

红外衰减全反射光谱及其在生物学中的应用

倪 行

贾 玉 珍

包 建 春

(南京师大化学系, 南京)

(河北师大化学系, 石家庄)

(南开大学化学系, 天津)

提 要

本文介绍了红外衰减全反射光谱 (IR-ATR) 的基本原理及其在生物学领域内的广泛应用。文中列举了 ATR 技术对生物分子的组成、形态、表面结构以及表面吸附的定性和定量研究的例子。

红外吸收光谱的常规方法是测定样品的透射光谱, 而对某些强吸收物质, 需用反射光谱, 但一般反射光谱随吸收系数的变化其变化不明显。1961 年 J. Fahrenfort^[1] 提出了衰减全反射 (Attenuated Total Reflection, ATR) 法, 解决了上述问题, 从而开辟了一个新的研究途径。ATR 技术问世以来, 发展迅速, 多种 ATR 装置现已成为富里叶变换红外 (FT-IR) 仪的常规附件, 它对于表面和界面的微小变化很灵敏, 同时该技术制样方便, 不破坏样品表面, 是研究各类样品表面结构的最有力的手段之一。ATR 谱在生物、医学领域应用极为普遍, 可用来研究酶的结构与活性间的关系^[2]、生物分子的表面吸附及表面性质^[3]、血液表面的相互作用^[4]、医学材料与人体、血液表面的接触等问题^[5], 而最常见的是研究生物的生理条件、生化组成, 因多数活性生物组织含水 65—85%, 因而研究生物分子的组成、结构形态和相互影响必须在自然介质即水溶液中进行。ATR 谱对处于高吸收介质(如水)中的生物分子能进行快速定性和灵敏的定量分析。在最近的三、四年中, ATR 用于生物、医学领域的文献已有二十多篇。

一、基本 原 理

在均匀介质中光沿着直线传播, 但光从一个介质进入另一介质时, 光线在两个介质的分

界面上被分为反射光线和折射光线, 进入第二介质的折射光其进行方向可用折射定律表示:

$$\frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} = \frac{n_2}{n_1} = n_{21} \quad (1)$$

(1) 式表明了入射角 θ_1 的正弦与折射角 θ_2 的正弦之比取决于第二介质的折射率 n_2 与第一介质的折射率 n_1 之比, 即第二介质对第一介质的相对折射率 n_{21} 。在 $n_1 > n_2$ 的情况下, $\theta_2 > \theta_1$ 。当 $\theta_1 = 90^\circ$ 时, 光线不再进入第二介质, 而按反射定律返回原介质, 这种完全返回原介质的反射, 称为全反射或全内反射。此时的人射角称为临界角 θ_c , 它可根据下式计算而得:

$$\sin \theta_c = \frac{n_2}{n_1} = n_{21} \quad (2)$$

因此当光从光密介质向光疏介质折射, 且入射角超过临界角 ($\theta_1 > \theta_c$) 时, 则发生全反射。然而理论和实践都已表明, 即使在发生全反射的情况下, 入射光的电磁波不就此中断在分界面上, 在第二介质中仍有入射光的确定值, 其值为:

$$\left. \begin{aligned} E &= E_0 e^{-z/d_p} \\ d_p &= \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta_1 - n_{21}^2}} \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

式中 E_0 是入射光的强度, z 是光进入第二介质的深度, 当透入第二介质的光振幅按指数律衰

减到原来的 $\frac{1}{e}$ 时,即 $Z = dP$,则 dP 称为透穿深度。(3)式表明透入第二介质的波强度在 Z 方向急剧下降,透入深度仅约为波长数量级的一薄层内,故将它称为倏逝波或表面波。若第二介质吸收率 $K = 0$,则倏逝波的能量仍返回第一介质,这是“无损耗全反射”。但若第二介质 $K \neq 0$,则倏逝波在光疏介质中传播时能量遭到了损耗,不再全部返回光密介质,导致全反射时反射光波能量的衰减,这即为本文开始时提到的“衰减全反射”。当 $K \ll n_2$ 的情况下,所衰减的能量 ΔR 可用下式^[6]表示

$$\Delta R = 1 - R \approx \frac{4}{n_{21} \cos \theta} \left(\frac{K}{n_2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

