

MORPHOLOGIC AND SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) BEE POLLEN

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

ABSTRACT

The aim of this work was morphologic and spectroscopic analysis of bee pollen samples originated from sunflower (*Helianthus annuus* L.). Difference in composition of monofloral sunflower bee pollen in comparison with original flower pollen was detected by FTIR, FT NIR and Raman spectra. Difference in colour was determined by diffuse reflectance VIS spectroscopy and by calculation of colour parameters. Obtained results confirmed that vibration spectroscopic methods are sensitive to sample composition. Fructose detected by FTIR and Raman in bee pollen samples is originated from sunflower nectar. Raman and Vis spectra confirmed the presence of specific carotenoids reflecting botanical origin of the raw flower pollen. Well resolved clusters of flower pollen and bee pollen samples were evident from the CIE $L^*a^*b^*$ colour diagram.

Keywords: sunflower (*Helianthus annuus* L.), flower and bee pollen, vibration spectroscopy, diffuse reflectance VIS spectroscopy, colour estimation

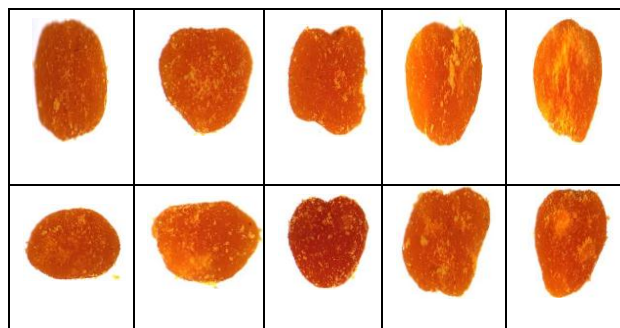
ÚVOD

Slunečnice roční (*Helianthus annuus* L. – rod *Helianthus*, čeleď *Asteraceae*) patří mezi nejvýznamnější olejninu. V současnosti se pěstuje po celém světě. Největší světové pěstovatele jsou Ruská federace, Ukrajina, Argentina a Francie. Slunečnicové soukvětí poskytuje nejen nektar ale rovněž dostatečné množství květového pylu. **Vear et al. (1990)** při studiu hybridů určili průměrný počet pylových zrn z jednoho soukvětí v rozsahu 26 387 – 42 087 pylových zrn. Vzhledem k tomu že opylování květů zabezpečují včely, je i vhodným zdrojem včelího obnožkového pylu (**Seiler, 1997**). Obnožkový (včelí) pyl se skládá ze směsi květového pylu s nektarem a včelími výměšky (**Qian et al., 2008; Almeida-Muradian et al., 2005; Silva et al., 2006**). Tento včelařský produkt je zdrojem volných aminokyselin a bílkovin, tuků a mastných kyselin, jednoduchých cukrů a polysacharidů, řady antioxidantních 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**).

Vibrační spektroskopické metody jsou běžně používané ke strukturní analýze 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.). FTIR a Ramanova spektroskopie poskytují informace o chemickém složení květových pylů a je užitečná při jejich strukturní analýze a identifikaci (**Ivleva et al., 2005; Gottardini et al., 2007; Pappas et al., 2003**). Slunečnicový květový pyl má výrazné žluto-oranžové zbarvení díky přítomnosti karotenoidů. Tyto látky mají biologický význam, zejména antioxidantní aktivitu. Karotenoidy z různých zdrojů mají červeno-žluté, oranžové až červené zbarvení. Barvu pylové hmoty lze stanovit na základě reflektančních spekter ve viditelné oblasti (obvykle 380 – 770 nm). 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 $L^*a^*b^*$.

Tato práce je věnovaná analýze souborů květových a obnožkových včelích pylů ze slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) pomocí vibračních spektroskopických metod a spektroskopického stanovení barvy.

