

光声光谱及其在生物化学中的应用

宋 鸿 铤 邱 德 仁

(复旦大学化学系)

光声光谱是近几年来发展起来的一种研究物质吸收光谱的新技术。它与传统的分光光度技术相似,但又具有传统吸收光谱所不及的独特优点,可以测量粉末、斑痕、织物以及生物膜、生物组织或生物体液等一些不溶性的样品或产生强烈光散射样品的吸收光谱。因此,在广泛的科学领域中获得了应用^[1-3]。1979年在美国举行了第一次光声光谱国际会议并决定创办 *Journal of Photoacustics* 专业杂志,发展十分迅速。

一、光声效应和光声光谱的基本原理

光声效应是光声光谱的物理基础。早在1880年电话发明人 Bell 和1881年 Tyndall、Röntgen 先后分别发现了固体物质和气体物质的光声效应,即当装置在密闭样品池中的物质受到斩波光的照射时,观察到产生声音的物理现象。气体物质的光声效应机理是:当光束照射到装在密闭池中的气体时,气体分子吸收了部分光能而发热,从而引起密闭池中气体压力的变化;当光照切断时,这种发热和气体压力的变化就消失。因此,当几十赫乃至上千赫的频率(音频)调制的光束间歇地投照样品时,产生相同频率的压力波动,这种压力波动与声音产生的空气波动一样,使装在样品池上的微音器(即麦克风)接受信号,加以放大和检测。固体与液体的光声效应情况也相类似,当样品池中的固体或液体样品受到斩波光束的照射时,引起样品的周期性加热,热从样品表面传递至周围的气体(池中的空气或充入的其他合适气体),使固-气界面的气体薄层产生振荡运动,相当于

一个“声活塞”,驱动样品池内其他气体作相应的振荡,从而产生周期性压力变化,为微音器所检测。

由于样品对各种波长的单色光具有选择吸收,因此光声信号也随波长改变。以照射光的波长为横坐标,光声信号的相对大小为纵坐标,即可给出物质的光声光谱。其吸收峰的波长位置是物质定性鉴定的基础。

由于光声信号是由样品吸收光能后转变为热能的过程中产生的,因此,光声信号的强度或功率与被吸收的光强或功率成正比:

$$P_{PAS} = P_{abs}\beta_\lambda$$

式中 P_{PAS} 为光声信号的强度或功率, P_{abs} 为吸收光的强度或功率, β_λ 是波长为 λ 时的转换系数,它是光吸收转变为热的转换效率的量度。

对一个简单体系的光吸收,可以从物质对电磁辐射的经典关系计算。设吸收层厚度为 b , 克分子吸收系数为 ϵ , 浓度为 c , 波长 λ 处的光吸收 P_{abs} 可由 Beer 定律给出:

$$\begin{aligned} P_{abs,\lambda} &= P_{0,\lambda} - [P_{0,\lambda} \exp(-2.3\epsilon_\lambda cb)] \\ &= P_{0,\lambda} [1 - \exp(-2.3\epsilon_\lambda cb)] \end{aligned}$$

$P_{0,\lambda}$ 是波长为 λ 的照射单色光的强度或功率。光声信号 $P_{PAS,\lambda}$ 由 $P_{abs,\lambda}$ 乘以转换系数 β_λ 而得到:

$P_{PAS,\lambda} = P_{abs,\lambda}\beta_\lambda = P_{0,\lambda}[1 - \exp(-2.3\epsilon_\lambda cb)]\beta_\lambda$
在吸收转弱时指数项展开式中的高次项可以忽略,则

$$\begin{aligned} P_{PAS,\lambda} &= P_{0,\lambda}[1 - (1 - 2.3\epsilon_\lambda cb)]\beta_\lambda \\ &= P_{0,\lambda}(2.3\epsilon_\lambda cb)\beta_\lambda \end{aligned}$$

上式表明,光声信号正比于样品中吸光物质的浓度,以致有可能获得具有线性关系的工作曲

线。当然上式仅是理想条件下获得的，实际上光声信号还与许多实验因素有关。

二、光声光谱的仪器装置和实验技术

图 1 为光声光谱仪示意图。由如下三部分组成：

1. 光源 由于光声信号正比于照射光的强度，因此要求高强度和稳定的单色光源。通常采用大功率（1 KW）氙弧灯并配以强光单色仪来获得高强度单色光。激光在强度和纯度上虽是更理想的单色光源，但目前还缺乏从紫外到

