

Dipl.-Chem. Franziska Schulte

**Raman-Spektroskopie als Werkzeug
für die Charakterisierung und
Klassifizierung von Pollen**

Die vorliegende Arbeit entstand an der BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.

Impressum

**Raman-Spektroskopie als Werkzeug für die
Charakterisierung und Klassifizierung von Pollen**

2010

Herausgeber:

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
Unter den Eichen 87

12205 Berlin

Telefon: +49 30 8104-0

Telefax: +49 30 8112029

E-Mail: info@bam.de

Internet: www.bam.de

Copyright © 2010 by

BAM Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung

Layout: BAM-Arbeitsgruppe Z.64

ISSN 1613-4249

ISBN 978-3-9813346-8-5

Raman-Spektroskopie als Werkzeug für die Charakterisierung und Klassifizierung von Pollen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von
Frau Dipl.-Chem. Franziska Schulte
geboren am 11.08.1980 in Wiesbaden

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Dr. h.c. C. Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät I:

Prof. Dr. L.-H. Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ulrich Panne
2. Prof. Dr. Janina Kneipp

eingereicht am: 28.11.2009
Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2009

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Abteilung I der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) in Kooperation mit der Humboldt Universität zu Berlin unter der Anleitung von Prof. Ulrich Panne und Prof. Janina Kneipp durchgeführt. Zu besonderem Dank bin ich meiner Betreuerin Janina Kneipp verpflichtet, die mir den nötigen Freiraum bei der Bearbeitung ließ und bei Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Bei Ulrich Panne bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten Themas.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei dem NMR-Arbeitskreis der BAM besonders bei Alf Pawlik und Prof. Christian Jäger für die Untersuchung zahlreicher Proben und sich anschließende lehrreiche Diskussionen.

Dr. Jens Mäder danke ich für die Analyse der Carotinoide mittels HPTLC und Prof. Kroh für die Benutzung seiner Laborräume in der TU Berlin.

Dr. Steffen Weidner danke ich für die Untersuchung von Pollenproben mit Hilfe von MALDI.

Für die Unterstützung bei der Aufnahme von IR-Spektren innerhalb der BAM und bei Bessy bedanke ich mich bei Anka Kohl beziehungsweise Dr. Ulrich Schade.

Des Weiteren bin ich Ires Feldmann dankbar für die ESEM-Aufnahmen der Pollenkörner.

Zu Dank verpflichtet bin ich Dr. Peter Lasch vom RKI für die Benutzung eines Kryostaten.

Eine Einführung in die Identifizierung von Pollenkörnern mit Hilfe der Lichtmikroskopie erhielt ich von Susanne Kannabei und bin ihr hierfür zu großem Dank verpflichtet.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeits-

gruppe „Optische Spektroskopie und Prozessanalytik“ von Prof. Janina Kneipp, der Fachgruppe I.42 „Optische Spektroskopie“ an der BAM und der Arbeitsgruppe „Strukturanalytik und Umweltchemie“ von Prof. Michael Linscheid für Anregungen, Tipps und Unterstützung bedanken. Hervorheben möchte ich Marek Höhse, er hat durch das Erklimmen hoher Bäume, die Korrektur meines Manuskriptes und Erzeugen eines angenehmen Büroklimas durch zahlreiche Eispausen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank an die Forschungspraktikanten, die diese Arbeit durch zahlreiche Messungen bereichert haben.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken, die mich fortwährend unterstützt hat.

Abstract

The chemical composition of pollen, the physiological containers that produce the male gametophytes of seed plants, has been a subject of research of plant physiologists, biochemists, and lately even material scientists for various reasons. The aim of this work was the analysis of whole pollen grains and pollen components by Raman Spectroscopy. These experiments were complemented by other techniques such as Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM), High-Performance-Thin-Layer-Chromatography (HPTLC), Infrared Spectroscopy (IR) and Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy (NMR).

As reported here, individual fresh pollen grains and their morphological constituents can be characterized and also classified in situ without prior preparation. Classification of pollen is based on their biochemical fingerprint revealed in their Raman spectrum. Raman spectroscopy is nondestructive and can be carried out with single pollen grains or fragments. It could be shown that the biochemical makeup of the pollen (as a part of the recognition/mating system) is altered during formation of a new biological species and that the species-specific chemical similarities and dissimilarities indeed reflect in the Raman spectral fingerprint. On the basis of the chemical information, unsupervised multivariate analysis consisting of hierarchical clustering revealed in most cases chemical similarities between species that were indicative of both phylogenetic relationship and mating behavior.

Therefore experiments were conducted that gave the in situ Raman spectroscopic signatures of the carotenoid molecules. As the data indicates, the in situ Raman spectra of the carotenoid molecules measured in single intact pollen grains provide in situ evidence of interspecies variations in pollen carotenoid content, structure, and/or assembly without prior purification. Results from HPTLC confirmed that carotenoid

composition varied greatly between species and that the different in situ spectral signatures reflect indeed differences in carotenoid composition. Moreover, comparison of the HPTLC data with resonant Raman spectra measured in situ illustrated that resonant Raman spectroscopy is very sensitive compared to approaches that need to rely on extraction procedures. In addition, the in situ difference spectra already include spectral features that may arise due to association of the carotenoid molecules with the biological matrix. A database of the species-specific in situ carotenoid spectra could in the future be used for automated spectrum correction and identification. This would fulfill an important prerequisite for fast analysis of pollen, and also of other plant tissues, e.g., in quality control of produce.

To learn more about components present in pollen other than carotenoids Raman, IR and NMR spectra were collected from purified pollen compounds. Structural changes due to the applied isolation procedures could be detected. This fact has to be kept in mind for the structural elucidation of sporopollenin. This macromolecule is responsible for the longevity and stability of pollen, hence possible applications in materials science palynology and food technology arise. Based on the Raman spectra numerous compounds were detected within pollen such as amino acids, phospholipids, cellulose and coumaric acid. The distribution of these molecules within the pollen grains was illustrated by 2D Raman mapping experiments.

Apart from microspectroscopic studies of quiescent, inactive pollen grains, also the dynamic process of pollen germination was investigated by Raman spectroscopy. The result permits the conclusion that differences between the spectra of germinated and non germinated pollen are caused by metabolic changes. This shows that Raman spectroscopy is not only a tool for fingerprinting and structure analysis but could also be useful for other disciplines.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Pollen und ihre Bedeutung	5
1.2	Zielsetzungen	9
2	Theoretische Grundlagen	11
2.1	Schwingungs-Spektroskopie	11
2.2	Raman-Spektroskopie	14
2.2.1	Der Raman-Effekt	14
2.2.2	Raman-Spektroskopie in der Analytik	16
2.2.3	Verstärkung der Raman-Streuung	18
2.3	Infrarot-Spektroskopie	19
2.4	Kernspinresonanz-Spektroskopie	22
2.5	HPTLC	24
2.6	ESEM	25
2.7	Multivariate Auswertungen	26
2.7.1	Hauptkomponentenanalyse	26
2.7.2	Clusteranalyse	28
2.7.3	Künstliche neurale Netze	29
3	Materialien und Methoden	31
3.1	Chemikalien	31
3.2	Pollenproben	31
3.3	Raman-Messungen	32
3.3.1	Aufnahme der Pollenspektren für die Klassifizierung	32
3.3.2	Bildung der in-situ Differenzspektren der Carotinoide	32

3.3.3	Parameter der Carotinoidmessungen	33
3.3.4	Einstellungen der Mapping-Experimente	33
3.3.5	Akquisition der oberflächenverstärkten Raman-Spektren	34
3.3.6	Spektrenvorbehandlung	34
3.4	FTIR-Messungen	34
3.5	Multivariate Datenauswertung	35
3.5.1	Hauptkomponentenanalyse	35
3.5.2	Clusteranalyse	35
3.5.3	Künstliche neuronale Netze	36
3.6	HPTLC-Messungen	36
3.7	NMR-Messungen	37
3.8	ESEM	38
3.9	Pollenpräparationen	39
3.9.1	Exineaufreinigung mit Hydrogenfluorid [1]	39
3.9.2	Acetolyse nach Erdtman [1]	39
3.9.3	Enzymatische Exineaufreinigung [2]	39
3.9.4	Exinereinigung mit Kaliumhydroxid nach [3]	40
3.9.5	Freisetzen der Sporoplasten mit MMNO [4]	40
3.9.6	Wasserextraktion	40
3.9.7	Auflösen ganzer Pollenkörner	41
3.9.8	Kryodünnschnitte von Roggenpollenkörnern	41
3.10	Keimung von Pollen	41
4	Klassifizierung von Pollenspektren	43
4.1	Stand der Forschung	43
4.2	Potential der Schwingungs-Spektroskopie	45
4.3	Experimentelle Voraussetzungen	46
4.4	Hierarchische Clusteranalyse	52
4.4.1	Reproduzierbarkeit	57
4.5	Hauptkomponentenanalyse	62
4.6	Künstliche neuronale Netze	66
4.7	Auf dem Weg zur automatischen On-line-Detektion	70
5	Carotinoide in Pollen	71
5.1	Analyse von Carotinoiden	71
5.2	In-situ Caroteoidsignatur	74
5.3	Carotinoidanalyse mittels HPTLC	78
5.3.1	Quantitative Auswertung	84

5.4	RRS an Carotinoiden	87
5.5	HPTLC-RRS	88
5.6	Fazit	93
6	Molekulare Zusammensetzung der Pollen	97
6.1	Stand der Forschung	97
6.2	Chemische Kartierung in Dünnschnitten	99
6.3	Analyse der Pollenhülle	102
6.3.1	ESEM	102
6.3.2	Schwingungs-Spektroskopie	105
6.3.3	NMR-Spektroskopie	113
6.3.4	Ergebnisse der Untersuchungen der Pollenfraktionen	120
6.4	Bestandteile der Pollenhüllen	121
6.5	Analysen des Polleninneren	123
6.6	Löslichkeit der Exine	126
7	Pollenkeimung	131
7.1	Stand der Forschung	131
7.2	In-situ Raman-Messungen	133
8	Zusammenfassung und Ausblick	141
9	Anhang	145
9.1	Tabellen	145
9.2	Abkürzungen	149
9.3	Lebenslauf	151
9.4	Publikationsverzeichnis	152
	Literaturverzeichnis	155
	Abbildungsverzeichnis	173
	Tabellenverzeichnis	181

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Pollen und ihre Bedeutung

Pollen sind die männlichen Gametophyten der Samenpflanzen. Als Träger des männlichen genetischen Materials müssen sie in der Lage sein, weite Strecken und ungünstige klimatische Bedingungen zu überwinden. Aus diesem Grunde produzieren Pflanzen eine große Anzahl an Pollenkörnern, so kann eine einzelne Roggenähre bis zu vier Millionen Pollenkörner freisetzen. Pollenkörner können durch den Wind 100 km weit getragen werden und sind noch in Höhen von 4000 m nachweisbar.

In Abbildung 1.1 (links) ist die Struktur eines Pollenkorns dargestellt. Die Pollenhülle besteht aus zwei Lagen, die äußere Schicht ist die Exine, darauf folgt die Intine. Die Exine besteht aus dem Biomakromolekül Sporopollenin, dessen Struktur bis heute ungeklärt ist. Die Pollenhülle kann weiter untergliedert werden, dies ist in Abbildung 1.1 (rechts) zu sehen. Die Exine besteht aus mehreren Strukturelementen, dem Tektum, der Columella und der Fußschicht. Auf der Außenseite des Pollenkorns befinden sich die Strukturelemente, sie können stäbchen-, keulen-, kegel-, warzen- oder netzförmig sein und geben den Pollenkörnern einer Art eine charakteristische Textur [5]. Die Aufgabe der Columella besteht darin, ein Pollenkorn bei Wasserverlust zu stabilisieren. Der Zwischenraum der strukturierten Oberflächen ist mit dem sogenannten Pollenkitt aufgefüllt. Diesem werden zahlreiche Funktionen zugeschrieben wie der Schutz der Pollenkörner vor Austrocknung, ultravioletter Strahlung, Bakterien und Hydrolyse [6]. Außerdem ent-

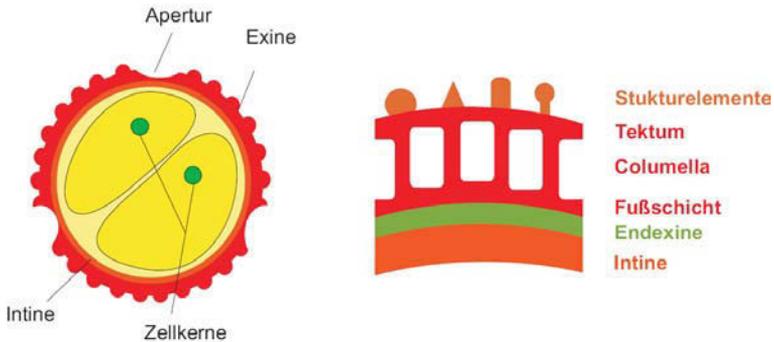


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines Pollenkorns (links), Aufbau der Pollenhülle nach [5]

hält diese lipidreiche Substanz Proteine, die verantwortlich für die Erkennung der Pollen auf dem Stigma ist [6]. Die Hauptbestandteile der Intine sind Cellulose und Pektin. Von dieser Membran umschlossen sind die vegetativen und generativen Zellen [7, 8, 5].

In Abbildung 1.2 ist eine Aufnahme von Roggenpollenkörnern unter 400-facher Vergrößerung gezeigt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie unter Umgebungsbedingungen (engl.: *environmental scanning electron microscopy*, ESEM) erstellt wurde. Hier ist die typische Form der Roggenpollenkörner gut zu erkennen. In der Aufnahme eines einzelnen Roggenpollenkorns in Abbildung 1.3 ist die Oberfläche, gut zu erkennen. Die runde Struktur auf der Oberfläche ist eine Apertur. Diese ist von Bedeutung für den Befruchtungsprozess: Hat ein Pollenkorn die Narbe erreicht, wird der Pollenschlauch erzeugt, durch den die Spermienzellen zum Fruchtknoten transportiert werden. Der Pollenschlauch durchbricht die Wand des Pollenkorns an den Aperturen. Morphologische Charakteristika der Pollenkörner wie die Anzahl der Aperturen und die Textur der Oberfläche können als Bestimmungsmerkmale herangezogen werden.

Die Fähigkeit von Pflanzen, Tausende von Pollenkörnern freizusetzen, kann für Allergiker zur Qual werden. So sind jedes Jahr im Frühling Millionen Menschen von allergischen Erkrankungen betroffen. Die Anzahl der Personen, die unter allergologischen Erkrankungen wie Heuschnupfen leiden, ist in den Industrienationen auf 10 % der Gesamt-

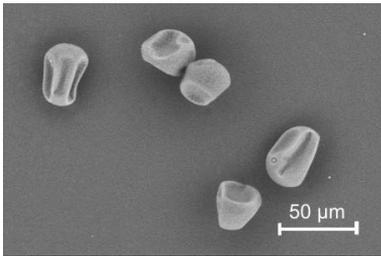


Abbildung 1.2: ESEM-Aufnahme (400× Vergrößerung) von Roggenpollenkörnern

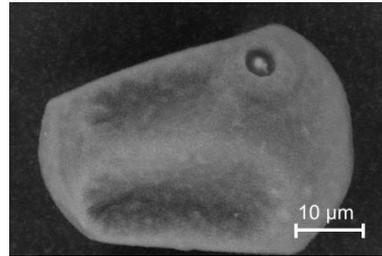


Abbildung 1.3: ESEM-Aufnahme (2000× Vergrößerung) eines Roggenpollenkorns

bevölkerung angestiegen, somit gehören Pollenallergien zu den größten gesundheitlichen Problemen in westlichen Gesellschaften [9]. Dies wird durch die fortschreitende Globalisierung noch verstärkt, da sich Pflanzen weit jenseits der Grenzen ihrer Herkunftsländer ausbreiten können [10]. In diesen Zusammenhang bekannt geworden ist das beifußblättrige Traubenkraut (*Ambrosia artemisiifolia*), welches unter Allergologen als besonders aggressiv gilt.

Damit betroffene Allergiker frühzeitig und umfassend gewarnt werden können, sind Pollenflugwarnungen wichtig. Diese Informationen werden seit den 1980er Jahren vom Deutschen Wetterdienst veröffentlicht [11]. Die Pollenflugvorhersagen basieren auf einer Auszählung der über einen Tag gesammelten Pollen. Die Pollenkörner werden durch einen speziell ausgebildeten Mitarbeiter mikroskopisch identifiziert. Diese Daten sind nur bedingt aktuell, da sie vom Vortag stammen. Eine automatisierbare On-line-Detektion böte die Möglichkeit einer schnellen, zeitnahen Pollenwarnung ohne den Einsatz eines Wissenschaftlers.

Pollenallergien treten besonders in westlichen Ländern auf, deswegen wird ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Allergie und bestimmter Umweltfaktoren beziehungsweise dem Lebensstil vermutet [12]. Forschungsergebnisse anderer Gruppen legen dar, dass Ruß und Stickoxide, die durch den Autoverkehr abgegeben werden, Auswirkungen auf die Stärke der Allergie haben [13, 14]. Es besteht die Hoffnung, dass sich neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Pollenkörner oder Wechselwirkungen zwischen Pollenkörnern und Partikeln für Verbesserungen der Allergitherapie nutzen lassen.

Neben der medizinischen Bedeutung von Pollen ist die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit Pollen für viele Fachrichtungen wichtig. Funde von Pollen an historischen Stätten erlauben beispielsweise Rückschlüsse auf die Besiedlungsgeschichte dieser Gebiete [15]. Dass Pollenkörner viele Jahrhunderte unversehrt überdauern können, verdanken sie ihrer stabilen Hülle: der Exine. Vor allem Palynologen beschäftigen sich seit über 100 Jahren mit der chemischen Zusammensetzung der Pollenkörner, besonders mit dem Biomakromolekül aus dem die Exine besteht: Sporopollenin. Um die chemische Struktur der Pollenhüllen zu untersuchen, müssen diese von den anderen Bestandteilen der Pollenkörner abgetrennt werden. Hierfür existieren etablierte Prozeduren, allerdings sind die Auswirkungen dieser Umsetzungen auf das Sporopollenin nicht untersucht.

Aufgrund der chemischen Inertheit gegenüber gebräuchlichen Säuren und den meisten organischen Lösungsmitteln ist Sporopollenin für Materialwissenschaftler interessant. Es wird bereits als Drugcarrier und Mikroreaktor erprobt [16, 17]. Die Oberflächenbeschaffenheit des Sporopollenins ist für den "Blütenblatteffekt" (engl.: petal effect) verantwortlich [18]. Wassertropfen behalten auf Blütenblättern ihre sphärische Form und bleiben aufgrund adhäsiver Kräfte haften. Die Physisorption kann ebenfalls für die Immobilisierung von Lipasen auf Sporopollenin genutzt werden [19]. Auf diese Weise können Lipasen für technische Prozesse mehrmals verwendet werden. Kürzlich wurde herausgefunden, dass Sporopollenin den tranigen Geschmack von Fischölen überdecken kann [20], weshalb Sporopollenin als Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden könnte. Des Weiteren wird modifiziertes Sporopollenin als Ionenaustauscher für Chloranilin [21], Phenole [22], Aminosäuren [23] und Schwermetalle [24] benutzt.

Nicht nur die chemische Zusammensetzung der Exine ist unbekannt, auch das Wissen über biochemische Vorgänge in Pollen ist beschränkt. Die Anzahl phänomenologischer Untersuchungen von Pollen anhand von Dünnschnitten ist in der Palynologie hoch. Allerdings können mit diesem Verfahren keine dynamischen Prozesse untersucht werden, so ist beispielsweise über die biochemischen Parameter des Keimungsprozesses wenig bekannt. Dabei könnten Erkenntnisse über das Wachstum von Pflanzenzellen auf andere biologische Systeme übertragen werden [25].

1.2 Zielsetzungen

Aus der bisher beschriebenen Problematik leiten sich die Ziele der hier vorliegenden Dissertation ab. Zum einen soll die Basis für eine automatische Pollenidentifizierung gelegt werden, zum anderen soll das Wissen über die Biochemie der Pollen vertieft werden. Eine automatisierbare On-line-Detektion setzt die Klassifizierung und Identifizierung der Pollenarten voraus. Hierfür sollen verschiedene mathematische Verfahren getestet und deren Parameter optimiert werden. Fehlerquellen sollen bewertet und wenn möglich umgangen werden.

Der zweite Aspekt dieser Arbeit besteht darin, Pollen mit Hilfe analytischer Methoden zu untersuchen, um Erkenntnisse über die chemische Zusammensetzung der Pollenkörner zu gewinnen. So soll insbesondere eine Korrelation chemischer Gruppen mit morphologischen Strukturen der Pollen erreicht werden. Im Zuge dieser Analysen soll eine Bewertung der etablierten Reaktionen zur Isolation der Pollenhüllen erfolgen. Auch der Prozess der Keimung soll untersucht werden. Insbesondere soll ermittelt werden, welche biochemischen Parameter sich während diesem biologischen, physiologischen Prozess verändern.

Der letzte Punkt bezieht sich auf die Aufklärung der chemischen Struktur morphologischer Elemente der Pollen wie der Hüllen und die Gewinnung von Informationen über biochemische Prozesse, die auf zellulärer Ebene ablaufen.

Das sind komplexe Fragestellungen, zu deren Beantwortung eine robuste Technik mit der Möglichkeit zur in-situ Applikation und Automatisierbarkeit benötigt wird. Die Raman-Spektroskopie kann diese Anforderungen erfüllen. Sie ist eine zerstörungsfreie Methode mit einer hohen Empfindlichkeit. Komplexe Proben können in situ untersucht werden. Darüberhinaus ist die Raman-Spektroskopie in Kombination mit einem Mikroskop für bildgebende Verfahren geeignet. Anhand der Raman-Spektren können Strukturinformationen über die Proben gewonnen werden. Besonders wichtig ist die Eigenschaft der Raman-Spektren, wie ein Fingerabdruck zur eindeutigen Identifizierung genutzt werden zu können. Diese Vorteile der Raman-Spektroskopie können zudem ohne aufwendige Probenpräparation genutzt werden. In dieser Arbeit soll die Raman-Mikrospektroskopie für die Lösung der hier stehenden Probleme eingesetzt werden.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

2.1 Schwingungs-Spektroskopie

Pollen sind komplexe biologische Proben, deswegen stellt die Aufklärung ihrer chemischen Struktur hohe Anforderungen an die verwendeten analytischen Methoden. Die schwingungs-spektroskopischen Verfahren erfüllen diese Ansprüche. Sie untersuchen die Molekülschwingungen einer Probe und liefern daraus Strukturinformationen. Es sind zerstörungsfreie Methoden mit denen sogar lebende biologische Systeme *in vitro* untersucht werden können. Durch die Kopplung an ein Mikroskop werden Auflösungen im Mikrometer-Bereich erreicht, dadurch können die Verteilungen chemischer Gruppen in einer Probe detektiert werden. Auch zur Identifizierung der Pollen ist die Schwingungs-Spektroskopie geeignet, da alle molekularen Gruppen einer Probe zum Spektrum beitragen. Somit können geringfügige Abweichungen der molekularen Zusammensetzung von zwei Proben in ihren Spektren nachgewiesen werden. Weitere wichtige Voraussetzungen für eine automatische On-line-Detektion sind schnelle Meßzeiten und eine einfache Probenpräparation, dies ist sowohl für die Raman- als auch für die Infrarot-Spektroskopie (IR) gegeben. In den folgenden Abschnitten sollen die zugrunde liegenden Prinzipien der Schwingungs-Spektroskopie vorgestellt werden, die Details der Raman- und der IR-Spektroskopie sollen

anschließend einzeln erläutert werden.

Wie zuvor erwähnt untersuchen die Raman- und die IR-Spektroskopie Molekülschwingungen. Durch elektromagnetische Strahlung werden Moleküle zu Schwingungen um ihre Gleichgewichtslage angeregt. Die Anzahl der Schwingungen eines Moleküls berechnet sich mit $3N-6$, wobei N der Anzahl der Atome entspricht. Lineare Moleküle können nur um zwei Achsen rotieren, somit ergibt sich $3N-5$ für die Berechnung der Freiheitsgrade linearer Moleküle. Generell werden zwei Arten von Schwingungen unterschieden: Valenzschwingungen und Deformationsschwingungen. Bei Valenzschwingungen ändern sich die Bindungslängen zwischen den Atomen. Während einer Deformationsschwingung verkleinert oder vergrößert sich der Winkel zwischen den Atomen. Eine schematische Darstellung der Schwingungsmöglichkeiten eines dreiatomigen Moleküls ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

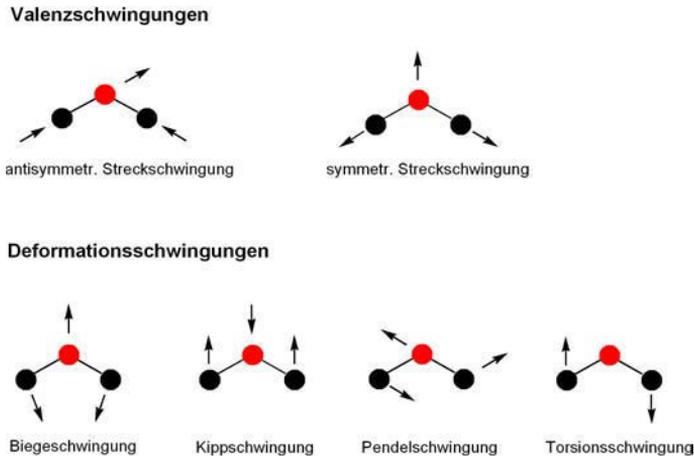


Abbildung 2.1: Übersicht der Schwingungsmöglichkeiten eines dreiatomigen Moleküls

Die Schwingungsfrequenzen beziehungsweise Wellenzahlen von zweiatomigen Molekülen können aus der Quantenmechanik abgeleitet werden. So läßt sich aus den Atommassen m_1 und m_2 sowie der Kraftkonstante f , die ein Maß für die Bindungsstärke ist, die Schwingungsfrequenz $\tilde{\nu}$

eines zweiatomigen Moleküls berechnen.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{f \left(\frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \right)} \quad (2.1)$$

Die Energien der Molekülschwingungen mit Hilfe des Morse Potentials dargestellt werden. Der anharmonische Oszillator beschreibt die Energiezustände, die von einem zweiatomigen Molekül eingenommen werden, unter Berücksichtigung der Dissoziationsenergie sowie dem Auftreten von Oberton- und Kombinationsschwingungen. Eingestrahlichtes

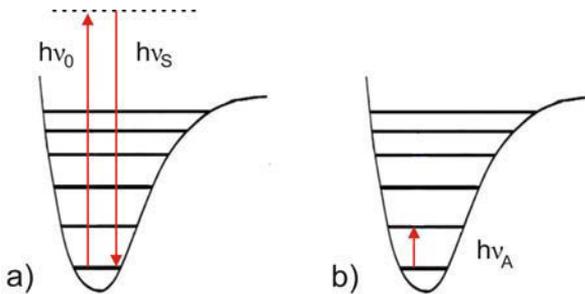


Abbildung 2.2: Wechselwirkung von Licht mit einem Molekül für den Fall der a) Raman-Streuung, b) IR-Absorption

Licht kann mit den Molekülen einer Probe auf verschiedene Weisen wechselwirken, es kann unter anderem zur Absorption oder Streuung von Licht kommen. In Abbildung (2.2) sind die Vorgänge bei der Raman-Streuung (2.2 a) und der IR-Absorption (2.2 b) dargestellt.

Welche Schwingungen IR- oder Raman-aktiv sind, kann durch die unterschiedlichen Auswahlregeln beider Spektroskopiearten bestimmt werden. Schwingungen sind IR-aktiv, das heißt Moleküle absorbieren Licht, wenn sich bei den Schwingungen das Dipolmoment ändert. Im Gegensatz dazu zeigen Raman-Signale die Modulation der Polarisation während der Schwingung an. Voraussagen über die Symmetrieeigenschaften eines Moleküls können durch das Alternativverbot getroffen werden. Dies besagt, dass zu einem Symmetriezentrum symmetrische Schwingungen nicht IR-aktiv sind und umgekehrt antisymmetrische Schwingungen nicht Raman-aktiv sein können.

2.2 Raman-Spektroskopie

2.2.1 Der Raman-Effekt

Die Raman-Spektroskopie ist die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Methode, deswegen soll im Folgenden die zugrunde liegende Theorie ausführlich besprochen werden. Der Raman-Effekt wurde aufgrund quantenmechanischer Überlegungen von Smekal (1923), Kramers und Heisenberg (1925), Schrödinger (1926) und Dirac (1927) vorhergesagt. In den Jahren von 1922 bis 1928 untersuchte Raman die Streuung von Licht in Flüssigkeiten. Im Laufe dieser Messungen stießen Mitarbeiter von Raman auf einen bis dahin unbekanntem Streuprozess, diese Entdeckung wurde 1928 veröffentlicht [26]. Zeitgleich beschäftigten sich Landsberg und Mandelstam [27] in der Sowjetunion mit den theoretischen Grundlagen des neuen Effekts. In den USA prägte Wood den Begriff der Stokes- und Anti-Stokes-Linien. 1930 erhielten Raman und Krishnan für die Entdeckung dieses Effekts den Nobelpreis für Physik.

Der Raman-Effekt besagt, dass bei der Bestrahlung einer Probe mit monochromatischem Licht das Streulicht neben der eingestrahlenen Frequenz auch Spektrallinien kleinerer und größerer Frequenz enthält. Die Vorgänge bei der Streuung von Licht an einem Molekül sind in Abbildung 2.3 dargestellt. Trifft ein Photon mit der Energie $h\nu_0$ auf ein Molekül, ist ein elastischer Streuprozess am wahrscheinlichsten. In diesem Fall ändert sich die Energie des Photons nicht (Rayleigh-Streuung). Ein kleiner Teil der Photonen wird unelastisch gestreut, hierbei wird Schwingungsenergie ausgetauscht, es kommt zur Raman-Streuung. Es werden zwei Prozesse unterschieden, trifft ein Photon $h\nu_0$ auf ein Molekül, das sich im Schwingungs-Grundzustand ν_0 befindet, überträgt das Photon einen Teil seiner Energie auf das Molekül. Das Molekül gelangt in einen angeregten Schwingungszustand $h\nu_S$, das Photon verliert Energie, so dass sein Energiezustand durch $h\nu_{R-}$ beschrieben wird. Durch Emission dieser Photonen entstehen die Stokes-Linien. Aus Zusammenstößen von Photonen mit Molekülen, die sich im ersten angeregten Schwingungszustand ν_1 befinden, können Photonen mit höherer Energie $h\nu_{R+}$ generiert werden. Das Molekül verliert in diesem Fall die Schwingungsenergie $h\nu_S$. Die daraus resultierenden Linien sind die Anti-Stokes-Linien. Entsprechend der Boltzmannverteilung befindet sich bei Raumtemperatur eine geringe Anzahl Moleküle in einem angeregten Zustand, somit sind die Intensitäten dieser Signale schwach.

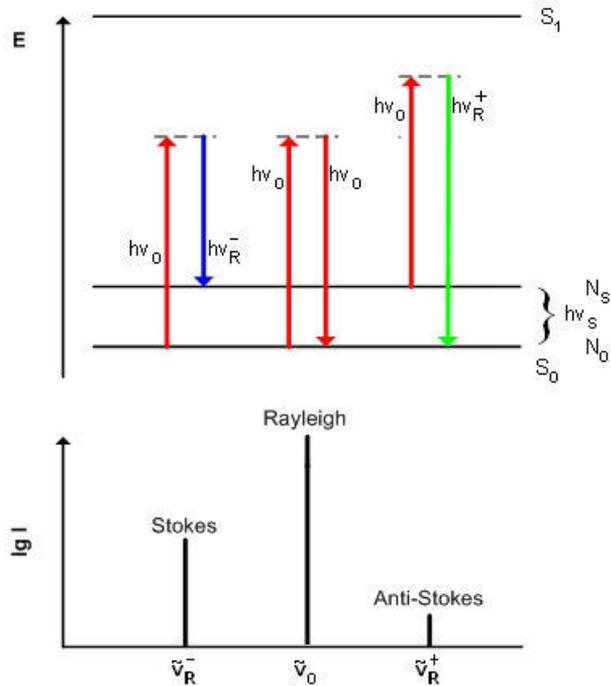


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Streuung von Licht an einem Molekül

Daher wird bei analytischen Anwendungen der Raman-Spektroskopie vorwiegend die Stokes-Verschiebung betrachtet.

Die Intensität der Raman-Streuung wird durch verschiedene Faktoren bestimmt, dies sind die Intensität und Wellenlänge des Lasers sowie die Konzentration und Streueigenschaften der Probe. Gleichung 2.2 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Intensität der Raman-Streuung I_R , der Polarisierbarkeit α_j der j -ten Normalschwingung Q_j und der Raman-Streuung $\bar{\nu}_0 \pm \bar{\nu}$, es ergibt sich eine Abhängigkeit von der vierten Potenz der Wellenlänge.

$$I_R = \mu'(\bar{\nu}_0 \pm \bar{\nu}_j)^4 \alpha_j^2 Q_j^2 \tag{2.2}$$

Außerdem kann die Intensität der Raman-Streuung in Abhängigkeit von dem Streuquerschnitt angegeben werden. Wobei der Raman-Streu-

querschnitt σ Auskunft darüber gibt, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein einfallendes Photon mit einer bestimmten Ramanverschiebung gestreut wird. Die Einheit des Streuquerschnitts ist $[\text{cm}^2]$, er muß empirisch bestimmt werden und ist proportional zur Intensität des Raman-Signals I_R .

$$I_R = I_0 \sigma_j D dz \quad (2.3)$$

D ist das Maß für die Dichte der Streuer pro Fläche und dz symbolisiert die zurückgelegte Strecke des Lasers in der Probe. I_0 steht für die Leistung des Lasers.

Die Anregungswellenlängen für die Raman-Spektroskopie liegen im Allgemeinen im sichtbaren Bereich, somit bietet sich die Kopplung eines Raman-Spektrometers an ein Lichtmikroskop an. Die Objektive fokussieren den Laserstrahl und bieten die Möglichkeit, das von der Probe gestreute Licht unter einem weiten Winkel einzusammeln. Für die Kombination eines Lichtmikroskops mit einem Raman-Spektrometer muß der Laserstrahl entlang der optischen Achse in einer 180° Geometrie verlaufen. Ein Beispiel für einen solchen Aufbau ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

2.2.2 Raman-Spektroskopie in der Analytik

Seit der Entdeckung des Raman-Effekts im Jahr 1928 haben zahlreiche Erfindungen und technische Weiterentwicklungen dazu beigetragen, dass sich die Raman-Spektroskopie im Laboralltag etabliert hat. Ein bekanntes Problem der Raman-Spektroskopie ist der geringe Streuquerschnitt der Raman-Streuung im Vergleich zum Streuquerschnitt der Fluoreszenz. Eine Möglichkeit dies zu umgehen, bietet die Nutzung der Fourier-Transform-Raman-Spektroskopie mit einer Anregung von 1064 nm [28]. Zwar ist die resultierende Raman-Streuung etwas schwächer als bei einer Anregung im sichtbaren Bereich, aber die Fluoreszenz nimmt um mehrere Größenordnungen ab [29]. Weitere Verbesserungen wurden durch den Einsatz von neuen Detektoren und Diodenlasern erzielt. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde entscheidend durch den Einsatz neuer Detektoren verbessert [30]. Außerdem sind die Weiterentwicklung der Computer sowie die Erfindung von Faseroptiken und Diodenlaser zu erwähnen [31].

Heutzutage wird die Raman-Spektroskopie in vielen analytischen Laboren eingesetzt, es können feste und flüssige Proben untersucht wer-

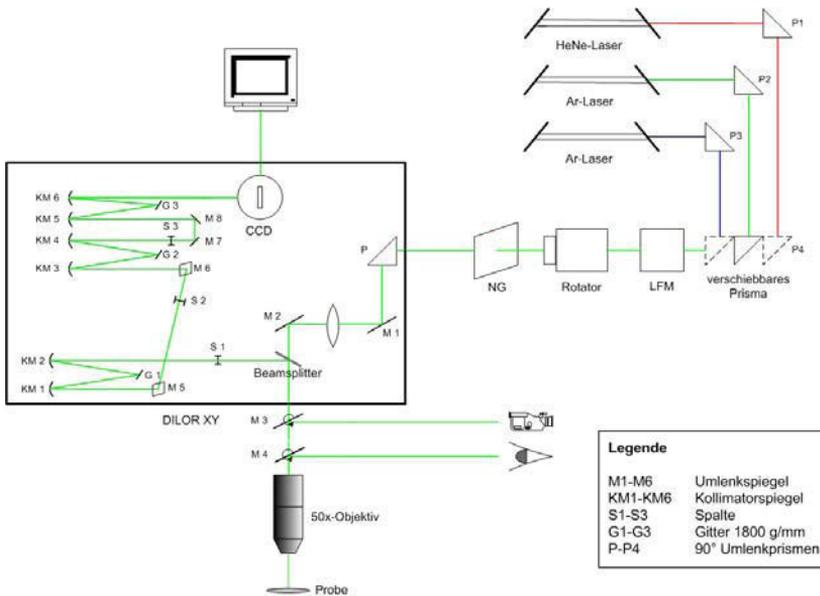


Abbildung 2.4: Beispielhafter Aufbau eines Raman-Spektrometers

den. Das Spektrum der möglichen Proben reicht vom einzelnen Molekül [32] bis hin zu komplexen biologischen Systemen. So kann beispielsweise zwischen gesunden und kanzerogenen Gewebeproben unterschieden werden [33]. Die Nutzung von Faseroptiken ermöglicht Messungen im Prozess in beliebiger Entfernung vom Spektrometer [34]. In der Archäometrie ist die Nutzung tragbarer Raman-Spektrometer beliebt, da diese die Untersuchung von Bauwerken oder Kunstwerken ermöglichen, die nicht transportiert werden können [35]. Über die bisher besprochenen qualitativen Fragestellungen hinaus kann die Raman-Spektroskopie auch als quantitative Technik angewendet werden [36]

Die Einsatzmöglichkeiten der Raman-Spektroskopie erstrecken sich von der Analyse einfacher Moleküle hin bis zu komplexen Materialien, dabei können qualitative und quantitative Verfahren angewendet werden.

2.2.3 Verstärkung der Raman-Streuung

Ein Nachteil der Raman-Spektroskopie ist die geringe Empfindlichkeit, nur 10^{-6} bis 10^{-8} der Laserphotonen werden zu Ramanphotonen umgewandelt, das entspricht Streuquerschnitten von circa 10^{-30} cm². Stimmt die Anregungswellenlänge mit dem elektronischen Übergang eines Moleküls überein, kann die Signalintensität um den Faktor 10^6 erhöht werden. Eine Verstärkung des Raman-Signals wird bereits bei der Annäherung der Anregungswellenlänge an einen elektronischen Übergang beobachtet, in diesem Fall wird von Präresonanz gesprochen. Kommt es zur resonanten Verstärkung der Signale, können Oberton- und Kombinationsschwingungen beobachtet werden. [37]

Ein Problem der unverstärkten Raman-Spektroskopie sind Streuquerschnitte, die deutlich kleiner sind als die Streuquerschnitte der Fluoreszenz mit 10^{-17} bis 10^{-16} cm², so werden Raman-Signale häufig durch Fluoreszenz verdeckt. Die Empfindlichkeit kann im Fall der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (engl.: *surface enhanced Raman scattering*, SERS) um sechs bis acht Größenordnungen gesteigert werden, in einigen Fällen gelingt sogar der Nachweis einzelner Moleküle [38, 39]. In diesen Experimenten resultieren vergleichbare Empfindlichkeiten für Fluoreszenz und SERS [32]. Ein weiterer Vorzug der SERS-Experimente ist, dass die Fluoreszenz durch die Nähe zu den Metallstrukturen gelöscht wird, dies wird durch Abklingkanäle ermöglicht [40].

SERS wurde erstmals 1974 von Fleischmann *et al.* für Pyridin an einer aufgerauhten Elektrodenoberfläche beobachtet, aber erst 1977 von Jeanmarie und Van Duyne sowie Albrecht und Creighton als Verstärkungseffekt verstanden [41]. Es handelt sich nicht um einen Oberflächeneffekt sondern um ein Phänomen, das auf die Wechselwirkung mit Metall-Nanostrukturen zurück zu führen ist.

Die Verstärkung setzt sich aus einer chemischen und einer elektromagnetischen Komponente zusammen. Die chemische Verstärkung kann einen Faktor von 10^2 annehmen, sie kommt durch die Adsorption eines Moleküls am Metall zustande. Die Wechselwirkung zwischen Adsorbat und Substrat beeinflusst die Lage der Molekülorbitale und der enthaltenen Elektronen, dies wiederum wirkt sich auf den Streuquerschnitt aus. Eine Erklärung liefert die Charge-Transfer Theorie: Bei der Adsorption der Probe auf dem Metall bildet sich eine Bindung zwischen Metall und Adsorbat, es kommt zu einer Überlappung der Orbitale, so

dass Elektronen zwischen den Orbitalen ausgetauscht werden können. Dieser neu gebildete Komplex kann in den Bereich einer resonanten Anregung der Laserwellenlänge fallen. Die elektromagnetische Feldverstärkung beruht auf einer Wechselwirkung der optischen Felder des eingestrahlten Lichts und der gestreuten Photonen mit Oberflächenplasmonen der Metalle [32]. Licht kann Plasmonen auf der Oberfläche des Substrats erzeugen, wenn ein Metall verwendet wird, dessen Plasmonenanregung im Bereich des einfallenden Lichts liegt. Die Plasmonen von beispielsweise Gold, Silber und Kupfer werden durch sichtbares Licht - wie es in Raman-Experimenten genutzt wird - angeregt. Das kann zu Verstärkungen von bis zu 10^{14} führen.

Die erzielten Verstärkungen sind im hohen Maße von den verwendeten Metallstrukturen abhängig. Es werden Methoden der Lithographie oder der Abscheidung von Metallen auf strukturierten Kunststoffoberflächen eingesetzt, um reproduzierbare SERS-Signale zu erhalten. Kolloidale Metallösungen weisen gute Verstärkungsfaktoren auf, allerdings ist die Reproduzierbarkeit eingeschränkt [42]. Besonders geeignet sind Partikelcluster in der Größenordnung um 50 nm, sie erzeugen elektrische Felder, die senkrecht auf der Metalloberfläche stehen und an den Oberflächenstrukturen lokalisiert sind [42].

In der unten stehenden Gleichung sind die Zusammenhänge zwischen dem SERS-Signal $P^{SERS}(\nu_S)$ und der Intensität des Lasers ($I\nu_L$), dem Raman-Streuquerschnitt der adsorbierten Probe (σ_{ads}^R), der Anzahl der am SERS-Prozess beteiligten Moleküle (N), sowie der Feldverstärkung, die auf die Photonen des Lasers ($|A(\nu_L)|^2$) und der gestreuten Raman-Photonen ($|A(\nu_S)|^2$) wirkt, aufgeführt [38].

$$P^{SERS}(\nu_S) = N\sigma_{ads}^R |A(\nu_L)|^2 |A(\nu_S)|^2 I(\nu_L) \quad (2.4)$$

2.3 Infrarot-Spektroskopie

Neben der Raman -Spektroskopie wurde die IR-Spektroskopie eingesetzt. Diese Technik liefert aufgrund der gegensätzlichen Auswahlregeln komplementäre Informationen. Die Grundlagen für die IR-Spektroskopie wurden im Vergleich zur Raman-Spektroskopie früh geschaffen, bereits im Jahre 1800 entdeckte Herschel die IR-Strahlung am roten Ende des sichtbaren Spektrums [43]. Basierend auf dem Prinzip der von A. A. Michelson 1890 erfundenen Interferometer konnten die ersten

Fourier-Transform-Spektrometer gebaut werden. In den FT-Spektrometern fällt das Licht durch eine relativ große Apertur auf den Detektor, so dass das Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber den bis dahin üblichen Zweikanalspektrometern verbessert wurde (Jacquinot-Vorteil). Die Überlegenheit der FT-Spektrometer wird auch durch den Multiplex-Vorteil begründet, der einen Zeitgewinn bei der Spektrenaufnahme darstellt. Durch den Einsatz eines Lasers kann die Spiegelposition und dadurch auch die Wellenzahl exakt bestimmt werden. Ein weiterer Vorzug ist, dass der Einfluss des Streulichts auf die Messungen beseitigt wird. Nach der Entwicklung leistungsfähiger Computer, die für die Fourier-Transformation benötigt wurden, verdrängten diese die bis dahin gebräuchlichen Ein- und Zweikanal-Spektrometer.

IR-spektroskopische Untersuchungen beruhen auf Messungen der Transmission von Licht durch eine Probe. Hierfür sind zwei Gesetzmäßigkeiten bedeutend. Die Schwächung der Strahlungsintensität mit der Weglänge beim Durchgang durch die absorbierende Probe und der Zusammenhang der Intensitätsabnahme mit der Konzentration der absorbierenden Probe. Beides wird im Lambert-Beerschen-Gesetz vereinigt. Hierbei ist E die Extinktion bei der Wellenlänge λ_0 , I_0 die Intensität des einfallenden Lichts, I die Intensität des transmittierten Lichts, c die Konzentration der absorbierenden Substanz, ε der wellenlängenabhängige Extinktionskoeffizient und d die Weglänge des Lichts durch die absorbierende Substanz.

$$E_\lambda = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right) = c \cdot \varepsilon_\lambda \cdot d \quad (2.5)$$

Zur Analyse kleiner Probenmengen können FTIR-Spektrometer und Mikroskope kombiniert werden. Für die Kopplung eines Mikroskops an ein FTIR-Spektrometer werden andere optische Bauteile als in einem Lichtmikroskop benötigt. Der Grund sind die Wellenlängen des IR-Lichts von 5000 bis 400 cm^{-1} , in diesem Bereich ist Glas nicht lichtdurchlässig, stattdessen werden reflektierende Optiken verwendet. Burch entwickelte 1947 die bis heute gebräuchlichen Cassegrain-Linsen, sie können als Kondensor und Objektiv eingesetzt werden [44]. Um die Probe im IR-Strahl zu positionieren, muss das Mikroskop auch als Lichtmikroskop fungieren, dies wird durch den Einsatz beweglicher Spiegel verwirklicht. IR-Spektren können im Transmissions- oder Reflektionsmodus aufgezeichnet werden. Der Strahlengang im Transmissionsmodus ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Eine weitere Verbesserung

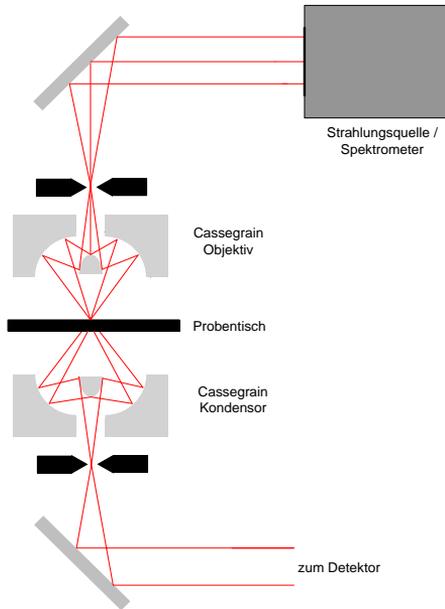


Abbildung 2.5: Strahlengang des Transmissionsmodus in einem IR-Mikroskop

der IR-Mikrospektroskopie bietet die Verwendung eines Detektors mit vielen flächig angeordneten Detektorelementen [45]. Es können Spektren in allen Elementen des Detektors gleichzeitig aufgenommen werden, dies bringt einen Multiplexvorteil.

Die IR-Mikrospektroskopie mit herkömmlichen Strahlungsquellen weist Auflösungen von circa $10 \times 10 \mu\text{m}$ auf [46]. Meist wird ein Stab aus Siliciumcarbid (Globar) auf 1300 bis 1500 K aufgeheizt, wodurch eine kontinuierliche Strahlung freigesetzt wird [47]. Durch den Einsatz von Synchrotronstrahlung als Strahlungsquelle kann die IR-Spektroskopie für die Untersuchung geringer Probenmengen optimiert werden. Die Synchrotronstrahlung wurde 1947 in einem Teilchenbeschleuniger entdeckt [48]. Diese elektromagnetische Strahlung wird von Elektronen ausgesendet, welche sich auf einer Kreisbahn bewegen. Die Brillanz dieser Quelle ist um den Faktor 1000 höher als in herkömmlichen IR-Sys-

temen, somit verbessert sich das Signal zu Rausch Verhältnis [49]. Es resultieren Auflösungen von weniger als $10 \mu\text{m}$.

2.4 Kernspinresonanz-Spektroskopie

Die magnetische Kernspinresonanz (engl.: *nuclear magnetic resonance*, NMR) erweitert das Spektrum der in dieser Arbeit eingesetzten analytischen Methoden um ein kernspezifisches Verfahren. Diese Technik beruht auf einer Wechselwirkung des magnetischen Dipolmomentes von Atomkernen mit einem elektromagnetischen Radiofrequenzfeld in Gegenwart eines starken äußeren Magnetfeldes. Es können nur Kerne mit einem Kern- oder Eigendrehimpuls $I \neq 0$ bestimmt werden, I nimmt bestimmte, diskrete Werte an:

$$|I| = \sqrt{I(I+1)}\hbar \quad (2.6)$$

Das magnetische Moment μ ist über das gyromagnetische Verhältnis γ proportional mit I verknüpft. Es erzeugt ein Dipolmoment, welches charakteristisch für die chemische und magnetische Umgebung des Kerns ist.

$$\mu = \gamma I \quad (2.7)$$

$$|\mu| = \gamma\sqrt{I(I+1)}\hbar \quad (2.8)$$

Eine Vielzahl von Effekten beeinflussen NMR-Experimente, am stärksten ist die Zeeman-Wechselwirkung. Aus ihr resultiert eine effektive (nicht messbare) Magnetisierung in Richtung des angelegten Magnetfeldes B_0 definiert als z -Richtung. Es wird nur der Unterschied zwischen z und $-z$ erfasst. Ein weiterer Effekt kann durch die Einstrahlung eines zusätzlichen Magnetfeldes B_1 beobachtet werden. Hierbei werden Übergänge zwischen benachbarten Energieniveaus induziert, daraus resultiert eine Spinumkehr. Neben der Beeinflussung des Kernspins durch äußere Magnetfelder wirken sich innere lokale Magnetfelder aus. Die elektronische Umgebung eines Kerns im B_0 -Feld induziert kleine aber messbare Magnetfelder, diese werden als chemische Verschiebung bezeichnet und relativ zu einer Referenzsubstanz detektiert. Des Weiteren bedingt das magnetische Moment eines Kerns die Ausbildung eines Kerndipols, zwischen zwei Kernen kann es zu Dipol-Dipol-Wechselwirkungen kommen, welche abhängig vom gyromagnetischem

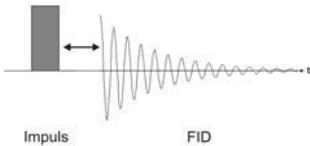


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung eines Einzelimpuls-Experiments

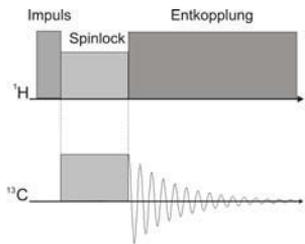


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung eines Kreuzpolarisations-Experiments

Verhältnis und von dem Abstand der beiden Kerne ist. Homo- und heteronukleare Kopplungen führen zu einer starken Verbreiterung der Signale.

