

Masteroppgave i kjemi

Analyse av forbindelser av høymolekylær vekt i pollen
ved bruk av termokjemolyse-GC-MS og FT-IR

Mari Halstenrud

November 2016



Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Kjemisk Institutt

Universitetet i Bergen

Sammendrag

Organisk materiale inneholder komplekse polymerer med høy molekylvekt og stor kjemisk stabilitet, som det er vanskelig å analysere med tradisjonelle metoder. Termokjemolyse er en teknikk som kan omdanne de komplekse polymerene slik at egner seg for kromatografiske analyser. Teknikken brukes sammen med gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS) i analysen av biopolymerer i ferskt og fossilt pollen. Biopolymerene inneholder fenolsyrer, slik som *para*-kumarinsyre, og absorberer UV-stråling. Det er formulert en hypotese om at økt UV-B-stråling fører til økt mengde fenolsyrer. Siden de UV-absorberende forbindelsene også er funnet i fossilt pollen, kan dette i så fall brukes til å lage en potensiell modell for UV-B-flux gjennom tidene. Dette kan ha betydning for klimatologer, økologer og evolusjonsbiologer. Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR) er en alternativ metode til termokjemolyse-GC-MS.

Pollenprøvene som er brukt i denne oppgaven stammer fra tre ulike furuarter; hovedsakelig *Pinus sylvestris*, men også *Pinus pinaster* og *Pinus canariensis*. De kommer fra 20 ulike populasjoner som dekker breddegrader fra Nord-Norge til Kanariøyene.

Målene med denne oppgaven er å bruke termokjemolyse-GC-MS til å se på sammenhengen mellom mengde *para*-kumarinsyre og UV-B-eksponering. En tilsvarende undersøkelse er gjennomført ved hjelp av FT-IR, der UV-B-data sammenlignes med (C=C)/(OH)-forholdene fra FT-IR-spektre. Ved hjelp av fullstendige GC-MS-profiler av *Pinus*-pollen er det undersøkt hvilke andre forbindelser som finnes i *Pinus*-pollen, og om noen av disse forbindelsene har en sammenheng med UV-B på samme måte som *para*-kumarinsyre er antatt å ha. Til slutt vil multivariat modellering brukes til å lage modeller som kan predikere UV-B-stråling, både basert på data fra termokjemolyse-GC-MS og FT-IR.

Resultatene fra analysen basert på termokjemolyse-GC-MS avslører en positiv sammenheng mellom *para*-kumarinsyre og UV-B når alle de tre *Pinus*-artene er inkludert. Denne sammenhengen blir minimal dersom bare *Pinus sylvestris* inkluderes. Basert på analysen med FT-IR blir det en negativ sammenheng mellom *para*-kumarinsyre og UV-B. Fullstendige GC-MS-profiler viser at det finnes både aromatiske og fettsyreforbindelser i *Pinus*-pollen, og at toluen og 1-etenyl-4-metoksybenzen har en lignende sammenheng med UV-B som *para*-kumarinsyre har. Multivariat modellering viser at det er mulig å lage modeller som kan predikere UV-B, både basert på termokjemolyse-GC-MS og FT-IR. De beste modellene lages imidlertid basert på data fra FT-IR-analyse, uten at det er stor forskjell.

Forord

To lærerike år på masterstudiet i kjemi er snart omme, og det er mange jeg må takke for god hjelp på veien.

Først og fremst vil jeg takke veilederne mine, Tanja Barth og Alistair Seddon. Takk for en spennende oppgave og god veiledning underveis. Spesielt takk til Alistair som har lært meg opp i py-GC-MS-systemet, og bare vært en telefonsamtale unna når ikke alt har fungert som det skal.

Jeg vil takke Mari Jokerud og Terje Lygre for god hjelp på GC-laben, Linn Krüger for godt selskap under pollenplukking, samt Egil Nodland for god hjelp til FT-IR og programmet Sirius.

I tillegg vil jeg takke Boris Zimmerman som tok meg godt imot på NMBU, og Murat Bagcioglu som var til god hjelp under mitt opphold på Ås.

Jeg vil også takke mine medstudenter for gode diskusjoner og sosialt samvær, og som har gjort studietiden i Bergen til noen minnerike år.

Til slutt vil jeg takke familie, kjæreste og venner for oppmuntrende ord og god støtte gjennom min tid som student.

Mari Halstenrud

Forkortelser

CsvSD	Standardavvik for kryssvalidering
DCM	Diklormetan
EMSC	Utvidet multiplikativ signalkorrigerer
FT-IR	Fourier Transform infrarød spektroskopi
GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi-massespektrometri
MeOH	Metanol
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
PC	Prinsipalkomponent
PCA	Prinsipalkomponentanalyse
<i>p</i> CA	<i>para</i> -kumarinsyre
<i>p</i> -kumarinsyre	<i>para</i> -kumarinsyre
PLS	Delvis minste kvadraters metode
PTGC	Temperaturprogrammert gasskromatografi
PTV	Programmed temperature vaporisator
Py-GC-MS	pyrolyse-gasskromatografi-massespektrometri
R	Korrelasjonskoeffisient
RSD	Relativt standardavvik
SIM	Selected ion monitoring
Spp.	<i>Species pluralis</i>
TAA	Tetraalkylammoniumsalt
TAAH	Tetraalkylammonium hydroksid
TBAH	Tetrabutylammonium hydroksid
THM	Termisk assistert hydrolyse og metylering
TMAH	Tetrametylammonium hydroksid
UV	Ultrafiolett

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	i
Forord	iii
Forkortelser	iv
Innholdsfortegnelse	v
1. Introduksjon	1
1.1 Bakgrunn	1
1.2 Biopolymerer i pollen – sporopollenin	1
1.3 <i>Pinus species pluralis</i> (spp.)	3
1.4 Ultrafiolett stråling (UV-stråling)	3
1.5 Termokjemolyse	4
1.6 Kvantifisering av fenolsyrer	5
1.7 Dataanalyse	5
1.8 Prosjektmål	6
2. Eksperimentell teori	7
2.1 Gasskromatografi (GC)	7
2.2 Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR)	10
2.3 Multivariat analyse	11
2.3.1 Prinsipalkomponentanalyse (PCA)	11
2.3.2 Delvis minste kvadraters metode (PLS)	12
2.3.3 Forbehandling av data	13
2.3.4 Derivasjon	13
2.4 Analyse av pollen	14
2.4.1 Metoden som baserer seg på Blokker <i>et al.</i> (2005)	15
2.4.2 Indre standard	15
2.4.3 Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR) som metode	16
2.4.4 Metoden som baserer seg på Lomax <i>et al.</i> (2008)	16
3. Eksperimentelle metoder	17
3.1 Innsamling av pollenprøve	17
3.2 Tillaging av pollenprøver	19
3.2.1 Tillaging av pollenprøve 1	19
3.2.2 Tillaging av pollenprøve 2	20
3.2.3 Tillaging av pipette	22
3.3 Innsamling av UV-B-data fra tidligere og nåtid	22
3.4 Tillaging av tetrametylammonium hydroksid-blanding (TMAH)	22

3.5 Forbehandling av pollenprøver med TMAH	23
3.6 Tillaging av standard	24
3.7 Informasjon om gasskromatograf og temperaturprogram	25
3.8 Identifisering av komponenter med NIST MS database	25
3.9 FT-IR-analyse	26
3.10 Multivariat analyse	26
4. Resultater	29
4.1 Forbindelser funnet i <i>Pinus</i> spp.	29
4.1.1 Kromatogram av standard.....	29
4.1.2 Kromatogram av pollenprøve	30
4.2 Termokjemolyse-GC-MS som metode.....	31
4.2.1 Reproduserbarhet	31
4.2.2 Kvantifisering av <i>p</i> -kumarinsyre	33
4.2.3 Breddegrad mot <i>p</i> -kumarinsyre	34
4.2.4 Årlig UV-B-dose mot <i>p</i> -kumarinsyre	35
4.2.5 Forbindelsenes korrelasjon med UV-B.....	37
4.2.6 Prinsipalkomponentanalyse (PCA) basert på GC-MS-data.....	38
4.2.7 Delvis minste kvadraters metode (PLS) basert på GC-MS-data.....	40
4.3 FT-IR som metode.....	42
4.3.1 FT-IR-spekter av pollenprøve.....	42
4.3.2 Reproduserbarhet	44
4.3.3 Metoden som baserer seg på Lomax <i>et al.</i> (2008).....	44
4.3.4 Prinsipalkomponentanalyse (PCA) basert på FT-IR-data.....	46
4.3.5 Delvis minste kvadraters metode (PLS) basert på FT-IR-data	47
5. Diskusjon	52
5.1 Kvantifisering av fenolsyrer	52
5.1.1 Kvantifisering basert på termokjemolyse-GC-MS	52
5.1.2 Kvantifisering basert på FT-IR	53
5.2 Andre forbindelser funnet i <i>Pinus</i> spp.-pollen.....	54
5.2.1 Forbindelser funnet i <i>Pinus</i> spp.-pollen	54
5.2.2 Andre forbindelser som kan brukes som <i>para</i> -kumarinsyre.....	55
5.3 Multivariat analyse	57
5.3.1 Prinsipalkomponentanalyse (PCA)	57
5.3.2 Delvis minste kvadraters metode (PLS) basert på termokjemolyse-GC-MS	57
5.3.3 Delvis minste kvadraters metode (PLS) basert på FT-IR	61

5.3.4 Sammenligning av PLS-modeller laget ved termokjemolyse-GC-MS og FT-IR....	63
5.4 Sammenligning av termokjemolyse-GC-MS og FT-IR	64
5.4.1 Termokjemolyse-GC-MS som metode	64
5.4.2 FT-IR som metode	65
6. Konklusjon	66
7. Videre arbeid	67
8. Referanser	68
9. Appendiks	72
A1- Datasett med råarealer fra termokjemolyse-GC-MS	72
A2- Datasett der råarealene er normalisert med hensyn på korrigert toppareal for indre standard, termokjemolyse-GC-MS	74
B- Pilotforsøk	76
C1- Modeller for predikert mot målte UV-B-data basert på GC-MS-data.....	81
C2 - Modeller for predikert mot målte UV-B-data basert på FT-IR-data	85

1. Introduksjon

1.1 Bakgrunn

I både ferskt og fossilt organisk materiale finnes det komponenter med høy molekylvekt. Disse komponentene inneholder komplekse polymerer med delvis ukjente strukturer. På grunn av deres høye molekylvekt og høye kjemiske stabilitet er det vanskelig å analysere komponentene med tradisjonelle metoder. Ved hjelp av termokjemolyse kan de komplekse komponentene bli omdannet slik at de er mottakelige for kromatografiske analyser (Challinor, 2001; Helleur, 2010). Teknikken brukes sammen med gasskromatografi-massespektrometri i analysen av biopolymerer i ferskt og fossilt pollen, og gjennomføres av PARASOL-prosjektet som holder til på biologisk institutt ved Universitetet i Bergen. Biopolymerene inneholder fenolsyrer som absorberer ultrafiolett stråling (UV-stråling), som en del av plantens forsvarsmekanisme mot UV-stråling (Rozema *et al.*, 2001; Blokker *et al.*, 2005). På grunn av dette er det formulert en hypotese om at økt UV-B-stråling fører til økt mengde fenolsyre. Siden disse UV-absorberende fenolsyrene også er funnet i fossilt materiale, kan dette i så fall brukes til å lage en potensiell modell for UV-B-flux gjennom tidene. Et mulig alternativ til termokjemolyse kan være Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR) som gir signaturer av hele den biokjemiske komposisjonen til pollen. FT-IR-spekter av pollen inneholder spesifikke signaler fra lipider, proteiner, karbohydrater, samt biopolymerer som finnes i celleveggen (Zimmerman *et al.*, 2015).

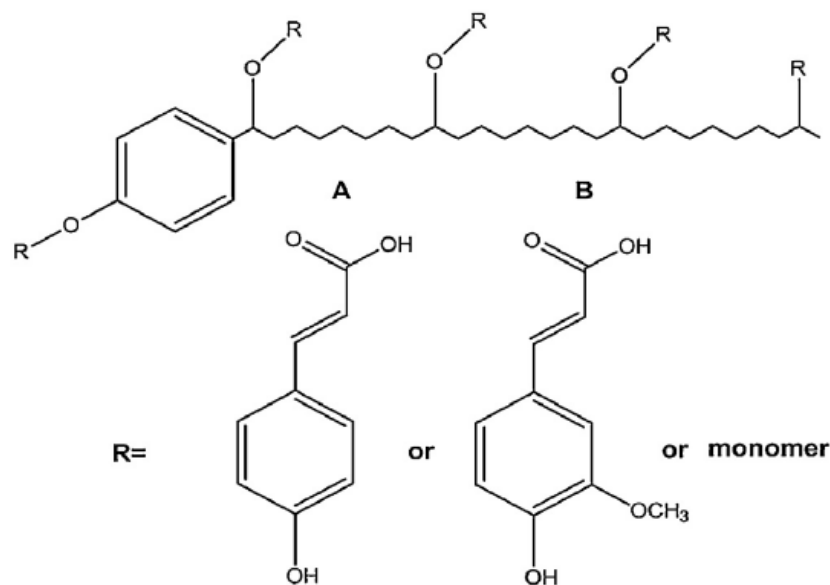
En modell for UV-B-flux gjennom tidene vil være viktig for klimatologer, økologer og evolusjonsbiologer (Willis *et al.*, 2009; Fraser *et al.*, 2014). Dette er på grunn av at det antas at UV-B-strålingen, som har nådd Jordens overflate, har gjennomgått store variasjoner gjennom Jordens historie (Beerling *et al.*, 2007). Som et resultat av dette har UV-B-stråling sannsynlig hatt påvirkning på klima, biodiversitet og økosystemer (Willis *et al.*, 2009).

1.2 Biopolymerer i pollen - sporopollenin

Pollen er en viktig del av livssyklusene til høyere planter, og er en del av de hannlige reproduksjonseenhetene til en plante. Pollenveggene består av et indre og et ytre lag, der det ytre består av biopolymeren sporopollenin (Rozema *et al.*, 2001; Fraser *et al.*, 2011). Sporopollenin er motstandsdyktig mot biokjemisk og fysisk stress, og det er denne delen som sørger for

bevaringen av pollenkornene gjennom fossilisering. Det indre laget er et cellulose-pectin-lag, som ikke blir bevart gjennom fossilisering (Rozema *et al.*, 2001).

Sammensetningen av sporopollenin er ikke fullstendig kartlagt, men ut fra geokjemiske analyser er det funnet ut at det er dannet av fettsyreenheter og enkle fenoler, se figur 1.1 (Watson *et al.*, 2007). Ifølge Bløkker *et al.* (2005) er fenolsyrene methyl 3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate (*para*-kumarinsyre) og (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid (ferulsyre) (figur 1.1) en viktig del av sporopollenin. *para*-kumarinsyre og ferulsyre har i tillegg de kjemiske navnene 4-hydroxykanelsyre og 4-hydroxy-3-methoxykanelsyre og kan plasseres under kanelsyrederivater (de Leeuw *et al.*, 2006). Til sammen danner fenolsyrene og fettsyreenhetene et nettverk av ikke-hydrolyserbare, uløselige biomakromolekyler. Figur 1.1 viser en forenklet kjemisk struktur av sporopollenin, der R kan bindes med en eterbinding (C-O-C), eller med en esterbinding (C-O-CO-C), slik som i de to fenolsyrene *para*-kumarinsyre og ferulsyre.



Figur 1.1: Forenklet kjemisk struktur av sporopollenin. A: *para*-kumarinsyre. B: ferulsyre (al Sandouk-Lincke *et al.*, 2014).

1.3 *Pinus species pluralis* (spp.)

Pollenprøvene som er brukt i denne oppgaven er de samme som ble brukt i Willis *et al.* (2011) og er pollen fra furutrærne *Pinus sylvestris*, *Pinus pinaster* og *Pinus canariensis*. De norske navnene på disse furuartene er henholdsvis furu, strandfuru og kanarifuru. Ifølge Willis *et al.* (2011) er pollen fra *Pinus* spp. godt egnet for å lage et kontinuerlig fossilregister. Grunnene til dette er at gruppen produserer store, særegne pollenkorn (typisk 100 – 200 µm i diameter) og produserer mange pollenkorn. I tillegg er gruppen intolerant til skygge, noe som fører til at trær fra gruppen *Pinus* vanligvis vokser på steder der det er mye sol, og da også UV-B-lys. Pollen fra *Pinus* spp. er vanlig å finne i fossile sekvenser i Europa og Nord-Amerika, og har et kontinuerlig fossilregister som går tilbake 200 millioner år (Willis *et al.*, 2011).

Studien til Willis *et al.* (2011) brukte *Pinus* spp.-pollen til å teste sammenhengen mellom *p*-kumarinsyre og UV-B-stråling langs en breddegradsgradient i Europa, og til å rekonstruere endringer i UV-B-strålingen over de siste 11000 år ved å bruke *Pinus* spp.-pollenkorn som var ekstrahert fra sedimentkjerner som stammet fra Vest-Norge. Metoden som ble brukt er basert på metoden til Blokker *et al.* (2005), og utført i «selected ion monitoring (SIM) mode», der bare utvalgte ioner blir detektert.

1.4 Ultrafiolett stråling (UV-stråling)

UV-B-stråling står for 1,5% av stålingen som kommer fra solen (Willis *et al.*, 2011). Denne stålingen har en direkte innvirkning på fotosyntese og primær planteproduksjon hos planter (Rozema *et al.*, 2001). For å beskytte seg mot ødeleggelse av cytoplasma og organeller har planter en aktiv forsvarsmekanisme mot UV-stråling. En del av denne mekanismen er at fenolsyrene i sporopollenin har evnen til å absorbere UV-stråling. Det er postulert at produksjonen av de absorberende fenolsyrene øker når eksponeringen av UV-B-stråling øker (Rozema *et al.*, 2001; Blokker *et al.*, 2005; Willis *et al.*, 2011).

Det finnes ingen register over målinger av UV-B-stråling gjennom tidene, og de instrumentelle registrene går bare tilbake til 1920-tallet (Willis *et al.*, 2011). Et tema for forskning er å lage en potensiell modell for UV-B-flux ved å kartlegge den biokjemiske responsen som finnes i pollen fra eldre og fra nyere tider (Fraser *et al.*, 2011).

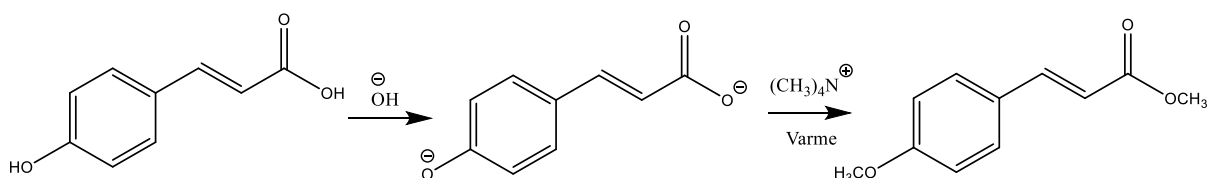
1.5 Termokjemolyse

Pyrolyse er en metode som involverer kontrollert termisk fragmentering av komplekst materiale i fravær av oksygen, utført ved temperaturer fra 400°C til 700°C. Metoden kan utføres på ikke-flyktige organiske forbindelser, eller forbindelser som ikke er mulig å løse. På grunn av dette er pyrolyse egnet for direkte analyse av faste forbindelser med analytiske teknikker som gasskromatografi (GC) og gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS) (Helleur, 2010).

Termokjemolyse er en veletablert *in situ*-teknikk som kan brukes i analysen av mange ulike materialer. Metoden kalles også termisk assistert hydrolyse og metylering (THM), og er en form for analytisk pyrolyse (Helleur, 2010). Challinor (2001) skriver at THM ofte er brukt til kjemisk karakterisering av ulike syntetiske og naturlige materialer, som blant annet inkluderer lipider, voks, jord og sedimenter.

Metoden involverer en hydrolyseprosess ved høy temperatur, der en får hydrolytisk spalting ved eter- og esterbindinger. Dette skjer ved bruk av en sterk basisk reagens, tetraalkylammonium hydroksid (TAAH). Det dannes tetraalkylammoniumsalter (TAA), som videre pyrolyseres til de respektive alkylderivatene (Challinor, 2001). Termokjemolysen fører til dannelsen av mindre polare, alkylerte produkter med lavere molekylvekt som egner seg for kromatografiske analyser (Helleur, 2010). Et vanlig THM-derivatiseringsreagens er tetrametylammonium hydroksid (TMAH) (Challinor, 2001).

Martin *et al.* (1995) har analysert ligniner, isolert fra blant annet furu, ved hjelp av pyrolyse og THM ved bruk av tetrametylammonium hydroksid (TMAH) og tetrabutylammonium hydroksid (TBAH) som derivatiseringsreagenser. Derivatisering vil si å omdanne ikke-flyktige polare eller termisk sensitive forbindelser til mer flyktige derivater (Sobeih *et al.*, 2008). Martin *et al.* (1995) har også foreslått en reaksjonsvei for pyrolytisk butylering av lignineneheter med TBAH. Figur 1.2 viser en tilsvarende reaksjonsvei for *p*-kumarinsyre og TMAH.



Figur 1.2: Forslag til reaksjonsvei for THM av *p*-kumarinsyre og TMAH (tegnet etter Martin *et al.*, 1995).

Reagensene som brukes i termokjemolyse har evnen til å derivatisere de sure funksjonelle gruppene hos analyttene og å reagere i et bredt temperaturområde. I disse reaksjonene dannes det derivatiserte forbindelser som er mer flyktige. Noen reagenser har evnen til å reagere ved høye temperaturer og å bidra til selektiv kløyving av spesifikke bindinger, slik som ester- og eterbindinger. Reagensen tilsettes til en liten mengde prøve uten et krav om forbehandling av prøven eller ekstraksjonssteg (Helleur, 2010).

Termokjemolyse har flere fordeler, inkludert at den er rask, sensitiv, gir høyt utbytte, minimal prøvebehandling, i tillegg til at det er billig (Lee *et al.*, 2012) Det trengs også små mengder av det organiske materialet som skal brukes (Blokker *et al.*, 2005).

1.6 Kvantifisering av fenolsyrer

Kvantifisering av *para*-kumarinsyre og ferulsyre er en stor utfordring ved termokjemolyse-GC-MS. Dette er fordi fenolsyrene er en del av en makromolekylstruktur med stor variasjon i intermolekylære bindinger. Blokker *et al.* (2005) foreslo at forholdet mellom *para*-kumarinsyre og ferulsyre kunne brukes til å identifisere endringer i pollenkjemi. En alternativ metode for kvantifisering av *para*-kumarinsyre er foreslått av Seddon *et al.* (under evaluering), og går ut på å tilsette en kjent mengde indre standard til prøvene før analyse, og så normalisere toppen til *para*-kumarinsyre i forhold til toppen til den indre standarden. Dette er gjort for å gjøre kvantifiseringen av fenolsyrene bedre.

1.7 Dataanalyse

I denne oppgaven behandles store datamengder. Når det kan være over tusen variabler tilgjengelig, slik som i Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR), kan det være vanskelig å få ut viktig informasjon. På grunn av dette er det brukt statistiske metoder for å behandle dataene. Multivariat dataanalyse, eller kjemometri, som det heter når det anvendes på kjemiske data, bruker anvendt matematikk, statistikk og informasjonsvitenskap til å velge optimale prosedyrer for generering av data og for å ekstrahere optimal informasjon fra data (Nortvedt *et al.*, 1996).

1.8 Prosjektmål

Prosedyren som brukes i denne oppgaven ble først utviklet av Blokker *et al.* (2005), og deretter videreutviklet gjennom PARASOL-prosjektet (Seddon *et al.*, under evaluering). I studien til Willis *et al.* (2011) ble det vist en positiv sammenheng mellom *p*-kumarinsyre og UV-B-stråling. Denne oppgaven vil i første omgang undersøke om det går an å reprodusere denne sammenhengen. Siden Willis *et al.* (2011)-studien utførte analysene i SIM-mode, er det ikke undersøkt hvilke andre forbindelser som finnes i *Pinus* spp.-pollen. På grunn av dette vil analysene i denne oppgaven gi fullstendige GC-MS-profiler slik at det går an å undersøke hvilke andre forbindelser, utenom *p*-kumarinsyre, som finnes i *Pinus* spp.-pollen, og om noen av disse forbindelsene har en sammenheng med UV-B, slik som *p*-kumarinsyre er antatt å ha. Det er to ulike teknikker som brukes til pollenanalyse; termokjemolyse-GC-MS og Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR), og så langt er det ingen som har brukt disse metodene i samme studie. I denne oppgaven blir multivariat modellering brukt til å lage modeller for å se om det er mulig å bruke de målte verdiene til å predikere UV-B-stråling. Dette vil bli utført både på profiler som kommer fra termokjemolyse-GC-MS og FT-IR. De to metodene blir sammenlignet for å se om det går an å ekstrahere lignende miljødata fra profilene.

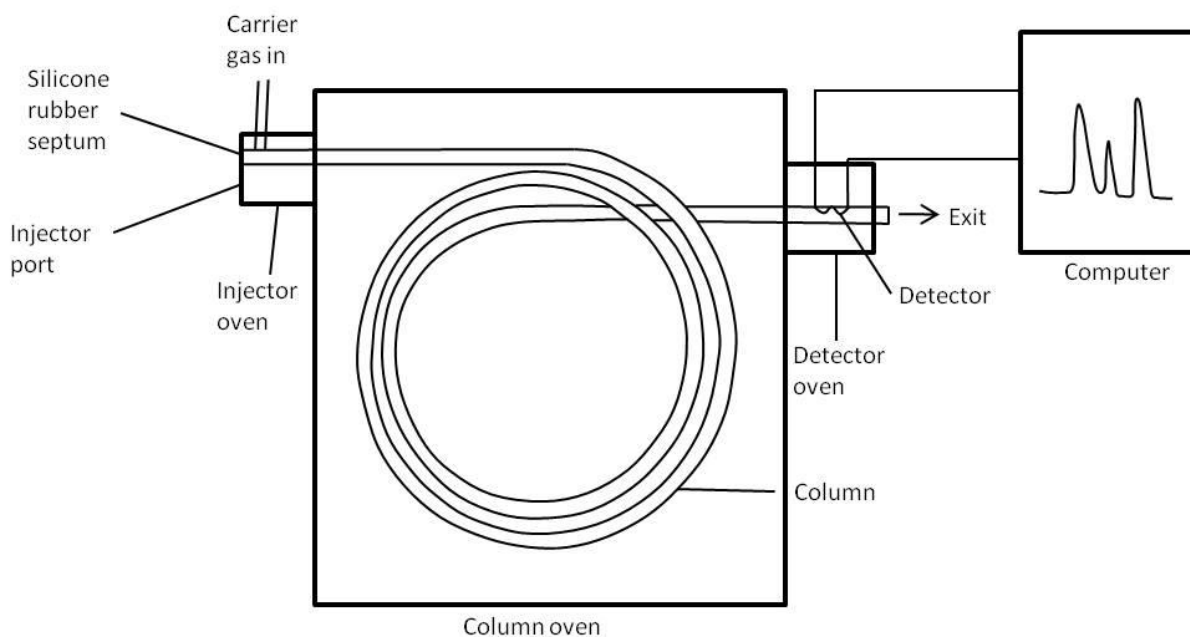
2. Eksperimentell teori

2.1 Gasskromatografi (GC)

Kromatografi er en samlebetegnelse på metoder som separerer komponentene i komplekse blandinger (Miller, 2005). I kromatografi er det to faser, der den ene er stasjonær og den andre er mobil. Den mobile fasen er løsemiddelet som beveger seg gjennom kolonnen, mens den stasjonære fasen sitter på innsiden av kolonnen (Miller, 2005; Harris, 2010).

Når mobilfasen er en gass, kalles det for gasskromatografi (GC). Teknikken utføres som kolonnekromatografi, og stoffene som skal analyseres må være flyktige og stabile ved de temperaturene som benyttes (Greibrokk *et al.*, 1998).

En gasskromatograf kan beskrives med tre hoveddeler; injeksjonsporten, kolonnen og detektoren (figur 2.1).



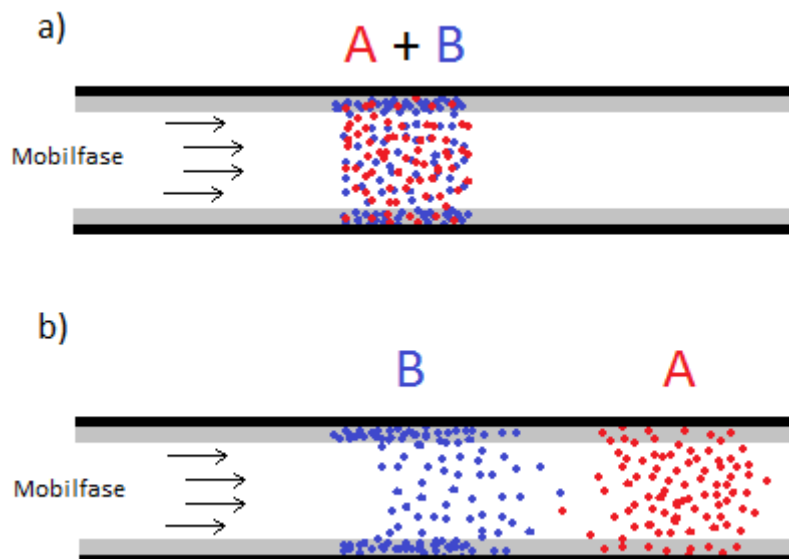
Figur 2.1: Skjematisk diagram av en gasskromatograf (tegnet etter Harris, 2010).

En prøve med flyktig væske eller gass blir injisert gjennom et septum (gummiskive) og inn i et oppvarmet kammer, der den raskt fordampes. Videre vil dampen føres gjennom kolonnen ved hjelp av bæregassen. De vanligste bæregassene er N_2 , He og H_2 , der He brukes i denne oppgaven.

I kolonnen vil komponentene fordele seg mellom mobil- og stasjonærfasen. Hvordan de fordeler seg vil avhenge av de eksperimentelle betingelsene; type mobil- og stasjonærfase,

lengde og diameter på kolonnen, trykk og temperatur, prøvens størrelse med mer (Greibrokk *et al.*, 1998).

På grunnlag av ulik interaksjon til stasjonærfasen vil de ulike komponentene bli holdt tilbake i systemet i ulik grad. Hele tiden vil det være analytter som enten befinner seg i mobilfasen eller i stasjonærfasen. Dette kan kalles en sorpsjon-desorpsjonsprosess, og skjer mange ganger etter hvert som molekylene beveger seg gjennom kolonnen (Miller, 2005). Tiden det tar for hver analytt gjennom kolonnen avhenger av tiden komponentene oppholder seg i stasjonærfasen. For at separasjonen skal skje, må de ulike komponentene komme ut av systemet ved forskjellig tid. Figur 2.2a) viser to ulike analytter (A og B) i kolonnen. Figur 2.2b) viser at analytt B oppholder seg lenger i stasjonærfasen, og altså beveger seg senere enn analytt A.



Figur 2.2: a) Viser to ulike analytter (A og B), b) Viser at analytt B oppholder seg lenger i stasjonærfasen og vil bruke lenger tid enn analytt A.

Kolonnen er plassert i en ovn. Gjennom temperaturprogrammert gasskromatografi (PTGC) blir temperaturen i kolonnen økt underveis i prøvekjøringen. Temperaturøkningen fører til at partisjonskoeffisientene til analyttene minker, og med det beveger seg raskere. Dette fører igjen til lavere retensjonstider (Miller, 2005).

Etter kolonnen er analyttene separert og må gå gjennom en detektor for å bli påvist. I gasskromatografi er et massespektrometer ofte brukt som detektor (GC-MS). Massespektrometri er en sensitiv detektor som gir både kvalitative og kvantitative data (Harris, 2010). Et massespektrometer består av en ionekilde, en masseanalysator og en detektor, alt

under lavt trykk ($10^{-4} - 10^{-8}$ torr). I massespektrometeret vil analyttene bli ionisert, eventuelt fragmentert, for deretter å gå videre til masseanalysatoren der de blir separert på grunnlag av masse-til-ladning-forholdet, m/z . Ut fra den ionestrømmen som dannes og m/z -forholdene lages det et massespekter som er karakteristisk for den originale analytten (Miller, 2005).

I denne oppgaven er det utført pyrolyse-gasskromatografi-massespektrometri (py-GC-MS). Det vil si at prøven som skal analyseres ikke injiseres direkte inn i gasskromatografen, men blir først plassert i en ovn som hurtig varmes opp til temperaturer som fører til termisk dekomponering av analyttene (Miller, 2005). Dette må gjøres fordi pollenkornene inneholder komponenter med høy molekylvekt og høy kjemisk stabilitet, som er vanskelig å analysere uten denne dekomponeringen. Pyrolysedelen kan skje både «offline» eller «online». I denne oppgaven skjer den «online» der en pyrolyseenhet er montert direkte på gasskromatografen. Figur 2.3 viser py-GC-MS-systemet som ble brukt i denne oppgaven.



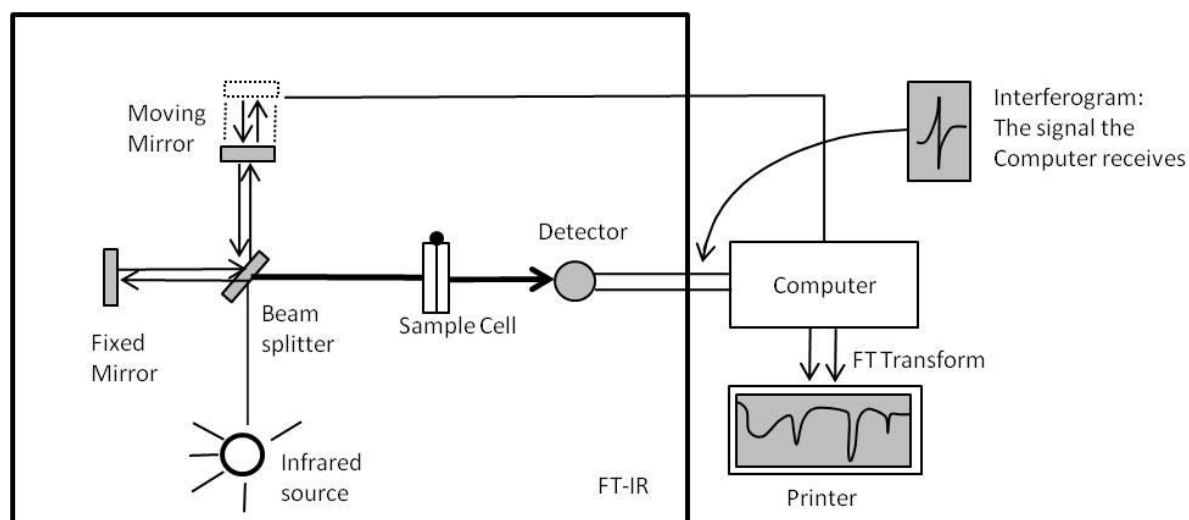
Figur 2.3: Bilde av py-GC-MS-systemet.

2.2 Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR)

Spektroskopi er et verktøy som brukes til å identifisere og å finne strukturell informasjon til både kjente og ukjente molekyler ved hjelp av lys fra det elektromagnetiske spekteret. Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR) bruker lys i det infrarøde området og måler vibrasjons- og rotasjonsenergi i de kjemiske bindingene i et molekyl. I det infrarøde spekteret vil hver topp samsvare med en funksjonell gruppe, og frekvensområdet er vanligvis mellom 4000 og 650 cm^{-1} (Pavia *et al.*, 2015).

I Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR) (figur 2.4) vil hele frekvensområdet i det infrarøde spekteret bli brukt. Lyset deles i to stråler med lik intensitet. Strålene dirigeres slik at den ene strålen får lenger vei enn den andre. Dette fører til både konstruktive og destruktive interferenser, noe som danner et interferogram. Interferogrammet inneholder informasjon om mengden energi som ble absorbert ved hver bølgelengde (Williams og Fleming, 2008; Pavia *et al.*, 2015).

Interferogrammet er et plot av intensitet mot tid, noe som ikke er leselig som et vanlig IR-spekter. For å få et leselig spekter, et plot av intensitet mot frekvens, må interferogrammet Fourier-transformeres. Dette er en matematisk prosess som gjøres av en datamaskin som er innebygget i instrumentet (Williams og Fleming, 2008).



Figur 2.4: Skjematisk diagram av et Fourier transform infrarødt spektrometer (tegnet etter Pavia *et al.*, 2015).

