

六种蜂花粉的红外光谱三级鉴别研究

吴杰^{1,3}, 周群², 吴黎明¹, 安建东¹, 孙素琴^{2*}, 胡福良³

1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093

2. 清华大学化学系生命有机磷化学及化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084

3. 浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310029

摘要 采用傅里叶变换红外光谱(FTIR)结合二阶导数谱和热扰动下的二维相关红外光谱技术对6种不同花粉,即杏花花粉、油菜花粉、茶花粉、西瓜花粉、荷花花粉和虞美人花粉,进行了快速无损的鉴别。结果表明,在一维红外光谱图上,不同花粉的蛋白质、脂肪和糖类物质的特征吸收峰在相对峰强和峰位上均存在一定的差异,在二阶导数谱上差异很明显。而在二维红外谱图上,由于6种花粉的自动峰及相关峰簇的位置和数量不同,其差别体现得更为明显和直观。因此,三级红外宏观指纹图谱法是鉴别不同蜂花粉种类的一种有效和快速检测方法。

关键词 蜂花粉; 红外光谱; 二维相关红外光谱; 鉴别

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)02-0353-05

引言

蜂花粉是由蜜蜂从蜜源植物花朵中采集,混入花蜜和分泌物后加工而成的不规则团状物^[1],其营养成分非常复杂,含有脂肪、碳水化合物、蛋白质、氨基酸、维生素、类胡萝卜素、类黄酮和色素等^[2],素有“浓缩的营养库”之称^[3]。目前,蜂花粉及其制品因其丰富的营养已成为人们所广泛接受的一种辅助保健食品^[3-5]。

蜂花粉的种类很多,一般按照植物来源分类。不同花粉之间营养成分和生物学功能均存在一定差别^[2,6,7],且因所含色素不同,其颜色也存在较大差异。卫生部也仅将油菜花粉等8种花粉列入了“作为普通食品管理的食品新资源名录”。为了对蜂花粉的植物来源进行区分,有效评价花粉的营养和生物学功效,更好规范花粉的生产、加工和流通环节,有必要建立一种快速、准确判断花粉品种的方法。目前鉴别花粉品种的主要方法为感官判断和显微镜镜检,主观性强,准确性低。

傅里叶变换红外光谱法(FTIR)和二维相关红外光谱技术具有宏观整体鉴定复杂体系以及无损快速的特点,已被广泛的应用于药用动植物等领域的真伪、优劣鉴别,一些易混淆动植物种类的快速区分等^[8]。本文利用基于二维相关红外

光谱技术的三级红外宏观指纹图谱法对6种不同植物来源的花粉进行了无损快速鉴别,分析结果印证了该法具有指纹性好、简便、快捷等特点,能够用于花粉品种的准确鉴别。

1 实验部分

1.1 仪器

红外光谱仪为Perkin Elmer公司的Spectrum GX型傅里叶变换红外光谱仪,光谱范围4000~400 cm⁻¹,中红外DTGS检测器,光谱分辨率为4 cm⁻¹,扫描信号累加32次。扫描时扣除H₂O和CO₂的干扰。

变温附件为北京市朝阳区自动化仪表厂的CKW-II型程序升温仪。控温范围为50~120℃。升温速度为2℃·min⁻¹。

1.2 样品来源与处理

油菜花粉、茶花粉、西瓜花粉、杏花花粉、荷花花粉、虞美人花粉分别采自相应主产区蜜源植物大量开花时,采集蜂种为意大利蜜蜂,单一花粉率大于95%。花粉采用日光干燥法干燥,密封后在4℃保存。

实验前分别称取1 kg,利用高速粉碎机粉碎,混合均匀后过100目筛。取花粉样品约3 mg与溴化钾200 mg混合,压片后用于红外光谱分析。

1.3 数据处理

收稿日期: 2009-03-10, 修订日期: 2009-06-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771636)和现代农业(蜂)产业技术体系岗位科学家科研经费项目资助