Die experimentelle Durchführung erfolgt, indem die Probe in ein magnetisches Feld eingebracht wird. Durch die Einstrahlung eines elektromagnetischen Feldes, das den Resonanzbedingungen entspricht, werden Übergänge zu energetisch höher liegenden Zuständen angeregt. Nach Abschalten des Hochfrequenz-Feldes geht die Magnetisierung in den Ausgangszustand zurück. Dieser Prozess wird Relaxation genannt, es gibt eine longitudinale und eine transversale Komponente. Die longitudinale Komponente (T_1) beschreibt die Relaxation in z-Richtung, das heisst in den Ausgangszustand. Während die transversale Komponente (T_2) die Dephasierung, den Verlust der Phasenkohärenz in der xy-Ebene, beschreibt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vornehmlich Festkörper-Experimente durchgeführt, aufgrund der Anisotropie der chemischen Verschiebung und der dipolaren Kopplung kommt es zur Linienverbreiterung gegenüber der hochauflösenden Flüssig-NMR-Spektroskopie. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, wird die Probe im magischen Winkel (engl.: *magic angle spinning*, MAS) rotiert [50]. Die Anisotropie der chemischen Verschiebung und der dipolaren Kopplung wird bei $\theta = 54.74^\circ$ ausgemittelt. Bei einem Einzelimpuls-Experiment (engl.: *single puls*, SP) wird mit einem Impuls B_1 eingestrahlt. Der Magnetisierungsvektor wird in die x-y-Ebene ausgelenkt, wodurch eine Wechselfeldspannung in der Empfängerspule induziert wird. Dies ist das NMR-Signal und

wird als freier Induktionsabfall (engl.: *free induction decay*, FID) beschrieben. Das Schema in Abbildung 2.6 illustriert diese Vorgänge. Des Weiteren wurde die Methode der Kreuzpolarisation (engl.: *cross polarization*, CP) eingesetzt. Mit der Kreuzpolarisation können Signale von Kernen mit geringer Empfindlichkeit wie ^{13}C -Kerne verstärkt werden. Eine Folge der Kopplung zwischen ^1H - und ^{13}C -Kernen ist die Substitution langer T_1^{C} - durch kürzere T_1^{H} -Zeiten. Für die Durchführung dieser CP-Experimente erfolgt die Magnetisierung in die x-y-Ebene durch einen 90° Impuls. Dann wird durch gleichzeitiges Einstrahlen zweier hochfrequenter Magnetfelder (Spinlock) ein Transfer der Magnetisierung der ^1H -Spins auf die ^{13}C -Spins ermöglicht (siehe Abbildung 2.7). Das Result ist ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber den SP-Experimenten.

2.5 Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie

Die Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie (engl.: *high performance thin layer chromatography*, HPTLC) wurde zur Auftrennung der in den Pollen enthaltenen Carotinoide benötigt. Wie alle chromatographischen Methoden beruht sie auf einer Trennung der Probe zwischen mobiler und stationärer Phase. Die HPTLC ist eine Form der festflüssig Chromatographie, die den allgemeinen Regeln der Chromatographie unterliegt. Die klassische Theorie der Chromatographie bezieht sich auf die Verteilung an einer Säule, zur Charakterisierung dieses Vorgangs wurden die Begriffe der Trennstufenhöhe und der Trennstufenzahl eingeführt. Wobei eine geringere Trennstufenhöhe gleichbedeutend mit einer besseren Auflösung ist. Die Trennstufenhöhe H kann durch die Van-Deemter-Gleichung beschrieben werden:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \quad (2.9)$$

In dieser einfachen Form wird die Trennstufenhöhe in Abhängigkeit der Strömungsgeschwindigkeit u durch die folgenden Effekte beschrieben. Die Konstante A steht für die Kornumströmung (Eddy-Diffusion), B ist die Longitudinaldiffusion (zufällige Diffusion) und C der Massenübergang zwischen der mobilen und der stationären Phase. Diese Effekte führen zu einer Bandenverbreiterung. Zu beachten ist, dass in

der HPTLC die Fließmittelzufuhr gesteuert werden muss, um eine konstante Geschwindigkeit zu gewährleisten.

Die Kenngröße der Dünnschichtchromatographie ist der Retentionsfaktor, der die Lage der Probe gegenüber der Fließmittelfront angibt. Anhand des Retentionsfaktors können qualitative Zuordnungen vorgenommen werden. Zur quantitativen Auswertung wird meist die Absorptionsspektroskopie verwendet. Heutzutage sind die Messungen vollautomatisiert: Vom Probenauftrag, über die Mehrfachentwicklung bis zur Detektion. Daraus resultieren Trennstufenzahlen von 5000 Böden, dem gegenüber steht eine Trennstufenzahl von 6000 bis 10000 die mittels Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (engl.: *high performance liquid chromatography*, HPLC) erreicht werden kann [51]. Trotzdem besitzt die HPTLC einzigartige Vorteile: Die aufgetrennten Komponenten sind auf der HPTLC-Platte vorhanden und in Einzelfällen sogar konservierbar. Außerdem kann zwischen einer Vielzahl organischer Lösungsmittel gewählt werden. [52, 53, 54]

2.6 Rasterelektronenmikroskopie unter Umgebungsbedingungen

Als bildgebendes Verfahren wurde in dieser Arbeit die Rasterelektronenmikroskopie unter Umgebungsbedingungen (engl.: *environmental scanning electron microscopy*, ESEM) verwendet. Die Auflösung eines Lichtmikroskops ist durch die Wellenlänge des Lichts limitiert, eine höhere Auflösung kann mit einem Elektronenmikroskop erreicht werden. Die Vorzüge der ESEM-Technik gegenüber herkömmlichen elektronenmikroskopischen Verfahren ergeben sich aus der Tatsache, dass die Probenoberfläche nicht bedampft und auch kein vollständiges Vakuum angelegt werden muss. Ein schwacher Gasdruck von circa 10 torr kann in der Umgebung der Probe toleriert werden, handelt es sich um Wasserdampf, können sogar lebende biologische Proben beobachtet werden [55]. Die Präsenz des Gases hat weitere positive Aspekte zur Folge, das zu detektierende Signal wird verstärkt und positiv geladene Gasmoleküle, die aus Zusammenstößen mit Elektronen hervorgehen, können Ladungsdifferenzen an der Probenoberfläche abbauen [56]. Dies ist der Grund dafür, dass keine leitende Schicht an der Probenoberfläche aufgebracht werden muss. Jedoch ist die resultierende Auflösung mit 5 nm schlechter als in herkömmlichen Rasterelektronen-Mikroskopen,

allerdings ist dies für die Untersuchung von Pollenkörnern nicht von Bedeutung.

Die technische Umsetzung gleicht der eines konventionellen Rasterelektronen-Mikroskopes: Ein Elektronenstrahl fährt die Probenoberfläche ab und die emittierten Elektronen werden detektiert. Diese Elektronen teilen sich in zwei Gruppen auf: Sekundärelektronen und rückgestreute Elektronen. Sekundärelektronen entstehen durch inelastische Stöße der eingestrahlenen Elektronen mit der Probe, sie besitzen Energien von 50 eV. Die rückgestreuten Elektronen sind Produkte von elastischen Stößen der primären Elektronen in der Probe mit Energien größer als 50 eV. Die Sekundärelektronen bilden die Oberfläche der Probe ab. Einen Blick in das Innere der Probe ermöglichen die rückgestreuten Elektronen. Durch eine Anreicherung von Schwermetallionen kann das Bild, welches durch die rückgestreuten Elektronen gewonnen wird, verbessert werden [56]. Zum Nachweis der Sekundär- bzw. der rückgestreuten Elektronen müssen separate Detektoren verwendet werden.

2.7 Multivariate Auswertungen

In dieser Arbeit wurden große Datenmengen produziert, die Raman-Spektren beispielsweise enthalten viele 100 Datenpunkte. Ein weiteres Problem ist die Komplexität dieser Proben. Denn es wurden keine reinen Substanzen untersucht sondern biologische Proben, deren Spektren sich aus den Überlagerungen der einzelnen Komponenten ergeben. Um die Informationen dieser Daten optimal nutzen zu können, wurden multivariate Auswertungsmethoden eingesetzt. Es kann zwischen einer Vielzahl multivariater Verfahren gewählt werden, diese können überwacht oder unüberwacht sein. Die Vielfalt der zur Verfügung stehenden Methoden ermöglicht die Beantwortung zahlreicher Fragestellungen, so dass die Chemometrie ein fester Bestandteil der analytischen Chemie geworden ist.

2.7.1 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (engl.: *principal component analysis*, PCA) wurde benutzt, um eine Datenreduktion und Varianzgewichtung zu erreichen. So wird durch die Beschränkung der ursprünglichen Variablen auf die Hauptkomponenten die Datenmenge reduziert. Diese

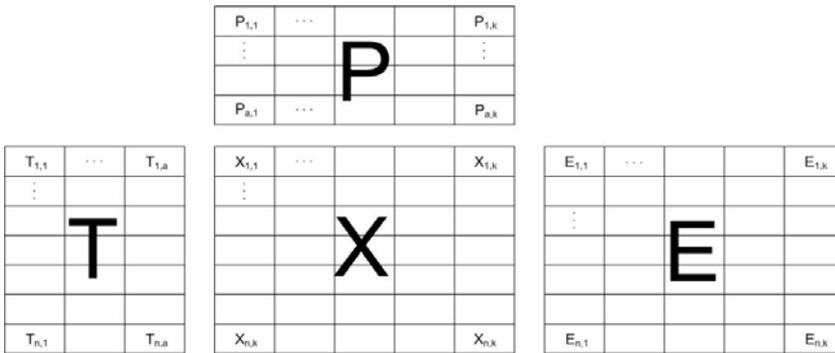


Abbildung 2.8: Darstellung der Ursprungsmatrix X durch Scores T , Loadings P und spektrale Residuen E

beschreiben die Varianz der Datenmatrix, die erste Hauptkomponente liegt in Richtung der größten Varianz der Daten. Die folgenden Faktoren liegen orthogonal zu dieser und beschreiben den maximalen Anteil der verbliebenen Varianz. Eine vergleichsweise geringe Anzahl an Hauptkomponenten kann über 90% der Varianz abbilden. Die Hauptkomponenten, die nur einen untergeordneten Teil der Varianz beschreiben, müssen nicht betrachtet werden.

Mathematisch verwirklicht wird das durch die Darstellung der Ursprungsmatrix X mittels zweier kleinerer Matrizes, die als Scores (Faktorenwerte) T und Loadings (Faktorenloadungen) P bezeichnet werden (siehe Abbildung 2.8). Die Abweichung zwischen diesen und der ursprünglichen Matrix wird durch die spektralen Residuen E veranschaulicht. Die zu untersuchende Matrix enthält in den Spalten die Anzahl der Datenpunkte zum Beispiel eines Spektrums k und in den Zeilen die Anzahl der Messungen n . In den reduzierten Matrizes sind zusätzlich die Anzahl der Faktoren zu finden.

Durch die Visualisierung der Scores und Loadings kann die Interpretation der gewonnenen Daten vereinfacht werden. Die Scores sind die Koordinaten des neuen Raumes, der durch die verwendeten Hauptkomponenten aufgespannt wird. Die Darstellung der Scores mehrerer Hauptkomponenten gegeneinander gibt die Varianz der Messungen bezogen auf die ausgewählten Hauptkomponenten wieder. Es handelt sich hierbei um die Projektion der Daten auf ein durch die Eigenvektoren

aufgespanntes Koordinatensystem. In solchen Abbildungen kann die Gruppierung von Daten beobachtet werden. Mit Hilfe der Loadings kann der Beitrag der ursprünglichen Variablen zu den Hauptkomponenten überprüft werden. Eine Auftragung der Loadings gegeneinander gibt Auskunft darüber, welche Variablen korrelieren. Je kleiner der Winkel zwischen den Loadings ist, um so stärker ist die Korrelation, beträgt der Winkel 90° besteht kein Zusammenhang. Zusätzlich kann der Loadingsvektor einer einzelnen Hauptkomponente betrachtet werden. Dieser kann für eine Probe aus mehreren chemischen Substanzen wiedergeben, welche Substanz die größte Varianz der Hauptkomponente verursacht [57, 58, 59].

2.7.2 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse fasst Objekte aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Daten zu Gruppen zusammen. In dieser Arbeit wurde die Clusteranalyse eingesetzt, um die Spektren der Pollenkörner entsprechend der Zugehörigkeit zu einer Spezies zusammenzufassen. Hierfür werden die Spektren in Form von Vektoren als Punkte in einem n -dimensionalen Vektorraum dargestellt. Die Variablen sind die Absorptionseinheiten der IR-Spektren beziehungsweise die Intensitäten der Raman-Spektren. Wie ähnlich sich zwei Objekte sind, kann an der spektralen Distanz zwischen diesen Objekten abgelesen werden. Der spektrale Abstand d_{ij} zwischen zwei Spektren I und J kann zum Beispiel über den quadrierten Euklidischen Abstand berechnet werden (vergleiche Formel 2.10)

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (\chi_i - \chi_j)^2} \quad (2.10)$$

Da in dieser Arbeit ausschließlich unüberwachte Verfahren angewendet wurden, erfolgt die Gruppierung der Spektren einzig anhand der zuvor berechneten spektralen Distanzen ohne zusätzliche Informationen. Zuerst werden die zwei Spektren, die sich am ähnlichsten sind (die den geringsten spektralen Abstand aufweisen) zu einem Cluster zusammengefügt. Dann werden die Abstände erneut berechnet und der Vorgang wiederholt. Der Algorithmus, der für die Gruppenbildung ausgewählt wird, bestimmt in welcher Weise die Punkte zu Clustern zusammengefasst werden. In dieser Arbeit wurde der Wards Algorithmus am häufigsten verwendet. Das Kriterium des Wards Algorithmus weicht

von der zuvor besprochenen Verfahrensweise ab. Bei der Bildung der Cluster wird auf ein möglichst geringes Anwachsen der sogenannten Heterogenität H innerhalb einer Gruppe geachtet. Zwischen den Clustern hingegen wird die Heterogenität maximiert. Dafür werden n_p und n_q ähnliche Spektren in die Gruppen p und q eingeteilt, im nächsten Schritt werden n_i dieser Gruppen zu einem neuen Cluster i fusioniert. Die in der Gruppe verbleibenden Spektren, bilden die Gruppe r . Das zugrunde liegende Kriterium für die Fusion zweier Cluster ist also ein minimaler Zuwachs der Summe der Fehlerquadrate [60] (vergleiche mit Formel 2.11). Diese Methode hat sich zur Klassifizierung von Bakterien etabliert.

$$H_{r,i} = D_{r,i} = \frac{(n_p + n_q) \cdot D_{p,i} + (n_q + n_i) \cdot D_{q,i} - n_i \cdot D_{q,i}}{n + n_i} \quad (2.11)$$

Das Ergebnis der Gruppenbildung wird in einem Diagramm dem sogenannten Dendrogramm dargestellt. Auf der y-Achse ist die Heterogenität zwischen den Clustern abgebildet. Die horizontale Linie gibt die Heterogenität zwischen den Spektren vor der Gruppenbildung an. Diese Methode der Datenauswertung kann zur automatischen Klassifizierung eingesetzt werden.

2.7.3 Künstliche neurale Netze

Im Gegensatz zur Clusteranalyse stellen die künstlichen neuronalen Netze (engl.: *artificial neural networks*, ANN) ein Beispiel für ein total überwacht Verfahren dar. ANN dienen der Mustererkennung und können für die Lösung konkreter Fragestellungen aus unterschiedlichen Bereichen angewendet werden. Sie sind der Versuch, das Gehirn des Menschen als informationsverarbeitende Maschine nachzuempfinden. Als Bausteine des Gehirns sind etwa 10 Milliarden Neuronen auf vielfache Weise miteinander verknüpft. In den künstlichen neuronalen Netzen bilden miteinander verschaltete Einheiten (Neuronen) die Grundlage für ein lernfähiges System. Mit Hilfe einer Lernregel kann so ein Netz anhand von Beispielen (Trainingsdatensätzen) selbstständig Aufgaben lösen, dafür wird die Stärke der Verbindungen zwischen den Neuronen neu gewichtet.

Ein Netz ist aus mehreren Schichten aufgebaut (Eingabeeinheit, verdeckte Schicht, Ausgabereinheit). Die Verbindungen zwischen den Neuronen können vorwärts gerichtet sein oder in alle Richtungen weisen.

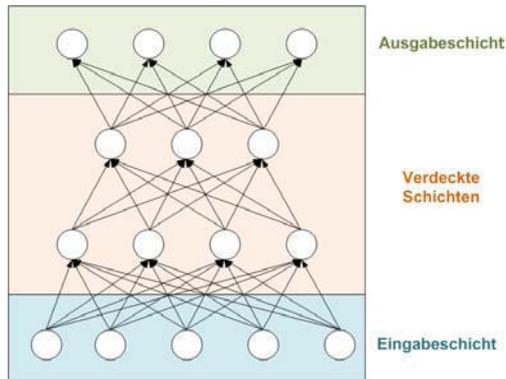


Abbildung 2.9: Beispiel für ein vorwärts gerichtetes Netz

Ein Beispiel für die Struktur eines künstlichen neuronalen Netzes ist in Abbildung 2.9 zu sehen. Wie stark die Schichten miteinander verbunden sind, wird durch die Gewichtung angegeben. Je größer der Wert dieser Gewichtung ist, um so stärker ist der Einfluss zweier Schichten aufeinander, das heißt in Richtung dieser Verbindungen werden verstärkt Informationen übermittelt. Damit ein Signal weitergeleitet werden kann, muss ein Schwellenwert überschritten werden, dies kann durch die Addition einzelner Signale geschehen [61, 62].

Das Netz lernt anhand eines Trainingsdatensatzes. Beim überwachten Lernen ist die Ausgabe vorgegeben und das Netz verändert die Gewichtung dementsprechend. In der Trainingsphase ist es entscheidend, ein Übertrainieren des Netzes zu vermeiden [63], deswegen wird die Qualität des Netzes während des Lernprozesses durch einen Validierungsdatensatz überprüft. Letztendlich wird das trainierte Netz auf einen Testdatensatz angewendet.

Kapitel 3

Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien

Handelsübliche Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Merck (Merck, Darmstadt, Deutschland) erstanden. Zusätzlich wurde Rinderseumalbumin (engl.: bovine serum albumin, BSA) von Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Cellulose Onozuka R10 und Macerozyme R10 von Yakult (Yakult Honsha, Tokio, Japan) sowie Percoll von Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) eingesetzt.

3.2 Pollenproben

Die Pollen wurden während der Blütezeit in Berlin und Umland gesammelt. Pollenproben, die nicht umgehend gemessen werden konnten, wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Um konstante Bedingungen zu schaffen und Ansammlung von Kondenswasser zu vermeiden, wurden die gefrorenen Pollenkörner für 20 Minuten im Exxikator bei Raumtemperatur aufgetaut. Ergänzt wurden diese Proben durch sechs käuflich erworbene Pollenspezies von Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Spektren von 57 Pollenspezies aus 16 Familien untersucht (siehe Tabellen im Anhang).

3.3 Raman-Messungen

Alle Raman-Messungen wurden an einem LabRam HR800 (Jobin Yvon, Bensheim, Deutschland) durchgeführt. Das BX41 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) wurde mit drei Objektiven (100×, 50× oder 10×) betrieben und war mit dem 800 mm langen Spektrograph verbunden. Als Detektor wurde eine mit Stickstoff gekühlte CCD (1024 × 256 Pixel, Horiba, Deutschland) verwendet. Die Anregungswellenlängen von 785, 633 oder 488 nm wurden mit Hilfe eines Dioden- (Toptica, Graefelfing, Deutschland), Helium-Neon- (Jobin Yvon, Bensheim, Deutschland) und einem Argon-Laser (Melles Griot, Aalsbergen, Niederlande) erzeugt; so waren die Leistungen auf der Probe 15, 6 und 4 mW. Um die Rayleighstreuung zu unterdrücken, wurden Notchfilter verwendet. Für alle Messungen wurde eine Lochblende von 1000 μm und eine Spaltbreite von 100 μm eingestellt.

3.3.1 Aufnahme der Pollenspektren für die Klassifizierung

Die Spektren einzelner Pollenkörner wurden bei einer Anregungswellenlänge von 785 nm aufgenommen. Die Pollenkörner wurden auf CaF_2 -Fenstern plaziert. Unter Verwendung des 100×-Objektives wurden Leistungen von 4.7 W/cm^2 erzielt. Die Spektren wurden im Bereich von 380 bis 1700 cm^{-1} aufgenommen. Um geeignete Signal-Rausch-Verhältnisse zu erhalten, betrug die Messzeit 10 s. Die Auflösung lag bei Einsatz eines Gitters mit 300 gr/mm^2 bei 2 cm^{-1} .

3.3.2 Bildung der in-situ Differenzspektren der Carotinoide

Die in-situ Differenzspektren der Carotinoide aus ganzen Pollenkörnern wurden durch Bestrahlung der Probe mit 633 nm gebildet, hierfür wurden mit Pausen von 5 s Spektren á 1 s aufgenommen. Der Abbau der Carotinoide wurde durch Nutzung des 100×-Objektives erreicht (1.9 W/cm^2). Diese Spektren wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, die Grenze bildete ein Spektrum, für das die Intensität des Signals bei 1520 cm^{-1} um die Hälfte zurückgegangen war. Aus diesen beiden Gruppen wurde jeweils ein Mittelwertspektrum gebildet. Die Differenz der Mittelwertspektren spiegelte die charakteristischen Merkmale der Caro-

tinoide wieder. Für diese Experimente wurde ein Gitter mit 300 gr/mm^2 eingesetzt, woraus sich eine Auflösung von 3 cm^{-1} ergab.

3.3.3 Parameter der Carotinoidmessungen

Die aufgetrennten Carotinoide wurden unter Verwendung der resonanten Anregung bei 488 nm direkt auf der HPTLC-Platte und die Referenzcarotinoide als Pulver auf CaF_2 -Fenstern gemessen. Um Veränderungen der Proben nach der Auftrennung zu vermeiden, wurde die Leistung des Laser nicht über $8.5 \times 10^{-2} \text{ W/cm}^2$ gesetzt. Dies wurde beispielsweise durch die Verwendung des $10\times$ -Objektivs oder durch den Einsatz von Filtern erreicht. Die Spektren der Referenzcarotinoide wurden mit einem Gitter mit 1800 gr/mm^2 aufgenommen, wodurch sich eine Auflösung von 0.65 cm^{-1} ergab. Unter Nutzung eines Gitters mit 300 gr/mm^2 konnten die Messzeiten verkürzt werden, damit ergab sich eine Auflösung von 5 cm^{-1} für die Messungen der aufgetrennten Carotinoide. Der Messbereich umfasste 300 bis 4000 cm^{-1} , die Messzeiten variierten von 1 bis 20 s .

3.3.4 Einstellungen der Mapping-Experimente

Für die zweidimensionale Darstellung der Intensitäten der Raman-Spektren über die Probenfläche wurde das Programm LabSpec (Horiba, Bensheim, Deutschland) benötigt. Es wurden Mapping-Experimente des Dünnschnitts der Roggenpollenkörner sowie von keimenden Pollenkörnern durchgeführt. Hierfür wurde der Probenstisch relativ zum $100\times$ -Objektiv bewegt, die Schrittlänge betrug $2 \mu\text{m}$ in jede Richtung. Für eine Messung des Roggenpollendünnschnitts betrug die Schrittweite in x -Richtung $1.5 \mu\text{m}$ und $3 \mu\text{m}$ in y -Richtung. In jedem Punkt des über die Probe gelegten Rasters wurde ein Raman-Spektrum mit einer Anregung von 785 nm , 15 mW und 10 s aufgenommen. Für die graphische Darstellung wurde die Fläche unterhalb einer per Hand ausgewählten Bande gegen die Ortskoordinaten mit Hilfe der Software Origin (OriginLab Corporation, Northampton, USA) aufgetragen.

3.3.5 Akquisition der oberflächenverstärkten Raman-Spektren

Für die oberflächenverstärkten Raman-Spektren der Wasserextrakte von Pappel-, Birken-, Salbei-, Ambrosia-, Hirse- und Roggenpollenkörnern wurden 0.2 mg der jeweiligen Pollenkörner in 100 μl Wasser gegeben. Diese Suspension wurde bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubiert. Dann wurden 2 μl der überstehenden Lösung abgenommen und 20 μl einer kolloidalen Goldlösung zugesetzt. Die kolloidale Goldlösung wurde entsprechend der Prozedur von Lee und Meisel hergestellt [64].

3.3.6 Spektrenvorbehandlung

Die tägliche Kalibrierung und Optimierung des Gerätes erfolgte anhand der Bande eines Siliciumwafers bei 520.7 cm^{-1} . Zur Kalibrierung der Spektren über den gesamten Messbereich wurde zusätzlich ein Spektrum $\Delta 10\text{ s}$ von 4-Acetamidophenol aufgenommen. Dann wurden die x-Achsen anhand der Positionen der Signale des 4-Acetamidophenols bei 390.9, 651.6, 857.9, 1168.5, 1323.9 und 1648.4 cm^{-1} kalibriert. Hierfür wurde das Programm GRAMS/AI (Thermo Scientific, Waltham, USA) genutzt.

3.4 FTIR-Messungen

Die FTIR-Messungen wurden an einem Equinox 55 Spektrometer (Bruker, Ettingen, Deutschland) ausgeführt. Das Mikroskop IRscope II wurde mit einem Quecksilber-Cadmium-Tellur-Detektor (engl.: *mercury cadmium telluride*, MCT) und einem $15\times$ Objektiv verwendet. Die Spektren wurden mit Quelle des mittleren infraroten (MIR) Bereichs im Transmissions-Modus aufgezeichnet. Es wurden 1024 oder 512 Scans im Bereich von 900 bis 4000 cm^{-1} aufgenommen. Der Blackman-Harris 3 Term und ein Zero-filling Faktor von 2 wurden ausgewählt und ergaben eine Auflösung von 4 cm^{-1} . Wie bei den Raman-Experimenten wurden die Proben auf CaF_2 -Scheiben gemessen.

IR-Spektren mit Anregung durch Synchrotronstrahlung wurden an der IRIS Beamline des Berliner Elektronenspeicherrings aufgenommen. Die Synchrotronstrahlung wurde als Lichtquelle in einem Nicolet (Thermo Scientific, Waltham, USA) Spektrometer verwendet. Das Spek-

trometer war an ein konfokales IR-Mikroskop von Nicolet (Thermo Scientific, Waltham, USA) gekoppelt. Das Mikroskop war mit einem Stickstoff gekühlten MCT-Detektor ausgerüstet und verfügte über eine verstellbare rechteckige Apertur, ein 32 \times -Objektiv und einen beweglichen Probenstisch. Die Spektren wurden in einem Bereich von 1000 bis 4000 cm^{-1} aufgezeichnet. Unter Verwendung der Apodisationsfunktion Hepp-Genzel und einem Zero-filing Faktor von 2 wurde eine Auflösung von 4 cm^{-1} erreicht.

3.5 Multivariate Datenauswertung

Die Spektrenvorbereitung für die multivariaten Verfahren beinhaltete zusätzlich zu der Spektrenvorbehandlung eine Korrektur der Basislinien, die Bildung der 1. Ableitung, eine Vektornormierung über den gesamten Spektralbereich und eine Glättung über neun Punkte. Für diese Operationen wurde die Software Origin (OriginLab Corporation, Northampton, USA) verwendet.

3.5.1 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse wurde unter Zuhilfenahme von Matlab (TheMathWorks, Natick, USA) und der PLS Toolbox (Eigenvector, Wenatchee, USA) verwirklicht. Die Raman-Intensitäten des gesamten spektralen Bereichs (380 bis 1700 cm^{-1}) aller Spektren wurden in eine Datenmatrix eingeladen. Für die Ausführung der Hauptkomponentenanalyse wurde der Befehl „pca“ verwendet. Die Korrelation der Faktorwerte ausgewählter Hauptkomponenten gegeneinander wurde mit „scatter3“ erreicht.

3.5.2 Clusteranalyse

Die Clusteranalyse wurde mit der Software OPUS NT (Bruker, Ettlingen, Deutschland) realisiert. Der gesamte spektrale Bereich von 380 bis 1700 cm^{-1} konnte eingelesen werden. Hierfür mussten die Spektren im OPUS-Format vorliegen. In der Clusteranalyse wurden die spektralen Distanzen über den quadrierten Euklidischen Abstand bestimmt und die Dendrogramme unter Anwendung des Wards Algorithmus erstellt.

3.5.3 Künstliche neurale Netze

Für die Analyse der multivariaten Daten unter Nutzung künstlicher neuraler Netze wurde die Software SNNS (Universität Stuttgart, Stuttgart, Deutschland) eingesetzt. Um die Werte der Raman-Intensitäten in die Software einlesen zu können, wurden diese in dem Programm Origin (OriginLab Corporation, Northampton, USA) transponiert und als Textdatei exportiert. Die Auswahl des Spektralbereiches wurde anhand von visuellen Unterschieden in den Spektren getroffen. Für die Differenzierung der Spektren von Gräser- und Baumpollen wurde der Bereich von 1580 bis 1675 cm^{-1} ausgewählt. Dieser Bereich umfasste 68 Datenpunkte, woraus sich 68 Eingabeeinheiten ergaben. Die Netztopologie wurde durch die Variation der verdeckten Schichten von 0 bis 10 optimiert. Für die Diskriminierung dieser beiden Klassen wurde eine Ausgabeeinheit benötigt. Als Lernalgorithmus wurden die folgenden Verfahren der SNNS-Software getestet: Backpropagation, BackpropMom, Rprop, Quickprop.

3.6 HPTLC-Messungen

Um Carotinoide aus Pollenkörnern zu extrahieren, wurden Pollenkörner von sechs Arten gesammelt: Weisse Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*), Salweide (*Salix caprea*), Götterbaum (*Ailanthus altissima*), Gewöhnliche Esche (*Fraxinus fragilis*), Steinweichel (*Prunus mahaleb*) und Sommerlinde (*Tilia platyphyllus*). Diese wurden direkt nach dem Pflücken mit Aceton extrahiert bis die Extraktionslösung farblos blieb. Für die Einwaagen von 6.2, 2.7, 8.6, 10, 62 und 10.7 mg wurden zwischen 300 bis 900 μl Aceton benötigt.

Alle Experimente wurden im verdunkelten Labor durchgeführt, um der Zersetzung der Carotinoide vorzubeugen. Als externe Standards wurden Lösungen von Zeaxanthin, Cryptoxanthin, β -Carotin und Lutein in Aceton angefertigt. Zur Kalibration wurden die Stammlösungen im Verhältnis 1:1:1:1 (v/v) gemischt und mit n-Hexan verdünnt. Die Standard- und die Probenlösungen wurden mit einem Volumen von 0.5 bis 15 μl mit einem automatischen Probenapplikator Automatic TLC Sampler IV (CAMAG, Muttenz, Schweiz) aufgetragen. Die Breite der Probenspots betrug 5.3 mm, der Abstand zwischen den einzelnen Spots lag bei 9.4 mm. HPTLC-Platten (Merck, Darmstadt, Deutschland) aus Kieselgel ohne Lumineszenzindikator wurden verwendet. Direkt nach

Tabelle 3.1: Variation des Lösungsmittelsystems für die HPTLC/AMD-Trennung

Lauf Nr.	THF [Vol %]	Dichlormethan [Vol %]	n-Hexan [Vol %]
1	10	90	0
2	9	91	0
3	8	92	0
4	7	93	0
5	6	94	0
6	5	95	0
7	4	96	0
8	3	97	0
9	0	80	20
10	0	60	40
11	0	40	60
12	0	30	70
13	0	20	80
14	0	10	90
15	0	0	100

dem Trocknen wurden die Platten in der AMD II Einheit mit Hilfe eines Eluationssystems bestehend aus Tetrahydrofuran, Dichlormethan und n-Hexan entwickelt. Wie die Zusammensetzung dieses Systems variiert wurde, ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Es wurden Spektren im ultravioletten und sichtbaren (engl.: *ultra-violett and visible*, UV/Vis) Bereich von 250 bis 650 nm aufgenommen, um die optimale Wellenlänge für die Quantifizierung zu ermitteln. Die quantitative Auswertung wurde bei 425 nm mit einer Öffnung von 4.0×0.3 mm und einer Scan-Geschwindigkeit von 20 mm/s durchgeführt. Abhängig von dem zu betrachtenden Bereich wurde die Kalibration auf Grundlage einer linearen oder polynominalen Regression durchgeführt, die Fläche des Signals wurde für die quantitative Auswertung betrachtet.

3.7 NMR-Messungen

Für die Festkörper-NMR-Spektren standen ein Bruker DMX-400-(9,4 T) und ein Bruker Avance-600-(14,1 T) Spektrometer (Bruker BioSpin,

Rheinstetten, Deutschland) zur Verfügung. Die hochaufgelösten NMR-Spektren wurden am Bruker DMX-400-Spektrometer aufgenommen. Die Eichung der ^{13}C -Spektren erfolgte an der Carboxylresonanz von Glycin zu $\delta_{13\text{C}} = 176.2$ ppm. Die ^{31}P -Spektren wurden an einem kristallinem Hydroxylapatit, das im Folgenden mit P3 abgekürzt wird, zu $\delta_{31\text{P}} = 2.3$ ppm geeicht. Die Eichung der ^{19}F -Spektren erfolgte an Polytetrafluorethylen zu $\delta_{19\text{F}} = -121.9$ ppm.

Das hochaufgelöste ^1H -NMR-Spektrum wurde mit einem tbi-Probenkopf unter einer 30° Anregung und einer Experimentwiederholzeit von 30 s aufgenommen, wobei 64 Akkumulationen durchgeführt wurden.

Die Festkörper-MAS-NMR-Spektren wurden mit einem 4 mm H/X/Y-Probenkopf im Dualmodus unter MAS-Bedingungen aufgenommen, wobei während der Signaldetektion ^1H -entkoppelt wurde. Alle Experimente wurden an den Referenzsubstanzen Glycin und P3 optimiert. Die ^1H - $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -CP-MAS-NMR-Spektren wurden bei einer Probenrotationsfrequenz von 13 kHz und einer Experimentwiederholzeit von 2 s am Bruker DMX-400 aufgenommen. Ebenfalls am Bruker DMX-400 wurde das $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -MAS-NMR-Spektrum bei einer Probenrotationsfrequenz von 13 kHz und einer Experimentwiederholzeit von 600 s aufgezeichnet. Es wurden 114 Akkumulationen durchgeführt. Das Bruker Avance-600 wurde eingesetzt um ^1H - $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -CP-MAS-NMR-Spektren und das $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -MAS-NMR-Spektrum zu generieren, die Parameter für die Probenrotationsfrequenz waren 12.5 kHz oder 12 kHz bei einer Experimentwiederholzeit von 2 s beziehungsweise 60 s. Das ^{19}F -MAS-SP-NMR-Spektrum wurde mit demselben Spektrometer aufgenommen bei einer Probenrotationsfrequenz von 22.5 kHz und einer Experimentwiederholzeit von 1 s.

3.8 Rasterelektronenmikroskopie unter Umgebungsbedingungen

Die Morphologie der Pollenkörner wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie unter Umgebungsbedingungen (engl.: *environmental scanning electron microscopy*, ESEM) untersucht. Hierfür wurde ein XL30 ESEM-FG (FEI Company, Hillsboro, USA) verwendet unter Nutzung der Rückstreuerelektronenabbildung (engl.: *backscattered electrons*, BSE) bei einer $400\times$, $500\times$ oder $2000\times$ Vergrößerung. Die angelegte

Spannung lag bei 15kV.

3.9 Pollenpräparationen

3.9.1 Exineaufreinigung mit Hydrogenfluorid [1]

200 mg der Pollenkörner wurden in einem Plastikgefäß mit 2 ml wasserfreiem Hydrogenfluorid (HF) in Pyridin überschichtet. Das Gefäß wurde mit Parafilm verschlossen und 5 Stunden bei 40 °C im Wasserbad erwärmt. Die Pollenkörner wurden durch Zentrifugation von der überstehenden Lösung abgetrennt und gewaschen bis ein neutraler pH-Wert erreicht wurde. Abschließend wurden die Pollenkörner zweimal mit Ethanol und einmal mit Methanol gewaschen.

3.9.2 Acetolyse nach Erdtman [1]

300 mg Pollenkörner wurden 5 Minuten in 50 ml einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure im Verhältnis 9 zu 1 im kochenden Wasserbad erwärmt. Die Lösung verfärbte sich braun. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung entfernt und mit 30 ml Eisessig überschichtet. Nach 60 Minuten wurden die Pollenkörner per Zentrifugation abgetrennt und wiederholt mit Wasser gewaschen.

3.9.3 Enzymatische Exineaufreinigung [2]

1 g der Pollenkörner wurde in einem Mörser mit 10 ml einer Mischung aus wässrigem N-Methylmorpholin-N-oxid (MMNO) und Cyclohexylamin (3:4) suspendiert. Nach 20 Minuten wurden 5 ml Wasser hinzugefügt und diese Suspension wurde für 2 Stunden gerührt. Anschließend wurde diese Mischung mit Wasser auf das dreifache Volumen aufgefüllt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Spuren der Reagenzien wurden durch viermaliges Waschen mit Wasser entfernt. Der Rückstand wurde resuspendiert in 24 ml 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) (pH-Wert 5.2) und erneut abgetrennt. Während dieser Behandlung trieben freigesetzte Sporoplasten an die Oberfläche und konnten zusammen mit der überstehenden Flüssigkeit entfernt werden. Nach erneuter Zugabe von 12 ml Pufferlösung wurden 120 mg Cellulysin, 160 mg Ma-

cerase und 16 mg BSA zugesetzt. Diese Suspension wurde bei 28 °C im Wasserbad gerührt. Nach 2 Stunden wurde mit 24 ml Wasser verdünnt und die Lösung abgetrennt, um die Enzyme zu entfernen. Der Rückstand wurde in 0.15 M Natriumchlorid (NaCl) resuspendiert und wieder abgetrennt. Um eine Gradientenzentrifugation durchführen zu können, wurde der Rückstand in 20 ml 0.15 M NaCl aufgenommen und in 2 Portionen à 10 ml aufgeteilt, welche in jeweils ein 50 ml Röhrchen gegeben wurden. Diese enthielten bereits 10 ml 1.08 und 1.12 g/ml Percoll. Nach einer Zentrifugation bei $3000 \times g$ für 30 Minuten wurde eine Auftrennung der Sporoplasten, Tetrade und Exine erreicht. Die freien Exine bildeten einen Rückstand am Boden des Gefäßes, sie wurden durch mehrmaliges Waschen mit Wasser gereinigt.

3.9.4 Exinereinigung mit Kaliumhydroxid nach [3]

In eine Fusion aus 2.54 g Kaliumhydroxid (KOH) und 0.5 ml Wasser (100 °C) wurden 19 mg Pollenkörner hinzugegeben. Die Reaktionsmischung verfärbte sich augenblicklich dunkel. Zum Auflösen der Reste des KOH wurde Wasser hinzugefügt. Der aus Pollenkörnern bestehende Niederschlag wurde abgetrennt und fünfmal mit Wasser und Ethanol gewaschen.

3.9.5 Freisetzen der Sporoplasten mit MMNO [4]

200 mg Pollenkörner wurden in 4 ml einer Lösung aus 60% wässriger MMNO, Cyclohexylamin und 0.29 M Saccharose suspendiert (2:1:1). Nach 120 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde die überstehende Lösung abgetrennt und der Niederschlag in 0.29 M Saccharose erneut suspendiert, dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Abschließend wurde mit Wasser gewaschen. Der Niederschlag enthielt Sporoplasten und Pollenhüllen. Auf eine weitere Auftrennung wurde verzichtet, da die zu analysierende Stelle durchs Mikroskop ausgewählt werden konnte.

3.9.6 Wasserextraktion

Es wurden ungefähr 30 mg Pollenkörner in ein Becherglas überführt, mit destilliertem Wasser überschichtet und für mehrere Stunden bei

6 °C gekühlt. Die überstehende Flüssigkeit, welche die wasserlösliche Fraktion der Pollen enthielt, wurde per Zentrifugation abgetrennt.

3.9.7 Auflösen ganzer Pollenkörner

Circa 200 mg Pollenkörner wurden mit 1 g der ionischen Flüssigkeiten 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (TMBC) oder 1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat (TMST) in einen Reaktionskolben gegeben. Dieser wurde in ein Ölbad überführt, welches auf 120 °C erhitzt wurde. Nach kurzer Zeit bildete sich eine klare Flüssigkeit. Für eine vollständige Acetylierung wurden 3 ml Essigsäureanhydrid hinzugefügt, die Lösung zeigte einen Farbwechsel zu braun. Die Ausfällung des acetylierten Produkts und dem Produkt der einfachen Umsetzung der ionischen Flüssigkeiten wurde durch Zusatz von Methanol erreicht. Der Niederschlag wurde abgetrennt und mit Methanol gewaschen. Die acetylierten Produkte waren unlöslich in Chloroform.

3.9.8 Kryodünnschnitte von Roggenpollenkörnern

Für die Kryoschnitte wurden Roggenpollenkörner in einem Tropfen Gefriermedium (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) auf einem Stück Kork in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Unter Verwendung eines Kryostaten bei 20 °C (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden Schnitte mit einer Dicke von 10 μm erzeugt. Die Schnitte wurden auf CaF_2 -Scheiben getrocknet und gemessen.

3.10 Keimung von Pollen

Es wurde jeweils eine Spatelspitze der Pollenkörner mit 2 ml der Nährlösung in eine Petrischale überführt. Nach 24 und 48 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Ansätze in Eppendorf-Gefäße überführt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Drei Nährlösungen wurden getestet, die Zusammensetzungen sind nachstehend aufgeführt. 50 ml der ersten Lösung enthielten 12.46 g (36.40 mmol) Saccharose, 12.60 mg (0.05 mmol) Calciumnitrat-Tetrahydrat und 2.80 mg (0.05 mmol) Borsäure [65]. Die Bestandteile der zweiten Lösung waren 5.54 g (16.19 mmol) Saccharose, 5.50 mg (0.02 mmol) Calciumnitrat-Tetrahydrat und 3.00 mg (0.05 mmol) Borsäure [65]. Für die Darstellung der dritten Lösung wurden 14.17 g (41.40 mmol) Saccharose, 7.90 mg (0.13 mmol) Borsäure, 9.40 mg (0.13

mmol) Kaliumchlorid, 2.34 mg (0.02 mmol) wasserfreies Calciumchlorid zugegeben, der pH-Wert wurde unter Zugabe von MES bei pH 5.5 fixiert [66].

Kapitel 4

Klassifizierung von Pollenspektren

4.1 Stand der Forschung

Die Identifizierung und Klassifizierung von Pollen ist ein wichtiges Werkzeug in der Pflanzentaxonomie und Paleontologie. Des Weiteren kann die Identifizierung fossiler Pollenfunde Rückschlüsse auf die Besiedlungsgeschichte historischer Gebiete oder die Entwicklung von Vegetationszonen geben [15]. Auch zur Behandlung von Pollenallergien kann die Identifizierung von Pollenkörnern wichtig sein. Routinemäßig werden Pollenkörner anhand der Form und Textur der Oberfläche mittels lichtmikroskopischer Untersuchung identifiziert [67]. Diese Methode ist zeitaufwendig und personalintensiv, deswegen wird versucht neue, schnellere, genauere Methoden zu entwickeln.

Eine vielversprechende Methode basiert auf der Aufnahme von dreidimensionalen Fluoreszenzbildern, welche durch sogenannte vektorunterstützte Maschinen (engl.: *support vector machines*, SVM) ausgewertet werden [68]. Neben diesem Ansatz gibt es auch einige schwingungsspektroskopische Versuche Pollenkörner zu klassifizieren [69, 70]. So wurden 20 Pollenarten mit der FTIR-Spektroskopie untersucht [67]. Es gelang, Pollenspezies der gleichen Gattung zu unterscheiden, dies ist mit Hilfe der Lichtmikroskopie unmöglich. Jedoch wurden große Probenmengen benötigt, um Kaliumbromid-Presslinge herzustellen [67].

Durch Messung in abgeschwächter Totalreflexion konnte die benötigte Probenmenge kaum reduziert werden, es wurden immer noch mehrere Milligramm Pollen benötigt [70]. Auch die Leistungsfähigkeit Raman-spektroskopischer Methoden wurde getestet. Anregung im UV-Bereich mit 257 nm wurde genutzt, um Bakterien von Pollen anhand der resonanzverstärkten Raman-Banden im Bereich von 1600 bis 1660 cm^{-1} zu unterscheiden [71]. Manoharan *et al.* vermuteten, dass diese Banden von der Exine generiert werden [71]. Im SERS-Experiment bei 514 nm gelang ebenfalls die Diskriminierung von Bakterien und Pollen [69]. Mit der gleichen Anregungswellenlänge wurden unverstärkte Raman-Spektren aufgenommen und mit Hilfe einer Clusteranalyse klassifiziert [72]. Aber die erzielten Diskriminierungsleistungen zwischen den Pollenspezies der genannten Raman-Studien waren nicht zufriedenstellend [71, 69, 72]. Gründe hierfür waren ungeeignete experimentelle Bedingungen. Beispielsweise ergaben sich Messzeiten von 90 Minuten, da die Analyse kommerzieller Pollenproben durch einen hohen Fluoreszenzuntergrund gestört wird [72]. Auch andere analytische Verfahren erwiesen sich bisher als unzureichend für eine effiziente Klassifizierung und Identifizierung von Pollenproben. Basierend auf der Clusteranalyse von ^{13}C -NMR-Spektren konnten moderne Pollenkörner von fossilen Pollenkörnern und Sporen unterschieden werden [73]. Eine Speziesunterscheidung innerhalb dieser Gruppen gelang nicht. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die benötigte Probenmenge von ungefähr 100 mg [73]. Andere Techniken wie die laserinduzierte Plasmaspektroskopie als elementspezifische Methode erwiesen sich als ungeeignet [74]. So ließen sich die Unterschiede in den Spektren der untersuchten Pollenspezies auf die Anbaugelände der Pflanzen und deren Düngung zurückführen. Eine Klassifizierung aufgrund der biologischen Gattung der Pollenkörner konnte nicht erreicht werden [74]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zwar zahlreiche analytische Verfahren zur Diskriminierung von Pollenarten getestet wurden, aber es konnte noch keine ausreichende Grundlage für eine effiziente Identifizierung von Pollenproben geschaffen werden.

4.2 Potential der Schwingungs-Spektroskopie

Die Grundlagen für eine automatische Detektionsmethode, wie sie für Pollenflugwarnungen benötigt würde, sind noch nicht geschaffen. In dieser Arbeit soll das Potential der schwingungs-spektroskopischen Methoden für die Klassifizierung und Identifizierung von Pollen untersucht werden. Dafür sollen in diesem Abschnitt zuerst die Vor- und Nachteile der IR- als auch der Raman-Spektroskopie erläutert werden.

Mit der Raman-Spektroskopie kann eine höhere Auflösung erzielt werden. Unabhängig von der durch die Beugungsgrenze bedingten geringeren Ortsauflösung wird die Auflösung eines IR-Mikroskops durch das Signal-Rausch-Verhältnis begrenzt. Bei Verwendung eines Messflecks von $20\ \mu\text{m}$ (zum Beispiel erreicht durch eine Blende von $0.3\ \text{mm}$ bei Verwendung eines $15\times$ -Objektivs) ist die Aufnahme auswertbarer Spektren einzelner Pollenkörnern schwierig. Es müßten sehr lange Messzeiten gewählt werden. Im Gegensatz hierzu ist die Untersuchung individueller Pollenkörner mit Hilfe der verwendeten Raman-Apparatur ohne Probleme durchzuführen.

Eine Möglichkeit, den erwähnten Nachteil der IR-Spektroskopie zu überwinden, besteht in der Nutzung einer Synchrotronquelle. Durch die hohe Brillanz dieser Quelle kann auch bei kleinen Probenvolumina ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erzielt werden. In Abbildung 4.1 ist das Spektrum eines einzelnen Fliederpollenkorns abgebildet. Dies wurde an der IRIS-Beamline bei BESSY II aufgenommen. Allerdings ist die Nutzung dieser Strahlungsquelle für eine Routineanwendung, wie sie im Falle von Pollenflugwarnungen notwendig wäre, nicht denkbar.

Beim Vergleich der IR- und Raman-Spektren in den Abbildungen 4.2 und 4.1 wird deutlich, dass die Raman-Spektren eine Vielzahl schmaler, diskreter Banden aufweisen, dies könnte sich für die Entwicklung effizienter Auswertemethoden als Vorteil erweisen. Aus der vorangegangenen Diskussion ergibt sich eine bessere Eignung der Raman-Spektroskopie für eine automatische On-line-Detektion. Diese soll mit Variation einiger Parameter gegenüber den in Abschnitt 4.1 vorgestellten Verfahren optimal genutzt werden. So könnte durch die Nutzung einer Anregungswellenlänge im nahen infraroten (NIR) Bereich, unter Verwendung empfindlicher Detektoren, mittels eines geeigneten experimentellen Aufbaus sowie der Auswahl frisch gesammelter Pollenkörner

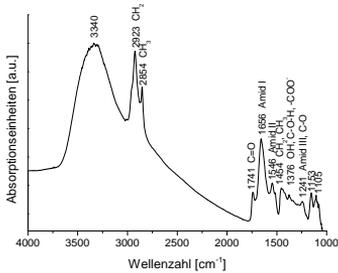


Abbildung 4.1: FTIR-Spektrum eines einzelnen Pollenkorns angeregt mit Synchrotronstrahlung ($3 \times 3 \mu\text{m}$)

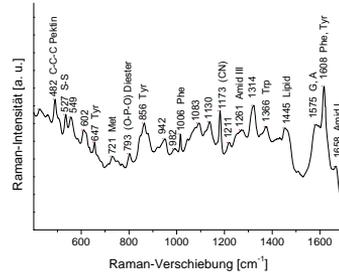


Abbildung 4.2: Raman-Spektrum eines einzelnen Pollenkorns (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm^2)

als Probe das Potenzial der Raman-Spektroskopie für die Klassifizierung von Pollenkörnern ausgeschöpft werden.

4.3 Experimentelle Voraussetzungen

In einem Raman-Spektrum überlagern sich die Informationen aller chemischen Gruppen einer Probe, deshalb kann ein Raman-Spektrum als Fingerabdruck einer Probe verstanden werden. Die Peaks in einem Raman-Spektrum eines Pollenkorns lassen sich Molekülen wie zum Beispiel Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen zuordnen.

Mit einem Raman-Mikroskop, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, bei Anregung im NIR ergeben sich Eindringtiefen von mehreren Millimetern. Unter Berücksichtigung der Größe eines Pollenkorns von 15 bis $60 \mu\text{m}$, kann angenommen werden, dass Banden aus der Exine, Intine und dem Polleninneren generiert werden. Charakteristische Banden der Pollenproben und deren Zuordnungen sind in Abbildung 4.2 und Tabelle 4.1 aufgeführt.