式中 R 是反射率,(4)式表明入射角愈大,相对折射率愈小,所衰减的能量愈大,并且衰减能量随吸收率的增大成 $\frac{1}{2}$ 次方增大,这就说明ATR技术的灵敏性,而且在样品的吸收峰处,也是ATR谱的峰,所以ATR谱与透射光谱极为相似。如图1^[7]。

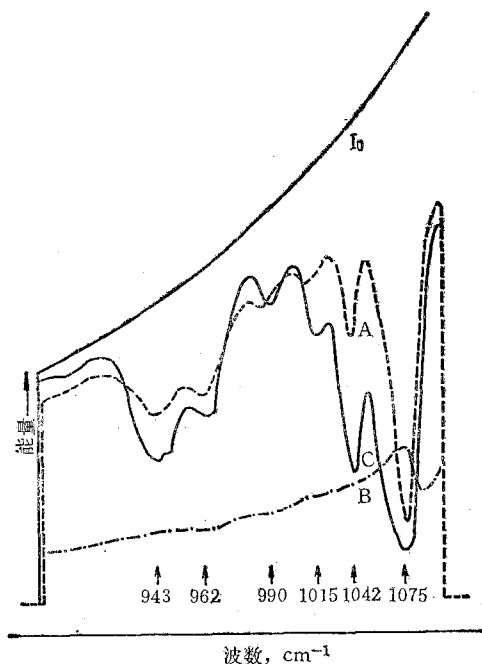


图1 邻苯二甲酸二丁酯谱

I_0 光谱的参考强度 A 透射谱 B 常规反射谱 C ATR 谱(以 AgCl 为棱镜)

为了进一步增大灵敏度,ATR技术采用

多重内反射(Multiple Internal Reflection, MIR)法,如图2所示。用高折射率的光学材

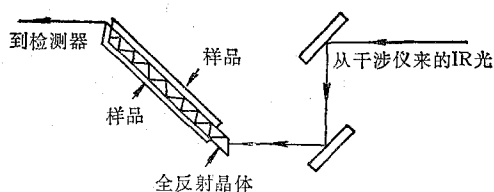


图2 FTIR-ATR 装置光路图

料制成棱镜,将样品和它保持良好的光学接触,使光波发生多次内全反射。设反射次数为 N ,则衰减了的总能量近似地为: $N \cdot \Delta R$ 。可见对于吸收率甚小的样品,采用多重反射法将能有效地提高测量灵敏度。在这方法中对棱镜的透明度要求极高,通常可选用锗($n = 4$)、硅($n = 3.4$)、KRS-5($n = 2.4$)、硫化锌($n = 2.4$)、氯化银($n = 2.0$)等光学材料。

二、应用

1. 研究生物分子的组成和结构 B. Quintard-dorques 等人对水溶液中生物分子 β -丙

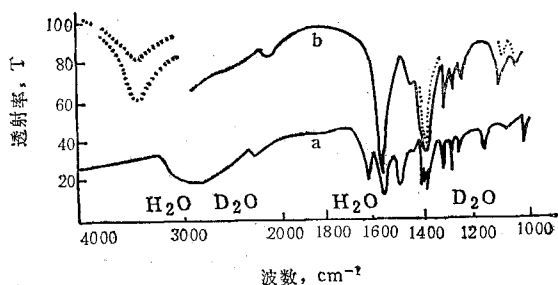


图3 β -丙氨酸的 ATR 谱

a. 固体状的透射谱 b. 水溶液中的 ATR 谱 (虚线表示在重水中的谱线)

