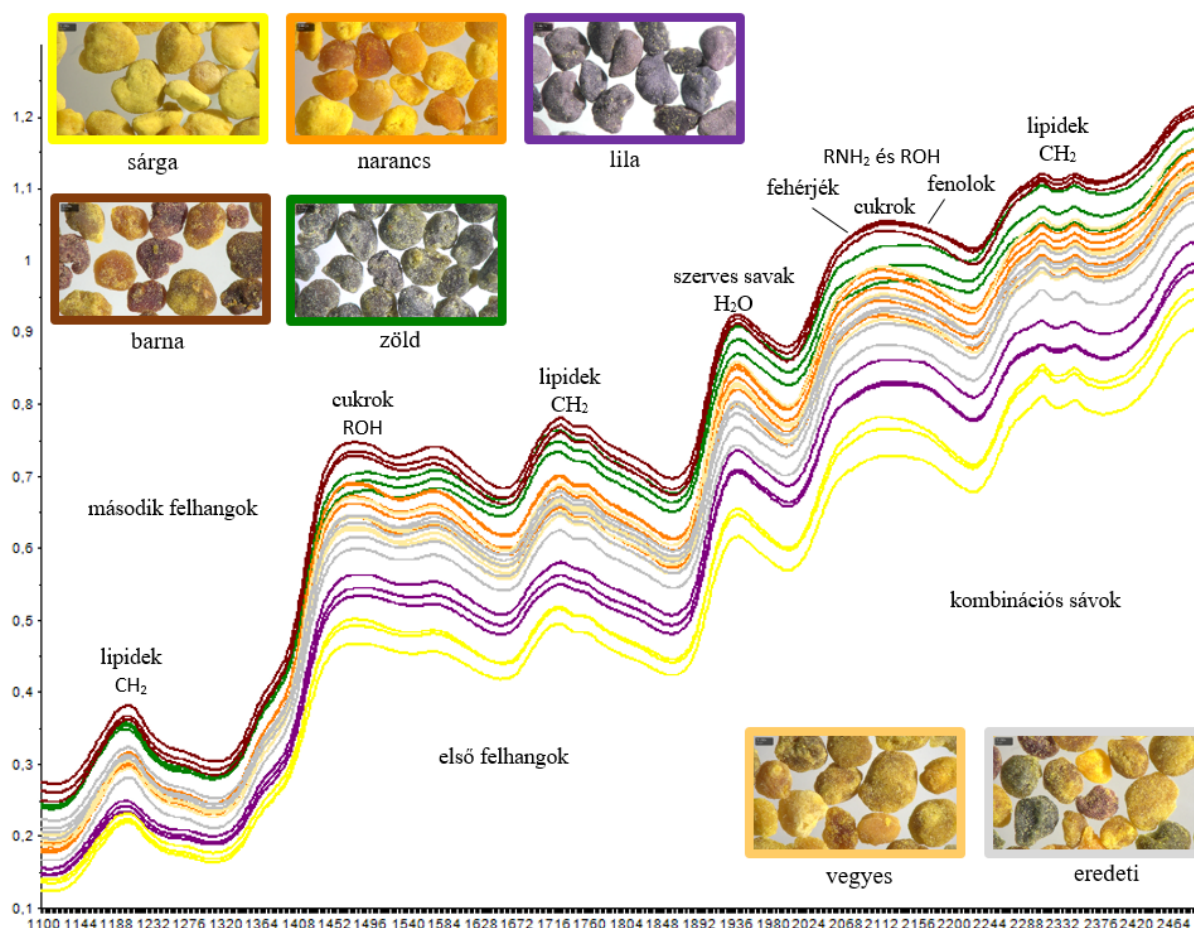
A csúcsok azonosításában a második deriváltak mellett még nagy segítséget nyújthat, ha hasonló anyaggal foglalkozó munkák eredményeit is megnézzük. BSc szakdolgozatomban már vizsgáltam kezeletlen virágporokat: az akkor mért spektrumokat és asszignációikat a 20. ábra mutatja be. Látható, hogy az oldószeres kezelések némileg hatással lehetnek egy-egy adott csúcsra, de az egész spektrum jellege nagyon hasonlít a korábbi mintákéra, és az akkori munkámhoz használt cikkben bemutatottakra is. (Bleha *et al.*, 2021)



18. ábra: **Napraforgópollenek** Vis detektorral mért, simítással kombinált 2. derivált Vis-NIR spektrumai különböző rés-kapu (gap-segment) beállításokkal
(hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)



19. ábra: **Napraforgópollenek** *PbS* detektorral mért NIR spektrumai matematikai kezeléseik nélkül (1. oszlop), matematikai kezelésekkal (2-3. oszlop) és ez utóbbiak kombinációival (4-5. oszlop)
(hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)



20. ábra: Korábbi munkám során kezeletlen virágporcsomók vizsgálatánál végzett NIR asszignáció (Madács, 2022)

A lipidek második felhangjainak megjelenésénél (1200 nm környékén) a csak **hideg/forró** vizes kezelésen átesett minták nagyobb, és szinte teljesen egyező mértékű jelet adnak, míg leghatékonyabbnak a **Soxhlet-extrakció és a Cellosolve™** együttes alkalmazása volt. A cukrok második felhangjainál (1450-1550 nm között) jelentős eltérést nem láthatunk a kezelések között, ami nagyjából egybeesik azzal, hogy az összes minta átesett egy poláris kezelésen, ezzel csökkentve a vízoldható cukrok mennyiségét. A spektrumok csúcsainak jellege is kicsit eltér a korábban vizsgált natív mintáimtól. A lipidek első felhangjainál (1725 és 1755 nm) megint csak a **forró vizes** illetve **hideg vizes** minta mutatja a legnagyobb csúcsot, és ezek hasonlóan is néznek ki, mint a korábbi natív mintáimnál mért spektrumok, ami nem meglepő, hisz vízzel nem oldjuk ki a zsírokat. Érdekes, hogy itt a foszforsavas kezeléshez képest a **Soxhlet + Cellosolve** és a **hideg NaLaSH + hideg IPA** is kisebb intenzitást mutat. A kombinációs sávoknál 2060 és 2170 nm között egy kicsit eltérnek a kezelt mintáim spektrumainak jellegei a korábbi natív mintákétól, ebben valószínűleg megint a cukrok kioldódása játszik szerepet. Itt egyértelműen a foszforsavval kezelt minta adja a legkisebb jeleket, tehát ott nem csak a cukrok, hanem más, fényelnyelést okozó anyagok is távoztak a

mintából. A kombinációs sávban található kettős lipidcsúcs (2306 és 2348 nm) jellegénél fogva a **Soxhlet + Cellosolve** kezelést mutatja a legjobbnak.

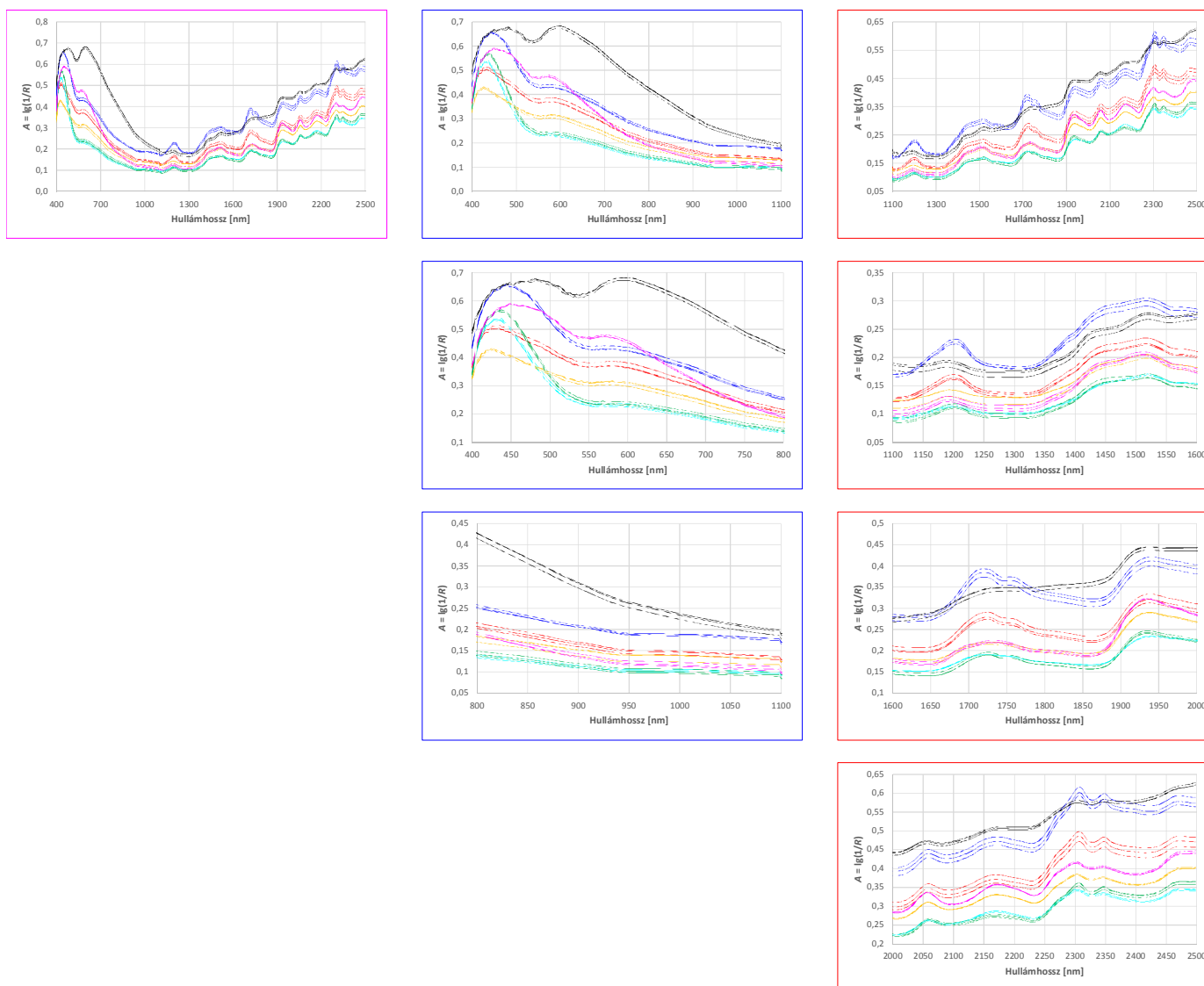
Összesítve az eddig ismertetett eredményeket valószínűsíthető, hogy a lipidek kioldásában a **Soxhlet + Cellosolve** kezelés végezte a legjobb munkát a napraforgópolleneknél, de a foszforsavas tisztítás spektrumai mutatták talán a legegységibb alakot, bár továbbra is hangsúlyozandó, hogy a különböző tisztítási eljárások nem okoztak akkora különbségeket. A korábbi natív virágcsomó mintákhoz képest vannak szembetűnő, az összes spektrumon megjelenő eltérések, amik valószínűleg a vízzel oldható poliszacharidok távozásának köszönhetők.

4.1.2. Repcepollenek spektrumai

A 21. ábrán a repcepollenek „as is” spektrumai láthatóak, az eddig is alkalmazott logikai sémában. Itt már első ránézésre is nagyobb különbségek észlelhetők a különböző oldószeres eljárások között, viszont az továbbra is egyértelműen kijelenthető, hogy a párhuzamos mérések együtt futnak, nincs közöttük számottevő eltérés sehol. A repcepollenek esetében a napraforgóhoz képest kettővel több minta állt rendelkezésemre, így két új szint (**hideg víz + hideg IPA** és **forró víz + forró IPA**) is láthatunk a spektrumok közt. A **hideg víz + hideg IPA** és a **hideg NaLaSH + hideg IPA** esetében nagyon finom szemcséjű porokat vizsgáltam, ami egybevág azzal, hogy ezek adják a legkisebb intenzitású jelet. A foszforsavval kezelt minta egy durva szerkezetű, kissé odaégettnek tűnő anyag volt, melynek már a dörzsmozsárban való porítása is nehezemre esett, így nem meglepő, hogy e mintánál erős *A* jeleket kapunk (Vis-ben a sötét szín, NIR-ben a durvább szemcsék adnak kisebb reflexiót). Az eredmények alapján a **hideg vizes** minta esetében se sikerült a többihez közelítő szemcseméretű port készítenem.

A 22. ábrán a repcepollenek SNV-vel előkezelt teljes spektrumai láthatóak. Ahogy a napraforgónál, úgy itt is a két detektor mérési tartománya külön esett át a normálási folyamaton. Az alapvonalak összehúzó hatása itt is látványos hatást ért el, és a spektrumok között első ránézésre is szembetűnő a foszforsavval kezelt mintáé, melynél a legtöbb csúcs intenzitása lecsökkent. A többi spektrum is talán picit nagyobb különbségeket mutat, mint a napraforgó esetében.

A csúcsok asszignálásában a 23. ábra segített, mely (akárcsak a napraforgónál) egyszerre mutatja az „as is”, azaz kezeletlen spektrumokat, majd az SNV illetve a második derivált *gls5* simítási beállításának hatásait, majd ennek a két technikának a kétféle keresztezését. Emellett itt is összevetettem az eredményeket, a 20. ábrán látható korábbi natív mintákkal. A melléklet tartalmazza a különböző *gap-segment* beállítások hatásait a repce esetében (I. melléklet / 3-4. ábra), illetve a *gls5* alkalmazását a teljes spektrumon (I. melléklet / 5. ábra).



21. ábra: **Bepcepollene** Si és PbS detektorokkal mért, matematikai kezelés nélküi (ún. „as is”) Vis-NIR spektrumai
(hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)



22. ábra: **Repcepollene**, **Si** és **PbS** detektorokkal mért, SNV matematikai kezelésen átesett Vis-NIR spektrumai
 (hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)



23. ábra: **Receptolténes** PbS detektorral mért NIR spektrumai matematikai kezeléseik nélkül (1. oszlop), matematikai kezeléseikkel (2-3. oszlop) és ez utóbbiak kombinációival (4-5. oszlop) (hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)

Általánosságban kijelenthető, hogy a repcepollenek esetében a foszforsavas spektrum sokkal enyhébb intenzitású csúcsokkal rendelkezik, így ezt a továbbiakban az adott pontoknál nem is emelem majd ki. A lipidek második felhangjainak megjelenésénél (1200 nm környékén) elmondható, hogy a Soxhlet-extrakció vagy az IPA használata (hőmérséklete nem releváns) intenzitáscsökkenést mutat a NaLaSH, illetve a különböző vizes kezelésekhez képest. A cukrok második felhangjainál (1450-1550 nm között) jelentős eltérés itt sincs az oldószeres kezelések között, de érdekes módon, mintha az egyszerű vizes mosások itt kisebb intenzitásokat mutatnának. A lipidek első felhangjainál (1725 és 1755 nm) – nem meglepő módon – itt is a **hideg vizes**, illetve a **forró vizes** minta mutatja a legnagyobb csúcsot (utóbbi kicsit kisebb intenzitású). A szerves savak első felhangjainál (1940 nm) érdekes módon a **Soxhlet + Cellosolve**, illetve a **forró IPA** adják a legnagyobb jelet, melyek eddig inkább alacsonyabb intenzitásúak voltak. A kombinációs sávoknál 2060 és 2170 nm között – akár csak a napraforgó-pollen esetében – jelentős eltérés van a korábbi natív és a mostani kezelt minták között. Itt megint a szerves savaknál már észlelt anomáliát tapasztalhatjuk. A kombinációs sávban található kettős lipidcsúcs (2306 és 2348 nm) esetében megint a **forró víz** és a **hideg víz** adja a legnagyobb jelet, és ismét az IPA, illetve a **Soxhlet + Cellosolve** esetében láthatunk kisebb abszorbananciát az oldószerekkel távozó, csak kisebb mennyiségben visszamaradt lipidek okán.

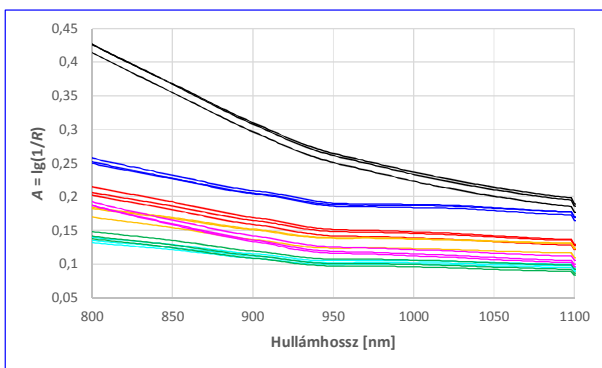
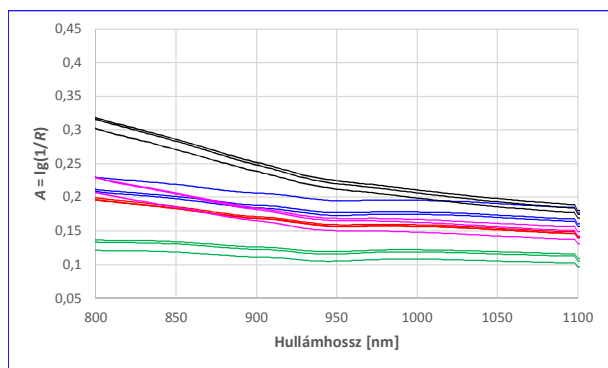
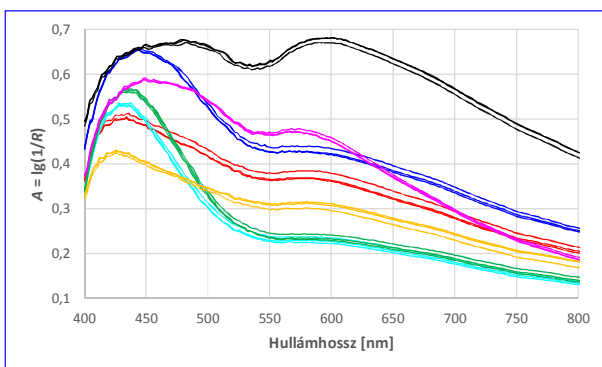
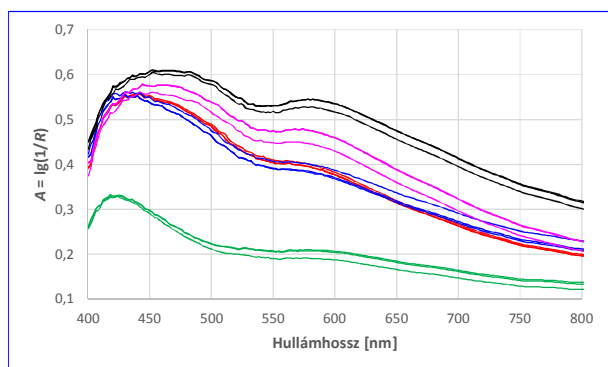
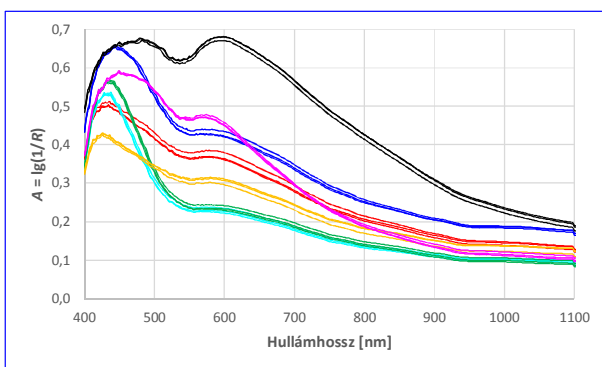
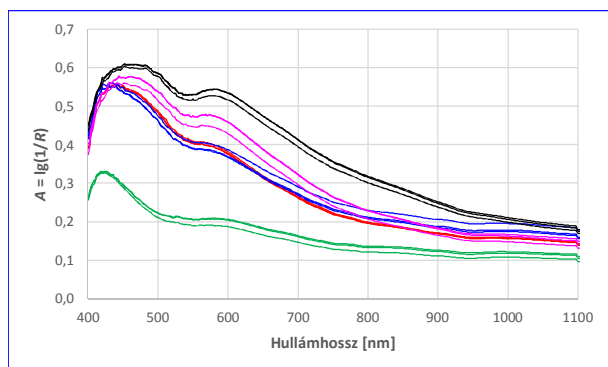
Összességében elmondható, hogy a **meleg vizes** és a **hideg vizes** kezelés nagyon hasonló értékeket ad, illetve a **Soxhlet + Cellosolve** és a **forró IPA** eljárások jeleskedtek leginkább a lipidek kioldásában, és ezen spektrumok is nagyjából együtt mozognak. Természetesen nem szabad megfeledkezni arról sem, hogy a foszforsavat végig mellőztük az elemzés során, mert arról gyakorlatilag minden esetben elmondható lett volna, hogy ez a kezelés szolgál a legkevésbé intenzív jelekkel, azaz a leginkább elszegényíti a polleneket a vizsgált komponensekre nézve.

4.1.3. Napraforgó- és repcepollenek spektrumainak összehasonlítása

A 24. ábrán látható a matematikai kezelések nélküli spektrumok Si detektorral mért tartományainak összehasonlítása a két pollen esetében. A Vis hullámhossztartományai azért érdekesek, mert itt jelennek meg a minták színeinek hatásai. Amelyik szín tartományában elnyel a minta, a szemünk számára annak a komplementere válik láthatóvá. Ennek az értelmezésében segít a 25. ábra, mely szemlélteti az előbb leírtakat, és információt ad a különböző színek elnyelési tartományairól.

napraforgó

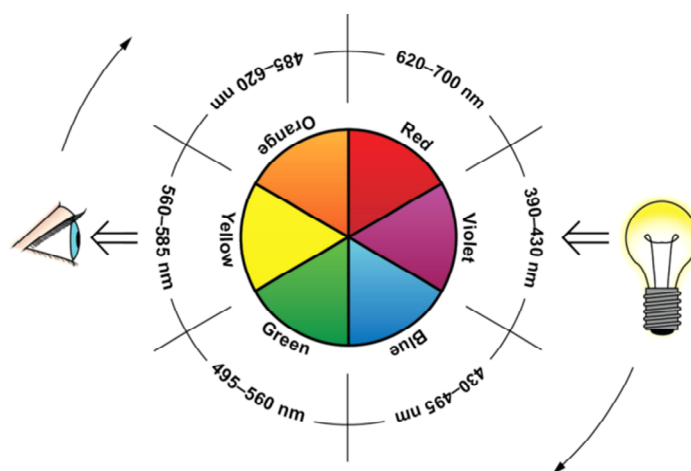
repce



24. ábra: Pollenek Vis detektorral mért, matematikai kezelés nélküli (ún. „as is”) Vis-NIR spektrumai

(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;

repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)



25. ábra: A színek elnyelési tartományának és az ezáltal láthatóvá váló komplementer színek bemutatása (Algar et al., 2016)

Látható, hogy a mintáknak 430 nm körül van egy elnyelési csúcsa, tehát az ibolyánál mutatnak abszorbanciát, azaz számunkra a sárga szín látható. A másik megjelenő csúcs 590-600 nm tájékán mutatkozik, mely a sárga, illetve narancssárga szín elnyelése, azaz itt az ibolya illetve a kék szín érvényesül. Mivel a két csúcs épp az egymással két komplementer színnél mutat abszorbanciát, így nem meglepő, hogy gyakorlatilag mindegyik vagy barnás volt, vagy sárga. A **hideg NaLaSH + hideg IPA**-val kezelt minták esetén (26. ábra) egy nagyon világos, sárga anyagot láthattunk (mely korrelációt mutat az itt látható spektrumaival), illetve a **hideg víz + hideg IPA** esetén is hasonló jellegű porról beszélhetünk, így nem csoda, hogy a repce esetében ez a két spektrum ennyire illeszkedik egymáshoz. A melegebb kezelések esetén a sárga szín csökkenését észlelhetjük, és a komplementere erősödik, azaz a szemünk számára egyre barnább anyagokat látunk. A foszforsavval kezelt minták barnultak be a legjobban (26. ábra), és a két pollen közül a repce öltött sötétebb színt, amit a spektrumokon is láthatunk (24. ábra). A Vis tartományban az azonos kezelésen átesett minták nagyjából hasonló eredményt adnak.

Érdekesség, hogy az antociánok jellemző színei (piros, rózsaszín, lila, kék) a csak vízzel kezelt minták esetében gyakorlatilag teljesen eltűntek. Nem kaptunk eredeti, érintetlen virágpormintát, így nem tudhatjuk, hogy eredetileg mennyire jelentek meg ezek a színek, de az előzményként használt tanulmány (Hegedűs et al., 2021) is tesz egy megjegyzést, hogy az első kezelési fázis során színváltozást tapasztaltak. Mindez azért lehet, mert az antociánok vízoldható vegyületek, tehát könnyen kioldódhattak, a másik színanyag, a karotinoidok pedig zsírban oldódnak, azaz a sárga szín intenzitása inkább a zsírtartalomhoz köthető.

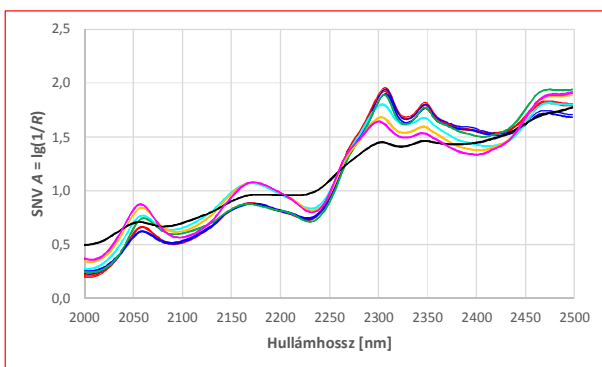
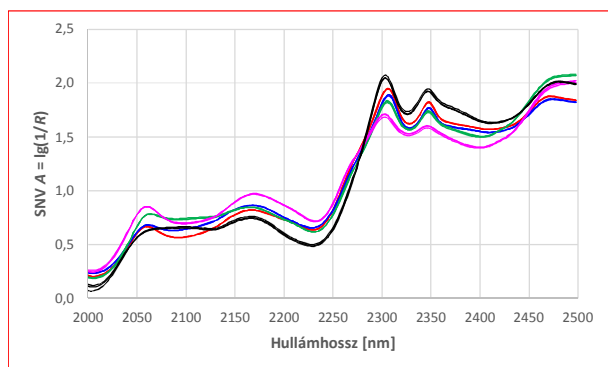
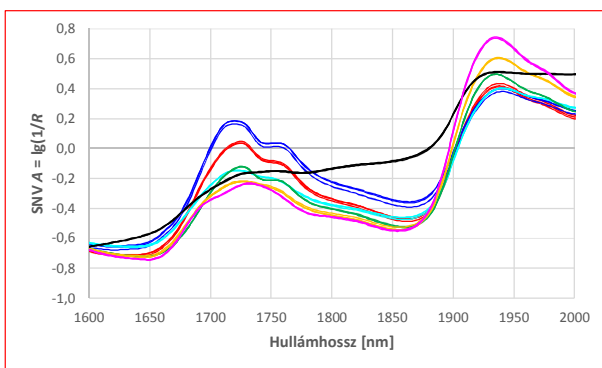
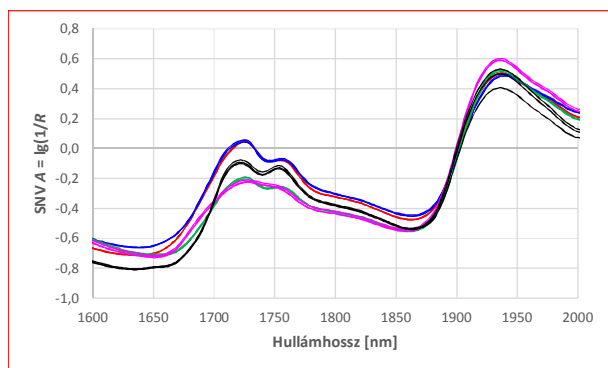
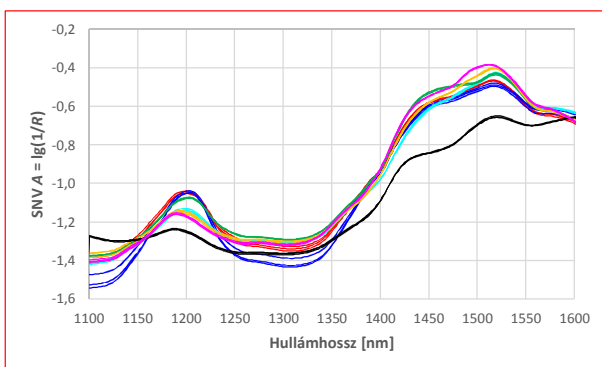
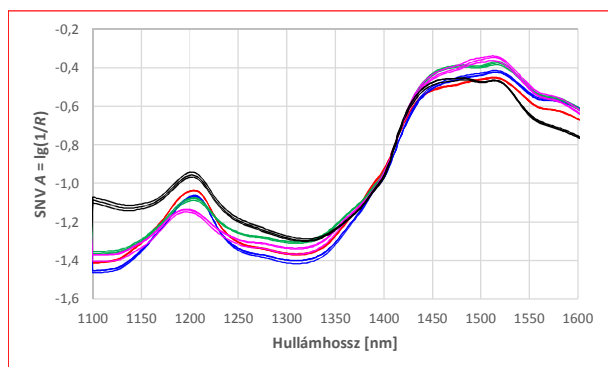
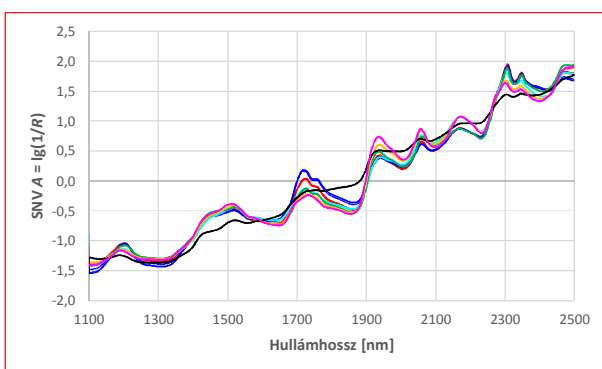
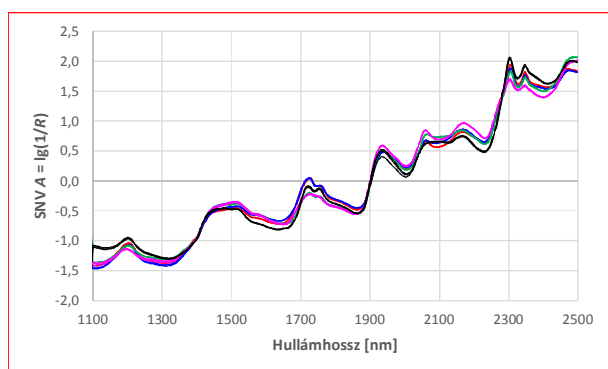


26. ábra: *Hideg NaLaSH + hideg IPA* kezelt (balra), illetve H_3PO_4 kezelt pollenminták (jobbra)
(sorrend balról jobbra a fényképeken: *napraforgó*, *repcse*)

