

植物激素脱落酸分子的光谱与结构研究：理论与实验

张燕燕^{1,2}, 李冬贤^{1,2}, 马刘正^{1,2}, 张浩^{1,2}, 苏睿^{1,2}, 李林泽^{1,2}, 胡建东^{1,2,3*}

1. 河南农业大学机电工程学院, 河南 郑州 450002
2. 河南省农业激光技术国际联合实验室, 河南 郑州 450002
3. 小麦玉米作物学国家重点实验室, 河南 郑州 450002

摘要 植物激素脱落酸(ABA)是植物通过自身代谢产生的有机信号小分子,在极低浓度下可对植物自身产生明显的生理效应,是植物体内五大内源激素之一,因能促进植物叶片的脱落而得名,主要存在于植物干枯的叶子、根茎、种子等部位。由于对植物生长的调节能力,ABA在农业工程领域有着极大的应用前景。然而,ABA在植物体内的浓度很低,实现超低浓度检测是ABA应用的关键。关于ABA的检测,文献中已经报道的方法有很多,但是利用拉曼光谱技术对ABA的理论和实验研究还未见报道,拉曼光谱技术有着样品前处理简单、分析速度快、对于检测人员要求低,更适用于原位和现场检测等特点,因此对ABA拉曼光谱的机理和实验研究可为在植物激素检测及鉴定中提供可靠的依据。利用软件 Gaussian09 和 GaussView5.0 构建优化 ABA 的分子结构,计算了 ABA 的分子能级、前线轨道、拉曼光谱(Raman)、红外光谱(IR)及核磁共振谱(NMR)。为了验证理论计算的准确性,检测了 ABA 分子的 IR、Raman、表面增强拉曼光谱(SERS)和 NMR 谱。结果表明:ABA 的拉曼特征峰理论计算值位于 616, 1 056, 1 272 和 1 689 cm^{-1} 处,实验测得的拉曼特征峰位于 612, 1 048, 1 272 和 1 635 cm^{-1} 处, SERS 实验获得的特征峰位于 598, 1 032, 1 268 和 1 625 cm^{-1} 处,理论计算和实验结果吻合较好;同时对 ABA 在 400~4 000 cm^{-1} 波长区间的 IR 和 Raman 特征峰进行了指认,指出了其在相应的峰位置上较强拉曼光谱的分子振荡模式,其中拉曼最强峰 1 635 cm^{-1} 主要来自于 ABA 分子碳碳双键和碳碳单键的伸缩振动,其中碳碳双键的伸缩振动引起的拉曼散射最强。最后,对比 ABA 的计算和实验核磁共振谱,并进行原子归属指认和原子相对位移分析,进一步研究了 ABA 的分子结构,为 ABA 的痕量检测提供了一定的实验参考和理论依据。

关键词 脱落酸;拉曼光谱;红外光谱;核磁共振谱;密度泛函理论

中图分类号: Q433.4 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2021)09-2859-07

引言

植物激素是由植物在自身体内合成的一类微量有机物^[1],在植物体内某一部位产生,再转运到作用部位^[2],在含量极低的情况下就能对植物的生长产生明显的生理效应^[3]。脱落酸(abscisic acid, ABA)是天然的生长抑制素,因能促进植物的叶子脱落而得名^[4],具有调节植物气孔关闭、抑制种子萌发、促进植物休眠等作用,在农业生产中有极大的应用前景,因此植物中 ABA 的痕量检测对于构建植物激素测定的新思想新方法有着重要的意义^[5]。目前,已经报道了多种 ABA 定量检测的技术,包括气相色谱/质谱(GC/

MS)^[6]、高效液相色谱/质谱(HPLC/MS)^[7]、酶联免疫吸附试验(ELISA)^[8]、毛细管电泳^[9]、化学发光法^[10]及局域表面等离子共振法(LSPR)^[11]等。这些方法由于其敏感性和选择性较高可以检测植物激素到超低水平,但是它们通常耗时,需要繁琐的样品预处理和富集。因此,在农业工程的研究上非常需求发展一个敏感,快速,简单的植物激素测定方法,而拉曼光谱技术因其灵敏度高、样品前处理快速简单而广泛应用于有机、无机和小分子检测中,而利用拉曼光谱技术定量检测 ABA 的研究还未见报道。

密度泛函理论(density functional theory, DFT)是通过电子密度来研究多种领域中电子结构的领先方法^[12],利用 DFT 计算待测分子的分子轨道、静电势、电子跃迁能级可以

收稿日期: 2020-09-07, 修订日期: 2021-01-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671581), 国家重点研发计划项目(2017YFD0801204)资助

