

## NOVÉ TRENDY VE TŘÍDĚNÍ A HODNOCENÍ KVALITY OBNOŽKOVÝCH PYLŮ NEW TRENDS IN CLASSIFICATION AND QUALITY ESTIMATION OF BEE POLLENS

*Andriy Synytsya, Alla Synytsya, Roman Bleha, Ján Gróf, Janka Nůžková, Radovan Ostrovský, Jana Čopíková, Ján Brindza*

### ABSTRACT

The aim of this work was evaluation of spectroscopic methods used for classification of bee pollen samples according to difference in their composition (FTIR, FT Raman, and FT NIR) and colour (diffuse reflectance VIS). Measured spectra were analysed by hierarchy cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). Obtained results confirmed that vibration based spectroscopic methods are sensitive to sample composition. FT Raman and VIS spectra confirmed differences in specific pigments (flavonoids and carotenoids) reflecting botanical origin of the raw flower pollens. The combination of spectroscopic methods used in this work helps better classify bee pollens which is important for quality estimation and utilization of this agricultural and beekeeping product.

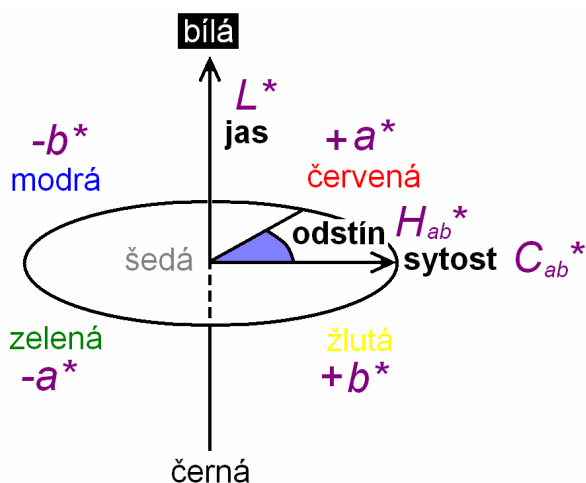
**Key words:** bee pollen, classification, vibration spectroscopy, colour estimation, hierarchy cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA)

---

### ÚVOD

Obnožkový pyl se skládá ze směsi květového pylu z nektarem a včelími výměšky. Tento včelařský produkt byl charakterizován jako zdroj volných aminokyselin a bílkovin, tuků a mastných kyselin, jednoduchých cukrů a polysacharidů, řady antioxidačních látek, zejména kyseliny askorbové, karotenoidů a flavonoidů (Qian et al., 2008; Almeida-Muradian et al., 2005; Gonzalez-Martín et al., 2007; Gonzales-Paramas et al., 2006; Silva et al., 2006; Tomas-Lorente et al., 1992; Ohta et al., 2007; Di Paola-Naranjo et al., 2004). Obnožkové pyly se významně liší podle chemického a botanického složení, což vede k nutnosti jejich účinné identifikace a třídění. Jestliže sběr pylu probíhá z jednoho botanického druhu rostlin, pylové granuly mají stejné biochemické a strukturní vlastnosti, což může posloužit jako vodítko pro třídění pylu podle botanického původu. Pokud pylu není dostatek, včelí dělnice navštěvují květiny různých rostlinných druhů čímž dochází ke smíchání odlišných pylů v pylové kuličce. Vzniklé pylové granule budou mít variabilní vlastnosti založené na poměru zdrojů z různých botanických taxonů. Třídění takového materiálu je mnohem komplikovanější (Human, Nicolson, 2006; Silva et al., 2006; Gonzalez-Martín et al., 2007). Zjištění botanického původu a složení obnožkových pylů pomocí klasických analytických postupů je náročné z hlediska práce a času. Někdy při chemickém zpracování dochází vzorku k degradaci nestabilních látek, což vede k chybám v jejich stanovení (Almeida-Muradian et al., 2005).

Vibrační spektroskopické metody jsou běžně používané pro strukturní analýzu biologického materiálu, nevyžadují zvláštní přípravu vzorků a vylučují faktory vedoucí ke zkreslení výsledků (chemická a termální degradace, vymizení složek během přípravy a extrakce a pod.). Ramanova a infračervená (FTIR – *Fourier transformed infrared*) spektroskopie poskytují informace o struktuře a chemickém složení biologických vzorků a jsou široce uplatněná při jejich analýze. FTIR spektroskopie byla úspěšně použita pro identifikaci medových (Pappas et al., 2003) a alergenových (Gottardini et al., 2007) květových pylů. Byly vytvořeny knihovny FTIR spekter pro rychlou identifikaci květových pylů.



**Obrázek 1** Uspořádání barevného prostoru CIE  $L^*a^*b^*$

Tato metoda dokázala rozlišit druhy rostlin ze stejného rodu, přičemž možnosti světelné mikroskopie jsou obvykle omezené na rozlišování čeledí a rodů. Využití knihovny FTIR spekter květových pylů při analýze obnožkových pylů však má určité omezení vzhledem ke smíšenému botanickému původu a přítomnosti dalších složek (nektar, včelí výměšky). Kombinace vibračních spekter s multivariační analýzou je účinná pro identifikaci a třídění surovin a potravin (Coimbra et al. 1999, Černá et al. Čopíková et al. 2006, Vesela et al. 2007). Charakterizace a třídění alergických květových pylů 4 druhů rostlin bylo provedeno pomocí Ramanové mikrospektroskopie a multivariační analýzy (Ivleva et al., 2005). Měření spekter bylo provedeno ze samotného pylového zrna identifikovaného mikroskopicky. Ramanova spektra pylu obsahovala řadu charakteristických píků, které byly přiřazeny jednotlivým složkám pylového zrna. Multivariační analýza vibračních spekter by mohla pomoci řešení problému třídění obnožkových pylů.