2.3 Multivariat analyse

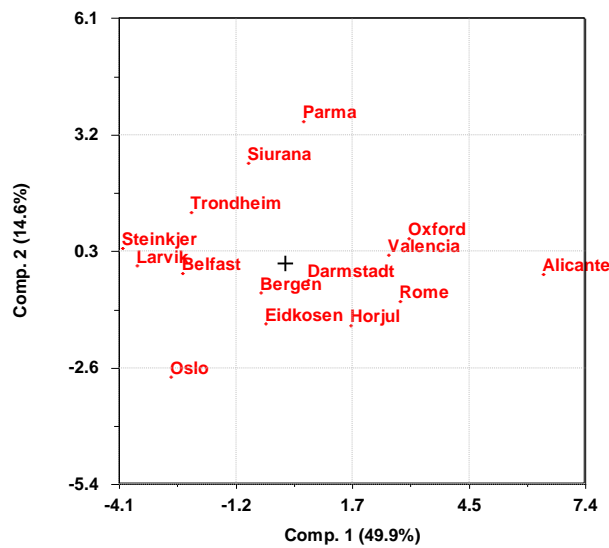
2.3.1 Prinsipalkomponentanalyse (PCA)

Prinsipalkomponentanalyse (PCA) er en matematisk metode som brukes til å redusere flerdimensjonal data til færre faktorer som inneholder en signifikant del av den totale variansen i dataene (Jolliffe, 1986). Ifølge Nortvedt *et al.* (1996) er det i praksis vist at det går an å redusere antall variable fra flere hundre til noen få, avledende variable uten å miste noe vesentlig av informasjonen i datamaterialet.

I et kjemisk datasett med svært mange objekter og variabler er det sannsynlig at mye av den samme informasjonen finnes igjen i flere av variablene. På grunn av dette er det mulig å finne et lite antall underliggende variabler som kan forklare all systematisk informasjon i datasettet. Disse underliggende variablene kan kalles latente variabler og er lineærkombinasjoner av de opprinnelige variablene. I PCA kalles de latente variablene for prinsipalkomponenter (PC-er) (Nortvedt *et al.*, 1996).

Ved å utføre en PCA vil de originale dataene fortsatt være der, men de er rotert slik at PC-ene er de nye aksene (Smith, 2002). Hver PC består av en skårvektor og en ladningsvektor. Skårene er koordinatverdiene for de enkelte prøvene for hver enkelt PC (Nortvedt *et al.*, 1996). Ved å plote de komponentene som har størst varians, vil dette gi en oversikt over prøvene og hvordan de ligger i forhold til hverandre i det reduserte koordinatsystemet. På denne måten kan skårplottet gi informasjon om hvilke prøver som har bidratt mest til variasjonen på de ulike aksene, samt hjelpe til å finne relasjoner, likheter, ulikheter og grupperinger blant prøvene (Nortvedt *et al.*, 1996). Likheter mellom ulike prøver finnes ved å se på avstander og vinkler. Jo mindre avstand og vinkel det er mellom to prøver, jo likere er de hverandre. Vinkler på 0° , 90° og 180° betyr henholdsvis positiv korrelasjon, ingen korrelasjon og negativ korrelasjon mellom to prøver.

Figur 2.5 viser et skårplot fra PCA-analyse av data fra termokjemolyse-GC-MS. Her er det prøvene Alicante og Parma som har bidratt mest til variasjonen på hver sin PC. PCA fungerer på en slik måte at PC 1 vil forklare mest variasjon, PC 2 vil forklare nest mest variasjon, PC 3 vil forklare mest variasjon etter PC 2 osv. I figur 2.5 forklarer PC 1 49,9% av variasjonen og PC 2 14,6% av variasjonen. Siden Alicante har størst utslag på PC 1, er det denne prøven som forklarer mest variasjon blant prøvene.



Figur 2.5: Skårplot fra PCA-analyse av py-GC-MS-data.

Ladningene sier noe om hvordan hver enkelt prinsipalkomponent er relatert til de opprinnelige variablene. Om enkelte prøver har variert mye for noen variable, vil dette gi høye ladningsverdier for disse variablene på komponenten som er i fokus (Nortvedt *et al.*, 1996).

Ved å plote skårene og ladningene i samme plot, gir dette et biplot. Dette plottet viser hvordan objektene er forklart av variablene.

2.3.2 Delvis minste kvadraters metode (PLS)

I to sett med variable X og Y vil en PCA-analyse fokusere på kriteriet om maksimum varians i X. I en delvis minste kvadraters analyse (PLS) er formålet heller å beskrive sammenhengen mellom de to settene (Nortvedt *et al.*, 1996). Til dette formålet er ikke alltid prinsipalkomponentene de ideelle latente variablene. I stedet kan det være lurt å få ut den informasjonen i X som samvarierer mest mulig med informasjonen i Y (Nortvedt *et al.*, 1996). Dette er en måte å dekomponere X-rommet slik at de latente variablene beskriver Y-rommet på best mulig måte.

For å undersøke PLS-modellens prediksjonskvalitet går det an å utføre en ekstern validering. Det vil si å dele det originale datasettet inn i et kalibreringssett og et valideringssett. PLS-modellen bygges på grunnlag av kalibreringssettet, mens valideringssettet blir tilpasset modellen. Valideringssettet fungerer som ukjente prøver, og prediksjonsavvik fra tilpasningen

gir en indikasjon på modellens prediksjonskvalitet. I denne oppgaven er ekstern validering brukt på FT-IR-datasettet.

2.3.3 Forbehandling av data

Data samlet direkte fra de eksperimentelle metodene kalles rådata og kan inneholde støy, grunnlinjedrift, dominante variabler og andre faktorer som kan kamuflere viktig informasjon i datasettet (Nortvedt *et al.*, 1996). Forbehandling av rådataene kan derfor være nødvendig for å fjerne effekter som ikke representerer de egenskapene i datasettet som er av interesse.

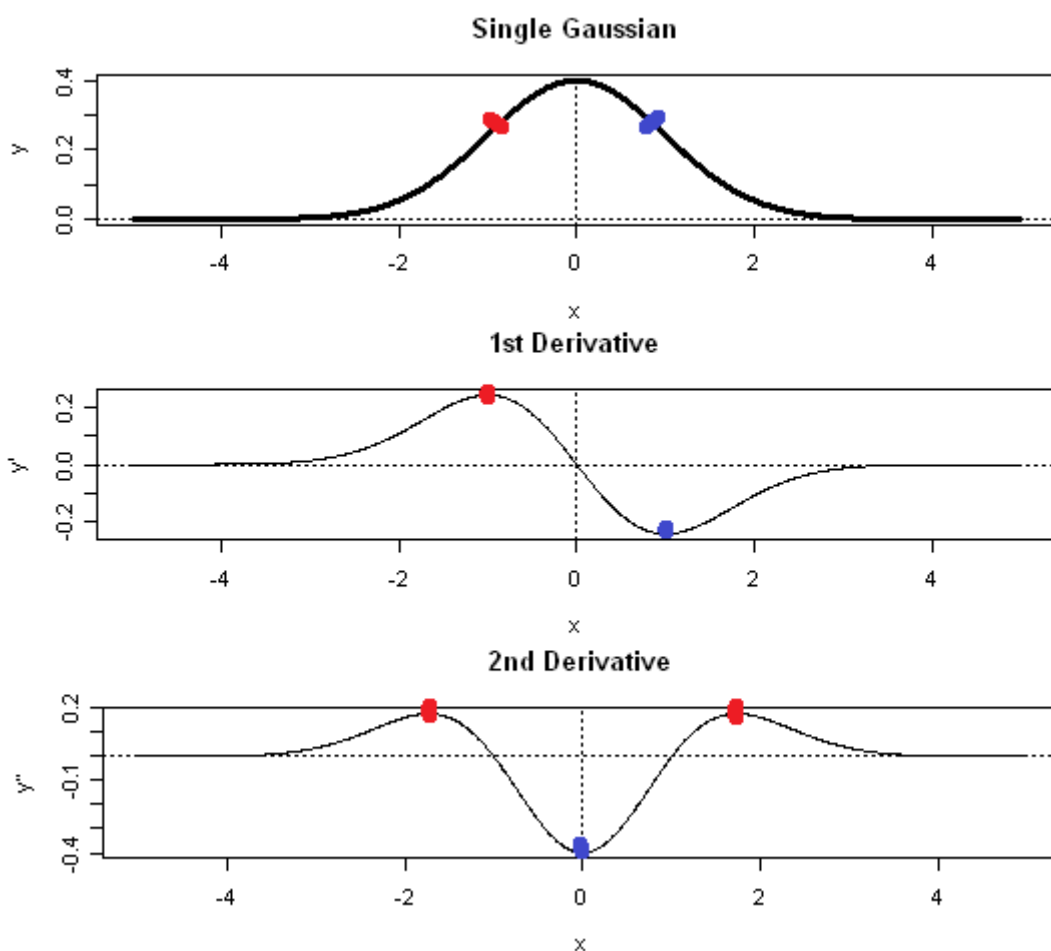
Sentrering av rådataene gjør at det er mulig å observere variasjon mellom objekter uavhengig av deres plassering rundt gjennomsnittet i datasettet. Sentreringen gjøres ved å regne ut gjennomsnittsverdien for hver variabel, for så å subtrahere gjennomsnittsverdien fra de originale verdiene. Dette fører til at senteret til koordinatsystemet settes til senteret av datasettet (Nortvedt *et al.*, 1996).

Standardisering fører til at variablene får lik varians. Dette gjøres ved å dele hver variabel på dens standardavvik.

Dersom det er baselinjeforskjeller mellom prøver i et spektrum, må rådataene korrigeres for dette. Dette er mulig gjennom derivering, og i denne oppgaven er rådataene fra FT-IR-analysene førstegradsderivert.

2.3.4 Derivasjon

Derivasjon er brukt i forbehandlingen av FT-IR-dataene. På bakgrunn av dette kommer en liten innføring i hva derivasjon gjør med dataene. Den deriverte til en funksjon sier noe om hvor bratt kurven stiger og i hvilken retning den går. Kurven stiger om den deriverte er positiv, synker om den er negativ, og verken stiger eller synker om den er 0 (Aarnes, 2014). Figur 2.6 viser hvordan en enkel gausskurve gjøres om når den førstegradsderiveres og andregradsderiveres. Det røde og det blå punktet på gausskurven er henholdsvis den høyeste positive og den høyeste negative stigningen på kurven. Etter en førstegradsderivering vil disse to punktene bli et maksimumspunkt og et minimumspunkt. I tillegg vil toppunktet til gausskurven bli et nullpunkt etter deriveringen. Etter en andregradsderivering vil maksimumspunktet på gausskurven bli et minimumspunkt.



Figur 2.6: Gausskurve med tilhørende førstegradsderivert og andregadsderivert (Glynn, 2007).

2.4 Analyse av pollen

Termokjemolyse-GC-MS og FT-IR er de to analytiske teknikkene som er brukt til å identifisere kjemisk variasjon i sporopollenin. Det er imidlertid viktig å nevne at det ikke bare er sporopollenin som analyseres, men pollenkornet i sin helhet. Det betyr at også andre forbindelser, som ikke nødvendigvis er en bestanddel i sporopollenin, blir funnet i pollenprøvene, som for eksempel lipider, karbohydrater og proteiner.

Metodene som er brukt ved de to teknikkene er beskrevet i delkapitlene 2.4.1 - 2.4.4, der de to første beskriver metoden som er brukt ved termokjemolyse-GC-MS og de to siste beskriver metoden som er brukt ved FT-IR.

2.4.1 Metoden som baserer seg på Blokker *et al.* (2005)

Termokjemolyse sammen med gasskromatografi-massespektroskopi bruker en sterk basereagens, tetrametylammonium hydroksid (TMAH), for å depolymerisere komponentene i sporopollenin, og med det omforme dem til metylestere (Challior, 2001; Blokker *et al.*, 2005). Siden derivatene er kjemisk stabile er det mulig å karakterisere de ulike forbindelsene, samt kvantifisere dem. Absolutt kvantifisering er imidlertid ikke mulig, da fenolsyrene er en del av en makromolekylstruktur med stor variasjon i intermolekylære bindinger (Blokker *et al.*, 2005). I stedet for å bruke de absolutte verdiene fra termokjemolyse-GC-MS-analysen foreslo Blokker *et al.* (2005) at forholdet mellom *p*-kumarinsyre og ferulsyre kunne brukes til å identifisere endringer i pollenkjemi. Dette var på grunn av at de to forbindelsene så ut til å respondere ulikt på UV-B-eksponering. Det å bruke forholdet mellom *p*-kumarinsyre og ferulsyre ga ingen forbedring i resultatene, men forholdet kan fjerne nødvendigheten av å telle et presist antall pollenkorn for hver prøve. Siden det ikke har blitt funnet ferulsyre i *Pinus* spp.-pollen, er en annen metode utviklet av Seddon *et al.* (under evaluering) for å gjøre kvantifiseringen av fenolsyrene bedre. Metoden går ut på å tilsette en kjent mengde indre standard til prøvene før analysen, for så å normalisere toppen fra *p*-kumarinsyre med hensyn på toppen fra den indre standarden.

2.4.2 Indre standard

Metoden ved å tilsette en indre standard er spesielt nyttig der reproduserbarheten fra dag til dag kan variere, slik som i kromatografi. En indre standard er en forbindelse som er kjemisk lik analytten og som ikke finnes i prøven fra før av. En kjent mengde indre standard tilsettes hver prøve før analyse. Etter analyse blir signalet fra analytten regnet ut fra signalet fra den indre standarden (Miller, 2005; Harris, 2010). I denne oppgaven er den indre standarden karboksylsyren nonadekansyre, som det forventes skal ha lignende reaksjonseffektivitet som *p*-kumarinsyre og at den oppfører seg lignende i TMAH-reaksjonen.

2.4.3 Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR) som metode

Pollenkorn som skal gjennom en FT-IR-analyse blir ikke forbehandlet før analysen. Analysen gjennomføres ved hjelp av et spektrometer med et tilhørende IR-mikroskop. Før analysen av pollenkornene tas det opp et bakgrunnsspektrum som referanse. For hver pollenprøve skannes

det mellom 60-70 pollenkor, med 64 skann per pollenkor. Et endelig spekter for en prøve blir laget ved å ta gjennomsnittet av de 60-70 spektrene som er tatt opp for prøven. For å kunne sammenligne de ulike prøvene kan det være nødvendig med forbehandling av dataene. Dette innebærer derivering av dataene og valg om hvilke spektrale områder fra spektrene som skal brukes til sammenligning. Lomax *et al.* (2008) foreslo en måte for å karakterisere kjemien til sporopollenin etter en FT-IR-analyse. Metoden forklares under.

2.4.4 Metoden som baserer seg på Lomax *et al.* (2008)

Ved hjelp av FT-IR-analyse har Lomax *et al.* (2008) kommet fram til en metode der forholdene mellom topphøyder brukes til å karakterisere kjemien til sporopollenin. Dette gjøres for å fjerne potensiell påvirkning av forskjeller i prøvetykkelse på absolutte absorptionsverdier (Jardine *et al.*, 2015), samt å gi det aromatiske signalet en enhetsfri ratio (Fraser *et al.*, 2011). Topphøyder normaliseres i forhold til OH-toppen, da denne toppen finnes i hver prøve og ventes å ha en stabil topphøyde (Watson *et al.*, 2007). Forholdet mellom det aromatiske signalet og OH-signalet plottes mot UV-B-data.

Metoden som baserer seg på Lomax *et al.* (2008) er brukt i flere studier (Stemans *et al.*, 2010; Fraser *et al.*, 2011, 2014a; Lomax *et al.*, 2012; Jardine *et al.*, 2015), og også brukt i denne oppgaven. Grunnen til at metoden er utført her er at *Pinus* spp.-pollen har ulike morfologi enn andre slekter, og dette gjør det potensielt vanskeligere å bruke FT-IR-analyse. Metoden er kun brukt under delkapittel 4.3.3 og 5.1.2, og ikke brukt som en forbehandling under PCA- og PLS-analyser.

3. Eksperimentelle metoder

3.1 Innsamling av prøve

Pollenprøvene er de samme som ble brukt i Willis *et al.* (2011) og ble hentet vår/ tidlig sommer i 2008 og 2009. De kommer fra 19 populasjoner i skoger, botaniske hager og parker og dekker breddegradene fra Nord-Norge (69°37'N) til Hellas (35°16'N), se figur 3.1. Hovedsakelig kommer pollenet fra *Pinus sylvestris*, men for Kreta og Aten stammer pollenet fra *Pinus pinaster*, da *Pinus sylvestris* ikke finnes naturlig. I tillegg til prøver fra Europa, ble det også hentet inn pollenprøver fra Tenerife, Kanariøyene, som stammer fra *Pinus canariensis*, se tabell 3.1.



Figur 3.1: Kartet viser hvor pollenprøvene er hentet fra (Willis *et al.*, 2011).

Tabell 3.1: Stedsdetaljer om hvor det er samlet inn pollen fra *Pinus* spp., samt årlig innkomst av UV-B-stråling. Bredde- og lengdegrader er skrevet i desimalgrader (Willis *et al.*, 2011). Se kapittel 3.3 for hvordan UV-B-dataen er innsamlet.

Land	Sted	Breddegrad	Lengdegrad	Årlig UV-B [Jm^{-2}]
Norge	Eidkosen	69,633	18,739	7650,322
Norge	Steinkjer	64,015	11,512	7977,760
Norge	Trondheim	63,435	10,496	8638,640
Norge	Bergen	60,359	5,250	7929,867
Norge	Oslo	59,983	11,029	7731,142
Norge	Larvik	59,066	9,983	8671,000
Storbritannia	Belfast	55,013	-6,600	8514,283
Storbritannia	Oxford	51,783	-1,260	10418,400
Tyskland	Darmstadt	49,904	8,686	11135,517
Slovenia	Horjul	46,314	14,311	12751,075
Italia	Parma	44,624	10,179	14011,875
Italia	Roma	41,892	12,463	15702,925
Spania	Siurana	41,262	0,938	17543,392
Spania	Alicante	40,457	-3,750	19272,625
Spania	Valencia	39,349	-0,380	18044,642
Hellas	Aten, botanisk hage	38,016	23,648	18666,117
Hellas	Aten, nasjonal hage	37,976	23,740	18544,442
Hellas	Kreta, Rethymnon	35,404	24,866	20857,717
Hellas	Kreta, Heraklion	35,337	25,141	20645,767
Kanariøyene	Tenerife	28,343	-16,625	29909,875

Ved hvert sted ble det hentet stilker som inneholdt pollen fra rundt fem furutrær, der hvert tre er en prøve. Trærne sto i små samlinger der de var utsatt for mye sollys. For å redusere effekten av at trærne var utsatt for skygge fra andre trær, ble det valgt trær som sto i utkanten. Avstanden mellom trærne var mellom 5 og 10 m, og de vokste ved lav til middels høyde (< 600 moh).

En papirkonvolutt ble holdt rundt pollenstilken og ble ristet slik at så mye løse pollenkorn som mulig ble samlet i konvolutten. Deretter ble den samme pollenstilken kuttet av og lagt i konvolutten. Videre ble hver konvolutt lukket igjen med tape rundt alle kanter for å hindre lekkasjer, og deretter lagt i enda en papirkonvolutt. Konvoluttene fra hvert tre ble lagret separat for å hindre kryssforurensing. Figur 3.2 viser hvordan hannblomstene og pollenkornene til *Pinus sylvestris* ser ut.



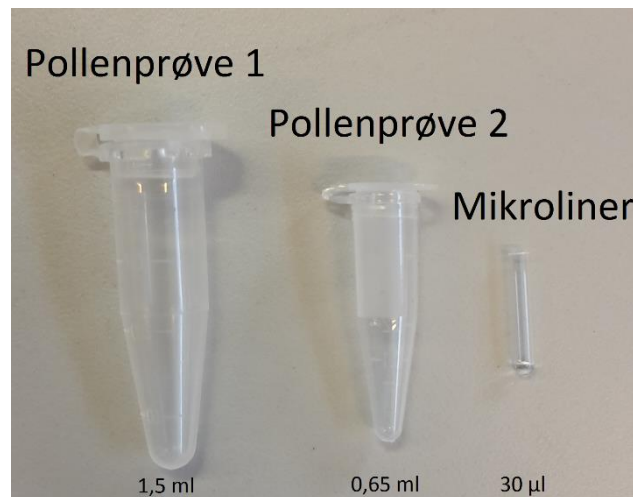
Figur 3.2: Bilde av hannblomst (venstre) og pollenkorn (høyre) fra *Pinus sylvestris* (Pharmallerga).

3.2 Tillaging av pollenprøver

Pollenprøvene som er laget i denne oppgaven betegnes pollenprøve 1 og pollenprøve 2. Tillagingen av disse er beskrevet under. For å lage pollenprøver som skal gjennom termokjemolyse-GC-MS ble først pollenprøve 1 laget. Dette er et utvalg pollen, som er overført i vann, fra ett tre. Fra pollenprøve 1 ble det plukket ut et kjent antall pollenkorn. Det er denne prøven som kalles pollenprøve 2, og som skal gjennom termokjemolyse-GC-MS.

3.2.1 Tillaging av pollenprøve 1

En pollenprøve inneholder pollenkorn fra ett tre fra ett av stedene. Et eppendorfrør (1,5 ml) ble fylt til litt over halvfullt med destillert vann. Deretter ble en spatel brukt til å overføre frie pollenkorn/blomst fra konvolutten og over i eppendorfrøret. Eppendorfrøret ble så ristet godt i 1-2 minutter og deretter sentrifugert. Tilstrekkelig sentrifugering var da det hadde samlet seg pollen i bunnen av eppendorfrøret. Figur 3.3 viser en oversikt over eppendorfrørene som har blitt brukt til å lage pollenprøve 1, samt pollenprøve 2.



Figur 3.3: Eppendorfrør som brukes i tillaging av pollenprøve 1 og pollenprøve 2, samt LINEX DMI mikroliner (ATAS GL) som brukes i tillaging av pollenprøve 2.

3.2.2 Tillaging av pollenprøve 2

Pollenprøve 1 brukes videre til å lage pollenprøve 2, som til slutt skal gjennom termokjemolyse-GC-MS. Pollenprøve 2 ble laget ved å plukke pollen ved hjelp av sug. En slange ble klippet til rundt en armlengde. I den ene enden ble det satt en pipettespiss, som tilhører en automatisk pipette, som munnstykke. I den andre enden ble det satt en tillaget pipette, se 3.2.3 og figur 3.4.



Figur 3.4: Slange med munnstykke og pipette brukt til å plukke pollen.

Destillert vann og deretter 10 μ l av pollenprøve 1 ble overført til et objektglass på et Zeiss AXIO vert. A1 invertert mikroskop. Figur 3.5 viser tre ulike typer objektglass, der fordypningene kalles brønner. Munnstykket på slangen ble så puttet i munnen, og pipetten ble satt ned i brønnen med pollenkornene. Munnen/ tungen ble brukt til å regulere innsuget av pollenkorn. For at ikke suget skulle bli for sterkt i begynnelsen, på grunn av kapillarkrefter, ble det sugd inn litt vann i pipetten før den ble satt i brønnen med pollenkorn.



Figur 3.5: Objektglass med en, to og tre brønner (LabScientific inc.).

Det var tre brønner på objektglasset, så om pollenprøven var forurenset ble de to andre brønnene brukt for å tynne ut forurensningen. Da ble de opptalte pollenkornene blåst ut i neste brønn med destillert vann i stedet for å bli blåst direkte ut i mikrolinieren. I den neste brønnen ble kornene talt opp på nytt og blåst ut i siste brønn på objektglasset. På denne måten ble pollenprøven renere. Ferdige prøver ble til slutt tørket i varmeskap på 50°C over natten.

I en prøve på 200 pollenkorn ble det plukket 50 pollenkorn av gangen. Disse ble blåst forsiktig ut i en LINEX DMI mikroliner (30 μ l), figur 3.3. For å få pollenkornene til å ligge i bunnen av mikrolinieren ble den sentrifugert mellom hver gang den fikk tilsatt flere pollenkorn. Under sentrifugeringen ble mikrolinieren plassert i et eppendorfrør (0,65 ml), der den også ble oppbevart da den var ferdiglaget.

3.2.3 Tillaging av pipette

De vanlige glasspipettene som brukes på laboratoriet har for store åpninger til å plukke pollen med. Disse måtte derfor gjøres tynnere. Pipetten ble holdt fast i hver ende, og midten av spissen på pipetten ble ført inn i en flamme. Da glasset begynte å mykne, ble endene dratt fra hverandre og tatt ut av flammen på samme tid. Pipetten vil ryke dersom den holdes for lenge i flammen. Spissen kan til slutt knekkes etter ønsket lengde.

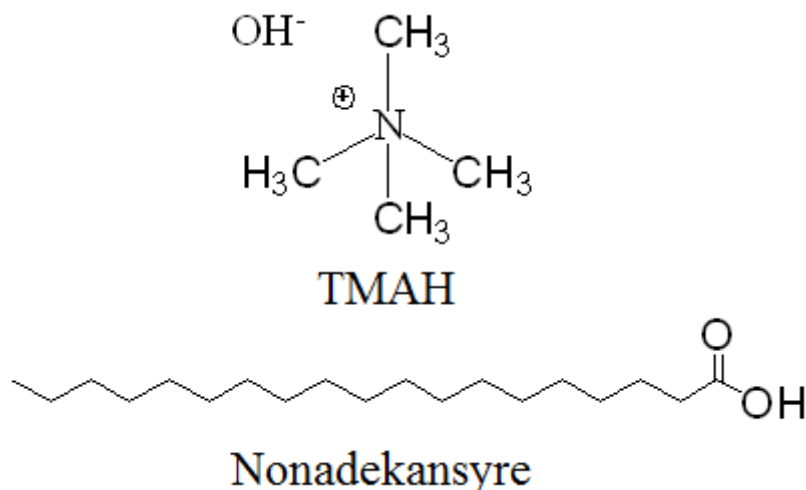
3.3 Innsamling av UV-B-data fra tidligere og nåtid

Målinger av den årlige innkommende UV-B-strålingen (J m^{-2}) ved hvert pollensted ble innhentet ved å bruke en satellittbasert overflate-UV-B-dose som er korrigert for overskyet vær og ozon. Målingene er tilgjengelig ved henvendelse til Jean Verdebout, Institute for Environment and Sustainability, European Commission, Joint Research Centre, Ispra, Italia. Datasettet inneholder estimater av UV-dose over en periode på 20 år med måling hver halvtime (1984-2003) og har en høy geografisk oppløsning på $0,05^\circ$ (Willis *et al.*, 2011). UV-B-dataene som er brukt i denne oppgaven er oppført i tabell 3.1.

3.4 Tillaging av tetrametylammonium hydroksid-blanding (TMAH)

Før pollenprøve 2 gikk gjennom termokjemolyse-GC-MS ble den forbehandlet ved å tilsette tetrametylammonium hydroksid (TMAH). TMAH-blandingen besto av en løsning av nonadekansyre (50 μl), metanol (MeOH) (1000 μl) og 25% TMAH (200 μl). Løsningen av nonadekansyren besto av 0,001g nonadekansyre løst i 1 ml MeOH. Strukturformlene til TMAH og nonadekansyre kan ses i figur 3.6 og reaksjonsligningen mellom dem vises i ligning (3.1).

Ligning (3.1) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{COOH} + (\text{CH}_3)_4\text{NOH} \rightarrow \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{COOCH}_3 + (\text{CH}_3)_4\text{N}$



Figur 3.6: Strukturformler til TMAH og nonadekansyre.

Det ble brukt tre ulike TMAH-blandinger i denne oppgaven, se tabell 3.2.

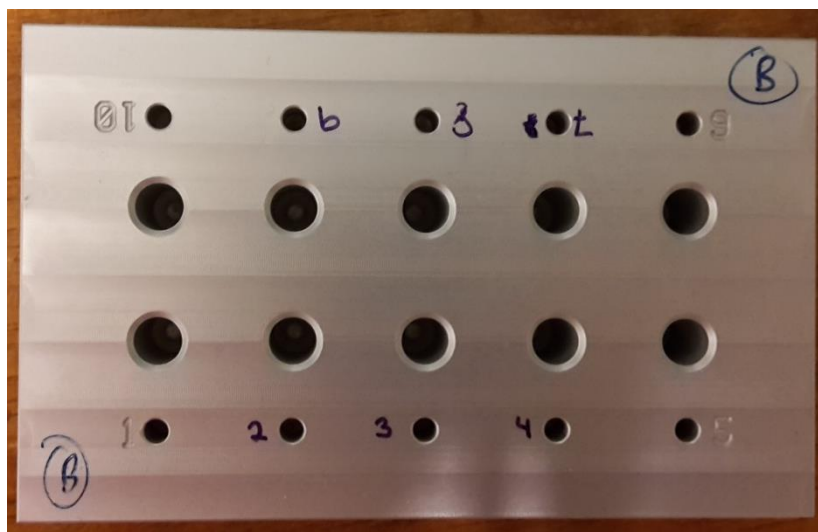
Tabell 3.2: TMAH-blanding 1, 2 og 3.

	Blanding 1	Blanding 2	Blanding 3
Forbindelse	Masse (g)	Masse (g)	Masse (g)
Nonadekansyre	0,0361	0,0346	0,0379
MeOH	0,7773	0,7717	0,7468
25% TMAH	0,3820	0,3263	0,3198

3.5 Forbehandling av pollenprøve 2 med TMAH

I forbehandlingen av pollenprøve 2 ble det brukt en Hamilton Digital sprøyte, en sentrifuge, tillaget TMAH-blanding og metanol (MeOH). Det ble brukt et stativ med plass til ti prøver om gangen, se figur 3.7. Eppendorfrørene ble plassert i de største hullene, mens mikrolinerne ble plassert i de minste hullene. Sprøyten ble vasket med MeOH fem ganger, og 2 µl TMAH-blanding ble tilsatt hver mikroliner. Mikrolinerne ble deretter lagt tilbake i eppendorfrørene og sentrifugert. Samtidig som prøvene ble sentrifugert, ble sprøyten vasket ti ganger med MeOH.

Da alle ti prøver hadde fått tilsatt TMAH-blanding, ble mikrolinerne tatt ut av eppendorfrørene igjen, og latt stå i romtemperatur i 20 minutter for å la MeOH fordampe. Til slutt ble stativet satt i varmeskap på 70°C i to timer. Etter dette var prøvene klare for termokjemolyse-GC-MS.



Figur 3.7: Stativ med plass til ti prøver av gangen.

3.6 Tillaging av standard

Under kjøring av pollenprøvene ble det kjørt en standard etter hver andre prøve, altså hver tredje kjøring var en standard. Dette var for å sjekke om instrumentet oppførte seg stabilt gjennom forsøket. Etter 10 kjøring ble det også kjørt en blank. I denne oppgaven ble det brukt tre ulike standarder som besto av nonadekansyre, *p*-kumarinsyre, 25% TMAH og MeOH. Tabell 3.3 viser blandingsforholdene. Forholdene mellom nonadekansyre og *p*-kumarinsyre var forskjellig i hver blanding; 1:1, 1:1,5 og 1:2. Disse ble løst opp i MeOH 1 i tabell 3.3, før de fikk tilsatt 25% TMAH og MeOH 2.

Reaksjonsveien mellom *p*-kumarinsyre og TMAH kan ses i figur 1.2, og reaksjonsligningen mellom nonadekansyre og TMAH kan ses i ligning (3.1).

Tabell 3.3: Standardblanding 1, 2 og 3.

	Blanding 1	Blanding 2	Blanding 3
Forbindelse	Masse (g)	Masse (g)	Masse (g)
Nonadekansyre	0,0100	0,0109	0,0109
<i>p</i> -kumarinsyre	0,0098	0,0160	0,0204
MeOH 1	3,1291	3,0249	3,1286
25% TMAH	1,6657	1,6191	1,6866
MeOH 2	3,1101	3,0887	3,1014

3.7 Informasjon om GC og temperaturprogram

Gasskromatografen er av typen HP Agilent 6890 Plus G1530 med HP Agilent 5973 Mass Selective Detector. GC-systemet er utstyrt med en Optic 3 PTV-injektor (ATAS GL, Veldover, Nederland) og en autosampler fra PAL Combi som transporterer glasslinere til pyrolyseenheten. PTV-injektoren er utstyrt med en enhet for elektronisk gasskontroll som blir brukt til å tilføre bæregassen og split flow. Optic 3 PTV-injektoren er et injeksjonssystem som baserer seg på linere, noe som betyr at pollenkorn må overføres til LINEX DMI 30 μ l mikrolinere (ATAS GL), som så plasseres i glasslinere, og som tilslutt plasseres i pyrolyseenheten. Glasslinerne ble vasket i en 97:3 diklormetan (DCM): MeOH-løsning for å minimere forurensing mellom prøvekjøringene.

Kolonnen som ble brukt er en HP-Ultra med en lengde på 25 m, en indre diameter på 0,2 mm og en filmtykkelse på 0,33 μ m. Bæregassen er helium. Kolonnestrømmen til bæregassen ble satt til 0,9 ml/min, og split flow ble satt til 250 ml/min under injeksjon av prøve og deretter til 20 ml/min. Temperaturprogrammet for pyrolysen ble satt fra 40°C til 600°C ved omtrent 60°C/sek. Temperaturprogrammet for GC-ovnen tilsvare det fra Willis *et al.* (2011) og er beskrevet i tabell 3.4.

Tabell 3.4: Temperaturprogram for GC-ovnen.

	Rate [°C/min]	Temp. [°C]	Holdetid [min]	Tid [min]
Start		40	6,00	6,00
Rampe 1	15,00	130	0,00	12,00
Rampe 2	8,00	250	0,00	27,00
Rampe 3	20,00	320	1,50	32,00

3.8 Identifisering av komponenter med NIST MS database

Identifiseringen av komponentene, som ble funnet ved termokjemolyse-GC-MS-analysene, ble utført ved hjelp av MS-databasen National Institute of Standards and Technology (NIST). Databasen er innebygd i datasystemet som ble brukt under analysene og inneholder massespektre som fungerer som referanser til allerede kjente forbindelser. For identifisering av

komponentene ble massespektrene til hver topp i kromatogrammene sammenlignet med flere massespektre som ble foreslått av NIST-databasen. En forbindelse ble identifisert da massespekteret fra kromatogrammet sammenfalt med et foreslått massespekter fra databasen. Dersom det ikke ble funnet et passende massespekter til en topp, ble toppen karakterisert som en ukjent forbindelse.

3.9 FT-IR-analyse

FT-IR-analysene ble gjort ved hjelp av et VERTEX 70 FTIR spektrometer med et HYPERION 3000 IR mikroskop (Bruker Optik GmbH, Germany). Spektrene ble tatt opp i «transmission mode» med spektral oppløsning på 4 cm^{-1} og digital avstand på $1,929 \text{ cm}^{-1}$. Systemet er utstyrt med global mid-IR-kilde og en Mercury Cadmium Telluride (MCT)-detektor som er kjølt ned ved hjelp av flytende nitrogen.

60-70 individuelle pollenkorn ble målt per pollenprøve, og det ble tatt opp et korresponderende FT-IR-spektrum per korn. Spektrene ble målt i området $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$, med 64 skann for spektrene for bakgrunn og prøve. Det ble brukt et 15x objektiv med $25 \times 25 \mu\text{m}$ åpning.

Pollenkornene ble ikke forbehandlet før de ble målt. Frie pollenkorn ble overført til et 3 mm ZnSe optisk vindu og plassert under mikroskopet. Før målingene av pollenkornene ble startet, ble det tatt opp et bakgrunnsspektrum som referanse ved å måle et tomt område, altså et område uten pollenkorn, på ZnSe-vinduet. Deretter ble mikroskopet brukt til å finne pollenkornene. Et forstørret bilde av pollenkornene kunne ses på en dataskjerm, og ved hjelp av en joystick ble området med mest pollenkorn valgt ut for analyse. Området med pollenkorn ble tatt bilde av, og 60-70 pollenkorn ble plukket ut for skanning. Det var viktig å velge pollenkorn som så hele ut og som ikke var ufokusert i bildet. Etter endt analyse ble et endelig spekter for prøven laget ved å ta gjennomsnittet av de 60-70 spektrene.

3.10 Multivariat analyse

Multivariat analyse utføres på den samlede data ved å bruke programmet SIRIUSTM, versjon 10.0 (Sirius, 2004). Modeller basert på prinsipalkomponentanalyse (PCA) og delvis minste kvadraters analyse (PLS) lages på innsamlede data. PCA-modellene er bygget for å se hvordan de identifiserte forbindelsene oppfører seg i forhold til hvilket sted de er hentet fra, samt å se

etter eventuelle uteliggere i datasettet. PLS-modellene er bygget for å se om den innsamlede dataen kan brukes til å predikere UV-B-innstråling.