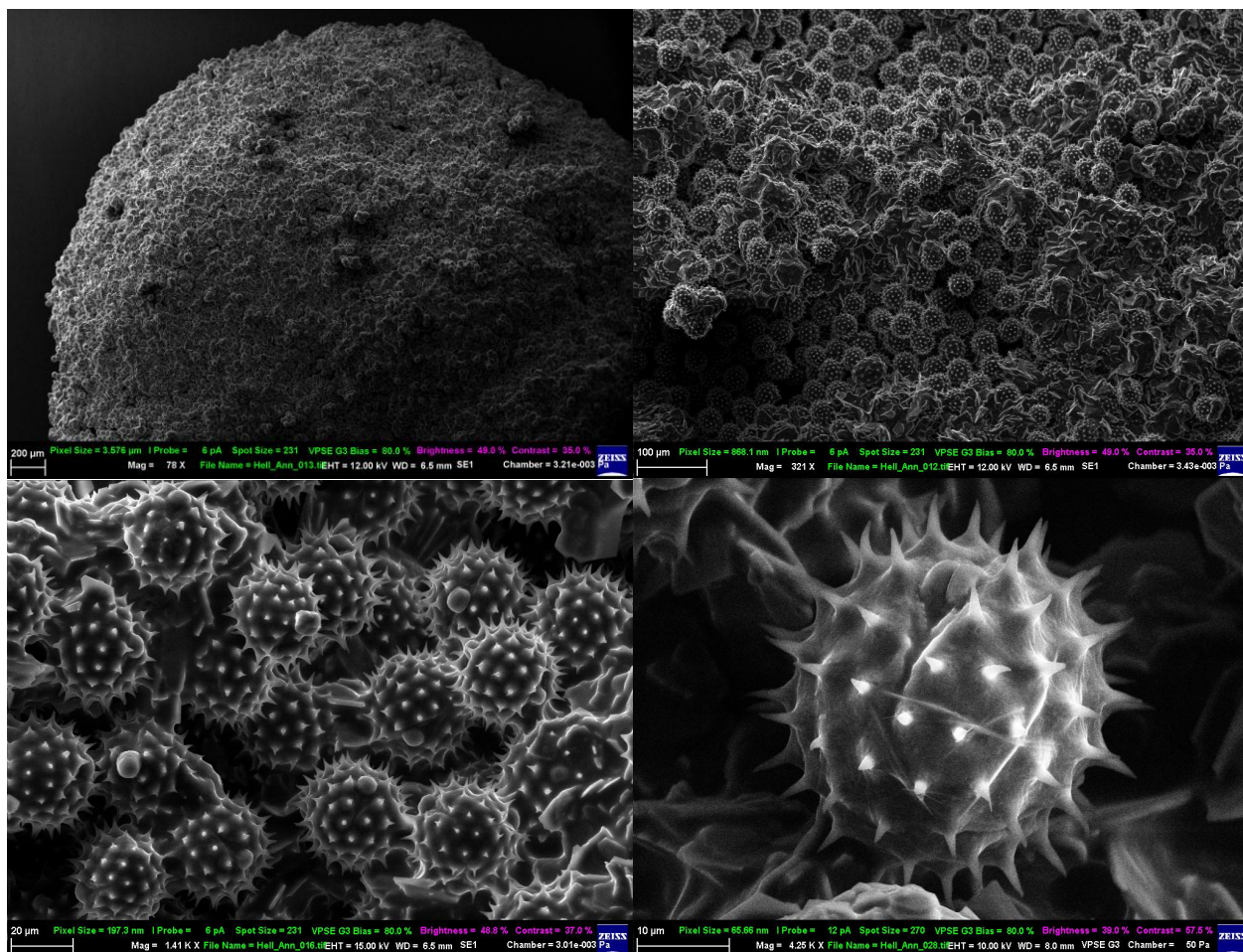


Obrázek 1 Variabilita tvaru a zbarvení vybraných včelích pylových obnožek slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) znázorněna pomocí plnoautomatické makrolupy Zeiss Discovery V12. Foto: Alexej Oravec © 2009

MATERIÁL A METODY

Vzorky květového (KP) a obnožkového včelího (VP) pylu ze slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) byly získané z různých lokalit Slovenské republiky.