A 27. és 28. ábrán a két pollenfajta PbS detektorral mért, SNV korrigált, illetve simítással kombinált 2. derivált NIR spektrumait vethetjük össze. Látható, hogy mindkét növény esetében nagyjából azonos helyeken jelennek meg csúcsok, legfeljebb azok intenzitása tér el egymástól. Ez utóbbi valószínűleg összefüggésbe hozható a szakirodalom azon állításával, hogy a sporopolleninek hasonló összetételűek, de botanikai származásuk szerint összetevőik aránya eltérhet. Szembetűnő az is, hogy a repce esetében a foszforsavas kezelés jóval hatékonyabb volt. A napraforgónál a *hideg vizes*, illetve a *forró vizes* mosás hasonló spektrumokat adott, de a repcénél nagyobb eltéréseket láthatunk. Erről a szerzők (Hegedűs *et al.*, 2021) is írtak, hogy a legtöbb minta esetén mindegy volt a víz hőmérséklete, de a repcénél a meleg víz kevésbé volt szerintük hatékony. Az azonos kezelések hatásai némiképp eltérnek a két pollennél, így úgy gondolom, hogy ha ezt a technológiát használnánk a tisztítás nyomon követésére, akkor valószínűleg minden pollenhez uralkodó gazdanövényenként más-más standard spektrumot kellene rögzíteni. A többi, botanikai eredet alapján összehasonlítható spektrumára a mellékletben található (I. melléklet / 6-10. ábra).

napraforgó

repce



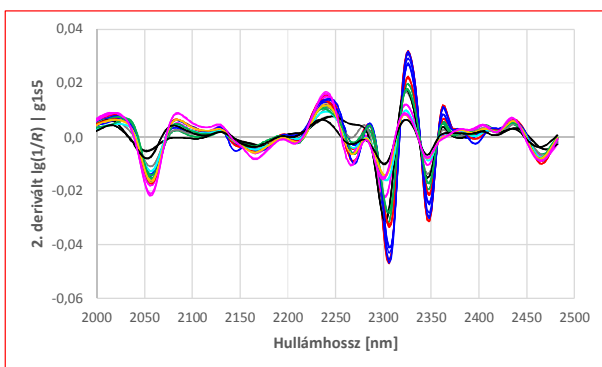
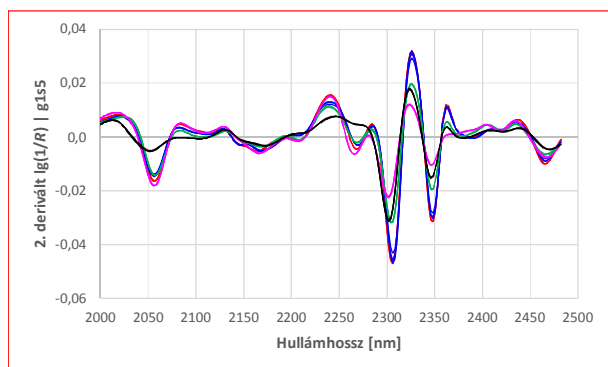
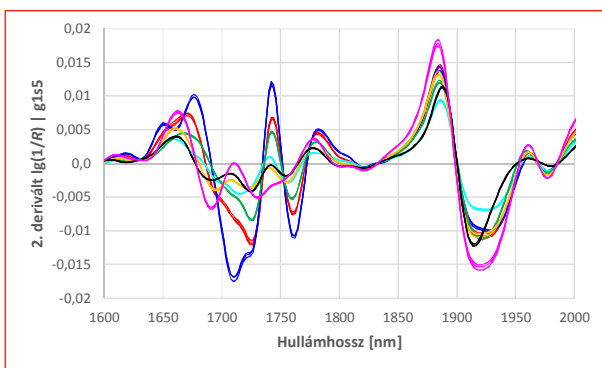
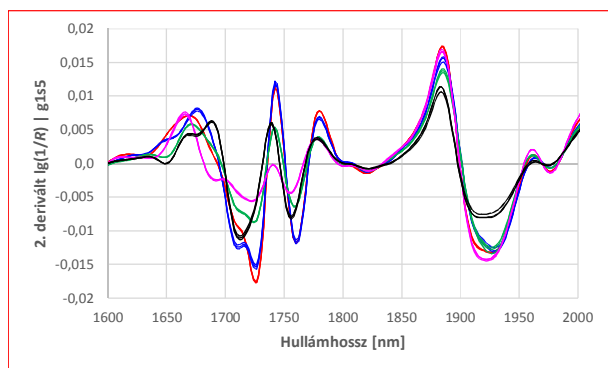
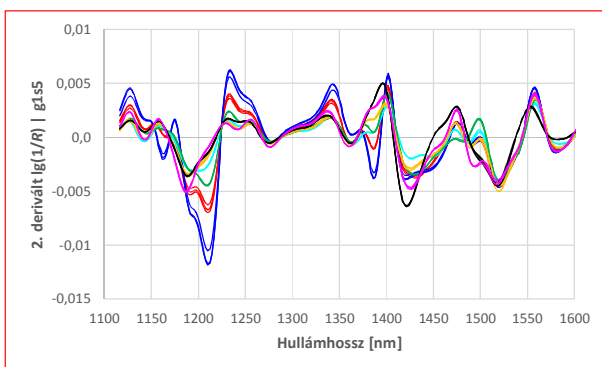
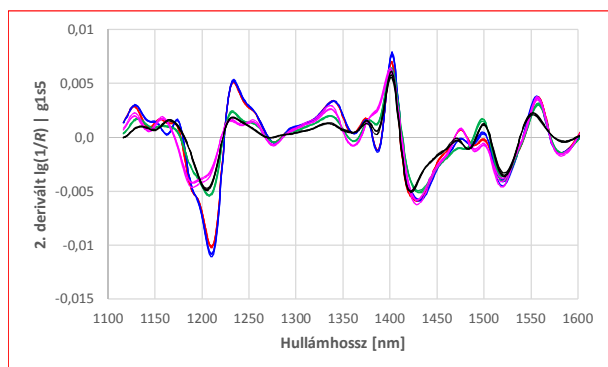
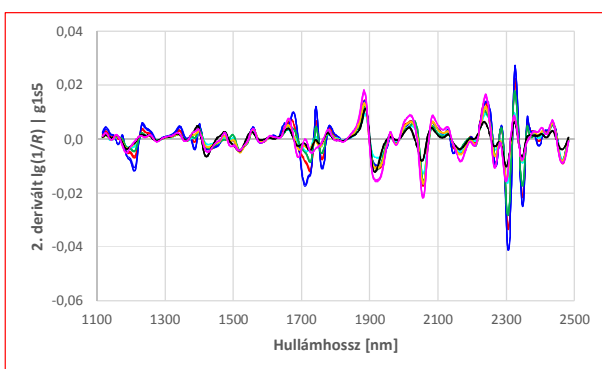
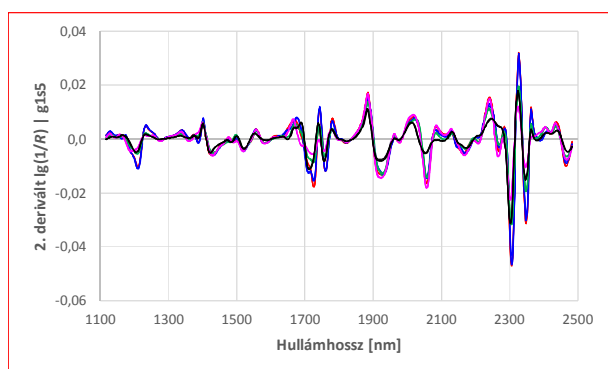
27. ábra: Pollenek NIR detektorral mért, SNV matematikai kezelésen átesett NIR spektrumai

(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;

repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)

napraforgó

repce



28. ábra: Pollenek NIR detektorral mért, simítással kombinált 2. derivált NIR spektrumai
(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;
repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)

4.2. FT-IR spektrumok bemutatása

A 29. és 30. ábra bemutatja az oldószeres kezeléseken átesett napraforgó-, illetve repcepollenek teljes ATR FT-IR spektrumát kezeletlenül és SNV előkezelés után is. Jól látható, hogy spektrum-transzformáció nélkül hatalmas alapvonal-eltolódásokat kapunk, melynek magyarázata a különböző szemcseméretű és keménységű minták eltérő érintkezése a pár milliméter átmérőjű gyémánkristállyal. A könnyebb értékelés érdekében mindenképp érdemes SNV előkezelést alkalmazni, azonban el kell döntenünk, hogy a vegyértékrezgések tartományát ($4000\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$), illetve az ujjlenyomat-tartományt ($1800\text{--}650\text{ cm}^{-1}$) együtt normáljuk, vagy külön-külön. Ezeken az ábrákon mind a két verzió látható: a 2. oszlopban a teljes tartomány együttes kezelése történt meg, míg a 3. oszlopban azt láthatjuk, mikor a normálást a két tartományra külön végezzük el, majd azokat összeillesztjük. Alaposabban megvizsgálva látszik, hogy egy-egy csúcsnál eltérések lehetnek az intenzitások között az eltérő módszereknek köszönhetően.

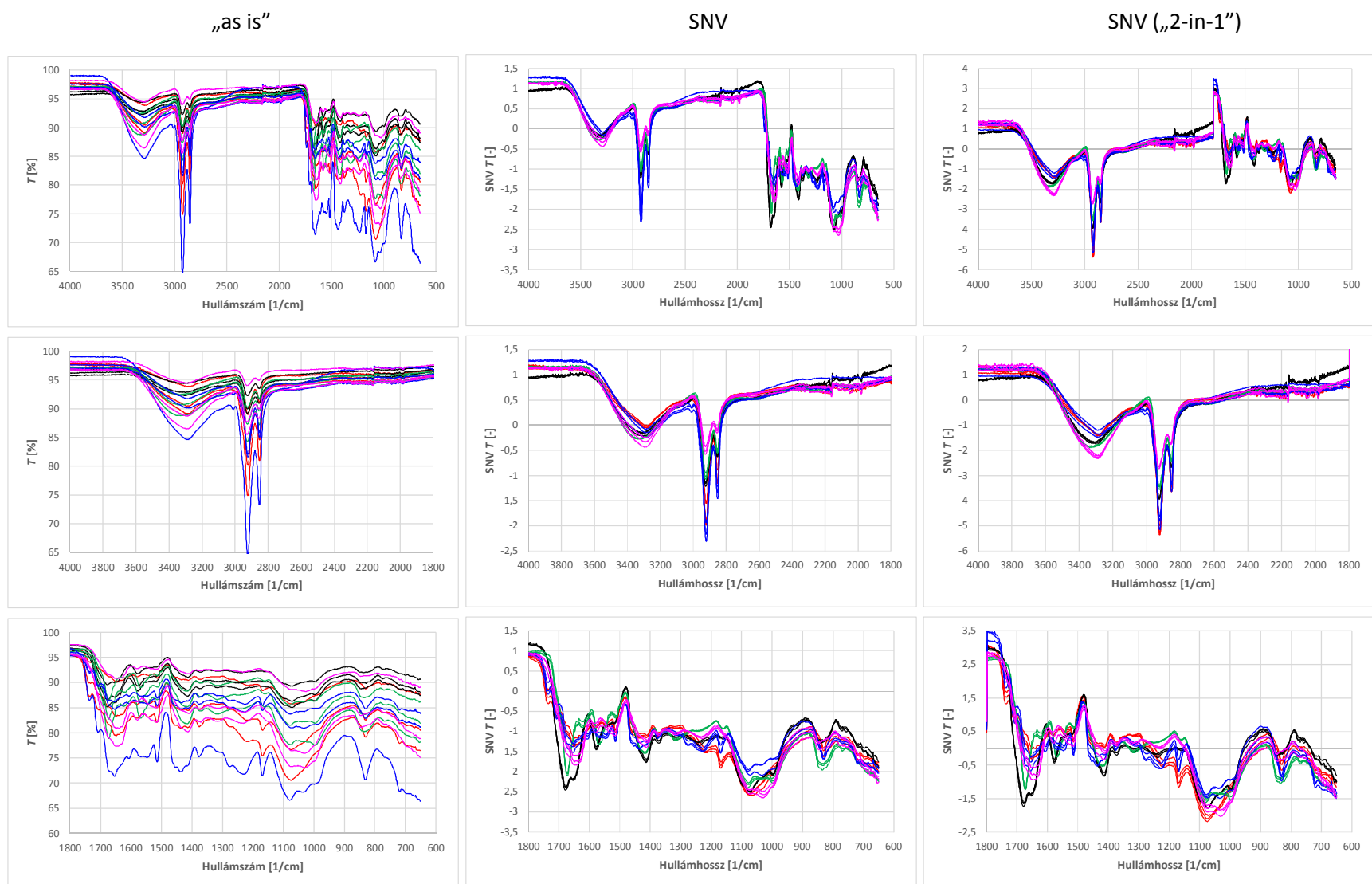
A 31. ábrán a két pollenfajta összehasonlítását láthatjuk. A vegyértéktartományban ($4000\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) nincs nagy eltérés, mindkét esetben érzékelhetünk egy csúcsot 3300 cm^{-1} körül, melyért az O–H kötések lehetnek felelősek (amelyek lehetnek víz vagy szénhidrát – mint polihidroxi-oxovegyületek – eredetű), vagy az N–H kötések, melyek például a fehérjék peptidkötéseire jellemzőek. Az, hogy a kettő közül melyik érvényesül jobban, a csúcs alakjából kikövetkeztethető. Ha inkább egy U betűre hasonlít, akkor az O–H kötések dominálnak, ha pedig inkább V betűre, akkor az N–H kötések okozzák az elnyelést. Esetünkben szinte az összes spektrum inkább V alakot ölt, ami nem meglepő, hisz a legtöbb kezelési folyamat az oldószer eltávolításával, szárítással zárult, így a nedvesség okozta O–H elnyelések kizárhatók. Egyedül a **hideg NaLaSH + hideg IPA** spektruma enged arra következtetni, hogy ott talán a víz is megjelent ezen a hullámhosszon. A következő két csúcsot kettős lipidcsúcsként szokták emlegetni. Itt látszik, hogy mindkét pollen esetében a csak vízzel kezelt minták adják a legnagyobb csúcsokat, ami nem meglepő, tekintve hogy ezeknél a lipidek kioldására még nem voltak egyéb törekvések. Legjobb eredményeket a lipidszint csökkentésében – akárcsak a NIR tartományban – itt is a **Soxhlet + Cellosolve** kezelés adta, de a foszforsavval is jó eredményeket értek el.

Az ujjlenyomat-tartományt ($1800\text{--}650\text{ cm}^{-1}$) elemzéséhez fontos megemlítenünk, hogy ez egy komplex biológiai minta, így a csúcsok azonosítása meglehetősen nehéz feladat. A 32. ábra egy korábbi mérés spektrumait mutatja be, ahol kezeletlen virágpороkat vizsgáltam ezen a tartományon. Azonnal látszik, hogy a cukrok által generált hatalmas csúcs ($1190\text{--}950\text{ cm}^{-1}$) a

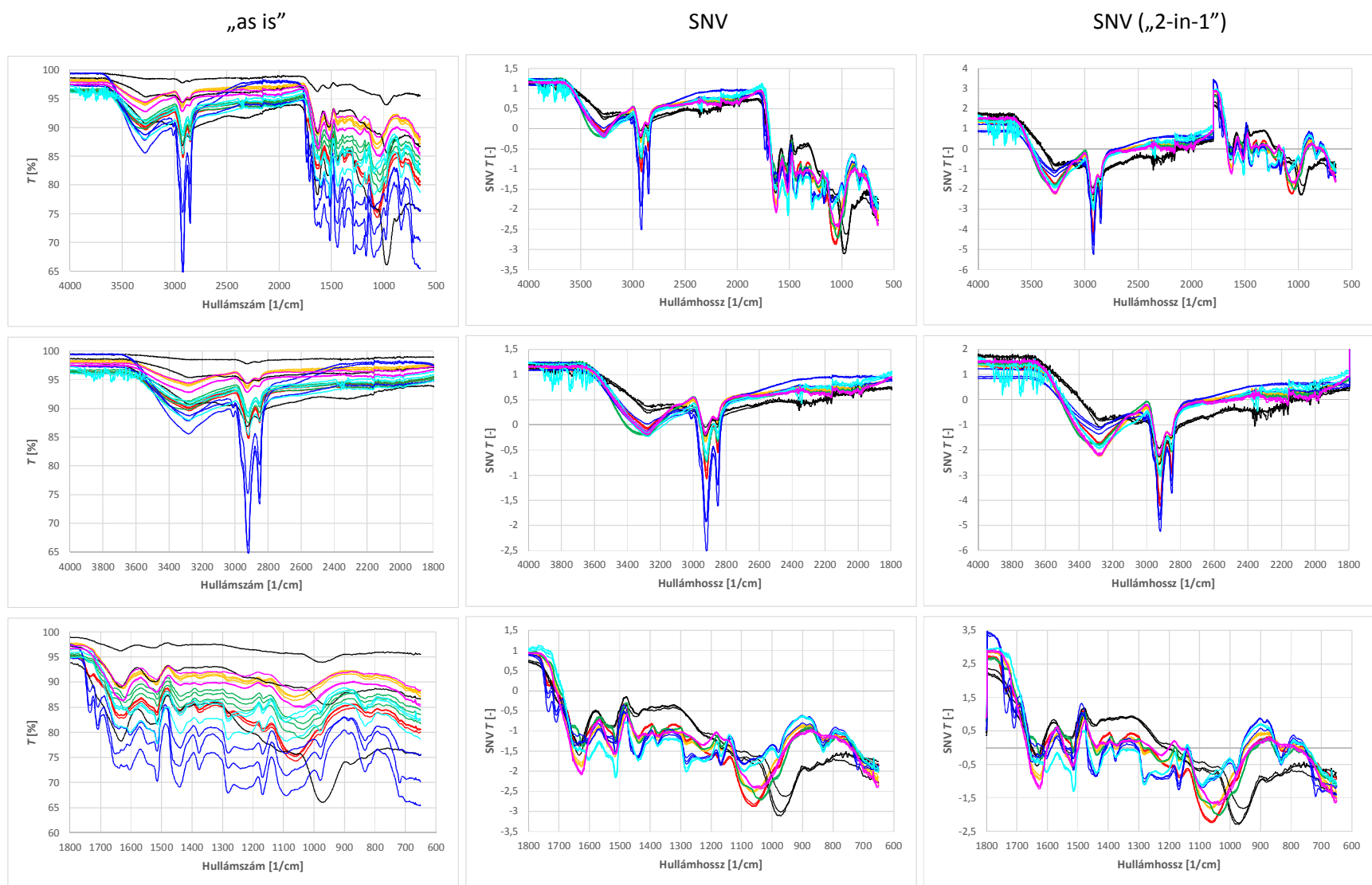
kezelésnek alávetett mintáknál jóval kisebb, mindemellett viszont elmondható, hogy a spektrumok alapvetően megegyeznek, hasonló helyeken adnak csúcsokat. A napraforgó- és repcepollen minták FT-IR spektrumainak összevetését megnézve azt is láthatjuk, hogy míg az előbbinél sokkal egyezőbb, rendezettebb ábrát kaptunk, addig utóbbinál sokkal zavarosabb az egész kép. Nem szabad elfeledkeznünk róla, hogy a repce esetében több mintát mértünk, többféle tisztítási módszer hatásosságát vizsgáljuk, és már ez is okot adhat a spektrumok zavarosságára, de mindenképp érdemes megemlíteni, hogy több kezelés mintha intenzívebb jeleket adna néhol, mint az egyszerű vizes mosással kezelt társaik. A repce esetében egész nagy különbség van közöttük is, hogy **forró vízzel**, vagy **hideg vízzel** kezelték. Erről a korábbi cikkben (Hegedűs *et al.*, 2021) is beszámoltak, hogy a repce esetében a hideg vízzel jobb hatásfokot tudtak elérni meglepő módon, és itt is azt láthatjuk, hogy a hideg víz esetében mértük a legkisebb csúcsokat a cukroknál. A foszforsavas kezelés spektruma a repcénél drasztikusan másképp fut, mint a többiek, amit akár elkönnyvelhetnénk hatásosságnak is, de érdekes kérdés, hogy a cukrok jellemző tartományainál miért ad teljesen máshol intenzív jelet, mint a társai. Felmerül a lehetőség, hogy itt esetleg már roncsolódhatott, a sporopollenin szerkezete is.

Az, hogy a két pollenfajta hasonló, de mégsem teljesen azonos spektrumokat generált, alátámasztja az irodalom azon állítását, hogy botanikai származástól függően eltérő összetételű sporopolleninek tisztítását végezzük (és már maga a virágporcsomó is más tápanyagértékekkel rendelkezhetett valószínűleg). Az eredmények alapján az a gondolat is felvetül, hogy pollenfajtánként eltérő hatásúak a tisztítási módszerek, hisz míg a napraforgónál kevés változást láthatunk, addig a repcénél sokkal változékonyabb spektrumok születtek – nem csak itt, de a NIR tartományban is. Másik magyarázat lehet erre az anomáliára, hogy a repcepollenokről azt az információt adták mikroszkopikus vizsgálatok alapján, hogy enyhén sérült pollenszemcséket tartalmaz. Lehetséges, hogy a károsult részek miatt tudtak az oldószerek jobban hatni.

A mellékletben megtalálhatóak a kezeletlen spektrumok (*II. melléklet / 1. ábra*) és a teljes spektrumon normált ábrák (*II. melléklet / 2. ábra*) összehasonlításai is.



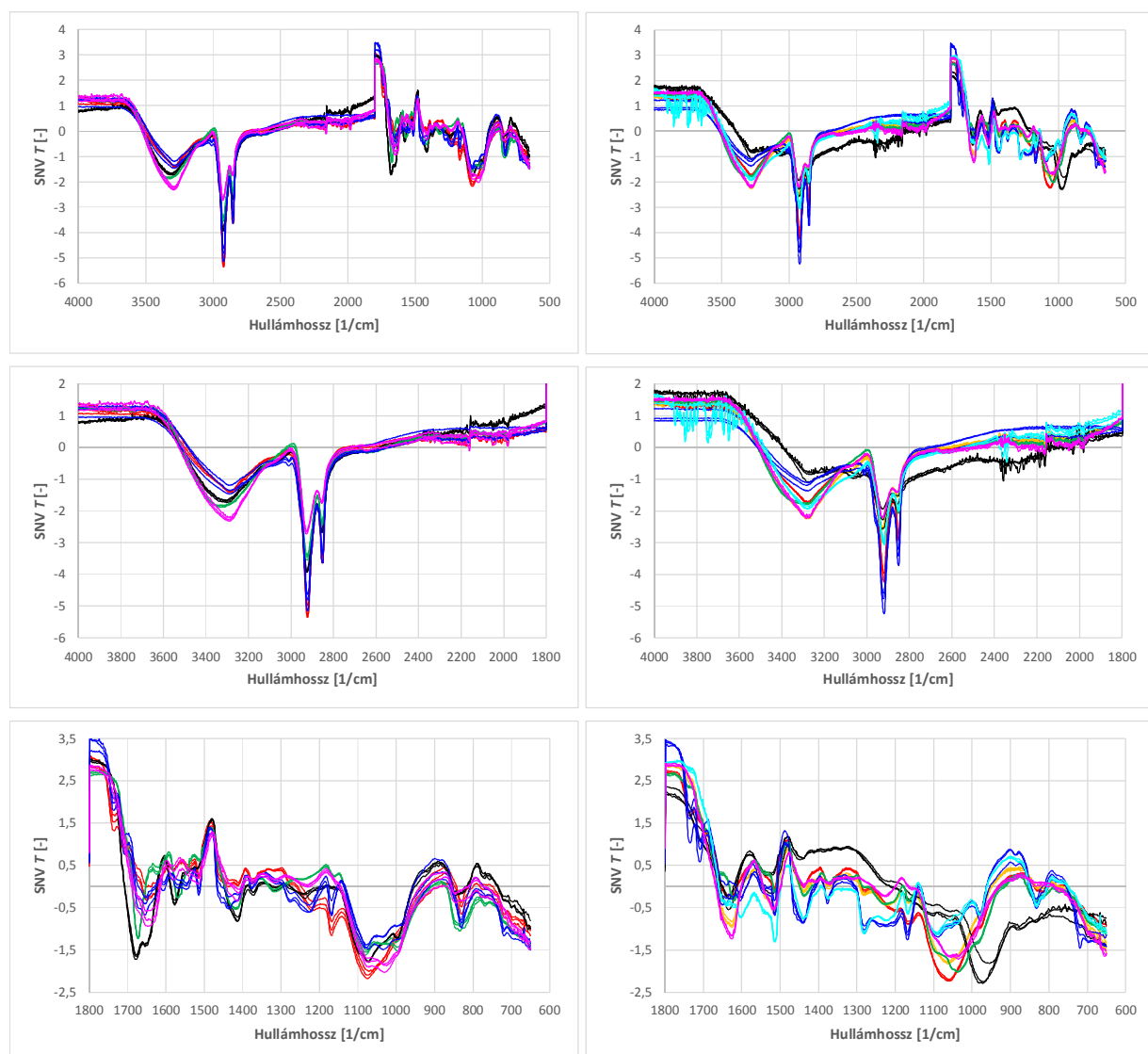
29. ábra: **Napraforgópollenek** ATR FT-IR spektrumai matematikai kezelések nélkül (1. oszlop) és SNV matematikai kezelésen átesve teljes tartományra számítva (2. oszlop), illetve a 4000-1800 1/cm és 1800-650 1/cm-es tartományokra külön-külön számítva, majd összefűzve (3. oszlop) (hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)



30. ábra: Pollen pollenek ATR FT-IR spektrumai matematikai kezelések nélkül (1. oszlop) és SNV matematikai kezelésen átesve teljes tartományra számítva (2. oszlop), illetve a 4000-1800 1/cm és 1800-650 1/cm-es tartományokra külön-külön számítva, majd összefűzve (3. oszlop) (hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)

napraforgó

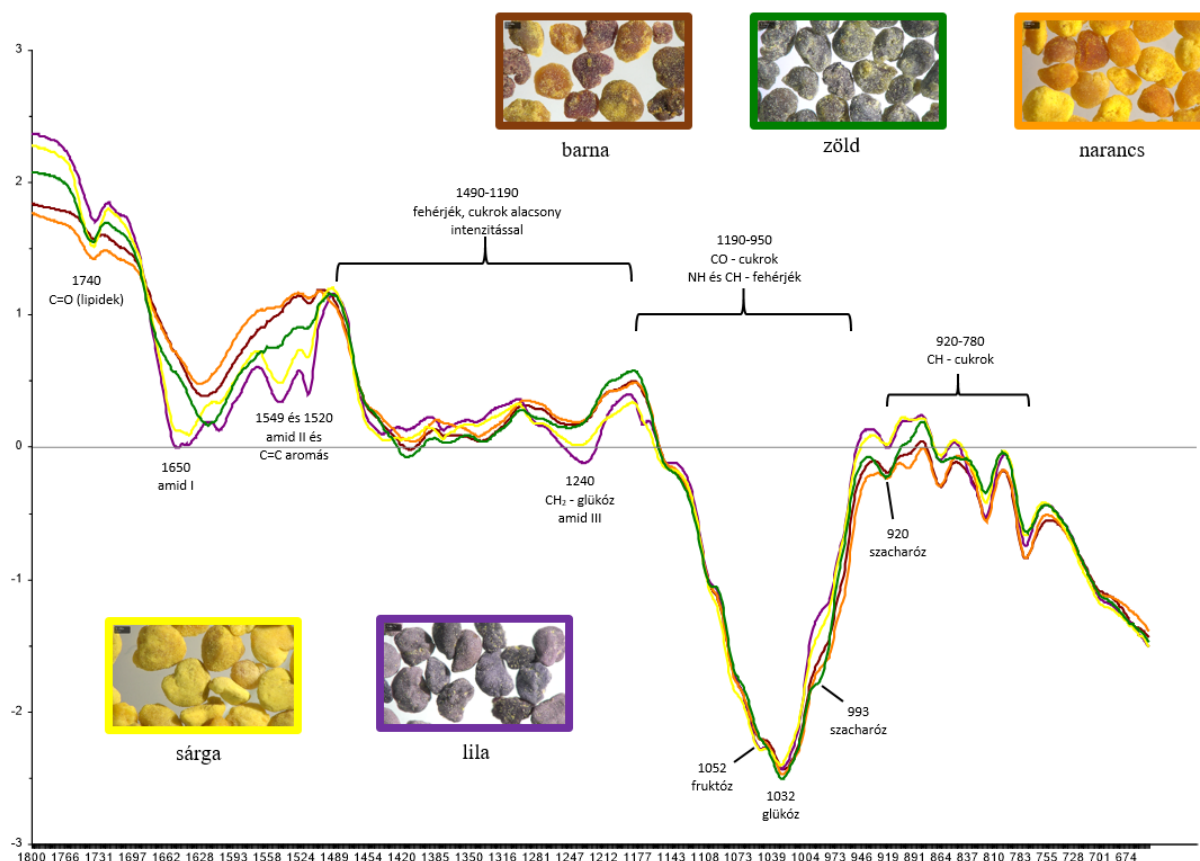
repce



31. ábra: Pollenek SNV matematikai kezelésén átesett, a 4000-1800 1/cm és 1800-650 1/cm-es tartományokra külön-külön számított, majd összefűzött ATR FT-IR spektrumai

(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;

repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)



32. ábra: Korábbi munkám során kezeletlen virágporcsomók vizsgálatánál végzett IR asszignáció (Madács, 2022)

4.3. Klaszterelemzés

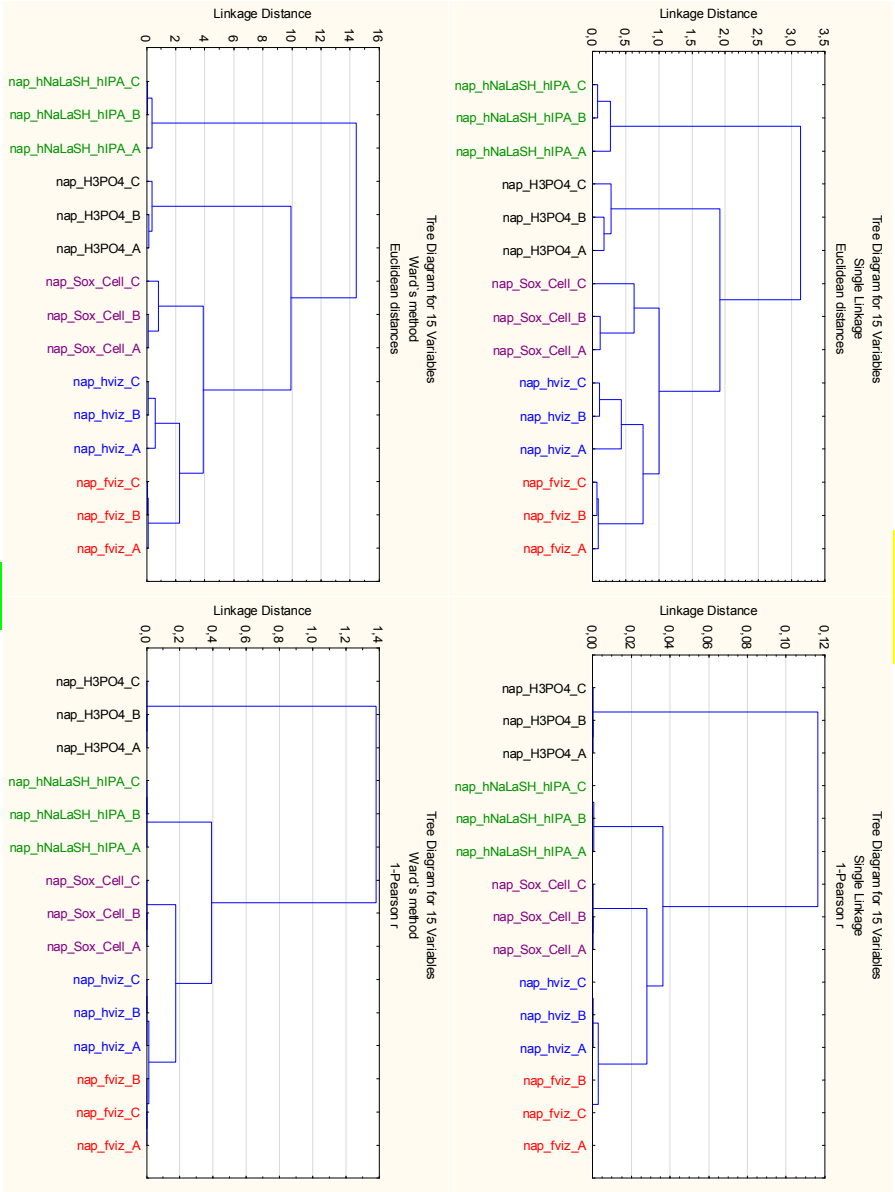
4.3.1. Vis-NIR spektrumok klaszterelemzése

A 33. ábrán a teljes, kezeletlen Vis-NIR spektrumok klaszterelemzése látható. Minden pollenfajta esetében négy ábra készült, mivel kombinálásra került, hogy euklideszi távolság vagy Pearson-féle korrelációs együttható, illetve egyszerű lánc (*single/simple linkage*) vagy Ward-módszer volt alkalmazva. Mindazonáltal elemzési módszertől függetlenül kijelenthető, hogy a párhuzamos minták minden esetben egyértelműen nagy hasonlóságot mutatnak, az első (azaz a legnagyobb rokonságot mutató tagokból álló) klaszterek minden esetben ezekből képződnek, és csak utána vonódnak össze más oldószeres eljárással kezelt pollenekkel. A 34. ábrán az SNV-vel előkezelt PbS detektoros mérések eredményeit mutatom be, mert leginkább ez képes nekünk információval szolgálni arról, hogy kémiai összetétel szempontjából mennyire hasonlítanak egymásra a vizsgált anyagok.

