

# PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Fizika Doktori Iskola

Nemlineáris optika és spektroszkópia program

## Optikai spektroszkópai módszerek továbbfejlesztése

PhD értekezés

**Makkai Géza**

Témavezető:

**Dr. Erostyák János**

egyetemi docens



**PÉCS, 2013.**

# Tartalomjegyzék

<b>1</b>	<b>Bevezetés</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Célkitűzés</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Elméleti háttér</b>	<b>11</b>
3.1.	Elegyek és oldatok . . . . .	11
3.2.	Komponensek kimutatásának fizikai és kémiai módszerei keverékek esetén .	12
3.2.1.	Kromatográfia . . . . .	13
3.2.1.1.	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia . . . . .	13
3.3.	Abszorpció és lumineszcencia . . . . .	13
3.3.1.	A fényelnyelés alapja . . . . .	15
3.3.2.	Az abszorpciót követő folyamatok sebességi együtthatói . . . . .	18
3.3.3.	A lumineszcencia hatásfoka . . . . .	18
3.3.4.	A lumineszcencia csillapodása . . . . .	19
3.3.5.	Színképek . . . . .	19
3.3.6.	Spektrofotométerek . . . . .	20
3.3.7.	Több komponens meghatározása . . . . .	21
3.3.8.	Derivatív spektrofotometria . . . . .	22
	<b>Eredmények</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Módszerek és eljárások</b>	<b>26</b>

4.1. Felhasznált vegyszerek és minták . . . . .	26
4.1.1. Rodamin festékek . . . . .	26
4.1.2. Búza minták . . . . .	27
4.2. Mérőberendezés . . . . .	27
4.3. Mérési módszerek . . . . .	29
4.3.1. Keverékek . . . . .	29
4.3.2. Gerjesztési-emissziós mátrixok . . . . .	30
4.3.3. Reflexiós spektrumok . . . . .	31
4.4. Számítási módszerek . . . . .	32
4.4.1. Szimulációk . . . . .	32
4.4.1.1. Lognormált spektrum alak . . . . .	32
4.4.1.2. A Rayleigh-szórás szimulációja . . . . .	35
4.4.1.3. Poisson zaj előállítása . . . . .	35
4.5. Derivatív mátrix izopotenciális szinkronfluorometria és a legkisebb négyzetösszegezen alapuló illesztés módszerei . . . . .	36
4.5.1. DMISF spektrumok előállítása . . . . .	38
4.5.2. A legkisebb négyzetek módszere . . . . .	41
4.6. Fusarium Graminearum által fertőzött búzaszemek szennyezettségének megállapításának módszerei . . . . .	44
4.6.1. Infection Sensitive Spectral Index (ISSI) . . . . .	45
<b>5 Diszkusszió</b>	<b>48</b>
5.1. Derivatív mátrix izopotenciális szinkronfluorimetria (DMISF) és a legkisebb négyzetösszegezen alapuló illesztés (LSF) érzékenységének összehasonlítása . . . . .	48
5.1.1. DMISF . . . . .	49
5.1.2. LSF . . . . .	51

<i>TARTALOMJEGYZÉK</i>	3
5.2. Több komponens egyidejű meghatározása a MISF módszer továbbfejlesztésével . . . . .	52
5.2.1. Két komponensből álló keverékek . . . . .	53
5.2.2. Három komponensből álló keverékek . . . . .	54
5.3. Fusarium Graminearum által fertőzött búzaszemek szennyezettségének megállapítása digitális spektroszkópai módszerekkel . . . . .	58
<b>6 Összefoglalás</b>	<b>65</b>
6.1. MISF és LSF módszerek összehasonlítása . . . . .	65
6.2. QMISF . . . . .	67
6.3. Fusarium Graminearum által fertőzött búzaszemek szennyezettségének megállapítása ISSI módszerrel . . . . .	68
<b>7 Summary</b>	<b>70</b>
7.1. Comparison of MISF and LSF methods . . . . .	70
7.2. QMISF . . . . .	72
7.3. Identification of Fusarium graminearum Infection Severity of Wheat Grains by ISSI method . . . . .	73
<b>Köszönetnyilvánítás</b>	<b>75</b>
<b>A Origin<sup>®</sup> C programfájl</b>	<b>87</b>



# Ábrák jegyzéke

3.1. Oldhatósági folyamatábra. . . . .	12
3.2. Jablonski séma. . . . .	16
3.3. Stokes-eltolódás. . . . .	20
3.4. Szimulált Gauss görbe és deriváltjai. . . . .	23
3.5. Átfedő sávok eliminálása derivatíváltak képzésével. . . . .	24
4.1. Az alkalmazott festékek. . . . .	27
4.2. Jobin Yvon Tau3 fluorolog. . . . .	28
4.3. $10^{-7}$ M Rodamin B és $10^{-7}$ M Rodamin 6G kontúrtérképe. . . . .	30
4.4. (A): A mérésekhez használt spektrofluoriméter és az optikai kábel szürke előtét-lemeze. (B) Az optikai elrendezés Y kábel esetén. (C) A méréshez használt optikai kábel felszíne. . . . .	31
4.5. A mért komponensek ( $10^{-7}$ M Rodamin B és $10^{-7}$ M Rodamin 6G) para- métereit felhasználó szimulált spektrumok kontúrtérképe. . . . .	33
4.6. Szimulált lognormált spektrum. . . . .	34
4.7. Poisson eltérések generálása visszautasításos módszerrel. . . . .	35
4.8. Erősen átfedő, mért komponensek felületi grafikonjai. $10^{-7}$ M Rodamin 6G (pont) és $10^{-7}$ M Rodamin B (vonallal) . . . . .	38
4.9. Adott intenzitás-szinthez (izopotenciálhoz) tartozó pontok $10^{-7}$ M koncent- rációjú Rodamin 6G felületén. . . . .	39

4.10. A kiválasztott MISF útvonal (alsó kék, félkövér pontok) és az ezekhez talált intenzitások (felső vörös, félkövér pontok) a keverék mátrixán ( $10^{-7}$ M Rodamin 6G és $10^{-7}$ M Rodamin B). . . . .	40
4.11. A kiértékelés területe (piros, félkövér paralelogramma) ( $10^{-7}$ M Rodamin 6G és $10^{-7}$ M Rodamin B) keverékének kontúrtérképén . . . . .	42
4.12. A reziduumok eloszlása a legkisebb négyzetösszegű illesztés után. . . . .	44
5.1. DMISF spektrumok intenzitásai modell keverék esetén. A Modell 6G koncentrációja $10^{-7}$ M-nak felel meg és értéke változatlan, míg a keresett Modell B koncentrációját az ábra tartalmazza. A zaj értéke 0%. . . . .	49
5.2. A DMISF módszer linearitása különböző mértékű zajok esetén. A keresett komponens a Modell B volt, állandó $10^{-7}$ M Modell 6G mellett. . . . .	50
5.3. Az LSF módszer linearitása különböző zajok esetén. A keresett komponens a Modell B volt, állandó $10^{-7}$ M Modell 6G mellett. . . . .	51
5.4. Három modell ( $10^{-7}$ M Rodamin B, röviden B, $10^{-7}$ M Rodamin 6G, röviden G és $10^{-7}$ M Rodamin R116, röviden 116) komponensből álló keverék kontúrtérképe. . . . .	53
5.5. Mérési pontok (kék X) kétkomponensű ( $10^{-7}$ M Modell B és $10^{-7}$ M Modell 6G) keverék esetén. Zölddel jelölt trajektórián, amely az interferáló komponens egyik izopotenciális vonala. . . . .	54
5.6. Mérési pontok (a keresett komponens félértékszélességén vett izopotenciálon) három komponens esetén (kék X). . . . .	55
5.7. Az egymást „virtuálisan” keresztező trajektóriák (zöld és piros) elhelyezkedése és a mérési pontok (kék) 3 dimenzióban . . . . .	56
5.8. A QMISF módszerrel számolt koncentrációk linearitása két komponens esetén (konstans $10^{-7}$ M Modell G, $5 \times 10^{-10}$ M – $1 \times 10^{-7}$ M Modell B). Zajszint: 0.1 %. . . . .	56

5.9. A QMISF módszerrel számolt koncentrációk linearitása két komponens esetén (konstans $10^{-7}$ M Modell G, $5 \times 10^{-10}$ M – $1 \times 10^{-7}$ M Modell B). Zajszint: 0.2 %. . . . .	57
5.10. A QMISF módszerrel számolt koncentrációk linearitása két komponens esetén (konstans $10^{-7}$ M Modell G, $5 \times 10^{-10}$ M – $1 \times 10^{-7}$ M Modell B). Zajszint: 0.5 %. . . . .	57
5.11. Teljesen fertőzött szemek gerjesztési-emissziós mátrixa. . . . .	58
5.12. Különböző mértékben szennyezett búzaszemek normalizált relatív reflexiós spektrumai. . . . .	59
5.13. (A) Kiválasztott egészséges szemek. (B) Előállított ISSI képek. (C) Az ISSI képek hisztogramjai és azok paraméterei. . . . .	60
5.14. (A) Kiválasztott teljesen fertőzött (80%) szemek. (B) Előállított ISSI képek. (C) Az ISSI képek hisztogramjai és azok paraméterei. . . . .	60
5.15. Különböző mértékben fertőzött szemek sorozata (sorrendben fentről lefelé: 0%, 2%, 5%, 25%, 50%, 80%). . . . .	61
5.16. Teljesen egészséges (0%) és teljesen fertőzött (80%) szemek ISSI hisztogramjai, valamint súlypontjainak $X$ pozíciói (szaggatott vonalak). . . . .	63
5.17. Különböző ISSI hisztogramok $X_{\text{átlag}}$ értékei. . . . .	64
5.18. A válogatott minta ISSI(RG) hisztogramjainak $X_{\text{átlag}}$ értékei. A piros szaggatott vonal jelzi az elválasztási határvonalat. Az e fölötti $X_{\text{átlag}}$ értékű szemeket elfogadjuk, az ez alattiakat visszautasítjuk. . . . .	64

# Táblázatok jegyzéke

3.1. Spektroszkópiai módszerek. . . . .	14
4.1. Az alkalmazott Rodamin festékek gerjesztési és emissziós maximumai. . . .	26
5.1. A DMISF módszerrel kiszámolt koncentrációk különböző mértékű zajok esetén. . . . .	50
5.2. Az LSF módszerrel kiszámolt koncentrációk különböző mértékű zajok esetén.	52

# 1. fejezet

## Bevezetés

A fluoreszcencia spektroszkópia módszereit, eljárásait egyre szélesedő körben használják az orvosi, biokémiai és biofizikai kutatásokban. Az elterjedt módszerek nemcsak a tisztán kémiai, vagy fizikai kutatásokat segítik, hanem egyre inkább összeolvadnak. Ezen tudományterületek együttese alkalmas arra, hogy minél érzékenyebb, hatásosabb módszerekkel lehessen kimutatni egyes vegyületeket egy keverékoldatban egy drogteszt esetén, vagy bizonyos folyamatok hatását egy biológiai minta esetén. Ezen spektroszkópai eljárások vitathatatlan előnyei közé tartozik rendkívüli érzékenységük és időbeli felbontóképességük. Az egyre kifinomultabb mérőberendezések már szubnanoszekundumos folyamatok fénykibocsátását is képesek érzékelni, ezáltal válik lehetségessé az eddigieknél jóval bonyolultabb szerkezetek feltérképezése például egy adott biológiai minta esetén.

Azonban a technika fejlődésével az adatfeldolgozás elméletének is lépést kell tartania, hiszen minél kisebb időtartományban mérünk, annál nagyobb az esélye a szisztematikus hiba fellépésének, illetve az érzékenység növelésével a mérés zaja is növekszik. Kellően nagy energiájú megvilágításnál egyéb nem várt hatások is felléphetnek, mint például a komplexképződés, mellékreakciók, vagy egyéb energiáttranszferrel járó belső konverziók.

A modern eszközökkel a mérések során kapott, kellően nagy felbontású adathalmaz feldolgozásakor a legnagyobb hangsúly az alkalmazott algoritmusokon van. Minél pontosabb az alkalmazott simító, illesztő és kereső algoritmus, annál jobb az eljárás érzékenysége és

megbízhatósága, valamint reprodukálhatósága. Kutatási tevékenységem fő célja olyan, új numerikus módszerek kifejlesztése és az eddig ismert kiértékelő technikákkal való összehasonlítása volt, melyekkel tovább növelhető a kiértékelések megbízhatósága és pontossága. Munkám első felében hasonló kvantumhatásfokú komponensekből álló keverékoldatokból történő kimutatás módszereit vizsgáltam és fejlesztettem tovább. A feladat megvalósítása során előre meghatározott keverékoldatokon végeztem méréseket, tesztelve a kiértékelő algoritmusok határait erősen átfedő komponensek esetén. A korábbi és újonnan kifejlesztett módszereket szimulált adathalmazokkal is teszteltem, modellezve a mérésekből eredő hibákat is. Többkomponensű keverékek esetén a keresett komponens fluoreszcenciáján kívüli sugárzások mind, mint zavaró, mérési zajjal terhelt háttér jelennek meg. Az új kiértékelő módszerek kifejlesztése során arra törekedtem, hogy tovább csökkentssem a keresett komponens koncentrációjának kimutatási határértékét.

A második részben összetett biológiai és kémiai folyamatok eredményeként megjelenő optikai változások mennyiségi meghatározásával és a kiértékelés felgyorsításának lehetőségeivel foglalkoztam. Az élelmiszer-egészségügyi szempontból kiemelten kezelt fuzárium fertőzés okozta optikai reflexió változásait vizsgáltuk. A búzaszemek alakja és elszíneződése, valamint azok fertőzöttségi szintje között szoros összefüggés található. Az egészségügyi normák nagyon szigorúak, így emberi fogyasztásra a csak teljesen egészséges búzaszemekből előállított termékek alkalmasak. Célunk egy olyan spektroszkópiai módszer kidolgozása volt, amely új és gazdaságos, nagy áteresztőképességű szelekciót tesz lehetővé.

## 2. fejezet

### Célkitűzés

Kutatásaim során elsődleges céloom olyan kiértékelő módszerek megkeresése, tesztelése és továbbfejlesztése volt, amelyek több komponensből álló keverékoldatok elemzésére adnak lehetőséget. A fluoreszcencia spektroszkópia területén gyors ütemben fejlődő technikát választottam, az úgynevezett Mátrix Izopotenciális Szinkronfluorimetriát. Célul tűztem ki ezen módszernek mind szimulált, mind valódi valódi mérési környezetben történő alkalmazását, tesztelését és lehetőség szerint összehasonlítását korábbi, bevált technikákkal. Az elsődleges szempont minden esetben az alkalmazott módszer kiértékelési sebességének gyorsítása és megbízhatóságának növelése volt a fizikát és az informatikát együttesen felhasználó numerikus modellezés révén.

Munkám második felében a céloom olyan új, digitális spektroszkópai módszer kidolgozása volt, melynek segítségével bizonyos kémiai és/vagy biológiai folyamatok eredményeként megjelenő optikai változások alapján gyors és viszonylag olcsón megvalósítható szétválogatást lehet végezni. Konkrétan a *Fusarium Graminearum* nevű gombafertőzés miatt a búzaszemeken megjelenő rózsaszínes, fehéres elszíneződés alapján, a fertőzött szemek digitális spektroszkópai módszerekkel történő elválasztásának technológiáját dolgoztam ki.

## 3. fejezet

# Elméleti háttér

### 3.1. Elegyek és oldatok

Az elegyek két vagy több egyfázisú komponensből álló homogén, vagy inhomogén rendszerek. Az elegyek komponensei esetén molekuláris eloszlásról beszélhetünk, míg keverékek esetén az egyes komponensek megtartván fázistulajdonságaikat, makroszkopikusan diszpergált fázisokként oszlanak szét egymás között. Elegyek esetén oldatról akkor beszélünk, ha az egyik komponens részaránya jóval nagyobb a többiekhez képest. Összetételüket móltörtben, molaritásban, vagy molalításban (Raoult-koncentráció) adhatjuk meg. Móltört esetén az adott komponens anyagmennyiségét osztjuk az elegy összes komponensének mennyiségével [1]:

$$x_i = \frac{n_i}{\sum n_i} \quad (3.1)$$

Az általunk is gyakran használt kémiai koncentráció azt adja meg, hogy hány mól oldott anyag van egységnyi térfogatú elemben:

$$c_i = \frac{n_i}{V_{\text{oldat}}} \quad (3.2)$$

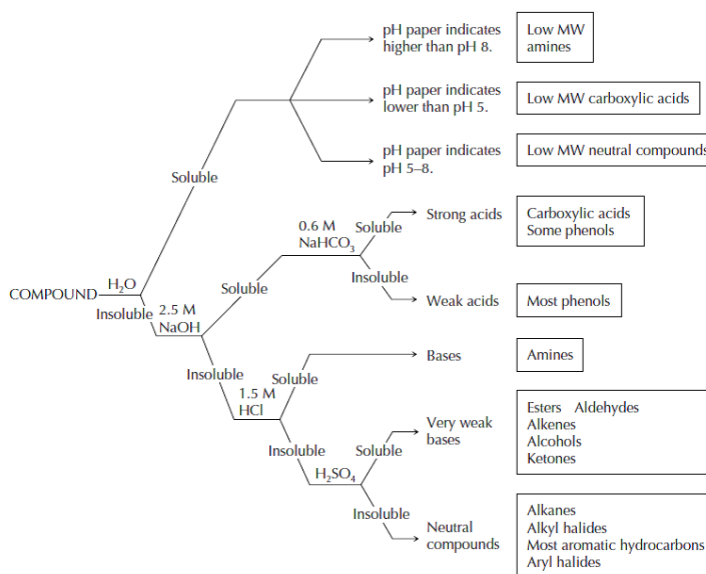
Mértékegységként általában mol/dm<sup>3</sup>, vagy mol/m<sup>3</sup> használatos. A keverékek komponensei különböző fizikai módszerekkel (mágneses tér, desztillálás, szűrés) szétválaszthatóak [2].



## 3.2. Komponensek kimutatásának fizikai és kémiai módszerei keverékek esetén

Egy adott komponens mennyiségi kimutatásához elengedhetetlen annak kémiai szerkezetének ismerete, a fizikai tulajdonságok meghatározása. Ezen kvantitatív elemzésnek első lépései közé tartozik a fizikai tulajdonságok meghatározása. A legfontosabb az olvadáspont megállapítása és az eközben kialakuló fázisállapot-változások detektálása. Következő lépésként említhető a keresett komponens oldhatóságának megállapítása. Ehhez öt különböző reagens használatos [3]: (1) víz, (2) 2.5 M (9%) NaOH, (3) 0.6 M (5%) NaHCO<sub>3</sub>, (4) 1.5 M (5%) HCl, és (5) tömény kénsav (96%) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ezek alapján feltérképezhetők a keresett anyag funkcionális csoportjai, savasságuk és annak erőssége. A 3.1. ábra jól szemlélteti az oldhatóság vizsgálatának lépéseit.



3.1. ábra. Oldhatósági folyamatábra.

A minőségi meghatározást további, spektroszkópiai módszerekkel finomíthatjuk. A legelterjedtebb technikák közé sorolhatjuk az NMR spektroszkópiát [4], amely a szerves struktúrák, szénváz-szerkezetek feltérképezésében hathatós segítség. A molekulatömeg meghatározásához használatos a tömegspektrométer (MS), mellyel összetett szerves rendszerek,

elegyek elválasztást követő minőségi és mennyiségi elemzése valósítható meg [3]. Az infravörös (IR) spektroszkópia eszközeivel a funkciós csoportok megléte, vagy éppen hiánya adhat plusz információt az analízishez [5].

### 3.2.1. Kromatográfia

Minőségi és mennyiségi meghatározásra is használható módszer. Segítségével általában szerves vegyületek komponensei választhatóak szét. Működésének alapja, hogy a mozgófázisba (folyadék vagy gáz) kevert mintaelegyet szoros kontaktusba hozzuk egy azzal nem keveredő másik fázissal, az úgynevezett állófázissal. A mozgófázist állandó mozgásban tartva a mintaelegy komponensei bizonyos kontaktidő után elkülönülnek egymástól. Az elkülönülés idejét detektálva egy a mintakomponenseket reprezentáló csúcissorozatot (kromatogramot) kapunk. A kromatogramról olvasható le az egyes csúcsokhoz tartozó retenciós (visszatartási) idő, amely a minta mozgófázisba juttatásától a detektor által mért maximális koncentráció megjelenéséig eltelt idő.

#### 3.2.1.1. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Nagy hatékonyságú, gyors analízist biztosító eszköztípus. A hatékonyság növelését speciális megosztó fázisok alkalmazása mellett apró, nagy fajlagos felületű töltetek alkalmazásával érik el. A mozgófázis áramoltatása nagy nyomáson történik. Széleskörű alkalmazhatósága mellett érzékeny és sokoldalú detektorokkal szerelhető fel. A detektor sok esetben egy spektrofotométer, amely vagy multispektrális (dióda-array), vagy a mérési hullámhossz szerint programozható az analízisidő függvényében.

### 3.3. Abszorpció és lumineszcencia

Az egyik legelterjedtebb anyagvizsgálati módszer, minőségi (kvalitatív) és mennyiségi (kvantitatív) meghatározásra egyaránt alkalmas. Alapját az elektromágneses sugárzás és

3.1. táblázat. Spektroszkópiai módszerek. (Forrás: [6], 3. oldal)

Hullámhossz-tartomány		Sugárzás és anyag kölcsönhatása	Analitikai módszer
Gamma	0,5–10 pm	Magátmenetek	Mössbauer-spektroszkópia
Röntgen (X-ray)	0,01–10 nm	Belső elektronátmenetek, ionizáció	Röntgenspektroszkópia
Távoli ultraibolya (FUV)	10–180 nm	Vegyértékelektronok gerjesztése	Spektrofotometria
<b>Ultraibolya (UV)</b>	180–350 nm		
<b>Látható (VIS)</b>	350–780 nm		
Közeli infravörös (NIR)	780–1000 nm	Rezgési és forgási átmenetek	IR-spektroszkópia
Infravörös (IR)	1–30 $\mu\text{m}$		
Távoli infravörös (FIR)	30–300 $\mu\text{m}$	Forgási átmenetek	
Mikrohullámok	0,3 mm–1 m	Forgási átmenetek, elektronspin átmenetek	Mikrohullámú spektroszkópia
Rádióhullámok	1–300 m	Magspin átmenetek	NMR

a vele kölcsönhatásba lépő anyag biztosítja. A minta az elektromágneses sugárzás egy részét elnyeli, melynek hatására a vele kölcsönhatásba lépő atomok, molekulák gerjesztett állapotba kerülnek. Bizonyos várakozási idő után az atomok, molekulák visszatérnek alapállapotukba, miközben szintén elektromágneses sugárzást bocsátanak ki. Mind az elnyelési (abszorpciós), mind a kibocsátási (emissziós) spektrum, mind ezek kombinációja (abszorpciós-elnyelési mátrix) ujjlenyomatként szolgál az egyes minták vizsgálatakor, fontos információkat szolgáltatva a bennük lévő komponensek elemzéséhez. A módszer előnye, hogy viszonylag kevés anyagmennyiséggel és -az esetek döntő többségében- roncsolásmentesen lehet méréseket végezni. A módszerek csoportosítása a hullámhossz tartományok szerint a 3.1. táblázatban található.

### 3.3.1. A fényelnyelés alapja

A fényelnyelés alapja, hogy a fotont elnyelő, vagy kibocsátó atom, illetve molekula csak meghatározott energiaszintű állapotokban lehet. Abszorpció és emisszió esetében energetikai szempontból e stacionárius állapotok között mozog a rendszer. Az elnyelt, vagy kisugárzott foton frekvenciája a Bohr posztulátum szerint:

$$E_2 - E_1 = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}, \quad (3.3)$$

ahol  $h$  a Planck-állandó,  $\nu$  a frekvencia,  $\lambda$  a hullámhossz.

Atomok esetében vonalas színeképeket kapunk, az elnyelt és kisugárzott fény azonos frekvenciájú (rezonancia fluoreszcencia). Molekulák esetén az elektronfelhőre több atommag együttes erőtere hat, a molekula elektron energia szintjei nem azonosak az öt felépítő atomokéval. Ráadásul az elektronfelhő energiaszintjét a molekulát alkotó atomok rezgései és az egész molekula forgása is megváltoztatja.

$$E = (E_{\text{el}}) + (E_{\nu}) + (E_r), \quad (3.4)$$

ahol  $E_{\text{el}}$  a molekula elektronállapota,  $E_{\nu}$  a rezgési-,  $E_r$  a rotációs energia összetevő.

Az adott energiaértékek közül az elektronállapot részaránya a legnagyobb, kvantált energiaszintjei közötti átmenetnek megfelelő fotonok hullámhossza jellemzően 125 nm – 1250 nm-ig terjed. A rezgési és forgási energiaszintek különbségének megfelelő frekvencia az infravörös, illetve a távoli infravörös és mikrohullám tartományába esik [6]. Az együttes kölcsönhatásoknak köszönhetően a molekulák esetén nagyon összetett színeképet kapunk. Gőz és gáz halmazállapotban sávrendszereket kapunk, folyadékban az egymáshoz közel eső vonalak összemosódnak. Ezen sávok, sávrendszerek helyéből, szélességéből és maximumából következtetni lehet a molekulában található vegyület- és kötéstípusok jellegére és számára.