Příbuzné druhy květových pylů jsou obvykle velmi podobné a proto může být v některých případech obtížná identifikace jen na základě morfologie. K řešení tohoto problému by mohlo pomoci porovnání jejich zbarvení. Květový pyl, obsahující mastná barviva z květinových prašníku, se výrazně liší barvou. Rozmanitost zbarvení zrn obnožkového pylu závisí na zdrojovém květinovém pylu. Odstín pylu je závislý na botanickém původu, stupni zralosti a chemickém složení. Mezi typickými chromofory pylů patří flavonoidy a karotenoidy. Oba typy chromoforů jsou běžné složky rostlin a mají biologický význam, zejména antioxidační aktivitu (Almaraz-Abarca et al., 2007, Leja et al., 2007); flavonoidy navíc přispívají imunitě rostlin protože jsou toxické pro řadu bakterií. Karotenoidy mají červeno-žluté, oranžové až červené zbarvení; barva flavonoidů je velmi rozmanitá a závisí na jejich struktuře. Výskyt a poměr jednotlivých barviv ve včelích pylech se stanovují pomocí separačních metod, zejména vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Di Paola-Naranjo et al. 2004). Hodnoty obsahu barviv byly použity jako markéry určitých druhů rostlin a pro charakterizaci biologického účinku a kvality pylu (Campos et al. 1997; Serra Bonvehí et al., 2001; Tomás Lorente et al., 1992; Tomás-Barberán et al., 1989).

Barvu pylové hmoty lze stanovit pomocí analýzy obrazu nebo na základě reflektančních spekter ve viditelné oblasti (obvykle 380 – 770 nm). První způsob potřebuje digitální mikro- nebo mikroskop; druhý – UV-Vis spektrofotometr s reflektanční sférou. Analýza mikroskopického obrazu pylové hmoty poskytuje nejen informace o zbarvení pylových zrn, a také o variabilitě jejich počtu, velikosti, tvaru a textury povrchu. Určení barvy pomocí analýzy obrazu potřebuje zařízení pro transformace barevných prostorů a proto nemůže být natolik spolehlivé jak určení s využitím reflexní spektroskopie. Reflexní spektrofotometry slouží k rutinnímu měření barvy a poskytují výsledky blízké vizuálnímu vjemu. Při reflexním měření se zjišťuje poměr odraženého monochromatického světla ke světlu dopadajícímu; následujícím krokem je transformace naměřených spekter do systému barevnosti CIE  $L^*a^*b^*$  (obrázek č. 1). Zatím není jasné nakolik barva obnožkového pylu koreluje s jeho botanickým původem. Analýza 10 vzorků obnožkových pylů z Jižní Brazílie ukázala, že jednobarvost vzorku obnožkového pylu

nemůže být spolehlivým důkazem toho, že pochází z jednoho druhu rostlin (Almeida-Muradian et al. 2005). Přesto měření barvy lze využít pro třídění vzorků pylů v kombinaci s dalšími charakteristikami, například mikroskopická morfologie nebo obsahy/distribuce určitých chemických markerů. Dělení obnožkového pylu podle barevných vlastností odráží rozmanitost ve složení barviv, což je důležité pro odhad kvality a biologické aktivity tohoto cenného produktu včelařství.

Táto práce je věnovaná třídění souborů vzorků a obnožkových včelích pylů neznámého botanického původu pomocí následujících postupů: (a) kombinace spektroskopické a multivariační analýzy naměřených spekter, a (b) spektroskopického stanovení barvy. Pro určení botanického druhu vzorků byly použité referenční vzorky květových a monoflorálních včelích pylů.

## MATERIÁL A METODIKA

**Tabulka 1** Seznam vzorků květového a včelího pylu

| Druh                 | Botanický původ               | Počet vzorků |
|----------------------|-------------------------------|--------------|
| Květové pylu         | slunečnice                    | 18           |
|                      | moruše směs                   | 1            |
|                      | mák setý                      | 1            |
|                      | žito seté                     | 1            |
|                      | tomel japonský (kaki, churma) | 2            |
| Obnožkové včelí pylu | slunečnice                    | 10           |
|                      | řepka olejná                  | 10           |
|                      | zlatobýl                      | 1            |
|                      | mák divý                      | 1            |
|                      | svazenka                      | 1            |
|                      | jetel plazivý                 | 1            |
|                      | neznámý                       | 132          |

Vzorky květového (KP) a obnožkového včelího (VP) pylu byly získané z různých lokalit Slovenské republiky (tabulka č. 1). Soubor 132 vzorků VP neznámého botanického původu po primárním třídění podle konzistence a vizuální barvy byly homogenizované a připravené pro měření spekter.

Měření FT Ramanových spekter v rozsahu  $150\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  bylo provedeno pomocí FT Ramanového spektrometru Equinox 55/S (Bruker, USA) vybaveným křemenným děličem světla a Ge detektorem chlazeným tekutým  $\text{N}_2$ . Byl použit Nd:YAG laser emitující záření při  $\lambda=1064\text{ nm}$  a výkonem 250 mW. Pro každý vzorek bylo použito průměrné spektrum z 1054 skenů změřený ve skleněné lahvičce při  $25^\circ\text{C}$  s rozlišením  $4.0\text{ cm}^{-1}$ . FTIR a FT NIR spektra vzorků pylů byla změřena na FT-IR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA). FTIR spektra byla měřena v KBr tabletě v rozsahu vlnočtů  $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$  s rozlišením  $2\text{ cm}^{-1}$ ; počet skenů byl 64. FT NIR spektra byla změřena v rozsahu vlnočtů  $4000\text{--}10000\text{ cm}^{-1}$  s rozlišením  $2\text{ cm}^{-1}$  a počtem skenů 100. Druhá derivace FT NIR spekter byla vypočtena pomocí algoritmu Norris (délka segmentu 5, mezera mezi segmenty 5). Difúzně reflektanční Vis spektra (%R) byla naměřena na UV-Vis spektrofotometru UV4 (UNICAM, Velká Británie), nástavec Labsphere pro měření reflexních spekter. Rozsah měření 380 – 800 nm, šířka štěrbin 4 nm, rychlost skenování  $240\text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ , datový interval 2 nm, počet skenů 10. Všechna spektra a 2. derivace FT NIR spekter byla exportována do tabulkového formátu pro další zpracování pomocí softwarů Origin 6.0 (Microcal Origin, USA) a Excel 2003 (Microsoft, USA). Spektra byla vyhlazena pomocí FFT filtru, 5 – 10 bodů; Vis spektra byla navíc převedena do jednotek  $\log(1/R)$ . Spektra v jednotkách absorbance nebo  $\log(1/R)$  byla normalizována podél osy Y v rozsahu 0 až 1.