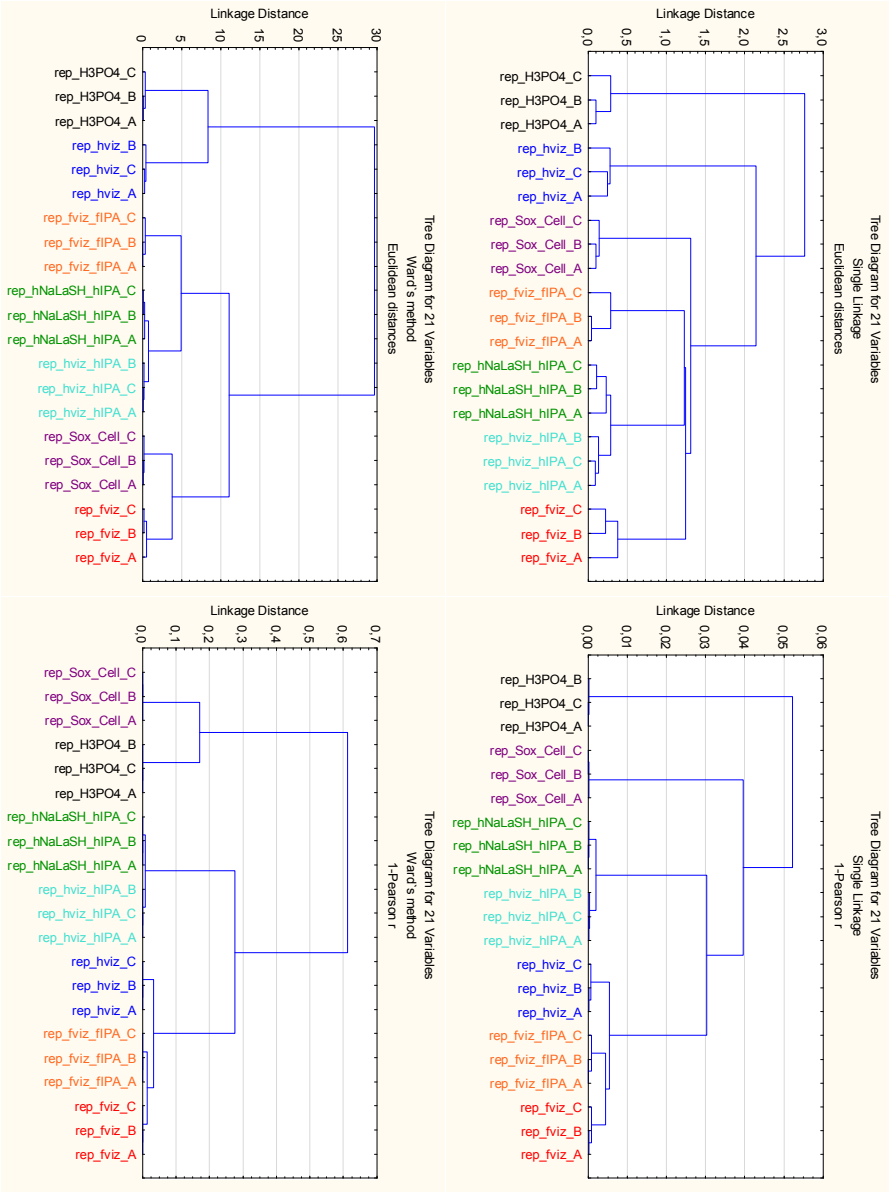
A napraforgó esetében a négy ábra közül három igazából teljesen ugyanazt mutatja, csak a távolságok eltérőek. A két csak vízben oldott minta (hideg/forró víz) alkotja a legközelebbi csoportot, továbbá nagy hasonlóság mutatkozik a hideg NaLaSH + hideg IPA és a Soxhlet + Cellosolve kezelések között. Ez utóbbi azért érdekes, mert a tanulmány (Hegedűs *et al.*, 2021),

mely hátra hagyta számomra ezeket a mintákat, nem is emeli ki igazán, hogy az utóbbi kezelésnek milyen eredményei lettek, bár az F2-es kezelésen átesett anyagnak minősíti. A klaszterelemzés arra enged következtetni, hogy a Cellosolve™ egy nem túl hatékony kezelést nyújtott a mintának, valószínűleg ezért nem lett kiemelve a cikkben sem. A foszforsavval kezelt minta láthatóan nagyon távoli rokonságban van a többiekkel, ami egyrészt érthető, hisz ez egy hatékony F2-es kezelésen is túlesett, másrészt mégis meglepő, mert ez a nagy különbség a spektrumokon kevésbé volt szembetűnő.

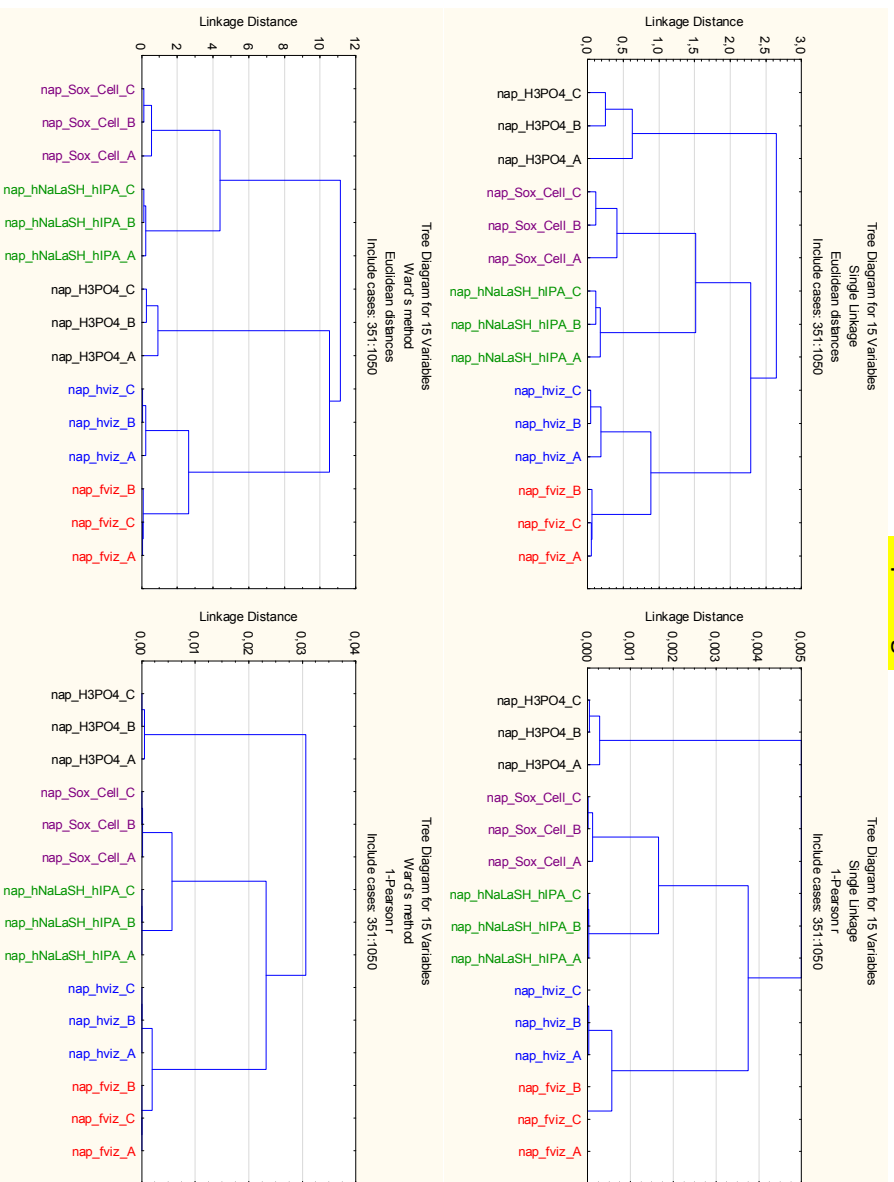
A repcénél az összes elemzési módszer azt mutatja, hogy a foszforsavas kezelés erősen elvág a többiekkel. A **Soxhlet + Cellosolve** ezeken az ábrákon a **forró víz + forró IPA** kezeléssel mutat legnagyobb korrelációt, ami egybevág egyrészt az előbbi megállapításommal – hogy a Cellosolve™ valójában nem nyújtott hatékony F2-es kezelést – és az előzetes tanulmány azon megállapításával is, hogy bár a Soxhlet nyújtotta a legeredményesebb kezelést, a forró víz és forró IPA egymás utáni alkalmazása nem maradt le tőle nagyon hatékonyságban. Láthatjuk azt is, hogy a legtöbb esetben az egyszerű forró illetve hideg vizes kezelések általában itt is elég hamar egy klasztert alkotnak. A további klaszterelemzések ábrái a *melléklet III. szekciójában* találhatóak.



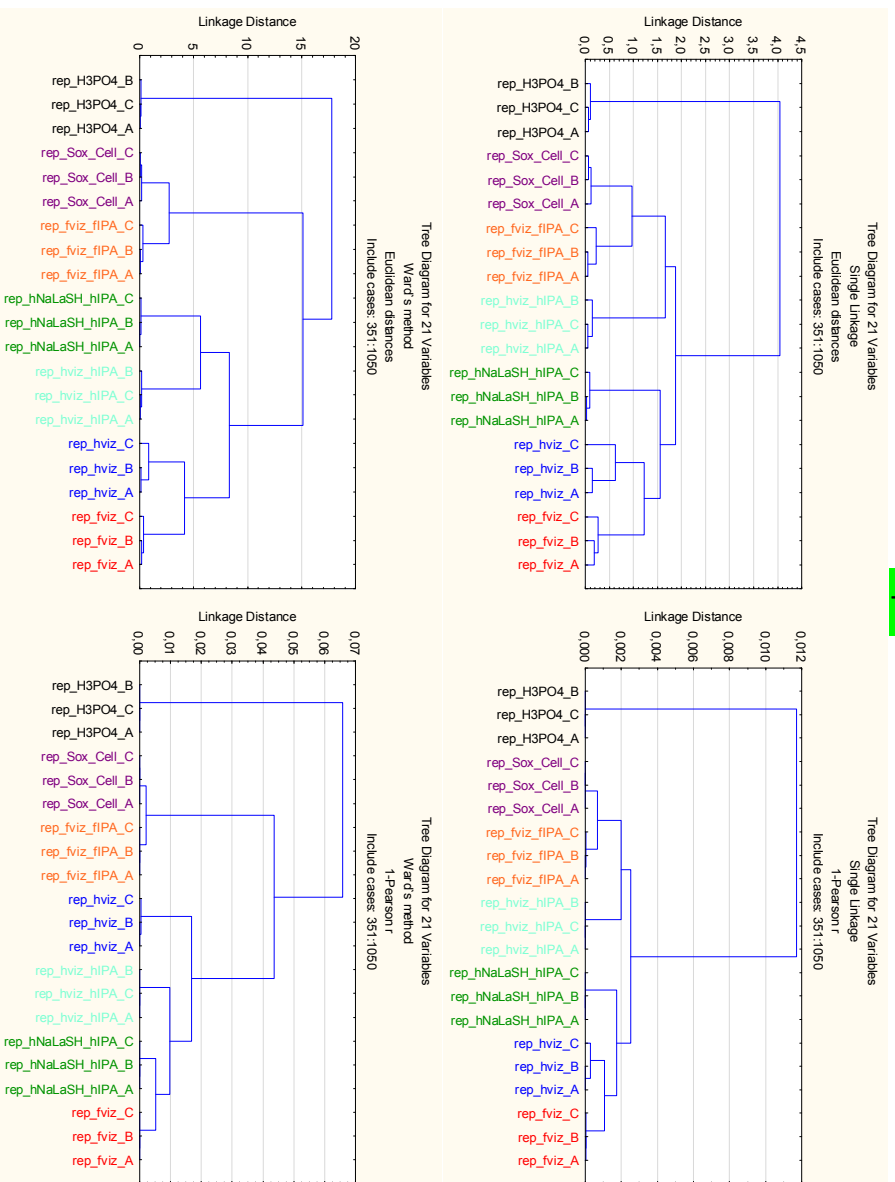
repce



33. ábra. Pollenek Si és *Pbs* detektorokkal mért, matematikai kezelés nélküli (in. „as is”) Vis-NIR spektrumaira készített klaszterelemzés (CA) dendrogramját
(napraforgó: *hideg viz, forró viz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*;
repce: *hideg viz, forró viz, hideg viz + hideg IPA, forró viz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*)



repce



34. ábra: Pollenek *Pbs* detektorral mért, SNV matematikai kezelésen átesett NIR spektrumaiba készített klaszterelemzés (CA) dendrogramját

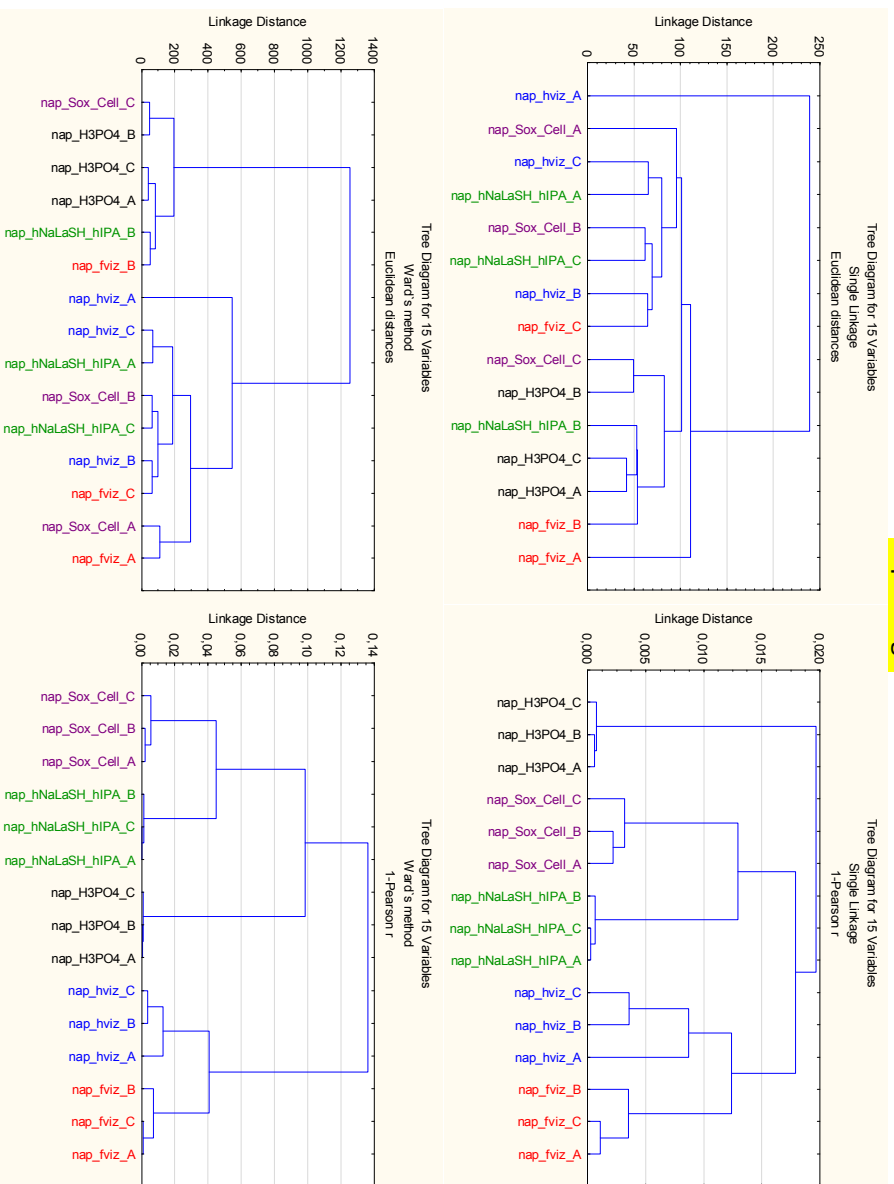
(napraforgó: *hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*;
repce: *hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*)

4.3.2. FT-IR spektrumok klaszterelemzése

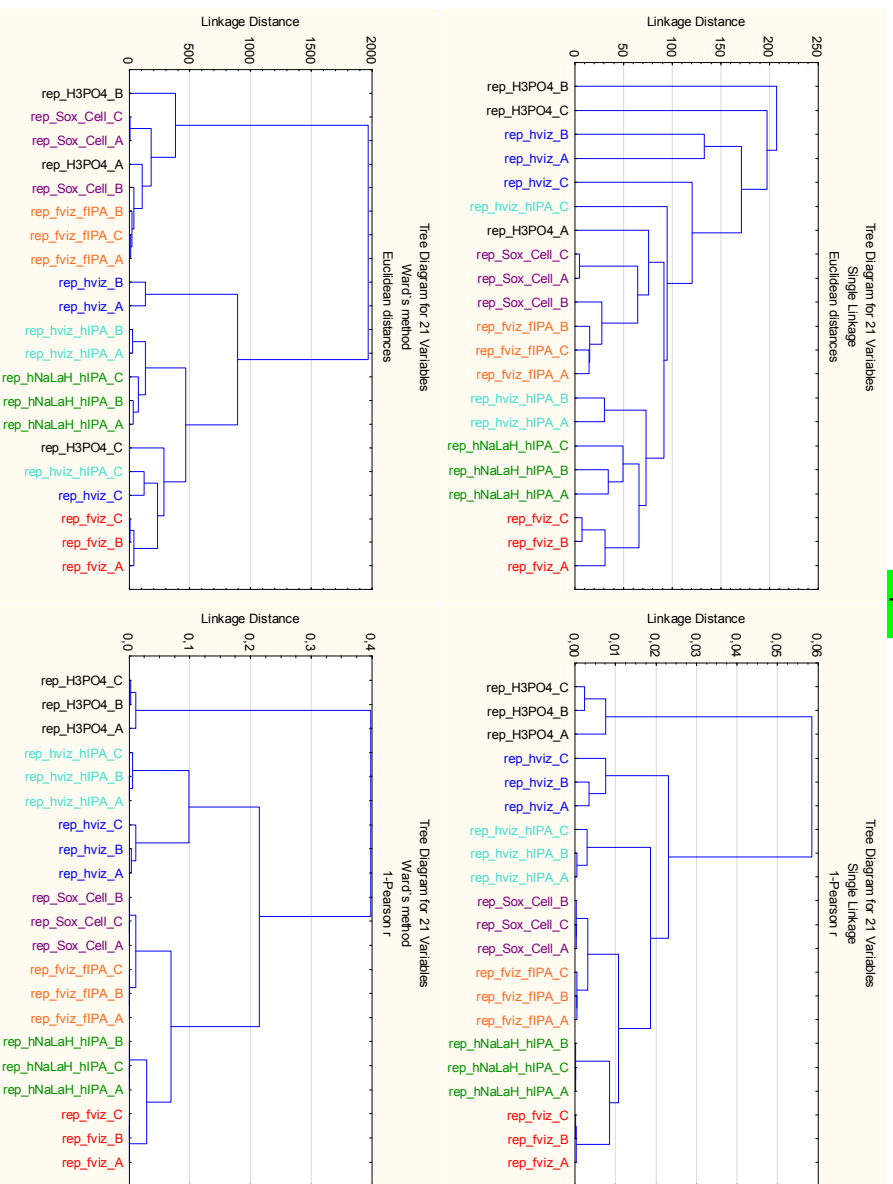
A 35. ábrán a teljes, kezeletlen ATR FT-IR spektrumok klaszterelemzése láthatóak. Megfigyelhetjük, hogy míg az euklideszi távolság esetében a minták párhuzamosai nem alkotnak egyértelmű csoportokat, addig a Pearson-féle korrelációs együttható alkalmazásánál minden esetben jól láthatóan először egymással képeznek klasztereket a párhuzamosak, és csak utána vegyítődnek más oldószeres eljárásokon átesett anyagokkal. Ez annak köszönhető, hogy az SNV előkezelés nélkül az euklideszi távolságoknál az alapvonal-eltolódások dominálnak, míg a Pearson-féle korrelációs együttható nem nézi az alapvonalbeli különbségeket, csak az alakbeli eltéréseket. Ezt támasztja alá a 36. ábra is, mely ugyanezen tartomány SNV-vel előkezelt klaszterelemzését mutatja. Itt láthatjuk, hogy nem csak a párhuzamos minták rendeződtek, de a klaszterelemzési módszerek is egészen hasonló eredményeket mutatnak.

Mivel egy adott anyag összetételbeli jellemzésére az ujjlenyomat-tartomány (1800-650 cm^{-1}) a legalkalmasabb, így a 37. ábrán ennek a klaszterelemzését is prezentálom. Látható, hogy míg a 36. ábrán a napraforgó csak vízzel kezelt mintái elkülönültek, itt igazából csak az emelhető ki, hogy a foszforsavval kezelt minták spektrumai jól elkülönülnek a többiektől, de azok között egyrészt nincs nagy hasonlóság, másrészt mikor elkezdenek közös klasztereket alkotni, akkor viszonylag hamar egyesül mind a négy csoport.

A repcénél szintén jelentős eltérést mutat a foszforsavas minta, de mindenképp fontosnak tartom kiemelni, hogy ezeknél a polleneknél (ahol már a Vis-NIR spektrumok között is nagyobb eltéréseket észlelhettünk) ezen az ábrán gyakorlatilag minden esetben megegyezik a dendrogram szerkezete, azaz nem csak a párhuzamos minták, de az eltérő kezelési eljárások is egyértelmű csoportokat képeznek. Meglepő módon itt a két csak vízben oldott minta (hideg/forró víz) nem mutat akkora azonosulást, de ez alapján feltételezhetjük, hogy a velük először csoportot képző hideg víz + hideg IPA, illetve hideg NaLaSH + hideg IPA hozzájuk hasonló hatékonyságot mutathat. A korábbi tanulmányban (Hegedűs *et al.*, 2021) azt írták, hogy a repce esetében a hideg víz mutatott hatékonyabb tisztítást, azt feltételezték, hogy forró víz esetén valamiféle szerkezeti változás gátolja a tisztítási folyamatot. Tehát feltételezhetjük, hogy a teljes F1-es fázison végig ment minták közül valószínűleg a NaLaSH-sal kezelt érte el legkevésbé a célját. Itt is – akár csak a Vis-NIR klaszterelemzésnél – azt láthatjuk, hogy a forró IPA és a Soxhlet kezelése szoros hasonlóságot mutat, de hiába alkalmaztak a Soxhlet után Cellosolve™-ot, az inkább hasonlít az F1 fázis mintáira, mint a foszforsavas kioldás eredményére. A további FT-IR tartományon végzett klaszterelemzések a melléklet IV. szekciójában találhatók.

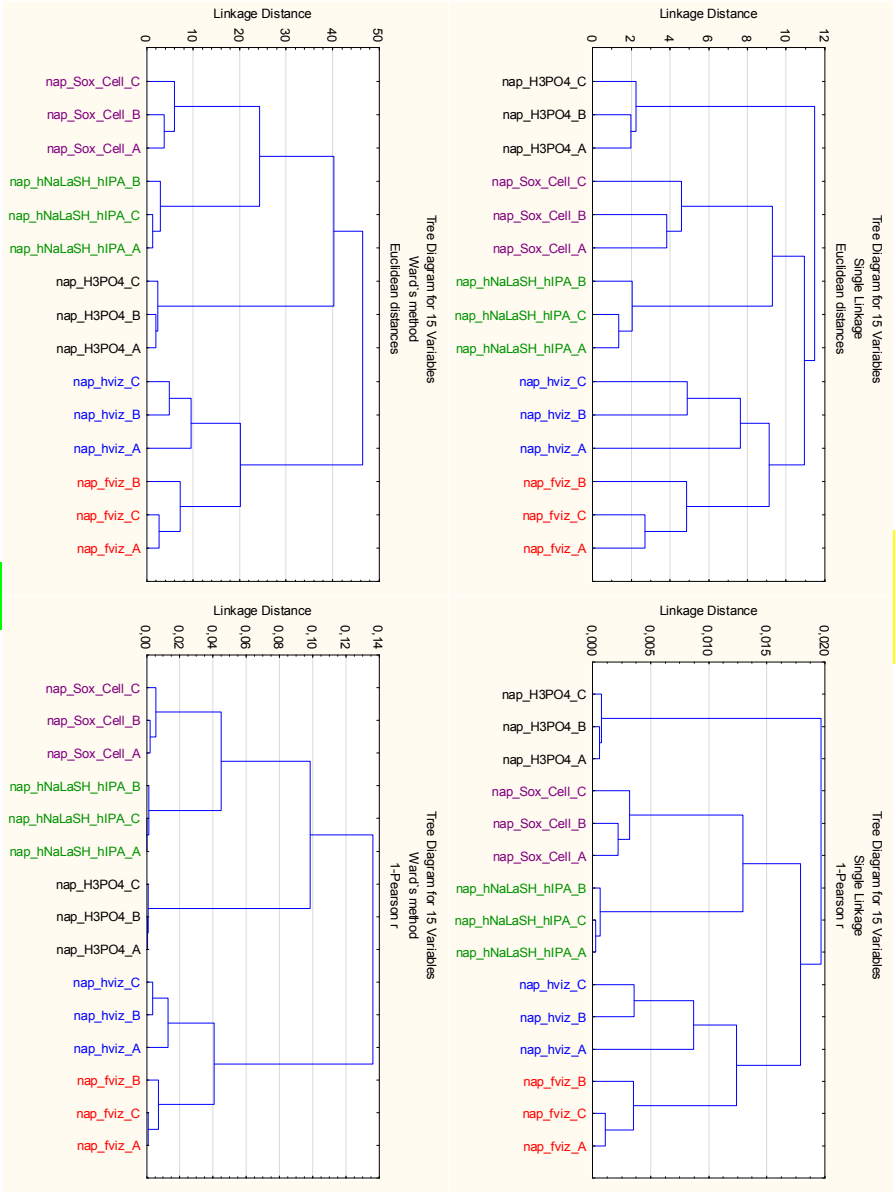


repce

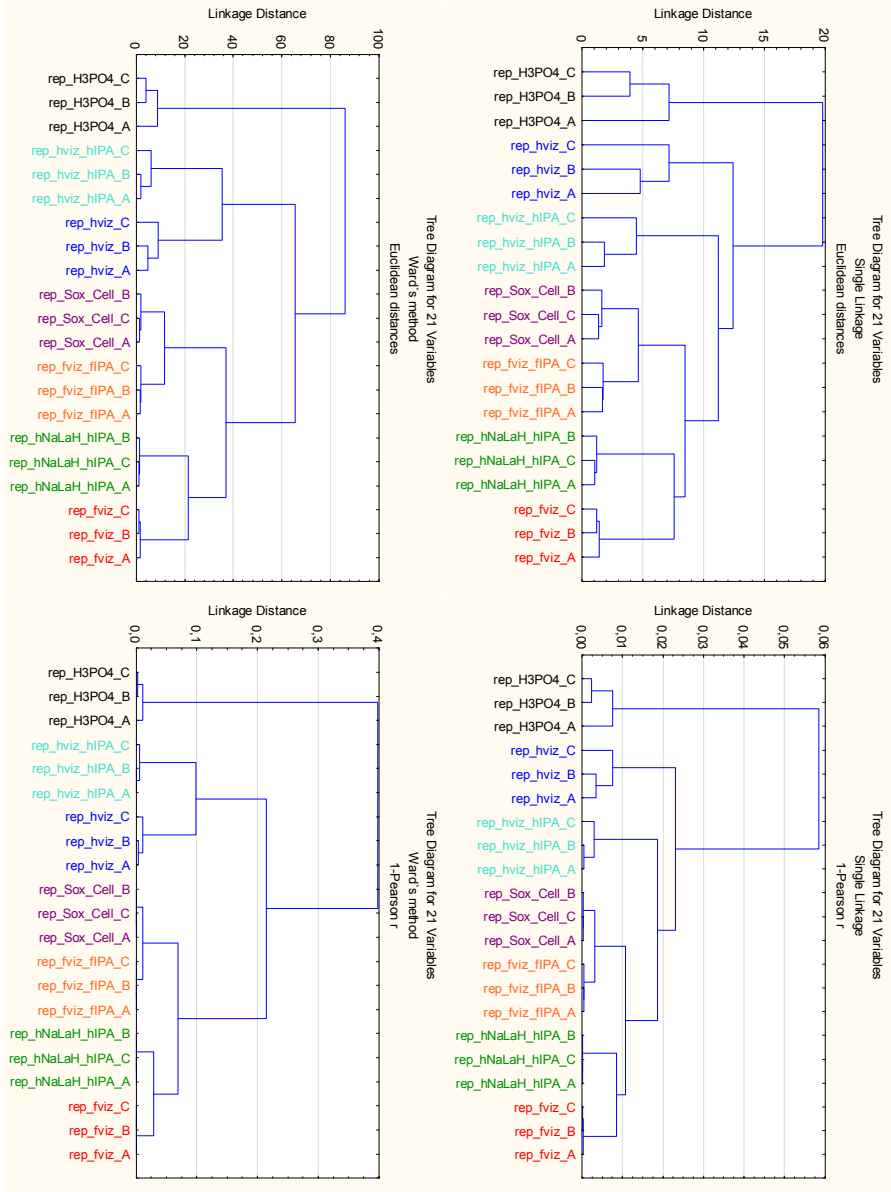


35. ábra: Matematikai kezelés nélküli (ún. „as is”) ATR-FT-IR spektrumok teljes mérési tartományára (4000–650 $1/\text{cm}$) készített klaszterelemzés (CA) dendrogramjait