作者简介: 张燕燕, 女, 1981 年生, 河南农业大学机电工程学院副教授 e-mail: zyanyan0923@163.com

* 通讯作者 e-mail: jdhu@henau.edu.cn

为实验研究提供分子层面的解析。近年来,利用 DFT 理论对分子的结构进行优化研究分子光谱性能的报道越来越多,透美红等利用 DFT 对苜蓿红分子结构和 SERS 进行研究,得到苜蓿红分子理论拉曼光谱的特征峰^[13];何伟平等对头孢氨苄的密度泛函进行研究,进一步验证头孢氨苄的分子结构^[14];Dikmen 利用 DFT 对 3,5 二甲氧基 4 羟基肉桂酸的 Raman, SERS 进行研究,研究银原子与分子结构的最佳结合位点,为 3,5 二甲氧基 4 羟基肉桂酸的表面增强拉曼研究奠定理论基础^[15]。目前,利用 DFT 理论对植物激素 ABA 的光谱研究还未见到报道。

从理论和实验两个方面对 ABA 分子的光谱和结构进行了研究,运用 Gaussian09 的 B3LYP/6-31G(d,p) 基组研究了 ABA 分子的 Raman, SERS 和 IR; 运用 Gaussian 的 NMR 方法计算 ABA 的 NMR 谱; 将所得的理论计算光谱与实验所得的谱学数据进行对比,对分子结构进行了分析,以保证计算得到的每一个稳定构型都对势能面上的一个局域最小点。

1 实验部分

1.1 方法

实验中所用的 ABA 样品购自生工生物工程(上海)股份有限公司,粉末状,分子式为 $C_{15}H_{20}O_4$, 分子量为 $264.32 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。取 0.5 mg 的 ABA 粉末放于硅片上,由显微共聚焦拉曼光谱仪(中国卓立汉光)测得 ABA 的拉曼光谱;在 120°C 的条件下,采用 0.5 mL、1% 柠檬酸三钠溶液还原 50 mL、0.01% 的氯金酸溶液制得微粒尺寸 60 nm 的金溶胶,金溶胶的 SPR 峰在 530 cm^{-1} 。各取 $10 \mu\text{L}$ $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ABA 溶液与 60 nm 的金溶胶混合,取混合物 $10 \mu\text{L}$ 滴在干净的硅片上,室温晾干,检测其 SERS 光谱;ABA 的红外光谱由 Nexus470 智能型傅立叶变换红外光谱仪(美国 NICOLET)测量;核磁共振光谱由 400MR 核磁共振波谱仪(美国安捷伦)测量。

1.2 计算方法

采用 Gaussian09 和 GaussView5.0 软件,在 DFT 的 B3LYP/6-31G(d,p) 基组水平上搭建分子结构优化并进行计算,计算 ABA 的 Raman 和 IR,利用 NMR 的 B3LYP/6-31+G(d) 基组来计算 NMR,并将理论计算得到的 Raman, IR, NMR 与实验所得的相应光谱进行对比。

2 结果与讨论

2.1 脱落酸分子结构优化

ABA 分子由有 39 个原子和 146 个电子组成,基于 DFT,使用 Gaussian 09 将 ABA 分子优化至最低能级,结构优化计算后,分子构型的 5 个最小振动频率值为: 24.83, 36.56, 39.19, 71.16 和 89.88, 它们对应的振动强度分别为 1.538 4, 2.804 3, 2.534 0, 0.076 3 和 0.726 2, 说明优化后的分子无虚态,分子结构稳定,可以作为后续光谱分析的结构。优化后的总能量为 -884.54 eV , 偶极矩为 1.435 3。其优化后的分子结构如图 1 所示。

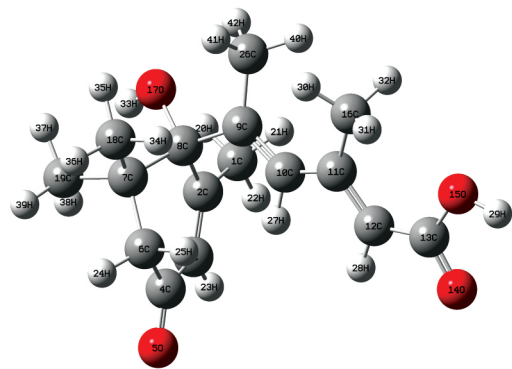


图 1 脱落酸的分子结构

Fig 1 The molecular structure of ABA

由图 1 可以看出, ABA 的分子结构主要由 C2, C3, C4, C6, C7 和 C8 组成的环状结构和五个甲基 C1-H20-H21-H22, C16-H30-H31-H32, C18-H34-H35-H36, C19-H37-H38-H39, C26-H40-H41-H42, 一个羰基 C4=O5, 一个羧基 C13-O14-O15-H29、一个羟基 O17-H33 组成。

2.2 能级和分子轨道

Gaussian09 计算了 ABA 分子能量最高的 6 个占据轨道和能量最低的 6 个空轨道能级,为了更全面地观察轨道电势分布情况,选择对电子虚态的其中 6 个空轨道 76—81 轨道和电子占据的其中 6 个轨道 70—75 轨道计算电势。如图 2 所示:第 75 号分子轨道为 HOME 轨道, $E_{75} = -0.244 88 \text{ eV}$;第 76 号分子轨道为 LUME 轨道, $E_{76} = -0.094 39 \text{ eV}$, 能隙 $\Delta E = E_{76} - E_{75} = -0.150 49 \text{ eV}$, 能隙很小,表明电子容易从 HOME 轨道跃迁到 LUME 轨道。