Sety upravených spekter v tabulkovém formátu (FT Raman; FTIR; FT NIR – spektra a 2. derivace; VIS – spektra v jednotkách %R a  $\log(1/R)$ ) byla exportována do softwaru Statistica 7.0 (Statsoft, USA), kde byly vypočteny hodnoty popisné statistiky a provedena vícerozměrová statistická analýza. Rozdíly mezi vzorky byly zkoumány pomocí HCA (zvolené metody shlukování: nevážený průměr

skupin dvojic, úplné spojenie a Wardova metóda) na základe Euklidovej a Manhattanovej blokovej vzdialenosti a prezentované vo forme dendrogramu podobnosti objektu. Analýza PCA bola provedená na základe kovariácií a boli pripravené grafy komponentní zátěže a komponentního skóre.

Naměřená VIS spektra byla použita pro výpočet barevných parametrů systémů CIE XYZ a CIELab pomocí programu Excel 2003 (Microsoft, USA). Transformační rovnice pro výpočet hodnot X, Y a Z je dána zhruba vztahy:

$$X = \sum_{\lambda=400}^{700} E_{\lambda} R_{\lambda} x_{\lambda} \quad Y = \sum_{\lambda=400}^{700} E_{\lambda} R_{\lambda} y_{\lambda} \quad Z = \sum_{\lambda=400}^{700} E_{\lambda} R_{\lambda} z_{\lambda}$$

Kde  $E_{\lambda}$  je energie světelného záření, která je udávána tabelárně pro příslušné vlnové délky spektra  $\lambda$  a řadu světelných zdrojů jako D<sub>65</sub>, C (denní světlo) A (večerní světlo-světlo žárovky), T1 (umělá světla) apod.;  $x_{\lambda}$ ,  $y_{\lambda}$ ,  $z_{\lambda}$  jsou trichromatičtí členitelé, což jsou poměrná kolorimetrická množství měrných barevných podnětů tzv. normálního pozorovatele pro příslušné světelné zdroje. Jsou udávána pro 2° a 10° pozorovatele;  $R_{\lambda}$  jsou naměřené hodnoty reflektance světelného záření. Z hodnot X, Y, Z byly vypočteny souřadnice  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  barevného systému CIELAB a základní barevné rozdíly podle následujících rovnic:

$$L = 116 \cdot \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} - 16$$

$$a = 500 \cdot \left[ \left( \frac{X}{X_n} \right)^{\frac{1}{3}} - \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} \right]$$

$$b = 200 \cdot \left[ \left( \frac{Y}{Y_n} \right)^{\frac{1}{3}} - \left( \frac{Z}{Z_n} \right)^{\frac{1}{3}} \right]$$

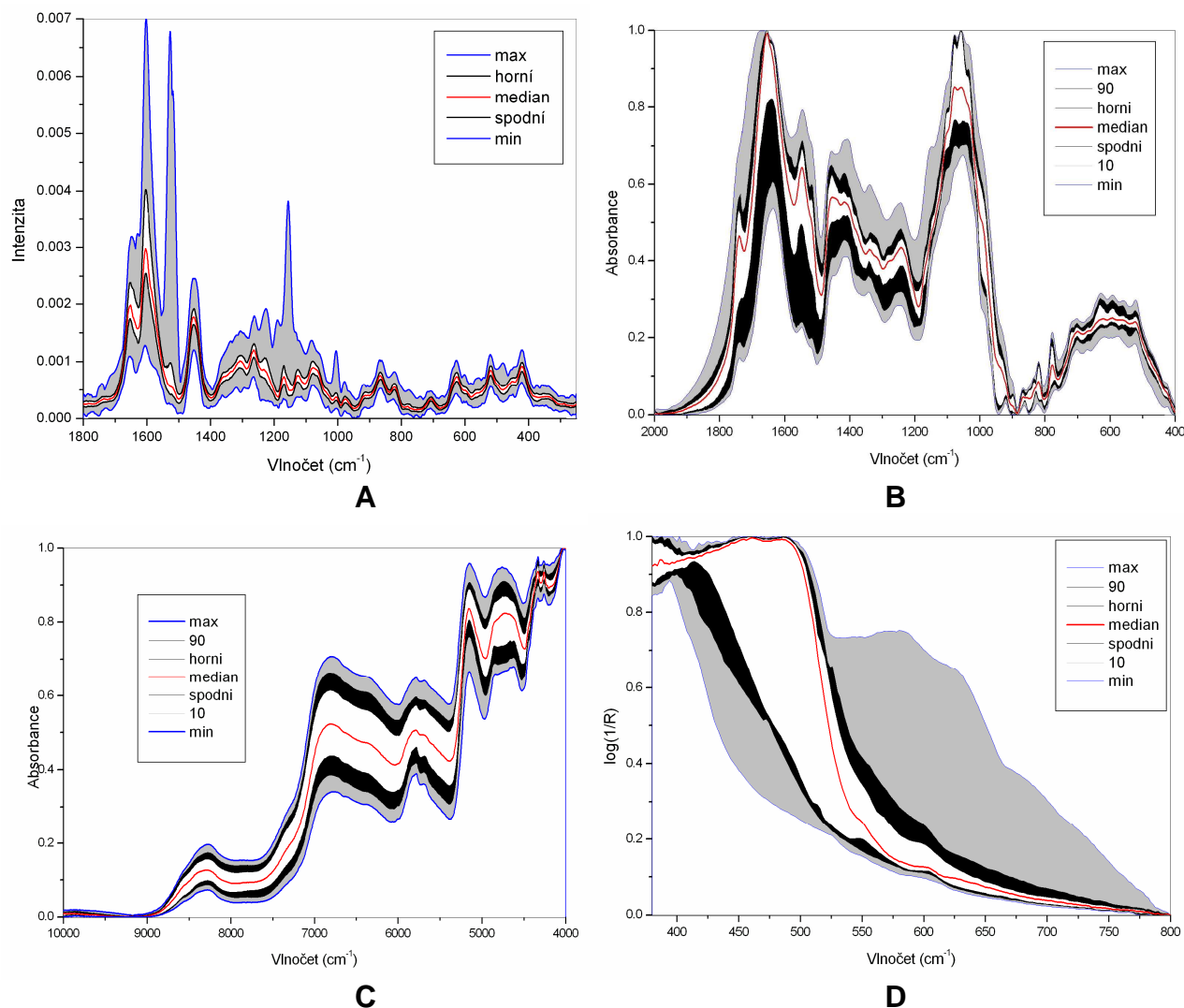
kde  $X_n$ ,  $Y_n$ ,  $Z_n$  jsou barevné souřadnice pro bílý standard a normované osvětlení D<sub>65</sub> a 10° normálního pozorovatele tj. D 65/10 ( $X_n = 94.811$ ,  $Y_n = 100$ ,  $Z_n = 107.304$ ).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