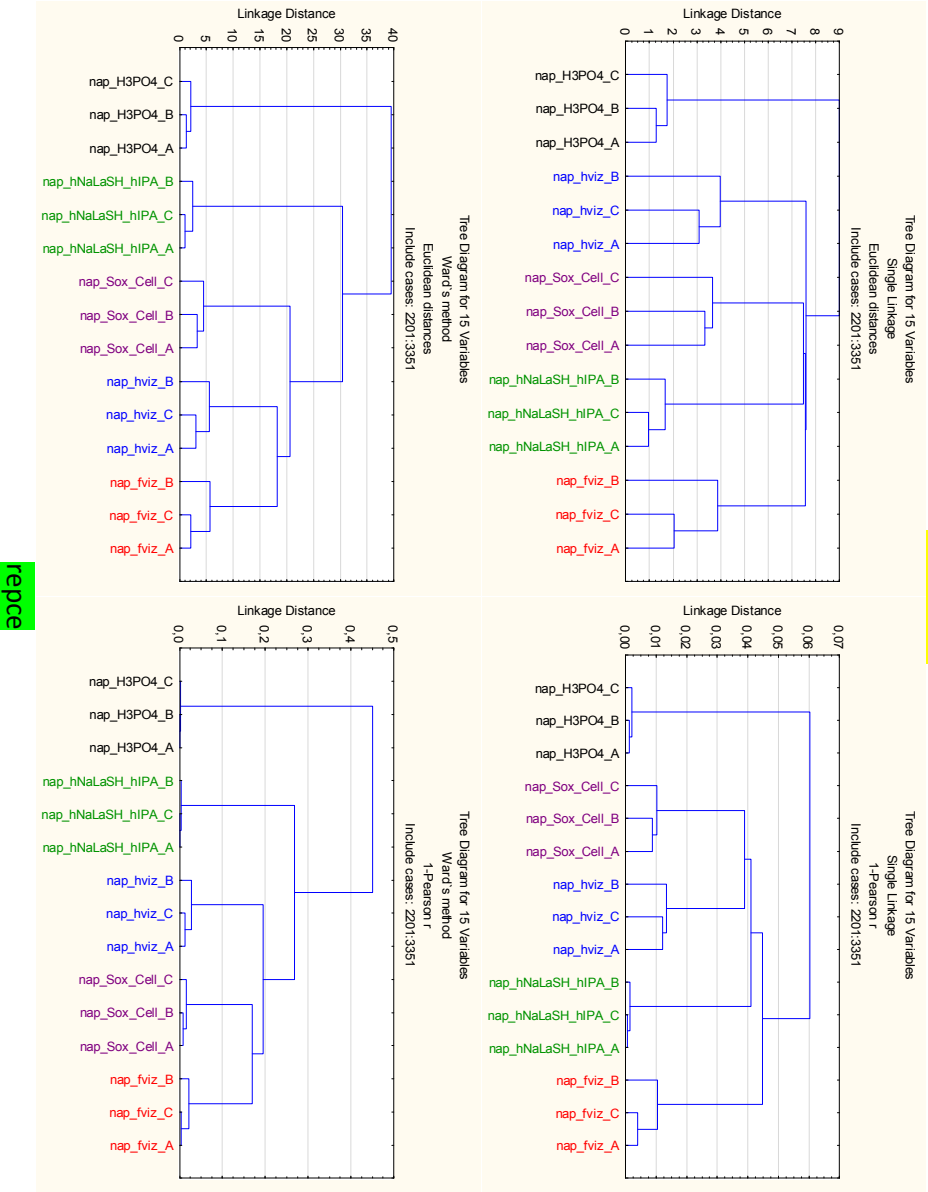
(napraforgó: *hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*;
 repce: *hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*)



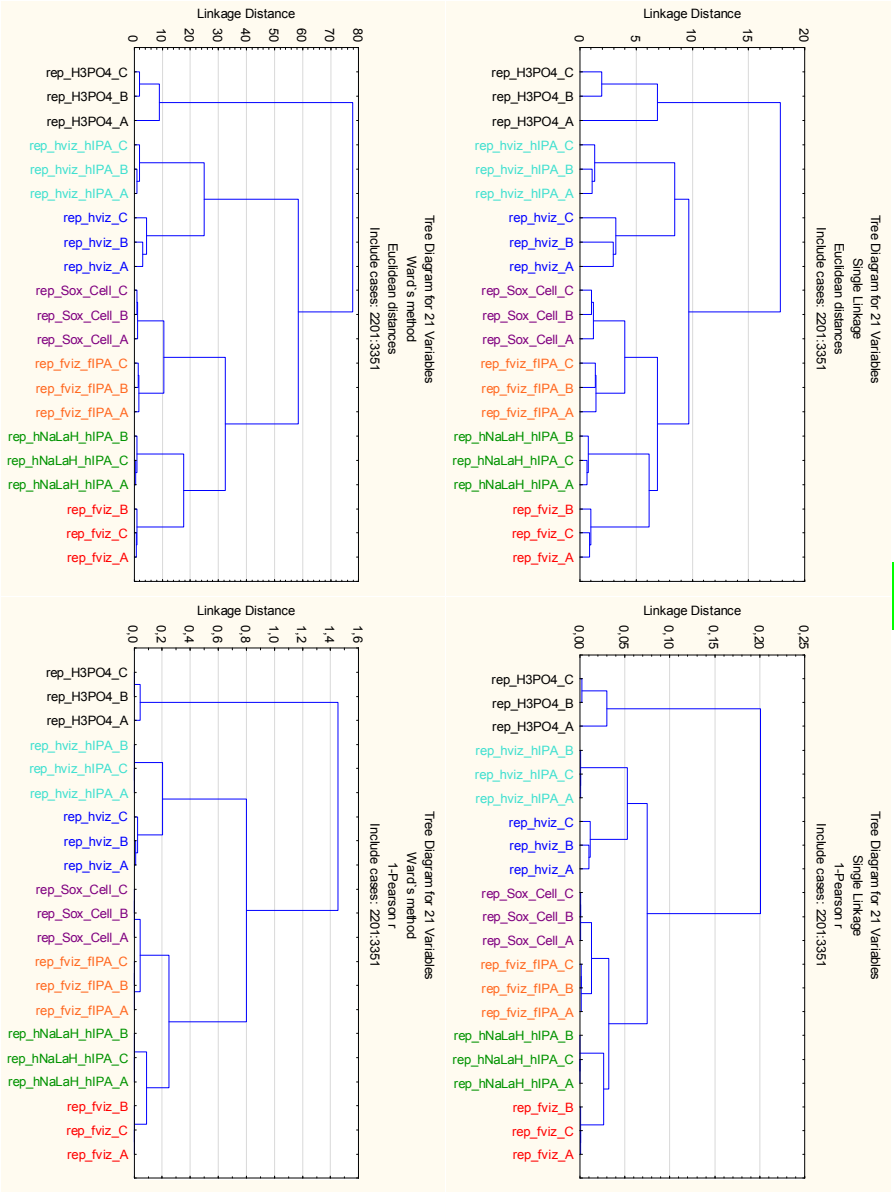
repce



36. ábra: SNV matematikai kezelésén átesett ATR-FT-IR spektrumok teljes mérési tartományára (4000-650 1/cm) készített klaszterelemzés (CA)dendrogramjai
(napraforgó: *hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*;
repce: *hideg víz, forró víz, hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*)



repce



37. ábra: SNV matematikai kezelésen átesett ATR-FT-IR spektrumok 1800-650 1/cm tartományára készített klaszterelemzés (CA)diagramjait
(napraforgó: *hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*;
repce: *hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*)

5. Összefoglalás és kitekintés

A kutatásom során feltérképeztem az infravörös spektroszkópia potenciálját a virágpорок oldószeres kezeléseinek nyomon követésében, mely lehetőséget adna gyors, roncsolásmentes ellenőrzési lépésekre a sporopollenin kapszulák tisztítási folyamatában. Vizsgálataimat egy diszperziós, diffúz reflexiós spektrofotométerrel vizsgáltam meg látható (Vis) és közeli infravörös (NIR) tartományban, míg a közép infravörös ((M)IR) tartományban egy Fourier-transzformációs (FT), csillapított teljes reflexiós (ATR) technikán alapuló készüléket használtam. Az eredményként kapott spektrumokon különböző transzformációkat alkalmaztam (normálás, simítással kombinált deriválás) majd sokváltozós adatelemzésnek vetettem alá (klaszterelemzés). A kutatásomhoz mintaként egy korábbi tanulmány (Hegedűs *et al.*, 2021) eredményeképpen keletkezett anyagokat használtam. Ők a sporopollenin tisztításának alternatív eljárásait vizsgálták, ezek hatékonyságát elemezték.

Mintáim csoportosítása több szempontból is történhet. Származásuk alapján voltak fehérvári napraforgó, illetve szigetközi repce virágpорcsomókból kiinduló anyagok. A tisztítási folyamatot az előbb említett cikkben két lépésre osztották az alapján, hogy feltételezhetően milyen anyagok oldódtak már ki belőlük. A spektrumok előkezelése után elemeztem a kapott eredményeket és összevettem azokat egy korábbi mérésemmel, ahol natív *bee pollen*-t vizsgáltam ugyanilyen spektroszkópai technikákkal. A mostani anyagaim láthatóan kisebb cukortartalommal bírtak, amit alátámaszt az, hogy mindegyik volt vízzel mosva, így a könnyen hozzáférhető vízdoldható szénhidrátok kioldódhattak. A napraforgó esetében a víz hőmérséklete, úgy tűnt, nem számít, de a repcénél arra az eredményre jutottam a közép infravörös tartományt elemezve (egybehangzóan a korábbi publikációban megfogalmazottakkal), hogy valószínűleg a hideg víz hatékonyabb módszerrel szolgált. Nem ez volt az egyetlen kezelési módszer, melyre másképp reagált a két pollen: a legtöbb esetben a napraforgó spektrumain sokkal kisebb változások voltak észlelhetőek, mint a repcénél. A foszforsavas kezelés hatékonyságának eltérése volt a legkiugróbb eredmény az összes közül, ugyanis a repcénél sokkal nagyobb változásokat generált a spektrumokban. A klaszterelemzés alapján mindkét mérési technika (diszperziós Vis-NIR és ATR FT-IR) képes volt szegregálni a különböző kezelési folyamatokon átesett mintákat egymástól.

A fentiekben összegzett eredmények alapján úgy gondolom, hogy a diffúz reflexiós spektrofotométer és a Fourier-transzformációs ATR is alkalmas lehet egy tisztítási folyamat ellenőrzésére, de valószínűleg a különböző pollenfajták között tapasztalt eltérések miatt minden

pollen esetében először rögzíteni kell az adott fajta tiszta sporopollenin spektrumát, és csak ezen standard ismeretében válna jól nyomon követhetővé általuk a tisztítási folyamat. Következő lépésként érdemes lenne több botanikai származású mintát bevonni, illetve minden esetben egy minta standarddal definiálni, hogy milyen összetételre törekszünk, hisz egészségügyi alkalmazások terén (mikrokapszulázás) kritikus lehet, hogy pontosan ellenőrizni tudjuk, hogy nem jelent-e meg esetleg új anyag a kezelések hatására a mintánkban.

6. Irodalomjegyzék

- Ageitos J. M., Robla S., Valverde-Fraga L., Garcia-Fuentes M., & Csaba N. (2021). Purification of Hollow Sporopollenin Microcapsules from Sunflower and Chamomile Pollen Grains. *Polymers* **13**(13), 2094. <https://doi.org/10.3390/polym13132094>
- Ahlers, F., Bubert, H., Steuernagel, S., & Wiermann, R. (2000). The Nature of Oxygen in Sporopollenin from the Pollen of *Typha angustifolia* L. *Zeitschrift für Naturforschung C* **55**, 129–136. <https://doi.org/10.1515/znc-2000-3-401>
- Ahokas, H. (1976). Evidence of a pollen esterase capable of hydrolysing sporopollenin. *Experientia* **32**, 175–177. <https://doi.org/10.1007/BF01937750>
- Algar, W. R., De Jong, C. A. G., Maxwell, E. J., & Atkins, C. G. (2016). Demonstration of the Spectrophotometric Complementary Color Wheel Using LEDs and Indicator Dyes. *Journal of Chemical Education* **93**(1), 162–165. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.5b00665>
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied Spectroscopy* **43**(5), 772–777. <https://doi.org/10.1366/0003702894202201>
- Bedinger, P. (1992). The Remarkable Biology of Pollen. *The Plant Cell* **4**(8), 879–887. <https://doi.org/10.1105/tpc.4.8.879>
- Bogdanov, S. (2016). Pollen: Collection, Harvest, Composition, Quality. The Pollen Book. Chapter 1. https://www.researchgate.net/publication/304011810_Pollen_Collection_Harvest_Composition_Quality
- Braconnot, H. (1829). Recherches chimiques sur le pollen de *Typha latifolia* L., famille des typhacées. *Annales de Chimie et de Physique Ser. 2* **49**, 91–105.
- Borg, M., & Twell, D. (2011). Pollen: Structure and Development. In *eLS* (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0002039.pub2>
- Bleha, R., Shevtsova, T. V., Živčáková, M., Korbářová, A., Ježková, M., Saloň, I., Brindza, J., & Synytsya, A. (2021). Spectroscopic Discrimination of Bee Pollen by Composition, Color, and Botanical Origin. *Foods* **10**(8), 1682. <https://doi.org/10.3390/foods10081682>
- Bryś, M. S., Skowronek, P., & Strachecka, A. (2021). Pollen Diet—Properties and Impact on a Bee Colony. *Insects* **12**(9), 798. <https://doi.org/10.3390/insects12090798>
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., & Frigerio, C. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research* **47**(2), 156–163. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>
- Carpes, S. T., Mourao, G. B., De Alencar, S. M., & Masson, M. L. (2009). Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee-pollen from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology* **12**(3), 220–229. <https://doi.org/10.4260/BJFT2009800900016>
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**(4), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>

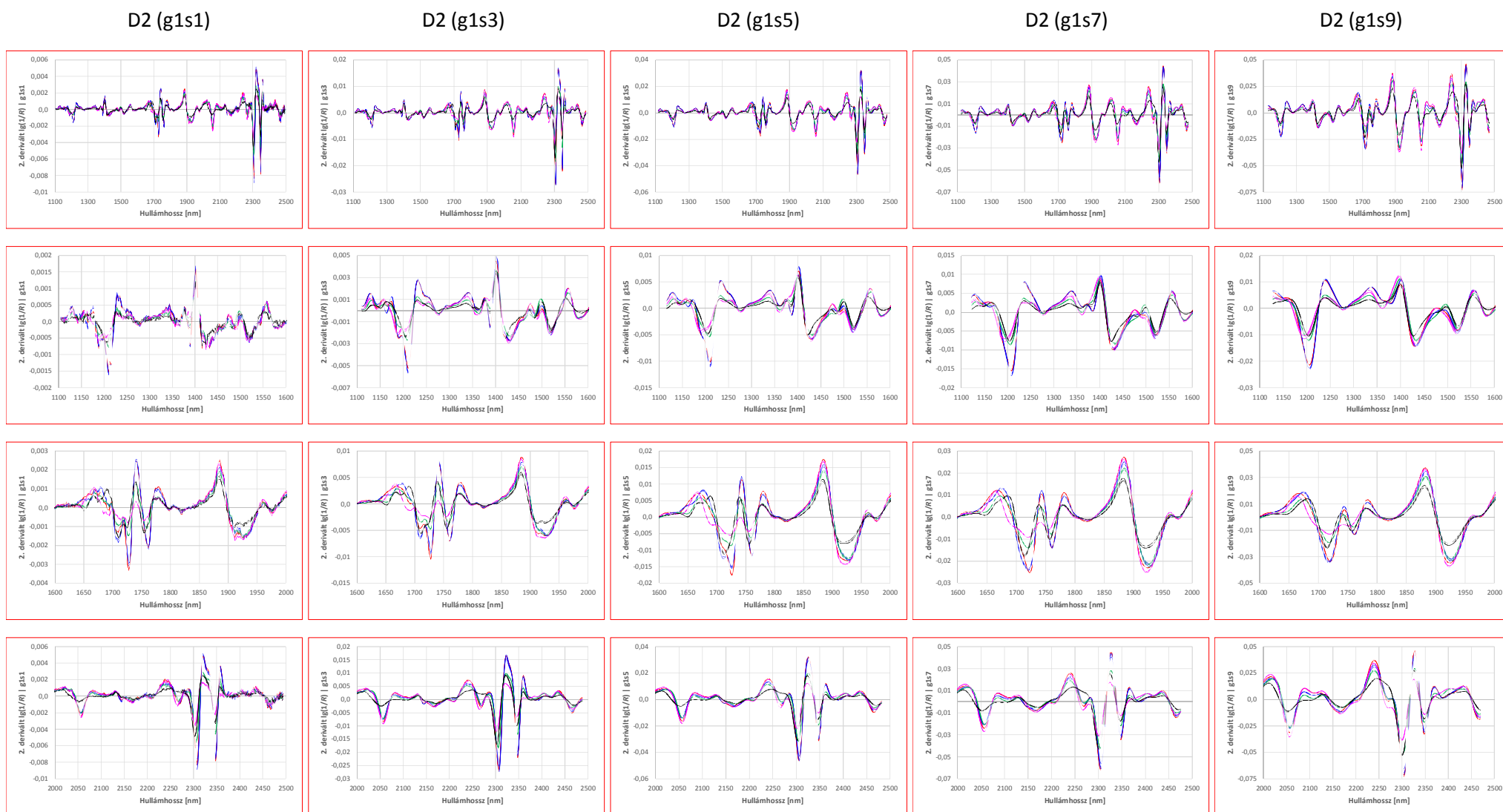
- Clarke, D., Morley, E. & Robert, D. (2017). The bee, the flower, and the electric field: electric ecology and aerial electroreception. *Journal of Comparative Physiology A* volume **203**, 737–748.
<https://doi.org/10.1007/s00359-017-1176-6>
- Dalmadi, I., Seregély, Zs., Kaffka, K., & Farkas, J. (2007). Néhány többváltozós kemometriai módszer alkalmazása műszeres analitikai vizsgálatok értékelésére. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* **53**(4), 222–238.
http://epa.oszk.hu/03100/03135/00231/pdf/EPA03135_elelmiszervizsgalati_kozlemenyek_2007_04_22_2-238.pdf
- De-Melo, A. A. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2017). Chemical Composition of Bee Pollen. In *Bee Products - Chemical and Biological Properties*, Alvarez-Suarez, J. (Ed.), Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_11
- De-Melo, A. A. M., Estevinho, M. L. M. F., Sattler, J. A. G., Souza, B. R., da Silva Freitas, A., Barth, O. M., & Almeida-Muradian, L. B. (2016). Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *LWT - Food Science and Technology* **65**, 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.014>
- Domínguez, E., Mercado, J. A., Quesada, M. A., & Heredia, A. (1998). Isolation of intact pollen exine using anhydrous hydrogen fluoride. *Grana* **37**, 93–96. <https://doi.org/10.1080/00173139809362649>
- Domínguez-Valhondo, D., Bohoyo Gil, D., Hernández, M.T. & González-Gómez, D. (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *International Journal of Food Science & Technology* **46**(10), 2204–2211.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02738.x>
- Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J., & Kulma, A. (2016). The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* **17**(2), 160. <https://doi.org/10.3390/ijms17020160>
- Edlund, A. F., Swanson, R., & Preuss, D. (2004). Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *The Plant Cell* **16**(S1), S84–S97. <https://doi.org/10.1105/tpc.015800>
- Erdtman, G. (1960). The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* **54**, 561–564.
- Faegri, K. (1971). The preservation of sporopollenin membranes under natural conditions. In *Sporopollenin*, J. Brooks, P. R. Grant, M. Muir, P. Van Gijzel & G. Shaw (Eds.), Academic Press, London, pp. 256–272.
- Filyushin, M. A., Dzhos, E. A., Shchennikova, A. V. *et al.* (2020). Dependence of Pepper Fruit Colour on Basic Pigments Ratio and Expression Pattern of Carotenoid and Anthocyanin Biosynthesis Genes. *Russian Journal of Plant Physiology* **67**, 1054–1062. <https://doi.org/10.1134/S1021443720050040>
- Formicki, G., Gren, A., Stawarz, R., Zysk, B., & Gal, A. (2013). Metal Content in Honey, Propolis, Wax, and Bee Pollen and Implications for Metal Pollution Monitoring. *Polish Journal of Environmental Studies* **22**, 99–106.
http://www.pjoes.com/pdf-88957-22816?filename=Metal%20Content%20in%20Honey_.pdf
- Fraser, W. T., Scott, A. C., Forbes, A. E. S., Glasspool, I. J., Plotnick, R. E., Kenig, F. *et al.* (2012). Evolutionary stasis of sporopollenin biochemistry revealed by unaltered Pennsylvanian spores. *New Phytologist* **196**(2), 397–401. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04301.x>

- Gergely, Sz. (2005). Közei infravörös spektroszkópia alkalmazása a búza érésdinamikai folyamatainak követésében. Doktori (PhD) értekezés, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
- Hegedüs, K., Fehér, C., Jalsovszky, I. *et al.* (2021). Facile isolation and analysis of sporopollenin exine from bee pollen. *Scientific Reports* **11**, 9952. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87619-8>
- Human, H. & Nicolson, S.W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* **67**(14), 1486–1492
- Jing, Y., Hui, W., Jicheng, Z. & Weidong, H. (2017). Review of recent UV-Vis and infrared spectroscopy researches on wine detection and discrimination, *Applied Spectroscopy Reviews* **53**(1), 65–86. <https://doi.org/10.1080/05704928.2017.1352511>
- John, J. F. (1814). Über den befruchtungsstaub, nebst einer analyse des tulpenpollens. *Journal für Chemie und Physik* **12**, 244–252.
- Kasprzyk, I., Depciuch, J., Grabek-Lejko, D., & Parlinska-Wojtan, M. (2018). FTIR-ATR spectroscopy of pollen and honey as a tool for unifloral honey authentication. The case study of rape honey. *Food Control* **84**, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.015>
- Kayacan, S., Sagdic, O. & Doymaz, I. (2018). Effects of hot-air and vacuum drying on drying kinetics, bioactive compounds and color of bee pollen. *Journal of Food Measurement and Characterization* **12**, 1274–1283 <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9741-4>
- Kostić, A. Ž., Pešić, M. B., Mosić, M. D., Dojčinović, B. P., Natić, M. M., & Trifković, J. Đ. (2015). Mineral content of bee pollen from Serbia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **66**, 251–258. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2630>
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2015**, 297425, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/297425>
- Li, FS., Phyto, P., Jacobowitz, J. *et al.* (2019). The molecular structure of plant sporopollenin. *Nature Plants* **5**, 41–46. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0330-7>
- Li, Q. Q., Wang, K., Marcucci, M. C., Sawaya, A. C. H. F., Hu, L., Xue, X. F., & Hu, F. L. (2018). Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *Journal of Functional Foods* **49**, 472–484. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.008>
- Liolios V., Tananaki V., Dimou M., Kanelis D., Goras G., & Karazafiris E. (2016). Ranking pollen from bee plants according to their protein contribution to honey bees. *Journal of Apicultural Research* **54**, 582–592. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1173353>
- Német B. (2010). Az infravörös spektroszkópia elméleti és mérés technikai alapjai. <http://www.physics.ttk.pte.hu/pages/munkatarsak/nemetb/Spektr-Lab-Elm-6-Infravoros-spektroszkopia.pdf>
- Mackenzie, G., Boa, A. N., Diego-Taboada, A., Atkin, S. L., & Sathyapalan, T. (2015). Sporopollenin, The Least Known Yet Toughest Natural Biopolymer. *Frontiers in Materials* **2**(66), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fmats.2015.00066>
- Madács, Á. (2022). Virágpor vizsgálata látható és infravörös spektroszkópiával. Szakdolgozat, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék.

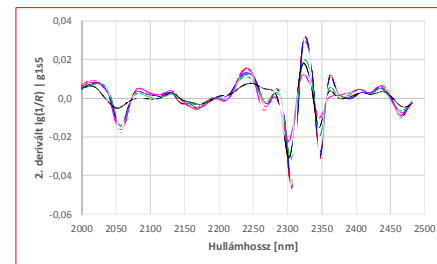
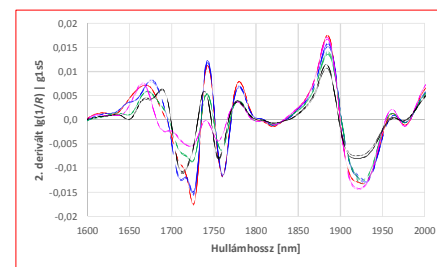
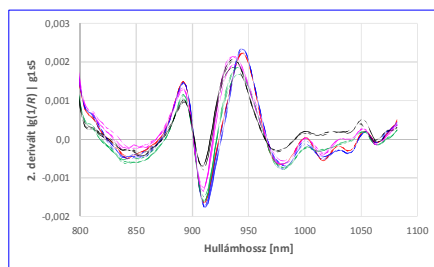
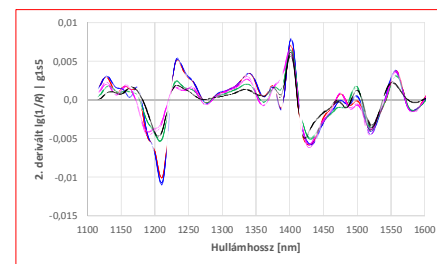
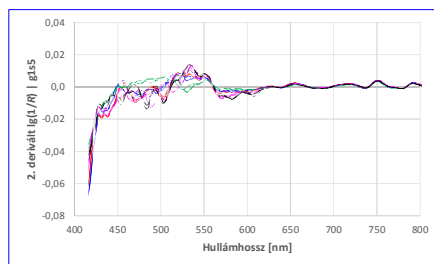
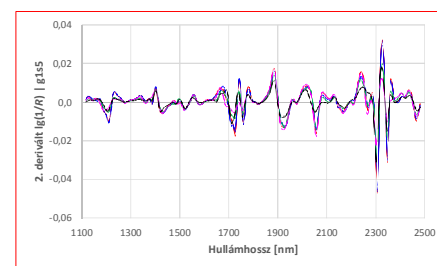
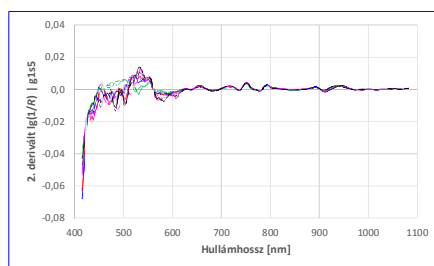
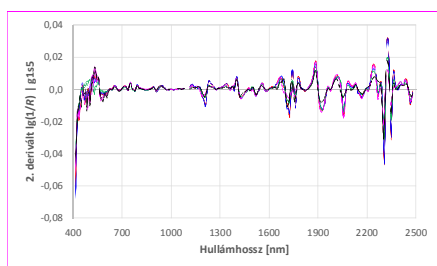
- Mărgăoan, R., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Dulf, F. V., Bunea, A., Socaci, S. A. *et al.* (2014). Predominant and Secondary Pollen Botanical Origins Influence the Carotenoid and Fatty Acid Profile in Fresh Honeybee-Collected Pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**(27), 6306–6316. <https://doi.org/10.1021/jf5020318>
- McDougal, H.: Pollen Grain: Definition, Structure & Function. In *Modern Biology*, Study.com, 24 December 2015. <https://study.com/academy/lesson/pollen-grain-definition-structure-function.html>
- Modro, A. F., Silva, I. C., & Luz, C. F. (2009). Analysis of pollen load based on color, physicochemical composition and botanical source. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **81**(2), 281–285. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652009000200014>
- Mohammadrezakhani, S., Hajilou, J., & Rezanejad, F. (2018). Evaluation of phenolic and flavonoid compounds in pollen grains of three *Citrus* species in response to low temperature. *Grana* **57**(3), 214–222. <https://doi.org/10.1080/00173134.2017.1358763>
- PerkinElmer, Inc.: FT-IR Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance (ATR) (2005). https://cmdis.rpi.edu/sites/default/files/ATR_FTIR.pdf
- Pokol Gy. (Ed.) (2011). *Analitikai kémia*. Typotex Elektronikus Kiadó Kft., Budapest ISBN 978-963-2794-66-2. https://www.typotex.hu/book/9105/pokol_gyorgy_szerk_analitikai_kemia
- Prđun, S., Svečnjak, L., Valentić, M., Marijanović, Z., & Jerković, I. (2021). Characterization of Bee Pollen: Physico-Chemical Properties, Headspace Composition and FTIR Spectral Profiles. *Foods* **10**(9), 2103. <https://doi.org/10.3390/foods10092103>
- Rezanejad, F. (2012). Air pollution effects on flavonoids in pollen grains of some ornamental plants. *Turkish Journal of Botany* **36**(1), 49–54. <https://doi.org/10.3906/bot-1008-15>
- Sattler, J. A. G., de Melo, I. L. P., Granato, D., Araujo, E., de Freitas, A. D. S., Barth, O. M., & de Almeida-Muradian, L. B. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil. *Food Research International* **77**, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013>
- Serra-Bonvehí, J., & Escolà-Jordà, R. (1997). Nutrient Composition and Microbiological Quality of Honeybee-Collected Pollen in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**(3), 725–732. <https://doi.org/10.1021/jf960265q>
- Slezsák, J. (2017). Gyógyszeripari alapanyagok polimer csomagolóanyagokon keresztül való mérése különböző optikai elrendezésű NIR spektrofotométerekkel. Diplomamunka, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék.
- Stanley, R. G., & Linskens, H. F. (Eds.) (1974). *Pollen: Biology, Biochemistry, Management*. Springer-Verlag, Berlin, p. 307.
- Stark, E. W. & Luchter, K. (2003). Diversity in NIR Instrumentation. In *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference*, Davies, A.M.C. & Garrido-Varo, A. (Eds.), NIR Publications, Chichester pp. 55–66.
- Szigeti, T. (2013). Módszerfejlesztés Fourier-transzformációs közeli infravörös technika (FT-NIR) alkalmazási körének kibővítésére az élelmiszeripari mintákon. Doktori (PhD) értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Doktori Iskola.
- Thakur, M., & Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology* **98**, 82–106. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001>

