

豆类种子自然老化过程的红外光谱研究

杨卫梅¹, 刘刚^{1*}, 欧全宏¹, 安冉¹, 符致秋¹, 李建美¹, 时有明²¹ 云南师范大学物理与电子信息学院, 云南 昆明 650500;² 曲靖师范学院物理与电子工程学院, 云南 曲靖 655011

摘要 老化种子的鉴定对农业生产和粮食安全具有重要意义。利用红外光谱三级鉴别法(傅里叶变换红外光谱技术、二阶导数红外光谱技术和二维相关红外光谱技术相结合)对不同储藏年份的豆类种子进行区分。结果显示:3种豆类种子的傅里叶变换红外光谱图总体相似,且主要由蛋白质和碳水化合物的吸收峰组成;不同储藏年份的豆类种子的原始红外光谱仅在 $1800\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 范围内有微小差异,几个吸收强度比随储藏年份增加呈现下降趋势;方差分析显示不同储藏年份的种子的吸光度比有显著差异;不同储藏年份的种子的二阶导数红外光谱(在 $1800\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 范围内)的吸收峰形状和强度存在差异;在二维相关红外光谱中,不同储藏年份的蚕豆和红豆种子(在 $860\sim 1690\text{ cm}^{-1}$ 范围内)及大豆种子(在 $1350\sim 1800\text{ cm}^{-1}$ 范围内)的自动峰和交叉峰出现的位置、数目及强度存在显著差异,其中数目随储藏年份增加而减少,强度随储藏年份增加而减弱。偏最小二乘法分析能对不同储藏年份的种子进行快速分类。3种豆类种子在老化过程中都表现出明显的光谱差异,表明红外光谱三级鉴别法可以快速区分不同储藏年份的豆类种子,有望发展成为简单、快速鉴别种子老化的光谱方法。

关键词 光谱学; 老化; 傅里叶变换红外光谱; 豆类种子; 二维相关红外光谱

中图分类号 O436 文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP55.123001

Infrared Spectroscopy of Naturally Aged Legume Seeds

Yang Weimei¹, Liu Gang^{1*}, Ou Quanhong¹, An Ran¹, Fu Zhiqiu¹, Li Jianmei¹, Shi Youming²¹ School of Physics and Electronic Information, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan 650500, China;² School of Physics and Electronic Engineering, Qujing Normal University, Qujing, Yunnan 655011, China

Abstract The identification of seed aging has a great significance for agricultural production and food security. In this paper, three kinds of legume seeds with different storage years are distinguished by a tri-step IR spectra method, including Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, second derivative infrared (SD-IR) spectroscopy and two-dimensional correlation infrared (2D-IR) spectroscopy. The results show that the FT-IR spectra of three kinds of legume seeds are very similar, which are composed of the absorption peaks of protein and carbohydrate. But slight differences of original infrared spectrum of legume seeds with different storage years are observed in the range of $1800\sim 700\text{ cm}^{-1}$. The absorption intensity ratios of three kinds of legume seeds show a decrease tendency with the increase of storage time. The variance analysis of the absorption intensity ratio show that the absorbance ratio of the seeds with different storage years is significantly different. More obvious differences are exhibited in their SD-IR spectra in the range of $1800\sim 700\text{ cm}^{-1}$. In 2D-IR spectra, the positions, numbers and intensities of auto-peaks and cross-peaks are obvious different in the range of $860\sim 1690\text{ cm}^{-1}$ for broad bean seeds and red kidney bean seeds, and in the range of $1350\sim 1800\text{ cm}^{-1}$ for soybean seeds. The numbers decrease with the increase of storage years and the intensities weaken with the increase of storage years. Partial least squares analysis can accurately distinguish legume seeds with different storage years. Three kinds of legume seeds show obvious spectra differences, which demonstrate that FT-IR spectrum combined with SD-IR spectrum and 2D-IR spectrum can be used to discriminate legume seeds with different storage years. The method can provide a simple and rapid spectral method for detecting seed aging.

Key words spectroscopy; aging; Fourier transform infrared (FT-IR) spectrum; legume seeds; two-dimensional correlation infrared (2D-IR) spectrum

OCIS codes 070.4790; 120.7280; 300.6170; 300.6300

收稿日期: 2018-05-21; 修回日期: 2018-06-11; 录用日期: 2018-06-19

基金项目: 国家自然科学基金(31760341)、云南省高校科技创新团队支持计划

* E-mail: gliu66@163.com

1 引言

种子老化是指种子活力的自然衰退,即种子生活力逐渐减弱以至完全丧失的过程。随着储藏时间的延长,种子会发生复杂的生理生化变化,如自身的呼吸氧化、各种酶活动。受到外界干扰后,种子的发芽率会降低,活力减弱,蛋白质、DNA 和 RNA 的合成能力下降^[1-2]。此外,种子内有毒有害物质的累积会使其发霉腐烂,这会严重影响粮食生产及食品安全^[3]。因此,种子老化的鉴定对农业生产具有重要意义。利用发芽率、发芽势和电导率测定种子活力^[4]的方法耗时费力;以色泽、式样等鉴定种子品质的方法会受鉴定人员主观意识的影响。此外,有研究者利用电泳法和 TCA 丙酮法^[5]、免疫测试和抗氧化反应法^[6]、聚合酶链式反应法^[7]、液相色谱-串联质谱和多种反应监测法^[8]、比色法^[9]、谷胱甘肽氧化还原电位和差示扫描量热分析法及电子自旋共振法^[10]、微卫星^[11]法等鉴定种子的老化,但这些方法需要对样品进行预处理,成本高且耗时。

