

生物物理技术

——波谱技术及其在生物学中的应用

林克椿

高等教育出版社

内 容 提 要

本书为高校生物物理课程教学参考丛书之一,系统介绍了生物物理中常用的一些波谱技术,包括吸收光谱术、发射光谱术(荧光与磷光)、振动光谱术(红外与拉曼光谱术)、旋光色散与圆二色技术、核磁共振技术、电子自旋共振技术和穆斯堡尔谱术等。并对每一种技术在生物学各领域的应用都尽可能举例说明。本书对有关物理理论的介绍以大学生物系和医学院学生所能接受的程度为准,并涉及新近的研究进展。也可作为生物系其他专业高年级本科生或研究生的参考书。

生物物理技术

——波谱技术及其在生物学中的应用

林克椿

*

高等教育出版社出版

高等教育出版社照排中心照排

新华书店北京发行所发行

国防工业出版社印刷厂印刷

*

开本 850×1168 1/32 印张 8 字数 200 000

1989年5月第1版 1989年5月第1次印刷

印数 0001—1 120

ISBN 7-04-002125-0/Q·130

定价 2.15 元

序 言

生物物理学的发展，在很大程度上依赖于物理学技术的开发及其在生物学中的应用。X射线衍射技术的应用是一个极好的例子，它使人们第一次能够“看到”核酸和蛋白质晶体中原子的空间排布，从而对大分子的空间结构有了一个明确的认识，并由此推动着分子生物学的飞速发展。电子显微镜及其相应技术的利用，使人们能更直观地观察亚细胞以至大分子的形象。各种光谱与波谱技术的应用，不仅可以辨认许多重要的生物活性物质，而且可以了解它们的结构、有序性、相互作用、代谢过程及分子运动的状况，甚至还能用来直接观察活体。总之，由于具备了许多现代化的技术手段，生物学已经逐步摆脱了过去那种以描述和定性为主的研究阶段，迅速向精密科学发展。近代生物学——其中也包括生物物理学在内——的研究工作者，如果不掌握上述技术的基本物理原理、仪器技术的特点及其使用方法，以及它们在各方面应用的可能性，将会遇到极大的困难，甚至寸步难行。而对于一个生物物理学工作者来说，生物物理技术已经成为本门学科中的一个重要组成部分，这也是编著这一套生物物理学参考教材时，要把生物物理技术作为几个分册独立成书的根据。

鉴于生物物理技术内容很多，很难包括在同一本教材之中，因此本书选择了几种光谱与波谱技术，编为一册。为了简明起见，本册定名为波谱技术及其在生物学中的应用。考虑到当前国内的现实情况，对基本物理理论的叙述将以生物系学生所能接受的程度为准，而对每一种技术在生物学各领域的应用则尽可能举例说明。希望本书对分子生物学、生物化学、生理学、细胞学、免疫学、药理学等相近的学科也能有所裨益。为了便于读者进一步深

入钻研基本原理及其应用，在每章之末都列举一些参考书或文献。

编者

1988年9月

目 录

序言	(1)
第一章 波谱学总论	(1)
§1 电磁波谱	(1)
§2 能级与跃迁	(4)
§3 谱的产生及主要参数	(6)
§4 波谱测量	(9)
第二章 吸收光谱术	(12)
§1 分子的能量状态	(12)
§2 吸收定律	(16)
§3 吸收的测量	(18)
§4 应用	(20)
§5 快速反应技术——吸收测量的新进展	(32)
第三章 发射光谱术 (荧光与磷光)	(36)
§1 发射的基本原理	(36)
§2 荧光测量	(38)
§3 荧光分子与影响荧光的因素	(55)
§4 荧光技术的应用	(66)
第四章 振动光谱 (红外与拉曼光谱术)	(92)
§1 分子的振动及其能级	(92)
§2 红外吸收谱仪	(98)
§3 红外与拉曼光谱术在生物学中的应用	(100)
第五章 旋光色散与圆二色技术	(110)
§1 基本原理	(110)
§2 测量	(116)
§3 圆二色技术的应用	(121)

