

核苷混合物的太赫兹谱定量分析

张增艳, 肖体乔*, 赵红卫, 余笑寒, 席再军, 徐洪杰

中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800

摘要 以物质的太赫兹吸收全谱为特征指纹可以进行混合物的成分分析。生物物质容易受外界影响而变性, 使用光子能量只有毫电子伏特的太赫兹波来分析物质成分不会带来有害的电离辐射。文章使用太赫兹谱成分分析法对腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷的混合物做了分析, 实验结果表明该方法可以较为准确地分析出这几种核苷混合物的成分及其含量, 相对误差在 10% 以内, 并对误差产生的原因做了简要分析。该项研究表明, 此方法简单有效而且对样品无损。有可能成为生物物质成分分析的一种新手段, 从而进一步拓展太赫兹谱的应用领域。

关键词 太赫兹谱学; 定量分析; 核苷

中图分类号: O433, O655

文献标识码: A

DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)09-1990-04

引言

太赫兹(TH)辐射是指频率在 0.1~10 THz 之间的电磁波, 其波段介于红外和微波之间。太赫兹时域光谱技术(TH-TDS)是基于飞秒超快激光技术的远红外波段光谱测量新技术, 在物理、化学、材料等方面有很多应用研究^[1-4]。德国科学家 Walther 等首次利用 TH-TDS 技术研究了视黄醛分子不同异构体 9-cis, 13-cis, all-trans 的 TH 吸收光谱的显著差异, 成功获得了视网膜分子不同振动模式及结构转换机制的重要证据^[1]。Fischer 等用 TH-TDS 研究了构成 DNA 分子的 4 个碱基和对应的脱氧核苷在太赫兹波段的性质, 观察到许多独特的光谱特征, 同时发现它们的吸收和折射都有很明显的差别^[2]。最近在对两种联苯酚类化合物的研究表明太赫兹波技术能够用于区分 2, 2'-二羟基联苯和 4, 4'-二羟基联苯这两种同分异构体^[5]。这些研究结果预示了 TH-TDS 技术将在生物化学、制药业中发挥重要的作用。结果同时表明 TH 波段内的吸收谱具有反映物质结构的指纹特征。这就使得用太赫兹全谱对物质及其混合物进行成分及含量分析成为可能。我们在对苯甲酸及其甲基取代物的混合物的分析研究中发现这种方法对于化学混合物的成分分析也是十分有效的^[6]。

生物化学物质容易受外界影响而变性, 使用光子能量只有毫电子伏特的太赫兹波来分析物质成分不会带来有害的电离辐射, 可以对物质进行无损检测, 这对于生物化学物质的检测显得尤为优越。另外使用太赫兹谱成分分析法分析物质

成分和含量时测量简单方便, 易实施。分子间弱相互作用, 如氢键、范德华力、偶极的旋转和振动跃迁以及晶体中晶格的低频振动吸收都对应于太赫兹波段。这些都决定了这种分析方法在材料和生物化学等领域具有独特的优点和广阔的应用前景。

核苷与脱氧核苷是生命遗传物质 DNA 和 RNA 的元件, 核苷与脱氧核苷经过化学修饰成为众多的核苷衍生物。核苷与脱氧核苷及其衍生物是具有生物活性的物质, 很多直接可作为药物使用, 也是合成其他大量药物的原料。在食品、饲料、日化、农业、材料等领域也有着极其重要的作用。核苷类成分是生物细胞维持生命活动的基本组成元素, 参与 DNA 代谢过程, 具有多种生物活性, 有着广泛的用途^[7]。在对多名胃癌患者尿中核苷水平与肿瘤体积的研究中发现, 胞苷含量与肿瘤的体积正相关^[8]。所以检测混合物中各种核苷的含量具有重要的生化和医学意义。本文使用太赫兹谱成分分析法对腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷的混合物做了分析, 结果表明太赫兹谱成分分析法可以较准确地分析这几种核苷混合物的成分和含量。该方法简单有效而且无损于样品, 有望成为生物物质成分分析的一种新手段, 从而进一步拓展太赫兹谱的应用领域。

1 实验

1.1 实验装置及实验条件

实验装置如图 1, 主要设备有美国光谱物理公司制造的

收稿日期: 2007-05-10, 修订日期: 2007-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(10574134)和中国科学院知识创新工程项目资助