红外光谱三级鉴别法是在傅里叶变换红外光谱(FT-IR)的基础上,通过二阶导数红外光谱(SD-IR)来提高光谱的分辨率,再利用二维相关红外光谱(2D-IR)通过温度微扰来研究各组分基团分子的振动行为差异,揭示各官能团之间的相互作用,简化复杂光谱的重叠峰^[12-13]的方法。傅里叶变换红外光谱、二维相关红外光谱技术已广泛应用在中草药鉴定方面^[14],傅里叶变换红外光谱技术、近红外光谱技术也被广泛应用于农作物种子的鉴定:Jia 等^[15]利用近红外光谱技术鉴定涂料玉米种子;Ambrose 等^[16]利用近红外和拉曼光谱技术测量比较玉米种子的活力;Lu 等^[17]利用傅里叶变换红外光谱和声光谱(PAS)技术对不同品种的油菜籽进行分类;Kandpal 等^[18]利用近红外高光谱成像系统结合多元统计分析研究甜瓜种子的生存能力和活力;Ambrose 等^[19]利用高光谱成像技术测量玉米种子的活力;Chen 等^[20]利用傅里叶变换红外光谱与二维相关红外光谱相结合的技术测定大青种子的化学变化。本文应用红外光谱三级鉴别法(FT-IR、SD-IR、2D-IR相结合的方法),鉴别不同储藏年份的 3 种豆类种子,为鉴别种子的老化提供参考。

2 实验

2.1 仪器设备

实验选用美国 PerkinElmer 公司生产的 Frontier

型傅里叶变换红外光谱仪,配备 DTGS 探测器,测定范围为 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$,分辨率为 4 cm^{-1} ,累计扫描 16 次。采用 EUROTHERM 公司生产的 SYD-TC-01 型温度控制仪,温度控制在 $50\sim 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 范围内,升温速率为 $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$,每隔 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 采集一次光谱,温度为 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 28%。

2.2 样品采集及检测

实验用蚕豆、大豆、红菜豆均采自云南省陆良县,均在 2013 年收集并于室温(温度为 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 27%)下储藏,并且样品一直储藏在固定的地方。每年 11 月份都对样品进行测量,3 种样品每次各测试 10 个样品。实验时,将样品放入玛瑙研钵中磨成细粉,再加入适量的溴化钾搅磨均匀(1 mg 样品与 100 mg 溴化钾混合研磨),制成压片,然后测试光谱,所测光谱均扣除纯溴化钾背景。

2.3 光谱处理和数据分析

使用红外光谱处理软件(OMNIC 8.2)对所采集的原始光谱进行基线校正、平滑、纵坐标归一化、平均谱图及平滑点数为 5 的 Savitsky-Golay 二阶导数预处理。利用 Origin 8.6 软件对 10 次测量值的平均红外光谱的原始光谱和二阶导数红外光谱数据进行处理,使用清华大学分析中心编制的二维相关分析软件(TD 4.2 软件)对动态谱进行同步相关红外光谱分析,利用 SPSS 软件进行方差分析,再利用 SIMCA (soft independent modelling of class analogy)软件进行偏最小二乘法分析。

3 实验结果

3.1 种子的红外光谱特征

图 1 为 3 种豆类种子在收获当年的平均红外光谱图,可以看出,3 种样品的原始光谱图总体相似,典型的特征峰归属如下:在 $3400\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰为蛋白质的 N-H 和多糖 O-H 的伸缩振动;在 $2927, 2856\text{ cm}^{-1}$ 附近的峰分别为 CH_2 的反对称和对称伸缩振动^[21];大豆在 1744 cm^{-1} 附近的峰为油脂 C=O 的伸缩振动;在 $1650, 1536, 1243\text{ cm}^{-1}$ 附近的峰分别为蛋白质酰胺 I、II、III 带的特征吸收峰^[22]。在 $1500\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ 范围内的峰为蛋白质、脂肪酸和多糖的混合振动吸收区,在 $1155, 1075, 1051\text{ cm}^{-1}$ 附近的弱吸收峰为蛋白质、多糖等分子的 C-O 伸缩振动^[21],在 950 cm^{-1} 指纹区以下是蛋白质和碳水化合物的 N-H 和 O-H 的面外弯曲振动及碳水化合物中糖环振动的重叠峰^[23-24]。可以看出,3 种豆类种子的红外光谱主要

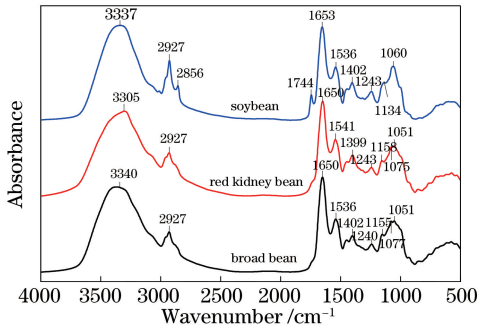


图 1 3 种豆类种子的傅里叶变换红外光谱

Fig. 1 FT-IR spectra of three kinds of legume seeds by protein and carbohydrate absorption peaks.

