

# 飞秒激光二维红外光谱

王建平

(中国科学院化学研究所, 中国科学院分子科学中心, 分子反应动力学国家重点实验室, 北京 100080. E-mail: [jwang@iccas.ac.cn](mailto:jwang@iccas.ac.cn))

**摘要** 近年来出现的飞秒激光二维红外(2D IR)光谱技术具有以飞秒时间分辨率测定凝聚相分子动态结构的潜力. 时间分辨率取决于飞秒激光的脉冲宽度, 分子结构信息存在于二维谱的对角峰和非对角峰中. 本文较为全面地论述了 2D IR 的基本原理, 介绍了 2D IR 的发展历史以及最新动态, 特别是近年来 2D IR 在蛋白质及多肽的结构和动力学方面的代表性研究结果; 并以蛋白质酰胺- 带为例, 着重探讨了一维和二维红外光谱模拟所用的振动激子模型, 以及量子化学从头计算、分子动力学模拟在激子模型和光谱模拟中的应用. 还简单介绍了偏振光的调控在二维红外光谱学中的用途以及存在的一些实际问题, 也介绍了同位素取代, 特别是碳-13 取代在多肽结构的 2D IR 表征中的有效性, 并分析了水溶液中多肽局部动态结构研究的一个实例. 最后, 提出了 2D IR 的一些基础研究方向和应用研究方向以及有待解决的一些技术问题.

**关键词** 飞秒激光 二维红外光谱 光子回波 非谐性常数 振动激子 振动耦合常数 密度泛函计算 分子动力学模拟

许多化学、物理和生物过程, 如化学键的形成与断裂、电荷转移、蛋白质折叠与聚集, 不仅与平衡态的分子结构有关, 还与其结构的波动情况有关. 这使得凝聚相中分子复合体结构的实时检测研究具有重要意义. 为了对凝聚相分子体系动态结构有一个完整的认识, 理想的实验手段是在化学键或原子水平上对体系以极高的时间分辨率进行跟踪. 长期以来, 化学物理界以及结构生物界的工作者们一直在寻找这样一种有效的检测手段. 两个较为成熟且广泛应用的检测方法是 X 射线晶体衍射和二维核磁共振(2D NMR), 两者都能给出具有原子分辨率的结构信息. 例如, 晶相和非晶凝聚相的时间分辨 X 射线衍射已经具有 100~150 ps( $10^{-12}$  s)的时间分辨率<sup>[1,2]</sup>. 但是, 时间分辨 X 射线衍射需要同步辐射设备, 目前还难以实验室平台化. 而二维核磁已经能检测溶液相中的大分子结构, 尽管其时间分辨率有限(约毫秒至微秒级). 近年来出现的飞秒( $10^{-15}$  s)激光二维红外(two-dimensional infrared, 2D IR)光谱技术则是对上述两类手段的一个很好的弥补.

飞秒二维红外光谱是分子体系在时域中一系列超快红外激光脉冲作用下所产生的受激振动光子回波响应(stimulated photon echo)经二维傅里叶变换后在二维频域中的表达. 它用非谐振子的相互作用来

测定化学基团之间的空间结构关系. 与之类似的 2D NMR 则用核自旋来测定原子间的空间几何关系<sup>[3]</sup>. 二维红外光谱, 作为一种新颖的前沿光谱学手段, 不仅有飞秒时间分辨率, 还有能测定凝聚相分子动态结构的潜力. 其时间分辨率取决于飞秒激光的脉冲宽度, 而分子结构信息则存在于二维光谱的对角峰和非对角峰中. 本文将对飞秒二维红外光谱这一技术的发展及其应用作一个较为全面的论述.

## 1 二维红外光谱发展历史

飞秒激光二维红外光谱技术是实验和理论工作者们多年辛勤劳动的结晶(见近几年的几篇综述<sup>[4-10]</sup>和书籍<sup>[11,12]</sup>). 2D IR 的雏形最早报道于 1998 年<sup>[13]</sup>, 所利用的是频域中的红外飞秒激光泵浦-探测方法, 相当于 NMR 的双共振技术. 其做法是通过扫描一个较窄的泵浦光带而记录一个频率范围较宽的探测光信号来得到泵浦-探测 2D IR 光谱<sup>[13,14]</sup>. 真正意义上的二维红外光谱技术利用的是红外光子回波现象. 红外光子回波很早就被用于分子动力学研究, 但直到 20 世纪 90 年代末, 红外光子回波的研究一直局限于单波长下的信号强度随时变化, 见近期文献综述<sup>[15]</sup>. 基于光子回波的、首次实现了频率分辨的二维红外光谱报道于 2000 年<sup>[16,17]</sup>, 它向世人宣告了飞秒激光二

维红外光谱的诞生. 随后在一个很短的时期内, 二维红外得到了非常迅速的发展. 在这期间报道的有基于光子回波的双频 2D IR 实验 (相当于异核 2D NMR)<sup>[18]</sup>、倍频 2D IR<sup>[19,20]</sup>和六波混频 2D IR<sup>[21]</sup>. 在这期间发展起来的还有双频红外飞秒激光泵浦-探测光谱技术<sup>[22]</sup>, 以及基于泵浦-探测的双频 2D IR 光谱技术<sup>[23]</sup>. 这些技术的发展, 都是与近年来飞秒激光技术的发展、新颖非线性光学材料的发现及光学参量放大器等光转换器件的实现分不开的.

## 2 二维红外光谱原理

在时域中基于光子回波的二维红外光谱技术可以用四波混频来描述(图 1). 四波混频指的是在时域中三束飞秒激光脉冲(波矢为  $k_1$ ,  $k_2$  和  $k_3$ )聚焦在样品上产生一束光信号, 即受激光子回波信号(波矢为  $k_s$ ). 在相位匹配几何条件(如  $k_s = -k_1+k_2+k_3$ )下产生的回波信号是非线性光学中众所周知的现象<sup>[11,12]</sup>, 在此不多作叙述. 频率分辨的红外光子回波的特点是先利用外差(heterodyne)检测手段, 在时域中将受激光子回波信号完整地记录下来(包括其相位和振幅), 再利用傅里叶变换将时域回波信号转换成频域信号. 外差检测是通过第四束输入激光脉冲作为局域振荡波(local oscillator, LO, 波矢为  $k_{LO}$ )而实现, 此时得到的回波信号是  $k_{LO}$  和  $k_s$  的卷积.

二维红外光谱实验需要飞秒红外脉冲激光作驱

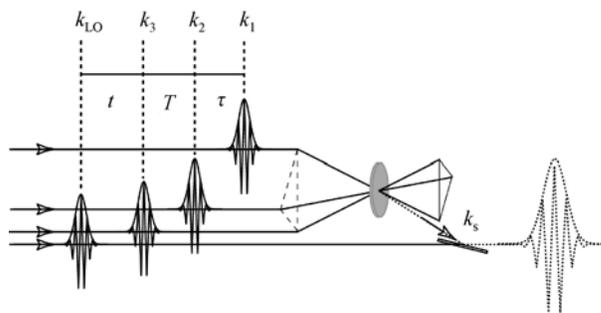


图 1 四波混频所产生的红外光子回波示意图  
回波信号的出现满足相位匹配条件, 如  $k_s = -k_1+k_2+k_3$

动源. 图 2 是二维红外光谱干涉仪简化光路图. 典型的硬件配置包括一套 1 kHz 的 Ti:Sapphire 飞秒再生脉冲放大系统(其输出波长一般在 800 nm 左右), 经由共线光学参量放大器(optical parametric amplifier, OPA)和差频产生器(difference frequency generator, DFG)进行光转换, 就可得到飞秒中红外光脉冲驱动源. 此光脉冲的能量应在 1  $\mu$ J 左右, 以保证所得回波信号的可测量性, 光脉宽则通常会比 OPA 的输入源稍宽. 接下来, 此中红外光脉冲通常被一分为四:  $k_1$ ,  $k_2$  和  $k_3$  各占约三分之一(各约 300 nJ),  $k_{LO}$  约占 5%. 控制光脉冲  $k_1$ ,  $k_2$  和  $k_3$  的频带、相位匹配几何、彼此的时间延迟以及在液体样品上的聚焦, 即可选择性地激发某一分子体系的相关振动态, 在空间某一方向上产生受激回波信号. 将局域振荡波 LO 与回波信号