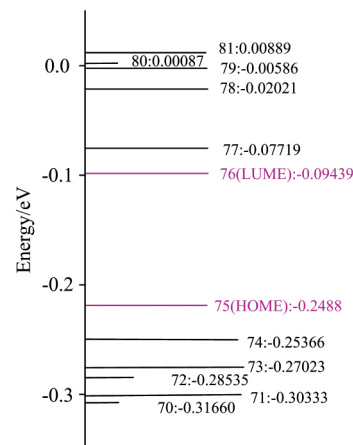


图 2 脱落酸的分子轨道能级图

Fig 2 Molecular orbital energy level diagram of ABA

第 73—78 轨道的电子云分布情况如图 3 所示。从图 3 可以看出, ABA 分子的 HOME 和 LUME 电子云呈局域分布, HOME 和 LUME 的电子云主要分布在 C 原子的周围和 C=C 双键的两侧, C 原子周围的电子密度较高, O 原子的周围的电子密度次之, H 原子的周围电子密度相对较低,说明, H 原子对 ABA 分子的拉曼光谱特性影响较小,拉曼活性主要集中在 C=C 双键处。

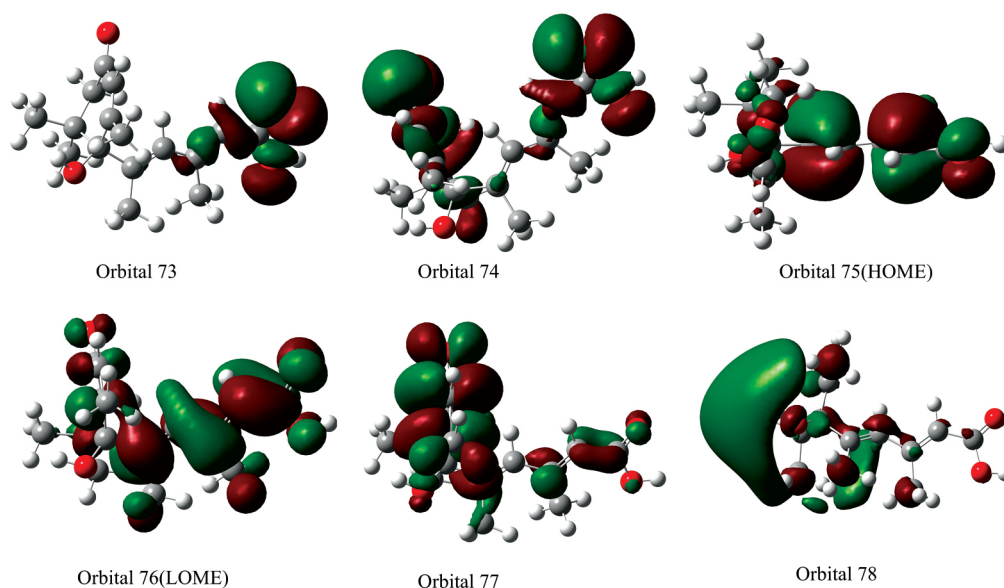


图 3 脱落酸的分子轨道电子云分布图

Fig 3 Distribution of molecular orbital electron clouds of ABA

2.3 拉曼和表面增强拉曼光谱

如图 4 所示, ABA 的拉曼特征峰主要集中在 $600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 之间, 这个区间内分子微运动方式主要是伸缩振动和摇摆振动, 在 $1800 \sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ 之间没有特征峰。计算的拉曼最强峰在 1689 cm^{-1} , 实验拉曼的最强峰在 1635 cm^{-1} , 实验 SERS 的最强峰在 1625 cm^{-1} , 计算值较实验测定的拉曼数值和 SERS 测定的数值大, 这是由于在高斯的计算模拟中将分子看做是单独的, 不考虑分子之间相互作用的影响。若高斯计算时取修正系数为 0.97, 那么 DFT 计算所得的最强峰频移为 1638 cm^{-1} , 与实验测的拉曼频移 1635 cm^{-1} 相差 3 cm^{-1} , 差别较小, 说明计算的拉曼频移与实验测定的拉曼频移吻合良好。

