

次黄嘌呤及其核苷的 THz 光谱^{*}

马晓菁^{1,2)} 赵红卫^{1)†} 代 斌²⁾ 刘桂锋¹⁾

1) 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800)

2) 石河子大学化学化工学院, 石河子 832003)

(2007 年 10 月 15 日收到, 2007 年 11 月 14 日收到修改稿)

利用太赫兹时域光谱(terahertz time-domain spectroscopy, 简称 THz-TDS) 技术研究了次黄嘌呤及其核苷在 0.3—1.6 THz 波段的光谱特性. 结果显示 THz 波对该碱基及核苷的结构变化有灵敏响应, 其中次黄嘌呤在该波段无特征吸收, 而其核苷在 1.4 THz 处有强的指纹特征吸收峰. 根据 Hartree-Fock 模拟计算提示该低频振动来源于嘌呤环与戊糖环的扭摆振动. 定量研究的结果表明, 在一定浓度范围内所测化合物 THz 吸收强度与浓度呈线性关系, 符合朗伯-比尔定律. 利用 THz 谱成分分析法对次黄嘌呤及其核苷的混合物进行了定量解析, 获得了混合物中各成分的含量, 相对误差不超过 7%, 并就误差产生的原因做了简要分析.

关键词: 太赫兹时域光谱, 次黄嘌呤, 次黄嘌呤核苷, 定量分析

PACC: 3220F, 3580B, 3310

1. 引 言

红外及拉曼等各种光谱技术已成为分析和表征物质结构常用的手段. 通过分析物质的红外及拉曼光谱特征吸收, 能够得到分子中官能团振动或转动的结构信息. 近年来研究表明, 生物分子中一些弱的相互作用(如氢键, 范德华力)及大分子的骨架振动(构型弯曲), 偶极的旋转和振动跃迁以及晶体中晶格的低频振动在太赫兹(terahertz, THz)波段体现出很强的响应^[1], 使得 THz 波技术成为研究物质结构和特性的一种新手段. 同时, 由于 THz 光子能量只有毫电子伏特不会对物质造成电离损伤, 使其在生物化学无损检测中显示出独特的优势.

THz 波是位于微波和红外之间的电磁辐射, 太赫兹时域光谱(terahertz time-domain spectroscopy, 简称 THz-TDS) 是基于飞秒超快激光技术发展的远红外波段光谱测量新技术. 自 Markelz 等人^[2] 首次用 THz-TDS 技术研究发现 DNA、牛血清蛋白和胶原质在 THz 波段表现出不同的吸收特性以来, 国内外诸多研究者将该新技术应用于生物化学及药物分子结构和相互作用方面的研究. 其中对大分子(蛋白

质^[3,4]及核酸^[5,6]等)以及小分子(氨基酸^[7,8], 碱基及核苷^[9-11], 糖^[12,13]等)的分子结构、分子识别和无标记检测^[14,15]等方面的研究都取得了一系列成果, 为人们了解物质结构提供了新的视角和帮助. 另外, THz-TDS 在用于药物分析^[16]、正常及癌症组织的鉴别^[17]研究中也体现出无损伤、快速、高灵敏度等独特优势, 预示出 THz 技术在化学、生物学、医学、制药业中潜在的应用前景.

次黄嘌呤(hypoxanthine)和次黄嘌呤核苷(或肌苷, inosine)是核酸代谢的重要产物(结构如图 1 所示), 同时也是重要的药物和药物中间体, 广泛用于医药和食品领域. 对它们结构的深入研究有利于全面认识其生物化学性质及其在医学中的应用. 本文首次利用 THz-TDS 技术研究了次黄嘌呤及其核苷在

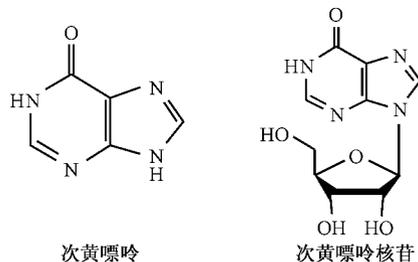


图 1 次黄嘌呤及其核苷的分子结构

^{*} 国家自然科学基金(批准号:10574134)资助的课题.