- Tóth, L. (2019). UV-VIS spektrofotometria. Gyakorlati segédlet a műszeres analitika gyakorlathoz, Debreceni Egyetem, Szerves Kémia Tanszék. <http://inorg.unideb.hu/download/kurzusok/public//7/UV-VIS%20SPEKTROFOTOMETRIA.pdf>
- Végh, R., Puter, D., Vaskó, Á., Csóka, M., & Mednyánszky, Z. (2022). Mézek és virágporok beltartalmi összetételének és színjellemzőinek vizsgálata. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* **68(1)**, 3779–3792. <https://doi.org/10.52091/EVIK-2022/1-4-HUN>
- Verslues, P. E., & Sharma, S. (2010). Proline Metabolism and Its Implications for Plant-Environment Interaction. *The Arabidopsis Book* **2010(8)**, e0140. <https://doi.org/10.1199/tab.0140>
- Wellman, C. H., Osterloff, P. L., & Mohiuddin, U. (2003). Fragments of the earliest land plants. *Nature* **425**, 282–285. <https://doi.org/10.1038/nature01884>
- Wilmesmeier, S., Steuernagel, S., & Wiermann, R. (1993). Comparative FTIR and ¹³C CP/MAS NMR Spectroscopic Investigations on Sporopollenin of Different Systematic Origins. *Zeitschrift Für Naturforschung C* **48(9-10)**, 697–701. <https://doi.org/10.1515/znc-1993-9-1003>
- Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J., & Sun, P. (2013). Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61(3)**, 708–718. <https://doi.org/10.1021/jf304056b>
- Zeghoud, S., Rebiai, A., Hemmami, H., Ben Seghir, B., Elboughdiri, N., Ghareba, S., Ghernaout, D., & Abbas, N. (2021). ATR-FTIR Spectroscopy, HPLC Chromatography, and Multivariate Analysis for Controlling Bee Pollen Quality in Some Algerian Regions. *ACS Omega* **6(7)**, 4878–4887. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05816>
- Zetzsche, F., & Kálin, O. (1931). Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen V. 4. Zur Autoxydation der Sporopollenine. *Helvetica Chimica Acta* **14(1)**, 517–519. <https://doi.org/10.1002/hlca.19310140151>
- Zetzsche, F., & Vicari, H. (1931). Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen. III. 2. *Picea orientalis*, *Pinus silvestris* L., *Corylus Avellana* L. *Helvetica Chimica Acta* **14(1)**, 62–67. <https://doi.org/10.1002/hlca.19310140105>
- Zuluaga, C. M., Serrato, J. M., & Quicazan, M. C. (2015). Chemical, nutritional and Bioactive characterization of Colombian Bee-Bread. *Chemical Engineering Transactions* **43**, 175–180. <https://www.aidic.it/cet/15/43/030.pdf>

7. Mellékletek

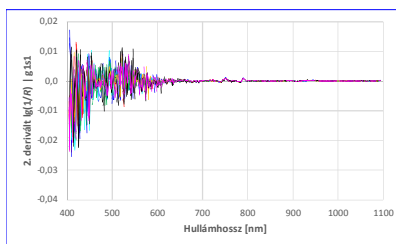


I. melléklet / 1. ábra: **Napraforgópollenek** PbS detektorral mért, simítással kombinált 2. derivált Vis-NIR spektrumai különböző rés-kapu (gap-segment) beállításokkal (hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)

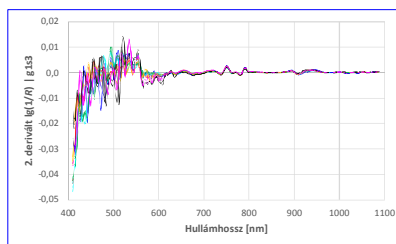


I. melléklet / 2. ábra: Napraforgópollenek Si és PbS detektorokkal mért, simítással kombinált 2. derivált Vis-NIR spektrumai (hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)

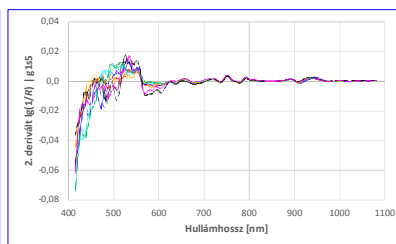
D2 (g1s1)



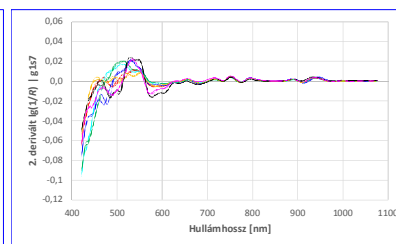
D2 (g1s3)



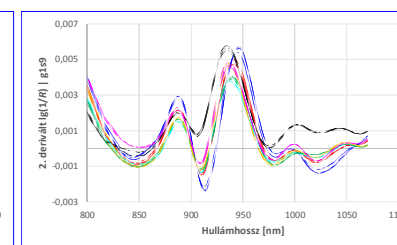
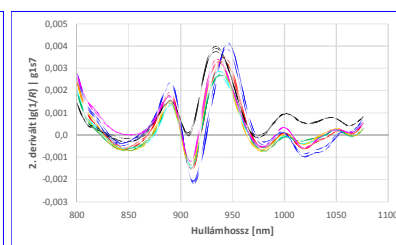
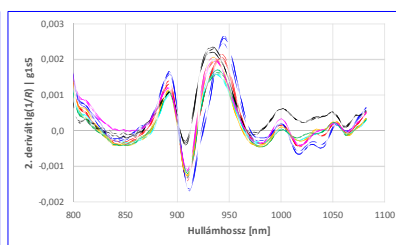
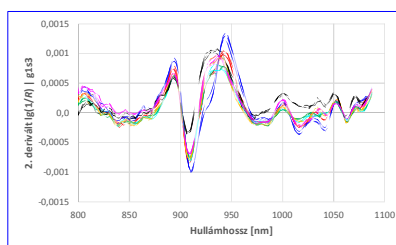
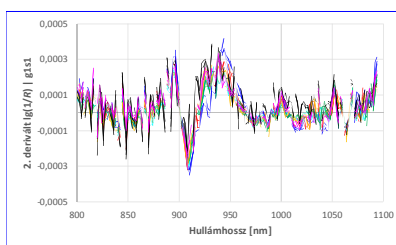
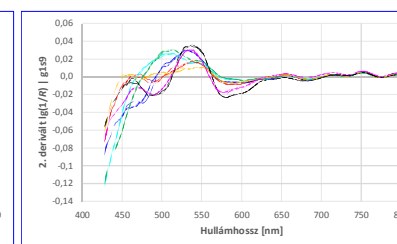
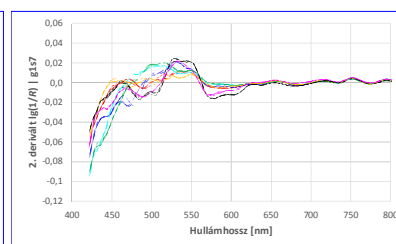
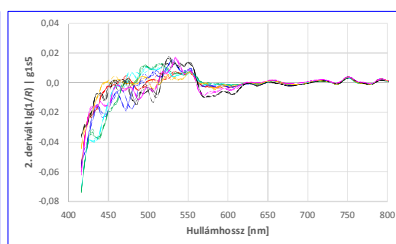
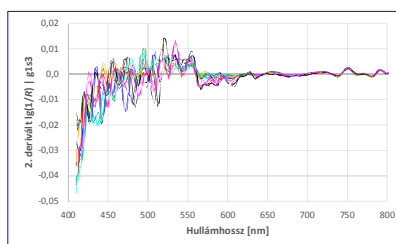
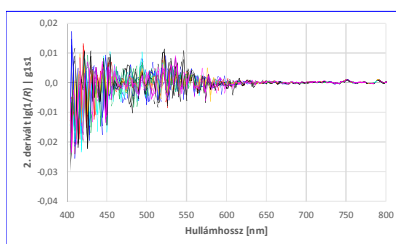
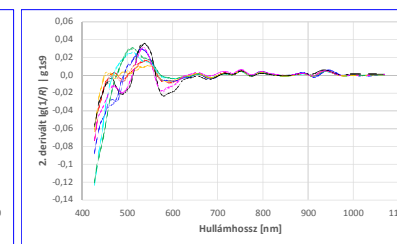
D2 (g1s5)



D2 (g1s7)

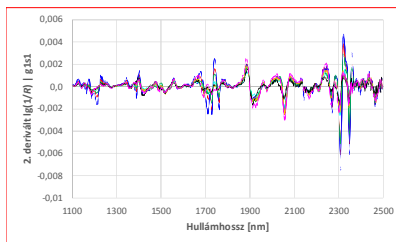


D2 (g1s9)

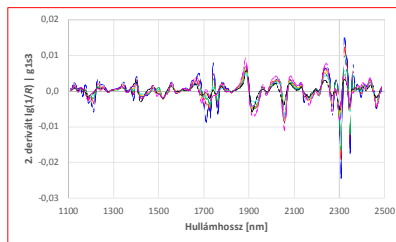


I. melléklet / 3.ábra: **Rep. epallene** Vis detektorral mért, simítással kombinált 2. derivált Vis-NIR spektrumai különböző rés-kapu (gap-segment) beállításokkal
(hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)

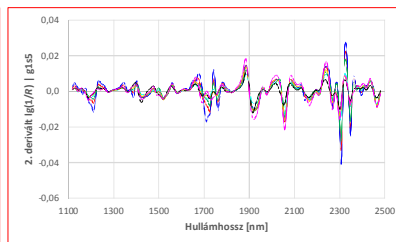
D2 (g1s1)



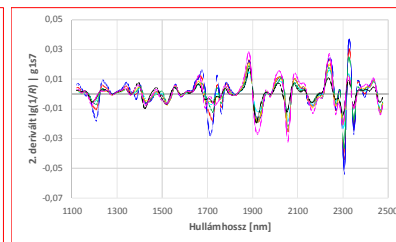
D2 (g1s3)



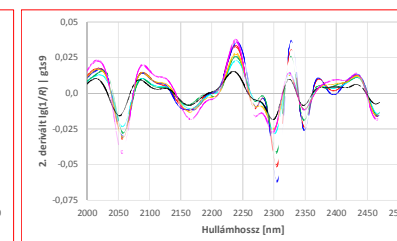
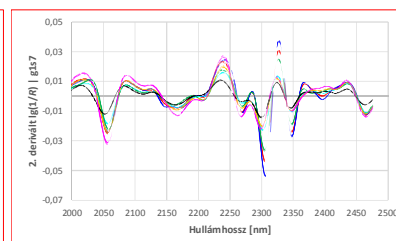
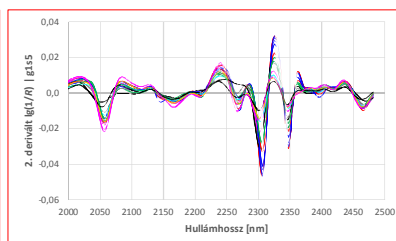
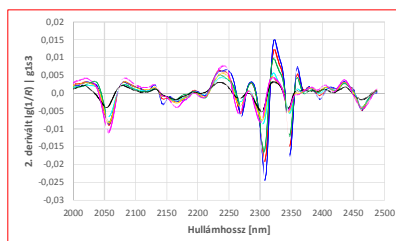
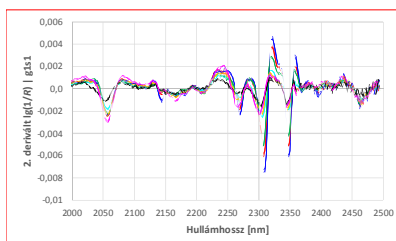
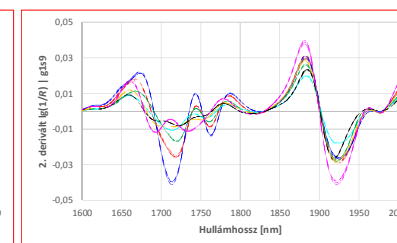
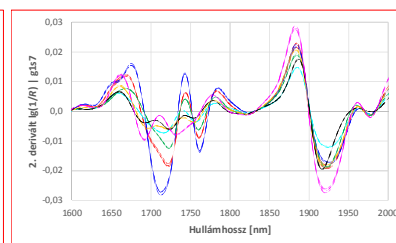
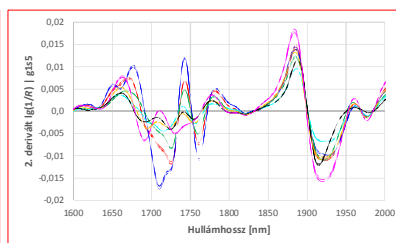
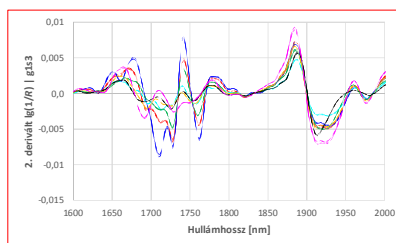
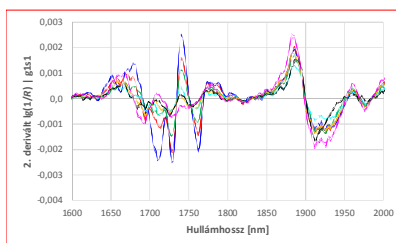
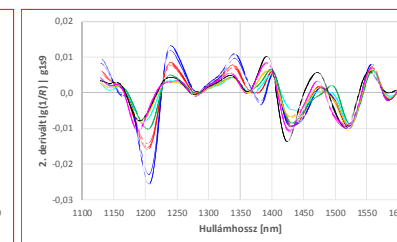
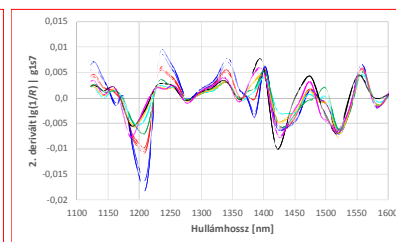
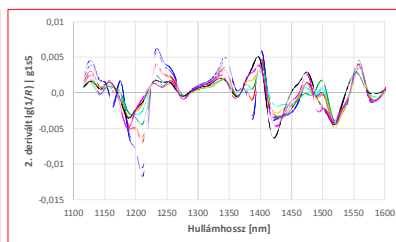
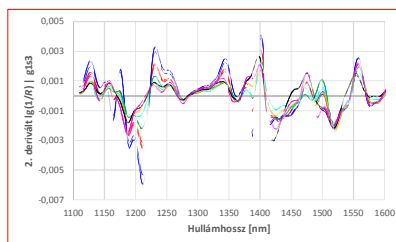
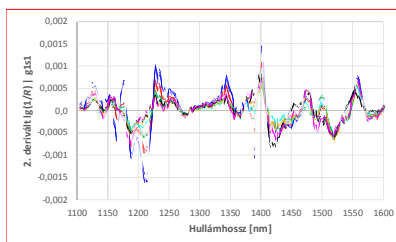
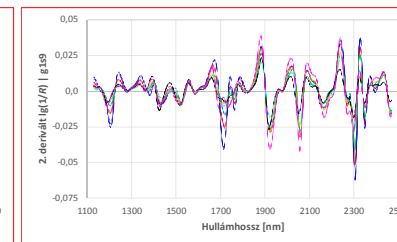
D2 (g1s5)



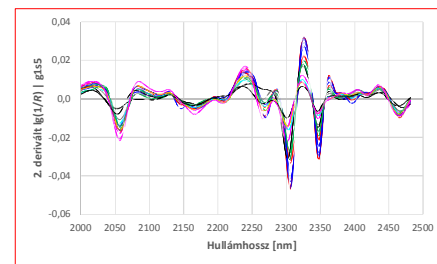
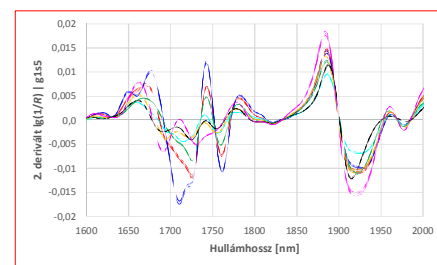
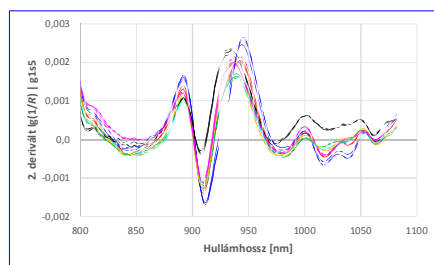
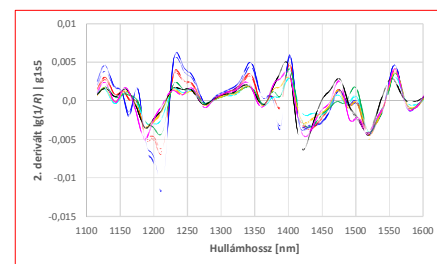
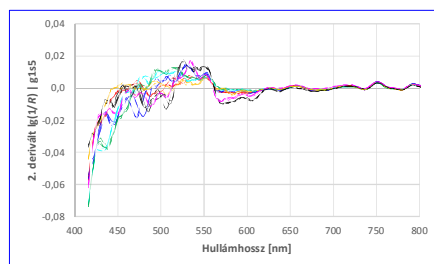
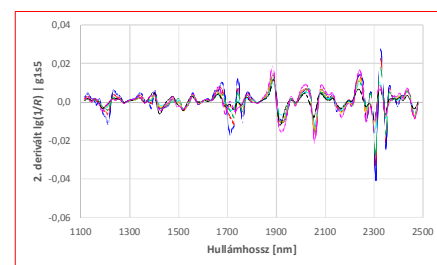
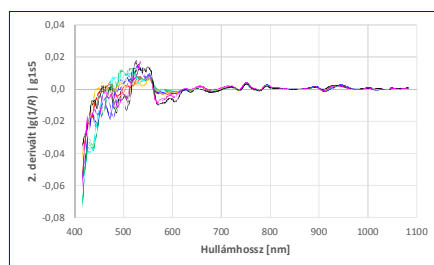
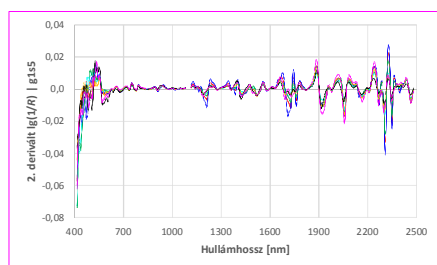
D2 (g1s7)



D2 (g1s9)



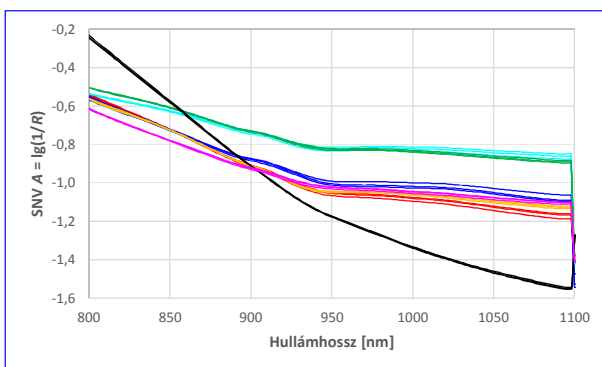
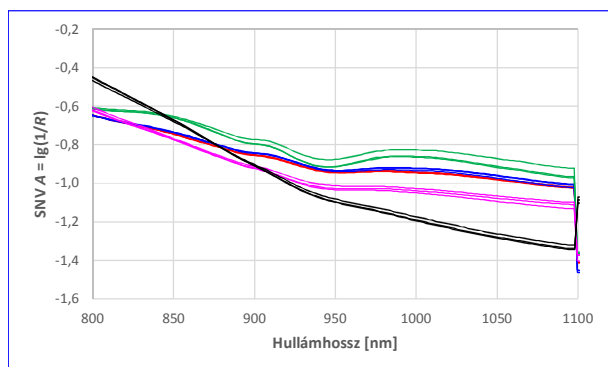
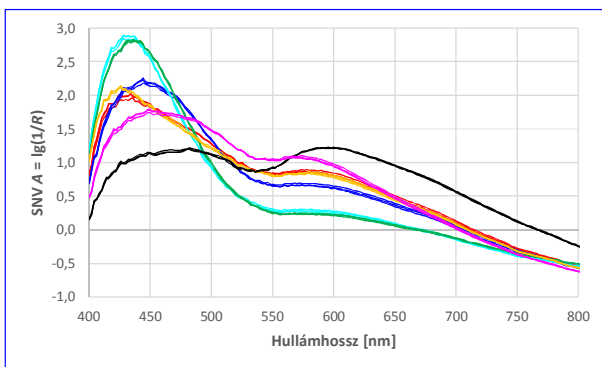
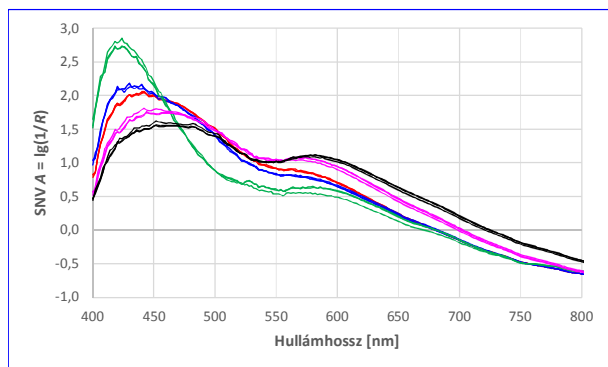
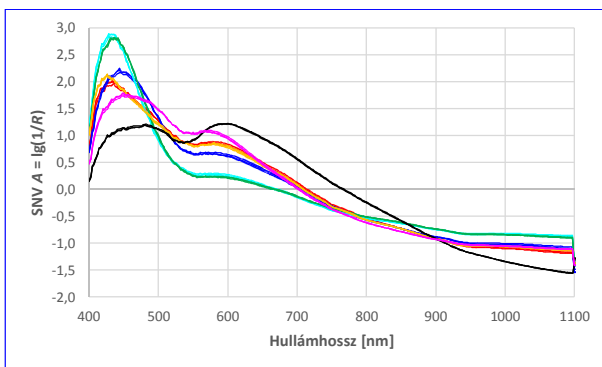
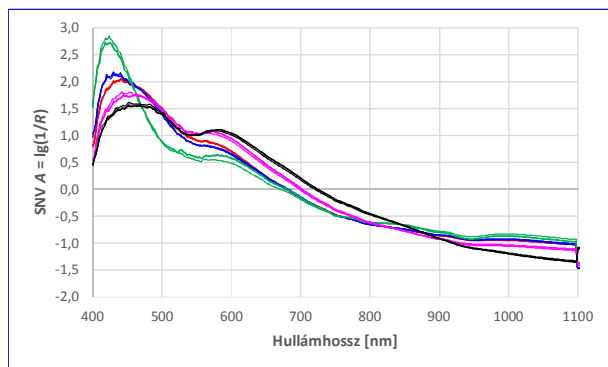
1. melléklet / 4. ábra: **Recepollenc** PBS detektorral mért, simítással kombinált 2. derivált Vis-NIR spektrumai különböző rés-kapú (gap-segment) beállításokkal (hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)



I. melléklet / 5. ábra: **Peperpollen** Si és PbS detektorokkal mért, simítással kombinált 2. derivált Vis-NIR spektrumai
(hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)

napraforgó

repce



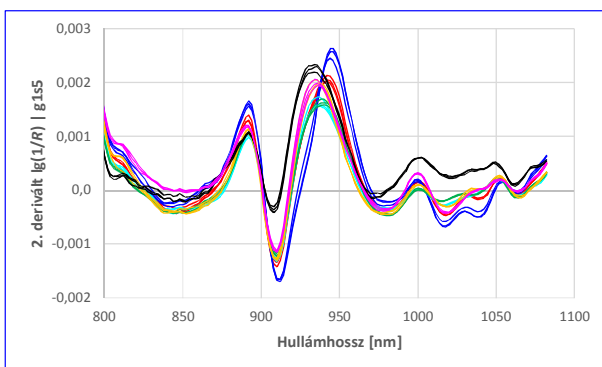
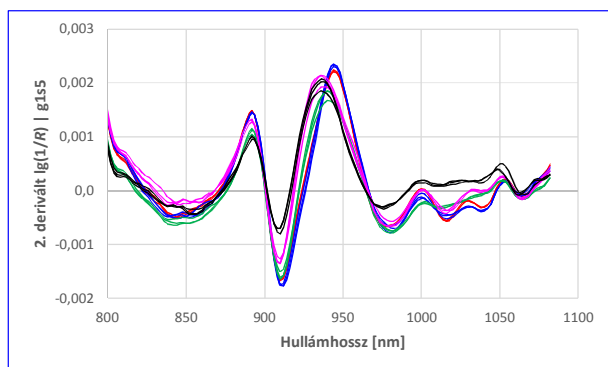
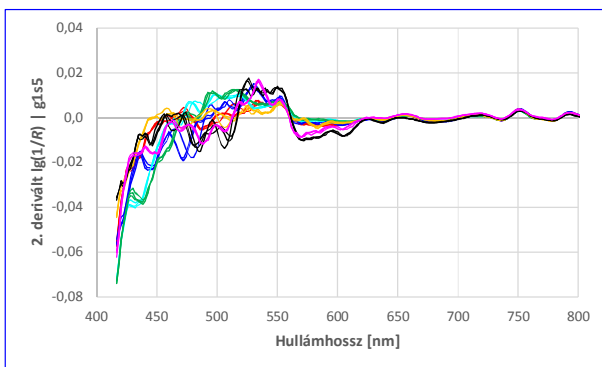
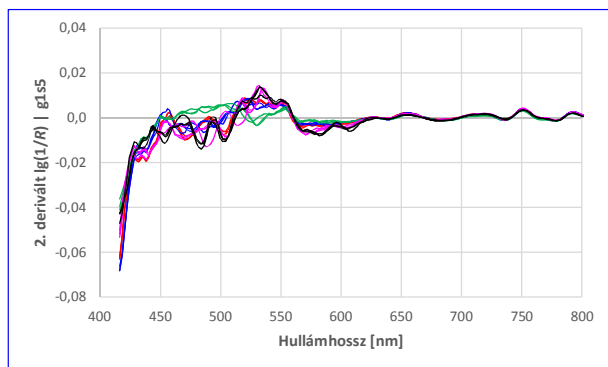
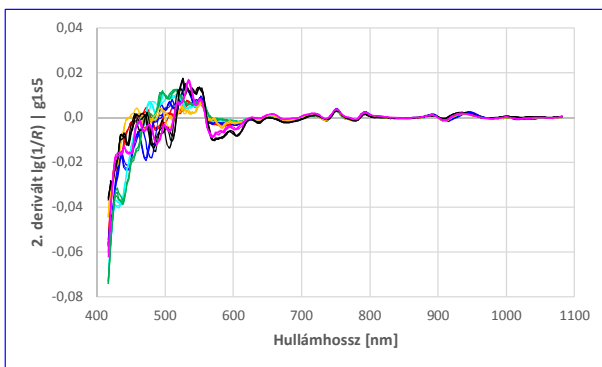
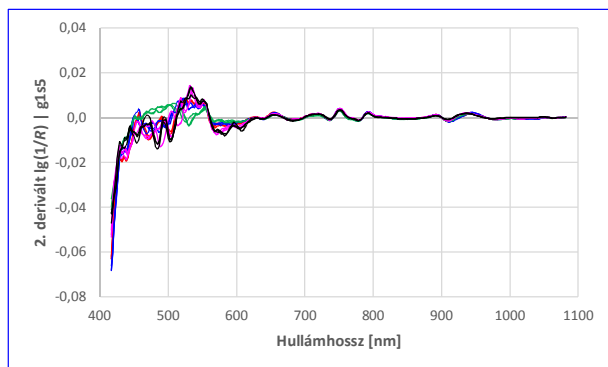
I. melléklet / 6. ábra: Pollenek *Vis* detektorral mért, SNV matematikai kezelésen átesett *Vis*-NIR spektrumai

(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;

repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)

napraforgó

repce



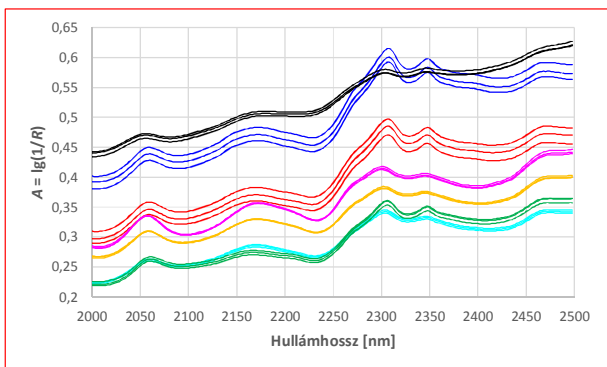
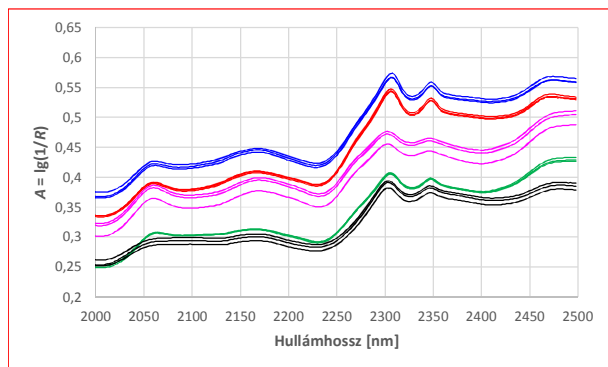
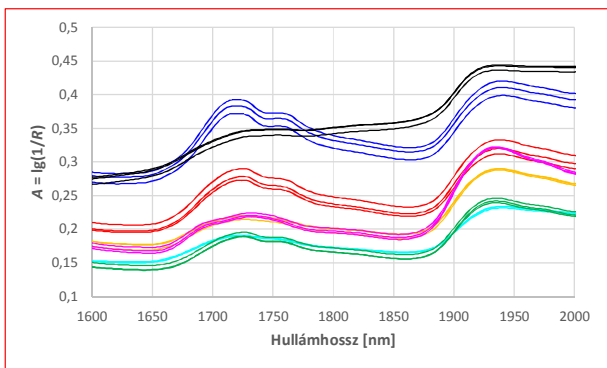
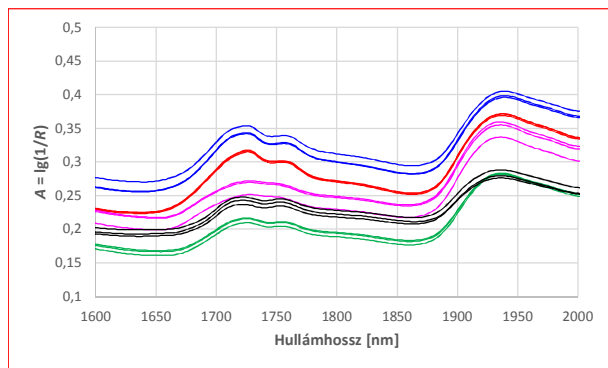
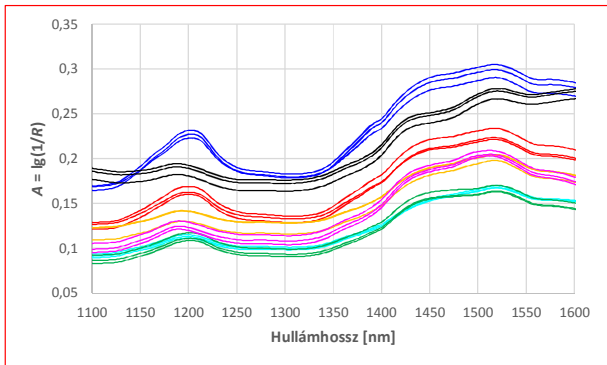
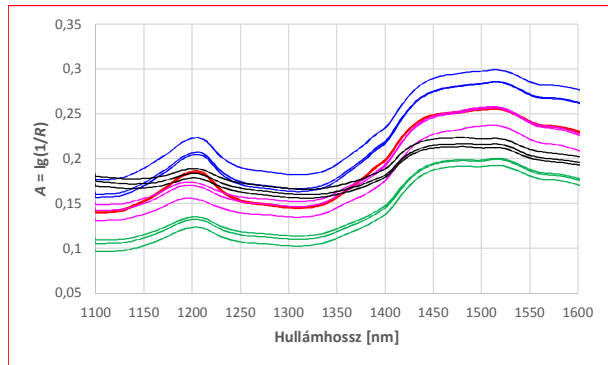
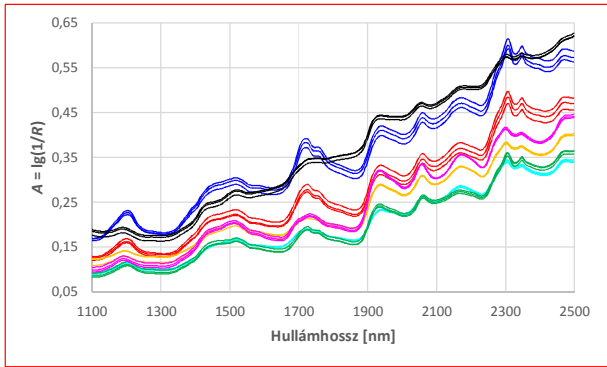
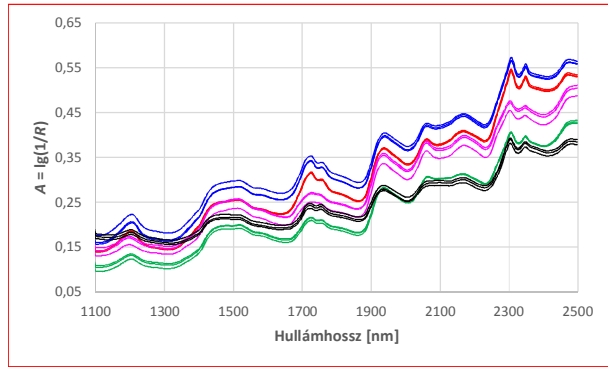
I. melléklet / 7. ábra: Pollenek *Vis* detektorral mért, simítással kombinált 2. derivált *Vis*-NIR spektrumai