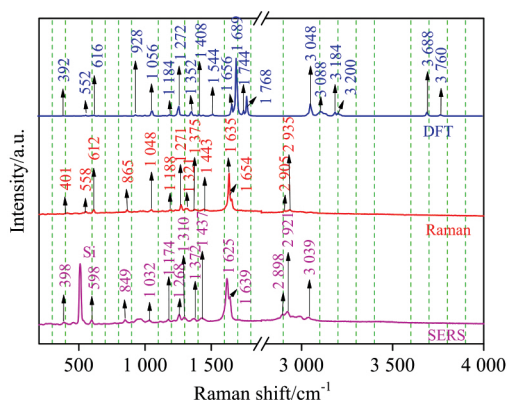


图 4 脱落酸的 DFT 计算、拉曼实验和 SERS 实验对比

Fig 4 The comparison of DFT calculation, Raman and SERS experiment of ABA

对比 DFT 计算、Raman 和 SERS 实验, ABA 分子信号较强的拉曼峰有五个, 分别是 1635 , 1271 , 1048 , 865 和 612 cm^{-1} , 分别对应于 ABA 分子结构中碳碳双键的伸缩振

动、碳碳单键的伸缩振动、甲基的非平面摆动、碳碳单键的外扭式振动及碳氢键的平面和非平面摆动, 说明 ABA 的拉曼特征峰主要来自于碳碳双键和碳碳单键的振动, 其中碳碳双键的伸缩振动引起的拉曼散射最强, 所以 1635 cm^{-1} 可以作为 ABA 的拉曼特征峰用于植物激素 ABA 的定性和定量检测。

不同的拉曼频移对应于分子中不同原子和基团的振动, ABA 的拉曼频移对应的振动模式如表 1 所示: 拉曼频移小于 1100 cm^{-1} 所对应的分子振动模式以 C—H 键的非平面摇摆振动为主; 拉曼频移在 $1100 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 之间所对应的分子振动模式以 C—C 单键的非对称伸缩为主; 拉曼频移在 $1600 \sim 1800 \text{ cm}^{-1}$ 之间所对应的分子振动模式以碳碳双键的对称伸缩为主; 拉曼频移大于 2900 cm^{-1} 时所对应的分子振动模式以 C—O 和 C—H 单键的非对称伸缩和非平面振动为主; 如: 拉曼频移在 1053 cm^{-1} 所对应分子振动为: 五个甲基的非平面振动, 以及 C6—H25, C6—H24, C9—H26, C12—H28 和 C3—H23 的平面振动, 除了 O 原子以外, 几乎所有的 C—H 都振动; 1056 cm^{-1} 对应 C10—C27 的非平面振动, 四个甲基 C16—H30—H31—H32, C1—H20—H21—H22, C19—H37—H381—H39, C18—H35—H36—H34 的非平面振动, 但甲基 C16—H30—H31—H32 的振动最为剧烈; 1075 对应甲基 C16—H30—H31—H32 的剧烈非平面振动, 其他四个甲基不动; 1688 cm^{-1} 对应于 C9—C10 对称伸缩振动和 C11—C12 的非对称伸缩。高斯计算后显示: 凡是拉曼峰较强的位置都反映在分子结构的整体振动上, 几乎没有原子或基团是静止不动的, 所以拉曼峰较强的位置都是几个分子或基团相应振动叠加的结果。

2.4 红外光谱

红外光谱反映的是分子的振动和转动的加和表现, 不同分子的振动和转动不同, 红外光谱具有高度的特异性, 与拉曼光谱相互补充, 用于表征和鉴别各种化学物种。图 5(a,b)

表 1 脱落酸的 DFT, Raman, SERS 特征峰及其归属
Table 1 DFT, Raman and SERS characteristic peaks of ABA and their attribution

