

食品科学中拉曼光谱研究进展

张涛, 李军科, 刘柱, 袁士芳

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡214122; 2. 无锡商业职业技术学院, 江苏无锡214153)

摘要 仪器的发展使得拉曼光谱的应用越来越广泛。对微观结构变化的灵敏性、样品的非破坏性、使用的样品量较小及其高分辨率等都是选择拉曼光谱作为分析手段的主要原因。综述了拉曼光谱在蛋白质、脂类、碳水化合物分析中的应用研究进展。

关键词 蛋白质; 脂类; 碳水化合物; 拉曼光谱

中图分类号 TS207.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)33-10563-03

Study Progress in Raman Spectroscopy of Food Science

ZHANG Tao et al (State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122)

Abstract The application of Raman spectroscopy technique has been wider and wider with the development of instrument science. Raman was an interesting option for several reasons including sensitivity to small structural changes, non-invasive sampling capability, minimal sample preparation, and high spatial resolution. Herein, the applications of Raman spectroscopy in food science were reviewed.

Key words Protein; Fat; Carbohydrates; Raman Spectroscopy

在过去的两个世纪, 拉曼光谱作为一个分子或复杂分子体系的重要研究方法取得了长足发展, 在许多领域均有其应用研究报道^[1]。拉曼光谱和远红外光谱均属于振动谱, 共同用于完成一个物质结构中分子结构完整的共振分析, 逐步成为化学和物理性质定性分析方面的重要工具^[2]。在理解小分子物质结构的基础之上, 结构分析理论延伸至较大分子体系如聚合物、生物大分子等, 拉曼光谱在这些领域的应用具有重要的影响。

1 拉曼光谱在蛋白质分析中的应用

Painter^[3]指出, 拉曼光谱具有一个非常明显但还未开发的巨大潜力: 即用于分析食品加工过程(如混合、加热及胶凝等)中对结构变化敏感的各个独立组分的特性。蛋白质拉曼光谱不仅可以反映肽链的骨架振动, 而且可以反映侧链周围微环境的变化。它的优点在于适用范围广, 既可用于水溶液又可用于非水溶液; 既可用于晶体又可用于粉末、纤维, 尤其可用于胶体^[4]。

表1^[4-6]列出了一些蛋白构象拉曼谱带的指认信息。包括各种氨基酸侧链(胱氨酸和半胱氨酸的S-S和S-H, 色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸中的苯环, 脂肪族氨基酸中的基团, 天门冬氨酸和谷氨酸中的COO⁻和COOH, 组氨酸中的咪唑基)的振动跃迁, 氨基键和骨架的伸缩振动, 都可用于测定骨架的构型, 提供多肽链或蛋白质中不同类型的二级结构之间的比例。

在50~550/cm和2330~2580/cm分别测定S-S键和S-H键的伸缩振动, 就可知体系里是否含有二硫化物及巯基。二硫键在构象张力下会形成二面角, 角度为(85±20)°, 它们在450~500/cm出峰。假设二硫键不受张力的影响, 那么由二硫键伸缩振动产生的拉曼光谱带的精确位置因与C-S和C-C键周围内部旋转有关, 在二硫键周围就会产生相关构象的信息。例如, 鹰嘴豆分离蛋白溶液的拉曼谱在525/cm出峰, 二硫键以gauche-gauche-trans存在。而在加热胶凝后消失, 表示二硫键发生了改变^[6]。

作者简介 张涛(1973-), 女, 陕西咸阳人, 讲师, 从事天然产物开发及利用研究。

收稿日期 2007-06-22

表1 拉曼光谱各主要谱带的指认

波数 / cm ⁻¹	指认	结构信息
510	νS-S	gauche-gauche-gauche 构型
528	νS-S	gauche-gauche-trans 构型
547	νS-S	trans-gauche-trans
759	Trp 吡啉环	强度增强表示残基埋藏, 对环境极性敏感
850/830	Tyr	9.10~10.7 暴露式氢键的供体或受体; 其他埋藏式氢键的受体
1004	Phe	对构象变化不敏感, 作为强度标准化的内标
1447	CH ₂	
1655	酰胺, νC=O	- 螺旋
1667	酰胺, νC=O	无规结构
1670~1673	酰胺, νC=O	- 折叠