### Popisná statistická analýza spekter

Nákres popisné statistické analýzy Ramanových spekter 132 vzorků VP neznámého původu v rozsahu 250–1800  $\text{cm}^{-1}$  (obrázek č. 2a) odráží variabilitu jejich chemického složení. Největší variabilitu ukazují píky při 1526 a 1156  $\text{cm}^{-1}$ . Nejintenzivněji Ramanove pásy odpovídají skeletovým vibracím aromatických a alifatických složek pylů. Pásy kolem 1742 a 1649  $\text{cm}^{-1}$  byly přiřazené vibracím  $\nu(\text{C}=\text{O})$  lipidů a bílkovin. Pásy kolem 1630 a 1602  $\text{cm}^{-1}$  mohou být příspěvkem  $\nu(\text{C}=\text{C})$  polyfenolů. Píky při 1005, 1156 a 1526  $\text{cm}^{-1}$  odpovídají vibracím C-CH<sub>3</sub>, CC a C=C vazeb  $\beta$ -karotenů (Schulz et al., 2005). První pík má navíc výrazný příspěvek vibrace Phe kruhu bílkovin. Variabilitu poměru fenolových látek a karotenoidů v KP a VP vysvětluje výrazné změny intenzit v těchto oblastech spekter. Pás 1448  $\text{cm}^{-1}$  odpovídá vibracím CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> skupin různého původu. Porovnání FT Ramanových spekter KP a VP stejného botanického druhu (slunečnice) vedlo k závěru, že řada pásů VP jsou charakteristické pro amorfni fruktosu, hlavní cukernou složku nektaru (Soderholm et al., 1999).

Na obrázku č. 2b je výsledek popisné statistické analýzy FTIR spekter referenčních vzorků v oblasti 400–2000  $\text{cm}^{-1}$ . Je zřetelná výrazná variabilita spekter, což ukazuje na rozdíly v poměru chemických složek. Výrazné píky v oblasti 1500–1800  $\text{cm}^{-1}$  ukazují na přítomnost karbonylových (esterů, karboxylů, amidů) a nenasycených sloučenin. Dva intenzivní píky kolem 1510–1540  $\text{cm}^{-1}$  (amid II) a 1650–1660  $\text{cm}^{-1}$  (amid I) ukazují na přítomnost bílkovin. Méně výrazný pík kolem 1740  $\text{cm}^{-1}$  byl přiřazen  $\nu(\text{C}=\text{O})$  vibracím esterů, což ukazuje na přítomnost tuků. Řada vzorků má IČ pás  $\delta(\text{H}_2\text{O})$  kolem 1640  $\text{cm}^{-1}$ . Oblast 1200–1500  $\text{cm}^{-1}$  obsahuje řadu nevýrazných pásů obzvláště deformačních vibrací



**Obrázek 2** Popisná statistická analýza spekter referenčních vzorků KP a VP: FT Raman (A), FTIR (B), FT NIR (C) a Vis (D) (A – soubor 132 vzorků VP neznámého původů, B, C, D – referenční vzorky KP a VP)