第六章 核磁共振技术	(133)
§ 1 核磁共振的基本原理	(134)
§ 2 仪器与实验方法	(147)
§ 3 核磁共振技术在生物、医学中的应用	(160)
第七章 电子自旋共振技术	(189)
§ 1 电子自旋共振的基本原理	(190)
§ 2 电子自旋共振谱仪	(202)
§ 3 电子自旋共振技术在生物、医学中的应用	(207)
第八章 穆斯堡尔谱术	(230)
§ 1 基本原理——穆斯堡尔效应	(230)
§ 2 实验装置与测量参数	(235)
§ 3 穆斯堡尔谱术在生物学中的应用	(238)

第一章 波谱学总论

波谱学(spectroscopy)是研究各种不同频率(或波长)电磁波性质的科学,所采用的研究技术称为波谱技术。根据波长或频率的不同,可将电磁波区分为许多不同的波段。并分别给予不同的名称。而波谱学中涉及紫外、可见和红外波段的部分,常称为光谱学。为了统一起见,目前统称为波谱学。

近20年来,波谱技术对于生物体系的应用发展十分迅速,它使人们掌握了许多手段用于研究生物大分子以及更复杂的体系,并已成为许多学科的常规武器。尽管这些技术名称不同,应用的方面也有所不同,但是作为电磁波及其与物质相互作用的特点来说,仍然有许多共同之处。本章的目的一方面在于介绍一些波谱学的基本概念,另一方面也在于给读者以统一的、关于波谱技术的总的印象,以便了解不同波段电磁波的特征,便于在不同目的的研究工作中选择合适的技术。

§1 电磁波谱(electromagnetic spectrum)

电磁辐射也称为电磁波,它指传播着的交变电磁场。其中每一点的电场矢量 E 和磁场矢量 H 互相垂直, E 和 H 又都和传播方向 c 垂直,见图1-1。相邻二个电场的同位相点之间的距离称为电磁波的波长,用 λ 表示。每一点电场(或磁场)完成一次振动所需时间的倒数,即每秒振动次数称为电磁波的频率,用 ν 表示,则