注: ν表示伸缩, 表示弯曲。

芳香族氨基酸侧链有几条特征性的拉曼谱带, 其中一些可用于检测微环境的极性或者氢键的变化。如色氨酸从疏水环境中的“包埋”式转化为极性水溶液中的“暴露”式, 在760/cm附近的谱带强度就会降低。色氨酸残基的“暴露”式可由两种凝胶拉曼光谱鉴定, 即通过加热-乳白蛋白和-乳球蛋白而形成的透明胶和通过加热或用溶菌酶还原二硫键形成的不透明胶。酪氨酸残基侧链的双带850和830/cm, 其强度的比值揭示酪氨酸微环境的变化, 反映酪氨酸的存在状态及其所在肽链骨架的结构信息^[8], 而且可以指示酚羟基所形成的氢键。例如, 在-乳白蛋白凝胶拉曼光谱中是否含有酪氨酸残基可由I₈₅₀/I₈₃₀的减小来确定, 可以理解为, 它指示了作为氢键供体的酚羟基作用的增强或者是酪氨酸残基在凝胶网络中包埋程度的增加^[8]。与色氨酸和酪氨酸相反, 苯丙氨酸的谱带位置和强度与构型和微环境无关, 因此, 在1004/cm的尖峰可被作为测量蛋白质拉曼光谱的内标^[9]。

脂肪族氨基酸残基分别在2800~3000/cm和1440~1465/cm显示C-H的伸缩和弯曲振动。尽管一些研究是用亚甲基变形谱带的强度作为内标, 但其他研究者也报道了亚甲基变形的谱带强度是溶剂的极性和微环境的函数, 因此其可能用于指示脂肪族残基间的疏水相互作用^[10]。同样地, C-H的伸缩振动谱带由2940/cm向高波数方向移动可以敏感地说明这条谱带指示微环境的极性和蛋白变性。

带电氨基酸残基的功能基团在红外波谱中可显示比在

拉曼光谱中更强的谱带。这些谱带也可以提供重要信息如离子化状态和金属络合物。例如,内部灌注的肌肉纤维收缩过程中观察到表征羰基化合物的C=O伸缩振动的 $1412/\text{cm}$ 处谱带强度减小,说明在收缩过程中可收缩蛋白的带正电荷残基和带负电荷残基间的相互作用^[11]。组氨酸残基的咪唑环在球蛋白的光谱中很弱或检测不到,但可表征离子化状态,在pD为7.5观察蛋黄高磷蛋白时,在 $1406/\text{cm}$ 出现带正电的N-氘代咪唑衍生物的特征性谱带,表明pK值较高,离子对与蛋白质的磷酸丝氨酸之间存在广泛的相互作用^[12]。

蛋白质的酰胺键(肽键)有几个独特的振动模式,其中酰胺I和III谱带对于研究次级结构是最重要的^[13-14]。由于蛋白的水溶液样品的拉曼光谱中其他混杂侧链振动会在酰胺III谱带区产生谱带,以及水的谱带与酰胺I的谱带发生交叠,因此,拉曼光谱中蛋白的次级结构的解释应该基于酰胺I和III谱带的同时观察。其他额外信息也可考虑通过检测氘代后的变化或其他骨架振动模式获得^[14-15]。酰胺I和III谱带的傅立叶去卷积法和最小二乘分析法是最常用的技术,用于解析谱带并分辨各谱带所指代的成分。基于这些技术,蛋白质中不同类型二级结构的比率可作为一种特性来研究,包括盐诱导^[11,15-16]、热凝胶^[5,9]、冷冻干燥^[12-13,17]、结晶^[8]、冷冻和冷藏保藏^[18]等发生的构象改变。

2 拉曼光谱在脂类分析中的应用

在油脂和脂肪工业中,湿化学法和气相色谱法等经典方法用于定量研究顺式和反式异构体的数量和不饱和度,而单晶X射线、粉状衍射和散射及示差扫描量热法用于给三酰基甘油和二酰基甘油的同质多晶现象提供详细信息。尤其是随着傅立叶变换技术的出现,红外光谱法和拉曼光谱法都可能取代或至少作为耗时的经典方法的补充,因此,可作为快速的筛选方法以达到质量控制的目的,也可用于影响晶型转变和稳定性的因素的基础研究。

色散激光拉曼光谱法表明:在 1656 和 $1670/\text{cm}$ 处的拉曼谱带的强度分别与可食植物油中顺式和反式异构体的含量有关。同样,C=C伸缩振动与 CH_2 剪式振动散射强度比值与参考物甘油三酯和非结合植物油的碘值有关^[19]。