作者简介: 吴杰, 1962年生, 中国农业科学院蜜蜂研究所研究员

*通讯联系人 e-mail: sunsq@tsinghua.edu.cn; apiswuwu@126.com

二阶导数谱的获得采用 Perkin-Elmer 公司的 Spectrum v3.02 操作软件, 平滑点数为 13。

二维相关红外光谱图的获得采用清华大学分析中心红外光谱组自行设计的二维相关分析软件。

2 结果与讨论

2.1 6 种花粉的一维红外谱图比较

由于几种花粉都含有大量的蛋白质、糖类物质和一些油脂, 在红外谱图上均体现了明显的特征峰。其中, 脂类物质的特征为在 2926 和 2855 cm^{-1} 附近出现的强而尖锐的亚甲基伸缩振动的吸收峰, 以及 1740 cm^{-1} 附近的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰, 在 1240 cm^{-1} 附近出现的与脂类化合物的 $\text{C}=\text{O}$ 振动以及核酸的磷氧伸缩振动相关的谱峰也说明了花粉中脂类化合物的大量存在; 蛋白质的特征为分别位于 1650 和 1550 cm^{-1} 附近的酰胺 I 带 $\text{C}=\text{O}$ 吸收峰和酰胺 II 带 $\text{N}-\text{H}$ 和 $\text{C}-\text{N}$ 吸收峰; 位于 1054 cm^{-1} 附近的 $\text{C}=\text{O}$ 振动特征峰和 930 至 770 cm^{-1} 之间的系列振动峰的存在表明花粉中含有较高含量的糖类物质。图 1 为 6 种花粉在 $2000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 之间的一维红外谱图。

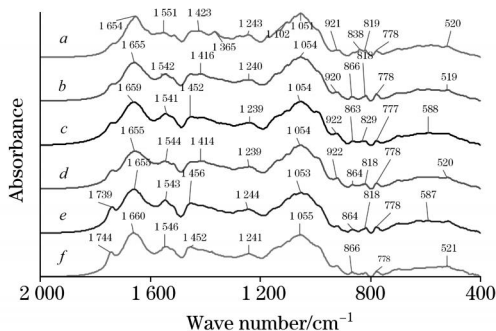


Fig 1 FTIR spectra of six kinds of bee pollens ($2000\sim 400\text{ cm}^{-1}$)

a: Lotus pollen; b: Corm poppy pollen; c: Camellia pollen; d: Apricot pollen; e: Rape pollen; f: Watermelon pollen

与其他几种花粉相比, 西瓜花粉(图 1f)和油菜花粉(图 1e)分别位于 1744 和 1739 cm^{-1} 的酯羰基吸收峰, 强度较大, 峰形尖锐, 加上位于 1240 cm^{-1} 附近的 $\text{C}=\text{O}$ 振动吸收峰也较宽, 说明分子中酯羰基含量较高。而杏花花粉(图 1d)、茶花粉(图 1c)、虞美人花粉(图 1b)和荷花花粉(图 1a)在 1740 cm^{-1} 附近出现了较小的肩峰, 其峰高依次降低, 说明这 4 种花粉的酯羰基含量小于油菜花粉和西瓜花粉, 且其脂肪含量依次降低。

分别比较位于 1656 和 1545 cm^{-1} 附近的蛋白质酰胺 I 带和酰胺 II 带, 发现油菜花粉和西瓜花粉红外谱图的酰胺 I 带和酰胺 II 带吸收峰较强, 说明这两种花粉的蛋白质含量较高; 茶花粉和虞美人花粉红外谱图中也存在强度中等的酰胺 I 带和 II 带吸收峰; 杏花花粉和荷花花粉的酰胺 I 带和 II 带吸收峰强度相对较弱, 说明这两种花粉的蛋白质含量相对较少。

6 种花粉红外谱图中, 位于 1054 cm^{-1} 附近的糖类物质的 $\text{C}=\text{O}$ 振动吸收峰均很强, 甚至掩盖了位于 1160 cm^{-1} 附近的油脂 $\text{C}=\text{O}$ 峰, 说明 6 种花粉都有很高含量的糖类物质。西瓜花粉和油菜花粉的酰胺 I 带吸收峰强度与分别位于 1055 和 1053 cm^{-1} 的糖类物质吸收峰峰强差别不大, 说明这两种花粉的蛋白质和糖类物质含量差别不大; 其他 4 种花粉的糖类物质的 $\text{C}=\text{O}$ 振动吸收峰强度均明显高于相对应的酰胺 I 带吸收峰, 说明它们的糖类物质含量要高于蛋白质含量, 其中差别最大的是杏花花粉。比较位于 $930\sim 750\text{ cm}^{-1}$ 之间的糖类物质的系列特征峰可知, 6 种花粉在糖类物质的组成上存在着一定差异。由于组成峰花粉的糖类物质主要为葡萄糖和果糖^[9], 对照葡萄糖和果糖的标准红外谱图可知, 西瓜、油菜和虞美人 3 种花粉的葡萄糖含量要高于其他 3 种花粉。