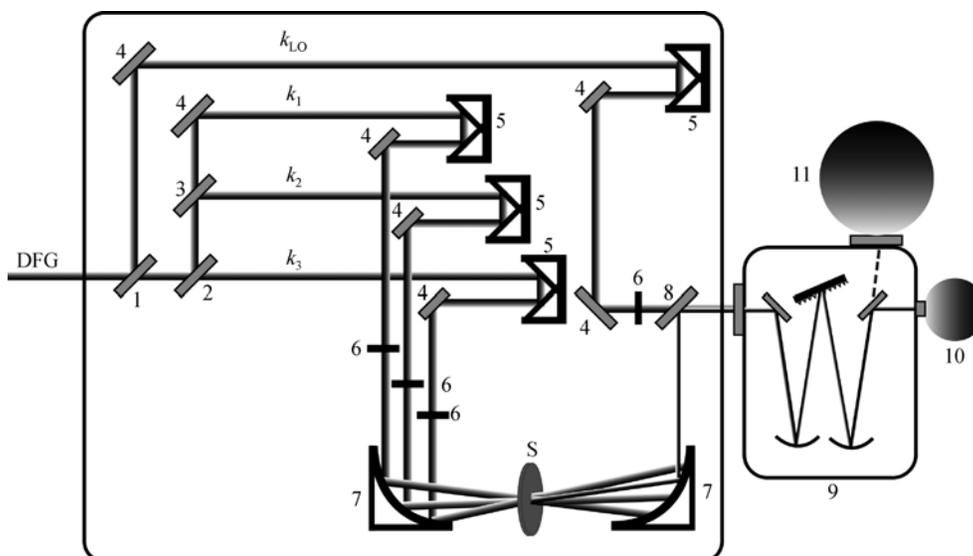


图 2 二维红外光谱干涉仪简化光路图

1~3: 分束片; 4: 反射镜; 5: 翻转镜; 6: 红外偏振片; 7: 抛物镜; 8: 氟化钙反射/透射片; 9: 单色仪; 10: 单元 MCT 检测器;  
11: 一维线阵 MCT 检测器; DFG: 差频产生器(的输出); S: 样品;  $k_1$ -3: 三束红外激光;  $k_{LO}$ : 局域振荡波

延时共线以实现外差检测. 经过外差的受激回波信号的记录先通过单色仪再由单元的(或一维线阵的)碲镉汞(mercury cadmium telluride, MCT)红外检测器来完成. 从图 1 和 2 可以看到, 回波信号在空间和方向上不同于产生它的任何三束输入脉冲( $k_1$ ,  $k_2$  和  $k_3$ ), 所以二维红外信号可以不受背景噪音的影响.

受激红外光子回波信号的本质是振动基态和第一、第二激发态的布居及弛豫过程. 对所研究体系(一个或多个非谐振子)来讲, 它们的振动基态和第一及第二激发态之间的跃迁都会发生( $\Delta v = \pm 1$ ,  $v$  为振动量子数). 例如, 第一束脉冲( $k_1$ )产生两个振动态的相干, 第二( $k_2$ )和第三束脉冲( $k_3$ )随后跟进, 可以在这个相干演变的基础上激励不同的振动态, 最后产生一个自由感应衰减. 所产生的自由感应衰减实际上是一个发射信号, 可以来自第一或第二激发态. 在实验中, 当使用单元 MCT 检测器时, 固定  $k_2$  和  $k_3$  之间的延时  $T$  (布居时间), 分别扫描  $k_1$  和  $k_2$  之间的延时  $\tau$  (相干时间)以及  $k_3$  的作用时间  $t$  (检测时间), 便得到一个沿  $\tau$  和  $t$  的二维时域回波振荡信号, 图 3 给出了一个实验数据的实例, 这是从水溶液中的一个 25 单元的  $\alpha$ -螺旋素所测得的回波信号. 图 3 中纵坐标是经过放大后的回波信号强度, 只具有相对意义. 可以看到  $\tau$  或  $t$  在大约 1.2 ps 之后, 回波信号已经基本消失, 数据的信噪比还是相当高的. 将二维时域回波振荡信号经过二维傅里叶变换就得到一张二维频域谱, 即 2D IR 谱. 若使用一维线阵 MCT 检测器, 则  $t$ -轴无需扫描, 检测器记录的已是经过傅里叶变换(由单色仪完成)的频谱, 这样能大量缩短整体数据采集所需的时间. 当  $k_2$  和  $k_3$  之间的延时  $T$  成为一个扫描变量时, 可以得到 3D IR 谱. 当使用单元 MCT 时,  $\tau$  和  $t$  所需的扫描时间范围取决于回波信号的持续时间, 扫描步长则取决于非谐振子的基频. 在条件允许时应尽量以小步长采集完整的回波信号. 以蛋白质酰胺-带振动模式(主要为 C=O 伸缩振动)为例, 第一振动激发态寿命  $T_1 \approx 1.0$  ps, 每一时间轴通常需扫描 1.5 ps 或更长时间, 步长约为 20 fs(图 3). 另外, 2D IR 实验通常有两种形式: 一种是图 1 中所示的情形,  $k_1$  先于  $k_2$  到达样品, 这意味着  $\tau < 0$ , 将得到所谓的相位重聚(rephasing)谱. 另一种是  $k_1$  后于  $k_2$  到达样品, 这意味着  $\tau > 0$ , 将得到所谓的非相位重聚(non-rephasing)谱; 相位重聚谱与非相位重聚谱二者的等份之和将得到第三种谱, 即所谓的相关谱(或纯吸收谱), 其结果是消

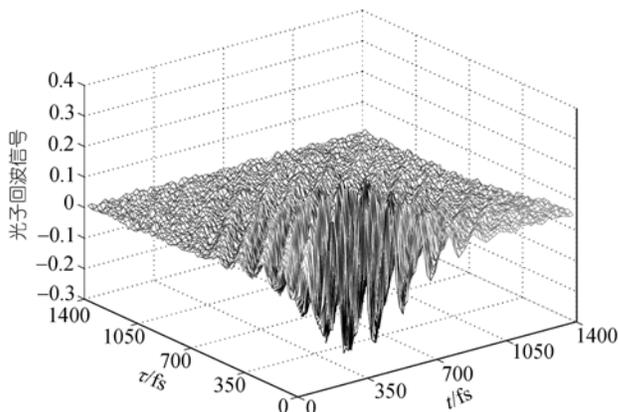


图 3 典型的沿  $\tau$  和  $t$  的二维红外光谱时域信号

除了相位重聚谱与非相位重聚谱中常见的尾峰. 这三种光谱表达在 2D NMR 中也比较常见.

另外, 许多常规 2D NMR 实验都有其相应的红外类似体, 如 NMR 双共振对应 IR 双共振<sup>[13]</sup>, NMR 的相关谱(correlation spectroscopy, COSY)对应 IR 的 COSY<sup>[24]</sup>, NMR 的核 Overhauser 效应谱(nuclear Overhauser effect spectroscopy, NOESY)对应 IR 的三束红外脉冲受激回波谱(three infrared pulse stimulated echo spectroscopy, THIRSTY)<sup>[5]</sup>, 异核 2D NMR 对应双频 2D IR<sup>[18,25]</sup>, NMR 化学交换对应 2D IR 超快化学交换<sup>[26,27]</sup>.

### 3 二维红外光谱的特征

图 4 给出了一张模拟的两个耦合非谐振子的相位重聚 2D IR 光谱. 它的两个频率轴分别为  $\omega_\tau$  和  $\omega_t$  (对应  $\tau$  和  $t$ , 在这里  $T$  设为常数). 2D IR 谱能直接给出每个非谐振子的基频和倍频频率, 反映在成对且反