傅立叶转化-拉曼光谱在各种分析中已取得重大的进展。其主要优点是大大降低了数据获取时间和免去了样品的预处理过程。第1个优点源于使用Michelson干涉仪,而第2个优点则是使用了近红外激发,它可以避免存在于可食脂肪如黄油、植物油、人造黄油中的胡萝卜素或其他色素的潜在荧光效应,这个问题是色散激光技术的一大障碍。

已报道碘值和各种油脂、人造黄油、黄油的特定拉曼光谱带有很好的相关性,建立定量程序来测定总的饱和度^[20-21],即通过测量 $1700\sim 1601/\text{cm}$ 处C=C的伸缩振动峰与在 $1790\sim 1713/\text{cm}$ 处的C=O伸缩振动峰的面积比,或者测量C=C的伸缩振动峰面积与在 $1543\sim 1382/\text{cm}$ 处的 CH_2 剪式振动峰的面积比^[19]。

顺式和反式异构体的比例可以通过分别测定在 1657 和 $1667/\text{cm}$ 的相对强度来进行定量,顺式异构体的含量可由在 1265 和 $1303/\text{cm}$ 的谱带的强度比来确定,这与气相色谱分析结果有很好的相关性。当反式异构体浓度大于总不饱和

度的20%时,进行顺式和反式异构体的标准混合物的傅立叶自身去卷积光谱可获得定量结果。通过应用主要组分回归方法分析标准脂肪混合物光谱中的顺反异构体建立的多组分光谱分析可获得与气相色谱一致的测量结果^[19]。

另一潜在的应用领域是研究甘油酯分子的排列和填充,这些分子的选择性排列也就是它的多态形式,导致了脂肪和油不同的熔点和不同的物理特性。在20多年前,Larsson and Rand报道^[22]由于不同的液体-晶体、水-晶体相的存在引起脂肪分子中的烃侧链环境的变化,会导致拉曼光谱中C-H伸缩振动区域的极大不同。 CH_2 和 CH_3 的对称和反对称模式可以提供在以下一些情况下烃链间相互作用的有价值的信息,如不同的状态、多晶态形式、乳化或与蛋白质的相互作用。在 2850 和 $2885/\text{cm}$ 处的拉曼谱带的相对强度可能与碳氢侧链的无序性有关, I_{2850}/I_{2885} 比值随着侧链排列的松弛度增加而增加,增加顺序:薄层液晶<六角或立液晶<胶束溶液<有机溶剂中的溶液^[22]。分析C-H拉曼光谱区域可以为食品体系提供直接信息,例如,牛奶的脂肪球颗粒表面的大多数碳氢链被指明是处于呈晶体的、紧密排列的形式中。这个解释是通过观察拉曼光谱中牛奶的特征性谱带即 $2890/\text{cm}$ 处的C-H伸缩振动峰,此峰正是晶体排列的特征峰。相反,对于相应的分散的牛奶脂肪的光谱显示出在 $2850/\text{cm}$ 的谱带增强,它指代液相中 CH_2 的对称伸缩振动。

用拉曼光谱对甘油二酯的多晶态性已有研究,并用X射线衍射、红外光谱和差示扫描量热法进行补充^[23]。脂与蛋白质、脂与水分子间的相互作用,也用拉曼光谱进行了研究,即充分利用拉曼光谱研究这些呈混浊或不透明的体系。

3 拉曼光谱在碳水化合物分析中的应用

与其他生物大分子相比,关于拉曼光谱在碳水化合物中应用的报道相对较少。然而,随着傅立叶转换拉曼光谱技术的使用,在生物技术和工业应用中的进展,使得人们对这方面的兴趣高涨^[24]。拉曼激光纤维光学方法的工业应用最近已被定为选择性分析甜瓜果肉中糖(葡萄糖、果糖、蔗糖)的分析方法。

傅立叶转换拉曼光谱可用于清晰地分析结构非常接近的物质,如结晶D-葡萄糖、D-半乳糖、D-果糖,或者-异构体、-异构体^[25]。双糖、低聚糖、多糖的结构组分也可用拉曼光谱的特征谱带进行说明,例如蔗糖的谱带显示了两种单糖组分的异构物的特征谱带: $847/\text{cm}$ 的-葡萄糖, $868/\text{cm}$ 的-果糖。麦芽糖谱带显示的特征谱带为: $847/\text{cm}$ 的-葡萄糖, $898/\text{cm}$ 的-葡萄糖。然而纤维双糖仅在 $885/\text{cm}$ 处显示-异头碳的谱带^[24]。

