

叶绿素的太赫兹光谱特性

蒋 玲¹,虞江萍¹,徐雨田¹,李 春¹,孙海军²,徐 莉²,刘云飞^{1*}

(1.南京林业大学信息科学技术学院,江苏 南京 210037;2.南京林业大学现代分析测试中心,江苏 南京 210037)

摘要:为了分析叶绿素分子在太赫兹频段的吸收特性,也为探索生物样品的鉴定以及混合物成分测定的新方法,采用傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)和密度泛函理论(density functional theory,DFT)研究了马尾松松针叶绿素以及叶绿素a和b标准样的太赫兹光谱。结果表明,萃取的马尾松松针叶绿素以及叶绿素a和b标准样在2.86 THz频段均出现包络吸收峰。借助于密度泛函理论,计算了单分子叶绿素a和b的太赫兹光谱,计算结果表明叶绿素a在2.86 THz频段的包络吸收峰由叶绿素分子内的卟啉环和叶绿醇的振动和转动产生。由于理论计算采用单分子结构,与实验采用的叶绿素晶体结构存在差别,导致计算的叶绿素b分子虽然在2.86 THz频段有吸收峰,但是未呈现包络吸收特性,这表明除了分子内的相互作用力,分子间的弱相互作用力产生的振动和转动对于叶绿素b的太赫兹光谱吸收特性同样有重要的影响。

关键词:太赫兹光谱;松针叶绿素;傅立叶变换光谱仪;密度泛函理论

中图分类号:O433

文献标志码:A

文章编号:1000-2006(2015)06-0181-04

Investigation of terahertz spectra of chlorophyll

JIANG Ling¹, YU Jiangping¹, XU Yutian¹, LI Chun¹, SUN Haijun², XU Li², LIU Yunfei^{1*}

(1. College of Information Science and Technology, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China;

2. Advanced Analysis and Testing Center, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: This paper presents the investigation of the THz spectra of chlorophyll of masson pine leaf, chlorophyll a and b standard sample by using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and density functional theory (DFT), in order to study the vibration and rotation of chemical bonds in chlorophyll molecule at THz frequencies, which will be used to identify the components in mixing biological samples. The frequency shift characteristic of THz spectra of chlorophyll due to the change of molecular structure will efficiently detect the development of pine wilt disease. The THz spectra of the extracted chlorophyll of masson pine leaf display a strong absorption at 2.86 THz, and weak absorption at the same frequency occurs for chlorophyll a standard sample, and chlorophyll b standard sample, which originates from porphyrin ring and phytol in the chlorophyll structure. In the other frequencies, the absorptions were not distinct. Based on the absorption performance of chlorophyll, we can identify the mixing biological samples. We studied the theoretical mechanism of absorption frequencies for chlorophyll by terms of DFT. The calculated results indicate the vibration and rotation originated from intermolecular interactions have more important effect on the THz absorption spectra compared with intramolecular interactions.

Keywords: terahertz spectra; pine chlorophyll; FTIR; DFT

太赫兹波(也称T射线),介于微波和近红外之间,指的是在0.1~10 THz(对应波长30 μm~3 mm)范围内的电磁辐射。太赫兹辐射对很多介电材料和非极性的液体具有良好的穿透性,许多有机分子在太赫兹频段具有强的吸收和色散特性,物质的太赫兹光谱(发射、反射和透射光谱)包含丰富

的物理和化学信息,使得它们具有类似指纹的唯一特点。同时太赫兹辐射的能量只有毫电子伏(1~12 meV),低于各种化学键的键能,不会引起有害的电离反应,因而被广泛应用于无损检测领域。太赫兹光谱对于研究生物分子的结构、分子之间的反应、分子与环境的相互作用等都具有独特的优势,

收稿日期:2014-10-08

修回日期:2014-12-09

基金项目:国家自然科学基金项目(31200541,31170668);江苏省自然科学基金项目(BK2012417);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

第一作者:蒋玲,博士。*通信作者:刘云飞,教授。E-mail: lyf@njfu.edu.cn。

引文格式:蒋玲,虞江萍,徐雨田,等.叶绿素的太赫兹光谱特性[J].南京林业大学学报:自然科学版,2015,39(6):181-184.

