

傅里叶变换红外光谱技术在植物学中的应用

左云, 刘畅, 方炎明* (南京林业大学生物与环境学院, 江苏南京 210037)

摘要 综述了傅里叶红外光谱技术的工作原理及其在生物大分子、亲缘地理学和生理学上的应用, 指出了傅里叶红外光谱技术今后的发展方向, 为傅里叶红外光谱技术在植物学领域的研究提供借鉴。

关键词 傅里叶红外光谱技术; 生物大分子; 亲缘地理学; 植物生理

中图分类号 Q94 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)23-0006-03

Application of FTIR Technology in Botany Research

ZU Yun, LIU Chang, FANG Yan-ming* (College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract We reviewed the working principle of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and its applications in biological macromolecules, affinity geography and physiology, and pointed out the future development direction in order to provide reference for FTIR application in the study of botany in the future researches.

Key words Fourier transform infrared spectroscopy; Biological macromolecules; Affinity geography; Plant physiology

傅里叶红外光谱技术(FTIR)应用十分广泛, 几乎涉及到自然科学的每个领域, 如化工、食品、医药、环境、气象、文物鉴定、质量监控、地质等^[1]。近年来, FTIR 也越来越多地被应用到植物学领域。不同的化学成分具有不同的红外光谱, 傅里叶变换红外光谱根据这个特性, 能够进行快速准确的辨别鉴定^[2]。笔者综述了 FTIR 的工作原理及其在生物大分子、亲缘地理学和生理学上的应用, 并探讨了 FTIR 在植物学研究中遇到的一些问题, 旨在为 FTIR 在植物学领域的应用提供借鉴。

1 FTIR 的工作原理

FTIR 是利用傅里叶变换红外光谱仪测量样品宽带红外光谱, 对样品进行定性定量分析的一门技术。FTIR 具有的“指纹”特征性, 使得人们利用傅里叶变换红外光谱仪检测化合物中官能团和极性键振动的分子振动光谱, 不同化合物具有不同的分子特征振动和转动频率, 从而鉴定出其化学成分^[1]。

傅里叶变换红外光谱仪属于干涉性光谱仪, 由红外光源、干涉仪、样品室、检测器、激光器、红外反射镜、控制电路和电板组成。光源发出一束光, 通过干涉仪, 被干涉仪分成 2 束光, 一束透射到达动镜, 一束反射到达定镜。透射到达动镜的红外光被反射到分束器后, 有一部分被透射返回光源, 另一部分经反射到达样品; 反射到定镜的光再经过定镜的反射作用到达分束器后, 一部分经过分束器的反射作用返回光源, 另一部分透过分束器到达样品。用红外光照射样品, 在特定波长范围的能量与分子的振动能量相当, 就被分子吸收。分子由低能态过渡到高能态, 产生能级跃迁, 出现红外分子吸收光谱, 其中吸收谱带的强度取决于偶极矩的变化大小^[3-4]。

FTIR 具有灵敏度高、操作简单、重复性好的优点, 被广

泛应用在医学、化工、气象、文物鉴定等研究领域^[5]。随着 FTIR 的不断成熟, 在植物学中的应用也越来越广泛, 如研究探测生物大分子结构, 包括蛋白质二级结构的测定、核酸和脂质的研究、植物亲缘地理关系的研究、植物生理指标的测定等。

2 FTIR 在生物领域的应用

FTIR 作为一种现代结构常用的分析技术, 摒弃了传统的化学分析方法, 是生物大分子研究领域的一大突破。FTIR 现已被用来观测分析蛋白质结构变化, 检测脂质和糖类的含量及种类。

2.1 FTIR 在生物大分子上的应用

2.1.1 FTIR 在蛋白质上的应用。蛋白质是一类极为重要的生物大分子, 几乎各种生命活动都与蛋白质有关, 蛋白质的构象影响蛋白质的功能。FTIR 可观测到蛋白质结构的微小变化, 定量分析蛋白质的各二级结构, 逐渐发展成为定量分析蛋白二级结构常用的手段^[6-7]。