[†] 通讯联系人. E-mail: zhaohongwei@sinap.ac.cn

0.3—1.6 THz 波段的低频振动模式和吸收光谱差异,从新的角度了解它们的结构特点,考察了含量与 THz 吸收强度间的关系并对其混合物 THz 光谱进行了定量分析.

2. 实验方法及材料

2.1. 实验装置

实验所用 THz-TDS 装置(如图 2 所示)由美国光谱物理 Mai Tai 飞秒激光器和 Zomega 公司研制的 THz 系统组成.激光器中心波长为 800 nm,平均功率 700 mw,脉冲宽度小于 100 fs,重复率为 80 MHz.激光脉冲被分为两路,一路作为抽运光,激发大孔径 GaAs 光电导天线产生 THz 脉冲;另一路作为探测光,利用电光采样原理探测 THz 波的电场强度,探测元件为 ZnTe 晶体^[18].通过扫描探测激光脉冲和 THz 脉冲的相对时间延迟,可获得 THz 脉冲随时间变化的电场波形,并从中提取吸收系数和折射率等物理参量. THz 信号的动态范围大于 3000,频谱分辨率好于 1 cm^{-1} ,信噪比大于 1000.为减少空气中水对 THz 的吸收,测量过程中 THz 光路部分充以氮气,测量在室温下进行.

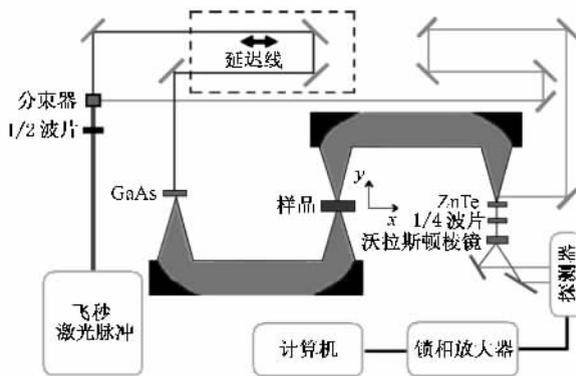


图 2 THz-TDS 实验装置示意图

2.2. 样品制备

次黄嘌呤及次黄嘌呤核苷购于 Lancaster 公司,纯度为 99%,使用时未进一步纯化.定量分析中样品分别以不同比例与聚乙烯(在 THz 波段基本透明)粉末均匀混合.混合物成分分析中两种样品按不同比例混合均匀,并以 1:1 比例掺于聚乙烯,采用红外压片法在 3500 kg 压力下压制成直径为 13 mm,厚度约 1.0 mm 的薄片,且样品表面无裂缝、两平面保

持平行,以减少测量时的多重反射.

2.3. 数据处理方法

THz 脉冲穿过样品时会被样品散射和吸收.实验测量可以得到 THz 脉冲时域电场波形,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 THz 脉冲的频谱,分别记作 $E_0(\omega)$ 和 $E(\omega)$,满足关系式^[19]

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

其中 D 为样品厚度, ω 为频率, c 是真空中光速, $A(\omega)$, ϕ 是 THz 波的幅度和相位, $\mathcal{T}(n, \kappa)$ 是 THz 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,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 均匀混合成质量为 m 的混合样品,其吸收系数为

$$\alpha(\omega) = \sum_{i=1}^n b_i \alpha_i(\omega),$$

$$b_1 : b_2 : \dots : b_n = m_1 : m_2 : \dots : m_n, \quad (2)$$

以各组分的 THz 吸收谱为基准谱,用线性回归技术^[20]对混合物在这个测量波段内的吸收谱进行处理可以得到混合物中各化合物的成分和相对含量.

3. 结果及分析

3.1. 光谱分析

THz-TDS 技术可直接获得 THz 波通过样品前后电场强度随时间变化的波形即时域谱,并通过傅里叶变换将 THz 时间波形转换成频域谱.图 3(a)是 THz 波在氮气中传播(参比信号)和穿过次黄嘌呤核苷样品获得的时域信号.可以看出样品信号相对于参比信号有一定的时间延迟,这是由于 THz 波在次黄嘌呤核苷样品中的折射率大于氮气中的所致.图 3(b)是时域谱经过快速傅里叶变换所得频域谱,其中氮气在测量范围内无特征吸收,因此 1.4 THz 处的强吸收凹陷是由次黄嘌呤核苷样品吸收引起的.