为确定分子构型、构象和环境影响提供了指纹特征^[1-5]。

叶绿素是光合作用能力和植被发育阶段的指示器,是监测植被生长健康状况的重要指标之一。叶绿素的研究主要集中在荧光特性及叶绿素含量的分析,其光谱特性方面的研究主要采用高光谱遥感技术,可以为植物叶绿素含量的定量化诊断提供简便有效、非破坏性的数据采集和处理方法。高光谱遥感技术仅研究植物叶片的光谱反射率或吸收率的差异,表征叶绿素含量及荧光参数与高光谱数据之间的相关系数,无法解析叶绿素分子结构及分子振动模式的变化^[6-10],而太赫兹光谱技术在分析分子构象、分子构型、分子间相互作用方面具有独特的优势,另外叶绿素属于生物小分子,相比于其他生物大分子,更容易获得指纹谱。研究叶绿素太赫兹光谱能够解析叶绿素分子间和分子内的相互作用力,阐明叶绿素分子结构与其太赫兹特征峰的相关性,为区分含有叶绿素结构类型的化合物,以及进行混合物的测定具有借鉴意义,也为日后进一步研究如松材线虫病害引起的叶绿素分子结构的变化,进而导致太赫兹吸收峰频率的偏移提供重要依据。

叶绿素分子主要由两部分组成,核心部分是卟啉环,负责对光进行吸收,另外具有一条很长的脂肪烃侧链,称为叶绿醇。叶绿素通过卟啉环中的单键和双键的改变来吸收可见光,叶绿素a与叶绿素b在吡咯环Ⅱ上的附加基团上有差异,叶绿素a是甲基,而叶绿素b是醛基。叶绿素很不稳定,遇到光、酸、碱、氧、氧化剂等都会使其分解。在制备过程中,需要避光进行,同时采用现摘现测,以避免叶绿素分子发生变化。笔者采用傅里叶变换红外光谱仪(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)研究了从马尾松松针中萃取的叶绿素的太赫兹光谱特性,并与市售的植物叶绿素a标准样和b标准样进行比较,采用密度泛函理论(DFT)分析其差异及产生的原因。

1 材料与方法

1.1 松针和叶绿素样品的制备

从1年生长势均一的盆栽马尾松苗上采集松针,松针质量为5 g,剪碎浸泡于10 mL丙酮溶液中,离心去除沉淀;将含有叶绿素和其他色素的溶液混合物与聚乙烯粉末混合,经过冷冻烘干后,研磨均匀并压片。为了比较不同植物叶绿素的吸收谱,叶绿素a和b标准样购于上海将来试剂公司,

均从菠菜中提取,样品纯度高于90.0%,叶绿素a和b样品呈晶体状。将0.01 g叶绿素与0.09 g聚乙烯粉末均匀混合后,用研钵研磨均匀,以减小散射效应对光谱的影响。

1.2 测试装置和方法

太赫兹光谱实验测试采用德国Bruker公司的Vertex80V型傅里叶变换红外光谱仪^[11],傅里叶变换红外光谱仪覆盖远红外(太赫兹波段)、中红外和近红外频段,频率范围为0.15~375 THz。测试频段范围为1~4 THz,处于太赫兹频段。测量时抽真空以减少空气中水分对太赫兹信号的吸收,远红外光谱测试过程中使用工作在液氦温度的Bolometer探测器,以提高仪器的灵敏度。

1.3 理论计算

采用Gaussian09软件,使用半经验算法AM1和密度泛函(density functional theory)理论及6~31G(d)基组^[12],分别对叶绿素a和b单分子结构进行尺寸优化并计算吸收频率,与实验结果比较。

