

讲 座

差示扫描量热法 (DSC) 及其在生物学和生物化学中的应用

傅 亚 珍

(中国科学院生物物理研究所)

热力学是研究物质热性质和热运动规律的科学。热力学定律具有普遍应用性和高度可靠性,它可以用于研究自然界中的一切物质、研究物质的转变及能量的转化。

机体内各个水平上的生理活动,如呼吸、血液循环、肌肉收缩、神经传导、细胞分裂乃至蛋白质分子的合成等,无一不伴随着能量的转化过程,其动力来源于热能,同时,也散发出一部分不能做功的热。可见生命与热是息息相关的。因此我们可以通过研究机体中的热现象,去探讨各个水平上生理活动的机理、生命本质乃至生命的起源。

随着人们对生物体认识的加深以及量热技术的不断提高,到本世纪七十年代,形成了生物热力学和生物化学热力学这两个生物学分支,它们用独特的热力学理论为进一步认识生命的本质展现了广阔的前景。

量热法是热力学研究中的重要方法。它直接研究生物体系自身所固有的热力学过程,不需要添加任何试剂,所以不会引入干扰生物系统正常活动的因素。它可以直接用离体的组织或悬浮液进行测量,而不需要象分光光度法那样将生物试样制备成透光的清澈溶液。尽管量热法缺乏特异性,但由于生命科学所研究的体系本身固有的特性,常常允许用非特异的分析方法,而且有时比特异的分析方法效果更好,有助于发现新的现象,因此,它是生命科学研究的一种有效方法。

量热法主要分为等温量热法和扫描量热

法。前者是将试样控制在等温条件下测量试样的热效应,后者则是对试样进行温度扫描(升温或降温)而测量试样的热效应。本文介绍的扫描量热法,它测量的是试样和热惰性参比物在温度扫描中所发生的热效应之差,所以也叫做差示扫描量热法 (Differential Scanning Calorimetry 简称 DSC)。

一、DSC 的原理

DSC 采用的是“零位平衡”原理。差示扫描量热系统分为两个控制环路,如图(1)所示。其中一个环路作平均温度控制,以保证按预定的速率升高样品和参比材料的温度。第二个环路是用来保证当样品和参比材料之间一旦出现温度差(由于样品的放热反应和吸热反应)时能够调节功率输入以消除这种温度差。这就是零位平衡的原理。这样,通过连续不断地和自动地调节加热器(样品端和参比端各有一个单独的加热器)的功率,使样品支架的温度与参比支

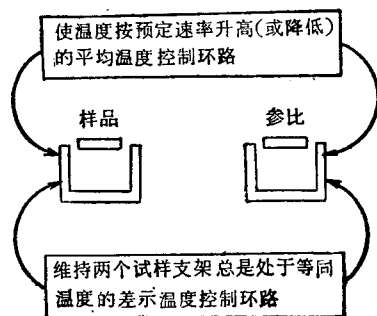


图 1 差示扫描量热系统的两个控制环路的示意图

架的温度保持相同。这时,有一个与输入到样品的热流和输入到参比材料的热流之间的差值成正比的信号 dH/dt 被馈送到记录仪中。实际上,这个记录仪还同时记录样品和参比材料的平均温度。

DSC 直接测量的物理参数是温度 (T)、时间 (t) 和热流速率 (dH/dt)。即当试样和参比物以同一个温度程序扫描时,测量试样在某个温度或某个时刻所发生的热流变化速率。根据热力学定律可知,在等压条件下,系统的状态函数焓 (H) 的增加值等于系统所吸收的热量,即 $dH = dQ$ 。DSC 的测量一般都是在等压条件下进行,因此 DSC 所测量的热流速率也就是焓的变化速率,即 $dQ/dt = dH/dt$ 。