蛋白质受到物理或者化学因素的影响, 二级结构发生变化, 蛋白质变性后二级结构中的 α -螺旋向 β 结构转化, 但是一级结构没有改变。红外光谱分析蛋白二级结构的步骤^[6]: 首先对蛋白质在酰胺 I 带的红外特征吸收峰进行分辨率增强处理, 得到蛋白二级结构组分的个数和位置; 其次对酰胺 I 带进行光谱分峰拟合得到不同蛋白二级结构的含量。Glassford 等^[8]介绍了衰减全反射-傅里叶红外光谱技术(ATR-FTIR)作为无标记、非破坏性的分析技术, 应用在蛋白质呈像上的最新研究结果。Sarroukh 等^[9]利用 ATR-FTIR 研究类淀粉蛋白的结构和生物功能, 认为该技术在研究结构蛋白聚集转化到多肽过程中的持续观测优势。沈子威等^[10]利用 FTIR 研究在不同频率和不同功率的强声波作用下花粉细胞的细胞壁蛋白质二级结构的变化, 结果显示 400 Hz 的强声波对细胞壁膜的相行为及蛋白质二级结构具有明显的影响。刘鹭等^[11]为了探讨铬对蛋白结构的影响, 使用 FTIR 分析铬作用前后蛋白质二级结构的变化, 结果显示, 铬与蛋白的键合导致大分子蛋白中的 α -螺旋结构和无

作者简介 左云(1990—), 女, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 研究方向: 植物学。* 通讯作者, 教授, 博士生导师, 从事植物学研究。

收稿日期 2017-05-24

规则卷曲结构被破坏,导致蛋白质变性。

2.1.2 FTIR 在糖上的应用。广泛分布在植物体各种组织中的糖是植物碳水化合物的重要运转和存储物质。植物生理上,糖的测定常使用蒽酮比色法,可是这种方法不仅繁琐,更具有危险性。FTIR 的使用能够大大降低试验过程中的安全隐患。

常静等^[12]利用傅里叶变换红外光谱测定不同等级灵芝的多糖含量,结果表明,不同等级灵芝的吸光度变量与灵芝多糖含量之间显著相关。Wang^[13]采用 FTIR 对来自 14 个地区的白英细胞壁中半纤维素、多糖、木质素 3 个指标进行快速鉴定对比,发现这 3 个指标可以作为特征值,来鉴别不同地区的白英。李伦^[1]研究了木兰科 14 种植物不同叶龄的红外光谱,发现尽管红外光谱吸收峰的位置基本一致,然而特征峰不同,通过数据拟合以及子峰峰高比分析,可以计算多糖的相对含量。孙元琳等^[14]建立了一套对果胶多糖酯化度快速鉴定的方法,与过去的化学滴定法相比,FTIR 大大提高了工作效率,是一种可行的方法。

2.1.3 FTIR 在脂质上的应用。FTIR 在脂质上应用也越来越常见。由脂肪酸和醇反应生成的酯及其衍生物统称为脂类,包括油脂、类脂、类固醇等。通常情况下脂质的测定采用索氏提取法,然而这种方法存在很多弊端,FTIR 的使用可以弥补这些不足。

Wang 等^[15]研究表明,FTIR 能够有效测定南美油藤种子不饱和脂肪酸和亚麻酸的含量,并且能够表明种子发育过程中基因表达和脂质/不饱和脂肪酸积累之间的关系。Dean 等^[16]通过控制淡水中 N 含量,利用 FTIR 检测衣藻和淡水藻中脂质的含量,衣藻和淡水藻的快速代谢反应能够改变其营养的可利用性,FTIR 可作为一种有效的方法用于高通量脂质诱导的测定。范璐等^[17]分析大豆、棕榈、芝麻、菜籽、花生、棉籽、米糠、油 8 种植物的成分,通过植物的红外吸收光谱,可以对 8 种植物的油脂进行鉴定。

目前,FTIR 在生物大分子上应用主要集中在对蛋白质二级结构的测定,对核酸、脂质和糖类的研究相对较少,需进一步研究。

2.2 FTIR 在亲缘地理学上应用 目前,研究植物亲缘地理关系的主要方法是分子生物学方法和生物化学方法,但是这些方法的应用存在以下几个弊端:方法技术复杂;需要大量的化学试剂;样品处理耗时且耗资^[18]。FTIR 在亲缘地理学上的应用很大程度上解决了上述问题。FTIR 主要运用不同种群的植物具有不同的化学成分,不同的化学成分产生红外光谱特征吸收峰的强度和位置峰形不同,这些特性是人们鉴别植物类群及其亲缘关系的主要依据,也就是 FTIR 的“指纹”特征。