此外, 6 种花粉红外谱图的 1450 cm^{-1} 附近均有较强的甲基的 $\text{C}-\text{H}$ 弯曲吸收形成的吸收峰。其中, 荷花花粉在 1365 cm^{-1} 处有一个尖锐的吸收峰, 可能作为荷花花粉区别于其他 5 种花粉的依据之一。

比较 6 种花粉的羰基、酰胺带以及糖类物质相对应的特征吸收峰强度, 可以发现这 3 类吸收峰的强度在不同品种花粉中存在较大差别。利用这些吸收峰的区别, 参考其他位置的吸收峰差异, 就可以将 6 种花粉区分开。

2.2 6 种花粉的二阶导数红外谱图比较

二阶导数红外光谱能有效提高分辨率, 消除背景和基线的影响, 扩大谱图间的差异, 是红外光谱分析的有效工具。图 2(a) 为 6 种花粉在 $1850\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ 范围的二阶导数红外谱图, 图 2(b) 为 6 种花粉在 $1300\sim 700\text{ cm}^{-1}$ 范围的二阶导数红外谱图。从图 2 中可以看出, 6 条谱线存在着较大差别。

由图 2(a) 可以看出, 西瓜花粉和油菜花粉的二阶导数谱图中, 1747 cm^{-1} 附近的羰基吸收峰明显强于其他 4 种花粉, 而荷花花粉的羰基吸收峰是 6 种花粉中最弱的。荷花花粉和虞美人花粉分别位于 1650 和 1656 cm^{-1} 的含有大量酰胺带的特征吸收峰强度明显强于其他 4 种花粉, 最强的为荷花花粉, 其次为虞美人花粉。比较 1515 和 1468 cm^{-1} 的峰强, 可以看出杏花花粉和荷花花粉 1515 cm^{-1} 谱峰要强于 1468 cm^{-1} , 茶花粉和虞美人花粉这 2 个峰的吸收强度相似, 而油菜花粉和西瓜花粉的 1515 cm^{-1} 谱峰强度小于 1468 cm^{-1} 。

由图 2(b) 可以看出, 6 种花粉位于 $1200\sim 750\text{ cm}^{-1}$ 之间众多糖的特征峰存在明显差异, 其中 984 , 919 , 815 和 780 cm^{-1} 附近的 4 个谱峰强度的差异最为明显。茶花粉 986 和 918 cm^{-1} 的峰强强于其他五种花粉的相对应的谱峰峰强, 且 986 cm^{-1} 谱峰强于 918 cm^{-1} ; 油菜花粉和荷花花粉 984 cm^{-1} 附近的谱峰也强于 919 cm^{-1} 附近的谱峰, 虞美人花粉和杏花花粉中这两个谱峰强度相似, 而西瓜花粉的 919 cm^{-1} 峰强更强。

比较 6 种花粉的 817 和 779 cm^{-1} 附近的谱峰峰强, 油菜花粉和虞美人花粉的谱图均形成了很强的双峰, 但油菜花粉的 817 cm^{-1} 谱峰略强于 781 cm^{-1} , 而虞美人花粉正好相反。

荷花花粉这2个峰的峰强接近,但弱于油菜花粉和虞美人花粉。其他3种花粉的 817 cm^{-1} 谱峰均弱于 779 cm^{-1} 谱峰,其强度由大到小依次为西瓜花粉、杏花花粉和茶花粉。