Az elnyelési, vagy abszorpciós spektrumból az adott oldat koncentrációját számolhat-

juk ki a Lambert–Beer törvény alapján. Egy  $I_0$  intenzitású monokromatikus fénynyaláb intenzitása 1 cm vastagságú rétegen áthaladva  $I$ -re csökken, vagyis:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\beta l}, \quad (3.5)$$

ahol  $\beta$  a Bunsen-féle abszorpció, vagy más néven extinkciós koefficiens annak a rétegvastagságnak a reciproka, amelyben az intenzitás tized részére csökken. Beer törvénye szerint általános esetben a Bunsen-féle koefficiens és a koncentráció között az alábbi összefüggés írható fel:

$$\beta = \varepsilon \cdot c, \quad (3.6)$$

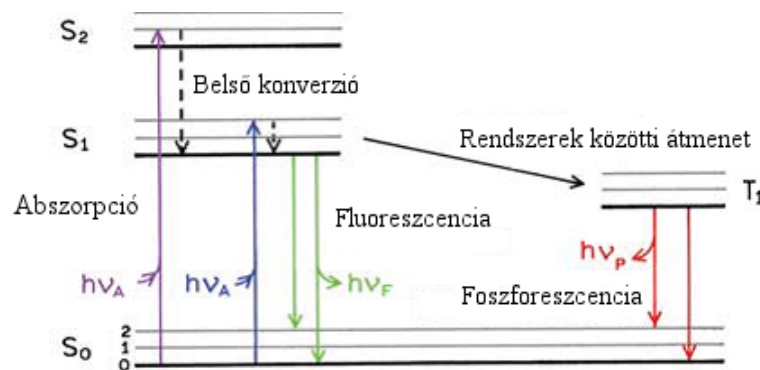
ahol  $\varepsilon$  az extinkciós koefficiens, vagy moláris abszorbancia,  $c$  a koncentráció.

A Lambert-Beer törvény végleges formája:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (3.7)$$

ahol  $l$  a réteg vastagsága cm-ben,  $c$  a koncentráció mol/dm<sup>3</sup>-ben.

A Perrin-Jablonski diagram (3.2. ábra) jól szemlélteti egy molekula elektronfelhőjének



3.2. ábra. Jablonski séma. (Forrás: [7], 5. oldal)

energiaszintjeit és fény hatására bekövetkező fotofizikai folyamatait. A Boltzmann eloszlás szerint szobahőmérsékleten a molekulák döntő többségben ( $S_0$ ) alapállapotban vannak. Abszorpciót követően ( $h \cdot \nu_A$ ) kerülnek gerjesztett ( $S_1$  vagy  $S_2$ ) állapotba.

Lumineszcencia az összefoglaló neve minden olyan fénykibocsátási folyamatnak, amely-nél a fényt kibocsátó rendszer nem a magas hőmérséklet, hanem egyéb okok következtében világít. Esetünkben az "egyéb ok" a fény elnyelése (fotolumineszcencia). Egy (szingulett) gerjesztett állapot átlagos élettartama  $10^{-8}$  s. Ezen állapotból sugárzásos, vagy sugárzásmentes átmenettel kerülhet vissza alapállapotba. Az azonos multiplicitású (spinű) állapotok közötti, foton kibocsátásával járó átmenetet fluoreszcenciának (Fluorescence) nevezzük. Sugárzásmentesen is kerülhet alsóbb energia állapotba a molekula, vagy rendszerek közötti átmenettel (Intersystem Crossing, röviden: IC) triplett állapotba (T). Ebből az állapotból a tiltott spin átmenet miatt sokkal kisebb valószínűséggel kerül vissza  $S_0$  alapállapotba, a szint élettartama a sokkal hosszabb ( $1\mu\text{s} - 1\text{ms}$ ). A belső konverzió sebessége a szingulett energiaszintek távolságának csökkenésével felgyorsul. A fluoreszcencia a gerjesztést követően azonnal jelentkezik. Intenzitása a impulzus gerjesztést követően exponenciálisan csökken az adott molekulára (energia szintre) jellemző idővel.

Foszforeszcenciának nevezzük a különböző multiplicitású állapotok között létrejövő, sokkal hosszabb lecsengésű sugárzást. Leggyakrabban az  $S_1-S_0$  átmenet jön létre, ritkábban az  $S_2-S_0$ ,  $T_2-T_1$  átmenetek. Az  $S_1-S_0$  átmenet úgy is létrejöhet, hogy a molekula az abszorpciót követő relaxáció során először  $S_1$ -ből  $T_1$  állapotba kerül, majd innét termikus gerjesztés hatására ismét  $S_1$  állapotba jut. Ezt nevezzük késleltetett fluoreszcenciának. Az egyes energiaszintek jellemző élettartama [8]:

- $S_0-S_1$  abszorpciós átmenet, általában nem egyensúlyi állapotba:  $< 10^{-15}$  s;
- $S_1$  relaxációs ideje:  $\sim 10^{-12} - 10^{-10}$  s;
- $S_1-S_0$  átmenetnél  $S_1$  átlagos élettartama:  $\sim 10^{-10} - 10^{-8}$  s;
- $S_0$  relaxációs ideje:  $\sim 10^{-12}$  s;
- $S_1-T_1$  sugárzás nélküli átmenet:  $\sim 10^{-7}$  s;
- $T_1$  relaxációs ideje:  $\sim 10^{-12}$  s;

- T<sub>1</sub>-S<sub>0</sub> foszforeszcencia sugárzás: > 10<sup>-6</sup> s;
- T<sub>1</sub>-S<sub>1</sub> sugárzás nélküli átmenet: ~ 10<sup>-7</sup> s.

### 3.3.2. Az abszorpciót követő folyamatok sebességi együtthatói

Egy kezdetben [A<sup>0</sup>] koncentrációban jelenlévő, alapállapotú (S<sub>0</sub>) molekulából a gerjesztést követően [A<sup>1</sup>] jut gerjesztett S<sub>1</sub> állapotba, ahonnan sugárzásmentes folyamattal, vagy emisszióval visszakerül S<sub>0</sub> alapállapotba. Ekkor a koncentráció időbeli függése az alábbi képlettel írható le:

$$-\frac{d[A^1]}{dt} = (k_r^S + k_{nr}^S)[A^1], \quad (3.8)$$

ahol  $k_r^S$  a foton kibocsátásával járó rezonáns folyamat sebességi együtthatója,  $k_{nr}^S$  a sugárzás nélküli, nem rezonáns sebességi együttható. Felhasználva, hogy

$$k_{nr}^S = k_{IC}^S + k_{ISC}^S, \quad (3.9)$$

ahol  $k_{IC}^S$  a belső konverzió, míg  $k_{ISC}^S$  a spinváltó átmenet sebességi együtthatója, integrálás után azt kapjuk, hogy:

$$[A^1] = [A^1]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right), \quad (3.10)$$

ahol  $[A^1]_0$  a gerjesztett állapotban lévő molekulák koncentrációja,  $\tau_s$  az S<sub>1</sub> állapot élettartama:

$$\tau_s = \frac{1}{(k_r^S + k_{nr}^S)} \quad (3.11)$$

### 3.3.3. A lumineszcencia hatásfoka

A kvantumhatásfok ( $\Phi_n$ ) megadja az 1 s alatt emittált és elnyelt fotonok számának hányadosát. Folyamatos gerjesztéskor:

$$\Phi_e = \frac{\nu_e}{\nu_a} \Phi_q = \frac{\lambda_a}{\lambda_e} \Phi_q, \quad (3.12)$$

ahol  $\Phi_e$  az energia-hatásfok.

Impulzusgerjesztéskor a kvantumhatásfok:

$$\Phi_q = \frac{\int_0^\infty N_e dt}{\int_0^t N_a dt}, \quad (3.13)$$

ha a gerjesztés  $t$  ideig tartott. Másképpen kifejezve:

$$\Phi_q = \frac{k_e N_m}{k_a N_n}, \quad (3.14)$$

ahol  $N_m$  a gerjesztett,  $N_n$  az alapállapotban lévő molekulák száma,  $k_e$  az emissziós,  $k_a$  az abszorpciós átmeneti gyakoriság.

### 3.3.4. A lumineszcencia csillapodása

A lumineszcencia csillapodása impulzus gerjesztés esetén exponenciális jellegű folyamat, a lumineszcencia intenzitása arányos a gerjesztett állapotbeli molekulák számával (3.10):

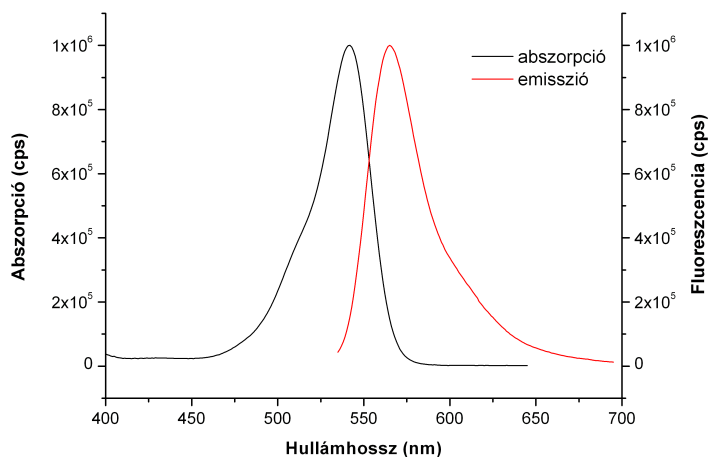
$$I(t) = I(0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_0}\right), \quad (3.15)$$

ahol  $\tau_0$  az az idő, amely alatt a  $t = 0$  időpontban gerjesztett részecskék száma  $e$ -ad részére csökken. Ezt a gerjesztett állapot átlagos élettartamának, vagy a lumineszcencia csillapodási idejének is nevezzük.

### 3.3.5. Színképek

Színképnek, vagy spektrumnak nevezzük az anyag által kisugárzott fény intenzitásának az energiakvantumoknak rezgésszám, illetve hullámhossz szerinti eloszlását. Molekulák esetén az abszorpciós maximum és a fluoreszcencia maximuma közti energiakülönbséget Stokes-eltolódásnak hívjuk (3.3. ábra), vagyis a fluoreszcencia spektrum súlypontja mindig hosszabb hullámhosszoknál helyezkedik el, mint az abszorpciós színképé [9].





3.3. ábra. Stokes-eltolódás Rodamin B etanolos oldata esetén.

Ha az alap és a gerjesztett állapotok vibrációs szintjei közötti energiaszintek megegyeznek, akkor a fluoreszcencia spektrum az első elnyelési sáv tükörképe lesz. Ezen tükörszimmetria szabályt először Ljovsin fogalmazta meg:

$$f_q(\nu) = \text{konst} \cdot \varepsilon(2\nu_0 - \nu), \quad (3.16)$$

ahol  $f_q$  az emissziós kvantumspektrum,  $\nu_0$  a tükörfrekvencia.

### 3.3.6. Spektrofotométerek

A spektrofotométerek olyan optikai mérőberendezések, amelyek segítségével detektálni, mérni lehet a mintán áthaladó, közel monokromatikus fény intenzitás változásait a hullámhossz függvényében. Főbb komponenseik: sugárforrás, mintatér, monokromátor, detektor, erősítő és rögzítő. Csoportosítani tudjuk őket a mérés hullámhossz tartománya szerint (UV, VIS, IR), a beérkező fény bontásának módja szerint (rácsos és prizmás) és felépítésük szerint (egy- és kétsugaras spektrofotométerek) [6]. Sugárforrásként UV tartományban deutériumot, láthatóban wolfram lámpát, míg IR tartományban globár, vagy Nernst izzót használnak. Mintatérként üveg-, vagy kvarcküvettek használatosak. Ezen

küvelták esetén természetesen az optikai úthosszként szolgáló oldalhossz a legfontosabb paraméter. A monokromátor egység az összetett fény felbontására, illetve meghatározott, közel monokromatikus fény előállítására szolgál. A prizmás készülékek fényereje általában jobb, de felbontóképességük erősen hullámhosszfüggő, ezért inkább a rácisos monokromátorok használatosak napjainkban. Detektorként leggyakrabban fotoelektronsokszorozót használnak, hiszen széles hullámhossztartományban és jobb jel-zaj viszonytal működnek, de egyre terjednek a félvezető detektorok (PIN diode) és a sokcsatornás (CCD, diode array) detektorok.

### 3.3.7. Több komponens meghatározása

Egymással reakcióba nem lépő elegyek esetén az abszorpciós spektrum az egyes komponensek spektrumából tevődik össze:

$$A_{\text{össz}} = A_1 + A_2 + \cdots + A_n = \sum_{i=1}^n A_i. \quad (3.17)$$

$n$  különböző hullámhosszon mérve elvileg meghatározható az  $n$  db komponens, mivel:

$$A_{\text{össz}} = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \cdots + \varepsilon_n c_n l = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i l, \quad (3.18)$$

ahol  $\varepsilon$  az abszorpciós koefficiens.

Megmérve az egyes komponensek tiszta spektrumát, a koncentrációk ismeretében minden hullámhosszra a koefficiens kiszámolható. Így a keverék minta spektrumából egy  $n$  ismeretlenes egyenletrendszer megoldásával megadható az egyes komponensek koncentrációja. Egy kétkomponensű keverék esetén:

$$A_{\text{össz},1} = \varepsilon_{A,\lambda_1} c_A l + \varepsilon_{B,\lambda_1} c_B, \quad (3.19)$$

$$A_{\text{össz},2} = \varepsilon_{A,\lambda_2} c_A l + \varepsilon_{B,\lambda_2} c_B, \quad (3.20)$$

ahol  $A$  és  $B$  a két komponens,  $\lambda$  a hullámhosszat jelöli.

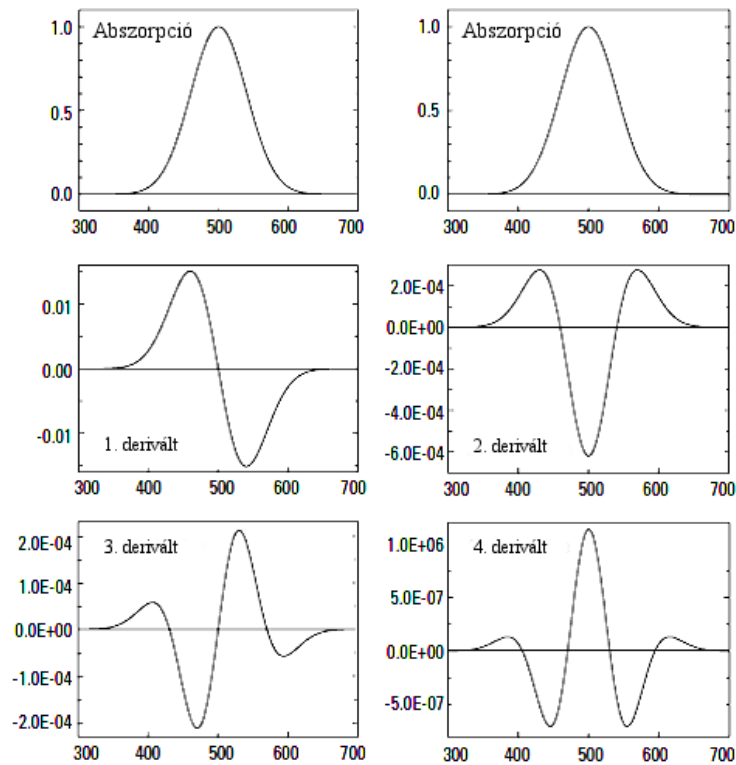
### 3.3.8. Derivatív spektrofotometria

A derivatív technika a spektrometriai módszerek leggyakrabban, kvalitatív és kvantitatív meghatározások esetén is jól alkalmazható módszere. Háttérkorrekcióra, vagy erősen átfedő komponensek szétválasztására is kitűnően alkalmas eljárás, melyre számos új, standardizált mérési eljárást fejlesztettek az elmúlt évek során. A módszer alapelve, mely szerint a felvett spektrumot hullámhossz szerint deriválják -nagyobb móltra tekint vissza- [10–12]. A jelenlegi mérőberendezések a méréssel szinte egy időben állítják elő a derivatív színeképet, lehetőséget adva bizonyos automatizálási feladatokra. A deriválási folyamat során az eredeti függvény minimum és maximum helyei zérus értéket vesznek fel, az inflexiós pontok pedig a második derivált spektrum zérus helyei lesznek. Minél magasabb rendű deriváltat képzünk, annál strukturáltabb szerkezetet kapunk (3.4. ábra). A gyakorlatban általában a második és az ezt követő páros sorszámú deriváltakat használják a kiértékelések során. A technika segítségével kiemelhetőek az alap színeképen mutató minimális eltérések, így bizonyos jelenségek abszorpcióra, vagy emisszióra gyakorolt hatását jobban figyelemmel tudjuk kísérni. A konstans háttér eltávolítására már az első derivált is alkalmas. Ha a háttér a hullámhossz függvénye szerint monoton változik, akkor a második deriváltnál értéke zérus lesz. Amennyiben a háttér hullámhosszfüggését magasabb rendű függvény írja le, úgy a negyedik vagy magasabb rendű derivált lesz alkalmas annak eliminálására. Az alábbi egyenlet segítségével széles átfedő sávok megszüntetésére van lehetőség, ha a vizsgált komponens keskeny sávval rendelkezik:

$$\frac{D_X^n}{D_Y^n} = \frac{W_Y^n}{W_X^n}, \quad (3.21)$$

ahol  $X$  a keskenyebb,  $Y$  a szélesebb, átfedő sáv,  $D^n$  az adott sáv  $n$ -edik deriváltjának amplitúdója,  $W$  az eredeti sáv szélesség).

A sáv szélesség növekedésével a derivált görbe sávjainak intenzitása rohamosan csökken. A módszer használatával tehát a széles és éles sávok közötti különbség növelhető (3.5. ábra).



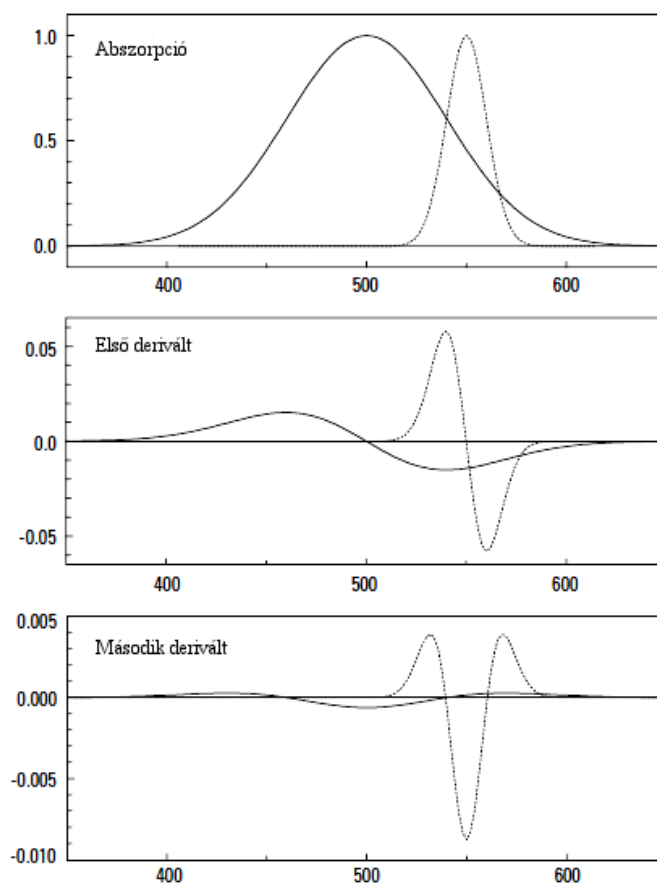
3.4. ábra. Szimulált Gauss görbe és deriváltjai. (Forrás: Anthony J. Owen: Uses of Derivative Spectroscopy, Application Note)

Kettő, vagy több komponensű keverékek mennyiségi analizésére is kiválóan alkalmas technika. Kellően híg oldatok esetén, vagyis amikor a koncentráció lineáris kapcsolatban áll a mért intenzitások maximumával, az alábbi egyenlet felhasználásával számíthatunk koncentrációt:

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n \varepsilon}{d\lambda^n} bc, \quad (3.22)$$

ahol  $\lambda$  a hullámhossz,  $A$  az abszorbancia,  $\varepsilon$  az extinkciós koefficiens,  $b$  a minta optikai úthossza,  $c$  a minta koncentrációja.

A derivált spektrum maximuma és minimuma közti különbség egy előre kiválasztott hullámhosszon jobb jel-zaj arányt ad, viszont az átfedő komponensek interferenciája ilyenkor felerősödik. Továbbá minél magasabb rendű a derivált, annál jobban romlik az előbb említett jel-zaj aránya. Található viszont olyan pont, ahol a keresett komponens jele maximális, míg az interferálóé minimális. Több komponens együttes jelenléte esetén a



3.5. ábra. Átfedő sávok eliminálása. (Forrás: Anthony J. Owen: Uses of Derivative Spectroscopy, Application Note)

módszer hatásfoka algebrai metódusok segítségével tovább növelhető [12].

# Eredmények

## 4. fejezet

# Módszerek és eljárások

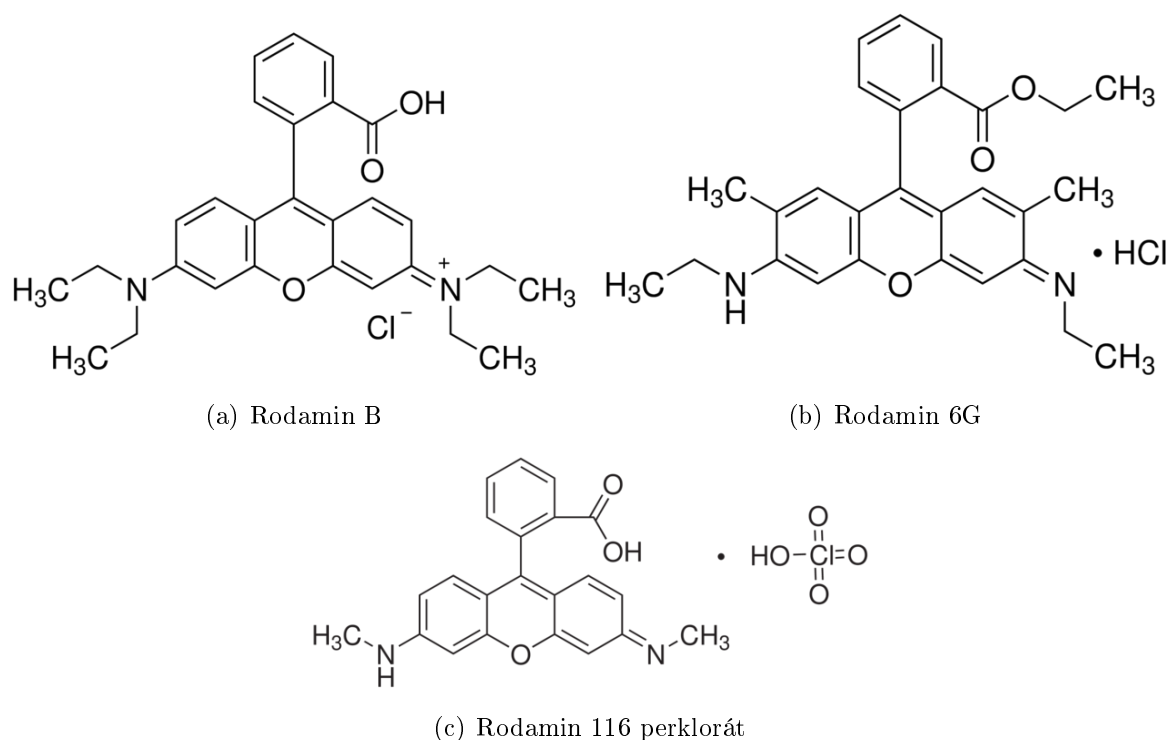
### 4.1. Felhasznált vegyszerek és minták

#### 4.1.1. Rodamin festékek

Munkám során a teszteléshez használt keverékoldatok elkészítésekor Rodamin B ( $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ ), Rodamin 6G ( $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ ) és Rodamin 116 perklorát ( $C_{22}H_{18}N_2O_3 \cdot HClO_4$ ) festékpорок (Sigma-Aldrich) különböző koncentrációjú elegyeit állítottam elő. Oldószerként spektroszkópiailag tisztaságú etanolt használtam ( $CH_3CH_2OH$ ) (Sigma-Aldrich). Az egyes komponensek elnyelési és kibocsátási maximumaihoz tartozó spektrális adatokat a 4.1. táblázatban összegeztem. A felhasznált festékek hasonló abszorpciós koefficienssel és kvantumhatásfokkal rendelkeznek.

4.1. táblázat. Az alkalmazott Rodamin festékek gerjesztési és emissziós maximumai.

	$\lambda_{ger}$ (nm)	$\lambda_{emi}$ (nm)
Rodamin 6G	530	550
Rodamin B	542	566
Rodamin 116	516	540



4.1. ábra. Az alkalmazott festékek. (Forrás: <http://www.sigmaaldrich.com>)

### 4.1.2. Búza minták

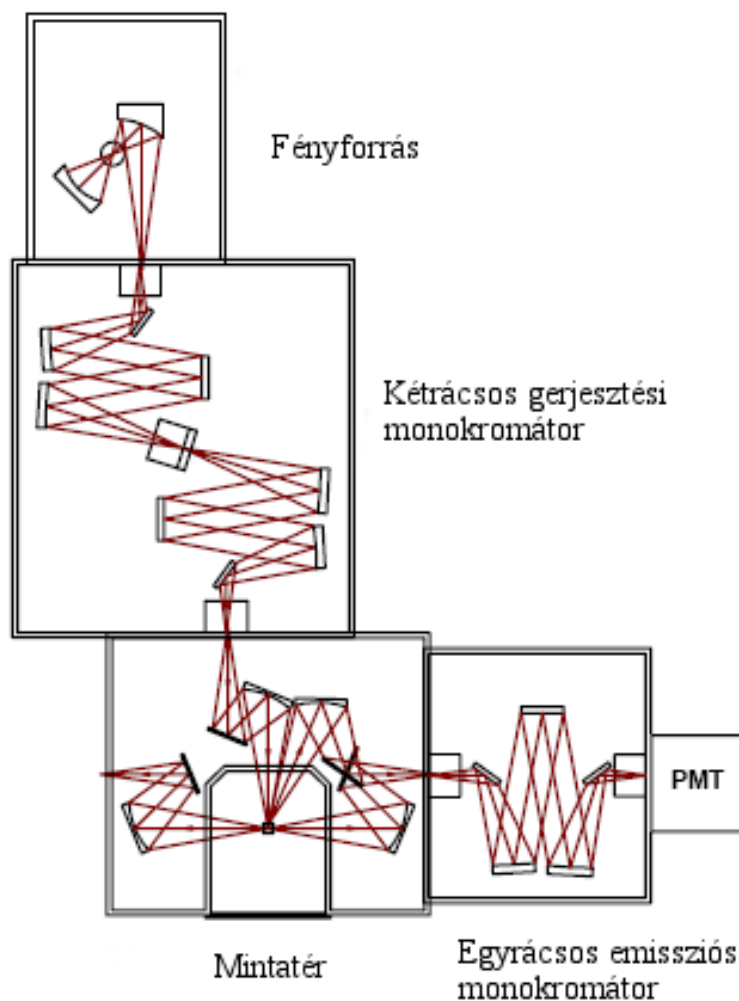
A mérésekhez használt, összesen 26 mintát a szegedi Gabonakutató Nonprofit Kft-től kaptuk. A fusarium graminearum jelenlétére utaló toxin mennyiségét – az úgynevezett deoxinivalenol (DON) tartalmat – nagy teljesítményű folyadékkromatográfiai módszerrel (HPLC), laboratóriumi körülmények között a Dr. Mesterházy Ákos vezette csoport állapította meg. Az előkészítés során 6 g mennyiségű mintát őröltek meg, amelyből 5 g-ot használtak fel a kiértékeléshez. A munkám során különböző összeállítású mintacsoportokat használtam fel a mérésekhez.