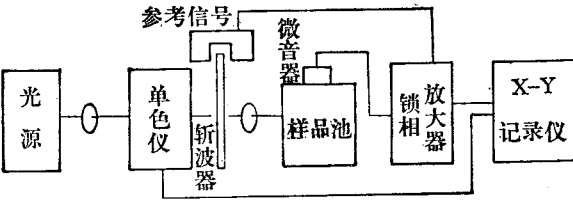


图 1 光声光谱仪示意图

近红外光谱范围内连续方便可调的激光器，应用受到限制。调制单色光频率的斩波器有机械斩波和电子斩波两种，频率在几十赫至 2000 赫之间可调。

2. 光声池 它包括装有窗口的样品池和灵敏的微音器。光声池要求与外界有良好的隔音和防震。为增大信号也可在池内装置几个微音器。

3. 检测记录系统 光声信号经锁相放大后输入 $x-y$ 记录仪的 y 轴，波长扫描输入 x 轴。

现有光声光谱的商品仪器见文献[4]。

光声光谱的实验技术中，最重要的是必须对光源的光谱分布作归一化校正。由于氙灯对各种波长发射的强度不同，因此以光声信号的绝对强度对波长所作的光声光谱中包含光源的光谱分布的成分，故必须进行归一化校正。归一化的方法是，用碳黑作黑体吸收剂^[5]，测绘出的光声光谱表示光源的光谱分布，然后将样品的光声信号与碳黑的光声信号相比较求得信号的相对强度，这样获得的光声光谱就是归一化了的样品光谱。

三、光声光谱在生物学上的应用

1. 生物化学样品的光声光谱

血红蛋白单体结构系由两条 α 链和两条 β 链组成，每条 α 链和 β 链又都与一个血红素原的辅基相结合，它具有三个吸收峰：400 nm 附近的 Soret 吸收带（或 γ 带）、550—610 nm 处的 α 吸收带以及 520—550 nm 处的 β 吸收带。但是，由于在血浆和红细胞中存在着其他的蛋白质和一些类脂化合物，会产生强烈的光散射，不能获得满意的吸收光谱，因此，必须先从全血中萃取分离血红蛋白，然后由血红蛋白水溶液获得它的吸收光谱。如若采用光声技术，则只需将样品涂布后在空气中干燥几分钟即可直接进行分析。从图 2 可见：涂布的全血（a）、从血浆中分离得到的红细胞（b）以及萃取血红蛋白（c）三种光声光谱都十分相似，且全血与萃取血红蛋白的光声光谱一样清晰，血红蛋白的三个特征吸收也十分明显。其他蛋白质和一些类

脂化合物在这里不再产生干扰。因此不再需要经过通常的萃取分离步骤，即能用光声光谱直接研究全血中的血红蛋白^[6]。

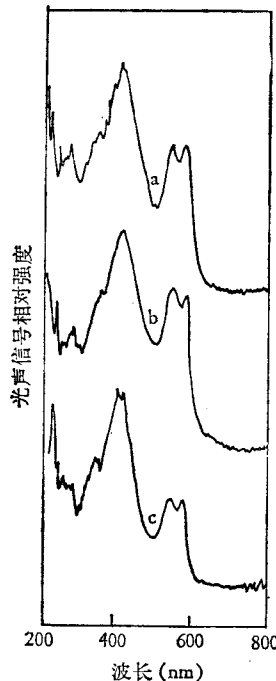


图 2 血红蛋白的光声光谱

- (a) 在全血中
- (b) 在红细胞中
- (c) 从红细胞中萃取的血红蛋白

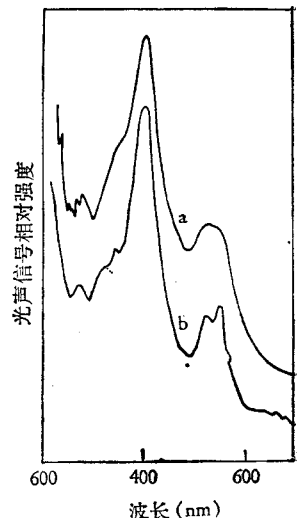


图 3 粉末状细胞色素 c 的光声光谱

- (a) 被气化的 (b) 被还原的

图 3 是被氧化的和被还原的细胞色素 c 处于冻干或多晶状态时的光声光谱。它与水溶液的吸收光谱十分相似, 这表明冻干并不使细胞色素 c 这样的血红素蛋白有明显的改变, 也说明光声光谱研究冻结状态的血红素蛋白类物质是很合适的^[6]。