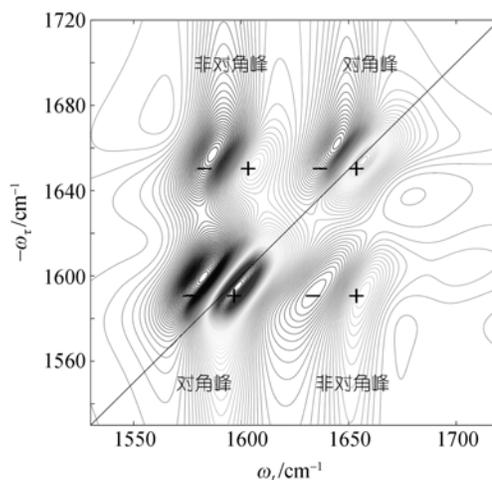


图 4 两个耦合的非谐振子的相位重聚 2D IR 光谱模拟

相(正,负)出现的对角峰之 $\omega_i$ 值中. 2D IR谱也能直接给出每两个耦合的非谐振子的和频频率,反映在成对且反相出现的非对角峰(又称作交叉峰)之 $\omega_i$ 值中. 所以两个耦合的非谐振子在一张2D IR模拟光谱图中会出现8个峰. 但是严格地讲,当耦合常数非零时,振动基态和第一及第二激发态之间的禁阻跃迁会变得允许,会出现多于8个的峰. 需要指出的是,只有非谐振子才会产生2D IR信号,谐振子的成对且反相出现的峰因拥有相同频率而在2D IR谱中可能会消失. 所以在两个紧凑的频率轴上的2D IR谱能给出非谐振子的非谐性常数. 非谐性常数表现在对角或非对角峰正负信号沿 $\omega_i$ 轴的绝对频率差中. 2D IR谱中每一对对角峰的 $\omega_i$ 值与其1D IR(或FTIR)谱峰的频率相同. 2D IR的对角峰沿对角线方向( $-\omega_r = \omega_i$ )延长而沿反对角线方向窄化,表明2D IR光谱的分辨率高过1D IR. 另外,对角峰的峰型能反映振子的频率分布;均匀线宽反映在反对角线方向上,总体线宽(均匀加非均匀)则反映在对角线方向上,因而对角峰的峰型能揭示吸收基团的结构波动情况. 而非对角峰峰型能反映成对耦合振子的频率分布的相关性,揭示的是体系内不同部分的结构相关波动情况. 另外,图4中标明的“ $-\omega_r$ ”是由于通常的相位重聚谱的 $\omega_r$ 需作正负反转,以便其2D IR峰能与非相位重聚的2D IR峰拥有相同的中心频率从而易于比较,或进行数学处理,如相加后能得到纯吸收谱. 需指出的是,2D IR光谱的两个频率轴如何编排安置并非至关重要,在二维光谱领域中至今还没有标准化.

2D IR技术具有以飞秒时间分辨率测定凝聚相分子动态结构的潜力,分子动态结构信息存在于二维光谱的对角峰和非对角峰中. 如上所述,对角峰能揭示分子结构波动的分布,因此包含平衡态时分子平均结构信息. 交叉峰表现出的非谐性常数与振子间的耦合常数紧密关联,而振动耦合常数与距离的三次方成反比(跃迁偶极矩近似),通常能表达为成对化学基团的相对位置及距离的函数. 对于C=O伸缩振动模式,当两基团相距10 Å (1 Å = 0.1 nm)时偶极耦合依然显著. 这一点胜过2D NMR中的核Overhauser效应(其有效距离约为4 Å)<sup>[31]</sup>. 另外一个独立的分子结构信息是振动跃迁偶极矩之间的角度,它能从偏振二维红外光谱得到. 因此从偏振光谱中我们也能得到化学键或基团之间的相对角度关系. 正是因为这些原因,涉及多种振动模式的2D IR谱能得到的结

构信息将更为丰富. 当延时 $T$ 成为一个变量时,或将动力学触发手段与2D IR相结合时,2D IR还能描述非平衡态下分子结构的随时变化,从而可作为一种超快化学动力学工具. 这些优点将使得2D IR成为与X射线衍射和二维核磁共振相辅相成的研究手段,因而可以广泛应用于凝聚态化学、物理和生物方面的研究.

## 4 二维红外光谱的研究

最初的二维红外光谱的研究从小分子量蛋白质的泵浦-探测开始<sup>[13]</sup>. 所选用的结构探针是蛋白质酰胺-带振动模式. 由于酰胺-带的吸收峰强,主要贡献基团为C=O且处于蛋白质骨架链上,因而成为理想的蛋白质结构探针. 实际上对于蛋白质和多肽而言,除了酰胺-带以外,酰胺-带(C-N伸缩振动等)和酰胺-A带(主要为N-H伸缩振动),以及 $C_\alpha$ -H伸缩振动等模式都是表征分子结构的有效光谱参数. 但是,同类基团的红外吸收峰通常有重叠,因此人们很快认识到二维红外光谱研究需从小分子做起. 不仅仅是实验<sup>[14,16,17,24,28,29]</sup>,理论模拟也是如此<sup>[30-32]</sup>. 在随后几年的研究中还包括酰胺-带和酰胺-带的相互作用<sup>[18]</sup>,酰胺-带和酰胺-A带的相互作用<sup>[23]</sup>,以及C=O和 $C_\alpha$ -H的相互作用<sup>[33,34]</sup>. 此外,对N-H, N-D等基团的二维红外光谱特性也有研究报道<sup>[35,36]</sup>,这些研究使得人们对小分子体系的二维红外光谱有了一个初步的认识. 在最近几年,研究体系还包括较大的多肽,如 $\alpha$ -螺旋<sup>[37,38]</sup>, $\beta$ -发夹<sup>[39]</sup>, $\beta$ -折叠<sup>[40-42]</sup>,膜蛋白<sup>[43,44]</sup>,以及小分子量蛋白质<sup>[45]</sup>等. 与此同时,二维红外的研究范围也渐渐地从多肽扩展到其他领域,如液体水的氢键动力学<sup>[46-48]</sup>等. 二维红外在蛋白质折叠研究方面也已经开始<sup>[45,49,50]</sup>.

## 5 二维红外光谱的模拟

二维红外光谱的模拟始于酰胺-带<sup>[13,14,30-32]</sup>. 人们发现酰胺-带处于一个相对隔离的频率范围内:酰胺-带比它低大约100  $\text{cm}^{-1}$ ,而 $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ 和N-H等振动频率比它高至少1000  $\text{cm}^{-1}$ . 而且此前的理论研究已经发现,多肽中的酰胺-带吸收峰并不是彼此独立的,而是彼此相互耦合的<sup>[51]</sup>. 在这种情况下,可以假设酰胺-带的谱线分布主要源于同类模式间的耦合,与其他模式间的耦合可以忽略不计. 因此,可以用一种所谓的“振动激子模型”来描述耦合的振动态集簇的性质以及态间跃迁<sup>[4,52,53]</sup>. 振动激子模型借鉴了Davydov的电子态激子模型<sup>[54]</sup>. 对于 $N$ 个相互

耦合的非谐振子,为了描述第一激发态,振动激子模型需要一个哈密顿矩阵.矩阵的对角元是 $N$ 个振子的零级频率,最初通常设为简并的.矩阵的非对角元是同类模式间的耦合常数( $\beta$ ),通常假设为双线性的,即耦合是成对的.将此矩阵对角化能得到本征值和本征向量.这是第一振动激发态的情形.耦合使简并的第一振动激发态发生能级劈裂,形成所谓的激子态 $|k\rangle$ (图 5).利用本征向量,将 $N$ 个无耦合振子的基态到第一激发态( $|0\rangle\rightarrow|1\rangle$ )的跃迁偶极矩转换成从基态到第一激子态( $|0\rangle\rightarrow|k\rangle$ )的跃迁偶极矩,从而将偶极矩强度再分配到激子态画面.将得到的跃迁强度对本征值作图,并给予适当的光谱增宽参数,即可得到一维光谱,或 FTIR 谱.二维谱的模拟也基于同样道理,只是操作起来略为烦琐一些.在振动激子图像中,第二振动激发态发生能级劈裂,形成第二激子态 $|kk'\rangle$ ,其原因是振子的非谐性常数( $\Delta$ )和振动耦合常数的存在.此时的哈密顿矩阵对角元包含双声子态 $|kk\rangle$ 和双粒子态 $|kk'\rangle$ .在双声子态中振动激发只局限在同一振子上,因而就是所谓的倍频态;而双粒子态则涉及到两个振子的激发.在激子模型中假定 $\Delta$ 只出现在双声子态中.并且,非对角元当中只有某些耦合项存在,即当双声子态和双粒子态拥有相同的第一激发态组分时,它们才有耦合,强度为 $\sqrt{2}\beta$ <sup>[4]</sup>.同时,计算二维谱常常用到由费曼图来表示的三阶非线性响应信号,对于相位重聚和非相位重聚情形,各需若干个费曼图来表示<sup>[4,55]</sup>.若假设布洛赫(Bloch)弛豫模型,则二维红外光谱在频域中有解析解,此处不再赘述,可参见相关文献<sup>[20,31,53]</sup>.所得二维谱的两个轴, $\omega_r$ -轴只对应于 $|0\rangle\rightarrow|k\rangle$ 跃迁频率,而 $\omega_i$ -轴则对应于

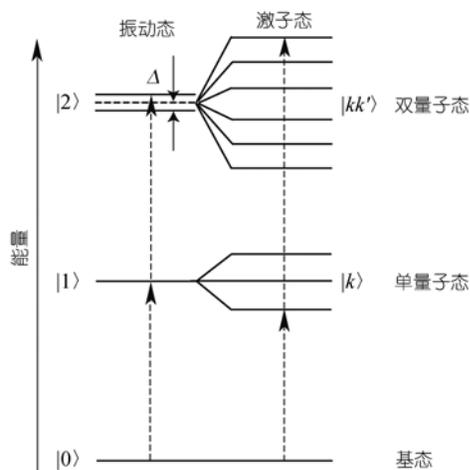


图 5 多肽的酰胺-带振动激子模型

$|0\rangle\rightarrow|k\rangle$ 和 $|k\rangle\rightarrow|kk'\rangle$ 两种跃迁频率(图 4).另外,根据需要,振动激子模型的哈密顿矩阵其对角元可以包含一个微扰项,称为对角元无序参数.对角元无序参数通常由相关的或不相关的正态分布函数来引入<sup>[53]</sup>,但也可通过其他途径.