## 4.2. Mérőberendezés

A színképeket egy Jobin-Yvon Fluorolog Tau 3 spektrofluorométer segítségével vettem fel. A méréseket steady-state módban, foton számlálással végeztem,  $21\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ -on temperálva egy Wavelength Electronics LFI-3751 típusú Peltier hűtő segítségével.



A készülék sematikus vázlatát a 4.2. ábrán látható.



4.2. ábra. Jobin Yvon Tau3 fluorolog.

Technikai paraméterek:

- Fényforrás: léghűtéses 450W Xenon lámpa;
- Belépési rés tartomány: 0-14 nm.
- Gerjesztési monokromátor: Marásos technikával készült Czerny-Turner típusú (1200 vonal/mm) optikai rács, csillanási hullámhossz: 330 nm. Beállítható hullámhossz tartomány: 200-700 nm. Diszperzió értéke: 4,2 nm/mm.

- Mintatér: T-kialakítású (Right-Angle és Front Face mérést támogató), gerjesztési referencia detektorral (kalibrált fotodióda) ellátva.
- Emissziós monokromátor: a gerjesztési monokromátorral megegyező típusú, csilánási hullámhossz: 500 nm. Beállítható hullámhossz: 300-1000 nm. Diszperzió értéke: 4,2 nm/mm.
- Kilépési rés tartomány: 0-14 nm.
- Emissziós detektor: R928P nagy érzékenyséű fotoelektronsokszorozó. Mérési tartomány: 185-900 nm.

A mérésekhez 1 cm belső méretű Hellma gyártmányú kvarc küvettákat használtam. A gerjesztési hullámhossz tartománya 400-600 nm volt 2 nm-es lépésközzel. Az emissziós oldali monokromátor szintén 2 nm-es lépésközzel 500-650 nm-ig pásztázott. A belépő és kilépő rések 3 nm-en voltak rögzítve, figyelembe véve, hogy az elméleti sávszélesség:

$$\text{sávszélesség (nm)} = \text{résszélesség (mm)} \times \text{diszperzió (nm/mm)} \quad (4.1)$$

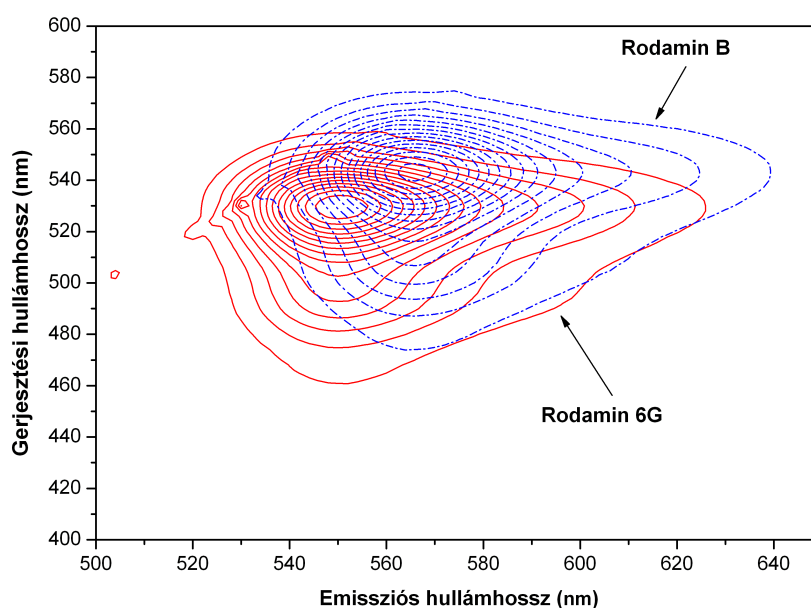
## 4.3. Mérési módszerek

### 4.3.1. Keverékek

A kalibrációs görbék előállításához mindegyik festékből egy  $10^{-5}$  M etanosos törzsoldatot készítettem. Ezek hígításával a következő koncentrációsorozatot állítottam elő:  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $2 \times 10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M. Ezen oldatok kellően hígak ahhoz, hogy a Lambert-Beer törvény értelmében az extinkciók egyenes arányban álljanak a koncentrációval.

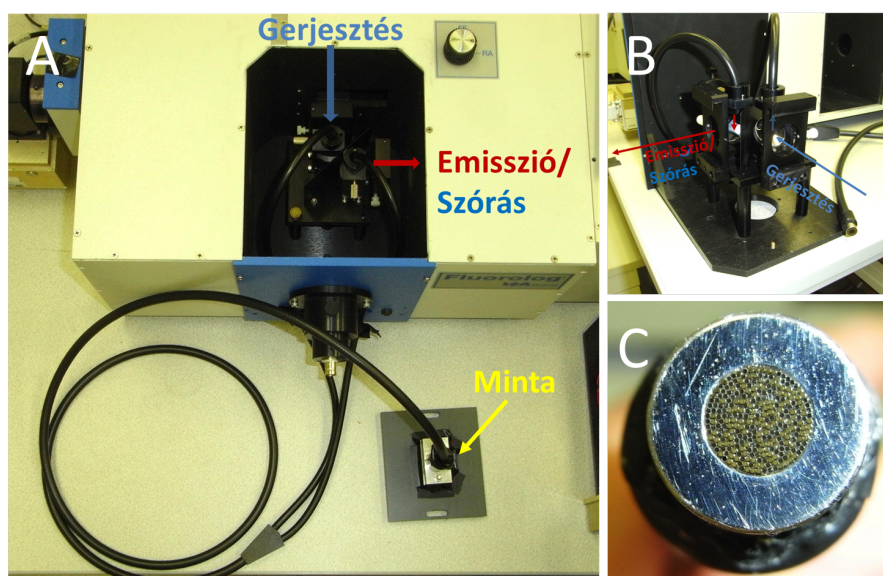
### 4.3.2. Gerjesztési-emissziós mátrixok

A gerjesztési-emissziós mátrixok (angolul Excitation-Emission Matrix, röviden EEM) méréseihez ezen alap oldatokból, 2 illetve 3 komponensből álló elegyeket állítottam össze, kombinálva minden egyes komponens koncentrációját az  $5 \times 10^{-10}$  M –  $10^{-7}$  M tartományban. A gerjesztési-emissziós mátrix egymás után mért emissziós színeképek sorozatából épül fel, ahol a gerjesztő hullámhossz értékét lépésenként változtatjuk. Az így kapott mátrix x tengelye az emissziós hullámhosszakat, az y tengelye a gerjesztési hullámhosszakat, míg a z tengely az ezen hullámhossz-párokhoz tartozó intenzitásértékeket tartalmazza. Ezen mátrixok felhasználásával kontúrtérképeket hozhatunk létre, amelyek az azonos intenzitás-értékű pontokat összekötő görbék intenzitás szerinti eloszlását ábrázolják. A 4.3. ábrán két komponens ( $10^{-7}$  M Rodamin B és  $10^{-7}$  M Rodamin 6G) mátrixának kontúrtérképe látható. Látható, hogy a két festék gerjesztési és emissziós ma-



4.3. ábra.  $10^{-7}$  M Rodamin B és  $10^{-7}$  M Rodamin 6G kontúrtérképe.

ximuma közel, kb. 15 nm-re helyezkedik el egymáshoz képest. A kimutatás nehézsége már a két komponens 1:10 arányt meghaladó keverésénél jelentkezik, ideális tesztkörnyezetet teremtve az egyes módszerek kimutatási határainak elemzéséhez.



4.4. ábra. (A): A mérésekhez használt spektrofluoriméter és az optikai kábel szürke előtétlemeze. (B) Az optikai elrendezés Y kábel esetén. (C) A méréshez használt optikai kábel felszíne.

### 4.3.3. Reflexiós spektrumok

A méréseket a már bemutatott Horiba Jobin-Yvon Fluorolog Tau-3 spektrofotométerrel végeztem (4.4. ábra). Kettéágazó Y optikai kábelt használtam a búzaszemek megvilágításához és az azok által emittált/szórt fény begyűjtéséhez. A további elemzésekhez gerjesztési-emissziós mátrixokat vettem fel. A mérés során használt paraméterek:

Gerjesztési hullámhossz: 240 nm – 550 nm-ig 5 nm-es lépésekkel;

Emissziós hullámhossz: 300 nm – 700 nm-ig 5 nm-es lépésekkel;

A gerjesztési és emissziós oldali rés szélessége 3 nm volt.

A reflexiós spektrumot szomszédos pontok adják, ahol  $\lambda_{\text{ger}} = \lambda_{\text{emi}}$ . A detektor rendszer telítődésének elkerülése végett a reflexiós spektrumokat külön kell mérni, jóval alacsonyabb intenzitások mellett.

Az  $R(\lambda)$  relatív reflektanciát az alábbiak szerint számolhatjuk:

$$R(\lambda) = \frac{I_{X\%}(\lambda)}{I_{\text{MAX}\%}(\lambda)}, \quad (4.2)$$

ahol  $I_{X\%}(\lambda)$  és  $I_{MAX\%}(\lambda)$  az intenzitások értékei  $\lambda_{ger} = \lambda_{emi}$  esetén. Az alsó indexek a fertőzöttség mértékét mutatják. Mivel véletlenül kiválasztott szemek abszolút reflexióját mérjük, azok térbeli pozíciójának megváltozása miatt - az alkalmazott mérési eljárás mellett - a mért színeképi intenzitások mintáról-mintára változnak. Ezt korrigálhatjuk annak a ténynek a felhasználásával, hogy a mért reflexiós spektrumokban nincs számottevő különbség egy bizonyos ( $\sim 700 - 800$  nm) hullámhossz tartományon. Ezért az előbb definiált  $R(\lambda)$ -t korrigálhatjuk az ezen a tartományon vett intenzitások hányadosainak átlagával:

$$\left\langle \frac{I_{X\%}(\lambda')}{I_{MAX\%}(\lambda')} \right\rangle, 700\text{nm} < \lambda' < 800\text{nm} \quad (4.3)$$

Elméletileg  $I_{X\%}(\lambda')$  és  $I_{MAX\%}(\lambda')$  intenzitásoknak egyenlőnek kéne lenniük, de a gyakorlatban ezek különböznek, ezért e különbséget korrigálhatjuk az alábbiak szerint:

$$R_{\text{norm}}(\lambda) = \frac{\frac{I_{X\%}(\lambda)}{I_{MAX\%}(\lambda)}}{\left\langle \frac{I_{X\%}(\lambda')}{I_{MAX\%}(\lambda')} \right\rangle} \quad (4.4)$$

Ennek eredményeként kapjuk a különböző mértékben szennyezett szemek normalizált relatív reflektancia spektrumait.

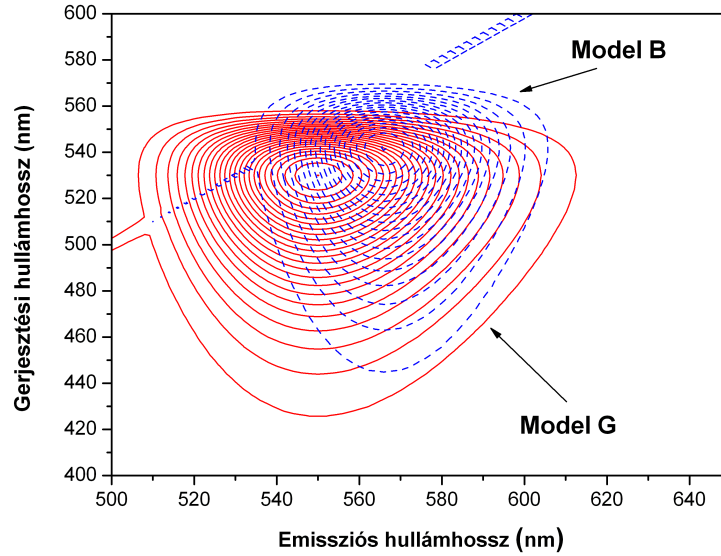
## 4.4. Számítási módszerek

### 4.4.1. Szimulációk

#### 4.4.1.1. Lognormált spektrum alak

Az egyes metódusok teszteléséhez a valódi, mért színeképeken kívül szimulált, mesterséges spektrumokat állítottam elő. Segítségükkel kikerülhető a szisztematikus és véletlen mérési hiba lehetősége, valamint a jel-zaj viszony a megfelelő algoritmusokkal könnyebben, széles határok között, pontosan beállítható. A spektrumok alakját (mind gerjesztési, mind emissziós oldalról) az alábbi (4.5) lognormált formával közelítettem, hiszen szá-

mos irodalmi hivatkozás bizonyítja, hogy segítségükkel a szerves molekulák valódi, mért színeképe jól közelíthető [13–15]. A 4.5. ábrán az előző ábrához (4.3. ábra) tartozó komponensek szimulált változata látható. Az intenzitás hullámhossz szerinti eloszlása az alábbi



4.5. ábra. A mért komponensek ( $10^{-7}$  M Rodamin B és  $10^{-7}$  M Rodamin 6G) paramétereit felhasználó szimulált spektrumok kontúrtérképe.

egyenletekkel adható meg [14]:

$$I(\lambda) = I\left(\frac{10^4}{\lambda_m}\right) \cdot \exp\left\{-\left(\frac{\ln 2}{\ln^2 \varrho}\right) \cdot \ln^2 \left[\frac{a - \frac{10^4}{\lambda}}{a - \frac{10^4}{\lambda_m}}\right]\right\}, \quad \text{ha } \lambda < a \quad (4.5)$$

$$I(\lambda) = 0, \quad \text{ha } \lambda \geq a \quad (4.6)$$

$\varrho$  az aszimmetria paramétere:

$$\varrho = \frac{\frac{10^4}{\lambda_m} - \frac{10^4}{\lambda_-}}{\frac{10^4}{\lambda_+} - \frac{10^4}{\lambda_m}}, \quad (4.7)$$

(ahol  $\lambda_+$  és  $\lambda_-$  a félértékszélességhez tartozó bal és jobb oldali hullámhossz értékek,  $\lambda_m$  a maximum intenzitáshoz tartozó hullámhossz. A (4.5) egyenletben szereplő  $a$  határérték

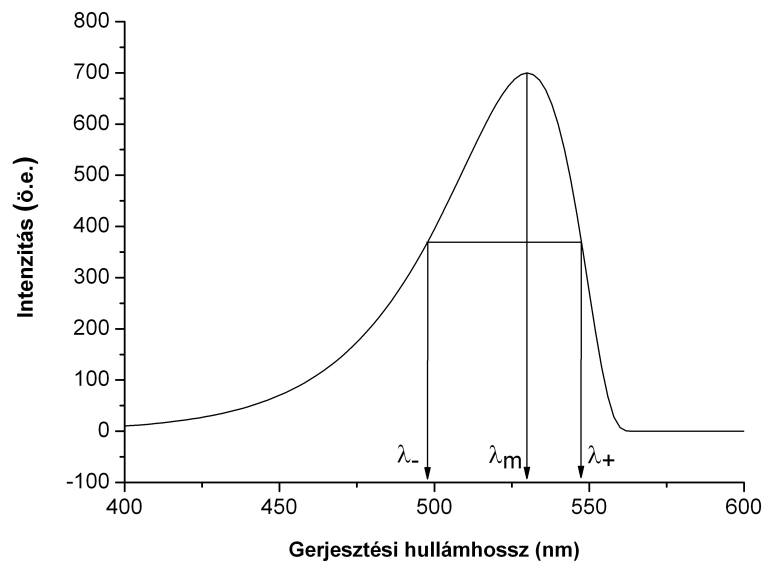
a következőképpen fejezhető ki:

$$a = \frac{\frac{10^4}{\lambda_m^2} - \frac{10^4}{\lambda_- \lambda_+}}{2 \cdot \frac{10^4}{\lambda_m} - \left( \frac{10^4}{\lambda_-} + \frac{10^4}{\lambda_+} \right)} \quad (4.8)$$

Az eredeti közleményben az összes egyenletben (4.5–4.8) hullámhossz ( $\lambda$ ) helyett hullám-szám ( $\bar{\nu}$ ) szerepelt [14]. A spektrofluoriméterekkel végzett mérések ekvidisztans hullám-hosszú mátrixokat adnak, ezért szükséges volt az átváltás az általában  $\text{cm}^{-1}$ -ben megadott hullámszámról a nm-ben megadott hullámhosszra az alábbiak szerint:

$$\bar{\nu} = \frac{10^4}{\lambda} \quad (4.9)$$

A szimulált spektrum alakját a 4.6. ábra szemlélteti.



4.6. ábra. Szimulált lognormált spektrum.

#### 4.4.1.2. A Rayleigh-szórás szimulációja

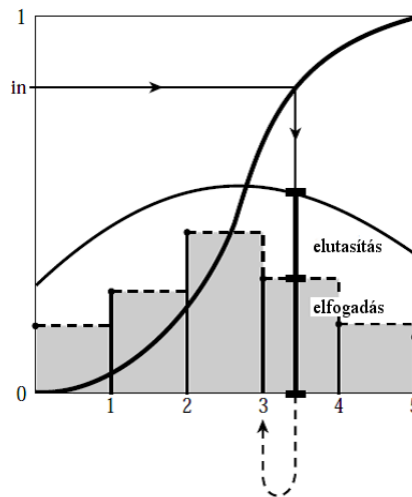
Szimulált gerjesztési-emissziós mátrixokat állítottam elő, melyekhez a mért gerjesztési-emissziós mátrixok Rayleigh-szórásainak paramétereit (félértékszélesség, maximum) felhasználó Gauss-eloszlású fényszórást adtam hozzá.

#### 4.4.1.3. Poisson zaj előállítása

Foton számláló módban a mért zajt legjobban a Poisson típusú eloszlással lehet közelíteni. Ezért ilyen típusú zajt adtam hozzá a lognormált alakot leíró szimulált mátrixokhoz. Az addendumot Poisson-eltérések visszautasításos módszerével generáltam. Az alábbi formula felhasználásával folytonos eloszlást kapunk [16]:

$$q_x(m)dm = \frac{x^{[m]}e^{-x}}{[m]!}dm, \quad (4.10)$$

ahol  $[m]$  az  $m$ -hez legközelebb eső, annál kisebb egész szám. A 4.7. ábra az algoritmus működését szemlélteti. Az adatok generálása közben az adott algoritmus használatával



4.7. ábra. Poisson eltérések generálása visszautasításos módszerrel.

kapjuk:

$$\psi = \text{Poidev}(m), \quad (4.11)$$



ahol  $m$  a várható érték. Számos futtatás eredményeként azt kapjuk, hogy a várható érték megegyezik a varianciával, mint ahogy az egy Poisson-eloszlás esetén várható.

A mátrixok generálásakor az egyes adatpontok előállításához a végső formula:

$$I_{i,j}^* = I_{i,j} + \sqrt{I_{i,j}} \cdot (\psi - m) \cdot \zeta, \quad (4.12)$$

ahol  $I_{i,j}$  a mátrix zaj nélküli intenzitásértéke az adott ponton,  $I_{i,j}^*$  a zajjal ellátott intenzitás,  $i$  a sor és  $j$  az oszlop sorszáma a mátrixban,  $\zeta$  a hibafaktor.

A futtatások során  $m = 100$ -at választva  $\zeta = 0,2$  érték megfelel a 0,2%-os zajnak az adott intenzitás viszonyában.

Az előzőekben leírt módszerek felhasználásával állítottam elő a mindkét ( $i$  és  $j$ ) irányban lognormált alakot mutató, Poisson-zajjal ellátott modell mátrixokat. A szoftveres megvalósítás OriginPro<sup>®</sup> 7 segítségével történt. Az említett program saját, beépített programozási nyelvvel rendelkezik, amely LabTalk névre hallgat. Ezt egészíti ki az Origin C környezet, amely mint elnevezése is mutatja natív ANSI C programozási nyelvet támogat [17]. Ezen kívül, korlátozottan C++ és C# kiterjesztések is elérhetőek, mint például osztályok definiálása, függvények túlterhelése (egy név alatt több függvény is elérhető, csak más paraméterekkel) és referencia szerinti hivatkozások. A kétféle környezet ötvöztetésével tetszőleges algoritmusok állíthatóak elő, melyek a fő programból indíthatóak és eredményük, mint új táblázat, vagy mátrix jelenik meg az alkalmazásban.

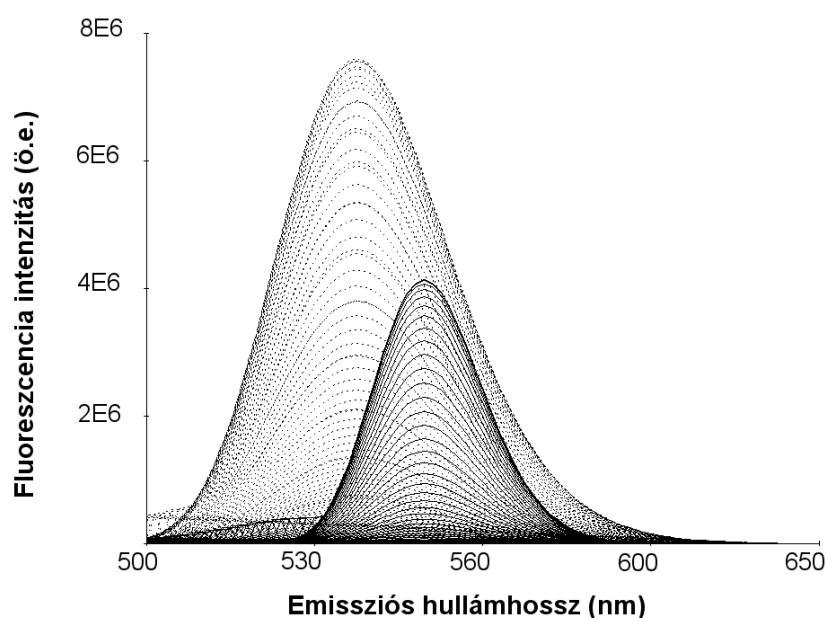
## 4.5. Derivatív mátrix izopotenciális szinkronfluorometria és a legkisebb négyzetösszegezen alapuló illesztés módszerei

Keverékoldatok esetén a spektrálisan átfedő komponensek koncentrációjának meghatározásakor számos nehézség merül fel. Az analitikai módszerek fejlődésével egyre újabb

és újabb mérési eszközök és feldolgozó algoritmusok állnak rendelkezésre, melyek képesek az egyes komponensek koncentrációinak meghatározására kellően bonyolult oldatok esetén is. Számos biológiai minta esetén a keresett molekula marker jele rejtve marad a többi vegyület széles spektrumú sugárzása miatt. Ilyen esetekben speciális algoritmusokat kell kiválasztani ahhoz, hogy a rejtett információ kinyerhető legyen a kvantitatív meghatározásokhoz. Elterjedt módszerei vannak a komponensek közvetlen és szimultán meghatározásának. A leghatékonyabbak között említhető a null-átmeneti első derivált (angolul Zero Crossing First Derivative) spektrofotometriás módszer [18, 19], szinkronfluorimetriát alkalmazó eljárások [20–23], a második deriváltat elemző módszerek [28–30]. Szintén több komponens szétválasztására alkalmas eljárás a párhuzamos faktor analízis és az N-utas részleges négyzetösszegezen alapuló regresszió [31]. Munkám során olyan technikákat kerestem, amelyek kellően jó felbontóképességgel rendelkeznek és kellően ellenállóak a hibákkal szemben. Két, a témakörben elterjedten használt, spektrális felbontásra alkalmas metódust hasonlítottam össze. Elsőként az egyre nagyobb népszerűségnek örvendő derivált mátrix izopotenciális szinkronfluorimetriát (angolul Derivative Matrix Isopotential Synchronous Fluorescence, röviden DMISF) [32–36]. Ez, mint ahogyan azt az elnevezése is mutatja, egy derivatív módszert alkalmazó spektroszkópai módszer. Másodszor egy régóta alkalmazott, klasszikusnak mondható módszert, a legkisebb négyzeteken alapuló illesztést (angolul Least Squares Fitting, röviden LSF) teszteltem [37–41]. Mindkét módszernek megvannak a maga előnyei és hátrányai. Előnyeik közé jó felbontási képességük, míg hátrányaik közé a felhasznált módszerek miatti zajfüggésük sorolható. Habár mindkét eljárás kiválóan alkalmas a háttérben megbújó komponensek kimutatására, a mögöttük lévő matematikai apparátus még nem került összehasonlításra spektroszkópai szempontból. Mint az köztudott, a mért színeképek mindig tartalmaznak szisztematikus hibákat és véletlen zajokat, melyek megnehezítik ezen eljárások precíz összehasonlítását, ezért szükséges modell adatok előállítása, melyek az eredetiekhez hasonló, de kontrollált zajjal rendelkező halmazok. Munkám során a két módszer detektálási és zajtűrési határait állapítottam meg mért és szimulált adatok felhasználásával.