图 4 为按照 2.3 节中数据处理方法获得的次黄嘌呤和次黄嘌呤核苷的吸收系数及折射率.图 4(a)

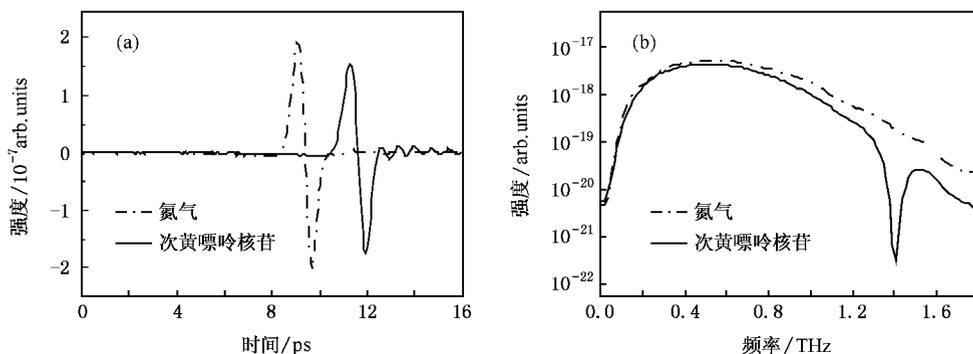


图3 THz波在氮气(虚线)和次黄嘌呤核苷(实线)中传播的时域谱(a)及相应的频域谱(b)

中,次黄嘌呤在0.3—1.6 THz波段没有明显特征吸收,吸收谱和折射率呈缓慢上升趋势。图4(b)中次黄嘌呤核苷在1.4 THz处有一很强的吸收峰,且折射率相应有很大增加。通常,生物分子在THz波段的吸收是由一些低频振动引起,如分子间氢键或晶格振动等^[9]。构成核酸的五种主要碱基与所对应核苷的THz吸收光谱有所异同^[9-11],其中,相同吸收峰是由共有的碱基引起,核苷有而碱基没有的吸收峰主要来源于戊糖基的贡献,包括戊糖基之间以及

戊糖与碱基间形成的氢键;碱基有而核苷没有的吸收主要来源于碱基所形成的氢键,核苷中戊糖基阻挡了这些氢键的形成^[10]。由于次黄嘌呤核苷分子之间可以形成多个氢键^[21-22],且在结构上次黄嘌呤和次黄嘌呤核苷相差一个戊糖基,次黄嘌呤在此波段无吸收,因此初步推断次黄嘌呤核苷在1.4 THz处的强吸收与戊糖基的振动模式有关,该振动模式包括其晶格振动及与戊糖基有关的分子内和分子间氢键振动。

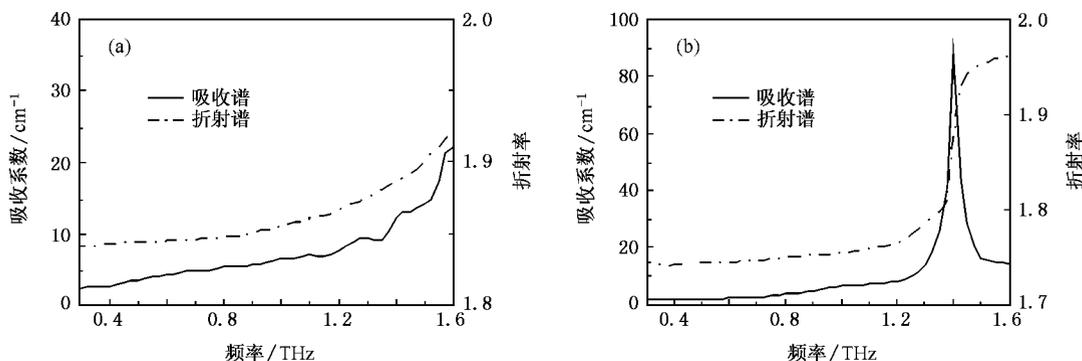


图4 次黄嘌呤(a)和次黄嘌呤核苷(b)的THz吸收系数(实线)和折射率(虚线)