对角元素(零级频率)的估计正逐渐引起人们的兴趣.最新研究表明,对蛋白质和多肽体系而言,酰胺-带的零级频率通常与其二级结构有关<sup>[39]</sup>.简并假设加无序参数不能够合理地描述其哈密顿矩阵的对角元素.零级频率的评估也可通过其他方式进行,如结合分子动力学模拟(molecular dynamics (MD) simulations).溶液相分子零级频率能从以静电作用为主的模型中得到.这是因为,分子的振动频率由核运动的势能面决定,而势能面取决于溶质的电子态构象以及所受到的溶剂施加的力.由于在许多溶剂中静电作用占主导,若其变化缓慢(如在平衡态情形),则可在溶质分子上选取某些参考点并求得其静电势或静电场,并利用参数拟合得到半经验模型,将静电势或静电场转换成某一振动模式的振动频率位移,从而建立一个从静电作用到振动频率位移的转换图.这里的频率位移指的是从气相到凝聚相的频率变化.最近连续报道了这方面的有关蛋白质和多肽体系的酰胺-带的理论研究<sup>[56-59]</sup>.所报道的转换图既有静电势类型的<sup>[56-58]</sup>,又有静电场类型的<sup>[59,60]</sup>.蛋白质的骨架和侧链以及溶剂等的静电效应均可考虑在频率转换图中.

耦合常数的求值一般可以用量子化学从头计算(如密度泛函理论计算)结合跃迁偶极矩(或跃迁电荷)相互作用模型计算<sup>[14,51-53,61]</sup>.振动模式间的耦合可以这样理解:当某一振动模式被激发时,另一振动模式有所感应,那么我们称这两个振动模式彼此耦合.相应的两个振动态是离域化的,振动模为离域模.相反,如果两个振动模式对彼此的激发毫无感应,那么这两个振动模式彼此相互独立,相应的两个振动态是局域化的,振动模为局域模.密度泛函理论计算能得到简正振动频率及振动波函数.将波函数去混合(de-mixing)<sup>[62]</sup>,我们能得到一个零耦合的局域模图像,包括零级频率和耦合常数.因此波函数去混合过程包含了振动模式去耦合处理.对酰胺-带而言,在波函数去混合过程中,为了方便起见,一般假设 $C=O$ 伸缩振动占绝对主导.当然可以将整个酰胺单元( $-CONH-$ )都考虑进去.得到的零级频率和耦合

常数虽然是分子在气相中的结果,但是对凝聚相体系,特别是较为刚性的分子,仍具有参考价值.但是,量子化学理论计算对稍微大一些的体系处理起来在目前还有难度,故此时耦合常数的求值一般还需借助跃迁偶极矩(或跃迁电荷)的相互作用模型.由于偶极矩是由电荷决定的,对于空间两个相距较远的振子,跃迁偶极矩和跃迁电荷将给出相同的答案.当相距较近时,电荷模型会稍好一些.但是对于相邻的两个酰胺基团而言,耦合常数有必要通过量子化学从头计算来获得.这是因为此时的耦合既有静电作用成分,又有化学键成分.

蛋白质酰胺-带的振动是否适合用激子模型来描述?最近,我们用密度泛函理论计算考察了多肽中酰胺-,和A带振动模式的非谐性常数,并从量子化学出发评估了振动激子模型<sup>[62]</sup>.结果表明,量子化学从头算得到的两个酰胺-带的振动非谐性常数,与激子模型得到的非谐性常数,两者的相关系数大于0.9.此结论是基于一系列典型的二、三肽构象得到的.这表明蛋白质的酰胺-带振动是可以由激子模型来描述的.振动激子模型的进一步完善,尤其是与MD模拟的结合,将使得由原子坐标出发的一、二维红外光谱的模拟成为可能.目前,研究型的、各具特色的一、二维红外光谱模拟软件正在逐渐由各个研究组独立地开发出来<sup>[53,59,63-66]</sup>.

## 6 偏振二维红外光谱

由于激光通常是线偏振光,最初的2D IR通常都用垂直偏振的三束入射光( $k_1, k_2$ 和 $k_3$ )来产生垂直偏振的回波信号 $k_s$ (我们称此时偏振条件为 $\langle zzzz \rangle$ ).但是不久人们就发现,将四束线偏振光进行适当的调控,得到的2D IR谱会产生一些奇妙的现象.这一技术是在2001年发展起来的<sup>[67-69]</sup>.例如,在 $\langle zxxz \rangle$ 时( $k_1$ 和 $k_s$ 为垂直偏振, $k_2$ 和 $k_3$ 为水平偏振),2D IR对角峰信号强度通常是在 $\langle zzzz \rangle$ 时的三分之一;而在 $\langle 45^\circ, -45^\circ, x, z \rangle$ 时对角峰消失而只留下非对角峰<sup>[68]</sup>.实际上在以上所有的各向异性实验中,几何观察量是系综平均的 $\langle P_2(\cos\theta_{ij}) \rangle$ <sup>[67]</sup>,这里 $\theta_{ij}$ 是非谐振子*i*和*j*的跃迁偶极矩向量夹角, $P_2 = \frac{1}{2}(3\langle \cos^2\theta_{i,j} \rangle - 1)$ 是二次勒让德(Legendre)多项式.因此,从原理上讲,对每一对非谐振子都能测定其 $P_2$ .传统的泵浦-探测也是利用这一点来得到结构信息.另外,最近几年来,人们认识到手性导致的(chiral-induced)2D IR可以用来获取2D

IR中的分子结构信息<sup>[70,71]</sup>.例如, $\langle zzzx \rangle$ 是一种被提议的手性2D IR偏振条件,它与 $\langle zzzz \rangle$ 相比,二维光谱信号重叠少,分辨率有所提高,对于大分子量体系的2D IR解析会有帮助.但是,需要指出的是,在实验室里进行各种偏振2D IR光谱的常规测量目前还有一些困难,这是因为目前商业化的红外偏振片的消光比(extinction ratio)通常只有50:1,因此得到的偏振2D IR总是伴随有残余对角峰或非对角峰,给光谱的完美解析带来一些不利.这种情况在某些对偏振条件更为苛求的2D IR方法(如手性2D IR)的使用中尤其明显.

## 7 同位素取代效应

将同位素标记引进振动光谱如红外和拉曼以研究分子结构特征已经有很多年,而同位素标记在二维红外光谱中的应用当然是近几年的事情<sup>[20,37,38,43,72]</sup>.使用同位素标记极大地拓宽了FTIR和2D IR的应用范围.人们可以研究膜、脂类,也可以研究蛋白质,还可以研究酶反应中间体.由于蛋白质酰胺-带的振动主要是由C=O伸缩振动组成, $^{13}\text{C}=\text{O}$ 取代将使酰胺-带的振动红移大约为 $40\text{ cm}^{-1}$ .而 $^{13}\text{C}=\text{O}$ 取代时红移大约有 $60\text{ cm}^{-1}$ .这些红移,将改变振动激子图像(振动能级分布),改变振子的离域化情况,但不太改变振动耦合常数.同位素标记有助于蛋白质局域结构的表征,如下述的 $\beta$ -发夹的最新2D IR研究就是很好的一例<sup>[39]</sup>.另外,双同位素标记更能使我们通过2D IR直观地看到并定量评估振动耦合常数,如最近有关 $\alpha$ -螺旋的2D IR研究<sup>[37,38]</sup>.同位素标记还有利于非平衡态分子体系进行动态结构表征,如其在时间分辨红外研究蛋白折叠过程中的应用<sup>[73]</sup>,被证明是很有效的.