Morfometrická analýza včelích pylových obnožek byla provedena na 6 vybraných hybridech. V pokusech byly použity 94 – 100 náhodně vybraných obnožek z každého hybrida. Hmotnost obnožek (mg) byla určena pomocí analytických vah. Výška (mm), šířka (mm) a plocha obnožek (mm^2) byly naměřeny pomocí automatické makrolupy Zeiss Discovery V12 s digitálních obrazových



Obrázek 2 SEM obrazy (zvětšení 78×, 321×, 1410× a 4250×) včelí pylové obnožky a jednotlivých pylových zrn slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.)

záznamů obnožek a použitím softwaru pro obrazovou analýzu – Zeiss AxioVision 4.7.1 (modul Automatic Measurement). Pravost pylových zrn na obnožkách byla určena pomocí elektronového mikroskopu ZEISS EVO LS 15.

FTIR spektra vzorků pylů byla změřena na FT-IR spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) v KBr tabletě v rozsahu vlnočtů $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ (střední IČ oblast – MIR) a $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ (blízká IČ oblast – NIR) s rozlišením 2 cm^{-1} ; počet skenů byl 64 (MIR) a 100 (NIR).

Měření FT Ramanových spekter v rozsahu $150 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ bylo provedeno pomocí FT Raman spektrometru Equinox 55/S (Bruker, USA) vybaveným křemenným děličem světla a Ge detektorem chlazeným tekutým 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°C s rozlišením 4.0 cm^{-1} .

Difúzně reflektanční Vis spektra (% R) byla naměřena na UV-Vis spektrofotometru UV4 (UNICAM, Velká Británie), nástavec Labsphere pro měření reflexních spekter. Rozsah měření $380 - 800 \text{ nm}$, šířka štěrbin 4

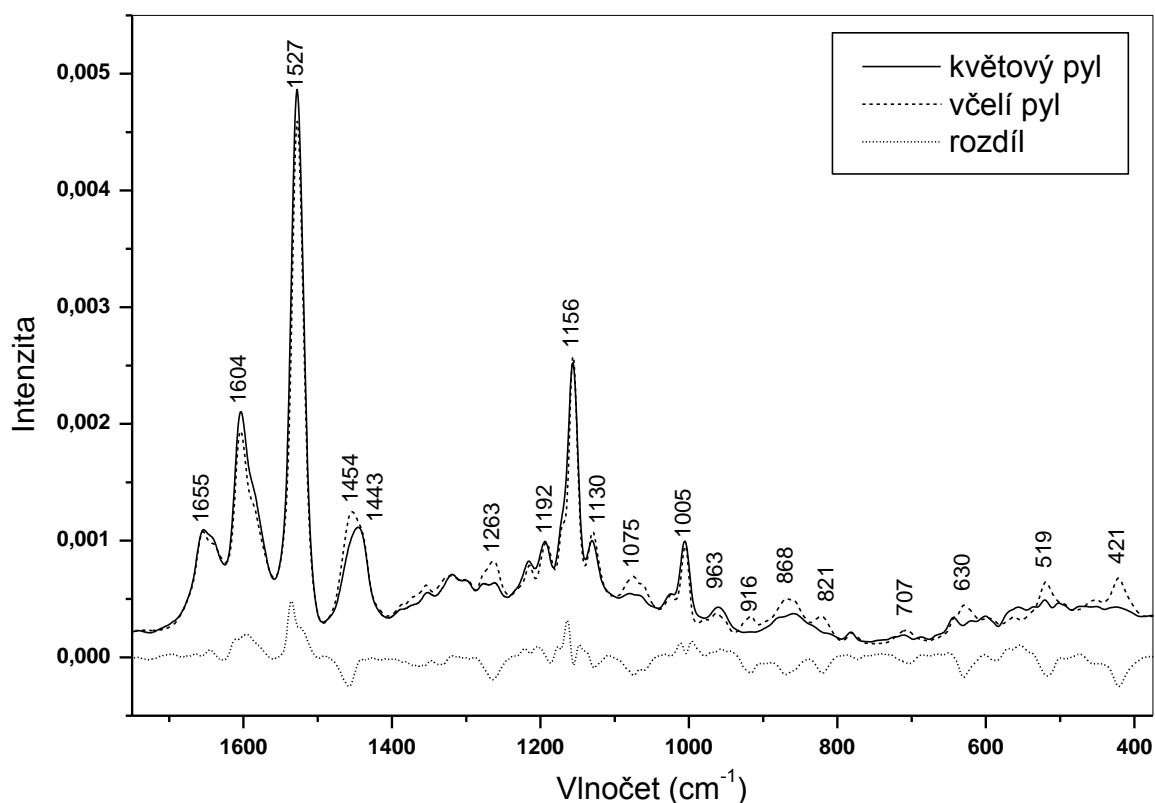
nm, rychlost skenování $240 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, datový interval 2 nm , počet skenů 10.