### 4.5.1. DMISF spektrumok előállítása

A DMISF spektrum előállításához bemenetként egy 3 dimenziós gerjesztési-emissziós mátrix (angolul Excitation-Emission Matrix, röviden EEM) szükséges. Ezen mátrix azonos intenzitású pontjait összekötő zárt görbét izopotenciális görbéknek nevezzük. Egy két komponenset tartalmazó keverék esetén, ha azok spektrális átfedésben vannak, a következő megkülönböztetést tehetjük: a nagyobb intenzitást, tehát burkoló felületet adó komponens lesz az interferáló, míg az intenzitásban elnyomott vegyület a keresendő összetevő (4.8. ábra). A DMISF spektrum előállításához első lépésként a keresendő minta mát-



4.8. ábra. Erősen átfedő, mért komponensek felületi grafikonjai.  $10^{-7}$ M Rodamin 6G (pont) és  $10^{-7}$  M Rodamin B (vonal)

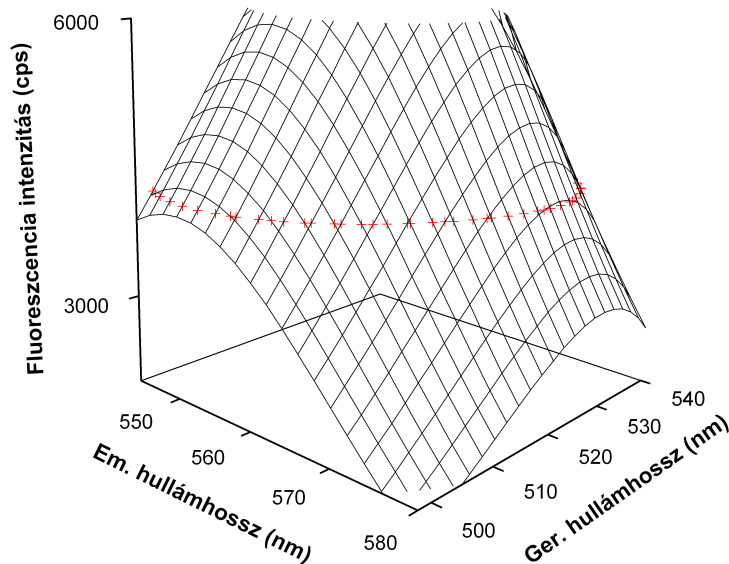
rixának maximumát választjuk ki, majd az ezen intenzitáshoz tartozó görbét keressük az interferáló komponens mátrixán. Mivel az adott intenzitásértékhez nagy valószínűséggel nem tartozik adatpont (csomópont) az interferáló mátrix felületén, ezért Lagrange-interpolációval [33] adjuk meg a keresett intenzitású görbe gerjesztési és emissziós pontjait. Így gerjesztési-emissziós hullámhossz párokat kapunk egy adott intenzitással az adott felületen. Ezt követi a DMISF intenzitásértékeinek meghatározása a keverék mátrixából.

Az előzőek során kapott hullámhossz párokhoz tartozó fluoreszcencia intenzitásokat kell kinyernünk a keverék adataiból. Ehhez a felületet jól közelítő illesztés szükséges. Ehhez 5 ponton súlyozott Bezier-interpolációt alkalmaztam, amellyel megbecsülhetjük a kívánt hullámhossz értékekhez (amelyek tehát nem feltétlenül egész számok) tartozó intenzitásértékeket. A megfelelő spline-ok kalkulációjához teszteltem az OriginPro<sup>®</sup> 7.3, 5 és 7 ponton súlyozott Bezier-spline-t használó illesztését. Az 5 pontos Bezier-interpoláció használatával az illesztés hibaszintje 1%-on belül maradt:

$$B(t) = \sum_{i=0}^5 \binom{5}{i} t^i (1-t)^{5-i} P_i; \quad t \in [0, 1], \quad (4.13)$$

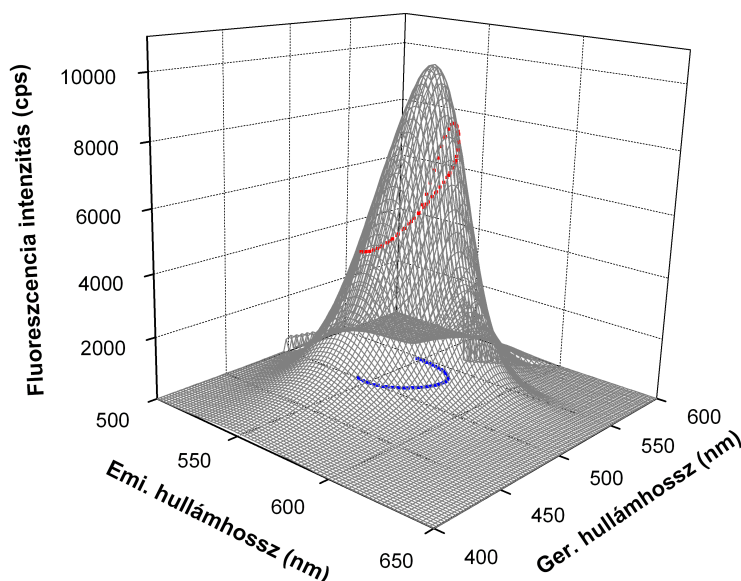
ahol  $B(t)$  az interpolációs görbe az első és utolsó pont között,  $P_n$  ( $n = 1 \dots 5$ ) a súlyozó pontok (2 balra és 2 jobbra az aktuális ponton kívül) az aktuális régió belül. A kellő pontosság eléréséhez a  $t \in [0, 1]$  intervallumot 1000 részre osztottam.

Miután megkaptam az izopotenciális szinthez társított hullámhosszakot (4.9. ábra), inverz Bezier-interpoláció használatával megkaptam a keverékmátrix adott pontokban vett



4.9. ábra. Adott intenzitásszinthez (izopotenciálhoz) tartozó pontok  $10^{-7}$  M koncentrációjú Rodamin 6G felületén.

intenzitásait. A 4.10. ábra mutatja az izopotenciális útvonalhoz tartozó hullámhossz-



4.10. ábra. A kiválasztott MISF útvonal (alsó kék, félkövér pontok) és az ezekhez talált intenzitások (felső vörös, félkövér pontok) a keverék mátrixán ( $10^{-7}$  M Rodamin 6G és  $10^{-7}$  M Rodamin B).

párok koordinátáit (alsó félkövér pontok) és az ezekhez talált intenzitásértékek helyeit (felső félkövér pontok). Az említett Lagrange, Bezier és inverz-Bezier számításokat az általam Origin C-ben írt programmal végeztem (A. függelék).

Az izopotenciális útvonal tehát egy meghatározási sorozatot jelöl, ahol minden ponthoz egy emissziós és gerjesztési hullámhossz pár társítható. Ezen pontokon végigfutva minden ponthoz egy adott intenzitásérték társítható a keverék mátrixából (4.10. ábra felső vörös, félkövér pontjai). Kinyervén az intenzitásokat, megkapjuk a mátrix izopotenciális szinkronfluorimetriás spektrumot, röviden MISF szinképet. Intenzitásértékei a keresett komponens változó és az interferáló komponens állandó fluoreszcencia jelének a összegei. Itt már áttérhetünk a hullámhosszak helyett megfigyelési sorra, hiszen itt már egy felülethez társított értékek ábrázolását valósítjuk meg.

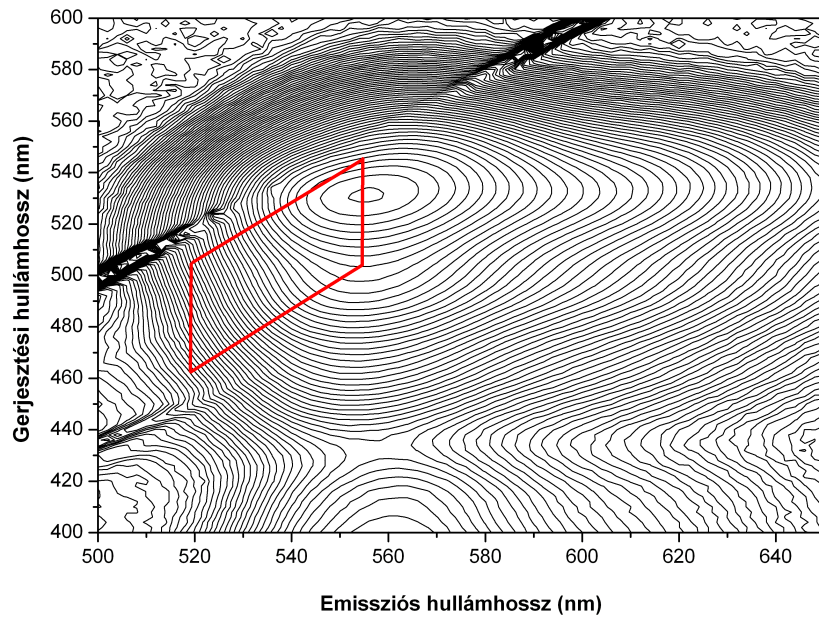
A MISF spektrum első deriváltjának képzése előtt szükséges annak simítása, melyet Savitzky-Golay algoritmus segítségével végeztem [42]. Az eljárás helyi-polinom illesz-

tést végez, és a simított görbe értékeit adja a vizsgált függvényértékek helyein, ezáltal csökkentve az első derivált fluktuációját. A keresett komponens koncentrációjának meghatározásakor, főleg zajosabb mérések esetén, a simítás mértéke erősen befolyásolja az algoritmus használatával számított értékek pontosságát. Ezért az OriginPro<sup>®</sup> 7 beépített Diff/Smooth függvényét használtam különböző paraméterekkel, hogy a legjobban illeszkedő, simított görbét állítsam elő. A kellően illesztett MISF spektrum deriválásával állítjuk elő a DMISF spektrumot. Mivel a meghatározási útvonal az interferáló komponens azonos intenzitású pontjain megy keresztül, ezért a kapott MISF spektrum deriválásakor ezen komponens kinullázódik. Tehát az alkalmazott eljárás előnye az, hogy a DMISF spektrum független lesz a háttérkomponens koncentrációjától, lehetővé téve a keresett komponens koncentrációjának meghatározását. A legnagyobb és legkisebb derivált értékek különbsége arányos a koncentrációval [32,36], híg oldatok esetén.

#### 4.5.2. A legkisebb négyzetek módszere

Keverékoldatok esetén az egyes komponensek koncentrációjának meghatározása a legkisebb négyzetek illesztésének (angolul Least Squares Fitting, röviden LSF) módszerét alkalmazva egy lineáris egyenletrendszer megoldását jelenti. Az eljárás célja, hogy minimalizálja  $\chi^2$  értékét, ami az összes spektrális pontokban vett reziduumok négyzetösszegével egyenlő. Az eljárás során alkalmazott rutinok gyorsak és még komplex keverékek esetén is jó találati arányuk van. A módszer használatához egy általam továbbfejlesztett programot futtattam MathCad<sup>®</sup> 14 környezetben. A program egy lineáris mátrixegyenletet old meg, melynek eredményeként a keresett komponens bemeneti mátrixához viszonyított koncentrációját kapjuk meg. A számolások során korlátozott területű kiértékelést használtam, hogy javítsam a kimutatás pontosságát (4.11. ábra).

A módszer szerint akkor kapjuk a legjobb illesztést, ha a maradékok négyzetösszege  $\chi^2$  minimális. Az interferáló komponens gerjesztési-emissziós mátrixa legyen:  $F_1(i, j)$ ; a keresendő komponens mátrixa legyen:  $F_2(i, j)$ . A mért minta mátrixát  $Y(i, j)$  az előző kettő lineáris kombinációjaként állíthatjuk elő, miközben a megfelelő Poisson típusú zajjal



4.11. ábra. A kiértékelés területe (piros, félkövér paralelogramma) ( $10^{-7}$  M Rodamin 6G és  $10^{-7}$  M Rodamin B) keverékének kontúrtérképén

látjuk el az adott mátrixokat.  $A$  és  $B$  a két komponens mennyiségi faktorai. A reziduum négyzetösszege az alábbiak szerint számolható:

$$\chi^2 = \sum_{i,j} (Y(i,j) - (A \cdot F_1(i,j) + B \cdot F_2(i,j)))^2. \quad (4.14)$$

$\chi^2$  minimumát akkor kapjuk, ha  $\partial\chi^2/\partial A = 0$  és  $\partial\chi^2/\partial B = 0$ . Ennek mátrix formája a következőképpen írható:

$$\begin{pmatrix} \sum F_1^2(i,j) & \sum F_2(i,j) \cdot F_1(i,j) \\ \sum F_1(i,j) \cdot F_2(i,j) & \sum F_2^2(i,j) \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} A \\ B \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sum F_1(i,j) \cdot Y(i,j) \\ \sum F_2(i,j) \cdot Y(i,j) \end{pmatrix}. \quad (4.15)$$

Megoldva az alábbi inverz mátrix egyenletet:

$$\overline{M} \cdot \overline{X} = \overline{N} \quad \Rightarrow \quad \overline{X} = \overline{M}^{-1} \cdot \overline{N}, \quad (4.16)$$

azt kapjuk, hogy:

$$\begin{aligned} A &= \frac{\det(M_A)}{\det(M)} = \\ &= \frac{(\sum F_1(i, j)Y(i, j)) \cdot (\sum F_1^2(i, j)) - (\sum F_1(i, j)F_2(i, j)) \cdot (\sum F_2(i, j)Y(i, j))}{(\sum F_1^2(i, j)) (\sum F_2^2(i, j)) - (\sum F_1(i, j)F_2(i, j))^2}, \quad (4.17) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} B &= \frac{\det(M_B)}{\det(M)} = \\ &= \frac{(\sum F_2(i, j)Y(i, j)) \cdot (\sum F_1^2(i, j)) - (\sum F_1(i, j)F_2(i, j)) \cdot (\sum F_1(i, j)Y(i, j))}{(\sum F_1^2(i, j)) \cdot (\sum F_2^2(i, j)) - (\sum F_1(i, j) \cdot F_2(i, j))^2}, \quad (4.18) \end{aligned}$$

ahol  $M$  a (4.15) egyenlet baloldalán álló mátrix;  $\det(M_i)$  jelöli annak a mátrixnak a determinánsát, amelyben az  $i$ -edik ismeretlen együtthatói helyére a jobb oldalon álló számokat helyettesítjük (Cramer-szabály).

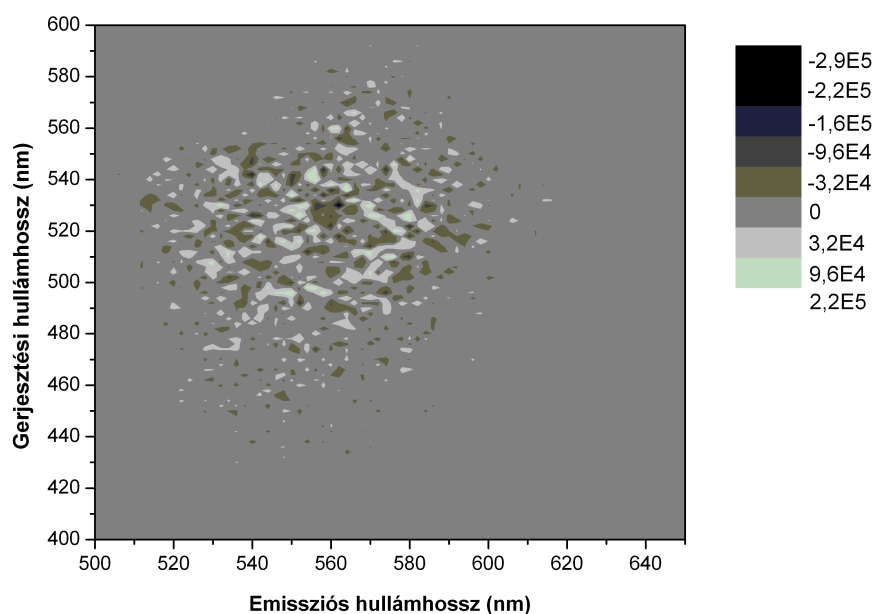
A számolás során fontos a mátrix  $(i, j)$  tartományának behatárolása, hiszen ezen számítási módszer érzékeny a kiugró értékekre. Ezért különböző tartományokat teszteltem ahhoz, hogy teljes mértékben kizárjam a mátrixban szereplő Rayleigh- és Raman-szórások vonalait és ezáltal növeljem a módszer megbízhatóságát. Ezen szórások vonalai, mint éles sávok jelennek meg a mátrixokban, intenzitásuk a monokromátorok helytelen kalibrációja esetén több százaléknyit is ingadozhat. Ezen effektusok nem kívánt hibákat eredményeznek a koncentráció meghatározásakor. Legfőképpen a Rayleigh-vonalak, hiszen keresztmetszetük és intenzitásuk jóval nagyobb a Raman-sávnál.

Megoldva a (4.14)-(4.18) egyenleteket kapjuk  $A$ -t és  $B$ -t, a két bemenetként szolgáló komponens koncentrációjának szorzófaktorát. Ahhoz, hogy az illesztés pontosságát megítélhessük, egy 3 dimenziós grafikont hoztam létre a maradékokból (4.12. ábra), melyet az alábbi egyenlettel kaphatunk meg:

$$\text{Res}(i, j) = \sum_{i, j} (Y(i, j) - (A \cdot F_1(i, j) + B \cdot F_2(i, j))). \quad (4.19)$$

A pozitív, illetve negatív reziduumokat mutató területek nagysága és véletlenszerű eloszlása tükrözi az illesztés jóságát.





4.12. ábra. A reziduumok eloszlása a legkisebb négyzetösszegű illesztés után.

## 4.6. *Fusarium Graminearum* által fertőzött búzaszemek szennyezettségének megállapításának módszerei

A *Fusarium Graminearum* egy gabonaféléket megfertőző gombafajta [43–47]. Másodlagos anyagcseretermékei, az úgynevezett mikotoxinok, káros hatással vannak az emésztő- és ivarszervekre. Nagyobb dózisban súlyos hormonzavart, kiskorúaknál halált is okozhatnak. A fertőzött búzaszemek jellegzetes fehéres-rózsaszínes elszíneződést mutatnak, víztartalmuk jelentősen csökken. A feldolgozásra váró gabona fertőzöttsége jelentősen csökkenthető a vizuálisan elkülöníthető szemek szelektálásával, így a toxikus tartalom az egészségügyi határ alá szorítható. A különböző mikotoxinok eltérő kémiai struktúrája miatt analitikus kimutatásuk korábban kivitelezhetetlen volt egy adott módszer alkalmazásával. Napjainkban számos kvalitatív és kvantitatív módszer létezik a toxintartalom kimutatására. Ezek közül a legismertebbek gázkromatográfiát (GC) [48,49], vékonyrétegkromatográfiát (TLC) [50] és kapilláris elektroforézist (CE) [51] felhasználó módszerek, melyek alkalmasak mennyiségi analízisre. A legelterjedtebb mérési eljárások nagy telje-

sítményű folyadékkromatográfiát (HPLC) alkalmaznak [49, 52–57]. A Turner és társai által közölt cikk [58] részletes áttekintést ad e technikákról. Több toxin egyidejű kimutatására az LC-MS/MS tömegspektrográfiai eljárás ad lehetőséget [59]. A fertőzöttség jellegét és mennyiségét ergoszterol és gomba DNS tartalom mérésével nagy pontossággal kimutathatjuk. Ezen módszerek kiválóan alkalmazhatóak laboratóriumi körülmények között, azonban a továbbfertőzést a legjobban vizuális szelekciót végző eljárásokkal lehet elkerülni [60, 61].

Az utóbbi 10-15 év során számos, főképpen számítógéppel segített eljárás látott napvilágot. A legelterjedtebbek közé egy optikai megfigyelést végző, színelemzésen alapuló módszer [62], digitális képelemző eljárás [63], ellipszist illesztő algoritmus [64] és formavizsgáló eljárások tartoznak [65]. Ezen eljárások mindegyike gyors és gazdaságos analízist tesz lehetővé. A korábbi munkák legjobb hatásfokkal a látható és infravörös tartomány elnyelési és reflexiós színeképeinek elemzésére koncentráltak [60, 66–70]. A legutóbbi módszerek e spektrális tartományokon belüli egy, illetve két hullámhosszt használó szelekciós metódust valósítanak meg. Az általunk kidolgozott módszer a látható tartományt használva egy gyors és rendkívül olcsó eljárást biztosít a fertőzöttség mértékének spektroszkópiai alapokon vett becslésére. A módszer segítségével megállapítható egy szétválasztási határ, melynek segítségével gyors optikai szortírozás valósítható meg.

#### 4.6.1. Infection Sensitive Spectral Index (ISSI)

A digitális elemzéshez a búzaszemek látható tartományban felvett fényképeit használtam fel. A képeket egy síkágyas szkener (Samsung SCX-4300 multifunkciós lézernyomtató és szkener) segítségével 600dpi felbontással készítettem. A szemeket közvetlenül az üvegre helyeztem, a jól elkülöníthető háttérrel egy matt fekete kartonlap adta. A további feldolgozás céljából a kimenet formátumának 24 bites bmp-t választottam. Borland Delphi 7 alatt fejlesztett program segítségével nyertem ki az egyes képpontok vörös-zöld-kék (RGB) értékeit. Ezeket felhasználva hisztogramokat állítottam elő további elemzés céljából. A fertőzöttség mértékét kifejező spektrális index, angolul Infection Sensitive

Spectral Index (ISSI) fogalmát bevezetve az adott kép spektrális tulajdonságait jellemezhetjük két hullámhossz(tartomány) segítségével:

$$ISSI(\lambda_1, \lambda_2) = \frac{I_{\lambda_1} - I_{\lambda_2}}{I_{\lambda_1} + I_{\lambda_2}}, \quad (4.20)$$

ahol  $I_{\lambda_1}$  és  $I_{\lambda_2}$  a az egyenként 8 bites R, G vagy B intenzitásértékek egyikét kapják értékül. Ennek segítségével minden egyes képponthoz kiszámolhatjuk annak ISSI értékét a hozzá tartozó R, G és B értékekből. Ezen ISSI értékekből előállíthatjuk az eredeti kép ISSI képét, amely két jellemző színkomponenst tartalmaz. Így összesen háromféle képet állíthatunk elő: ISSI(RG), ISSI(RB), ISSI(GB) [71–73]. Az így kapott adatokat az OriginPro 7.0 programba importálva annak beépített frekvenciaszámoló függvényével hisztogramokat állíthatunk elő minden egyes komponens-párra (RG, RB, GB). Ezen hisztogramok az egyes értékek előfordulási gyakoriságát szemléltetik a képben. Jellemzésükre több adatot is használhatunk. Elsőként a maximumhoz tartozó  $x$  koordináta ( $X_{\max}$ ) határozható meg, másodsorban a félértékszélesség (angolul Full width at half maximum, röviden FWHM) és végül a hisztogramhoz tartozó súlypont  $x$  koordinátája, amely az alábbi egyenlet szerint számolható:

$$X_{\text{átlag}} = \frac{\sum_{0.015}^1 I(x)x}{\sum_{0.015}^1 I(x)} \quad (4.21)$$

ahol  $x$  a hisztogram független változója (maga az ISSI érték),  $I(x)$  az adott ISSI értékű képpontok (pixelek) száma. Számos hisztogram elemzése után azt találtam, hogy az  $X_{\text{átlag}}$  paraméter a legmegbízhatóbb, az átlagolásnak köszönhetően kevésbé érzékeny a mérési zajra, amely az egyes búzaszemek egyedi, strukturált felületének köszönhető. Az alkalmazott átlagolásnak köszönhetően gyakorlatilag azonos  $X_{\text{átlag}}$  értékeket kaptam egy 70-80 szemből álló keverék összerázása és újbóli mérése során.

Összesen hat, különböző mértékben szennyezett búzacsoportot elemeztem ezen módszer segítségével. Minden egyes csoportról öt kép készült, véletlenszerűen kiválasztott szemekkel minden egyes alkalommal. Ez  $5 \times 10$  darab 24 bites bitmap képet jelent. Minden egyes képhez a fent említett eljárással három hisztogramot állítottam elő (RG, RB, GB). Ezen hisztogramokhoz tartozó  $X_{\text{átlag}}$  és FWHM került meghatározásra.

## 5. fejezet

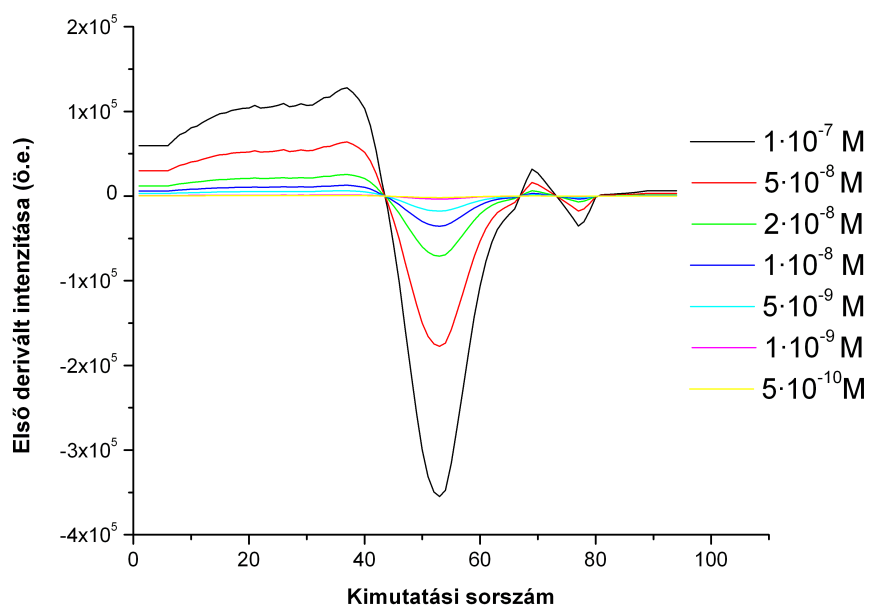
### Diszkusszió

#### 5.1. Derivatív mátrix izopotenciális szinkronfluorimetria (DMISF) és a legkisebb négyzetösszeget alapuló illesztés (LSF) érzékenységének összehasonlítása

A fluoreszcencia maximum intenzitásának 0, 0.5, 1, 2, 5 és 10 százalékát adtam hozzá az egyes mátrixokhoz, mint véletlen eloszlású zaj, hogy feltérképezzem az egyes kimutatási módszerek detektálási határait változó körülmények között. A zajfüggést modell mátrixok segítségével teszteltem. Minden egyes mátrix egyedi adatokkal rendelkezett, hasonlóan a valódi mért adatokhoz, melyek mérésről-mérésre változnak. A zaj Poisson-típusú volt, mely jól közelíti a valódi mérésekből eredő zajokat. Ahhoz, hogy megbízható következtetéseket tudjunk levonni, minden egyes adatgeneráló és illesztő eljárást egymás után többször futtattam. Az alábbi megállapítások több, független futtatás eredményének átlagolásait tartalmazzák. Úgy találtam, hogy 5 független futtatás eredménye stabil és megbízható eredményt szolgáltat.