图 2 为典型的 DSC 曲线,纵坐标为热流速率,它正比于作为温度函数的样品比热。因为 $\frac{dH}{dt} = m \times \frac{d\bar{H}}{dT} \times \frac{dT}{dt}$ 其中, m 为样品的重量, $\frac{d\bar{H}}{dT}$ 为样品的比热 (C_p)。若把热流速率除以样品重量及扫描速率,比热就可直接用纵坐标表示。横坐标为温度,也可以表示时间。因为 $\Delta t = \Delta T \cdot (dT/dt)^{-1}$ 。若试样发生吸热效应,则峰形在基线之上,如图中熔融峰。若试样发生放热效应 r ,则峰形在基线之下,如图中结晶峰。试样发生热效应的大小与峰面积成正比。峰的形状可以表明试样内发生的热效应变化速率对温度或时间的依赖关系。扫描基线若发生了具有拐点的改变,则说明试样内一定有玻璃化转变,如图所示。

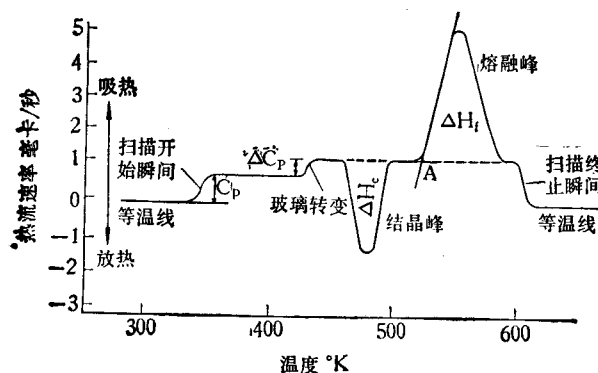


图 2 典型的 DSC 曲线

二、物理化学参数的测定

1. 热化学参数 包括熔融热、熔融温度、汽化热、汽化温度、升华热、比热、玻璃化转变温度、化学反应热、相变热、固化热、固化温度等等。用 DSC 测上述参数具有简便、快速、试样量少的优点。

2. 纯度 固体物质的纯度对其熔融峰的峰高和峰宽有显著影响。根据 Van't Hoff 方程,不纯物质的熔点 (T_m) 低于纯物质的熔点 (T_0), 其熔点温差为:

$$T_0 - T_m = \frac{RT_0^3 X}{\Delta H}$$

式中 $R = 1.987$ 卡·克分子 $^{-1}$ K $^{-1}$, 是气体常数。 ΔH 是纯物质的克分子熔融焓, 单位是卡·克分子 $^{-1}$ 。 X 是杂质的克分子分数。

不纯物质在熔融过程中,在某一温度 T_i 时已经熔融掉的部分的百分比 f 由下式给出:

$$f = \frac{T_0 - T_m}{T_0 - T_i}$$

于是 $T_i = T_0 - \frac{T_0 - T_m}{f}$

由上式看出,若用 T_i 对 $\frac{1}{f}$ 作图,则斜率为 $-(T_0 - T_m)$, 截距为 T_0 。再根据前面的 Van't Hoff 方程,只要做出试样的 DSC 曲线,求出几个 T_i 时的熔融分数,便可计算出试样(不纯物质)的纯度 $(1 - X)$ 。若 DSC 与计算机连用,则计算机可根据纯度计算程序,按照试样的熔融图形,自动计算并打印出试样的纯度,既简便又准确。

利用以上方程时,要求杂质与纯物质不能形成固溶体,该物质的熔融焓与杂质的性质无关,而且待测物纯度不能低于 92%, 否则要对以上方程加以修正^[1,2]。

当试样纯度很差时, T_i 对 $\frac{1}{f}$ 的图形会明显地偏离直线,此时要对曲线进行修正使之为一一直线。Sondack^[3] 提出了一个把应用 DSC 测定纯度所得的数据加以线性化的简单方程。