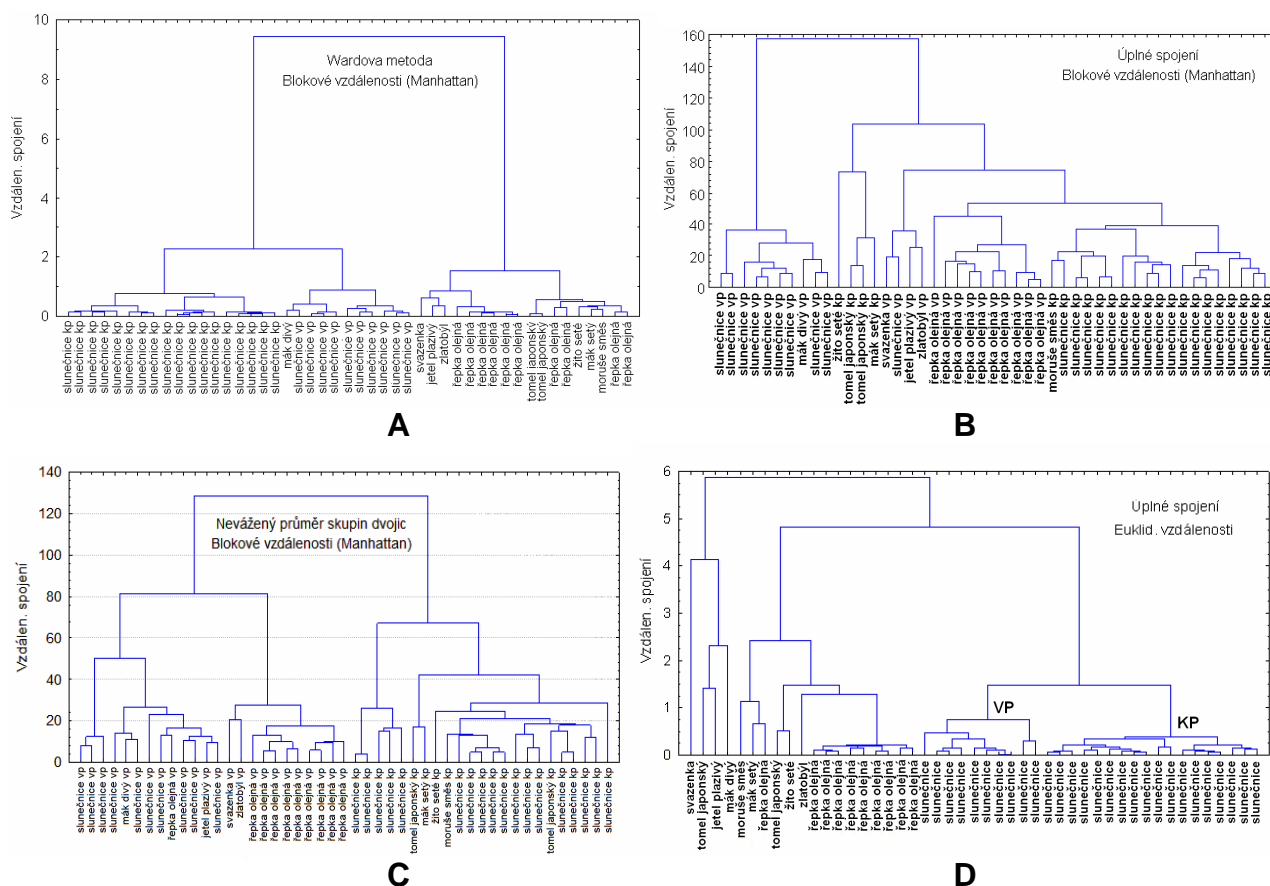
CH, NH, OH vazeb, vibrace amid III bílkovin, rovinné deformační vibrace sacharidů a  $\nu(\text{COC})$  esterů. Interpretace jednotlivých pásů je složitá vzhledem k jejich vzájemnému překrývání. Oblast  $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  obsahuje pásy valenčních vibrací CO, CN a CC sacharidů a bílkovin. Pás  $898\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na přítomnost celulosy a pásy  $777$ ,  $817$  a  $865\text{ cm}^{-1}$  jsou typické pro amorfni fruktosu.

Na obrázku č. 2c je znázorněn výsledek popisné statistické analýzy FT NIR spekter referenčních vzorků v oblasti  $4000\text{--}10000\text{ cm}^{-1}$ . Variabilita spekter KP a VP je výsledkem rozdílu ve složení organických látek. FT NIR spektra se skládají z velkého počtu se navzájem překrývajících pásů kombinačních vibrací a overtónů, jejichž přiřazení je mnohem obtížnější než základních vibrací ve střední IČ oblasti. Z tohoto důvodu interpretace NIR pásů zde není uvedena.

Na obrázku č. 2d je výsledek popisné statistické analýzy normalizovaných VIS spekter ( $380\text{--}800\text{ nm}$ ) referenčních vzorků v jednotkách  $\log(1/R)$ . Spektra se výrazně liší od mediánu, což je způsobeno odlišným složením chromoforů, mezi které patří hlavně karotenoidy a flavonoidy. Normalizace VIS spekter vedla k eliminaci šedé škály a ke zvýraznění jednotlivých odstínů.

#### HCA spekter

Výsledky HCA spekter referenčních vzorků KP a OP jsou znázorněny na obrázku č. 3. Dendrogram podobností Ramanových spekter (obrázek č. 3a) ukazuje na dva shluky: (a) slunečnice (KP a VP) a (b) řepky olejné (VP). Porovnání Ramanových spekter potvrdilo, že pyly s výrazným obsahem karotenoidů tvořili shluk a, přičemž pyly obsahující flavonoidy patřili shluku b. První shluk se navíc



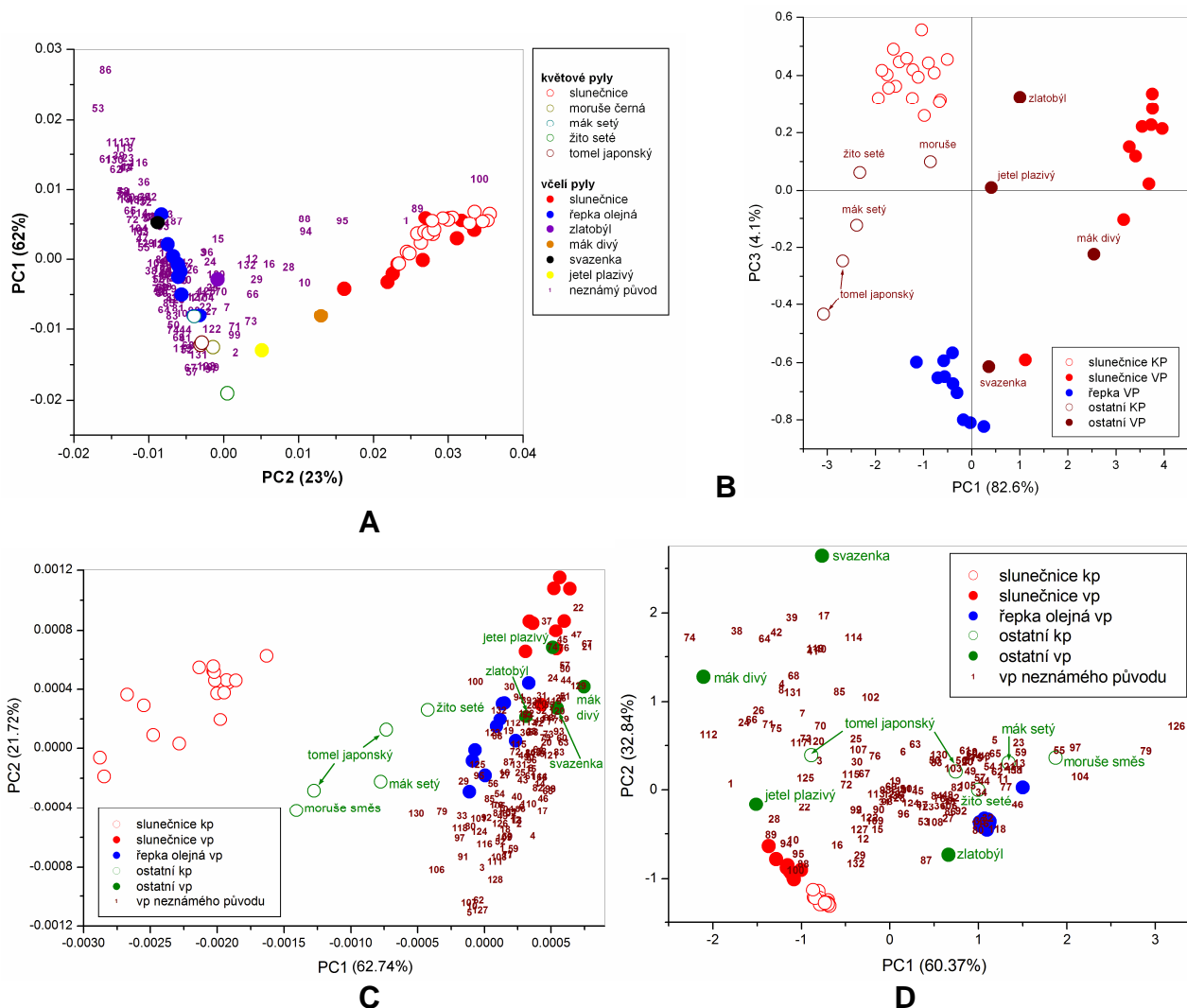
**Obrázek 3** Dendrogramy podobností referenčních vzorků KP a VP podle HCA spekter: FT Raman (A), FTIR (B), FT NIR (C) a Vis (D)