2 结果与分析

2.1 样品的光谱测试

从健康马尾松松针中萃取的色素(其中大部分为叶绿素,故文中称之为叶绿素),以及叶绿素a和b标准样的太赫兹光吸收谱进行比较,如图1所示。光谱显示在1~4 THz范围内,叶绿素a和b标准样出现很多微弱的吸收峰,除了部分吸收峰出现红移(向低频段偏移)和蓝移(向高频段偏移),大部分吸收峰位置一致,如叶绿素a在1.07和1.23 THz存在吸收峰,将其吡咯环Ⅱ上的附加基团由甲基变为醛基,形成叶绿素b分子,其频率产生红移,分别移向1.02和1.13 THz。在以2.86 THz为中心、宽约0.8 THz的频段,3种样品呈现一个包络吸收频段,其中萃取的叶绿素出现较大的吸收,其他两种标准样品呈现较弱的吸收峰,进行差分处理后,在2.86 THz附近出现一些吸收峰,整体呈现包络峰。根据DFT计算得知,该频率点的吸收峰来自于叶绿素分子内核心部分卟啉环的振动和转动。在萃取的叶绿素中除包含叶绿素a和b两种成分,同时含有其他色素等成分,这些成分可能含有与叶绿素类似的官能团,表现为加强了光谱在2.86 THz处的吸收;而在其他频率点,叶绿素与色素分子之间的相互作用,以及不同官能团的吸收特性差异,导致其与叶绿素a和b标准样在吸收峰位置、强度上存在较大差别。需要说明的是,经多次实验发现,在3.4 THz吸收率急剧降低,分析认为

是由与叶绿素混合的 PET 产生的吸收^[13]引起。

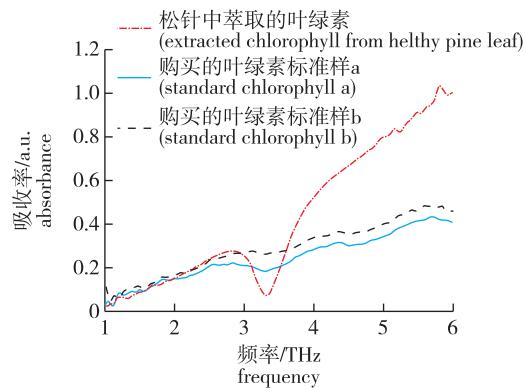


图 1 测试的叶绿素 a,b 以及从松针中萃取的叶绿素的吸收率

Fig.1 Absorption coefficient of chlorophyll a, b and extracted chlorophyll from pine leaf

2.2 太赫兹测试实验与理论结果的对比

对叶绿素 a 与叶绿素 b 标准样的分子结构建立的模型见图 2, 可以看出, 两者仅在吡咯环 II 的附加基团上有差异, 叶绿素 a 是甲基, 而叶绿素 b 是醛基。采用 Gaussian09 软件, 首先使用半经验算法 AM1 对单分子叶绿素 a 和 b 进行尺寸优化, 得

到初始的基态分子, 应用密度泛函(density functional theory)理论和 6-31G(d)基组, 再对其优化尺寸并计算频率, 所得的频率计算结果均无虚频, 说明优化的分子结构在基态较稳定, 计算结果可靠。

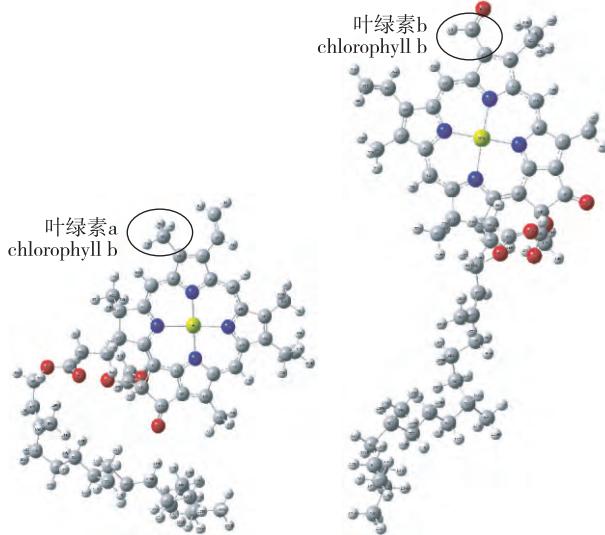


图 2 叶绿素 a 标准样和 b 标准样的分子结构

Fig.2 Structures of chlorophyll a (left) and chlorophyll b (right)