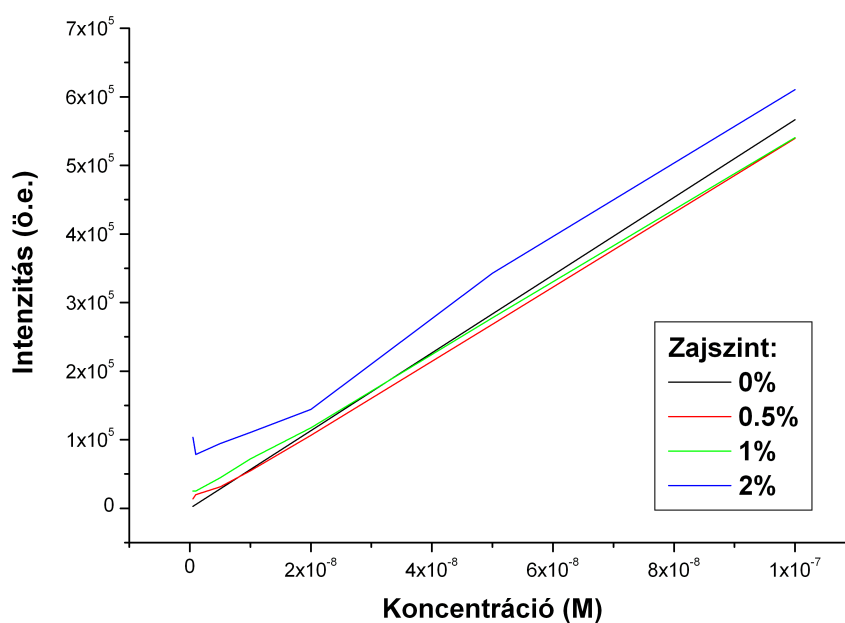
### 5.1.1. DMISF

A derivált spektrumok minimum és maximum értékének különbsége arányos az adott komponens koncentrációjával [28–32]. Az alábbi ábra a különböző koncentrációkhoz tartozó DMISF spektrumok intenzitásait mutatja modell keverékek esetén (5.1. ábra). Például a  $10^{-7}$  M Modell 6G a valódi, mért  $10^{-7}$  M-os Rodamin 6G intenzitásait és spektrális eloszlását szimulálja. Több futtatás eredményének kiátlagolása után az állandó háttérként



5.1. ábra. DMISF spektrumok intenzitásai modell keverék esetén. A Modell 6G koncentrációja  $10^{-7}$  M-nak felel meg és értéke változatlan, míg a keresett Modell B koncentrációját az ábra tartalmazza. A zaj értéke 0%.

szolgáló Modell 6G melletti Modell B intenzitásának linearitása megfelelő maradt. A következő ábra a számítások eredményeként kapott intenzitásokat mutatja a koncentrációk függvényében. A Modell 6G koncentrációja állandó volt, míg a Modell B koncentrációját  $10^{-9}$  M-tól  $10^{-7}$  M-ig változtattam, különböző mértékű zajosítást alkalmazva minden egyes mátrix generálás során. Mint ahogyan azt az 5.2. ábra is mutatja, a módszer érzékeny a zajra. Alacsony zajszint esetén a kimutatás pontossága jó (1/100), azonban a zaj növekedésével a kimutatás bizonytalansága rohamosan növekszik. A kiszámított koncentrációk minden esetben a valós értékeknél nagyobb eredményt adtak. Ez a zajnak, mint



5.2. ábra. A DMISF módszer linearitása különböző mértékű zajok esetén. A keresett komponens a Modell B volt, állandó  $10^{-7}$  M Modell 6G mellett.

5.1. táblázat. A DMISF módszerrel kiszámolt koncentrációk különböző mértékű zajok esetén. Az 10%-os hibahatáron belül elfogadott értékeket szürke háttér jelzi.

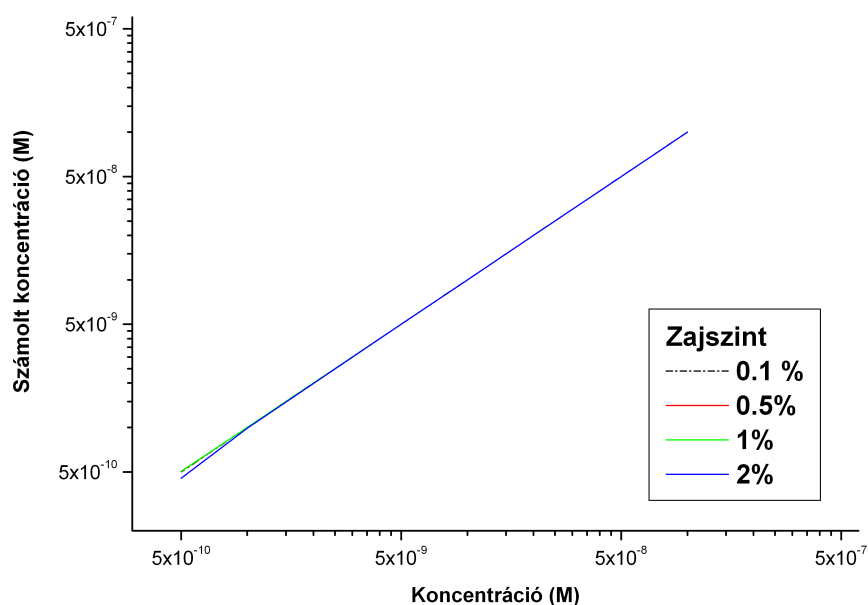
Konc/Zaj.	0%	0.5%	1%	2%	5%	10%
1.00E-7	1.00E-7	0.99E-7	0.99E-7	0.99E-7	1.26E-7	2.12E-7
5.00E-8	5.00E-8	4.95E-8	5.21E-8	5.38E-8	9.99E-8	19.9E-8
1.00E-8	1.00E-8	1.09E-8	1.68E-8	3.26E-8	7.16E-8	15.6E-8
5.00E-9	5.00E-9	12.1E-9	27.1E-9	31.5E-9	69.4E-9	168E-9
1.00E-9	1.00E-9	10.5E-9	13.7E-9	38.4E-9	52.2E-9	134E-9

Számított koncentrációk

virtuális komponensnek a megjelenésével magyarázható a kalkulációk során. A zaj hozzáadódik a keresett komponens intenzitásához, ha annak mértéke megközelítőleg azonos a komponens intenzitásával. A számított koncentrációk zajfüggését az 5.1. táblázatban összegeztem.

### 5.1.2. LSF

A módszer alkalmazása során az illesztést követően különbségi mátrixot számoltam, amely az illesztett és az eredeti keverék különbségét adja. Ezt ábrázolva (4.12. ábra) a pozitív és negatív különbségek kis értékű és véletlenszerű eloszlást mutatnak jó illesztés esetén. Ettől eltérő esetben az illesztési modell nem jó. Vagy spektrális csúszás történt a mérés során, vagy az illesztés során további spektrális komponenseket kell alkalmazni. Az 5.3. ábra mutatja a módszer kiváló linearitását a keresett komponens koncentrációjának megállapításánál. Itt a DMISF-hez hasonlóan a Modell B koncentrációját változtattam állandó Modell 6G jelenléte mellett. Az 5.2. táblázatban összefoglaltam az eljárás



5.3. ábra. Az LSF módszer linearitása különböző zajok esetén. A keresett komponens a Modell B volt, állandó  $10^{-7}$  M Modell 6G mellett.



5.2. táblázat. Az LSF módszerrel kiszámolt koncentrációk különböző mértékű zajok esetén. Az 10%-os hibahatáron belül elfogadott értékeket szürke háttér jelzi.

Valódi konc.	Konc./Zaj	0%	0.5%	1%	2%	5%	10%
	1.00E-7	1.00E-7	1.00E-7	1.00E-7	1.00E-7	1.00E-7	1.00E-7
5.00E-8	5.00E-8	5.00E-8	5.00E-8	5.00E-8	5.00E-8	5.09E-8	4.98E-8
1.00E-8	1.00E-8	1.00E-8	1.00E-8	1.00E-8	1.00E-8	1.00E-8	1.00E-8
5.00E-9	5.00E-9	5.00E-9	5.00E-9	5.00E-9	5.00E-9	5.00E-9	4.90E-9
1.00E-9	1.00E-9	1.00E-9	1.00E-9	1.00E-9	1.00E-9	1.00E-9	1.10E-9

Számított koncentrációk

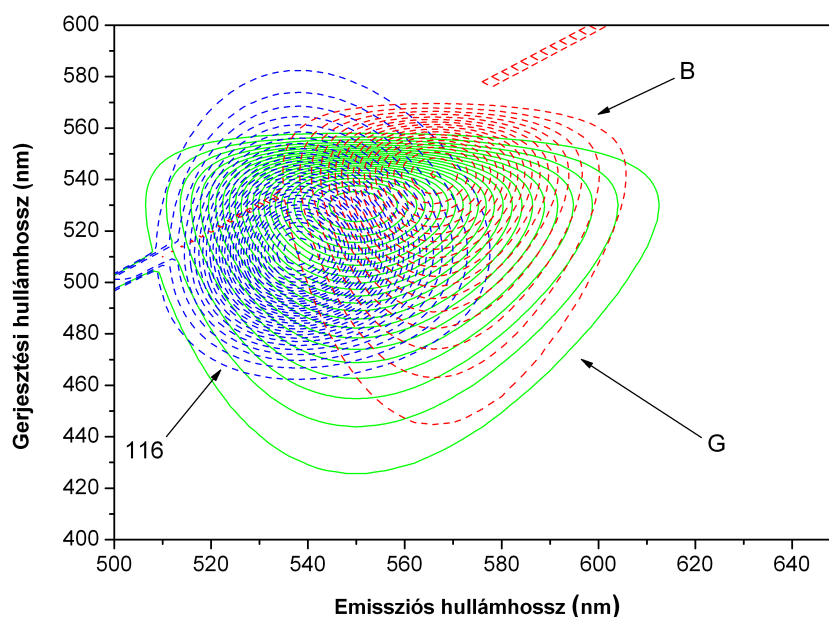
zajtól való függését. Látható, hogy a módszer segítségével kiszámolt koncentrációknak a mért koncentrációkkal való egyezése nagyon jó, 2%-nál nagyobb zaj esetén is kiváló. A koncentráció meghatározása még két nagyságrenddel kisebb keverékarány esetén is lehetséges.

## 5.2. Több komponens egyidejű meghatározása a MISF módszer továbbfejlesztésével

Egy többkomponensű keverék vizsgálata annak fizikai, vagy kémiai szétválasztása nélkül általában spektroszkópiai méréseken alapul. A konvencionális fluoreszcencia spektroszkópia esetében az abszorpciós és emissziós színeképeket használják az elemzésekhez. Átfedő színeképek esetén eddig a szinkronfluorimetria jelentett megoldást [39–43] élesebb és szeparáltabb spektrális sávjaival. Ezen módszer továbbfejlesztése az általunk is megvalósított és tesztelt DMISF eljárás, amely derivatív technikával segíti a háttér eliminálását. Célunk egy olyan továbbfejlesztett DMISF módszer megalkotása volt, mely lehetővé teszi kettőnél több komponens egyidejű meghatározását rövid idő alatt. Az eddigi tesztekben kiderült, hogy az LSF technika illesztési pontossága és zajtűrése is jobb, viszont a módszer alkalmazásához sok adatot (minél több, annál jobb) kell felvenni és feldolgozni. A MISF

technika a koncentráció meghatározásának idejét csökkenti, hiszen nem kell egy teljes emissziós-abszorpciós mátrixot végigmérni, elég csak a kijelölt izopotenciális trajektória pontjain mérni.

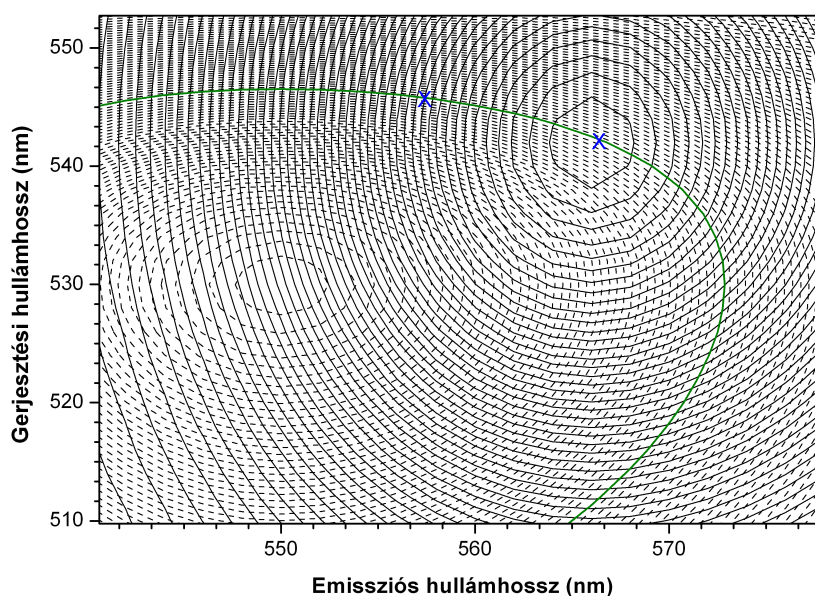
Az eddig alkalmazott MISF technikát egy 3 komponensből álló, spektrálisan továbbra is erősen átfedő keverékre is kiterjesztettük. Egy ilyen, szimulált keverék kontúrtérképe látható az 5.4. ábrán.



5.4. ábra. Három modell ( $10^{-7}$  M Rodamin B, röviden B,  $10^{-7}$  M Rodamin 6G, röviden G és  $10^{-7}$  M Rodamin R116, röviden 116) komponensből álló keverék kontúrtérképe.

### 5.2.1. Két komponensből álló keverékek

A DMISF spektrum képzése során a MISF spektrum egymást követő pontjainak különbségét képezzük, így ha az alap spektrumba intenzitás fluktuációk kerülnek, vagy a zaj mértéke megnő, a kimutatás határértéke jelentősen csökkenhet (5.1. táblázat). Hogy elkerüljük a fent említett problémát, csökkentettük a MISF megfigyelési pontjainak számát, ezáltal nem a szomszédos, hanem távolabbi pontok intenzitásának differenciáját képezzük. A keresett komponens maximumán átmenő izopotenciális trajektória kijelölésével



5.5. ábra. Mérési pontok (kék X) kétkomponensű ( $10^{-7}$  M Modell B és  $10^{-7}$  M Modell 6G) keverék esetén. Zölddel jelölt trajektórián, amely az interferáló komponens egyik izopotenciális vonala.

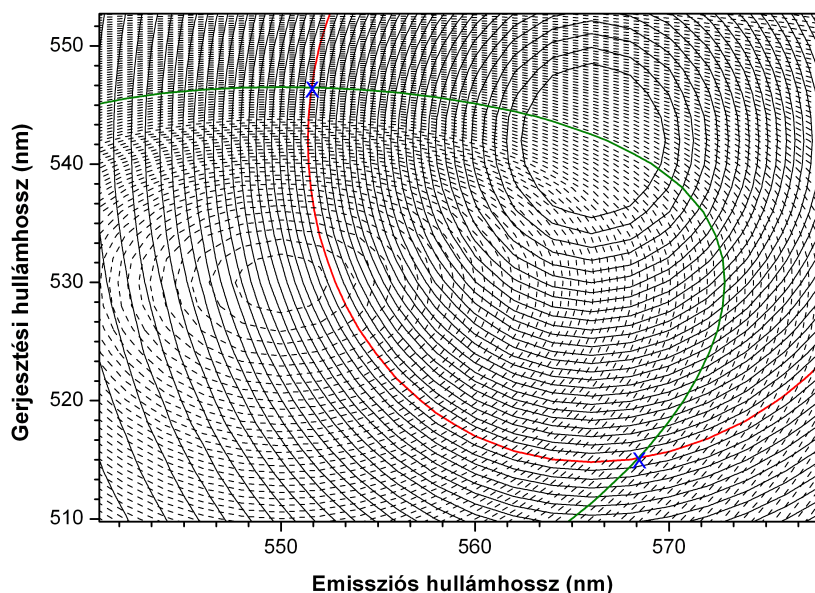
érhetjük el a legjobb érzékenységet. Ezen trajektória mentén olyan pontokat választunk ki, amelyeken a keresett komponens fluoreszcencia intenzitásának értéke szignifikánsan különböző és e különbség értéke jóval nagyobb, mint a zajos MISF spektrumban lévő fluktuációk. Az 5.5. ábrán az interferáló komponens zölddel jelölt izopotenciális trajektóriája látható, amely áthalad a keresett komponens maximumán. A kék „x”-ek jelölik a kiválasztott pontokat, ahonnan intenzitásértékeket olvasunk le. Ezek spektrális pozíciója a keresett komponens intenzitásának maximumánál és annak felénél vannak.

Ezen két ponthoz tartozó spektrális pozícióban a keverék mátrix intenzitásértékei leolvasva a két érték különbsége arányos lesz a keresett komponens koncentrációjával.

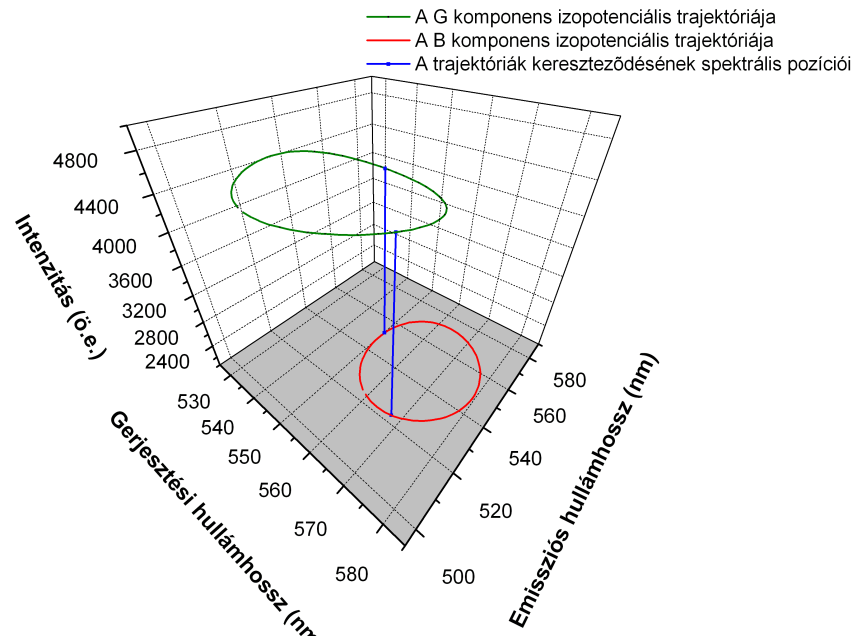
### 5.2.2. Három komponensből álló keverékek

Ezen technikát terjesztettük ki háromkomponensű keverékekre is, amely során a keresett (Modell 116) komponens koncentrációjának értéke pontosan meghatározható az immáron két, egyenként változó koncentrációjú háttérkomponens mellett.

Ehhez kettő, egymást keresztező trajektóriát kell találnunk. Ezen trajektóriáknak lehetőleg a keresett komponens minél nagyobb intenzitású spektrális pontjait kell keresztezniük. Az 5.6. ábrán zölddel a  $10^{-7}$  M-os oldatnak megfelelő Modell G és pirossal a  $10^{-7}$  M-os Modell B izopotenciális vonalait láthatjuk. A mérési pontokat kék X-ek jelölik. Az 5.7. ábra a két trajektória különböző intenzitásszinteken átfutó elhelyezkedését mutatja három dimenzióban. A kijelölt spektrális helyeken véve a keverék intenzitásértékeinek különbségét, mindkét háttérkomponens hatása eliminálható. Ezen különbség kizárólag a keresett komponens emissziós intenzitásával lesz arányos.

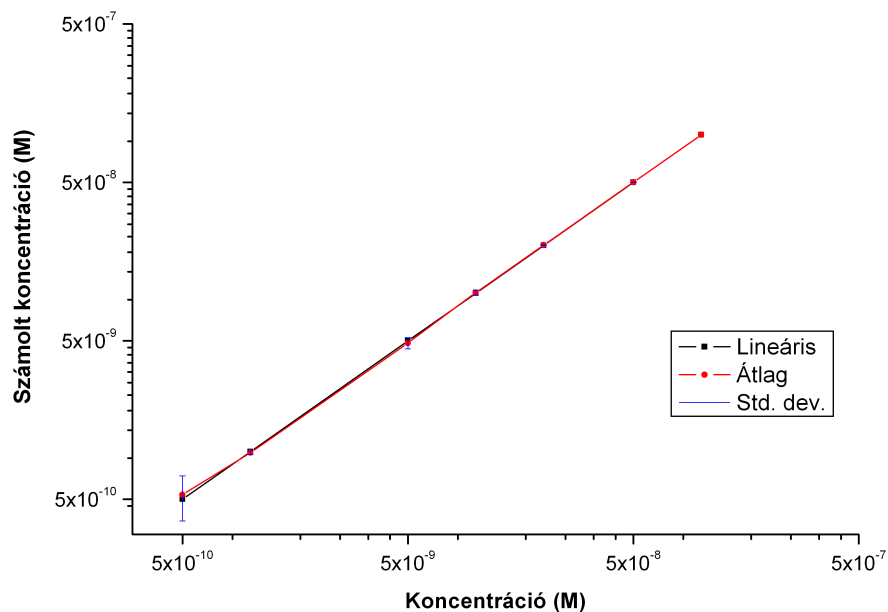


5.6. ábra. Mérési pontok (a keresett komponens félértékszélességén vett izopotenciálon) három komponens esetén (kék X).

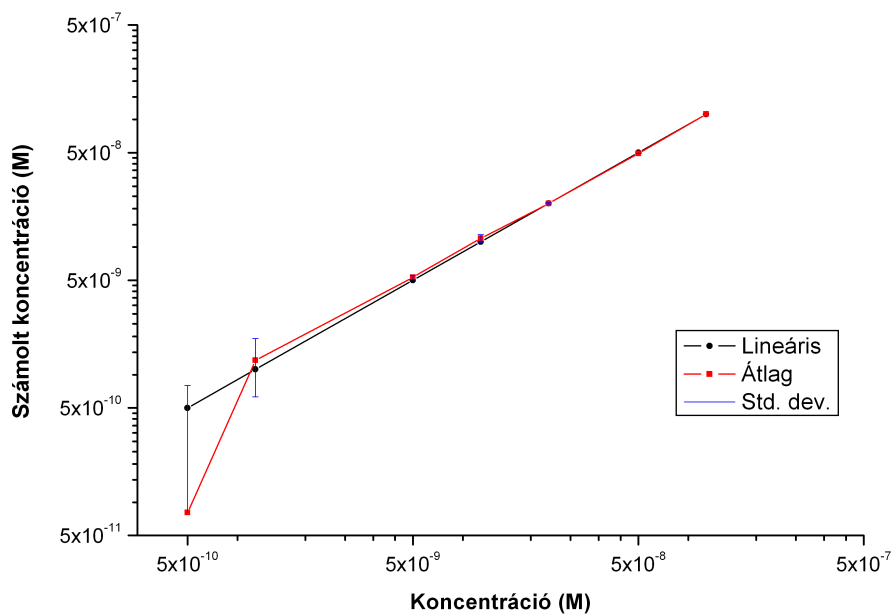


5.7. ábra. Az egymást „virtuálisan” keresztező trajektóriák (zöld és piros) elhelyezkedése és a mérési pontok (kék) 3 dimenzióban .

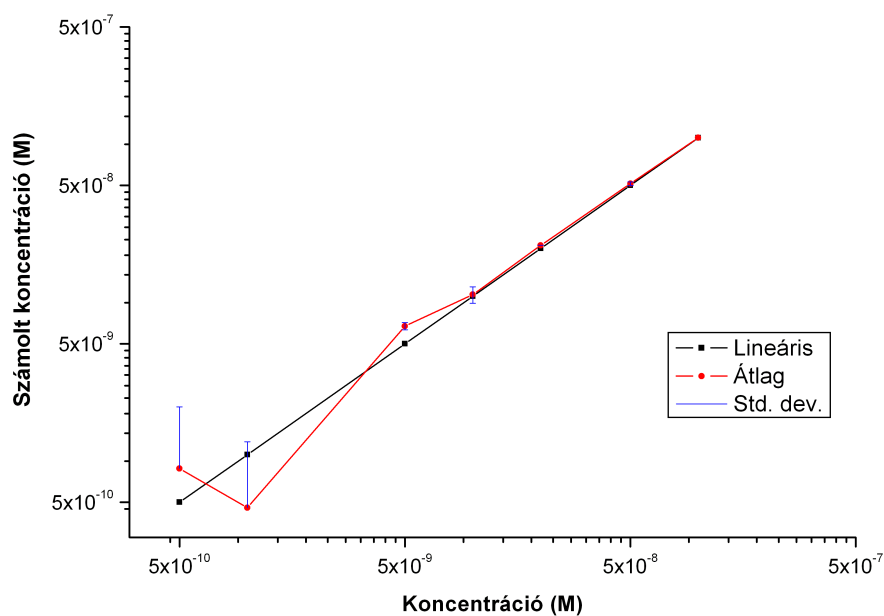
Az 5.8-5.10. ábra a továbbfejlesztett QMISF technika kimutatási érzékenységét mutatja 0,1; 0,2 és 0,5%-os zajszintek esetén.