一个非常典型的2D IR研究范例是我们最近的有关色氨酸拉链2的工作.色氨酸拉链2是一个有着12个氨基酸残基、在水溶液中形成稳定 $\beta$ -发夹的多肽分子.图6给出了它的分子构象及其在 $^{13}\text{C}=\text{O}$ 取代频率区的2D IR纯吸收光谱.当 $^{13}\text{C}=\text{O}$ 取代分别在Trp2和Gly7的酰胺基团上时,这一频率区的2D IR光谱特征清楚地表明,不同的肽链位置具有不同的动态骨架结构.这些光谱特征包括对角峰的峰型和峰走向(纵横轴长由虚线表示),所测得的非谐性常数,以及它们的 $|0\rangle \rightarrow |1\rangle$ 跃迁2D IR峰(“+”信号)在半峰高处的纵横比(纵横轴长由虚线箭头表示)等等.当 $^{13}\text{C}=\text{O}$ 取代在Trp2时,其对角峰沿对角线延伸较多,

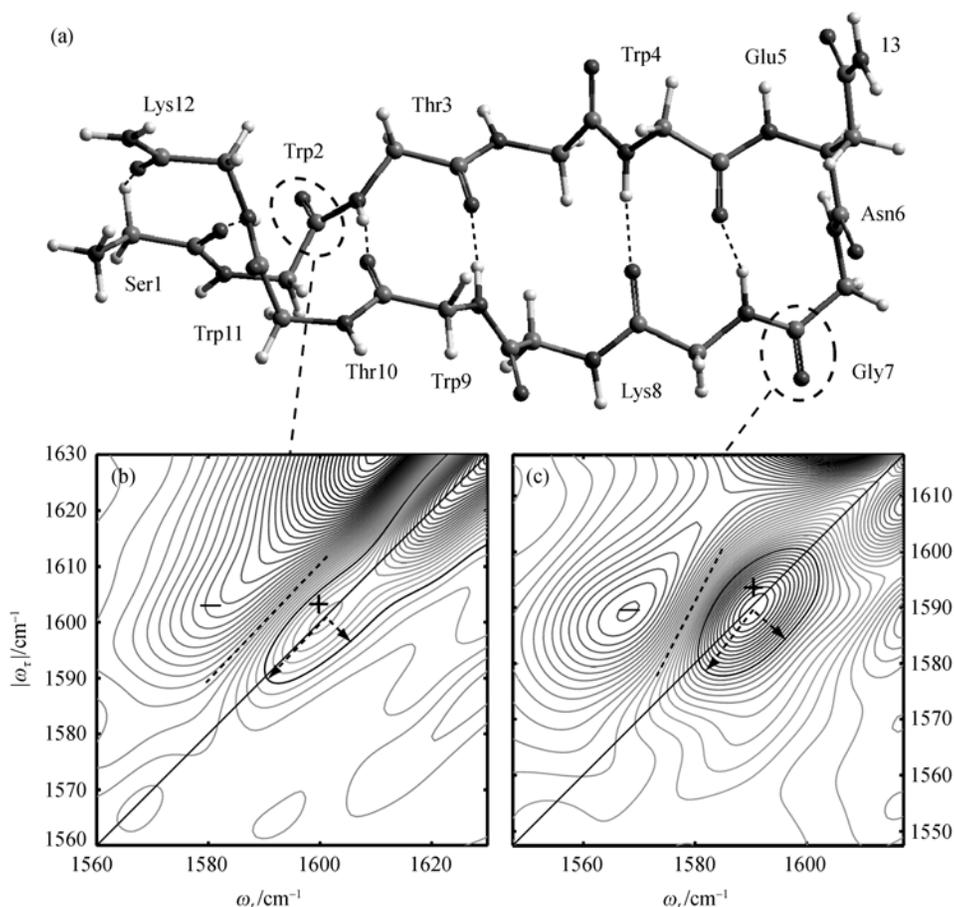


图 6 色氨酸拉链 2 的分子构象及其在  $^{13}\text{C}$ -取代频率区的 2D IR 纯吸收光谱

(a)  $\beta$ -发夹分子构象; (b)  $^{13}\text{C}=\text{O}$  取代在 Trp2 的 2D IR 谱; (c)  $^{13}\text{C}=\text{O}$  取代在 Gly7 的 2D IR 谱. 虚线表明由  $|0\rangle \rightarrow |1\rangle$  跃迁 (“+”信号) 和  $|1\rangle \rightarrow |2\rangle$  跃迁 (“-”信号) 所组成的 2D IR 对角峰的走向; 虚线箭头则表明其  $|0\rangle \rightarrow |1\rangle$  峰在半峰高处的纵横轴长

非均匀增宽较为明显, 表明了此处的  $\text{C}=\text{O}$  基团感受到了一系列溶剂分子的作用, 形成了较宽的振动频率分布, 反映的是一个比较柔韧的结构; 相反, 在 Gly7 处的 2D IR 对角峰的非均匀增宽不明显, 其  $\text{C}=\text{O}$  基团感受到的是一个比较刚性的结构. 这些都是肽链在从飞秒到几个皮秒的尺度上的动态结构信息. 可以预计, 2D IR 完全可以作为一种凝聚相复合体系的分子结构动力学手段, 在相关领域有着广阔的应用前景.

## 8 研究展望

鉴于其特性, 二维红外光谱技术期望应用于许多研究领域. 比较感兴趣的基础及应用研究大致有下述几个方面:

( ) 分子内和分子间相同或不同化学基团的振动耦合常数的测定. 二维红外光谱中非对角峰与成

对的分子振动模式耦合有密切关系. 而振动耦合常数又是化学基团的相对方位及距离的函数. 因此, 通过测定同类或不同类基团在结构已知的分子体系内的耦合常数, 可以建立和累积耦合常数与分子结构的关系, 建立数据库, 以便将来从耦合常数来推断未知分子的结构.

( ) 分子结构动力学研究. 二维红外光谱能成为一种强有力的结构动力学手段. 二维红外光谱信号反映的已经是凝聚相体系的平衡态分子超快结构动力学信息. 若与外部动力学触发相结合, 则还可以研究体系的非平衡态分子超快动力学. 简单的静态触发包括温度, pH, 离子强度等, 比较容易与 2D IR 结合. 瞬态动力学触发包括纳秒激光诱导温度阶越 ( $T$ -Jump), 或 pH 阶越 [74] 等. 温度阶越与单光束 IR 光谱检测技术已比较成熟, 近年来在蛋白质折叠领域的应用研究多有报道 [75-79]. 温度阶越与 2D IR 相结合

已有文献报道<sup>[45]</sup>。pH阶越与2D IR光谱技术结合使用目前还未见报道,但原理和技术上都是可行的。

( ) 理论模型的建立与完善。由于二维红外光谱能在超快时间分辨率下表征并跟踪体系的结构变化,因而能同分子动力学模拟联系起来。需要建立分子内和分子间化学基团相互耦合随时间变化的理论模型。利用经典力场的传统分子动力学模拟以及利用量子力场的从头算分子动力学模拟(*ab initio* MD simulations)将会扮演非常重要的角色。另外,目前流行的振动激子模型<sup>[4,53]</sup>有其局限性;它只能处理能级相近的同类振动模式。对于能级差较大的两个不同种类的振动模式,由于各自都可能存在同类或异类耦合存在,情况将比较复杂,需要进一步探讨振动激子模型的适用性。此外,对于一维和二维光谱的模拟,从原理上来讲,如果假设布洛赫弛豫模型<sup>[55]</sup>,时域法和频域法能给出相同的结果。但是当衰减机制较为复杂时,只有时域法才能用。此时的谱图模拟需从相关函数以及三阶非线性响应着手。