Data samlet direkte fra de eksperimentelle metodene kalles rådata og kan inneholde støy, grunnlinjedrift, dominante variabler og andre faktorer som kan kamuflere viktig informasjon i datasettet (Nortvedt *et al.*, 1996). På grunn av dette er det laget modeller der rådataen både er standardisert, for at variablene skal ha lik varians, og ikke standardisert for å se om lik varians hadde betydning for modellen. Rådataen er også sentrert slik at det er mulig å observere variasjon mellom objekter uavhengig av deres plassering rundt gjennomsnittet i datasettet. Objektene posisjon i forhold til hverandre er av større interesse. Sentreringen blir gjort automatisk av Sirius (2004).

For å legge inn rådataen i Sirius må det lages et nytt datasett. Her velges antall objekter og variabler, samt om datasettet skal være standardisert eller ikke. Under variabler må også verdier for UV-B og breddegrad legges til. For å kunne kjøre en PCA- eller PLS-analyse på rådataene må det først lages et subsett. Dette gjøres under «subset/define subset». Her velges hvilke objekter og variabler som skal være med i subsettet, i tillegg til om subsettet skal være standardisert eller ikke. Senere går det an å gå inn på «subset/edit subset» for å endre på hvilke objekter og variabler som skal være i subsettet.

Når en PCA-analyse skal kjøres, må type analyse endres til «classification/discrimination», og deretter «build model (PCA)». Neste steg er å ekstrahere komponenter. For alle komponentene blir det oppgitt hvor mye varians som blir forklart, samt standardavvik for kryssvalidering (C_{svSD}). De komponentene som har C_{svSD} under 1, blir valgt til å lage modellen. Et unntak fra dette er når komponent to er litt over en, men som faller tilbake under 1 på komponent tre. Det er viktig å tenke på at det er større mulighet for støy i modellen når flere komponenter tas med. I tillegg fører denne støyen til at kvaliteten på modellens prediksjon går ned. Når antall komponenter er valgt, går det an å se på skårer og ladninger, samt biplottet til dataene.

Når en PLS-analyse skal kjøres, må type analyse endres til «regression analysis», og deretter «build model (PLS/PCR)». Her er det viktig at variabelen breddegrad er fjernet fra subsettet, da UV-B og breddegrad har høy korrelasjon. Når komponentene skal ekstraheres, er det UV-B som skal velges som responsvariabel. Antall komponenter som skal lage modellen velges på samme måte som for PCA-analysen. Etter at antall komponenter er valgt, går det an å se på blant annet predikert mot målte verdier, regresjonskoeffisienter og residualer.

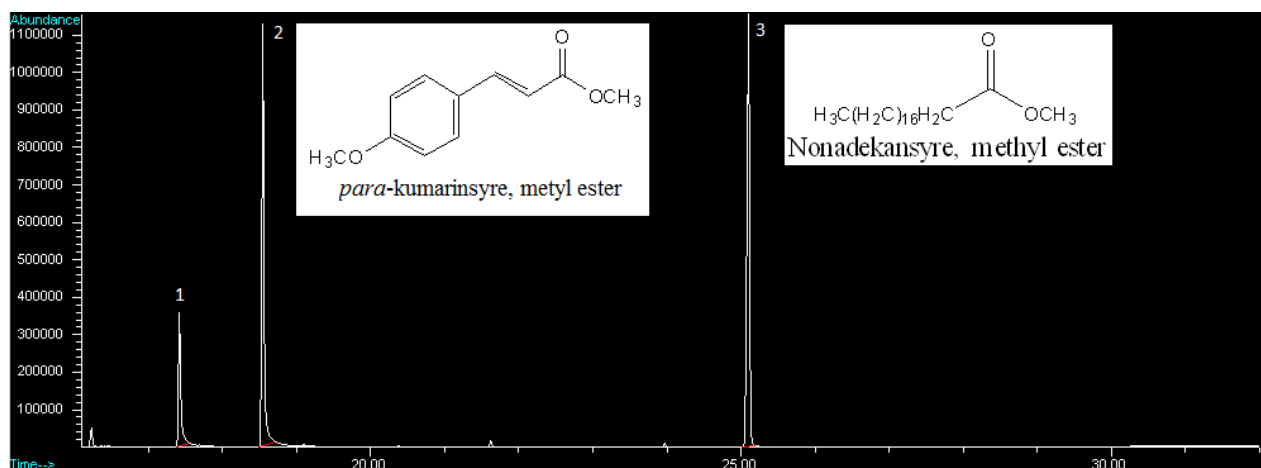
Beskrivelsen over gjelder for data fra både termokjemolyse-GC-MS-analyse og FT-IR-analyse. Rådataen fra FT-IR-analysen er i tillegg derivert for å korrigere baselinjen. Dette ble gjort under «dataset/transform dataset», og videre under «derivative and smoothing». Variablene ble førstegradsderivert med et filtervindu på 11 og orden 2. Filtervinduer på 7, 9 og 13 ble også testet ut, men dette ga ingen signifikante forskjeller. Derfor ble et filtervindu på 11 beholdt.

4. Resultater

4.1 Forbindelser funnet i *Pinus* spp.

4.1.1 Kromatogram av standard

Kromatogrammet i figur 4.1 viser komponentene i standarden. Toppene 1 og 2 eluerer ved henholdsvis 17,42 og 18,55 minutter og representerer methyl 3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate (*p*-kumarinsyre), som er en av fenolsyrene i sporopollenin som har evnen til å absorbere UV-stråling. Topp 3 eluerer ved 25,11 minutter og representerer nonadekansyre, som er den indre standarden. Tabell 4.1 viser en liste over forbindelsene, der de to toppene for *p*-kumarinsyre er kalt 1 og 2. Grunnen til at *p*-kumarinsyre er funnet ved to ulike topper i kromatogrammet er at *p*-kumarinsyre kan eksistere på to isomere former på grunn av dobbeltbindingen. Under termokjemolysen kan det oppstå rotasjon som kan føre til en blanding av *trans*- og *cis*-formasjonene. Siden disse har ulike egenskaper, vil det dannes to ulike topper i kromatogrammet.



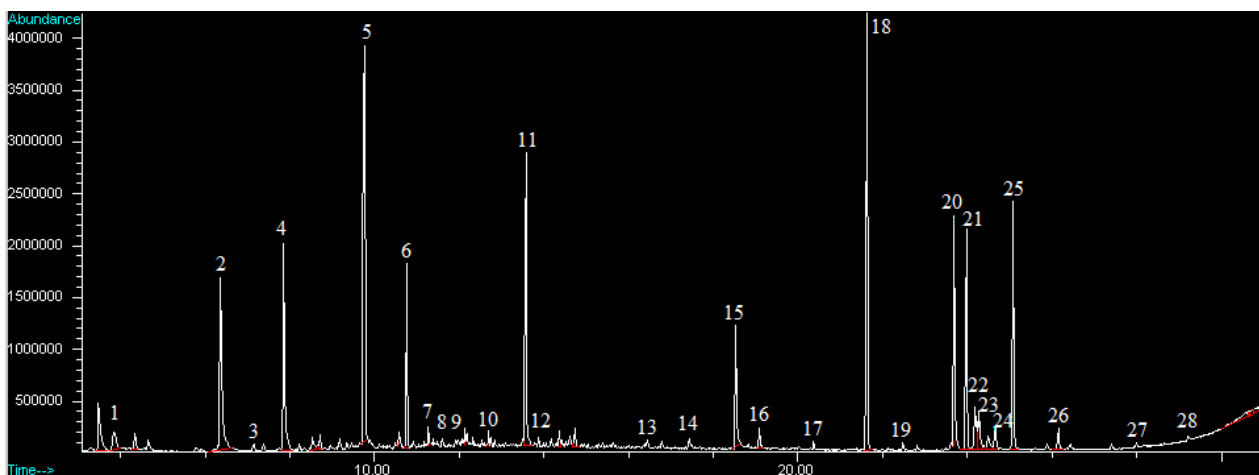
Figur 4.1: Kromatogram av standard, der hvert nummer representerer en forbindelse beskrevet i tabell 4.1.

Tabell 4.1: Oversikt over hvilke forbindelser som finnes i standarden.

Toppnr	Tid [min]	Forbindelse
1	17,42	Methyl 3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate, methyl ester, 1
2	18,55	Methyl 3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate, methyl ester, 2
3	25,11	Nonadecanoic acid, methyl ester

4.1.2 Kromatogram av pollenprøve

Figur 4.2 viser hvordan kromatogrammet til pollen, som har gjennomgått termokjemolyse-GC-MS, ser ut. Prøven inneholder pollen fra *Pinus sylvestris* som er samlet inn i Trondheim. Tabell 4.2 lister opp hvilke forbindelser som er funnet i pollenprøven. De ukjente forbindelsene i tabellen kunne ikke identifiseres med NIST MS database, men ukjent forbindelse 3 ser ut til å være av aromatisk karakter.



Figur 4.2: Kromatogram til en pollenprøve som inneholder 200 pollenkorn fra *Pinus sylvestris*, der hvert nummer representerer en forbindelse beskrevet i tabell 4.2.

Tabell 4.2: Forbindelser funnet i pollenprøven i figur 4.2.

Toppnr	Tid [min]	Forbindelse	Trivielle/ norske navn av utgangsmolekyl
1	3,86	Methylbenzene	Toluen
2	6,36	2-(Dimethylamino)acetic acid	Dimethylglycine
3	7,16	Ethylbenzene	-
4	7,86	Ukjent forbindelse 1	-
5	9,78	Ukjent forbindelse 2	-
6	10,77	Ukjent forbindelse 3 – aromatisk forbindelse	-
7	11,28	Benzoic acid, methyl ester	Metylbenzoat
8	11,59	Octanoic acid, methyl ester	Kaprylsyre
9	11,95	1-ethenyl-4-methoxybenzene	-
10	12,71	Nonanoic acid, methyl ester	Pelargonsyre
11	13,58	Ukjent forbindelse 4	-
12	13,90	Decanoic acid, methyl ester	Kaprinsyre
13	16,45	Dodecanoic acid, methyl ester	Laurinsyre
14	17,44	Methyl 3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate, methyl ester, 1	<i>para</i> -kumarinsyre
15	18,55	Methyl 3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate, methyl ester, 2	<i>para</i> -kumarinsyre

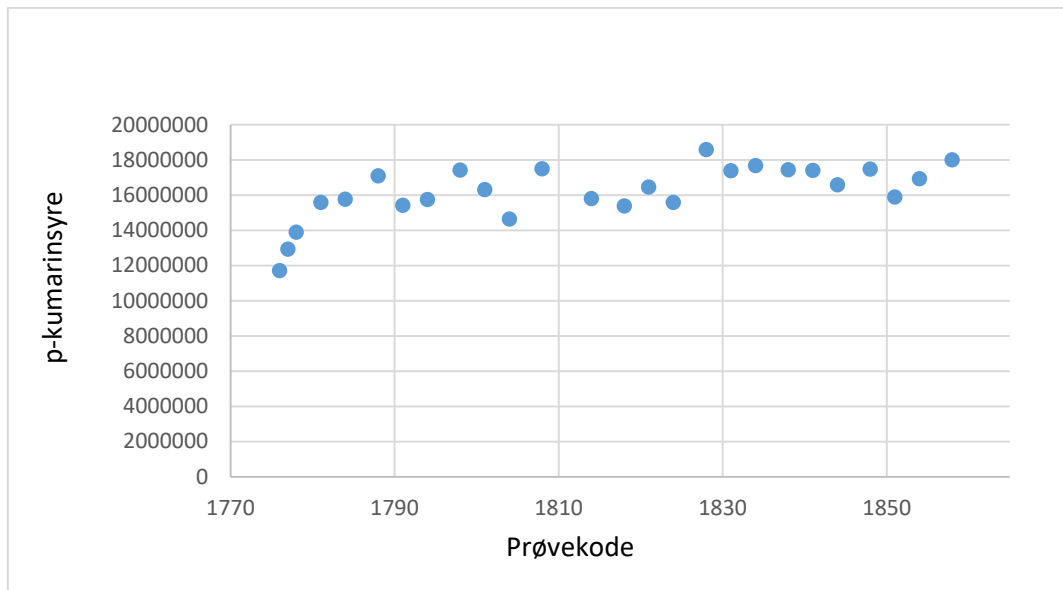
16	19,09	Tetradecanoic acid, methyl ester	Myristinsyre
17	20,40	Pentadecanoic acid, methyl ester	Pentadekansyre
18	21,66	Hexadecanoic acid, methyl ester	Palmitinsyre
19	22,14	Dibutyl phtalate	-
20	23,72	9-Octadecenoic acid, methyl ester	Oljesyre
21	24,00	Octadecanoic acid, methyl ester	Stearinsyre
22	24,20	7,10-Octadecadienoic acid, methyl ester, B	Linolsyre
23	24,29	7,10-Octadecadienoic acid, methyl ester, C	Linolsyre
24	24,67	7,10-Octadecadienoic acid, methyl ester, E	Linolsyre
25	25,10	Nonadecanoic acid, methyl ester	Nonadekansyre
26	26,17	Eicosanoic acid, methyl ester	Arakinsyre
27	28,01	Docosanoic acid, methyl ester	Behensyre
28	29,22	Tetracosanoic acid, methyl ester	Lignoserinsyre

4.2 Termokjemolyse-GC-MS som metode

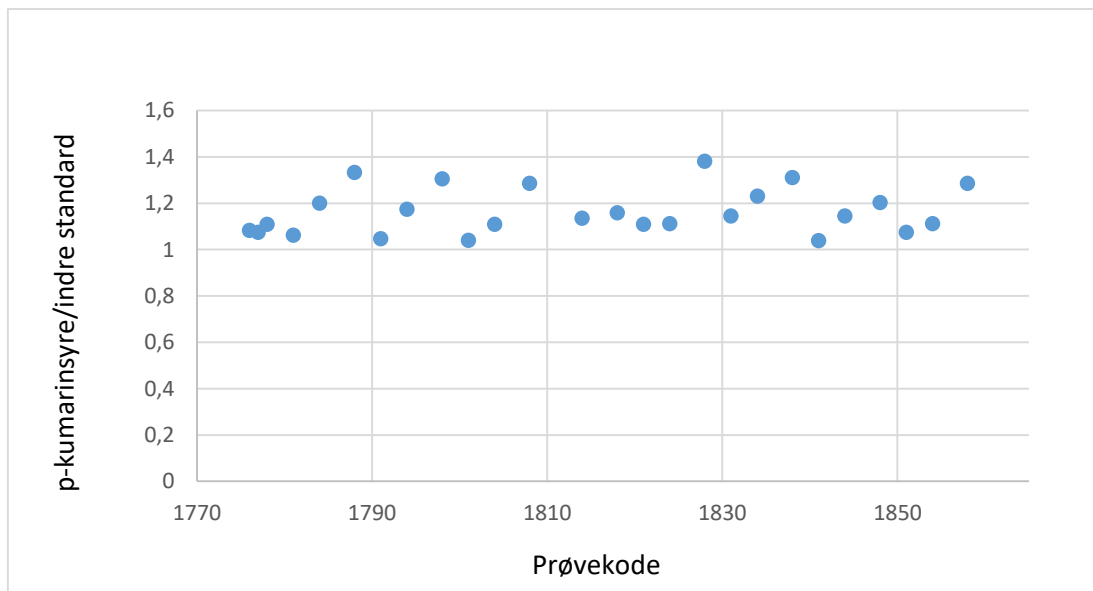
Resultatene er basert på totalt 123 pollenprøver laget fra 20 ulike populasjoner som strekker seg fra Tenerife (28°20') i sør til Eidkosen (69°37') i nord, med årlig innkomst av UV-B-stråling på henholdsvis 29 910 Jm⁻² til 7650 Jm⁻², se tabell 3.1. Antall pollenprøver fra hver populasjon varierer fra to til ti, der det er gjennomsnittet av prøvene fra hver populasjon som brukes i resultatene. Hele datasettet til rådataene finnes i appendiks A1, og hele datasettet til rådataene som er normalisert med hensyn på den indre standarden finnes i appendiks A2.

4.2.1 Reproduserbarhet

Ved hjelp av standardene, som ble kjørt ved hver tredje kjøring, er det mulig å se på hvordan reproduserbarheten til prøvene er. For å vise dette er blanding 2 brukt fra tabell 3.3. Figur 4.3 viser spredningsplottet for topparealet til *p*-kumarinsyre mot prøvekode. Siden den indre standarden er tilstede i blandingen, er det testet ut om reproduserbarheten blir bedre ved å normalisere toppen fra *p*-kumarinsyre på toppen fra den indre standarden, figur 4.4. Det relative standardavviket er 9,82% for figur 4.3 og 8,56% for figur 4.4, noe som kan tyde på at reproduserbarheten blir bedre ved å bruke forholdet mellom *p*-kumarinsyre og indre standard i stedet for råarealene fra analysen.



Figur 4.3: Spredningsplott for topparealet til p -kumarinsyre mot prøvekode. p -kumarinsyre er summen av p -kumarinsyre 1 og 2.

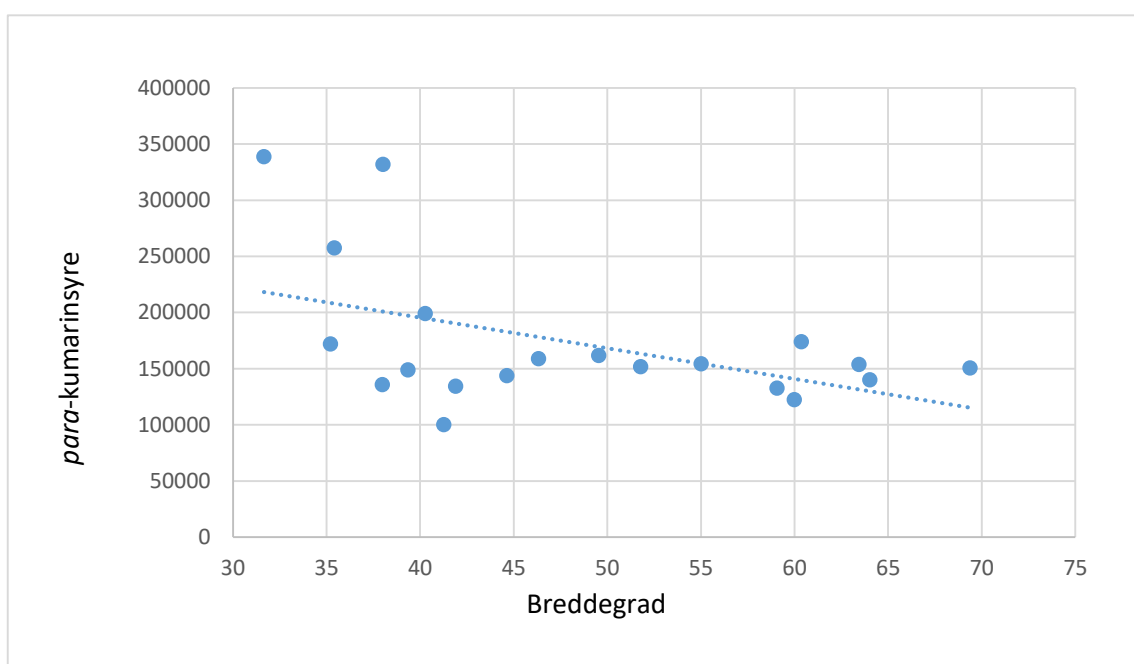


Figur 4.4: Spredningsplott for p -kumarinsyre/ indre standard mot prøvekode. p -kumarinsyre er summen av p -kumarinsyre 1 og 2.

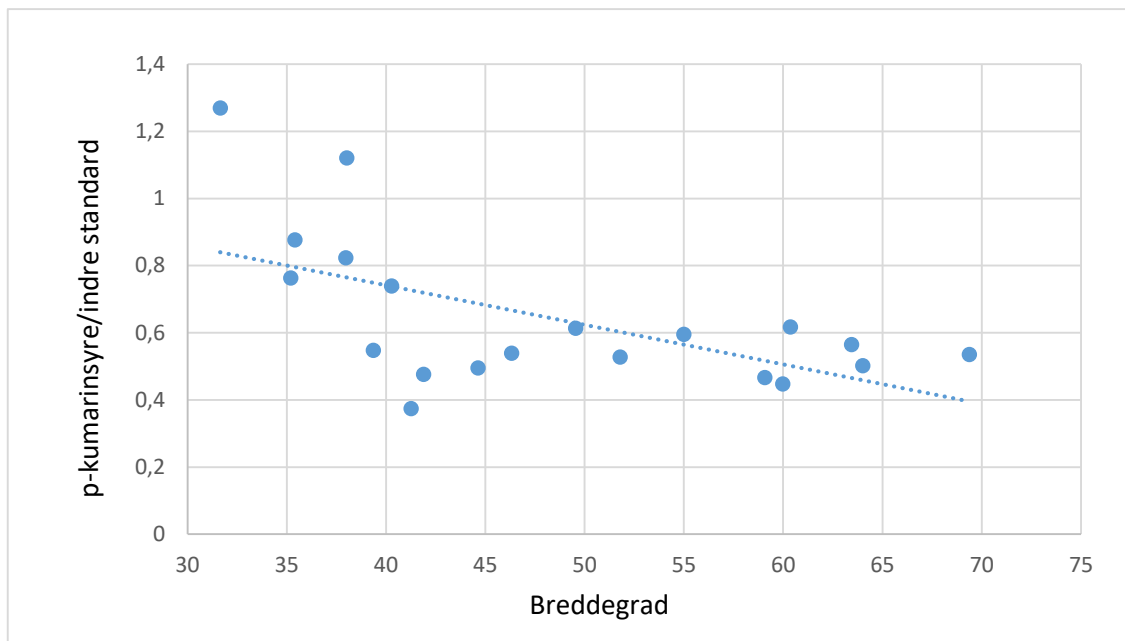
4.2.2 Kvantifisering av *p*-kumarinsyre

Det er her testet ut to ulike måter å kvantifisere *p*-kumarinsyre på. Den første er å bruke topparealene direkte fra termokjemolyse-GC-MS-analysen, og den andre er å bruke den indre standarden, som er tilsatt prøven, til å normalisere topparealet til *p*-kumarinsyre i forhold til topparealet til den indre standarden. Siden det er brukt tre ulike TMAH-løsninger med ulike mengder indre standard, er topparealet til den indre standarden korrigert i hver prøve etter hvilken TMAH-løsning som er brukt. Dette er gjort ved å korrigere topparealet til den indre standarden etter en satt baselinje. Det er altså det korrigerte topparealet til den indre standarden som er brukt ved normaliseringen.

Figur 4.5 viser spredningsplottet av *para*-kumarinsyre mot breddegrad. Her er mengden *p*-kumarinsyre funnet ved å dele det totale topparealet, som er målt ved hjelp av termokjemolyse-GC-MS, på antall pollen Korn prøven inneholdt. Korrelasjonskoeffisienten, R^2 , er 0,2355. Den andre måten å kvantifisere *p*-kumarinsyre på er å bruke den tilsatte indre standarden. Dette er vist i figur 4.6. Korrelasjonskoeffisienten, R^2 , ble 0,3412 med denne metoden, noe som er noe høyere enn den første metoden.



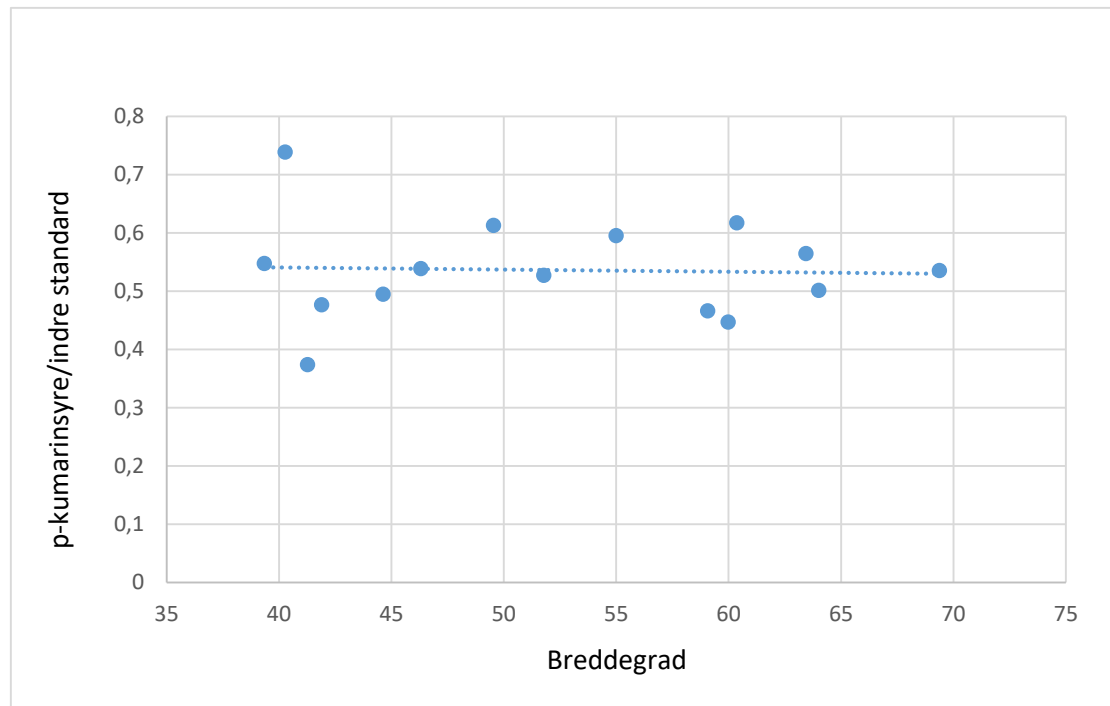
Figur 4.5: Spredningsplott av *para*-kumarinsyre mot breddegrad. Mengden *p*-kumarinsyre er funnet ved å dele summen av topparealene til *p*-kumarinsyre 1 og 2 på antall pollen Korn prøven inneholdt. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon. $y = -2725x + 304426$, $R^2 = 0,2355$.



Figur 4.6: Spredningsplott av *para*-kumarinsyre mot breddegrad. Mengden *p*-kumarinsyre er funnet ved å dele summen av topparealene til *p*-kumarinsyre 1 og 2 på topparealet til den indre standarden. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon. $y = -0,0118x + 1,2123$, $R^2 = 0,3412$.

4.2.3 Breddegrad mot *p*-kumarinsyre

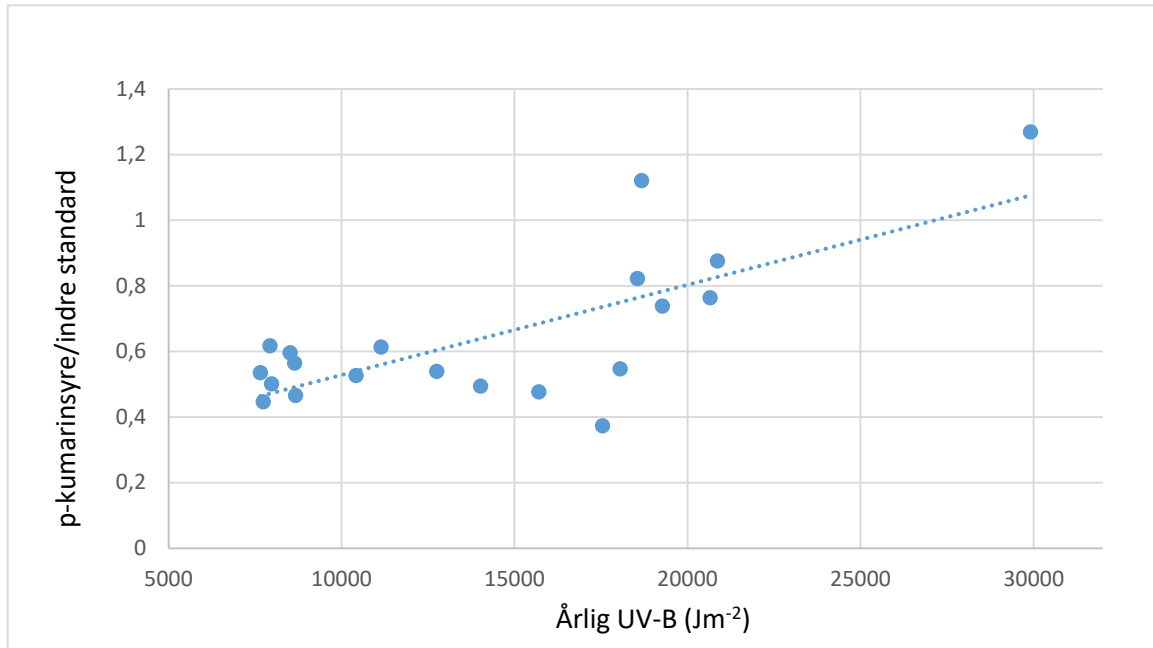
Figur 4.5 og 4.6 viser at mengden *p*-kumarinsyre i pollen fra *Pinus* spp. i en viss grad øker fra nord til sør, der populasjoner som vokser i Sør-Europa (Aten og Kreta) og Kanariøyene har de høyeste verdiene, og de som vokser lenger nord har de laveste verdiene. Trendlinjen viser en slik trend der mengden *p*-kumarinsyre minker med økende breddegrad, med en korrelasjonskoeffisient, R^2 , på 0,2355 for figur 4.5 og 0,3412 for figur 4.6. Siden det er analysert pollen fra tre ulike *Pinus*-arter, med hovedfokus på *Pinus sylvestris*, er det også et plott der populasjoner med *Pinus pinaster* og *Pinus canariensis* er fjernet, figur 4.7. I figur 4.7 er *p*-kumarinsyre basert på normalisering med hensyn på indre standard. Her blir korrelasjonen mellom *p*-kumarinsyre og breddegrad mye svakere, med en korrelasjonskoeffisient, R^2 , på 0,0019.



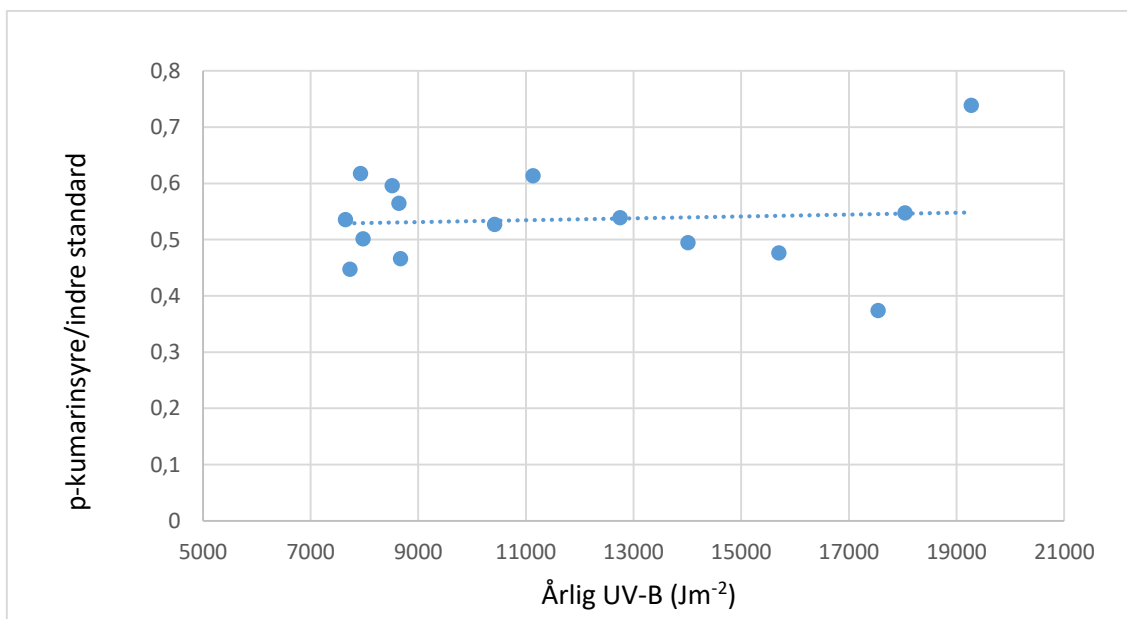
Figur 4.7: Spredningsplott av *para*-kumarinsyre mot breddegrad, der kun data fra populasjoner med *Pinus sylvestris* er inkludert, Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon, $y = -0,0004x + 0,5559$, $R^2 = 0,0019$.

4.2.4 Årlig UV-B-dose mot *p*-kumarinsyre

Figur 4.8 og 4.9 viser sammenhengen mellom mengde *p*-kumarinsyre og årlig inntak av UV-B-stråling. Mengden *p*-kumarinsyre i hver prøve er regnet ut ved å normalisere råarealene med hensyn på det korrigerte topparealet til den indre standarden. *p*-kumarinsyre er summen av *p*-kumarinsyre 1 og 2. Figur 4.8, der data fra alle *Pinus* spp.-artene er inkludert, viser en trend der mengden *p*-kumarinsyre øker med økt eksponering av UV-B-stråling, med en korrelasjonskoeffisient, R^2 , på 0,5360. Denne trenden bli mye svakere dersom det kun er data fra *Pinus sylvestris*, med en R^2 på 0,0066, figur 4.9.



Figur 4.8: Spredningsplott av *para*-kumarinsyre mot årlig innkomst av UV-B-stråling, der data fra alle de 20 populasjonene er inkludert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon, $y = 3 \cdot 10^{-5}x + 0,2535$, $R^2 = 0,5360$.



Figur 4.9: Spredningsplott av *para*-kumarinsyre mot årlig innkomst av UV-B-stråling, der kun data fra populasjoner med *Pinus sylvestris* er inkludert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon, $y = 2 \cdot 10^{-6}x + 0,5163$, $R^2 = 0,0066$.

4.2.5 Forbindelsenes korrelasjon med UV-B

Ved hjelp av programmet SIRIUSTM, versjon 10.0 (Sirius, 2004) er korrelasjonen mellom hver forbindelse i tabell 4.2 og innkommende UV-B-stråling beregnet, se tabell 4.3. Ikke alle forbindelsene i tabell 4.2 er tatt med videre i oppgaven. På bakgrunn av et pilotforsøk er de forbindelsene som har høyest korrelasjon med UV-B-stråling plukket ut til å være med i hovedoppgaven. Appendiks B viser resultatene fra pilotforsøket. Ytterligere undersøkelser av korrelasjoner underveis i oppgaven har ført til de 15 forbindelsene som er vist i tabell 4.3. Før analysene ble gjort, var det ingen føringer på hvordan forbindelsene ville korrelere til UV-B-stråling.

Korrelasjon måler retningen og styrken på den lineære sammenhengen mellom to kvantitative variabler. Korrelasjonsverdien, R , er alltid mellom -1 og 1, der verdier nær 0 indikerer en svak lineær sammenheng, og verdier som nærmer seg -1 eller 1 indikerer en sterkere lineær sammenheng. Når verdiene nærmer seg -1 eller 1 indikerer det at punktene ligger nær en rett linje (Moore *et al.*, 2012).

Tabell 4.3 viser at det er toluen, 1-etenyl-4-metoksybenzen, *para*-kumarinsyre 1 og *para*-kumarinsyre 2, med henholdsvis korrelasjoner på 0,828, 0,632, 0,719 og 0,612, som har de høyeste korrelasjonene med UV-B. Dette gjelder når alle populasjonene studeres. Korrelasjonen mellom UV-B og breddegrad er også verdt å merke seg. Disse er negativt korrelert (-0,920), noe som bekrefter at det er en økende UV-B-stråling ved lavere breddegrader.

Dersom det kun er data fra populasjoner med *Pinus sylvestris* som studeres, er ikke korrelasjonene de samme som når alle populasjonene er inkludert. Her er det toluen (0,766), oljesyre (0,724), linolsyre 2 (0,664) og linolsyre 3 (0,637) som har de høyeste korrelasjonene. I tillegg er *p*-kumarinsyre 2 negativt korrelert med UV-B.

Tabell 4.3: Oversikt over hvordan hver av forbindelsene funnet i *Pinus* spp. korrelerer med UV-B.