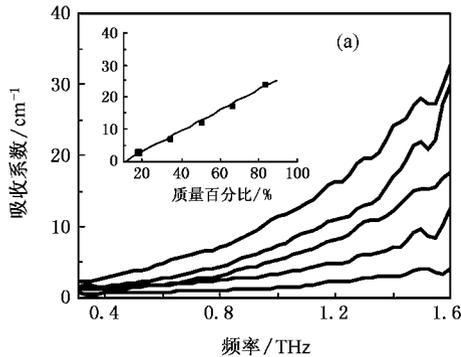
为进一步了解次黄嘌呤及其核苷在THz波段所对应的分子低频振动模式,运用Gaussian 03软件,采用Hartree-Fock理论6-311+G*基组对次黄嘌呤及其核苷进行了结构优化和频率计算。计算结果没有负频产生,说明得到的结构是稳定构象,优化后的结构中构成嘌呤环的原子在同一平面内,且与戊糖环有一定的夹角。计算结果中次黄嘌呤在实验所测范围内没有吸收;但次黄嘌呤核苷分子在1.33 THz处有显著的吸收峰,与实验吸收峰位1.4 THz相对应,该吸收主要是由戊糖环与嘌呤环的摆动及扭转振动产生。计算所得吸收峰位相对实验值有小幅频移,这可能是由理论模拟温度(0 K)与

实验温度(293 K)不同引起,且理论计算是对单个气相分子建模计算,未涉及分子间相互作用及其他环境因素的影响,而实际样品为固态粉末。

3.2. 定量研究

THz-TDS技术不仅能够用于化合物及生物分子的结构定性分析,而且也适用于定量研究^[23]。虽然如图4(a)所示次黄嘌呤在所测波段没有特征吸收,但其吸收随频率增加呈上升趋势,对其不同含量的THz吸收系数测定结果可以看出(图5),在同一频率处其吸收强度随含量的增加而相应增大。利用最小二乘法分别对两种物质在1.4 THz处的实验数据进

行拟合,发现样品的吸收系数在所测浓度范围内与浓度的增加呈线性关系,如图5插图所示,符合朗伯-比尔定律.由于光谱测量受到 THz-TDS 动态范围的



影响,因此表现出在一定浓度范围内成线性,该 THz-TDS 系统的检出限一般为 4%^[23].

图6为测量所得次黄嘌呤及其核苷混合物的

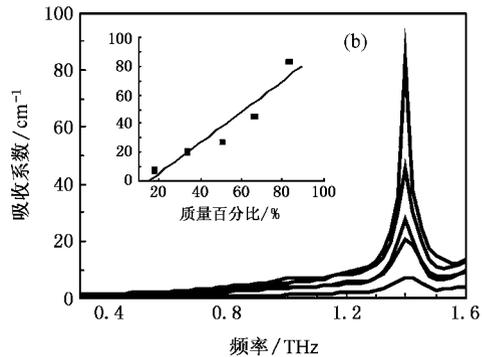


图5 不同浓度(从上至下质量百分比依次为 83%、66%、50%、34%、17%)的次黄嘌呤(a)及次黄嘌呤核苷(b)的 THz 吸收谱,插图分别为次黄嘌呤及其核苷在 1.4 THz 处吸收系数随浓度的变化

THz 吸收谱.以次黄嘌呤及其核苷在 0.5—1.6 THz 的吸收系数谱为基准谱,根据朗伯-比尔定律,用线性回归技术对混合物的 THz 光谱进行处理,得到各个混合物中两种物质成分的相对含量,见表1.可以看出用该方法定量分析的结果与实际含量相吻合,其中,混合物2的分析结果与实际含量间的相对误差最大是 7%,其他混合物分析结果的相对误差均小于 5%.

