

叶绿素的脉冲激光光声研究*

左伯莉 邓延倬** 曾云鹄

(武汉大学化学系, 武汉 430072)

提 要

用光声法研究了叶绿素的光声信号与入射激光能量及激光照射时间的关系。用液体流动光声池与高效液相色谱联机, 在 610nm 处得到叶绿素 a、b 的光声色谱图, 研究了叶绿素 a/b 比值与激光辐照时间的函数关系。

关键词 激光, 光声, 液相色谱, 叶绿素

光声谱是基于测量样品吸收光能后的无辐射弛豫而建立起来的一种光谱分析技术。它有着较高的灵敏度和广泛的适用性, 对样品形态无特殊要求, 特别是对常规吸收光谱法难以检测的一些高散射、不透明样品, 它亦能测定。所以, 光声法在生物、医学等领域有着广泛的应用前景^[1]。

叶绿素存在于叶绿体中。它是植物在光合作用中吸收光能的主要色素, 在光合作用中具有重要地位, 曾对它进行了广泛而深入的研究^[2]。在叶绿素研究中, HPLC 技术和分光光度法是人们熟知的分离纯化和吸收光谱研究的重要手段。近年来, 光声法也用于叶绿素及光合作用的研究^[3-5]。由于光声法的优异特点, 曾用它研究过粉末和溶液状态下的叶绿素光谱特性及未损伤的绿叶。本文作者亦曾比较过螺旋藻处于正常生理状态下和有 DCMU 存在下光声谱 (610nm—680nm) 的差异^[6]。DCMU 的存在, 切断了光合电子转移链, 使光合作用受阻, 叶绿素吸收的光能更多地以热去激励方式释放出来, 因而观察到光声信号增强。

本文用脉冲激光光声法研究了菠菜叶绿素乙醇提取液对激光辐照的稳定性。用 HPLC 与光声检测器联机, 分离测定了叶绿素 a 和 b, 以及 a/b 比值在激光辐照下随时间的变化。发

现在辐照初期, a/b 比值随辐照时间增加而呈指数下降, 表明叶绿素 a 比 b 更易于光致损伤, 同时也表明激光光声法及其与 HPLC 联机检测技术在生物化学研究中可望成为一种新的分离分析技术。

实验装置和样品

1. 实验装置

用于色谱分离和光声测定的实验装置如图 1 所示。脉冲激光由 Nd:YAG 倍频泵浦的染

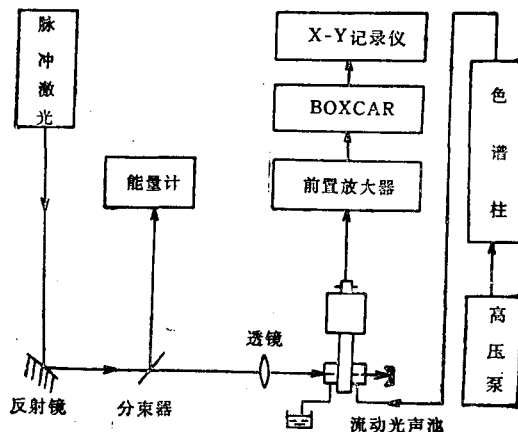


图 1 光声色谱实验装置图

* 国家自然科学基金资助课题。

** 通讯联系人, 武汉大学分析测试中心。

料激光器 (Quintel 公司) 提供。脉宽约 8ns, 重复率 10Hz。染料为 DCM + LK700, 输出波长 610—680nm。实验用的液体光声池和流动光声池分别与文献[7]和[8]中所用的相同。光声信号经前置放大后输入 BOXCAR 积分器 (162/165 型, PAR 公司) 进行信号处理, 用 X-Y 记录仪记录。色谱柱为不锈钢柱 ($\phi 4.6 \times 150\text{mm}$), 填料 C_{18} , $d_p 10\mu\text{m}$ 。高压泵为 YSB-2 型往复平流泵 (中国科学院上海分院科学仪器厂)。流动相为 95% 乙醇, 使用前真空过滤并除气。柱压 30kg/cm^2 , 流速 0.3ml/min , 每次进样量 $10\mu\text{l}$ 。

2. 样品

样品为菠菜叶绿素乙醇萃取液。取新鲜菠菜叶 10g, 除去叶脉, 剪碎, 用研钵碾碎, 加入 20ml 无水乙醇, 用棉花及滤纸先后过滤, 得到叶绿素的乙醇萃取液。