Der Einfluss der biologischen Heterogenität, der Stabilität der Proben und des experimentellen Aufbaus auf die Spektren wurde in vorangestellten Experimenten untersucht. Veränderungen dieser Parameter können sich in den Spektren niederschlagen und so die Ergebnisse der Clusteranalyse beeinflussen. Für die Untersuchung der Stabilität des

Tabelle 4.1: Zuordnung bedeutender Banden im Spektrum eines Pollenkorns (U = Uracil, C = Cytosin, A = Adenin, G = Guanin, Trp = Tryptophan, Phe = Phenylalanin, Tyr = Tyrosin, Met = Methion)

Peak [cm^{-1}]	Molekül	Zuordnung
1661	U, C, G	C=O Streckschwingung
1650	Amid I	C=O Streckschwingung
1585	Phe, Tyr	
1573	G, A	
1533	Carotinoid	ν_1 (C=C Streckschwingung)
1450	Lipide	CH ₂ Biegeschwingung
1369	Trp	Indolring
1280	Amid III	C-N Streckschwingung (C-N-H Biegeschwingung)
1279	Carotinoid	ν_5
1198	Tyr, Phe	
1191	Carotinoid	ν_4
1177	Nukleotide	C-N Streckschwingung
1164	Carotinoid	ν_2 (C-H und C-C Streckschwingung)
1030	Phe	C-C Ring Biegeschwingung
1012	Trp	
1010	Carotinoid	ν_3 (CH ₃ Kippschwingung)
1005	Phe	C=C Ring-Atemschwingung
968		CH ₃ symmetrische Streckschwingung
960	Carotinoid	ν_6
850/830	Tyr	Ring-Atemschwingung
780		O-P-O Streckschwingung
717	Met	C-S Streckschwingung
648	Tyr	C-C Ring-Twist
620	Phe	C-C Ring-Twist
583		
526	Cystein	S-S Streckschwingung
480		C-C-C Gerüstschwingungen

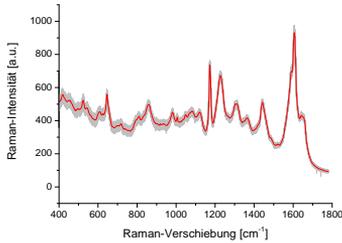


Abbildung 4.3: Spektren eines Ambrosiapollenkorns gemessen über einen Zeitraum von 3 Stunden

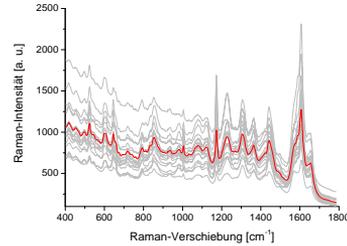


Abbildung 4.4: Mittelwertspektrum (rot) aus 16 Messungen einzelner Ambrosiapollenkörner

Aufbau und der Probe wurden über einen Zeitraum von drei Stunden 76 Spektren à 10s von einem Pollenkorn der Spezies *Ambrosia* aufgenommen. Wie in Abbildung 4.3 zu erkennen ist, variieren die Intensitäten der Spektren nur geringfügig. Daraus folgt, dass der Aufbau und die Probe über diesen Zeitraum stabil sind.

Um die Unterschiede zwischen individuellen Pollenkörnern einer Spezies und die möglichen Auswirkungen der biologischen Variabilität auf die Klassifizierung zu testen, wurden zwei Experimente durchgeführt. Zuerst wurden Raman-Spektren von 16 *Ambrosia*-Pollenkörnern aufgenommen, um die Variation zwischen den Spektren individueller Pollenkörner einer Spezies zu untersuchen. Das Mittelwertspektrum dieser Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen ist in Abbildung 4.4 zu sehen. Da diese Pollenkörner käuflich erworben wurden, ist unsicher, ob sie von derselben Blüte, derselben Pflanze oder von verschiedenen Pflanzen stammen. Deswegen wurde ein zweites Experiment durchgeführt, in dem die Gruppierung der Spektren von Pollenkörnern individueller Bergahorn-Bäume untersucht wurde. Die Pollenkörner wurden an unterschiedlichen Standorten innerhalb Berlins gesammelt: Wilhelm-Ostwald-Straße (Adlershof, Probe: B1), Weigandufer (Neukölln, Probe: B2), Saalestraße (Neukölln, Probe: B3), Glasbläseriesei (Adlershof, Probe: B4) und Richard-Willstätter-Straße (Adlershof, Probe: B5). Auf diese Weise sollte geprüft werden, ob der Standort der Bäume die Klassifizierungsexperimente beeinflusst. Jeweils drei Spek-

tren von Pollenkörnern individueller Bäume wurden für die Clusteranalyse verwendet. Das resultierende Dendrogramm ist in Abbildung 4.5 dargestellt. Es beweist, dass der Standort des Baumes keinen Einfluss auf die Gruppierung der Spektren hat.

Die richtige Lagerung der Pollenkörner ist wichtig für die Vergleichbarkeit der Spektren frischer und gelagerter Proben. Welche Auswirkungen Alterung und Hitze auf die Membran der Pollenkörner haben können, wurde von Hoekstra *et al.* untersucht [75, 76]. Die Veränderungen, verursacht durch die Lagerung der Pollenkörner bei Raumtemperatur, wurden mit Hilfe der IR-Spektroskopie und der differentiellen Kalorimetrie (engl.: *differential scanning calorimetry*, DSC) untersucht [75]. Die Ergebnisse der DSC-Messungen offenbarten eine geänderte Struktur der Phospholipide in der Membran. In den IR-Spektren konnten keine Auswirkungen der Lagerung bei Raumtemperatur auf die Form und Lage der Amid I Bande festgestellt werden [75, 77], was Veränderungen der Proteinstruktur ausschließt.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Lagerung der Pollenkörner bei Raumtemperatur auf die Raman-Spektren untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Das untere Spektrum (4.6 b) wurde von dem Pollenkorn eines Fuchsschwanzes (*Alpecurus pratensis*) direkt nach dem Sammeln aufgezeichnet. Der Effekt, den die Aufbewahrung bei Raumtemperatur für fünf Monate auf das Raman-Spektrum eines Pollenkorns derselben Art hat, ist in dem oberen Spektrum (4.6 a) deutlich zu erkennen. Es wurde ein Anstieg des Fluoreszenzuntergrundes beobachtet, und die relativen Intensitäten der Banden im Bereich um 1650 cm^{-1} änderten sich. Der Anstieg der Fluoreszenz tritt bei allen Pollenarten in Abhängigkeit von der Lagerung auf, dies steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen aus anderen Raman-Arbeiten [72]. Kommerzielle Pollenproben können für lange Zeiträume vor dem Erwerb eingelagert worden sein. Dieser Sachverhalt erklärt die Schwierigkeiten, die sich bei der Verwendungen dieser Proben ergaben [72]. Geologen nutzen die Intensität der Fluoreszenz zur Altersbestimmung fossiler Pollen [78].

Welche Folgen hohe Temperaturen und Dehydrierung auf den Zustand von Pollen haben, erläuterten Keijzer *et al.* [79]. Durch die Erhitzung der Pollenkörner wird ein Teil der Proteine denaturiert, nur Proteine in einer α -Helix Konformation bleiben stabil [79]. Der Umgang mit dehydrierten Pollenkörner ist kritisch. In hydrierten Pollenkörnern sind die polaren Köpfe der Phospholipide von Wasser umgeben, bei

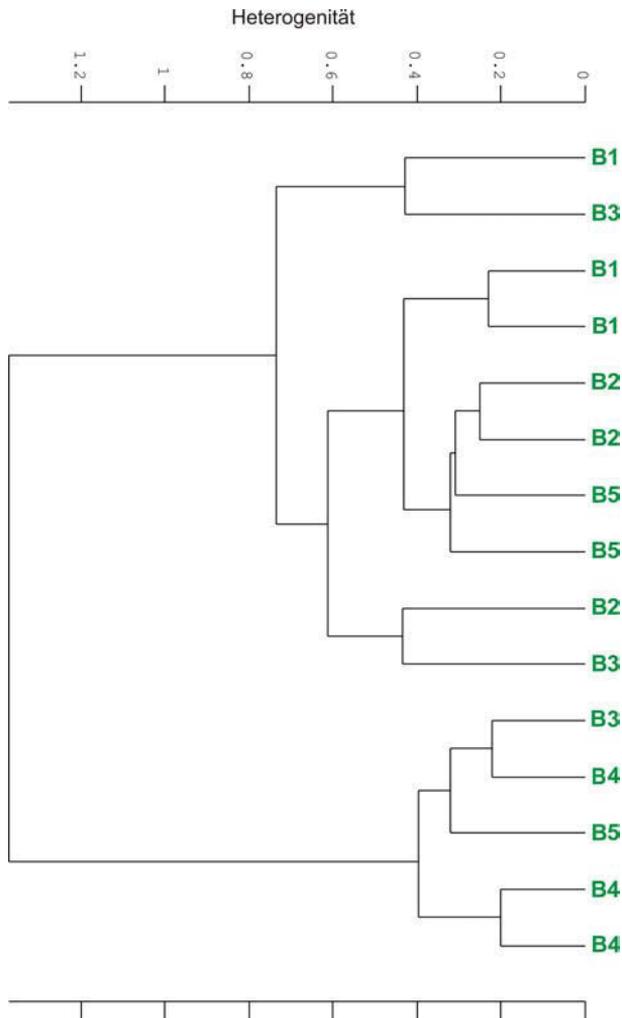


Abbildung 4.5: Dendrogramm basierend auf 15 Raman-Spektren von Pollenkörnern des Bergahorns (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²), gesammelt an fünf unterschiedlichen Standorten, bezeichnet mit B1 bis B5. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm⁻¹, Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards

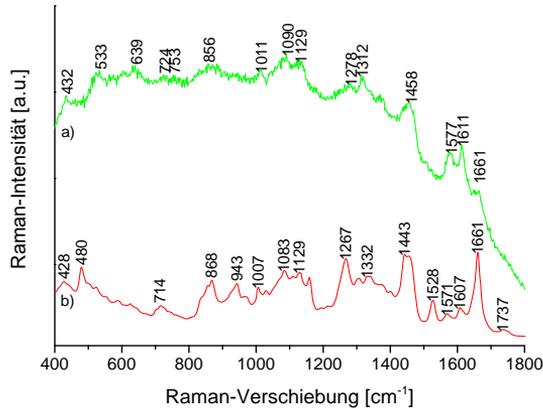


Abbildung 4.6: Raman-Spektren von Pollenkörnern des Fuchsschwanzes, a) nach Lagerung bei Raumtemperatur für fünf Monate, b) direkt nach dem Sammeln (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²)

Verlust des Wassers verringert sich der Abstand zwischen den Phospholipiden. Dies wirkt sich vorrangig auf die unpolaren Ketten aus, der Grund hierfür sind verstärkte Van-der-Waals-Wechselwirkungen. So wird die Belastung an den Kanten höher und Risse entstehen. Dem entgegen wirkt ein hoher Zuckeranteil, die Kohlenhydrate können die entstehenden Lücken ausfüllen und die Pollenkörner stabilisieren [79]. So sind dehydrierte Pollenkörner mit einem hohen Zuckeranteil lange stabil. Der Kontakt von trocken und kühl gelagerten Pollenkörnern mit Wasser hat zur Folge, dass die Pollenkörner platzen und Cytoplasma austritt. Verhindert wird dies durch kontrolliertes Auftauen der Proben bei erhöhter Temperatur (28°C) oder durch Sättigung des Pollenkorns mit Wasserdampf [80]. Allerdings ist die Speziesabhängigkeit dieser Verhaltensweisen nicht geklärt, die Versuche wurden zumeist mit Pollenkörnern der Art *Typha angustifolia* durchgeführt. Eine Untersuchung dreier weiterer Pollenspezies zeigte Abweichungen von diesem Verhalten [81]. Denkbar ist, dass die klimatischen Gegebenheiten des Habitats der Spezies die optimalen Lagerungsbedingungen bestimmen [82].

Ein Maß für die Vitalität von Pollen ist die Anzahl und Länge der ausgebildeten Pollenschläuche [77]. Die Keimfähigkeit der Pollenkörner wird in hohem Maße von der Art der Lagerung beeinflusst. Wichtige Faktoren sind dabei die Luftfeuchtigkeit und die Temperatur [82]. Pollenkörner, welche bei -20°C gelagert werden, weisen kaum Modifikationen der Keimfähigkeit auf.

Unter Berücksichtigung der Aspekte der Vitalität und Alterung wurden die Parameter der Lagerung für frisch gesammelte Pollenkörner wie folgt festgesetzt: Die Pollen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert, aufgetaut wurden die Pollenkörner im Exsikkator bei Raumtemperatur. Es wurde weder ein Aufplatzen der Pollenkörner noch ein Anstieg der Fluoreszenz in den Raman-Spektren beobachtet.

4.4 Hierarchische Clusteranalyse

Wie bereits erwähnt, kann ein Raman-Spektrum als Fingerabdruck einer Probe mit Beiträgen aller enthaltenen chemischen Gruppen verstanden werden. Die hierarchische Clusteranalyse (engl.: *hierarchical cluster analysis*, HCA) als unüberwachtes Verfahren fasst diese zu Gruppen zusammen. Zu einem Cluster vereint werden Raman-Spektren, die große Ähnlichkeit hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften besitzen. So konnte die HCA beispielweise erfolgreich für die Unterscheidung von gesundem und krankem Gewebe eingesetzt werden [83].

In dieser Arbeit wurde die Methode zunächst für die Klassifizierung kommerzieller Pollenproben entsprechend ihrer Spezies eingesetzt. Das Dendrogramm der Raman-Spektren in Abbildung 4.7 belegt, dass dies erfolgreich war. Die Spektren einer Pollenart bilden jeweils eine Gruppe, nur drei Spektren wurden falsch klassifiziert. Vergleichbare Ergebnisse erzielte eine Clusteranalyse von IR-Spektren derselben Proben (Abbildung 4.8). Beide Klassifizierungsexperimente bestätigen die Hypothese, dass die hierarchische Clusteranalyse zwischen Spektren von Pollen verschiedener Arten unterscheiden kann.

Allerdings stammen die Pollen dieser Klassifizierungsexperimente nicht nur aus unterschiedlichen Gattungen sondern auch aus verschiedenen Familien. So wurde für die folgenden Experimente die Anzahl der Pollenspezies erhöht und es wurden frisch gesammelte Pollenproben untersucht. Eine erste Clusteranalyse der Raman-Spektren dieser Daten

ergibt, dass die Spektren der Pollenkörner von Sommer- und Winterlinden sowie der Fliederspezies *Syringa vulgaris* und *Syringa persica* jeweils ein Cluster bilden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Klassifizierungsergebnis läßt sich ableiten, dass ein Zusammenhang zwischen dem Clusterverhalten der Pollenspektren und ihrer phylogenetischen Herkunft besteht. Zunächst konnten aufgrund der saisonalen Gegebenheiten 91 Spektren von 15 Pollenspezies aus 10 Familien untersucht werden. In dem Dendrogramm in Abbildung 4.9 ist zu erkennen, dass sich die Spektren einer Spezies jeweils in einem Cluster befinden. Auffällig ist die große Distanz des Clusters aus den Spektren der Pollenkörner von Sommerlinden, Kastanien und Salweiden zu den übrigen Spektren. Abbildung 4.11 a, c, e zeigt die Mittelwertspektren dieser drei Pollenspezies. Sie weisen Peaks mit hohen Intensitäten bei 1532, 1150 und 1005 cm^{-1} auf, dies sind charakteristische Peaks der Carotinoide. Im folgenden Kapitel, welches sich detailliert mit Carotinoiden in Pollen befasst, wird auf die präresonante Verstärkung (um circa eine Größenordnung) dieser Raman-Banden selbst bei 785 nm eingegangen [84]. Die resonanzverstärkte Signatur der Carotinoide überlagert die Banden der Pollenkomponenten in den Spektren der Kastanien-, Salweiden- und Sommerlindenpollenkörner, deshalb ähneln sich diese Spektren besonders stark und bilden ein eigenes Cluster.

Der Einfluss der Carotinoide auf die Klassifizierung kann eingeschränkt beziehungsweise umgangen werden, indem die Carotinoide vor der Aufnahme der Spektren gezielt abgebaut werden. Die Bestrahlung der Pollenkörner mit einem Laser der Wellenlänge 633 nm wirkt sich auf die Carotinoidsignatur in den Raman-Spektren der Pollenkörner aus. Die Intensitäten der charakteristischen Banden bei ungefähr 1005, 1150 und 1520 cm^{-1} gehen zurück, dies wird in Abbildung 4.12 gezeigt. Der zeitliche Verlauf der Zersetzung kann für die Carotinoidpeaks in einem Kastanienpollenkorn verfolgt werden, nach 70-minütiger Bestrahlung sind die Signalintensitäten auf Null gesunken. Diese Vorgehensweise wurde auf die Pollen der Kastanien, Sommerlinden und Salweiden übertragen. Mit den carotinoidfreien Spektren wurde erneut eine Clusteranalyse durchgeführt. Das sich ergebende Dendrogramm ist in Abbildung 4.10 zu sehen. Auch nach der Carotinoidkorrektur sind die Spektren entsprechend ihrer Arten trennbar. Ausnahmen sind die Spektren der Eichenpollenkörner und 4 % falsch klassifizierte Spektren. Die Unterschiede von Spektren der Pollen einer Gattung sind kleiner als zwischen den Gattungen. Beispiele für Spektren einer Gattung, die zu

4 Klassifizierung von Pollenspektren

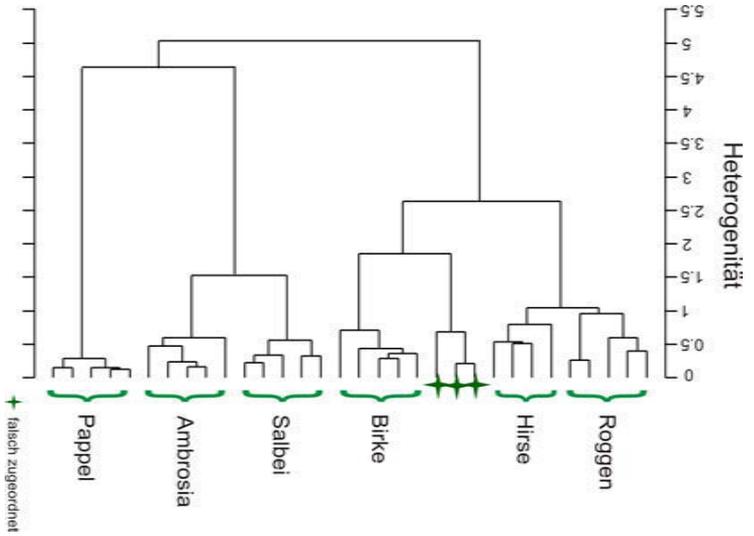


Abbildung 4.7: Dendrogramm basierend auf 32 Raman-Spektren (785 nm, 10s, 1,9 W/cm²) von 6 Pollenarten. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm⁻¹, Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards

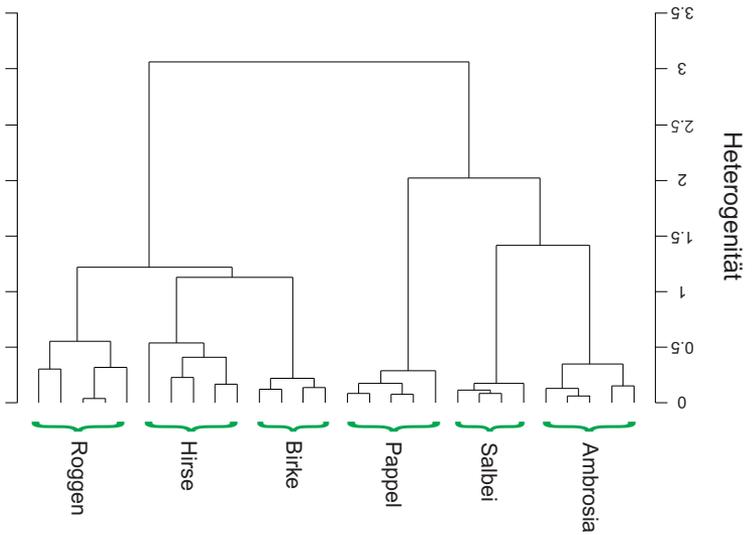


Abbildung 4.8: Dendrogramm basierend auf 28 FTIR-Spektren von 6 Pollenspezies. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 900 - 1800 cm⁻¹, Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards

4.4 Hierarchische Clusteranalyse

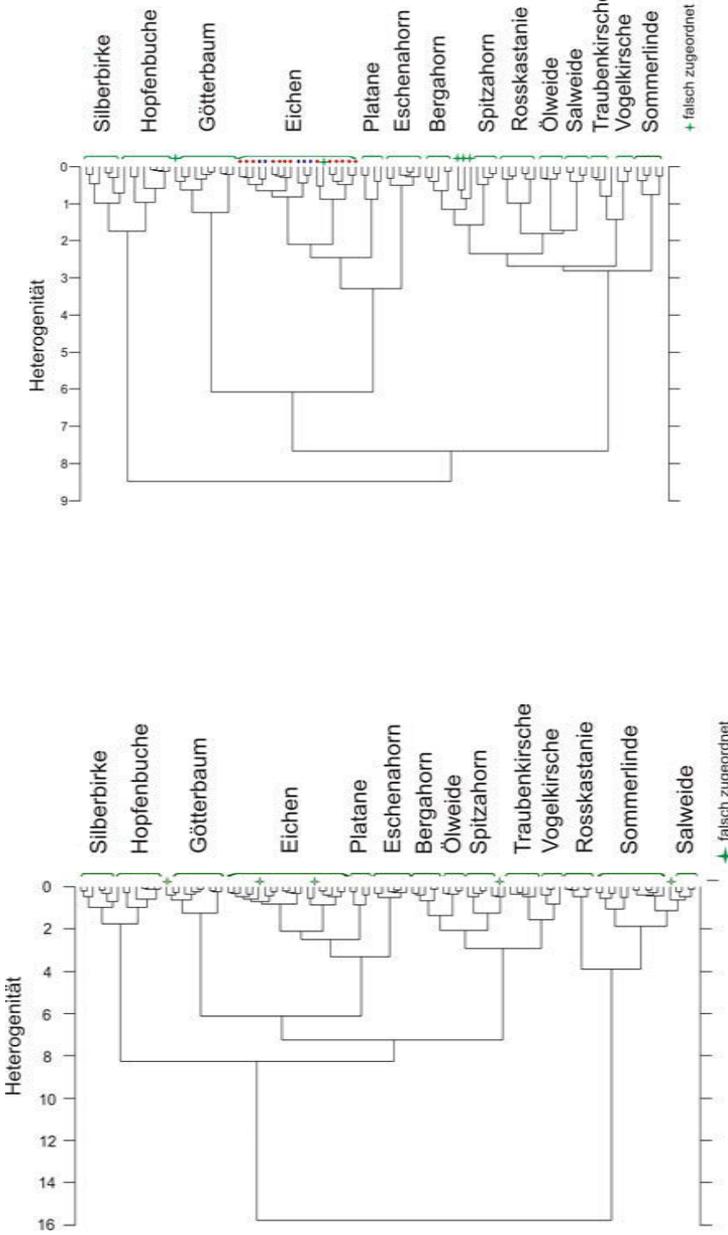


Abbildung 4.10: Dendrogramm basierend auf 91 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²) von 14 Baumarten. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm⁻¹, Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards

Abbildung 4.9: Dendrogramm basierend auf 101 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²) von 14 Baumarten. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm⁻¹, Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards

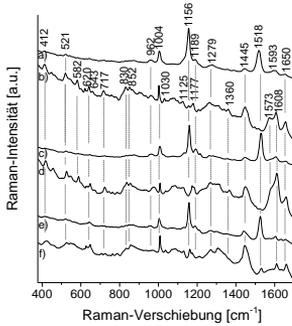


Abbildung 4.11: Spektren von a/b) Kastanien-, c/d) Sommerlinden- und e/f) Salweidenpollen vor und nach dem Bestrahlen mit 633 nm (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²)

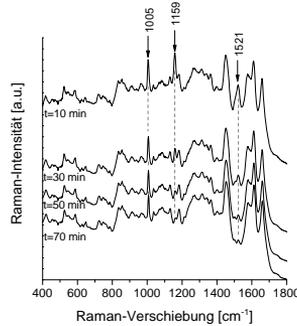


Abbildung 4.12: Raman-Spektren eines Kastanienpollenkorns nach 10, 30, 50 und 70 Minuten (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²)

einem Cluster zusammengefasst werden können, liefern die Spektren der Pollenkörner der Vogel- und Traubenkirschen sowie die Spektren des Berg- und Feldahorns. Die Spektren einer dritten Ahornart (dem Eschenahorn) gruppieren zusammen mit den Spektren der Eichen- und Platanenpollenkörner. Der Unterschied zwischen den Ahornarten könnte auf die Herkunft der Baumsorten zurückzuführen sein. Der Eschenahorn kommt aus Nordamerika, wohingegen Berg- und Feldahorn ursprünglich aus Asien stammen. Auffällig ist, dass die Spektren der Pollenkörner der Stiel- und der Roteichen keine Klassen bilden, die mit der Spezies korreliert werden können. Das Pollenkorn als Träger des männlichen Erbguts nimmt eine Schlüsselrolle bei der Befruchtung ein. Auch die Chemie des Pollenkorns stellt ein Element der Fortpflanzung zwischen zwei Arten dar. Die chemische Zusammensetzung der Eichenpollenkörner ist fast identisch, dies wird durch den Fingerabdruck der Raman-Spektren bestätigt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Hybridisierung zwischen Eichenspezies häufiger auftritt als bei anderen Pflanzenarten [85], scheint die Barriere für eine Fremdbefruchtung zwischen Eichen auffällig klein zu sein. Das wird in der chemischen Zusammensetzung der Pollenkörner reflektiert.

In der Systematik der Biologie befindet sich das Taxon der Familie über dem Taxon der Gattung, dieser Zusammenhang wird auch in dem Dendrogramm in Abbildung 4.10 gefunden. So bilden die Spektren der Pollenkörner der Birkengewächse ein eigenes Cluster (Weißbirke und Hopfenbuche). Ebenfalls in einer Gruppe befinden sich die Spektren der Pollenkörner der Rosskastanien, des Feld- und Bergahorns. Sie sind Mitglieder der Gattungen der Rosskastanien und der Ahorne, beide gehören zu der Familie der Seifenbaumgewächse. Erst nach dem Ausbleichen der Carotinoide ordnen sich die Spektren der Rosskastanienpollen in das Cluster der Seifenbaumgewächse ein, dies verdeutlicht die Notwendigkeit des Carotinoidabbaus vor der Spektrenaufnahme.

Diese Klassifizierungsergebnisse unterstützen die Annahme, dass sich die Unterschiede zwischen den einzelnen Arten in den Raman-Spektren widerspiegeln. Die Gruppierung der Raman-Spektren aufgrund der Zugehörigkeit zu einer Pollenspezies ist vielversprechend im Hinblick auf die Entwicklung einer automatischen On-line-Detektionsmethode. Nicht nur chemische Eigenschaften der Pollen lassen sich in den Raman-Spektren wiederfinden, sie reflektieren auch biologische Merkmale wie die phylogenetische Verwandtschaft der Pollenarten. Ein weiteres Indiz für die Korrelation zwischen dem chemischen Aufbau eines Pollenkorns und seiner biologischen Eigenschaften ist, dass es nicht gelang zwischen den Spektren der Stiel- und Roteiche zu unterscheiden. Das biologische Äquivalent hierzu ist die weit verbreitete Hybridisierung zwischen Eichen.

4.4.1 Reproduzierbarkeit

Voraussetzung für den Aufbau einer automatischen On-line-Detektionsmethode ist eine Datenbank mit einer Vielzahl an Raman-Spektren verschiedener Pollenarten. Diese Datensammlung muß fortlaufend erweitert werden, um zu gewährleisten, dass Schwankungen aufgrund ökologischer, klimatischer und geographischer Veränderungen berücksichtigt werden. Im Verlauf dieser Arbeit wurde dementsprechend die Anzahl der untersuchten Pollenspezies gesteigert, so dass 250 Spektren von 37 Baumpollenspezies aus 12 Familien sowie 45 Spektren von 9 Gräserpollenspezies hinzugefügt werden konnten. Es wurden die gleichen Parameter unter Auswertung des gesamten Spektralbereichs (380 bis 1700 cm^{-1}) wie zuvor für die Clusteranalyse verwendet. Das Klassifizierungsergebnis ist in Abbildung 4.13 zu sehen.

4 Klassifizierung von Pollenspektren

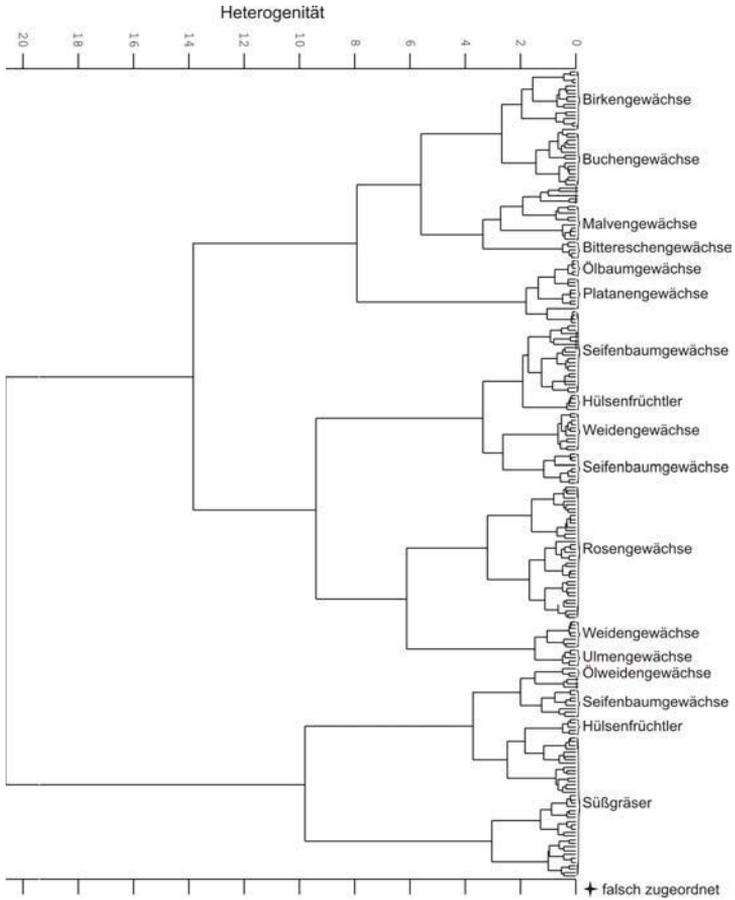


Abbildung 4.13: Dendrogramm basierend auf 250 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²) von 37 Baumpollenarten und 9 Gräserpollenspezies. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm⁻¹, Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards

4.4 Hierarchische Clusteranalyse

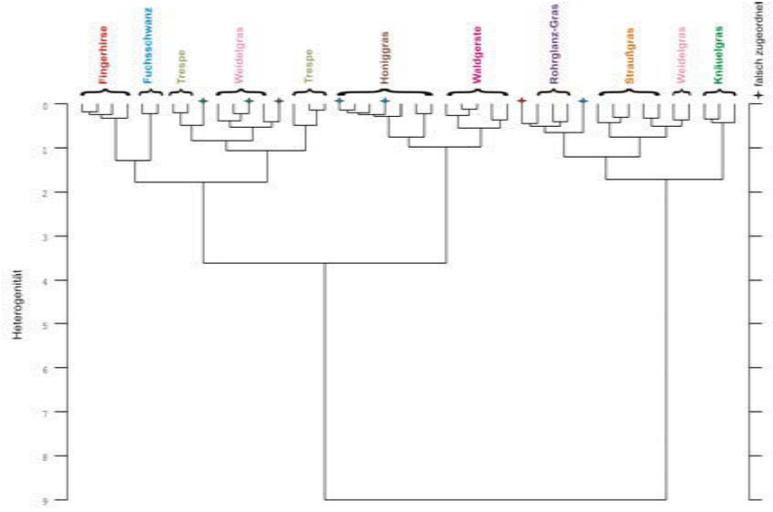


Abbildung 4.15: Dendrogramm basierend auf 45 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²) von 9 Gräserpollenspezies. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm⁻¹, Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards

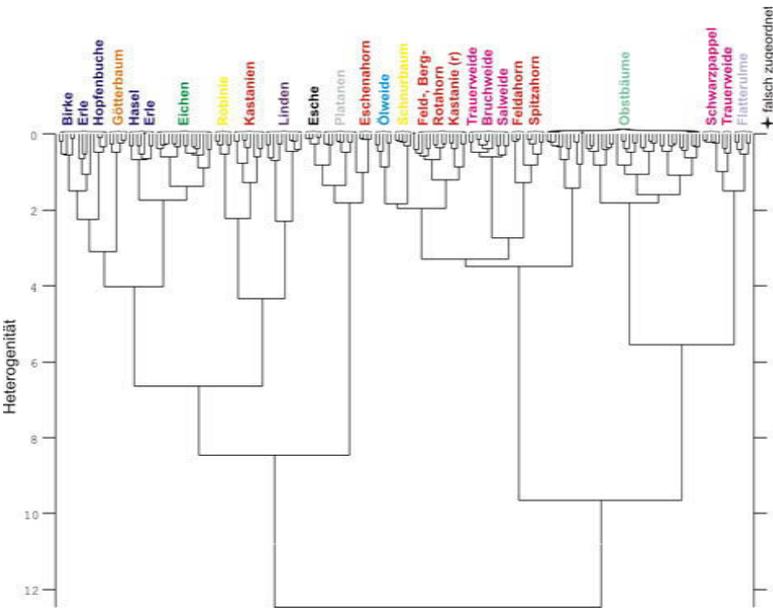


Abbildung 4.14: Dendrogramm basierend auf 205 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²) von 37 Baumpollenarten. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm⁻¹, Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards

Um die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gruppen der Baum- und Gräserpollenkörner untersuchen zu können, wurden zwei separate Clusteranalysen durchgeführt. Das Klassifizierungsergebnis in Abbildung 4.14 zeigt die Gruppierung der Spektren der Baumpollen, das Dendrogramm in Abbildung 4.15 stellt die Ergebnisse der Clusteranalyse der Spektren der Gräserpollen dar. Bezugnehmend auf diese drei Clusteranalysen kann festgestellt werden, dass die Klassifizierung der Pollenspektren aufgrund der Spezieszugehörigkeit gelingt. Des Weiteren tritt auch eine Gruppierung entsprechend der taxonomischen Familie, wie schon in Abbildung 4.10 beobachtet wurde, auf. Eine Ausnahme bilden die Seifenbaumgewächse, die Spektren der Pollenkörner dieser Familie bilden drei Cluster. Aber auch dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Clusteranalysen. Wie dort besprochen, beeinflusst die geographische Herkunft der Pflanzen der Seifenbaumgewächse das Klassifizierungsergebnis.

Die Klassifizierung der Spektren der Gräserpollen ist weniger zuverlässig als die analoge Klassifizierung der Spektren der Baumpollen. 15 % der Spektren der Gräserpollen sind falsch zugeordnet. Demgegenüber stehen 1.5 % falsch klassifizierte Spektren der Baumpollen. Vermutlich sind die Unterschiede der chemischen Zusammensetzung der Gräserpollen zu gering, da die untersuchten Gräser alle der Familie der Süßgräser angehören. Somit ist diese Gruppe homogener als die Gruppe der Baumpollen, die Pollenspezies verschiedener Familien enthält. Außerdem wurde für alle Clusteranalysen der gesamte spektrale Bereich von 380 bis 1700 cm^{-1} verwendet, um die hierarchische Clusteranalyse als vollständig unüberwachtes Verfahren anzuwenden. Die Unterschiede auf molekularer Ebene zwischen den untersuchten Grasarten können sehr gering sein, so dass sie nur in kleinen Bereichen des Spektralbereichs nachgewiesen werden können. Dies wurde auch bei vielen hierarchischen Clusteranalysen zur Klassifizierung von Mikroorganismen beobachtet. Meistens wurde für diese ein schmaler Wellenzahlenabschnitt ausgesucht oder ein überwachtes Verfahren ausgewählt [86, 87]. So sind die in dieser Arbeit erzielten Klassifizierungsergebnisse bei Verwendung des gesamten Wellenzahlenbereiches um so erfreulicher. Unter Verwendung ausgesuchter Wellenzahlenbereiche könnte die Diskriminierung zwischen den verschiedenen Arten der Gräserpollenkörner weiter verbessert werden. Allerdings sollte in dieser Arbeit die hierarchische Clusteranalyse als unüberwachtes Verfahren angewendet werden als Vorbereitung für die im weiteren Verlauf dieser Arbeit an-

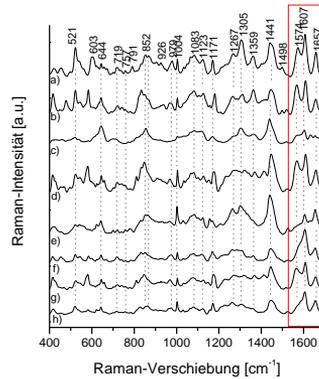


Abbildung 4.16: Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²) einzelner Pollenkörner der a) Stieleiche, b) Flatterulme, c) Winterlinde, d) Eberesche, e) Sommerlinde, f) Salweide, g) japanische Kirsche h) Bergahorn, der Bereich von 1530 bis 1700 cm⁻¹ ist rot umrandet

gewandten multivariaten Verfahren. Auch mit den ausgewählten Parametern unter Verwendung des gesamten spektralen Bereichs wird eine ausreichende Trennung der Cluster der Spektren der Baumpollenkörner und der Gräserpollen im Dendrogramm 4.13 erreicht.

Überraschenderweise befinden sich die Spektren der Robinienpollenkörner ebenfalls in dem Cluster der Gräserpollenkörner. Die Spektren der Gräserpollenkörner unterscheiden sich deutlich im Bereich von 1500 bis 1700 cm⁻¹ hinsichtlich der relativen Intensitäten von den Spektren der Baumpollenkörner (vergleiche mit den Abbildungen 4.16 und 4.17). Die Spektren der Robinienpollenkörner gleichen den Gräserpektren. Es lässt sich sagen, dass die Bande um 1660 cm⁻¹ mit hohen Intensitäten und der Peak bei 1607 cm⁻¹ nur mit geringen Intensitäten in den Spektren der Gräserpollenkörner auftritt. Bei den Spektren der Baumpollenkörner verhält es sich entgegengesetzt, hier ist die Intensität der Bande bei 1607 cm⁻¹ hoch und niedrig für die Bande um 1660 cm⁻¹.

Um einen Vergleich der Daten aus zwei aufeinander folgenden Jahren durchführen zu können, wurde das Dendrogramm in Abbildung 4.18 erstellt. Es wurden Spektren gleicher Spezies aus zwei Messreihen miteinander verglichen. Die Spektren einer Spezies bilden ein Cluster,

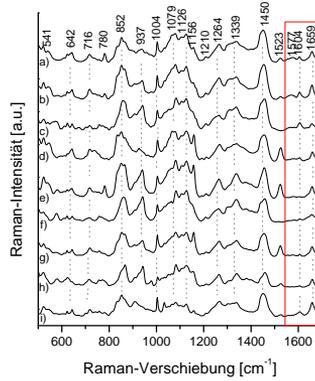


Abbildung 4.17: Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm^2) einzelner Pollenkörner der a) Rohrglanz, b) Fingerhirse, c) Fuchsschwanz, d) Straußgras, e) Weidelgras, f) Honiggras, g) Trefle, h) Waldgerste, i) Robinie, der Bereich von 1530 bis 1700 cm^{-1} ist rot umrandet

teilweise kann zwischen den Spektren der beiden Messreihen nicht unterschieden werden. Beispiele hierfür sind die Spektren der Pollenkörner der Eichen, Hopfenbuchen und Ölweiden. Die Spektren der Birkenpollenkörner der zwei Meßreihen fallen nicht in ein Cluster, da die Spektren aus dem Jahr 2007 einen höheren Gehalt an Carotinoiden aufweisen als im Jahr danach. Der gleiche Zusammenhang wurde für die Spektren der Pollenkörner des Eschenahorns beobachtet. Dieses Dendrogramm belegt, dass auch Spektren von Pollenkörnern, die in verschiedenen Jahren gesammelt wurden und so unterschiedlichen Witterungsverhältnissen ausgesetzt waren, entsprechend ihrer Spezies klassifiziert werden.

4.5 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (engl.: *principal component analysis*, PCA) ermöglicht es durch Datenkompression und Varianzgewichtung Datensätze zu strukturieren, zu vereinfachen und zu veranschaulichen. Dafür werden Linearkombinationen aus den gemessenen Variablen berechnet [88]. Diese künstlichen Größen besitzen einen größeren Infor-

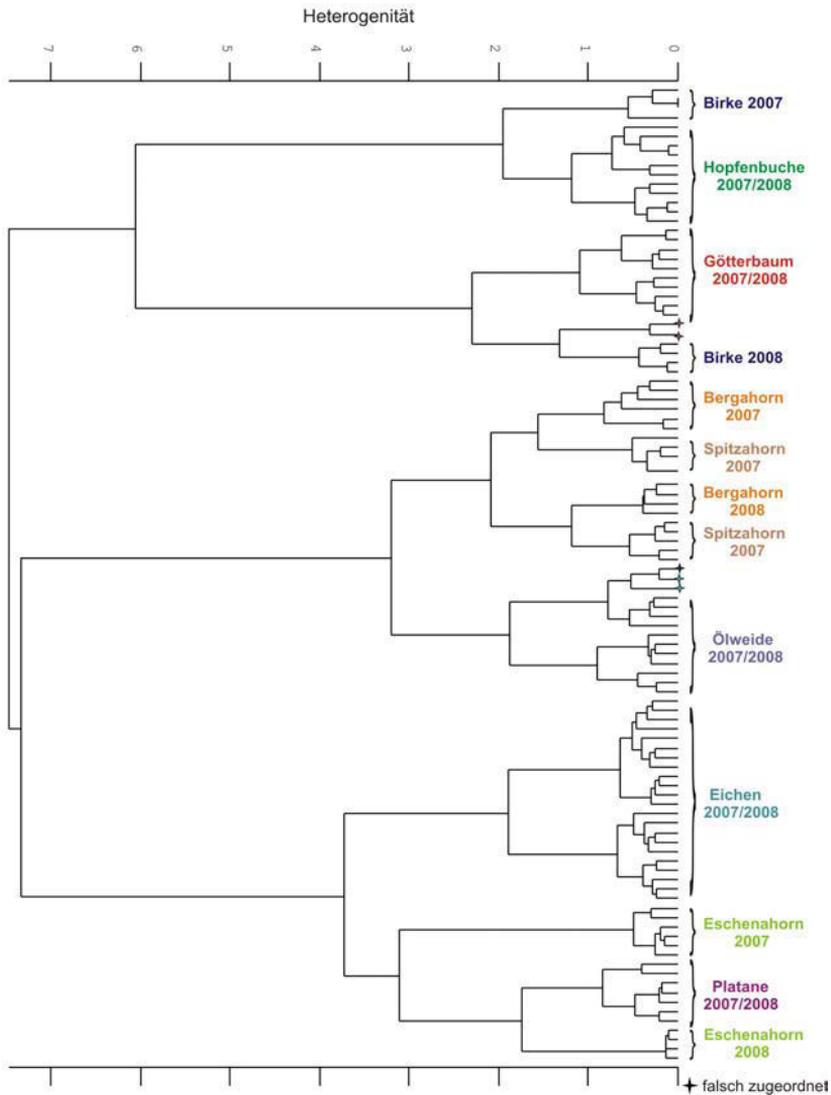


Abbildung 4.18: 102 Raman-Spektren (785 nm , 10 s , 1.9 W/cm^2) von 9 Baumpollenarten aus den Jahren 2007 und 2008. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: $380 - 1700 \text{ cm}^{-1}$, Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards

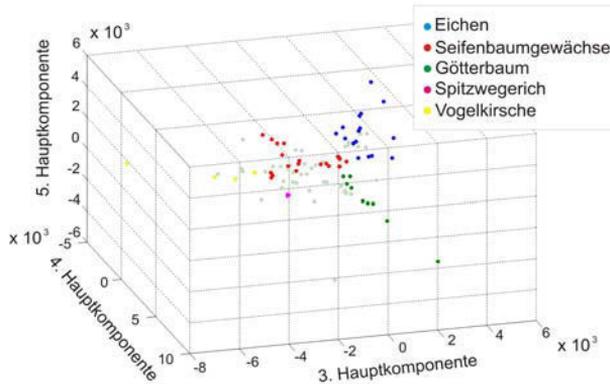


Abbildung 4.19: Auftragung der Scores der Hauptkomponenten 3, 4, 5 für die Spektren der Eichen-, Ahorn-, Götterbaum-, Spitzwegerich und Vogelkirschenpollenkörner

mationsgehalt als die Anfangsvariablen. Die Anzahl der Faktoren ist geringer als die Menge der Ausgangsvariablen durch die Projektion in einen varianzgewichteten Faktorraum. Das bedeutet, dass eine Datenreduktion stattfindet. Durch die Auftragung der Faktorenwerte (engl.: *Scores*) gegeneinander kann die Bildung von Datengruppen verdeutlicht werden.

Dieses Verfahren wurde für 91 Spektren der Baumpollenkörner angewendet, dabei konnte keine Gruppenbildung beobachtet werden. Offensichtlich sind die Unterschiede zwischen den Spektren der verschiedenen Pollenarten über den gesamten spektralen Bereich zu gering. Die Auftragung der Scores der dritten, vierten und fünften Hauptkomponente ist in Abbildung 4.19 für die Spektren der Eichen-, Ahorn-, Götterbaum-, Spitzwegerich und Vogelkirschenpollenkörner dargestellt. Die Scores dieser Pollenspezies sind farbig hervorgehoben. Sie können zu Gruppen zusammengefasst werden, ohne dass es zu Überschneidungen zwischen den Gruppen kommt.

In den Abbildungen 4.20 und 4.21 sind die ersten sieben Faktorenladungen (engl.: *Loadings*) der Hauptkomponentenanalyse der Messungen aus den Jahren 2007 und 2008 aufgetragen. Im Datensatz von 2007 ist zu erkennen, dass für die Varianz, die durch die erste Hauptkom-

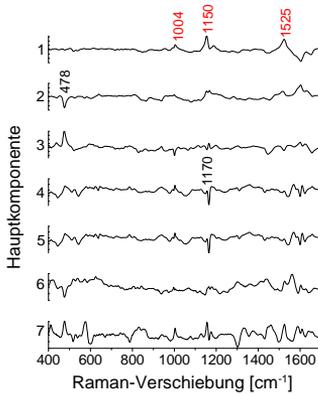


Abbildung 4.20: Loadings der PCA des Jahres 2007, typische Frequenzen der Carotinoide sind rot markiert

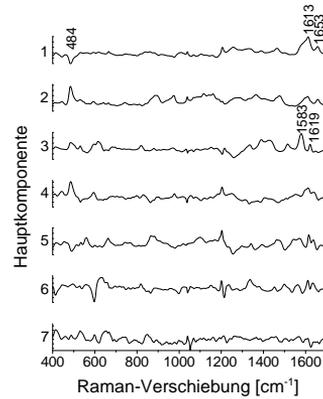


Abbildung 4.21: Loadings der PCA des Jahres 2008

ponente repräsentiert wird, die Banden bei 1525, 1150 und 1004 cm^{-1} verantwortlich sind. In Übereinstimmung mit der Clusteranalyse werden auch in der PCA die Carotinoide als Quelle der größten Varianz identifiziert (vergleiche Dendrogramm in Abbildung 4.9). Die Deutung der übrigen Loadings ist nicht eindeutig, es überlagern sich die spektralen Beiträge einer Vielzahl von chemischen Gruppen. Die Bande bei 480 cm^{-1} scheint von Bedeutung für die Entstehung der Varianz, allerdings ist diese Bande nicht speziesspezifisch. Aufgrund der Varianzgewichtung steigt der Einfluss des Rauschens innerhalb der Loadings an. Aus den Loadings kleinerer Varianz (ab PCA 4) können keine Informationen mehr gewonnen werden. Aufgrund des Abbaus der Carotinoide durch Bestrahlung mit der Anregungswellenlänge 633 nm besitzen diese keinen Einfluss auf die Varianz der Messreihe von 2008. Welche chemischen Gruppen die Varianz der zweiten Messreihe beeinflussen, lässt sich anhand der Loadings nicht feststellen, da eine Hauptkomponente nicht zwangsläufig mit einem einzigen chemischen Bestandteil gleichzusetzen ist [58]. Die Bande bei ungefähr 480 nm ist wie zuvor in den Loadings enthalten.

4.6 Künstliche neuronale Netze

Künstliche neuronale Netze (engl.: *artificial neural networks*, ANN) erobern ein immer weiteres Anwendungsgebiet, beispielsweise können die ANN eine Entscheidungshilfe für Pathologen bei einer Krebsdiagnose bilden [89]. Der objektive Nutzen solcher Entscheidungshilfen konnte nachgewiesen werden [89]. Auch die Anwendung dieser Methode für die Überwachung der Wasserqualität lieferte vielversprechende Resultate [90].

Ein kritischer Faktor für die Auswertung von Daten unter Verwendung künstlicher neuronaler Netze ist die Anzahl der zur Verfügung stehenden Spektren. Die Anzahl der Spektren des Trainingsdatensatzes gibt einen Anhaltspunkt, aus wie vielen Datenpunkten der zu untersuchende Spektralbereich bestehen sollte: Übersteigt die Anzahl der Trainingspektren die Menge der Eingabewerte um ein Vielfaches, kann es zur Überanpassung (engl.: *overfitting*) des Netzes kommen. Andererseits kann von zu wenigen Trainingsdaten keine Generalisierbarkeit abgeleitet werden. Um beide Effekte zu vermeiden, findet in der Trainingsphase ein Abgleich zwischen Trainings- und Validierungsdatensatz statt. Die Entwicklung der Fehlerquadrate des Trainings- und des Validierungsdatensatzes werden verglichen. Wird der Fehler des Trainingsdatensatzes kleiner und steigt der Fehler des Validierungsdatensatzes gleichzeitig an, ist der Lernalgorithmus zu gut auf die Trainingsdaten angepasst. In diesem Moment wird der Algorithmus auf das Rauschen des Trainingsdatensatzes eingestellt, er verliert seine Allgemeingültigkeit und ist überangepasst. Das Training muss vor Eintreten dieses Punktes gestoppt werden.