产生误差的原因主要有:测量仪器本身的原因,如稳定性、测量极限等;制样过程带来的误差,如称量误差、样品在研钵内研磨混和以及转移、压片过程中都会有损失;数据分析方法的选取.因此提高仪器的稳定性,选取严格的制样方法和恰当的数据分析

方法能够进一步提高分析精度.

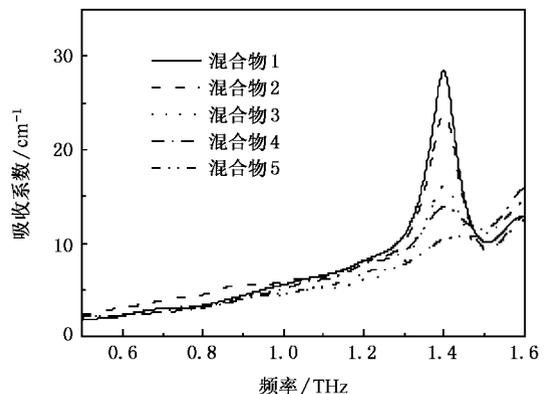


图6 次黄嘌呤及其核苷混合物1—5的 THz 吸收光谱

表1 各混合物的实际成分含量和定量分析结果(样品与聚乙烯 1:1 混合)

样品	实际含量		分析结果	
	次黄嘌呤/%	次黄嘌呤核苷/%	次黄嘌呤/%	次黄嘌呤核苷/%
混合物 1	20(14mg)	80(56mg)	19.4	80.6
混合物 2	40(28mg)	60(42mg)	37.2	62.8
混合物 3	60(42mg)	40(28mg)	58.2	41.8
混合物 4	80(56mg)	20(14mg)	79.3	20.7
混合物 5	90(63mg)	10(7mg)	89.7	10.3

4. 结 论

本文利用 THz-TDS 技术考察了室温条件下次黄嘌呤和次黄嘌呤核苷两种重要生物分子在远红外

0.3—1.6 THz 波段的指纹光谱特性.利用 Hartree-Fock 方法对它们分子振动频率进行模拟计算,所得结果与实验有较好吻合,其中次黄嘌呤核苷在 1.4 THz 处的吸收表现为嘌呤环与戊糖环的低频扭摆.定量测量分析结果表明,一定浓度范围内,物质的 THz 吸收强度和浓度呈线性,符合朗伯-比尔定

律.通过对次黄嘌呤及其核苷混合物的 THz 光谱解析,获得了与实验一致的定量结果,表明该方法可以较为准确地分析出混合物的成分及其含量.本文的研究加深了对次黄嘌呤以及核苷在远红外低频振动

结构的认识,对进一步研究修饰核苷与生物大分子之间的相互作用、分子识别提供了帮助.定量研究的结果则表明,THz-TDS 技术可广泛应用于生物医药的定性及定量分析.