5.8. ábra. A QMISF módszerrel számolt koncentrációk linearitása két komponens esetén (konstans  $10^{-7}$  M Modell G,  $5 \times 10^{-10}$  M –  $1 \times 10^{-7}$  M Modell B). Zajszint: 0.1 %.



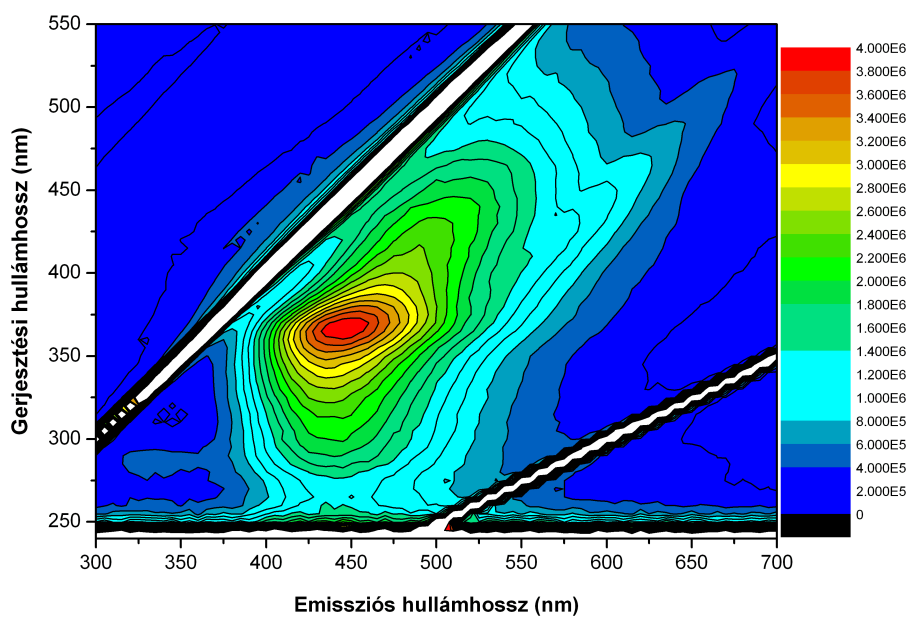
5.9. ábra. A QMISF módszerrel számolt koncentrációk linearitása két komponens esetén (konstans  $10^{-7}$  M Modell G,  $5 \times 10^{-10}$  M –  $1 \times 10^{-7}$  M Modell B). Zajszint: 0.2 %.



5.10. ábra. A QMISF módszerrel számolt koncentrációk linearitása két komponens esetén (konstans  $10^{-7}$  M Modell G,  $5 \times 10^{-10}$  M –  $1 \times 10^{-7}$  M Modell B). Zajszint: 0.5 %.

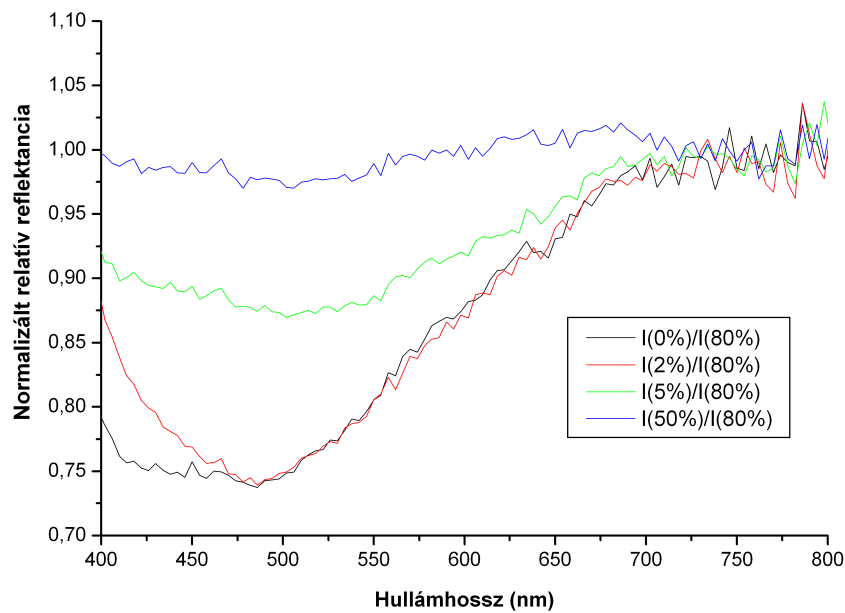
### 5.3. Fusarium Graminearum által fertőzött búzaszemek szennyezettségének megállapítása digitális spektroszkópai módszerekkel

Az emissziós-gerjesztési mátrixok egy jól definiált elnyelési területet mutatnak (5.11. ábra), melyek alakja és pozíciója mintánként csak kis mértékben változik. Számos mérést elvégezve kijelenthető, hogy az egyes minták fertőzöttségének mértéke nem állapítható meg, még nagyon részletes fluoreszcenciás mátrixok használata esetén sem. Az 5.11. ábra intenzitásait figyelembe véve látható, hogy a lumineszcencia jele jóval kisebb a szóráshoz képest, amelyet a  $\lambda_{\text{ger}} = \lambda_{\text{emi}}$  pontok mentén kapunk. Így tehát az alacsony intenzitású lumineszcencia nem zavarja a fehér fényű megvilágítással történő, megfelelő szűrőkkel mért abszorpciós/reflexiós méréseket. A normalizált relatív reflexiós spekt-



5.11. ábra. Teljesen fertőzött szemek gerjesztési-emissziós mátrixa.

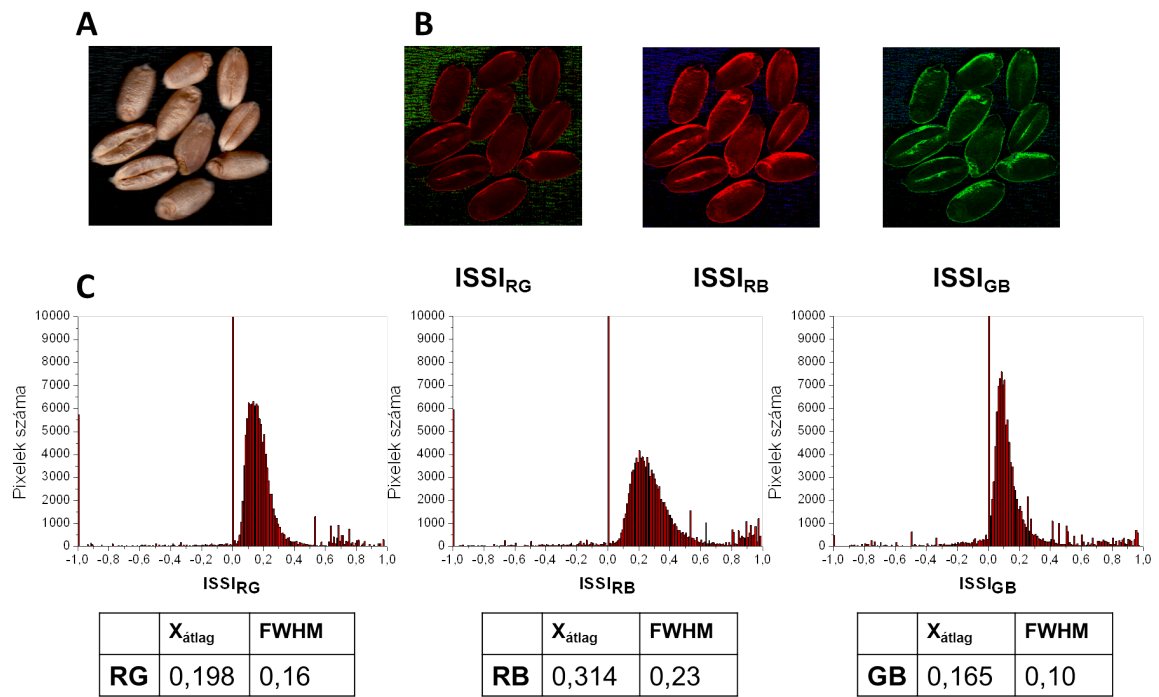
rum (5.12. ábra) reprodukálható monotonitást mutat, azaz az alacsonyabb fertőzöttségi szint alacsonyabb relatív reflexivitást mutat a 400nm – 700nm-es spektrális tartományban. Magasabb fertőzöttség tehát magasabb reflexiót jelent az alacsonyabb hullámhosszak



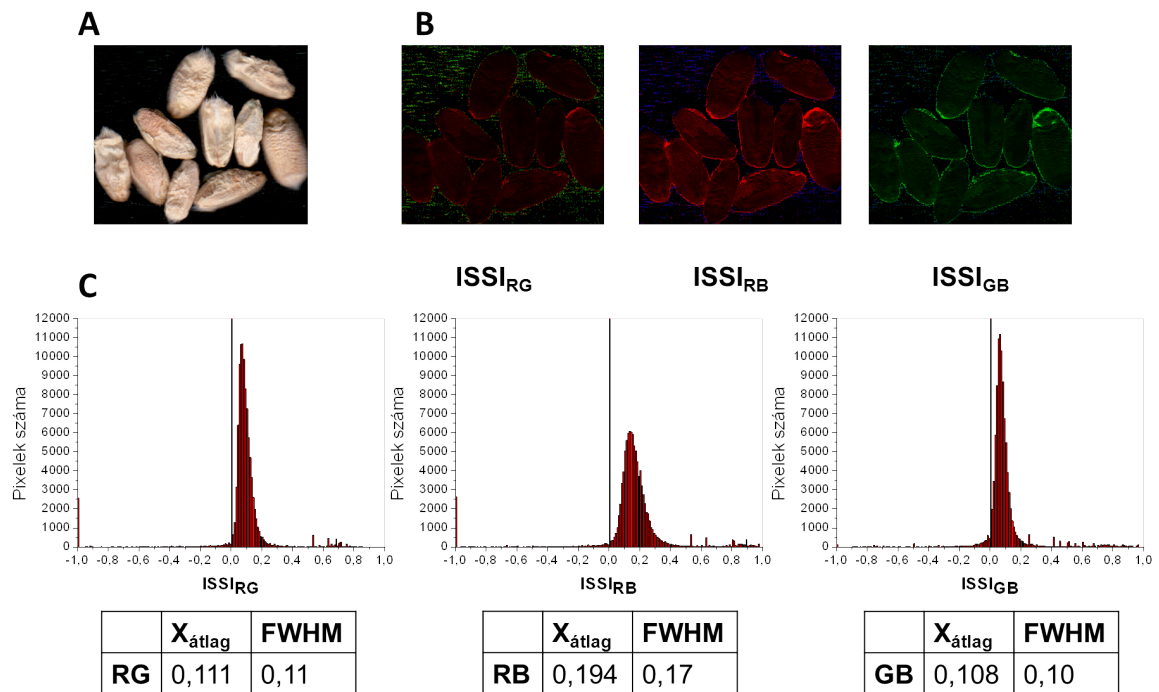
5.12. ábra. Különböző mértékben szennyezett búzaszemek normalizált relatív reflexiós spektrumai.

felé. Ez a tény jó egyezést mutat a szemmel történő kiértékeléssel, vagyis a fertőzött szemek jóval fehérebbnek tűnnek az egészséges barna színű szemeknél. Fontos megjegyezni, hogy ezen spektrumok korrigálva vannak a szemek elmozdulásával járó effektusokkal szemben. Ezen tények lehetőséget adnak arra, hogy a felvett képek ISSI analízisével megfelelő becslést adhassunk az egyes minták fertőzöttségi szintjére. Az 5.13-5.15. ábrák az analízishez szükséges képeket és hisztogramokat tartalmazzák teljesen egészséges és különböző mértékben (2%–80%) fertőzött búzaszemek esetében. Az „A” ábrák a 16 bites RGB kódolású színes képeket mutatják fekete háttérrel, a „B” ábrák az ezekből előállított ISSI képeket, míg a „C” ábrák a kiszámított hisztogramokat és a hisztogramok súlypontjainak  $X_{\text{átlag}}$  koordinátáit valamint félértékszélességeit. Szignifikáns kapcsolatot lehet kimutatni a fertőzöttségi szint és a hisztogram paramétereinek között. Az általunk kiválogatott, különböző mértékben szennyezett csoportot elemezve (5.15. ábra) az  $X_{\text{átlag}}$  értékeinek meghatározásakor a következő feltételeket alkalmaztam:





5.13. ábra. (A) Kiválasztott egészséges szemek. (B) Előállított ISSI képek. (C) Az ISSI képek hisztogramjai és azok paramétereit.



5.14. ábra. (A) Kiválasztott teljesen fertőzött (80%) szemek. (B) Előállított ISSI képek. (C) Az ISSI képek hisztogramjai és azok paramétereit.



	$X_{\text{átlag}}$	FWHM
<b>RG</b>	0,198	0,16
<b>RB</b>	0,314	0,23
<b>GB</b>	0,165	0,10



	$X_{\text{átlag}}$	FWHM
<b>RG</b>	0,181	0,13
<b>RB</b>	0,298	0,18
<b>GB</b>	0,150	0,10



	$X_{\text{átlag}}$	FWHM
<b>RG</b>	0,178	0,12
<b>RB</b>	0,296	0,20
<b>GB</b>	0,145	0,10



	$X_{\text{átlag}}$	FWHM
<b>RG</b>	0,160	0,11
<b>RB</b>	0,273	0,18
<b>GB</b>	0,139	0,10



	$X_{\text{átlag}}$	FWHM
<b>RG</b>	0,146	0,12
<b>RB</b>	0,253	0,18
<b>GB</b>	0,131	0,10

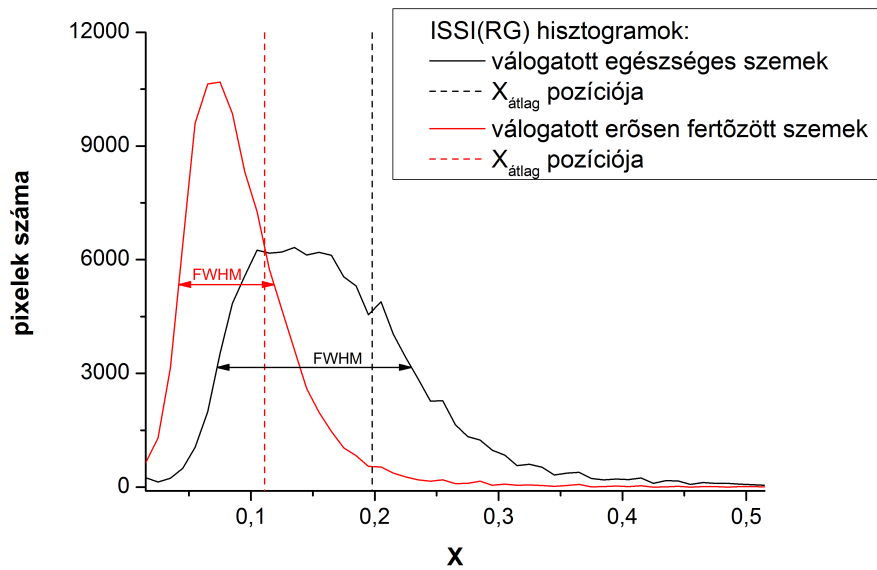


	$X_{\text{átlag}}$	FWHM
<b>RG</b>	0,111	0,11
<b>RB</b>	0,194	0,17
<b>GB</b>	0,108	0,10

5.15. ábra. Különböző mértékben fertőzött szemek sorozata (sorrendben fentről lefelé: 0%, 2%, 5%, 25%, 50%, 80%).

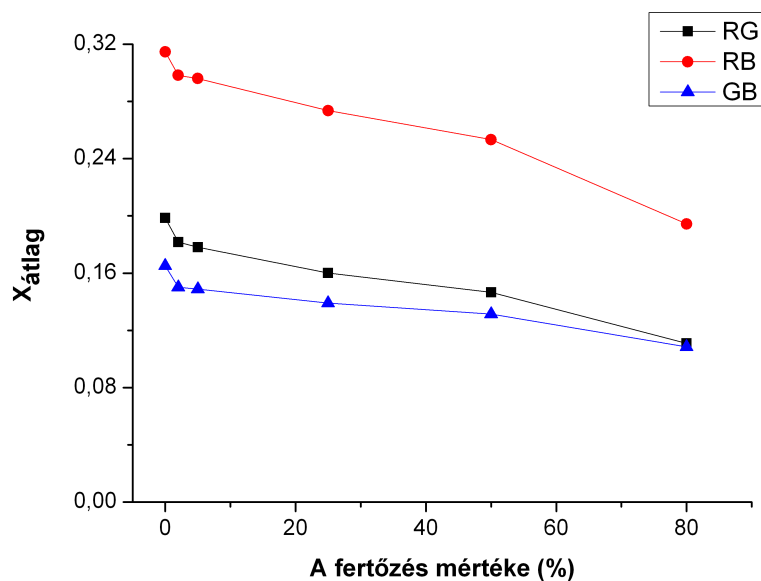
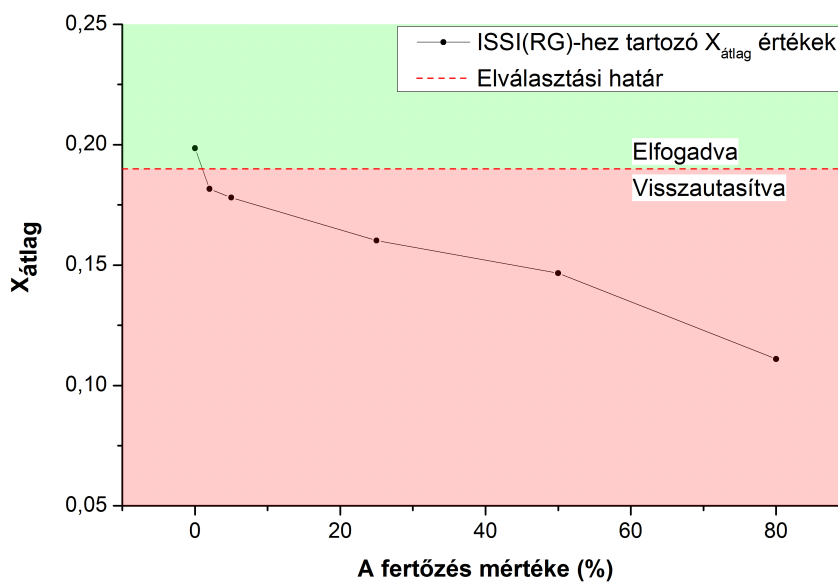
- A negatív ISSI értékekhez tartozó hisztogram értékek elhanyagolhatóak.
- Az  $X=0$  helyen vett nagy érték a fekete háttérnek köszönhető képpontok ISSI értékei, ezért
- a megmaradt  $0,015 - 1$  tartományt használtam  $0,01$ -es lépésközzel.

Az 5.16. ábrán a teljesen egészséges (0%) és teljesen fertőzött (80%) mintákhoz tartozó hisztogramok grafikonjai jól elkülönülnek. A barnább, egészséges szemekhez tartozó hisztogram félértékszélessége nagyobb, a pixelszámok alacsonyabb értékűek. Ezzel szemben a fertőzött szemek grafikonja jóval kisebb félértékszélességet mutat magasabb pixelszámok mellett. Az egyes hisztogramokhoz tartozó súlypontok  $X$  értékei viszonylag távol, kb.  $0,1$  távolságra helyezkednek el egymástól. A futtatások során az is megállapítható, hogy az  $X_{\text{átlag}}$  értékek és a félértékszélességek között monoton összefüggés van. Magasabb  $X_{\text{átlag}}$  értékhez minden esetben magasabb félértékszélesség tartozik. Több mintacsoport elemzése után megállapítható, hogy az egyes mintacsoportokhoz (bizonyos fajta, vagy fajtákból álló búzakeverék) minden esetben egy meghatározott  $X_{\text{átlag}}$  érték társítható mint szeparációs határ. Ezen határ megállapításához egy adott típusú minta esetén sorozatmérésre van szükség, ahol a különböző mértékben szennyezett mintákhoz tartozó  $X_{\text{átlag}}$  értékeket ábrázoljuk a szennyezettségi fok függvényében. Az RG és RB hisztogramok  $X_{\text{átlag}}$  értékei monoton csökkennek a fertőzöttségi szint emelkedésével (5.16. ábra). Hasonló, de nehezebben kiértékelhető eredményt adnak a félértékszélességek adatai is. A GB hisztogramok esetén sokkal alacsonyabb a különbség a zöld és kék komponensek között, amelyeket a fertőzöttség közel azonos mértékben módosít.



5.16. ábra. Teljesen egészséges (0%) és teljesen fertőzött (80%) szemek ISSI hisztogramjai, valamint súlypontjainak  $X$  pozíciói (szaggatott vonalak).

Megállapítható, hogy a zöld és kék spektrális területek többé-kevésbé együtt mozognak a fertőzöttség szintjével. Az 5.17. ábrán az RG, RB és GB hisztogramokhoz tartozó  $X_{\text{átlag}}$  értékek láthatóak. Több minta mérése során az RG hisztogram paraméterei bizonyultak a legmegbízhatóbbaknak. Az 5.18. ábrán az ezen hisztogramokhoz tartozó  $X_{\text{átlag}}$  értékek alapján megállapított elválasztási határ látható.

5.17. ábra. Különböző ISSI hisztogramok  $X_{\text{átlag}}$  értékei.5.18. ábra. A válogatott minta ISSI(RG) hisztogramjainak  $X_{\text{átlag}}$  értékei. A piros szaggatott vonal jelzi az elválasztási határvonalat. Az e fölötti  $X_{\text{átlag}}$  értékű szemeket elfogadjuk, az ez alattiakat visszautasítjuk.

## 6. fejezet

# Összefoglalás

### 6.1. MISF és LSF módszerek összehasonlítása

Megállapítható, hogy mind a derivatív technikával segített MISF, mind az LSF módszer egyaránt alkalmas erősen átfedő komponensek esetén azok szimultán kimutatására. A DMISF módszer jó érzékenységgel és szelektivitással rendelkezik, de magasabb mérési zajok esetén érzékenysége rohamosan csökken (5.2. ábra). Alacsony zajszint mellett, azonos kvantumhatásfokú és magas koncentrációban jelen lévő interferáló komponensek esetén alkalmas 1%-os keverékarányú komponens kimutatására. A keresett komponens megtalálásának határai, 10%-os hibahatáron belül (5.1. táblázat):

- 0% relatív zaj mellett 1%-os keresett/háttér komponensarány
- 0.5% relatív zaj mellett 10%-os keresett/háttér komponensarány
- 2% relatív zaj mellett 50% keresett/háttér komponensarány

Gyakorlatilag zajmentes esetben a módszer alkalmas (különböző koncentrációban jelen lévő komponensek keveréke esetén) két nagyságrenddel kisebb komponens kimutatására.

Az LSF módszer zajérzékenysége jóval kisebb. 0.1%-os koncentrációarány esetén is képes a megfelelő szelekcióra (5.3. ábra). A keresett komponens megtalálásának határai, 10%-os hibahatáron belül (5.2. táblázat):

- 0% relatív zaj mellett 0.1%-os keresett/háttér komponensarány
- 5% relatív zaj mellett 1%-os keresett/háttér komponensarány
- 10% relatív zaj mellett 10% keresett/háttér komponensarány

A zajszint alacsonyan tartása és a megfelelő simító algoritmusok használata mellett a DMISF alkalmas egyszerre több komponens koncentrációjának reprodukálható és megbízható kimutatására. A mindennapi mérések során a DMISF módszer használatával jóval kevesebb mérési adatra van szükség, ami a mérési idő csökkenését jelenti. Ez esetben elég az előre meghatározott izopotenciális trajektória pontjain fluoreszcencia intenzitást mérni. Zajosabb minták esetén, főleg ha azok több ismeretlen komponenset is tartalmaznak az LSF módszer előnyösebb. A mérési eredmény, miszerint képes a háttérhez képest 0,1%-ban jelenlévő komponens kimutatására is, a sokkal több adatponton történő simításnak és illesztésnek köszönhető. Eredetileg mindkét módszer ugyanazon bemeneti adatokat, az úgynevezett emissziós-gerjesztési mátrixokat használja fel. A kalkulációk tovább finomíthatóak megfelelő rész adatterületek kiválasztásával, ezek viszont csak az egész adatsor mérése után választhatóak ki. A DMISF biztonságosan csak maximum háromkomponensű keverékek analíziséhez használható, ahol párhuzamosan két összetevő koncentrációjának meghatározása lehetséges egy időben. Az LSF módszer nem korlátozza a használható keverékek komponenseinek és kimutatandó összetevőinek számát. Habár ezen módszer verhetetlen a relatíve kis koncentrációk kimutatásában, a DMISF módszer egy jelentős előnnyel rendelkezik, miszerint nem érzékeny a háttérsugárzás interferáló hatására. Köszönhetően a derivatív számítási technikának a konstans háttér eltűnik a DMISF spektrumból. Ezen tulajdonsága, különösen ismeretlen biológiai minták esetén juttatja előnyhöz a többi kiértékelő módszerrel szemben. Amennyiben a spektrofluoriméter képes a kijelölt, nem ekvidisztans gerjesztési-emissziós spektrumpontokat végigszkennelni, jelentősen csökkenhet a mérési eljárás időszükséglete.