叶绿素 a 和 b 标准样的太赫兹测试光谱, 以及采用 Gaussian 软件仿真的光谱比较见图 3。

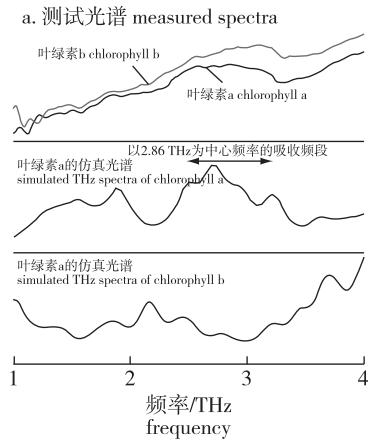
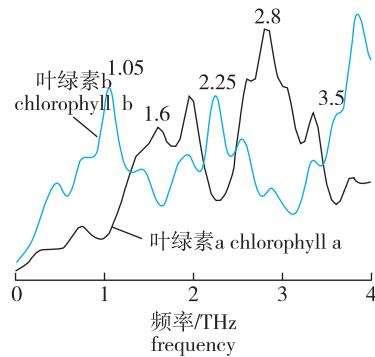


图 3 测试和仿真的叶绿素 a 标准样和 b 标准样的太赫兹光谱

Fig.3 Measured and simulated THz spectra of chlorophyll a and chlorophyll b

b. 0~4 THz 仿真光谱
simulated spectra at 0~4 THz



在以 2.86 THz 为 中心频率、宽约 0.8 THz 的频段范围内, 计算的叶绿素 a 和 b 光谱呈现吸收峰, 吸收峰位置和测试结果较为吻合, 但是强度存在差异。其中叶绿素 a 与测试结果一致, 吸收峰呈现包络形状, 而叶绿素 b 的吸收虽然也呈现吸收峰, 但未呈现包络形状。出现理论计算结果与实验不一致, 可能是由于实验测试采用叶绿素晶体结构, 理论计算中采用叶绿素 a 和 b 的单分子结构, 计算结

果仅呈现分子内的相互作用力, 分子间的相互作用未得到体现。而分子间的作用力、范德华力及氢键对太赫兹光谱特性有重要的影响^[14-15], 笔者曾在维生素类分子研究中发现分子间的作用力对太赫兹吸收峰影响较大, 造成吸收峰的红移和蓝移, 并严重弱化一些吸收峰, 且叶绿素 b 分子间的作用力要强于叶绿素 a, 导致了包络吸收峰的消失^[5]。这对于分析叶绿素的多分子结构对吸收峰位置的影

响具有借鉴意义。

进一步比较在0~4 THz范围内计算的叶绿素a和b的太赫兹光谱可以发现,在1.05、1.6、2.25、2.8、3.5 THz处,叶绿素a与叶绿素b因结构微小的差别,吸收峰具有明显的差异,其中叶绿素b的吸收谱线中1.05 THz处吸收峰便是由醛基的振动产生的。

3 讨 论

采用密度泛函理论(DFT)分析了叶绿素分子a和b的光谱特性,测试了萃取的健康马尾松针叶绿素和市售的叶绿素a及b标准样的光谱特征,并具体讨论了实验和理论计算结果的差异性。实验表明3种样品在以2.86 THz为中心频率、宽为0.8 THz的频段,均出现包络吸收峰,该频段的吸收峰来自于叶绿素结构里的核心部分卟啉环分子的振动和转动。由于萃取的叶绿素中含其他色素,其可能与叶绿素分子结构类似的官能团加强了在2.86 THz的吸收,因此其包络吸收强度高于叶绿素a和b标准样。在其他频率点,叶绿素与色素分子之间的相互作用,以及不同官能团的吸收特性差异,导致萃取的叶绿素与叶绿素a和b标准样在吸收峰位置、强度上存在较大差别。DFT计算结果验证了叶绿素a在2.86 THz频段的包络吸收峰,理论计算与测试结果较为吻合,而叶绿素b在此频段无包络吸收峰,是由于理论计算采用单分子结构,忽略了分子间的作用力,故推断分子间的作用力对2.86 THz频段的吸收有加强作用。在2.86 THz包络吸收峰以外的其他频段,由于叶绿素a和叶绿素b在吡咯环II上的附加基团上存在的差异,将叶绿素a中的甲基演变为叶绿素b中的醛基,引起太赫兹吸收峰的偏移,即1.07、1.23 THz等处出现的红移。以上研究结果表明在太赫兹频段,相比于分子内的作用力,分子间的作用力对吸收峰也存在一定的影响,这与生物分子在中红外及近红外频段的光谱特性有很大不同。该研究对太赫兹光谱在生物分子混合物测定和安全检测领域有一定的借鉴意义,也为研究松材线虫病害引起的叶绿素分子结构的变化,进而导致太赫兹吸收峰频率的偏移提供了检测依据。