近年来,FTIR 在系统分类方面取得了很多进展,涉及苔藓植物、蕨类植物、被子植物等高等植物。田兰婷等^[19]鉴定 9 种来自于陕西省的大戟属叶片红外光谱,分析比较这些图谱的差异,划分地锦草、大戟、华北大戟、湖北大戟、南大戟、乳浆大戟和泽漆为一类,甘遂和续随子各自单独为一类。

Gao 等^[20]研究了长序榆的亲缘地理关系,FTIR 结果表明浙江开化、浙江遂昌和江西武宁是一个类群,浙江松阳和福建南平是一个类群,安徽歙县和浙江临安是另一个类群。Jungandreas 等^[21]研究表明,FTIR 对硅藻细胞应对各种非生物因素的生理和生化反应的研究是有效的技术支撑。有学者采用 FTIR 测定研究草豆蔻、红豆蔻、云南草蔻和长柄山姜 4 种姜科植物,得出云南草蔻和草豆蔻的亲缘关系最近^[22]。罗庇荣等^[23]对杜鹃 4 个亚属的花瓣进行 FTIR 测试,结果显示同种花瓣峰形相似,不同种花瓣峰形有差异,证明了 FTIR 能够应用于准确鉴别 4 个杜鹃亚属。FTIR 也被应用于苔藓的分类。孔黎春等^[24]利用该技术测定齿边缩叶藓、多枝缩叶藓和中华缩叶藓 3 种缩叶藓属植物的红外谱图,分类结果显示水平衰减全反射-傅里叶变换红外光谱法具有较好的可行性。

有研究表明,FTIR 在亲缘地理学上的应用存在缺陷,在有些情况下 FTIR 不能测定同属不同种间的植物。陈国奇等^[25]使用 OMNI 采样器-傅里叶变换红外光谱对 8 科 80 种草本被子植物种子进行检测,聚类分析结果发现,其中有 8 组植物与亲缘关系不同的其他属植物混合在一起,在 7 组同种不同亚种或品种植物中,仅有 1 组植物被聚合在一起,也说明 FTIR 在对植物亲缘关系研究或者分类上具有一定的局限性。但是随着科学技术的不断发展,FTIR 与其他技术的联用为解决这个弊端提供了可能。

2.3 FTIR 在生理学上应用 植物生理学上常见的有机物测定往往是在植物样品进行提取、分离、蒸馏等多种方式之后对提取液进行分析测定。这种方法存在很多局限性,不仅样品的提取需要消耗人力、物力和财力,而且因为分析的结果不是原有活体状态下进行的检测,所以其结果往往存在多重误差。另外,植物样品中的成分多且复杂,会导致样品中各种分光谱之间相互叠加或者是特征峰的重叠。FTIR 在生理学上的应用大大解决了这些问题,傅里叶变换红外光谱仪对植物样品进行检测时,不用化学处理,大大缩短了人资物力消耗。其次,在原有活体状态下对植物样品中的有机物进行检测,没有破坏原有植物样品的组织和结构,相对避免了结果误差。再者,FTIR 应用简单、方便、易于操作。总之,FTIR 具备这些优点,使其在植物生理上的应用被越来越多的人接受^[26]。

付川等^[27]利用 FTIR 研究紫花苜蓿对铜胁迫的耐性机理,用不同浓度铜处理紫花苜蓿的根茎叶后,采用 FTIR 测其化学成分的变化,结果显示铜对紫花苜蓿的化学成分影响不大。然而薛生国等^[28]采用 FTIR 测定锰胁迫处理后的酸模叶蓼,发现锰浓度较低时,茎组织里的糖类和氨基酸等有机物增加,叶组织中的氨基酸、多肽和蛋白质类物质含量增大,当锰浓度升高时,植物耐锰性增强,但是有机物含量下降。吴秀文等^[29]研究钾硼胁迫对棉花叶片物质成分的影响,FTIR 结果表明缺少钾处理时有 4 个特征峰消失,其他特征峰的吸光值低于对照处理,说明蛋白质、核糖、可溶性糖、纤维素的含量降低并且结构发生改变;缺硼处理时,特征峰的吸光

值高于对照组,说明缺硼阻碍蛋白质、可溶性糖等碳水化物的运输导致含量增加;在硼铁同时缺少时,吸收强度和特征峰的位置与对照处理有很大的差别,发现多糖和核酸含量降低,而可溶性糖和蛋白质的含量增加。Xie 等^[30]比较现代楠木和古代埋埋楠木的化学成分、化学结构和精油成分,FT-IR 检测发现古代楠木的木质素高于现在楠木,但是现在楠木的半纤维素含量高于古代楠木。