Všechna spektra 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 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 byla exportována do softwaru Statistica 9.0 (Statsoft, USA), kde byly vypočteny hodnoty popisné statistiky a provedena vícerozměrová statistická analýza.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Na obrázku č. 1 jsou zřejmé rozdíly ve tvaru a zbarvení jednotlivých včelích pylových obnožek. V tabulce č. 1 jsou uvedeny výsledky statistické analýzy jejich plochy, šířky a výšky. Koeficient variability v (%) se určil střední stupeň variability znaku pro plochu a střední až vysoký stupeň variability znaku pro šířku a výšku. Výsledky potvrzují významnou variabilitu těchto parametrů nejen mezi druhy, ale rovněž v rámci druhů. Na obrázku č. 2 je vidět jak jsou pylová zrna uspořádána v obnožce a znázorněna jejich



Obrázek 3 Ramanova spektra vzorků květového a včelího pylu ze slunečnice roční (*Helianthus annuus L.*)

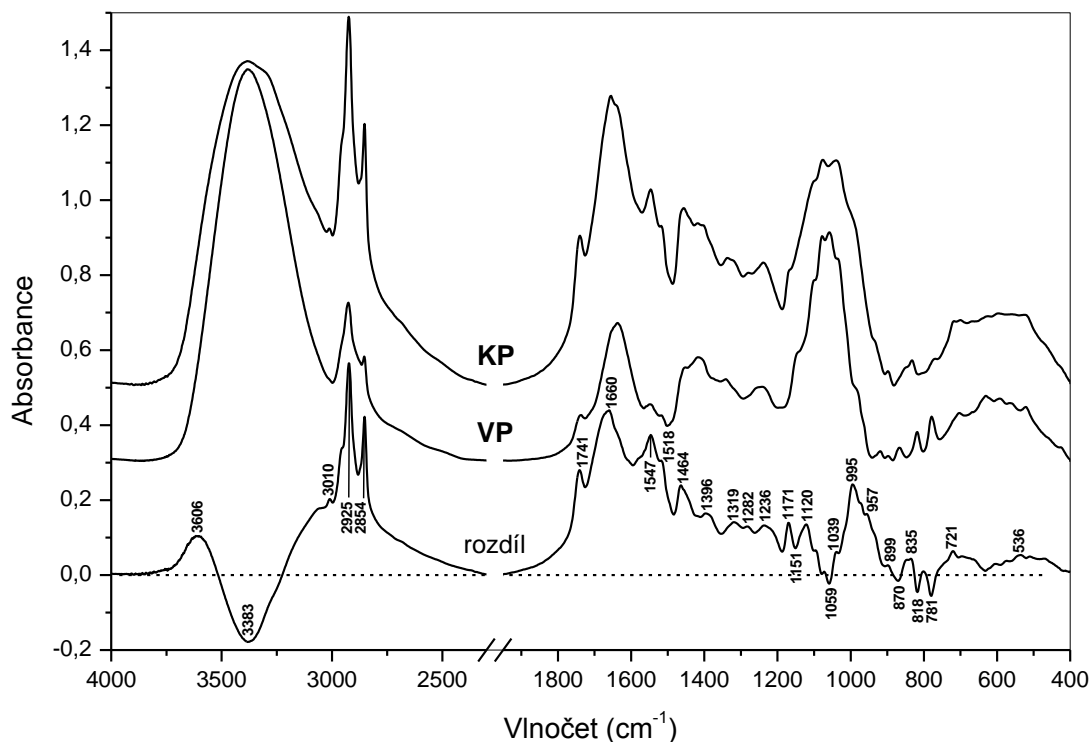
morfologie. Je zřetelná směs pylových zrn slunečnice roční stmelena nektarem a včelími výměšky. Na obrázku jsou zobrazené shluky pylových zrn a detail jednoho pylového zrna. Na základě morfologických znaků slunečnicového pylu lze určovat stupeň homogenity včelích pylových obnožek.

