

doi:10.3788/gzxb20154409.0930001

玉米花粉中营养物质的傅里叶变换红外光谱特征

时有明¹, 李栋玉¹, 易时来²

(1 曲靖师范学院 物理与电子工程学院, 云南 曲靖 655011)

(2 西南大学—中国农业科学院 柑桔研究所, 重庆 400712)

摘 要: 为了研究玉米花粉中的蛋白质和多糖等营养物质, 采用傅里叶变换红外光谱结合曲线拟合技术分析曲辰 9 号和靖丰 3 号两种杂交玉米花粉。玉米花粉的傅里叶变换红外光谱显示蛋白质的特征吸收峰酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带出现在 $1\ 653\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 546\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 241\ \text{cm}^{-1}$ 附近, 多糖特征吸收峰出现在 $1\ 078\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 056\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1\ 030\ \text{cm}^{-1}$ 和 $995\ \text{cm}^{-1}$ 附近。对比它们的傅里叶变换红外光谱的蛋白质和多糖特征吸收带, 两种玉米花粉存在一定差异, 表明它们所含的蛋白质和多糖含量不同。对 $1\ 900\sim 950\ \text{cm}^{-1}$ 吸收带实施傅里叶自去卷积和二阶导数处理后再进行曲线拟合分析, 剥离出因光谱叠加而掩盖的特征吸收子峰。子峰信息显示曲辰 9 号玉米花粉中多糖的含量高于靖丰 3 号玉米花粉, 而蛋白质的含量关系则相反。研究表明, 傅里叶变换红外光谱技术可为玉米花粉中营养物质的研究提供一种便捷的手段。

关键词: 光谱学; 傅里叶变换红外光谱; 曲线拟合; 玉米花粉; 蛋白质; 多糖

中图分类号: O433.4

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2015)09-0930001-5

Discrimination and Characterization of Nutrient Substance in Corn Pollen Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy

SHI You-ming¹, LI Dong-yu¹, YI Shi-lai²

(1 College of Physics and Electronic Engineering, Qujing Normal University, Qujing, Yunnan 655011, China)

(2 Citrus Research Institute, Southwest University-Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: To investigate the protein, polysaccharide and other nutrient substance in corn pollen, Fourier transform infrared spectroscopy combined with curve-fitting analysis was used to investigate two species of hybrid corn pollen, which called Quchen-9 and Jingfeng-3. The Fourier transform infrared spectra of corn pollen presented the characteristic absorption bands of protein and polysaccharide obviously. The peaks at $1\ 653\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 546\ \text{cm}^{-1}$ and $1\ 241\ \text{cm}^{-1}$ were assigned to amide-I band, amide-II band and amide-III band respectively, which come from protein of corn pollen. The peaks at $1\ 078\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 056\ \text{cm}^{-1}$, $1\ 030\ \text{cm}^{-1}$ and $995\ \text{cm}^{-1}$ were characteristic absorption bands of pollen polysaccharide. Compared with these characteristic absorption bands at the spectra of Quchen 9 and Jingfeng 3, there were obvious differences between the two species of corn pollen. It indicated that the concentration of protein and polysaccharide in corn pollen had difference between the species of Quchen-9 and Jingfeng-3. Fourier self-deconvolution and second derivative of the $1\ 900\sim 950\ \text{cm}^{-1}$ band was followed by curve-fitting analysis to generate the underlying multi-component peaks. The relative area percentages of multi-component peaks showed that the polysaccharide content in the corn pollen of Quchen-9 was higher than that of the Jingfeng-3. However, the relationship of protein content was reverse. The present results suggest that Fourier transform infrared spectroscopy is a promising method to identify nutrient substance

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (No. 2012AA101904)、云南省应用基础研究项目 (No. 2013FZ111) 和云南省教育厅重点科研项目 (No. 2011Z012) 资助

第一作者: 时有明 (1982-), 男, 副教授, 硕士, 主要研究方向为生物光谱学。Email: sym8295@163.com

收稿日期: 2015-04-27; 录用日期: 2015-06-23

<http://www.photon.ac.cn>

in corn pollen.