$$\lambda \nu = c \quad (1.1)$$

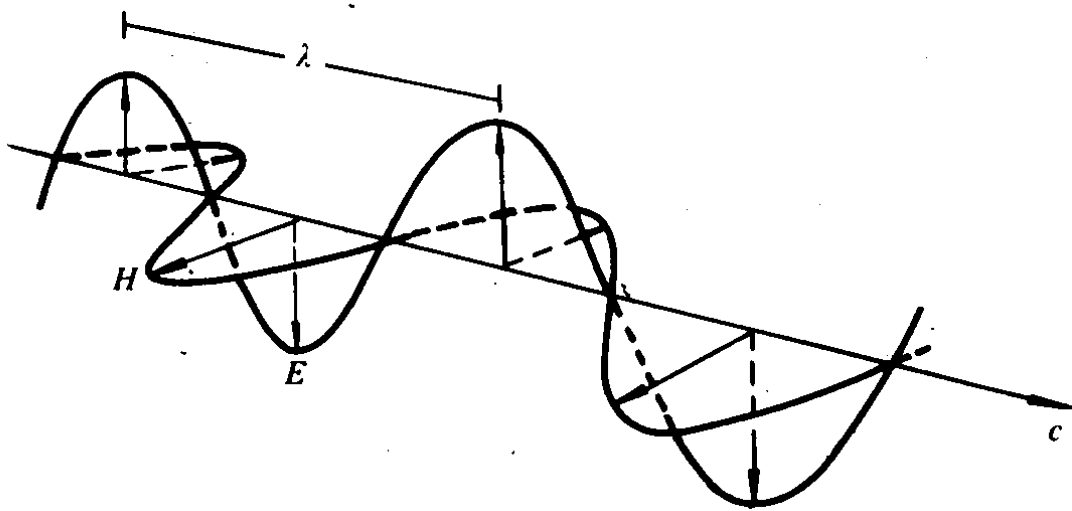


图 1-1 电磁波

其中 c 为波速，即每秒传播距离。电磁波在真空中的波速约为 $3 \times 10^8 \text{ m/s}$ 。 λ 的单位为 m (米) 或 nm (纳米, $1\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$)； ν 的单位为 Hz (赫兹, $1\text{Hz} = 1\text{s}^{-1}$) 或 kHz (千赫, $1\text{kHz} = 10^3 \text{ Hz}$)、 MHz (兆赫, $1\text{MHz} = 10^6 \text{ Hz}$)、 GHz (吉赫, $1\text{GHz} = 10^9 \text{ Hz}$) 等。每厘米中的电磁波数称为波数 (wave number)，用 σ 表示，单位为 cm^{-1} 。可见

$$\sigma = \frac{1}{\lambda} \quad (1.2)$$

电磁辐射不仅具有波动性，而且具有粒子性，即表现为一个个分立的、带有一定能量的粒子，称为量子 (quantum)，有时也称为光子 (photon)。一个量子的能量为

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (1.3)$$

式中 h 为 Planck 常数，其值为 $6.626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ 。可见量子的能量与波长有关，其单位可用 eV (电子伏特) 或其倍数如 keV 、 MeV 等，也可以用 J/mol (焦耳 / 摩尔)，其相互关系如下：

$$1\text{eV} = 1.602 \times 10^{-19} \text{J} = 96.5 \text{kJ/mol} \quad (1.4)^*$$

各种电磁波按其波长(或频率、能量)可顺序排列成为相互连续的图谱,称为电磁波谱。图1-2表示电磁波谱,为清楚起见,各个波段按同样间隔排列。实际上,根据波长的数字不难看出,有些波段很窄,如可见光,而有些波段则很长,如红外, γ 射线等。

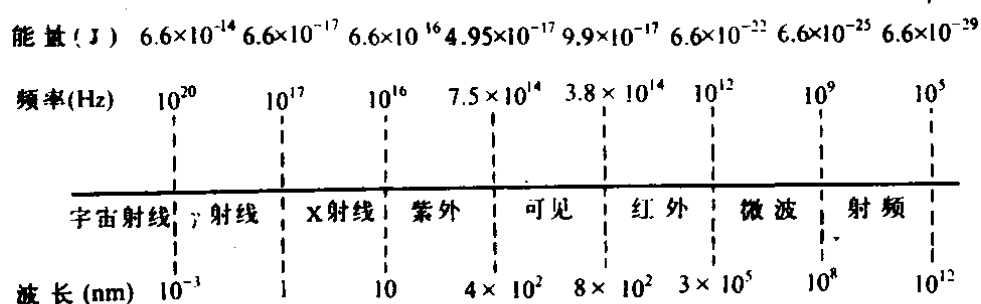


图1-2 电磁波谱

上述电磁波谱中的每一个波段,其所涉及的能量几乎都和分子或其组成(电子与原子核)的某一种运动方式有关,因而在和物质相互作用时,不同的波段都在不同程度上影响整个分子的能量状态,根据其不同性质就可找到不同波段的电磁波在研究分子结构及其运动中的应用,这也正是波谱学具有广泛应用价值的重要原因。例如紫外线与可见光主要作用于分子中的价电子,吸收光谱、发射光谱以及旋光色散与圆二色等技术就利用了这二个区段的电磁波。红外线与分子的振动与转动相关,微波与电子的自旋运动相关,射频与原子核的自旋运动相关,由此而产生了红外吸收光谱、电子自旋共振(ESR)与核磁共振(NMR)等技术。从紫外向更短波长的各波段扩展,其能量已超过一个化学键的键能,因此都能引起分子的激发、电离与键的断裂,并引起相应的化学反应。其中X射线与分子中内层电子的运动有关,X射线衍射就是