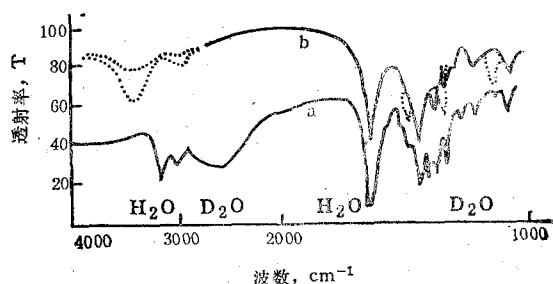


图4 L-脯氨酸的 ATR 谱

a. 固体状的透射谱 b. 水溶液中的 ATR 谱 (虚线表示在重水中的谱线)

氨酸和L-脯氨酸的ATR红外光谱进行了研究^[8],实验采用分辨率为 $1-2\text{ cm}^{-1}$ 的光谱仪在 $4000-200\text{ cm}^{-1}$ 的波谱范围来获得ATR谱图,入射角固定在 45° 角,棱镜为锗($n=4.0$),图3、4^[8]在晶体里,氨基酸以“两性离子”存在,所以呈现出一个电离的羧基($-\text{COO}^-$)和一个氨盐(NH_3^+)的吸收峰。如图3 β -丙氨酸的 $-\text{COO}^-$ 的强烈反对称和对称的伸缩振动分别是 1570 cm^{-1} 和 1400 cm^{-1} , NH_3^+ 的对称和反对称伸缩振动分别是 1635 cm^{-1} 和 1505 cm^{-1} , 另外还有一个中心在 2700 cm^{-1} 处的宽吸收峰也表示 NH_3^+ 的伸缩振动,而在溶液中 NH_3^+ 带消失,即 1635 cm^{-1} 和 1505 cm^{-1} 处谱消失了,取而代之的 NH_2 的强伸缩振动出现在 3400 cm^{-1} 处,以及出现在属于 CH_2CH_2 基团的 1100 cm^{-1} 波带,三个 CH_2 振动出现在 $1260-1340\text{ cm}^{-1}$ 范围内,可见从固体到溶液所受到的影响。L-脯氨酸谱类似于 β -丙氨酸, COO^- 振动在高频 $2400-3100\text{ cm}^{-1}$,而低于 1400 cm^{-1} 的一些细小的峰是五角脂环结构。

在重水中出现了一些峰,这是由于H和D自然交换在复杂的分子里,变性部分发生了键的断裂,由此可见ATR谱对研究生物分子提供了方便。

2. 蛋白质表面吸附的定量研究 维持人类生命的人造材料,在医疗实践中的使用越来越广泛,而这些材料与生命相联系。如: 输送血液,血浆蛋白质迅速吸附在材料上,随后薄层沉积,白细胞相互作用,形成血栓并凝结,这种

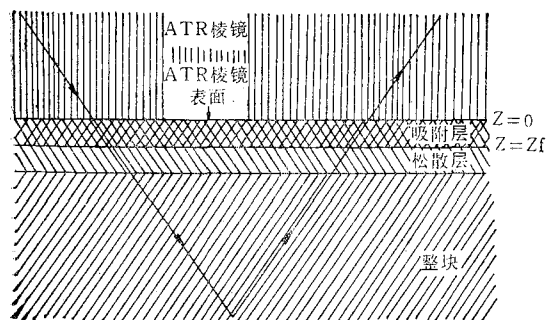


图5 蛋白质在ATR棱镜上吸附层、松散层和整体溶液的区域示意图

有害的相互作用的程度主要取决于多聚物,对于蛋白质吸附在材料表面的定量研究较困难,而文献[9]使用ATR技术测定了一定时间内蛋白质的吸附情况。图5是研究被吸附蛋白质薄膜的简化图。被吸附蛋白质薄膜是一致密的、厚度为 Z_f 的堆积层,它与倏逝波透入深度相比是相当小的,此外还有一松散层很容易解析,其蛋白质浓度较紧密层低,越过这一层则浓度均匀一致,称为整体溶液。松散的吸附层和整体(bulk)溶液蛋白质对ATR谱的贡献大小,取决于溶液中蛋白质的浓度,吸附层、松散层(即过渡层)和整体溶液的比例。由于倏逝波的透入深度比被吸附蛋白质薄层的厚度大得多,因此对倏逝波深度内的未被表面吸附的蛋白质的光谱贡献要作校正。即总的蛋白质信号中有多少是整个蛋白质的贡献,这里使用近似方法,用水作内参考标准。