结果和讨论

1. 叶绿素光声信号与人射激光能量的关系

用液体传感器得到如图 2 所示的在不同能量激光照射下, 叶绿素的光声信号响应曲线。激光能量低于 1.2mJ 时, 叶绿素吸光后产生的热弹信号与人射能量成线性关系。能量超过 1.2mJ 时, 曲线趋于平坦, 产生非线性效应。其原因是由于叶绿素部分地被破坏, 光吸收能力下降。

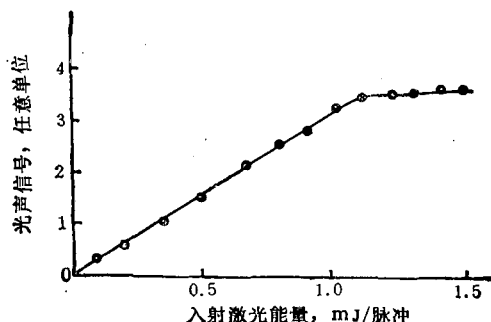


图 2 叶绿素光声信号与人射激光能量的关系曲线 ($\lambda = 610\text{nm}$)

2. 激光照射时间对光声信号的影响

为了解在高能量脉冲激光持续照射下, 叶

绿素对光照的稳定性, 我们将叶绿素溶液置于 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 比色皿中, 激光束 (截面 0.196cm^2) 从比色皿上方直接照射样品溶液, 得到叶绿素光声信号强度的时间曲线 (图 3)。由图 3 可见, 在 1.2mJ /脉冲的激光照射下, 叶绿素溶液光声信号强度随照射时间增加而迅速下降。实验说明, 叶绿素溶液很易受到光破坏, 尤其在强光作用下, 其吸光功能迅速下降。

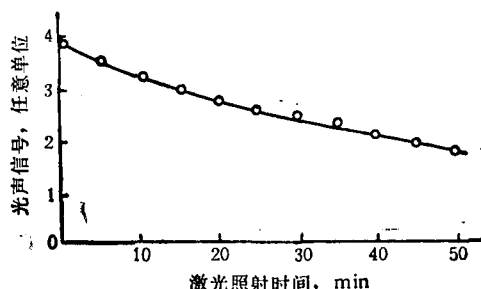


图 3 脉冲激光照射时间对叶绿素光声信号的影响 (激光能量: 1.2mJ /脉冲)

3. 叶绿素 a、b 的光声色谱分离测定

菠菜中含有多种植物色素, 但在 610nm 波长下, 只有叶绿素 a、b 有吸收。在叶绿素 a、b 的 HPLC 分离实验中, 曾选用过多种溶剂。结果表明, 甲醇或乙腈为流动相时, 背景信号强; 用无水乙醇, 叶绿素 a、b 不能有效分离, 乙醇中含水过多, 保留时间太长。最佳的流动相为 95% 乙醇, 它能很好地分离叶绿素 a 和 b, 保留时间分别为 15.6min 和 12min (图 4), 与紫外色谱图相一致^[9]。

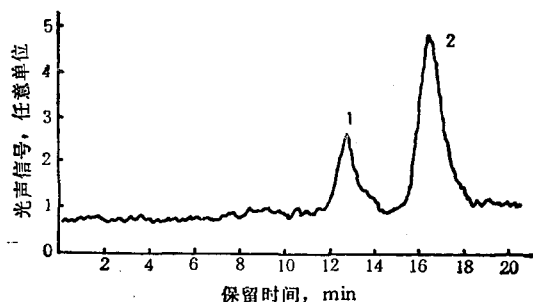


图 4 叶绿素 a、b 光声色谱图

色谱条件: 激光能量 0.8mJ /脉冲; $\lambda = 610\text{nm}$;
进样量 $10\mu\text{l}$; 流动相 95% 乙醇
峰序: 1—叶绿素 b; 2—叶绿素 a

由图 4 计算的叶绿素 a/b 色谱峰面积比约为 2.4, 低于文献值 2.7^[2]。其原因可能与选取的检测波长和它们的荧光量子产额有关。文献报导, 在丙酮溶液中, 叶绿素 a 的量子产额 (0.24) 比叶绿素 b (0.09) 大得多^[2]。荧光量子产额高, 光声信号小。