(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;

repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)

napraforgó

repce



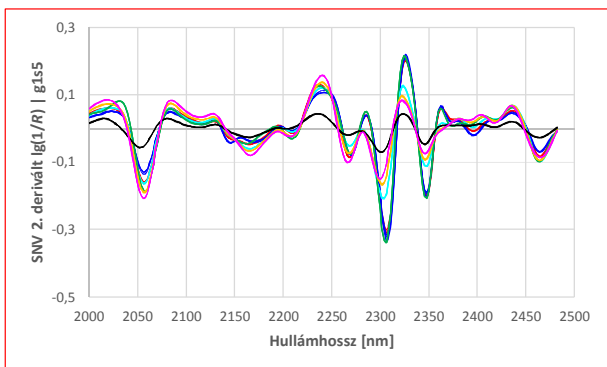
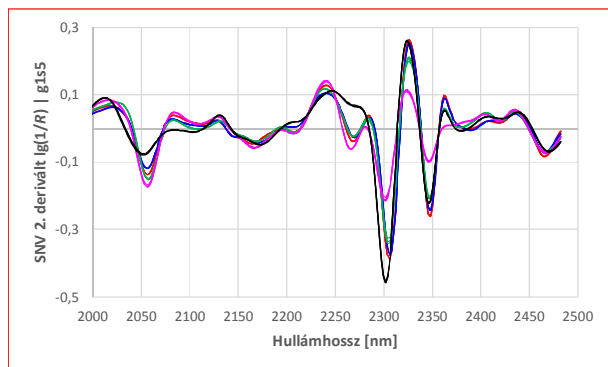
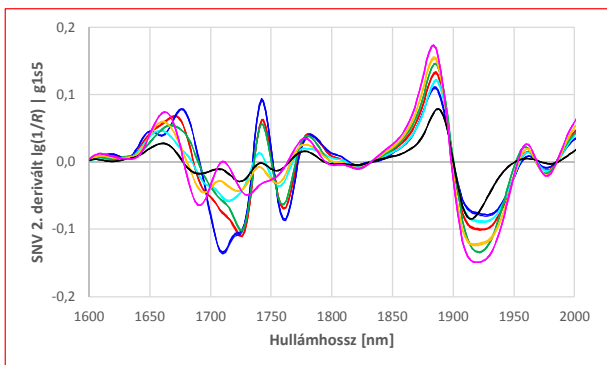
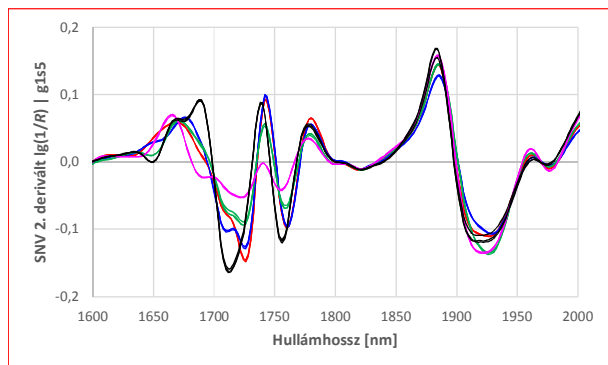
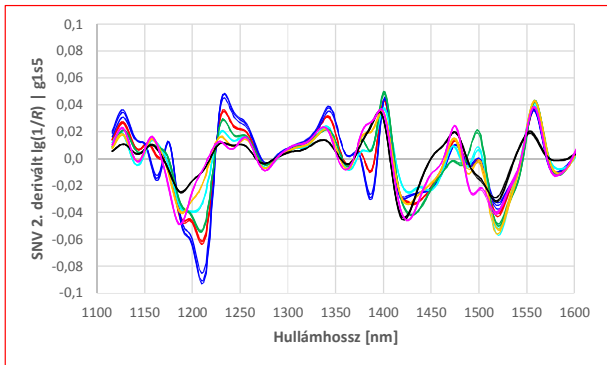
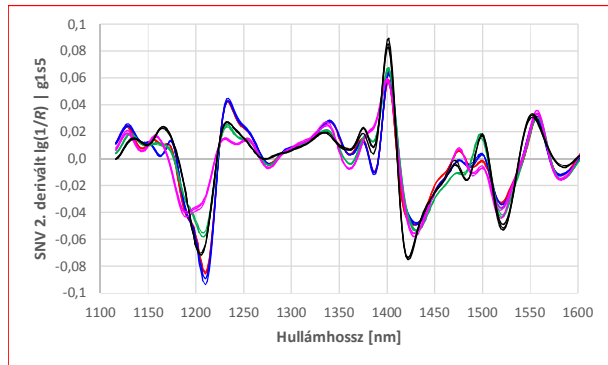
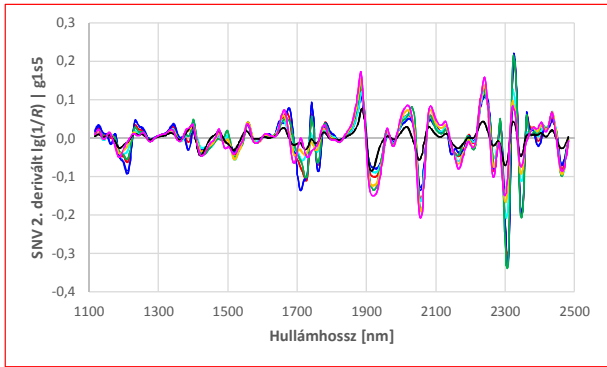
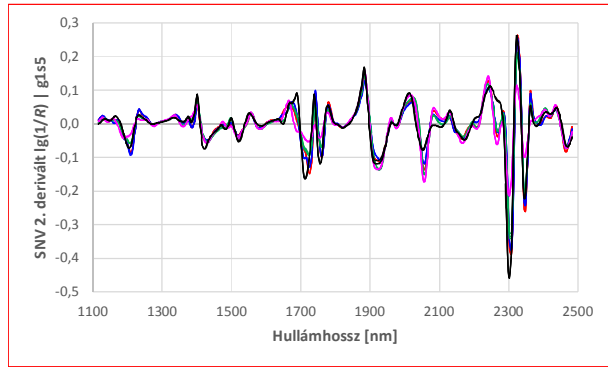
I. melléklet / 8. ábra: Pollenek NIR detektorral mért, matematikai kezelés nélküi (ún. „as is”) NIR spektrumai

(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;

repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)

napraforgó

repce



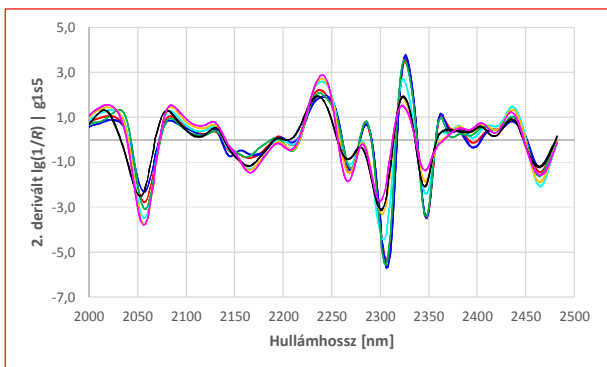
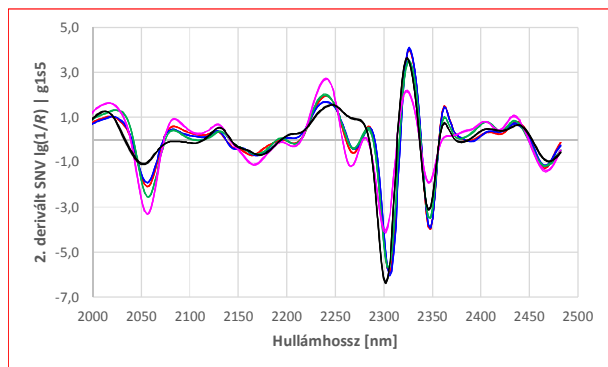
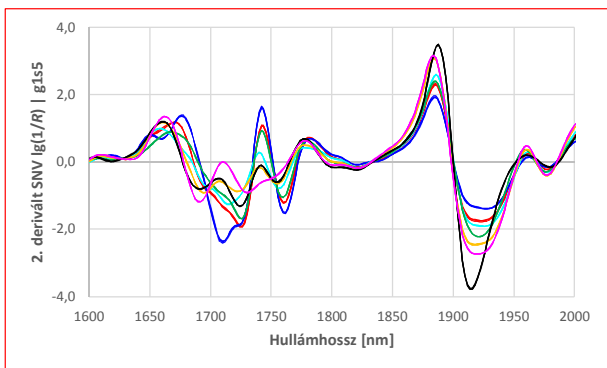
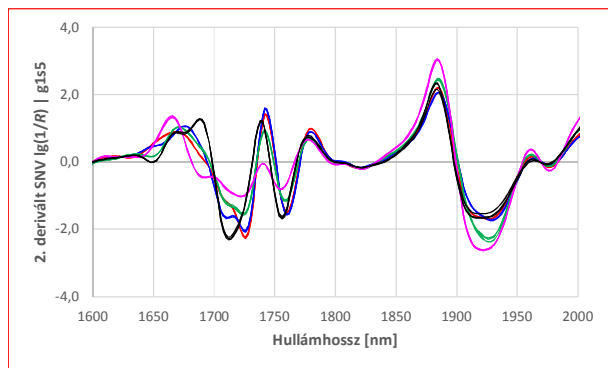
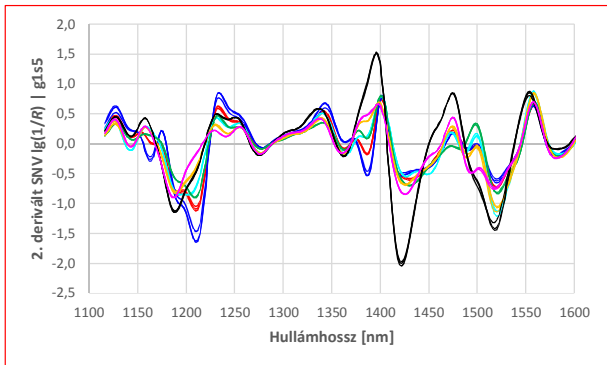
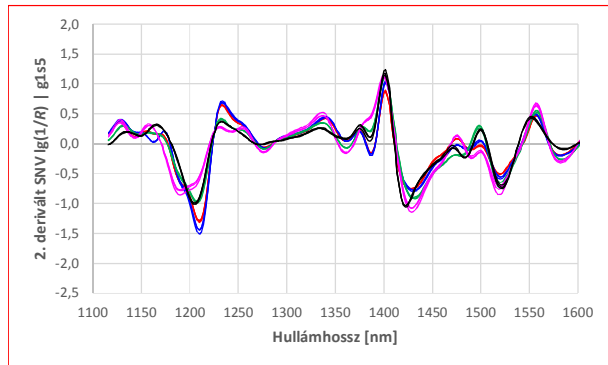
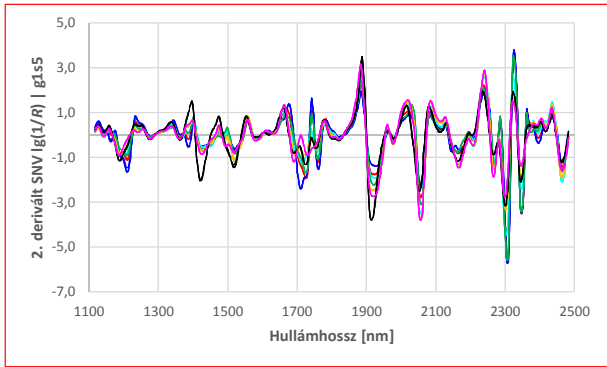
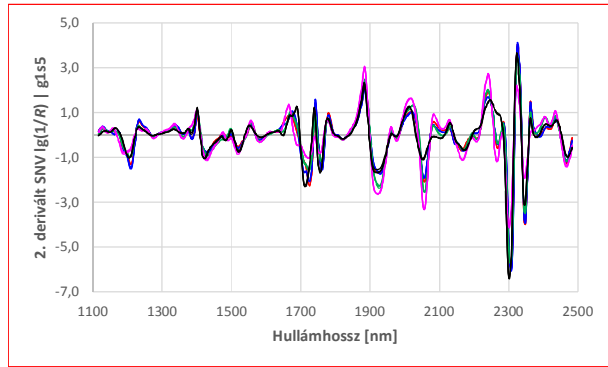
I. melléklet / 9. ábra: Pollenek NIR detektorral mért, SNV matematikai kezelésen átesett, majd simítással kombinált 2. derivált NIR spektrumai

(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;

repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)

napraforgó

repce



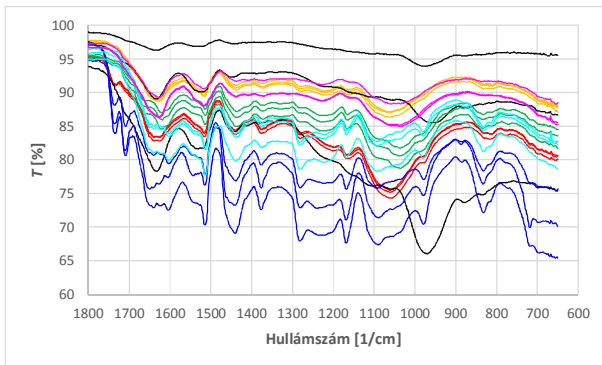
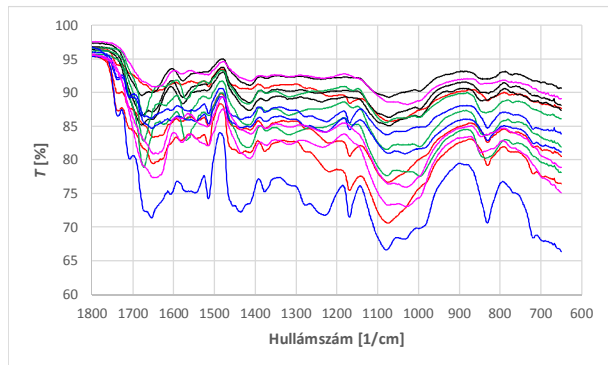
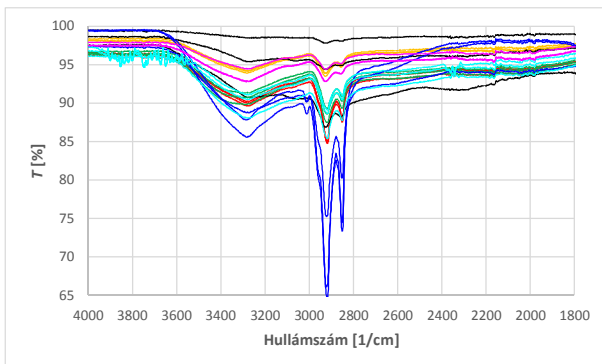
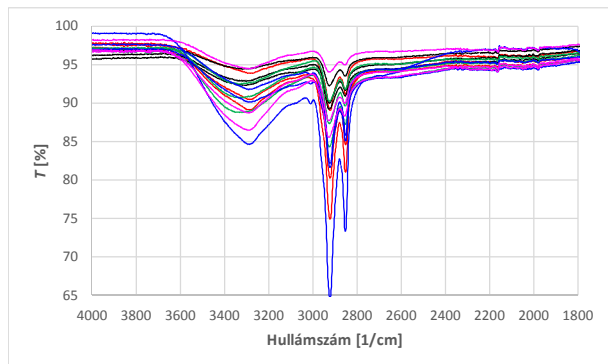
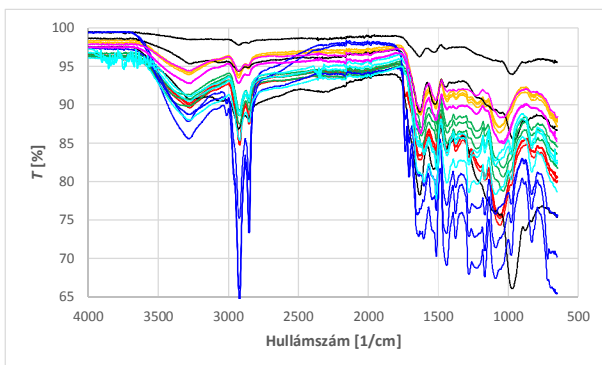
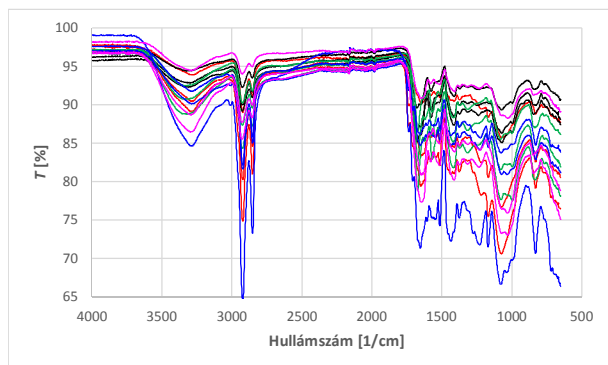
I. melléklet / 10. ábra: Pollenek NIR detektorral mért, simítással kombinált 2. derivált, majd SNV matematikai kezelésen átesett NIR spektrumai

(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;

repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)

napraforgó

repce



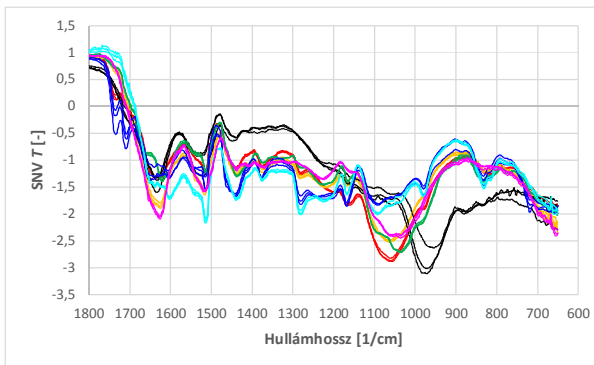
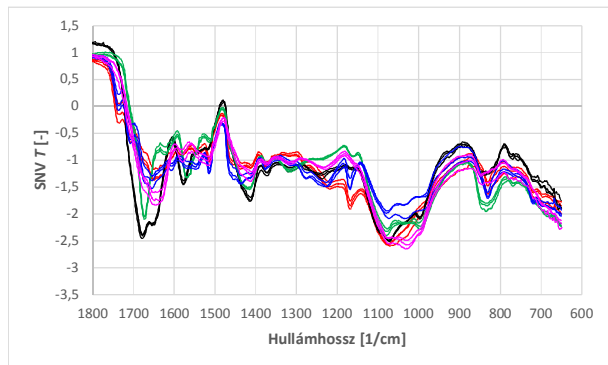
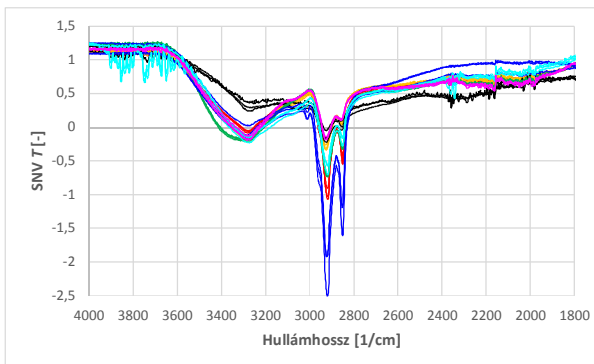
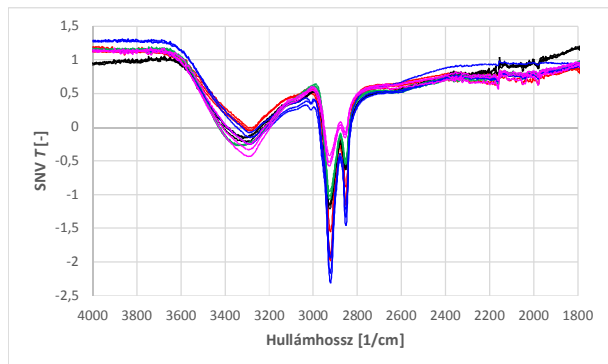
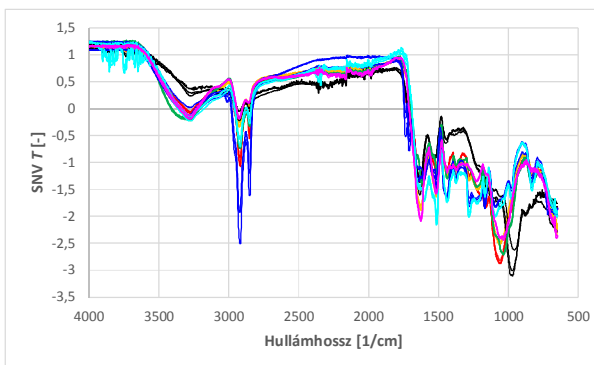
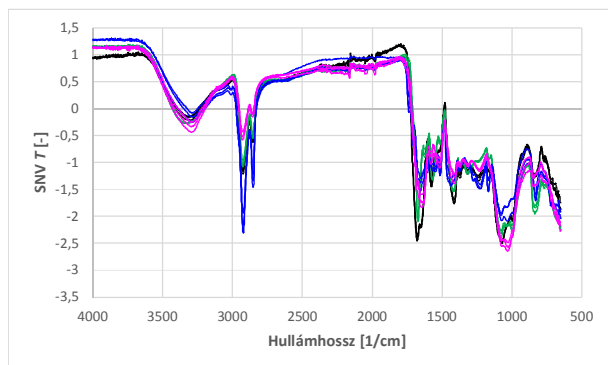
II. melléklet / 1. ábra: Pollenek matematikai kezelés nélküli (ún. „as is”) ATR FT-IR spektrumai

(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;

repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)

napraforgó

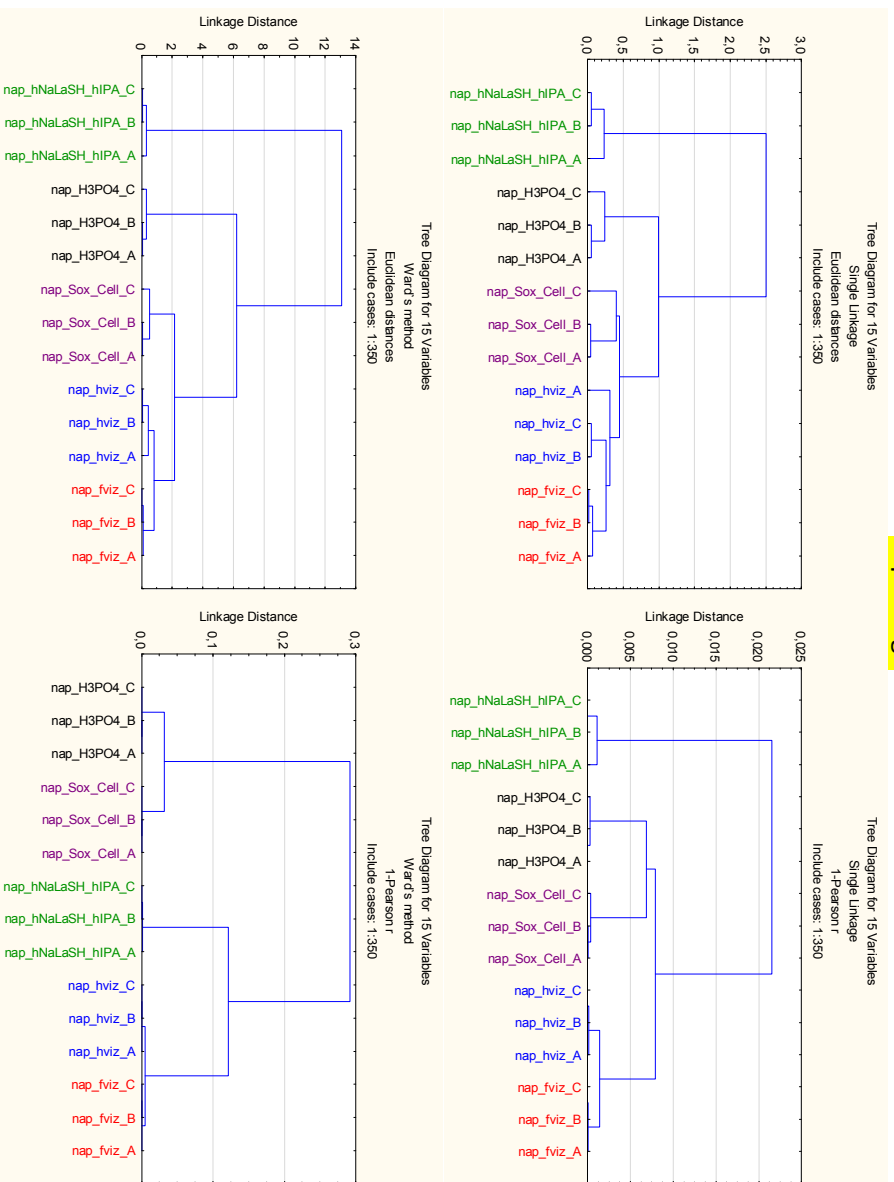
repce



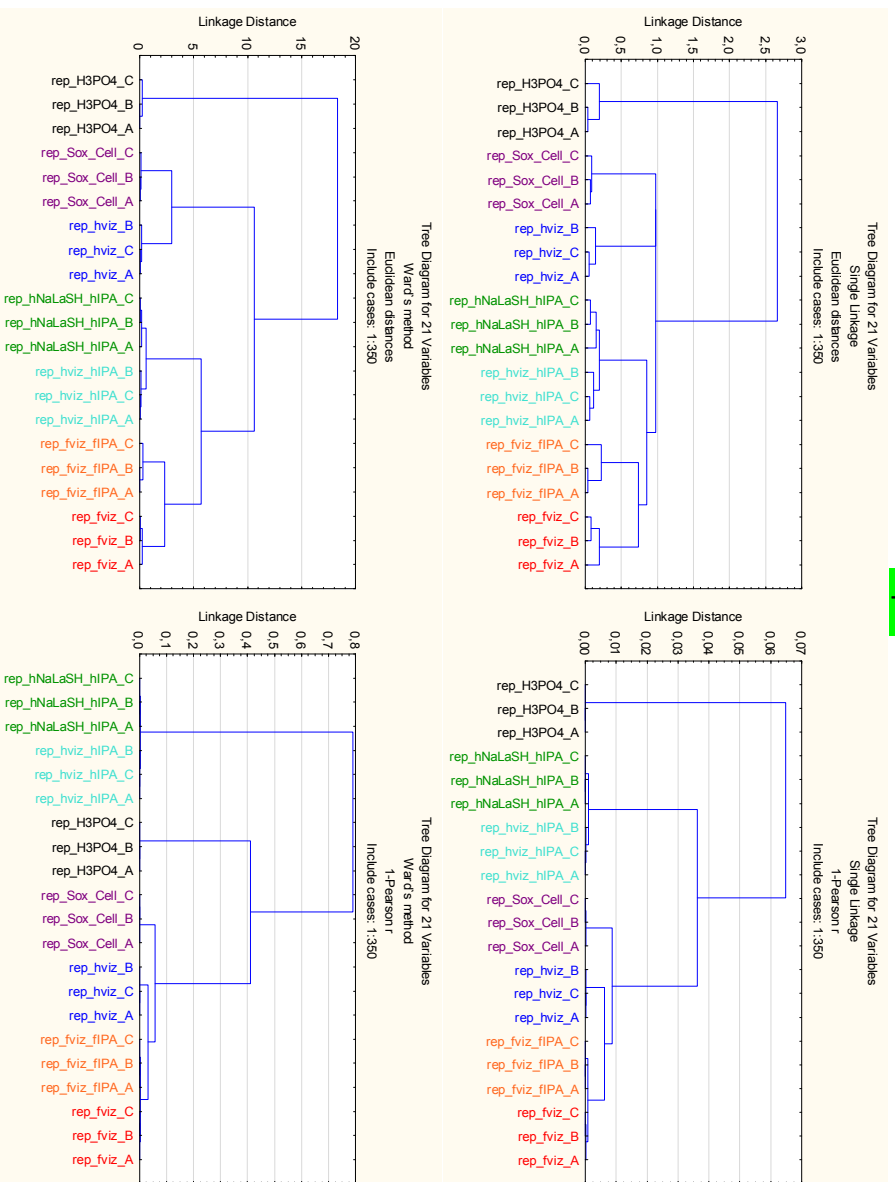
II. melléklet / 2. ábra: Pollenek SNV matematikai kezelésen átesett, teljes tartományra számított ATR FT-IR spektrumai

(napraforgó: hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4 ;

repce: hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H_3PO_4)