Key words: Spectroscopy; Fourier transform infrared spectroscopy; Curve fitting; Corn pollen; Protein; Polysaccharide

OCIS Codes: 300.6170; 300.6300; 300.6340; 300.6390; 300.1030

0 引言

玉米花粉是禾本科玉蜀黍属植物玉蜀黍的雄性生殖细胞,呈现为直径 80 μm 左右的椭圆形或圆形形状.花粉中的蛋白质和多糖具有较大的药用和食用价值,成为人们关注的热点^[1].近年随着杂交玉米育种技术的不断发展,大量杂交玉米品种育种成功.不同品种的杂交玉米花粉中蛋白质、多糖营养物质的含量存在差异,因此对玉米花粉中营养物质含量的研究具有一定的意义.

目前研究花粉中蛋白质和多糖含量采用的主要方法有质谱、高效液相色谱等^[2].这些方法可以获得精确的结果,但在测量时需要将玉米花粉进行一系列的生化处理,从而破坏了蛋白质、多糖等营养成分的分子结构,且存在测试成本高和过程复杂等问题.傅里叶变换红外光谱(Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)是利用波数在 4 000~400 cm^{-1} 范围内的光与生物样品相互作用,获取生物样品的分子结构信息,是一种物理分析方法,相对于化学和生物的分析方法,测试过程简单、测试成本低廉并对生物样品无损^[3-5].傅里叶变换红外光谱技术在蛋白质和多糖研究领域的应用较为成熟,蛋白质和多糖的傅里叶变换红外光谱具有自己独特的指纹特征^[6-7].玉米花粉是多种营养成分组成的复杂体系,它的傅里叶变换红外光谱由各营养组分的红外吸收叠加而成,因此蛋白质和多糖的特征吸收峰信息被掩盖.本文采用光谱剥离的方法对严重叠加的玉米花粉光谱进行曲线拟合分析,确定蛋白质和多糖在玉米花粉光谱中的特征吸收带,比较两种杂交玉米花粉中蛋白质和多糖的含量.

1 材料与方法

1.1 样品采集与光谱测试

将云南珠江种业有限公司培育的靖丰 3 号和云南曲辰种业有限公司培育的曲辰 9 号两种杂交玉米分别春播在田间,保证相同的光照、气候等生长条件,在盛花期采用雄穗套袋方法采集花粉.花粉样品获得后在 35 $^{\circ}\text{C}$ 气温下干燥 48 h.用电子天平分别称量花粉与溴化钾,按 2 : 250 比例放入玛瑙研钵混合进行研磨,然后压片测试,获得样品的傅里叶变换红外光谱.同一种玉米花粉样品随机取样三次测试,三次测试的光谱偏相关系数均大于 0.99,表明实验具有可重复性.

1.2 仪器参量与数据处理

Avatar FTIR 360 傅里叶变换红外光谱仪用于获

取光谱,红外光谱测试范围为 4 000~400 cm^{-1} ,光谱分辨率为 2 cm^{-1} .采用 Omnic 8.2 软件对获得的光谱进行吸光度归一化、基线校正和平滑处理,消除每次样品压片厚度不一样对定量分析的影响.二阶导数光谱处理过程中采用 Savitsky-Golay 平滑方法,平滑数据点阈值选用 3 点. Voigt 函数模型被用于模拟叠加子峰峰形.曲线拟合完成后,拟合光谱与原始光谱的偏相关系数大于 0.996,表明拟合效果较好.

2 结果与分析

2.1 两种玉米花粉的傅里叶变换红外光谱特征

曲辰 9 号和靖丰 3 号杂交玉米花粉的傅里叶变换红外光谱见图 1.它们光谱中 3 700~3 000 cm^{-1} 是羟基和氨基的叠加吸收区,玉米花粉的吸收峰出现在 3 365 cm^{-1} 附近,吸收较强. 2 930 cm^{-1} 和 2 856 cm^{-1} 来源于甲基的振动吸收.曲辰 9 号玉米花粉的光谱在 1 734 cm^{-1} 出现明显的肩峰,此吸收峰来源于酯类羰基振动吸收.靖丰 3 号玉米花粉的红外光谱在此位置也有出现肩峰的趋势,但受其他吸收峰的叠加影响较大,肩峰没有曲辰 9 号光谱中的明显.该吸收峰说明在花粉里含有少量的脂类物质. 1 652 cm^{-1} 附近的吸收峰是蛋白质的酰胺 I 带的特征吸收峰,来源于 C=O 的伸缩振动. 1 545 cm^{-1} 是酰胺 II 带的振动吸收,归属为 N-H 的弯曲振动和 C-N 的伸缩振动.另外蛋白质还在 1 240 cm^{-1} 附近出现酰胺 III 带特征吸收峰,归属于 C=N 和 N-H 的伸缩振动^[8].酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带三个特征吸收峰的存在说明了玉米花粉中含有一定量的蛋白质. 1 200~700 cm^{-1} 范围的红外光谱主要来源于玉米花粉中多糖类物质的吸收,在该范围主要出现 1 080 cm^{-1} 、1 050 cm^{-1} 、923 cm^{-1} 、