rozštěpil na menší shluky slunečnicových KP a VP. Vzorek VP máku divého zřejmě obsahoval karotenoidy a byl přiřazen shluku **a**; ostatní KP a VP patřili shluku **b**. HCA FTIR spekter vedla k rozlišení třech shluků slunečnicových KP, slunečnicových a řepkových VP (obrázek č. 3b). Podle patrných rozdílů FTIR spekter lze uvažovat, že shlukování je způsobeno rozdílem poměru sacharidy: bílkoviny. Většina vzorků s výjimkou máku divého (VP) a moruše smés (KP) nepatřila žádnému z těchto shluků a tím ukázala specifické složení. HCA FT NIR spekter vedla k rozdělení souboru na dva shluky KP a VP (obrázek č. 3c), což ukazuje na citlivost této spektroskopické metody na přídavek nektaru (voda, fruktosa). Na obrázku č. 3d je znázorněn dendrogram PCA normalizovaných VIS spekter. Došlo k rozlišení třech shluků KP a VP ze slunečnice a VP z řepky olejné, žádný z ostatních vzorků se nedostal do označených shluků v následku výrazné barevné odlišnosti.

### PCA spekter

Výsledky PCA Ramanových spekter celého souboru vzorků jsou znázorněny na rozptylovém diagramu komponentního skóre (obrázek č. 4a). Podle hodnot extrémů křivek komponentních zátěží PC1 a PC2 byl vysvětlen příspěvek jednotlivých složek. Oblast deformačních vibrací CH<sub>2</sub> a CH<sub>3</sub> kolem 1440 cm<sup>-1</sup> je nevýrazná, což znamená že příspěvek alifatických skupin je nepatrný. Naopak, charakteristické pásy fenolových látek a karotenoidů jsou velmi silné. Hodnoty extrémů komponentních zátěží kolem 1602, 1526, 1156 a 1006 cm<sup>-1</sup> posloužily jako hlavní vodítka pro třídění vzorků do shluků na základě obsahů karotenoidů a flavonoidů. Body s extrémními hodnotami PC1 a PC2 určují dva trendy variability vzorků: hlavní trend ukazuje na zvětšení obsahu flavonoidů – shluk řepky olejné (nárůst hodnoty PC1), vedlejší trend ukazuje na zvětšení obsahu karotenoidů – shluk slunečnice (nárůst hodnoty PC2). Oblasti záporných PC1 a PC2 obsahují body vzorků s nízkým obsahem jak karotenoidů tak i flavonoidů. Vzorky č. 10, 88, 89, 94, 95 a 100 se dostaly do blízkosti shluků slunečnicových pylů což může ukazovat na stejný botanický původ.

Kombinace PC1 a PC3 analýzy FTIR spekter referenčních vzorků (obrázek č. 4b) vedla k rozlišení třech shluků KP a VP ze slunečnice a VP z řepky olejná, přičemž větší shluky všech KP a OP byly také oddělené od sebe. Jeden vzorek OP slunečnice ukázal výraznou odchylku což by mohlo být