Die Anwendung künstlicher neuronaler Netze stellt eine Ergänzung der Clusteranalyse hinsichtlich der Detektion von Pollen für Pollenflugwarnungen dar. Mit Hilfe der Clusteranalyse gelang die *Klassifizierung* der Pollenspektren, der nächste Schritt für eine Anwendung in einem On-line-Warnsystem ist jedoch die *Identifizierung* der Pollenspezies mit Hilfe neuronaler Netze. In dieser Arbeit standen insgesamt 210 Spektren für die Trainings-, Validierungs- und Testphase zur Verfügung. Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Punkte muss bei dieser Anzahl von Spektren ein Bereich mit circa 80 Datenpunkten ausgewählt werden. Wie die Clusteranalysen in diesem Kapitel gezeigt haben, müssten wesentlich mehr Datenpunkte einbezogen werden, um eine Diskriminierung der Pollenarten zu erreichen. Die prinzipielle Eig-

nung der künstlichen neuronalen Netze wurde für den Einsatz in einem Raman-basierten Identifizierungssystem anhand der folgenden Fragestellungen überprüft:

- Identifizierung der Spektren individueller Pollenkörner als Gräser- oder Baumpollen
- Einteilung der Spektren der Pollenkörner in allergologische nicht relevante (beispielsweise Rosaceae) oder allergologisch relevante Arten
- Überprüfung ob Carotinoide vorhanden sind

Anhand der ersten Fragestellung zur Unterscheidung von Gräser- und Baumpollen soll auf die Optimierung der Parameter und die dem Verfahren innewohnenden Schwierigkeiten eingegangen werden. Die Auswahl des spektralen Bereiches basiert auf dem visuellen Vergleich der Spektren von Baum- und Gräserpollenkörnern (siehe Abbildungen 4.17 und 4.16). Der ausgewählte Bereich reicht von 1575 bis 1676 cm^{-1} und umfasst 68 Datenpunkte. Es konnten 210 Spektren in Trainings-, Validierungs- und Testdatensatz eingeteilt (113;47;63) werden. Da der spektrale Bereich 68 Datenpunkte umfasst, weist das Netz 68 Eingabewerte auf. Die Anzahl der verdeckten Schichten wurde von null bis zehn variiert, die besten Ergebnisse wurden mit zwei verdeckten Schichten erzielt. Um zwischen Gräser- und Baumpollen unterscheiden zu können, wurde ein Ausgabewert definiert. Dieser nimmt die Werte null für Baumpollen und eins für Gräserpollen an. Für die Zuordnung der Proben zu diesen beiden Klassen wurden alle Ausgabewerte bis 0.4 abgerundet und ab 0.6 aufgerundet. Werte zwischen diesen Grenzen wurden nicht zugeordnet. Ein Beispiel für eines der getesteten Netze mit zehn verdeckten Schichten ist in Abbildung 4.22 dargestellt. Es sind die Verbindungen zwischen den Schichten dargestellt und die durch Anwendung des Lernalgorithmus der Fehlerrückführung erreichten Werte der Gewichtungen. Auch die Parameter der Spektrenvorbehandlung für den Trainingsdatensatz wurden variiert: zuerst wurde über den gesamten spektralen Bereich (400 bis 1800 cm^{-1}) eine Vektornormierung durchgeführt, dann wurde über den gesamten spektralen Bereich (400 bis 1800 cm^{-1}) eine Vektornormierung durchgeführt und die 1. Ableitung gebildet. Diese Vorbehandlung wurde wiederholt für die Daten, die zuvor nur über den untersuchten spektralen Bereich

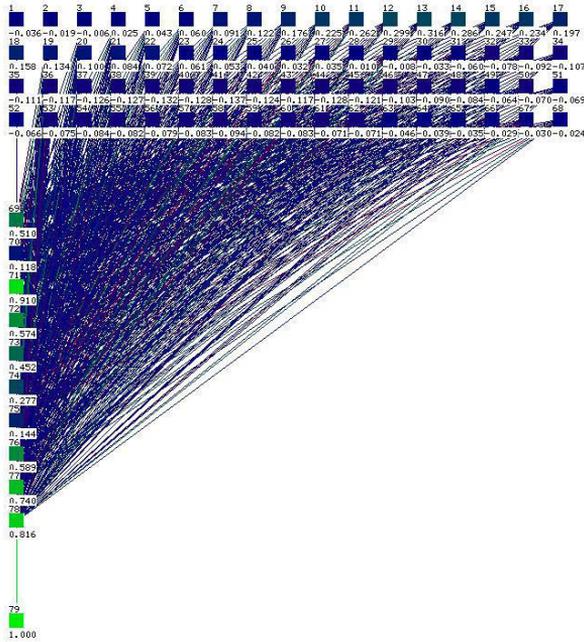


Abbildung 4.22: Verbindungen und Gewichtungen in einem Netz mit zehn verdeckten Schichten unter Anwendung der Fehlerrückführung

(1570 bis 1650 cm^{-1}) normiert wurden. Es wurden die Ergebnisse unter Verwendung von vier unterschiedlichen Lernalgorithmen der SNNS-Software ausgewertet: Backpropagation, Quickprop, Rprop und BackpropMom verwendet.

Durch die Lernalgorithmen werden die Gewichtungen eines Netzes optimiert und so ein gewünschtes Verhalten erzielt. Am häufigsten wird der Algorithmus der Fehlerrückführung (engl.: *backpropagation*) verwendet, der auf der Hebbschen Lernregel basiert. Diese besagt, dass eine Verbindung zwischen zwei Einheiten gestärkt wird, wenn beide zur gleichen Zeit aktiv sind. Eine Erweiterung dieses Algorithmus stellt die Fehlerrückführung mit Momentum-Term (engl.: *backpropagation with momentum term*, Abk.: BackpropMom) dar. Der Vorteil gegenüber dem konventionellen Verfahren beruht auf der Addition eines Terms, der die

Tabelle 4.2: Übersicht darüber wieviele der Spektren richtig identifiziert wurden (VN = Vektornormierung)

Algorithmus	VN gesamter Bereich, original Spektrum	VN gesamter Bereich, 1. Ableitung	VN Teilbereich, original Spektrum	VN Teilbereich, 1. Ableitung
Backprop	100 %	88 %	92 %	94 %
Quickprop	100 %	82 %	94 %	94 %
Rprop	98 %	100 %	95 %	92 %
BackpropMom	98 %	97 %	94 %	90 %

vorangegangene Gewichtsveränderung berücksichtigt. Damit kann eine Stagnation in Bereichen langsamen Lernens verhindert werden. Bei dem Verfahren der elastischen Fehlerrückführung (engl.: *resilient back propagation*, Abk.: Rprop) ist die Veränderung der Vorzeichen der Gewichtung der partiellen Ableitungen entscheidend für die Schrittgröße in Richtung des Minimums. Als letzte Methode wurde das Verfahren der schnellen Übertragung (engl.: *quick propagation*, Abk.: Quickprop) ausgewählt, hierbei ist eine schnelle Verarbeitung gewährleistet durch die Analyse der 2. Ableitung des Fehlers.

Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über den Anteil der Spektren, welche der richtigen Klasse (Gräser- und Baumpollen) zugeordnet wurden. Insgesamt ergeben sich zufriedenstellende Werte, mindestens 92 % der Spektren wurden richtig als Gras- oder Baumpollen identifiziert. Die Zuordnungen mit Richtigkeiten von 82 und 88 % sind nicht ausreichend, da in diesen Fällen 60 bis 100 % aller getesteten Gräserpollenspektren falsch klassifiziert wurden. Auffällig war, dass ein Spektrum der Robinienpollenkörner den Gräserpollenkörnern zugeordnet wurde. Dies wurde ebenso bei der Klassifizierung der Spektren mit Hilfe der Clusteranalyse beobachtet. Wie zuvor besprochen zeigen die Spektren der Gräserpollen und der Robinie ähnliche Banden (vergleiche Abschnitt 4.4.1).

Durch die Variation der gewählten Parameter können weitere Verbesserungen erzielt werden. Beispielsweise kann das Lernen langsamer erfolgen, indem die Veränderungen der Gewichtungen von 0.21 auf 0.1 herabgesetzt werden. Dies wurde für den vierten Datensatz bei der Auswahl des Lernalgorithmus „BackpropMom“ erreicht. Der Anteil der richtig klassifizierten Spektren erhöhte sich von 90 auf 94 %. Die erzielten Werte können sicherlich durch den Einsatz einer größeren Anzahl Trainingsspektren weiter verbessert werden, beweisen aber bereits jetzt

die Leistungsfähigkeit der Neuronalen Netze für die Lösung dieser Aufgabe. Ob auch die Identifizierung der Pollenarten auf Grundlage dieser Methode gelingt, muß in weiterführenden Experimenten in den nächsten Jahren geklärt werden.

4.7 Auf dem Weg zur automatischen On-line-Detektion

Raman-Spektren dienen als Fingerabdruck einer bestimmten biochemischen Zusammensetzung, so reflektieren Spektren der Pollenkörner den Phänotyp der Pflanze. Die Ergebnisse konnten anhand biologischer Konzepte wie beispielsweise der phylogenetischen Herkunft erklärt werden. Es zeigten sich Korrelationen zwischen den Raman-Spektren der Pollenkörner (und damit der chemischen Zusammensetzung) bestimmter Spezies und Phänomen, die mit Vorgängen der Befruchtung in Verbindung gebracht werden können. Ein Beispiel hierfür ist ein vermehrtes Auftreten von Hybridisierung bei Eichen und der Einfluß der geographischen Herkunft bei Ahornbäumen auf das Klassifizierungsergebnis. Die Gruppierung der Raman-Spektren aufgrund der phylogenetischen Herkunft ist unabhängig von klimatischen Einflüssen oder dem Standort. Die Ergebnisse der Clusteranalysen konnten mit Daten aus verschiedenen Jahren reproduziert werden. Die Gesamtheit der Daten belegt, dass die hierarchische Clusteranalyse geeignet ist, um die Spektren von Pollen zu klassifizieren. Somit ist der Grundstein für eine automatische On-line-Detektion gelegt. Darauf aufbauend sollen die künstlichen neuronalen Netze getestet werden für die Identifizierung individueller Pollenkörner anhand ihrer Raman-Spektren. Die Diskriminierung zwischen Baum- und Gräserpollen gelang und belegt das Potenzial dieser multivariaten Methode für die Erkennung von Pollen. Dieses Kapitel beweist die Eignung der Raman-Spektroskopie kombiniert mit multivariater Auswertung für eine automatische On-line Erkennung von Pollen für die Erstellung von Pollenflugwarnungen.

Kapitel 5

Carotinoide in Pollen - Untersuchungen mittels resonanter Raman- Streuung

5.1 Analyse von Carotinoiden

Carotinoide sind natürlich vorkommende Pigmente, sie verursachen Färbungen von gelb bis rot und sind unter anderem für die Farbe von Paprika, Safran und roten Blättern verantwortlich. Ebenfalls durch Carotinoide hervorgerufen wird die Blaufärbung des lebenden Hummers [91], allerdings sind diese Carotinoide proteingebunden. Carotinoide sind von großer Bedeutung in der Natur und für den Menschen. So sind Carotinoide die Vorläufer von Vitamin A, welches für das Sehvermögen essentiell ist. Außerdem wirkt sich der Verzehr von Carotinoiden positiv auf die Gesundheit aus. Werden Carotinoide wie Lycopene der Nahrung zugefügt, sinkt das Risiko, an Krebs oder Herzleiden zu erkranken [92]. Vermutet wird, dass die antioxidativen Eigenschaften des Lycopens dafür verantwortlich sind [92]. Weitere positive Effekte werden Carotinoiden wie β -Carotin und Canthaxanthin zugeschrieben, sie sollen die Kommunikation zwischen Zellen verbessern.

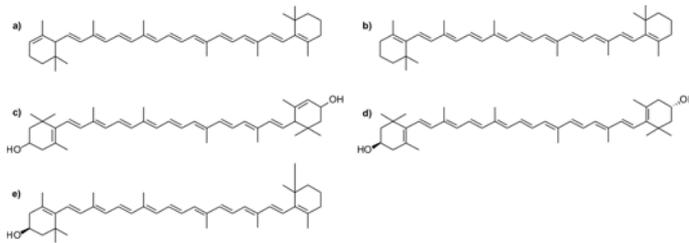


Abbildung 5.1: Strukturformeln der Carotinoide a) α -Carotin, b) β -Carotin, c) Lutein, d) Zeaxanthin, e) Cryptoxanthin

Diese Eigenschaft könnte im Sinne einer schnellen Mobilisierung gegen Krankheitserreger genutzt werden [93]. Anhand der Konzentration von Carotinoiden in bestimmten Lebensmitteln kann die Herkunft überprüft werden. Eier aus biologischer Herkunft weisen signifikant höhere β -Carotingehalte auf [94].

In der Natur sind ungefähr 600 Carotinoide bekannt, deren Strukturen sich vom C_{40} -Isoprenoidgrundgerüst ableiten. In Abbildung 5.1 sind einige der für diese Arbeit relevanten Carotinoidstrukturen zu sehen. Die Carotinoide zeichnen sich durch ihre Farbigkeit aus, die auf einer Absorption im sichtbaren Bereich des Lichts durch das konjugierte Doppelbindungssystem besteht. Durch die Absorption von Licht wird ein $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang angeregt, es wird ein bindendes π -Elektron der Doppelbindung in ein unbesetztes nichtbindendes Orbital angehoben. Innerhalb eines konjugierten Systems liegen diese Orbitale bei niedrigerer Energie vor, da die Elektronen delokalisiert sind. Aufgrund der Absorption im Sichtbaren ist die UV/Vis Spektroskopie eine häufig angewandte Methode, um Carotinoide zu identifizieren. Die Banden in den UV/Vis Spektren der Carotinoide entsprechen den Übergängen in den ersten angeregten Zustand (400 nm), den zweiten angeregten Zustand (350 nm) und den dritten angeregten Zustand (270 nm).

Welche Aufgabe Carotinoide in Pollenkörnern erfüllen ist unklar. Vermutlich sind die Carotinoide wichtig, um Insekten anzulocken oder fungieren als Radikalfänger [95]. Die meisten Untersuchungen von Carotinoiden in Pollenkörnern beschränken sich auf die Analyse von Pollenkörnern von Blumen. So wurden die folgenden Carotinoide in Pollenkörnern des Gartenkürbis (*Cucurbita pepo*), der Ringelblume (*Calendula officinalis*) sowie der Tigerlilie (*Lilium tigrinum*) identifiziert:

β -Carotin, Cryptoxanthin, β -Carotin-5,6,5,6-dieoxid, Zeaxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin, Flavoxanthin, Lutein, 9/9-Z-Lutein, α -Carotin, Luteoxanthin [96, 97, 98, 99, 100]. Kano *et al.* verdeutlichen die Verteilung von β -Carotin auf der Oberfläche eines Lilienpollenkorns mittels kohärenter Anti-Stokes-Raman-Streuung (engl.: *coherent anti-Stokes Raman scattering*, CARS). Die Verteilung der Carotinoide über die Fläche des Pollenkorns ist ungleichmäßig [101].

Eine häufig eingesetzte Methode zur Analyse von Carotinoiden ist die Dünnschichtchromatographie (engl.: *thin layer chromatography*, TLC). Der Grund hierfür ist die einfache Handhabung und die weite Verbreitung in der Lebensmittelchemie. Auch die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (engl.: *high performance thin layer chromatography*, HPTLC) wurde bereits erfolgreich für die Analyse von Carotinoiden in biologischen Matrices angewendet beispielsweise in Gerstenblättern [102], Schnecken [103] und Wein [104]. Mit Hilfe der Raman-Spektroskopie (RS) können Carotinoide in-situ ohne aufwendige Extraktionsschritte gemessen werden. Die resultierenden Raman-Banden sind bei einer Anregungswellenlänge von 400 bis 550 nm resonanzverstärkt und können ohne Störung durch andere Bestandteile detektiert werden [105]. Zusätzliche Informationen über die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen oder die chemische Umgebung können aus der Lage der ν_1 -Bande bei ungefähr 1520 cm^{-1} gewonnen werden [106]. Mittels resonanter Raman-Spektroskopie (RRS) wurden zum Beispiel Carotinoide in Vogelfedern identifiziert [91]. Außerdem kann anhand der Raman-Spektren zwischen proteingebundenen und freien Carotinoiden unterschieden werden [107]. Grundlegende Arbeiten über resonanzverstärkte Raman-Spektren von aufgereinigten Carotinoiden gaben in den vergangenen Jahrzehnten einen Aufschluss über die Zuordnung der Peaks zu Strukturen der Carotinoide und über das Zustandekommen der Kombinations- und Obertonschwingungen [108, 105, 84].

Welcher Informationsgehalt in in-situ erzeugten resonanzverstärkten Raman-Spektren ganzer Pollenkörner über die Carotinoidzusammensetzung enthalten ist, soll hier geprüft werden. Dafür sollen in-situ erzeugte Spektren mit den Raman-Spektren der aufgetrennten Carotinoide verglichen werden. Mit dieser Methodenkombination sollen die Carotinoidextrakte verschiedener Pollenarten untersucht werden (Rosskastanie, Sommerlinde, Esche, Salweide, Steinweichsel, Götterbaum).

5.2 In-situ Carotinoidsignatur ganzer Pollenkörner

Wie unter 5.1 kurz erwähnt, erzeugen Carotinoide resonanzverstärkte Raman-Banden, welche um viele Größenordnungen intensiver sind als die normalen Peaks der Pollenkörner. Dies geschieht insbesondere bei Anregung des $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergangs. Auch bei längerwelliger Anregung (bis ins NIR bei 785 nm) sind die Carotinoidebanden noch verstärkt, daraus resultieren falsche Zuordnungen in der Clusteranalyse. Der Einfluss der Carotinoide auf das Klassifizierungsergebnis kann reduziert werden, indem die Carotinoide vor der Aufnahme der Raman-Spektren kontrolliert abgebaut werden (vergleiche Abschnitt 4.4). Im Folgenden soll die in den Raman-Spektren enthaltene Information über die Carotinoide selektiv extrahiert werden. Dafür soll die Probe mit einer Wellenlänge von 633 nm bestrahlt werden, so dass die Intensitäten der Carotinoidebanden in Abhängigkeit von der Zeit abnehmen. Der Unterschied zwischen den Spektren, die vor und nach dem Abbau der Carotinoide aufgenommen werden, resultiert allein aus der Carotinoidsignatur. Mit Hilfe dieser in-situ generierten Differenzspektren können die spektralen Eigenschaften der reinen Carotinoide untersucht werden. Dies ermöglicht zudem eine verlässliche Korrektur der Spektren für die Clusteranalyse. Außerdem können Erkenntnisse über die chemische Struktur der in einem Pollenkorn vorliegenden Carotinoide gewonnen und die Zusammensetzung der Carotinoidefraktion untersucht werden. Raman-Spektren bieten die Möglichkeit, dies mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität zu verwirklichen.

Um die Frage zu klären, ob sich die Carotinoidekomposition in Abhängigkeit von der Pollenspezies ändert, wurden in-situ Differenzspektren von Salweiden-, Kastanien- und Steinweichspollen generiert. Diese Pollenspezies weisen besonders intensive Carotinoidebanden auf. Bei Bestrahlung der Proben mit 633 nm werden die Carotinoide abgebaut, dies kann anhand des Rückgangs der Signalintensitäten bei 1160 und 1520 cm^{-1} in Abbildung 4.12 verfolgt werden. Dieser Effekt kann für die Darstellung der Spektren der lichtempfindlichen Moleküle genutzt werden. Die Differenzspektren der Carotinoidsignatur aus ganzen Pollenkörnern werden durch Bestrahlen der Probe mit 633 nm gebildet, hierfür werden mit Pausen von 5 s Spektren von 1 s aufgenommen. Die Spektren werden in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Grenze bildet ein

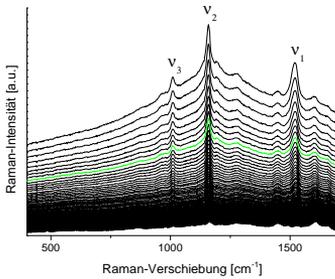


Abbildung 5.2: Raman-Spektren eines Rosskastanienpollenkorns (633 nm, 1 s, 1.9 W/cm²) zur Bildung eines Differenzspektrums

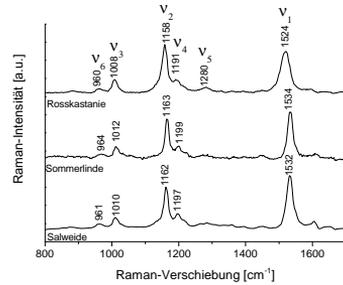


Abbildung 5.3: In-situ erzeugte Differenzspektren von individuellen Salweiden-, Sommerlinden- und Kastanienpollen

Spektrum, für das die Intensität der Bande bei 1520 cm⁻¹ um die Hälfte zurückgegangen ist (grün markiert, siehe Abbildung 5.2). Aus diesen beiden Gruppen wird ein Mittelwertspektrum gebildet, die Differenz dieser gemittelten Spektren spiegelt die charakteristischen Merkmale der Carotinoide wieder. Die resultierenden in-situ erzeugten Differenzspektren der Kastanien-, Salweiden- und Sommerlindenpollenkörner (siehe Abbildung 5.3) zeigen deutliche Unterschiede in Bezug auf die Position und Form der Carotinoïdbanden. Die Positionen und Halbwertsbreiten der Carotinoïdmoden variieren in Abhängigkeit von der Pollenspezies des Pollenkorns. Im Spektrum der Rosskastanienpollen ist die Bande zu tieferen Wellenzahlen verschoben (1524 cm⁻¹ im Vergleich zu 1534 cm⁻¹ oder 1532 cm⁻¹ im Spektrum der Sommerlinden- bzw. Salweidenpollen). Die Halbwertsbreite der ν_1 -Bande im Spektrum des Kastanienpollenkorns ist deutlich größer als für die anderen beiden Pollenarten. Ein weiterer Unterschied zwischen den drei Spektren in Abbildung 5.3 ist die Lage der ν_2 -Bande, diese liegt im Spektrum des Kastanienpollenkorns bei deutlich niedrigeren Wellenzahlen als in den anderen Spektren. Die in-situ erzeugten Differenzspektren verschiedener Pollenarten reflektieren Abweichungen der molekularen Strukturen der Carotinoide in der Zusammensetzung der Carotinoïdfraction und der Umgebung der Pigmentmoleküle in den Pollenhüllen. Carotinoide können sich hinsichtlich der Anzahl der konjugierten Doppelbindun-

gen im Molekül und der Substituenten der Ringstruktur unterscheiden. Das sind Faktoren, die auch die spektralen Merkmale der Raman-Spektren beeinflussen. Ebenso kann der Einbau der Carotinoide in die Exine Veränderungen der Carotinoidsignatur in den Raman-Spektren bedingen [91, 109]. Unabhängig von der Konformation der vorliegenden Carotinoide in einer Pollenart werden Abweichungen in den in-situ erzeugten Differenzspektren durch variierende Zusammensetzungen der Carotinoide in einer Pflanzenart verursacht. Die große Bandbreite der ν_1 -Schwingung im Spektrum des Pollenkorns der Kastanien im Vergleich zu den Spektren der anderen Pollenspezies kann mit der Anzahl der Carotinoide in Verbindung gebracht werden.

Die Intensität der Carotinoidbanden in den Spektren ganzer Pollenkörner ist abhängig von der Pollenspezies. In den Spektren der Pollenkörner der Salweiden, Sommerlinden und Obstbäume sind die Intensitäten hoch, wohingegen die Banden um 1520 , 1160 und 1005 cm^{-1} in anderen Pollenarten kaum zu detektieren sind. In Abbildung 5.4 sind Mittelwertspektren von 16 Pollenarten zu sehen, in denen die Carotinoidsignatur unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Beispielsweise überlagern in den Spektren der Kastanien-, Sommerlinden- und Salweidenpollenkörnern die charakteristischen Banden der Carotinoide die typische Pollensignatur. In den Spektren der Spitzahorn-, Traubenkirschen-, Vogelkirschen-, Bergahorn- und Götterbaumpollenkörner ist vor allem die Bande um 1520 cm^{-1} deutlich ausgeprägt. Andere Spektren weisen keine Carotinoidschwingungen auf, dies ist in den Spektren der Eschen- und Hopfenbuchenpollenkörnern der Fall.

Alle Spektren in der Abbildung 5.4 wurden in Präresonanz (Anregungswellenlänge: 785nm) aufgenommen. Folglich sind die Intensitäten der Carotinoidbanden geringer als bei resonanter Anregung mit 488 nm . Dies wird am Beispiel des Spektrums eines Eschenpollenkorns in Abbildung 5.5 deutlich. Bei Anregung mit 785 nm sind keine Carotinoidpeaks zu erkennen (siehe Abbildung 5.4), wohingegen bei Anregung mit 488 nm die Empfindlichkeit gesteigert wird, und die Carotinoidbanden auf dem Fluoreszenzuntergrund hervortreten (siehe Abbildung 5.5).

Neben der Pollenart und der Anregungswellenlänge kann die Exposition im Sonnenlicht einen Einfluss auf die Intensität der Carotinoidpeaks haben. Die Carotinoide werden durch Bestrahlung mit Sonnen- oder Raumlicht abgebaut, dieser Effekt kann auch bei Lagerung im ungekühlten hellen Raum beobachtet werden. Die Carotinoidgehalte in frischen Pollenkörnern derselben Spezies variieren nur geringfügig, so

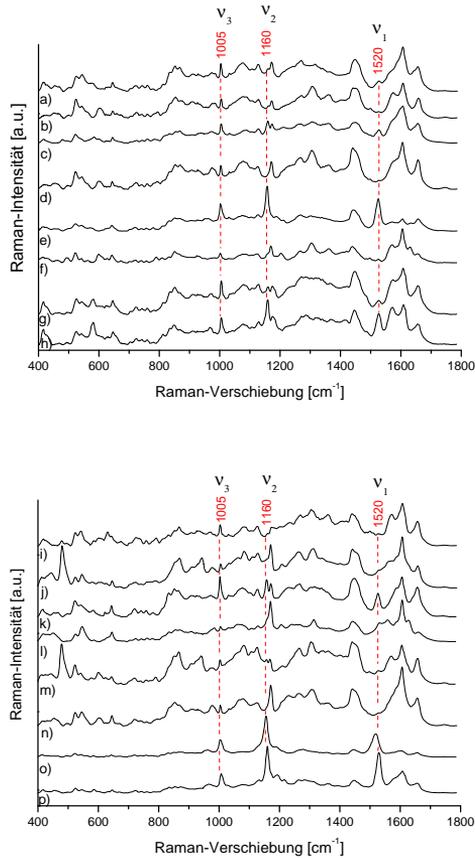


Abbildung 5.4: Raman-Spektren generiert von einem Pollenkorn der a) Ölweide, b) Robinie, c) Spitzahorn, d) Stieleiche, e) Sommerlinde, f) Platane, g) Traubenkirsche, h) Vogelkirsche, i) Eschenahorn, j) Birke, k) Bergahorn, l) Götterbaum, m) Hopfenbuche, n) Esche, o) Rosskastanie, p) Salweide (785 nm, 10 s, 4.7 W/cm²)

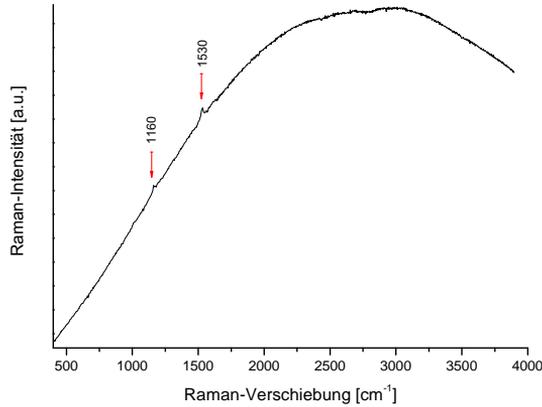


Abbildung 5.5: Raman-Spektrum eines Eschenpollenkorns (488 nm, 1 s, 1.3 W/cm^2)

dass ein konstanter Carotinoidgehalt vermutet werden kann, solange die Pollenkörner im physiologischen Kontakt zur Mutterpflanze stehen.

Durch die in-situ Messungen der resonanzverstärkten Raman-Banden konnte bestätigt werden, dass sich die Zusammensetzung der Carotinoide sowie die Struktur und Einbauweise in die Sporopolleninmatrix verschiedener Pollenspezies unterscheidet. Um genaue Informationen über die Carotinoidzusammensetzung zu gewinnen, wurden im Folgenden Carotinoide extrahiert und mittels HPTLC separiert.

5.3 Carotinoidanalyse mittels HPTLC

Für die Untersuchung von Carotinoiden ist die Dünnschichtchromatographie als Routinemethode etabliert, allerdings erzielen einfache chromatographische Läufe keine Trennung strukturell ähnlicher Carotinoide wie Lutein und Cryptoxanthin [110]. Selbst die Trennung dieser beiden Carotinoide unter Verwendung der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl.: *high performance liquide chromatography*, HPLC) ist nicht zufriedenstellend [104].

In dieser Arbeit sollte die Leistungsfähigkeit der HPTLC für die

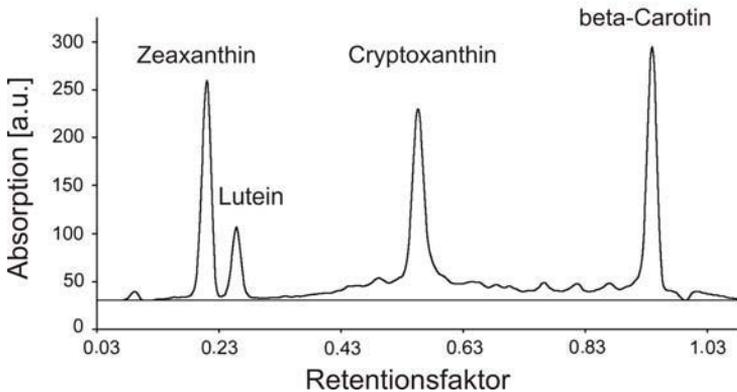


Abbildung 5.6: Densitogramm der HPTLC-Trennung der Referenzcarotinoide Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin und β -Carotin (425 nm)

Trennung extrahierter Carotinoide getestet werden. Unter Verwendung der Referenzcarotinoide, welche anhand der wenigen bisherigen Publikationen über das Vorkommen von Carotinoiden in Pollen (siehe Abschnitt 5.1) ausgesucht wurden, wurde ein HPTLC-Lauf entwickelt. Für die Trennung der Referenzcarotinoide β -Carotin, Cryptoxanthin, Lutein, Zeaxanthin wurde ein HPTLC-Lauf mit mehrfacher Entwicklung etabliert. Die Zusammensetzung der Eluationsphase sowie der Polaritätsgradient dieser Phase wurden variiert. Das Lösungsmittelsystem setzte sich aus Tetrahydrofuran, Dichlormethan und n-Hexan zusammen. Die Zusammensetzung der mobilen Phase wurde variiert, so dass im Verlauf der Trennung die Polarität des Eluationssystems abnimmt (siehe Tabelle 3.1). Das Densitogramm in Abbildung 5.6 zeigt die erfolgreiche Trennung der Referenzcarotinoide. Der derart optimierte Lauf wurde für die Trennung der Carotinoide in Acetonextrakten ausgewählter Pollenarten (Kastanie, Salweide, Steinweichsel, Götterbaum, Esche, Sommerlinde) angewendet. Hierbei war es ein Ziel eine quantitative Aussage über die Carotinoidgehalte treffen zu können. Die Densitogramme der Acetonextrakte von Pollen der Spezies Sommerlinde, Salweide, Kastanie, Steinweichsel und des Götterbaums sind in Abbildung 5.7 zu sehen.

Einen Überblick über die detektierten Carotinoide und deren Retentionsfaktoren (R_f) gibt Abbildung 5.8. Im Extrakt der Eschenpol-

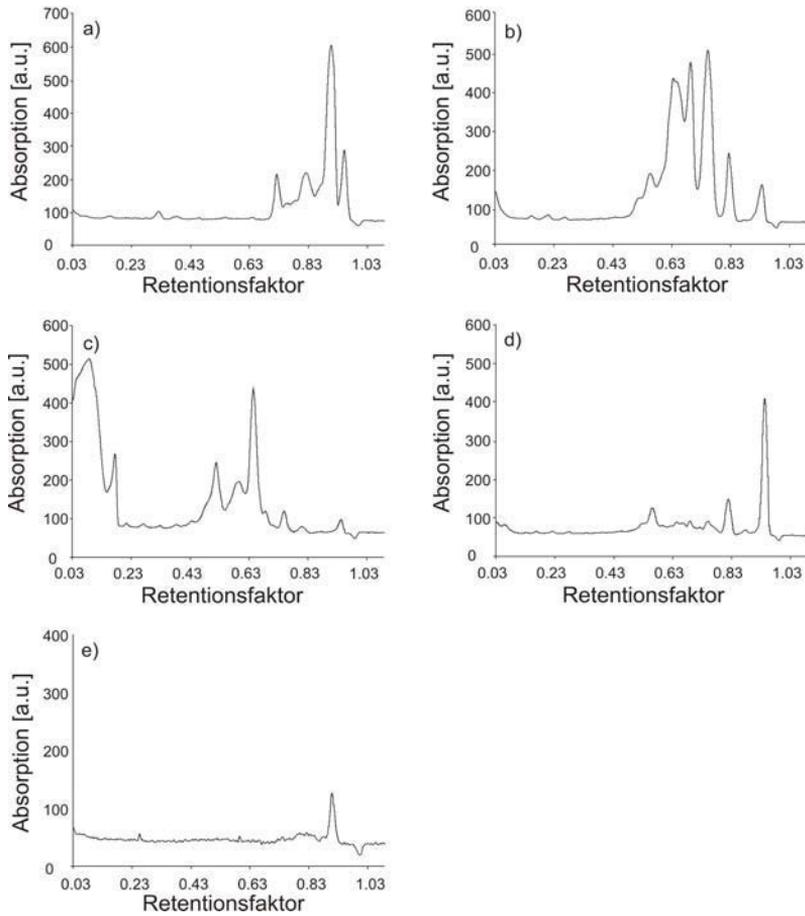


Abbildung 5.7: Densitogramme der HPTLC-Trennungen der Pollenextrakte der a) Sommerlinde, b) Salweide, c) Kastanie, d) Steinweichel und e) Götterbaum (425 nm)

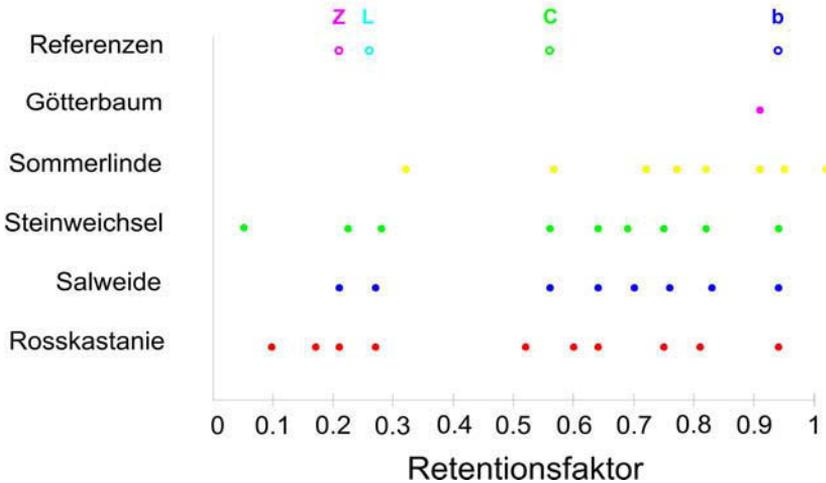


Abbildung 5.8: Auftragung der Retentionsfaktoren der in den Proben gefundenen Carotinoide und der Referenzcarotinoide (Z = Zeaxanthin, L = Lutein, C = Cryptoxanthin, b = beta-Carotin)

len konnten keine Carotinoide nachgewiesen werden, dies stimmt mit dem Ergebnis der Raman-Messung bei 785 nm überein (siehe Abbildung 5.4). Wahrscheinlich ist die Konzentration der Carotinoide in den Eschenpollenkörnern zu gering. Trotzdem konnten mit resonanter Anregung Carotinoide in einem einzelnen Kastanienpollenkorn nachgewiesen werden (vergleiche Abbildung 5.5). In den übrigen Extrakten variiert die Anzahl der unterschiedlichen Carotinoidmoleküle von einem im Extrakt der Pollen des Götterbaumes bis hin zu zehn im Extrakt der Rosskastanienpollen. Die Referenzsubstanz β -Carotin wurde in allen Extrakten nachgewiesen. Die Zusammensetzungen der Extrakte der Steinweichsel-, Sommerlinden- und Salweidenpollen zeigen kaum Abweichungen. In dem Extrakt der Kastanienpollen wurden die meisten Carotinoide gefunden. Dies bestätigt die Annahme, dass die große Halbwertsbreite der ν_1 -Schwingung in dem in-situ Spektrum mit der Anzahl unterschiedlicher Carotinoide korreliert. Je mehr Substanzen mit unterschiedlicher Struktur zu einer Raman-Bande beitragen, desto breiter wird die Bande. Inwieweit sich qualitative Abweichungen zwischen den Densitogrammen durch Konzentrationsunterschiede erklären lassen, ist

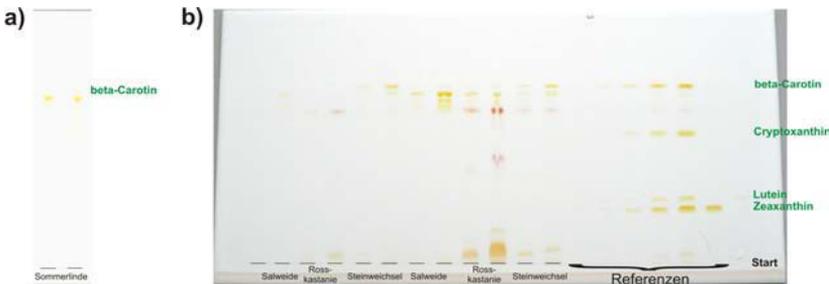


Abbildung 5.9: Fotografien der HPTLC-Platten nach der Auftrennung der Carotinoidextrakte von Pollen der Arten a) Sommerlinde, b) Salweide, Kastanie und Steinweichsel sowie Mischungen der Referenzcarotinoide

schwer abzuschätzen. So könnten zum Beispiel Carotinoide in dem Extrakt der Kastanienpollenkörner vorkommen, die sich in den Extrakten der übrigen Pollenspezies nicht nachweisen lassen, weil sie dort in zu geringen Konzentrationen vorliegen. Das Carotinoid mit einem Retentionsfaktor von 0.6 ist typisch für den Extrakt der Kastanienpollen. Dieser Spot verfügt über eine tiefrote Färbung, die in den Spots der anderen Pollenextrakte nicht beobachtet wird (siehe Abbildung 5.9). Diese HPTLC-Ergebnisse belegen, dass speziesspezifische Unterschiede in der Carotinoid-Zusammensetzung bestehen.

Durch den Vergleich der Retentionsfaktoren von Referenzcarotinoiden und aus den Proben extrahierten Carotinoiden konnten erste Zuordnungen zu Carotinoidspezies getroffen werden (siehe Abbildung 5.9). Da nur eine begrenzte Anzahl an Referenzcarotinoiden zur Verfügung stand, gestaltete sich eine komplette Identifizierung aller Carotinoide in Pollen schwierig.

Eine zusätzliche Möglichkeit der strukturellen Charakterisierung der Proben bietet die Absorptionsspektroskopie unter Verwendung von UV/ Vis-Licht [111]. In Abbildung 5.10 sind Absorptionsspektren der Carotinoide aus den Extrakten der Steinweichsel-, Salweiden- und Kastanienpollen mit einem Retentionsfaktor von 0.94 dargestellt. Diese Spektren werden mit einem Absorptionsspektrum von β -Carotin verglichen. Im Absorptionsspektrum des Carotinoids aus dem Steinweichselextrakt ($R_f = 0.94$) zeichnet sich eine Bande bei 350 nm ab. Dies ist ein Indiz für die Präsenz von cis-Isomeren. Zechmeister *et al.* fanden

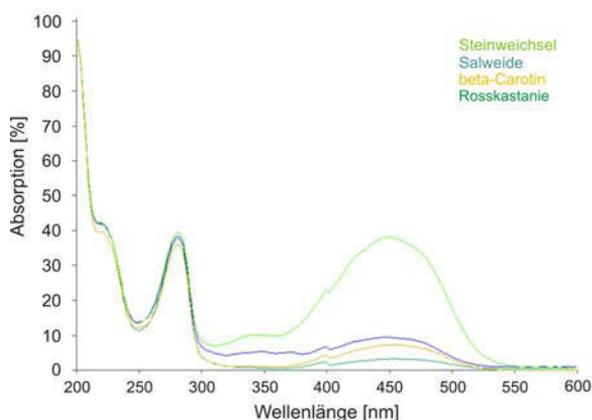


Abbildung 5.10: UV/Vis-Spektren der Extrakte der Steinweichsel-, Salweiden- und Rosskastanienpollen ($R_f = 0.94$) sowie β -Carotin

bei Untersuchungen zur Isomerisation von Carotinoiden heraus, dass sich parallel zur Bildung der *cis*-Isomere eine Bande zwischen 320 und 380 nm formiert [112, 113, 114]. Der *cis*-Peak entsteht durch den Übergang von Elektronen in den ersten angeregten Zustand [115]. Die Intensität der *cis*-Bande korreliert mit der Position der *cis*-Konfiguration. Befindet sich die *cis*-Bindung in der Mitte des Moleküls, ist die Bande am intensivsten [116].

Die spektralen Eigenschaften der Carotinoide werden durch den Chromophor (die konjugierten Doppelbindungen) gekennzeichnet. So wird mit der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen, das Maximum der Absorption zu höheren Wellenzahlen verschoben [117]. Der Einfluss der Endgruppen auf λ_{max} ist gering. Beispielsweise hat β -Carotin ein Absorptionsmaximum in Ethanol bei 450 nm ebenso wie Zeaxanthin [117]. In Abbildung 5.11 sind die UV-Vis Spektren von vier Spots aus dem Extrakt der Kastanienpollen zu sehen. Obwohl es sich um unterschiedliche Carotinoide handelt, variieren die Maxima der Banden nur um wenige Nanometer (siehe auch Auflistung in Tabelle 9.4). Dies ist ein Grund dafür, dass es deutlich schwieriger ist UV-Vis-Spektren von Carotinoiden zu diskriminieren als die Schwingungs-Spektren. Ein weiteres Problem entsteht, wenn die Konzentrationen der Carotinoide auf den HPTLC-Platten zu niedrig sind. Die Spektren sind dann nicht

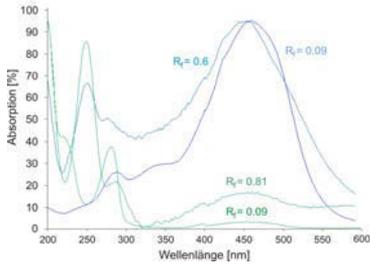


Abbildung 5.11: UV/Vis Spektren von Carotinoiden aus dem Extrakt der Kastanienpollen ($R_f=0.09, 0.6, 0.81, 0.91$)

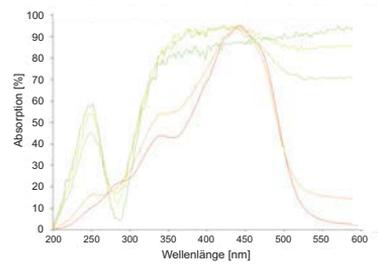


Abbildung 5.12: Absorptionsspektren einer Verdünnungsreihe des Zeaxanthins ($1/0.8/0.6/0.4/0.2$)

mehr auswertbar. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 5.12 für eine Verdünnungsreihe des Zeaxanthin dargestellt.

Ein Versuch die Retentionsfaktoren und die dazugehörigen Absorptionsmaxima der jeweiligen Messflecke zu korrelieren ist in Abbildung 5.13 dargestellt. Das Maximum der Absorption wird als weiterer Parameter für die Identifizierung einer Carotinoidspezies herangezogen. Diese Darstellung verdeutlicht, dass die Carotinoide aus Extrakten der Salweide-, Sommerlinde- und Kastanienpollen identische Positionen der Absorptionsmaxima aufweisen bei gleichem R_f (hier $R_f = 0.72$). Aber es gibt auch UV/Vis-Spektren von Carotinoiden mit gleichem Retentionsfaktor, die sich unterscheiden. Dies ist für die Carotinoide ($R_f = 0.65$) aus den Extrakten der Kastanien- und Salweidepollen zu sehen.

5.3.1 Quantitative Informationen der HPTLC-Daten

Für die Carotinoide β -Carotin, Cryptoxanthin, Zeaxanthin und Lutein konnten über die Auswertung der Flächeninhalte der Densitogramme die Konzentrationen in den Pollenextrakten abgeschätzt werden. Die Abtrennung der Pollenkörner von den Staubbeuteln vor der Extraktion gilt allgemein als schwierig, so dass sich Carotinoide aus den Staubbeuteln ebenfalls in den Proben befinden können. Hier muß angemerkt werden, dass bisher nur sehr wenige Untersuchungen von Carotinoiden aus reinem Pollenmaterial durchgeführt wurden. Allerdings wurde im Fall

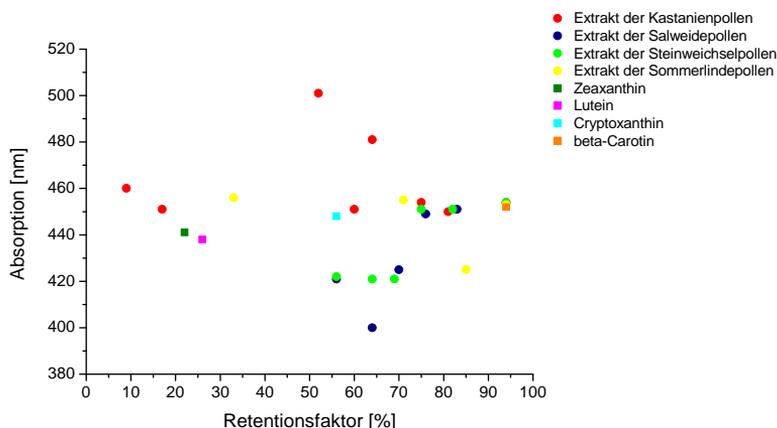


Abbildung 5.13: Auftragung von Retentionsfaktoren und Absorptionsmaxima der extrahierten Carotinoiden

der Rosskastanien kein Unterschied in der Carotinoidzusammensetzung eines Extraktes aus Pollen und Pollen plus Staubbeutel festgestellt.

Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Die Referenzcarotinoide β -Carotin und Lutein konnten in allen Extrakten der Kastanien-, Salweiden-, Steinweichsel- und Sommerlindenpollen nachgewiesen werden. Cryptoxanthin wurde nicht in dem Extrakt der Kastanienpollen gefunden und Zeaxanthin fehlte in dem Extrakt der Pollen der Sommerlinde. Die Konzentration der Carotinoide in dem Extrakt der Pollen des Götterbaumes war zu gering für eine Quantifizierung.

Die Gehalte der Carotinoide variieren deutlich in Abhängigkeit von der Pollenspezies, in den Pollenkörnern der Kastanie und der Steinweichsel ist die Konzentration von β -Carotin am höchsten. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass der Extrakt der Kastanienpollen die meisten Carotinoide enthält, die nicht identifiziert werden konnten. Zudem sind diese Carotinoide mit höheren Konzentrationen als in den anderen Proben vorhanden. In den Pollen der Salweiden und der Sommerlinden ist die Konzentration des Cryptoxanthins im Vergleich zu den übrigen Referenzcarotinoiden am höchsten. Bei allen quantitativen Be-

Tabelle 5.1: Durchschnittlicher Gehalt der Referenzcarotinoide β -Carotin, Cryptoxanthin, Lutein und Zeaxanthin in den Extrakten der Kastanien-, Salweiden-, Steinweichsel- und Sommerlindenpollen bestimmt mit Hilfe der Densimetrie (425 nm)

Spezies	R _f	Zuordnung	Gehalt [ppm]	Wiederholung
Kastanie	0.09			
	0.17			
	0.21	Zeaxanthin	3.9 ± 0.9	2
	0.27	Lutein	2.5 ± 1.2	4
	0.52			
	0.60			
	0.64			
	0.75			
	0.81			
	0.94	β -Carotin	4.7 ± 0.8	4
Salweide	0.21	Zeaxanthin	7.0 ± 0.2	2
	0.27	Lutein	3.5 ± 0.7	2
	0.56	Cryptoxanthin	9.6 ± 2.5	2
	0.64			
	0.70			
	0.76			
	0.83			
Steinweichsel	0.94	β -Carotin	6.8 1.4	4
	0.06			
	0.22	Zeaxanthin	6.4 ± 0.8	2
	0.28	Lutein	4.3 ± 0.4	2
	0.56	Cryptoxanthin	4.3 ± 1.3	4
	0.64			
	0.69			
	0.75			
Sommerlinde	0.82			
	0.94	β -Carotin	17.5 ± 0.8	4
	0.32	Lutein	1.9 ± 0.14	2
	0.53	Cryptoxanthin	7.9 ± 1.2	2
	0.72			
	0.76			
	0.82			
	0.91			
Götterbaum	0.95	β -Carotin	6.1 ± 0.7	2
	1.02			
	0.94	β -Carotin	^a	
Esche	^b			

^a Der Gehalt an β -Carotin war zu gering für eine Quantifizierung.

^b Es konnten keine Signale mit Hilfe der Densimetrie detektiert werden.

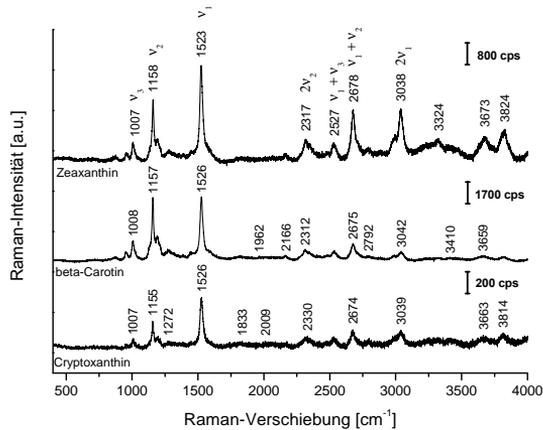


Abbildung 5.14: Raman-Spektren von Zeaxanthin, β -Carotin und Cryptoxanthin (488 nm, 10 s, 1.3 W/cm², 1800 gr/mm)

trachtungen muß in Erwägung gezogen werden, dass der Präparations- und Extraktionsprozess den finalen Carotinoidgehalt des Extraktes bestimmt.

5.4 Resonante Raman-Spektroskopie an Referenzcarotinoiden

Für ein besseres Verständnis der in-situ erzeugten Differenzspektren und der später geplanten Kopplung der Raman-Spektroskopie an die HPTLC wurden zunächst Raman-Spektren der Referenzcarotinoide aufgenommen. Analog zur Messung der Retentionsfaktoren mittels HPTLC wurden Raman-Spektren von β -Carotin, Zeaxanthin und Cryptoxanthin aufgezeichnet. Lutein lag nicht in reiner Form vor, deswegen wurde kein Referenzspektrum erstellt. Die Spektren wurden in Resonanz mit der Anregungswellenlänge 488 nm gemessen (siehe Spektren in Abbildung 5.14). Diese Spektren, die in Resonanz mit dem elektronischen $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang der Carotinoide gemessen wurden, weisen Banden im Bereich von 2000 bis 4000 cm⁻¹ auf. Diese Banden sind Kombinati-

onsschwingungen und Obertönen zuzuordnen. In Abbildung 5.14 sind die Beiträge der Schwingungen erster Ordnung zu den Kombinations- und Obertonschwingungen gekennzeichnet. Die Obertonschwingungen der ν_1 - beziehungsweise ν_2 -Banden liegen bei ungefähr 3040 cm^{-1} und 2320 cm^{-1} . Außerdem sind die Kombinationsschwingungen von $\nu_1 + \nu_3$ (2527 cm^{-1}) und $\nu_1 + \nu_2$ (2678 cm^{-1}) zu erkennen. Die Unterschiede zwischen den Spektren der Referenzcarotinoide bei gleicher Anregungswellenlänge erscheinen zuerst gering. Trotzdem kommt es zu Verschiebungen der ν_1 -Bande um 5 cm^{-1} , die Positionen der ν_2 -Schwingung variieren um 3 cm^{-1} . Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit der Literatur [99].