比较不同储藏年份的 3 种豆类种子的原始红外光谱(图 2), 可见: 各个吸收峰的位置较接近, 但吸

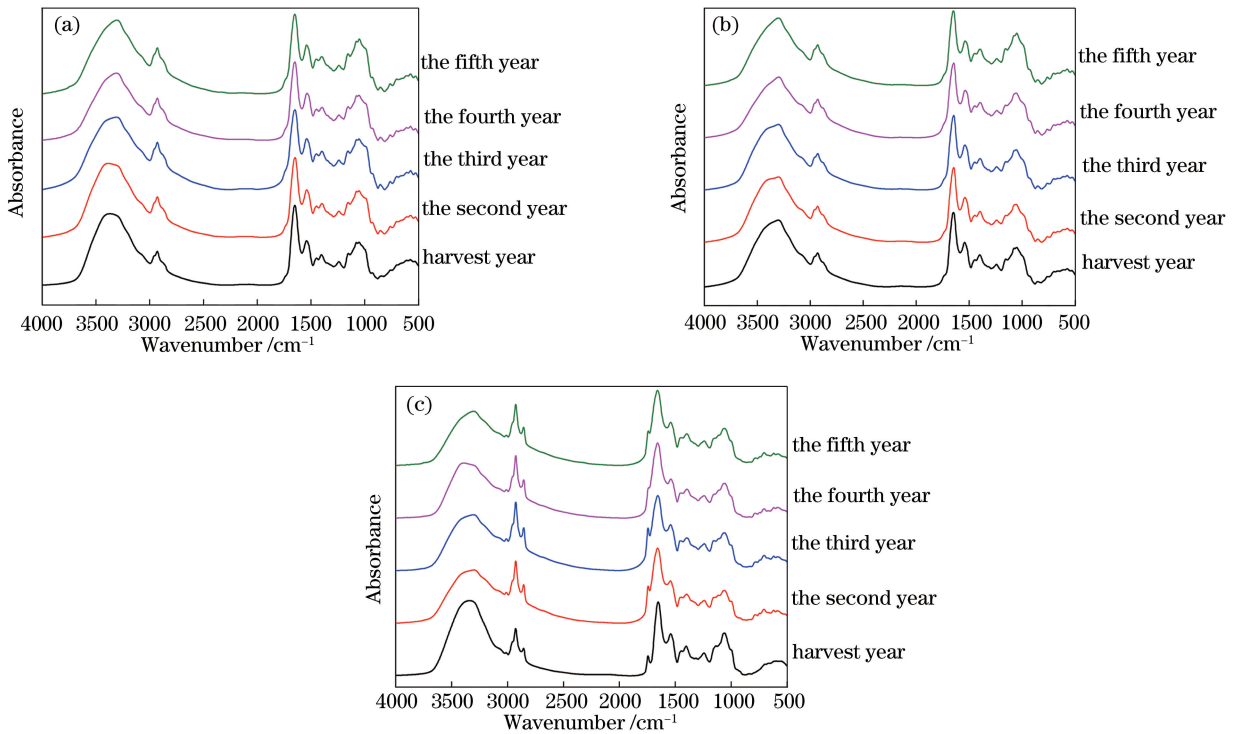


图 2 不同储藏年份的 3 种豆类种子的傅里叶变换红外光谱。(a) 蚕豆种子; (b) 红菜豆种子; (c) 大豆种子

Fig. 2 FT-IR spectra of three kinds of legume seeds with different storage years. (a) Broad bean seeds; (b) red kidney bean seeds; (c) soybean seeds

3.2 单因素方差分析

进一步利用吸收强度比 (A_{1649}/A_{2926} 、 A_{1649}/A_{1538} 、 A_{1649}/A_{1240} 、 A_{1649}/A_{1052} 、 A_{1061}/A_{2923}) 进行方差分析。方差分析是将总的方差分解为各个方差的成分, 然后利用显著性检验法判断某一因素是否有影响, 或者判断哪个因素的影响较大, 从而确定不同因素的效应^[25]。利用 SPSS 软件对不同储藏年份的 3 种豆类种子的 10 次检测光谱吸收强度比的组间进行单因素方差分析。以光谱吸收系数比作为响应

收强度比随储藏年份的增加总体呈下降的趋势; 从收获当年到第 5 年, 蚕豆的吸收强度比 A_{1649}/A_{2926} 分别为 2.373、1.972、1.692、1.83、1.762, A_{1649}/A_{1538} 分别为 1.792、1.684、1.570、1.647、0.942, A_{1649}/A_{1240} 分别为 3.401、3.049、2.71、2.985、2.793; 从收获当年到第 5 年, 红菜豆的吸收强度比 A_{1649}/A_{2929} 分别为 2.07、2.068、2.047、1.936、1.838, A_{1649}/A_{1052} 分别为 2.012、1.966、1.853、1.667、1.431, A_{1649}/A_{1240} 比分别为 3.521、3.368、3.152、2.732、2.786; 从收获当年到第 5 年, 大豆的吸收强度比 A_{1659}/A_{2923} 分别为 1.588、1.233、1.112、1.224、1.244, A_{1061}/A_{2923} 分别为 0.925、0.538、0.559、0.565、0.615; 以上比值均随储藏年份的增加呈下降的趋势。

变量, 以储藏年份作为影响因素, 对方差齐次性进行检验, 输出的概率都大于显著性水平 0.05, 因此各组的总体方差相等, 满足方差分析的前提条件。单因素方差分析计算结果显示(表 1), 除了蚕豆种子的 A_{1650}/A_{1240} 的组间方差分析结论的 P 值大于 0.05 外, 另外种豆类种子的 A_{1650}/A_{2927} 、 A_{1650}/A_{1530} 、 A_{1650}/A_{1240} 、 A_{1050}/A_{2927} 组间方差分析结论的 P 值都小于 0.05, 表明不同储藏年份种子的光谱吸收强度比存在差异。

表 1 单因素方差分析计算结果

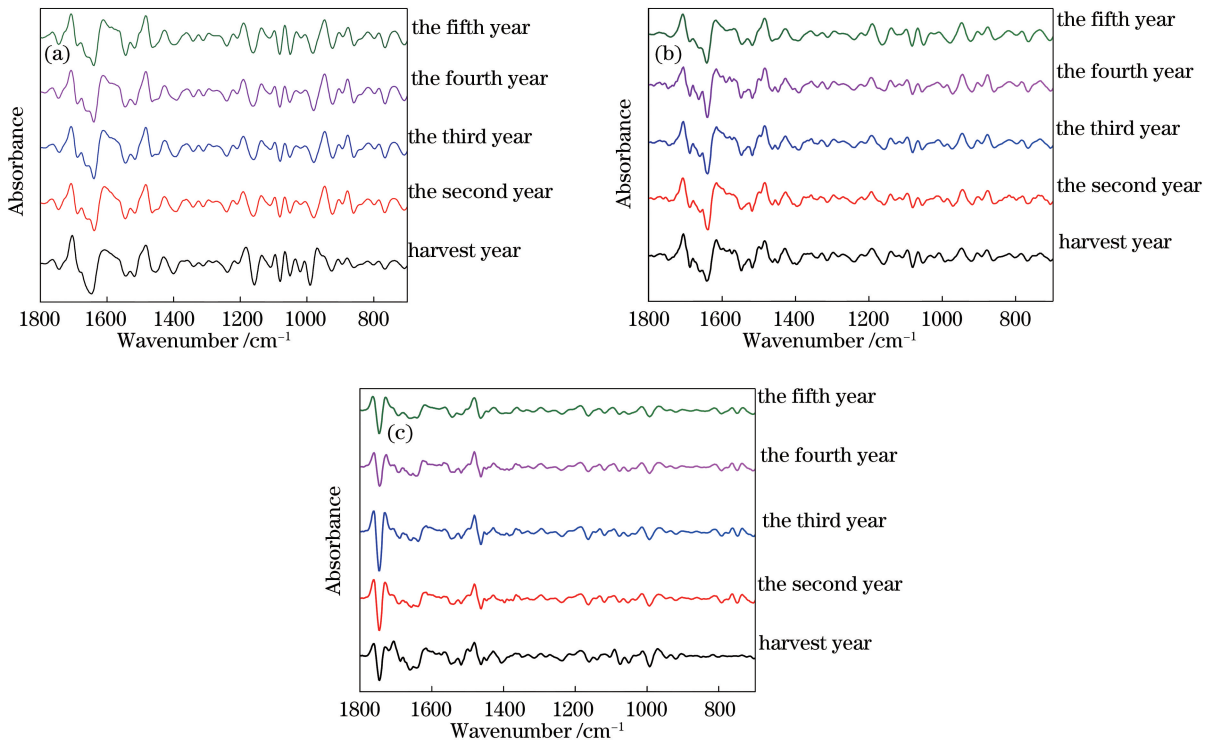
Table 1 Results for one-way analysis of variance