( ) 氢键动态学及质子转移研究。深入理解超快氢键动态学在目前相当热门,特别是有关生物分子和水分子的氢键。这里的水分子包括所谓的“生物水”,即生物分子第一水合层内的水分子。2D IR可研究的对象主要是氢键的给体和受体的振动,在中红外区有吸收峰。当基团A—H成为氢键给体时,其伸缩振动频率通常发生红移且吸收增强。当氢键较强时A—H的吸收峰会增宽许多(如O—H振动,峰宽超过 $500\text{ cm}^{-1}$ ),因而使微观结构的分析复杂化。但是2D IR有着比FT IR谱线窄的特点,外加超快时间分辨率,仍然能提供化学键水平的结构信息,因而是研究氢键动态学的有效手段。与质子隧穿效应有关的不同的化学构象也能用2D IR来区分。氢键交换的快过程和慢过程能够用3D IR来表述。这些新颖的实验将提供大量有关氢键的结构信息,加深我们对氢键动态结构的认识。

( ) 蛋白质及多肽折叠机理研究。一个非常重要的问题是如何表征蛋白质骨架链的折叠/伸展folding/unfolding的早期过程。从皮秒到几个纳秒的范围内,蛋白质折叠的实验数据几乎是零。另一方面,分子动力学模拟计算在这一时间段积累了大量的虚拟蛋白质折叠过程。二维红外光谱正好可以填补这一时间段的实验空白。结合外部动力学触发,二维红外光谱能跟踪体系的结构变迁,提供丰富的化学键水平的

结构描述。不仅能对蛋白质的折叠态和伸展态结构进行表征,还可以捕获折叠中间体。众所周知的折叠模型,包括两态(two-state)模型和下坡(down-hill)模型<sup>[80]</sup>,可以得到实验的检验。2D IR技术在这一领域的应用尚未见报道。另外,双频2D IR实验将允许我们将溶剂的作用也考虑进来。已有证据表明,实现皮秒升温是完全可能的<sup>[81]</sup>,若将2D IR技术结合温度阶跃技术,即可进行这方面的研究。瞬态实验可选的研究体系有很多,如许多近年来报道的快速折叠子(fast folder)。含20个氨基酸残基的色氨酸笼(Trp-cage)便是一例<sup>[82]</sup>。有研究表明色氨酸笼属两态折叠,折叠时间短于 $4\text{ }\mu\text{s}$ <sup>[83]</sup>。另外,最近报道的瞬态IR泵浦-探测研究环型肽的光致构象变化<sup>[49,50]</sup>,已经揭示了多肽链在皮秒时间轴上有较为复杂的动力学,证明了利用飞秒2D IR研究多肽折叠的可行性和必要性。

( ) 波长和相位可调控的二维及三维红外光谱技术发展。将研究对象从探测波长为目前主要在 $3\text{ 或 }6\text{ }\mu\text{m}$ 左右( $3330\text{ 或 }1660\text{ cm}^{-1}$ )延扩到整个中红外( $2.5\sim 20\text{ }\mu\text{m}$ ,  $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ ),会使大量的分子振动模式都能被用来报告体系的分子结构。目前被称作“分子标尺”的荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer)通常需要在体系中引入成对的荧光给体与受体。振动光谱的优势在于体系内化学基团本身就是振动生色团。多维(二维及三维)红外光谱具有飞秒的时间分辨率,它们能提供的实时结构信息是X射线衍射和核磁共振目前难以做到的。多维红外光谱还能有其他形式,比如最近报道的六波混频(五阶非线性响应)的二维红外光谱技术<sup>[84]</sup>,从中能得到的分子结构信息会更为丰富。另外,如同在NMR中的情形类似,脉冲整形(pulse shaping)在多维红外光谱有着广泛的应用前景。脉冲整形即对激光脉冲宽度和相位进行调控。通常利用液晶材料或变形镜来实现。中红外光的脉冲整形已经有报道<sup>[85,86]</sup>。将整形的光脉冲引入2D IR实验,并通过信息反馈,将可以随意调控二维红外光谱中某一信号与其余信号的强度对比度,从而更有利于2D IR图谱分析和动态分子结构表征。

## 9 与其他振动光谱的比较

2D IR光谱技术是一种非线性振动光谱手段,涉及到分子体系的振动基态和第一、第二激发态的跃迁和弛豫。与之相比,经典的FT IR则是一种线性振动

光谱手段,只涉及到分子体系的振动基态和第一激发态的跃迁和弛豫.在2D IR光谱中,某一对角峰的 $|\omega_r|$ 值与其1D IR(或FT IR)谱峰的频率是一致的.若将2D IR光谱向 $\omega_r$ -轴作投影,则将得到与宽频瞬态泵浦-探测类似的信号.另一方面,近年来流行的二维红外相关谱<sup>[87-90]</sup>是在线性的FT IR的基础上衍生而来.给被测样品施加一系列系统的、比体系内分子振动弛豫时间慢得多的外部扰动,记录其一系列相应的FT IR光谱,并对这些FT IR光谱进行数学相关分析,就可得到二维红外相关谱.二维红外相关谱反映的是各个基团在外部慢扰动下所发生的振动频率和强度等变化的先后顺序及其相关性.因此,与本文所描述的飞秒激光2D IR从概念和原理上均有本质的区别.

当前在我国开展激光二维光谱研究的时机业已成熟.国家自然科学基金委化学科学部在2004年组织国内著名化学家讨论“新世纪的物理化学——学科前沿与展望”时,已经有专家指出激光二维红外光谱是分子动力学与动态学在新世纪发展的一个重要前沿学科<sup>[91]</sup>.然而,在国内目前还没有一套建好的飞秒激光2D IR装置.因此发展和推广二维光谱技术任重而道远.

## 10 小结

综上所述,飞秒激光二维红外光谱不但包含了传统一维光谱所能提供的有关凝聚相分子体系的物种信息和有限的结构信息,而且能揭示所给出的光谱信号中包含的若干结构单元的相对位置,从而能提供更为丰富的结构信息.二维红外光谱不仅涉及分子体系的振动基态和第一激发态,而且还可涉及到其第二或更高的激发态,因此是一种新颖的多维、多参量分析手段.作为一种强有力的光谱手段,二维光谱开拓了人们的视野,近几年在《科学》(*Science*),《自然》(*Nature*),《美国科学院院刊》(*PNAS*)和《美国化学学会会刊》(*JACS*)等期刊都不断有文章报道<sup>[26,27,39,45,64,92,93]</sup>.可以断言,随着二维红外光谱技术的发展与完善,在其他波长段的二维光谱必将得到发展.最直接的是二维可见光谱.二维可见光谱目前已经在一些实验室里得到了实现<sup>[92]</sup>.多维光谱将会成为传统一维光谱的很好的补充和延伸,在基础科学和应用科学方面的前景不可估量.在不远的将来,多维光谱必将成为一种强有力的实验室的常规分析手段.多维光谱技术的发展和壮大,必将推动光谱学

以及化学、物理学和生命科学的发展.

## 参 考 文 献

- 1 Schotte F, Lim M, Jackson T A, et al. Watching a protein as it functions with 150-ps time-resolved x-ray crystallography. *Science*, 2003, 300(5627): 1944—1947[DOI]
- 2 Ihee H, Lorenc M, Kim T K, et al. Ultrafast x-ray diffraction of transient molecular structures in solution. *Science*, 2005, 309(5738): 1223—1227[DOI]
- 3 Ernst R R, Bodenhausen G, Wokaun A. Principles of Nuclear Magnetic Resonances in One and Two Dimensions. London/New York: Oxford University Press, 1987
- 4 Hamm P, Hochstrasser R M. Structure and dynamics of proteins and peptides: Femtosecond two-dimensional infrared spectroscopy. In: Fayer M D, ed. Ultrafast Infrared and Raman Spectroscopy. New York: Marcel Dekker Inc, 2001. 273—347
- 5 Ge N H, Hochstrasser R M. Femtosecond two-dimensional infrared spectroscopy: IR-COSY and THIRSTY. *PhysChemComm*, 2002, 5(3): 17—26[DOI]
- 6 Zanni M T, Hochstrasser R M. Two-dimensional infrared spectroscopy: A promising new method for the time resolution of structures. *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11(5): 516—522[DOI]
- 7 Jonas D M. Two-dimensional femtosecond spectroscopy. *Annu Rev Phys Chem*, 2003, 54: 425—463[DOI]
- 8 Khalil M, Demirdoeven N, Tokmakoff A. Coherent 2D IR spectroscopy: Molecular structure and dynamics in solution. *J Phys Chem A*, 2003, 107(27): 5258—5279[DOI]
- 9 Mukamel S, Abramavicius D. Many-body approaches for simulating coherent nonlinear spectroscopies of electronic and vibrational excitons. *Chem Rev*, 2004, 104(4): 2073—2098[DOI]
- 10 Hochstrasser R M. Dynamical models for two dimensional infrared spectroscopy of peptides. *Adv Chem Phys*, 2006, 132: 1—56[DOI]
- 11 Shen Y R. The Principles of Nonlinear Optics. New York: John Wiley & Sons, 1984
- 12 Mukamel S. Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy. New York: Oxford University Press, Inc, 1995
- 13 Hamm P, Lim M, Hochstrasser R M. Structure of the amide I band of peptides measured by femtosecond nonlinear-infrared spectroscopy. *J Phys Chem B*, 1998, 102(31): 6123—6138[DOI]
- 14 Hamm P, Lim M, DeGrado W F, et al. The two-dimensional IR nonlinear spectroscopy of a cyclic penta-peptide in relation to its three-dimensional structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 2036—2041[DOI]
- 15 Fayer M D. Fast protein dynamics probed with infrared vibrational echo experiments. *Annu Rev Phys Chem*, 2001, 52: 315—356[DOI]
- 16 Asplund M C, Zanni M T, Hochstrasser R M. Two-dimensional infrared spectroscopy of peptides by phase-controlled femtosecond vibrational photon echoes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(15): 8219—8224[DOI]
- 17 Asplund M C, Lim M, Hochstrasser R M. Spectrally resolved three pulse photon echoes in the vibrational infrared. *Chem Phys Lett*, 2000, 323(3-4): 269—277[DOI]
- 18 Rubtsov I V, Wang J, Hochstrasser R M. Dual-frequency 2D-IR spectroscopy heterodyned photon echo of the peptide bond. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10): 5601—5606[DOI]
- 19 Fulmer E C, Mukherjee P, Krummel A T, et al. A pulse sequence