4. 激光照射对叶绿素 a、b 比值的影响

在强激光照射下, 叶绿素光声信号的迅速降低, 是吸光色素受光照破坏所致, 在 610nm 波长下, 叶绿素 a、b 均有吸收, 为了解 a、b 组分对光致损伤的差异, 我们将受光照不同时间的叶绿素乙醇溶液经色谱柱分离后得到峰面积比, 其关系如图 5 所示。由图可见, 随着照射时间增加, a/b 峰面积比下降。初始 20min 内下降较快, 此后比较平缓。用 a/b 峰面积比的对数与照射时间作图, 20min 内呈一直线, 说明

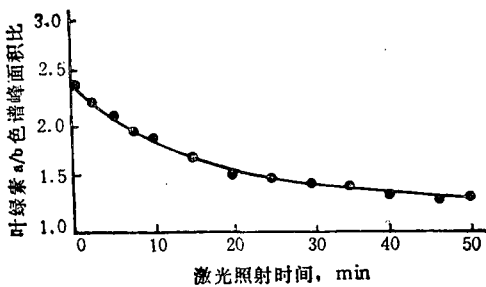


图 5 叶绿素 a、b 色谱峰面积比与激光照射时间的关系 (激光能量 1.2mJ/脉冲)

a/b 比值的衰减符合指数规律, 叶绿素 a 比 b 更易于光致破坏。

叶绿素 a、b 在结构上均属于二氢卟啉同镁原子的络合物, 不同的是叶绿素 b 的 C-3 位是醛基而 a 的是甲基。叶绿素 a 的光稳定性差可能与其光合作用功能有关。高等植物光合作用中吸收光能的主要色素是叶绿素 a。叶绿素 b、胡萝卜素及叶黄素等为辅助色素, 主要协助捕捉光能, 并传递到含有特殊叶绿素 a 分子的反应中心, 以推动电子传递过程, 促进水的光解和 CO₂ 的固定。由于这些光稳定性差导致叶绿素 a 易受光破坏。

参 考 文 献

- 1 Balasubramanian D *et al.* *Can J Phys*, 1986; **64**:1132
- 2 梅镇安, 孙琦, 容寿榆编著. 光合作用. 北京: 北京大学出版社, 1987: 29—30
- 3 Carpentier R *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1984; **534**:228
- 4 Bules G *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1982; **452**:679
- 5 Rosencwaig A 著, 王耀俊等译. 光声学和光光谱学. 北京: 科学出版社, 1986: 261—264
- 6 左伯莉, 邓延倬, 曾云鹗. 应用激光, (待发表)
- 7 阎宏涛, 邓延倬, 曾云鹗. 光谱学与光谱分析, 1990; **10** (2): 27
- 8 左伯莉, 邓延倬, 曾云鹗. 光谱学与光谱分析, (待发表)
- 9 Easking K *et al.* *J Chromatogr*. 1977; **135**:217

[本文于 1990 年 3 月 21 日收到,
9 月 29 日修回]

(上接第 213 页)

- 11 Green M, Cosslett V E. *Proc Phys Soc*, 1961; **78**: 1206
- 12 Kolbenstvedt H. *J Appl Phys*, 1967; **38**: 4785
- 13 Schreiber T P, Wims A M. *Ultramicroscopy*, 1981; **6**: 323
- 14 Dayhoff M O *et al.* In: Dayhoff M O *et al.* eds, *Atlas of protein sequence and structure*, Washington: National Biomedical Research Foundation, 1976: 267
- 15 Dayhoff M O *et al.* In: Dayhoff M O *et al.* eds, *Atlas of protein sequence and Structure*, Washington: National Biomedical Research Foundation, 1978: 306
- 16 Dayhoff M O *et al.* In: Dayhoff M O *et al.* eds, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Washington: National Biomedical Research Foundation, 1972: D-14
- 17 Inokuti M. *Rev Mod Phys*, 1971; **43**: 297
- 18 Bambynek *et al.* *Rev Mod Phys*, 1972; **44**: 716
- 19 Tixier R, Philibert J. In: Mollenstedt G *et al.* eds, *Proc 5th int cong on X-ray optics and microanalysis*, Berlin: Springer Verlag, 1969: 180

[本文于 1990 年 4 月 16 日收到, 11 月 26 日修回]