Absorption intensity ratio	Broad bean seeds			Red kidney bean seeds			Soybean seeds		
	Sum of square	<i>F</i> ratio	<i>P</i> value	Sum of square	<i>F</i> ratio	<i>P</i> value	Sum of square	<i>F</i> ratio	<i>P</i> value
A_{1650}/A_{2927}	0.528	4.435	0.004	0.563	21.878	0	3.677	22.238	0
A_{1650}/A_{1530}	0.559	20.386	0	0.129	26.382	0	0.214	10.717	0
A_{1650}/A_{1240}	0.839	1.726	0.161	2.844	33.921	0	1.786	11.665	0
A_{1050}/A_{2927}	0.467	6.976	0	0.208	11.869	0	0.993	28.734	0

3.3 二阶导数红外光谱分析

在原始红外光谱的基础上,通过二阶导数红外光谱提高光谱的分辨率进行区分。由图 3 可见:当年收获的蚕豆在 1680 cm^{-1} 附近出现了弱的吸收峰,而储藏第 2~第 5 年的蚕豆在 $1689, 1661\text{ cm}^{-1}$ 附近出现了两个弱的吸收峰;当年收获和储藏第 5 年的红菜豆在 1022 cm^{-1} 附近出现了弱的吸收峰,而储藏第 2~第 4 年的红菜豆在此处无吸收峰出现;当年收获的大豆在 1141 cm^{-1} 附近出现了弱吸收峰,而储藏第 2~第 4 年的大豆在此处无吸收峰;当年收获的蚕豆在 $1648, 1400, 1155, 1109, 1080, 1050, 1020, 990\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰强度比储藏

第 2~第 5 年的强;当年收获的红菜豆在 $1747, 1547, 1517, 1313, 1079\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰强度比储藏第 2~第 5 年的强;收获当年的大豆在 $1746, 1518, 1462, 1405, 1237, 1075, 1050, 992, 946, 918\text{ cm}^{-1}$ 附近的吸收峰强度比储藏第 2~第 5 年的强;不同储藏年份的蚕豆在 $1550\sim 1510\text{ cm}^{-1}$ 、 $910\sim 840\text{ cm}^{-1}$ 范围的光谱吸收峰的形状和强度不同,不同储藏年份红菜豆在 $1500\sim 1470\text{ cm}^{-1}$ 范围的光谱吸收峰的形状和强度存在差异;不同储藏年份的大豆在 $1730\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ 、 $1500\sim 1470\text{ cm}^{-1}$ 、 $1040\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的光谱吸收峰的形状和强度存在差异,据此可以对不同储藏年份的豆类种子进行区分。

图 3 不同储藏年份的 3 种豆类种子在 $1800\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 范围内的二阶导数红外光谱。

(a) 蚕豆种子; (b) 红菜豆种子; (c) 大豆种子

Fig. 3 SD-IR spectra of three kinds of legume seeds with different storage years in the range of $1800\sim 700\text{ cm}^{-1}$.

(a) Broad bean seeds; (b) red kidney bean seeds; (c) soybean seeds

3.4 二维相关红外光谱分析

二维相关红外光谱通过引入外界微扰来研究各组分基团分子振动行为的差异,将传统红外光谱信号扩展到二维上来提高光谱的分辨率,简化复杂光谱的重叠峰,提供更多的细节信息^[26]。对3种不同储藏年份的豆类种子进行二维相关红外光谱处理,得到二维相关同步谱的等高线图及自动峰图谱。

由图4(a)可以看出:在860~1690 cm^{-1} 波段范围内,当年收获的蚕豆种子的二维相关红外光谱中出现了7个强自动峰,最强峰位于1631 cm^{-1} 处,最弱峰位于1139 cm^{-1} 处,有15组较强的正交叉峰;储藏第2年的蚕豆种子的二维相关红外光谱中有8个强自动峰,最强峰位于1554 cm^{-1} 处,最弱峰位于1642 cm^{-1} 处,有7组较强的正交叉峰;与当年收获的蚕豆种子相比,储藏第2年的蚕豆种子的二维相关红外光谱在907,1141,1554 cm^{-1} 附近的自动峰强度增强,但在1643 cm^{-1} 附近的自动峰强度减弱;储藏第3年的蚕豆种子的二维相关红外光谱的自动峰和交叉峰数目不变,其位置与储藏第2年的蚕豆种子的位置相近,最强峰也在1556 cm^{-1} 附近,但最弱峰的位置变为1010 cm^{-1} ,且在1642 cm^{-1} 附近的自动峰强度减弱;储藏第4年的蚕豆种子的二维相关红外光谱中出现了2个最强自动峰(在1220,1504 cm^{-1} 附近)和11个次强自动峰,最强峰位于1220 cm^{-1} 处,最弱峰位于1049 cm^{-1} 处,有17组较强的正交叉峰;与储藏第2年和第3年的蚕豆种子比较,储藏第4年的蚕豆的二维相关红外光谱在1222,1633 cm^{-1} 自动峰附近的强度更大,但其余的自动峰强度减弱;储藏第5年蚕豆种子的二维相关红外光谱中也出现13个强自动峰,最强峰位于1560 cm^{-1} 处,最弱峰位于1375 cm^{-1} 处,出现12组较强的正交叉峰;与储藏第4年的蚕豆种子比较,储藏第5年的蚕豆种子的二维相关红外光谱在1222,1504 cm^{-1} 附近的峰强度减弱,在901,949,1137,1560,1631 cm^{-1} 附近的自动峰强度增强。