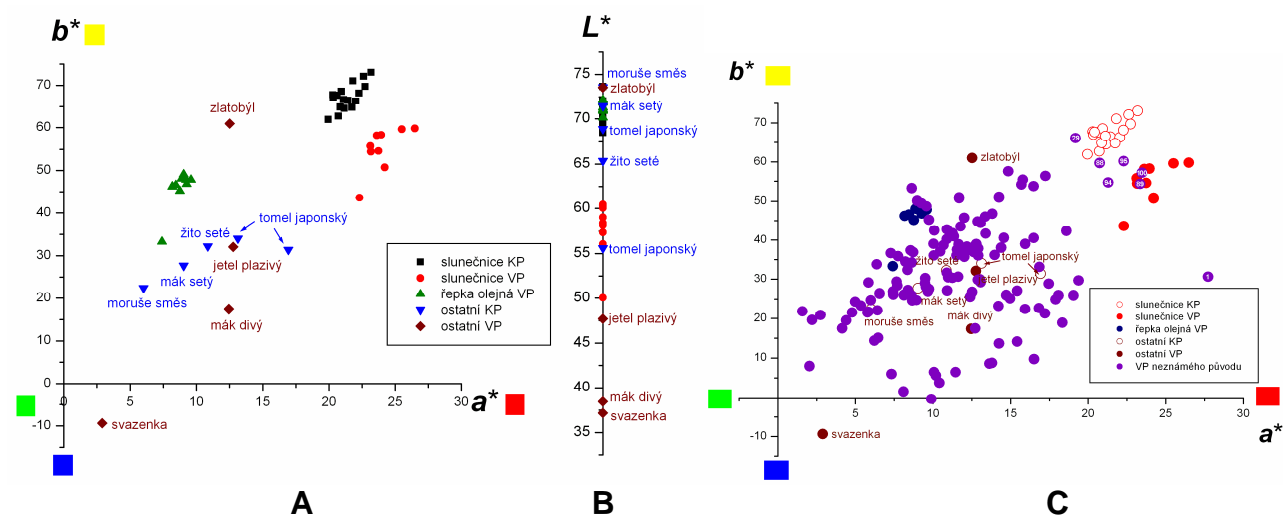
**Obrázek 4** Grafy komponentního skóre podle PCA spekter: FT Raman (A), FTIR (B), 2. derivace FT NIR (C) a Vis (D) (A, C, D – rozšířený soubor, B - referenční vzorky KP a VP)

způsobeno odlišným složením. Podobný výsledek měla kombinace PC1 a PC2 analýzy FT NIR spekter celého souboru vzorků (obrázek č. 4c).

Výsledek PCA Vis spekter rozšířeného souboru vzorků je znázorněn na grafu komponentního skóre PC2 versus PC1 (obrázek č. 4d). Je vidět umístění shluku a jednotlivých vzorků, které těmto shlukům nepatří. Jsou rozprostřeny po jednotlivých kvadrantech v závislosti na jejich zbarvení. Vzorky č. 10, 88, 89, 94, 95 a 100 se dostali do oblasti odstínu slunečnicových pylů což koreluje s výsledkem PCA FT Ramanových spekter.

#### Stanovení barvy

Na obrázku č. 5a,b je vidět barevné rozdělení referenčních vzorků KP a VP. Na grafu odstínů  $\{a^*, b^*\}$  (obrázek č. 5a) se od sebe výrazně oddělily shluky slunečnice (KP a VP) a řepky olejná (VP), ostatní vzorky se umístily dle jejich barevnosti. Většina pylů se nachází v červeno-žlutém kvadrantu, pouze VP ze svazenky v červeno-modrém kvadrantu. Osa  $L^*$  popisuje jas naměřených barev (obrázek č. 5b). Vzorky se rozdělily na světlé, střední a tmavé podél osy jasu. Barevné rozdělení rozšířeného souboru KP a VP je znázorněno na obrázku č. 5c. Vzorky č. 88, 89, 94, 95 a 100 se opět dostaly do blízkosti slunečnicových VP.



**Obrázek 5** Barevné diagramy vzorků KP a VP: grafy odstínů (A, C) a osa jasu (B) (A, B – referenční vzorky, C – rozšířený soubor)

## ZÁVĚR

Vibrační spektroskopické metody jsou citlivé na rozdíly v chemickém složení vzorků. S jejich pomocí byla prokázána přítomnost bílkovin, sacharidů, tuků a barviv ve vzorcích květových a obnožkových včelích pylů. Pomocí HCA a PCA vibračních spekter se podařilo rozdělit soubor vzorků do shluků dle rozdílu v jejich složení. Jednotlivé metody se výrazně lišili svou citlivostí na přítomnost a poměr složek pylů. Difúzně reflektanční VIS spektrometrie byla účinná při rozdělení vzorků pylů na základě jejich barvy. Na základě HCA/PCA Vis spekter a diagram barevnosti lze rozdělit vzorky pylů podle jejich botanického složení, protože pyly odlišného původu obsahují různý poměr barviv – karotenoidů a flavonoidů. Dále přítomnost nektaru a včelích výměšků ovlivňovala vjem barviv, což vedlo k rozdělení shluků KP a VP stejného druhu (slunečnice). Kombinace spektroskopických metod a multivariační analýzy je účinná pro třídění a hodnocení kvality obnožkových pylů, což má význam pro využití těchto produktů zemědělství a včelařství.

## LITERATURA

- ALMARAZ-ABARCA, N., CAMPOS, M. DA G., ÁVILA-REYES, J. A., NARANJO-JIMÉNEZ, N., CORRAL, J. H., GONZÁLEZ-VALDEZ, L. S., 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybeecollected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). In *Journal of Food Composition and Analysis*, roč. 20, 2007, s. 119–124.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B., PAMPLONA, L. C., COIMBRA, S, BARTH, O. M., 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. In *Journal of Food Composition and Analysis*, roč. 18, 2005, s. 105-111.
- CAMPOS, M, MARKHAM, K. R., MITCHELL, K. A., DA CUNHA, A. P., 1997. An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. In *Phytochemical Analysis*, roč. 8, 1997, s. 181–185.
- COIMBRA, M. A., BARROS, A., RUTLEDGE, D. N., DELGADILLO, I., 1999. FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts. In *Carbohydrate Research*, roč. 317 (1999), 145-154.