作者简介: 张增艳, 1980 年生, 中国科学院上海应用物理研究所在读博士 * 通讯联系人, e-mail: tqxiao@sinap.cn

Mai Tai 飞秒激光器, 美国 Zomega 公司研制的 TH 系统。飞秒激光器的平均功率大于 700 mW, 脉宽小于 100 fs。激光脉冲被分为两路, 一路作为泵浦光, 激发大孔径 GaAs 光电导天线产生 TH 脉冲; 另一路作为探测光, 利用光电采样原理探测 TH 波的电场强度, 探测元件为 ZnTe 晶体。通过扫描探测激光脉冲和 TH 脉冲的相对时间延迟, 即可得到 TH 脉冲随时间变化的电场波形。太赫兹系统频率分辨率小于 0.01 THz, 信噪比大于 1000。整个太赫兹光学系统在一个密闭的盒子中, 实验时冲入氮气使湿度小于 2%, 有效地把大气中水分的吸收降到最低^[9, 10]。实验在常温下进行, 温度为 294.5~295.5 K。

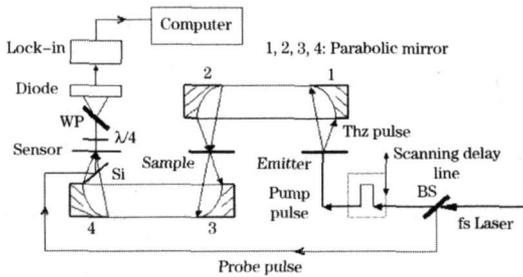


Fig 1 Experimental setup for terahertz time domain spectroscopy

1.2 样品制备

腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷和尿苷的纯度均大于 99%, 使用时未做进一步处理。取它们中的几种按比例均匀混和。把这几种核苷及其混合物均以 1:1 的比例与聚乙烯(PE, 聚乙烯在 TH 波段的吸收很少, 基本是透明的)均匀混合后, 在 3×10^8 Pa 的压强下压制成直径 13 mm, 厚度 1.4 mm 左右的薄片, 且样品表面无裂缝, 两平面保持平行。

1.3 数据处理方法

实验测量可以得到太赫兹脉冲时域电场波形, 在穿过样品前后的电场强度分别记作 $E_0(t)$ 和 $E(t)$, 通过傅里叶变换得到穿过样品前后的太赫兹脉冲的频谱, 分别记作 $E_0(\omega)$ 和 $E(\omega)$, 那么它们满足关系式^[11]

$$E(\omega) = A(\omega) e^{i\phi(\omega)} = A_0(\omega) e^{i\phi_0(\omega)} T(n, \kappa) e^{-\alpha(\omega)D} e^{i\frac{2\pi}{\lambda}(n-1)D} = E_0(\omega) T(n, \kappa) e^{-\alpha(\omega)D} e^{i\frac{2\pi}{\lambda}(n-1)D} \quad (1)$$

其中 D 为样品厚度, ω 为频率, c 是真空中光速, $A(\omega)$, ϕ 是 TH 波的幅度和相位, $T(n, \kappa)$ 是 TH 波在样品两界面处透射系数的乘积。通过(1)式可以获得样品的吸收系数 α 和折射率 n 。

根据朗伯-比尔定律^[12], 由质量分别为 m_1, m_2, \dots, m_n , 吸收系数分别为 $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$ 的样品 S_1, S_2, \dots, S_n 均匀混合而成的质量为 m 的混合样品的吸收系数满足

$$\alpha(\omega) = \sum_{i=1}^n b_i \alpha_i(\omega) \quad b_1 : b_2 : \dots : b_n = m_1 : m_2 : \dots : m_n \quad (2)$$

这样以各组分的太赫兹吸收谱为基准谱, 用线性回归技术对混合物在这个测量波段内的吸收谱进行处理就可以得到各混合物中纯化化合物的成分和相对含量。可以把问题归结为解多元线性回归方程的求解。正规方程的矩阵形式为^[13]

$$Y = b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_n X_n \quad (3)$$

$$X' X B = X' Y$$

其解为

$$B = (X' X)^{-1} X' Y \quad (4)$$

2 实验结果与讨论

使用 TH-TDS 技术测量这五种核苷样品, 经后处理得到它们的吸收系数随频率的变化如图 2 所示, 可以发现它们在测量波段的吸收有着明显差别。图中虚线为它们的折射系数, 每个吸收峰出现的位置都被折射率上的同时变化所证实。用 TH-TDS 装置测量几种核苷混合物的太赫兹谱, 经后处理可以得到它们的吸收系数谱如图 3。