## 6.2. QMISF

Azt találtuk, hogy elég két adatpont a három komponensből álló keverék emissziósgerjesztési mátrixából ahhoz, hogy meghatározhassuk a keresett komponens koncentrációját. Először is tudnunk kell, hogy milyen komponensekből áll a keverékünk, majd ezen összetevők mátrixainak pontos elemzésére van szükségünk ahhoz, hogy meghatározhassuk ezen adatpontokat. A megfelelő izopotenciális útvonalak kiválasztásával lehetőségünk van a keresett komponens koncentrációjának meghatározására egy, vagy akár két ismeretlen koncentrációjú háttérkomponens mellett. Ehhez elegendő a megfelelő spektrális pontokban mért fluoreszcencia intenzitások különbségének előállítását:  $[I(\lambda_{\text{ger},1}, \lambda_{\text{emi},1}) - I(\lambda_{\text{ger},2}, \lambda_{\text{emi},2})]$ . A módszer így alkalmas a többihez képest kevesebb mint 1:200 intenzitásarányú fluorofór kimutatására még viszonylag magasabb (a háttér maximum intenzitásnak 1-2%-a) zaj megléte esetén is.

A QMISF jelentős, kb. két nagyságrenddel jobb kimutatási faktorra rendelkezik a klasszikus DMISF módszerhez képest. Végeredményként egy keverék oldat mérése során elég két spektrális pontot kiválasztani az interpolált mátrixból ahhoz, hogy kvantitatív elemzést végezhesünk. Ez egy érzékeny, rendkívül gyors, szinte valós idejű kimutatást tesz lehetővé. A QMISF legfontosabb jellemzői:

- a háttér komponensek koncentrációja gyakorlatilag indifferens,
- az érzékenység sokkal jobb a klasszikus DMISF-hez képest,
- elég két pontban mérni.

Mivel csak két pontban mérünk, ezért elengedhetetlen a minél jobb jel/zaj viszony megtalálása a mérés során. Ezt az integrációs idő növelésével, a gerjesztési impulzusok számának növelésével vagy mérési idő megnyújtásával érhetjük el. Ezen időnövekedés még mindig elfogadható, ha csak két pontban kell azt megtenni. A méréseim során a QMISF módszerrel rövid időn belül a háttérhez viszonyítva relatíve kis  $10^{-3} - 10^{-4}$  koncentrációkülönbség mérhető, hasonló kvantumhatásfokú összetevők esetén. Ezen eredmények alapján nagyon



gyors rutinmérések dolgozhatóak ki.

### 6.3. *Fusarium Graminearum* által fertőzött búzaszemek szennyezettségének megállapítása ISSI módszerrel

Legelőször különböző mértékben fertőzött búzaszemek gerjesztési-emissziós mátrixát mértem. A fertőzés jelének tulajdonítható emissziós maximum spektrális pozíciója:  $\lambda_{\text{ger}} = 365$  nm és  $\lambda_{\text{em}} = 445$  nm. A spektrális alak és annak pozíciója kis mértékben a fertőzéssel együtt változik. Mindezek ellenére megállapítható, hogy fluoreszcenciás mérésekkel nem lehet megbízható kimutatási módszert alkotni a fertőzött szemek szelekciójára.

A továbbiak során mért reflexiós spektrumok már szignifikánsabb összefüggést mutatnak a spektrumalak és a fertőzöttség mértéke között. A kimutatáshoz referencia spektrumok felvétele szükséges az adott búzafajta különböző mértékben fertőzött szemeinek csoportjairól. Ezen spektrumok felhasználásával jó közelítésű becslést lehet adni az újonnan mért minta fertőzöttségi szintjéről. Számolásaim alapján 2-5 százalékpontos hibaszint érhető el.

Megállapítható, hogy a fertőzés mértéke inkább a rövidebb hullámhossz régiókban okoz látható változást. A reflexiós spektrum és alakja nagymértékben változhat az egyes szemek pozíciójának változásakor, így e spektrumok összehasonlításához szükséges egy normalizációs metódus bevezetése. Az így megalkotott Normalizált relatív reflexiós spektrumok esetén megállapítható, hogy az egészséges szemek reflexiója 25-30%-kal kevesebb a rövidebb hullámhossz tartományokban. Felhasználva ezen megállapításokat a fertőzöttség megállapításához egy háromszínű karakterizációs eljárást dolgoztam ki, amely a búzaszemekről felvett képek R, G, B koordinátáit felhasználó spektrális analízisen alapul. Ezen ISSI függvények segítségével új spektrális paramétereket társíthatunk a felvett képek minden egyes képpontjához. Használva az ISSI(RG), ISSI(RB) és ISSI(GB) függvényeket, minden egyes pixelen hisztogramokat állíthatunk elő, melyek két fontos paraméterrel szolgálnak: a pozitív tartományon (0,015-1) számolt súlypont  $X$  koordinátájának helyét

megadó  $X_{\text{átlag}}$  és a félértékszélességet megadó FWHM paramétereket. A búzaszemek digitális fényképeinek ISSI analízise egy megbízható és gyors módszer azok szennyezettségének megállapításához. Legszignifikánsabban az ISSI(RG) képekhez tartozó paraméterek jelzik a fertőzés mértékét. Ez minél magasabb, annál alacsonyabb az  $X_{\text{átlag}}$  és FWHM értéke (5.16. és 5.17. ábra). Megállapítható, hogy ezen módszer az egészségbiológiai szempontból fontos egészséges és fertőzött szemek szeparációjára jól használható. Ehhez mindösszesen egy gyors digitális kamerára van szükség, majd a kapott kép ISSI(RG) hisztogramjának előállítására és annak  $X_{\text{átlag}}$  paraméterének meghatározására. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy búzaszemek esetén előállítható egy olyan specifikus spektrum, melynek elemzésével megbecsülhető a szemek fertőzöttségi szintje.

## 7. fejezet

# Summary

### 7.1. Comparison of MISF and LSF methods

It was found that the simultaneous detection of spectrally closely overlapping compounds is possible using both MISF method combined with derivative techniques and LSF method. The DMISF method has high sensitivity and selectivity, but at higher noise levels the sensitivity of detection decreases more rapidly (Fig. 5.2). DMISF is capable to discriminate fluorophores of similar quantumyield being in not more than 1% concentration compared to interfering high concentration components at low noise level. Detection limits of the wanted compound within 10% error limit (Table 5.1):

- 1% of the background component when the noise level was 0%
- 10% of the background component when the noise level was 0.5%
- 50% of the background component when the noise level was 2%

In practically noiseless circumstances, DMISF is capable to discriminate compounds differing in their concentrations in more than two orders of magnitude.

LSF is capable to discriminate 0.1% concentration even at higher noise level (Fig. 5.3). Detection limits of the wanted compound within 10% error limit (Table 5.2):

- 0.1% of the background component when the noise level was 0%

- 1% of the background component when the noise level was 5%
- 10% of the background component when the noise level was 10%

At low noise level, DMISF can detect more than one component at the same time and its results can be very reproducible and stable using proper smoothing algorithms. In routine measurements, DMISF needs much less data, which means less measuring time. It is enough to measure fluorescence intensity data along the isopotential trajectory calculated in the preliminary measurements. At higher noise level and even in the presence of more unknown components in mixtures, LSF is the preferable method. It is able to detect one component even at 0.1% concentration compared to the background. We attribute this higher sensitivity to the higher number of data points used in the fitting algorithm. Originally, both methods based on the same data sets, namely, on the EEMs. After the preliminary measurements, different subsets can be selected from EEMs to optimize the numerical procedures. But these subsets can only be well selected after measuring the whole matrices. DMISF can be extended to not more than three component mixtures, where parallel determination of two components is possible. This kind of limitation is not present with LSF, where the number of components to be determined is not limited. Although LSF is unbeatable in finding components being in very low concentrations, DMISF has a significant advantage: it is not sensitive to the amount of the background component. Because of the derivative calculation technique, the constant background disappears from the DMISF spectra even if it was at higher or lower concentration. This property gives a very valuable advantage to DMISF. Unfortunately, in the practice of spectroscopists, not all of the spectrofluorometers can be programmed to scan along an arbitrary route in the EEM. When a spectrofluorometer can scan not only using equidistant spectral points, the measurement's time is reduced drastically and routine scans can be run in several seconds.

## 7.2. QMISF

We found, that two data points from a three component mixture's EEM are enough to establish a reliable concentration determination. First, we have to know which compounds are in the solution and precise measurement and analysis of components' EEMs are needed. But then, by selecting proper isopotential trajectories, the wanted component's concentration can be determined both in case of one-component or even two-component background of unknown concentration. We have to measure fluorescence intensity just in two spectral points, and the intensity difference is proportional to the concentration of the wanted compound:  $[I(\lambda_{\text{exc},1}, \lambda_{\text{emi},1}) - I(\lambda_{\text{exc},2}, \lambda_{\text{emi},2})]$ . This method is capable to quantitatively determine fluorophores being in less than 1:200 fluorescence intensity ratio compared to each other even at medium noise level (1–2 % of intensity of the background component).

This result is a significant, roughly two order of magnitude improvement compared to the classical DMISF method. At the final form, when the investigation of a certain complex sample has been done, only two spectral points are to be selected from the interpolated EEM. It means that a very sensitive, extremely fast, almost real time measurement can be established for determining the concentration of a wanted component very precisely. The most important features of QMISF are that:

- the concentrations of background components are indifferent,
- the sensitivity is much higher compared to classical DMISF,
- measurements only at two spectral positions are enough.

The Signal/Noise ratio can be improved with increasing the integration time, the number of excitation pulses, the scanning time, and so forth in fluorescence measurements. A longer measuring time is still acceptable with the proposed new QMISF technique, when fluorescence intensity should be measured at only two spectral points in the routine measurements. Other techniques need measuring at much more spectral points, and

there may be no time to collect these data to be noiseless enough. A main force of QMISF is that the wanted component can be found at a reasonable measuring time at even  $10^{-3} - 10^{-4}$  relative concentration compared to the background (assuming similar quantum yields both for wanted and background components). Based on these results, fast routine measurements could be implemented.

### 7.3. Identification of *Fusarium graminearum* Infection Severity of Wheat Grains by ISSI method

EEMs of diseased wheat seeds were measured first. Fluorescence emission attributed to the consequence of infection is found with a maximum around  $\lambda_{\text{ger}} = 365$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 445$  nm. The spectral shape and its position changes slightly with the degree of infection. Nevertheless, fluorescence is found to be inadequate for establishing a reliable discrimination method.

Reflectance spectra show more significant relation between the degree of infection and the spectral shape. To use these spectra one needs a reference spectral series measured on differently infected seeds of the same wheat type. The comparison of measured and reference spectra can yield a very good estimation of degree of infection. A 2-5 percentage-point error level can be achieved.

The intensity data of the reflectance spectra may vary quite a lot according to the unique shape and reflectance of the every seeds. A normalization method is needed to make these spectra comparable. For this purpose we utilized the fact, that there is a long wavelength spectral region where no influence of infection can be observed. From the Normalized relative reflectance spectra it seems obvious, that healthy seeds have at least 25-30% lower reflection at shorter wavelengths than the infected ones.

Based on these facts we can use a three-color characterization of the seeds. R, G and B components of seeds' images have been used for spectral analysis. ISSI functions can be used very well for ordering new spectral parameters to each pixel. The use of ISSI(RG),

ISSI(RB) and ISSI(GB) functions opens the way to use special, new characterizing parameters. The center of gravity's X coordinate evaluated at a positive range (0.015 to 1):  $X_{\text{mean}}$  and the FWHM parameters.

ISSI-analysis of digital images of seeds seems a reliable and fast method in determining the degree of infection. The most significant change with the level of infection is found in ISSI(RG) image, thus its parameters are the most proper for characterizing the degree of infection. Higher infection means lower  $X_{\text{mean}}$  (Figs. 5.16. and 5.17.) and FWHM values of ISSI(RG). It was found, that a fast and simple method can be established for deciding whether the sample is infected at all or not. Using digital cameras, taking a single image is the first step. The second step is the preparation of the ISSI(RG) histogram, and finally the  $X_{\text{mean}}$  of this histogram has to be calculated. The results clearly show that the spectral analysis is possible and we found specific spectra that correlated well with the disease severity.

# Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok témavezetőmnek Dr. Erostyák Jánosnak a kitartó szakmai irányításért és a munkám során nyújtott segítségért.

Őszintén köszönöm családomnak kitartó támogatásukat és segítségüket. Külön köszönöm Dr. Sánta Imrének és Dr. Mechler Mátyásnak az évek során nyújtott sok-sok segítséget és iránymutatást.



# Irodalomjegyzék

- [1] LÁSZLÓ KRISZTINA, GROFCSIK ANDRÁS, KÁLLAY MIHÁLY, KUBINYI MIKLÓS: *Fizikai Kémia I. Kémiai Termodinamika*. TypoTEX kiadó (2011)
- [2] KORCSMÁROS IVÁN, SZŐKEFALVI-NAGY ZOLTÁN: *Szervetlen kémia*. Tankönyvkiadó (1980)
- [3] JERRY R. MOHRIG, CHRISTINA NORING HAMMOND, PAUL F. SCHATZ: *Techniques in Organic Chemistry*. Freeman, W. H. & Company (2010)
- [4] DR. THOMAS LEHMANN: *<sup>1</sup>H-NMR spektroszkópia*. Freie Universität Berlin – Institut für Chemie und Biochemie, Egyetemi jegyzet (2008)
- [5] DR. ZSIGMOND ÁGNES: *A szerves kémia alapjai*. SZTE Egyetemi jegyzet (2008)
- [6] DR. FÁBIÁN ISTVÁN: *Spektrofotometria*. Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Egyetemi Sillabusz (2009)
- [7] JOSEPH R. LAKOWICZ: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3<sup>rd</sup> ed., Springer (2006)
- [8] DR. EROSTYÁK JÁNOS, DR. KOZMA LÁSZLÓ, DR. BERGOU JÁNOS, DR. PINTÉR FERENC: *Általános Fizika III*. Dialóg Campus (1999)
- [9] MARÓTI PÉTER, LACZKÓ GÁBOR: *Orvosi Fizika II*. Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem (1992)

- [10] WHITAKER S, PIGFORD RL: *Numerical Differentiation of Experimental Data*. Industrial and Engineering Chemistry **52(2)**, 185 - 187 (1960)
- [11] MORREY JR: *On Determining Spectral Peak Positions from Composite Spectra with a Digital Computer*. Analytical Chemistry **40(6)**, 905-914 (1968)
- [12] GÖRÖG SÁNDOR: *Spektrofotometriás gyógyszeranalízis*. Akadémiai Kiadó, Budapest (1993)
- [13] SIANO DB, METZLER DE: *Band shapes of the electronic spectra of complex molecules*. J. Chem. Phys. **51**, 1856-1861 (1969)
- [14] BURSTEIN EA, EMELYANENKO V: *Log-normal description of fluorescence spectra of organic fluorophores*. Photochem. Photobiol. **64(2)**, 316-320 (1996)
- [15] NARAYANASWAMY BALAKRISHNAN, WILLIAM W.S. CHEN: *Handbook of tables for order statistics from lognormal distributions with applications*. Kluwer Amsterdam, Netherlands (1999)
- [16] WILLIAM H. PRESS, SAUL A. TEUKOLSKY, WILLIAM T. VETTERLING, BRIAN P. FLANNERY: *Numerical Recipes in C*. 2<sup>nd</sup> edition, Cambridge University Press, New York (1992)
- [17] ORIGINLAB CORPORATION: *Programming in Origin C*. OriginLab Corp., Northampton (2002)
- [18] SOURI E, AMANLOU M, FARSAM H, AFSHARI A: *A Rapid Derivative Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Naphazoline and Antazoline in Eye Drops*. Chem. Pharm. Bul. **54**, 119-122 (2006)
- [19] ABDINE HH, GAZY AA, ABDEL-HAY MH: *Simultaneous determination of melatonin-pyridoxine combination in tablets by zero-crossing derivative spectrophotometry and spectrofluorimetry*. Journal of Pharma. and Biomed. Anal. **17**, 379-386 (1998)

- [20] REYNOLDS DM: *Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy*. Water Research **37**, 3055-3060 (2003)
- [21] PATRA D, MISHRA AK: *Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis*. Trends in Anal. Chem. **21**, 787-798 (2002)
- [22] WEI ZHANG, DAN-LI LIN, ZHE-XIANG ZOU, YAO-QUN LI: *A novel approach for simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by Shpol'skii non-linear variable-angle synchronous fluorescence spectrometry*. Talanta **71**, 1481-1486 (2007)
- [23] PISTONESI MF, DI NEZIO MS, CENTURIÓN ME, PALOMEQUE ME, LISTA AG, FERNÁNDEZ BAND BS: *Determination of phenol, resorcinol and hydroquinone in air samples by synchronous fluorescence using partial least-squares (PLS)*. Talanta **69**, 1265-1268 (2006)
- [24] ANDRADE-EIROA Á, DE-ARMAS G, ESTELA H-M, CERDÁ V: *Critical approach to synchronous spectrofluorimetry I.* Trends in Anal. Chem. **29(8)**, 885-901 (2010)
- [25] XIANLI LIU, JINQIU JING, SHENGFANG LI, GUODONG ZHANG, TAO ZOU, XIANYOU XIA, WEIDONG HUANG: *Measurement of pyrene in the gills of exposed fish using synchronous fluorescence spectroscopy*. Chemosphere **86**, 198-201 (2012)
- [26] GUOXIONG HUA, BRODERICK J, SEMPLÉ KT, KILLHAM K, SINGLETON I: *Rapid quantification hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin of polycyclic (HPCD) soil aromatic hydrocarbons extracts by in synchronous fluorescence spectroscopy (SFS)*. Environmental Pollution **148**, 176-181 (2007)
- [27] PATRA D, MISHRA AK: *Investigation on simultaneous analysis of multicomponent polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in water samples: a simple synchronous fluorimetric method*. Talanta **55**, 143-153 (2001)

- [28] RUIZ TP, LOZANO CM, TOMÁS V, CARPENA J: *Analysis of binary mixtures of flufenamic, meclofenamic and mefenamic acids by derivative synchronous fluorescence spectrometry*. *Talanta* **47**, 537-545 (1998)
- [29] SÖZGEN K, TÜTEM E: *Second derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of cobalt, nickel and iron using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol*. *Talanta* **62**, 971-976 (2004)
- [30] LAGE-YUSTY MA, LÓPEZ-GONZÁLEZ J, SIMAL-LOZANO J: *Resolution of 13 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Constant-wavelength Synchronous Spectrofluorometry*. *Anal. Sciences* **21**, 1203-1206 (2005)
- [31] DIVYA O, MISHRA AK: *Multivariate methods on the excitation emission matrix fluorescence spectroscopic data of diesel-kerosene mixtures: A comparative study*. *Anal. Chim. Acta* **592**, 82-90 (2007)
- [32] YAO-QUN LI, WEI SUI, CHUN WU, LI-JUN YU: *Derivative Matrix Isopotential Synchronous Fluorescence Spectroscopy for the Direct Determination of 1-Hydroxypyrene as a Urinary Biomarker of Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. *Anal. Sci.* **17**, 167-170 (2001)
- [33] PULGARIN JAM, MOLINA AA, LÓPEZ PF: *Simultaneous Direct Determination of Amiloride and Triamterene in Urine Using Isopotential Fluorimetry*. *Anal. Biochem.* **292**, 59-68 (2001)
- [34] PULGARIN JAM, MOLINA AA: *Matrix isopotential synchronous fluorescence Direct determination of gentisic acid in urine*. *Anal. Chim. Acta* **296**, 87-97 (1994)
- [35] PULGARIN JAM, MOLINA AA, LÓPEZ PF: *Direct determination of closely overlapping drug mixtures of diflunisal and salicylic acid in serum by means of derivative matrix isopotential synchronous fluorescence spectrometry*. *Anal. Chim. Acta* **583**, 55-62 (2007)

- [36] DAN-LI L, LI-FANG H, YAO-QUN LI: *Rapid and Simultaneous Determination of Coproporphyrin and Protoporphyrin in Feces by Derivative Matrix Isopotential Synchronous Fluorescence Spectrometry*. *Clinical Chemistry* **50**, 1797-1803 (2004)
- [37] MAEDER M, ZUBERBUHLER AD: *Nonlinear Least-Squares Fitting of Multivariate Absorption Data*. *Anal. Chem.* **62**, 2220-2224 (1990)
- [38] ALEXANDER M. MOOD, FRANKLIN A. GRAYBILL: *Introduction to the Theory of Statistics*. 2<sup>nd</sup> ed, McGraw-Hill, New York (1963)
- [39] PHILIP R. BEVINGTON, D. KEITH ROBINSON: *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*. McGraw-Hill, New York (1969)
- [40] WALTER CLARK HAMILTON: *Statistics in Physical Sciences*. The Ronald Press Co., New York (1964)
- [41] NORMAN RICHARD DRAPER, HARRY SMITH: *Applied Regression Analysis*. 3<sup>rd</sup> ed., Wiley, New York (1998)
- [42] SAVITZKY A, GOLAY MJE: *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. *Anal. Chem.* **36**, 1627-1639 (1964)
- [43] GUOXIONG HUA, KILLHAM K, SINGLETON I: *Potential application of synchronous fluorescence spectroscopy to determine benzo[a]pyrene in soil extracts*. *Environmental Pollution* **139**, 272-278 (2005)
- [44] PARRY DW, JENKINSON P, MCLEOD L: *Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review*. *Plant Pathology* **44**, 207-238 (1995)
- [45] MIEDANER T: *Breeding wheat and rye for resistance to Fusarium diseases*. *Plant Breeding* **116**, 201-220 (1997)
- [46] MESTERHÁZY Á: *Fusarium species of wheat in South Hungary, 1970-1983*. *Cereal Res. Comm.* **12**, 167-170 (1984)

- [47] MESTERHÁZY Á: *Types and components of resistance against Fusarium head blight of wheat*. Plant Breeding **114**, 377-386 (1995)
- [48] VOSS KA, SNOOK ME: *Stability of the mycotoxin deoxynivalenol (DON) during the production of flour-based foods and wheat flake cereal*. Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess. **27(12)**, 1694-1700 (2010)
- [49] TÓTH B, MESTERHÁZY Á, HORVÁTH Z, BARTÓK T, VARGA M, VARGA J: *Genetic variability of central European isolates of the Fusarium graminearum species complex*. European Journal of Plant Pathology **113**, 35-45 (2005)
- [50] GARRIDO CE, HERNÁNDEZ PEZZANI C, PACIN A: *Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (Zea mays L.), from 1999 to 2010*. Food Control **25**, 660-665 (2012)
- [51] MURILLO-ARBIZU M, GONZÁLEZ-PEÑAS E, AMÉZQUETA S: *Comparison between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for the study of the occurrence of patulin in apple juice intended for infants*. Food and Chemical Toxicology **48**, 2429-2434 (2010)
- [52] DEL PONTE EM, GARDA-BUFFON J, BADIALE-FURLONG E: *Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil*. Food Chemistry **132**, 1087-1091 (2012)
- [53] RUBERT J, SOLER C, MANES J: *Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods*. Food Chemistry **133**, 176-183 (2012)
- [54] MUSCARELLA M, MAGRO SL, NARDIELLO D, PALERMO C, CENTONZE D: *Development of a new analytical method for the determination of fumonisins B1 and B2 in food products based on high performance liquid chromatography and fluorimetric detection with post-column derivatization*. Journal of Chromatography A **1203**, 88-93 (2008)

- [55] SILVA L, FERNÁNDEZ-FRANZÓN M, FONT G, PENA A, SILVEIRA I, LINO C, MAÑES J: *Analysis of fumonisins in corn-based food by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detectors*. Food Chemistry **112**, 1031-1037 (2009)
- [56] MESTERHÁZY Á, BARTÓK T, KÁSZONYI G, VARGA M, TÓTH B, VARGA J: *Common resistance to different Fusarium spp. causing Fusarium head blight in wheat*. European Journal of Plant Pathology **112**, 267-281 (2005)
- [57] MESTERHÁZY Á: *Role of deoxynivalenol in aggressiveness of Fusarium graminearum and F. culmorum and in resistance to Fusarium head blight*. European Journal of Plant Pathology **108**, 675-684 (2002)
- [58] TURNER NW, SUBRAHMANYAM S, PILETSKY SA: *Analytical methods for determination of mycotoxins: A review*. Anal. Chim. Acta **632**, 168-180 (2009)
- [59] BERTHILLER F, SCHUHMACHER R, BUTTINGER G, KRŠKA R: *Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. **1062(2)**, 209-216 (2005)
- [60] DELWICHE SR: *Classification of scab- and other mould-damaged wheat kernels by near-infrared reflectance spectroscopy*. Transactions of the ASAE **46(3)**, 731-738 (2003)
- [61] VARGA M, BARTÓK T, MESTERHÁZY Á: *Determination of ergosterol in Fusarium infected wheat by liquid chromatography – atmospheric pressure photoionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. **1103**, 278-283 (2006)
- [62] LUO X, JAYAS DS, SYMONS SJ: *Identification of Damaged Kernels in Wheat using a Colour Machine Vision System*. Journal of Cereal Science **30**, 49-59 (1999)

- [63] TAHIR AR, NEETHIRAJAN S, JAYAS DS, SHAHIN MA, SYMONS SJ, WHITE NDG: *Evaluation of the effect of moisture content on cereal grains by digital image analysis*. Food Research International **40**, 1140-1145 (2007)
- [64] GONG ZHANG, JAYAS DS, WHITE NDG: *Separation of touching grain kernels in an image by ellipse fitting algorithm*. Biosystems Engineering **92(2)**, 135-142 (2005)
- [65] SHOUCHE SP, RASTOGI R, BHAGWAT SG, JAYASHREE KRISHNA SAINIS: *Shape analysis of grains of Indian wheat varieties*. Computers and Electronics in Agriculture **33**, 55-76 (2001)
- [66] PRYSTUPA DA, PALIWAL J: *A High Throughput Optical System for the Detection and Removal of FDK from Fusarium-Infected Wheat*. Proc. of the 5<sup>th</sup> Canadian Workshop of Fusarium Head Blight, Winnipeg, Nov. 27-30, p. 103. (2007)
- [67] MESTERHÁZY Á ET AL.: *An improved strategy for breeding FHB resistant wheat must include Type I resistance..* Proc. of the 5<sup>th</sup> Canadian Workshop of Fusarium Head Blight, Winnipeg, Nov. 27-30, p. 51. (2007)
- [68] TRIPATHI S, MISHRA HN: *A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder*. Food Control **20**, 840-846 (2009)
- [69] YANG IC, DELWICHE SR, CHEN S, LO YM: *Enhancement of Fusarium head blight detection in free-falling wheat kernels using a bichromatic pulsed LED design*. Optical Engineering **48(2)**, 023602 (2009)
- [70] DELWICHE SR, GAINES CS: *Wavelength selection for monochromatic and bichromatic sorting of Fusarium-damaged wheat*. Applied engineering in agriculture **21**, 681-688 (2005)
- [71] MIRIK M, MICHELS GJ, JR., KASSYMZHANOVA-MIRIK S, ELLIOTT NC, CATTANA V, JONES DB, BOWLING R: *Using digital image analysis and spectral ref-*



- lectance data to quantify damage by greenbug (Hemitera: Aphididae) in winter wheat. Computers and electronics in agriculture* **51**, 86-98 (2006)
- [72] KRASNOWSKA EK, GRATTON E, PARASASSI T: *Prodan as a Membrane Surface Fluorescence Probe: Partitioning between Water and Phospholipid Phases. Biophysical Journal* **74**, 1984-1993 (1998)
- [73] SANCHEZ SA, TRICERRI MA, GUNTHER G, GRATTON E: *Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope. Modern Research and Educational Topics in Microscopy. FORMATEX* 1007-1014 (2007)

# Publikációk

## A témában megjelent publikációk:

1. G. Makkai, A. Buzády, J. Erostyák: Sensitivity Test of Derivative Matrix Isopotential Synchronous Fluorimetry and Least Squares Fitting Methods J. Fluor. 20 (1) January (2010) 87-94.
2. G. Makkai, J. Erostyák: Quick Multicomponent Analysis Based on Matrix Isopotential Synchronous Fluorimetry ISRN Spectroscopy (2012)  
<http://www.hindawi.com/isrn/spectroscopy/aip/917879/>
3. G. Makkai, Á. Mesterházy, J. Erostyák: Spectroscopy Study of Fusarium graminearium infection of wheat seeds by image histograms Opt. Eng. 52 (5) (2013)  
doi: 10.1117/1.OE.52.5.057004

## Poszterek:

1. G. Makkai, Á. Mesterházy, J. Erostyák: Spectroscopy Study of Fusarium graminearium infection of wheat seeds by image histograms; XV International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS 2012), June 19-22, (2012), Barcelona; Spain PP43.
2. G. Makkai, A. Buzády, J. Erostyák: Improved sensitivity of matrix isopotential synchronous fluorimetry; XIV International Symposium on Luminescence Spectro-

metry (ISLS 2010), July 13-16, (2010), Prague; Czech Republic P082.