对于糖类的振动运动而出现的明显条带可以用来研究食物中成分分布情况。比如:近红外-傅立叶转换拉曼光谱显示了由于糖而引起的条带,在 1462 、 1126 、 $840/\text{cm}$ 处位于胡萝卜中心部位的光谱强于外层部位,表明胡萝卜中心部位含糖量高^[26]。

拉曼光谱学研究诸如纤维素、玉米淀粉、琼脂糖、糊精、葡聚糖、交联葡聚糖和合成蔗糖多聚物等物质,显示了这种技术在确认多糖以及研究多糖在加工过程中变化的应用,包括糊化^[27]。对于马铃薯直链淀粉、马铃薯支链淀粉和蜡质

玉米淀粉以及蜡质玉米淀粉的水相体系得到不同光谱图已有报道,尤其是2700~3100/cm处的C-H伸缩区域和480/cm处主要骨架区域;不同淀粉材料的干粉末样品能通过它们的拉曼光谱来有效地区分^[28]。这些光谱的差异表明了样品的相对结晶程度,同样还报道了浓缩的蜡质玉米淀粉水溶液制品的糊化和回生变化,这与部分重结晶的微晶融化是一致的^[28]。

对于食品体系中碳水化合物与其他成分相互作用的研究是拉曼光谱另一个潜在的应用。当 α -环糊精作为主要分子与其他分子作用时,其特征谱带有所变化。拉曼光谱不仅可以用来表明水的构成在甜味中的作用,也可以用来区别糖和其他甜味剂^[29-30]。

拉曼光谱除了能分析食品的组成之外,它还能应用于食品科学的其他领域,能够研究痕量化合物、核酸或者是它们的组成,以及研究细胞及组织、微生物,甚至是食品包装。在糖发酵产生醇的过程中^[31],直接分析所获得的产物已经被证实了,使用FT-拉曼光谱证明了包括在牛奶酪蛋白中含有胶质钙磷酸盐在内的生物和人造磷酸盐的有机物和矿物质化合物的性质^[32]。拉曼光谱同样能分析用于包装材料的聚烯烃,像聚乙烯、聚丙烯或者聚氯乙烯,还能研究这些多聚物的结构和组成。