在这2个范围的导数图中,6种花粉均有各自明显的特征峰,可以容易的区别出来。相对而言,油菜花粉和西瓜花

粉,杏花花粉和茶花粉之间的二阶导数谱相似度较高,利用二维相关红外光谱或者放大的导数谱能更好地进行区分。

2.3 6种花粉二维红外谱图的比较

图3和图4分别为6种花粉在 $800\sim 1\,350\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,350\sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$ 范围内的二维相关红外谱图。

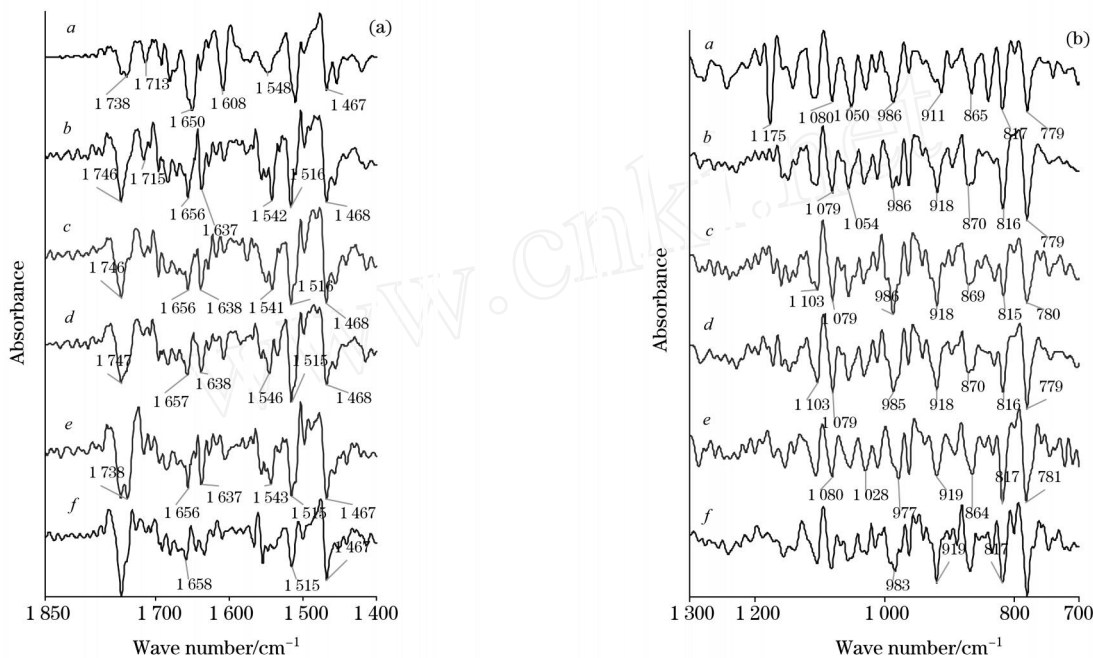


Fig 2 Second derivative IR spectra of six kinds of bee pollens

(a) : $1\,850\sim 1\,400\text{ cm}^{-1}$; (b) : $1\,300\sim 700\text{ cm}^{-1}$

a: Lotus pollen; b: Com poppy pollen; c: Camellia pollen; d: Apricot pollen; e: Rape pollen; f: Watermelon pollen