FT Ramanova spektra slunečnicového KP a VP v rozsahu 250 – 1800 cm⁻¹ jsou uvedena na obrázku č. 3. Nejintenzivnější Ramanovy pásy odpovídají skeletovým vibracím aromatických a alifatických složek pylů. Pásky kolem 1655 a 1602 cm⁻¹ mohou být příspěvkem $\nu(\text{C}=\text{O})$ bílkovin a $\nu(\text{C}=\text{C})$ polyfenolů. Píky při 1005, 1156 a 1526 cm⁻¹ odpovídají vibracím C-CH₃, CC a C=C vazeb β -karotenů (Schulz et al., 2005). První pík má navíc výrazný příspěvek vibrace Phe kruhu bílkovin (Ancenbacher a Strauch, 1979). Pás 1443 cm⁻¹ odpovídá vibracím CH₂, CH₃ skupin různého původu. Porovnání Ramanových spekter KP a VP ze slunečnice vedlo k závěru, že řada pásů VP kolem 1454, 1263, 1075, 916, 868, 821, 707, 630, 519 a 421 cm⁻¹ jsou charakteristické pro amorfní fruktosu, hlavní cukernou složku nektaru (Soderholm et al., 1999).

Na obrázku č. 4 jsou zobrazena FTIR spektra slunečnicového KP a VP v rozsahu 400–4000 cm⁻¹. Řada

pásů při 2925, 2854, 1464 a 721 cm⁻¹ (vibrace CH₂ skupin) a další pás kolem 1741 cm⁻¹ (valenční vibrace C=O esterů) potvrzují přítomnost tuků (Guillén a Cabo, 1997). Dva intenzivní pásy kolem 1547 cm⁻¹ (amid II) a 1660 cm⁻¹ (amid I) jsou důkazem bílkovin (Barth, 2007). Oblast 1200–1500 cm⁻¹ obsahuje řadu pásů, obzvláště deformačních vibrací 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 900–1200 cm⁻¹ obsahuje pásy valenčních vibrací CO, CN a CC sacharidů, bílkovin a tuků. Pásky KP kolem 899 a 835 cm⁻¹ ukazují na přítomnost celulosy a pektinu, složek buněčných stěn pylového zrna. Pásky VP při 781, 818, 870, 1059 a 1151 cm⁻¹ jsou typické pro amorfní fruktosu, která pochází z květového nektaru (Ibrahim et al., 2006).

Na obrázku č. 5 jsou znázorněny FT NIR spektra KP a VP slunečnice roční (*Helianthus annuus L.*) v oblasti 4000–10000 cm⁻¹. Přiřazení NIR pásů je uvedeno na tomto obrázku. Je zřejmé, že pásy tuků a bílkovin jsou výraznější v případě KP a pásy vody a cukrů v případě VP (Robert a Cadet, 1998; Workman a Jerome, 1996; Weyer, 1985; Šašić a Ozaki, 2000), což koreluje s výsledkem FTIR a Ramanových spekter.



Obrázek 4 FTIR spektra vzorků květového (KP) a včelího (VP) pylu ze slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.)