此外, 光声光谱用于研究不溶性的生化样品如细胞色素 P₄₅₀ 和不透明的肌红蛋白晶体也是很成功的^[1]。

2. 植物化学样品的光声光谱

叶绿素是植物合成必不可少的催化剂, 它在结构上与血红素有相似的地方, 都含有卟啉环, 反映在吸收光谱上, 在 400 nm 附近有 Soret 吸收带, 650 nm 处有叶绿素的特征吸收。如果用传统的分光光度法对植物叶子进行研究, 必须先经萃取分离, 才能获得萃取物溶液的吸收光谱。然而从普通绿叶不经分离直接获得的叶绿素的光声光谱 (图 4) 也能提供光谱区域在 420nm 附近的 Soret 带、450—550 nm 的类胡萝卜素带以及 600—700 nm 间的叶绿素带, 完整地表达叶绿体的光学性质^[1]。由于光声光谱可从不经任何处理的新鲜植物样品中获得有关的光学特性, 因此可以通过比较各种样品的光声光谱来获得关于植物处于正常生长还是发生病变的有用信息^[1]。

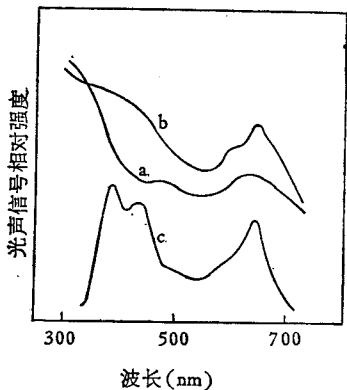


图 4 叶绿素的光声光谱
(a) 在菠菜全叶中 (b) 均匀捣碎的菠菜全叶
(c) 差示光声光谱(b-a)

考虑到菠菜叶子表面具有角质层, 因此对它进行光声光谱的研究更有意义^[7], 完整的菠

菜叶子的光声光谱如图所示 4a, 它在整个可见区的吸收异乎寻常的低, 叶绿素的吸收也未显示出来。如将菠菜均匀捣碎, 或将菠菜叶的角质层除去以后再进行光声光谱分析 (图 4b)。它在可见区的吸收, 特别是叶绿素的吸收带, 都显现了出来。图 4 c 是 b 与 a 的差示光声光谱, 与叶绿素萃取液的吸收光谱十分相似。菠菜全叶样品和均匀捣碎样品两者光声光谱之所以不同, 是由于全叶样品表面的角质层虽然能够使照射光透入表皮内层, 但对叶绿体的热扩散起阻碍作用, 使叶绿体的光声信号难以产生。当样品具有透明的表面层时(如角质层)其光声光谱就要用差示法克服层效应的影响(图 4c)。

3. 机体代谢和天然产物的光声光谱^[1]

用光声光谱研究了一系列藻类 (只需几毫克干燥样品), 观察到只有其中两种藻类在 320nm 处有芳香环和高度共轭的次级代谢物的吸收带。这个例子表明光声光谱有可能从复杂的生物体系中检出某一成分的微小信息, 这也是其它光谱方法所不能比拟的。

4. 医学样品的光声光谱

应用光声光谱研究动物和人体的骨、牙等硬组织和皮肤、肌肉、脏器软组织也很有意义。以对天竺鼠表皮的光声光谱研究为例^[1,2],

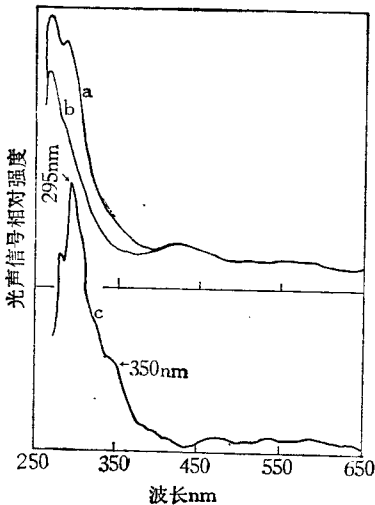


图 5 天竺鼠表皮的光声光谱

图 5 中的光声光谱曲线 a 为经 2% 杀菌剂

TCSA (tetrachlorosalicylanilide 四氯水杨基酞替苯胺) 的乙醇溶液处理过的。b 为未经处理的表皮。c 则是两者的差示光声光谱, 它反映表皮经 TCSA 处理后的变化。它也启示我们: 人体组织发生病变时, 组织的光声光谱可能提供有价值的信息, 使之成为早期诊断疾病包括癌症的有用工具, 这可能是光声光谱最有潜在价值的应用领域。