参考文献

- [1] GRASSELLI J G, WALDER F, PETTY C, et al. Industrial applications of raman spectroscopy[J]. *Journal of Molecular Structure*, 1993, 294: 207-210.
- [2] XUE G. Fourier transform raman spectroscopy and its application for the analysis of polymeric materials[J]. *Prog Polym Sci*, 1997, 22: 313-406.
- [3] PAINTER P C. The application of Raman spectroscopy to the characterization of food[M]. *Food Analysis: Principles & Techniques. Volume 2. Physicochemical Techniques*. New York: [s.n.], 1984: 511-545.
- [4] NONAKA M, ICHANE, NAKAI S. Raman spectroscopic study of thermally induced gelation of whey proteins[J]. *J Agric Food Chem*, 1993, 41: 1176-1181.
- [5] GOSAL WS, ROSS MURPHY S B. Globular protein gelation[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2005, 5: 188-194.
- [6] 张涛. 鹰嘴豆分离蛋白的制备及其功能性质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [7] CAREY P R, FAST P, KAPLAN H. Molecular structure of the protein crystal from *Bacillus thuringiensis* a Raman spectroscopic study[J]. *Biophysical Acta*, 1986, 872: 169-197.
- [8] SIAMWIZA MN, LORD R C, CHEN MC, et al. Interpretation of the doublet at 850 and 830/cm in the Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds[J]. *Biochemistry*, 1975, 14: 4870-4876.
- [9] NGARIZE S, ADAMS A, HOWELL N K. Studies on egg albumen and whey protein interactions by FT-Raman spectroscopy and rheology[J]. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18: 49-59.
- [10] ICHANE, NAKAI S. Raman spectroscopic study of thermally and/or dithiothreitol induced gelation of lysozyme[J]. *J Agric Food Chem*, 1991, 39: 1238-1245.
- [11] HONZATKO R B, WILLIAMS R W. Raman spectroscopy of amino acid secondary structure, disulfide conformation, and the environment of tyrosine[J]. *Biochemistry*, 1982, 21: 6201-6205.
- [12] CAILLIE J P, HEGNON GOSSELIN M, PEZOLET M. Laser raman study of internally perfused muscle fibers: Effect of Mg^{2+} , ATP and Ca^{2+} [J]. *Biophysical Acta*, 1983, 758: 121-127.
- [13] PRESCOTT B, RENGUPALAKRISHNAN V, GIMCHER MJ, et al. A raman spectroscopic study of hen egg yolk phosphovitin: Structures in solution and in the solid state[J]. *Biochemistry*, 1986, 25: 2792-2798.
- [14] SUI H, BYLER D M. Fourier decomposition of the amide I raman band of proteins as related to conformation[J]. *Appl Spectrosc*, 1988, 42: 819-826.
- [15] WILLIAMS R W. Protein secondary structure analysis using raman amide I and amide III spectra[J]. *Methods Enzymol*, 1986, 130: 311-331.
- [16] PRZYBYCIENT M, BAILEY J E. Structure-function relationships in the inorganic salt induced precipitation of α -chymotrypsin[J]. *Biophysical Acta*, 1989, 995: 231-245.
- [17] BARRETT T W, PELLICLAS WL. Laser raman light-scattering observations of conformational changes in myosin induced by inorganic salts[J]. *Bophys J*, 1978, 23: 349-358.
- [18] BYLER D M, FARRELL H M, SUI H. Raman spectroscopic study of casein structure[J]. *J Dairy Sci*, 1988, 71: 2622-2629.
- [19] FONTECHA J, BELLANATO J, JUAREZ M. Infrared and raman spectroscopic study of casein in cheese: effect of freezing and frozen storage[J]. *J Dairy Sci*, 1993, 76: 3303-3309.
- [20] BAILEY G F, HORVAT R J. Raman spectroscopic analysis of the cis/trans isomer composition of edible vegetable oils[J]. *Am Chem Soc*, 1972, 49: 494-498.
- [21] SADEGH JORABCH H, HENDRA P J, WILSON R H, et al. Determination of the total unsaturation in oils and margines by fourier transform raman spectroscopy[J]. *J Am Chem Soc*, 1990, 67: 483-486.
- [22] SADEGH JORABCH H, WILSON R H, BELTON P S, et al. Quantitative analysis of oils and fats by fourier transform raman spectroscopy[J]. *Spectrochim Acta*, 1991, 47A(9/10): 1449-1458.
- [23] LARSSON K, RAND R P. Detection of changes in the environment of hydrocarbon chains by raman spectroscopy and its application to lipid-protein systems[J]. *Biophysical Acta*, 1973, 326: 245-255.
- [24] SHANNON R J, FENERTY J, HAMILTON R J, et al. The polymorphism of diglycerides[J]. *J Sci Food Agric*, 1992, 60: 405-417.
- [25] CORBETT E C, ZICHY V, GÖAL J, et al. Fourier transform raman studies of materials and compounds of biological importance-II. The effect of moisture on the molecular structure of the Alpha and Beta anomers of glucose[J]. *Spectrochim Acta*, 1991, 47A(9/10): 1399-1411.
- [26] CÖRAL J, ZICHY V. Fourier transform raman studies of materials and compounds of biological importance[J]. *Spectrochim Acta*, 1990, 46A: 253-275.
- [27] OZAKI Y, CHO R, IKEGAYA K, et al. Potential of near-infrared fourier transform raman spectroscopy in food analysis[J]. *Appl Spectrosc*, 1992, 46: 1503-1507.
- [28] BULKIN B J, DEAI C M, KWAK Y T. Characterization of starch retrogradation using raman spectroscopy in gums and stabilizers for the food industry 3[C]// PHILLIPS G O, WEDLOCK D J, WILLIAMS P A. Elsevier: [s.n.], 1986: 485-496.
- [29] PORTMANN M O, SERGHAT S, MAILLOUTH M. Study of some factors affecting intensity time characteristics of sweetress[J]. *Food Chem*, 1992, 45: 83-92.
- [30] SERGHAT S, MAILLOUTH M, HOCPMANT, et al. Study of solvent interactions and the sweet taste of small carbohydrates. Part 1: Effect of solvent polarity on solution properties[J]. *Food Chem*, 1992, 45: 25-32.
- [31] MANOHARAN R. UV resonance raman spectra of bacteria, bacterial spores, protoplasts and calcium dipicolinate[J]. *J Microbiol Methods*, 1990, 11: 1-15.
- [32] SHOPE T B, VICKERS T J, MANN C K. The direct analysis of fermentation products by raman spectroscopy[J]. *Appl Spectrosc*, 1987, 41: 908-912.