| Number | DFT / cm^{-1} | Raman / cm^{-1} | SERS / cm^{-1} | Assignments |
|--------|------------------------|--------------------------|-------------------------|--|
| 1 | 392 | 401 | 398 | $\tau(\text{O7-H33}), \omega(\text{C9-H26}); \omega(\text{C19-H37-H381-H39})$ |
| 2 | 552 | 558 | | $\rho(\text{C24-H25}), \tau(\text{C2-C4})$ |
| 3 | 616 | 612 | 598 | $\omega(\text{C3-H23}); \rho(\text{C5-H24-H25})$ |
| 4 | | 865 | 846 | $\tau(\text{C9-C10})$ |
| 5 | 928 | | | $\omega(\text{C12-H28}), \omega(\text{C3-H23})$ |
| 6 | 1 056 | 1 048 | 1 032 | $\omega(\text{C16-H30-H31-H32}), \omega(\text{C1-H20-H21-H22}), \omega(\text{C19-H37-H381-H39}), \omega(\text{C18-H35-H36-H34}), \omega(\text{C10-H27})$ |
| 7 | 1 184 | 1 188 | 1 174 | $\nu_s(\text{C12-C13}), \nu_{as}(\text{C13-O15}), \rho(\text{O15-H29}), \rho(\text{O17-H33})$ |
| 8 | 1 272 | 1 271 | 1 268 | $\nu_s(\text{C3-C4}), \nu_{as}(\text{C7-C8}), \tau(\text{C6-H24-H25})$ |
| 9 | 1 304 | 1 321 | 1 310 | $\nu_{as}(\text{C3-C4}), \tau(\text{C6-H24-H25}), \rho(\text{C10-H27}), \rho(\text{C9-H26}), \rho(\text{O17-H33}), \rho(\text{C3-H23})$ |
| 10 | 1 352 | 1 375 | 1 372 | $\nu_{as}(\text{C8-C2}), \rho(\text{C3-H23}), \rho(\text{C9-H26}), \rho(\text{C10-H27})$ |
| 11 | 1 408 | | | $\nu_{as}(\text{C16-C11}), \rho(\text{C10-H27}), \rho(\text{C12-H28}), \omega(\text{C16-H30-H31-H32})$ |
| 12 | | 1 443 | 1 437 | $\nu_{as}(\text{C16-C11}), \rho(\text{C10-H27}), \rho(\text{C12-H28}), \omega(\text{C16-H30-H31-H32})$ |
| 13 | 1 544 | | | $\tau(\text{C18-H34-H35-H36}), \tau(\text{C19-H37-H38-H39}), \omega(\text{C6-24H}), \omega(\text{C6-25H})$ |
| 14 | 1 656 | | | $\nu_s(\text{C11-C12}), \nu_{as}(\text{C12-C13}), \nu_{as}(\text{C9-C10})$ |
| 15 | 1 688 | 1 635 | 1 625 | $\nu_s(\text{C9-C10}), \nu_{as}(\text{C11-C12})$ |
| 16 | | 1 654 | 1 639 | $\nu_s(\text{C11-C12}), \nu_{as}(\text{C12-C13}), \nu_{as}(\text{C9-C10})$ |
| 17 | 1 744 | | | $\nu_s(\text{C4-O5})$ |
| 18 | 1 768 | | | $\nu_s(\text{C13-O14}), \nu_{as}(\text{C12-C13}), \nu_s(\text{C9-C10})$ |
| 19 | | 2 905 | 2 898 | $\nu_{as}(\text{C18-H34-H35-H36})$ |
| 20 | | 2 935 | 2 921 | $\nu_{as}(\text{C5-H25}), \nu_{as}(\text{C5-H24})$ |
| 21 | 3 048 | | 3 039 | $\nu_{as}(\text{C1-H20-H21-H22})$ |
| 22 | 3 088 | | | $\nu_{as}(\text{C16-H30-H31-H32})$ |
| 23 | 3 184 | | | $\nu_{as}(\text{C3-H23})$ |
| 24 | 3 200 | | | $\tau(\text{C9-H26}), \tau(\text{C10-H27}), \tau(\text{C12-H28})$ |
| 25 | 3 688 | | | $\nu_{as}(\text{O15-H29})$ |
| 26 | 3 760 | | | $\nu_{as}(\text{O17-H33})$ |

注: ν_s 为对称伸缩振动; ν_{as} 非对称伸缩振动; σ 为面内剪式振动; ρ 为平面摇摆振动; ω 为非平面摇摆振动; τ 为面外扭式振动

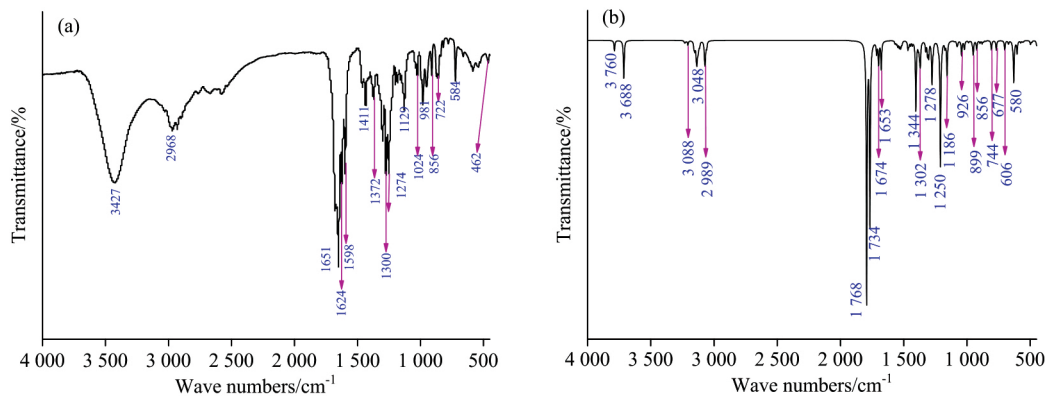


图 5 红外吸收光谱 (IR)

(a): 实验; (b): 计算

Fig 5 Infrared absorption spectra of ABA (IR)