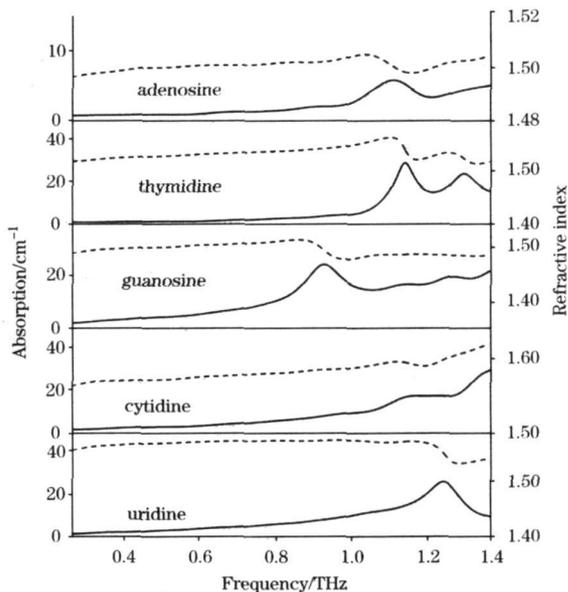


Fig. 2 THz absorption coefficient (solid line) and refractive index (dot line) of adenosine, thymidine, guanosine, cytidine and uridine

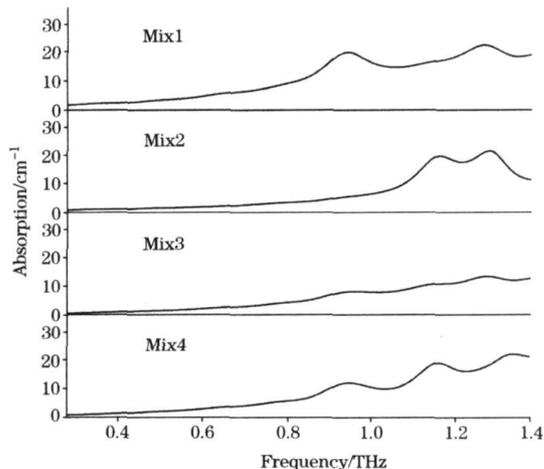


Fig. 3 THz absorption coefficient of the mixtures Mix1, Mix2, Mix3 and Mix4

以这五种核苷的吸收系数谱为基准谱(取频率为 0.3~1.4 TH),根据朗伯-比尔定律^[6,12],用线性回归技术^[13]对混合物的吸收系数谱进行处理得到各个混合物中各种核苷的成分和相对含量如表 1。同时混合物中不含有的核苷种类在分析出的结果中也可以将其排除在外,即混合物所含的核苷种类可以被分析出来。从表中可以看出用太赫兹成分分析法分析出的这四种混合物的成分和含量与实际情况是比较一致的,分析结果与实际含量间的相对误差都在 10% 以内。比如

对于胸苷、鸟苷、尿苷按等份额混和后的样品 Mix3,分析结果为胸苷、鸟苷、尿苷的含量比例为 34.8%, 30.3% 和 34.9%, 相对误差最大为 9%。而对于混合物 Mix2 的分析结果中相对误差最小为 2%。另外在对于所含核苷种类最多的腺苷、鸟苷、胞苷和尿苷按等份额混和后的样品 Mix4 的研究中,用太赫兹谱分析出来的比例为 23.9%, 23.5%, 27.1% 和 25.5%, 相对误差为 8.4%。

Table 1 Actual contents and the analysed results for the mixtures

样品	实际成分					处理结果				
	腺苷	胸苷	鸟苷	胞苷	尿苷	腺苷	胸苷	鸟苷	胞苷	尿苷
Mix1	-	-	66.7	-	33.3	0	0	68.4	0	31.6
Mix2	-	50	-	-	50	0	49.1	0	0	50.9
Mix3	-	33.3	33.3	-	33.3	0	34.8	30.3	0	34.9
Mix4	25	-	25	25	25	23.9	0	23.5	27.1	25.5

3 结 论

利用太赫兹时域光谱装置对腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷和尿苷进行了测量,发现它们在太赫兹波段的吸收谱存在明显的差别。测量了它们混合物的太赫兹谱,并且利用太赫兹成分分析法对其进行了分析。实验结果表明该方法可以较为准确地分析出这几种核苷混合物的成分及其含量,相对误差在 10% 以内。该方法简单有效而且无损于样品,有可能成为生

化物质成分分析的一种新手段,从而进一步拓展太赫兹谱的应用领域。

产生的相对误差主要来源于 3 个方面。一个是测量仪器本身的原因,比如稳定性,测量极限等;一个是制备样品时带来的误差,几种核苷在研钵内均匀混和研磨或者转移至压片机中压片的过程中样品会有少量的损失;还有就是数据分析方法的选取。因此提高仪器的稳定性,选取更严密的制样方法和更好的数据分析方法有望进一步提高使用太赫兹谱分析物质成分和含量的分析精度。