3 展望

近年来,计算机技术飞速前进推动了 FTIR 的发展,许多行业利用其来鉴别物质的真伪和含量的多少,但是 FTIR 也存在一些缺陷,需要人们对 FTIR 进行不断的完善和补充。

未来 FTIR 的发展主要趋向于建立各种标准光谱特征数据库,方便快速准确地鉴别物质属性,如完善建立蛋白质或者核酸的特征数据库,便于精准地实现蛋白质或核酸的鉴定。其次,FTIR 向仪器的专门化、微型化和普及化的方向发展^[31]。例如,在大气监测领域出现了遥感 FTIR,这种大气监测技术是根据实际情况发展而成,不仅能够同时检测多种大气中存在的化合物,而且能够提供远距离的实时监测^[32]。20 世纪 80 年代初将显微技术应用到傅里叶变换红外光谱仪,诞生了衰减全反射-傅里叶变换红外光谱,使微区成分的分析变得方便而快捷,主要应用于塑料、橡胶、纺织等领域的检测,近年来在物质的化学行为或者物理方面也开始使用^[33]。红外发展的方向主要是红外连用技术,相继出现了变温红外、高压红外、红外光声光谱、偏振红外、红外遥感技术和色散光谱^[34]。傅立叶变换红外光谱仪与色谱的联用可进行多组分样品的分离与定性,傅立叶变换红外光谱仪与热重联用可进行样品的热稳定性研究,与拉曼光谱联用可得到红外光谱弱吸收的信息^[35]。

FTIR 具有传统化学分析法所不可比拟的优越性,这种方法能够快速而准确地鉴定植物的化学结构和成分,对植物生理生化有深远的影响。目前,傅里叶红外光谱与其他技术的联用为精准有效地鉴定植物亲缘地理关系提供了可能,未来 FTIR 在植物学上的应用将在生物大分子和测定植物生理生化 2 个方面得到更广泛的推广。