5.5 Methodenkopplung HPTLC-RRS

Um einen Vergleich der Carotinoidsignaturen kompletter Pollenkörner mit den Spektren der einzelnen Carotinoide zu ermöglichen, werden Raman-Spektren der extrahierten Carotinoide nach der Auftrennung mittels HPTLC aufgezeichnet. Für die Kombination von HPTLC und resonanter Raman-Spektroskopie (RRS) wurden zuvor meist NIR-Anregungen gewählt, um Interferenzen durch Fluoreszenz von der Platte zu vermeiden [118, 119]. Damit die geringen Bandenintensitäten ausgeglichen werden können, wurde die Ausnutzung von Verstärkungsmechanismen vorgeschlagen [120]. Unter Verwendung der Anregung von 488 nm in dieser Arbeit ist es möglich Raman-Messungen der separierten Carotinoide direkt auf der HPTLC-Platte durchzuführen. Bei resonanter Anregung fällt die Fluoreszenz von der HPTLC-Platte gegenüber der starken Raman-Signatur der Carotinoide nicht ins Gewicht.

Es wurden Spektren der pulvrigen Referenzsubstanzen mit Spektren der Referenzcarotinoide auf den Platten verglichen, um Veränderungen der Raman-Spektren durch Wechselwirkungen der Probe mit der HPTLC-Platte auszuschließen. Zum Vergleich wurden die Referenzcarotinoide in Aceton gelöst und ein Tropfen dieser Lösung auf die Platte appliziert. Die Spektren dieser Proben sind in Abbildung 5.15 zu sehen. Zusätzlich wurden Spektren von den Referenzcarotinoiden nach abgeschlossenem chromatographischen Lauf gemessen (siehe Abbildung 5.16). Es wurden keine Veränderungen der Bandenpositionen beobachtet und keine Raman-Banden der HPTLC-Platte detektiert. Dahingegen wird deutlich, dass bei der relativ geringen präresonanten

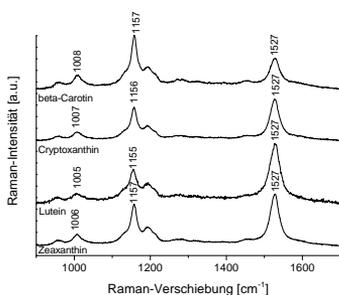


Abbildung 5.15: Raman-Spektren der Referenzcarotinoide gelöst in Aceton nach dem Eintrocknen auf einer HPTLC-Platte (488 nm, 1 s, 1.3 W/cm^2)

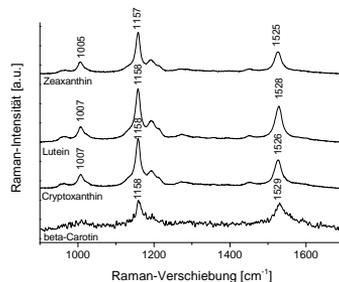


Abbildung 5.16: Raman-Spektren der Referenzcarotinoide nach Auftrennung per HPTLC (488 nm, 1 s, 1.3 W/cm^2)

Verstärkung der Carotinoide-Banden bei Anregung im NIR, das Raman-Spektrum der Carotinoide vom Spektrum der HPTLC-Platte überlagert wird (siehe Abbildung 5.17). Der Untergrund und die Banden bei 487 , 784 , 915 und 969 cm^{-1} kommen von der HPTLC-Platte.

Die Spektren der Carotinoide aus den Extrakten der Kastanien-, Sommerlinden- und Steinweichselpollenkörner sind in den Abbildungen 5.18, 5.20 und 5.21 zu sehen. Die Spektren, der aus den Kastanienpollen extrahierten Carotinoide (siehe Abbildung 5.18), weisen neben den für Carotinoide charakteristischen Banden im Fingerprint-Bereich Banden im Bereich der Kombinations- und Obertonschwingungen auf. Hierzu gehören die Peaks bei 2313 ($2 \times \nu_2$), 3044 ($2 \times \nu_1$), 2529 ($\nu_1 + \nu_3$) sowie 2686 cm^{-1} ($\nu_1 + \nu_2$). Die Positionen der ν_1 -Bande variieren zwischen 1529 und 1536 cm^{-1} . Dieser Fakt unterstützt die Schlussfolgerung, dass die ν_1 -Schwingung im in-situ Differenzspektrum des Kastanienpollenkorns aufgrund der strukturellen Heterogenität der enthaltenen Carotinoide verbreitert ist. Jedoch liegen die Positionen der ν_1 -Banden der aufgetrennten Carotinoide höher als das ν_1 -Signal im Differenzspektrum des Kastanienpollenkorns (vergleiche Abbildung 5.3). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Carotinoide mit niedrigen Wellenzahlen für die Position der ν_1 -Schwingungen im

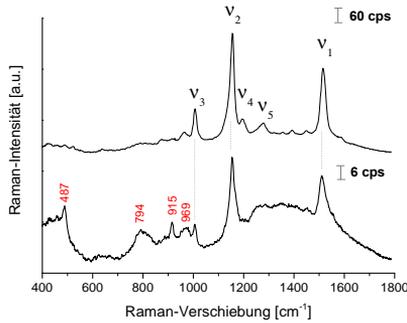


Abbildung 5.17: Raman-Spektren zweier Spots aus dem Kastaniensextrakt, Banden der HPTLC-Platte sind rot markiert (785 nm, 10 s, 4.7 W/cm^2)

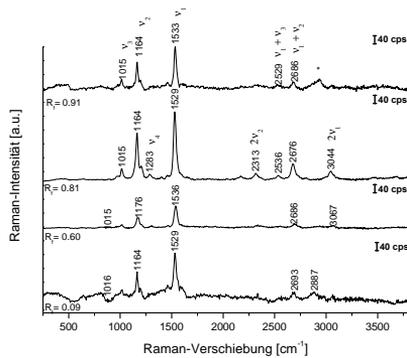


Abbildung 5.18: Raman-Spektren der Carotinoide aus dem Extrakt der Rosskastanienpollen mit den Retentionsfaktoren 0.91, 0.81, 0.6 und 0.09 (488 nm, 10 s, $8.5 \times 10^{-2} \text{ W/cm}^2$)

in-situ Spektrum liegen nicht im Extrakt der Kastanienpollen oder nur in geringen Konzentrationen enthalten waren. Oder diese Carotinoide wurden vor dem Raman-Experiment abgebaut. Allerdings befinden sich die ν_1 -Positionen mit einem R_f von 0.81 und 0.9 bei tieferen Wellenzahlen als die ν_1 -Banden in den Extrakten der übrigen Pollenspezies. Dies ergibt der Vergleich mit den Spektren der Extrakte aus Sommerlinden- und Steinweichselpollen (siehe Abbildungen 5.20 und 5.21). Die Positionen der ν_1 -Banden in diesen Spektren liegen bei 1532 oder 1533 cm^{-1} , dies steht in guter Übereinstimmung mit den in-situ generierten Differenzspektren.

Die Spektren in Abbildung 5.19 wurden aus den Spektren der aufgetrennten Carotinoide generiert, es werden Abweichungen der Positionen der Carotinoidmoden gegenüber den in-situ Spektren der ganzen Pollenkörner (siehe Abbildung 5.3) nachgewiesen. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Unterschiede bereits durch den Extraktionsprozess hervorgerufen wurden. Auch der Einfluss der Pollenmatrix auf die Position der ν_1 -Schwingung in dem in-situ erzeugten Differenzspektrum kann in Abhängigkeit von der Pollenspezies unterschiedlich ausgeprägt sein und die zuvor diskutierten Abweichungen verursachen.

Der Vergleich von Spektren der Extrakte aus den Pollen der Kastanie, Salweide und Steinweichsel mit einem Retentionsfaktor von 0.94 ist in Abbildung 5.22 dargestellt. Die Positionen der Banden der C-C Einfach- und der C-C Doppelbindung sind für diese drei Substanzen identisch, sie liegen bei 1164 und 1533 cm^{-1} . Auch im Bereich der Kombinations- und Obertonschwingungen sind Unterschiede zu erkennen. Die Kombination aus der ν_1 - und ν_2 -Schwingung liegt bei circa 2686 cm^{-1} und ist in allen Spektren zu finden. Die Bande bei 2936 cm^{-1} im Spektrum der Probe der Rosskastanie wird durch die HPTLC-Platte verursacht. Dieses Signal ist nur nachweisbar, wenn das Carotinoid in geringen Konzentrationen vorliegt. Aus den Bandenlagen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Carotinoide überwiegend als trans-Isomere vorliegen [99]. Das steht in guter Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass trans-Isomere stabiler sind als die cis-Isomere und somit häufiger in der Natur vorkommen. Im Gegensatz dazu waren nach dem HPTLC-Lauf cis-Isomere beobachtet worden (vergleiche Abbildung 5.10). Daraus kann geschlossen werden, dass derselbe HPTLC-Spot cis- und trans-Isomere enthält. Der Anteil der Carotinoide, der als cis-Isomer vorlag, muss vor dem Raman-Experiment eine Umlagerung vollzogen haben.

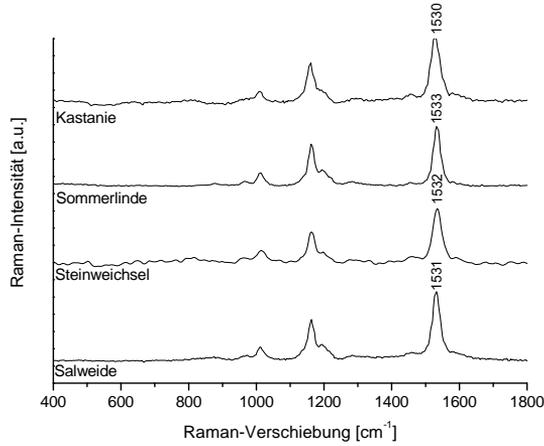


Abbildung 5.19: Mittelwertspektren generiert aus den Raman-Spektren der aufgetrennten Carotinoide

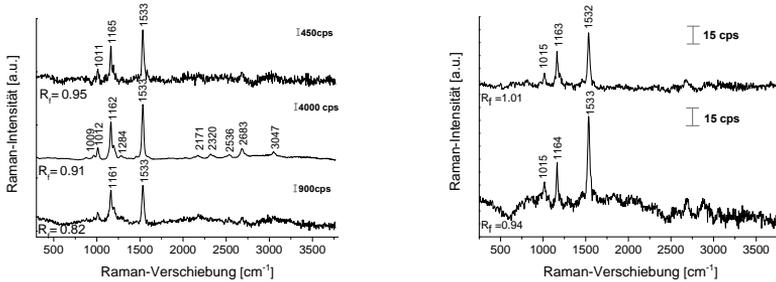


Abbildung 5.20: Raman-Spektren der Carotinoide aus dem Extrakt der Sommerlindepollen ($R_f = 0.95, 0.9, 0.82$) (488 nm, 1 s, $8.5 \times 10^{-2} \text{W/cm}^2$)

Abbildung 5.21: Raman-Spektren der Carotinoide aus dem Extrakt der Steinweichselpollen ($R_f = 1.01, 0.94$) (488 nm, 10 s, $8.5 \times 10^{-2} \text{W/cm}^2$)

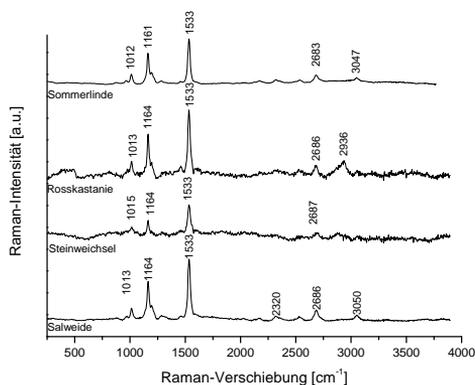


Abbildung 5.22: Raman-Spektren der Extrakte der Sommerlinden-, Rosskastanien-, Steinweichsel- und Salweidenpollen mit einem Retentionsfaktor von 0.94 (488 nm, 1 s, $8.5 \times 10^{-2} \text{W/cm}^2$)

Ein Ausbleichen der Carotinoide auf der HPTLC-Platte wurde innerhalb kurzer Zeit trotz gekühltem und abgedunkeltem Transport beobachtet. Da die Auswahl der Messpunkte für die Raman-Messung visuell erfolgte, trug das schnelle Ausbleichen dazu bei, dass nicht von allen Spezies HPTLC-, Raman- und UV/Vis-Daten vorliegen.

Obwohl eine Identifizierung aller Carotinoide nicht möglich war, kann anhand der Auftragung der Positionen der ν_1 -Bande bei circa 1520 cm^{-1} gegen die Maxima der UV-Messungen (siehe Abbildung 5.23) die Anzahl der C-Atome in den Carotinoiden abgeschätzt werden. Für Vergleichszwecke wurden Literaturwerte für Moleküle mit 30, 35, 40 und 50 C-Atomen eingesetzt [106]. Der Vergleich ergibt, dass die Carotinoide der Pollen 35 bis 40 C-Atome enthalten.

5.6 Fazit: Raman-Spektroskopie an Carotinoiden aus Pollen

In welchem Verhältnis stehen die in-situ generierten Carotinoidsignaturen der ganzen Pollenkörner zu den Raman-Spektren der mittels

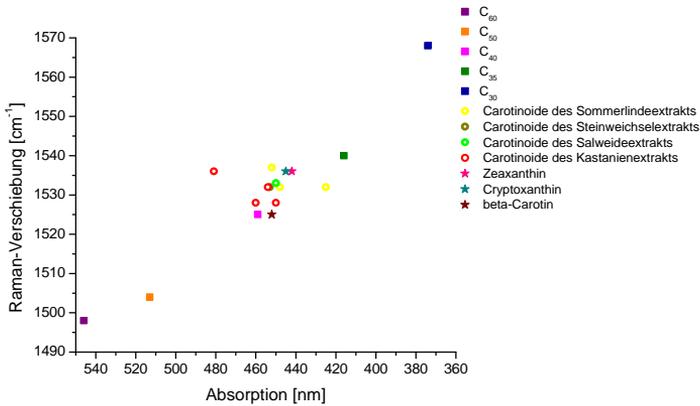


Abbildung 5.23: Korrelation der Absorptionsmaxima und der Position der ν_1 -Schwingungen der extrahierten Carotinoide

HPTLC aufgetrennten Carotinoide? Aus den vorliegenden Daten kann das Fazit gezogen werden, dass in-situ erzeugte resonante Raman-Spektren der Pollenkörner artspezifische Informationen über die Carotinoid-Zusammensetzung und Struktur liefern. Dies wurde durch die in Abschnitt 5.2 diskutierten in-situ Raman-Daten einzelner Kastanienpollenkörner und die Kombination von HPTLC-AMD mit resonanter Raman-Spektroskopie belegt (siehe zum Beispiel Abbildung 5.3).

Die in-situ Applikation zeigte Vorteile gegenüber der Raman-Messung der aufgetrennten Carotinoide: Es entfallen aufwendige Extraktions- und Reinigungsschritte. Alle enthaltenen Carotinoide tragen zum Differenzspektrum der Carotinoide signatur bei und es können keine Substanzen während der Aufreinigung verloren gehen. Obwohl die in-situ Spektren von einem einzelnen Pollenkorn generiert werden, enthalten sie die gleichen Informationen wie die Spektren der aufgetrennten Carotinoide. Da die Spektren in Resonanz angeregt werden, ist die Detektion sehr empfindlich, wie am Beispiel der Carotinoide in einem Eschenpollenkorn bewiesen werden konnte. Sogar der Einfluss der Matrix auf die Positionen der Carotinoidbanden könnte aus den in-situ erzeugten Raman-Spektren abgelesen werden. Diese Eigenschaften ermöglichen den Einsatz der in-situ generierten Spektren, um Korrekturen

der Pollenspektren für die Clusteranalyse durchzuführen. Spezies-spezifische Carotinoidsignaturen könnten mathematisch von den Spektren der jeweiligen Pollenart abgezogen werden, so dass das Ausbleichen der Carotinoide vor der Messung unnötig werden würde (siehe Kapitel 4). Zudem ist die resonante Raman-Spektroskopie eine geeignete Methode, um die Analyse von Carotinoiden zu ergänzen. Vor allem als Erweiterung der Absorptionsspektroskopie empfiehlt sie sich aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit und den enthaltenen Strukturinformationen über die untersuchten Moleküle. Ein Vorteil der Kombination von Raman-Spektroskopie und HPTLC ist mit Sicherheit, dass strukturelle Informationen ohne a priori Annahmen über Retentionsfaktoren erhalten werden können. Um diese Methodenkombination zu verbessern, müssen in der Zukunft schnelle Methoden für ein automatisches Ansteuern der Messpunkte und für eine On-line-Detektion unmittelbar im Anschluß an den HPTLC-Lauf entwickelt werden. So könnte die resonante Raman-Spektroskopie als empfindliche Methode nach der Auftrennung von Carotinoiden zur Identifizierung dieser in komplexen Proben wie Pollen dienen.

Kapitel 6

Molekulare Zusammensetzung der Pollen

6.1 Stand der Forschung

Der Aufbau von Pollen ist seit langer Zeit Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Schon im Jahre 1889 erkannte Mangin, dass die Membranen der Pollenkörner aus zwei Schichten bestehen [121]. Er fand heraus, dass die Innere dieser Schichten aus unterschiedlichen Kohlenhydraten aufgebaut ist - hauptsächlich Cellulose. Zetzsche bestätigte dies durch eine Blaufärbung der Intine mit Iod und prägte den Begriff Sporopollenin für den unlöslichen Teil der Pollenkörner [122, 123]. Gleichzeitig unterbreitete er einen Vorschlag für die Strukturformel des Sporopollenins von Roggenpollen: $C_{90}H_{134}O_{31}$ [124]. Bis heute ist die Aufklärung der Struktur des Sporopollenins nicht gelungen. Lange Zeit galten Carotinoide als Monomere dieses Biopolymers, weil die Bildung der Pollenkörner in den Staubbeuteln mit einem erhöhten Carotinoidwert korreliert [125]. Inhibitoren der Carotinoidbiosynthese beeinflussten die Bildung des Sporopollenins jedoch nicht [96], daher wurde dieser Vorschlag verworfen. Ergebnisse von FTIR- und NMR-Untersuchungen ließen den Schluss zu, dass Sporopollenin aus einer aliphatischen und einer aromatischen Komponente besteht [126, 82, 127, 1]. In den

NMR-Spektren dominiert die aliphatische Komponente [126, 82], ergänzend lassen sich in den FTIR-Spektren Banden den Carbonyl- sowie Estergruppen zuordnen [1, 127]. Diese Befunde wurden mit Hilfe weiterer Techniken bestätigt [128]. Es ist nicht bekannt, wie die aliphatischen und aromatischen Komponenten miteinander verbunden sind und inwieweit sich die Zusammensetzung verschiedener Pollenspezies unterscheidet. Als Bestandteile der aromatischen Komponente wurden verschiedene Moleküle diskutiert. Der Einbau von Phenylalanin in die Exinematrix wurde mittels Einsatz von Tracern belegt [129]. Das Hauptprodukt eines Pottascheaufschlusses ist Hydroxybenzoesäure als Reaktionsprodukt von Zimtsäure [129]. Untersuchungen mit Hilfe der Pyrolyse-Gas-Chromatographie wiesen auf Cumarinsäure als Vorläufer des Makromoleküls hin [130]. Mit Hilfe von Antikörpern wurde diese in der Pollenhülle nachgewiesen [131].

Bei Messungen des Sporopollenins von Bärlapppollen (*Lycopodium clavatum*) mit Matrix-unterstützter Laser-Desorptions-Ionisation wurden Fragmente mit maximal 18 kD erzeugt. Die Abstände der Massen lassen keinen Rückschluss auf eine einfache Dimerisierung zu [132]. Dies widerspricht Beobachtungen von Wiermann *et al.*, die eine Abspaltung chemisch identischer Fragmente bei der Zersetzung des Sporopollenins von Rohrkolbenpollen (*Typha angustifolia*) mit der FTIR-Spektroskopie beobachtet haben [133]. Die Unlöslichkeit des Sporopollenins schränkt die Analyse auf Festkörpermethoden ein. Eine Alternative bietet die Verwendung von 2-Aminoethanol als Lösungsmittel für Sporopollenin. In einer sich anschließenden ¹H-NMR Analyse wurden tri- oder tetra-substituierte Phenole gefunden, allerdings wurden große Bereiche des Spektrums von Signalen des 2-Aminoethanols überdeckt [134].

Bei vielen der vorgestellten Techniken wurde das Sporopollenin von den übrigen Komponenten der Pollenkörner abgetrennt. Für die Isolation des Sporopollenins werden Säuren [1], organische Lösungsmittel [2] oder anorganische Reagenzien [4] eingesetzt. Mögliche Reaktionen dieser Chemikalien mit der Pollenhülle wurden bisher in wenigen Arbeiten bedacht [132, 96]. Die aufgereinigten Proben wurden mikroskopisch geprüft, dabei wird angenommen, dass eine Modifikation der chemischen Zusammensetzung des Sporopollenins mit einer Veränderung der Morphologie der Pollenkörner einhergeht.

Ein anderer Ansatz zur Strukturaufklärung des Sporopollenins basiert auf der Annahme, dass in fossilen Pollenkörnern nur das Sporopol-

lenin erhalten bleibt. Deshalb bietet die Analyse fossiler Pollenproben die Möglichkeit, Sporopollenin ohne vorhergehende Isolation zu untersuchen. Diese Analysen wurden vornehmlich mit der ^{13}C -Festkörper-NMR durchgeführt. Im Vergleich zu der Untersuchung frischer Pollenkörner wurde ein höherer Anteil an Aromaten sowie ein geringerer Sauerstoffgehalt gefunden [73, 135, 136]. Ob Rückschlüsse von fossilen Pollenproben auf moderne und rezente Spezies zulässig sind, ist nicht geklärt. Im Rahmen dieser Experimente wurde Sporopollenin unterschiedlichen Ursprungs verglichen (von Pollen, Algen, Sporen) [137]. Die Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum waren bei den höheren Pflanzen breiter, dies lässt auf eine größere Heterogenität der chemischen Gruppen schließen [137].

Untersuchungen des Polleninneren dagegen sind selten, sie beschränken sich auf die Analyse der Allergene. Lange Zeit war unklar, welche Moleküle die allergischen Reaktionen auslösen. Heute ist bekannt, dass die Pollenallergene hauptsächlich zu drei Proteinfamilien gehören: Expansinen, Profilinen und calciumbindenden Proteinen [138, 139].

6.2 Chemische Kartierung in Dünnschnitten

Die Verteilung von chemischen Gruppen in einer Probe kann mit Hilfe von mikrospektroskopischen Kartierungsexperimenten dargestellt werden. Bei solchen Messungen wird ein Raster über die Probenfläche gelegt und in jedem Punkt dieses Rasters wird ein Raman-Spektrum erzeugt. Anschließend wird ein spektrales Merkmal, zum Beispiel eine Bande, ein Spektralbereich, eine Frequenz oder eine Klassenzugehörigkeit ausgewählt und als Funktion der Ortskoordinate dargestellt. Somit können Raman-Moden Strukturen innerhalb des Pollenkorns zugeordnet werden.

Die Intensitätsverteilung der Banden bei 483, 784, 850/830, 1002, 1448 und 1651 cm^{-1} in vier individuellen Roggenpollenkörnern ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Der Peak bei 483 cm^{-1} kann der C-C-C Deformationsschwingung der Kohlenhydrate wie Stärke oder Pektin zugeordnet werden [140]. Die Bande bei 784 cm^{-1} ist ein Indiz für das Vorkommen von Nukleinbasen und Nukleinsäuren. Charakteristisch für *para*-disubstituierte Benzole ist das Fermidublett bei 850/830 cm^{-1} [141]. Phenylalanin erzeugt ein scharfes Signal bei 1002 cm^{-1} . Die De-

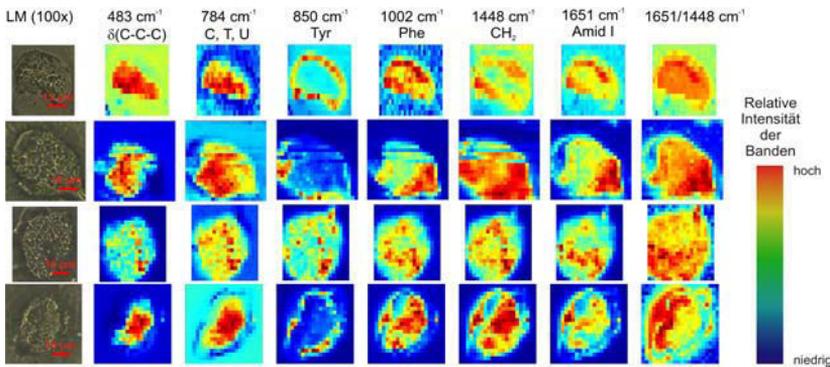


Abbildung 6.1: Darstellung der Intensitätsverteilungen für die angegebenen Peaks in Dünnschnitten á $10\ \mu\text{m}$ von Roggenpollenkörnern (auf CaF_2 -Fenstern gemessen, $785\ \text{nm}$, $10\ \text{s}$, $1.9\ \text{W}/\text{cm}^2$)

formationsschwingung der CH_2 -Gruppen aliphatischer Moleküle kann der Bande bei $1448\ \text{cm}^{-1}$ zugeordnet werden.

Die Amid I Bande bei $1651\ \text{cm}^{-1}$ tritt in den Spektren aller Proteine auf. Ihre Intensität über die Fläche des Pollenkorns aufgetragen, gibt somit die Verteilung der Proteine wieder. Die sich ergebenden Muster der Amid I Bande und des Peaks bei $1002\ \text{cm}^{-1}$ sind kongruent, die Proteine sind hauptsächlich im Zellinneren zu finden. Das Dublett bei $850/830\ \text{cm}^{-1}$ ist charakteristisch für *para*-disubstituierte Benzole wie die Aminosäure Tyrosin. In diesem Fall ist es unwahrscheinlich, dass die Bande durch Tyrosin enthaltendes Protein verursacht wird. Denn die maximale Intensität dieser Bande wird in der Exine gemessen und nicht im Bereich des Zellinneren, wo die Proteine hauptsächlich vorliegen. Eine Ursache für das Dublett kann freies Tyrosin sein oder ein anderes *para*-disubstituiertes Benzol. Die Intensität des Lipidpeaks bei $1450\ \text{cm}^{-1}$ ist in der Pollenhülle und im Zellkern hoch. Die Erklärung hierfür ist, dass Phospholipide die inneren und äußeren Membranen bilden.

Mit Hilfe der ausgewählten Banden können morphologische Strukturen des Pollenkorns wie die Hülle, der Zellkern und Kohlenhydratreserven abgebildet werden. Im Bereich des Sporopollenins überlagern sich aliphatische und aromatische Banden, dies stimmt mit bisherigen Untersuchungen zum Aufbau dieses Biomakromoleküls überein [126, 127].

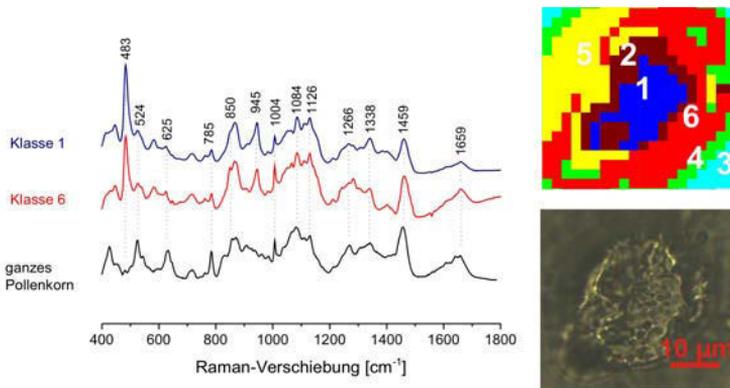


Abbildung 6.2: Hierarchische Clusteranalyse der Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²) eines Dünnschnitts von einem Roggenpollenkorn, die Klassen zweier Spektren sind beispielhaft gezeigt

Neben der chemischen Kartierung wurden hierarchische Clusteranalysen derselben Dünnschnitte ausgewertet, ein Ergebnis ist in Abbildung 6.2 zu sehen. Die Raman-Spektren dieses Pollenkorns können in sechs Gruppen unterteilt werden. Als Beispiel sind die Spektren der ersten und sechsten Klasse dargestellt. Ein Vergleich dieser Spektren mit dem Mittelwertspektrum eines ganzen Roggenpollenkorns offenbart Unterschiede. Die Banden bei 483 und 945 cm⁻¹ wurden in den Spektren der ersten und sechsten Klasse detektiert aber nicht in dem Spektrum des kompletten Pollenkorns. Die relativen Intensitäten der Peaks bei 524, 625 und 785 cm⁻¹ sind im Spektrum des ganzen Pollenkorns höher. Neben diesen Unterschieden existieren viele Gemeinsamkeiten vor allem im Bereich von 1000 bis 1800 cm⁻¹. Dies kann durch die Eindringtiefe des Lasers erklärt werden. Das Raman-Signal stammt nicht ausschließlich von der Probenoberfläche, tiefer liegende Schichten tragen ebenso zum Raman-Spektrum bei [142]. So kann beispielweise der Fokus auf einem Zellkern liegen, aber auch darunter oder darüber liegendes Cytoplasma liefert einen Beitrag zum entstehenden Spektrum. Eine Abschätzung der Eindringtiefe für eine Anregungswellenlänge von 785 nm ergibt einen Wert von mehreren Millimetern.

6.3 Analyse der Pollenhülle

Für die Analyse des Sporopollenins ist die Isolation des Polymers eine Voraussetzung. Allerdings kann die gewählte Aufreinigungsmethode die Ergebnisse der Analyse beeinflussen. In dieser Arbeit wurden die Hüllen der Pollenkörner durch verschiedene Methoden aufgereinigt und die resultierenden Proben mit Hilfe spektroskopischer Methoden verglichen. Die ausgewählten Präparationen sind Routinemethoden der Palynologen oder basieren auf Veröffentlichungen in Fachzeitschriften, sie umspannen einen langen Zeitraum in der Geschichte der Pollenanalysen. Die Acetolyse wurde in den 1930er Jahren von Erdtman eingeführt [82], wohingegen die Aufreinigung des Sporopollenins mit wasserfreiem Hydrogenfluorid (HF) erst 1998 veröffentlicht wurde [1].

Im Folgenden wurden die Exine von Roggenpollenkörnern mit verschiedenen Methoden (siehe Tabelle 6.1) isoliert, die aufgereinigten Fraktionen wurden mittels Raman-, FTIR- und NMR-Spektroskopie analysiert. Welche Technik angewendet werden konnte, war von der Probenmenge und den Eigenschaften der Probe abhängig. Jede Technik weist Vor- und Nachteile auf. So sind für die Festkörper-NMR Probenmengen von mindestens 100 mg erforderlich. Raman-Spektren dagegen können von einem einzelnen Pollenkorn gewonnen werden, doch es kann zur Überlagerung durch Fluoreszenz kommen. Bei der FTIR-Mikro-Spektroskopie ist die Ortsauflösung gemäß der Beugungsbegrenzung wesentlich geringer als für die Raman-Mikro-Spektroskopie, daher können keine Spektren von individuellen Pollenkörnern mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis aufgenommen werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von intakten und behandelten Pollenkörnern gemacht, um Veränderungen der Morphologie zu dokumentieren.

6.3.1 Rasterelektronenmikroskopie unter Umgebungsbedingungen

Pollen werden von Botanikern anhand ihrer Form und Oberflächenbeschaffenheit unterschieden, ein unverzichtbares Hilfsmittel hierfür ist das Lichtmikroskop. Eine bessere Auflösung als Lichtmikroskope bieten die Rasterelektronenmikroskope, welche auch unter Umgebungsbedingungen (engl.: *environmental scanning electron microscopy*, ESEM) genutzt werden können. In Abbildung 6.3 werden ESEM-Aufnahmen

Tabelle 6.1: Überblick der Edukte, Umsetzungen und Produkte der verwendeten Reaktionen zur Isolation der Pollenfraktionen, CHA=Cyclohexylamin

Nr.	Edukt	Umsetzung	Produkt
1.	ganze Pollen	+ HF für 5h bei 40°C	Exine
2.	gemahlene Pollen	+ HF für 5h bei 40°C	Exine
3.	ganze Pollen	1) in $C_4H_5O_3 : H_2SO_4$ erhitzen 2) + $C_2H_4O_2$	Exine
4.	ganze Pollen	1) für 2h in MMNO : CHA (3:4) 2) + MES 3) + Cellulysin, Macerace, BSA 4) Gradientenzentrifugation	Exine
5.	ganze Pollen	in KOH-Schmelze	Exine
6.	ganze Pollen	für 2h in MMNO,CHA, Saccharose (2:1:1)	Sporoplasten, Exine mit Intineresten
7.	ganze Pollen	Extraktion mit H_2O (kalt)	Polleninneres, Rückstand

unbehandelter Roggenpollenkörner mit Roggenpollenkörnern nach Abschluss unterschiedlicher Aufreinigungsmethoden verglichen. Roggenpollenkörner sind ca. 40 μm lang, stabförmig und besitzen Einkerbungen an den Seiten. In Abbildung 6.3 a ist ein unbehandeltes Roggenpollenkorn mit Apertur zu sehen. Nach der Behandlung mit HF (siehe Tabelle 6.1 Methode 1) wirken die Pollenkörner eingefallen, die Einkerbungen an den Seiten treten deutlicher hervor (6.3 b). Durch den Einsatz von N-Methylmorpholin-N-oxid (MMNO) platzen die Pollenkörner auf, die Enzyme können in die Pollenhülle eindringen und die Intine abbauen (Methode 4). Ohne die Intine fehlt der Pollenhülle die Stabilität, die morphologischen Charakteristika eines Roggenpollenkorns gehen verloren (6.3 c). Das Erhitzen der Roggenpollenkörner in einer Lösung bestehend aus Schwefelsäure und Essigsäure (Methode 3) verändert die Farbe der Pollenkörner von gelb zu braun, deutliche morphologische Veränderungen sind in Abbildung 6.3 d jedoch nicht auszumachen. Durch einen basischen Aufschluss (Methode 5) platzen die Pollenkörner auf und das Polleninnere kann entfernt werden. Allerdings gelang das Beseitigen der Salzreste trotz intensiven Waschens nicht (6.3 e). Die Verwendung von MMNO ohne anschließendes Hinzufügen von Enzymen (Methode 6) resultiert in eingefallenen Pollenkörnern ähnlich denen in Abbildung 6.3 b, allerdings ist an der Spitze des Pollenkorns eine Veränderung der Oberfläche zu erkennen (6.3 f).

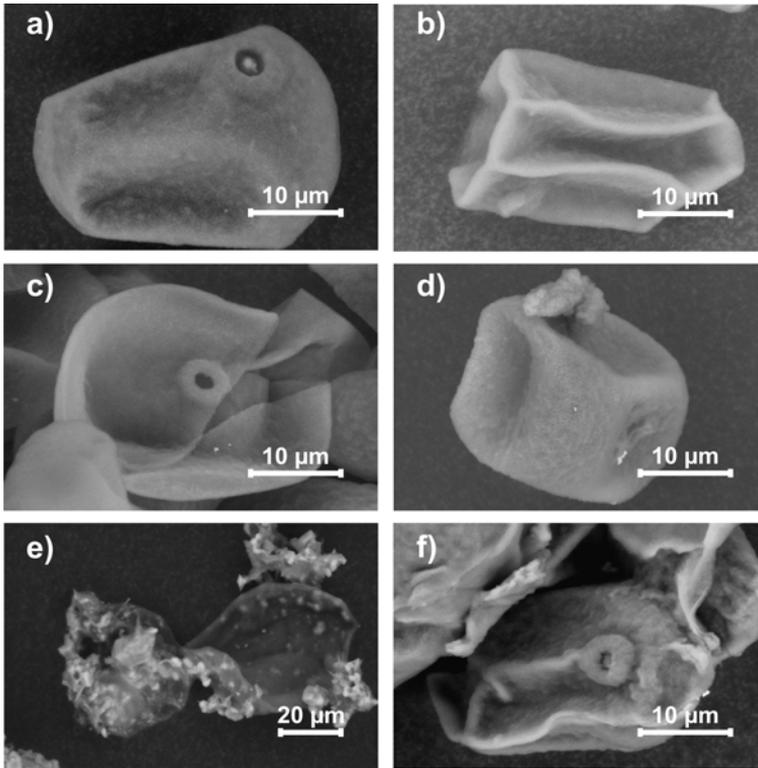


Abbildung 6.3: ESEM-Aufnahmen von einem a) unbehandelten Roggenpollenkorn ($2000\times$ Vergrößerung), b) mit HF behandelten Roggenpollenkorn ($2000\times$ Vergrößerung), c) Roggenpollenkorn nach der Enzymaufreinigung ($2000\times$ Vergrößerung), d) Roggenpollenkorn nach Acetolyse ($2000\times$ Vergrößerung), e) Roggenpollenkorn nach basischem Aufschluss ($1500\times$ Vergrößerung), f) Roggenpollenkorn nach der Behandlung mit MMNO ($2000\times$ Vergrößerung)

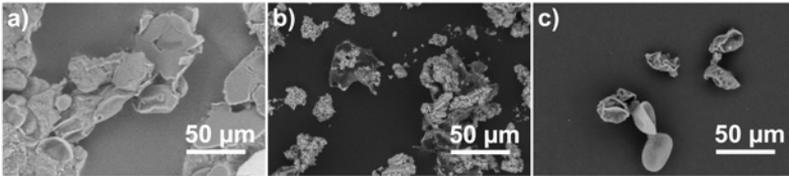


Abbildung 6.4: ESEM-Aufnahmen von Pollenkörnern nach der Behandlung mit a) MMNO (500× Vergrößerung), b) KOH (500× Vergrößerung), c) Schwefelsäure und Essigsäure (400× Vergrößerung)

Wie Abbildung 6.4 illustriert, sind die entstehenden Sporopolleninfraktionen nicht homogen. Die ESEM-Aufnahmen der Umsetzungen mit a) MMNO, b) KOH und c) Schwefelsäure/Essigsäure verdeutlichen dies. Nur wenige Pollenkörner weisen die typischen Strukturmerkmale der Roggenpollenkörner auf, hingegen sind viele nicht mehr als Roggenpollenkörner zu identifizieren. Es ist nicht geklärt, ob von den im Mikroskop beobachtbaren Veränderungen der Pollenmorphologie Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung zulässig sind. Weder kann von einem unverändert aussehenden Pollenkorn auf ein Ausbleiben einer chemischen Umsetzung, noch durch morphologische Veränderungen auf chemische Veränderungen geschlossen werden. Dies war das Ziel der spektroskopischen Experimente in diesem Teil der Arbeit.

6.3.2 Schwingungs-Spektroskopie

Die Schwingungs-Spektroskopie wurde zur Untersuchung isolierter Pollenkomponenten eingesetzt, um das Verständnis der komplexen Spektren der ganzen Pollenkörner zu erleichtern. Die Zuordnung einer Raman-Bande zu einer bestimmten Pollenfraktion erleichtert die Interpretation der Spektren. Die so gewonnenen chemischen Informationen sollen das Wissen der Botaniker über Pollenbestandteile erweitern. Mit gebräuchlichen Aufreinigungsprozeduren wurden die Exineschicht, die Intineschicht (anhaftend an der Exineschicht) und die innenliegenden Sporoplasten, die zelluläre Fraktion, isoliert. Zur Aufreinigung des Sporopollenins wurden Methoden mit Wasserstofffluorid [1], MMNO [2] sowie die Acetolyse [4] genutzt. Der innere Teil der Pollen, der Sporoplast, wurde durch eine Prozedur mit MMNO in Kombination mit Cyclohexylamin (Methode 6) freigesetzt und konnte von der Exine-

schicht getrennt werden. Die derart isolierten Fragmente wurden mit Raman- und FTIR-Mikro-Spektroskopie analysiert. Die schwingungsspektroskopischen Methoden wurden eingesetzt, um die Veränderungen der aufgereinigten Sporopolleninfraktionen gegenüber dem unbehandelten Pollenkorn zu detektieren. Es muss dabei bedacht werden, dass Unterschiede durch das Polleninnere verursacht werden können, welches nur in den ganzen Pollenkörnern enthalten ist. Um auch den Einfluss des Polleninnern auf die Spektren zu berücksichtigen, wurden Pollenkörner mit Wasser extrahiert (Methode 7) und der Extrakt (dieser enthält beispielsweise die Allergene) sowie der Rückstand untersucht.

Aus den Schwingungs-Spektren der Fraktionen lassen sich die Beiträge der Einzelkomponenten zum FTIR- und Raman-Spektrum abschätzen. Die FTIR-Spektren des extrahierten Sporoplasten (6.5 b nach Methode 7), der Exineschicht aufgereinigt mit HF (6.5 c nach Methode 1), gekocht mit Schwefelsäure/Essigsäure (6.5 d nach Methode 3), aufgereinigt mit MMNO/Enzymen (6.5 g nach Methode 4), mit teilweise anhaftender Intineschicht (6.5 f nach Methode 6) sowie die Spektren der extrahierten Pollenkörner (6.5 e nach Methode 7) und der Extrakt (6.5 b nach Methode 7) wurden mit dem Spektrum unbehandelter Roggenpollenkörner (6.5 a) verglichen. Die Banden des Wasserextrakts dominieren das FTIR-Spektrum der ganzen Pollenkörner, die Banden der Kohlenhydrate bei 1058, 1077 und 1106 cm^{-1} sind in den Spektren beider Fraktionen zu finden. Diese Banden sind typisch für Pyranosylringe wie sie beispielsweise in der DNA vorkommen [43]. Ebenso treten die Banden bei 1238, 1335, 1400 und 1453 cm^{-1} in beiden Spektren auf, diese können den Schwingungen der C-H und O-H Bindungen der Kohlenhydrate zugewiesen werden [43].

Die breite Amid I Bande bei 1640 cm^{-1} setzt sich aus mehreren Beiträgen zusammen und gibt Auskunft über die Sekundärstruktur der Proteine. Eine Bande im Bereich von 1650 bis 1657 cm^{-1} ist typisch für eine α -Helix Konformation, Banden bei 1630 und 1680 cm^{-1} entsprechen der Sekundärstruktur einer β -Faltblattkonformation [143]. Oft kommt es zu Überlagerungen der Konformationen. So ist eine Unterscheidung zwischen einer α -Helix Struktur und einer ungeordneten Struktur nicht möglich, da für die ungeordnete Konformation eine Bande bei 1655 cm^{-1} charakteristisch ist [143]. Eine ausführlichere Diskussion der Proteinsekundärstruktur anhand der Amid I Bande erfolgt im Zusammenhang mit der Interpretation des Wellenzahlenbereichs von 1600 bis 1700 cm^{-1} (siehe Abbildung 6.5).

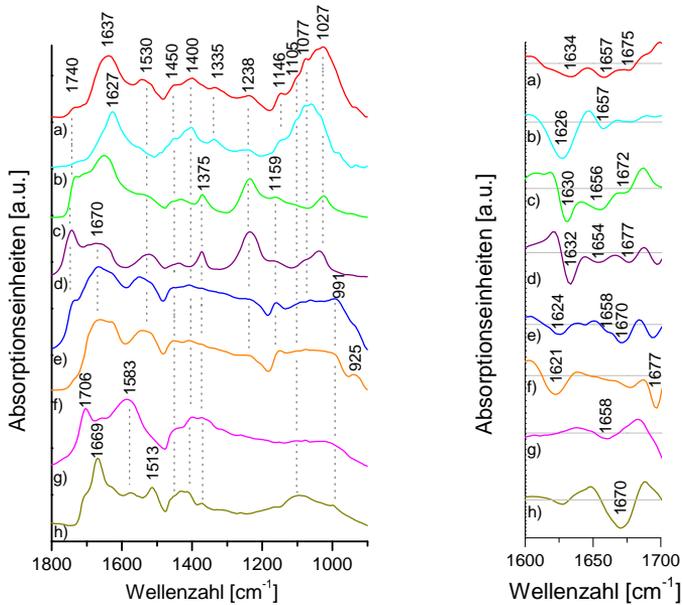


Abbildung 6.5: FTIR-Spektren (links) und deren zweite Ableitung (rechts) von a) unveränderten Roggenpollenkörnern b) dem Wasserextrakt eines Roggenpollenkorns, c) mit HF behandelten Pollenkörnern, d) Pollenkörner gekocht mit Schwefelsäure/Essigsäure, e) dem Rückstand der Wasserextraktion, f) mit MMNO umgesetzten Pollenkörnern, g) mit Enzymen gereinigten Roggenpollenkörner sowie h) Roggenpollenkörnern aus der KOH-Schmelze

Im Spektrum des Wasserextrakts (Methode 7) treten Unterschiede im Vergleich zum Spektrum des vollständigen Roggenpollenkorns um 1000 und 1542 cm^{-1} auf. Die Unterschiede im Bereich um 1000 cm^{-1} können durch das Fehlen der Cellulose erklärt werden. Cellulose besitzt Absorptionsbanden zwischen 1000 und 1200 cm^{-1} [144]. Im Spektrum des Roggenpollenkorns nach der Acetolyse (6.5 d nach Methode 3) sind deutliche Veränderungen zu erkennen. Die Exine ist Acetolyse-resistent, das heisst, sie wird durch die Acetylierung im Gegensatz zur Intine nicht abgebaut. Die charakteristischen Banden der Acetylgruppe liegen bei 1020, 1243, 1373 und 1436 cm^{-1} . Die Bande im Bereich von 1735 bis 1775 cm^{-1} könnte ein Hinweis auf den unvollständigen Abbau der Cellulose sein, da diese Bande typisch für acetylierte Cellulose ist. Diese Annahme kann durch Daten aus der Literatur belegt werden [145]. Im Spektrum, der durch den Einsatz von HF (Methode 1) gewonnenen Sporopolleninfraktion (6.5 c), zeigen sich die Banden der Acetylgruppen mit geringeren Absorptionen als im Spektrum der acetylierten Fraktion. Die Spektren vom Rückstand der Wasserextraktion (6.5 e nach Methode 7) und der Aufreinigung mit MMNO/Cyclohexylamin (6.5 f nach Methode 6) stimmen in der Position und relativen Absorption der Banden überein. Ursächlich ist die Übereinstimmung der chemischen Prozesse: Das Polleninnere tritt aus und lässt die Exine teilweise mit anhaftender Intine zurück. Bei der Extraktion mit Wasser ist die Wasserlöslichkeit des Polleninneren für diesen Vorgang verantwortlich. Im anderen Ansatz fungiert MMNO als starker Dipol und kann die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Cellulose brechen, dadurch platzen die Pollenkörner auf und setzen die Sporoplasten frei [146]. Aber ein wichtiger Unterschied ist, dass bei dem Entlassen des Sporoplasten durch MMNO die Intine an den Sporoplasten anhaften kann, dies geschieht bei der Wasserextraktion nicht. Deswegen unterscheiden sich die Spektren der Hüllen nur geringfügig. Von den Sporoplasten, die mittels Erhitzen in MMNO gewonnen wurden, konnten aufgrund zu geringer Absorptionen keine Spektren mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis aufgenommen werden. Ein Vergleich mit den Spektren des Wasserextrakts wäre wünschenswert gewesen. Durch den Einsatz von Cellulase und Pektinase im Anschluss an das Erhitzen in MMNO (Methode 4) wird die Intine vollständig abgebaut, dies wird durch Fehlen der Absorptionsbanden im Bereich von 1000 bis 1200 cm^{-1} belegt (6.5 g). Zusätzliche Banden, im Vergleich zum Spektrum des ganzen Roggenpollenkorns, sind um 1585 und

1700 cm^{-1} zu erkennen. Im Spektrum des basischen Aufschlusses (6.5 h nach Methode 5) wird eine Bande schwacher Intensität im Bereich der Kohlenhydrate bei 996 cm^{-1} detektiert. Bei der Reaktion der Pollenkörner mit KOH können wasserlösliche Alkalisalze der Kohlenhydrate entstehen, ferner kann ein basischer Abbau der Cellulose stattfinden [147]. Weitere Auswirkungen der KOH-Schmelze auf die Pollenkörner sind anhand des Spektrums schwer abzuschätzen. Zusätzliche Banden sind bei 1515 und 1670 cm^{-1} zu erkennen.

Veränderungen der Sekundärstruktur der Proteine können anhand der Form der Amid I Bande überwacht werden, zu diesem Zweck soll die zweite Ableitung von 1600 bis 1700 cm^{-1} betrachtet werden (siehe Abbildung 6.5). Die zweite Ableitung der Amid I Bande ist geeignet für die Interpretation der Proteinsekundärstruktur, da eine Reduzierung der Linienbreite in einer verbesserten Auflösung der Banden resultiert [148]. Untersuchungen in einer anderen Arbeit zur Lagerung von Pollenkörnern mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie ergaben, dass sich die Proteinstruktur von Rohrkolbenpollen (*Typha angustifolia*) durch Alterung nicht verändert [75]. Ein weiteres Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass die Proteine des Cytoplasmas und nicht die Membranproteine die Proteinabsorption der vollständigen Pollenkörner bestimmen [75]. In dieser Arbeit zeigte die Amid I Bande des ganzen Roggenpollenkorns Beiträge bei 1634, 1657 und 1675 cm^{-1} , folglich liegt eine Mischung aus α -Helix, β -Faltblatt und ungeordneter Struktur vor (siehe 6.5 a). Im Spektrum des Polleninneren (siehe 6.5 b) liegt das Maximum bei 1626 cm^{-1} . Die Form der Amid I Bande im Spektrum der HF aufgereinigten Fraktion (siehe 6.5 c), ähnelt der Amid I Bande des unbehandelten Roggenpollenkorns mit Banden bei 1630, 1656 und 1672 cm^{-1} . Eine Überlagerung der Beiträge der verschiedenen Sekundärstrukturen (α -Helix, β -Faltblatt, ungeordnet) ist in der acetylierten Fraktion zu erkennen (siehe 6.5 d). Die Spektren der Hüllen nach der Behandlung mit Wasser (6.5 e) und MMNO (6.5 f) weisen eine Bande um 1658 cm^{-1} auf, allerdings liegt der überwiegende Anteil in einer β -Faltblatt Struktur vor. In der enzymaufgereinigten Komponente (6.5 g) liegen die Proteine hauptsächlich ungeordnet und als α -Helix vor. Im letzten Spektrum der Abbildung 6.5 h liegt eine schmale Bande bei 1670 cm^{-1} begleitet von einer Bande niedriger Intensität bei 1627 cm^{-1} vor.