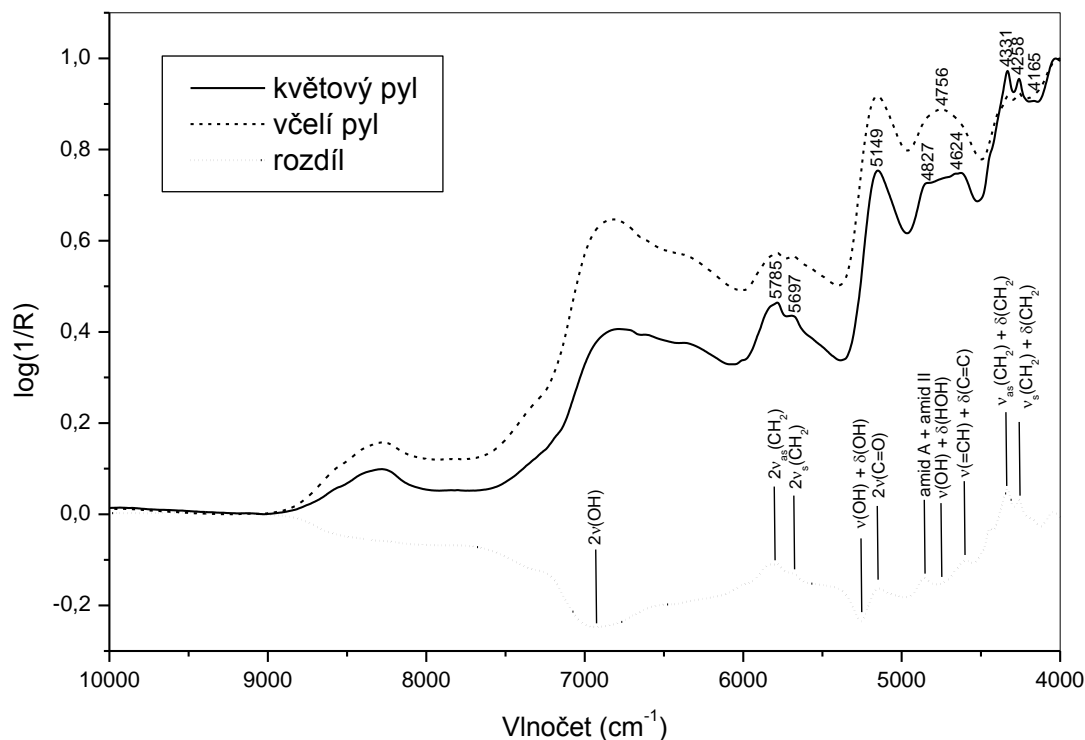
Na obrázku č. 6 je výsledek měření Vis spekter (380–800 nm) KP a VP slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.) v jednotkách $\log(1/R)$ po normalizaci. Spektra se výrazně liší v oblasti 525 – 650 nm, což je způsobeno vlivem vody a cukrů. Normalizace Vis spekter vedla k eliminaci šedé škály a ke zvýraznění jednotlivých odstínů. Na obrázku č. 7 je vidět barevné rozdělení vzorků slunečnicových KP a VP. Na grafu odstínů $\{a^*, b^*\}$ (obrázek č. 7 vlevo) se od sebe výrazně oddělily dva shluky (KP a VP) podle jejich barevnosti. Slunečnicové pylů se nachází v červeno-žlutém kvadrantu, oblast žluto-oranžových odstínů. Osa L^* popisuje jas naměřených barev (obrázek č. 7 vpravo). Vzorky se rozdělily podél osy jasu na 2 shluky světlejších KP a tmavších VP.

ZÁVĚR

Vibrační spektroskopické metody (FT-IR, FT Raman a FT-NIR) 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 ze slunečnice. Difúzně reflektanční VIS spektrometrie byla účinná při rozdělení vzorků na základě jejich zbarvení. Dále vliv nektaru a včelích výměšků na vjem barviv (karotenoidů) vedl k rozdělení shluků slunečnicových KP a VP na základě analýzy Ramanových a Vis spekter a při porovnání parametrů CIE $L^* a^* b^*$.

LITERATURA

- 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.
- ANZENBACHER, P., STRAUCH, B., 1979. Use of Raman spectroscopy for studying biological macromolecules. In *Chemické listy*, roč. 73, 1979, s. 496–516.
- BARTH, A., 2007. Infrared spectroscopy of proteins. In *Biochimica et Biophysica Acta*, roč. 1767, 2007, s. 1073–1101.
- DI PAOLA-NARANJO, R. D., SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, J., GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M., RIVAS-GONZALO, J. C., 2004. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of anthokyanin 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-



Obrázek 5 FT NIR spektra vzorků květového a včelího pylu ze slunečnici roční (*Helianthus annuus L.*)

IR) spectroscopy as a tool for pollen identification *Aerobiology*, roč. 23, 2007, s. 211–219.

GUILLÉN, M. D., CABO, N., 1997. Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. In *Journal of the Science of Food and Agriculture*, roč. 75, 1997, s. 1–11.

IBRAHIM, M., ALAAM, M., EL-HAES, H., JALBOUT, A. F., DE LEON, A., 2006. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. In *Eclético Química*, São Paulo, roč. 31, 2006, s. 15–21.