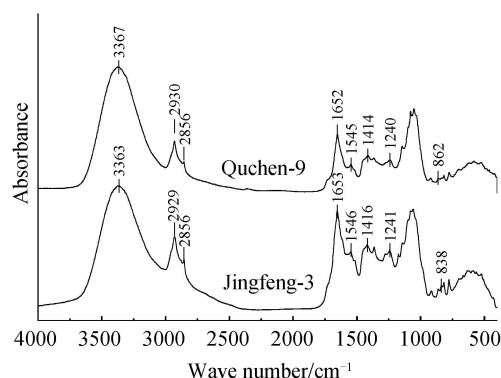


图 1 曲辰 9 号和靖丰 3 号两种玉米花粉的傅里叶变换红外光谱

Fig. 1 The Fourier transform infrared spectra of Quchen-9 and Jinfeng-3 species of corn pollens

862 cm^{-1} 、836 cm^{-1} 、818 cm^{-1} 和 777 cm^{-1} 吸收峰. 在 1 080 cm^{-1} 和 1 050 cm^{-1} 附近的特征吸收峰表明了葡聚糖的存在, 分别归属为 C—O 和 C—C 的伸缩振动, 923 cm^{-1} 和 836 cm^{-1} 附近的吸收峰是 α -型糖苷键的指纹吸收峰^[9]. β -型糖苷键的指纹吸收峰出现在 890 cm^{-1} 附近, 而玉米花粉光谱中该峰不明显, 说明玉米花粉中葡聚糖主要是 α -型多糖^[10]. 从玉米花粉红外光谱中可看出, 蛋白质和多糖物质的吸收峰较强, 特征区和指纹区主要以它们的吸收峰为主, 表明花粉中含有大量的蛋白质和多糖.

2.2 玉米花粉中蛋白质和多糖含量的曲线拟合

蛋白质和多糖是玉米花粉作为保健品的关键营养物质, 曲辰 9 号和靖丰 3 号杂交玉米花粉的傅里叶变换红外光谱均明显反映出它们含有大量的蛋白质和多糖, 具体反映在酰胺 I 带 (1 652 cm^{-1}) 和多糖吸收带 (1 050 cm^{-1}) 的强吸收. 同时傅里叶变换红外光谱也显示出这两种杂交玉米花粉所含的蛋白质和多糖含量存在一定的差异. 在曲辰 9 号玉米花粉的光谱中酰胺 I 带 (1 652 cm^{-1}) 和多糖吸收带 (1 051 cm^{-1}) 的吸光度之比 A_{1652}/A_{1051} 等于 0.694, 而靖丰 3 号玉米花粉的光谱中酰胺 I 带 (1 653 cm^{-1}) 和多糖吸收带 (1 054 cm^{-1}) 的吸光度之比 A_{1653}/A_{1054} 等于 0.977. 这反映出两种杂交玉米花粉中蛋白质和多糖的含量比例存在差异. 玉米花粉的红外光谱中蛋白质和多糖在特征区和指纹区叠加严重, 为了进一步分析两种玉米花粉中蛋白质和多糖的含量比例, 需要对它们光谱中的蛋白质和多糖的叠加区进行光谱剥离.

玉米花粉的傅里叶变换红外光谱中 4 000~1 900 cm^{-1} 主要是氨基、羟基、甲基、亚甲基等的混合吸收, 950~400 cm^{-1} 吸收带指纹特征较明显, 但吸收较弱. 因此 1 900~950 cm^{-1} 吸收带成为分析花粉所含营养物质的关键吸收带. 该吸收带包含了红外光谱的特征区和指纹区, 玉米花粉中的营养物质在该范围会出现一定的特征吸收, 特别是蛋白质和多糖在该范围吸收较为明显. 光谱剥离时先对 1 900~950 cm^{-1} 吸收带进行傅里叶自去卷积和二阶导数运算, 从而得出该范围参与叠加子峰的波数位置和叠加子峰的个数, 然后进行曲线拟合运算.