Die Raman-Spektren der aufgetrennten Pollenkomponenten sind in Abbildung 6.6 zu sehen. Es konnte kein Raman-Spektrum des Wasser-

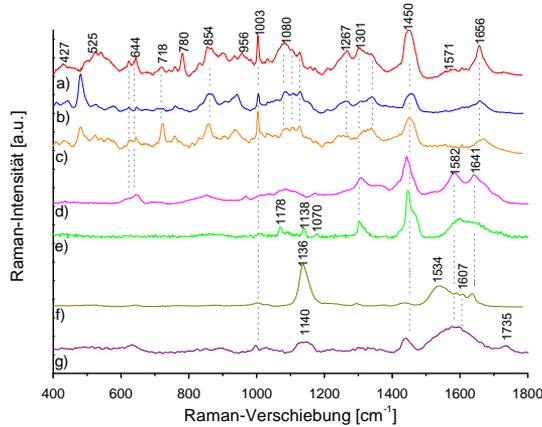


Abbildung 6.6: Raman-Spektren von a) den unveränderten Roggenpollenkörnern, b) dem Rückstand der Wasserextraktion, c) den mit MMNO umgesetzten Roggenpollenkörnern, d) den mit Enzymen gereinigten Roggenpollenkörnern, e) den mit HF behandelten Roggenpollenkörnern, f) den Roggenpollenkörnern aus der KOH-Schmelze, g) den in Schwefelsäure/Essigsäure gekochten Roggenpollenkörnern (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm^2)

extrakts der Roggenpollenkörner aufgezeichnet werden, weil das Signal-Rausch-Verhältnis zu niedrig war. Mit Ausnahme dieser Probe wurden die identischen Fraktionen wie zuvor mit der FTIR-Spektroskopie untersucht. In Analogie zu den FTIR-Messungen weisen die Raman-Spektren der Hüllen nach der Behandlung mit Wasser (6.6 b nach Methode 7) und MMNO (6.6 c nach Methode 6) Ähnlichkeiten auf. In beiden Fällen sind immer noch Peaks der Cellulose von 1060 bis 1140 cm^{-1} zu erkennen [140]. Insgesamt stimmen diese Spektren mit dem Spektrum des unbehandelten Roggenpollenkorns überein, nur fehlt die intensive Bande um 480 cm^{-1} . Dieser Peak tritt nicht in allen Spektren auf, deswegen ist die Zuordnung dieser Bande zu einer Struktur in den Pollenkörnern besonders schwer. Es ist allerdings bekannt, dass es sich um eine C-C-C Deformationsschwingung der Kohlenhydrate handelt. In dem Spektrum der Fraktion der Enzymaufreinigung (6.6 d, Me-

thode 4) dominieren die Merkmale der Proteine und Lipide. Typisch für Proteine sind auch im Raman-Spektrum die Moden der Amidfunktion. Die Amid I Bande um 1655 cm^{-1} wird hauptsächlich verursacht durch die Streckschwingung der CO-Gruppe und die Amid II Bande um 1570 cm^{-1} wird hervorgerufen durch eine Überlagerung der Biegeschwingung von NH sowie der Streckschwingung der CN-Gruppe. Aus der CN-Streckschwingung und der CNH Biegeschwingung resultiert die Amid III Bande bei 1300 cm^{-1} [143]. Charakteristisch für Lipide ist die Biegeschwingung der CH_2 -Gruppe bei 1450 cm^{-1} . Das Spektrum der HF-Aufreinigung (6.6 e, Methode 1) besitzt ähnlich dem zuvor besprochenen Spektrum der Enzymaufreinigung Protein- und Lipid-Signale. Aber die Intensitäten dieser Banden bei circa 1580 und 1640 cm^{-1} sind niedriger. Zusätzlich sind Banden mit geringeren Intensitäten bei 1070 , 1138 und 1178 cm^{-1} zu erkennen, diese können von Schwingungen der CF_2 - oder CH_2F - Gruppen stammen [145]. Der basische Aufschluss (Methode 5) verändert das Raman-Spektrum (6.6 f) grundlegend. Der intensivste Peak befindet sich bei 1136 cm^{-1} , dies weist auf das Vorhandensein von Ketonen hin [145]. Nach der Acetolyse (Methode 3) weist das Spektrum (6.6 g) Peaks bei 1140 , 1450 , 1580 und 1735 cm^{-1} auf. Die zuletztgenannte Bande ist typisch für die C=O Schwingung der Acetylgruppe.

Die Analyse der Pollenkomponenten wurde durch die Aufreinigung und Raman-spektroskopische Untersuchung einer zweiten Pollenart ergänzt. Die folgende Diskussion bezieht sich auf Raman-Spektren von Ambrosiapollenkörnern und ihren Bestandteilen. Die Pollenfraktionen nach der Behandlung mit MMNO und HF sind in Abbildung 6.7 dargestellt. Durch den Einsatz von MMNO/Cyclohexylamin (Methode 6) wurde der Sporoplast aus der Pollenhülle entlassen und es konnte von beiden Komponenten ein Raman-Spektrum generiert werden. Die Aufnahmen in Abbildung 6.8 zeigen ein geöffnetes Ambrosiapollenkorn (6.8a) und einen freigesetzten Sporoplasten (6.8b).

Es wurden zwei Sporopolleninfraktionen durch Umsatz mit HF gewonnen. Die Vorbereitung der Ambrosiapollenkörner wurde variiert, indem die Pollenkörner einmal in einer Schwingungsmühle gemahlen wurden (Methode 2), das andere Mal wurde darauf verzichtet (Methode 1). Wiederum wird ein Vergleich zu dem Spektrum eines unbehandelten Ambrosiapollenkorns gezogen. Im Spektrum des Sporoplasten (6.7 b) inklusive anhaftender Intine sind Banden der Proteine, Lipide und Cellulose zu erkennen. In den Spektren der Hüllen treten ebenfalls

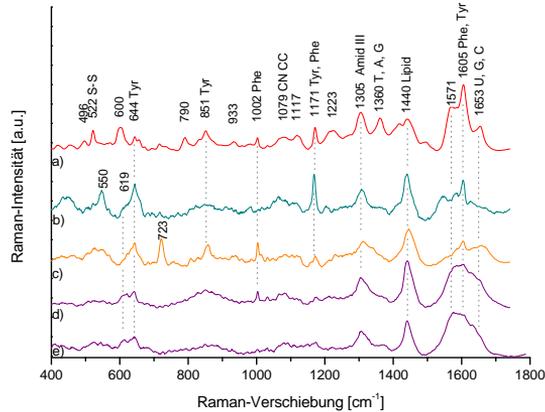


Abbildung 6.7: Raman-Spektren a) eines unbehandelten Ambrosiapollenkorns, b) eines entlassenen Sporoplasten nach Behandlung mit MMNO, c) von der zurückbleibenden Hülle nach der Behandlung mit MMNO, d) von der Exine nach Erhitzen mit HF, e) wie d) nur wurden die Pollen zuvor gemahlen (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²)

Protein- und Lipidpeaks auf. Unterschiede zwischen den Spektren der verschiedenen Aufreinigungsprozeduren der Pollenexine werden anhand der Phenylalaninbande bei 1002 cm^{-1} deutlich. In den Spektren der Exine nach der Behandlung mit MMNO/Cyclohexylamin (6.7 c) und dem Erhitzen in HF (6.7 d) ist die Bande des Phenylalanin deutlich zu erkennen. Das Mahlen der Ambrosiapollenkörner vor dem Erhitzen mit HF zeigt einen Abbau der Ringstruktur durch das Fehlen der Bande bei 1002 cm^{-1} an (6.7 e). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Spektren der HF-Prozedur kann im Bereich der Cellulose (von 1000 bis 1150 cm^{-1}) identifiziert werden. Der Grund hierfür ist, dass Cellulose und Ligninstrukturen durch das Mahlen zerstört wurden [149]. Außerdem konnten durch die Zerkleinerung der Pollenkörner die Chemikalien besser mit der Intine wechselwirken. So sind, wie zuvor diskutiert, die Cellulosebanden von geringerer Intensität und das Phenylalaninsignal fehlt.

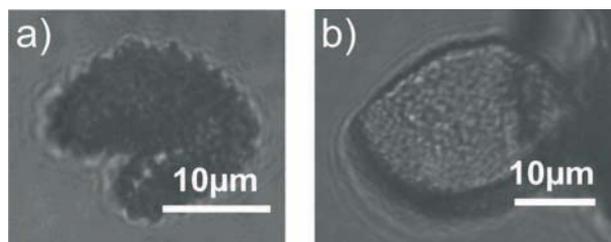


Abbildung 6.8: a) offenes Ambrosiapollenkorn nach der Behandlung mit MMNO/Cyclohexylamin (100× Vergrößerung), b) freigesetzter Sporoplast nach der gleichen Behandlung (100× Vergrößerung)

Tabelle 6.2: Typische Signalpositionen in ^{13}C -Festkörper-Spektren und deren Zuordnung

chem. Verschiebung δ [ppm]	Zuordnung
10-50	aliphatische Kohlenwasserstoffe
50-90	Kohlenhydrate
90-160	ungesättigte Kohlenwasserstoffe (Alkene, Aromaten)
160-180	Carboxylgruppen (Säuren, Ester)
170-205	Aldehyde
175-225	Ketone
170	C=O der Acetylgruppe
21	CH ₃ der Acetylgruppe

6.3.3 NMR-Spektroskopie

Als Ergänzung der schwingungsspektroskopischen Techniken wurde die NMR-Spektroskopie eingesetzt, es wurden ^1H -, ^{13}C -, ^{19}F - und ^{31}P -Kerne untersucht. Dabei wurden dieselben Proben mit der Festkörper-NMR-Spektroskopie analysiert wie zuvor mit den schwingungsspektroskopischen Methoden. Zunächst sollen hier die ^{13}C -MAS-Spektren betrachtet werden. Die ^{13}C -NMR-Spektroskopie ist weit verbreitet und wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen für die Analyse von Pollenkörnern eingesetzt [126, 73, 137].

Die ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektroskopie konnte für die Analyse der HF, Schwefelsäure/Essigsäure und der Enzym aufgereinigten Frakti-

on verwendet werden. Aufgrund der geringen Häufigkeit der ^{13}C -Kerne und den daraus resultierenden langen Akquisitionszeiten wurde die Anregung der Kohlenstoffkerne durch eine Kopplung an die Protonen realisiert. Die Spektren sind in Abbildung 6.9 im Vergleich zu dem Spektrum der unbehandelten Roggenpollenkörner zu sehen. Dafür wurden die Spektren auf die Scananzahl normiert. In der Literatur finden sich einige Beispiele für Sporopollenin, welches durch Acetolyse gewonnen wurde [150, 135] und anschließend via ^{13}C -Festkörper-NMR untersucht wurde. Charakteristische Verschiebungen der Acetylgruppe wurden bei 21 und 170 ppm beobachtet. Des Weiteren kann aus dem Spektrum in Abbildung 6.9 die Schlußfolgerung gezogen werden, dass die Cellulose der Intine nur teilweise abgebaut werden konnte. Dies belegt das verbleibende Signal der Cellulose bei 72 ppm. Außerdem werden zusätzliche Signale im Bereich der Cellulose bei 96 und 101 ppm nachgewiesen, dies könnte ein Anzeichen für sulfatierte Cellulose sein.

Beispiele für Strukturanalysen der anderen Aufreinigungsmethoden sind in der Literatur nicht zu finden. Allen Spektren der Pollenkomponenten gemeinsam sind hohe Intensitäten im Bereich der aliphatischen Ketten von 10 bis 50 ppm und die Präsenz von Signalen der Kohlenhydrate (55-90 ppm), der Alkene (90-150 ppm), der Aromaten (130 ppm) oder Säuren (170-180 ppm). Verschiebungen im Bereich der Ketone (210 ppm) existieren mit geringen Intensitäten. Die Signale der unbehandelten Roggenpollenkörner bei 62, 72, 82 und 102 ppm sind charakteristisch für Cellulose [151]. Tabelle 6.2 fasst die Positionen dieser Verschiebungen und ihrer Zuordnungen zusammen.

Das Spektrum der Roggenpollenkörner nach der Enzymaufreinigung (Methode 4) weist einige Unterschiede im Vergleich zum Spektrum der ganzen Roggenpollenkörner auf. Im Bereich der Verschiebungen, verursacht durch Carboxylgruppen, entstehen zwei neue Strukturen bei 161 und 170 ppm. Diese Signale können durch ein Molekül hervorgerufen werden, das Säure- und Alkoholgruppen im Verhältnis 1:1 enthält. Dies könnte beispielweise Hydroxyzimtsäure sein. Der Abbau der Cellulose konnte anhand der Intensität des Signals für das C_1 -Kohlenstoffatom der Cellulose bei 72 ppm überwacht werden. Das Fehlen dieses Signals im Spektrum der enzymaufgereinigten Fraktion beweist den vollständigen Abbau der Cellulose. Außerdem wurde ein Anstieg der Signalintensität im aliphatischen Bereich detektiert, eine Erklärung hierfür könnten Umlagerungsprodukte der Cellulose sein. Das Spektrum der HF Fraktion (Methode 1) besitzt eine zusätzliche Verschiebung bei 50 ppm

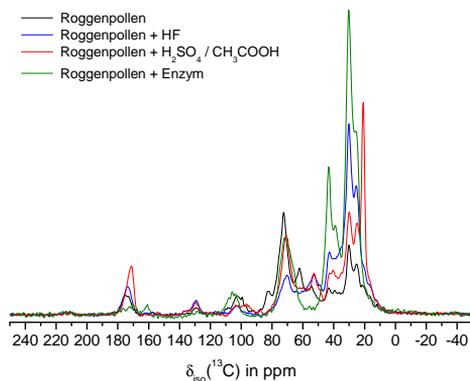


Abbildung 6.9: ^{13}C -MAS-CP-Spektren der ganzen Roggenpollen (schwarz), der Sporopolleninfraktionen aufgereinigt mit HF (blau), MMNO plus Enzyme (grün) und Schwefelsäure/Essigsäure (rot)

gegenüber dem Spektrum der kompletten Roggenpollenkörner (siehe Abbildung 6.9). Und wie im zuvor besprochenen Spektrum der Enzymbehandlung tritt ein Rückgang der Signalintensitäten im Bereich der Cellulose, begleitet von einem Anstieg der Signalintensitäten der aliphatischen Verschiebungen, auf. Erneut stellt sich die Frage, ob der Abbau der Cellulose diese Änderungen hervorgerufen hat. Ein genereller Unterschied zwischen dem ^{13}C -MAS-CP-Spektrum der kompletten Pollenkörner und den Spektren der Pollenfraktionen ist, dass in den Spektren der isolierten Pollenhüllen die Signale aus dem Polleninneren wegfallen.

Das ^{13}C -MAS-CP-Spektrum der Probe, welches unter Einsatz von MMNO und enzymatischem Abbau der Intine gewonnen wurde, zeigt geringe Abweichungen gegenüber dem ^{13}C -MAS-Spektrum der vollständigen Pollenkörner. Dies ist ein sanfter Weg zur Sporopolleninengewinnung, deswegen wurde von dieser Probe ein quantitatives ^{13}C -Einzelimpuls(SP)-MAS-Spektrum detektiert (siehe 6.10). In SP-Spektren sind die Signalintensitäten proportional zur Konzentration, dieser Zusammenhang geht in den CP-Spektren verloren. Anhand der Integrale

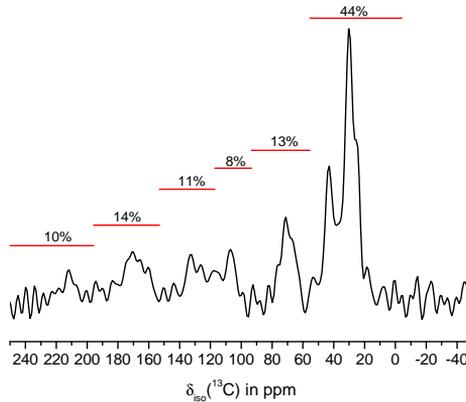


Abbildung 6.10: Übersicht über den prozentualen Anteil der chemischen Gruppen im ^{13}C -MAS-SP-Spektrum der enzymaufgereinigten Sporopolleninfraktion

dieses ^{13}C -MAS-SP-Spektrums wurde der prozentuale Anteil der chemischen Gruppen im Sporopollenin abgeschätzt. Es ergaben sich Anteile von 42 % für aliphatische Ketten, 17 % für Kohlenhydrate, 8 % für Alkene, 11 % für Aromaten, 15 % für Carboxylgruppen (Ester und Säuren) und die restlichen 7 % entfallen auf Ketone. Diese Ergebnisse entsprechen früheren Analysen, die an Sporopollenin von Lilienpollen (*Lilium longiflorum*) durchgeführt wurden. Hierbei wurde die Sporopolleninfraktion durch Erhitzen mit MMNO ohne den Einsatz von Enzymen gewonnen [152].

Phospholipide sind wichtige Bestandteile biologischer Membranen. Sie liegen in den Membranen in einer Doppelschicht-Struktur vor, allerdings kann die Zugabe bestimmter Detergentien die Bildung einer hexagonalen Anordnung begünstigen [153, 154]. Cullis *et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen der Konformation der Phospholipide in der Membran und den ^{31}P -NMR-Spektren der Proben. Anhand der Form der ^{31}P -Signale kann die vorliegende Konformation identifiziert werden. Die Doppelschicht-Phase verursacht ein breites Signal mit einer Schulter im Tieffeld und einem intensiven Beitrag im Hochfeld. Die

Linienform der hexagonalen Phase erscheint gespiegelt und deutlich schmaler. Ein symmetrisches Signal mit niedriger Linienbreite entsteht durch die isotrope Bewegung von Phospholipiden, die in Form von Micellen oder Vesikeln vorliegen. Das ^{31}P -NMR Spektrum von vollständig hydratisierten Pollenkörnern der Spezies *Typha angustifolia* zeigt die Charakteristika einer Doppelschicht-Anordnung mit einem Signal bei 15 ppm und einer Schulter im Tieffeld. Diese Verschiebung wird von einem intensiven Signal bei 0 ppm überlagert, welches durch mobile phosphorhaltige Substanzen verursacht wird. Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass die Pollenkörner Phospholipide aufweisen, die sich in einer Bilayer-Struktur anordnen. Des Weiteren müssen Moleküle wie Zucker, Nukleotide oder anorganische Phosphate in Pollenkörnern enthalten sein, die das zentrale Signal bei 0 ppm hervorrufen [153]. Sind die Pollenkörner teilweise hydratisiert, ist nur das Signal bei 0 ppm zu erkennen [153].

Die ^{31}P -MAS-CP-Spektren der Sporopolleninfraktionen, die innerhalb dieser Doktorarbeit untersucht wurden, sind in Abbildung 6.11 dargestellt. Das Spektrum des ganzen Roggenpollenkorns wird von der Verschiebung bei 0 ppm dominiert. In den Spektren der aufgereinigten Proben ist der Gehalt an Phosphor geringer, vermutlich weil phosphorhaltige Substanzen wie phosphorylierte Zucker oder Phospholipide aus dem Polleninneren nicht mehr präsent sind. Die ^{31}P -MAS-CP-Spektren der mit Enzymen (Methode 4) und Säuren (Methode 3) behandelten Roggenpollenkörner weisen ebenfalls ein Signal bei 0 ppm auf. Die Intensität dieser Signale ist im Vergleich zum Spektrum der unbehandelten Pollenkörner geringer. Zusätzlich ist das Signal im Spektrum der Enzymfraktion ins Hochfeld verschoben. Das ^{31}P -MAS-CP-Spektrum der Roggenpollenkörner nach der Behandlung mit HF (Methode 1) besitzt ein Signal mit schwacher Intensität bei 0 ppm plus ein Septett bei $\delta_{iso}(^{31}\text{P}) = -140$ ppm ($J = 716$ Hz). Diese Verschiebung ist charakteristisch für ein Hexafluorophosphatanion [155]. Aus diesen Spektren kann der Gehalt des Phosphors in den Proben abgeleitet werden, dafür wird der Phosphorgehalt in den kompletten Pollenkörnern auf 100 % gesetzt. Der Phosphorgehalt sinkt von 13 % in der enzymaufgereinigten Fraktion über 8 % in der säureaufgereinigten Fraktion bis auf 3 % in der HF-aufgereinigten Fraktion. In der zuletzt genannten Fraktion ist der Phosphorgehalt am geringsten, da der Phosphor durch die Reaktion mit dem HF abgebaut wurde. Das ^{19}F -MAS-SP-NMR-Spektrum in Abbildung 6.12 zeigt, dass auch andere Elemente aus den Pollenhül-

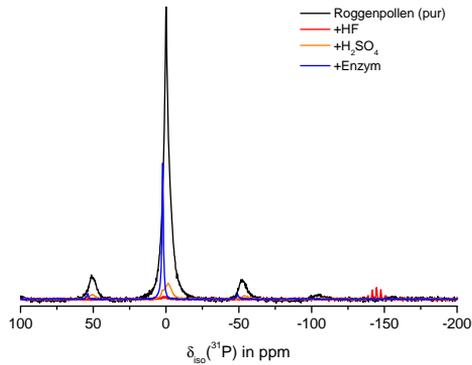


Abbildung 6.11: ^{31}P -MAS-CP-Spektren der ganzen Roggenpollenkörner (schwarz), der Sporopolleninfraktionen aufgereinigt mit HF (blau), MMNO plus Enzyme (grün) und Schwefelsäure/Essigsäure (rot)

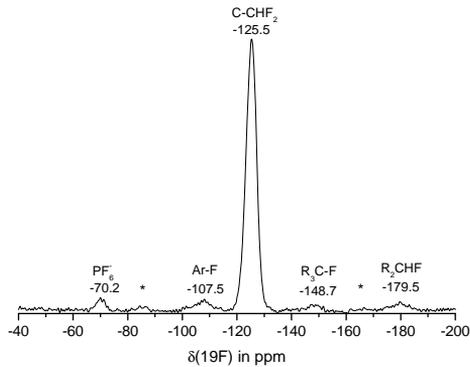


Abbildung 6.12: ^{19}F -MAS-SP-Spektrum der mit HF umgesetzten Roggenpollenkörner

len mit dem Wasserstofffluorid reagiert haben. Neben dem Signal der Hexafluorophosphatgruppe wurden die Verschiebungen von Aryl- und Alkanfluoriden detektiert. Das spricht dafür, dass sowohl die aromatische als auch die aliphatische Komponente der Pollenhüllen mit dem HF reagiert haben. In den ^{19}F -NMR-Spektren der übrigen Fraktionen konnte kein Fluor nachgewiesen werden.

Aufschluss über die chemische Umgebung der Verschiebungen können die CP-Spektren geben. Befinden sich Protonen in unmittelbarer Nähe einer chemischen Gruppe, die eine Verschiebung verursacht, kommt es zu einem Anstieg der Intensität. Sind die Protonen weiter entfernt, wird der Anstieg der Intensität zeitverzögert gemessen. Befinden sich keine Protonen in der Nähe, wird kein Signal detektiert. Dieses Experiment wurde für alle Proben in Bezug auf die Verschiebungen der ^{31}P -Kerne durchgeführt. Zu beachten ist, dass die Änderungen der Signalintensitäten keine quantitativen Rückschlüsse zulassen. Der Vergleich der ^{31}P -NMR-Spektren der Kreuzpolarisation und der Einzelimpuls-Anregung für die unbehandelten Roggenpollenkörner in Abbildung 6.13 zeigt, dass sich das Signal bei 0 ppm aus zwei Beiträgen zusammensetzt. Im CP-Spektrum tritt eine Schulter bei -3 ppm deutlich hervor, diese weist auf eine zusätzliche Phosphorgruppe hin in deren Nähe sich Protonen befinden. Dabei kann es sich beispielsweise um eine Phosphatgruppe handeln. Das Phosphorsignal im Spektrum der acetylierten Sporopolleninfraktion (Methode 3) bildet eine Schulter bei ca. 5 ppm aus. Die Spektren der übrigen Fraktionen zeigen keine Veränderungen im Kreuzpolarisationsexperiment. Denkbar ist, dass die Schulter bei -3 ppm im Spektrum der ganzen Roggenpollenkörner durch die Phosphate im Inneren der Pollenkörner verursacht wird, weil sie in den Spektren der Sporopolleninfraktionen fehlt.

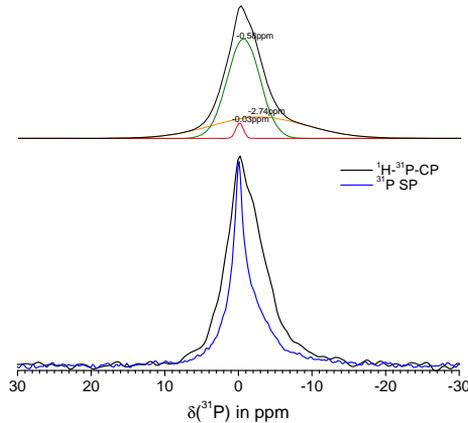


Abbildung 6.13: ^{31}P -MAS-SP-NMR-Spektrum (schwarz) und ^{31}P -MAS-CP-NMR-Spektrum (blau) der unbehandelten Pollenkörner im Bereich um 0 ppm

6.3.4 Ergebnisse der Untersuchungen der Pollenfraktionen

Aus den Daten der drei analytischen Techniken lassen sich die folgenden Schlussfolgerungen über die molekularen Veränderungen der Pollenhüllen ziehen: Eine Reaktion der Pollenhülle mit HF (Methoden 1 und 2) konnte durch die ^{31}P -MAS-SP- und ^{19}F -MAS-SP-Spektren bewiesen werden. Die Veränderungen der Pollenhüllen durch den Einsatz von Schwefel- und Essigsäure (Methode 3) sind bekannt und wurden mit Hilfe der FTIR- und der NMR-Spektroskopie zuvor beschrieben [133, 127]. Raman-spektroskopische Untersuchungen von Produkten der Acetolyse (Methode 3) wurden erstmals in dieser Arbeit durchgeführt. Eine Bande um 1730 cm^{-1} spiegelte die Acetylierung der Exine wieder. Das Raman-Spektrum des basischen Aufschlusses (Methode 5) zeigte, dass Ketone entstanden sind. Die Aufreinigung des Sporopollenins mittels Cyclohexylamin und MMNO (Methode 6) entfernte die Intine nicht vollständig, dies belegten die verbleibenden Banden der Cellulose in den Raman- und FTIR-Spektren. Der vollständige Abbau

der Intine gelang bei der Umsetzung mit MMNO/Cyclohexylamin mit anschließendem enzymatischen Verdau wie die ^{13}C -MAS-CP-NMR-, Raman- und FTIR-Spektren belegen. Diese Reaktion erfolgte als einzige bei Raumtemperatur ohne den Einsatz von Säuren, aber auch in diesen Spektren zeigten sich Veränderungen gegenüber den Spektren der ganzen Pollenkörner. Dies waren die Verschiebung des zentralen Signals im ^{31}P -MAS-CP-Spektrum, der zusätzliche Raman-Peak bei 1582 cm^{-1} und das Erscheinen der IR-Bande bei 1737 cm^{-1} , welches auf die Bildung einer Carbonylgruppe hindeutet. Des Weiteren konnten zwei neue Strukturen im Carboxylbereich und der Anstieg der Signalintensitäten im aliphatischen Bereich durch das ^{13}C -MAS-CP-Spektrum belegt werden. Allerdings war diese Methode die einzige bei der der vollständige Abbau der Intine gelang. Das konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden (siehe Abbildung 6.3 c). Unter Zuhilfenahme der Wassereextraktion sollte der Einfluss des Cytoplasmas auf die Spektren des gesamten Pollenkorns abgeschätzt werden. Diese Fraktion bestimmt die IR-Signatur der kompletten Pollenkörner. Anders verhält es sich mit den Raman-Spektren, es konnten im Spektrum der ganzen Pollenkörner nur wenige Banden dem Polleninneren zugeschrieben werden. Somit erwies sich die Raman-Spektroskopie als geeignet zur Untersuchung der Pollenhülle und damit des Sporopollenins. Durch den Vergleich der ^{31}P -MAS-CP und der ^{31}P -MAS-SP-NMR-Spektren konnten zwei unterschiedliche Phosphorspezies in den kompletten Pollenkörnern identifiziert werden. Mit Hilfe des ^{13}C -MAS-SP-NMR-Spektrums konnte der Anteil chemischer Gruppen im Sporopollenin abgeschätzt werden, so besteht die Pollenhülle zu fast 50 % aus aliphatischen Ketten.

6.4 Bestandteile der Pollenhüllen

Zahlreiche Techniken wurden genutzt, um die Struktur des Sporopollenins aufzuklären (siehe Abschnitt 6.1). Der Einsatz der Raman-Spektroskopie auf diesem Gebiet ist neu und, wie im vorangegangenen Abschnitt berichtet, besonders gut für die Analyse der Pollenhülle geeignet. Um die komplexen Spektren der intakten Pollenkörner besser zu verstehen, sollen in diesem Abschnitt die Raman-Spektren reiner Substanzen mit den Raman-Spektren ganzer Pollenkörner unterschiedlicher Spezies verglichen werden. Es wurden Chemikalien als Vergleichssub-

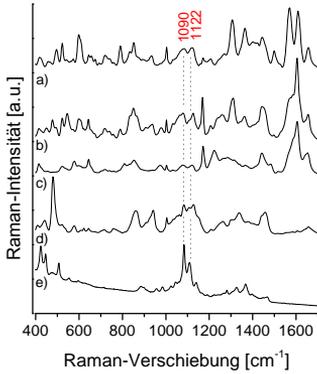


Abbildung 6.14: Raman-Spektren von Pollenkörnern der japanischen Kirsche, Esche, Birke, des Honiggrases und Raman-Spektren von Cellulose, Saccharose, Glukose, Fruktose (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²)

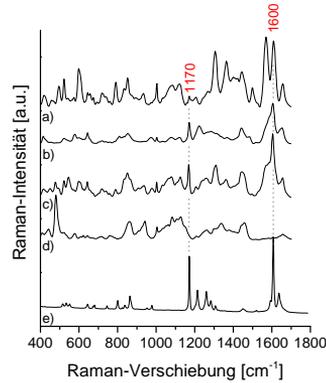


Abbildung 6.15: Raman-Spektren von Pollenkörnern der japanischen Kirsche, Esche, Birke, des Honiggrases sowie Raman-Spektren der Galakturon-, Coumarin- und Zimtsäure (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²)

stanzen ausgewählt, die aufgrund der Ergebnisse anderer Analysetechniken als Precursor oder Bestandteil des Sporopollenins wahrscheinlich sind (siehe 6.1). Um die biologische Variabilität zwischen den Pollenarten zu bedenken, wurden Spektren von Pollenkörnern aus vier Pflanzenfamilien ausgesucht. Der Vergleich der Zuckerpolymeren mit den Spektren der Kirsch-, Esche-, Birke- und Honiggraspollen (siehe Abbildung 6.14) ergibt, dass sich die Merkmale der Cellulose in den Spektren der Pollen wiederfinden lassen. Die Präsenz der übrigen Kohlenhydrate in den Pollenspezies lässt sich aufgrund dieser Darstellung nicht beweisen. Indes ist das kein Beleg für das Fehlen dieser Substanzen in den Pollenkörnern, die Raman-Peaks können von intensiveren Banden überlagert werden oder die Substanzen liegen in dem Messpunkt nicht vor.

Anhand der Spektren in Abbildung 6.15 werden die Gemeinsamkeiten zwischen den Spektren der Pollenkörner und den Spektren der Galakturon-, Coumarin- und Zimtsäure überprüft. Die intensiven Peaks

der Coumarinsäure bei 1172, 1597 und 1638 cm^{-1} sowie der Zimtsäure bei 1000 und 1607 cm^{-1} können in den Spektren der Pollenspezies nachgewiesen werden. Dies kann als Indiz für das Vorhandensein der fraglichen Säuren in den Pollenkörnern gewertet werden. Es gibt weitere Belege für das Vorkommen dieser Säuren in Pollenkörnern. Interessant ist ein Vorschlag zur Biosynthese von Sporopollenin von Murphy *et al.* [156]. Als Vorstufe des Sporopollenins ist eine Entwicklung ausgehend von Phenylalanin über Zimtsäure zu Coumarinsäure und Ferulasäure vorgeschlagen. Aus der Reaktion dieser Phenolsäuren mit Fettsäuren soll Sporopollenin entstehen.

6.5 Analysen des Polleninneren

In den vorangestellten Abschnitten lag der Schwerpunkt auf der Aufklärung der Struktur der Pollenhüllen, hier soll der Fokus auf die Komponenten des Polleninneren gelegt werden. Um den Einfluss des Polleninneren auf die Spektren der ganzen Pollenkörner abzuschätzen, wurde der Wassereextrakt der Pollenkörner analysiert. Es zeigte sich, dass der Wassereextrakt das IR-Spektrum der ganzen Pollenkörner bestimmt. Es konnten Peaks von Zuckern und Aminosäuren identifiziert werden.

Ein Raman-Spektrum derselben Probe konnte nicht aufgenommen werden, wofür eine zu geringe Konzentration der Moleküle verantwortlich ist. Eine Verstärkung der Intensitäten der Raman-Banden kann unter Verwendung der oberflächenverstärkten Raman-Streuung (engl.: *surface enhanced Raman scattering*, SERS) erzielt werden. Zu diesem Zweck wurden die Pollenkörner mit Wasser überschichtet und für eine Stunde inkubiert. Ein Teil der überstehenden Lösung wurde abgenommen und einer Goldkolloidlösung zugesetzt. Die Abtrennung der überstehenden Lösung von den Pollenkörnern ist wichtig, um zu kontrollieren, von welchem Teil der Pollenkörner die SERS-Signale generiert werden. Werden Banden aus der Suspension der Pollenkörner und der kolloidalen Lösung erzeugt, ist unsicher, ob SERS-Banden beobachtet werden oder unverstärkte Banden der Pollenhülle. Denn die Raman-Banden der äußeren Hülle oder der Carotinoide weisen Intensitäten in der Größenordnung der SERS-Signale des niedrig konzentrierten Polleninneren auf. Dies ist anzunehmen für die veröffentlichten SERS-Spektren von Sengupta *et al.* [71], die leider auf eine Angabe der verwendeten Pollenmenge verzichteten. Der Vergleich der SERS-Spektren

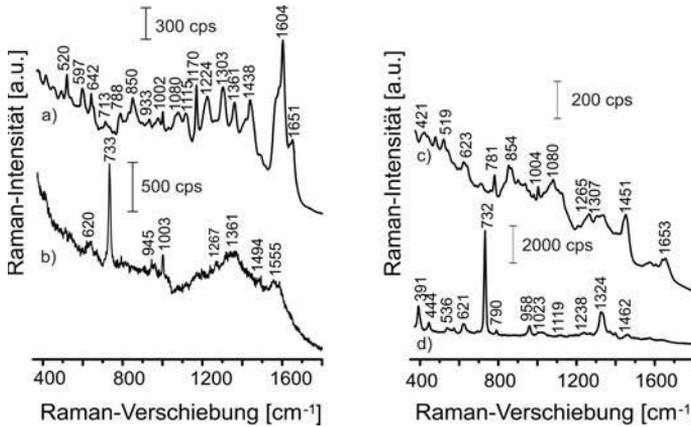


Abbildung 6.16: Raman-Spektren a) eines Ambrosiapollenkorns, b) eines Roggenpollenkorns (785 nm, 10 s, 18 mW); SERS-Spektren des Wasserextrakts der c) Ambrosiapollenkörner d) Roggenpollenkörner (785 nm, 1 s, 1.8 mW)

des Wasserextrakts mit den normalen Raman-Spektren der ganzen Pollenkörner ist in Abbildung 6.16 für Ambrosia- und Roggenpollenkörner dargestellt. Die oberflächenverstärkten Spektren werden von den Banden der Nukleinbasen und Aminosäuren dominiert. Die Signatur der zellulären Fraktionen variiert in Abhängigkeit von der untersuchten Spezies analog zu den Untersuchungen zur Klassifizierung und Identifizierung der Pollenarten.

Wie sehr sich die oberflächenverstärkten Spektren der Pollenarten unterscheiden, verdeutlicht Graphik 6.17. Hier sind die SERS-Spektren der Wasserextrakte von Roggen-, Pappel-, Birke-, Hirse-, Ambrosia- und Salbeipollenkörnern abgebildet. Der qualitative Vergleich dieser SERS-Spektren mit Spektren reiner Substanzen, die aus der Literatur entnommen wurden, zeigt die Präsenz von Nukleinsäuren, Aminosäuren (Valin, Methionin, Isoleucin, Prolein, Cystein, Tryptophan, Phenylalanin, Histidin) und Flavonoiden wie Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Campherol, Apigenin, Quercetin und Luteolin [157, 158, 159, 160, 161, 161, 162, 163, 164] im Polleninneren an. Viele dieser Moleküle sind physiologisch bedeutsam. Cystein-reiche Proteine sind für den Lipidtransport verantwortlich. Ihnen wird wie den Aminosäuren Phenylalanin und

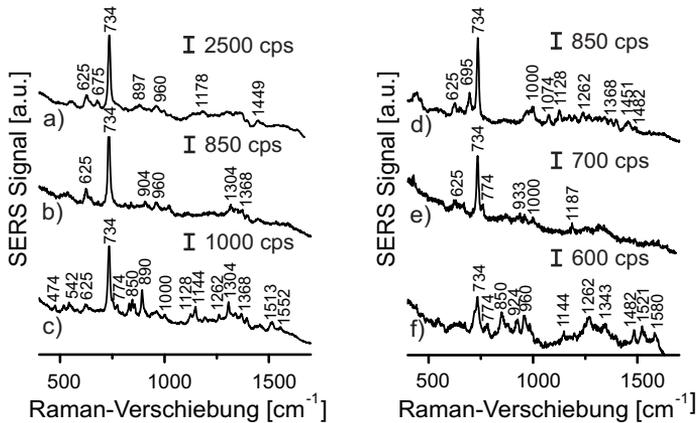


Abbildung 6.17: SERS-Spektren der Wasserextrakte von a) Roggen-, b) Pappel-, c) Birken-, d) Hirse-, e) Ambrosia- und f) Salbei-Pollenkörnern (785 nm, 1 s, 1.8 mW)

Tyrosin eine Rolle bei der Bildung der Exine zugeschrieben [165]. Flavonoide erfüllen zahlreiche Funktionen in den Pollen, sie schützen vor schädlicher UV-Strahlung und pathogenen Angriffen [166]. FAD ist zuständig für die Zellatmung. Die Schwingungen bei 625 und 1368 cm^{-1} können vom Isoquinolin verursacht werden [159], die Raman-Bande bei 542 cm^{-1} stammt vom Indol [167]. Beide weisen auf die Präsenz von Indol- und Isoquinolinalkaloiden hin, die in Wurzeln und Blättern höherer Pflanzen gefunden wurden und dort als antimikrobielle Substanz wirken [168, 169].

Die empfindliche Detektion kleinster Fragmente der Pollenkörner ist von Bedeutung für die Identifizierung von Partikeln in Aerosolen [170, 171, 172]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von SERS-Messungen in der Pollenanalytik ist die Untersuchung der Löslichkeit der allergologisch relevanten Bestandteile in Wasser. Pollen geben beim Kontakt mit Wasser Allergene ab, so dass allergische Reaktionen am Morgen durch die Löslichkeit der Allergene im Frühtau verstärkt werden. Über die SERS-Spektren der Pollenhüllen wurde ausführlich von Joseph *et al.* berichtet [173].

Der hydrophile Extrakt der Pollenkörner wurde mittels SERS analysiert, er wird von den Banden der Nukleinbasen und Aminosäuren dominiert. Nun soll die ^1H -Flüssig-NMR-Spektroskopie eingesetzt werden, um die Analyse des hydrophoben Extrakts durchzuführen. Die Verschiebungen des Chloroformextrakts der Roggenpollenkörner sind in Abbildung 6.18 zu sehen. Der Vergleich mit der Analyse eines lipophilen Extrakts der Kieselalge (*Thalassiosira pseudonana*) [174] ermöglicht die Zuordnung einiger Signale zu chemischen Gruppen. So werden Signale unterhalb von 1 ppm Methylgruppen zugeschrieben, allylische Methylgruppen verursachen Signale im Bereich von 1 bis 3 ppm. Protonen in der Nähe von Carboxylgruppen besitzen Verschiebungen von 4 ppm, diese können im Bereich um 5.2 ppm mit Signalen der Protonen ungesättigter Fettsäuren überlappen. Die Zuordnung der Verschiebungen der Carboxylgruppen kann weiter präzisiert werden, sie stammen wahrscheinlich vom Glycerin [175]. Aus der Kombination dieses Signals mit den typischen Verschiebungen der Fettsäuren kann die Präsenz von Triacylglyceriden abgeleitet werden. Triacylglyceride sind neutrale Lipide, die in vielen Zellen vorkommen wie zum Beispiel in der Eizelle des Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Dagegen wurden in Nervenzellen der Meeresschnecke *Aplysia* keine Triacylglyceride nachgewiesen. Ein Grund für diese Diskrepanz sind die unterschiedlichen Aufgaben dieser Zellen im Körper. Keimzellen wie die Eizelle oder das Pollenkorn besitzen Fettreserven zur Bildung neuer Zellen beziehungsweise im Fall der Pollenkörner zum Ausbilden des Pollenschlauches, Nervenzellen benötigen keine Fettreserven [175].

6.6 Löslichkeit der Exine

Die Strukturaufklärung von Sporopollenin wird aufgrund der Unlöslichkeit in gebräuchlichen Säuren und den meisten organischen Lösungsmitteln erschwert. Das bekannteste Lösungsmittel für die Exine ist 2-Aminoethanol. Sporopollenin kann nach enzymatischem Abbau oder Acetolyse der Intine in 2-Aminoethanol gelöst werden [176]. Frühere Untersuchungen zur Löslichkeit von Pollenkörnern in Aminoethanol zeigten, dass die Prozedur nicht auf alle Spezies angewendet werden kann [177]. Außerdem spielt das Alter der Proben eine entscheidende Rolle, ältere Proben lassen sich schwer oder gar nicht auflösen [121]. Ebenso können Pollenkörner des Rohrkolbens *Typha angustifolia* nach

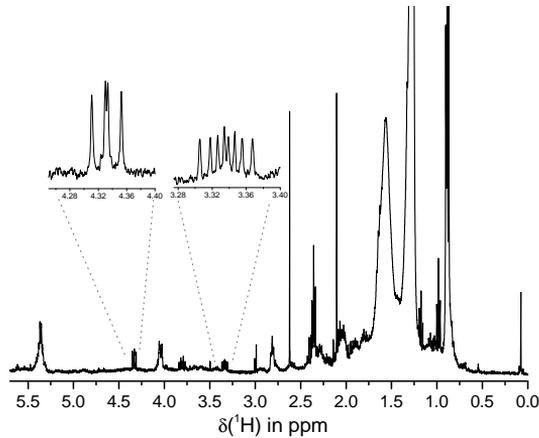


Abbildung 6.18: ^1H -NMR Spektrum der cellulären Fraktion extrahiert aus Roggenpollenkörnern mit Chloroform

Acetylisierung oder Silanierung in Piperidin gelöst werden [177].

Eine eigene Klasse der Lösungsmittel bilden die ionischen Flüssigkeiten, diese zeichnen sich durch elektrische Leitfähigkeit und niedrigen Dampfdruck aus [178]. Die Auswahl an ionischen Flüssigkeiten ist groß, es können ionische Flüssigkeiten synthetisiert werden, die für eine bestimmte Anwendung optimiert sind. So können zum Beispiel Biopolymere wie Cellulose [179, 180] und Lignin [181] aufgelöst werden. Unter Einbeziehung dieser Aspekte vor allem dem erfolgreichen Einsatz ionischer Flüssigkeiten als Lösungsmittel für biologische Proben [149],

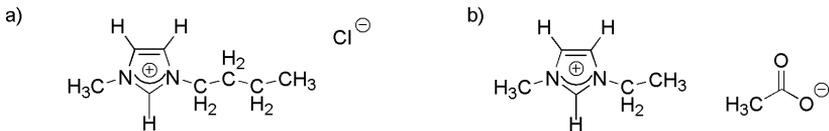


Abbildung 6.19: Strukturformel von a) 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid b) 1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat

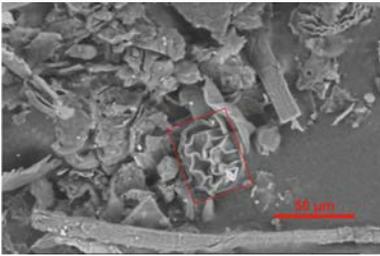


Abbildung 6.20: ESEM-Aufnahme (500× Vergrößerung) des reaggregierten Biomaterials der Umsetzung mit TMST

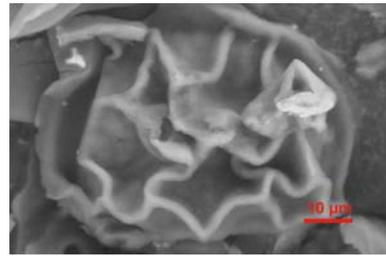


Abbildung 6.21: Bildausschnitt (2000× Vergrößerung) aus Abbildung 6.20

wurde in dieser Arbeit die Löslichkeit ganzer Pollenkörner in den ionischen Flüssigkeiten 1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat (TMST) und 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid (TMBC) erprobt.

Werden die Pollenkörner in ionischen Flüssigkeiten erhitzt, entsteht eine durchsichtige gelbgefärbte Lösung. Bei Zugabe von Wasser reagiert das Pollenmaterial. Die ESEM-Aufnahme in Abbildung 6.20 gibt einen Überblick über die Formenvielfalt des reaggregierten Materials. Es lassen sich Reste der Aperturen mit ihrer charakteristischen Morphologie und Ultrastruktur erkennen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass nicht das gesamte Material aufgelöst wurde. Das Material hat Aggregate unterschiedlicher Größen gebildet, ein großes knospenförmiges Gebilde ist in Abbildung 6.21 zu sehen.

Das reaggregierte Material wurde mittels FTIR-Spektroskopie analysiert, die resultierenden Spektren sind in Abbildung 6.22 dargestellt. Sie werden mit dem FTIR-Spektrum unbehandelter Roggenpollenkörner (6.22 a) und den FTIR-Spektren der reinen ionischen Flüssigkeiten [182, 183] verglichen. Die Banden der ionischen Flüssigkeit TMBC liegen bei 1168, 1459, 1567, 1630, 2874, 2929, 2958, 3099 und 3149 cm^{-1} (siehe Abbildung (6.22 b)). Die Biegeschwingung der H-C-C/H-C-N-Bindungen im Imidazol verursachen die Bande bei 1168 cm^{-1} , die Ringschwingung des Imidazols liegt bei 1570 cm^{-1} , die C-H Schwingungen des Ringes sind bei 3090 und 3147 cm^{-1} zu finden [182]. Ebenso zeigen sich in diesem Spektrum Schwingungen bei 1029, 1084, 1240 und 1542 cm^{-1} , die den unbehandelten Pollenkörnern zugeordnet werden

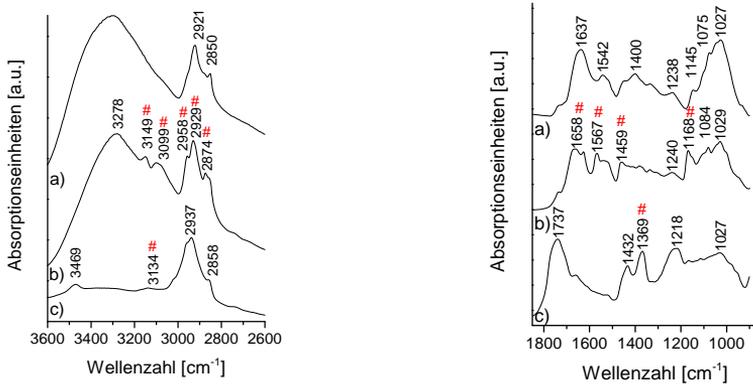


Abbildung 6.22: FTIR-Spektren von 3600 bis 2600 cm^{-1} (links) und von 1800 bis 900 cm^{-1} (rechts) der a) unbehandelten Roggenpollenkörner, des reagregierten Biomaterials aus b) 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid und c) 1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat, # kennzeichnet die Schwingungen der ionischen Flüssigkeiten

können. Überlagerungen von Banden beider Ausgangssubstanzen sind bei 1145 cm^{-1} sowie im Bereich der C-H Streckschwingungen zu erkennen.

Unter Verwendung von TMST als Lösungsmittel entstand die zweite Probe, das FTIR-Spektrum ist in Abbildung 6.22 c dargestellt. Die Übereinstimmungen dieses Spektrums mit den Spektren der eingesetzten Substanzen sind gering. Die Banden der Kohlenhydrate von 1000 bis 1150 cm^{-1} ähneln den Peaks im Spektrum der Pollenkörner, die Banden bei 1432, 3134 und 3469 cm^{-1} stammen von der ionischen Flüssigkeit [183]. Die Bande bei 1737 cm^{-1} kann durch eine Reaktion des Anions mit dem Biomaterial verursacht worden sein [183]. In ionischen Flüssigkeiten wird die Bande der Carbonylstreckschwingung zu tieferen Wellenzahlen verschoben (1566 cm^{-1}).

Die FTIR-Spektren belegen, dass eine Reaktion zwischen dem Lösungsmittel und den Pollenkörnern stattgefunden hat. Die Reaktionsfähigkeit des reagregierten Materials hat sich gegenüber dem unbehandelten Sporopollenin nicht verändert. Es lässt sich nicht in Chloroform

lösen, auch beeinflusst das Alter der verwendeten Pollenkörner die Reaktion nicht. Das entstandene Material besitzt eine ähnliche Stabilität wie das Ausgangsmaterial. Im Gegensatz zu diesem Experiment wurde eine veränderte Löslichkeit des reaggregierten Materials nach dem Auflösen in 2-Aminoethanol beobachtet. Es wurde berichtet, dass Pollenkörner nach einer vollständigen Acetolysierung in Chloroform gelöst werden können [121].

Durch die Löslichkeit in ionischen Flüssigkeiten und kontrolliertes Ausfällen auf strukturierten Oberflächen oder unter ausgesuchten Bedingungen könnten beispielsweise Mikroreaktoren in variablen Größen hergestellt werden. Diese könnten durch ihre chemische Stabilität für zahlreiche Anwendungen interessant sein.

Kapitel 7

Pollenkeimung

7.1 Stand der Forschung

Bei der Bestäubung wird das genetische Material in den Pollenkörnern von den Staubgefäßen einer Pflanze auf das weibliche Fortpflanzungsorgan (die Narben der Stempel) einer anderen oder derselben Pflanze übertragen. Die Distanz zwischen dem männlichen und dem weiblichen Fortpflanzungsorgan überwinden die Pollenkörner mit Hilfe des Windes oder von Insekten (Anemophilie bzw. Entomophilie). Auf der strukturierten Oberfläche der Pollenkörner befindet sich eine Lipidschicht, der Pollenkitt, welcher zahlreiche Aufgaben erfüllt. Er enthält flüchtige Substanzen die Insekten anlocken. Aufgrund der Klebrigkeit des Pollenkitts haften die Pollenkörner zum Beispiel an den Insekten und können auf andere Pflanzen übertragen werden. Zusätzlich sind in dieser Schicht Proteine enthalten, die zur Erkennung art eigener Pollenkörner auf der Narbe beitragen, artfremde Pollenkörner sterben ab [156]. Die Pollenkörner keimen innerhalb weniger Stunden, wenn sie die Narbe einer art eigenen Pflanze erreicht haben. Der Pollenschlauch tritt dann durch die Apertur aus und wächst in den Fruchtknoten. Um die Apertur zu durchbrechen, zersetzen Enzyme die Hülle an dieser Stelle [184]. Im Fruchtknoten löst sich die Spitze des Pollenschlauches auf und entlässt die männlichen Keimzellen. Zumeist werden zwei Keimzellen freigesetzt, eine Zelle befruchtet die Eizelle im Fruchtknoten, woraus sich der Samen entwickelt. Aus der zweiten Keimzelle bildet sich Nährgewebe zur Unterstützung der Samenentwicklung.