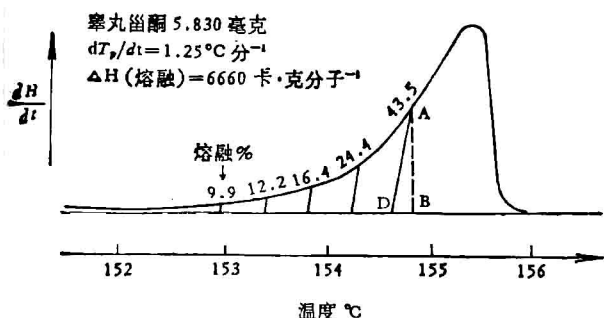


图 3 羧丸酯酮(不纯)的熔融曲线

A点,真正读出温度值是在D点的温度,A点的熔融分数为垂线AB以前的面积与总面积之比

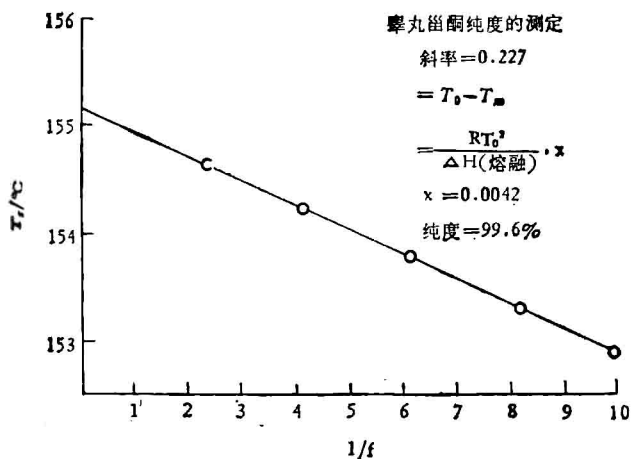


图 4 羧丸酯酮纯度的图解求值

图 3 和图 4 就是以羧丸酯酮的纯度测定为例介绍固体物质纯度的测定方法。

用 DSC 测纯度有以下几个优点: ① 试样少。② 灵敏度高。③ 准确度高(因为此法求出的是杂质的克分子分数,所以纵使实验误差为 10%,纯度的测定误差也只有万分之几)。

3. 分子量 M 如果试样发生热效应的转变是一个双态过程,即转变前后试样的变化过程只包含变化前后两种状态之间的直接转变而不存在中间过渡状态的过程,那么就可以从该试样的 DSC 曲线上通过峰面积的测量,计算出量热学的焓变 ΔH_{cal} (单位是卡/克)。也可以从 DSC 曲线中找到试样热转变一半时的温度 T_m ,及半峰宽 $T_2 - T_1$,再根据 Van't Hoff 公式

$$\Delta H_{VH} = 4RT_m^2/T_2 - T_1$$

计算出 Van't Hoff 焓变 ΔH_{VH} (单位: 卡/克分子)。式中 R 为气体常数。所以试样的分子量 M 即可用 $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$ 求出^[4]。

4. 反应平衡常数 K 在一个化学或生物化学反应过程中,反应焓变与反应程度成正比。如果反应是在等压条件下进行,那么根据 Van't Hoff 公式

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \Delta H_{VH}/RT^2$$

只要由试样反应的 DSC 曲线计算出 ΔH_{VH} ,就可以确定不同温度时的反应平衡常数 K ^[4]。

5. 结晶度、交联度及固化程度 据热分析法定义,一个晶体的结晶度为:

$$\text{结晶度} = \frac{\text{晶体试样的熔融焓}}{100\% \text{ 结晶的晶体的熔融焓}}$$

纤维样品的交联度及热固化物质的固化程度也可用与试样交联或热固化时的放热峰相应的焓变和已知交联度和固化度的物质的焓变之比表示,比值大者,说明试样的交联度或固化度大,反之则小。

6. 热导率、电导率和热辐射率 由于 DSC 所测量的热流的变化与样品的热导率^[5]、电导率^[6]和热辐射率^[7]有关,因此也可以测定这三个物理参数。

7. 相图 多元体系的熔融过程随温度变化的函数关系,可以通过它们的相图加以表示。

根据多元系统 DSC 曲线的熔融峰的开始和终止温度,便可做出熔融温度与组分含量的关系图,从图中可看出组分比例不同的多元系统在不同温度时的相分布^[8]。

8. 动力学参数 从原则上讲 DSC 可以测定化学反应程度与反应时间(或反应温度)的动力学关系。为了测出反应速率,我们可以按恒温方式或温度扫描方式来使用 DSC。采用恒温方式时,是把反应程度直接作为温度和时间的函数来测定的。例如,要测量分解放热反应的反应速率、可将若干个样品分别先后放进固定于某温度的量热计内,每个样品的放置时间长短不同。然后温度扫描得分解反应的 DSC 曲