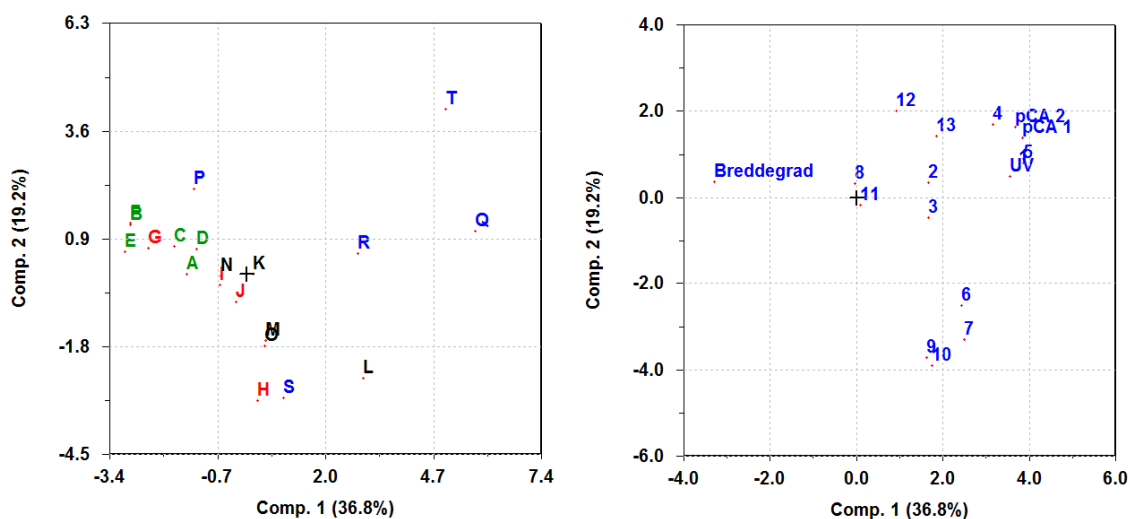
Forbindelse	Korrelasjon med UV-B, alle populasjoner	Korrelasjon med UV-B, kun populasjoner med <i>Pinus sylvestris</i>
Toluen	0.828	0.766
Ukjent 2	0.067	0.231
Ukjent 3	0.126	0.375
Metylbenzoat	0.477	0.257
1-etenyl-4-metoksybenzen	0.632	0.482
<i>para</i> -kumarinsyre 1	0.719	0.403
<i>para</i> -kumarinsyre 2	0.612	-0.036
Palmitinsyre	0.205	0.577
Oljesyre	0.430	0.724
Stearinsyre	-0.061	0.355
Linolsyre 1	0.214	0.548
Linolsyre 2	0.218	0.664
Linolsyre 3	0.249	0.637
Behensyre	0.414	0.421
Lignoserinsyre	0.311	0.052
Breddegrad	-0.920	-0.927

4.2.6 Prinsippkomponentanalyse (PCA) basert på GC-MS-data

Det er utført prinsippkomponentanalyse på alle pollendata ved hjelp av programmet SIRIUS™, versjon 10.0 (Sirius, 2004). Dette er gjort for å kunne finne sammenhenger, likheter og ulikheter blant prøvene. Figur 4.10 viser skår- (venstre) og ladningsplott (høyre) fra PCA basert på rådata av topparealene i pollenprøvene fra GC-MS-analysen. Tabell 4.4 forklarer symbolene som er brukt i figur 4.10. Skårplottet forklarer 56% av den totale variasjonen og viser at de objektene som skiller seg mest ut er T (Tenerife), Q (Aten botanisk hage), R (Rethymnon), L (Alicante) og P (Aten nasjonal hage). Alle disse objektene, unntatt Alicante, har data som kommer fra *Pinus pinaster* eller *Pinus canariensis*. Fargekodene viser at stedene i Norge (grønn) er samlet til venstre i plottet, stedene i Italia og Spania (svart) har minst variasjon, og stedene med *P. pinaster* og *P. canariensis* er i øvre del av spekteret, med unntak av Heraklion (S). De nordligste og de sørligste stedene er altså negativt korrelert.

Ladningsplottet viser, som vist i 4.2.5, at breddegrad og UV er negativt korrelert med hverandre. Variablene som ligger nær UV i plottet, som er positivt korrelert til UV, er 1 (toluen), 5 (1-etenyl-4-metoksybenzen), *p*CA 1 (*p*-kumarinsyre 1) og *p*CA 2 (*p*-kumarinsyre 2). Dette stemmer overens med korrelasjonene funnet i 4.2.5. Det er også en gruppering i ladningsplottet

som inkluderer 6 (palmitinsyre), 7 (oljesyre), 9 (linolsyre 1) og 10 (linolsyre 2). Disse er alle fettsyreforbindelser.



Figur 4.10: Skår- (venstre) og ladningsplott (høyre) fra PCA basert på rådata av topparealene i pollenprøvene fra GC-MS-data (Sirius, 2004). Skårplottet er fargekodet, der grønn farge representerer steder i Norge, rød farge representerer steder i Storbritannia, Tyskland og Slovenia, svart farge representerer steder i Italia og Spania og blå farge representerer steder med *Pinus pinaster* og *Pinus canariensis*. Tilhørende forklaring av symboler finnes i tabell 4.4.

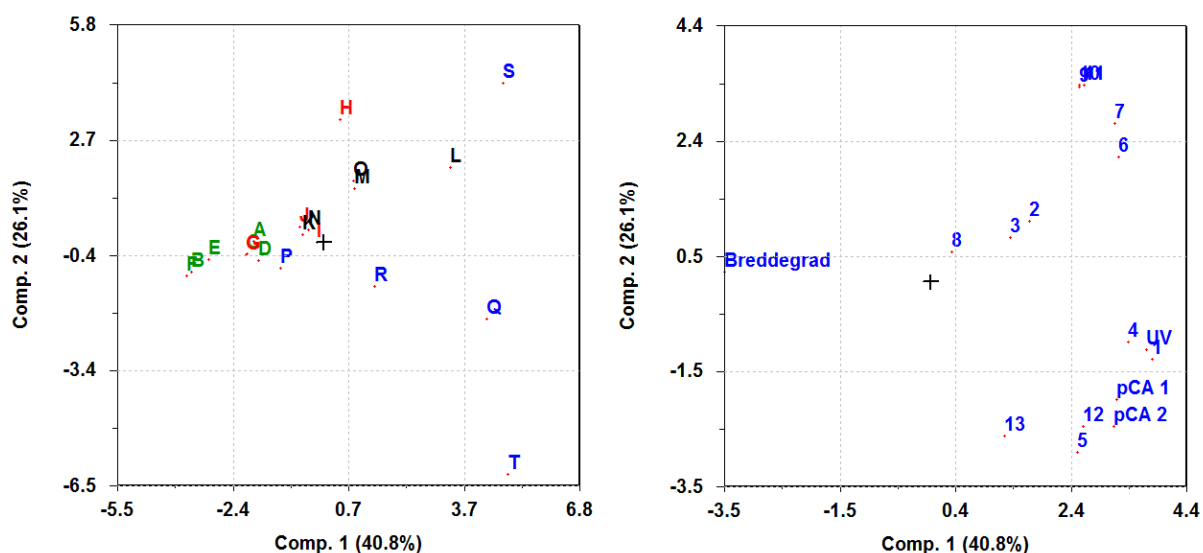
Tabell 4.4: Forklaring til symbolene brukt i figur 4.10, 4.11 og 4.15.

Symbol	Sted	Symbol	Sted	Symbol	Forbindelse
A	Eidkosen	N	Siurana	1	Toluen
B	Steinkjer	O	Roma	2	Ukjent 2
C	Trondheim	P	Aten, Nasjonal hage	3	Ukjent 3
D	Bergen	Q	Aten, Botanisk hage	4	Metylbenzoat
E	Oslo	R	Rethymnon	5	1-etenyl-4-metoxibenzen
F	Larvik	S	Heraklion	6	Palmitinsyre
G	Belfast	T	Tenerife	7	Oljesyre
H	Oxford			8	Stearinsyre
I	Darmstadt			9	Linolsyre 1
J	Horjul			10	Linolsyre 2
K	Parma			11	Linolsyre 3
L	Alicante			12	Behensyre
M	Valencia			13	Lignoserinsyre

Det er også utført PCA på dataene når rådataen er normalisert med hensyn på den indre standarden. Figur 4.11 viser skår- (venstre) og ladningsplott (høyre) og forklarer 66,9% av den totale variasjonen.

Skårplottet til venstre i figur 4.11 viser at T (Tenerife) er en mulig uteligger. Fargekodene viser at stedene i Norge (grønn) ligger til venstre i plottet, og at stedene i sør, Hellas og Tenerife (blå) ligger i nedre del av spekteret, med unntak av S (Heraklion).

Ladningsplottet til høyre i figur 4.11 viser at breddegrad og UV er negativt korrelert med hverandre, og at 1 (toluen) og 4 (metylbenzoat) har de høyeste korrelasjonene med UV.



Figur 4.11: Skår- (venstre) og ladningsplott (høyre) fra PCA basert på data som er normalisert med hensyn på indre standard (Sirius, 2004). Skårplottet er fargekodet, der grønn farge representerer steder i Norge, rød farge representerer steder i Storbritannia, Tyskland og Slovenia, svart farge representerer steder i Italia og Spania og blå farge representerer steder med *Pinus pinaster* og *Pinus canariensis*. Tilhørende forklaring av symboler finnes i tabell 4.4.

4.2.7 Delvis minste kvadraters metode (PLS) basert på GC-MS-data

Det er utført delvis minste kvadraters metode (PLS) på alle pollendata ved hjelp av programmet SIRIUS™, versjon 10.0 (Sirius, 2004). Siden pollenprøvene fra Hellas og Kanariøyene er fra to andre *Pinus*-arter, er det laget modeller der disse både er inkludert og ekskludert. Det er her laget modeller der predikert UV-B-verdi er plottet mot målt UV-B-verdi.

Tabell 4.5 viser resultater for PLS-analysene av de beste modellene som er funnet. Blant modellene der alle *Pinus*-artene er inkludert, er det den standardiserte som gir den beste modellen. Modellen har en korrelasjonskoeffisient, R^2 , på 0,620 med én komponent. Den ikke-standardiserte modellen får beste korrelasjonskoeffisient på 0,616 med tre komponenter.

I modellene der det kun er *Pinus sylvestris*-dataene som er inkludert er det den ikke-standardiserte datasettet som gir best korrelasjonskoeffisient. Sett i forhold til de to foregående modellene blir modellene dårligere dersom dataene fra *Pinus pinaster* og *Pinus canariensis* ekskluderes, uansett standardisering eller ikke.

Tabell 4.5: Resultat fra PLS-analyse med data basert på GC, der C_{sv}SD står for standardavvik for kryssvalidering og R^2 er korrelasjonskoeffisient.

Datasett	Forbehandling	PLS-komponenter	Forklart varians i		C _{sv} SD	R^2
			x (%)	y (%)		
Alle arter	Standardisert	1	50,18	62,01	0,77	0,620
	Ikke standardisert	1	68,94	30,14	0,95	0,302
		2	82,47	59,14	1,12	0,591
		3	93,92	61,61	0,96	0,616
Kun <i>P. sylvestris</i>	Standardisert	1	49,74	49,50	0,87	0,498
	Ikke standardisert	1	85,97	51,16	0,79	0,512

Det er i tillegg til disse modellene laget modeller der datasettet er normalisert med hensyn på den indre standarden, nonadekansyre. Tabell 4.6 viser resultatene fra PLS-analyse på de normaliserte datasettene. Tabellen viser flere modeller som er bedre, med tanke på korrelasjonskoeffisient, enn det som er funnet over. Beste korrelasjonskoeffisient er 0,715 og oppnås når alle arter er inkludert og datasettet er standardisert.

Tabell 4.6: Resultat fra PLS-analyse der datasettene er normalisert med hensyn på indre standard, der CsvSD står for standardfeil for kryssvalidering og R^2 er korrelasjonskoeffisient.

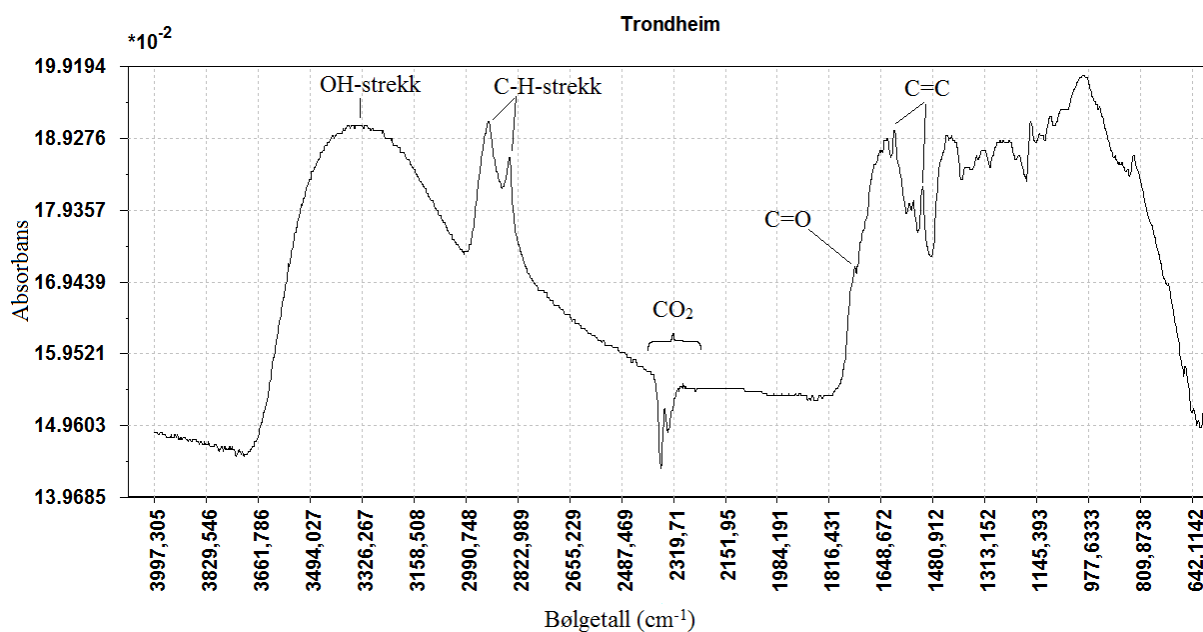
Datasett	Forbehandling	PLS-komponenter	Forklart varians i		CsvSD	R^2
			x (%)	y (%)		
Alle arter	Standardisert	1	44,75	67,86	0,77	0,679
		2	73,31	71,50	0,95	0,715
	Ikke standardisert	1	80,61	35,50	0,90	0,355
		2	93,73	63,91	0,94	0,639
		3	95,81	68,49	0,96	0,685
Kun <i>P. sylvestris</i>	Standardisert	1	49,47	54,86	0,81	0,549
	Ikke standardisert	1	83,74	54,10	0,75	0,541
		2	91,74	70,26	0,98	0,703

4.3 FT-IR som metode

Pollenkorn fra tilsvarende prøver som ble brukt til termokjemolyse-GC-MS-analyse ble også analysert med FT-IR-spektroskopi. Det var ingen forbehandling av pollenkornene før de ble målt, og hver pollenprøve fikk utført 64 skann. Det er transmisjonsspektre som brukes, da lyset har passert gjennom hele pollenkornene.

4.3.1 FT-IR-spekter av pollenprøve

Figur 4.12 viser et FT-IR-spekter av pollen fra *Pinus sylvestris* som er samlet inn i Trondheim. De markerte toppene representerer funksjonelle grupper som er funnet i *Pinus* spp.-pollen. Tabell 4.7 viser en mer detaljert liste. Det første brede absorpsjonsbåndet ved 3320 cm^{-1} representerer O-H-strekk. Det to neste toppene ved 2915 cm^{-1} og 2850 cm^{-1} viser henholdsvis asymmetrisk og symmetrisk C-H-strekk fra alifater. Den svake toppen ved 1731 cm^{-1} kan komme av C=O -strekk fra ester. Toppene ved 1602 cm^{-1} og 1511 cm^{-1} representerer C=C-strekk fra aromatiske ringstrukturer, der toppen ved 1511 cm^{-1} sannsynlig reflekterer enkelte aromatisk ringer som er karakteristiske i sporopollenin (Watson *et al.*, 2007). Området ved $2385\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$ representerer CO_2 . Programmet SIRIUSTM, versjon 10.0 (Sirius, 2004) er brukt til å plote spekteret.



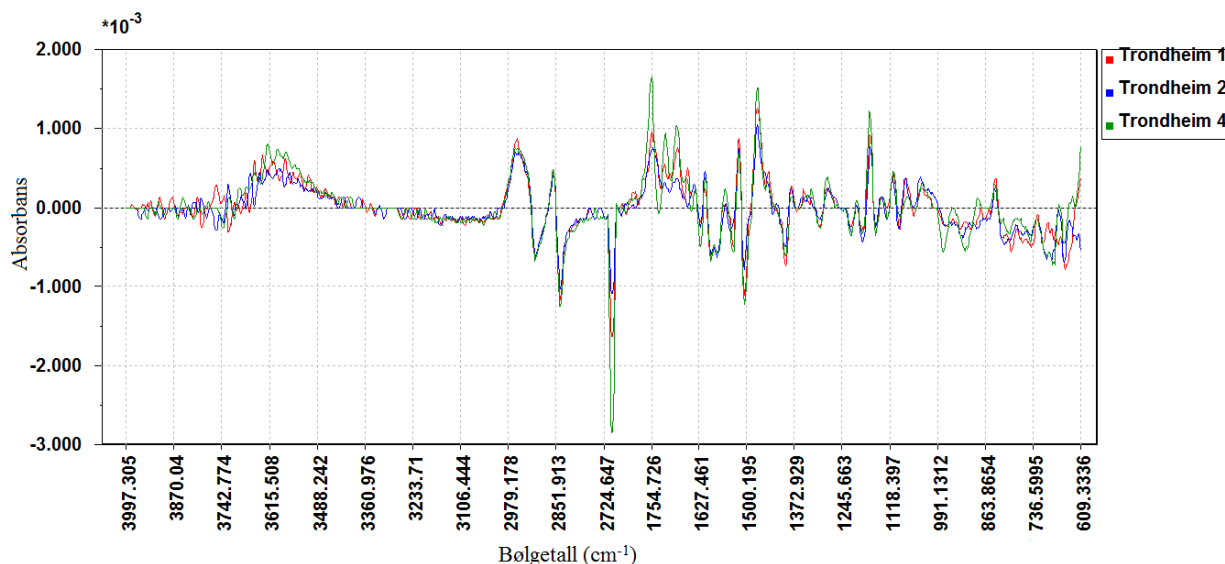
Figur 4.12: FT-IR-spekter av pollen fra *Pinus sylvestris* samlet i Trondheim med tolkning av absorbanstopper (Sirius, 2004).

Tabell 4.7: Funksjonelle grupper funnet i figur 4.12.

Bølgetall [cm ⁻¹]	Markerte toppler	Funksjonell gruppe
3320	O-H-strekk	Hydroksyl
2915	C-H-strekk	Alifatisk
2850	C-H-strekk	Alifatisk
1731	C=O	Ester
1602	C=C	Aromatisk
1511	C=C	Aromatisk

4.3.2 Reproduserbarhet

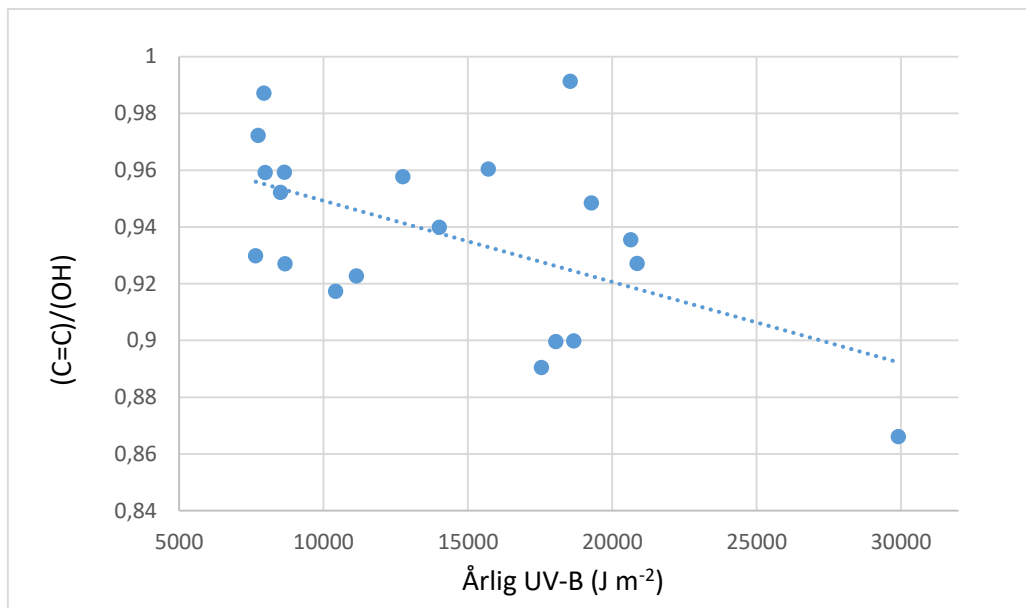
Reproduserbarheten for dataene fra FT-IR-analysen er testet ut ved å se på FT-IR-spektrene av pollen tatt fra samme sted. Figur 4.13 viser de førstegradsderiverte spektrene fra Trondheim lagt oppå hverandre. Liten variasjon mellom spektrene tyder på god reproduserbarhet.



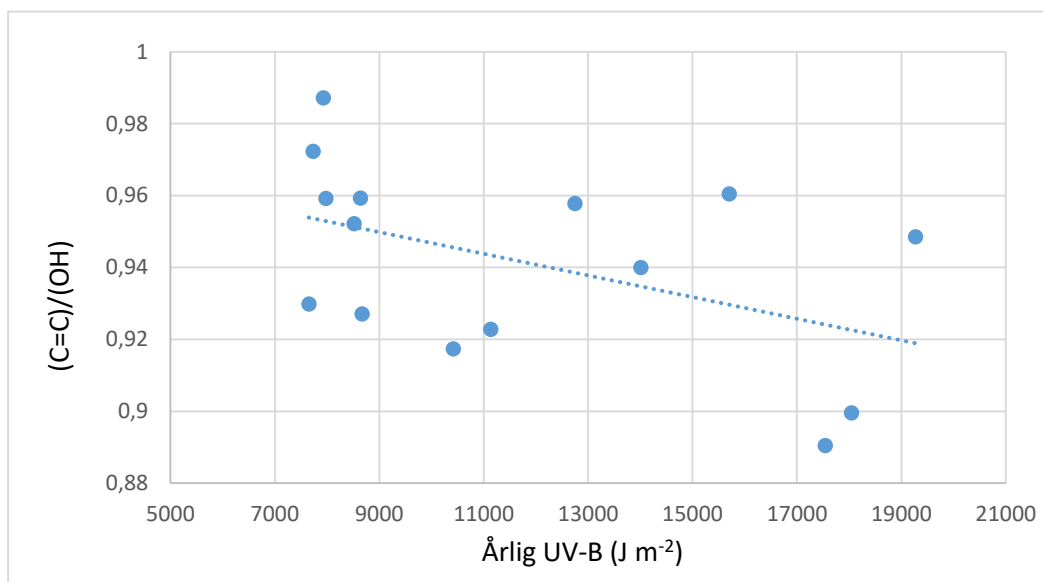
Figur 4.13: FT-IR-spekter av tre prøver fra Trondheim. Området mellom 2700-1860 cm^{-1} er fjernet da dette er området for CO_2 (Sirius, 2004).

4.3.3 Metoden som baserer seg på Lomax *et al.* (2008)

Metoden som baserer seg på Lomax *et al.* (2008) er beskrevet i 2.4.4. Figur 4.14 viser spredningsplottet av forholdene mellom topphøydene til aromatisk C=C-strekk (1511 cm^{-1}) og OH-strekk (3320 cm^{-1}) mot årlig inntak av UV-B-stråling, der data fra alle de 20 populasjonene er inkludert. Grafen viser en trend der (C=C)/(OH)-forholdet minker med økende inntak av UV-B-stråling. Den samme trenden ses når kun data fra populasjoner med *Pinus sylvestris* er inkludert, figur 4.15.



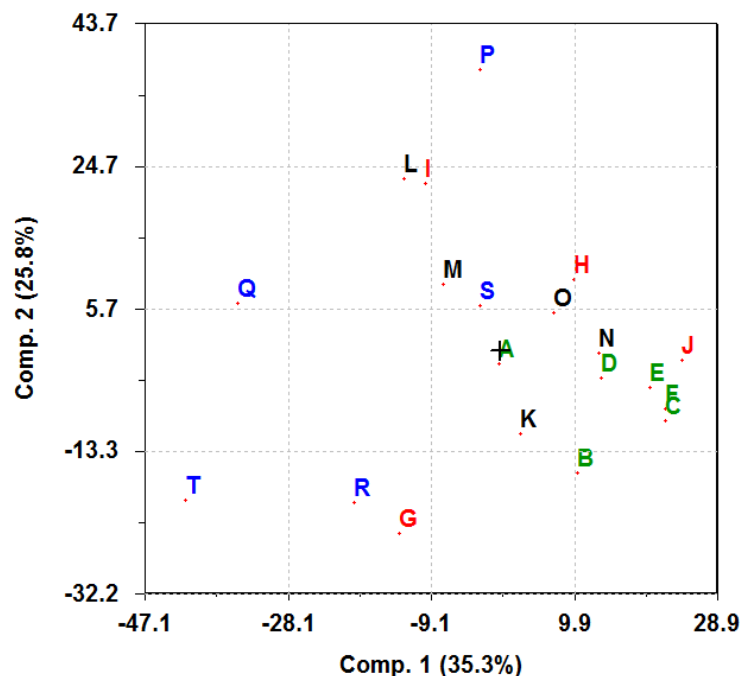
Figur 4.14: Spredningsplott av forholdet mellom topphøyden til C=C-aromatbåndet (1511 cm^{-1}) og topphøyden til OH-båndet (3320 cm^{-1}) mot årlig innkomst av UV-B-stråling, der data fra alle de 20 populasjonene er inkludert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon, $y = -3 \cdot 10^{-6}x + 0,9779$, $R^2 = 0,2920$.



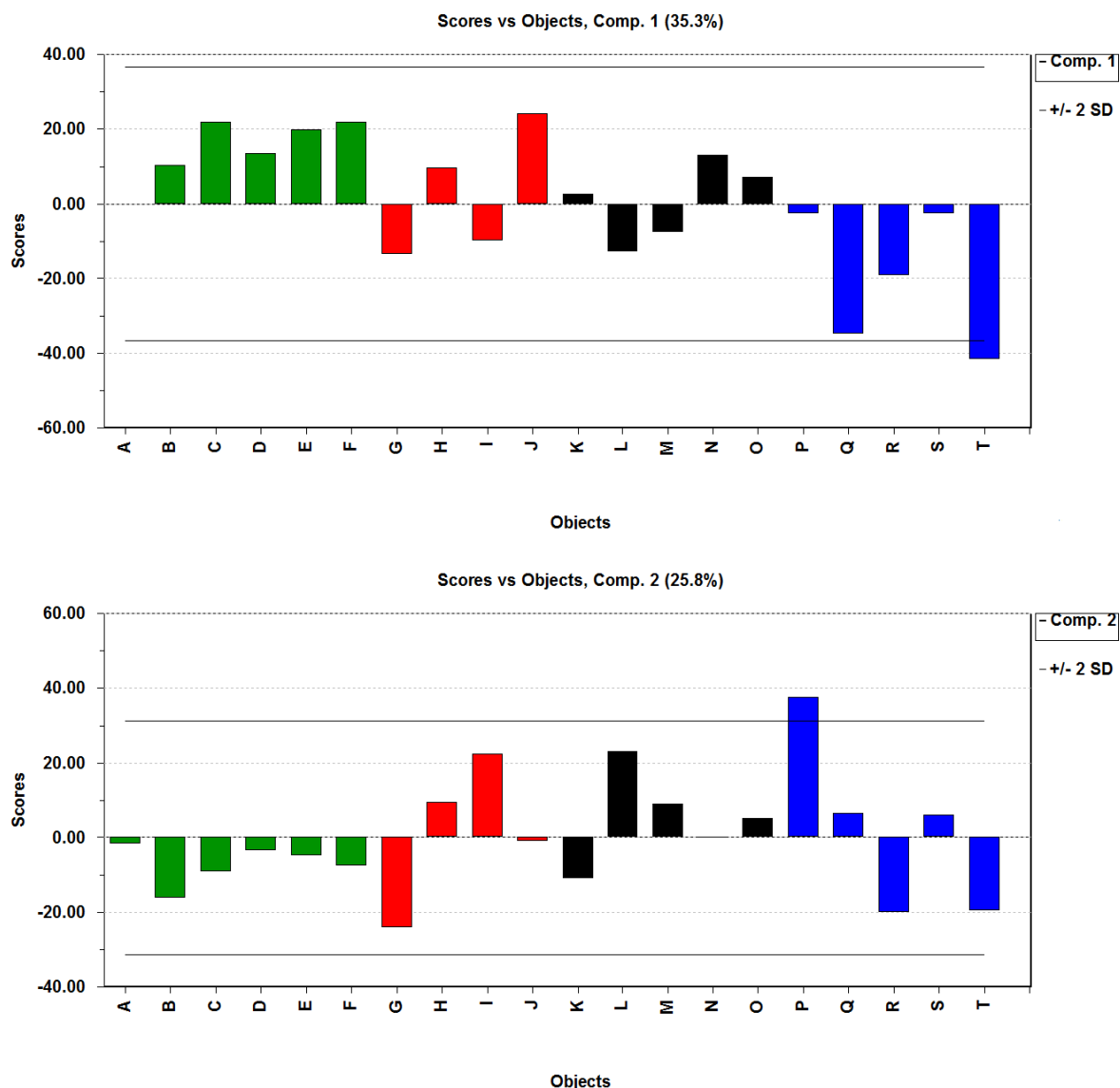
Figur 4.15: Spredningsplott av forholdet mellom topphøyden til C=C-aromatbåndet (1511 cm^{-1}) og topphøyden til OH-båndet (3320 cm^{-1}) mot årlig innkomst av UV-B-stråling, der kun data fra populasjoner med *Pinus sylvestris* er inkludert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon, $y = -3 \cdot 10^{-6}x + 0,9769$, $R^2 = 0,2202$.

4.3.4 Prinsipalkomponentanalyse (PCA) basert på FT-IR-data

Ved hjelp av Sirius (2004) er det også utført PCA på FT-IR-dataene. Figur 4.16 viser skårplottet fra PCA basert på FT-IR-dataene, og figur 4.17 viser hvordan de ulike objektene opptrer på komponent 1 (øverst) og 2 (nederst). Datasettet er førstegradsderivert, sentrert og standardisert. Plottet forklarer totalt 61,03% av variasjonen, der 35,3% forklarer variasjonen i komponent 1 og 25,8% forklarer variasjonen i komponent 2. T (Tenerife) har den største variasjonen på komponent en, og P (Aten nasjonal hage) har den største variasjonen på komponent to. Fargekodingen viser at stedene fra Norge (grønn) ligger nede til høyre i plottet og stedene med pollen fra *P. pinaster* og *P. canariensis* (blå) ligger spredt til venstre og øvre del av plottet.



Figur 4.16: Skårplott fra PCA basert på FT-IR-data (Sirius, 2004). Skårplottet er fargekodet, der grønn farge representerer steder i Norge, rød farge representerer steder i Storbritannia, Tyskland og Slovenia, svart farge representerer steder i Italia og Spania og blå farge representerer steder med *Pinus pinaster* og *Pinus canariensis*. Tilhørende forklaring av symboler finnes i tabell 4.4.

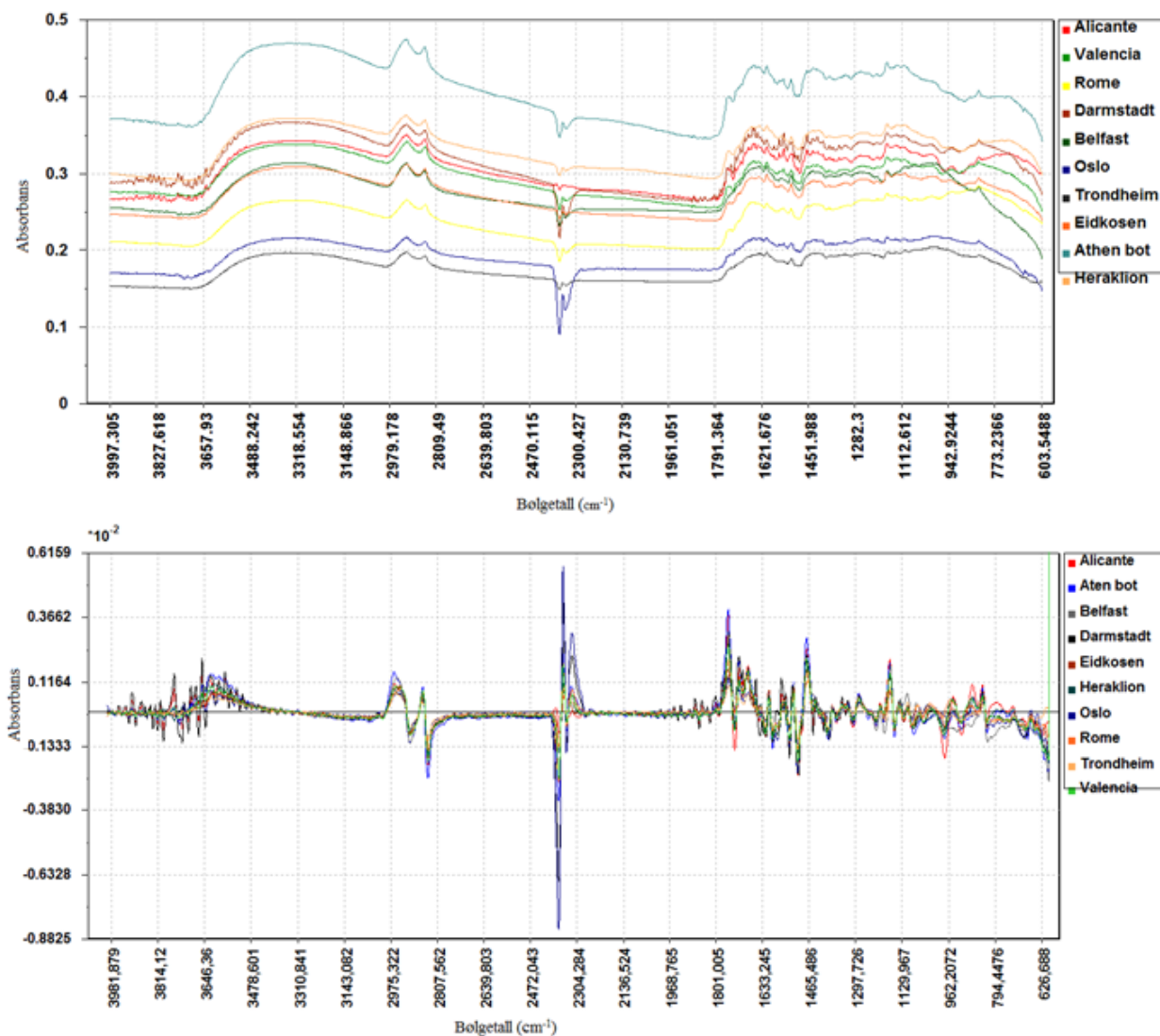


Figur 4.17: Plott av hvordan objektene opptrer på komponent 1 (øverst) og komponent 2 (nederst).

4.3.5 Delvis minste kvadraters metode (PLS) basert på FT-IR-data

På samme måte som pollenprøvene som er analysert med termokjemolyse-GC-MS er det også utført delvis minste kvadraters metode (PLS) på dataene fra FT-IR-analysen. Når alle FT-IR-dataene for alle pollenprøvene blir plottet i samme spekter ser det ut slik som det er vist i den øverste figuren i figur 4.18. I figuren er halvparten av objektene plottet. Figuren viser at det laveste punktet for det øverste spekteret er høyere enn det høyeste punktet for resten av de andre spektrene i figuren. På grunn av dette er datasettet førstegradsderivert, og med dette baselinjekorrigert. Den nederste figuren i figur 4.18 viser hvordan de samme objektene ser ut etter derivasjonen. I tillegg til derivering er alle dataene sentrert. Det er laget et kalibreringssett og et valideringssett, der modellene er bygget basert på kalibreringssettet. På grunn av mye støy

i spektrene for Alicante, Darmstadt og Aten nasjonal hage, se figur 4.18 (øverst), er bølgetall i områdene $4000-3303\text{ cm}^{-1}$ og $640-600\text{ cm}^{-1}$ fjernet. I tillegg er bølgetall i området $2700-1860\text{ cm}^{-1}$ fjernet siden dette normalt er området for CO_2 .



Figur 4.18: FT-IR-sprekter av 10 objekter (øverst) og FT-IR-spekter av de samme 10 objektene etter en førstegradsderivering (nederst).