(a): Experiment-IR spectrum; (b): DFT-IR spectrum

分别为实验检测的 ABA 红外光谱与计算得到的红外光谱图, 对比发现: 红外光谱的实测结果和实验结果吻合良好, 计算得到的红外光谱可作为拉曼定量检测的补充。

2.5 核磁共振谱

ABA 分子结构中含有羟基和羧基, 在核磁共振检测时

羟基和羧基中的氢易发生不显示的情况, 为了保证全部氢原子的相对位移都能确定, 检测时, 各取两份 10 mg 的 ABA 粉末分别溶于 0.5 mL 的甲醇和 DMSO 溶剂, 对比确定 H 原子的相对位移。图 6 为以 DMSO 为溶剂 ABA 的 ^1H 核磁共振谱, 对比甲醇溶剂的 ^1H 谱和 DMSO 中的 ^1H 谱发现, 甲醇

溶剂的 ^1H 谱有 19 个 H, 而 DMSO 溶剂的 ^1H 谱有 20 个 H, DMSO 溶剂的 ^1H 谱比甲醇溶剂的 ^1H 谱多了羟基上的氢。其他位置氢相对位移的实验与计算值如表 2 所示, 实验与计算值最大相差 1.052 ppm。

图 7 为 ABA 的 ^{13}C 核磁共振谱, 分子结构中不同位置 C

原子相对位移的实验值与计算值如表 3 所示, 实验与计算值最大相差 13.785 ppm。实验与计算结果对比说明: 实验结果与 DFT 计算结果较一致, 利用 DFT 计算 ABA 的核磁共振谱可以作为对 ABA 分子结构研究的补充和依据。