参考文献

- [1] 李伦. 基于傅里叶变换红外光谱的木兰科植物和竹类植物分类研究[D]. 昆明:云南师范大学,2013.
- [2] 邱璐,李晓勇,刘鹏,等. 九种蔷薇科植物叶片的傅里叶红外光谱与亲缘关系分析[J]. 光谱学与光谱分析,2014,34(2):344-349.
- [3] 韦柳花,苏敏,诸葛天秋,等. 傅里叶变换红外光谱技术在茶叶领域研究中的应用与展望[J]. 广西农学报,2014,29(6):40-43.
- [4] 顾聚兴. 傅里叶变换红外光谱仪[J]. 红外,2009,30(6):4.
- [5] 熊庆,郭彩红,宋红杰,等. 傅里叶变换红外光谱法中的对比实验教学设计[J]. 实验科学与技术,2014,12(5):11-12.
- [6] 李亦易,邹烨,李冬敏,等. 红外光谱法定量分析蛋白二级结构研究中水汽影响的评估[J]. 河北大学学报(自然科学版),2012,32(6):608-612.
- [7] 张秋会,黄现青,李苗云,等. 傅里叶红外光谱法研究肌肉蛋白质的二级结构[J]. 食品与发酵工业,2015,41(10):247-251.
- [8] GLASSFORD S E, BYRNE B, KAZARIAN S G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins[J]. Biochimica et biophysica acta(BBA)-proteins and proteomics,2013,1834(12):2849-2858.
- [9] SARROUKH R, GOORMAGHTIGH E, RUYSSCHAERT J M, et al. ATR-FTIR: A "rejuvenated" tool to investigate amyloid proteins[J]. Biochimica et biophysica acta(BBA)-biomembranes,2013,1828(10):2328-2338.
- [10] 沈子威,孙克利,杨钧,等. 应用傅里叶红外光谱研究强声波作用下植物壁蛋白质二级结构变化[J]. 光子学报,1999,28(7):600-602.
- [11] 刘鹭,侯东军,陈锋亮,等. 红外光谱法研究铬对酵母细胞内蛋白二级结构的影响[J]. 核农学报,2012,26(3):505-510.
- [12] 常静,唐延林,刘子恒,等. 灵芝多糖含量的红外光谱预测模型研究[J]. 光谱实验室,2010,27(2):677-680.
- [13] WANG Y L. Application of Fourier transform infrared microspectroscopy (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) for quick identification of Chinese herb *Solanum lyratum* [J]. Plant omics,2012,5(6):508-513.
- [14] 孙元琳,崔武卫,顾小红,等. 傅里叶变换红外光谱法测定当归果胶多糖的酯化度[J]. 光谱学与光谱分析,2009,29(3):682-685.
- [15] WANG X J, LIU A Z. Expression of genes controlling unsaturated fatty acids biosynthesis and oil deposition in developing seeds of *Sacha Inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) [J]. Lipids,2014,49(10):1019-1031.
- [16] DEAN A P, SIGEE D C, ESTRADA B, et al. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae[J]. Bioresource technology,2010,101(12):4499-4507.
- [17] 范璐,李娟. 红外光谱法识别八种植物油脂[C]// 河南省化学学会 2012 年学术年会论文摘要集. 开封:河南省化学学会,2012.
- [18] 杨佳. 傅里叶变换红外光谱技术在芝麻油真伪鉴别、掺伪与品质分析中的应用[D]. 北京:北京林业大学,2013.
- [19] 田兰婷,赵雪艳,王宁果,等. 陕西 9 种大戟属植物红外光谱分析及其分类学意义[J]. 植物研究,2016,36(2):310-315.
- [20] GAO J G, WU Y H, XU G D, et al. Phylogeography of *Ulmus elongata*, based on Fourier transform-infrared spectroscopy (FTIR), thermal gravimetric and differential thermal analyses[J]. Biochemical systematics & ecology,2012,40(2):184-191.
- [21] JUNGANDREAS A, WAGNER H, WILHELM C. Simultaneous measurement of the silicon content and physiological parameters by FTIR spectroscopy in diatoms with siliceous cell walls[J]. Plant & cell physiology,2012,53(12):2153-2162.
- [22] 刘艳,司民真,李家旺,等. 4 种山姜属植物的傅里叶变换红外光谱分析[J]. 安徽农业科学,2015,43(24):49-51,54.
- [23] 罗底荣,刘刚,张玉宾,等. 基于花瓣的傅里叶变换红外光谱鉴别分类杜鹃属植物[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(4):943-948.
- [24] 孔黎春,余鹏,程存归. 水平衰减全反射-傅里叶变换红外光谱结合化学计量学法应用于三种缩叶藓属植物的分类[J]. 理化检验(化学分册),2012,48(4):405-409.
- [25] 陈国奇,郭水良,韩琴筱,等. FTIR 在植物分类学中应用范围和方法的探究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版),2008(6):88-95.
- [26] 王赢. 铝胁迫蚕豆 FTIR 特征及生理特性的研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2010.
- [27] 付川,余顺慈,黄怡民,等. 紫花苜蓿对铜胁迫生理响应的傅里叶变换红外光谱法研究[J]. 生态学报,2014,34(5):1149-1155.
- [28] 薛生国,黄艳红,王钧,等. 采用 FTIR 法研究酸模叶蓼对锰胁迫生理响应的影响[J]. 中南大学学报(自然科学版),2011,42(6):1528-1532.
- [29] 吴秀文,郝艳淑,雷晶,等. 钾硼胁迫对棉花功能叶物质成分影响的 FTIR 表征[J]. 光谱学与光谱分析,2016,36(3):676-680.
- [30] XIE J L, QI J Q, HUANG X Y, et al. Comparative analysis of modern and ancient buried *Phoebe zhennan*, wood: Surface color, chemical components, infrared spectroscopy, and essential oil composition[J]. Journal of forestry research,2015,26(2):501-507.
- [31] 吕金光. 空间调制傅里叶变换红外光谱仪系统设计与信息处理研究[D]. 北京:中国科学院大学,2013.
- [32] 付琼. 遥感 FTIR 在大气环境监测领域的应用及新发展论述[J]. 工业,2015(25):49.
- [33] 姚杰,徐信武,冯玉英. 用红外光谱法研究麦秸各层面的化学组成[J]. 光谱学与光谱分析,2003,23(1):58-60.
- [34] 高扬. TurboFT 傅里叶变换红外辐射仪控制软件与数据处理方法研究[D]. 北京:中国地质科学院,2014.
- [35] 孙素琴,周群,陈建波. 中药红外光谱分析与鉴定[M]. 北京:化学工业出版社,2010.