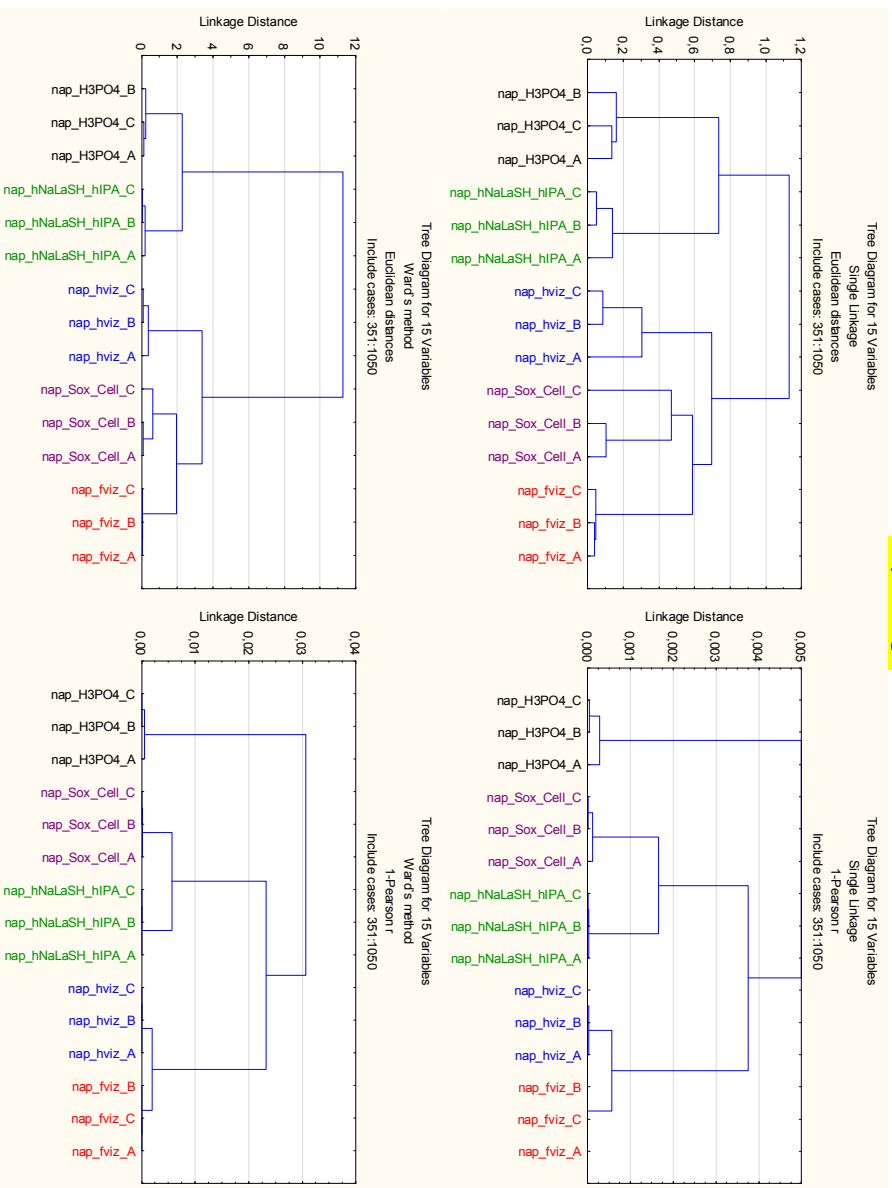
repce



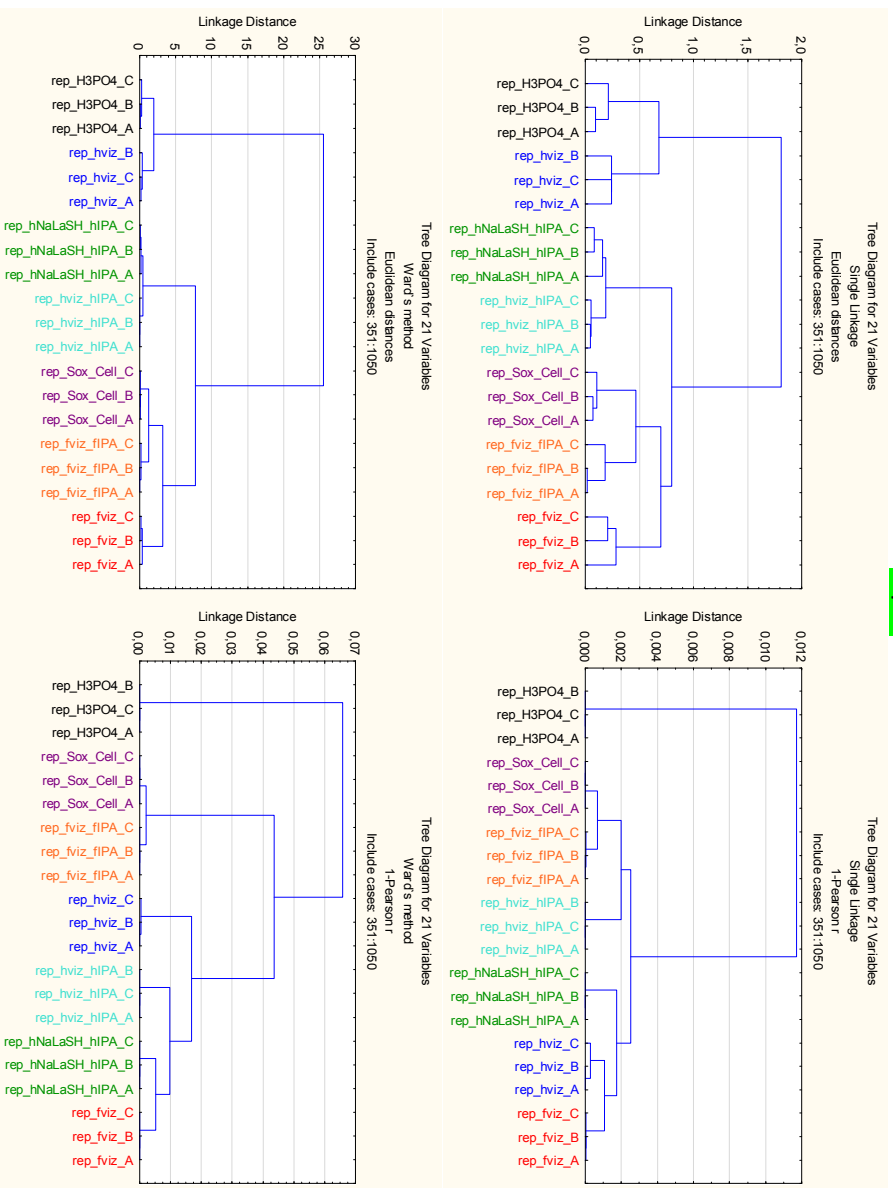
III. melléklet / 1. ábra: Pollenek *St* detektorral mért, matematikai kezelés nélküli (ún. „as is”) Vis-NIR spektrumaibara készített klaszterelemzés (CA) dendrogramjait

napraforgó:

hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄,
hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)

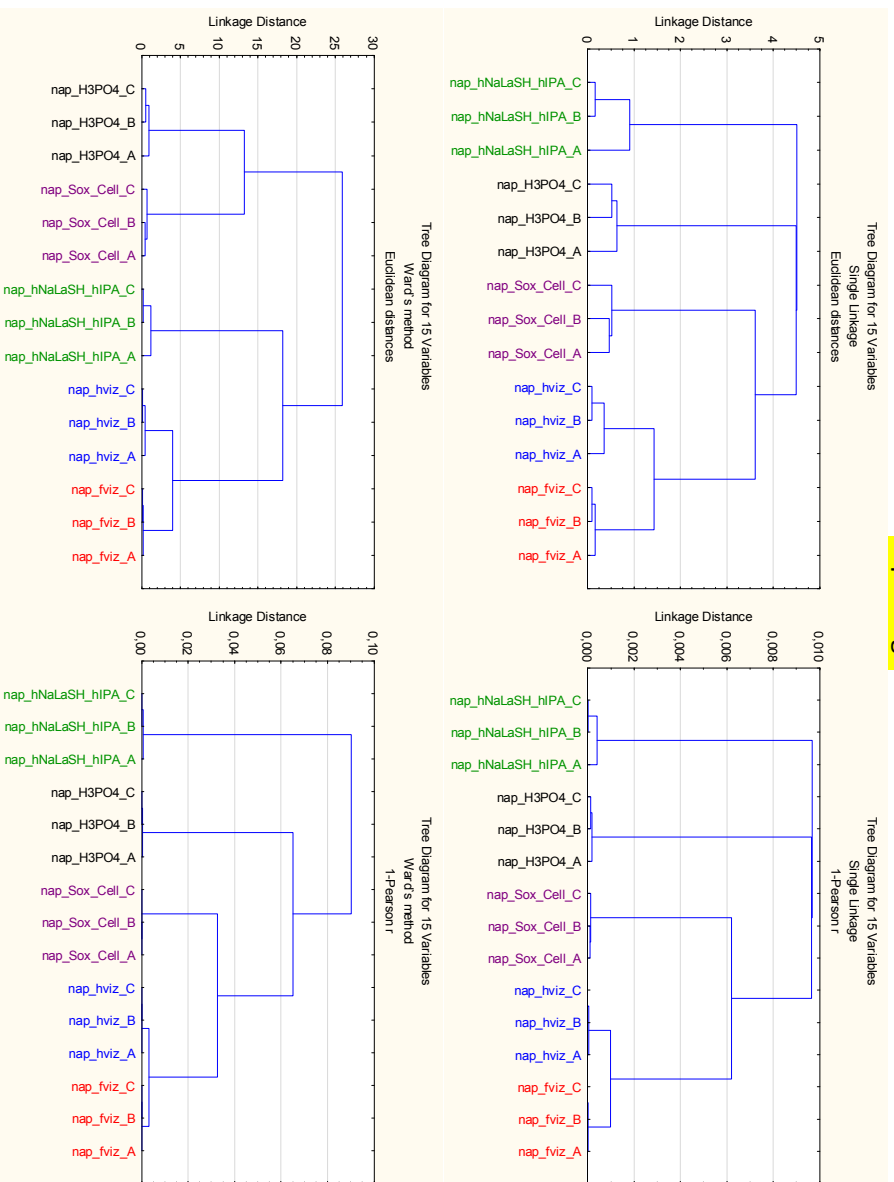


repce

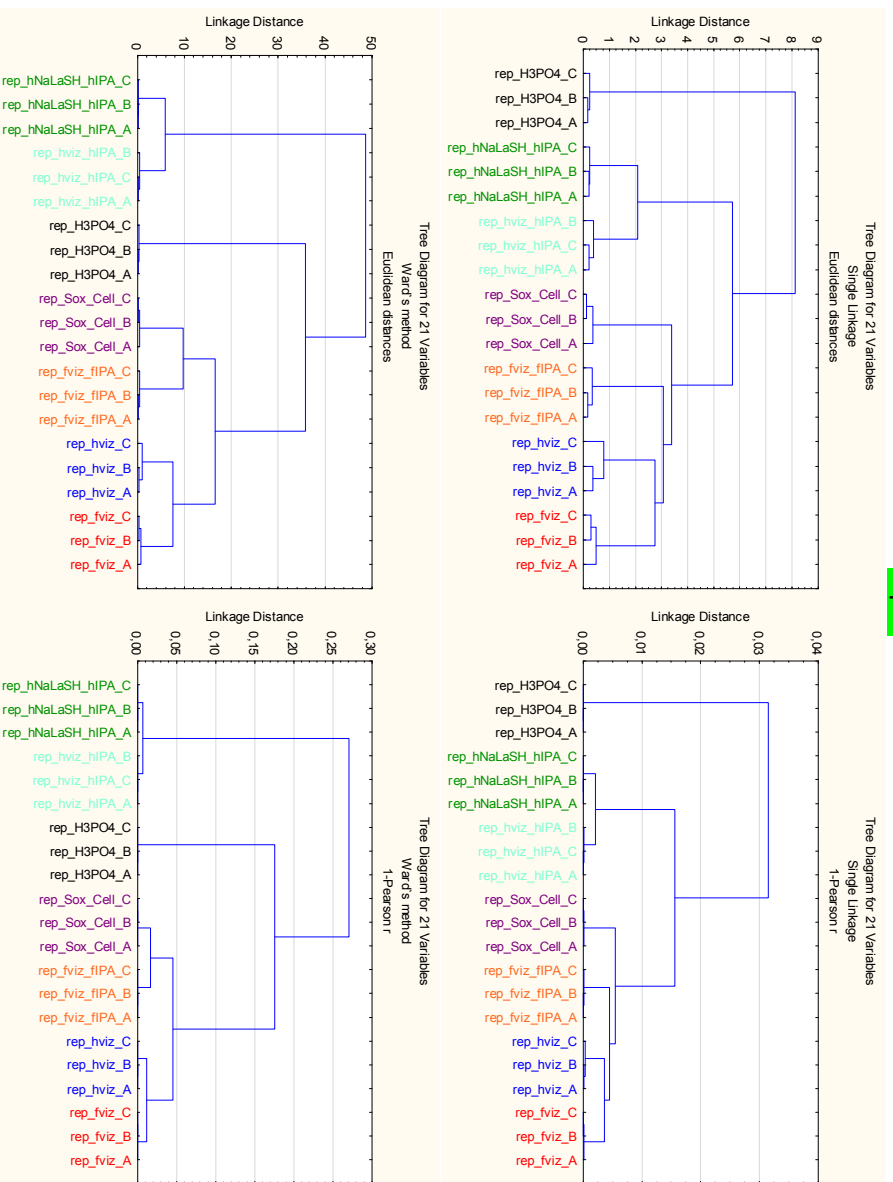


III. melléklet / 2. ábra: Pollenek *PBS* detektorral mért, matematikai kezelés nélküli (ún. „as is”) NIR spektrumaira készített klaszterelemzés (CA) dendrogramjai

(napraforgó: *hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*;
 repce: *hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*)



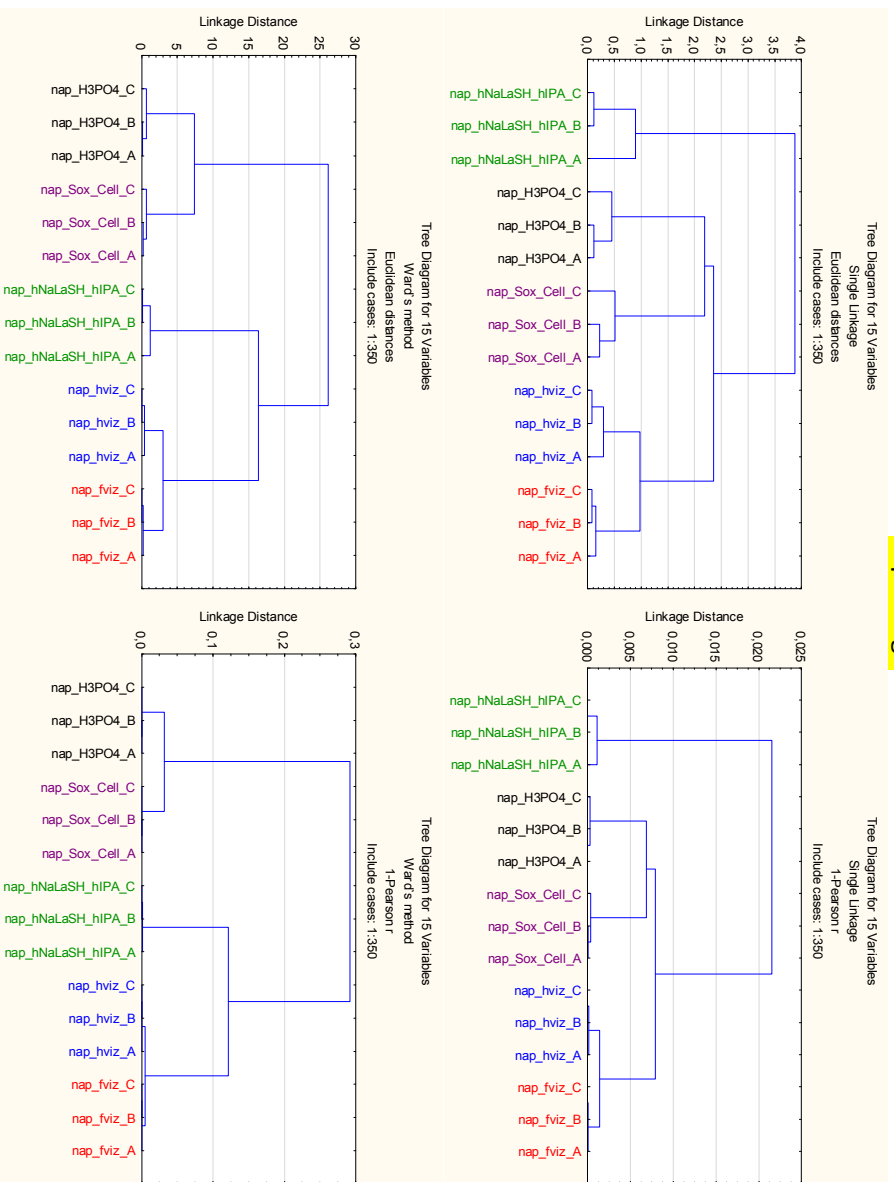
repce



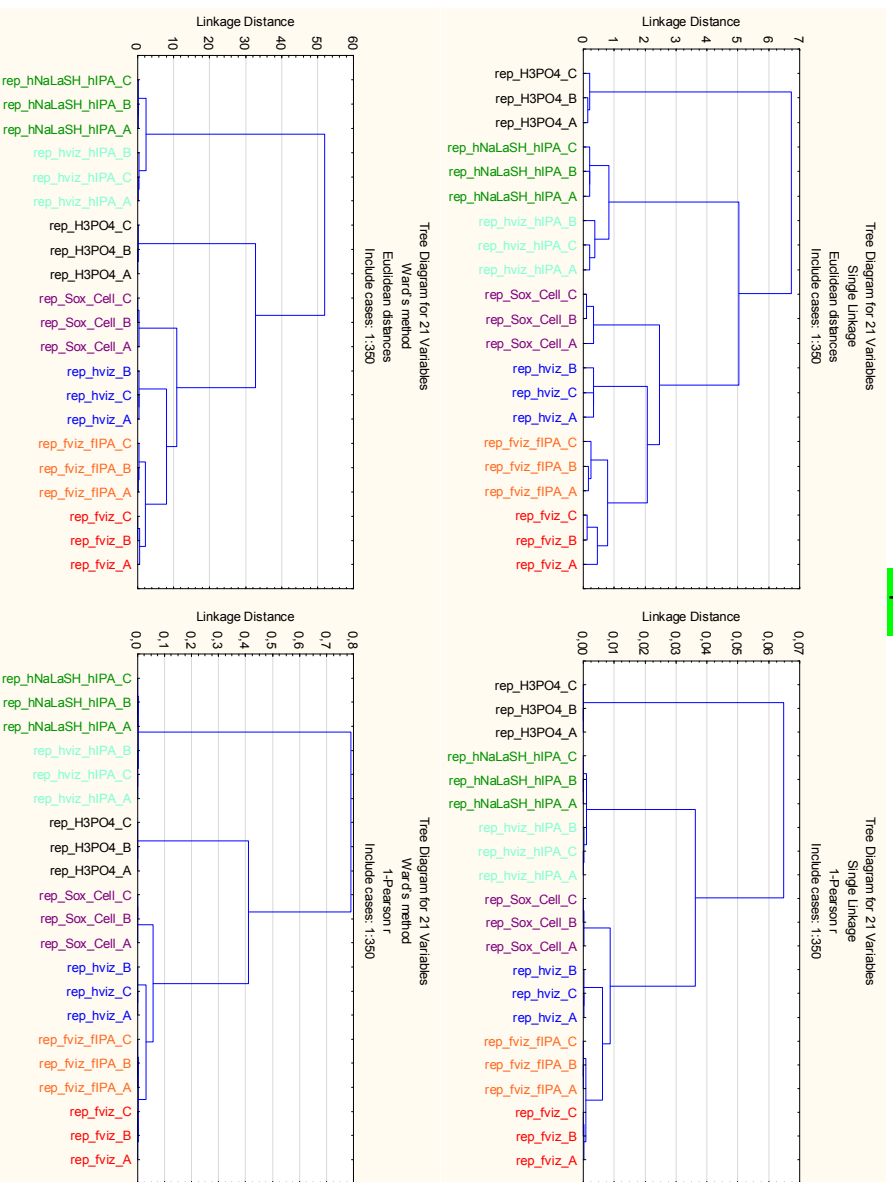
III. melléklet / 3. ábra: Pollenek **Si** és **PbS** detektorokkal mért, SNV matematikai kezelésén átesett Vis-NIR spektrumaira készített klaszterelemzés (CA) dendrogramjai

(napraforgó: **hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IP4, Soxhlet + Cellosolve, H3PO4**;

repce: **hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IP4, forró víz + forró IP4, hideg NaLaSH + hideg IP4, Soxhlet + Cellosolve, H3PO4**)



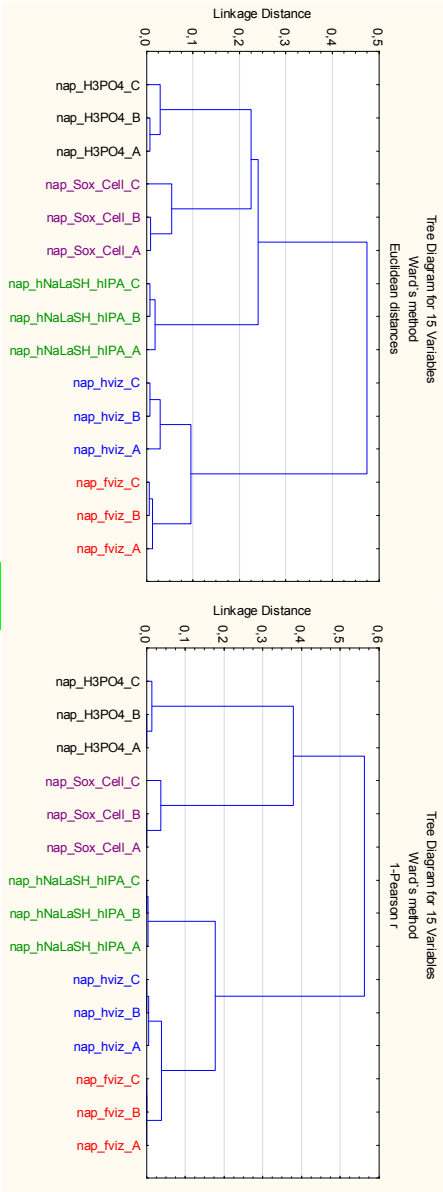
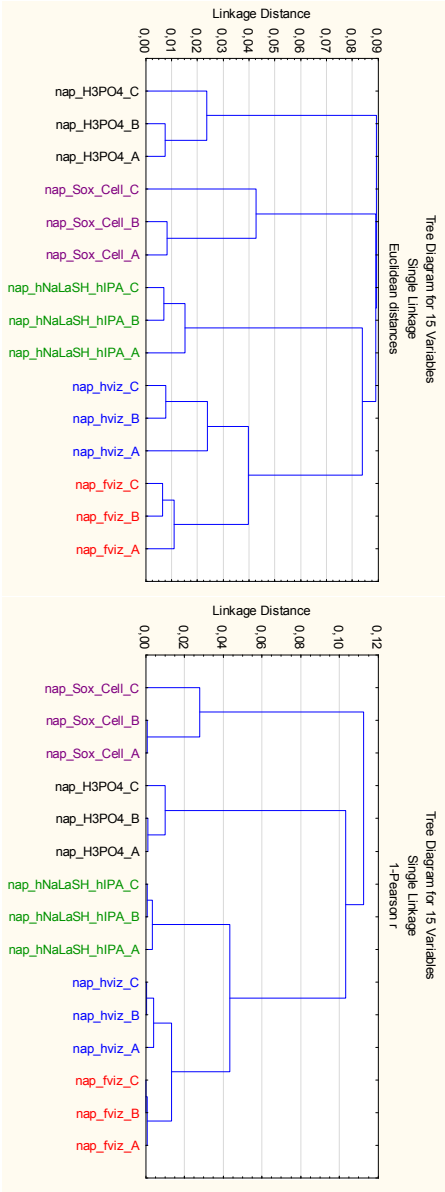
repce



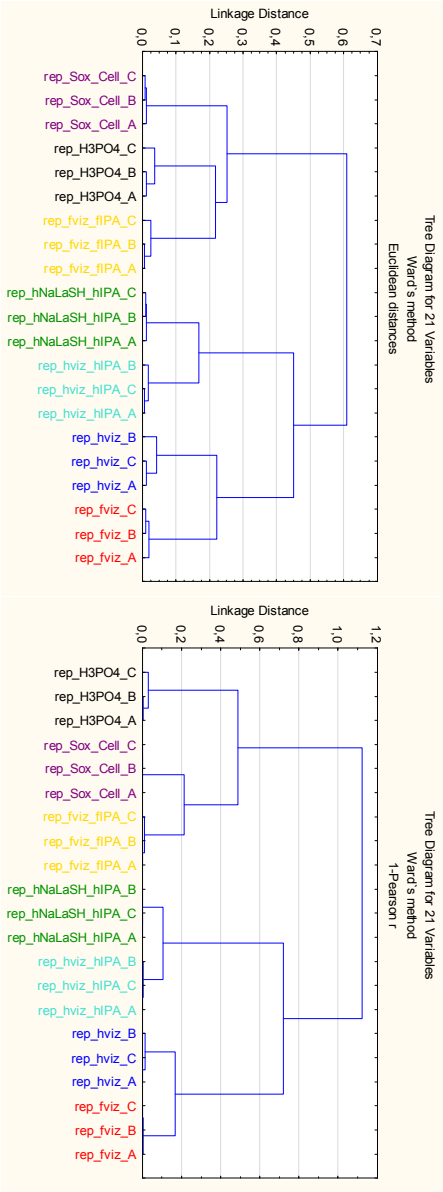
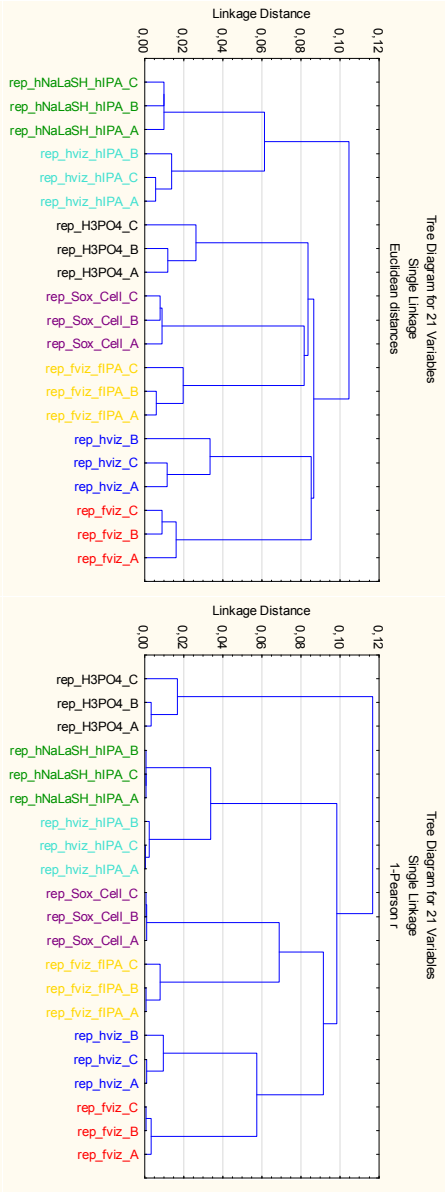
III. melléklet / 4. ábra: Pollenek *St* detektorral mért, SNV matematikai kezelésén átesett Vis-NIR spektrumaira készített klasterelentés (CA)átdendrogramjai

napraforgó: *hideg víz, forró víz, hideg NalaSH + hideg IP4, Soxhlet + Cellosolve, H3PO4*;
repce: *hideg víz, forró víz, hideg IP4, forró víz + forró IP4, hideg NalaSH + hideg IP4, Soxhlet + Cellosolve, H3PO4*

napraforgó

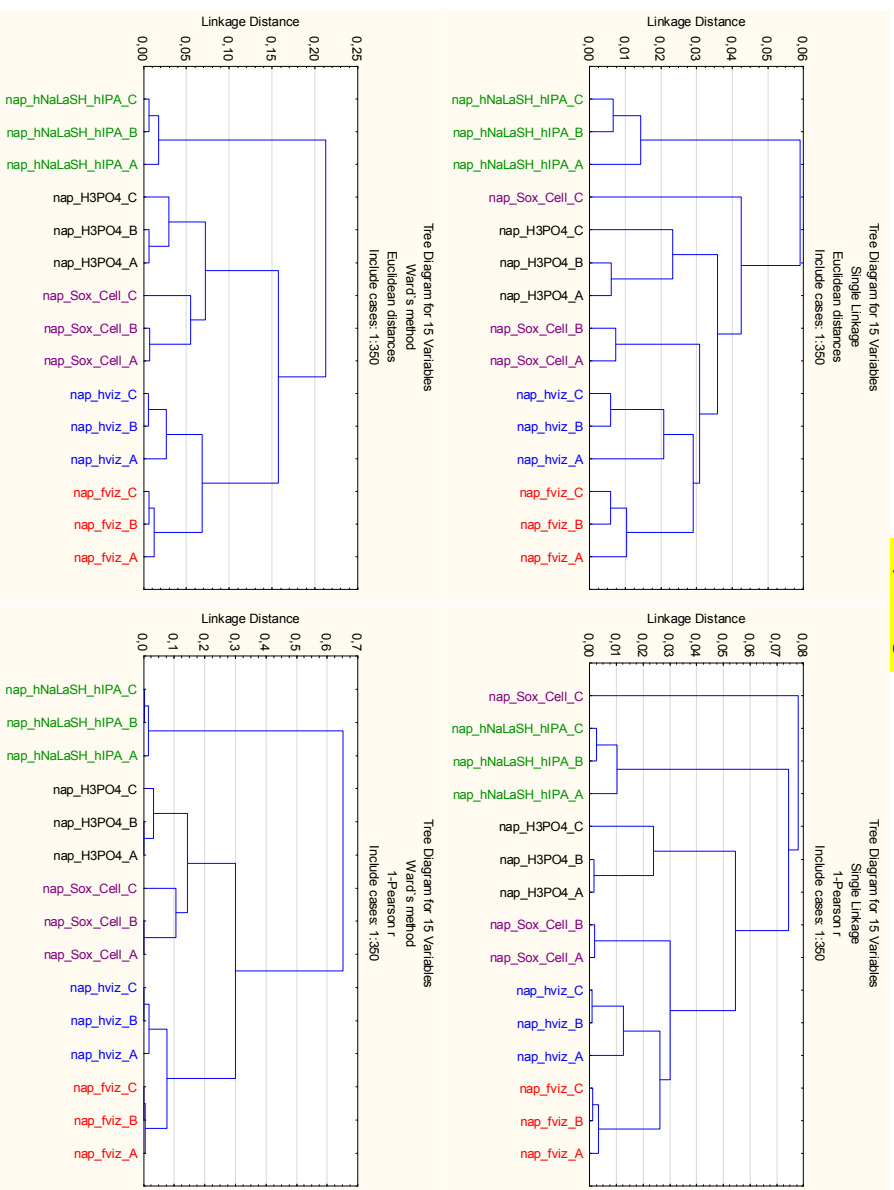


repce

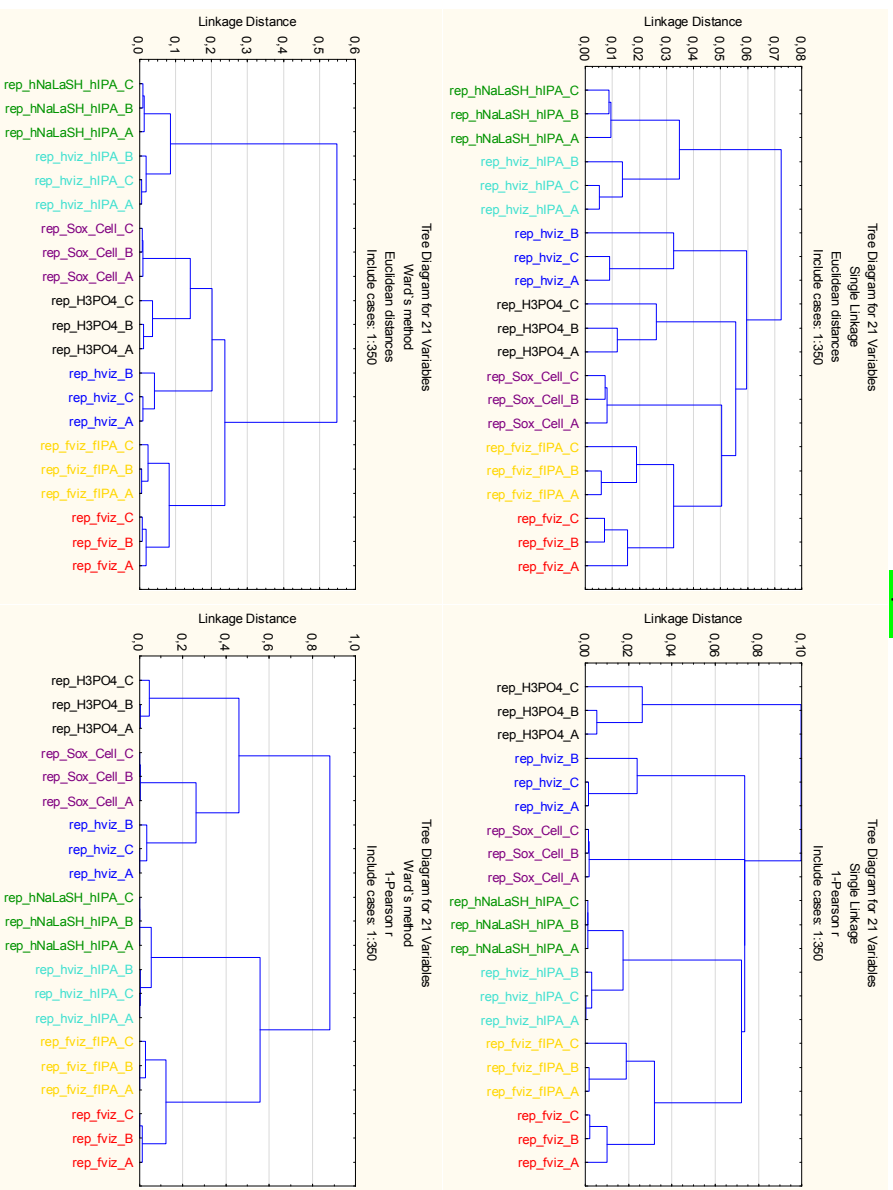


III. melléklet / 5. ábra: Pollenek **Sl** és **Pbs** detektorokkal mért, simiússal kombinált 2. derivált Vis-NIR spektrumaira készített klaszterelemzés (CA)dendrogramjait

napraforgó: **hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄**
repce: **hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄**