参考文献(References):

- [1] Sakai K. Terahertz optoelectronics: topics in applied physics [M]. Berlin: Springer, 2005: 97.
- [2] Nagel M, Richter F, Haring-Bolivar P, et al. A functionalized THz sensor for marker-free DNA analysis [J]. Physics in Medicine and Biology, 2003, 48(22):3625–3636.
- [3] Woodward R M, Wallace V P, Pye R J, et al. Terahertz pulse imaging of ex vivo basal cell carcinoma [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2003, 120(1):72–78.
- [4] Falconer R J, Markelz A G. Terahertz spectroscopic analysis of peptides and proteins [J]. Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 2012, 33(10):973–988.
- [5] Jiang L, Li M, Li C, et al. Terahertz spectra of L-ascorbic acid and thiamine hydrochloride studied by terahertz spectroscopy and density functional theory [J]. Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, 2014, 35(10):871–880.
- [6] Shafri M, Zulhaidi H, Salleh M, et al. Hyperspectral remote sensing of vegetation using red edge position techniques [J]. American Journal of Applied Sciences, 2006, 3(6):1864–1871.
- [7] Jago R A, Cutler M E J, Curran P J. Estimating canopy chlorophyll concentration from field and airborne spectra [J]. Remote Sensing of Environment, 1999, 68(3):217–224.
- [8] Dawson T P, Curran P J. A new technique for interpolating the reflectance red edge position [J]. International Journal of Remote Sensing, 1998, 19(11):2133–2139.
- [9] 杜华强,葛宏立,范文义,等.马尾松针叶光谱特征与其叶绿素含量间关系研究[J].光谱学与光谱分析,2009,29(11):3033–3037.
- Du H Q, Ge H L, Fan W Y, et al. Study on relationships between total chlorophyll with hyperspectral features for leaves of *Pinus massoniana* forest [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(11):3033–3037.
- [10] 徐华潮,骆有庆,张廷廷,等.松材线虫自然侵染后松树不同感病阶段针叶光谱特征变化 [J].光谱学与光谱分析,2011,31(5):1352–1356.
- Xu H C, Luo Y Q, Zhang T T, et al. Changes of reflectance spectra of pine needles in different stage after being infected by pine wood nematode [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(5):1352–1356.
- [11] Bruker Corporation. Bruker Vertex 80v specification. [2005–05–10]. <http://www.bruker.com/products/infrared-and-raman-spectroscopy/ft-ir-research-spectrometers/vertex-series/vertex-8080v/overview.html>.
- [12] Xu J, Plaxco K W, Allen S J. Absorption spectra of liquid water and aqueous buffers between 0.3 and 3.72 THz [J]. The Journal of Chemical Physics, 2006, 124(3):36101.
- [13] 李春,李森,蒋玲.基于宽频段太赫兹光谱技术的抗坏血酸和硫胺素研究 [J].光谱学与光谱分析,2015,35(4):595–598.
- Li C, Li M, Jiang L. Research on L-ascorbic acid and thiamine based on wide-band terahertz spectroscopy technique [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2015, 35(4):595–598.
- [14] Thomas K O, Rafal W, Frank R. Probing noncovalent interaction in biomolecular crystals with terahertz spectroscopy [J]. Chem Phys Chem, 2008, 9(4):544–547.
- [15] Matthew D K, Timothy M K. Noncovalent interactions between modified cytosine and Guanine DNA base pair mimics investigated by terahertz spectroscopy and solid-state density functional theory [J]. Journal of Physical Chemistry: A, 2011, 115(50):14391–14396.

(责任编辑 刘昌来)