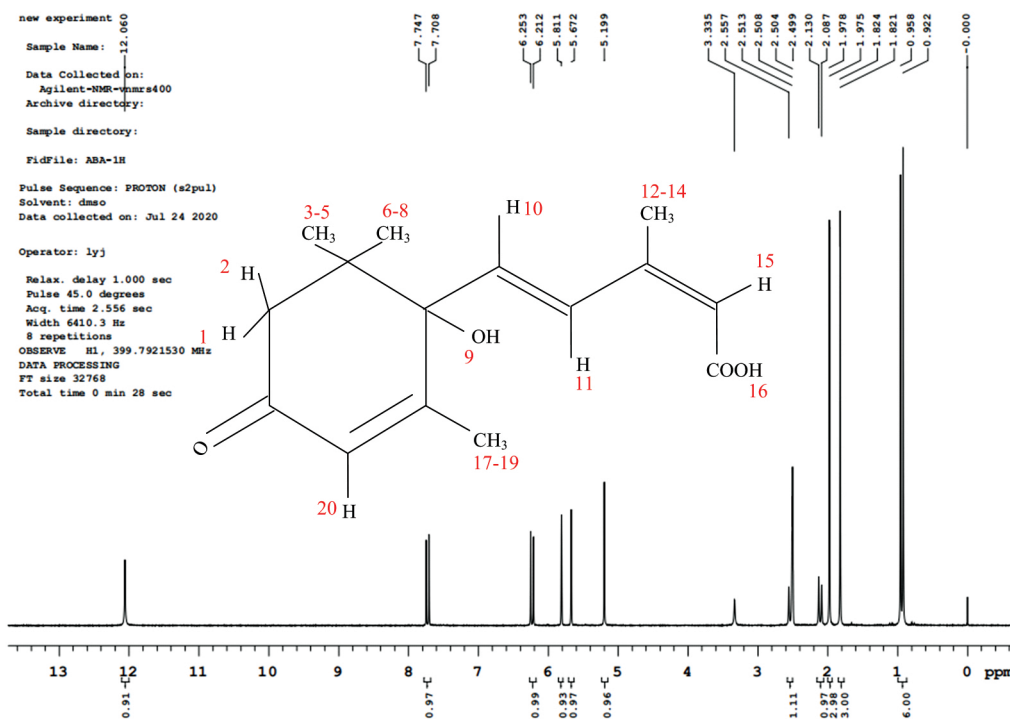


图 6 脱落酸的 ^1H -NMR

Fig 6 ^1H -NMR of the ABA

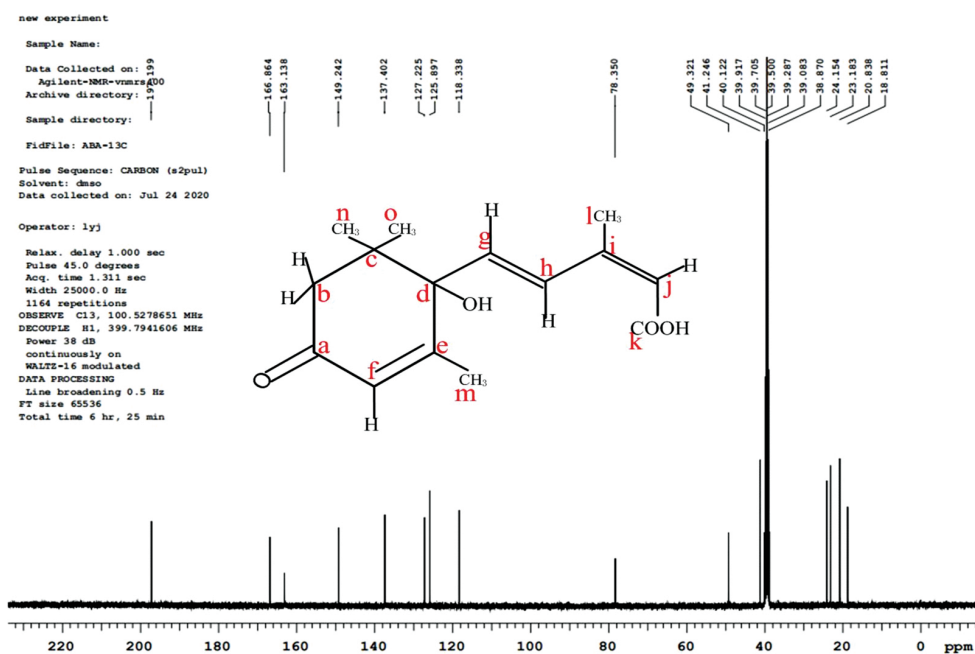


图 7 脱落酸的 ^{13}C -NMR

Fig 7 ^{13}C -NMR of the ABA

表 2 脱落酸的¹H-NMR 相对位移Table 2 ¹H-NMR relative displacement of ABA

| ¹ H | 1 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|
| Experiment/ppm | 2.513 | 0.922 | 0.958 | 2.499 | 2.504 | 2.508 | 6.212 | 5.199 | 5.672 |
| DFT/ppm | 2.467 | 1.011 | 1.023 | 2.478 | 3.556 | 2.562 | 6.023 | 5.043 | 5.564 |
| Δλ | 0.046 | -0.089 | -0.065 | 0.022 | -1.052 | -0.054 | 0.189 | 0.156 | 0.108 |
| ¹ H | 11 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| Experiment/ppm | 5.811 | 1.824 | 1.975 | 6.253 | 12.060 | 1.978 | 2.087 | 2.130 | 7.747 |
| DFT/ppm | 5.889 | 1.768 | 1.789 | 6.453 | 11.976 | 1.676 | 2.042 | 2.047 | 7.987 |
| Δλ | -0.078 | 0.056 | 0.186 | -0.2 | 0.084 | 0.302 | 0.045 | 0.083 | -0.24 |

表 3 脱落酸的¹³C-NMR 相对位移Table 3 ¹³C-NMR relative displacement of ABA

| ¹³ C | a | b | c | d | e | f | g | h |
|-----------------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
| Experiment/ppm | 197.199 | 39.705 | 127.225 | 78.350 | 137.402 | 125.897 | 149.242 | 163.138 |
| DFT/ppm | 194.992 | 41.107 | 126.322 | 84.836 | 131.231 | 132.605 | 155.148 | 176.923 |
| Δλ | 2.207 | -1.402 | 0.903 | -6.486 | 6.171 | -6.708 | -5.906 | -13.785 |
| ¹³ C | i | j | k | l | m | n | o | |
| Experiment/ppm | 40.122 | 137.402 | 166.864 | 18.811 | 20.838 | 23.183 | 24.154 | |
| DFT/ppm | 34.013 | 134.423 | 177.589 | 17.564 | 21.001 | 22.386 | 23.436 | |
| Δλ | 6.109 | 2.979 | -10.725 | 1.247 | -0.163 | 0.797 | 0.718 | |

3 结 论

基于密度泛函理论,对 ABA 分子搭建分子结构并进行优化,得到其稳定结构。利用 Gaussian09 的 B3LYP/6-31G(d, p)基组和 NMR 方法,计算 ABA 分子的常规 Raman 光谱、IR 及 NMR 谱。在此基础上,实验验证了 ABA 的 Raman、SERS、IR 及 NMR 谱,最后将计算谱图与实验结果进行对比及振动谱指认归属。结果说明:理论计算结果与实

验研究结果吻合良好,ABA 分子拉曼峰较强的位置都反映在分子结构的整体运动上,几乎没有原子或基团是静止不动的,拉曼峰较强的位置都是几个原子或基团相应振动叠加的结果,信号最强的特征峰在 $1\ 635\ \text{cm}^{-1}$,主要来自于碳碳双键的剧烈伸缩振动和碳碳单键的伸缩振动, $1\ 635\ \text{cm}^{-1}$ 可以作为拉曼特征峰用于 ABA 的定性和定量检测。这些工作将为光谱技术在植物激素检测中的发展和应用提供一定的实验参考和理论支撑,对后期植物激素 ABA 的定量检测研究提供可靠的理论基础。