对于红外吸收光谱而言, 光谱曲线上某点的一阶导数反映的是这一点切线的斜率, 峰尖、峰谷和肩峰对应的一阶导数等于零. 而在剥离红外吸收光谱的叠加带时, 寻找的是峰尖和肩峰的波数位置, 因此一阶导数光谱无法排除波谷的波数位置. 光谱曲线上某点的二阶导数则是描述该处在原始光谱中极值的情况. 通过

数学知识可知, 二阶导数取到极小值的波数位置对应的是原始光谱中的峰尖和肩峰的波数位置. 因此在看二阶导数谱时, 观察的是波谷的位置. 依次对红外光谱曲线上各点求二阶导数, 连成曲线便是二阶导数光谱. 红外光谱的信噪比对二阶导数光谱有一定影响, 因此并不是每一个峰谷位置都是真实的子峰位置^[11]. 傅里叶自去卷积光谱数据处理技术主要用于增强红外光谱的分辨能力, 将重叠的子峰位置显示出来. 但是傅里叶自去卷积的结果受到叠加子谱带宽度和分辨增强因子这两个因素影响, 运算过程中需要分析者凭经验确定这两个参量的大小, 因此去卷积的结果具有一定的人为因素^[12]. 为了检验傅里叶自去卷积的结果是否正确, 需要通过光谱曲线的二阶导数光谱来验证. 傅里叶自去卷积光谱中峰尖表示叠加子峰的波数位置, 二阶导数光谱中峰谷对应叠加子峰的波数位置. 傅里叶自去卷积光谱和二阶导数光谱相结合, 既弥补了对方的缺点, 又达到了相互检验的目的.

如果在某波数位置附近 (偏差范围 3 cm^{-1}) 同时出现傅里叶自去卷积光谱的峰尖和二阶导数光谱的峰谷, 说明该波数就是子峰的频率位置. 二阶导数光谱的峰谷和傅里叶自去卷积光谱的峰尖一一对应, 但峰尖和峰谷的波数位置不是绝对相等. 因为子峰的波数位置是通过两种不同方法来确定的, 两者误差在 3 cm^{-1} 内, 因此子峰的波数位置取两者的平均值. 在拟合的光谱范围内逐一寻找峰尖和峰谷的对应关系, 一组对应关系就有一个子峰, 通过该方法来确定子峰个数. 图 2 反映出靖丰 3 号杂交玉米花粉的傅里叶变换红外光谱剥离时, 通过傅里叶自去卷积光谱和二阶导数光谱相结合确定子峰位置和个数. 图 2 仅选取 1 900~

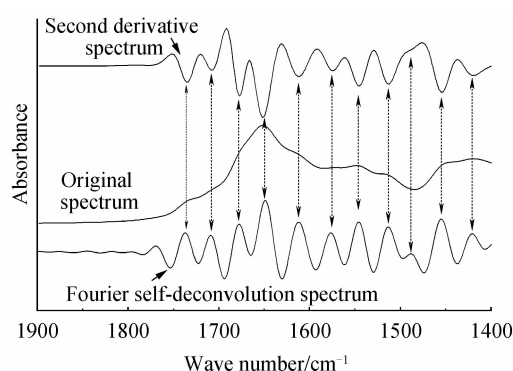


图 2 二阶导数光谱与傅里叶自去卷积光谱相结合确定叠加子峰的波数位置
Fig. 2 Determine the wave number of multi-component peaks by second derivative spectrum combined with Fourier self-deconvolution spectrum.

1 400 cm^{-1} 来说明二者相结合确定叠加子峰的方法,如果展示 1 900~950 cm^{-1} 整个谱带数据,子峰个数较多,相互叠加,不利于观察峰尖和峰谷的对应检验关系.图 2 中 1 490 cm^{-1} 附近,二阶导数光谱显示肩峰,不能确定其峰谷的准确位置,但通过傅里叶自去卷积光谱的峰尖清楚地指出了该子峰的波数位置.