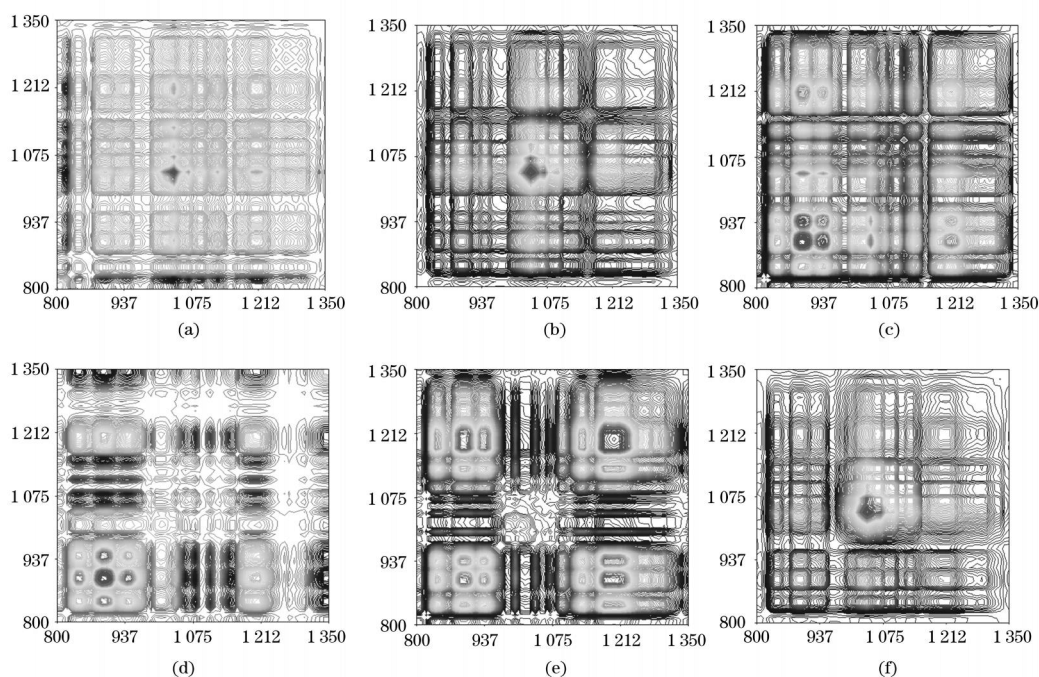


Fig 3 2D correlation IR spectroscopy of six kinds of bee pollens ($800\sim 1\,350\text{ cm}^{-1}$)

(a) : Lotus pollen; (b) : Com poppy pollen; (c) : Camellia pollen; (d) : Apricot pollen; (e) : Rape pollen; (f) : Watermelon pollen

由图 3 可见, 在 $800 \sim 1\,350\text{ cm}^{-1}$ 范围内的二维相关红外谱图中, 尽管所有的自动峰都是由糖环和分子中不同的 C—O 基团对热扰动响应产生的, 且自动峰之间的交叉峰均为正, 但 6 种花粉在自动峰及相关峰峰簇的位置、数量和强度上均存在明显差异, 说明不同花粉之间在糖的组成和分子结构上存在较大差别。

荷花花粉[图 3(a)]、茶花粉[图 3(c)]和西瓜花粉[图 3(f)]的最强自动峰均位于 $1\,054\text{ cm}^{-1}$ 附近, 但荷花花粉相对较弱。除此之外, 荷花花粉还有 $911, 940, 1\,050, 1\,080, 1\,108, 1\,140$ 和 $1\,212\text{ cm}^{-1}$ 七个较弱的自动峰; 茶花粉有较弱的 $1\,062\text{ cm}^{-1}$ 自动峰和几个强度更小的自动峰,

分别在 $918, 1\,079, 1\,103$ 和 $1\,210\text{ cm}^{-1}$ 位置; 西瓜花粉仅在 $1\,081$ 和 $1\,103\text{ cm}^{-1}$ 波数有 2 个很弱的自动峰, 明显少于荷花花粉和茶花粉。

虞美人花粉[图 3(b)]和杏花花粉[图 3(d)]最强的自动峰位于 894 cm^{-1} 。虞美人花粉还有位于 918 和 $1\,227\text{ cm}^{-1}$ 波数的较强自动峰和位于 $832, 1\,054$ 和 $1\,104\text{ cm}^{-1}$ 的弱自动峰; 而杏花花粉较强的自动峰位于 830 和 940 cm^{-1} , 弱自动峰位于 $1\,193\text{ cm}^{-1}$ 。

而油菜花粉[图 3(e)]最强的自动峰位于 $1\,194\text{ cm}^{-1}$, 两个较强的自动峰位于 890 和 919 cm^{-1} , 此外还有两个位于 832 和 $1\,152\text{ cm}^{-1}$ 的弱自动峰。