- for directly measuring the anharmonicities of coupled vibrations: Two-quantum two-dimensional infrared spectroscopy. *J Chem Phys*, 2004, 120(17): 8067—8078[DOI]
- 20 Kim Y, Wang J, Hochstrasser R M. Two-dimensional infrared spectroscopy of the alanine dipeptide in aqueous solution. *J Phys Chem B*, 2005, 109(15): 7511—7521[DOI]
- 21 Fulmer E C, Ding F, Zanni M T. Heterodyned fifth-order 2D-IR spectroscopy of the azide ion in an ionic glass. *J Chem Phys*, 2005, 122(3): 034302[DOI]
- 22 Rubtsov I V, Wang J, Hochstrasser R M. Vibrational coupling between amide-I and Amide-A modes revealed by femtosecond two color infrared spectroscopy. *J Phys Chem A*, 2003, 107(18): 3384—3396[DOI]
- 23 Rubtsov I V, Wang J, Hochstrasser R M. Dual frequency 2D-IR of peptide amide-A and amide-I modes. *J Chem Phys*, 2003, 118(17): 7733—7736[DOI]
- 24 Zanni M T, Gnanakaran S, Stenger J, et al. Heterodyned two-dimensional infrared spectroscopy of solvent-dependent conformations of acetylproline-NH<sub>2</sub>. *J Phys Chem B*, 2001, 105(28): 6520—6535[DOI]
- 25 Rubtsov I V, Kumar K, Hochstrasser R M. Dual-frequency 2D IR photon echo of a hydrogen bond. *Chem Phys Lett*, 2005, 402(4-6): 439—443[DOI]
- 26 Kim Y, Hochstrasser R M. Chemical exchange 2D IR of hydrogen-bond making and breaking. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11185—11190[DOI]
- 27 Zheng J, Kwak K, Asbury J, et al. Ultrafast dynamics of solute-solvent complexation observed at thermal equilibrium in real time. *Science*, 2005, 309(5739): 1338—1343[DOI]
- 28 Hamm P, Lim M, DeGrado W F, et al. Stimulated photon echoes from amide I vibrations. *J Phys Chem A*, 1999, 103(49): 10049—10053[DOI]
- 29 Zanni M T, Asplund M C, Hochstrasser R M. Two-dimensional heterodyned and stimulated infrared photon echoes of N-methylacetamide-D. *J Chem Phys*, 2001, 114(10): 4579—4590[DOI]
- 30 Piryatinski A, Tretiak S, Chernyak V, et al. Simulations of two-dimensional femtosecond infrared photon-echoes of glycine dipeptide. *J Raman Spec*, 2000, 31(1-2): 125—135[DOI]
- 31 Gnanakaran S, Hochstrasser R M. Conformational preferences and vibrational frequency distributions of short peptides in relation to multidimensional infrared spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(51): 12886—12898[DOI]
- 32 Scheurer C, Piryatinski A, Mukamel S. Signatures of beta-peptide unfolding in two-dimensional vibrational echo spectroscopy: A simulation study. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(13): 3114—3124[DOI]
- 33 Ha J H, Kim Y S, Hochstrasser R M. Vibrational dynamics of N—H, C—D, and C=O modes in formamide. *J Chem Phys*, 2006, 124(6): 064508[DOI]
- 34 Kumar K, Sinks L E, Wang J, et al. Coupling between C—D and C=O motions using dual-frequency 2D IR photon echo spectroscopy. *Chem Phys Lett*, 2006, 432(1-3): 122—127[DOI]
- 35 Chen J, Park J, Hochstrasser R M. Nonlinear-infrared responses of the N—H mode of pyrrole in carbon tetrachloride by heterodyned and stimulated echoes. *J Phys Chem A*, 2003, 107(49): 10660—10666[DOI]
- 36 Park J, Ha J H, Hochstrasser R M. Multidimensional infrared spectroscopy of the N-H bond motions in formamide. *J Chem Phys*, 2004, 121(15): 7281—7292[DOI]
- 37 Fang C, Wang J, Charnley A K, et al. Two dimensional infrared measurements of the coupling of amide modes of an  $\alpha$ -helix. *Chem Phys Lett*, 2003, 382(5-6): 586—592[DOI]
- 38 Fang C, Wang J, Kim Y, et al. Two-dimensional infrared spectroscopy of isotopomers of an alanine rich  $\alpha$ -helix. *J Phys Chem B*, 2004, 108(29): 10415—10427[DOI]
- 39 Wang J, Chen J, Hochstrasser R M. Local Structure of  $\beta$ -hairpin isotopomers by FTIR, 2D IR, and *ab initio* theory. *J Phys Chem B*, 2006, 110(14): 7545—7555[DOI]
- 40 Paul C, Wang J, Wimley W C, et al. Vibrational coupling, isotopic editing, and  $\beta$ -sheet structure in a membrane-bound polypeptide. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(18): 5843—5850[DOI]
- 41 Cheatum C M, Tokmakoff A, Knoester J. Signatures of  $\beta$ -sheet secondary structures in linear and two-dimensional infrared spectroscopy. *J Chem Phys*, 2004, 120(17): 8201—8215[DOI]
- 42 Londergan C, Wang J, Axelsen P H, et al. Excitonic signatures in 2-D infrared spectra of beta-sheet-forming peptides. *Biophys J*, 2006, 90(12): 4672—4685[DOI]
- 43 Mukherjee P, Krummel A T, Fulmer E C, et al. Site-specific vibrational dynamics of the CD3zeta membrane peptide using heterodyned two-dimensional infrared photon echo spectroscopy. *J Chem Phys*, 2004, 120(21): 10215—10224[DOI]
- 44 Fang C, Hochstrasser R M. Amide vibrations are delocalized across the hydrophobic interface of a transmembrane helix dimer. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(45): 16740—16745[DOI]
- 45 Chung H S, Khalil M, Smith A W, et al. Conformational changes during the nanosecond-to-millisecond unfolding of ubiquitin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(3): 612—617[DOI]
- 46 Stenger J, Madsen D, Hamm P, et al. A photon echo peak shift study of liquid water. *J Phys Chem A*, 2002, 106(10): 2341—2350[DOI]
- 47 Fecko C J, Eaves J D, Loparo J J, et al. Ultrafast hydrogen-bond dynamics in the infrared spectroscopy of water. *Science*, 2003, 301(5640): 1698—1702[DOI]
- 48 Asbury J B, Steinel T, Kwak K, et al. Dynamics of water probed with vibrational echo correlation spectroscopy. *J Chem Phys*, 2004, 121(24): 12431—12446[DOI]
- 49 Bredenbeck J, Helbing J, Behrendt R, et al. Transient 2D-IR spectroscopy: Snapshots of the nonequilibrium ensemble during the picosecond conformational transition of a small peptide. *J Phys Chem B*, 2003, 107(33): 8654—8660[DOI]
- 50 Bredenbeck J, Helbing J, Sieg A, et al. Picosecond conformational transition and equilibration of a cyclic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(11): 6452—6457[DOI]
- 51 Krimm S, Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv Protein Chem*, 1986, 38: 181—364
- 52 Torii H, Tasumi M. Model calculations on the amide-I infrared bands of globular proteins. *J Chem Phys*, 1992, 96(5): 3379—3387[DOI]
- 53 Wang J, Hochstrasser R M. Characteristics of the two-dimensional infrared spectroscopy of helices from approximate simulations and analytic models. *Chem Phys*, 2004, 297(1-3): 195—219[DOI]
- 54 Davydov A S. *Theory of Molecular Excitons*. New York: McGraw-Hill Book Co Inc, 1962
- 55 Ge N H, Zanni M T, Hochstrasser R M. Effects of vibrational frequency correlations on two-dimensional infrared spectra. *J Phys*