3. G. Makkai, A. Buzády, J. Erostyák: Fluorescence Spectroscopy Study of Fusarium graminearium infection of wheat seeds; 11th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence (MAF11), September 6-9, (2009), Budapest; Hungary PO 172.
4. G. Makkai, A. Buzády, J. Erostyák: Matrix Isopotential Synchronous Fluorometry vs. Least Squares Fitting. Comparative study of mixture analyzing methods; XIII International Symposium on Luminescence Spectrometry (ISLS 2008), September 7-11, (2008), Bologna; Italy PO123.
5. G. Makkai, A. Buzády, J. Erostyák: Sensitivity Limits of Matrix Isopotential Synchronous Fluorimetry; 9th Symposium on Instrumental Analysis (9th SIA), June 29-July 2, (2008), Pécs; Hungary P-41.

### **Témán kívüli publikációk:**

1. J. Erostyák, G. Makkai, A. Buzády, P. Molnár, S. V. Kukhlevsky: Relation between fluorescence decays and temporal evolution of excited states *J. Fluor.* 16 (3) May (2006) 301-307.

# A. Függelék

## Origin<sup>®</sup> C programfájl

```
1 #include <origin.h>
2
3 vector<double> Y(1000);
4 vector<double> XS(1000);
5 vector<double> M(20);
6 vector<double> YS(1000);
7 vector<double> mer(4);
8 vector<double> d(20);
9 vector<int> hely(4);
10 int n;
11 matrix<double> datain(20,2);
12 matrix<double> Mat(20,20);
13
14 void passage(matrix matr, vector vec, int rd)
15 {
16     int fut;
17     vector<double> avek(rd);
18     vector<double> bvek(rd);
19     vector<double> cvek(rd);
20     vector<double> alpha(rd);
21     vector<double> beta(rd);
22
23     for (fut=0; fut<rd-1; fut++)
24     {
25         avek[fut] = matr[fut][fut];
26         bvek[fut+1] = -matr[fut+1][fut];
27         cvek[fut] = -matr[fut][fut+1];
28     }
29     avek[rd-1]=matr[rd-1][rd-1];
30     alpha[0] = 0.0;
31     beta [0] = 0.0;
32     for (fut=0; fut<rd-1; fut++)
33     {
```

```

34     alpha[ fut+1] = cvek[ fut]/(avek[ fut]-bvek[ fut]*alpha[ fut] );
35     beta[ fut+1] = (vec[ fut]+bvek[ fut]*beta[ fut] )/(avek[ fut]-bvek
        [ fut]*alpha[ fut] );
36 }
37 M[rd-1] = (vec[rd-1]+bvek[rd-1]*beta[rd-1])/(avek[rd-1]-bvek[
        rd-1]*alpha[rd-1]);
38 for ( fut=rd-2; fut >0; fut --)
39 {
40     M[ fut ] = alpha[ fut+1]*M[ fut+1]+beta[ fut+1];
41 }
42 }
43
44
45 void mygorbe(matrix data)
46 {
47     vector<double> x(n),y(n),h(n),alpha(n),beta(n),gamma(n),delta(
        n),lambda(n),mu(n);
48     int i,j;
49     for (i=0;i<n;i++)
50     {
51         x[i] = data[i][0];
52         y[i] = data[i][1];
53         delta[i] = y[i];
54     }
55     for (i=0;i<n-1;i++)
56         h[i+1] = x[i+1]-x[i];
57
58
59     for (i=0;i<n-1;i++)
60         mu[i] = h[i]/(h[i+1]+h[i]);
61     mu[n-1] = 0.0;
62     lambda[0] = 0.0;
63     for (i=1;i<n-1;i++)
64         lambda[i] = h[i+1]/(h[i+1]+h[i]);
65     d[0] = 0.0;
66     for (i=1;i<n-1;i++)
67     {
68         d[i] = 6.0/(h[i+1]+h[i])*((y[i+1]-y[i])/h[i+1]-(y[i]-y[i-1])
            /h[i]);
69     }
70     d[n-1] = 0.0;
71     for (i=0;i<20;i++)
72     {
73         for (j=0;j<20;j++)
74         {
75             Mat[i][j] = 0.0;

```

```

76     }
77     }
78     for (i=0;i<n;i++)
79     {
80         Mat[i][i] = 2.0;
81         if (i<n-1)
82         {
83             Mat[i][i+1] = lambda[i];
84             Mat[i+1][i] = mu[i+1];
85         }
86     }
87
88     passage(Mat,d,n);
89
90     for (i=0;i<n-1;i++)
91     {
92         gamma[i] = (y[i+1]-y[i])/h[i+1]-(2.0*M[i]+M[i+1])/6.0*h[i
93             +1];
94         beta[i] = M[i]/2.0;
95         alpha[i] = (M[i+1]-M[i])/(6.0*h[i+1]);
96     }
97
98     for (i=0;i<1000;i++)
99         XS[i] = data[0][0]+(double)i*(data[n-1][0]-data[0][0])
100             /999.0;
101
102     for(j=0;j<1000;j++)
103     {
104         for(i=1;i<n;i++)
105         {
106             if(XS[j]<data[i][0])
107             {
108                 YS[j]=delta[i-1]+(XS[j]-data[i-1][0])*(gamma[i-1]+(XS[j]
109                     -data[i-1][0])*(beta[i-1]+(XS[j]-data[i-1][0])*alpha
110                         [i-1]));
111                 goto lab;
112             }
113         }
114     }
115     lab:;
116     YS[999] = data[n-1][1];
117 }
118
119 void go()

```

```

118 {
119     n=4;
120     double szam;
121     double hibahatar;
122     double ertekek=0;
123     double delta;
124     int futpoint ,x1 ,y1 ,maradek;
125     int ii ,jj;
126     Worksheet izo();
127     string maxmatrix=InputBox("Kérem a keresendő minta nevét!");
128     Matrix maxm;
129     maxm.Attach(maxmatrix);
130     string bematrix=InputBox("Kérem az interferáló minta nevét!");
131     Matrix interf;
132     interf.Attach(bematrix);
133     LT_set_str("bemt",bematrix);
134     string mixmatrix=InputBox("Kérem a keverék minta nevét!");
135     Matrix mix;
136     mix.Attach(mixmatrix);
137     string str="getnumber (A hibahatár:) hiba;"
138     "matrix -pg bemt_X minix maxix;"
139     "matrix -pg bemt_Y miny maxy;";
140     LT_execute(str);
141     double xmin , xmax , ymin , ymax;
142     LT_get_var("minix",&xmin);
143     LT_get_var("maxix",&xmax);
144     LT_get_var("miny",&ymin);
145     LT_get_var("maxy",&ymax);
146     uint sor = interf.GetNumRows();
147     uint oszl = interf.GetNumCols();
148     double mtxmax=0;
149     for(ii=0;ii<sor;ii++){
150         for(jj=0;jj<oszl;jj++){
151             if(mtxmax<interf[ii][jj]){
152                 mtxmax=interf[ii][jj];
153             }
154             if(ertekek<maxm[ii][jj]){
155                 ertekek=maxm[ii][jj];
156             }
157         }
158     }
159     if(mtxmax<ertekek){
160         string str="getnumber (Érték túl nagy. Kérem a keresett
161             szintet:) ertekek;";
162         LT_execute(str);
163         LT_get_var("ertekek",&ertekek);

```

```

163     }
164
165     LT_get_var("hiba",&hibahatar);
166     izo.Create(NULL, CREATE_VISIBLE);
167     izo.GetPage().Rename("Kimenet");
168     izo.AddCol();
169     Dataset xek("Kimenet_A");
170     Dataset yok("Kimenet_B");
171     Dataset zek("Kimenet_C");
172     uint szaml=0;
173     xek.SetSize(sor*oszl);
174     yok.SetSize(sor*oszl);
175     zek.SetSize(sor*oszl);
176     double fele,xa,xf,xfe;
177     for(ii=0;ii<sor;ii++)
178     {
179         for(jj=0;jj<oszl-1;jj++)
180         {
181             if (((interf[ii][jj]<ertek) && (interf[ii][jj+1]>ertek))
182                 || ((interf[ii][jj]>ertek) && (interf[ii][jj+1]<ertek)))
183                 {
184                     yok[szaml]=ymin+ii*(ymax-ymin)/(sor-1);
185                     for(int kk=0;kk<n;kk++){
186                         datain[kk][0]=xmin+(jj+kk-1)*(xmax-xmin)/(oszl-1);
187                         datain[kk][1]=interf[ii][jj+kk-1];
188                     }
189                     mygorbe(datain);
190                     for(kk=0;kk<999;kk++){
191                         if(abs(YS[kk]-ertek)<hibahatar){
192                             xek[szaml]=XS[kk];
193                             zek[szaml]=YS[kk];
194                             break;
195                         }
196                         if (((YS[kk]<ertek) && (YS[kk+1]>ertek)) || ((YS[kk]>
197                             ertek) && (YS[kk+1]<ertek))) {
198                             for(int ll=0;ll<n;ll++){
199                                 if(kk+ll==0){
200                                     datain[ll][0]=XS[0]+(kk+ll)*(XS[999]-XS[0])/999;
201                                     datain[ll][1]=YS[kk+ll];
202                                 } else if(kk+ll==1001){
203                                     datain[ll][0]=XS[0]+(kk+ll-2)*(XS[999]-XS[0])
204                                         /999;
205                                     datain[ll][1]=YS[kk+ll-2];
206                                 } else {
207                                     datain[ll][0]=XS[0]+(kk+ll-1)*(XS[999]-XS[0])
208                                         /999;

```



```

204         datain [ ll ][ 1 ] = YS [ kk + ll - 1 ];
205     }
206 }
207     mygorbe ( datain );
208     kk = 0;
209 }
210 }
211     szaml = szaml + 1;
212 }
213 }
214     printf ( "%d\n" , ii )
215 }
216 for ( jj = 0 ; jj < oszl ; jj ++ )
217 {
218     for ( ii = 0 ; ii < sor - 1 ; ii ++ )
219     {
220         if ( ( ( interf [ ii ][ jj ] < ertekek ) && ( interf [ ii + 1 ][ jj ] > ertekek ) )
221             || ( ( interf [ ii ][ jj ] > ertekek ) && ( interf [ ii + 1 ][ jj ] < ertekek ) ) ) {
222             xek [ szaml ] = xmin + ( jj ) * ( xmax - xmin ) / ( oszl - 1 );
223             for ( int kk = 0 ; kk < n ; kk ++ ) {
224                 datain [ kk ][ 0 ] = ymin + ( ii + kk - 1 ) * ( ymax - ymin ) / ( sor - 1 );
225                 datain [ kk ][ 1 ] = interf [ ii + kk - 1 ][ jj ];
226             }
227             mygorbe ( datain );
228             for ( kk = 0 ; kk < 999 ; kk ++ ) {
229                 if ( abs ( YS [ kk ] - ertekek ) < hibahatar ) {
230                     yok [ szaml ] = XS [ kk ];
231                     zek [ szaml ] = YS [ kk ];
232                     break ;
233                 }
234                 if ( ( ( YS [ kk ] < ertekek ) && ( YS [ kk + 1 ] > ertekek ) ) || ( ( YS [ kk ] >
235                     ertekek ) && ( YS [ kk + 1 ] < ertekek ) ) ) {
236                     for ( int ll = 0 ; ll < n ; ll ++ ) {
237                         if ( kk + ll == 0 ) {
238                             datain [ ll ][ 0 ] = XS [ 0 ] + ( kk + ll ) * ( XS [ 999 ] - XS [ 0 ] ) / 999 ;
239                             datain [ ll ][ 1 ] = YS [ kk + ll ] ;
240                         } else if ( kk + ll == 1001 ) {
241                             datain [ ll ][ 0 ] = XS [ 0 ] + ( kk + ll - 2 ) * ( XS [ 999 ] - XS [ 0 ] )
242                                 / 999 ;
243                             datain [ ll ][ 1 ] = YS [ kk + ll - 2 ] ;
244                         } else {
245                             datain [ ll ][ 0 ] = XS [ 0 ] + ( kk + ll - 1 ) * ( XS [ 999 ] - XS [ 0 ] )
246                                 / 999 ;
247                             datain [ ll ][ 1 ] = YS [ kk + ll - 1 ] ;
248                         }
249                     }
250                 }
251             }
252         }
253     }
254 }

```

```

245         }
246         mygorbe( datain );
247         kk=0;
248     }
249 }
250     szaml=szaml+1;
251 }
252 }
253     printf("%d\n", jj )
254 }
255 Worksheet rend();
256 Worksheet mixek();
257 rend.Create(NULL, CREATE_VISIBLE);
258 mixek.Create(NULL, CREATE_VISIBLE);
259 rend.GetPage().Rename("Rendezett");
260 mixek.GetPage().Rename("Mixertekek");
261 rend.AddCol();
262 Dataset xren("Rendezett_A");
263 Dataset yren("Rendezett_B");
264 Dataset zren("Rendezett_C");
265 xren.SetSize(szaml);
266 yren.SetSize(szaml);
267 zren.SetSize(szaml);
268 mixek.AddCol();
269 Dataset mixxek("Mixertekek_A");
270 Dataset mixyok("Mixertekek_B");
271 Dataset mixzek("Mixertekek_C");
272 mixxek.SetSize(szaml);
273 mixyok.SetSize(szaml);
274 mixzek.SetSize(szaml);
275 xren[0]=xek[0];
276 yren[0]=yok[0];
277 zren[0]=zek[0];
278 xek[0]=-10E15;
279 yok[0]=-10E15;
280 double atx;
281 double aty;
282 int eff=0;
283 for( jj=0;jj <szaml;jj++){
284     atx=0;
285     aty=0;
286     eff=0;
287     for( ii=0;ii <szaml;ii++){
288         if(pow(xren[jj]-xek[ii],2.0)+pow(yren[jj]-yok[ii],2.0)<pow
                (xren[jj]-atx,2.0)+pow(yren[jj]-aty,2.0)){
289             atx=xek[ii];

```

```

290         aty=yok [ ii ];
291         eff=ii ;
292     }
293 }
294     if (jj < szaml -1){
295         xren [ jj +1]=atx ;
296         yren [ jj +1]=aty ;
297         zren [ jj +1]=zek [ eff ] ;
298         xek [ eff]=-10E15 ;
299         yok [ eff]=-10E15 ;
300     }
301 }
302
303
304
305 //inverz bezier innét
306 for (jj =0;jj <szaml ;jj++)
307 {
308     if (rmod(xren [ jj ] , floor (xren [ jj ])) >0)
309     {
310         for (int kk=0;kk <n ;kk++)
311         {
312             maradek=mod( floor (xren [ jj ] ) ,2) ;
313             datain [kk][0]= floor (xren [ jj ] -maradek) +(kk -1)*(xmax-
                xmin)/(oszl -1);
314
315             futpoint=floor (xren [ jj ] -maradek) +(kk -1)*(xmax-xmin) /(
                oszl -1);
316             x1=(round (yren [ jj ] -ymin ,0) /((ymax-ymin) /(sor -1))) ; //
                ez fix
317             y1=((futpoint -xmin) /((xmax-xmin) /(oszl -1))) ;
318             printf ("Honnét veszem X-eket:%d\t%d\t\n" ,x1 ,y1) ;
319             datain [kk][1]=mix [x1][y1] ;
320             printf ("datain:%g\t%g\t\n" ,datain [kk][0] ,datain [kk
                ][1]) ;
321
322         }
323         printf("-----\n") ;
324         mygorbe (datain) ;
325
326
327         for (int mm=0;mm <999 ;mm++)
328         {
329
330             if (abs (xren [ jj ] -XS [mm]) < 1E-5)
331             {

```

```

332         mixxek [ jj ]=XS [mm] ;
333         mixyok [ jj ]=yren [ jj ] ;
334         mixzek [ jj ]=YS [mm] ;
335         break ;
336     }
337
338     if ( ((XS [mm]<xren [ jj ] ) && (XS [mm+1]>xren [ jj ])) || ((XS
339         [mm]>xren [ jj ] ) && (XS [mm+1]<xren [ jj ])) )
340     {
341         for ( int ll=0;ll<n;ll++){
342             if (mm+ll==0)
343             {
344                 datain [ ll ] [0]=XS [0] + (mm+ll )*(XS [999] -XS [0] ) /999;
345                 datain [ ll ] [1]=YS [mm+ll ] ;
346             }
347             else if (mm+ll ==1001)
348             {
349                 datain [ ll ] [0]=XS [0] + (mm+ll -2)*(XS [999] -XS [0] )
350                 /999;
351                 datain [ ll ] [1]=YS [mm+ll -2];
352             }
353             else
354             {
355                 datain [ ll ] [0]=XS [0] + (mm+ll -1)*(XS [999] -XS [0] )
356                 /999;
357                 datain [ ll ] [1]=YS [mm+ll -1];
358             }
359         }
360     }
361     mygorbe ( datain );
362     mm=0;
363 }
364 }
365 }
366 }
367 }
368 }
369 }
370 if (rmod (yren [ jj ] , floor (yren [ jj ]))>0)
371 {
372     for (int kk=0;kk<n;kk++)
373     {
374         maradek=mod ( floor (yren [ jj ] ) ,2) ;

```

```

375     datain [kk][0] = floor ( yren [ jj ] - maradek ) + (kk - 1) * (ymax -
        ymin) / (sor - 1);
376     futpoint = floor ( yren [ jj ] - maradek ) + (kk - 1) * (ymax - ymin) / (
        sor - 1);
377     y1 = (round (xren [ jj ] - xmin , 0) / ((xmax - xmin) / (oszl - 1)));
378     x1 = ((futpoint - ymin) / ((ymax - ymin) / (sor - 1)));
379     printf ("Honnét veszem Y-okat:%d\t%d\t\n" , x1 , y1);
380     datain [kk][1] = mix [x1][y1];
381     printf ("datain:%g\t%g\t\n" , datain [kk][0] , datain [kk
        ][1]);
382
383     }
384     printf ("-----\n");
385     mygorbe (datain);
386
387
388     for (int mm=0;mm<999;mm++)
389     {
390
391     if (abs (yren [ jj ] - XS[mm]) < 1E-5)
392     {
393         mixxek [ jj ] = xren [ jj ];
394         mixyok [ jj ] = XS[mm];
395         mixzek [ jj ] = YS[mm];
396         break;
397     }
398
399
400
401
402
403     if (((XS[mm]<yren [ jj ]) && (XS[mm+1]>yren [ jj ])) || ((
        XS[mm]>yren [ jj ]) && (XS[mm+1]<yren [ jj ])))
404     {
405     for (int ll=0;ll<n;ll++){
406         if (mm+ll==0)
407         {
408             datain [ ll ][0] = XS[0] + (mm+ll) * (XS[999] - XS[0]) / 999;
409             datain [ ll ][1] = YS[mm+ll];
410         }
411         else if (mm+ll==1001)
412         {
413             datain [ ll ][0] = XS[0] + (mm+ll - 2) * (XS[999] - XS[0])
                / 999;
414             datain [ ll ][1] = YS[mm+ll - 2];
415         }

```

```

416         else
417         {
418             datain [ 11 ][ 0 ] = XS [ 0 ] + ( mm + 11 - 1 ) * ( XS [ 999 ] - XS [ 0 ] )
                / 999 ;
419             datain [ 11 ][ 1 ] = YS [ mm + 11 - 1 ] ;
420         }
421     }
422
423     mygorbe ( datain ) ;
424     mm = 0 ;
425
426 }
427
428 }
429 }
430 }
431 }
432 }
433 }
434 }
435 }
436 }
437
438
439
440 void zaj ( )
441 {
442     {
443         double szorzo ;
444         string noise = InputBox ( " Kérem a zajosítandó mátrix nevét ! " ) ;
445         Matrix zajalap ;
446         zajalap . Attach ( noise ) ;
447         uint sorok = zajalap . GetNumRows ( ) ;
448         uint oszlopok = zajalap . GetNumCols ( ) ;
449         string str = " getnumber ( Mennyi legyen a zaj mértéke : ) szorzoka
                ; " ;
450         LT _execute ( str ) ;
451         LT _get _var ( " szorzoka " , & szorzo ) ;
452
453         for ( uint ii = 0 ; ii < sorok ; ii ++ ) {
454             for ( uint jj = 0 ; jj < oszlopok ; jj ++ ) {
455                 zajalap [ ii ][ jj ] = zajalap [ ii ][ jj ] + ( szorzo * ( sqrt ( - 2 * ln ( rnd ( ) ) ) *
                    cos ( 2 * pi * rnd ( ) ) ) ) * zajalap [ ii ][ jj ] ;
456             }
457         }
458     }

```

```

459
460
461 }
462
463 void kivonas(string name)
464
465 {
466     //double szorzo;
467     string elso=InputBox("Kérem a fő mátrix nevét!");
468     Matrix alap;
469     alap.Attach(elso);
470     uint sorok = alap.GetNumRows();
471     uint oszlopok = alap.GetNumCols();
472     string masodik=InputBox("Kérem a kivonandó mátrix nevét!");
473     Matrix masodikmatrix;
474     masodikmatrix.Attach(masodik);
475     //Mátrix létrehozása és feltöltése
476     MatrixLayer mat;
477     mat.Create("ki_eredmeny");
478     mat.GetPage().Rename(name);
479     mat.MatrixObjects(0).SetDimensions(sorok, oszlopok);
480     //mat.MatrixObjects(0).SetDigitMode(DIGITS_SIGNIFICANT);
481     //mat.MatrixObjects(0).SetDigits(5);
482     Matrix <double> aa;
483     BOOL bRet = aa.Attach(name);
484     //UINT rows = aa.GetNumRows();
485     //UINT cols = aa.GetNumCols();
486     printf("rows = %d\t cols = %d\n", sorok, oszlopok);
487     for (int ii = 0; ii < sorok; ii++)
488     for (int jj = 0; jj < oszlopok; jj++)
489     {
490     aa[ii][jj] = alap[ii][jj] - masodikmatrix[ii][jj];
491     }
492
493
494 }
495
496 void smooth()
497
498 {
499
500     int ii, jj, aves, aveo;
501     double ave;
502     string sm=InputBox("Kérem a simítandó mátrix nevét!");
503     Matrix smoothy;
504     MatrixLayer sm1;

```

```
505     sm1.Create("origin");
506     sm1.GetPage().Rename("Muho");
507     sm1.MatrixObjects(0).SetDimensions(101,101);
508     Matrix <double> smhelp;
509     smhelp.Attach("Muho");
510     smoothy.Attach(sm);
511     uint sory = smoothy.GetNumRows();
512     uint oszly = smoothy.GetNumCols();
513
514
515     for(ii=1;ii<sory-1;ii++){
516         for(jj=1;jj<oszly-1;jj++){
517             for(aves=-1;aves<2;aves++){
518                 for(aveo=-1;aveo<2;aveo++){
519                     ave+=smoothy[ii+aves][jj+aveo];
520                 }
521             }
522         }
523         smhelp[ii][jj]=ave/9;
524         ave=0;
525     }
526 }
527 }
528
529     for(ii=1;ii<sory-1;ii++){
530         for(jj=1;jj<oszly-1;jj++){
531             smoothy[ii][jj]=smhelp[ii][jj];
532         }
533     }
534 }
535
536 sm1.Destroy();
537 }
```