由图4(b)可以看出:在860~1690 cm^{-1} 波段范围内,当年收获的红菜豆种子的二维相关红外光谱中出现8个强自动峰,最强峰的位置为1642 cm^{-1} ,最弱峰的位置为1068 cm^{-1} ,有9组较强的正交叉峰;储藏第2年的红菜豆种子的二维相关红外光谱中有9个强自动峰,最强峰的位置为1646 cm^{-1} ,最弱峰的位置为1012 cm^{-1} ,有6组较强的正交叉峰;与当年收获的红菜豆种子相比,储藏第2年的红菜豆种子的二维相关红外光谱在1552 cm^{-1} 附近的自

动峰强度增强,在1220 cm^{-1} 附近的自动峰强度减弱;储藏第3年的红菜豆种子的二维相关红外光谱中出现了9个强自动峰,最强峰位于1633 cm^{-1} 处,最弱峰位于1370 cm^{-1} 处,有5组较强的正交叉峰;与当年收获及储藏第2年的红菜豆种子相比,储藏第3年的红菜豆种子的二维相关红外光谱在1228,1500 cm^{-1} 附近的自动峰强度增强,在1552 cm^{-1} 附近的自动峰强度强于收获当年的红菜豆种子而弱于储藏第2年的红菜豆种子;储藏第4年的红菜豆种子的二维相关红外光谱中出现了11个自动峰,最强峰的位置为1560 cm^{-1} ,最弱峰的位置为1099 cm^{-1} ,有14组较强的正交叉峰;与收获当年、储藏第2年、储藏第3年的红菜豆种子相比,储藏第4年的红菜豆种子的二维相关红外光谱中的自动峰数目增加,同时在1218,1496,1560 cm^{-1} 附近的自动峰强度增加,其余自动峰强度减弱;储藏第5年的红菜豆种子的二维相关红外光谱中的自动峰数目及位置与储藏第4年红菜豆种子的相近,最弱峰的位置变为1377 cm^{-1} ,出现了12组较强的正交叉峰,在893,943,1220 cm^{-1} 附近自动峰的强度强于当年收获、储藏第2年、储藏第3年的红菜豆种子,但在1220 cm^{-1} 附近的自动峰强度弱于储藏第4年的红菜豆种子;与储藏第4年的红菜豆种子相比,储藏第5年的红菜豆种子的二维相关红外光谱除了在1562 cm^{-1} 附近的自动峰强度增强外,其余的自动峰强度均减弱。

由图4(c)可以看出:在1350~1800 cm^{-1} 范围内,所有大豆种子的二维相关红外光谱中都出现了5个强自动峰;当年收获的大豆种子的二维相关红外光谱中的最强峰位于1556 cm^{-1} 处,最弱峰位于1410 cm^{-1} 处,有6组较强的正交叉峰;储藏第2年的大豆种子的二维相关红外光谱中出现2个最强自动峰,分别位于1550,1645 cm^{-1} 处,最弱自动峰的位置变为1413 cm^{-1} ,有5组强正交叉峰;储藏第3年的大豆种子在二维相关红外光谱中的最强自动峰位于1559 cm^{-1} 处,最弱峰位于1759 cm^{-1} 处,有2组强的正交叉峰;储藏第4年的大豆种子在二维相关红外光谱中的最强自动峰位于1555 cm^{-1} 处,最弱峰位于1408 cm^{-1} 处,有3组强正交叉峰;储藏第5年的大豆种子的二维相关红外光谱中有5组强正交叉峰。此外,由图4(c)还可以看出:不同储藏年份的大豆种子的自动峰位置有明显差异,储藏第2年的大豆种子的二维相关红外光谱在1413,1464 cm^{-1} 附近的自动峰强度弱于当年收获的大豆

种子,在 1645 cm^{-1} 附近的自动峰强度强于当年收获的大豆种子;在 1645 cm^{-1} 附近,储藏第 2 年的大豆种子二维相关红外光谱的自动峰强度最强;在 1631 cm^{-1} 附近,储藏第 5 年的大豆种子的二维相关红外光谱的自动峰强度比当年收获、储藏第 3 年、储藏第 4 年的大豆种子强;在 1751 cm^{-1} 附近,自动峰强度随着储藏年份的增加而降低;随储藏年份增加,

交叉峰数目减少。

据以上针对 3 种豆类种子二维相关红外光谱的分析可以得出,不同储藏年份的豆类种子的自动峰和交叉峰的位置、数目及强度存在显著差异,随着储藏年份增加,自动峰和交叉峰的数目减少,强度减弱。利用这一特点可以实现对不同储藏年份 3 种豆类种子的鉴别。