- [1] Walther M ,Plochocka P ,Fischer B ,Helm H ,Uhd Jepsen P 2002 *Biopolymers* **67** 310
- [2] Markelz A G ,Roitberg A ,Heilwei E J 2000 *Chem. Phys. Lett.* **320** 42
- [3] Xu J ,Plaxco K W ,Allen S J 2006 *Protein Sci.* **15** 1175
- [4] Kutteruf M R ,Brown C M ,Iwaki L K ,Campbell M B ,Korter T M ,Heilwei E J 2003 *Chem. Phys. Lett.* **375** 337
- [5] Fischer B M ,Hoffmann M ,Helm H ,Wilk R ,Rutz F ,Kleine-Ostmann T ,Koch M ,Uhd Jepsen P 2005 *Opt. Express* **13** 5205
- [6] Kistner C ,André A ,Fischer T ,Thoma A ,Janke C ,Bartels A ,Gisler T ,Maret G ,Dekorsy T 2007 *Appl. Phys. Lett.* **90** 233902-1
- [7] Ma S H ,Shi Y L ,Xu X L ,Yan W ,Yang Y P ,Wang L 2006 *Acta Phys. Sin.* **55** 4091 (in Chinese)[马士华、施宇蕾、徐新龙、严伟、杨玉平、汪力 2006 物理学报 **55** 4091]
- [8] Wang W N ,Li Y B ,Yue W W 2007 *Acta Phys. Sin.* **56** 781 (in Chinese)[王卫宁、李元波、岳伟伟 2007 物理学报 **56** 781]
- [9] Fischer B M ,Walther M ,Uhd Jepsen P 2002 *Phys. Med. Biol.* **47** 3807
- [10] Shen Y C ,Upadhyya P C ,Linfield E H ,Davies A G 2004 *Vib. Spectrosc.* **35** 111
- [11] Nishizawa J ,Sasaki T ,Suto K ,Tanabe T ,Saito K ,Yamada T ,Kimura T 2005 *Opt. Commun.* **246** 229
- [12] Walther M ,Fischer B M ,Uhd Jepsen P 2003 *Chem. Phys.* **288** 261
- [13] Ge M ,Zhao H W ,Ji T ,Yu X H ,Wang W F ,Li W X 2006 *Science in China (Series B)* **49** 204
- [14] Mickan S P ,Menikh A ,Liu H B ,Mannella C A ,MacColl R ,Abbott D ,Munch J ,Zhang X C 2002 *Phys. Med. Biol.* **47** 3789
- [15] Menikh A ,Mickan S P ,Liu H B ,MacColl R ,Zhang X C 2004 *Biosens. Bioelectron.* **20** 658
- [16] Liu H B ,Chen Y ,Zhang X C 2007 *J. Pharm. Sci.* **96** 927
- [17] Wallace V P ,Fitzgerald A J ,Pickwell E ,Pye R J ,Taday P F ,Flanagan N ,Ha T 2006 *Appl. Spectrosc.* **60** 1127
- [18] Wu Q ,Zhang X C 1995 *Appl. Phys. Lett.* **67** 3523
- [19] Duvillaret L ,Garet F ,Coutaz J L 1996 *Selected Topics in Quantum Electronics* **2** 739
- [20] Shi J R ,Luo C Y ,Zhang X D 2003 *J. Jilin Inst. Chem. Technol.* **20** 30 (in Chinese)[时景荣、罗传义、张晓东 2003 吉林化工学院学报 **20** 30]
- [21] Munns A R I ,Tollin P 1970 *Acta Cryst. B* **26** 1101
- [22] Chou C H ,Thomas G J Jr ,Struther Amott ,Campbell Smith P J 1977 *Nucleic Acids Res.* **4** 2407
- [23] Zhang Z Y ,Ji T ,Yu X H ,Xiao T Q ,Xu H J 2006 *Chin. Phys. Lett.* **23** 2239

THz spectra of hypoxanthine and inosine^{*}

Ma Xiao-Jing^{1,2)} Zhao Hong-Wei^{1)†} Dai Bin²⁾ Liu Gui-Feng¹⁾

1) *Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China*

2) *School of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832003, China*

(Received 15 October 2007 ; revised manuscript received 14 November 2007)

Abstract

Far-infrared absorption spectra and refractive indices of hypoxanthine and inosine have been measured by terahertz time-domain spectroscopy (THz-TDS) in the frequency range of 0.3—1.6 THz at room temperature. The experimental results show that there is a distinct difference between the THz absorption spectra of hypoxanthine and inosine, which suggests that THz-TDS is highly sensitive to molecular structures and the components. Hartree-Fock calculation was used to optimize and simulate the THz spectra obtained by measurement. The low frequency vibrational mode at 1.4 THz of inosine is attributed to the swing and torsion between purine and pentose rings according to the theoretical calculation. There is a linear relationship between the absorption intensity and the concentration of sample, which is consistent with Lambert-Beer's Law. Quantitative analysis of the components of mixtures of hypoxanthine and inosine was carried out by linear regression with non-negative constraint and the relative error was less than 7%. The sources of error were also discussed.

Keywords : THz-TDS, hypoxanthine, inosine, quantitative analysis

PACC : 3220F, 3580B, 3310

^{*} Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 10574134).

[†] Corresponding author. E-mail : zhaohongwei@sinap.ac.cn