对于透射光谱存在下列关系式:(Beer定律)

$$A = \epsilon lc \quad (5)$$

l ——比色皿厚度, c ——溶液浓度, ϵ ——消光系数。这关系式对于水和蛋白质两者均适用,分别为:

$$A_w = \epsilon_w l c_w \text{ 及 } A_p = \epsilon_p l c_p \quad (6)$$

这样

$$A_p = \frac{\epsilon_p c_p}{\epsilon_w c_w} A_w \quad (7)$$

ATR法的Beer定律可采用下列形式

$$A^* = \epsilon^* d e C \quad (8)$$

$d e$ 代替了比色皿的厚度,为红外光透入的深度, ϵ^* 不一定等于 ϵ ,是ATR参数。将该式应用于蛋白质和水的情况:

$$A_w^* = \epsilon_w^* d e w c_w \quad (9)$$

$$A_p^* = \epsilon_p^* d e p c_p$$

因为水谱线波长的透入深度 $d e w$ 不同于蛋白质谱线波长的透入深度 $d e p$,那么:

$$A_p^* = \frac{\epsilon_p^* c_p^* \lambda_p}{\epsilon_w^* c_w^* \lambda_w} \cdot A_w^* \quad (10)$$

式中 λ_p 和 λ_w 分别是定量测定蛋白质和水所使用的波长,上式简化为:

$$A_P^* = K C_P^* A_W^* \quad (11)$$

上式中 K 为常数, 假设:

$$\frac{\epsilon_P}{\epsilon_W} = \frac{\epsilon_P^*}{\epsilon_W^*} \quad (12)$$

$Z \gg Z_i$ 时 (Z 是光进入液体界面的距离, Z_i 是被吸附蛋白质薄膜的厚度), 则:

$$\frac{C_P}{C_W} = \frac{C_P^*}{C_W^*} \quad (13)$$

从而可计算整个蛋白质对 ATR 光谱的贡献程度。具体计算如下: 在各种厚度的透射器皿中测定 A_P 和 A_W , 从式

$$A_P = \frac{\epsilon_P C_P}{\epsilon_W C_W} \cdot A_W,$$

知其斜率为 $\frac{\epsilon_P C_P}{\epsilon_W C_W}$; 用 ATR 测定 A_P^* (1550 cm^{-1}) 和 A_W^* (1640 cm^{-1}), 将 (14) (15) 式代入 (12) 式得整个蛋白质组分的吸收系数:

$$A_{P,\text{bulk}}^* = \frac{\epsilon_P C_P}{\epsilon_W C_W} \cdot \frac{\lambda_P}{\lambda_W} \cdot A_W^* \quad (14)$$

计算吸附层蛋白质组分的吸收系数:

$$A_{P,\text{ads}}^* = A_P^* - A_{P,\text{bulk}}^* \quad (15)$$

整个蛋白质对谱线的贡献:

$$\text{百分比} = \frac{A_{P,\text{bulk}}^*}{A_P^*} \times 100 \quad (16)$$

从白朊和 IgG (免疫球蛋白) 溶液用不同厚度的器皿分别在 1400 cm^{-1} 和 1500 cm^{-1} 处所测得的透射谱线强度与水在 1640 cm^{-1} 处谱线呈线性关系的情况^[9], 可知这两种蛋白质在水谱线强度与酰胺 II 在 1500 cm^{-1} 处的谱线有好的关系, 从而我们可用水谱线作为槽有效厚度的内参考, 这是一个较可靠的校正方法。