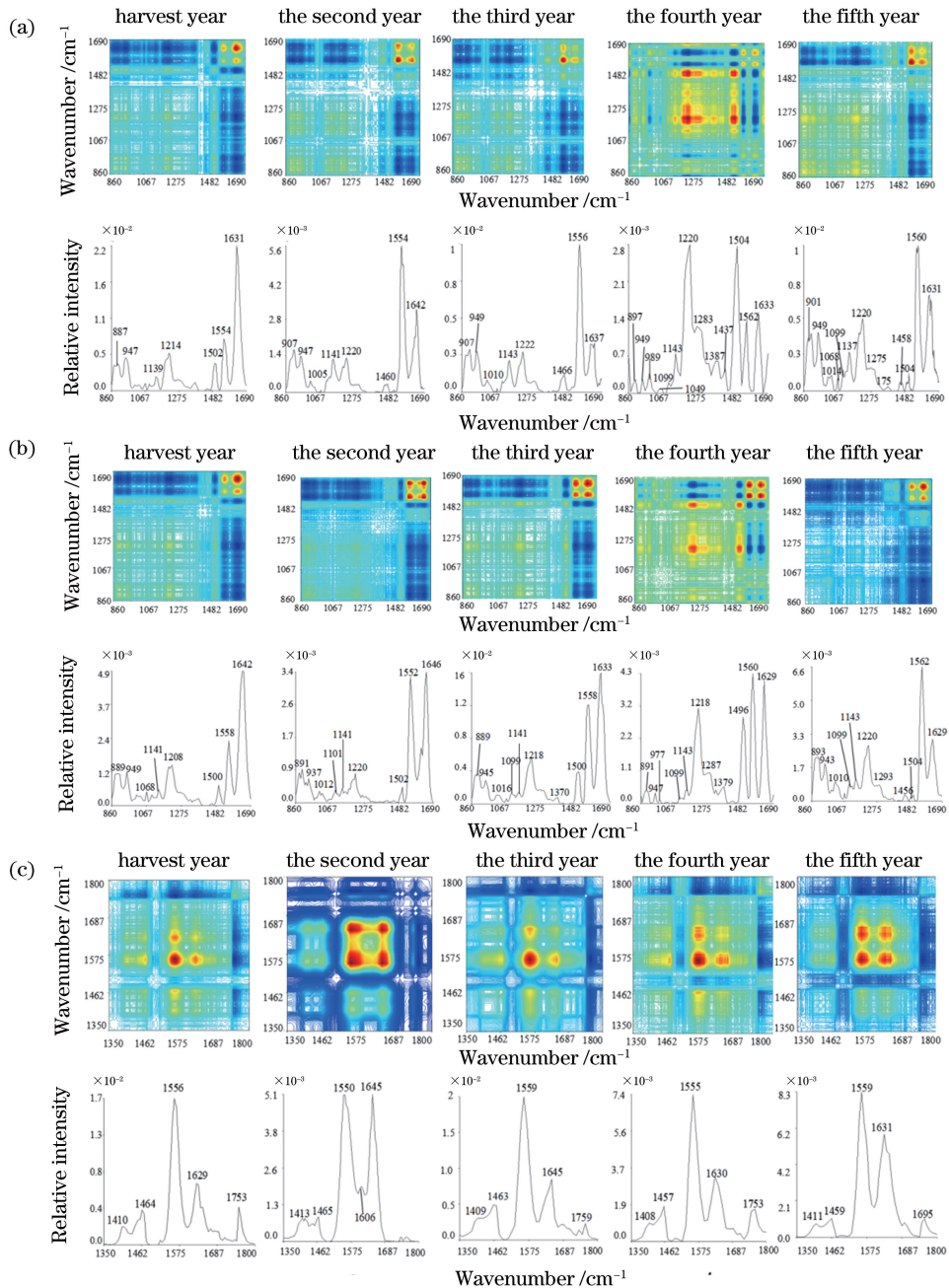


图 4 不同储藏年份的 3 种豆类种子在 $860\sim 1690\text{ cm}^{-1}$ 范围的二维相关红外光谱。

(a) 蚕豆种子; (b) 红菜豆种子; (c) 大豆种子

Fig. 4 2D-IR spectra of three kinds of legume seeds with different storage years in the range of $860\sim 1690\text{ cm}^{-1}$.

(a) Broad bean seeds; (b) red kidney bean seeds; (c) soybean seeds

3.5 偏最小二乘法分析

SIMCA 分类法是基于主成分分析的有监督模式的识别方法,它根据一组已知分类的训练集样本分别建立每一个类的主成分模型,在进行模式识别时,不同模型之间有充分的距离,所以不同模式之间存在显著差别^[27]。设光谱数据为自变量 X ,不同储藏年份的分类为因变量 Y ,对不同储藏年份的 3 种豆类种子在 $1800\sim 800\text{ cm}^{-1}$ 范围的二阶导数红外光谱进行偏最小二乘法分析。决定主成分的两个因素为 R^2_X 和 Q^2 值。 R^2 表示所提取的主成分能解释 X 变量的比例, Q^2 表示主成分能预测 X 变量的比例。一般认为 R^2_X 和 Q^2 值应大于 0.5,且越接近 1 越好^[28]。结果显示,蚕豆种子的 R^2_X 和 Q^2 值分别

为 0.913 和 0.768,红菜豆种子的 R^2_X 和 Q^2 值分别为 0.86 和 0.831,大豆种子的 R^2_X 和 Q^2 值分别为 0.805 和 0.799。由图 5 可以看出:除了第 2 年和第 5 年的个别蚕豆种子样品不能清晰地区分开,其余年份的样品均可以区分开;除了第 5 年和第 3 年的两个红菜豆种子样品的聚类有误差外,其余不同储藏年份的种子都能够很好地区分开;除了第 5 年和第 2 年的个别大豆种子样品的聚类有误差外,其余年份的样品都能够很好地区分开;3 种豆类样品在收获当年都能独自聚为一类,这表明不同储藏年份的种子的化学成分积累情况不同。

以上说明,偏最小二乘法能快速对不同储藏年份的种子进行分类。

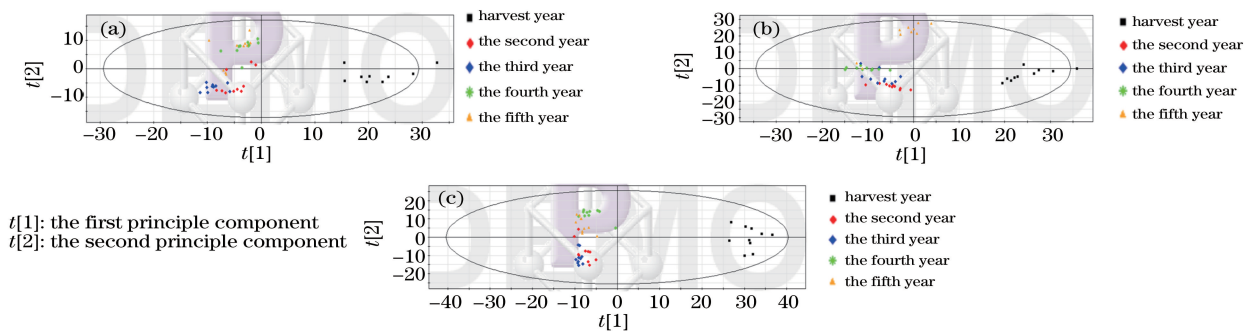


图 5 不同储藏年份的 3 种豆类种子的二阶导数光谱在 $1800\sim 800\text{ cm}^{-1}$ 范围的偏最小二乘法分析结果。

(a)蚕豆种子;(b)红菜豆种子;(c)大豆种子

Fig. 5 PLS-DA of the second derivative spectra in the range of $1800\sim 800\text{ cm}^{-1}$ for three kinds of legume seeds with different storage years. (a) Broad bean seeds; (b) red kidney bean; (c) soybean seeds