Tabell 4.8 viser resultatene av PLS-analysene av de beste modellene som er funnet. Det er utført analyser der alle *Pinus*-artene er inkludert og der bare *P. sylvestris* er inkludert. I tillegg er hver av disse datasettene både standardisert og ikke standardisert. I modellene der alle artene er inkludert, er det den standardiserte modellen som gir høyest korrelasjonskoeffisient. For den ikke-standardiserte er korrelasjonskoeffisienten, R^2 , 0,789, mens den er 0,880 for den standardiserte.

I modellene der kun *P. sylvestris* er inkludert, er det også modellen for det standardiserte datasettet som gir høyest korrelasjonskoeffisient. Begge korrelasjonskoeffisientene er imidlertid lavere enn de som ble sett i modellene for begge arter.

Tabell 4.8: Resultat fra PLS-analyse med data basert på FT-IR, der CsvSD står for standardavvik for kryssvalidering og R^2 er korrelasjonskoeffisient.

Datasett	Forbehandling	PLS-komponenter	Forklart varians i		CsvSD	R^2
			x (%)	y (%)		
Alle arter	Ikke standardisert	1	32,93	57,36	0,94	0,574
		2	68,75	62,78	1,15	0,628
		3	76,28	78,88	0,98	0,789
	Standardisert	1	34,75	58,71	0,84	0,589
		2	45,46	79,61	1,10	0,796
		3	62,45	88,00	0,99	0,880
Kun <i>Pinus sylvestris</i>	Ikke standardisert	1	54,15	46,13	0,84	0,461
		2	69,48	67,39	0,97	0,674
	Standardisert	1	34,36	56,35	0,87	0,564
		2	52,14	76,36	0,97	0,764

På bakgrunn av plottet i figur 4.18, der plottene for Alicante, Aten nasjonal hage og Darmstadt viser seg å ha mer støy rundt bølgetall i området $1860-1330\text{ cm}^{-1}$ enn de andre plottene, er det også laget modeller der disse er fjernet. Det er utført PLS-analyser både med uten *Pinus pinaster* og *Pinus canariensis*, slik det er vist i tabell 4.9. Tabellen viser at det er modellene med de standardiserte datasettene som gir høyest korrelasjonskoeffisient. Denne er høyest for modellen der alle arter er inkludert (0,892), og da også høyere enn det som ble funnet i tabell 4.8.

Tabell 4.9: Resultat fra PLS-analyse med data basert på FT-IR, der CsvSD står for standardavvik for kryssvalidering og R^2 er korrelasjonskoeffisient. Objektene Alicante, Aten nasjonal hage og Darmstadt er fjernet.

Datasett	Forbehandling	PLS-komponenter	Forklart varians i		CsvSD	R^2
			x (%)	y (%)		
Alle arter	Ikke standardisert	1	51,64	63,42	0,78	0,634
		2	63,78	80,27	1,02	0,803
		3	85,41	83,53	0,90	0,835
	Standardisert	1	42,28	64,45	0,75	0,645
		2	57,59	82,04	0,98	0,820
		3	71,60	89,23	0,94	0,892
Kun <i>Pinus sylvestris</i>	Ikke standardisert	1	39,98	51,27	0,88	0,513
		2				
	Standardisert	1	27,83	62,66	0,88	0,627
2		41,86	84,97	0,96	0,847	

Det er også testet ut en alternativ måte å forbehandle dataene på. Denne metoden brukes på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), og dataene er behandlet der. Dataene er konsentrert til det spektrale området $1900-800\text{ cm}^{-1}$, de er andregradsderivert ved hjelp av Savitzky-Golay-filter, og med et filtervindu på 15 og orden 2. Deretter er det utført utvidet multiplikativ signalkorrigerings (EMSC); en MSC-modell som er utvidet med en lineær, kvadratisk og kubisk komponent. Tabell 4.10 og 4.11 viser resultatene for PLS-analysene for henholdsvis når alle objektene er inkludert, og når Alicante, Darmstadt og Aten nasjonal hage er fjernet på grunn av støy. I modellene der alle objektene er inkludert, vil den beste modellen gi en korrelasjonskoeffisient, R^2 , på 0,802. Når de tre objektene Alicante, Darmstadt og Aten nasjonal hage blir fjernet, blir korrelasjonskoeffisienten, R^2 , 0,922. Sett i forhold til den beste modellen basert på førstegradsderivert data, med beste R^2 på 0,892, er ikke dette store forskjeller, og begge metodene er likeverdige og kan bli brukt til dette formålet.

Tabell 4.10: Resultat fra PLS-analyse med data basert på andregradsderivert data fra FT-IR-analyse, der CsvSD står for standardavvik for kryssvalidering og R^2 er korrelasjonskoeffisient.

Datasett	Forbehandling	PLS-komponenter	Forklart varians i		CsvSD	R^2
			x (%)	y (%)		
Alle arter	Ikke standardisert	1	25,12	37,98	1,19	0,380
		2	45,60	55,61	0,82	0,556
		3	87,59	74,42	0,89	0,744
	Standardisert	1	14,69	61,64	0,99	0,616
		2	35,39	75,04	0,85	0,750
		3	64,05	80,16	0,99	0,802
Kun <i>P. sylvestris</i>	Ikke standardisert	1	29,92	55,20	0,93	0,552
		2	75,77	59,91	0,96	0,599
	Standardisert	1	25,65	58,35	0,91	0,584

Tabell 4.11: Resultat fra PLS-analyse med data basert på andregradsderivert data fra FT-IR-analyse, der CsvSD står for standardavvik for kryssvalidering og R^2 er korrelasjonskoeffisient. Objektene Alicante, Aten nasjonal hage og Darmstadt er fjernet.

Datasett	Forbehandling	PLS-komponenter	Forklart varians i		CsvSD	R^2
			x (%)	y (%)		
Alle arter	Ikke standardisert	1	32,46	48,84	0,96	0,488
		2	44,67	80,61	0,83	0,806
		3	75,67	83,65	0,95	0,837
	Standardisert	1	25,35	59,94	0,88	0,599
		2	38,84	84,65	0,90	0,847
		3	48,63	92,24	0,96	0,922
Kun <i>P. sylvestris</i>	Ikke standardisert	1	41,01	53,13	0,88	0,531
	Standardisert	1	31,69	58,19	0,89	0,582

5. Diskusjon

5.1 Kvantifisering av fenolsyrer

5.1.1 Kvantifisering basert på termokjemolyse-GC-MS

I de fullstendige GC-MS-analysene som er utført på pollenprøvene er *p*-kumarinsyre funnet som en av forbindelsene. Det er denne UV-B-absorberende forbindelsen, sammen med ferulsyre, som er brukt i tidligere studier for å undersøke om det er mulig å lage en modell for å registrere variasjoner i UV-B-stråling gjennom tidene (Rozema *et al.*, 2001; Blokker *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2007; Lomax *et al.*, 2008, Willis *et al.*, 2011). For å se om det er en sammenheng mellom hvor pollenet stammer fra og hvor mye *p*-kumarinsyre som er funnet i pollenkornene, er det laget et plott der breddegrad er plottet mot mengde *p*-kumarinsyre, se figur 4.4. Denne figuren viser at mengden *p*-kumarinsyre i pollen fra *Pinus* spp. i en viss grad øker fra nord til sør, der populasjoner som vokser i Sør-Europa har høyere verdier enn populasjoner som vokser i Nord-Europa, med en korrelasjonskoeffisient, R^2 , på 0,3412. Det er imidlertid interessant å se at steder lenger sør i Norge, f. eks. Larvik, har en lavere konsentrasjon av *p*-kumarinsyre enn Eidkosen, som ligger helt nord i Norge. I følge Lomax *et al.* (2008) kan dette forklares ved at det ved høyere breddegrader er mer variasjon i ozonlaget, og dermed også UV-B-innstråling.

Pollenprøvene i denne oppgaven er de samme som ble brukt i Willis *et al.* (2011), og en sammenligning av resultatene viser at trenden er den samme. Det er imidlertid uheldig at det er brukt tre ulike *Pinus* spp.-arter i samme studie, da disse har ulik pollenstørrelse og ulik produksjon av *p*-kumarinsyre. Det er funnet ut at *P. pinaster* inneholder opptil dobbel mengde *p*-kumarinsyre enn andre *Pinus*-arter, selv etter korrigerings for pollenstørrelse (Jokerud *et al.*, innsendt b). Hvis dette tas i betraktning i denne oppgaven betyr det at det er resultatene der kun *P. sylvestris* er inkludert som vil gi et riktigere bilde av sammenhengen mellom *p*-kumarinsyre og breddegrad.

Artikkelen til Willis *et al.* (2011) har imidlertid ikke testet ut hvordan sammenhengen mellom *p*-kumarinsyre og UV-B-stråling blir dersom det kun er data fra *Pinus sylvestris* som inkluderes. I denne oppgaven viser plottet for *Pinus sylvestris*, figur 4.7, at trenden blir mye svakere ($R^2=0,0019$). Dette er et overraskende resultat, da det flere ganger tidligere er funnet en sammenheng mellom *p*-kumarinsyre og UV-B-stråling (Rozema *et al.*, 2001; Lomax *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2011). Den samme trenden vises når mengde *p*-kumarinsyre er plottet mot årlig innkomst av UV-B-stråling (figur 4.9). En potensiell forklaring på den svake trenden er at

det ikke er funnet noen sammenheng mellom mengde *p*-kumarinsyre og hvor mye UV-B-stråling planten har vært utsatt for over tid, men at den største produksjonen av *p*-kumarinsyre, som respons til UV-B-stråling, skjer de to siste ukene før blomstring (Jokerud *et al.*, innsendt a). På bakgrunn av dette kan det hende at UV-B-verdiene heller skulle vært verdier fra de siste to ukene før blomstring enn verdier av den årlige innkomsten av UV-B-stråling.

Som nevnt over, er det i tidligere studier funnet en sammenheng mellom UV-B-absorberende forbindelser i sporopollenin og UV-B-stråling. Rozema *et al.* viste i 2001 at konsentrasjonen til UV-B-absorberende forbindelser i *Vicia faba* (hestebønne) økte signifikant da planter som ble utsatt for UV-B-stråling ble sammenlignet med planter som ikke hadde blitt utsatt for UV-B-stråling. I 2008 utførte Lomax *et al.* en studie på sporopollenin hos *Lycopodium magellanicum* og *L. annotinum* (kråkefotfamilien) basert på pollenprøver fra ulike breddegrader. Resultatene viste at pollenprøver som kom fra nordlige (67° N) og sørlige (54° S) deler viste de laveste forekomstene av UV-B-absorberende forbindelser, og prøver som kom fra breddegrader nær ekvator hadde de høyeste forekomstene av UV-B-absorberende forbindelser. Dette sammenfaller med en tynnere stratosfære nær ekvator som fører til en høyere dose UV-B-stråling. En annen studie basert på *L. annotinum* så på hvordan skygge påvirket konsentrasjonen av UV-B-absorberende forbindelser. Resultatene viste at et høyere skydekke førte til lavere konsentrasjon av UV-B-absorberende forbindelser (Fraser *et al.*, 2011).

5.1.2 Kvantifisering basert på FT-IR

Metoden som baserer seg på Lomax *et al.* (2008) er en mye brukt metode for å karakterisere kjemien til sporopollenin innen Fourier transform infrarød spektroskopi (FT-IR) (Lomax *et al.*, 2008, 2012; Steemans *et al.*, 2010; Fraser *et al.*, 2011, 2014a; Jardine *et al.*, 2015). Dette er en måte å sammenligne ulike prøver basert på relativ forekomst av de funksjonelle gruppene funnet i FT-IR-spektrene. Tidligere studier har vist at endringer i topphøyden grunnet aromatiske ringstrukturer (1511 cm^{-1}) målt ved FT-IR, kan indikere en endring i forekomsten av UV-B-absorberende forbindelser i sporopollenin (Watson *et al.*, 2007; Lomax *et al.*, 2008). I følge Rozema *et al.* (2009) er det uklart hvorvidt (C=C)/(OH)-forholdet også kan reflektere endringer i graden av kryssbindinger i sporopollenin. Det er imidlertid funnet en signifikant korrelasjon mellom (C=C)/(OH)-forholdet og UV-B-stråling (Lomax *et al.*, 2008, 2012; Steemans *et al.*, 2010; Fraser *et al.*, 2011, 2014a; Jardine *et al.*, 2015).

Metoden er også brukt i denne oppgaven, og resultatene i figur 4.14 og 4.15 viser en trend der $(C=C)/(OH)$ -forholdet minker med økende innkomst av UV-B-stråling. Dette er altså det motsatte av hva som er funnet tidligere. En potensiell forklaring på den negative trenden er at metoden her er utført på *Pinus* spp.-pollen, som har en annen morfologi enn de andre slektene det har blitt utført på før. Siden *Pinus* spp.-pollen ikke er sfæriske og retningen på hvordan pollenkornene ligger under analysen har noe å si for hvordan det endelige FT-IR-spekteret blir, er FT-IR potensielt vanskeligere å utføre. Det kan derfor tyde på at denne form for kvantifisering ikke er tilstrekkelig når det kommer til *Pinus* spp.-pollen. Det er i tillegg ikke sikkerhet rundt hvor stabilt OH-signalet er.

5.2 Andre forbindelser funnet i *Pinus* spp.-pollen

5.2.1 Forbindelser funnet i *Pinus* spp.-pollen

Sporopollenin består av to hovedkomponenter; fettsyreenheter og enkle fenoler. Til sammen danner disse komponentene et nettverk av ikke-hydrolyserbare, uløselige biomakromolekyler (Blokker *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2007; Fraser *et al.*, 2011). Fenolsyrene *p*-kumarinsyre og ferulsyre er ifølge Blokker *et al.* (2005) en viktig del av sporopollenin. Ved hjelp av termokjemolyse-GC-MS er det utført fullstendige GC-MS-profiler på pollenprøver som inneholder pollen fra *Pinus sylvestris*, pollenprøver med pollen fra *Pinus pinaster* og pollenprøver med pollen fra *Pinus canariensis*. Det er funnet 28 ulike forbindelser, se tabell 4.2, der de samme forbindelsene er funnet i alle *Pinus*-artene. Både aromatiske og fettsyreforbindelser er funnet, der *p*-kumarinsyre finnes blant de aromatiske forbindelsene.

Fettsyreforbindelsene som er funnet i *Pinus*-pollen er de mettede fettsyrene med karbontall C8-C24 og de umettede fettsyrene oljesyre (18:1) og linolsyre (18:2). Ut fra geokjemiske analyser er det funnet ut at disse fettsyrene kan være en del av sporopollenin (Watson *et al.*, 2007). Challinor (1996) mener imidlertid at fettsyrene heller kommer fra andre deler av planten, som cytoplasma, der de fungerer som et matlager.

Resultatene fra analyse av *P. sylvestris* kan sammenlignes med analysen til Blokker *et al.* (2005). Det ble da utført en fullstendig THM-py-GC-MS-analyse på en acetolysert pollenprøve som inneholdt pollen fra svartor (*Alnus glutinosa*). Acetolyse er en kjemisk opprensning som er brukt innen palynologi for å fjerne organiske rester og isolere pollenkornene (Blokker *et al.*, 2005). I acetolysert *Alnus*-pollen ble det funnet en rekke aromatiske forbindelser, inkludert *p*-

kumarinsyre og ferulsyre. Det ble også funnet fettsyrer med lange karbonkjeder, samt andre forbindelser som ikke kunne identifiseres med standard MS-databaser. I motsetning til resultatene fra *Alnus*-pollen ble det ikke funnet ferulsyre i *Pinus*-pollen. Dette kan tyde på at pollen fra ulike slekter inneholder ulike forbindelser.

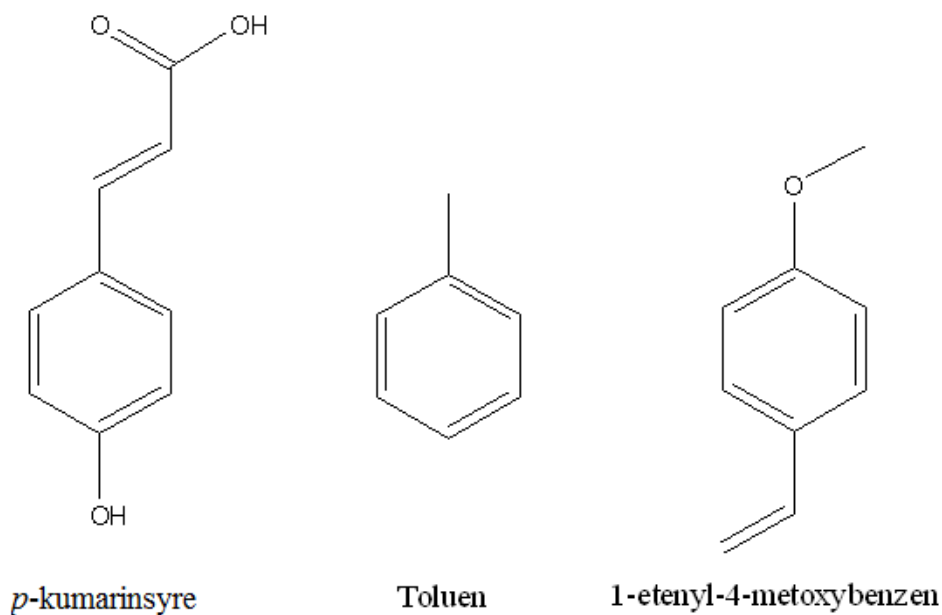
5.2.2 Andre forbindelser som kan brukes som *para*-kumarinsyre

Hittil i oppgaven har det vært mye fokus på *p*-kumarinsyre og hvordan den responderer på UV-B-stråling. I neste steg kan det være interessant å finne ut om det er andre forbindelser som fungerer på samme måte som *p*-kumarinsyre og kan brukes til samme formål. For å finne ut av dette er det her sett på korrelasjon basert på dataene fra termokjemolyse-GC-MS-analysen. Tabell 4.3 viser korrelasjonene mellom forbindelsene som er funnet i *Pinus* spp.-pollen og innkommende UV-B-stråling.

Tabellen viser at det er toluen, 1-etenyl-4-metoxybenzen, *para*-kumarinsyre 1 og *para*-kumarinsyre 2, med henholdsvis korrelasjoner på 0,828, 0,632, 0,719 og 0,612, som har de høyeste korrelasjonene med UV-B. Dette er alle aromatiske forbindelser, som ut fra sin struktur, har større kapasitet til å absorbere UV-B enn alifatiske syrer (Fraser *et al.*, 2011). Den høye korrelasjonen mellom *p*-kumarinsyre og UV-B styrker tidligere studier som også har funnet en slik sammenheng (Rozema *et al.*, 2001; Blokker *et al.*, 2006; Lomax *et al.*, 2008). Det er interessant å se at de fleste av de alifatiske syrene også har en positiv korrelasjon til UV-B. Zimmerman og Kohler utførte i 2014 en studie basert på FT-IR-analyser som tok for seg over 300 plantearter. Resultatene viste at det var store variasjoner i det relative innholdet av triglyserider. Forskjellene kunne være så store som ti ganger mellom to arter fra samme slekt, selv om artene vokste på samme lokalitet under de samme miljøbetingelsene. Samme studie viste også årlige variasjoner i innholdet av lipider i pollen, inkludert en klar korrelasjon med klimadata. Undersøkelsene ble gjort i sesongene 2011, 2012 og 2013, der det var et varmere klima i 2011 og 2013 og et kaldere klima i 2012. Det ble funnet en negativ korrelasjon mellom innhold av lipider og temperatur, der kaldt vær ga høyere produksjon av lipider i pollen. På bakgrunn av dette er det kanskje ikke så rart at også de alifatiske syrene har en positiv korrelasjon til UV-B.

Toluen og 1-etenyl-4-metoxybenzen, figur 5.1, har begge positiv korrelasjon med UV-B på lik linje med *p*-kumarinsyre. Ved å sammenligne strukturformlene til *p*-kumarinsyre og de to forbindelsene kan det være termokjemolysen som har ført til dannelsen av toluen og 1-etenyl-

4-metoxybenzen ut fra *p*-kumarinsyre og lignende forbindelser. Både toluen og 1-etenyl-4-metoxybenzen kan derfor brukes på samme måte som *p*-kumarinsyre.



Figur 5.1: Strukturformler til *p*-kumarinsyre, toluen og 1-etenyl-4-metoxybenzen.

Tabell 4.3 viser også forbindelsenes korrelasjoner med UV-B der kun populasjoner med *P. sylvestris* er inkludert. Toluen har nok en gang høyest korrelasjon med UV-B (0,766), mens forbindelsene med høyest korrelasjon etter toluen er oljesyre (0,724), linolsyre 2 (0,664) og linolsyre 3 (0,637), altså alifatiske syrer. Dette strider mot Fraser *et al.* (2011) sitt funn om at alifatiske syrer har lavere kapasitet til å absorbere UV-B enn aromatiske forbindelser. På en annen side, styrker dette funnet til Zimmerman og Kohler (2014) om at også andre miljøfaktorer utover UV-B-stråling har noe å si for innholdet av forbindelser i pollen. I tillegg er det verdt å merke seg at *para*-kumarinsyre 2 har negativ korrelasjon med UV-B, noe som strider imot hva som er funnet tidligere.

Selv om det her er fokus på at det er UV-B-eksponeringen som påvirker mengden av UV-B-absorberende forbindelser, er det viktig å tenke på at det i naturen også er andre faktorer som kan spille inn. Eksempler på dette er temperatur, nedbør, luftfuktighet, samt tilgjengeligheten av vann og næringsstoffer. Basert på innendørseksperimenter er det utført regresjonsanalyser på miljøfaktorene temperatur, nedbør og luftfuktighet. Resultatene viste at det ikke ble funnet signifikant korrelasjon mellom UV-B-absorberende forbindelser og disse miljøfaktorene (Lomax *et al.*, 2008; Rozema *et al.*, 2009). I eksperimenter utført utendørs, kan imidlertid disse

miljøfaktorene ikke unngås, slik det er funnet i studiene til Zimmerman og Kohler (2014) angående temperatur som beskrevet over.

Det finnes også andre miljøparametere som samvarierer med UV-B-innstråling. For eksempel øker UV-B-strålingen med 15% per 1000 høydemeter (Lomax *et al.*, 2012), med en økning av UV-B-absorberende forbindelser med en økende høydegradient (Searles *et al.*, 2001; Watson *et al.*, 2007). Den høydebaserte sammenhengen skyldes atmosfærens fysiske egenskaper, overflatealbedo og veilengden til den innkommende strålingen (Lomax *et al.*, 2015).

5.3 Multivariat analyse

5.3.1 Prinsipalkomponentanalyse (PCA)

Det er utført prinsipalkomponentanalyse (PCA) på alle data, både basert på termokjemolyse-GC-MS og FT-IR. Med tanke på PCA-plottene basert på termokjemolyse-GC-MS, figur 4.10 og 4.11, går det til en viss grad å bruke skårplott til å skille mellom pollendata fra de nordligste og sørligste stedene. Ladningsplottene kan tolkes på en slik måte at prinsipalkomponent 1 (PC 1) baserer seg på UV, mens prinsipalkomponent 2 (PC 2) baserer seg på en annen variabel, kanskje næring.

PCA-plottet basert på FT-IR, figur 4.16, viser at det er vanskeligere å skille stedene fra hverandre, sammenlignet med plottene basert på termokjemolyse-GC-MS, men det er allikevel et lite skille mellom nordlige og sørlige steder. Begge metodene viser også at Tenerife (T) og Aten botanisk hage (Q) skiller seg ut fra de andre stedene. Det kan altså se ut som om mye av den samme informasjonen ligger i PCA-plottene for termokjemolyse-GC-MS og FT-IR.

5.3.2 Delvis minste kvadraters metode (PLS) basert på termokjemolyse-GC-MS

Ved å utføre PLS på pollendataene er det ønskelig å lage modeller som kan si noe om UV-B-stråling basert på de målte verdiene for de forbindelsene som er funnet i *Pinus*-spp.-pollen. Det er her laget modeller der predikert UV-B-verdi er plottet mot målt UV-B-verdi. Modellene som her blir vist er basert på best mulig korrelasjonskoeffisient, og det er ikke tatt hensyn til at den er basert på flere *Pinus*-arter, som har ulik pollenstørrelse og ulik produksjon av *p*-kumarinsyre.

Etter å ha bygget et stort antall PLS-modeller basert på pollendataen som er analysert med termokjemolyse-GC-MS er det kommet fram til at den beste modellen for å predikere UV-B-

stråling er en modell der alle *Pinus*-artene er inkludert og der dataene er normalisert med hensyn på den indre standarden, og i tillegg er standardisert og sentrert.

I denne modellen er tre variabler fjernet; ukjent 2, ukjent 3 og stearinsyre. Alle variablene kan ses i tabell 4.3, og modellen kan ses i figur 5.2. Tabell 4.6 viser at forklart varians i x er 73,31% og forklart varians i y er 71,50% for 1. komponent. CsvSD er 0,95 og korrelasjonskoeffisienten, R^2 , er 0,715. I kjemisk sammenheng er ikke dette en høy korrelasjon, men det er på en annen side vist at det går an å lage en modell som kan predikere UV-B-stråling til en viss grad. Residualene i figur 5.3 viser at den høyeste residualen er verdien 6379 Jm^{-2} , som tilhører Siurana. Dette tilsvarer en prediksjonsfeil på 57,13%. De vektete regresjonskoeffisientene i figur 5.4 viser en oversikt over de variablene som er viktige for å bygge modellen. Figuren viser at *p*-kumarinsyre er positivt korrelert til UV-B-stråling, slik som tidligere beskrevet.

Modellene som ikke er vist her er vist i appendiks C1.

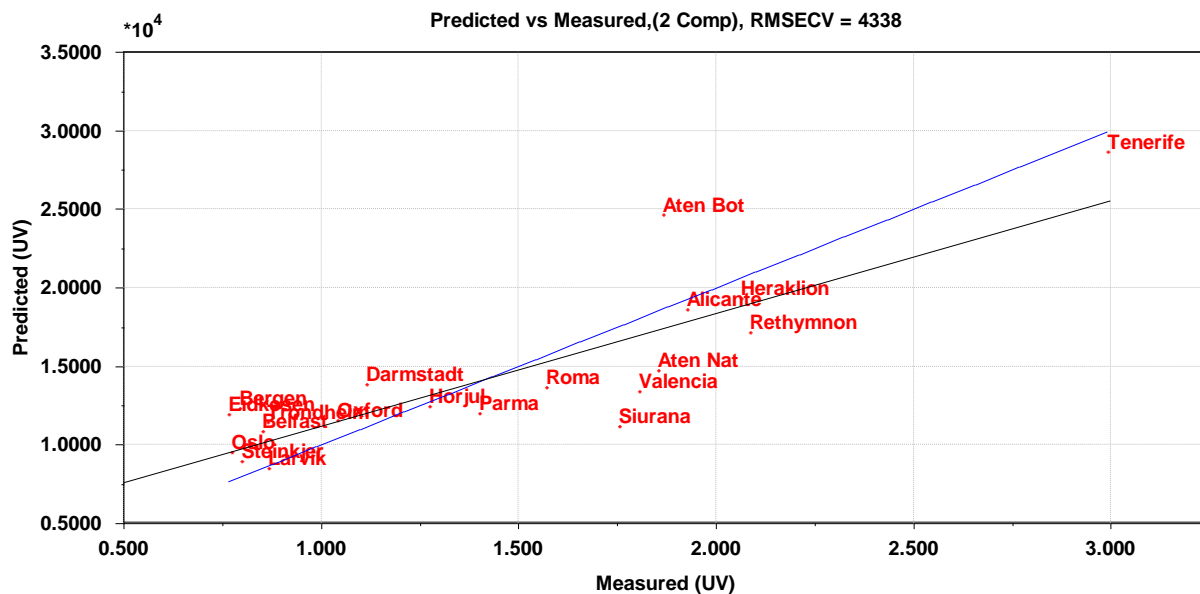
Den beste modellens funksjon er:

Ligning (5.1) Basert på vektete variabler:

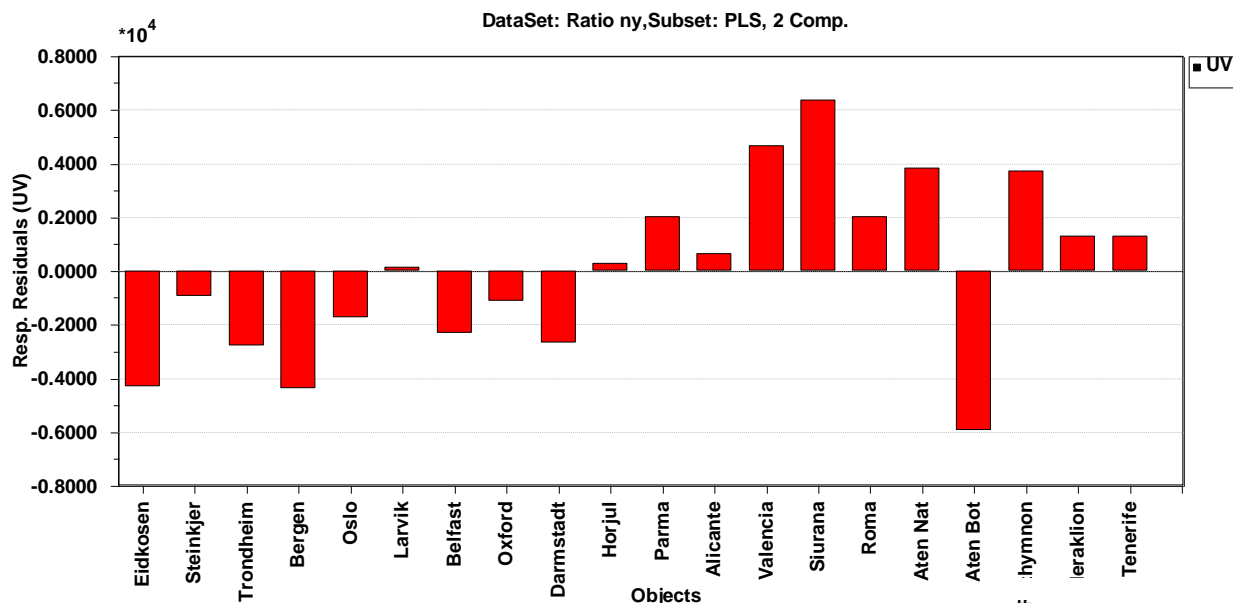
$$\begin{aligned} \text{UV} = & -1,29 + 0,21*\text{Toluen} + 0,13*\text{Metylbenzoat} + 0,09*1\text{-etenyl-4-} \\ & \text{metoxybenzen} + 0,23*\text{para-kumarinsyre 1} + 0,16*\text{para-kumarinsyre 2} + \\ & 0,02*\text{Palmitinsyre} + 0,09*\text{Oljesyre} - 0,01*\text{Linolsyre 1} + 0,02*\text{Linolsyre 2} + \\ & 0,02*\text{Linolsyre 3} + 0,04*\text{Behensyre} + 0,09*\text{Lignoserinsyre} \end{aligned}$$

Ligning (5.2) Basert på faktiske variabler:

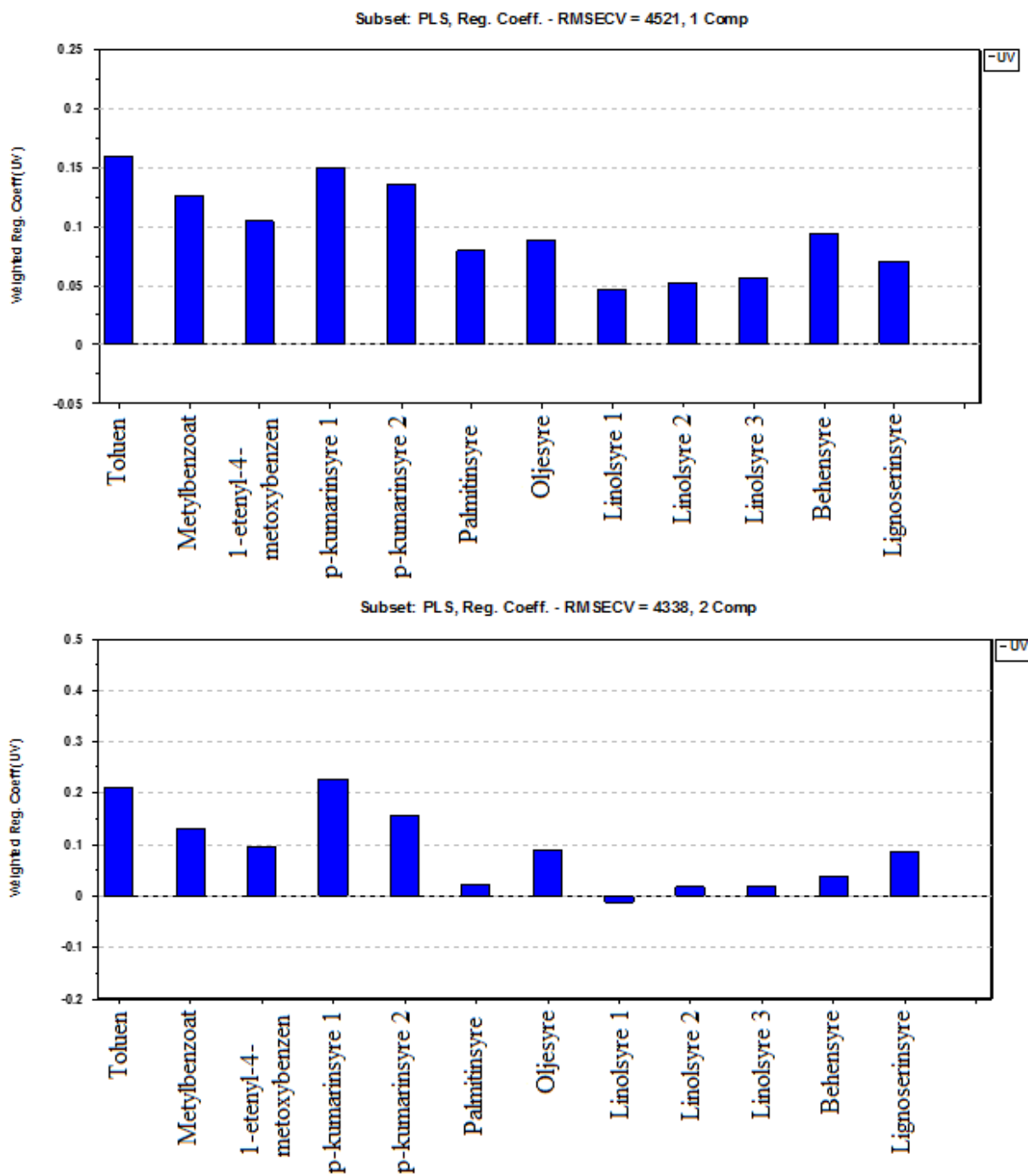
$$\begin{aligned} \text{UV} = & -7896 + 16334*\text{Toluen} + 55643*\text{Metylbenzoat} + 16078*1\text{-etenyl-4-} \\ & \text{metoxybenzen} + 41310*\text{para-kumarinsyre 1} + 4816*\text{para-kumarinsyre 2} + \\ & 493*\text{Palmitinsyre} + 1109*\text{Oljesyre} - 892*\text{Linolsyre 1} + 1435*\text{Linolsyre 2} + \\ & 2765*\text{Linolsyre 3} + 15706*\text{Behensyre} + 26013*\text{Lignoserinsyre} \end{aligned}$$



Figur 5.2: Predikert mot målte UV-B-data med en komponent basert på GC-data, der alle *Pinus*-arter er inkludert. Trendlinjen, svart linje, er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,715x + 4043,610$, $R^2 = 0,715$, korrigert $R^2 = 0,681$.



Figur 5.3: Residualene til objektene for modellen i figur 5.2 basert på GC-data.