References

- [1] Sussmilch Frances C, Atallah Nadia M, Brodribb Timothy J, et al. *Plant Signaling & Behavior*, 2017, 12(9): e1365210.
- [2] Dade Yu, Henning Wildhagen, Szymon Tylewicz, et al. *New Phytologist*, 2019, 223(3): 1192.
- [3] Liu Juan, Hasanuzzaman Mirza, Wen Huili, et al. *Protoplasma*, 2019, 256(5): 1217.
- [4] Gu Tingting, Jia Shufen, Huang Xiaorong, et al. *Planta*, 2019, 250(1): 145.
- [5] Iwona Bernacka-Wojcik, Miriam Huerta, Klas Tybrandt, et al. *Small*, 2019, 15(43).
- [6] LI Jin-ke, CHEN Hua-jun, CHEN Shao-liang(李金克, 陈华君, 陈少良). *Journal of Beijing Forestry University(北京林业大学学报)*, 2010, 32(5): 143.
- [7] Xiong Dongmei, Liu Zhen, Chen Han, et al. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2014, 4(03): 190.
- [8] Booz Valeria, Christiansen Charlotte Bayer, Kuhre Rune Ehrenreich, et al. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2019, 35(2): e3102.
- [9] Huang Linfang, He Man, Chen Beibei, et al. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1343: 10.
- [10] Zhou Guohua, Wang Ping, Yuan Ju, et al. *Science China Chemistry*, 2011, 54(8): 1298.
- [11] Wang Shun, Zhang Hao, Li Wei, et al. *Mikrochimica Acta*, 2019, 187(1): 413.
- [12] Idalgo José Ruiz, Neske Adriana, Iramain Maximiliano A. *Journal of molecular structure*, 2020, 1219: 0022.
- [13] LU Mei-hong, JIA Juan, LEI Hai-ying, et al(逯美红, 贾娟, 雷海英, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2020, 40(6): 1833.
- [14] HE Wei-ping, HUANG Ju, CHEN Miao-hui, et al(何伟平, 黄菊, 陈秒慧, 等). *Journal of Sichuan University(四川大学学报)*, 2018, 55(3): 564.

[15] Dikmen Gökhan. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 225; 1.

Spectroscopic and Structure Study of Plant Hormone Abscisic Acid: Theory and Experiments

ZHANG Yan-yan^{1, 2}, LI Dong-xian^{1, 2}, MA Liu-zheng^{1, 2}, ZHANG Hao^{1, 2}, SU Rui^{1, 2}, LI Lin-ze^{1, 2}, HU Jian-dong^{1, 2, 3*}

1. Department of Electrical Engineering, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

2. Henan International Joint Laboratory of Laser Technology in Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China

3. State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, Zhengzhou 450002, China

Abstract Plant hormone Abscisic Acid (ABA) is a small molecule of an organic signal produced by the plant's own metabolism and can produce an obvious physiological effect to the plant itself in very low concentrations. ABA is one of the five endogenous hormones in plants, named for its ability to promote leaf shedding and mainly exists in the plant's withered leaves, roots, seeds etc. Because of its ability to regulate plant growth, ABA has a great prospect of agricultural engineering. However, the concentration of ABA in plants is deficient, so the detection of ultra-low concentration is the key to the application of ABA. As for the detection of ABA, there are many detection methods reported in the literature, but as far as we know, the theoretical and experimental studies on ABA by Raman spectroscopy have not been reported. Raman spectral technology has the advantages of simple sample pretreatment, fast analysis speed, low requirements for the detection personnel, and more suitable for in-situ and in-situ detection. Therefore, the experimental and mechanistic study of ABA Raman spectroscopy can provide a reliable basis for detecting and identifying plant hormones. In this paper, the molecular structure of ABA was optimized by software Gaussian09 and GaussView5. 0, and the molecular energy level, Front orbit, Raman spectrum, Infrared spectrum and Nuclear magnetic resonance spectrum of ABA were calculated. In order to verify the accuracy of theoretical calculation, the IR, Raman, SERS and NMR spectra of ABA molecules were tested. The results show that: ABA Raman characteristic peak theory calculated value at 616, 1 056, 1 272 and 1 689 cm^{-1} , experimental measured Raman characteristic peak in 612, 1 048, 1 272, 1 635 cm^{-1} , SERS experiment to obtain the characteristics peak is located at 598, 1 032, 1 268, 1 625 cm^{-1} , the theoretical calculation and experimental results are in good agreement. At the same time, the infrared and Raman peaks of ABA were identified in the range of 400~4 000 cm^{-1} , and the molecular oscillation modes of the ABA producing Raman spectrum at the corresponding Raman frequency shift were pointed out. The most substantial Raman peak of 1 635 cm^{-1} was mainly caused by the stretching motion of the C=C bond and the C—C bond of ABA molecules, among which the stretching vibration of the C=C bond caused the most intense Raman scattering. Finally, atomic attribution and relative atomic displacement were analyzed, and the molecular structure of ABA was further studied according to comparing the calculation with the experimental nuclear magnetic resonance spectrum of ABA. What had done in the paper provided some experimental reference and theoretical basis for the trace detection of ABA.

Keywords Abscisic acid; Raman spectrum; Infrared spectrum; NMR spectrum; Density functional theory (DFT)

(Received Sep. 7, 2020; accepted Jan. 13, 2021)

* Corresponding author