4 分析与讨论

目前,研究人员对种子老化的研究主要集中在生理生化方面。研究结果显示,在种子老化过程中,种子活力下降,发芽率、发芽势指数较低,蛋白质等合成能力下降,干重减少,形状被破坏,有毒有害物质累积^[29]。Daniel 等^[11]利用微卫星标记方式对番茄种子衰老过程中的遗传完整性进行评价,得出了番茄种子在衰老过程中遗传完整性下降这一结论。光谱技术也可用于种子的测定,如袁贝等^[30]利用 GC-MS 测定了新、陈大米中脂肪酸的含量,结果发现陈米中的多不饱和脂肪酸质量分数降低,饱和脂肪酸质量分数上升;利用电子鼻方法检测新、陈大米的气味后发现两者差异明显,利用红外光谱分析发现大米陈化后的脂肪酸特征吸收峰在 $1745, 1149, 1017\text{ cm}^{-1}$ 附近的强度明显降低。李美凌等^[31]基于高光谱图像研究了水稻种子的活力,得出了不同老化程度的水稻种子的光谱曲线有一定差异的结论。

Ambrose 等^[16]利用近红外和拉曼光谱对玉米种子的活力进行了检测,并比较了两种方法对玉米种子活力测试及分类的优劣,得出近红外光谱测试玉米种子活力优于拉曼光谱技术的结论。本课题组利用傅里叶变换红外光谱研究种子老化期间光谱的变化规律,以区分不同储藏年份的豆类种子。研究结果显示:在原始光谱中,不同储藏年份种子的几个吸收强度比随储藏年份增加总体呈下降的趋势;进一步进行方差分析后发现,不同储藏年份的种子的吸收强度比有显著差异;偏最小二乘法能快速地对不同储藏年份的种子进行分类。不同储藏年份种子的二阶导数红外光谱显示出更明显的差异,在二维相关红外光谱中,不同储藏年份的种子的自动峰和交叉峰出现的数目及强度存在显著差异,随储藏年份增加,自动峰的数目减少,强度减弱。二维相关红外光谱技术有效地揭示出老化种子之间的差异,且优于傅里叶变换红外光谱的原始红外光谱和二阶导数红外光谱。利用红外光谱三级鉴别技术鉴别自然

老化豆类种子具有简便、快速和有效的特点。但本研究样品数量有限,有必要进行深入研究,测试不同种类的样品,以探寻光谱变化的一般规律,为种子自然老化的振动光谱鉴别提供参考。

5 结 论

本课题组运用傅里叶变换红外光谱、二阶导数红外光谱和二维相关红外光谱对自然老化豆类种子进行鉴别,结果显示:3种豆类种子的原始光谱主要由蛋白质及碳水化合物的吸收峰组成,在不同储藏年份的种子的光谱中,各个吸收峰差异微小,但吸收强度比存在一定差异;方差分析显示不同储藏年份种子的吸收强度比有显著差异,偏最小二乘法能对不同储藏年份的种子进行分类。在二阶导数光谱中,不同储藏年份的种子在 $1800\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 范围内的光谱存在明显差异。二维相关红外光谱显示:不同储藏年份的3种豆类种子的自动峰和交叉峰的数量随储藏年份的增加而减少,强度随储藏年份的增加而减弱。实验结果表明,利用红外光谱技术可以对不同储藏年份的豆类种子进行简单、有效的鉴别。

参 考 文 献

- [1] Moncaleano-Escandon J, Silva B C F, Silva S R S, *et al.* Germination responses of *Jatropha curcas* L. seeds to storage and aging[J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 44: 684-690.
- [2] Chen L L, Cheng H, Zhang Y Y, *et al.* Study on viability and physiological characteristics of aohan alfalfa seeds with different storage time[J]. *Seed*, 2017, 36(3): 23-27, 32.
陈玲玲, 程航, 张阳阳, 等. 不同贮藏年限敖汉苜蓿种子活力及生理特性的研究[J]. *种子*, 2017, 36(3): 23-27, 32.
- [3] Darrudi R, Hassandokht M R, Nazeri V. Effects of moist stratification, GA3 and seed age on seed germination of *Rheum khoranicum* B. Baradaran & A. Jafari [J]. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2015, 2(4): 168-173.
- [4] Wang C, Zhou J, Jiang K, *et al.* Differences in leaf functional traits and allelopathic effects on seed germination and growth of *Lactuca sativa* between red and green leaves of *Rhus typhina* [J]. *South African Journal of Botany*, 2017, 111: 17-22.
- [5] Jugran A, Bhatt I D, Rawal R S. Characterization of agro-diversity by seed storage protein

electrophoresis: focus on rice germplasm from Uttarakhand Himalaya, India [J]. *Rice Science*, 2010, 17(2): 122-128.