- Chem A, 2002, 106(6): 962—972[DOI]
- 56 Ham S, Kim J H, Lee H, et al. Correlation between electronic and molecular structure distortions and vibrational properties. Amide I modes of NMA-*n*D<sub>2</sub>O complexes. *J Chem Phys*, 2003, 118(8): 3491—3498[DOI]
- 57 Bour P, Keiderling T A. Empirical modeling of the peptide amide I band IR intensity in water solution. *J Chem Phys*, 2003, 119(21): 11253—11262[DOI]
- 58 Schmidt J R, Corcelli S A, Skinner J L. Ultrafast vibrational spectroscopy of water and aqueous N-methylacetamide: Comparison of different electronic structure/molecular dynamics approaches. *J Chem Phys*, 2004, 121(18): 8887—8896[DOI]
- 59 la Cour J T, Knoester J. A transferable electrostatic map for solvation effects on amide I vibrations and its application to linear and two-dimensional spectroscopy. *J Chem Phys*, 2006, 124(4): 044502[DOI]
- 60 Hayashi T, Zhuang W, Mukamel S. Electrostatic DFT map for the complete vibrational amide band of NMA. *J Phys Chem A*, 2005, 109(43): 9747—9759[DOI]
- 61 Moran A, Mukamel S. The origin of vibrational mode couplings in various secondary structural motifs of polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(2): 506—510[DOI]
- 62 Wang J, Hochstrasser R M. Anharmonicity of amide modes. *J Phys Chem B*, 2006, 110(8): 3798—3807[DOI]
- 63 Zhuang W, Abramavicius D, Hayashi T, et al. Simulation protocols for coherent femtosecond vibrational spectra of peptides. *J Phys Chem B*, 2006, 110(7): 3362—3374[DOI]
- 64 DeCamp M F, DeFlores L, McCracken J M, et al. Amide I vibrational dynamics of N-methylacetamide in polar solvents: The role of electrostatic interactions. *J Phys Chem B*, 2005, 109(21): 11016—11026[DOI]
- 65 Mukherjee P, Kass I, Arkin I, et al. Picosecond dynamics of a membrane protein revealed by 2D IR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(10): 3528—3533[DOI]
- 66 Hahn S, Ham S, Cho M. Simulation studies of amide I IR absorption and two-dimensional IR spectra of  $\beta$ -hairpins in liquid water. *J Phys Chem B*, 2005, 109(23): 11789—11801[DOI]
- 67 Hochstrasser R M. Two-dimensional IR-spectroscopy: Polarization anisotropy effects. *Chem Phys*, 2001, 266(2-3): 273—284[DOI]
- 68 Zanni M T, Ge N H, Kim Y S, et al. Two-dimensional IR spectroscopy can be designed to eliminate the diagonal peaks and expose only the crosspeaks needed for structure determination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20): 11265—11270[DOI]
- 69 Golonzka O, Tokmakoff A. Polarization-selective third-order spectroscopy of coupled vibronic states. *J Chem Phys*, 2001, 115(1): 297—309[DOI]
- 70 Abramavicius D, Zhuang W, Mukamel S. Probing molecular chirality via excitonic nonlinear response. *J Phys B: At Mol Opt Phys*, 2006, 39(24): 5051—5066[DOI]
- 71 Zhuang W, Abramavicius D, Mukamel S. Two-dimensional vibrational optical probes for peptide fast folding investigation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(50): 18934—18938[DOI]
- 72 Woutersen S, Hamm P. Isotope-edited two-dimensional vibrational spectroscopy of trialanine in aqueous solution. *J Chem Phys*, 2001, 114(6): 2727—2737[DOI]
- 73 Huang C-Y, Getahun Z, Wang T, et al. Time-resolved infrared study of the helix-coil transition using <sup>13</sup>C-labeled helical peptides. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(48): 12111—12112[DOI]
- 74 Carcelli M, Pelagatti P, Viappiani C. Determination of the pK<sub>a</sub> of the aci-nitro intermediate in o-nitrobenzyl systems. *Isr J Chem*, 1998, 38(3): 213—221
- 75 Williams S, Causgrove T P, Gilmanishin R, et al. Fast events in protein folding: Helix melting and formation in a small peptide. *Biochemistry*, 1996, 35(3): 691—697[DOI]
- 76 Dyer R B, Gai F, Woodruff W H, et al. Infrared studies of fast events in protein folding. *Acc Chem Res*, 1998, 31(11): 709—716[DOI]
- 77 Callender R, Dyer R B. Probing protein dynamics using temperature jump relaxation spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12(5): 628—633[DOI]
- 78 Dyer R B, Maness S J, Peterson E S, et al. The mechanism of  $\beta$ -hairpin formation. *Biochemistry*, 2004, 43(36): 11560—11566[DOI]
- 79 Du D, Zhu Y, Huang C-Y, et al. Understanding the key factors that control the rate of  $\beta$ -hairpin folding. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(45): 15915—15920[DOI]
- 80 Oliva F Y, Munoz V. A simple thermodynamic test to discriminate between two-state and downhill folding. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(28): 8596—8597[DOI]
- 81 Phillips C M, Mizutani Y, Hochstrasser R M. Ultrafast thermally induced unfolding of RNase A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(16): 7292—7296[DOI]
- 82 Neidigh J W, Fesinmeyer R M, Andersen N H. Designing a 20-residue protein. *Nat Struct Biol*, 2002, 9(6): 425—430[DOI]
- 83 Simmerling C, Strockbine B, Roitberg A E. All-atom structure prediction and folding simulations of a stable protein. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(38): 11258—11259[DOI]
- 84 Ding F, Fulmer E C, Zanni M T. Heterodyned fifth-order two-dimensional IR spectroscopy: Third-quantum states and polarization selectivity. *J Chem Phys*, 2005, 123(9): 094502[DOI]
- 85 Tan H-S, Warren W S. Mid infrared pulse shaping by optical parametric amplification and its application to optical free induction decay measurement. *Optics Express*, 2003, 11(9): 1021—1028
- 86 Shim S H, Strasfeld D B, Fulmer E C, et al. Femtosecond pulse shaping directly in the mid-IR using acousto-optic modulation. *Opt Lett*, 2006, 31(6): 838—840[DOI]
- 87 Noda I. Progress in two-dimensional (2D) correlation spectroscopy. *J Mol Struct*, 2006, 799(1-3): 2—15[DOI]
- 88 Li Y, Sun S, Zhou Q, et al. Identification of American ginseng from different regions using FT-IR and two-dimensional correlation IR spectroscopy. *Vib Spectrosc*, 2004, 36(2): 227—232[DOI]
- 89 Wang Y, Gao W, Noda I, et al. A Modified mean normalization method to reduce the effect of peak overlap in two-dimensional correlation spectroscopy. *J Mol Struct*, 2006, 799(1-3): 128—133[DOI]
- 90 Shen Y, Peng Y, Wu P, et al. Two-dimensional (2D) correlation spectroscopy. *Prog Chem*, 2005, 17(3): 499—513
- 91 梁文平, 杨俊林, 陈拥军, 等. 新世纪的物理化学——学科前沿与展望. 北京: 科学出版社, 2004
- 92 Brixner T, Stenger J, Vaswani H M, et al. Two-dimensional spectroscopy of electronic couplings in photosynthesis. *Nature*, 2005, 434(7033): 625—628[DOI]
- 93 Zheng J, Kwak K, Chen X, et al. Formation and dissociation of intra-intermolecular hydrogen-bonded solute-solvent complexes: Chemical exchange two-dimensional infrared vibrational echo spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(9): 2977—2987[DOI]