参 考 文 献

- [1] Walther M, Fischer B, Schall M, et al. Chem. Phys. Lett., 2000, 332(3-4): 389.
- [2] Fischer B M, Walther M, Uhd Jepsen P. Phys. in Medicine and Biology, 2002, 47: 3807.
- [3] Han Jiaguang, Zhang Weili, et al. Journal of Physical Chemistry B, 2006, 110: 1989.
- [4] HU Ying, WANG Xiao-hong, GUO Lan-tao, et al(胡颖,王晓红,郭澜涛,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(6): 1008.
- [5] GE Min, ZHAO Hong-wei, ZHANG Zeng-yan, et al(葛敏,赵红卫,张增艳,等). Acta Phys. Chim. Sin.(物理化学学报), 2005, 21(9): 1063.
- [6] Zhang Z Y, Yu X H, Zhao H W, et al. Opt. Commun., 2007, 277(2): 273.
- [7] ZHOU Meng-sheng, GU Wen-cong, et al(周梦圣,顾文聪,等). Biochemistry(生物化学). Shanghai: Shanghai Science and Technology Press(上海:上海科学技术出版社), 1998. 54.
- [8] CHEN Ying-jie, ZHENG Yu-fang, LI Xiang, et al(陈英杰,郑育芳,李巷,等). Journal of Oncology(肿瘤学杂志), 2004, 10(6): 416.
- [9] Fischer B, Hoffmann M, Helm H, et al. Semicond. Sci. Technol., 2005, 20: 246.
- [10] Röhne C, Keiding S R. Journal of Molecular Liquids, 2002, 101: 199.
- [11] Duvillaret L, Garet F, Couta J L. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 1996, 2(3): 739.
- [12] Markel A G, Roitberg A, Heilweil E J. Chem. Phys. Lett., 2000, 320: 42.
- [13] JIN Guang-yan, WANG Fa-xin, WANG Shi-cheng(金光炎,王发信,王式成). Statistical Analysis of Engineering Data(工程数据统计分析). Nanjing: Dongnan University Press(南京:东南大学出版社), 2002. 50.

Quantitative Analysis of Nucleotide Mixtures with Terahertz Time Domain Spectroscopy

ZHANG Zeng-yan, XIAO Ti-qiao*, ZHAO Hong-wei, YU Xiao-han, XI Zai-jun, XU Hong-jie

Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract Adenosine, thymidine, guanosine, cytidine and uridine form the building blocks of ribose nucleic acid (RNA) and deoxyribose nucleic acid (DNA). Nucleosides and their derivants are all have biological activities. Some of them can be used as medicine directly or as materials to synthesize other medicines. It is meaningful to detect the component and content in nucleosides mixtures. In the present paper, components and contents of the mixtures of adenosine, thymidine, guanosine, cytidine and uridine were analyzed. The absorption spectra of pure nucleosides were set as standard spectra. The mixture's absorption spectra were analyzed by linear regression with non-negative constraint to identify the components and their relative content in the mixtures. The experimental and analyzing results show that it is simple and effective to get the components and their relative percentage in the mixtures by terahertz time domain spectroscopy with a relative error less than 10%. Component which is absent could be excluded exactly by this method, and the error sources were also analyzed. All the experiments and analysis confirms that this method is of no damage or contamination to the sample. This means that it will be a simple, effective and new method in biochemical materials analysis, which extends the application field of TH-TDS.

Keywords Terahertz spectroscopy; Quantitative analysis; Nucleotide

(Received May 10, 2007; accepted Aug. 20, 2007)

* Corresponding author

2008 第3届亚太地区冬季等离子体光谱化学会议 2008 Third Asia Pacific Winter Conference on Plasma Spectrochemistry (2008 APWC)

由日本化学会和日本分析化学学会主办的第3届亚太地区冬季等离子体光谱会议(2008 APWC)将于2008年11月16~21日在日本筑波国际会议中心举行。

征文范围:

1. ICP-MS和ICP-OES的仪器与原理; 2. 样品的制备和导入; 3. ICP-MS的碰撞反应池技术与应用; 4. 新仪器与等离子体源; 5. 辉光放电光源; 6. 环境、金属组学和生命科学中的元素形态; 7. ICP-MS和ICP-OES的应用, 包括: 冶金、RoHS、高纯物质及半导体材料、核工业材料、环境、地质、海洋科学、食品、农业、生物学、临床和药物、质量控制和标准化等; 8. 同位素比和同位素稀释; 9. 激光烧蚀进样。

会议地点:

筑波国际会议中心(Tsukuba International Congress Center) (日本茨城县筑波市(Tsukuba, Ibaraki, Japan))

联系人: Prof. Naoki Furuta

Chuo University, Faculty of Science and Engineering, Department of Applied Chemistry, 1-13-27 Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8551, Japan

Tel: + 81-3-3817-1906, Fax: + 81-3-3817-1699

e-mail: nfuruta@chem.chuo-u.ac.jp

会议使用英语交流

会议详细信息请登录网站查询 <http://envsun.chem.chuo-u.ac.jp/plasma/2008apwc>