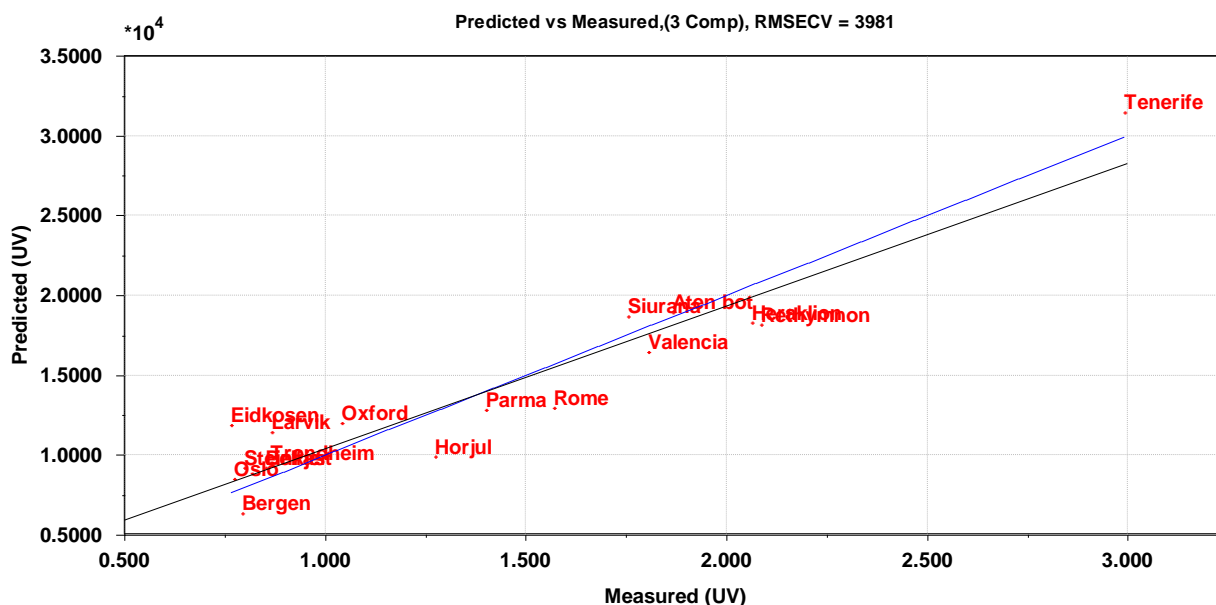


Figur 5.4: Vektete regresjonskoeffisienter for komponent 1 (øverst) og komponent 2 (nederst) for modellen i fig 5.2 basert på GC-data.

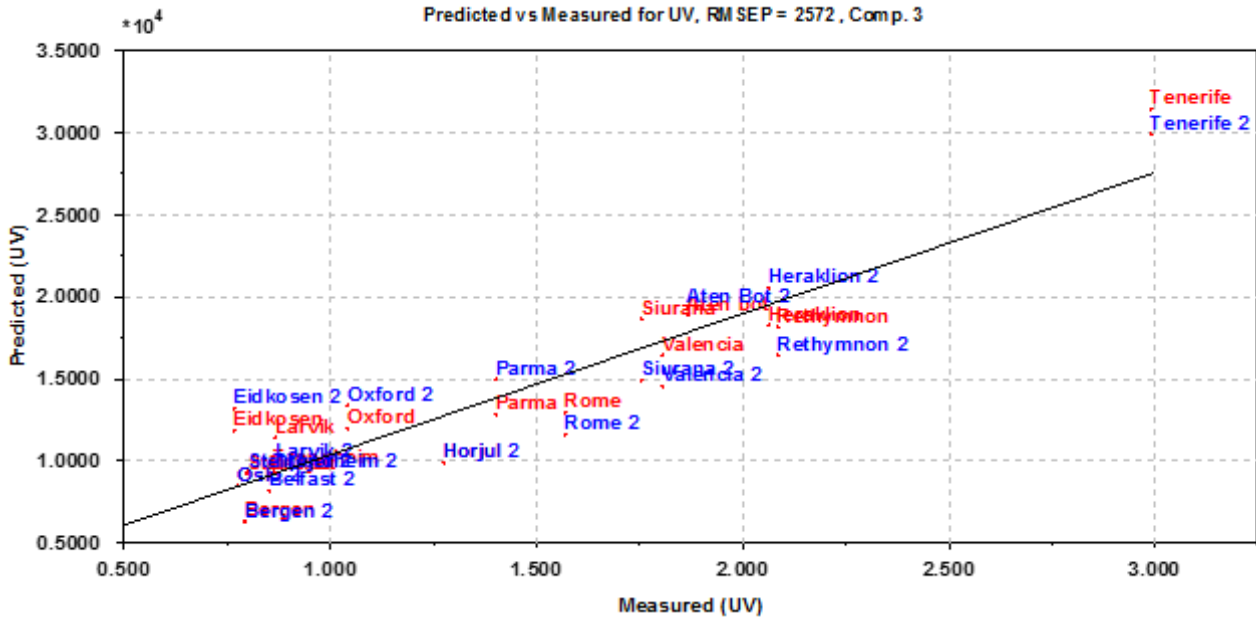
5.3.3 Delvis minste kvadraters metode (PLS) basert på FT-IR

Etter mye eksperimentering er det kommet fram til at den beste modellen for å predikere UV-B-stråling basert på FT-IR-data er modellen der alle arter er inkludert og datasettet er standardisert, se figur 5.5. Det er fjernet tre objekter, Alicante, Aten nasjonal hage og Darmstadt, på grunn av støy, som kan være forårsaket av vanndamp. I tillegg er det kun variabler i bølgetallområdene $3303\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$ og $1860\text{--}640\text{ cm}^{-1}$ som er inkludert. Fra tabell 4.9 gir den beste modellen en forklart varians på 71,60% i x og 89,23% i y for tre komponenter og en C_{sv}SD på 0,94. Med en korrelasjonskoeffisient på 0,892 er det vist at det er mulig å lage en modell som kan predikere UV-B-stråling. I figur 5.6 er valideringssettet satt inn i modellen for kalibreringssettet. Dette er for å se hvordan valideringssettet passer inn i modellen som er bygget. Den røde fargen representerer kalibreringssettet og den blå fargen representerer valideringssettet. Den høyeste prediksjonsfeilen i valideringssettet er på 72,94% og tilhører Eidkosen. Figur 5.7 viser residualene til objektene for modellen og viser at den største residualen er -4227 Jm^{-2} for Eidkosen. Dette tilsvarer en prediksjonsfeil på 55,26%.

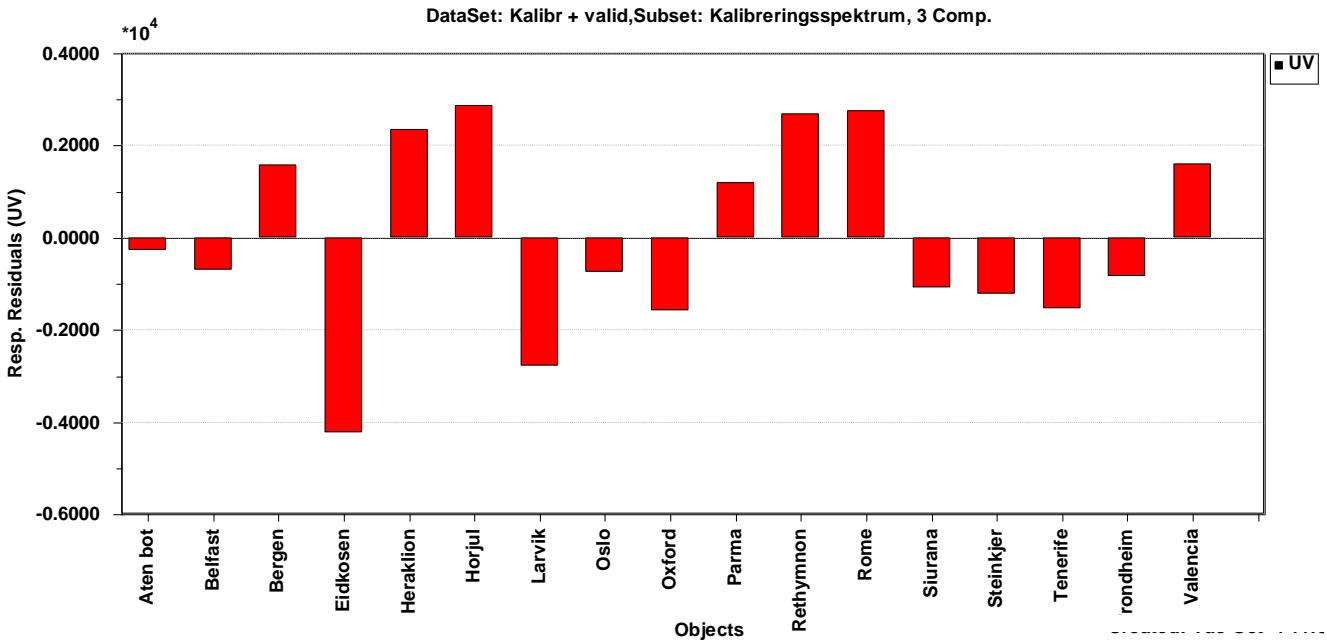
Modellene som ikke vises her er vist i appendiks C2.



Figur 5.5: Predikert mot målte UV-B-data med tre komponenter basert på FT-IR-data, der alle *Pinus*-arter er inkludert. Trendlinjen, svart linje, er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,892x + 1492,384$, $R^2 = 0,892$, korrigert $R^2 = 0,868$.

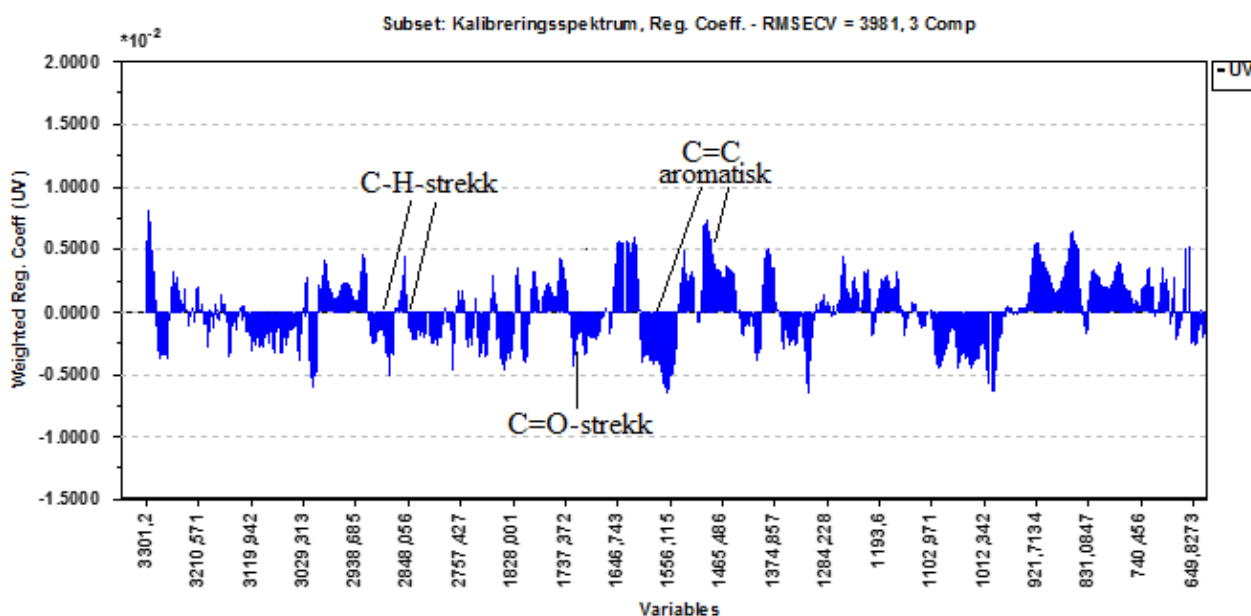


Figur 5.6: Predikert mot målte UV-B-data med tre komponenter basert på FT-IR-data fra både kalibreringssettet og valideringssettet. Rød farge representerer kalibreringssettet og blå farge representerer valideringssettet. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,860x + 1782,115$, $R^2 = 0,861$, korrigert $R^2 = 0,849$.



Figur 5.7: Residualene til objektene for modellen i figur 5.5 basert på FT-IR-data.

Figur 5.8 viser de vektete regresjonskoeffisientene til modellen, og viser hvilke variabler som er viktige for å bygge modellen. Ut fra denne figuren kan det ses at det ikke er noen spesielle topper som skiller seg ut som viktigere enn andre. Figuren inneholder områder med raske endringer fra positiv til negativ, noe som tyder på støy og som gjør tolkningen av spekteret vanskeligere. Det er imidlertid forsøkt å tolke de områdene der det er funnet funksjonelle grupper for *Pinus* spp.-pollen. Som ventet er området for aromatisk C=C, som befinner seg rundt 1511 cm^{-1} , positivt korrelert med UV. Dette er imidlertid ikke tilfelle for den andre toppen for aromatisk C=C, ved 1602 cm^{-1} , som er negativt korrelert med UV. Områdene for C-H-strekk ved 2915 cm^{-1} og 2850 cm^{-1} , og området for C=O-strekk fra ester, ved 1731 cm^{-1} , er alle negativt korrelert.



Figur 5.8: Vektete regresjonskoeffisienter for modellen i figur 5.5 basert på FT-IR-data etter en førstegradsderivering.

5.3.4 Sammenligning av PLS-modeller laget ved termokjemolyse-GC-MS og FT-IR

Som vist i delkapitlene 5.3.2 og 5.3.3 kan PLS-modeller for prediksjon av UV-B bygges basert på data fra både termokjemolyse-GC-MS-analyse og FT-IR-analyse. De beste modellene er vist i figur 5.2 og 5.5 basert på henholdsvis termokjemolyse-GC-MS-data og FT-IR-data. En sammenligning av disse modellene viser at den beste korrelasjonskoeffisienten finnes hos

modellen i figur 5.5; 0,892 mot 0,715 for modellen i figur 5.2. Modellen basert på termokjemolyse-GC-MS-data samler objektene lengst nord, til venstre i figuren, bedre enn modellen basert på FT-IR-data. For objektene lenger sør, midten av figuren, er det modellen basert på FT-IR-data som samler objektene best. Ved å se på prediksjonsfeilene for de to modellene har modellen i figur 5.2 (basert på GC-data) en gjennomsnittsfeil på 23,13% og en maksimumsfeil på 57,14%. De samme feilene for modellen basert på FT-IR er henholdsvis 16,50% og 55,26%.

5.4 Sammenligning av termokjemolyse-GC-MS og FT-IR

5.4.1 Termokjemolyse-GC-MS som metode

Som metode er termokjemolyse-GC-MS både tidskrevende og dyr, men den gir, på en annen side, en omfattende analyse av komponentene som inngår i pollen, og da også sporpollenin. Med en god karakterisering av de ulike fenolforbindelsene i pollenprøvene, kan metoden brukes til å spore opp biokjemiske endringer som kan si noe om hvordan komponentene responderer på UV-B-stråling.

En stor utfordring ved termokjemolyse-GC-MS er kvantifiseringen av *p*-kumarinsyre og ferulsyre. Dette er på grunn av at fenolsyrene er en del av en makromolekylstruktur med stor variasjon i intermolekylære bindinger. Det er derfor usannsynlig at *p*-kumarinsyre og ferulsyre vil ende opp kun som intakte monomerer etter en pyrolyse. I tillegg til *p*-kumarinsyre og ferulsyre vil variasjonen gi andre pyrolysefragmenter, og ulik grad av polymerisering eller bindingstyper vil gi varierende mengde *p*-kumarinsyre og ferulsyre (Blokker *et al.*, 2005). Seddon *et al.* (under evaluering) har utviklet en metode for å gjøre kvantifiseringen bedre. Metoden går ut på å tilsette en kjent mengde indre standard til prøvene før analysen, for så å normalisere toppen fra *p*-kumarinsyre med hensyn på toppen fra den indre standarden. For å teste metoden ble det laget fem kalibreringsløsninger med ulike konsentrasjonsforhold av indre standard (nonadekansyre) og *p*-kumarinsyre. Løsningene gikk gjennom termokjemolyse-GC-MS i «full scan mode», og deretter undersøkt om ulike konsentrasjonsforhold mellom representative ioner (m/z 161 og 192-ioner for *p*-kumarinsyre; m/z 74, 87 og 312-ioner for indre standard) ga lavere relativt standardavvik (RSD) enn råverdiene for de representative ionene til *p*-kumarinsyre. Resultatene viste at den laveste RSD ble funnet når m/z 161-ionet (*p*-kumarinsyre) ble normalisert med hensyn på m/z 74-ionet (indre standard) (RSD mellom 1,1-4,0%). RSD for råverdiene til m/z 161 for *p*-kumarinsyre var gjennomsnittlig 8,3% og for m/z

192 gjennomsnittlig 8,9%. Dette betyr en dobling av analytisk presisjon for en normalisering med hensyn på indre standard sammenlignet med direkte bruk av råverdiene.

Resultatene for kvantifiseringen av *p*-kumarinsyre i denne oppgaven viser at en normalisering av rådataene med hensyn på den indre standarden ikke gir en like stor forbedring i analytisk presisjon som ble vist i studien til Seddon *et al.* (under evaluering). Her ble det kun en forbedring på 12,8%. Et tilbakeblikk på figur 4.4 i resultatene for reproduserbarhet viser en trend der det er en økning i forholdet mellom *p*-kumarinsyre og indre standard i sykler på tre prøver. Prøvene ble kjørt med ulike mengder (0,1µl, 0,2µl og 0,3µl), men alle er regnet om til å gjelde 0,1µl. De ulike mengdene kan være en årsak til trenden med sykler på tre prøver, og hvorfor den analytiske presisjonen ikke ble forbedret ytterligere. Det er imidlertid uklart hvorfor de ulike mengdene fører til sykler på tre i figur 4.4.

5.4.2 FT-IR som metode

FT-IR-spektroskopi er en metode som ikke krever kjemisk forbehandling av prøvene. Dette er en fordel siden flere trinn i en forbehandling introduserer flere feil i analysen. I tillegg til dette er metoden rask og billig, og kan utføres på et lite antall pollenkorner. I følge Zimmerman *et al.* (2015) har FT-IR-spektroskopi potensiale for en automatisering av pollenidentifisering.

En utfordring ved metoden, når den utføres på pollen, er at pollenkorner har en stor morfologisk variasjon innen samme pollenprøve. Pollenkornerne har ulike former og har en inhomogen struktur. De har et multicellulært indre som består av cytoplasma, organeller, vakuoler, membraner og kjerne. På grunn av dette er det vanskelig å klassifisere pollentyper ut fra enkle pollenkorner (Zimmerman *et al.*, 2015). *Pinus* spp.-pollen, som er brukt i denne oppgaven, er ikke sfæriske og retningen på hvordan pollenkornerne ligger under analysen har noe å si for hvordan det endelige FT-IR-spekteret blir. For å løse dette problemet er det tatt opp spekter fra mellom 60-70 ulike pollenkorner per pollenprøve, for deretter å finne et gjennomsnittsspektrum.

6. Konklusjon

Kvantifisering av *p*-kumarinsyre ved hjelp av termokjemolyse-GC-MS basert på data der alle de tre *Pinus*-artene er inkludert viser en trend der mengden *p*-kumarinsyre øker med økt eksponering av UV-B-stråling. På grunn av ulik pollenstørrelse og ulik produksjon av *p*-kumarinsyre hos *Pinus*-artene, er det kommet fram til at sammenhengen mellom *p*-kumarinsyre og UV-B-stråling blir beskrevet riktigere dersom bare én *Pinus*-art studeres. Sammenhengen blir imidlertid minimal dersom det kun er data fra populasjoner med *Pinus sylvestris* som er inkludert. En potensiell forklaring på dette kan være at det ble brukt data for årlig inntak av UV-B-stråling, i stedet for data som er tatt to uker før plantenes blomstring, da produksjonen av *p*-kumarinsyre er størst.

Ved bruk av FT-IR viser kvantifiseringen av forholdet mellom det aromatiske signalet (C=C) og OH-signalet en trend der (C=C)/(OH)-forholdet minker med økende inntak av UV-B-stråling. Dette kan tyde på at denne form for kvantifisering ikke er tilstrekkelig når det utføres på *Pinus* spp.-pollen.

Det er funnet 28 ulike forbindelser i pollenprøvene som inneholder pollen fra *Pinus* spp. Det er funnet både aromatiske og fettsyreforbindelser, der *p*-kumarinsyre finnes blant de aromatiske forbindelsene. Fettsyreforbindelsene som er funnet er de mettede fettsyrene med karbontall C8-C24 og de umettede fettsyrene oljesyre (18:1) og linolsyre (18:2). Ved å bruke korrelasjon mellom forbindelsene som er funnet og UV-B er det kommet fram til at toluen og 1-etenyl-4-metoksybenzen kan brukes på samme måte og til samme formål som *p*-kumarinsyre.

Multivariat modellering på både GC-profilene og FT-IR-profilene har avslørt at det er mulig å lage modeller som kan predikere UV-B-stråling til en viss grad. Selv om termokjemolyse-GC-MS gir en mer omfattende analyse av komponentene i sporopollenin, er det likevel mye informasjon å finne i dataene fra FT-IR-analysen, ettersom det er mulig å lage bedre modeller basert på disse.

En sammenligning av termokjemolyse-GC-MS og FT-IR viser at termokjemolyse-GC-MS er både tidskrevende og dyr i forhold til FT-IR. Metoden gir imidlertid en bedre karakterisering av de ulike fenolforbindelsene, der FT-IR bare gir de funksjonelle gruppene som er tilstede i prøven. Begge metodene har utfordringer som bør undersøkes for at bestemmelsen av kjemisk variasjon i sporopollenin skal bli bedre.

7. Videre arbeid

I løpet av arbeidet med oppgaven har det dukket opp nye problemstillinger som det ikke har vært mulig å gjøre noe med innen rammen av oppgaven. Forslag for videre arbeid med oppgaven presenteres i dette avsnittet.

Siden de tre *Pinus*-artene som er brukt i denne oppgaven har store variasjoner i både størrelse og mengde *p*-kumarinsyre som produseres, kan videre arbeid være å prøve å korrigere for pollenstørrelsene. Utover dette er det kanskje best å konsentrere seg om kun én art for å unngå disse forskjellene. For å styrke resultatene vil det også være lurt å analysere flere pollenprøver per sted.

Det har også kommet fram at den største produksjonen av *p*-kumarinsyre skjer de to siste ukene før blomstring, og videre arbeid her kan være å bytte ut data fra den årlige UV-B-strålingen med data fra UV-B-stråling som gjelder de to siste ukene før plantenes blomstring.

I tillegg kan ulike problemstillinger rundt strukturen til sporopollenin være av interesse, siden sammensetningen av sporopollenin ikke er fullstendig kartlagt.

Siden det her kun er utført analyser på ferske pollenkorner, kan det i neste omgang være interessant å utføre analysene på fossilt pollen.

Et videre steg for prediksjonsmodellene som er laget, kan være å slå sammen de to datasettene for termokjemolyse-GC-MS og FT-IR for å se hvordan de korrelerer med hverandre.

Det finnes også andre typer pyrolyse-GC-enheter enn det som ble brukt i denne oppgaven, for eksempel «Curie point»-pyrolyse. Det kan være interessant å teste ut andre enheter for å se om det har noe å si for resultatene.

8. Referanser

Aarnes, H. (2014) *Derivasjon*, Universitetet i Oslo. Sett 25.10.16. Hentet fra:

<http://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/tall/derivasjon.pdf>

al Sandouk-Lincke, N. A.; Schwarzbauer, J.; Hartkopf-Froder, C.; Volk, H.; Fuentes, D.; Young, M.; Littke, R. (2014) The effect of different pyrolysis temperatures on organic microfossils, vitrain and amber-A comparative study between laser assisted- and Curie Point-pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 107, 211-223.

Beerling, D. J.; Harfoot, M.; Lomax, B.; Pyle, J. A. (2007) The stability of the stratospheric ozone layer during the end-Permian eruption of the Siberian Traps, *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 365(1856), 1843-1866.

Blokker, P.; Boelen, P.; Broekman, R.; Rozema, J. (2006) The occurrence of p-coumaric acid and ferulic acid in fossil plant materials and their use as UV-proxy, *Plant Ecology*, 182(1-2), 197-207.

Blokker, P.; Yeloff, D.; Boelen, P.; Broekman, R.; Rozema, J. (2005) Development of a proxy for past surface UV-B irradiation: A thermally assisted hydrolysis and methylation py-GC/MS method for the analysis of pollen and spores, *Analytical Chemistry*, 77(18), 6026-6031.

Challinor J. M. (1996) A rapid pyrolysis derivatisation gas chromatography- mass spectrometry method for profiling of fatty acids in trace quantities of lipids, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 37(2), 185-197.

Challinor, J. M. (2001) Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 61(1-2), 3-34.

de Leeuw, J. W.; Versteegh, G. J. M.; van Bergen, P. F. (2006) Biomacromolecules of algae and plants and their fossil analogues. *Plant Ecology*, 41, 209-233.

Fraser, W. T.; Lomax, B. H.; Jardine, P. E.; Gosling, W. D.; Sephton, M. A. (2014b) Pollen and spores as a passive monitor of ultraviolet radiation, *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2:12.

Fraser, W. T.; Sephton, M. A.; Watson, J. S.; Self, S.; Lomax, B. H.; James, D. I.; Wellman, C. H.; Callaghan, T. V.; Beerling, D. J. (2011) UV-B absorbing pigments in spores: biochemical responses to shade in a high-latitude birch forest and implications for sporopollenin-based proxies of past environmental change, *Polar Research*, 30, 8312.

Fraser, W. T.; Sephton, M. A.; Watson, J. S.; Lomax, B. H.; Harrington, G.; Gosling, W. D.; Self, S. (2014a) Changes in spore chemistry and appearance with increasing maturity, *Review of Palaeobotany and Palynology*, 201, 41-46.

Glynn, E. F. (2007) *Mixtures of Gaussians*, Stowers Institute for Medical Research. Sett 25.10.16. Hentet fra:

<http://research.stowers-institute.org/efg/R/Statistics/MixturesOfDistributions/>

Greibrokk, T.; Lundanes, E.; Rasmussen, K. E. (1998) *Kromatografi*, Oslo, Universitetsforlaget.

Harris, D. C. (2010) *Quantitative Chemical Analysis*. 8. edition, New York, W. H. Freeman and Company.

Helleur, R.; Shadkani, F. (2010) Recent applications in analytical thermochemolysis, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 89(1), 2-16.

Jardine, P. E.; Fraser, W. T.; Lomax, B. H.; Gosling, W. D. (2015) The impact of oxidation on spore and pollen chemistry, *Journal of Micropalaeontology*, 34, 139-149.

Jokerud, M.; Seddon, A. W. R; Barth, T.; Birks, J. B.; Bjune, A. E.; Willis, K. J.; Vandvik, V. (innsendt a) Pollen chemistry and UV-B radiation: Determining the temporal window of response in *Pinus sylvestris* along a latitudinal gradient in Europe, *Proceedings of the Royal Society B*.

Jokerud, M.; Seddon, A. W. R; Chipperfield, J. D.; Willis, K. J.; Vandvik, V. (innsendt b) Plastic responses and species-level variation of UV-B absorbing compounds in *Pinus* spp. to short-term variation in UV-B radiation, *New Phytologist*.

Jolliffe, I. T. (1986) *Principal Component Analysis*, New York, Springer-Verlag.

LabScientific Inc. Concavity Slides. Sett 09.11.16. Hentet fra:

<http://labscientific.com/Histology/Microscope-Slides/Concavity-Slides/>

Lee, C. S.; Sung, T. M.; Kim, H. S.; Jeon, C. H. (2012) Classification of forensic soil evidences by application of THM-PyGC/MS and multivariate analysis, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 96, 33-42.

Lomax, B. H.; Fraser, W. T. (2015) Palaeoproxies: botanical monitors and recorders of atmospheric change, *Palaeontology*, 58(5), 759-768.

Lomax, B. H.; Fraser, W. T.; Harrington, G.; Blackmore, S.; Sephton, M. A.; Harris, N. B. W. (2012) A novel palaeoaltimetry proxy based on spore and pollen wall chemistry, *Earth and Planetary Science Letters*, 353, 22-28.

Lomax, B. H.; Fraser, W. T.; Sephton, M. A.; Callaghan, T. V.; Self, S.; Harfoot, M.; Pyle, J. A.; Wellman, C. H.; Beerling, D. J. (2008) Plant spore walls as a record of long-term changes in ultraviolet-B radiation, *Nature Geoscience*, 1(9), 592-596.

Martin, F.; Delrio, C.; Gonzalezvila, F. J.; Verdejo, T. (1995) Thermally assisted hydrolysis and alkylation of lignins in the presence of tetra-alkylammonium hydroxides, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 35(1), 1-13.

Miller, J. M. (2005) *Chromatography. Concepts and Contrasts*. 2. edition. Hoboken, New Jersey. John Wiley & Sons, Inc.

Moore, D. S.; McCabe, G. P.; Craig, B. A. (2012) *Introduction to the Practice of Statistics*, 7. edition, W.H. Freeman and Company.

Nortvedt, R.; Brakstad, F.; Kvalheim, O. M.; Lundstedt, T. (1996) *Anvendelse av kjemometri innen forskning og industri*, Tidsforlaget Kjemi AS.

Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. (2015) *Introduction to Spectroscopy*. 5. edition. Cengage Learning.

Pharmallerga, *Pinus sylvestris*. Sett 05.11.16. Hentet fra:

<http://www.pharmallerga.com/gallery.html>

Rozema, J.; Blokker, P.; Fuertes, M. A. M.; Broekman, R. (2009) UV-B absorbing compounds in present-day and fossil pollen, spores, cuticles, seed coats and wood: evaluation of a proxy for solar UV radiation, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 8(9), 1233-1243.

Rozema, J.; Broekman, R. A.; Blokker, P.; Meijkamp, B. B.; de Bakker, N.; van de Staaij, J.; van Beem, A.; Ariese, F.; Kars, S. M. (2001) UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopollenin: the perspective to track historic UV-B levels, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 62(1-2), 108-117.

Searles, P. S.; Flint, S. D.; Caldwell, M. M. (2001) A meta analysis of plant field studies simulating stratospheric ozone depletion, *Oecologia*, 127(1), 1-10.

Seddon, A. W. R.; Jokerud, M.; Barth, T.; Birks, J. B.; Vandvik, V.; Willis, K. J. (under evaluering) An adapted protocol for reconstructions of surface UV-B irradiance using Thermally Assisted Hydrolysis of *Pinus sylvestris* pollen, *Review of Palaeobotany & Palynology*.

SIRIUS™, Pattern Recognition System AS (PRS AS). (2004) Versjon 10.0. Hentet fra:

<http://www.prs.no/Sirius/Sirius.html>

Smith, L. I. (2002) *A tutorial on Principal Components Analysis*. Sett 12.10.16. Hentet fra:

http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf

Steevens, P.; Lepot, K.; Marshall, C. P.; Le Herisse, A.; Javaux, E. J. (2010) FTIR characterisation of the chemical composition of Silurian miospores (cryptospores and trilete spores) from Gotland, Sweden, *Review of Palaeobotany and Palynology*, 162(4), 577-590.

Watson, J. S.; Sephton, M. A.; Sephton, S. V.; Self, S.; Fraser, W. T.; Lomax, B. H.; Gilmour, I.; Wellman, C. H.; Beerling, D. J. (2007) Rapid determination of spore chemistry using thermochemolysis gas chromatography-mass spectrometry and micro-Fourier transform infrared spectroscopy, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(6), 689-694.

Williams, D.; Fleming, I. (2008) *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. 6. edition. McGraw-Hill Higher Education.

Willis, K. J.; Bennett, K. D.; Birks, H. J. B. (2009) Variability in thermal and UV-B energy fluxes through time and their influence on plant diversity and speciation, *Journal of Biogeography*, 36(9), 1630-1644.

Willis, K. J.; Feurdean, A.; Birks, H. J. B.; Bjune, A. E.; Breman, E.; Broekman, R.; Grytnes, J. A.; New, M.; Singarayer, J. S.; Rozema, J. (2011) Quantification of UV-B flux through time using UV-B-absorbing compounds contained in fossil Pinus sporopollenin, *New Phytologist*, 192(2), 553-560.

Zimmerman, B.; Tafintseva, V.; Bagcioglu, M.; Berdahl, M. H.; Kohler, A. (2015) Analysis of Allergenic Pollen by FTIR Microspectroscopy, *Analytical Chemistry*, 88(1), 803-811.

Zimmerman, B.; Kohler, A. (2014) Infrared Spectroscopy of Pollen Identifies Plant Species and Genus as Well as Environmental Conditions, *Plos One*, 9(4).