玉米花粉是由各种营养物质组成的一个混合体系,因此其傅里叶变换红外光谱是来自各组分红外吸收的叠加.根据朗伯-比尔定律,组分的特征吸收带强度和组分在混合体系中的含量成正比.分析蛋白质和多糖子峰占整个吸收带面积的比例,可以反映它们在玉米花粉中的含量比例关系^[13-16].结合二阶导数光谱与傅里叶自去卷积光谱,确定叠加子峰的位置和个数.蛋白质和多糖的子峰位置与它们的特征吸收峰位置吻合度好,偏差均小于 3 cm^{-1} .用 Omnic 8.2 软件完成曲线拟合工作.曲线拟合运算后,从 1 900~950 cm^{-1} 吸收带分离出参与叠加的子峰,并获得各个子峰的面积、峰高和频率位置等相关参量.选用相同拟合参量对曲辰 9 号和靖丰 3 号杂交玉米花粉的光谱在蛋白质和多糖吸收特征区(1 900~950 cm^{-1})的曲线进行拟合,结果见图 3.蛋白质和多糖的吸收子峰从严重叠加的谱带中剥离出来,1 078 cm^{-1} 、1 056 cm^{-1} 、1 030 cm^{-1} 和 995 cm^{-1} 附近的子峰来源于多糖吸收.酰胺 I 带(1 653 cm^{-1})、酰胺 II 带(1 546 cm^{-1})和酰胺 III 带(1 241 cm^{-1})附近的吸收来源于蛋白质,1 735 cm^{-1} 附近的吸收来源于酯类羰基的吸收.

表 1 叠加子峰面积与叠加带面积之比间接反映蛋白质和多糖在玉米花粉中所占比例
Table 1 The relative ratios of multi-component peak area and the overlapped band area as a means to indirectly determine the content of protein and polysaccha

Corn specie	Curve-fitting analysis		Multi-component peaks							
	Wave number/ cm^{-1}	Area/%	995	1 030	1 056	1 078	1 241	1 546	1 653	1 735
Quchen-9	Wave number/ cm^{-1}									
	Area/%	3.91	12.07	6.62	4.82	4.49	2.94	7.71	0.89	
Jingfeng-3	Wave number/ cm^{-1}									
	Area/%	3.05	8.83	5.73	4.86	5.76	3.50	8.95	0.93	

玉米花粉的光谱拟合结果见表 1(Area 表示该子峰面积在叠加带总面积中所占的比例),曲辰 9 号玉米花粉的多糖吸收子峰面积比大于靖丰 3 号,尤其以 1 030 cm^{-1} 附近的吸收子峰最为明显.而在蛋白质的酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带特征吸收子峰上情况刚好相反.曲辰 9 号玉米花粉光谱中,1 078 cm^{-1} 、1 056 cm^{-1} 、1 030 cm^{-1} 和 995 cm^{-1} 子峰在 1 900~950 cm^{-1} 吸收带所占的比例是 27.42%,酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带特征吸收子峰占的比例是 15.14%,而靖丰 3 号分别是 22.47% 和 18.21%.这说明曲辰 9 号玉米花粉中多糖含量高于靖丰 3 号玉米花粉,而蛋白质含量则是靖丰 3 号玉米花粉高于曲辰 9 号玉米花粉.两种杂交玉米在 1 735 cm^{-1} 附近酯类羰基的特征吸收子峰均较弱,面积比分别为 0.89% 和

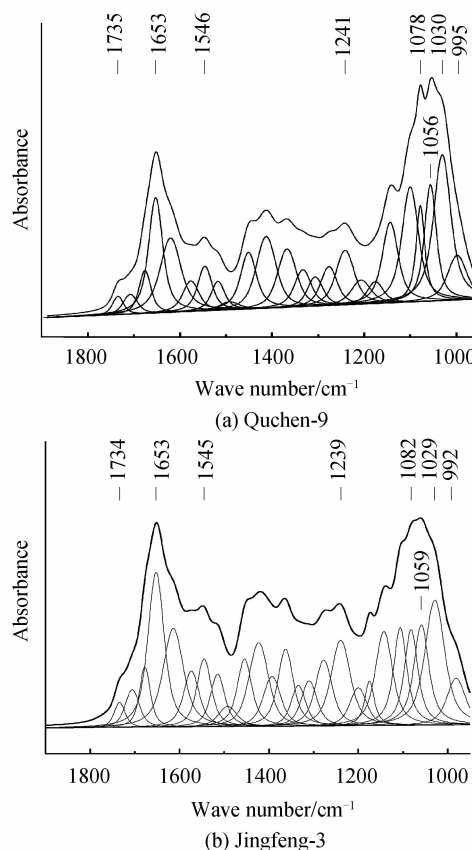


图 3 曲线拟合分析对两种玉米花粉的光谱在 1 900~950 cm^{-1} 范围内进行光谱剥离,获得 26 个叠加子峰
Fig. 3 Curve-fitting analysis of the spectral of species at range of 1 900~950 cm^{-1} with 26 multi-component peaks

0.93%,表明它们所含酯类物质无明显差异,且酯类物质在玉米花粉中含量较少.