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.

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.

ROBERT, C., CADET, F., 1998. Analysis of near-infrared spectra of some carbohydrates. In *Applied Spectroscopy Reviews*, roč. 33, 1998, č. 253–266.

SCHULZ, H., BARANSKA, M., BARANSKI, R., 2005. Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. In *Biopolymers*, roč. 77, s. 212–221.

SEILER, G. J., 1997. Anatomy and morphology of sunflower. In: *Sunflower Technology and Production*. Agron. 35. s. 67–111. Ed. Schneiter, A.A.

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.

ŠAŠIĆ, S., OZAKI, Y., 2000. Band assignment of near-infrared spectra of milk by use of partial least-squares regression. In *Applied Spectroscopy*, roč. 54, s. 1327–1338.

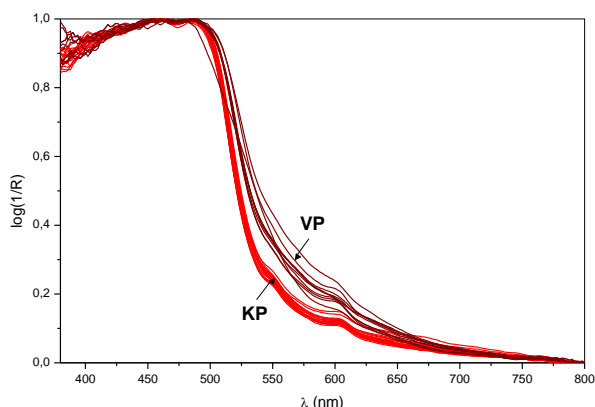
TOMAS-LORENTE, F., GARCIA-GRAU, M. M., NIETO, J. L., TOMAS-BARBEAN, F. A., 1992. Flavonoids from *Cistus ladanifer* bee pollen. In *Phytochemistry*, roč. 31, 1992, s. 2027–2029.

VEAR, F., PHAM-DELEGUE, M., TOURVIEILLE DE LABROUHE, D., MARILLEAU, R., LOUBLIER, Y., LE MÉTAYER, M., DOUAULT, P., PHILIPPON, J. P., 1990.

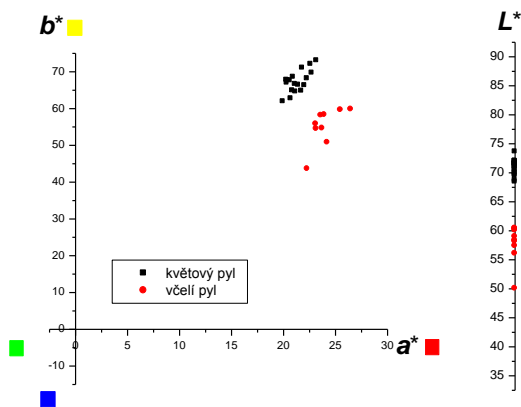
Genetical studies of nectar and pollen production in sunflower. In *Agronomie*, roč. 10, 1990, s. 219–231.

WEYER, L. G., 1985. Near-infrared spectroscopy of organic substances. In *Applied Spectroscopy Reviews*, roč. 21, 1985, s. 1–43.

WORKMAN, J. R., JEROME, J., 1996. Interpretive spectroscopy for near infrared. In *Applied Spectroscopy Reviews*, roč. 31, 1996, s. 251–320.



Obrázek 6 Difúzně reflektanční Vis spektra vzorků květového pylu (KP) a včelího pylu (VP) slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.)



Obrázek 7 Barevný diagram vzorků květového a včelího pylu slunečnice roční (*Helianthus annuus* L.)

Poděkování:

Práce vznikla za podpory MSMT ČR (projekt č. CEZ: MSM6046137305 a MSM6046137307) a MŠ SR projektu „Excelentní centrum ochrany a využití agrobiodiverzity – ECOVA, ITMS 26220120015“, na základe podpory operačního programu Výzkum a vývoj financovaného z Evropského fondu regionálního rozvoje.

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

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

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

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 76 Nitra Slovakia, Email: name@domainname.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

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

Ing. Janka Nôžková 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