Die Vorgänge während der Befruchtung und Ausbildung des Pollenschlauches sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Zumeist wurde die Analyse des Pollenschlauches mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) an Ultradünn-Schnitten durchgeführt. So wurde herausgefunden, dass Pollenschläuche von Lilienpollenkörnern der Arten *Lilium formosanum* oder *Lilium longiflorum* sich in zwei Bereiche einteilen lassen. Im vorderen Bereich befindet sich das endoplasmatische Retikulum, darauf folgen die Mitochondrien, der Golgi-Apparat und die Amyloplasten [185]. Derksen *et al.* beobachteten eine gleichmäßige Verteilung der Mitochondrien über den Pollenschlauch [186]. Welche Aufgabe die Mitochondrien beim Wachstum des Pollenschlauches erfüllen, ist unsicher. Mitochondrien dienen der Zelle als Energielieferanten, außerdem fungieren sie in Pilzen als Calciumspeicher [187]. Calcium kann aufgrund einer Potentialdifferenz in den Mitochondrien eingelagert werden. In der Spitze des Pollenschlauches von Gräserpollen wurden Polysaccharide nachgewiesen, in Baumpollen wurden diese nicht oder nur in geringerem Maße gefunden [188]. Der Pollenschlauch eines Lilienpollenkorns (*Lilium longiflorum*) ist von einer dünnen Hülle geschützt (0.1 bis 0.05 μm), im Gegensatz hierzu erreicht die Hülle eines Pollenkorns eine Dicke von 1 μm [189]. Die Zusammensetzung der Hüllen von Pollenschläuchen wurde für Pinienpollenkörner untersucht, sie besitzen zwei Schichten. Die innere Schicht besteht aus Callose, die Bestandteile der äußeren Schicht sind Pektin, Cellulose und Hemicellulose [190, 191]. Die Energie und das Material, welches für die Entwicklung des Pollenschlauches aufgewandt werden muss, ist in Form von Lipid- oder Stärkereserven gespeichert [192, 188, 156]. Die Ausdehnung des Pollenschlauches erfolgt oszillierend, dies wurde für die Pollen der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*) bewiesen [25]. Der Einfluss des hydrodynamischen Flusses aus den Zellen wurde durch den Einsatz von deuteriertem Wasser bestätigt, welches Raman-spektroskopisch nachgewiesen werden konnte [25]. Während der Keimung auftretende Veränderungen der chemischen Zusammensetzung konnten in Fichten- und Pinienpollenkörnern festgestellt werden. Es wurden IR-Spektren von Pollenkörnern in Resten des Nährmediums nach festgesetzten Zeitintervallen gemessen. In den Differenzspektren wurde eine Abnahme der Phosphatreserven, eine Steigerung der Kohlendioxid-Produktion, sowie eine Modifikation der Proteinsekundärstruktur und der Struktur der Phospholipide in der Membran festgestellt. Die Atmung durchläuft drei Phasen unterschiedlicher Intensität: Verstärkte Atmung zu Beginn der

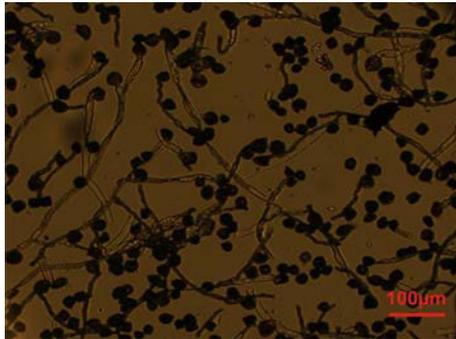


Abbildung 7.1: Aufnahme (10× Vergrößerung) von Salweidenpollenkörnern gekeimt in Saccharose, Borsäure, Kaliumchlorid, Calciumchlorid bei pH-Wert 5.5

Keimung, einen Rückgang der Atemtätigkeit am Anfang der Ausbildung des Pollenschlauchs und höchste Metabolismusaktivität im Verlauf der Ausdehnung des Pollenschlauchs [193]. Außerdem wurde die Synthese von Ribonukleinsäure (RNA) im vegetativen und regenerativen Zellkern von Pollen der Weihrauch-Kiefer (*Pinus taeda*) während der Ausbildung des Pollenschlauchs bestätigt [194]. Auch der Calciumgehalt spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus der keimenden Pollenkörner [195].

7.2 In-situ Raman-Messungen

Welche Auswirkungen Variationen der Zusammensetzung unterschiedlicher Keimlösungen auf den Keimungsprozess haben, wurde unter Verwendung dreier Nährlösungen getestet. Die Zusammensetzungen der Lösungen ist in Abschnitt 3.5 beschrieben. In Saccharose, Calciumnitrat und Borsäure wurde keine Ausbildung von Pollenschläuchen beobachtet. Obwohl die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Nährlösungen aus der Literatur bekannt waren [65, 66], ist nicht bekannt, wie effizient die Keimung der in dieser Arbeit verwendeten Pollenarten verlaufen würde.

Etablierte Techniken zur Untersuchung von Pollenschläuchen sind Kombinationen von Farbreaktionen und eine sich an die Lichtmikro-

7 Pollenkeimung

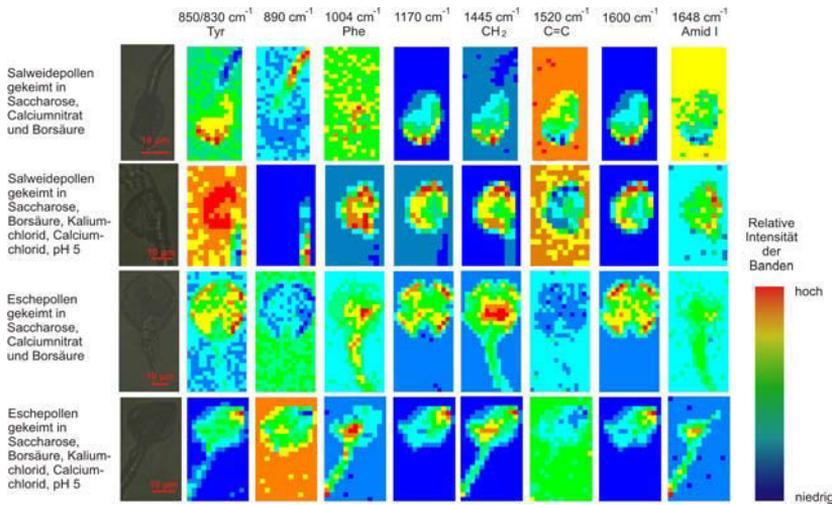


Abbildung 7.2: Darstellung der Intensitätsverteilungen für die angegebenen Banden in keimenden Eschen- und Salweidenpollenkörnern (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²)

skopie anschließende TEM Inspektion. Voraussetzung für letztere ist eine recht aufwendige Probenpräparation. Die Raman-Mikro-Spektroskopie bietet eine Möglichkeit, den Aspekt der Bildgebung mit einem hohen Gehalt an chemischen Informationen zu verbinden. Nach der Aufzeichnung von Raman-Spektren (orientiert an einem über die Probenoberfläche gelegtem Raster), kann die Intensität der Raman-Banden für ausgewählte Wellenzahlenbereiche als Funktion der Ortskoordinaten aufgetragen werden. Im Gegensatz zu Fluoreszenzmessungen werden dazu keine Marker benötigt.

Die Ergebnisse der orts aufgelösten Raman-Experimente für zwei Pollenspezies (Esche und Salweide) sind in Abbildung 7.2 zu sehen. Die Intensitätsverteilungen charakteristischer Raman-Banden *para*-disubstituierter Benzole (Fermi-Duplett bei 850/830 cm⁻¹), der Aminosäure Phenylalanin (bei 1004 cm⁻¹), der Lipide (Deformationsschwingung bei 1445 cm⁻¹), der Carotinoide (ν_1 bei 1520 cm⁻¹) und der Proteine (anhand der Amid I Bande um 1648 cm⁻¹) wurden als Funktion der Ortskoordinate aufgetragen. Ebenso wurde die Intensität besonders intensiver Raman-Banden bei 890, 1170 und 1600 cm⁻¹ kartiert,

die Zuordnung dieser Banden ist bisher nicht geklärt. Die Bande bei 1600 cm^{-1} ist Gegenstand zahlreicher Arbeiten von Hamaguchi *et al.*. Die Untersuchungen sollen einen Zusammenhang zwischen der Lebensfähigkeit von Hefezellen und der Intensität dieses Peaks in Hefezellen belegen [196, 197, 198, 199]. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde für diese Raman-Bande der Begriff „Signatur des Lebens“ (engl.: *signature of life*) geprägt. In der folgenden Diskussion soll ein Vorschlag zur Herkunft dieser Bande und des Peaks bei 1170 cm^{-1} unterbreitet werden.

Die Darstellungen der Intensitätsverteilungen bilden die Morphologie der Pollenkörner nach. Die Bande bei 890 cm^{-1} weist hohe Intensitäten entlang des Pollenschlauches auf, wohingegen die Spektren im Bereich des Pollenkorns intensive Banden bei 1170 und 1600 cm^{-1} aufweisen. Lipide und *para*-disubstituierte Benzole lassen sich in beiden Strukturen nachweisen. Die Banden der Aminosäure Phenylalanin und der Amid I Bande der Proteinsignatur sind im Pollenkorn und im Pollenschlauch präsent. Obwohl die Visualisierung der Signalintensitäten des Fermidubletts bei $850/830\text{ cm}^{-1}$ das Vorkommen des Moleküls im Pollenschlauch und dem Pollenkörper anzeigt, ist es unwahrscheinlich, dass es sich dabei um in Proteine eingebautes Tyrosin handelt. Vielmehr rührt es von anderen *para*-disubstituierten Benzolen, unter Umständen auch von freiem Tyrosin, her. Denn die Verteilung der Intensitäten dieser Banden unterscheidet sich von der Lokalisierung der Peaks der Amid I Bande. Die Existenz von *para*-disubstituierten Benzolen ohne gleichzeitiges Auftreten einer Amidfunktion im Pollenkorn ist im Einklang mit den Ergebnissen der Mapping-Messungen an Roggenpollenkörnern (siehe Abschnitt 6.2). Die Auftragung der Bande um 1520 cm^{-1} wurde durchgeführt, um die Ursache für die Herkunft des Peaks bei 1170 cm^{-1} zu überprüfen. Die ν_2 -Schwingung der Carotinoide liegt bei 1170 cm^{-1} und ist somit eine potenzielle Ursache für die Bande an dieser Stelle. Würde die Bande durch Carotinoide verursacht, müsste die Verteilung der Intensitäten der ν_1 -Schwingung mit der Verteilung der Bande bei 1170 cm^{-1} identisch sein. Es wird ein leicht erhöhter Untergrund im Spektralbereich der ν_1 -Schwingung beobachtet, dies ist auf eine Flanke anderer Signale zum Beispiel bei 1570 cm^{-1} zurückzuführen und nicht durch das Auftreten eines Peaks der Carotinoide (vergleiche mit Abbildung 7.4). Folglich ist die Bande bei 1170 cm^{-1} nicht der ν_2 -Schwingung der Carotinoide zuzuordnen. Die Kartierungen der Pollenkörner, die in der zweiten Nährlösung auskeimten, zeigen das in dieser Lösung Bestandteile des Polleninneren insbesondere *para*-

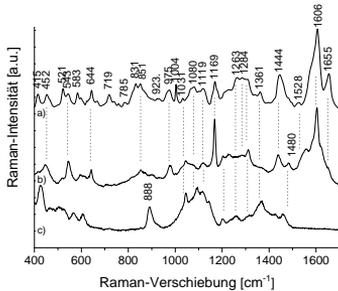


Abbildung 7.3: Raman-Spektren von a) einem ungekeimten Salweidenpollenkorn, b) einem gekeimten Salweidenpollenkorn, c) einem Pollenschlauch der Salweide (Keimlösung 3, 785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²)

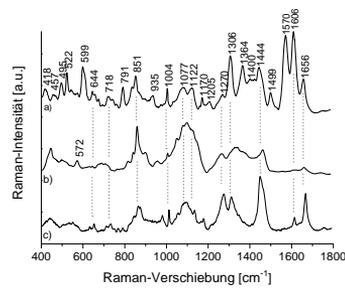


Abbildung 7.4: Raman-Spektren von a) einem ungekeimten Eschenpollenkorn, b) einem gekeimten Eschenpollenkorn, c) einem Pollenschlauch der Esche (Keimlösung 3, 785 nm, 10 s, 1.9 W/cm²)

disubstituierte-Benzole und phenolische Bestandteile austreten (siehe Abbildung 7.5).

Die Abbildungen 7.3 und 7.4 verdeutlichen die unterschiedliche chemische Zusammensetzung des Pollenkorns und des Pollenschlauches. Die Spektren wurden an repräsentativen Positionen des gekeimten Pollenkorns aufgezeichnet: In der Mitte des Pollenkorns und 2 μm entfernt vom Ansatz des Pollenschlauches. Zur Verdeutlichung der Veränderungen, die im Verlauf der Ausbildung der Pollenschläuche auftreten, werden diese Spektren den Spektren ungekeimter Pollenkörner gegenübergestellt. Typische Banden der Aminosäuren und Proteine sind in den Spektren des Pollenkörpers enthalten. Dies untermauert eine gesteigerte RNA-Synthese in den Zellkernen, wie sie mit anderen Methoden in keimenden Pollen beobachtet wurde [194]. In den Spektren der Pollenschläuche dominieren die Banden der Cellulose bei 1000 und 1200 cm⁻¹. Der Grund für den hohen Gehalt an Cellulose im Pollenschlauch ist der Aufbau der äußeren Wand aus Cellulose und Pektin [190]. Dies steht im Gegensatz zu den Membranen der Pollenkörner, die sich aus Phospholipiden bilden. Lipidreserven befinden sich überwiegend im Pollenkörper. Neben diesen Gemeinsamkeiten der untersuchten Pollenspezies zeigen

sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Arten. So existiert in dem Spektrum des Pollenschlauches eines Salweidenpollenkorns eine intensive Schwingung bei 890 cm^{-1} , die in den anderen Spektren nicht detektierbar ist (siehe Abbildung 7.3 c). Die Spektren der Pollenschläuche der Eschenpollen werden hingegen vom Fermiduplett bei $850/830\text{ cm}^{-1}$ beherrscht (siehe Abbildung 7.4c). Dieses Spektrum verdeutlicht, dass das Fermiduplett nicht von in Protein eingebautes Tyrosin verursacht wird, da die Intensität dieser Bande nicht mit einer hohen Intensität der Amid I Bande korreliert. Im gekeimten Eschenpollenkorn sind intensive Peaks bei 1270 und 1306 cm^{-1} zu beobachten (siehe Abbildung 7.4 b). Diese Banden sind auch im Spektrum unbehandelter Pollenkörner präsent, jedoch verfügt der Peak bei 1270 cm^{-1} über eine geringere Intensität. Das Spektrum der gekeimten Pollenkörner der Salweide wird durch die Schwingungen bei 1170 und 1600 cm^{-1} geprägt. Dieselben Banden erscheinen mit geringerer relativer Intensität in den Spektren der unbehandelten Salweidenpollen sowie in den Spektren der gekeimten und ungekeimten Eschenpollen.

Aus einem Vergleich der Spektren 7.3 a-c als auch 7.4 a-c untereinander kann gefolgert werden, dass sich der Stoffwechszustand in den Pollenkörnern ändert. Das kann aus Unterschieden in der chemischen Zusammensetzung zwischen gekeimten und ungekeimten Pollenkorn gefolgert werden. Spektren, die bei gekeimten Pollenkörnern von Pollenkorn und Pollenschlauch aufgenommen wurden, beinhalten zusammen nicht alle spektralen Merkmale, die das Spektrum des ungekeimten Pollenkorns enthält. Dies läßt auf einen radikal veränderten Metabolismus im gekeimten Pollenkorn schließen.

Welche molekulare Gruppe die Schwingung bei 1600 cm^{-1} verursachen könnte, wurde in zahlreichen Artikeln diskutiert [199, 200, 201]. Einigkeit besteht darüber, dass die Bande um 1600 cm^{-1} ein Indikator für die Bioaktivität der Mitochondrien ist. Weitere Moden, die in Mitochondrien beobachtet werden, liegen bei 1226 , 1301 , 1446 , 1602 und 1654 cm^{-1} . Diese Banden werden in Spektren der Mitochondrien von Hefezellen sowie von menschlichen Stammzellen gefunden [202]. Das Spektrum in Abbildung 7.5 eines keimenden Eschenpollenkorns weist dieselben Banden auf, es ähnelt dem Spektrum von Phosphatidylcholin [198]. Das ist ein Hauptbestandteil biologischer Membranen, welche beispielsweise Mitochondrien bilden. Zusätzlich weist es die Bande bei 1600 cm^{-1} auf und ist so mit den Spektren der Mitochondrien von Hefezellen vergleichbar. Um herauszufinden, ob der Peak bei 1600 cm^{-1}

in Pollenkörnern identisch mit der „Signatur des Lebens“ ist, wurde untersucht, ob sich die Intensität dieser Bande mit der Zeit verändert. Ein Zusammenhang mit der Atmungsaktivität der Mitochondrien kann durch gezieltes Blockieren der Atmung überprüft werden. Hierfür können wässrige Lösungen von Kaliumcyanid und Wasserstoffperoxid verwendet werden. Im Gegensatz zu einer deutlichen Veränderung der In-

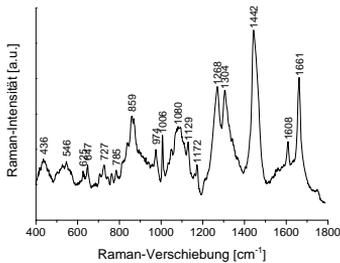


Abbildung 7.5: Raman-Spektrum eines keimenden Eschenpollenkorns (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm^2)

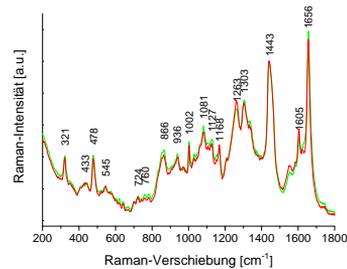


Abbildung 7.6: Raman-Spektren von einem Birkenpollenkorn zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ s}$ und $t = 16 \text{ Stunden}$ (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm^2)

tensität der „Signatur des Lebens“ in Hefezellen [196, 203] konnten in unserem Experiment keine Unterschiede in den Spektren über die Zeit beobachtet werden. Es ergeben sich lediglich geringfügige Abnahmen der Intensität der Banden bei 1263 und 1605 cm^{-1} , deren Signifikanz hier nicht belegbar ist. Auch die Auswertung der Wechselwirkungen mit den wässrigen Lösungen von Kaliumcyanid und Wasserstoffperoxid ergaben keine eindeutigen spektralen Veränderungen. Folglich ist das Auftreten dieser Bande nicht auf mitochondriale Aktivität rückführbar.

Um die Herkunft der „Signatur des Lebens“ in Hefezellen zu ermitteln, wurden Korrelationen dieses Peaks mit anderen Banden gesucht. Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Intensität der Bande bei 1600 cm^{-1} und den Lipidsignalen gefunden werden. Via Raman-spektroskopischer Maps wurde festgestellt, dass sich Bereiche hoher Intensitäten der „Signatur des Lebens“ mit Arealen hoher Proteingehalte decken [202]. Zudem wurde nach Korrelationen der Bande bei 1600 cm^{-1} mit anderen molekularen Gruppen gefahndet (vergleiche Abbildung

7.2). Der Vergleich der Intensitäten der Bande bei 1600 cm^{-1} mit der Bande bei 1170 cm^{-1} zeigt, dass beide Banden kolokalisiert sind. Mit den Aminosäuren und Proteinen konnte keine Übereinstimmungen bezüglich des Aufenthaltsortes gefunden werden. Der Vergleich von Referenzspektren mit Spektren der Pollen, der bereits in Abschnitt 6.4 diskutiert wurde, verdeutlicht, dass diese Banden möglicherweise durch Cumarinsäure, einem bekannten Bestandteil der Pollenhülle [131, 130], verursacht werden.

Die vorliegenden Ergebnisse der Kartierungen der keimenden Pollenkörner liefern erstmals eine Information über die molekulare Zusammensetzung während des Keimungsprozesses. Die Resultate dieser Untersuchung können wie folgt zusammengefasst werden. Die Spektren von Pollenkorn und Pollenschlauch zeigen deutliche Abweichungen in der Lage und Intensität der Raman-Banden, auch unterscheiden sie sich deutlich in der chemischen Zusammensetzung vom ungekeimten Pollenkorn. Dies weist auf einen veränderten Stoffwechselprozess während der Keimung hin. Als ungeeignet für die Auskeimung erwies sich die zweite Nährlösung (mit Saccharose, Calciumnitrat-Tetrahydrat, Borsäure), da wässrige Bestandteile aus den Pollen heraustraten. Dies könnte Implikationen für weitere Untersuchungen der Pollenkeimung haben.

Kapitel 8

Zusammenfassung und Ausblick

Die Analyse von Pollen ist wichtig, um den Grundstein für eine automatische Pollendetektion zu legen. Des Weiteren können kürzere Meßzeiten für die Carotinoidanalyse und neue Erkenntnisse über die biochemischen Vorgänge in Pollen während der Keimung erzielt werden. Die Aufklärung der Struktur des Sporopollenins könnte neue Anwendungsgebiete für dieses äußerst stabile Material erschließen. In dieser Arbeit wurden Ergebnisse hinsichtlich folgender Aspekte erzielt:

Eine automatische On-line-Detektion, basierend auf der Auswertung von Raman-Spektren, bietet die Möglichkeit einer schnellen verlässlichen Klassifizierung und Identifizierung von Pollenarten. Dies wird durch die Auswertung der Schwingungs-Spektren von Pollen erreicht, da diese die gesamte chemische Information aller im Molekül vorkommenden Gruppen beinhalten. Gegenüber den gängigen Methoden zur Pollenidentifizierung werden keine morphologischen Daten sondern molekulare Eigenschaften ausgewertet. Dafür wurde in dieser Arbeit das Potential der Raman-Spektroskopie genutzt. Die chemischen Merkmale einer Pollenspezies spiegeln die Rolle des Pollenkorns als Träger der Erbinformationen wieder. So gelang mittels hierarchischer Clusteranalyse nicht nur die Unterscheidung der Pollenspektren aufgrund ihrer Spezies, es konnte auch die phylogenetische Herkunft der Pollenarten aus den Ergebnissen der Klassifizierungsexperimente rekonstruiert wer-

den. Ein weiterer wichtiger Schritt für den Aufbau einer automatischen Methode zur Pollenidentifizierung stellt der Übergang von der Klassifizierung der Pollenarten mittels Clusteranalyse zur Identifizierung dar. Hier wurde die prinzipielle Eignung künstlicher neuraler Netze für Identifizierungszwecke bestätigt. Welche überwachten multivariaten Verfahren sich in einem komplexen möglichst weit anwendbaren Identifizierungsverfahren kombinieren lassen, kann nur durch extensive Datensammlungen über mehrere Jahre und unter Einbeziehung einer großen Anzahl von Arten gezeigt werden. Die große ökonomische und soziale Bedeutung eines automatischen Pollenwarnsystems liegt auf der Hand. In der Zeit von Februar bis September leiden viele Menschen in Deutschland unter allergischen Beschwerden wie Heuschnupfen oder Asthma. Für diese Betroffenen stellt eine schnelle und verlässliche Pollenflugvorhersage eine erhebliche Erleichterung dar. Bislang werden Pollenflugwarnungen aufgrund der Auswertung von sogenannten Burkard Pollenfallen erstellt. Dafür wird ein speziell ausgebildeter Mitarbeiter benötigt, trotzdem können diese Daten nur mit einer Verzögerung von einem Tag veröffentlicht werden. Benötigt wird eine automatische On-line-Detektion, die schneller, genauer und effizienter ist. Die Eignung der Raman-Spektroskopie wurde durch die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals belegt. Die in-situ Untersuchungen an Carotinoiden, die den zweiten Teil der Arbeit bildeten, haben zudem gezeigt, dass durch in-situ erzeugte Carotinoidspektren eine schnelle Korrektur der automatisch aufgenommenen Raman-Spektren der Pollenarten möglich ist. Dies verhindert falsche Zuordnungen aufgrund unterschiedlicher Carotinoidgehalte. Es muss ein Weg gefunden werden, die Pollenkörner aus der Luft zu filtern und für die Dauer der Messung stabil zu halten. Hierfür könnte die Kopplung eines Raman-Spektrometers an eine Ultraschallfalle, wie von Llaucks *et al.* [204, 205] vorgeschlagen, eingesetzt werden. Im Gegensatz zur Auswertung morphologischer Merkmale eines Pollenkorns wie üblich, werden im Fall der Raman-basierten Identifizierung die molekularen Eigenschaften der Probe verwendet. Dies erschließt neue Anwendungsgebiete. So könnten auch beschädigte Pollenkörner identifiziert werden, wie sie beispielsweise in alten Sedimentschichten gefunden werden.

Der Fingerabdruck der Raman-Spektren wurde erfolgreich für die Klassifizierung von Pollenarten eingesetzt, allerdings ist das Zustandekommen dieser komplexen Signatur noch nicht verstanden. In die-

ser Arbeit konnte das Wissen darüber, welche molekularen Gruppen und in welcher Weise diese zum Raman-Spektrum beitragen, erweitert werden. In-situ Messungen von Carotinoiden einzelner Pollenkörner bewiesen Abweichungen in der Zusammensetzung und in dem Gehalt der Carotinoide in Abhängigkeit von der untersuchten Pollenart. Raman-Messungen, der zuvor mit Hilfe der Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) getrennten Carotinoide, belegten, dass die in-situ erzeugten Differenz-Raman-Spektren die Signatur aller in einer Pollenart enthaltenen Carotinoide wiedergeben. Die Densitogramme und die Raman-Spektren der aufgetrennten Carotinoide bestätigten, dass breite Banden der Carotinoide in den Differenzspektren auf eine große Anzahl an Carotinoiden mit Abweichungen in der Lage der charakteristischen Banden hinweisen. Die in-situ erzeugten Differenzspektren beinhalten alle Merkmale der Carotinoidsignatur eines Pollenkorns, wie die Anzahl der enthaltenen Carotinoide, die strukturelle Heterogenität dieser Carotinoide und den Einfluss der umgebenden Exinematrix. Diese Differenzspektren sind molekular empfindlich. Es können Carotinoide in unterschiedlichen Matrices untersucht werden ohne Auftrennung der Spezies und Probenpräparation. Dies könnte beispielsweise für die Lebensmittelanalytik von Bedeutung sein. Die Kopplung der HPTLC und der Raman-Spektroskopie, welche in dieser Arbeit erstmals für eine akute Fragestellung verwendet wurde, eröffnet neue Wege zur empfindlichen Detektion von chromatographisch aufgetrennten Analytmolekülen.

Sporpollenin wird seit langem von Botanikern aufgereinigt, um die Struktur dieses Biomaterials aufzuklären. Die chemische Zusammensetzung der Exine ist bis heute ungeklärt. Dabei bestimmt die chemische Zusammensetzung physikalische Eigenschaften die für Materialwissenschaftler [16], Ingenieure [19] und Lebensmitteltechnologe [206] interessant sind. Botaniker bedienen sich einiger etablierter Techniken für die Isolation des Sporopollenins. Bisher stand bei diesen Untersuchungen die Morphologie des Exine-Materials im Vordergrund. Es ist aber anzunehmen, dass die verschiedenen Arten der chemischen Aufreinigung chemische Veränderungen der Pollenhüllen bewirken. In dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass die Raman-Spektroskopie einen Vergleich der verschiedenen Präparationsformen anhand der Spektren der Exine ermöglicht. Neben der Raman-Spektroskopie wurden IR- und NMR-Experimente durchgeführt. Es konnten Veränderungen in der molekularen Zusammensetzung der Pollenhüllen nach den Umset-

zungen detektiert werden. So konnten beispielsweise die Fluorierung der Pollenhüllen bei der Umsetzung mit Hydrogenfluorid nachgewiesen werden. Auch konnte der Anteil der aliphatischen Komponente im Sporopollenin(50 %) bestimmt werden, wohingegen der Anteil der aromatischen Komponente bei 11 % liegt. Zudem müssen neue Verfahren zur Aufklärung des Sporopollenins etabliert werden. Die Löslichkeit der Pollen in ionischen Flüssigkeiten, die in dieser Arbeit belegt wurde, ermöglicht neue Herangehensweisen. So können Flüssig-Methoden genutzt werden, die vorher nicht offenstanden. Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit bestand darin, dass die chemische Inertheit und Stabilität der Pollenhüllen nach dem Auflösen und der Reaggregation des Materials erhalten bleibt. So kann dieses Material neuen Anwendungen zugänglich gemacht werden, beispielsweise könnte durch kontrolliertes Ausfällen der aufgelösten Pollebhüllen auf strukturierten Oberflächen Mikroreaktoren variabler Größen hergestellt werden. Aufgrund der Stabilität dieses biologischen Materials könnte dies für zahlreiche Anwendungen von Interesse sein.

Neben der Untersuchung von Pollen im inaktiven beziehungsweise aufgereinigtem Zustand eignet sich die Raman-Spektroskopie zur Charakterisierung dynamischer physiologischer Prozesse. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse der orts aufgelösten Raman-Daten an keimenden Pollenkörnern konnten erstmals Informationen über molekulare Veränderungen während der Keimung liefern. Damit wird die Raman-Mikro-Spektroskopie nicht nur als Werkzeug für die Identifizierung und Strukturuntersuchung interessant, diese Technik kann auch Pflanzenphysiologen wichtige Erkenntnisse über die zu großen Teilen noch unbekanntem Vorgänge beim Keimungsprozess liefern.

Kapitel 9

Anhang

9.1 Tabellen

Übersicht gemessener Baumpollenarten

Spezies	bot. Name	Familie
Eschenahorn	<i>Acer negundo</i>	Sapindaceae
Spitzahorn	<i>Acer platanoides</i>	Sapindaceae
Bergahorn	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Sapindaceae
Feldahorn	<i>Acer campestre</i>	Sapindaceae
Rotahorn	<i>Acer rubrum</i>	Sapindaceae
Silberahorn	<i>Acer saccharinum</i>	Sapindaceae
Roskastanie (rot)	<i>Aesculus x carnea</i>	Sapindaceae
Roskastanie (weiß)	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Sapindaceae
Vogelkirsche	<i>Prunus avium</i>	Rosaceae
Traubenkirsche	<i>Prunus padus</i>	Rosaceae
Steinweichsel	<i>Prunus mahaleb</i>	Rosaceae
Hagiankirsche	<i>Prunus subhirtella</i>	Rosaceae
jap. Kirsche	<i>Prunus serrulata</i>	Rosaceae
vielblütiger Apfel	<i>Malus floribunda</i>	Rosaceae
Eberesche	<i>Sorbus aucuparia</i>	Rosaceae
Salweide	<i>Salix caprea</i>	Salicaceae
Trauerweide	<i>Salix alba "tristis"</i>	Salicaceae
Bruchweide	<i>Salix fragilis</i>	Salicaceae
Schwarzpappel	<i>Populus nigra</i>	Salicaceae

Silberpappel	<i>Populus alba</i>	Salicaceae
Hopfenbuche	<i>Ostrya carpinifolia</i>	Betulaceae
Hängebirke	<i>Betula pendula</i>	Betulaceae
Gemeine Hasel	<i>Corylus avellana</i>	Betulaceae
Schwarzerle	<i>alnus glutinosa</i>	Betulaceae
Gemeine Esche	<i>Fraxinus excelsior</i>	Oleaceae
Flieder (weiß)	<i>Syringa vulgaris</i>	Oleaceae
Flieder (violett)	<i>Syringa vulgaris</i>	Oleaceae
Zerreiche	<i>Quercis cerris</i>	Fagaceae
Stieleiche	<i>Quercus robur</i>	Fagaceae
Roteiche	<i>Quercus rubra</i>	Fagaceae
Gemeine Platane	<i>Platanus acerifolia</i>	Platanaceae
morgenländische Platane	<i>Platanus orientalis</i>	Platanaceae
Sommerlinde	<i>Tilia platyphyllus</i>	Malvaceae
Winterlinde	<i>Tilia cordata</i>	Malvaceae
Robinie	<i>Robinia pseudoaccacia</i>	Fabaceae
jap. Schnurbaum	<i>Styphnolobium japonicum</i>	Fabaceae
Götterbaum	<i>Ailanthus altissima</i>	Sinoroubaceae
Ölweide	<i>Eleagnus angustifolia</i>	Elaeagnaceae
Flatterulme	<i>Ulmus laevis</i>	Ulmaceae
Kornelkirsche	<i>Cornus mas</i>	Cornaceae
Spitzwegerich	<i>Plantago lanceolata</i>	Plantago

Tabelle 9.2: Überblick der gemessenen Gräserpollenarten

Spezies	bot. Name	Familie
Waldgerste	<i>Hordelymus europaeus</i>	Poaceae
Weißes Straußgras	<i>Agrostis stolonifera</i>	Poaceae
Wiesen-Fuchsschwanz	<i>Alopecurus pratensis</i>	Poaceae
Blutrote Fingerhirse	<i>Digitaria sanguinalis</i>	Poaceae
Knäuelgras	<i>Dactylis glomerata</i>	Poaceae
Deutsches Weidelgras	<i>Lolium perenne</i>	Poaceae
Wiesenrispe	<i>Poa pratensis</i>	Poaceae
Waldschilf	<i>Calamagrostis epigejos</i>	Poaceae
Wolliges Honiggras	<i>Holcus lanatus</i>	Poaceae
Trespe	<i>Bromus inermis</i>	Poaceae

Tabelle 9.3: Überblick der käuflich erworbenen Pollenarten

Spezies	bot. Name	Familie
Wilde Mohrenhirse	<i>Sorghum halepense</i>	Poaceae
Roggen	<i>Secale cereale</i>	Poaceae
Wüstensalbei	<i>Artemisia tridentata</i>	Asteraceae
Dreiblättriges Traubenkraut	<i>Ambrosia trifida</i>	Asteraceae
Wasserbirke	<i>Betula fontinalis</i>	Betulaceae
Pyramidenpappel	<i>Populus nigra italica</i>	Salicaceae

Tabelle 9.4: Analytische Parameter der Probenextrakte

Pollenart	R_f	Fläche [%]	Bereich	Max_{abs} [nm]	Position ν_1 [cm ⁻¹]
Kastanie	0.09	31.4	0.04-0.14	460	1529
	0.17	5.9	0.14-0.19	451	
	0.21	0.2	0.20-0.23		
	0.27	0.3	0.25-0.29		
	0.52	14.2	0.48-0.55	501	
	0.60	13.9	0.55-0.61	451	1536
	0.64	25.9	0.62-0.68	481	
	0.75	3.5	0.73-0.77	454	
	0.81	1.8	0.79-0.83	450	
	0.94	2.8	0.92-0.96	454	1529
Salweide	0.2	0.4	0.18-0.24		1533
	0.27	0.3	0.25-0.29		
	0.56	8.5	0.53-0.58	421	
	0.64	32.5	0.61-0.67	400	
	0.70	19.3	0.68-0.72	425	
	0.76	26.3	0.72-0.79	449	
	0.83	7.5	0.80-0.86	451	
	0.94	5.3	0.90-0.96	450	
Steinweichsel	0.06	0.8	0.05-0.08		1532
	0.22	0.8	0.20-0.23		
	0.28	0.9	0.25-0.29		
	0.56	13.6	0.54-0.58	422	
	0.64	6.2	0.63-0.65	421	
	0.69	7.5	0.67-0.71	421	
	0.75	8.0	0.73-0.77	451	
	0.82	15.3	0.79-0.84	451	
	0.94	46.9	0.90-0.97	454	
Sommerlinde	0.32	1.8	0.29-0.34		1533
	0.72	9.5	0.69-0.74		
	0.76	3.5	0.75-0.77		
	0.82	18.4	0.79-0.85		
	0.91	52.1	0.85-0.93		
	0.95	13.7	0.93-1.00		
	1.02	1.2	1.00-1.06		
Götterbaum	0.94	*	*	*	

* der Gehalt an β -Carotin liegt unterhalb der Nachweisgrenze

9.2 Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
ESEM	environmental scanning electron microscopy
IR	Infrarot
UV	Ultraviolett
FT	Fourier-Transform
SERS	<i>surface enhanced Raman scattering</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
MAS	<i>magic angle spinning</i>
SP	<i>single puls</i>
FID	<i>free induction decay</i>
CP	<i>cross polarization</i>
HPTLC	<i>high performance thin layer chromatography</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
ANN	<i>artificial neural network</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
MCT	<i>mercury cadmium telluride</i>
MIR	mittleres Infrarot
UV/Vis	<i>ultraviolet/visible</i>
HF	Hydrogenfluorid
MMNO	N-Methylmorpholin-N-oxid
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
TMBC	1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid
TMST	1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat
SVM	<i>support vector machine</i>
NIR	nahes Infrarot
U	Uracil
C	Cytosin
A	Adenin
G	Guanin
Trp	Tryptophan
Phe	Phenylalanin
Tyr	Tyrosin
Met	Methionin

DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
HCA	<i>hierarchical cluster analysis</i>
BackpropMom	<i>backpropagation with momentum term</i>
Rprop	<i>resilient back propagation</i>
Quickprop	<i>quick propagation</i>
CARS	<i>coherent anti-Stokes Raman scattering</i>
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
RS	Raman-Spektroskopie
RRS	resonante Raman-Spektroskopie
R_f	Retentionsfaktor

9.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Franziska Schulte
Geburtsdatum	11.08.1980
Geburtsort	Wiesbaden
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

- 10/2006 - 12/2009 **Doktorarbeit**
Kooperation der BAM in der Fachgruppe I.42 „Optische Spektroskopie“ und der HU Berlin in der Arbeitsgruppe „Optische Spektroskopie und Prozessanalytik“ betreut durch Prof. Janina Kneipp, Thema: „Analyse von Pollen mit Hilfe der Raman-Spektroskopie“
- 12/2005 - 08/2006 **Diplomarbeit**
in der BAM Fachgruppe I.3 „Strukturanalytik“ betreut durch Dr. Klaus-Werner Brzezinka, Thema: „Charakterisierung organischer synthetischer Farbpigmente des 20. / 21. Jahrhunderts mit Hilfe der Schwingungsspektroskopie“
- 09/2004 - 08/2005 **Studentische Hilfskraft**
im Deutschen Institut für Bautechnik, Auswertung eines Ringversuchs
- 10/2001 - 08/2006 **Studium**
der Chemie an der Humboldt Universität zu Berlin
- 08/2000 - 05/2001 **Auslandsaufenthalt**
an der Nørdmøre Folkehøgskole in Surnadal (Norwegen)
- 07/2000 **Abitur**
am Otto-Hahn-Gymnasium in Geesthacht

9.4 Publikationsverzeichnis

Artikel

F. Schulte, K.-W. Brzezinka, K. Lutzenberger, H. Stege, U. Panne. Raman spectroscopy of synthetic organic pigments used in 20th century works of art. *J. Raman Spectrosc.*, **39**(10): 1455-1463, 2008.

F. Schulte, J. Lingott, U. Panne, J. Kneipp. Chemical Characterization and Classification of Pollen. *Anal. Chem.*, **80**(24): 9551-9556, 2008.

F. Schulte, J. Mäder, L. W. Kroh, U. Panne, J. Kneipp. Characterization of pollen carotenoids with in situ and HPTLC-supported resonant Raman spectroscopy. *Anal. Chem.*, **81**(20): 8426-8433, 2009.

V. Joseph, F. Schulte, I. Feldmann, U. Panne, J. Kneipp

F. Schulte, A. Pawlik, C. Jäger, U. Panne, J. Kneipp. Insights and Limitations of Elucidating the Structure of Sporopollenin by Raman, IR and NMR Spectroscopy (in preparation)

F. Schulte, U. Panne, J. Kneipp. Changes in Pollen during Germination. (in preparation)

Buchkapitel

F. Schulte, V. Joseph, U. Panne, J. Kneipp. Applications of Raman and surface-enhanced Raman scattering to the analysis of eukaryotic samples. in *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields* P. Matousek und M. Morris (Springer November 2009)

Vorträge

U. Panne, J. Kneipp, F. Schulte, „Raman and FT-IR Spectroscopy for bioanalytical applications“, Euroanalysis in Antwerpen, 12.09.2007

F. Schulte, K. Lutzenberger, K. W. Brzezinka, H. Stege, U. Panne, „Raman Microscopy on Organic Synthetic Pigments- from Pure References to Painting Samples“, Scientific workshop on organic synthetic

colourants in München, 12.09.2008

F. Schulte, U. Panne, J. Kneipp, „Klassifizierung von Pollen anhand ihrer Raman-Spektren: Auf dem Weg zur On-line-Pollenwarnung“, 3. Interdisziplinäres Doktorandenseminar Analytik in Attendorn, 16.02.2009

F. Schulte, J. Mäder, L. W. Kroh, U. Panne, J. Kneipp. „Understanding In-situ Generated Resonance Raman Spectra Reflecting the Overall Carotenoid Composition in Pollen with the Help of High Performance Thin Layer Chromatography“, Euroanalysis in Innsbruck, 08.09.2009

Poster

F. Schulte, J. Kneipp, U. Panne. „Raman Spectroscopic Characterization and Identification of Pollen“, ECSBM in Paris, 04.09.2007

F. Schulte, K.-W. Brzezinka, K. Lutzenberger, H. Stege, U. Panne. „Analysis of synthetic organic pigments used in work of art and commercial paints by Raman spectroscopy“, Euroanalysis in Antwerpen, 12.09.2007

F. Schulte, J. Kneipp, U. Panne. „Classification and Identification of Pollen by Raman Spectroscopy“, 12th International Palynological Congress (IPC-XII 2008) in Bonn, 03.05.2008

F. Schulte, J. Kneipp, U. Panne. „Characterization of Pollen and their Constituents by Raman Spectroscopy“, ICORS in London, 20.08.2008

F. Schulte, J. Kneipp, U. Panne. „Raman-Spektroskopie als potentielles Werkzeug zur On-line Identifizierung von Pollen“, 4. Kolloquium Arbeitskreises Prozessanalytik der GDCh in Basel, 17.11.2008

F. Schulte, J. Mäder, L. W. Kroh, U. Panne, J. Kneipp. „HPTLC-supported and in-situ resonance Raman spectroscopy of carotenoid signature in pollen“, RKI Workshop in Berlin, 15.10.09 und Anakon in Berlin, 17.03.2009

F. Schulte, J. Mäder, L. W. Kroh, U. Panne, J. Kneipp. „Understanding

In-situ Generated Resonance Raman Spectra Reflecting the Overall Carotenoid Composition in Pollen with the Help of High Performance Thin Layer Chromatography“, ESCBM 2009 in Palermo, 30.08.2009

Literaturverzeichnis

- [1] E. Dominguez, J. A. Mercado, M. A. Quesada, and A. Heredia. Isolation of intact pollen exine using anhydrous hydrogen fluoride. *Grana*, **37**(2): 93–96, 1998.
- [2] N. M. Tarlyn, V. R. Franceschi, J. D. Everard, and F. A. Loewus. Recovery of exine from mature pollens and spores. *Plant Sci.*, **90**: 219–224, 1993.
- [3] D. Southworth. Solubility of pollen exines. *Amer. J. Bot.*, **61**(1): 36–44, 1974.
- [4] B. G. Baldi, V. R. Franceschi, and F. A. Loewus. Preparation and Properties of Pollen Sporoplasts. *Protoplasma*, **141**: 47–55, 1987.
- [5] P.D. Moore and M. E. Collinson. *Pollen analysis*. Oxford: Blackwell, 2. edition, 1991.
- [6] E. Pacini and M. Hesse. Pollenkitt - its composition, forms and functions. *Flora*, **200**(5): 399–415, 2005.
- [7] M. Hesse, H. Halbritter, R. Zetter, M. Weber, R. Buchner, A. Frosch-Radivo, and S. Ulrich. *Pollen Terminology: An illustrated Handbook*. Springer, 2009.
- [8] W. Punt, P. P. Hoen, S. Blackmore, S. Nilsson, and A. Le Thomas. Glossary of Pollen and Spore Terminology. *Rev. of Palaeobot. and Palynol.*, **143**(1-2): 1–81, 2007.
- [9] A. J. Woolcock, S. A. Bastiampillai, G. B. Marks, and V. A. Keena. The burden of asthma in Australia. *Med. J. Aust.*, **175**(1): 141–145, 2000.
- [10] F. Dessaint, B. Chauvel, and F. Bretagnolle. Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*): expansion history of a (biological pollutant) in France. *M S-Med. Sci.*, **21**(2): 207–209, 2005.
- [11] Deutscher Wetterdienst. <http://www.dwd.de>.

- [12] J. Ring, U. Krämer, T. Schäfer, and H. Behrendt. Why are allergies increasing? *Curr. Opin. Immunol.*, **13**: 701–708, 2001.
- [13] A. Majd and F. Ghanati. The effect of air pollution on the allergenicity of *Pinus elderica* (Pinaceae) pollen. *Grana*, **34**: 208–211, 1995.
- [14] M. Mastalerz, M. Glikson, and R. W. Simpson. Analysis of atmospheric particulate matter; application of optical and selected geochemical techniques. *Int. J. Coal Geol.*, **37**(1-2): 143–153, 1998.
- [15] D. G. Gavin, L. B. Brubaker, J. S. McLachlan, and W. W. Oswald. Correspondence of pollen assemblages with forest zones across steep environmental gradients, Olympic Peninsula, Washington, USA. *Holocene*, **15**(5): 648–662, 2005.
- [16] V. Paunov, G. Mackenzie, and S. Stoyanov. Sporopollenin micro-reactor for in-situ preparation, encapsulation and targeted delivery of active components. *J. Mater. Chem.*, **17**: 609–612, 2007.
- [17] S. R. Hall, H. Bolger, and S. Mann. Morphosynthesis of complex inorganic forms using pollen grain templates. *Chem. Commun.*, **22**: 2784–2785, 2003.
- [18] E. Bormashenko, T. Stein, R. Pogreb, and D. Aurbach. „Petal Effect“ on Surfaces Based on Lycopodium: High-Stick Surfaces Demonstrating High Apparent Contact Angles. *J. Phys. Chem. C*, **113**(14): 5568–5572, 2009.
- [19] H. Y. Tutar, E. Pehlivan, and M. Yilmaz. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*. *Int. J. Biol. Macromol.*, **45**(3): 315–320, 2009.
- [20] S. R. Barrier, A. Diego-Taboada, M. J. Thomasson, G. Mackenzie, and S. L. Atkin. Sporopollenin exines: a novel natural taste masking material. *Food Sci. Technol.*, **43**(1): 73–76, 2010.
- [21] M. Ucan, A. Gurten, and A. Ayar. Determination of the rate control step of chlorinated anilines in ligand exchange reactions on solid phase by using breakthrough technique. *Colloids Surf., A*, **219**(1-3): 193–199, 2003.
- [22] A. Ayar, S. Gural, A. A. Garten, and O. Gezici. On the removal of some phenolic compounds from aqueous solutions by using a sporopollenin-based ligand-exchange fixed bed - Isotherm analysis. *Desalination*, **219**(1-3): 160–170, 2008.
- [23] A. Ayar and B. Mercimek. Interaction of nucleic acid bases and nucleosides with cobalt ions immobilized in a column system. *Process Biochem.*, **41**(7): 1553–1559, 2006.

- [24] E. Pehlivan, M. Ersoz, S. Yildiz, and H. J. Duncan. Sorption of Heavy-Metal Ions on New Metal-Ligand Complexes Chemically Derived from Lycopodium-Clavatum. *Sep. Sci. Technol.*, **29**(13): 1757–1768, 1994.
- [25] L. Zonia, M. Muller, and T. Munnik. Hydrodynamics and Cell Volume Oscillations in the Pollen Tube Apical Region are Integral Components of the Biomechanics of *Nicotiana tabacum* Pollen Tube Growth. *Cell Biochem. Biophys.*, **46**: 209–232, 2006.
- [26] C. V. Raman and K. S. Krishnan. A new type of secondary radiation. *Nature*, **121**: 501–502, 1928.
- [27] G. Landsberg and L. Mandelstam. Eine neue Erscheinung bei der Lichtzertreuung. *Naturwissenschaften*, **16**: 557, 1928.
- [28] T. Hirschfeld and B. Chase. FT-Raman Spectroscopy: Development and Justification. *Appl. Spectrosc.*, **40**: 133–137, 1986.
- [29] P. Hendra, C. Jones, and G. Warner. *Fourier Transform Raman Spectroscopy; Instrumentation and Applications*. Wiley, New York, 1991.
- [30] J. Sweedler, K. Ratzloff, and M. B. Dertan. *Charge Transfer Devices in Spectroscopy*. VCH: New York, 1994.
- [31] R. L. McCreery. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, volume **157** of *Chemical Analysis*. John Wiley & Sons, first edition, 2000.
- [32] J. Kneipp, H. Kneipp, and K. Kneipp. SERS - a single-molecule and nanoscale tool for bioanalytics. *Chemical Society Reviews*, **37**(5): 1052–1060, 2008.
- [33] C. Kendall, M. Isabelle, F. Bazant-Hegemark, J. Hutchings, L. Orr, J. Babrah, R. Baker, and N. Stone. Vibrational spectroscopy: a clinical tool for cancer diagnostics. *Analyst*, **134**(6): 1029–1045, 2009.
- [34] T. R. M. De Beer, C. Bodson, B. Dejaegher, B. Walczak, P. Vercauysse, A. Burggraeve, A. Lemos, L. Delattre, Y. Vander Heyden, J. P. Remon, C. Vervaete, and W. R. G. Baeyens. Raman spectroscopy as a process analytical technology (PAT) tool for the in-line monitoring and understanding of a powder blending process. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**(3): 772–779, 2008.
- [35] M. Perez-Alonso, K. Castro, I. Martinez-Arkarazo, M. Angulo, M. A. Olazabal, and J. M. Madariaga. Analysis of bulk and inorganic degradation products of stones, mortars and wall paintings by portable Raman microprobe spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**(1): 42–50, 2004.
- [36] D. E. Nichelson. Quantitative Analysis of Mixtures of Benzene and Isopropylbenzenes by Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.*, **32**(12): 1634–1638, 1960.