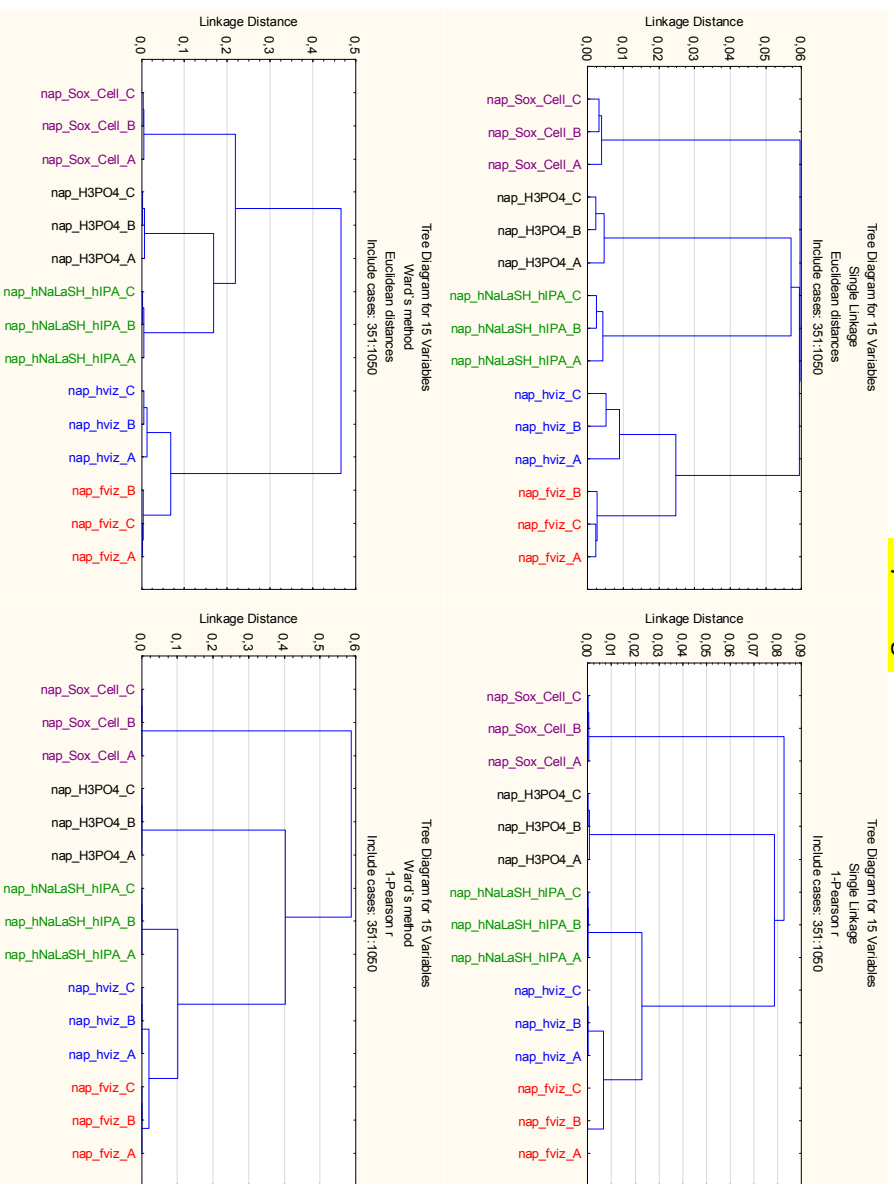
repce



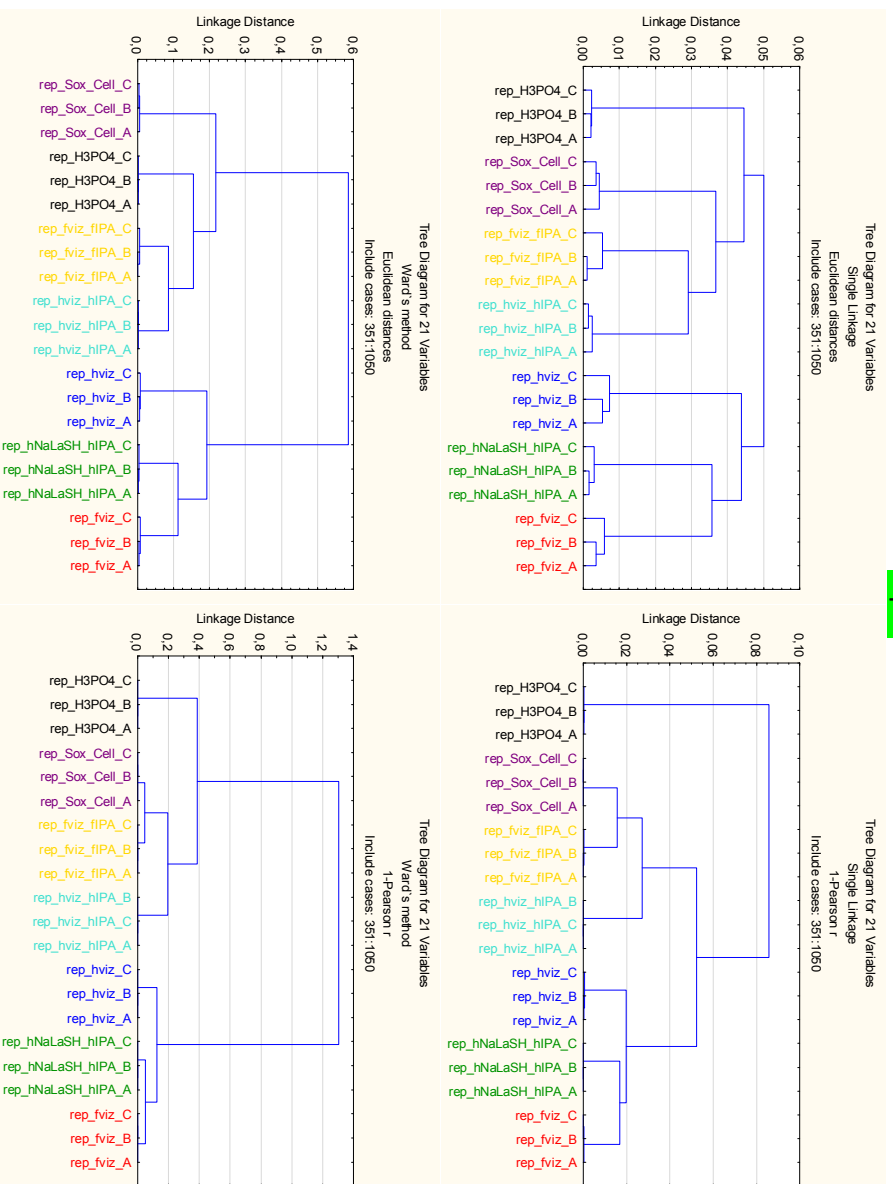
III. melléklet / 6. ábra: Pollenek *St* detektorral mért, simítással kombinált 2. derivált Vis-NIR spektrumaira készített klaszterelemzés (CA)dendrogramjai

napraforgó:

hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IP4, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄;
hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IP4, forró víz + forró IP4, hideg NaLaSH + hideg IP4, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄



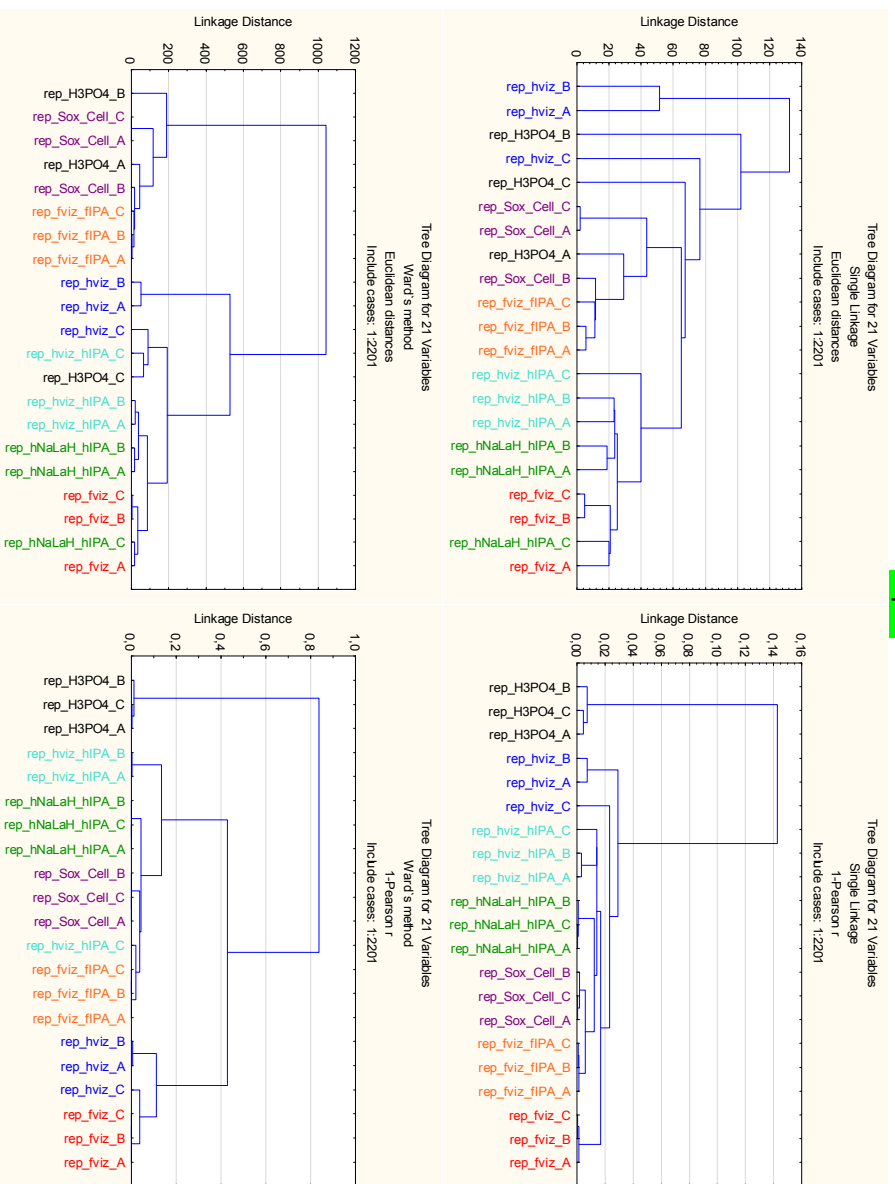
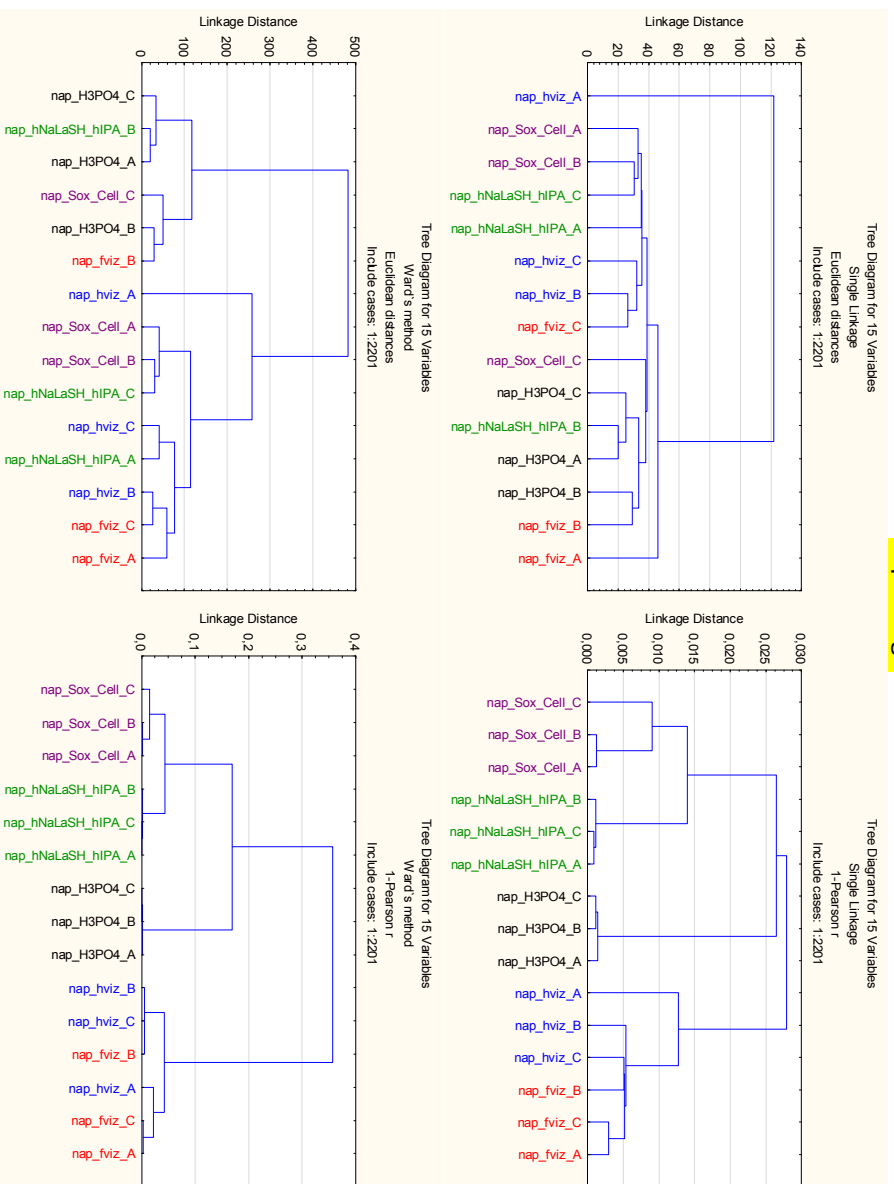
repce



III. melléklet / 7. ábra: Pollenek *Pbs* detektorral mért, szintússzal kombinált 2. derivált Vis-NIR spektrumaira készített klaszterelemzés (CA)dendrogramjai

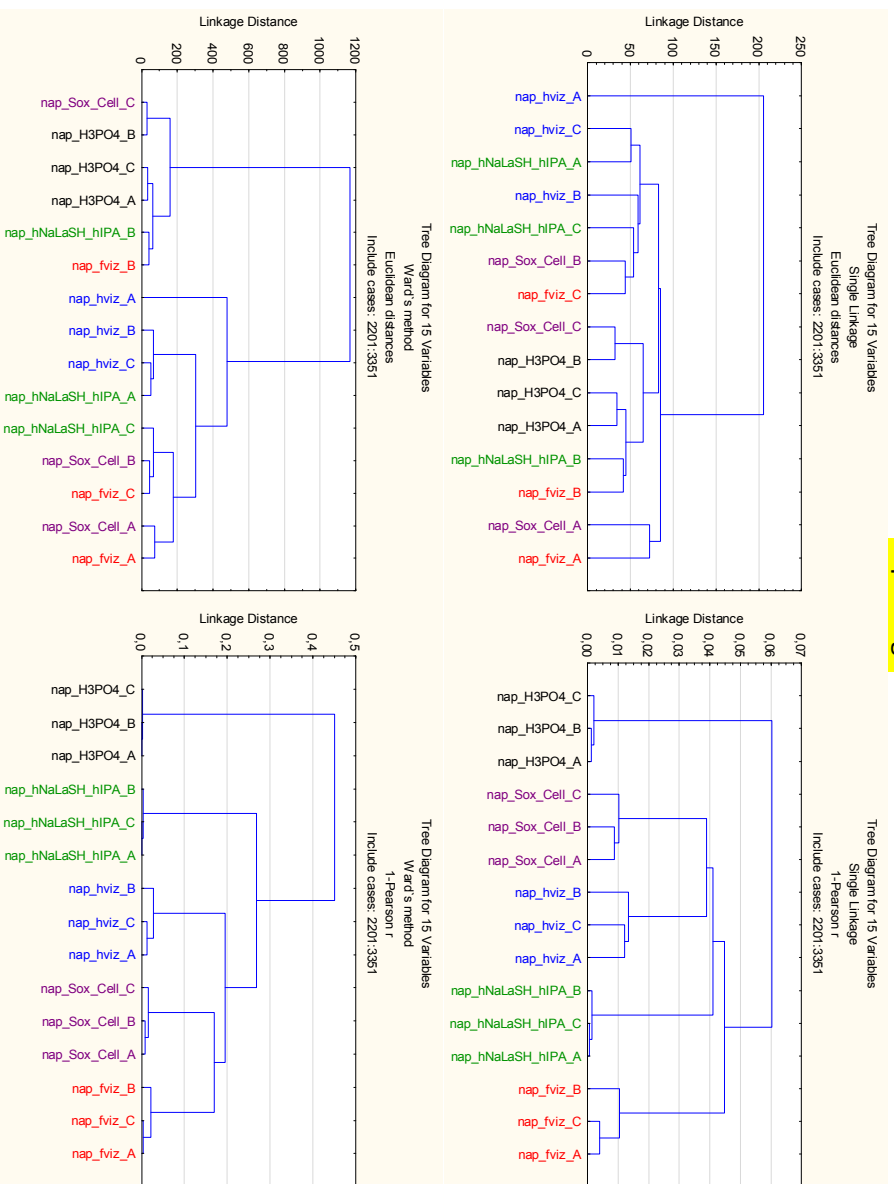
(napraforgó:

hideg viz, forró viz, hideg NaLaSH + hideg IP4, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄
hideg viz, forró viz, hideg viz + hideg IP4, forró viz + forró IP4, hideg NaLaSH + hideg IP4, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄)

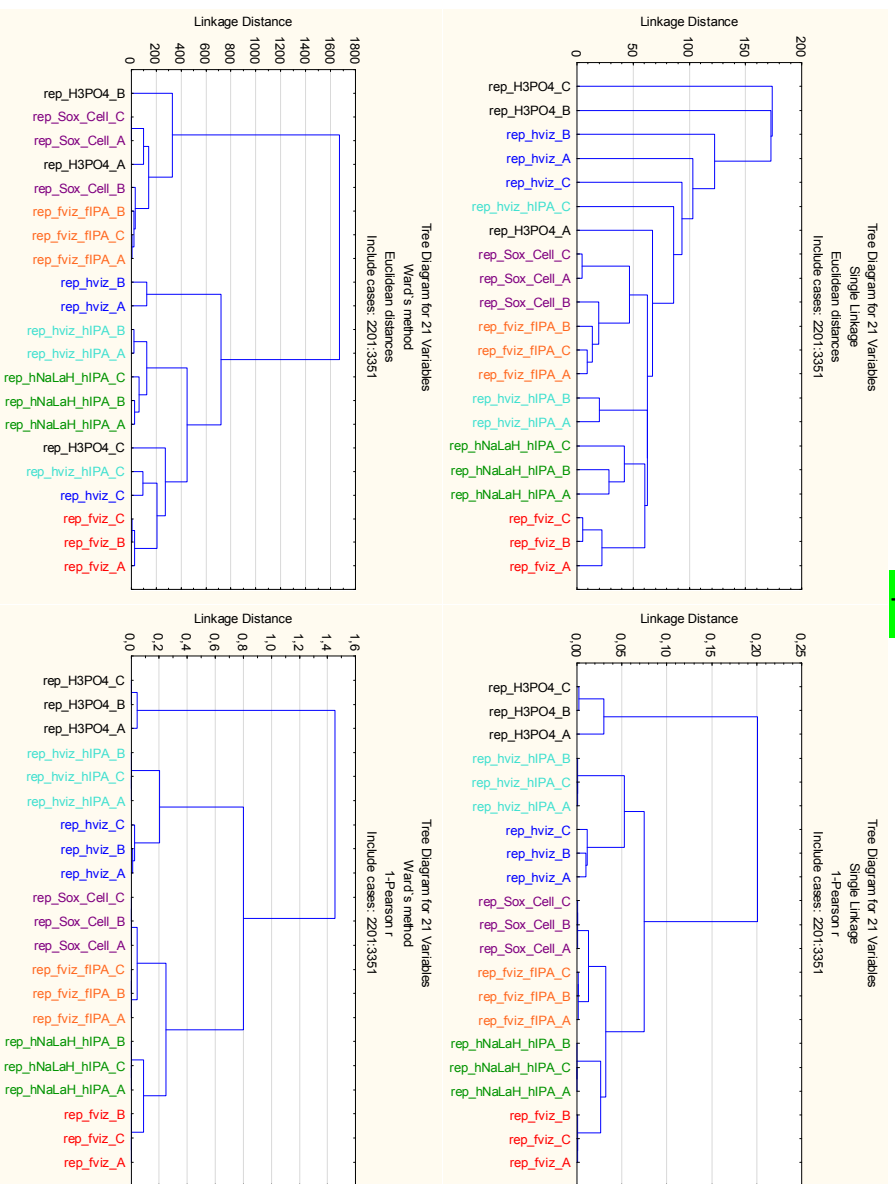


IV. melléklet / Lábja: Matematikai kezelés nélkül (ún. „as is”) ATR-FT-IR spektrumok 4000-1800 cm^{-1} tartományjára készített klaszterelemzés (CA) dendrogramjai

(un)pr(f)or(g)0: *hideg v1z, forró v1z, hideg NaLASH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*;
hideg v1z, forró v1z, hideg v1z + hideg IPA, forró v1z + forró IPA, hideg NaLASH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄

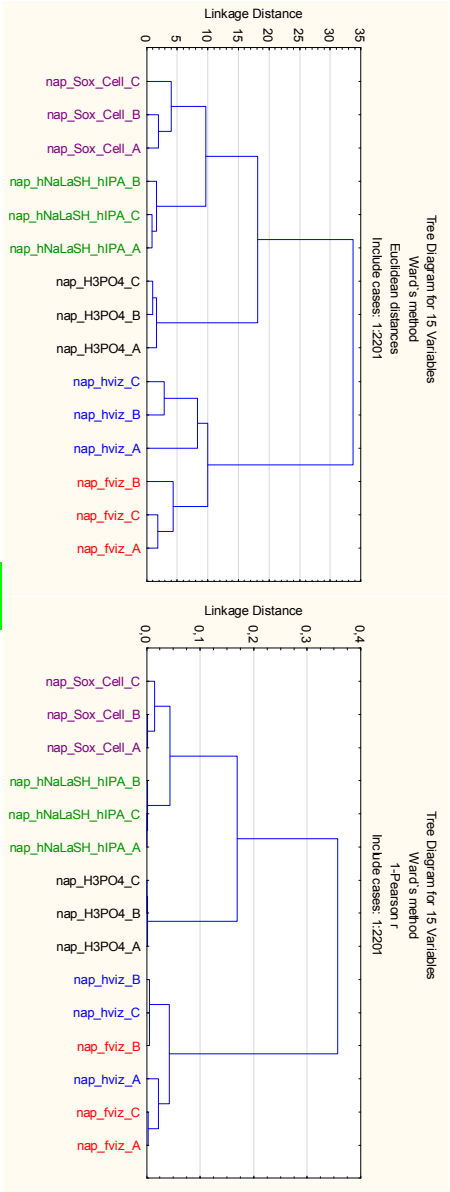
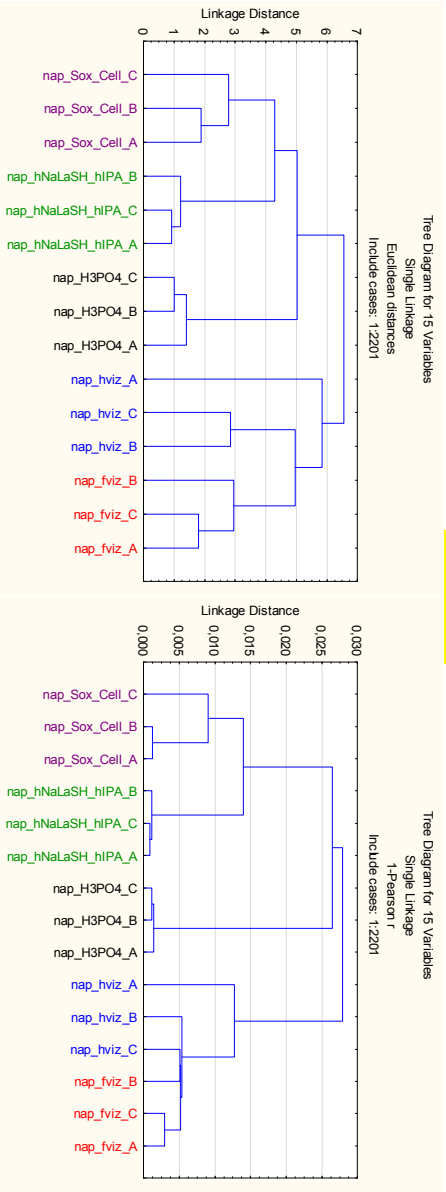


repce

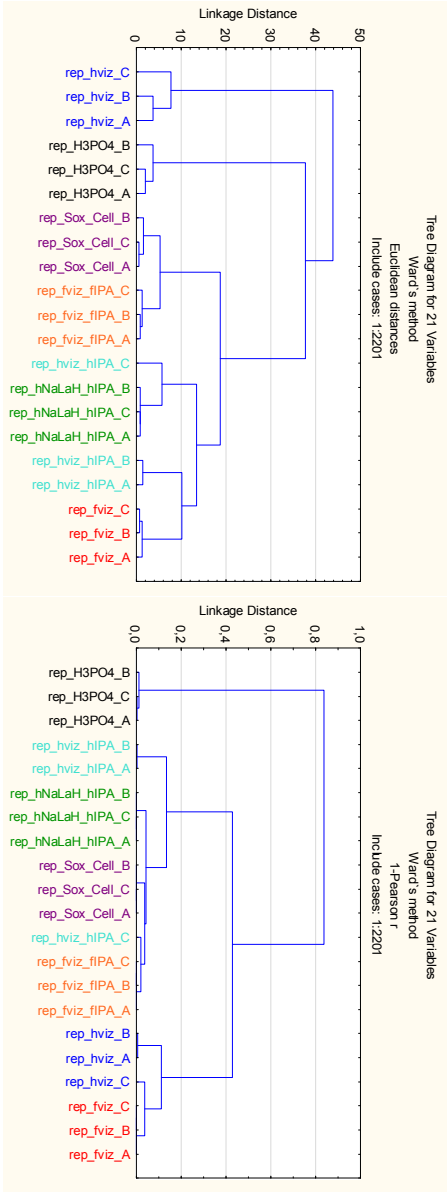
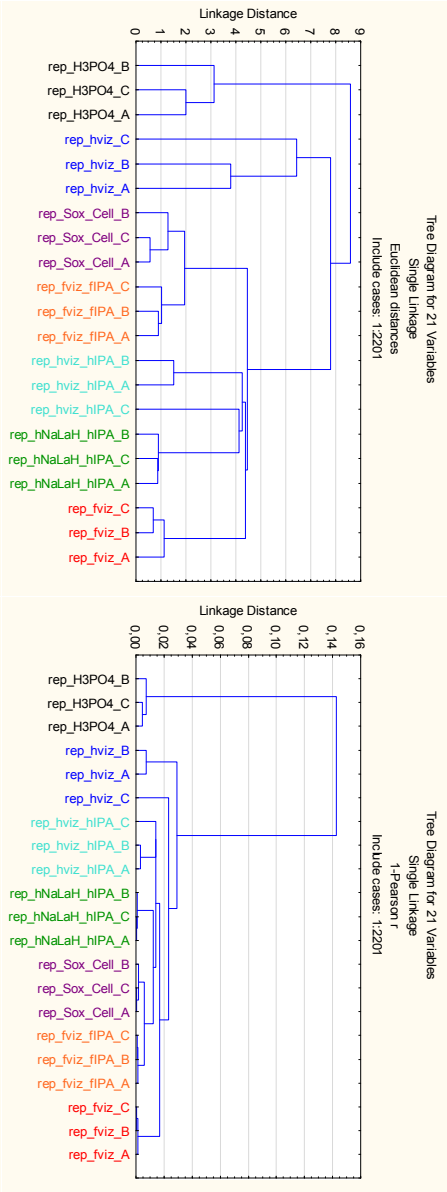


IV. melléklet / 2. ábra: Matematikai kezelés nélküli (ún. „as is”) ATR-FT-IR spektrumok 1800-650 1/cm tartományára készített klasterelentés (CA)dendrogramjai

(napraforgó: *hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*;
repce: *hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IPA, forró víz + forró IPA, hideg NaLaSH + hideg IPA, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*)



repce



IV. melléklet / 3. ábra: SNV matematikai kezelésén átesett ATR-FT-IR spektrumok 4000-1800 cm^{-1} tartományára készített klaszterelemzés (CA) dendrogramjai

(napraforgó: *hideg víz, forró víz, hideg NaLaSH + hideg IP4, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*;
repce: *hideg víz, forró víz, hideg víz + hideg IP4, forró víz + forró IP4, hideg NaLaSH + hideg IP4, Soxhlet + Cellosolve, H₃PO₄*)

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a témavezetőimnek, Dr. Gergely Szilveszternek és Slezsák Jánosnak a fáradtságot nem kímélő munkájukat és támogatásukat, melyek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Hálás vagyok az időért, amit rám áldoztak, és a rengetek tudásért, amit tőlük kaptam.

Köszönettel tartozom még Dr. Hanz Péternek, aki lehetővé tette a kutatásomat a minták biztosításával.

*A bemutatott kutatás a BME-EGA-02 számú projekt részeként
az Innovációs és Technológiai Minisztérium
Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból nyújtott támogatással,
a TKP2021 pályázati program finanszírozásában valósult meg.*