从方程 (11) 告诉我们, 用 ATR 法测定水谱线强度并结合透射法的校正曲线可计算整个蛋白质溶液的红外谱线强度, 再从方程 (16) 可

附表 IgG 溶液 (1mg/ml) 的测定

编号	水峰强度 (mAU)	测得 1400 cm^{-1} 的谱带的强度 (mAU)	计算得到整块溶液的 1400 cm^{-1} 谱带强度 (mAU)	整块溶液中蛋白质贡献的百分比%
1	700	6.8	0.13	2.0
2	680	6.1	0.13	2.1
3	730	5.1	0.14	2.8

计算整个溶液中蛋白质溶液的百分比。

附表列出用锆作为晶体和浓度为 1 mg/ml 的 IgG 溶液所测得的蛋白质谱线的强度, 并用方程 (16) 计算整个溶液中蛋白质贡献的百分比。

由上介绍了玻璃皿内流动体系蛋白质的表面作用以及没有吸附的蛋白质分布的光谱校正工作。

3. 其它方面 蛋白质吸附在表面上, 其形态、结构是否有改变曾有过争论, 用 ATR 研究这问题^[10], 证明了蛋白质分子直接与锆接触和吸附在其他蛋白质分子上是不同的。ATR 谱可研究免疫球蛋白 G 的单分子层^[11], 已证明在天然的和变性分子的二级结构中 β -构象占优势。此外, 用 ATR 谱还可研究对生物学聚合物的表面吸附^[12], 以及细胞中水的测定^[13]等, 在此不一一介绍。

应当指出: 采用 ATR 技术时, 被测的各类样品的折射率必须小于所使用稜镜的折射率, 这从 ATR 技术的基本原理中可知; ATR 谱图质量的好坏取决于稜镜与样品接触情况, 若生物样品不能保持与稜镜有良好的光学接触, 则 ATR 光谱没有良好的重复性和高的精确性, 影响图谱质量; 对固体样品, 谱带的强度取决于粒子的大小。粉碎度大, 紧贴在稜镜上的固体样品可得到强度较大的吸收峰, 但不能得到令人满意的定量解释, 对于液体和糊状物的 ATR 图谱, 可用来定量。

参 考 文 献

- [1] Fahrenfort, J.: *Spectrochimica Acta*, 1961, 17, 698.
- [2] Fringeli, Urs Peter.: *Nachr. Chem., Tech. Lab.*, 1985, 33(8), 708.
- [3] Pitt, W. G., Cooper, S. L.: *Biomaterials*, 1986, 7(5), 340.
- [4] Leininger, R. I. et al.: *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, 1983, 29, 152.
- [5] Kellner, R., Goetzinger, G.: *Mikrochim. Acta*, 1984, 2(1-2), 61.
- [6] Chantry, G. W.: "Long-Wave Optics", Academic Press Inc. (London) LTD United States Edition, Published by Academic Press Inc. (Harcourt Brace Jovanovich, Inc.) 1984, 276.

(下转第 448 页)

表2 注射外源性 CoQ₁₀ 后心肌线粒体中该物质含量变化的动态分析

按时间 (h) 分组	CoQ ₁₀ $\mu\text{g}/\text{mg}$ 线粒体蛋白		P 值
	CoQ ₁₀ 组 ($\bar{x} \pm SD$)	对照组 ($\bar{x} \pm SD$)	
0	0.23 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.04	$P > 0.05$
1	0.22 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.03	$P > 0.05$
2	0.26 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.04	$P < 0.05$
4	0.38 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.05	$P < 0.05$
8	0.65 $\pm$ 0.04	0.22 $\pm$ 0.03	$P < 0.01$
12	0.66 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.02	$P < 0.01$
16	0.61 $\pm$ 0.07	0.25 $\pm$ 0.03	$P < 0.01$
24	0.29 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.03	$P < 0.05$
36	0.27 $\pm$ 0.03	0.23 $\pm$ 0.04	$P < 0.05$
48	0.25 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.06	$P > 0.05$