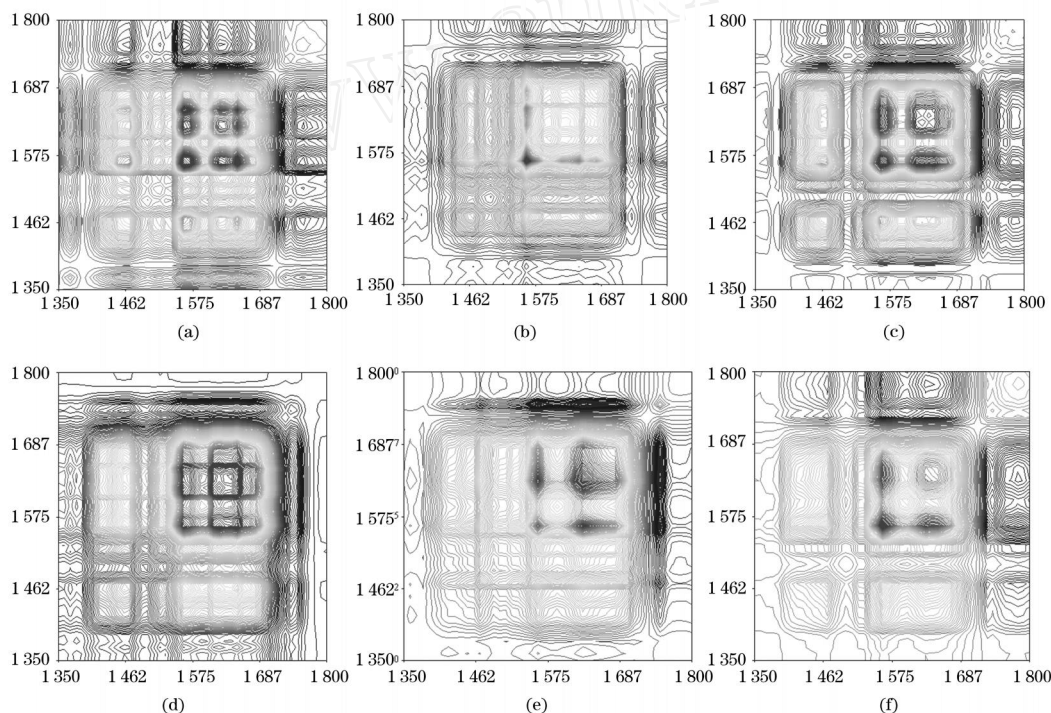


Fig 4 2D correlation IR spectroscopy of six kinds of bee pollens ($1\,350 \sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$)

(a) : Lotus pollen; (b) : Com poppy pollen; (c) : Camellia pollen; (d) : Apricot pollen; (e) : Rape pollen; (f) : Watermelon pollen

由图 4 可以看出, 在 $1\,350 \sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$ 范围内的二维相关红外谱图中, 6 种花粉的强自动峰均对应着蛋白的酰胺 I 和 II 带的特征吸收, 说明蜂花粉中蛋白质对热扰动比较敏感。但不同的花粉这些自动峰的相对强度存在明显差别, 其中杏花花粉[图 4(d)]自动峰强度最大, 其蛋白质对热扰动最为敏感, 荷花花粉[图 4(a)]和虞美人花粉[图 4(b)]次之, 而茶花粉[图 4(c)]蛋白质对热扰动相对最不敏感, 说明不同花粉的蛋白质组成和结构存在较大差异。

花粉在 $1\,468\text{ cm}^{-1}$ 处均有 1 个自动峰, 但除了荷花花粉和虞美人花粉相对较强外, 其他几种花粉位于 $1\,468\text{ cm}^{-1}$ 处的自动峰强度均很弱, 说明甲基上的 C—H 弯曲振动对热扰动不敏感, 但不同花粉之间存在差异。

在 $1\,500 \sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$ 范围内, 杏花花粉有 3 个极强的自动峰, 分别位于 $1\,546, 1\,638$ 和 $1\,657\text{ cm}^{-1}$ 波数位置; 荷花

花粉和虞美人花粉也分别有 3 个和 2 个强自动峰, 前者位于 $1\,572, 1\,638$ 和 $1\,650\text{ cm}^{-1}$ 波数位置, 而后者位于 $1\,542$ 和 $1\,637\text{ cm}^{-1}$ 处; 西瓜花粉[图 4(f)]在位于 $1\,634\text{ cm}^{-1}$ 波数位置有一个非常强的自动峰, 在 $1\,554$ 和 $1\,587\text{ cm}^{-1}$ 波数位置分别有一个较强和一个弱的自动峰; 而油菜花粉[图 4(e)]最强的自动峰位于 $1\,543$ 和 $1\,637\text{ cm}^{-1}$ 处的自动峰也比较强。