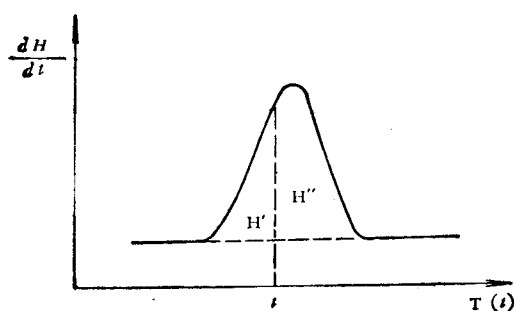


图5 化学反应的 DSC 曲线

线。其结果，每单位重量样品的放热峰面积随预先恒温放置时间的增加而减小。这个减小的程度就是衡量在原放置温度下的反应速率的尺度。改变不同的放置温度就可以得到反应速率与反应温度间的动力学关系^[9]。

采用温度扫描方式时，是将样品通过进行反应的温度范围，并记录其 DSC 曲线，如图 5。设在反应中某时刻 t 的反应程度为 α ，则

$$\begin{aligned}\alpha &= H'/H_0 \\ H_0 &= H' + H'' \\ \frac{d\alpha}{dt} &= \frac{1}{H_0} \frac{dH'}{dt}\end{aligned}$$

从上式可知，一个化学反应在某时刻 t 的反应速率 $(d\alpha/dt)$ ，等于此时时刻的峰高除以峰

面积。

采用温度扫描方式，不仅可以测出反应速率，还可探知反应机理。因为它可以求出反应动力学的另外三个参数，即活化能 E ，反应级数 n 和频率因子 A 。

我们知道，一般的化学反应速率可以用下列微分方程加以描述：

$$\frac{d\alpha}{dt} = K(T) \cdot f(\alpha) = K(T) \cdot (1 - \alpha)^n$$

此处， $\frac{d\alpha}{dt}$ 为反应速率， $K(T)$ 是取决于温度的反应速率常数， $f(\alpha)$ 是反应机制的假设模型函数。一般假设的函数是 $(1 - \alpha)^n$ ， α 为反应程度，也可视为反应物的浓度。

就一般动力学测量而言，速度常数 K 为：

$$K = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}}$$

经过数学推导后，便可由化学反应的 DSC 曲线上求出 E 、 n 和 A 。根据不同的数学处理，便有不同的求动力学参数的方法。主要有 Freeman-Corral 法^[10]或差减微分法，图解微分法^[11]及积分法^[12]等。由于所采用的反应机制的假设模型的不同，也还有不同的解析方法和结果^[13]。

(未完待续)

(上接第 33 页) 从表 2 还可以看出，用 1:0 的脂质体温育过的腹水癌细胞，其实验动物开始死亡时间与平均存活天数十分相近，由此看来，腹水癌细胞用 1:0 的脂质体温育后，其膜卵磷脂与胆固醇之比没有改变。

参 考 文 献

- [1] Shinitzky, M. et al.: *International Review of Cytology*, **60**, 121, 1979.
- [2] Giorgio Lenaz: *The molecular Biology of membranes*, Chapter 6. (Sindney Fleischer et al eds.), p. 137, Plenum Press, New York, 1978.
- [3] Inbar, M. et al.: *Europ J. Cancer*, **13**, 1231, 1977.
- [4] Shinitzky, M. et al.: *Biochimica et Biophysica*

Acta, **515**, 367, 1978.

- [5] 林克椿等:《生物化学与生物物理进展》, 1981 年, 第 6 期。
- [6] Christopher, J. et al.: *Biochemical Society Transaction*, **3**, 1009, 1975.
- [7] Shinitzky, M. et al.: *J. Molecular Biology*, **85**, 603, 1974.
- [8] Richard, A. et al.: *J. Clinical Investigation*, **25**, 115, 1975.
- [9] W. J. Van Blihserswijk et al.: *Biochemica et Biophysica Acta*, **467**, 309, 1977.
- [10] Rottem, S. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **604**, 65, 1980.
- [11] Sanford Shaffil, J. et al.: *Biochemistry*, **15**, 4832, 1976.
- [12] Cooper, R. A. et al.: *Biochemistry*, **17**, 327, 1978.

[本文于 1981 年 2 月 25 日收到]