9. Appendiks

Appendiks A1 - Datasett med råarealer fra termokjemolyse-GC-MS

Retensjonstid [min]	3,86	9,78	10,77	11,28	11,95	17,44	18,55	21,66	23,72
Forbindelse	Toluen	Ukjent 2	Ukjent 3	Metylbenzoat	1-ethenyl-4-methoxybenzen	p-kumarinsyre 1	p-kumarinsyre 2	Palmitinsyre	Oljesyre
Eidkosen	51038,90	604960,99	82232,39	36516,12	11072,65	21649,34	128875,41	404518,11	204733,49
Steinkjer	45378,85	684242,17	78486,69	33188,19	6366,68	18452,15	121453,13	314995,48	67956,94
Trondheim	52160,89	715530,76	89398,23	34481,44	7181,53	23649,89	130074,98	357617,28	109045,79
Bergen	46951,43	667014,22	76837,19	36129,31	10290,14	26089,41	147688,04	374372,10	140790,01
Oslo	50076,44	616655,02	54838,51	30168,98	9467,84	19329,33	102869,32	392411,33	95574,41
Larvik	46614,36	664702,01	69696,55	33989,14	8861,92	19023,77	113431,78	315533,99	72049,05
Belfast	54022,79	650386,55	82642,20	31079,51	9426,18	20822,06	133390,87	311181,19	84036,36
Oxford	49211,39	688220,55	84065,17	37144,09	13225,53	20809,08	130976,78	539392,74	317091,15
Darmstadt	60950,33	660900,09	78568,00	34528,39	13003,78	21207,68	140503,53	406085,78	194499,03
Horjul	54441,89	639343,56	68973,55	33908,47	11774,57	30209,45	128533,51	423792,01	216965,53
Parma	57496,56	754665,59	103582,46	37728,09	11927,47	25960,46	117772,50	365448,19	164751,41
Alicante	106717,14	687421,12	85483,28	33639,99	15990,12	33899,79	165010,20	480707,82	464116,70
Valencia	55451,21	643843,77	79582,53	35989,99	15430,18	22948,49	125772,98	485495,16	332104,10
Siurana		688160,13	95523,76	36328,76	6306,44	14817,79	85336,19	394487,32	165409,38
Roma	79200,79	649769,11	75359,48	33271,83	10224,19	29163,35	105196,41	515258,73	237761,96
Athen	68288,16	632294,47	62684,45	36259,68	0	27857,49	107775,96	178164,07	119135,02
nasjonal hage									
Athens	107087,40	777439,21	97233,41	48011,82	38719,29	45765,38	286057,66	518628,92	317919,49
botanisk hage									
Rethymnon	74633,63	741991,23	104327,26	35864,54	25687,17	37769,76	219488,51	413716,65	255438,67
Heraklion	68275,29	602388,57	69882,79	31250,12	16978,98	24691,44	147198,05	403671,44	465552,27
Tenerife	117307,19	633029,99	70629,43	43357,03	36040,49	48606,48	290138,29	406160,24	116699,95

Datsett med råarealer fra termokjemolyse-GC-MS fortsetter

Retensjonstid [min]	24,00	24,20	24,29	24,67	25,10	28,01	29,22	UV-B [μm^{-2}]	Breddegrad	Korrigerte verdier for nonadekansyre
	Stearinsyre	Linolsyre 1	Linolsyre 2	Linolsyre 3	Nonadekansyre	Behensyre	Lignoserinnsyre			
Eidkosen	223111,09	47035,83	31895,26	18156,59	266540,29	7913,39	21092,85	7650,32	69,37	278037,51
Steinkjer	190498,43	15921,11	13480,15	8302,64	264120,81	5416,69	13031,81	7977,76	64,02	278097,24
Trondheim	193468,72	26989,92	24451,93	13842,65	255810,68	6147,76	13011,25	8638,64	63,44	272107,13
Bergen	213571,92	36889,73	32746,38	17892,97	270543,64	7927,78	20092,47	7929,87	60,36	284053,55
Oslo	213042,60	22014,47	19400,75	11941,25	262653,15	6668,25	13952,61	7731,14	59,98	274959,90
Larvik	185648,91	13999,78	11300,59	7446,62	266555,03	6135,00	9165,14	8671,00	59,07	282674,94
Belfast	170666,16	24761,53	21373,69	13030,27	2098784,75	7798,71	7214,55	8514,28	55,00	279477,55
Oxford	229903,94	86605,91	77947,34	42073,50	267270,12	7530,55	8760,43	10418,40	51,78	288040,59
Darmstadt	198822,28	43688,41	40093,59	21824,72	263048,03	8711,24	15391,37	11135,52	49,54	270973,08
Horjul	215949,62	55027,68	50427,15	26871,04	280213,99	8893,94	17888,81	12751,08	46,31	295945,87
Parma	183441,40	43789,84	40045,51	20526,99	266626,19	7725,63	13330,72	14011,88	44,62	289236,82
Alicante	208313,23	86339,59	76341,41	41874,04	2834107,09	9954,07	17539,55	19272,63	40,27	276920,50
Valencia	222478,13	45831,99	59494,58	29353,20	256421,36	7333,89	10318,07	18044,64	39,35	271317,07
Siurana	215075,67	33582,14	32407,59	17564,15	269184,79	6471,72	16857,71	17543,39	41,26	268039,93
Roma	253037,00	67152,88	57968,16	32659,99	264152,69	7881,26	12155,17	15702,93	41,89	279655,03
Aten nasjonal hage	238717,15	39354,75	18585,75	147068,96	192049,68	41445,03	4368,16	18544,44	37,98	285206,11
Aten botanisk hage	198276,88	49071,97	43252,31	24342,02	262064,67	15488,39	14093,75	18666,16	38,02	295510,11
Rethymnon	198618,81	39367,19	35897,26	19709,08	259876,38	7143,48	16366,53	20857,72	35,40	293042,55
Heraklion	111581,71	83773,37	67075,28	38345,67	6526617,08	5132,49	9781,14	20645,77	35,20	243162,42
Tenerife	204122,59	16938,83	14668,28	9161,89	236517,15	20191,09	29373,29	29909,88	31,65	266702,15

Appendiks A2 – Datasett der råarealene er normalisert med hensyn på korrigert toppareal for indre standard, termokjemolyse-GC-MS

Retensjonstid [min]	3,86	9,78	10,77	11,28	11,95	17,44	18,55	21,66	23,72
Forbindelse	Toluen	Ukjent 2	Ukjent 3	Metylbenzoat	1-ethenyl-4-methoxybenzen	p-kumarinsyre 1	p-kumarinsyre 2	Palmitinsyre	Oljesyre
Eidkosen	0,17365	2,16614	0,30841	0,12997	0,02406	0,07593	0,45970	1,43307	0,72647
Steinkjer	0,15803	2,46997	0,28164	0,11931	0,02175	0,06594	0,43559	1,12114	0,24040
Trondheim	0,18151	2,62558	0,32529	0,12824	0,02723	0,08653	0,47828	1,32905	0,38645
Bergen	0,15667	2,38086	0,27935	0,12752	0,03476	0,09298	0,52450	1,32459	0,50987
Oslo	0,18255	2,24112	0,19592	0,10994	0,03435	0,07147	0,37566	1,45511	0,35241
Larvik	0,16538	2,44929	0,25396	0,12107	0,02664	0,06608	0,40009	1,10473	0,20884
Belfast	0,21220	2,51061	0,32704	0,12059	0,03415	0,07987	0,51576	1,22443	0,33030
Oxford	0,17387	2,40001	0,29408	0,12796	0,02903	0,07169	0,45543	1,87213	1,10487
Darmstadt	0,22740	2,42197	0,28211	0,13159	0,05074	0,08245	0,53081	1,51524	0,70690
Horjul	0,17175	2,19509	0,24225	0,11771	0,03863	0,10368	0,43530	1,47603	0,75597
Parma	0,18892	2,63293	0,36402	0,13247	0,04050	0,08945	0,40540	1,26591	0,57836
Alicante	0,30219	2,46709	0,30583	0,12467	0,05424	0,12786	0,61119	1,80004	1,71290
Valencia	0,20242	2,38087	0,22293	0,13347	0,04305	0,08469	0,46293	1,79022	1,22087
Siurana		2,57907	0,35937	0,13590	0,02362	0,05509	0,31876	1,46555	0,61656
Roma	0,27455	2,33599	0,27257	0,11926	0,03606	0,10286	0,37372	1,83700	0,84711
Athen nasjonal hage	0,22557	1,91175	0,18018	0,12784	0	0,14701	0,67592	1,13268	0,79677
Athen botanisk hage	0,36212	2,63195	0,32924	0,16233	0,13105	0,15450	0,96630	1,76047	1,07965
Rethymnon	0,25502	2,53180	0,35590	0,12251	0,08776	0,12866	0,74746	1,40880	0,86655
Heraklion	0,34312	2,94932	0,36244	0,15846	0	0,11212	0,65144	1,95929	2,17395
Tenerife	0,43806	2,37366	0,26541	0,16221	0,13494	0,18201	1,08730	1,52273	0,43884

Datsett der råarealene er normalisert med hensyn på korrigert toppareal for indre standard, termokjemolyse-GC-MS, fortsetter

Retensjonstid [min]	24,00	24,20	24,29	24,67	28,01	29,22	UV-B [Jm ⁻²]	Breddegrad
Forbindelse	Stearinsyre	Linolsyre 1	Linolsyre 2	Linolsyre 3	Behensyre	Lignoserinsyre		
Eidkosen	0,77337	0,16353	0,11721	0,06515	0,02761	0,07239	7650,32	69,37
Steinkjer	0,67310	0,05558	0,04690	0,02918	0,01933	0,04612	7977,76	64,02
Trondheim	0,72693	0,09429	0,08524	0,04869	0,02271	0,04935	8638,64	63,44
Bergen	0,74137	0,13080	0,11737	0,06323	0,02700	0,06766	7929,87	60,36
Oslo	0,78299	0,08264	0,07383	0,04432	0,02444	0,05058	7731,14	59,99
Larvik	0,64471	0,03723	0,03074	0,02038	0,02134	0,02718	8671,00	59,07
Belfast	0,67014	0,09835	0,08568	0,05136	0,02895	0,02381	8514,28	55,00
Oxford	0,79573	0,30102	0,27067	0,14630	0,02598	0,03015	10418,40	51,78
Darmstadt	0,74615	0,16700	0,15370	0,08333	0,03251	0,05970	11135,52	49,54
Horjul	0,74756	0,19414	0,17989	0,09392	0,03035	0,06206	12751,08	46,31
Parma	0,64020	0,15268	0,13967	0,07191	0,02644	0,04524	14011,88	44,62
Alicante	0,80853	0,32606	0,28639	0,15506	0,03645	0,06336	19272,63	40,27
Valencia	0,82268	0,16724	0,21852	0,10797	0,02702	0,03846	18044,64	39,35
Siurana	0,79523	0,12488	0,12069	0,06529	0,02390	0,06257	17543,39	41,26
Roma	0,90489	0,23842	0,20574	0,11624	0,02801	0,04342	15702,93	41,89
Athen nasjonal hage	0,41461	0,12489	0,10959	0,06646	0	0,03063	18544,44	37,98
Athen botanisk hage	0,67357	0,16676	0,14665	0,08266	0,05235	0,04769	18666,12	38,02
Rethymnon	0,67741	0,13378	0,12197	0,06703	0,02433	0,05558	20857,72	35,40
Heraklion	0,58835	0,38365	0,31147	0,18825	0,02055	0,02753	20645,77	35,20
Tenerife	0,76493	0,06369	0,05516	0,03449	0,07557	0,10971	29909,88	31,65

Appendiks B - Pilotforsøk

Mål

Målet med pilotforsøket var å teste hypotesen om at mengde *para*-kumarinsyre øker med økende UV-B-eksponering, samt finne ut om det er andre forbindelser i sporopollenin som kan brukes til samme formål som *para*-kumarinsyre.

Utførelse

Det ble laget til sammen sju pollenprøver med 500 pollenkorn i hver. Pollenprøvene ble plukket ut slik at breddegradene fra Nord-Norge til Hellas ble dekket. Det ble laget en prøve fra hvert av fem steder, samt to replikater for ett av stedene (Eidkosen) for å teste reproduserbarhet. Tabell B-1 viser hvilke steder som ble valgt ut til pilotforsøket.

Tabell B-1: Steder som er med i pilotforsøket.

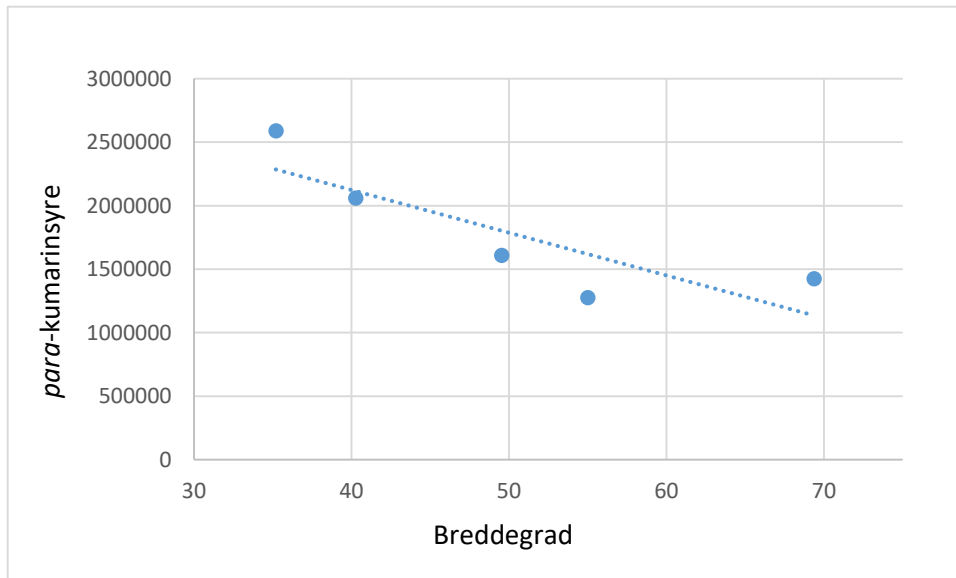
Land	Sted	Breddgrad (°)
Norge	Eidkosen	69,37
Nord-Irland	Belfast	55,00
Tyskland	Darmstadt	49,54
Spania	Alicante	40,27
Hellas	Heraklion	35,20

Det ble utført termokjemolyse-GC-MS på de sju pollenprøvene i «full scan MS mode». Ut fra kromatogrammene ble det identifisert så mange topper som mulig ved hjelp av NIST MS-database.

Resultater

para-kumarinsyre mot breddegrad

Figur B-1 viser spredningsplottet av mengde *para*-kumarinsyre og breddegrad. Trendlinjen viser at mengde *para*-kumarinsyre minker med økende breddegrad. Verdien for Eidkosen er et resultat av gjennomsnittet til de tre replikatene.



Figur B-1: Plott av *para*-kumarinsyre mot breddegrad. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon, $y = -33619x + 3 * 10^6$, $R^2 = 0,7064$.

Korrelasjon mellom forbindelsene og UV-B

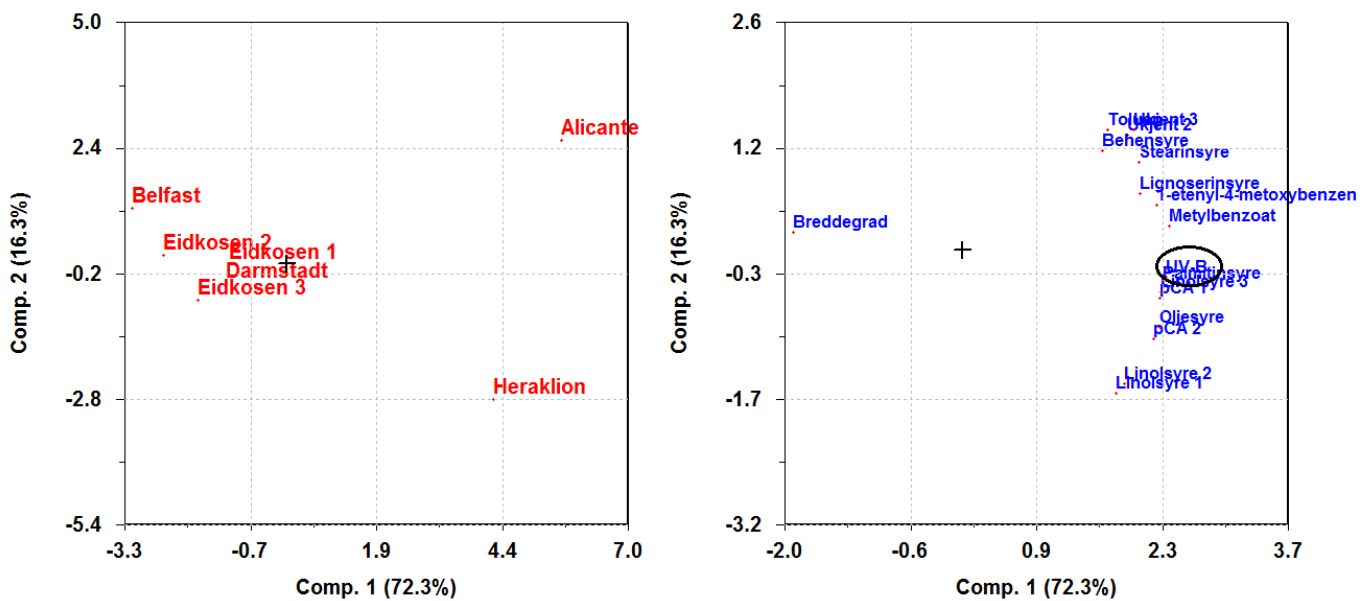
Ved hjelp av Sirius (2004) er forbindelsene som er identifisert analysert for korrelasjon med UV-B. Tabell B-2 viser korrelasjonene.

Tabell B-2: Korrelasjon mellom retensjonstid og UV-B.

Forbindelse	Korrelasjon	Forbindelse	Korrelasjon
Toluen	0,716	Dibutyl Phtalat	0,573
Etylbenzen	0,173	Linolsyre 0	0,631
Ukjent 1	-0,227	Oljesyre	0,833
Ukjent 2	0,674	Stearinsyre	0,600
Ukjent 3	0,683	Linolsyre 1	0,692
Metylbenzoat	0,966	Linolsyre 2	0,709
1-etenyl-4-metoksybenzen	0,885	Linolsyre 3	0,779
Pelargonsyre	0,349	Nonadekansyre	0,514
Kaprinsyre	0,212	Arakinsyre	0,953
Laurinsyre	0,446	Behensyre	0,571
<i>p</i> -kumarinsyre 1	0,976	Ukjent 5	-0,158
<i>p</i> -kumarinsyre 2	0,939	Lignoserinsyre	0,533
Myristinsyre	0,051	UV-B	1,000
Pentadekansyre	-0,068	Breddegrad	-0,925
Palmitinsyre	0,746		

Prinsipalkomponentanalyse (PCA)

Figur B-2 viser skårplottet (venstre) og ladningsplottet (høyre) til dataene i pilotforsøket. Komponent 1 forklarer 72,3% av variasjonen, og komponent 2 forklarer 16,3% av variasjonen. Skårplottet viser at prøvene fra Eidkosen ligger samlet, og ladningsplottet viser at UV-B (ringet rundt) og breddegrad er negativt korrelert.



Figur B-2: Skårplott (venstre) og ladningsplott (høyre) for pilotforsøket.

Diskusjon

De fullstendige GC-MS-analysene som er utført på de sju pollenprøvene viser at det finnes *p*-kumarinsyre i pollenkornene. Figur B-1 viser at mengden *p*-kumarinsyre øker med minkende breddegrad. Det betyr at det finnes mer *p*-kumarinsyre i pollen fra Hellas enn i pollen fra Norge. Korrelasjonskoeffisienten er 0,7064 og viser en sterk positiv sammenheng mellom mengde *p*-kumarinsyre og breddegrad. Dette resultatet stemmer overens med hva tidligere studier har kommet fram til (Rozema *et al.*, 2001; Lomax *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2011).

Fram til nå er det sett på hvordan *p*-kumarinsyre responderer på UV-B-stråling. For å finne ut om det er andre forbindelser som kan brukes på samme måte som *p*-kumarinsyre er programmet Sirius (2004) brukt til å finne korrelasjonen mellom forbindelsene som er funnet i *Pinus* spp.-pollen og UV-B-stråling. Tabell B-2 lister forbindelsene sammen med deres korrelasjon med UV-B. Det er flere forbindelser som har høye korrelasjoner med UV-B, og *p*-kumarinsyre finnes blant de med høyest korrelasjon. Det er imidlertid ikke bare de aromatiske forbindelsene som har høye korrelasjoner, det har også alifatiske syrer. Ifølge Fraser *et al.* (2011) har aromatiske forbindelser større kapasitet til å absorbere UV-B enn alifatiske syrer. På bakgrunn av disse korrelasjonene er forbindelsene med korrelasjon over 0,5 plukket ut til å være med i hovedoppgaven.

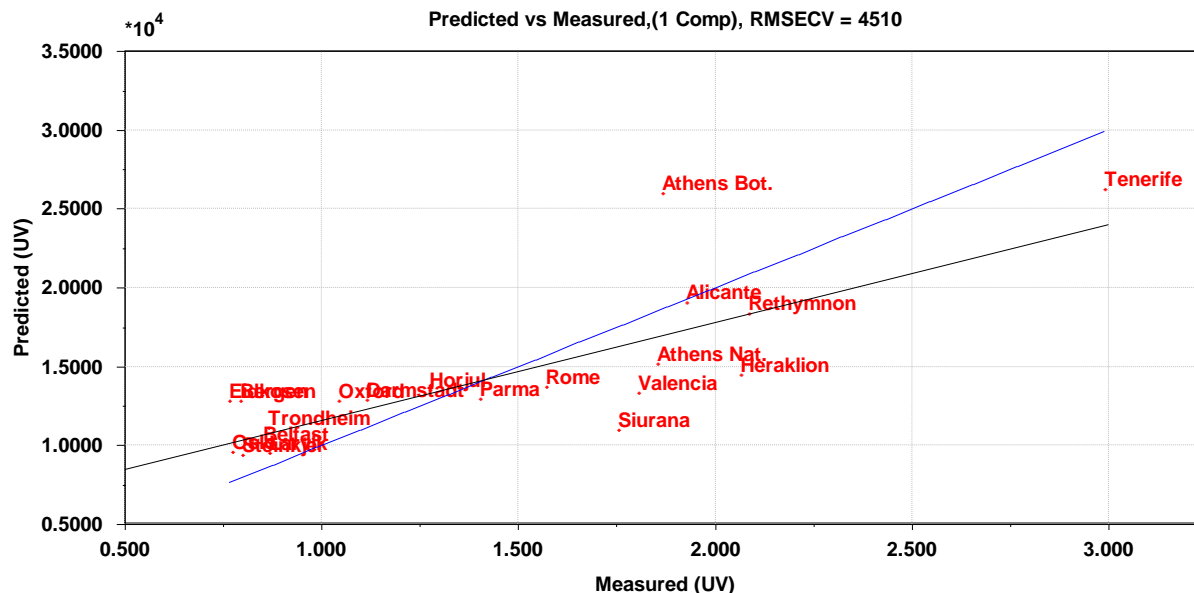
Av de sju pollenprøvene som ble laget, er tre av dem fra Eidkosen. Dette er for å se på reproduserbarheten til prøvene. Skårplottet i figur B-2 viser at de tre prøvene har liten avstand og vinkel mellom seg og er dermed svært like. Det ser også ut til at Darmstadt er lik de tre prøvene. Likhetene i plottet viser at reproduserbarheten til prøvene er god.

Konklusjon

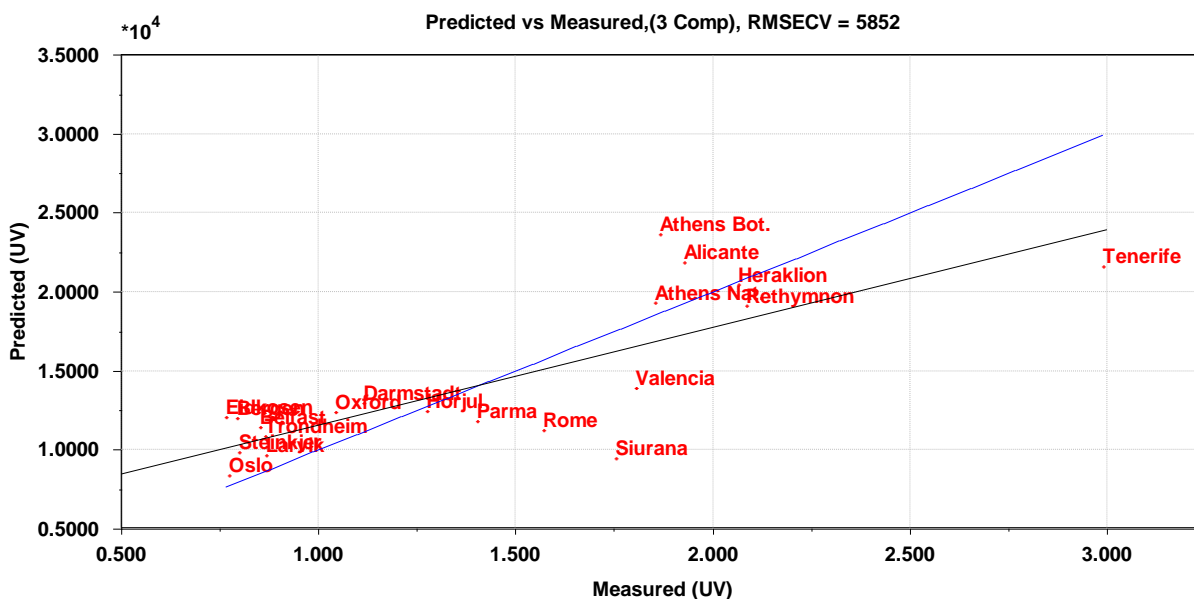
Gjennom pilotforsøket er det vist at mengde *p*-kumarinsyre øker med minkende breddegrad, noe som sammenfaller med tidligere studier. I tillegg er det funnet flere forbindelser som har høy korrelasjon med UV-B og som kanskje kan fungere på samme måte som *p*-kumarinsyre. Ved å kjøre tre prøver fra samme sted er det også funnet ut at reproduserbarheten til prøvene er god.

Appendiks C1 – Modeller for predikert mot målte UV-B-data basert på GC-MS-data

Alle arter basert på rådata

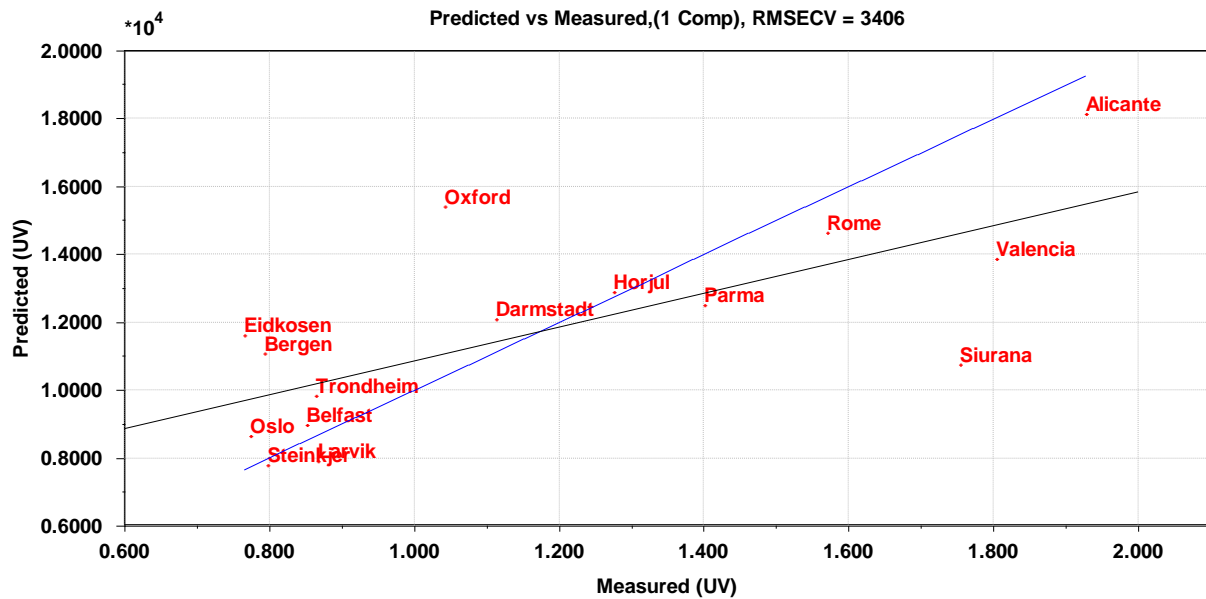


Figur C1-1: Alle arter er inkludert og datasettet er standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,620x + 5405,878$, $R^2 = 0,620$, korrigert $R^2 = 0,599$.

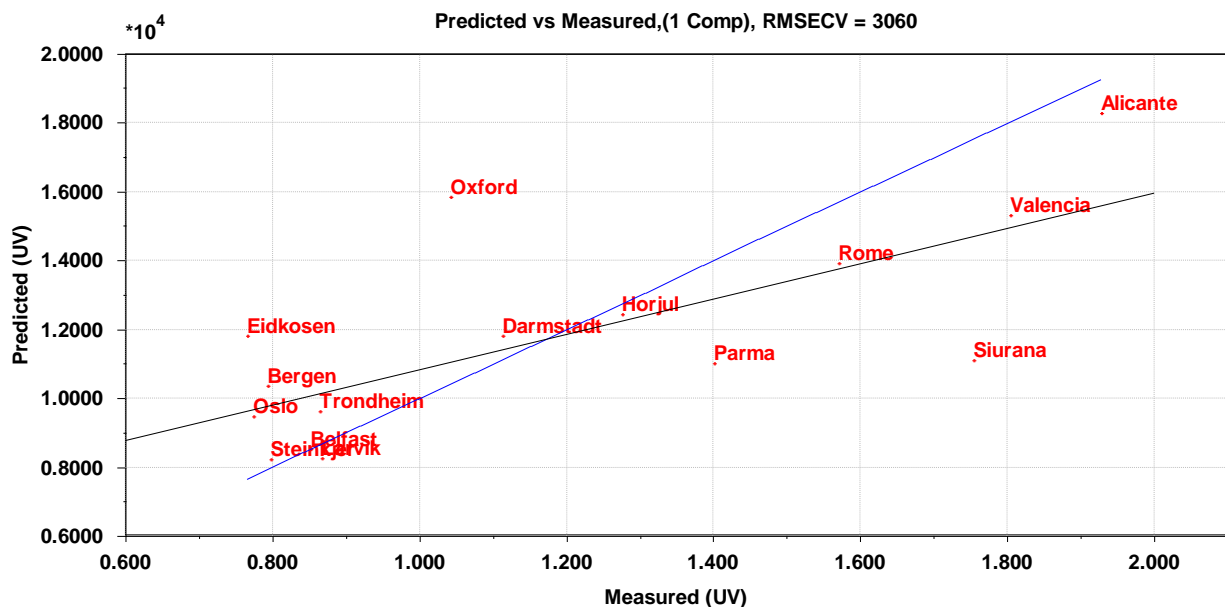


Figur C1-2: Alle arter er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,618x + 5416,309$, $R^2 = 0,616$, korrigert $R^2 = 0,544$.

Kun *P. sylvestris* basert på rådata

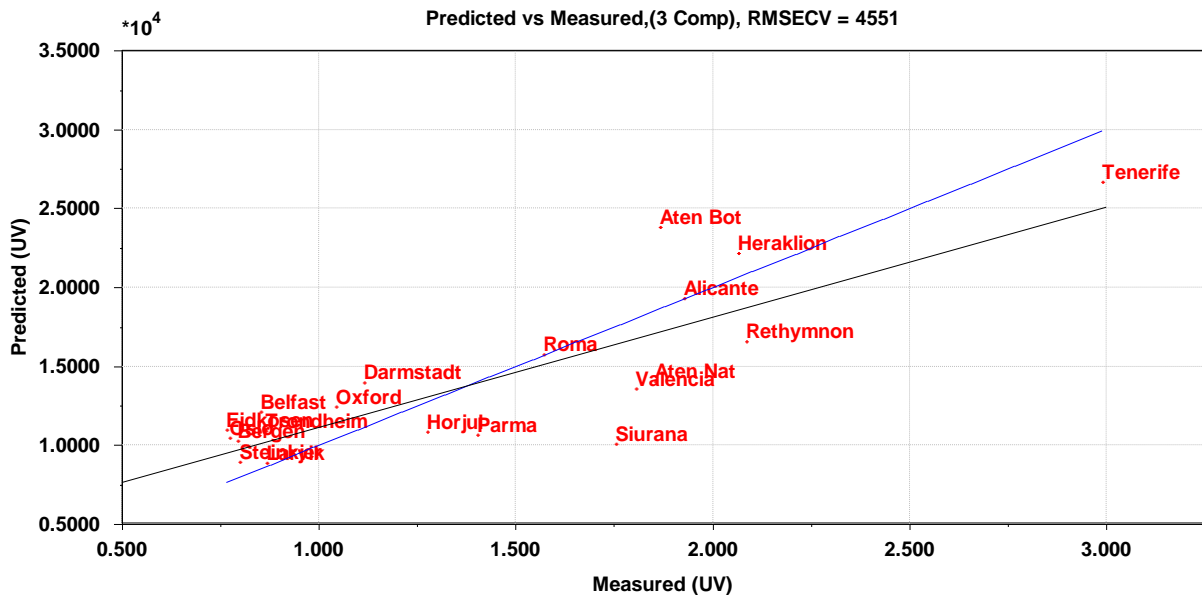


Figur C1-3: Kun *Pinus sylvestris* er inkludert og datasettet er standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,498x + 5889,453$, $R^2 = 0,498$, korrigert $R^2 = 0,459$.



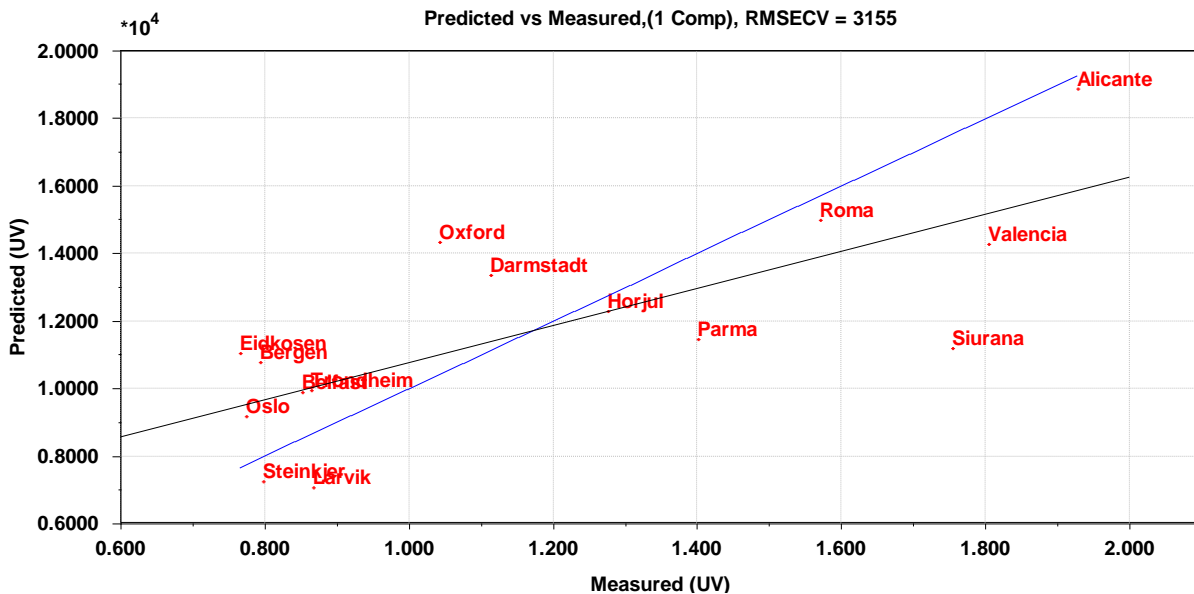
Figur C1-4: Kun *Pinus sylvestris* er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,512x + 5723,836$, $R^2 = 0,512$, korrigert $R^2 = 0,475$.

Alle arter basert på rådata som er normalisert med hensyn på indre standard

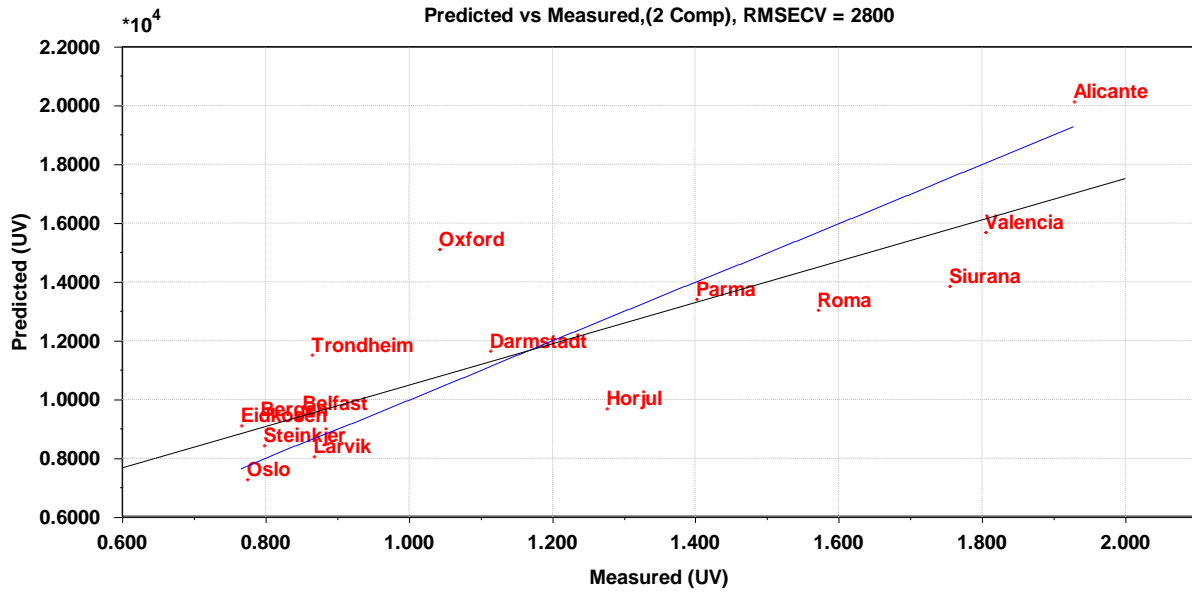


Figur C1-5: Datasettet er normalisert med hensyn på den indre standarden. Alle arter er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,696x + 4206,236$, $R^2 = 0,685$, korrigert $R^2 = 0,626$.

Kun *P. sylvestris* basert på rådata som er normalisert med hensyn på indre standard



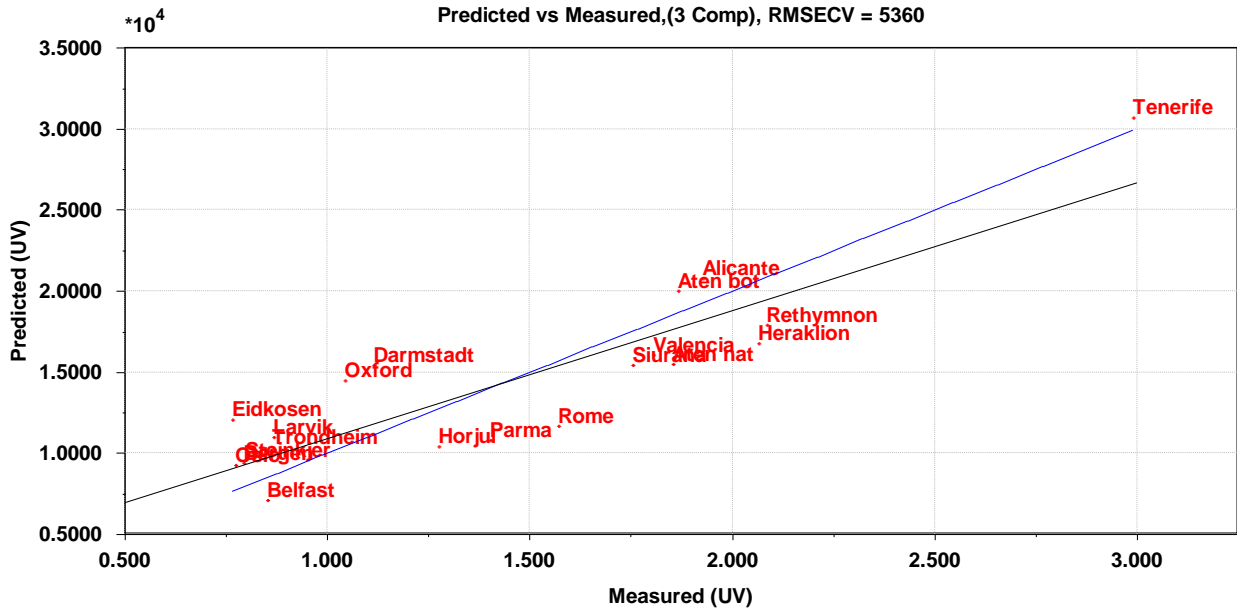
Figur C1-3: Datasettet er normalisert med hensyn på den indre standarden. Kun *Pinus sylvestris* er inkludert og datasettet er standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,549x + 5295,925$, $R^2 = 0,549$, korrigert $R^2 = 0,514$.