- [37] R. Petry, M. Schmitt, and J. Popp. Raman Spectroscopy - A prospective tool in the life sciences. *Chemphyschem*, **4**(1): 14–30, 2003.
- [38] K. Kneipp, H. Kneipp, and J. Kneipp. Surface-enhanced Raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates - From single-molecule Raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells. *Acc. Chem. Res.*, **39**(7): 443–450, 2006.
- [39] S. M. Nie and S. R. Emery. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science*, **275**(5303): 1102–1106, 1997.
- [40] S. De, A. Pal, N. R. Jana, and T. Pal. Anion effect in linear silver nanoparticle aggregation as evidenced by efficient fluorescence quenching and SERS enhancement. *J. Photochem. Photobiol., A*, **131**(1-3): 111–123, 2000.
- [41] A. Campion and P. Kambhampati. Surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Soc. Rev.*, **27**(4): 241–250, 1998.
- [42] W. E. Smith. Practical understanding and use of surface enhanced Raman scattering/surface enhanced resonance Raman scattering in chemical and biological analysis. *Chem. Soc. Rev.*, **37**(5): 955–964, 2008.
- [43] B. Schrader, editor. *Infrared and Raman Spectroscopy*. VCH: Weinheim, 1995.
- [44] J. E. Katon. Infrared microspectroscopy. A review of fundamentals and applications. *Micron*, **27**(5): 303–314, 1996.
- [45] E. N. Lewis, P. J. Treado, R. C. Reeder, G. M. Story, A. E. Dowrey, C. Marcott, and I. W. Levin. Fourier-Transform Spectroscopic Imaging Using an Infrared Focal-Plane Array Detector. *Anal. Chem.*, **67**(19): 3377–3381, 1995.
- [46] C. Petibois and M. C. Guidi. Bioimaging of cells and tissues using accelerator-based sources. *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**(5): 1599–1608, 2008.
- [47] D. A. Skoog and J. J. Leary. *Instrumentelle Analytik*. Springer, first edition, 1996.
- [48] F. R. Elder, A. M. Gurewitsch, R. V. Langmuir, and H. C. Pollock. Radiation from Electrons in a Synchrotron. *Phys. Rev.*, **71**(11): 829–830, 1947.
- [49] H. Y. N. Holman, M. C. Martin, and W. R. McKinney. Synchrotron-based FTIR spectromicroscopy: Cytotoxicity and heating considerations. *J. Biol. Phys.*, **29**(2-3): 275–286, 2003.
- [50] E. R. Andrew and E. Szczesniak. A historical account of NMR in the solid state. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.*, **28**: 11–36, 1995.

- [51] A. Marston. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry*, **68**(22-24): 2786–2798, 2007.
- [52] G. Schwedt. *Analytische Chemie - Grundlagen, Methode und Praxis*. Weinheim: VCH-Wiley, 2. edition, 2008.
- [53] M. Otto. *Analytische Chemie*. Weinheim: Wiley-VCH, 3. edition, 2006.
- [54] H. Jork, W Funk, W. Fischer, and H. Wimmer. *Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden*. Weinheim: Wiley-VCH, 1990.
- [55] S. P. Collins, R. K. Pope, R. W. Scheetz, R. I. Ray, P. A. Wagner, and B. J. Little. Advantages of Environmental Scanning Electron-Microscopy in Studies of Microorganisms. *Microsc. Res. Tech.*, **25**(5-6): 398–405, 1993.
- [56] A. M. Donald. The use of environmental scanning electron microscopy for imaging wet and insulating materials. *Nature Mater.*, **2**(8):v511–516, 2003.
- [57] A. M. C. Davies and T. Fearn. Back to basics: the principles of principal component analysis. *Spectrosc. Eur.*, **16**(6): 20–23, 2004.
- [58] A. M. C. Davies. Back to basics: applications of principal component analysis. *Spectrosc. Eur.*, **17**(2): 30–31, 2005.
- [59] R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, M. Valcárel, and H. M. Widmer, editors. *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*. WILEY-VCH: Weinheim, 2. edition, 2004.
- [60] H. S. Kim and S. B. Cho. An efficient genetic algorithm with less fitness evaluation by clustering. *Proceedings of the 2001 Congress on Evolutionary Computation*, **1/2**: 887–894, 2001.
- [61] M. Haun. *Simulation Neuronaler Netze: Eine praxisorientierte Einführung*. Expert-Verlag, Renningen, 1998.
- [62] A. Zell. *Simulation neuronaler Netze*. Oldenbourg, München, 1997.
- [63] T. Udelhoven, D. Naumann, and J. Schmitt. Development of a hierarchical classification system with artificial neural networks and FT-IR spectra for the identification of bacteria. *Appl. Spectrosc.*, **54**(10): 1471–1479, 2000.
- [64] P. C. Lee and D. Meisel. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.*, **86**: 3391–3395, 1982.
- [65] L. V. Kovaleva, E. V. Zakharova, Y. V. Minkina, G. V. Timofeeva, and I. M. Andreev. Germination and in vitro growth of petunia male gametophyte are affected by exogenous hormones and involve the changes in the endogenous hormone level. *Russ. J. Plant Physiol.*, **52**(4): 521–526, 2005.

- [66] H. J. Zi, Y. Xiang, M. Li, T. Wang, and H. Y. Ren. Reversible protein tyrosine phosphorylation affects pollen germination and pollen tube growth via the actin cytoskeleton. *Protoplasma*, **230**(3-4):183–191, 2007.
- [67] C. S. Pappas, P. A. Tarantilis, P. C. Harizanis, and M. G. Polissiou. New Method for Pollen Identification by FT-IR Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.*, **57**(1):23–27, 2003.
- [68] O. Ronneberger, E. Schultz, and H. Burkhardt. Automated pollen recognition using 3D volume images from fluorescence microscopy. *Aerobiologia*, **18**:107–115, 2002.
- [69] A. Sengupta, M. L. Laucks, and J. E. Davis. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Bacteria and Pollen. *Appl. Spectrosc.*, **59**(8):1016–1023, 2005.
- [70] E. Gottardini, S. Rossi, F. Cristofolini, and L. Benedetti. Use of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy as a tool for pollen identification. *Aerobiologia*, **23**(3):211–219, 2007.
- [71] M. Manoharan, E. Ghiamati, K. A. Britton, W. H. Nelson, and J. F. Sperry. Resonance Raman Spectra of Aqueous Pollen Suspensions with 222.5-242.4 nm Pulsed Laser Excitation. *Appl. Spectrosc.*, **45**(2):307–311, 1991.
- [72] N. P. Ivleva, R. Niessner, and U. Panne. Characterization and discrimination of pollen by Raman microscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**:261–267, 2005.
- [73] A. R. Hemsley, P. J. Barrie, W. G. Chaloner, and A. C. Scott. The Composition of Sporopollenin and Its Use in Living and Fossil Plant Systematics. *Grana*, pages 2–11, 1993. Suppl. 1.
- [74] A. R. Boyain-Goitia, D. C. S. Beddows, B. C. Griffiths, and H. H. Telle. Single-pollen analysis by laser-induced breakdown spectroscopy and Raman microscopy. *Appl. Opt.*, **42**(30):6119–6132, 2003.
- [75] W. F. Wolkers and F. A. Hoekstra. Heat stability of proteins in desiccation-tolerant cattail (*Typha latifolia* L) pollen - A Fourier transform infrared spectroscopic study. *Comp. Biochem. Physiol. A*, **117**(3):349–355, 1997.
- [76] W. F. Wolkers and F. A. Hoekstra. Aging of Dry Desiccation-Tolerant Pollen Does Not Affect Protein Secondary Structure. *Plant Physiol.*, **109**:907–915, 1995.
- [77] D. Vanbilsen, F. A. Hoekstra, L. M. Crowe, and J. H. Crowe. Altered Phase-Behavior in Membranes of Aging Dry Pollen May Cause Imbibitional Leakage. *Plant Physiol.*, **104**(4):1193–1199, 1994.

- [78] D. Yeloff and C. Hunt. Fluorescence microscopy of pollen and spores: a tool for investigating environmental change. *Rev. Palaeobot. Palyno.*, **133**(3-4): 203–219, 2005.
- [79] C. J. Keijzer. The process of anther dehiscence and pollen dispersal. *New. Phytol.*, **105**: 449–507, 1987.
- [80] J. H. Crowe, F. A. Hoekstra, L. H. Crowe, T. J. Anchordoguy, and E. Drobnis. Lipid Phase-Transitions Measured in Intact-Cells with Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy. *Cryobiology*, **26**(1): 76–84, 1989.
- [81] S. Sowa, K. F. Connor, and L. E. Towill. Temperature-Changes in Lipid and Protein-Structure Measured by Fourier-Transform Infrared Spectrophotometry in Intact Pollen Grains. *Plant Sci.*, **78**(1): 1–9, 1991.
- [82] M. Hofrichter and A. Steinbüchel. Sporopollenin. In *Biopolymers*. Wiley VCH, Weinheim, 2001.
- [83] C. Krafft, G. Steiner, C. Beleites, and R. Salzer. Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy. *J. Biophotonics*, **2**(1-2): 13–28, 2009.
- [84] S. Sufra, G. Dellepiane, G. Masetti, and G. Zerbi. Resonance Raman-Spectrum of Beta-Carotene. *J. Raman Spectrosc.*, **6**(6): 267–272, 1977.
- [85] J. H. Williams, W. J. Boecklen, and D. J. Howard. Reproductive processes in two oak (*Quercus*) contact zones with different levels of hybridization. *Heredity*, **87**: 680–690, 2001.
- [86] C. Kirschner, K. Maquelin, P. Pina, N. A. N. Thi, L. P. Choo-Smith, G. D. Sockalignum, D. Sandt, D. Ami, F. Orsini, S. M. Doglia, P. Allonde, M. Mainfait, G. J. Puppels, and D. Naumann. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J. Clin. Microbiol.*, **39**(5): 1763–1770, 2001.
- [87] K. Maquelin, C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. van den Braak, H. P. Endtz, D. Naumann, and G. Puppels. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J. Microbiol. Methods*, **51**(3): 255–271, 2002.
- [88] R. Henrion and G. Henrion. *Multivariate Datenanalyse*. Springer: Heidelberg, 1995.
- [89] P. J. Lisboa and A. F. G. Taktak. The use of artificial neural networks in decision support in cancer: A systematic review. *Neural Networks*, **19**: 408–415, 2006.
- [90] K. Chau. A review on the integration of artificial intelligence into water quality modelling. *Mar. Pollut. Bull.*, **52**: 726–733, 2006.

- [91] M. Veronelli, M. Zerbi, and R. Stradi. In situ resonance raman spectra of carotenoids in bird's feathers. *J. Raman Spectrosc.*, **26**: 683–692, 1995.
- [92] A.V. Rao and S. Agarwal. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutr. Res.*, **19**(2): 305–323, 1999.
- [93] <http://www.greenfacts.org/glossary/mno/neuron.htm>.
- [94] K. Hesterberg. *Raman-spektrsokopische Untersuchungen zu den Veränderungen des Gehalts an Carotinoiden im Produktlebenszyklus von Eiern von der landwirtschaftlichen Produktion bis um Verzehr*. PhD thesis, TU Berlin (Prozesswissenschaften), Berlin, 2006.
- [95] G. Masson, R. Baumes, J. L. Puech, and A. Razungles. Demonstration of the presence of carotenoids in wood: Quantitative study of cooperage oak. *J. Agric. Food Chem.*, **45**(5): 1649–1652, 1997.
- [96] A. K. Prah, H. Springstube, K. Grumbach, and R. Wiermann. Studies on Sporopollenin Biosynthesis - the Effect of Inhibitors of Carotenoid Biosynthesis on Sporopollenin Accumulation. *Z. Naturforsch. C*, **40**(9-10): 621–626, 1985.
- [97] E. Bako, J. Deli, and G. Toth. HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **53**(1-3): 241–250, 2002.
- [98] P. Karrer and A. Oswald. Carotenoids from pollen sacs of *Lilium tigrinum*. A new carotenoid : Antheraxanthene. *Helv. Chim. Acta*, **18**: 1303–1305, 1935.
- [99] H. Schulz, M. Baranska, and R. Baranski. Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. *Biopolymers*, **77**(4): 212–221, 2005.
- [100] K. H. Grumbach. Effect of Phytochrome on the Biosynthesis of Acyclic and Cyclic Carotenoids in Higher-Plants. *Photochem. Photobiol.*, **38**(6): 717–721, 1983.
- [101] H. Kano and H. O. Hamaguchi. Vibrational imaging of a single pollen grain by ultrabroadband multiplex coherent anti-stokes Raman scattering microspectroscopy. *Chem. Lett.*, **35**(10): 1124–1125, 2006.
- [102] M. H. Dauradelevagueresse and M. Bounias. Separation, Quantification, Spectral Properties and Stability of Photosynthetic Pigments on Cn-Coated HPTLC Plates. *Chromatographia*, **31**(1-2): 5–10, 1991.
- [103] R. T. Evans, B. Fried, and J. Sherma. Effects of diet and larval trematode parasitism on lutein and beta-carotene concentrations in planorbid

- snails as determined by quantitative high performance reversed phase thin layer chromatography. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **137**(2):179–186, 2004.
- [104] P. G. de Pinho, A. C. S. Ferreira, M. M. Pinto, J. G. Benitez, and T. A. Hogg. Determination of carotenoid profiles in grapes, musts, and fortified wines from douro varieties of *Vitis vinifera*. *J. Agric. Food Chem.*, **49**(11): 5484–5488, 2001.
- [105] H. Okamoto, Y. Sekimoto, and M. Tasumi. Assignment and Anharmonicity Analysis of Overtone and Combination Bands Observed in the Resonance Raman-Spectra of Carotenoids. *Spectrochim. Acta A*, **50**(8-9): 1467–1473, 1994.
- [106] L. Rimai, M. E. Heyde, and D. Gill. Vibrational-Spectra of Some Carotenoids and Related Linear Polyenes - Raman Spectroscopic Study. *J. Am. Chem. Soc.*, **95**(14): 4493–4501, 1973.
- [107] J. C. Merlin. Resonance Raman Analysis of Astaxanthin - Protein Complexes. *J. Raman Spectrosc.*, **18**(7): 519–523, 1987.
- [108] S. Saito, M. Tasumi, and C. H. Eugster. Resonance Raman-Spectra ($5800\text{--}40\text{ cm}^{-1}$) of All-Trans and 15-Cis Isomers of Beta-Carotene in the Solid-State and in Solution - Measurements with Various Laser Lines from Ultraviolet to Red. *J. Raman Spectrosc.*, **14**(5): 299–309, 1983.
- [109] B. Szalontai, C. Bagyinka, and L. I. Horvath. Changes in Raman-Spectrum of Frog Sciatic-Nerve During Action Potential Propagation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**(3): 660–665, 1977.
- [110] B. Schoefs. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends Food Sci. Techn.*, **13**(11): 361–371, 2002.
- [111] L. Zechmeister and R. M. Lemmon. Contribution to the stereochemistry of cryptoxanthin and zeaxanthin. *J. Am. Chem. Soc.*, **66**: 317–322, 1944.
- [112] A. Polgar and L. Zechmeister. A spectroscopic study in the stereoisomeric capsanthin set - cis-peak effect and configuration. *J. Am. Chem. So.*, **66**: 186–190, 1944.
- [113] L. Zechmeister and A. Polgar. Cis-trans Isomerization and spectral characteristics of carotenoids and some related compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **65**: 1522–1528, 1943.
- [114] L. Zechmeister and P. Tuzson. Isomerization of carotenoids. *Biochem. J.*, **32**: 1305–1311, 1938.

- [115] L. Zechmeister, A. L. LeRosen, W. A. Schroeder, A. Polgar, and L. Pauling. Spectral characteristics and configuration of some stereoisomeric carotenoids including prolycopene and pro-gamma-carotene. *J. Am. Chem. Soc.*, **65**: 1940–1951, 1943.
- [116] L. Zechmeister and A. Polgar. Cis-trans isomerization and cis-peak effect in the alpha-carotene set and in some other stereoisomeric sets. *J. Am. Chem. Soc.*, **66**: 137–144, 1944.
- [117] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander, editors. *Carotenoids - Spectroscopy*, volume 1B. Birkhäuser Verlag, 1995.
- [118] N. J. Everall, J. M. Chalmers, and I. D. Newton. In situ Identification of Thin-Layer Chromatography Fractions by FT Raman-Spectroscopy. *Applied Spectrosc.*, **46**(4): 597–601, 1992.
- [119] A. Rau. Basic Experiments in Thin-Layer Chromatography Fourier-Transform Raman-Spectrometry. *J. Raman Spectrosc.*, **24**(4): 251–254, 1993.
- [120] K. Istvan, G. Keresztury, and A. Szep. Normal Raman and surface enhanced Raman spectroscopic experiments with thin layer chromatography spots of essential amino acids using different laser excitation sources. *Spectrochim. Acta A*, **59**(8): 1709–1723, 2003.
- [121] I. W. Bailey. Some useful techniques in the study and interpretation of pollen morphology. *J. Arnold Arboretum*, **41**: 141–148, 1960.
- [122] G. Shaw and A. Yeadon. Chemical Studies on the Constitution of Some Pollen and Spore Membranes. *J. Chem. Soc. (C)*, pages 16–22, 1966.
- [123] F. Zetzsche and H. Vicari. Examinations on the membrane of spores and pollen II. Lycopodium clavatum. *Helv. Chim. Acta*, **14**: 58–78, 1931.
- [124] F. Zetzsche, P. Kalt, J. Liechti, and E. Ziegler. The constitution of Lycopodium spores, tasmanins, and long spores XI Note on the membrane of spores and pollen. *J. Prakt. Chem.*, **148**(9/10): 267–286., 1937.
- [125] J. Brooks and G. Shaw. Chemical Structure of the Exine of Pollen Walls and a New Function for Carotenoids in Nature. *Nature*, **219**: 532–533, 1968.
- [126] S. Wilmesmeier, S. Steuernagel, and R. Wiermann. Comparative FTIR and C-13 CP/MAS NMR-Spectroscopy Spectroscopic Investigations on Sporopollenin of Different Systematic Origins. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, **48**(9-10): 697–701, 1993.
- [127] F. Ahlers, H. Bubert, S. Steuernagel, and R. Wiermann. The Nature of Oxygen in Sporopollenin from the Pollen of Typha angustifolia L. *Z. Naturforsch. C*, **55**: 129–136, 2000.

- [128] M. Kawase and M. Takahashi. Chemical-Composition of Sporopollenin in Magnolia-Grandiflora (Magnoliaceae) and Hibiscus-Syriacus (Malvaceae). *Grana*, **34**(4): 242–245, 1995.
- [129] S. Gubatz, M. Rittscher, A. Meuter, A. Nagler, and R. Wiermann. Tracer Experiments on Sporopollenin Biosynthesis - an Overview. *Grana*, pages 12–17, 1993. Suppl. 1.
- [130] P. F. Vanbergen, M. E. Collinson, and J. W. Deleeuw. Chemical-Composition and Ultrastructure of Fossil and Extant Salvinialean Microspore Massulae and Megaspores. *Grana*, pages 18–30, 1993. Suppl. 1.
- [131] C. Niester-Nyveld, A. Hambrich, H. Kampendonk, S. Gubatz, K. B. Tentrye, M. Rittscher, S. Wilmesmeier, and R. Wiermann. Immunocytochemical localization of phenolic compounds in pollen walls using antibodies against p-coumaric acid coupled to bovine serum albumin. *Protoplasma*, **197**(3-4): 148–159, 1997.
- [132] S. E. M. Moore, A. R. Hemsley, A. N. French, E. Dudley, and R. P. Newton. New insights from MALDI-ToF MS, NMR, and GC-MS: mass spectrometry techniques applied to palynology. *Protoplasma*, **228**(1-3): 151–157, 2006.
- [133] H. Bubert, J. Lambert, S. Steuernagel, F. Ahlers, and R. Wiermann. Continuous Decomposition of Sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L. by Acidic Methanolysis. *Z. Naturforsch. C*, **57**: 1035–1041, 2002.
- [134] F. Ahlers, I. Thom, J. Lambert, R. Kuckuk, and R. Wiermann. H-1 NMR analysis of sporopollenin from *Typha angustifolia*. *Phytochemistry*, **50**(6): 1095–1098, 1999.
- [135] A. R. Hemsley, P. J. Barrie, and A. C. Scott. C-13 Solid-State NMR-Spectroscopy of Fossil Sporopollenins - Variation in Composition Independent of Diagenesis. *Fuel*, **74**(7): 1009–1012, 1995.
- [136] A. R. Hemsley and A. C. Scott. Studies of fossil and modern spore wall biomacromolecules using C-13 solid state NMR. *Ann. Bot.*, **78**(1): 83–94, 1996.
- [137] W. J. Guilford, D. M. Schneider, J. Labovitz, and S. J. Opella. High-Resolution Solid-State C-13 NMR-Spectroscopy of Sporopollenins from Different Plant Taxa. *Plant Physiol.*, **86**(1): 134–136, 1988.
- [138] A. Pomes. Allergen structures and biologic functions: The cutting edge of allergy research. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **8**(5): 425–432, 2008.
- [139] C. Radauer and H. Breiteneder. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **121**(4): 847–852, 2008.

- [140] H. Schulz and M. Baranska. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.*, **43**(1): 13–25, 2007.
- [141] M. N. Siamwiza, R. C. Lord, M. C. Chen, T. Takamatsu, I. Harada, H. Matsuura, and T. Shimanouchi. Interpretation of Doublet at 850 and 830 cm^{-1} in Raman-Spectra of Tyrosyl Residues in Proteins and Certain Model Compounds. *Biochem.*, **14**: 4870–4876, 1975.
- [142] A. M. Macdonald and A. S. Vaughan. Numerical simulations of confocal Raman spectroscopic depth profiles of materials: a photon scattering approach. *J. Raman Spectrosc.*, **38**(5): 584–592, 2007.
- [143] F. S. Parker. *Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*. Plenum press, New York, 1983.
- [144] H. G. M. Edwards, D. W. Farwell, and A. C. Williams. FT-Raman Spectrum of Cotton - a Polymeric Biomolecular Analysis. *Spectrochim. Acta, Part A*, **50**(4): 807–811, 1994.
- [145] G. Socrates, editor. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, volume 3. Wiley & Sons, 2004.
- [146] S. O. Kim, W. J. Shin, H. Cho, B. C. Kim, and I. J. Chung. Rheological investigation on the anisotropic phase of cellulose-MMNO/H₂O solution system. *Polym.*, **40**(23): 6443–6450, 1999.
- [147] M. A. Fox. *Organische Chemie*. Spektrum: Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994.
- [148] A. Mauerer and G. Lee. Changes in the amide I FT-IR bands of poly-L-lysine on spray-drying from alpha-helix, beta-sheet or random coil conformations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **62**(2): 136–142, 2006.
- [149] I. Kilpelainen, H. Xie, A. King, M. Granstrom, S. Heikkinen, and D. S. Argyropoulos. Dissolution of wood in ionic liquids. *J. Agricult. Food Chem.*, **55**(22): 9142–9148, 2007.
- [150] E. Dominguez, J. A. Mercado, M. A. Quesado, and A. Heredia. Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation. *Sex. Plant Reprod.*, **12**(3): 171–178, 1999.
- [151] A. Karrasch, C. Jaeger, M. Karakawa, F. Nakatsubo, A. Pottkast, and T. Rosenau. Solid-state NMR studies of methyl celluloses. Part 1: regioselectively substituted celluloses as standards for establishing an NMR data basis. *Cellulose*, **16**(1): 129–137, 2009.
- [152] K. E. Espelie, F. A. Loewus, R. J. Pugmire, W. R. Woollenden, B. G. Baldi, and P. H. Given. Structural-Analysis of Lilium-Longiflorum Sporopollenin by C-13 NMR-Spectroscopy. *Phytochemistry*, **28**(3): 751–753, 1989.

- [153] D. A. Priestley and B. Dekruiff. Phospholipid Motional Characteristics in a Dry Biological System - a P-31-Nuclear Magnetic-Resonance Study of Hydrating Typha-Latifolia Pollen. *Plant Physiol.*, **70**(4): 1075–1078, 1982.
- [154] P. R. Cullis and B. Dekruiff. Lipid Polymorphism and the Functional Roles of Lipids in Biological-Membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **559**(4): 399–420, 1979.
- [155] H. S. Gutowsky, D. W. McCall, and C. P. Slichter. Nuclear Magnetic Resonance Multiplets in Liquids. *J. Chem. Phys.*, **21**(2): 279–292, 1953.
- [156] P. Piffanelli, J. Ross, and D. Murphy. Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. *Sex. Plant Reprod.*, **11**(2): 65–80, 1998.
- [157] B. Giese and D. McNaughton. Surface-Enhanced Raman Spectroscopic and Density Functional Theory Study of Adenine Adsorption to Silver Surfaces. *J. Phys. Chem. B*, **106**(1): 101–112, 2002.
- [158] C. Otto, F. F. M. DeMul, A. Huizinga, and J. Greve. Surface enhanced Raman scattering of derivatives of adenine: the importance of the external amino group in adenine for surface binding. *J. Phys. Chem.*, **92**(5): 1239–1244, 1988.
- [159] W. Bolboaca, W. Kiefer, and J. Popp. Fourier transform Raman and surface-enhanced Raman spectroscopy of some quinoline derivatives. *J. Raman. Spectrosc.*, **33**(3): 207–212, 2002.
- [160] S. Stewart and P. M. Fredericks. Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. *Spectrochim. Acta A*, **55**(7-8): 1641–1660, 1999.
- [161] R. Aroca and R. Bujalski. Surface enhanced vibrational spectra of thymine. *Vib. Spectrosc.*, **19**(1): 11–21, 1999.
- [162] Y. Zheng, P. C. Carey, and B. A. Palfey. Raman spectrum of fully reduced flavin. *J. Raman Spectrosc.*, **2004**(7): 521–524, 35.
- [163] K. Sokolov, P. Khodorchenko, A. Petukhov, I. Nabiev, G. Chumanov, and T. M. Cotton. Contributions of Short-Range and Classical Electromagnetic Mechanisms to Surface-Enhanced Raman Scattering from Several Types of Biomolecules Adsorbed on Cold-Deposited Island Films. *Appl. Spectrosc.*, **47**(4): 515–522, 1993.
- [164] Z. Jurasekova, J. V. Garcia-Ramos, C. Domingo, and S. Sanchez-Cortes. Surface-enhanced Raman scattering of flavonoids. *J. Raman Spectrosc.*, **37**(11): 1239–1241, 2006.
- [165] P. F. Van Bergen, M. E. Collinson, and J. W. de Leeuw. Chemical composition and ultrastructure of fossil and extant salvinialean microspore massulae and megasporae. *Grana*, **32**: 18–30, 1993.

- [166] R. J. Weesie, J. C. Merlin, J. Lugtenburg, G. Britton, F. J. H. M. Jansen, and J. P. Cornard. Semiempirical and Raman spectroscopic studies of carotenoids. *Biospectroscopy*, **5**: 19–33, 1999.
- [167] J. Bukowska and K. Jackowska. Adsorption and oligomerization of indole molecules at Ag electrode as studied by SERS spectroscopy. *J. Electroana. Chem.*, **322**(1-2): 347–356, 1992.
- [168] U. Abbasoglu, B. Sener, Y. Günay, and H. Temizer. Antimicrobial Activity of Some Isoquinoline Alkaloids. *Arch. Pharm.*, **324**(6): 379–380, 1991.
- [169] J. Quetin-Leclercq, A. Favel, G. Balansard, P. Regli, and L. Angenot. Screening for in vitro Antifungal Activities of some Indole Alkaloids. *Planta Medica*, **61**: 475–477, 1995.
- [170] A. Sengupta, N. Brar, and E. J. Davis. Bioaerosol detection and characterization by surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci.*, **309**(1): 36–43, 2007.
- [171] M. Krause, B. Radt, P. Rosch, and J. Popp. The investigation of single bacteria by means of fluorescence staining and Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.*, **38**(4): 369–372, 2007.
- [172] P. Rosch, M. Harz, K. D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, A. Schule, G. Schmauz, M. Lankers, S. Hofer, H. Thiele, H. W. Motzkus, and J. Popp. On-line monitoring and identification of bioaerosols. *Anal. Chem.*, **78**(7): 2163–2170, 2006.
- [173] V. Joseph, F. Schulte, U. Panne, and J. Kneipp. (Manuskript in Vorbereitung).
- [174] M. S. Chauton, T. R. Storseth, and G. Johnsen. High-resolution magic angle spinning H-1 NMR analysis of whole cells of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): Broad range analysis of metabolic composition and nutritional value. *J. Appl. Phycol.*, **15**(6): 533–542, 2003.
- [175] S. C. Lee, J. H. Cho, D. Mietchen, Y. S. Kim, K. S. Hang, C. Lee, D. M. Kang, K. D. Park, B. S. Choi, and C. Cheong. Subcellular in vivo H-1 MR spectroscopy of *Xenopus laevis* oocytes. *Biophys. J.*, **90**(5): 1797–1803, 2006.
- [176] C. Jungfermann, F. Ahlers, M. Grote, S. Gubatz, S. Steuernagel, I. Thom, G. Wetzels, and R. Wiermann. Solution of sporopollenin and reaggregation of a sporopollenin-like material: A new approach in the sporopollenin research. *J. Plant Physiol.*, **151**(5): 513–519, 1997.
- [177] F. Ahlers, J. Lambert, and R. Wiermann. Acetylation and silylation of piperidine solubilized sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L. *Z. Naturforsch., C: Biosci.*, **58**: 11–12, 2003.

- [178] H. Weingaertner. Understanding ionic liquids at the molecular level: Facts, problems, and controversies. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**(4): 654–670, 2008.
- [179] D. A. Fort, R. C. Remsing, R. P. Swatloski, P. Moyna, G. Moyna, and R. D. Rogers. Can ionic liquids dissolve wood? Processing and analysis of lignocellulosic materials with 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem.*, **9**(1): 63–69, 2007.
- [180] R. P. Swatloski, S. K. Spear, J. D. Holbrey, and R. D. Rogers. Dissolution of cellulose with ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**(18): 4974–4975, 2002.
- [181] Y. Q. Pu, N. Jiang, and A. J. Ragauskas. Ionic liquid as a green solvent for lignin. *J. Wood Chem. Technol.*, **27**: 23–33, 2007.
- [182] J. Kiefer, K. Obert, A. Bosmann, T. Seeger, P. Wasserscheid, and A. Leipertz. Quantitative analysis of alpha-D-glucose in an ionic liquid by using infrared spectroscopy. *Chemphyschem*, **9**(9): 1317–1322, 2008.
- [183] T. Rajkumar and G. R. Rao. Characterization of hybrid molecular material prepared by 1-butyl 3-methyl imidazolium bromide and phosphotungstic acid. *Mater. Lett.*, **62**(25): 4134–4136, 2008.
- [184] G. L. Gheradini and P. L. Healey. Dissolution of outer Wall of Pollen Grain during Pollination. *Nature*, **224**: 718–719, 1969.
- [185] A. Lovy-Wheeler, L. Cardenon, J. G. Kunkel, and P. K. Hepler. Differential organelle movement on the actin cytoskeleton in lily pollen tubes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **64**(3): 217–232, 2007.
- [186] J. Derksen, T. Rutten, I. K. Lichtscheidl, A. H. N. Dewin, E. S. Pierson, and G. Rongen. Quantitative-Analysis of the Distribution of Organelles in Tobacco Pollen Tubes - Implications for Exocytosis and Endocytosis. *Protoplasma*, **188**((3-4)): 267–276, 1995.
- [187] N. N. Levina and R. R. Lew. The role of tip-localized mitochondria in hyphal growth. *Fungal Genet. Biol.*, **43**: 65–74, 2006.
- [188] J. Heslopharrison and Y. Heslopharrison. The Growth of the Grass-Pollen Tube. 1.Characteristics of the Polysaccharide Particles (P-Particles) Associated with Apical Growth. *Protoplasma*, **112**(1-2): 71–80, 1982.
- [189] W. G. Rosen, Gawlik S. R., Dashek W. V., and K. A. Siegesmund. Fine Structure and Cytochemistry of Lilium Pollen Tubes. *Am. J. Bot.*, **51**(1): 61–71, 1964.
- [190] L. P. Taylor and P. K. Hepler. Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Phys.*, **48**: 461–491, 1997.

- [191] D. D. Fernando, M. D. Lazzaro, and J. N. Owens. Growth and development of conifer pollen tubes. *Sex Plant Reprod.*, **18**(189):149–162, 2005.
- [192] T. Noguchi. Consumption of lipid granules and formation of vacuoles in the pollen tube of *Tradescantia reflexa*. *Protoplasma*, (**156**):19–28, 1990.
- [193] S. Sowa and K. F. Conor. Biochemical changes during pollen germination measured in vivo by infrared spectroscopy. *Plant Sci.*, **105**:23–30, 1995.
- [194] R. C. Frankis. RNA and Protein-Synthesis in Germinating Pine Pollen. *J. Exp. Biol.*, **41**(232):1469–1473, 1990.
- [195] J. L. Brewbake and B. H. Kwack. Essential Role of Calcium Ion in Pollen Germination and Pollen Tube Growth. *Am. J. Bot.*, **50**(9):859–862, 1963.
- [196] Y. S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, T. Ogura, and H. O. Hamaguchi. Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell. *J. Raman Spectrosc.*, **35**(7):525–528, 2004.
- [197] Y. Naito, A. Toh-e, and H. O. Hamaguchi. In vivo time-resolved Raman imaging of a spontaneous death process of a single budding yeast cell. *J. Raman Spectrosc.*, **36**(9):837–839, 2005.
- [198] Y. S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, and H. O. Hamaguchi. Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy. *Biochemistry*, **44**(30):10009–10019, 2005.
- [199] H. Kano and H. O. Hamaguchi. Supercontinuum dynamically visualizes a dividing single cell. *Anal. Chem.*, **79**:8967–8973, 2007.
- [200] L. G. Thygesen, M. M. Lokke, E. Micklander, and S. B. Engelsen. Vibrational microspectroscopy of food. Raman vs. FT-IR. *Trend. Food Sci. Technol.*, **14**(1):50–57, 2003. Times Cited: 22.
- [201] H. Tang, H. Yao, G. Wang, Y. Wang, Y-Q. Li, and M. Teng. NIR Raman spectroscopic investigation of single mitochondria trapped by optical tweezers. *Opt. Express*, **15**(20):12708–12716, 2007.
- [202] V. V. Pully and C. Otto. The intensity of the 1602 cm^{-1} band in human cells is related to mitochondrial activity. *J. Raman Spectrosc.*, **40**(5):473–475, 2009.
- [203] Y. S. Huang, T. Nakatsuka, and H. O. Hamaguchi. Behaviors of the „Raman Spectroscopic Signature of Life“ in single living fission yeast cells under different nutrient, stress, and atmospheric conditions. *Applied Spectrosc.*, **61**(12):1290–1294, 2007.

- [204] S. Santesson, J. Johansson, I. S. Taylor, I. Lavender, S. Fox, M. Sepaniak, and S. Nilsson. Airborne Chemistry Coupled to Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.*, **75**: 2177–2180, 2003.
- [205] M. L. Llaucks, G. Roll, G. Schweiger, and E. J. Davis. Physical and Chemical (Raman) Characterization Of Bioaerosols - Pollen. *J. Aerosol. Sci.*, **31**(3): 307–319, 2000.
- [206] C. Chen, E. A. Hendriks, R. P. W. Duin, J. H. C. Reiber, P. S. Hiemstra, L. A. de Weger, and B. C. Stoel. Feasibility study on automated recognition of allergenic pollen: grass, birch and mugwort. *Aerobiologia*, **22**(4): 275–284, 2006.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau eines Pollenkorns (links), Aufbau der Pollenhülle nach [5]	6
1.2	ESEM-Aufnahme (400× Vergrößerung) von Roggenpollenkörnern	7
1.3	ESEM-Aufnahme (2000× Vergrößerung) eines Roggenpollenkorns	7
2.1	Übersicht der Schwingungsmöglichkeiten eines dreiatomigen Moleküls	12
2.2	Wechselwirkung von Licht mit einem Molekül für den Fall der a) Raman-Streuung, b) IR-Absorption	13
2.3	Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Streuung von Licht an einem Molekül	15
2.4	Beispielhafter Aufbau eines Raman-Spektrometers	17
2.5	Strahlengang des Transmissionsmodus in einem IR-Mikroskop	21
2.6	Schematische Darstellung eines Einzelimpuls-Experiments	23
2.7	Schematische Darstellung eines Kreuzpolarisations-Experiments	23
2.8	Darstellung der Ursprungsmatrix X durch Scores T, Loadings P und spektrale Residuen E	27
2.9	Beispiel für ein vorwärts gerichtetes Netz	30
4.1	FTIR-Spektrum eines einzelnen Pollenkorns angeregt mit Synchrotronstrahlung ($3 \times 3 \mu\text{m}$)	46
4.2	Raman-Spektrum eines einzelnen Pollenkorns (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm^2)	46

4.3	Spektren eines Ambrosiapollenkorns gemessen über einen Zeitraum von 3 Stunden	48
4.4	Mittelwertspektrum (rot) aus 16 Messungen einzelner Ambrosiapollenkörner	48
4.5	Dendrogramm basierend auf 15 Raman-Spektren von Pollenkörnern des Bergahorns (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²), gesammelt an fünf unterschiedlichen Standorten, bezeichnet mit B1 bis B5. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm ⁻¹ , Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards	50
4.6	Raman-Spektren von Pollenkörnern des Fuchsschwanzes, a) nach Lagerung bei Raumtemperatur für fünf Monate, b) direkt nach dem Sammeln (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	51
4.7	Dendrogramm basierend auf 32 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²) von 6 Pollenarten. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm ⁻¹ , Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards	54
4.8	Dendrogramm basierend auf 28 FTIR-Spektren von 6 Pollenspezies. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 900 - 1800 cm ⁻¹ , Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards	54
4.9	Dendrogramm basierend auf 101 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²) von 14 Baumpollenarten. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm ⁻¹ , Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards	55
4.10	Dendrogramm basierend auf 91 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²) von 14 Baumpollenarten. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm ⁻¹ , Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards	55
4.11	Spektren von a/b) Kastanien-, c/d) Sommerlinden- und e/f) Salweidenpollen vor und nach dem Bestrahlen mit 633 nm (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	56
4.12	Raman-Spektren eines Kastanienpollenkorns nach 10, 30, 50 und 70 Minuten (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	56

4.13	Dendrogramm basierend auf 250 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²) von 37 Baumpollenarten und 9 Gräserpollenspezies. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm ⁻¹ , Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards	58
4.14	Dendrogramm basierend auf 205 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²) von 37 Baumpollenarten. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm ⁻¹ , Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards	59
4.15	Dendrogramm basierend auf 45 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²) von 9 Gräserpollenspezies. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm ⁻¹ , Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards	59
4.16	Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²) einzelner Pollenkörner der a) Stieleiche, b) Flatterulme, c) Winterlinde, d) Eberesche, e) Sommerlinde, f) Salweide, g) japanische Kirsche h) Bergahorn, der Bereich von 1530 bis 1700 cm ⁻¹ ist rot umrandet	61
4.17	Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²) einzelner Pollenkörner der a) Rohrglanz, b) Fingerhirse, c) Fuchschwanz, d) Straußgras, e) Weidelgras, f) Honiggras, g) Trespel h) Waldgerste, i) Robinie, der Bereich von 1530 bis 1700 cm ⁻¹ ist rot umrandet	62
4.18	102 Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²) von 9 Baumpollenarten aus den Jahren 2007 und 2008. Es wurde die 1. Ableitung untersucht, Spektralbereich: 380 - 1700 cm ⁻¹ , Distanzmaß: Quadrierte Euklidische Distanzen, Klassifikationsalgorithmus: Wards	63
4.19	Auftragung der Scores der Hauptkomponenten 3, 4, 5 für die Spektren der Eichen-, Ahorn-, Götterbaum-, Spitzwegerich und Vogelkirschenpollenkörner	64
4.20	Loadings der PCA des Jahres 2007, typische Frequenzen der Carotinoide sind rot markiert	65
4.21	Loadings der PCA des Jahres 2008	65

4.22	Verbindungen und Gewichtungen in einem Netz mit zehn verdeckten Schichten unter Anwendung der Fehlerrückführung	68
5.1	Strukturformeln der Carotinoide a) α -Carotin, b) β -Carotin, c) Lutein, d) Zeaxanthin, e) Cryptoxanthin	72
5.2	Raman-Spektren eines Rosskastanienpollenkorns (633 nm, 1 s, 1.9 W/cm ²) zur Bildung eines Differenzspektrums	75
5.3	In-situ erzeugte Differenzspektren von individuellen Salweiden-, Sommerlinden- und Kastanienpollen	75
5.4	Raman-Spektren generiert von einem Pollenkorn der a) Ölweide, b) Robinie, c) Spitzahorn, d) Stieleiche, e) Sommerlinde, f) Platane, g) Traubenkirsche, h) Vogelkirsche, i) Eschenahorn, j) Birke, k) Bergahorn, l) Götterbaum, m) Hopfenbuche, n) Esche, o) Rosskastanie, p) Salweide (785 nm, 10 s, 4.7 W/cm ²)	77
5.5	Raman-Spektrum eines Eschenpollenkorns (488 nm, 1 s, 1.3 W/cm ²)	78
5.6	Densitogramm der HPTLC-Trennung der Referenzcarotinoide Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin und β -Carotin (425 nm)	79
5.7	Densitogramme der HPTLC-Trennungen der Pollenextrakte der a) Sommerlinde, b) Salweide, c) Kastanie, d) Steinweichsel und e) Götterbaum (425 nm)	80
5.8	Auftragung der Retentionsfaktoren der in den Proben gefundenen Carotinoide und der Referenzcarotinoide (Z = Zeaxanthin, L = Lutein, C = Cryptoxanthin, b = beta-Carotin)	81
5.9	Fotografien der HPTLC-Platten nach der Auftrennung der Carotinoidextrakte von Pollen der Arten a) Sommerlinde, b) Salweide, Kastanie und Steinweichsel sowie Mischungen der Referenzcarotinoide	82
5.10	UV/Vis-Spektren der Extrakte der Steinweichsel-, Salweiden- und Rosskastanienpollen ($R_f = 0.94$) sowie β -Carotin	83
5.11	UV/Vis Spektren von Carotinoiden aus dem Extrakt der Kastanienpollen ($R_f=0.09, 0.6, 0.81, 0.91$)	84
5.12	Absorptionsspektren einer Verdünnungsreihe des Zeaxanthins (1/0.8/0.6/0.4/0.2)	84

5.13	Auftragung von Retentionsfaktoren und Absorptionsmaxima der extrahierten Carotinoiden	85
5.14	Raman-Spektren von Zeaxanthin, β -Carotin und Cryptoxanthin (488 nm, 10 s, 1.3 W/cm ² , 1800 gr/mm)	87
5.15	Raman-Spektren der Referenzcarotinoide gelöst in Aceton nach dem Eintrocknen auf einer HPTLC-Platte (488 nm, 1 s, 1.3 W/cm ²)	89
5.16	Raman-Spektren der Referenzcarotinoide nach Auftrennung per HPTLC (488 nm, 1 s, 1.3 W/cm ²)	89
5.17	Raman-Spektren zweier Spots aus dem Kastanienextrakt, Banden der HPTLC-Platte sind rot markiert (785 nm, 10 s, 4.7 W/cm ²)	90
5.18	Raman-Spektren der Carotinoide aus dem Extrakt der Rosskastanienpollen mit den Retentionsfaktoren 0.91, 0.81, 0.6 und 0.09 (488 nm, 10 s, 8.5×10^{-2} W/cm ²)	90
5.19	Mittelwertspektren generiert aus den Raman-Spektren der aufgetrennten Carotinoide	92
5.20	Raman-Spektren der Carotinoide aus dem Extrakt der Sommerlindenpollen ($R_f = 0.95, 0.9, 0.82$) (488 nm, 1 s, 8.5×10^{-2} W/cm ²)	92
5.21	Raman-Spektren der Carotinoide aus dem Extrakt der Steinweichselpollen ($R_f = 1.01, 0.94$) (488 nm, 10 s, 8.5×10^{-2} W/cm ²)	92
5.22	Raman-Spektren der Extrakte der Sommerlinden-, Rosskastanien-, Steinweichsel- und Salweidenpollen mit einem Retentionsfaktor von 0.94 (488 nm, 1 s, 8.5×10^{-2} W/cm ²)	93
5.23	Korrelation der Absorptionsmaxima und der Position der ν_1 -Schwingungen der extrahierten Carotinoide	94
6.1	Darstellung der Intensitätsverteilungen für die angegebenen Peaks in Dünnschnitten á 10 μ m von Roggenpollenkörnern (auf CaF ₂ -Fenstern gemessen, 785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	100
6.2	Hierarchische Clusteranalyse der Raman-Spektren (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²) eines Dünnschnitts von einem Roggenpollenkorn, die Klassen zweier Spektren sind beispielhaft gezeigt	101

6.3	ESEM-Aufnahmen von einem a) unbehandelten Roggenpollenkorn (2000× Vergrößerung), b) mit HF behandelten Roggenpollenkorn (2000× Vergrößerung), c) Roggenpollenkorn nach der Enzymaufreinigung (2000× Vergrößerung), d) Roggenpollenkorn nach Acetolyse (2000× Vergrößerung), e) Roggenpollenkorn nach basischem Aufschluss (1500× Vergrößerung), f) Roggenpollenkorn nach der Behandlung mit MMNO (2000× Vergrößerung) . . .	104
6.4	ESEM-Aufnahmen von Pollenkörnern nach der Behandlung mit a) MMNO (500× Vergrößerung), b) KOH (500× Vergrößerung), c) Schwefelsäure und Essigsäure (400× Vergrößerung)	105
6.5	FTIR-Spektren (links) und deren zweite Ableitung (rechts) von a) unveränderten Roggenpollenkörnern b) dem Wasserextrakt eines Roggenpollenkorns, c) mit HF behandelten Pollenkörnern, d) Pollenkörner gekocht mit Schwefelsäure/Essigsäure, e) dem Rückstand der Wasserextraktion, f) mit MMNO umgesetzten Pollenkörnern, g) mit Enzymen gereinigten Roggenpollenkörner sowie h) Roggenpollenkörnern aus der KOH-Schmelze	107
6.6	Raman-Spektren von a) den unveränderten Roggenpollenkörnern, b) dem Rückstand der Wasserextraktion, c) den mit MMNO umgesetzten Roggenpollenkörnern, d) den mit Enzymen gereinigten Roggenpollenkörnern, e) den mit HF behandelten Roggenpollenkörnern, f) den Roggenpollenkörnern aus der KOH-Schmelze, g) den in Schwefelsäure/Essigsäure gekochten Roggenpollenkörnern (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	110
6.7	Raman-Spektren a) eines unbehandelten Ambrosiapollenkorns, b) eines entlassenen Sporoplasten nach Behandlung mit MMNO, c) von der zurückbleibenden Hülle nach der Behandlung mit MMNO, d) von der Exine nach Erhitzen mit HF, e) wie d nur wurden die Pollen zuvor gemahlen (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	112
6.8	a) offenes Ambrosiapollenkorn nach der Behandlung mit MMNO/Cyclohexylamin (100× Vergrößerung), b) freigesetzter Sporoplast nach der gleichen Behandlung (100× Vergrößerung)	113

6.9	^{13}C -MAS-CP-Spektren der ganzen Roggenpollen (schwarz), der Sporopolleninfraktionen aufgereinigt mit HF (blau), MMNO plus Enzyme (grün) und Schwefelsäure/Essigsäure (rot)	115
6.10	Übersicht über den prozentualen Anteil der chemischen Gruppen im ^{13}C -MAS-SP-Spektrum der enzymaufgereinigten Sporopolleninfraktion	116
6.11	^{31}P -MAS-CP-Spektren der ganzen Roggenpollenkörner (schwarz), der Sporopolleninfraktionen aufgereinigt mit HF (blau), MMNO plus Enzyme (grün) und Schwefelsäure/Essigsäure (rot)	118
6.12	^{19}F -MAS-SP-Spektrum der mit HF umgesetzten Roggenpollenkörner	118
6.13	^{31}P -MAS-SP-NMR-Spektrum (schwarz) und ^{31}P -MAS-CP-NMR-Spektrum (blau) der unbehandelten Pollenkörner im Bereich um 0 ppm	120
6.14	Raman-Spektren von Pollenkörnern der japanischen Kirsche, Esche, Birke, des Honiggrases und Raman-Spektren von Cellulose, Saccharose, Glukose, Fruktose (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	122
6.15	Raman-Spektren von Pollenkörnern der japanischen Kirsche, Esche, Birke, des Honiggrases sowie Raman-Spektren der Galakturon-, Coumarin- und Zimtsäure (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	122
6.16	Raman-Spektren a) eines Ambrosiapollenkorns, b) eines Roggenpollenkorns (785 nm, 10 s, 18 mW); SERS-Spektren des Wasserextrakts der c) Ambrosiapollenkörner d) Roggenpollenkörner (785 nm, 1 s, 1.8 mW)	124
6.17	SERS-Spektren der Wasserextrakte von a) Roggen-, b) Pappel-, c) Birken-, d) Hirse-, e) Ambrosia- und f) Salbei-Pollenkörnern (785 nm, 1 s, 1.8 mW)	125
6.18	^1H -NMR Spektrum der cellulären Fraktion extrahiert aus Roggenpollenkörnern mit Chloroform	127
6.19	Strukturformel von a) 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid b) 1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat	127
6.20	ESEM-Aufnahme (500× Vergrößerung) des reaggregierten Biomaterials der Umsetzung mit TMST	128
6.21	Bildausschnitt (2000× Vergrößerung) aus Abbildung 6.20	128

6.22	FTIR-Spektren von 3600 bis 2600 cm^{-1} (links) und von 1800 bis 900 cm^{-1} (rechts) der a) unbehandelten Roggenpollenkörner, des reaggregierten Biomaterials aus b) 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid und c) 1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat, ‡ kennzeichnet die Schwingungen der ionischen Flüssigkeiten	129
7.1	Aufnahme (10× Vergrößerung) von Salweidenpollenkörnern gekeimt in Saccharose, Borsäure, Kaliumchlorid, Calciumchlorid bei pH-Wert 5.5	133
7.2	Darstellung der Intensitätsverteilungen für die angegebenen Banden in keimenden Eschen- und Salweidenpollenkörnern (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	134
7.3	Raman-Spektren von a) einem ungekeimten Salweidenpollenkorn, b) einem gekeimten Salweidenpollenkorn, c) einem Pollenschlauch der Salweide (Keimlösung 3, 785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	136
7.4	Raman-Spektren von a) einem ungekeimten Eschenpollenkorn, b) einem gekeimten Eschenpollenkorn, c) einem Pollenschlauch der Esche (Keimlösung 3, 785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	136
7.5	Raman-Spektrum eines keimenden Eschenpollenkorns (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	138
7.6	Raman-Spektren von einem Birkenpollenkorn zum Zeitpunkt t = 0 s und t = 16 Stunden (785 nm, 10 s, 1.9 W/cm ²)	138

Tabellenverzeichnis

3.1	Variation des Lösungsmittelsystems für die HPTLC/AMD-Trennung	37
4.1	Zuordnung bedeutender Banden im Spektrum eines Pollenkorns (U = Uracil, C = Cytosin, A = Adenin, G = Guanin, Trp = Tryptophan, Phe = Phenylalanin, Tyr = Tyrosin, Met = Methion)	47
4.2	Übersicht darüber wieviele der Spektren richtig identifiziert wurden (VN = Vektornormierung)	69
5.1	Durchschnittlicher Gehalt der Referenzcarotinoide β -Carotin, Cryptoxanthin, Lutein und Zeaxanthin in den Extrakten der Kastanien-, Salweiden-, Steinweichel- und Sommerlindenpollen bestimmt mit Hilfe der Densitometrie (425 nm)	86
6.1	Überblick der Edukte, Umsetzungen und Produkte der verwendeten Reaktionen zur Isolation der Pollenfraktionen, CHA=Cyclohexylamin	103
6.2	Typische Signalpositionen in ^{13}C -Festkörper-Spektren und deren Zuordnung	113
9.2	Überblick der gemessenen Gräserpollenarten	147
9.3	Überblick der käuflich erworbenen Pollenarten	147
9.4	Analytische Parameter der Probenextrakte	148