$n = 50$

讨 论

采用 HPLC 法测定心肌 CoQ 同系物含量的报道见于八十年代初^[8-10]。本实验所测得的结果与文献报道基本一致,不同的是本文补充报告了大鼠心肌组织和心肌线粒体中的 CoQ₈ 含量,这在既往文献中未见提及。

大鼠心肌和线粒体中的 CoQ₈、CoQ₉ 和 CoQ₁₀ 同系物之间,依次比前者多一个异戊聚二烯侧链,其脂溶性渐增,亲水性递减,氧化还原电位不同。因此在呼吸链体系中,有可能构成“CoQ 循环传递电子”机制。另外,心肌组织和线粒体中均以 CoQ₉ 的含量最高,有可能反映了大鼠心肌线粒体氧化磷酸化的基本方式和特点。

据本实验结果分析,心肌线粒体中 CoQ 同系物总量约占心肌全匀浆总量的 19.49%。这

一结果对于既往一直认为 CoQ 在线粒体中发挥生物学效应的传统观念是一个冲击。目前除了对于 CoQ 参与呼吸链机制了解的比较多之外,对于其它方面的作用所知甚少。

给大鼠注射 CoQ₁₀ 后,线粒体的摄取和代谢速度均比较迅速,所得结果与藤田孟等^[11]采用 ¹⁴C-标记的 CoQ₁₀ 示踪实验基本相似。说明正常大鼠心肌线粒体氧化磷酸化过程对 CoQ 的需求是生理量的需求,超负荷有可能成为代谢上的负担;线粒体自身对 CoQ “容量”明显存在着调控机制。因而推测,补充外源性 CoQ 对多种心肌疾病改善作用的一种可能性是与其内源性 CoQ 的缺乏有直接关系。

参 考 文 献

- [1] 山上徹:《新薬と臨床》,1979,28,901。
- [2] Nakamura, Y. et al.: *Cardiovasc. Res.*, 1982, 14 (3), 132.
- [3] 于維漢:《生態學的營養學研究》,1984,8,65—73。
- [4] 阿部皓一,他:《ピタミ>》,1977,51(3),111。
- [5] Fleischer, S. et al.: *Methods in Enzymology* Vol. XXXI, Academic press, New York, San Francisco, London, 1974, P 299—305.
- [6] 范崇竹等:《中華物理醫學雜誌》,1988,10(1),32。
- [7] Lowry, O. H: *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265.
- [8] Ikenoya, S. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 1981, 29 (1), 158.
- [9] Folkers, K and Yamamura, Y: *Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q*, Vol.3 Elsevier/ North-Holland, Biomedical press, New York, 1981, P 53—66.
- [10] Katayama, K. et al.: *B. A. B. Research Commu.*, 1980, 95(3), 971.
- [11] 藤田孟,他:《応用薬理》,1972,6(4),695。

[本文于1988年10月4日收到]

(上接第437页)

- [7] Fahrenfort, J.: *Spectrochimica Acta*, 1961, 17, 705.
- [8] Quintard-Dorques, B. et al.: *J. Mol. Struct.*, 1986, 143, 411.
- [9] Fink, J. D., Gendreau, R. M.: *Anal. Biochem.*, 1984, 139(1), 140.
- [10] Jakobsen, R. J., Cornell, D. G.: *Appl. Spectrosc.*, 1986, 40(3), 318.
- [11] Popov, V. Ya. et al.: *Biofizika*, 1982, 27(4), 604.
- [12] Castillo, E. J. et al., *Biomaterials* (Guildford, Engl.), 1984, 5(4), 186.
- [13] Korolev, Yu. N., Cherkulaeva, L. N.: *Biofizika*, 1986, 31(2), 347.

[本文于1988年8月22日收到]