在生物化学研究中, 由于样品组成的复杂性, 溶解、分离、富集等前处理往往是不可缺少的。因此, 薄层层析纸层析、电泳等分离技术在生物化学中的应用比其他化学领域更为广泛和重要。光声光谱如与这些分离富集技术相结合, 则又从另一侧面在生物化学中获得广泛的应用。这可以薄层层析为例^[8]。由于薄层层析的吸

附剂硅胶 G 是不透明的和强烈光散射的物质, 因此不能在薄板上直接鉴定各种分离物, 而光声光谱的独特优点使它能够直接在薄板上作出鉴定。这就大大提高了这些分离富集技术的实用价值。

参 考 文 献

- [1] Rosenwaig, A.: *Anal. Chem.*, 47, 592 A, 1975.
- [2] Rosenwaig, A.: *Physics Today*, 28, 23, 1975.
- [3] Adams, M. J.: et al.: *Analyst*, 101, 73, 1976.
- [4] *Princeton Applied Research Model Photoacoustic Spectrometer* 说明书。
- [5] Rosenwaig, A.: *Opt. Commun.*, I, 305, 1973.
- [6] Rosenwaig, A.: *Science*, 181, 657, 1973.
- [7] Adams, M. J. et al.: *Analyst*, 101, 553, 1976.
- [8] Rosenwaig, A. et al.: *Anal. Chem.*, 47, 548, 1975.

[本文于 1980 年 10 月 16 日收到]

旋 转 函 数 计 算 程 序

毕汝昌 林政炯 高义贵

(中国科学院生物物理研究所七室)

目前, 用 X 射线衍射法测定蛋白质和核酸晶体结构, 通常采用同晶置换法和反常散射法来解决周相问题。但是这些方法都需要制备合用的重原子衍生物, 而这一步往往需要长时间的大量的筛选工作。另一种解决周相问题的途径是所谓的分子置换法^[1]。这种方法利用不同晶体学环境里的结构相似性来得到周相信息, 因而不需要重原子衍生物。分子置换法的应用, 近些年取得了较大的进展, 尤其是在测定不同种属、不同晶型和不同族系蛋白质分子结构方面, 它显示了更大的优越性。不久前, 用分子置换法测定未知结构的计算技术有了发展, 能有效地用于修正多亚基蛋白, 特别是病毒晶体的周相。

用分子置换法测定晶体结构的步骤分为三个阶段: 确定分子(或亚单位)在晶胞里的取向; 确定分子在晶胞里的位置; 进行分子置换, 解决周相问题。为确定分子的取向, 通常应用比较

帕特逊函数的方法。由衍射强度算得的帕特逊函数含有两种原子间向量群。一种是仅含有分子取向信息的分子内原子间向量群, 它们分布在以原点为球心, 分子最大线度为半径的球体内; 另一种是包含分子间距离信息的不同分子的原子间向量群, 它们大都分布在上述球体以外。旋转函数就是基于帕特逊函数的这种性质, 用对比前一种向量群的方法来确定分子的相对取向。按 Rossmann 和 Blow 的定义^[2], 旋转函数

$$R(C) = \int P_1(X_1) P_2(CX_2) dV \quad (1)$$

其中 $X_2 = CX_1$ 、取决于三个独立角度的旋转矩阵 $[C] = [\alpha][\rho][\beta]$, $[\alpha]$ 和 $[\beta]$ 分别为笛卡尔坐标和晶体坐标系里的相互转换矩阵, $[\rho]$ 是在笛卡尔坐标系里的旋转矩阵。由此可以看出, 两个相对旋转的帕特逊函数 $P_1(X_1)$ 和 $P_2(CX_1)$ 的乘积按围绕原点的体积 U 的积分值