- ČERNÁ M., BARROS A. S., NUNES A., ROCHA S. M., DELGADILLO I., ČOPÍKOVÁ J., COIMBRA M. A., 2003. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. In *Carbohydrate Polymers*, roč. 51, 2003, č. 4, s. 383-389.
- ČOPÍKOVÁ, J., BARROS, A. S., ŠMÍDOVÁ, I., ČERNÁ, M., TEIXEIRA, D. H., DELGADILLO, I., SYNITSYA, A., COIMBRA, M. A., 2006. Influence of hydration of food additive polysaccharides on FT-IR spectra distinction. In *Carbohydrate Polymers*, roč. 63, 2006, s. 355-359.
- DI PAOLA-NARANJO, R. D., SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, J., GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M., RIVAS-GONZALO, J. C., 2004. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum*. In *Journal of Chromatography A*, roč. 1054, 2004, s. 205-210.
- GONZALEZ-MARTÍN, I., HERNANDEZ-HIERRO, J. M., BARROS-FERREIRO, N., NARCIS, S. C., GARCIA-VILLANOVA, R. J., 2007. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen. In *Talanta*, roč. 72, 2007, s. 998-1003.
- GONZALEZ-PARAMAS, A. M., BAREZ, J. A. G., MARCOS, C. C., GARCIA-VILLANOVA, R. J., SANCHEZ, J. S., 2006. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). In *Food Chemistry*, roč. 95, 2006, p. 148-156.
- GOTTARDINI, E., ROSSI, S., CRISTOFOLINI, F., BENEDETTI, L., 2007. Use of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy as a tool for pollen identification *Aerobiology*, roč. 23, 2007, s. 211-219.
- HUMAN, H., NICOLSON, S. W., 2006. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). In *Phytochemistry*, č. 67, 2006, s. 1486-1492.
- IVLEVA, N. P., NIESSNER, R., PANNE, U., 2005. Characterization and discrimination of pollen by Raman microscopy. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, roč. 381, 2005, s. 261-267.
- LEJA, M., MARECZEK, A., WYŻGOLIK, G., KLEPACZ-BANIAK, J., CZEKOŃSKA, K., 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. In *Food Chemistry*, roč. 100, 2007, s. 237-240.
- OHTA, S., FUJIMAKI, T., UY, M. M., YANAI, M., YUKIYOSHI, A., HIRATA, T., 2007. Antioxidant hydroxycinnamic acid derivatives isolated from Brazilian bee pollen. In *Natural Product Research*, roč. 21, 2007, s. 726-732.
- PAPPAS, C., TARANTILIS, P. A., HARIZANIS, P. C., POLISSIOU, M., 2003. New method for pollen identification by FT-IR Spectroscopy. In *Applied Spectroscopy*, roč. 57, 2003, s. 23-27.
- QIAN, W. L., KHAN, Z., WATSON, D. G., FEARNLEY, J., 2008. Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry In *Journal of Food Composition and Analysis*, roč. 21, 2008, s. 78-83.
- SCHULZ, H., BARANSKA, M., BARANSKI, R., 2005. Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. In *Biopolymers*, roč. 77, s. 212-221.
- SERRA BONVEHÍ, J., SOLIVA TORRENTÓ, M., CENTELLES LORENTE, E., 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, roč. 49, s. 1848-1853.
- SILVA, T. M. S., CAMARA, C. A., LINS, A. C. S., BARBOSA-FILHO, J. M., DA SILVA M. S., FREITAS, B. M., DOS SANTOS, F. A. R., 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. In *Journal of Food Composition and Analysis*, roč. 19, 2006, s. 507-511.
- SODERHOLM, S., ROOS, Y. H., MEINANDER, N., HOTOKKA, M., 1999. Raman spectra of fructose and glucose in the amorphous and crystalline states. In *Journal of Raman Spectroscopy*, roč. 30, 1999, s. 1009-1018.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A., TOMÁS-LORENTE, F., FERRERES, F., GARCIA-VIGUERA, C., 1989. Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee pollen. In *Journal of Science of Food and Agriculture*, roč. 47, 1989, s. 337.
- TOMAS-LORENTE, F., GARCIA-GRAU, M. M., NIETO, J. L., TOMAS-BARBEAN, F. A., 1992. Flavonoids from *Cistus ladanifer* bee pollen. In *Phytochemistry*, roč. 31, 1992, s. 2027-2029.

VESELÁ, A., BARROS, A. S., SYNYTSYA, A., DELGADILLO, I., ČOPÍKOVÁ, J., COIMBRA, M. A., 2007. Infrared spectroscopy and outer product analysis for quantification of fat, nitrogen, and moisture of cocoa powder. In *Analytica Chimica Acta*, roč. 601, 2007, s. 77-86.

### Poděkování

Práce vznikla za podpory MSMT ČR (projekt č. CEZ: MSM6046137305 ) a MŠ SR projektů ECOVA 26020120015 a KEGA3/7448/09.

### Kontaktní adresa:

Mgr. Andriy Synytsya, Ph.D. Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika. Tel.: +420 220 443 116, E-mail: [sinicaa@vscht.cz](mailto:sinicaa@vscht.cz)

Mgr. Alla Synytsya, Ph.D. Ústav analytické chemie, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika. Tel.: +420 220 444 106, E-mail: [sinical@vscht.cz](mailto:sinical@vscht.cz)

Roman Bleha. Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika. Tel.: +420 220 443 116, E-mail: [Roman.Bleha@vscht.cz](mailto:Roman.Bleha@vscht.cz)

Ing. Ján Gróf, CSc. VEGA konti s.r.o., Hlohovecká 850, 925 53 Pata, Slovenská republika. Tel.: +421 905 479 558, E-mail: [jgrof@vegakonti.sk](mailto:jgrof@vegakonti.sk)

Ing. Janka Nůžková PhD., Katedra genetiky a šľachtenia rastlín. Fakulta agrobiologie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Tel.: +421 376 414 787, E-mail: [Janka.Nozkova@uniag.sk](mailto:Janka.Nozkova@uniag.sk)

Ing. Radovan Ostrovský, Inštitút ochrany biodiverzity a biologickej bezpečnosti, Fakulta agrobiologie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Tel.: +421 376 414 787, E-mail: [Radovan.Ostrovsky@uniag.sk](mailto:Radovan.Ostrovsky@uniag.sk)

Prof. Ing. Jana Čopíková, CSc. Ústav chemie a technologie sacharidů, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika. Tel.: +420 220 443 114, E-mail: [copikovj@vscht.cz](mailto:copikovj@vscht.cz)

Doc. Ing. Ján Brindza, CSc. Katedra genetiky a šľachtenia rastlín. Inštitút ochrany biodiverzity a biologickej bezpečnosti, Fakulta agrobiologie a potravinových zdrojů, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Trieda Andreja Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika. Tel.: +421 376 414 787, E-mail: [Jan.Brindza@uniag.sk](mailto:Jan.Brindza@uniag.sk)