3 结论

本文采用傅里叶变换红外光谱的特征吸收带检测两种杂交玉米花粉的蛋白质和多糖含量.通过对 1 900~950 cm^{-1} 吸收带的曲线拟合处理,分析多糖的主要吸收子峰和蛋白质酰胺带的特征吸收子峰在拟合范围内的面积比,得出多糖和蛋白质在玉米花粉中的含量高低关系.曲线拟合结果显示曲辰 9 号玉米花粉中多糖的含量高于靖丰 3 号玉米花粉,而蛋白质含量情况则相反.傅里叶变换红外光谱技术结合曲线拟合分析可以快速、无损地反映出玉米花粉中这两种营养物质的含量差异,为玉米花粉的开发利用提供一定的

依据.

参考文献

- [1] 张浩. 玉米花粉抗辐射有效组分筛选及组成分析[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2012.
- [2] LV Huan-huan, WANG Xiao-yan, HE Yan-feng, *et al.* Identification and quantification of flavonoid aglycones in rape bee pollen from Qinghai-Tibetan Plateau by HPLC-DAD-APCI/MS[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, **38**(3): 49-54.
- [3] CHEN Nai-dong, CHEN Han, LI Jun, *et al.* Discrimination and similarity evaluation of tissue-cultured and wild *Dendrobium* species using Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2015, **1086**(4): 255-265.
- [4] ROHAETI E, RAFI M, SYAFITRI U D, *et al.* Fourier transform infrared spectroscopy combined with chemometrics for discrimination of *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza* and *Zingiber cassumunar*[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, **137**(4): 1244-1249.
- [5] BARBARA H S. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications[M]. New York: John Wiley and Sons Ltd., 2004.
- [6] GUERRERO P, KERRY J P, CABA K D. FTIR characterization of protein-polysaccharide interactions in extruded blends[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, **111**(10): 598-605.
- [7] ZHAO Zhan-yi, HUANGFU Long-tao, DONG Lu-lu, *et al.* Functional groups and antioxidant activities of polysaccharides from five categories of tea[J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, **58**(7): 31-35.
- [8] CHEN Xiang-yan, RU Yi, CHEN Feng-liang, *et al.* FTIR spectroscopic characterization of soy proteins obtained through AOT reverse micelles[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, **31**(2): 435-437.
- [9] TIAN Zhen-hua, WU Kun, LIU Wen-tao, *et al.* Two-dimensional infrared spectroscopic study on the thermally induced structural changes of glutaraldehyde-crosslinked collagen[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, **140**(4): 356-363.
- [10] GARIP S, GOZENO A C, SEVERCAN F. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates[J]. *Food Chemistry*, 2009, **113**(8): 1301-1307.
- [11] 翁诗甫. 傅里叶变换红外光谱仪[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.
- [12] 胡皆汉, 郑学仿. 实用红外光谱学[M]. 北京:科学出版社, 2011.
- [13] JEFF I B, YUAN Xia-wen, SUN Lin, *et al.* Purification and in vitro anti-proliferative effect of novel neutral polysaccharides from *Lentinus edodes* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, **52**(1): 99-106.
- [14] LIN S Y, HSU C H, SHEU M T. Curve-fitting FTIR studies of loratadine/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex induced by co-grinding process [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, **53**(3): 799-803.
- [15] WANG Xin, SHENG Da-ping, ZHU Zheng-jie, *et al.* Identification of Cortex *Eucommiae* from different producing areas by FTIR microspectroscopy[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, **141**(8): 94-98.
- [16] YU Pei-qiang. Molecular chemistry of plant protein structure at a cellular level by synchrotron-based FTIR spectroscopy: Comparison of yellow (*Brassica rapa*) and Brown (*Brassica napus*) canola seed tissues [J]. *Infrared Physics & Technology*, 2008, **51**(5): 473-481.

Foundation item: The National High Technology Research and Development Program (No. 2012AA101904), the Applied Basic Research Program of Yunnan Province, China (No. 2013FZ111) and the Key Research Foundation of Education Bureau of Yunnan Province, China (No. 2011Z012)