相对而言, 茶花粉的自动峰强度最弱, 仅在 $1\,541\text{ cm}^{-1}$ 波数位置有一个相对较强的自动峰, 另外, 在 $1\,468, 1\,516, 1\,656$ 和 $1\,696\text{ cm}^{-1}$ 处有 4 个弱的自动峰。

无论是在 $800 \sim 1\,350\text{ cm}^{-1}$ 范围, 还是在 $1\,350 \sim 1\,800\text{ cm}^{-1}$ 范围内的二维相关红外谱图中, 不同花粉在自动峰及相关峰峰簇的位置、数量和强度上均存在明显差异。利用引入了热微扰的二维相关红外光谱, 将 6 种花粉的红外特征放大, 提高了分辨率, 可以快速地进行区分鉴别。

3 结 论

本文利用傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 结合二阶导数谱和热扰动下的二维相关红外光谱技术的三级红外宏观指纹图谱法, 将化学成分组成差别不大的 6 种花粉明显和直观地进

行了鉴别。尽管在 6 种花粉的一维和二阶导数谱图上, 已经能比较明显地看出它们的差异, 但利用更高分辨率的二维谱图上自动峰及相关峰峰簇的位置、数量和强度不同等, 可以准确鉴别不同花粉品种, 并能揭示它们之间相应各官能团的变化规律, 为有效评价花粉的营养和生物学功效, 更好规范花粉的生产、加工和流通环节提供了技术保障。

参 考 文 献

- [1] Loidl A, Crailsheim K. *Journal of Comparative Physiology B*, 2001, 171: 313.
- [2] Hannelie H, Sue W N. *Phytochemistry*, 2006, 67: 1486.
- [3] Leja M, Mareczek A, Wyzgolik G, et al. *Food Chemistry*, 2007, 100: 237.
- [4] Almeida M L B, Lmeida M, Lucila C P, et al. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005, 18: 105.
- [5] Silva T M S, Camara C A, Da Silva L, et al. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, 19: 507.
- [6] ZHANG Hong-cheng, DONG Jie, LI Hui, et al (张红城, 董捷, 李慧, 等). *Food Science (食品科学)*, 2007, 28(9): 500.
- [7] TANG Lin, LI Qian, ZHAI Jir-liang, et al (唐琳, 李倩, 翟金亮, 等). *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报)*, 2008, 8(1): 17.
- [8] LIANG Bi-yan, LI Shu-yuan, SUN Su-qin (梁碧燕, 李书渊, 孙素琴). *Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析)*, 2009, 29(2): 313.
- [9] WU Li-ming, XUE Xiao-feng, ZHOU Xiao, et al (吴黎明, 薛晓峰, 周骁, 等). *Food Science (食品科学)*, 2008, 29(6): 335.

Study on the Identification of Six Kinds of Bee Pollens by Three-Step Infrared Macro-Fingerprint Method

WU Jie^{1,3}, ZHOU Qun², WU Li-ming¹, AN Jian-dong¹, SUN Su-qin^{2*}, HU Fu-liang³

1. Institute of Apicultural Research, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China
2. Key Laboratory of Bioorganic Phosphorus Chemistry and Chemical Biology (Ministry of Education), Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China
3. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract Six kinds of bee pollens, including apricot pollen, lotus pollen, rape pollen, camellia pollen, watermelon pollen and corn poppy pollen, were identified non-destructively by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) combined with derivative spectra and two-dimensional correlation spectroscopy (2D) in the present article. Compared with conventional IR spectra of samples, some certain differences were found in the characteristic peaks of proteins, lipids and carbohydrates. Obvious differences of the six kinds of bee pollens were found in the second derivative spectra. And in the 2D-IR correlation spectra, the samples presented the differences in the position and intensity of the autopeaks and correlation peak clusters. Therefore, the three-step IR macro-fingerprint provides a more rapid and effective method for the identification of different kinds of bee pollens.

Keywords Bee pollen; IR spectra; 2D-IR correlation spectra; Identification

(Received Mar. 10, 2009; accepted Jun. 20, 2009)

* Corresponding author