- [6] Dhivya K, Vengateswari G, Arunthirumeni M, *et al.* Bioprospecting of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC seed pod extract effect on antioxidant and immune system of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2018, 101: 45-53.
- [7] Park K W, Lee B, Kim C G, *et al.* Monitoring the occurrence of genetically modified maize at a grain receiving port and along transportation routes in the Republic of Korea [J]. *Food Control*, 2010, 21(4): 456-461.
- [8] Ueno K, Ishiwa S, Nakashima H, *et al.* Regioselective and stereospecific hydroxylation of GR24 by *Sorghum bicolor* and evaluation of germination inducing activities of hydroxylated GR24 stereoisomers toward seeds of *Striga* species [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015, 23(18): 6100-6110.
- [9] Cejudo-Bastante M J, Rodriguez-Morgado B, Jara-Palacios M J, *et al.* Pre-fermentative addition of an enzymatic grape seed hydrolysate in warm climate winemaking. Effect on the differential colorimetry, copigmentation and polyphenolic profiles [J]. *Food Chemistry*, 2016, 209: 348-357.
- [10] Li J G, Li S L, Han M, *et al.* Comparative analysis of four techniques for evaluating seed viability of *Caragana korshinskii* Kom [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2015, 37(1): 15-21.
李加国, 李松林, 韩梅, 等. 4种检测柠条种子活力技术的比较分析[J]. *北京林业大学学报*, 2015, 37(1): 15-21.
- [11] Daniel I O, Adabale O W, Adeboye K A, *et al.* Evaluation of genetic integrity of tomato seeds during ageing by microsatellite markers [J]. *Nigerian Journal of Genetics*, 2014, 28(2): 29-33.
- [12] Yu H C, Liu G, Ou Q H, *et al.* Study on Chinese rose leaves by two dimensional correlation infrared spectroscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2016, 53(5): 053003.
于海超, 刘刚, 欧全宏, 等. 月季花叶片的二维相关红外光谱研究 [J]. *激光与光电子学进展*, 2016, 53(5): 053003.
- [13] Lü H R, Ou Q H, Liu G, *et al.* Study of different quality xuanwei hams by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2015, 35(s2):

s230004.

吕慧茹, 欧全宏, 刘刚, 等. 不同品质宣威火腿的傅里叶变换红外光谱研究[J]. 光学学报, 2015, 35(s2): s230004.

- [14] Qu L, Chen J B, Zhou Q, *et al.* Identification of authentic and adulterated *Aquilaria Lignum Resinatum* by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and two-dimensional correlation analysis [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2016, 1124: 216-220.
- [15] Jia S Q, An D, Liu Z, *et al.* Variety identification method of coated maize seeds based on near-infrared spectroscopy and chemometrics [J]. *Journal of Cereal Science*, 2015, 63: 21-26.
- [16] Ambrose A, Lohumi S, Lee W H, *et al.* Comparative nondestructive measurement of corn seed viability using Fourier transform near-infrared (FT-NIR) and Raman spectroscopy [J]. *Sensors and Actuators B: Chemica*, 2016, 224: 500-506.
- [17] Lu Y Z, Du C W, Yu C B, *et al.* Classifying rapeseed varieties using Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy (FTIR-PAS) [J]. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2014, 107: 58-63.
- [18] Kandpal L M, Lohumi S, Kim M S, *et al.* Near-infrared hyperspectral imaging system coupled with multivariate methods to predict viability and vigor in muskmelon seeds [J]. *Sensors and Actuators B*, 2016, 229: 534-544.
- [19] Ambrose A, Kandpal L M, Kim M S, *et al.* High speed measurement of corn seed viability using hyperspectral imaging [J]. *Infrared Physics & Technology*, 2016, 75: 173-179.
- [20] Chen X D, Keong C Y, Mei X L, *et al.* Determination of chemical changes in *Isatis indigotica* seeds carried after Chinese first spaceship with FTIR and 2D-IR correlation spectroscopy [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014, 124: 528-534.
- [21] Li H M, Liu G, Ou Q H, *et al.* Analysis of eight bean species by two-dimensional correlation infrared spectroscopy [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2016, 53(3): 033003.
李会梅, 刘刚, 欧全宏, 等. 8种豆的二维相关红外光谱的分析[J]. 激光与光电子学进展, 2016, 53(3): 033003.
- [22] Yan R, Chen J B, Sun S Q, *et al.* Rapid identification of *Lonicerae japonicae* Flos and *Lonicerae Flos* by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and two-dimensional correlation analysis [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2016, 1124: 110-116.
- [23] Holse M, Larsen F H, Hansen Å, *et al.* Characterization of marama bean (*Tylosema esculentum*) by comparative spectroscopy: NMR, FT-Raman, FT-IR and NIR [J]. *Food Research International*, 2011, 44(1): 373-384.
- [24] Plans M, Simó J, Casañas F, *et al.* Characterization of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by infrared spectroscopy: comparison of MIR, FT-NIR and dispersive NIR using portable and benchtop instruments [J]. *Food Research International*, 2013, 54(2): 1643-1651.
- [25] Liu W T, Li P, Li D H, *et al.* Design of data processing system about analysis of variance [J]. *Computers and Applied Chemistry*, 2015, 32(5): 583-586.
刘伟涛, 李萍, 李德豪, 等. 方差分析数据处理系统的设计[J]. 计算机与应用化学, 2015, 32(5): 583-586.
- [26] Xiang L, Wang J J, Zhang G J, *et al.* Analysis and identification of two similar traditional Chinese medicines by using a three-stage infrared spectroscopy: *Ligusticum chuanxiong*, *Angelica sinensis* and their different extracts [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2016, 1124: 164-172.
- [27] Yang T W, Li T, Li J Q, *et al.* Study on the discrimination of *Boletus edulis* from different years and origins with FTIR [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2016, 36(7): 2117-2123.
杨天伟, 李涛, 李杰庆, 等. 不同年份和产地美味牛肝菌的红外光谱鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(7): 2117-2123.
- [28] Li S H, Pan X B, Ren Z, *et al.* PLS analysis of FT-IR spectrum of *Angelica sinensis* at different growth stages [J]. *China Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2013, 19(12): 132-135.
李四海, 潘新波, 任真, 等. 不同生长期当归红外光谱的偏最小二乘分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 132-135.
- [29] Sun C Y, Chen X, Zhang Z P, *et al.* Effects of seed aging on the quality of wheat seeds [J]. *Seed*, 2015, 34(8): 88-90.
孙常玉, 陈晓, 张志鹏, 等. 种子老化对小麦种子品质的影响[J]. 种子, 2015, 34(8): 88-90.
- [30] Yuan B, Shao L L, Zhang C D, *et al.* Analysis on

different quality characteristics between aged and fresh rice based on various analysis methods [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2016, 31(8): 1-5, 29.

袁贝, 邵亮亮, 张春丹, 等. 基于多种分析方法解析新陈大米品质特性[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(8): 1-5, 29.

[31] Li M L, Deng F, Liu Y, *et al.* Study on detection technology of rice seed vigor based on hyperspectral image[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2015, 27(1): 1-6.

李美凌, 邓飞, 刘颖, 等. 基于高光谱图像的水稻种子活力检测技术研究[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(1): 1-6.