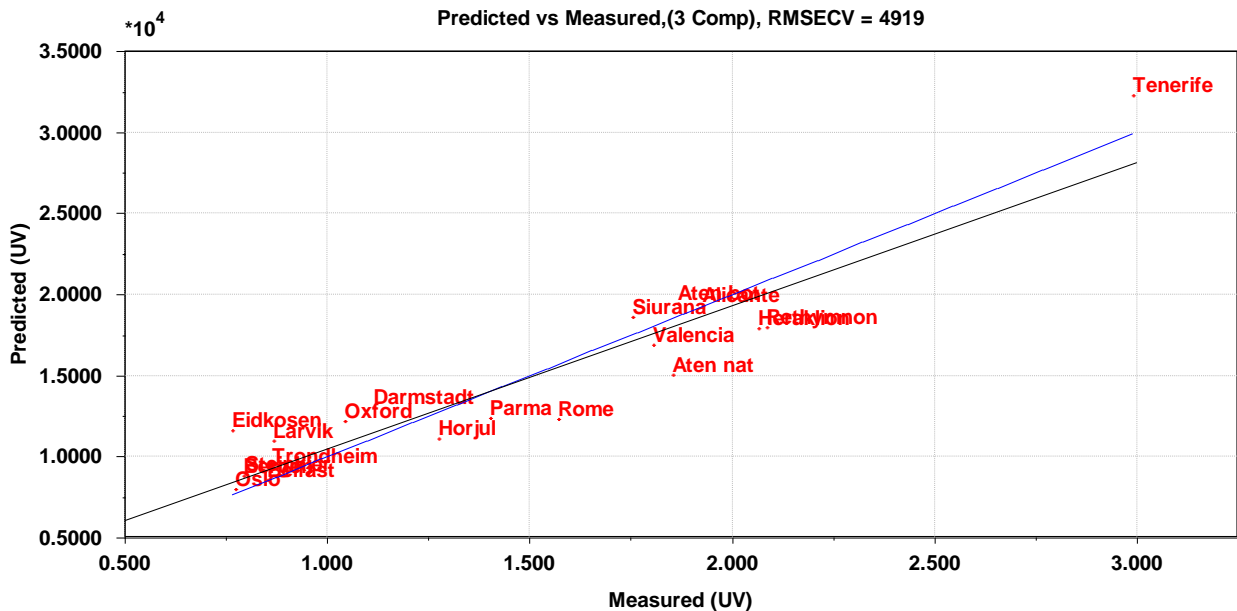
Figur C1-7: Datasettet er normalisert med hensyn på den indre standarden. Kun *Pinus sylvestris* er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,703x + 3488,620$, $R^2 = 0,703$, korrigert $R^2 = 0,653$.

Appendiks C2 – Modeller for predikert mot målte UV-B-data basert på FT-IR-data

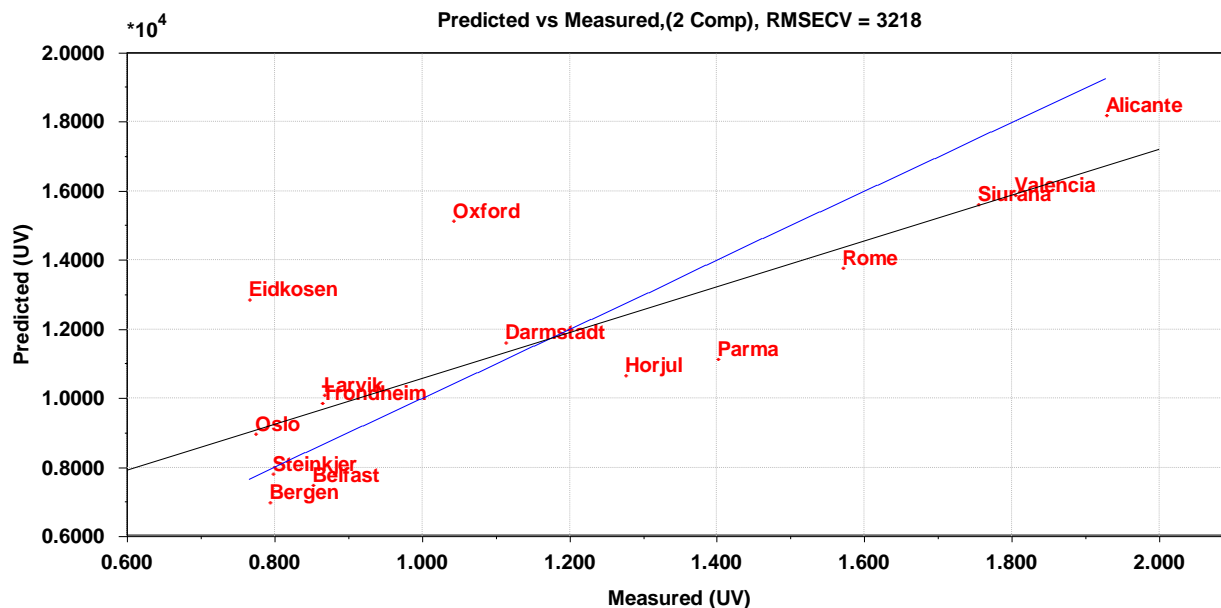
Alle arter basert på førstegradsderivert data



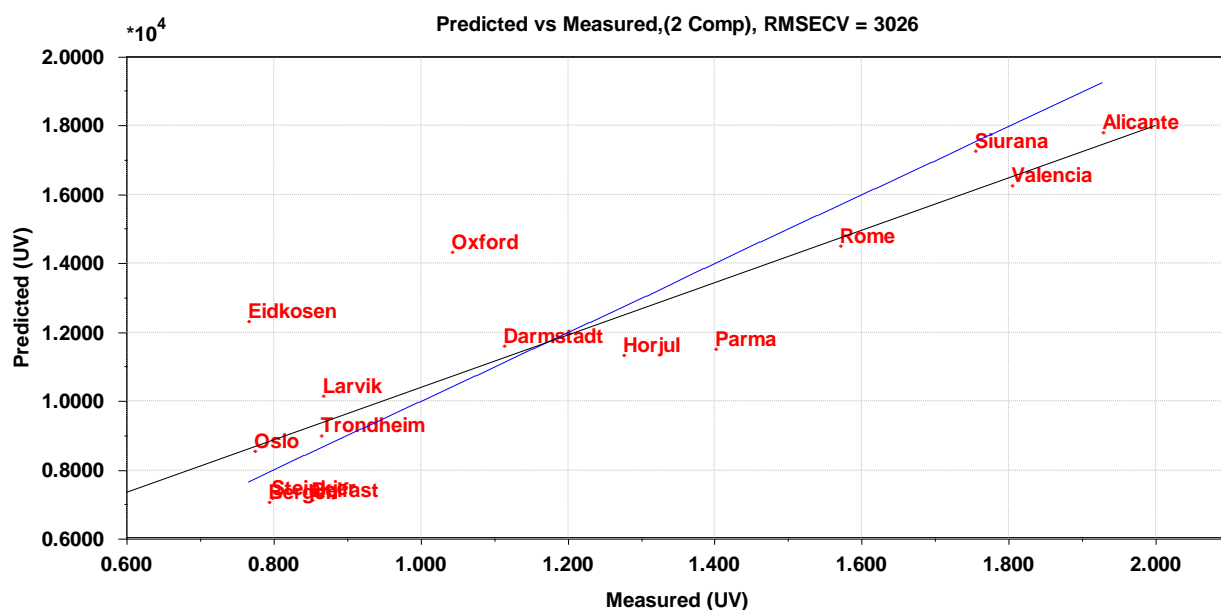
Figur C2-4: Alle arter er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,789x + 3006,191$, $R^2 = 0,789$, korrigert $R^2 = 0,749$.



Figur C2-2: Alle arter er inkludert og datasettet er standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,880x + 1708,055$, $R^2 = 0,880$, korrigert $R^2 = 0,857$.

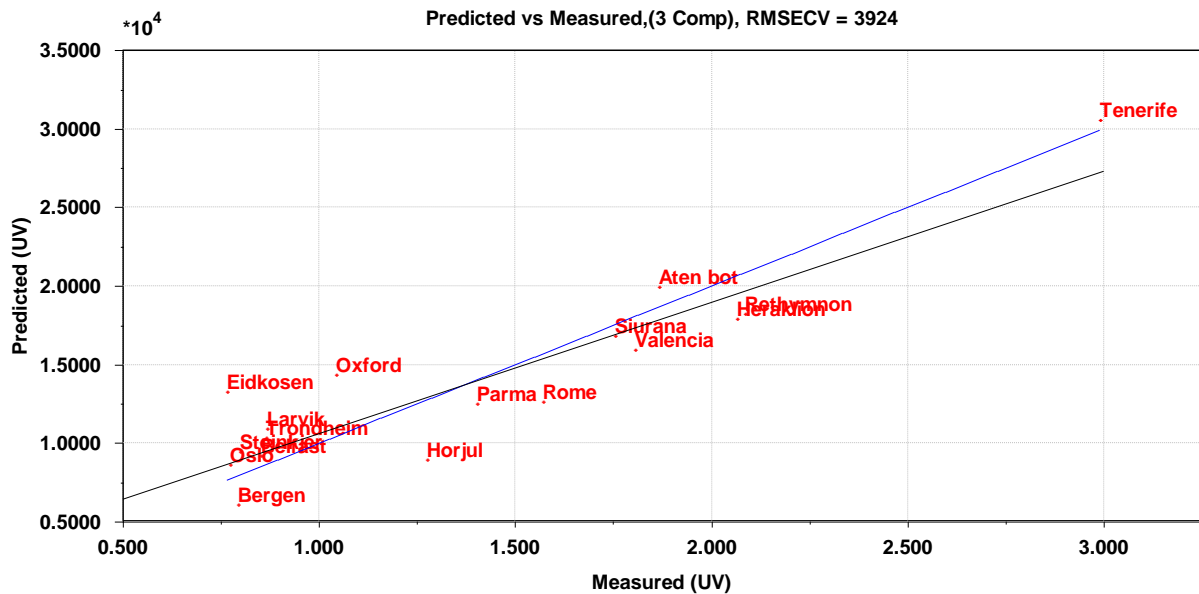
Kun *P. sylvestris* basert på førstegradsderivert data

Figur C2-3: Kun *P. sylvestris* er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,674x + 3826,436$, $R^2 = 0,674$, korrigert $R^2 = 0,620$.



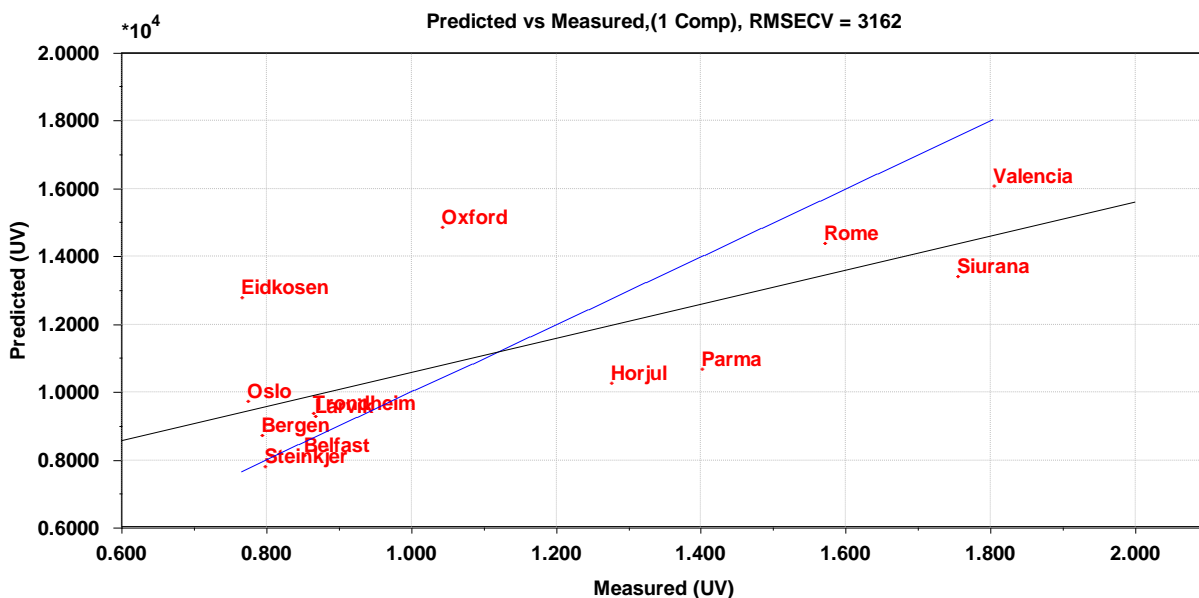
Figur C2-4: Kun *P. sylvestris* er inkludert og datasettet er standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,764x + 2773,968$, $R^2 = 0,764$, korrigert $R^2 = 0,724$.

Alle arter basert på førstegradsderivert data. Objektene Alicante, Darmstadt og Aten nasjonal hage er fjernet

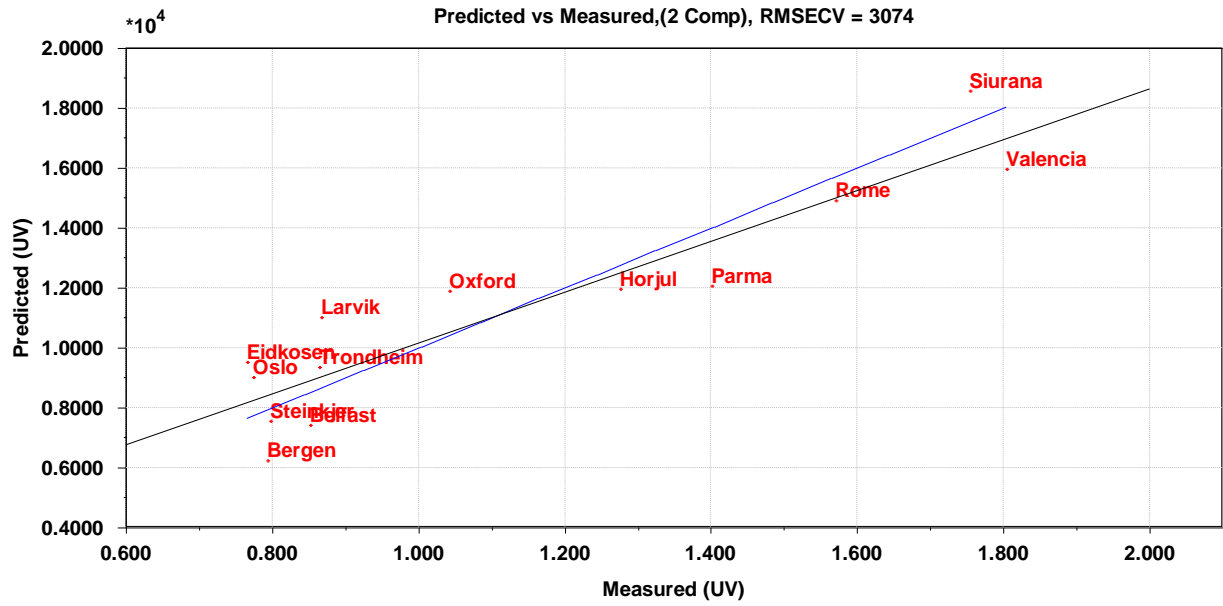


Figur C2-5: Objektene Alicante, Aten nasjonal hage og Darmstadt er fjernet. Alle arter er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,835x + 2283,240$, $R^2 = 0,835$, korrigert $R^2 = 0,797$.

Kun *P. sylvestris* basert på førstegradsderivert data. Objektene Alicante, Darmstadt og Aten nasjonal hage er fjernet

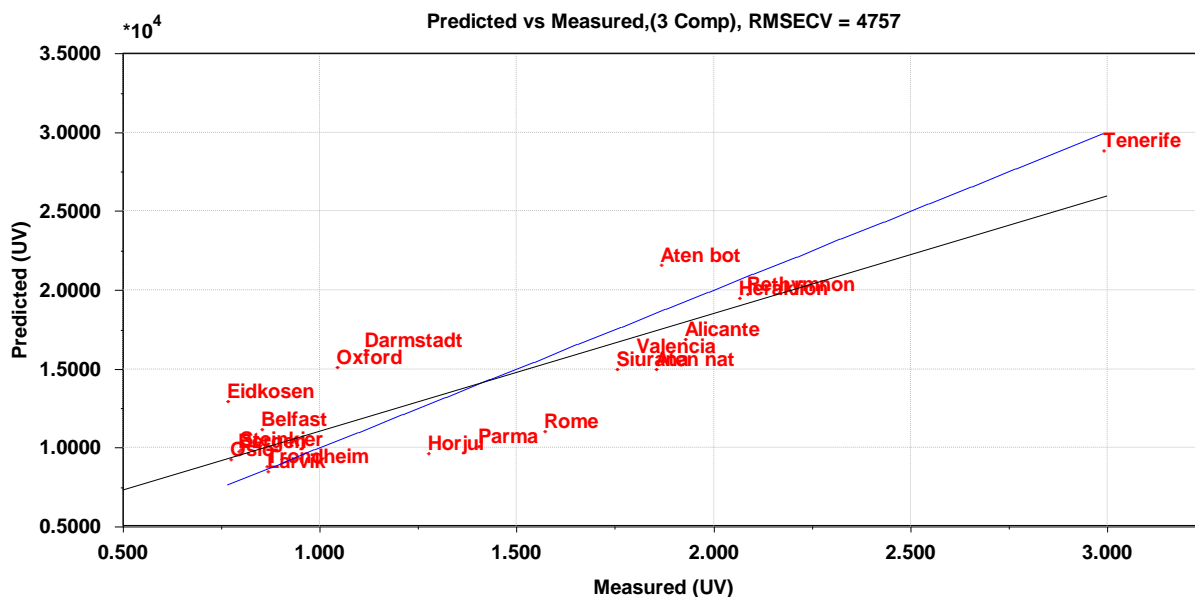


Figur C2-6: Objektene Alicante og Darmstadt er fjernet. Kun *P. sylvestris* er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,513x + 5456,805$, $R^2 = 0,513$, korrigert $R^2 = 0,468$.

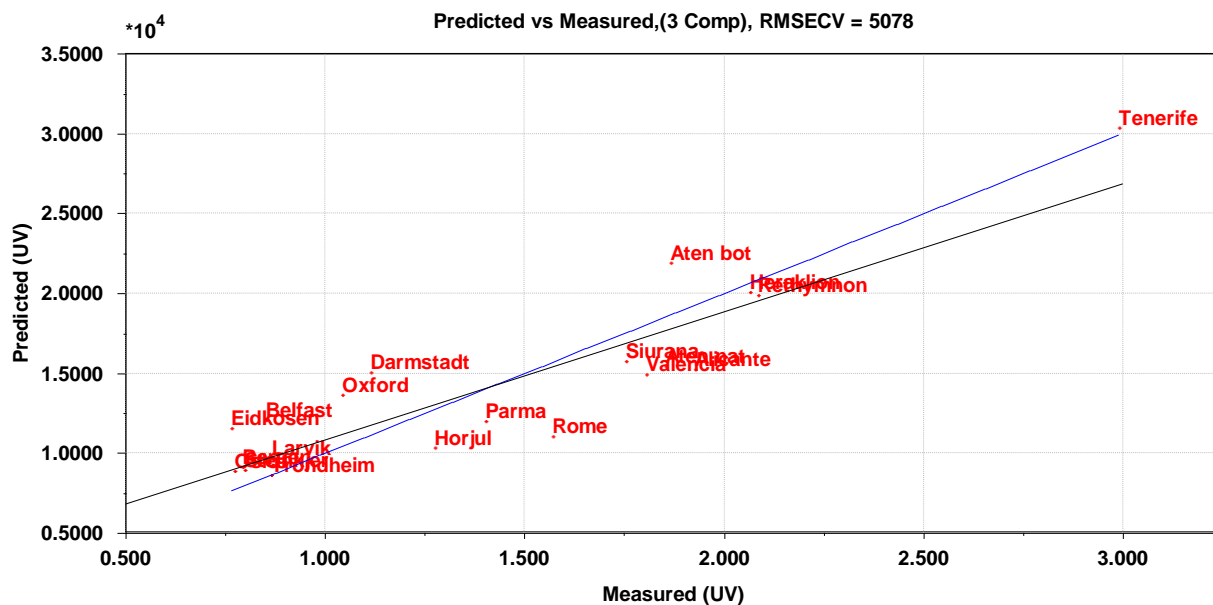


Figur C2-7: Objektene Alicante og Darmstadt er fjernet. Kun *P. sylvestris* er inkludert og datasettet er standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,847x + 1709,633$, $R^2 = 0,847$, korrigert $R^2 = 0,817$.

Alle arter basert på andregradsderivert data

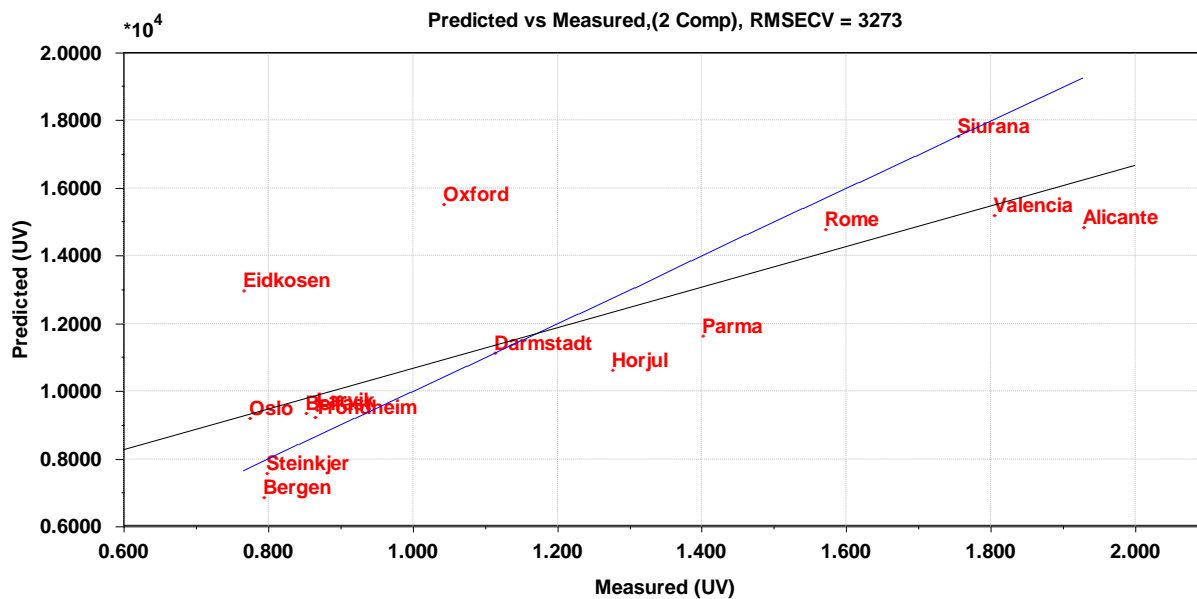


Figur C2-8: Alle arter er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,744x + 3639,742$, $R^2 = 0,744$, korrigert $R^2 = 0,696$.

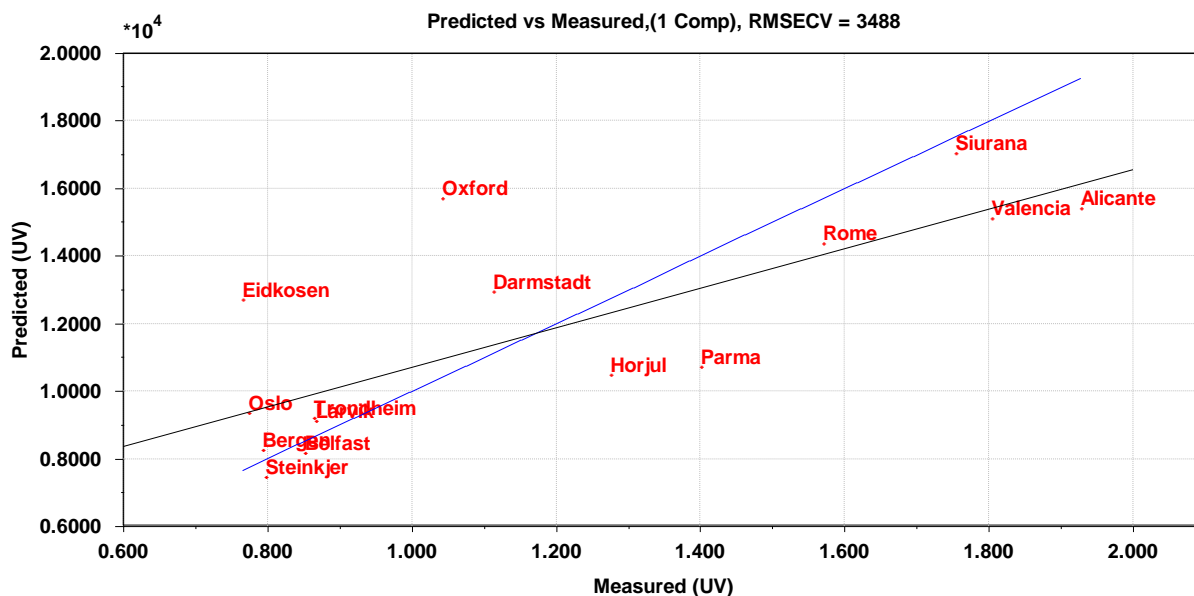


Figur C2-9: Alle arter er inkludert og datasettet er standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,802x + 2823,254$, $R^2 = 0,802$, korrigert $R^2 = 0,764$.

Kun *P. sylvestris* basert på andregradsderivert data

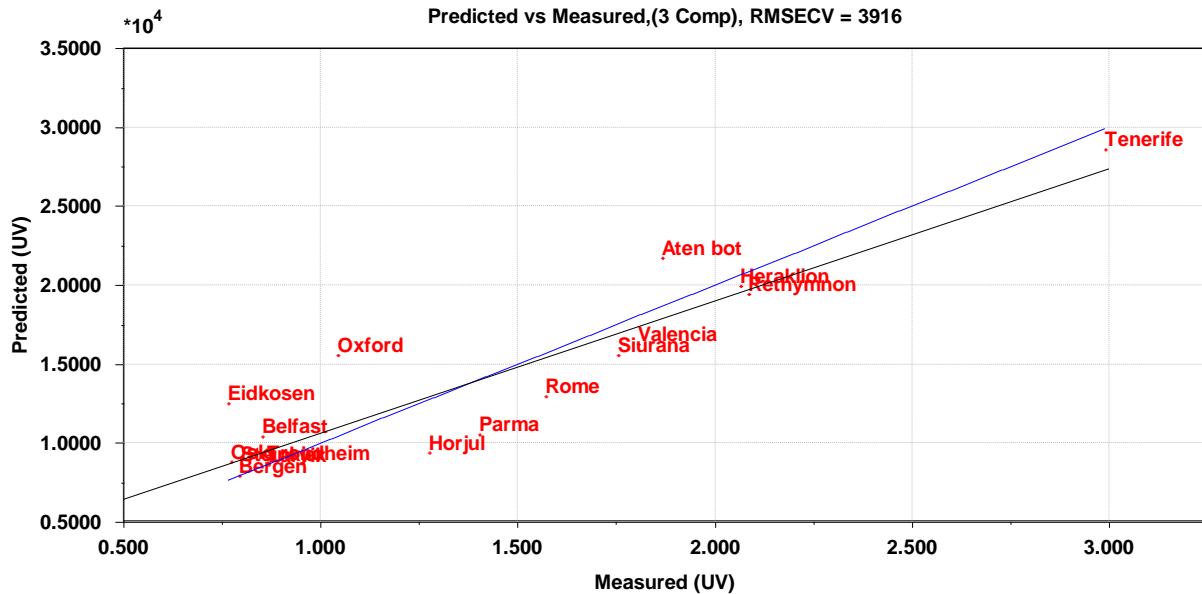


Figur C2-10: Kun *P. sylvestris* er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,599x + 4704,218$, $R^2 = 0,599$, korrigert $R^2 = 0,532$.

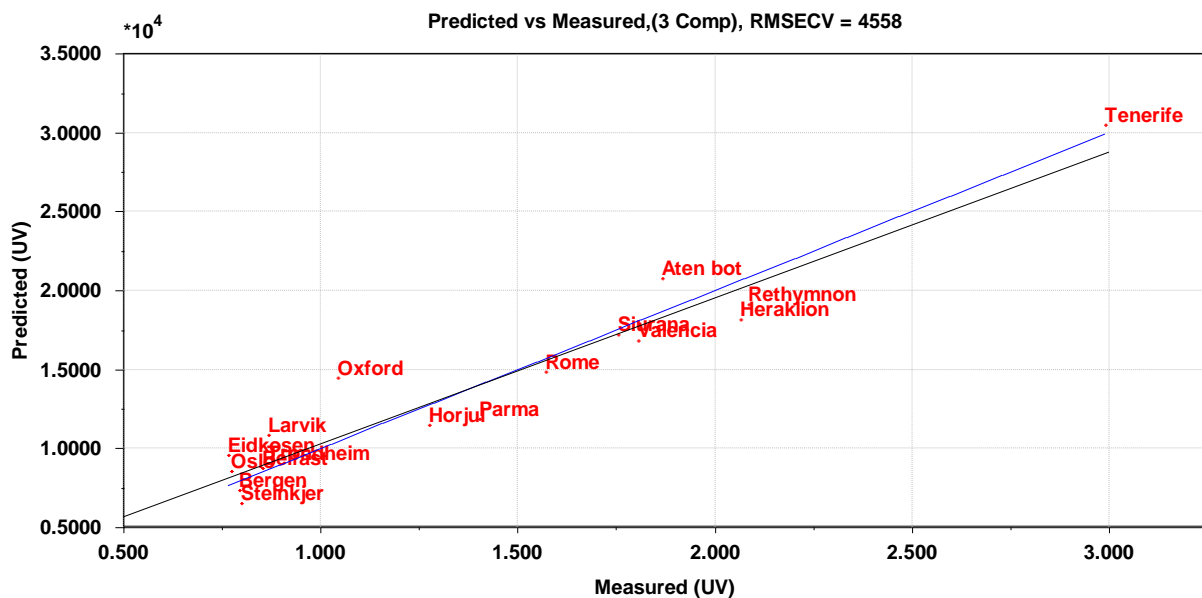


Figur C2-11: Kun *P. sylvestris* er inkludert og datasettet er standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,584x + 4886,301$, $R^2 = 0,584$, korrigert $R^2 = 0,552$.

Alle arter basert på andregradsderivert data. Objektene Alicante, Darmstadt og Aten nasjonal hage er fjernet

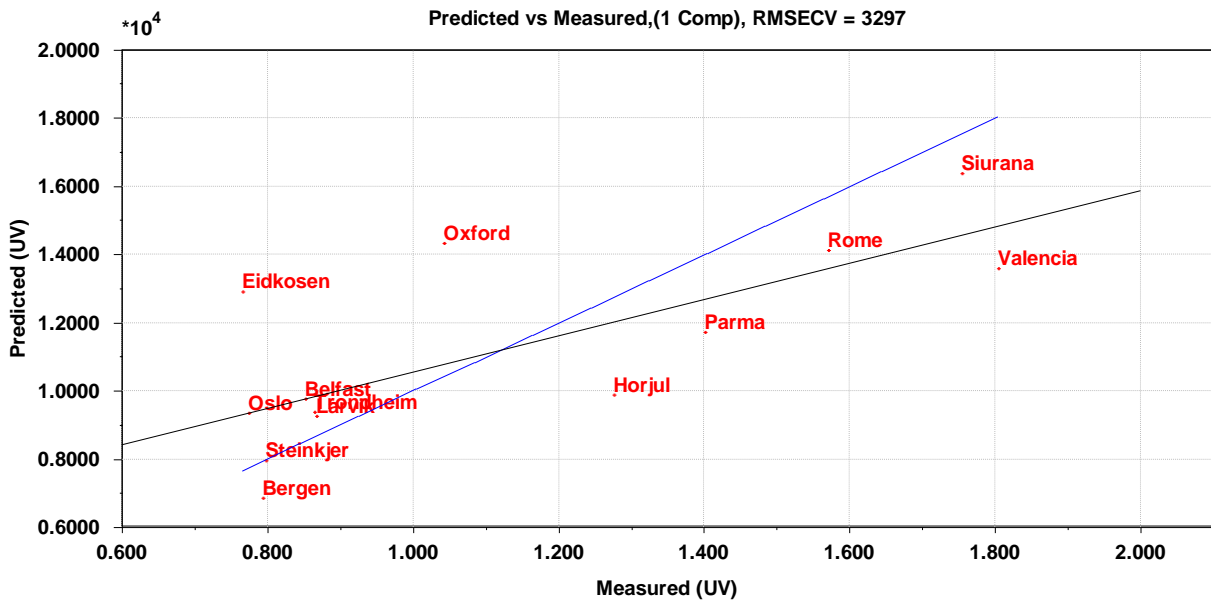


Figur C2-12: Objektene Alicante, Aten nasjonal hage og Darmstadt er fjernet. Alle arter er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,837x + 2266,066$, $R^2 = 0,837$, korrigert $R^2 = 0,799$.

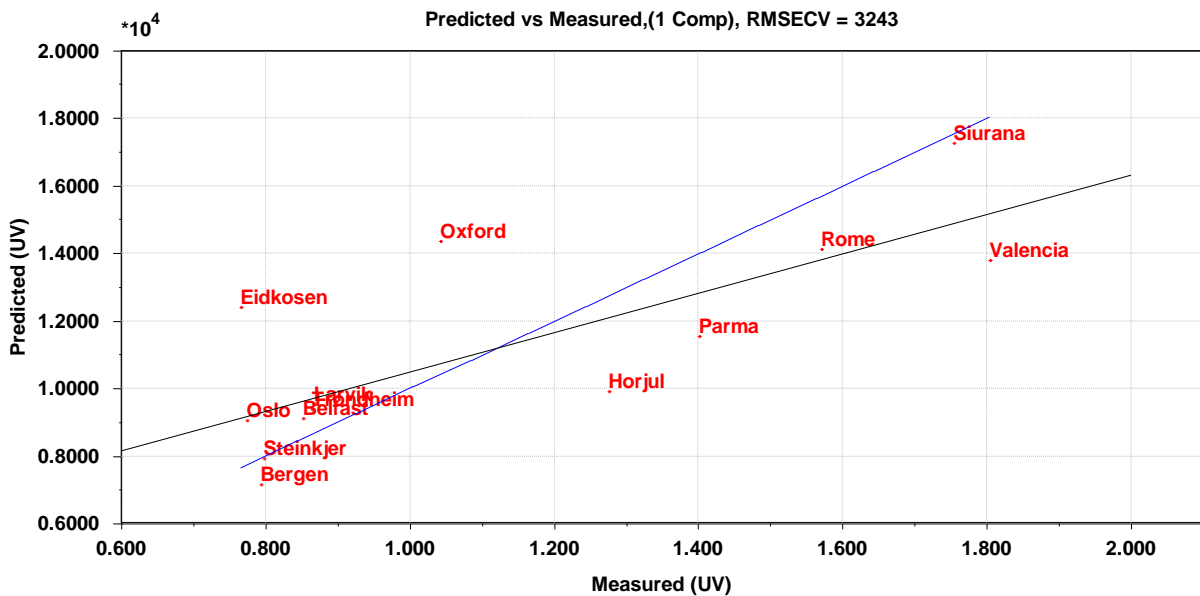


Figur C2-13: Objektene Alicante, Aten nasjonal hage og Darmstadt er fjernet. Alle arter er inkludert og datasettet er standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,922x + 1075,512$, $R^2 = 0,922$, korrigert $R^2 = 0,905$.

Kun *P. sylvestris* basert på andregradsderivert data. Objektene Alicante, Darmstadt og Aten nasjonal hage er fjernet



Figur C2-14: Objektene Alicante og Darmstadt er fjernet. Kun *P. sylvestris* er inkludert og datasettet er ikke standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,531x + 5249,263$, $R^2 = 0,531$, korrigert $R^2 = 0,489$.



Figur C2-15: Objektene Alicante og Darmstadt er fjernet. Kun *P. sylvestris* er inkludert og datasettet er standardisert. Trendlinjen er tilpasset ved lineær regresjon; $y = 0,582x + 4682,540$, $R^2 = 0,582$, korrigert $R^2 = 0,544$.