* $1\text{eV} = 1.602 \times 10^{-19} \text{J}$ 。每摩尔的 Avogadro 数为 6.022×10^{23} 。因此 $1\text{eV} = 1.602 \times 10^{-19} \times 6.022 \times 10^{23} = 96.5 \text{kJ/mol}$ 。

利用 X 射线在原子上的散射而得到有关分子结构的信息的。从原子核所释放的 γ 射线除作为一种标记物以外，由于放射核本身的反冲作用而发展成穆斯堡尔 (Mössbauer) 效应技术在生物学中也得到了应用。

从以上所述可知电磁波谱在研究分子运动中具有重要意义，而且每一波段都有其应用的价值。但另一方面也需要了解，不同的技术只应用了电磁波谱中的某一区段，它常常只能得出有关分子运动的有限信息，因而为了解决生物分子的结构与功能关系问题，常需要把几种不同技术所得到的结果结合起来，这样才能得到比较全面的知识。除此以外，尽管电磁波谱本身是连续的，但由于产生某种辐射以及相应探测技术的限制，实际上整个波谱中还有相当一部分空白区尚未得到深入研究。例如在远紫外到软 X 射线这一波段中，过去的研究就很少，但随着同步辐射 (synchrotron radiation) 技术在近年来的迅速发展，这一状况已经有了改观，它可以连续产生从 X 射线直到红外如此广宽的波长范围，为分子运动的研究创造了有利条件。这说明波谱学的发展还有许多工作可做。

§ 2 能级与跃迁

一个分子的总能量可以包括其平动、核取向、电子自旋、转动、振动以及电子能量等几部分，除了整个分子的平移运动可以认为具有连续的能量以外，分子中任意一种运动所涉及的能量变化都不是连续的。换言之，任意一种运动状态使分子具有分立的能量值，即具有分立的能级。转动、振动与电子运动的能级，主要决定于分子本身的性质以及外界环境如温度等，因此可以认为是分子本身所固有的一种性质。只有在电子自旋共振与核磁共振技术中，需要把分子置于恒定磁场中才能造成能级的分裂，从而产生不同的能级。尽管如此，关于能级 (energy levels)、跃迁

(transition)、吸收与发射等基本概念都相同。现以电子能级为代表, 结合图 1-3 加以说明。

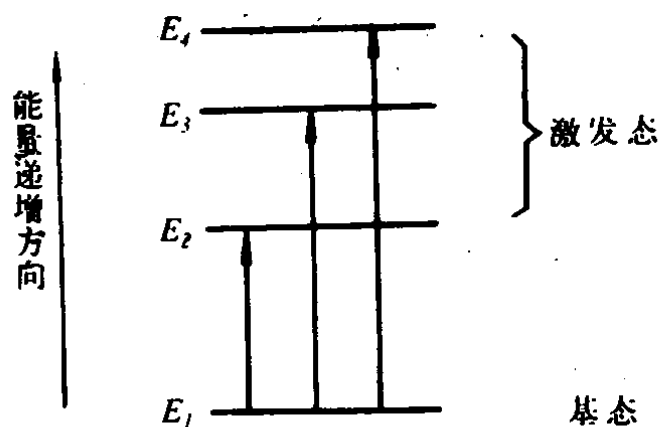


图1-3 能级与跃迁

分子中的某种运动常具有数值不同的几个能级, 其中最低的一个称为基态(ground state), 其余的均称为激发态(excited states)。对于如图 1-3 所示的电子能级, 常明确指出是电子激发态。这些能级都代表确定的能量值, 分别用 E_1 、 E_2 、 E_3 、 E_4 等表示。

分子中的能级变化统称为跃迁。理论上它可以发生在任意二个固有的能级之间。跃迁可以由多种原因产生。在波谱学中常由电磁波与分子的相互作用产生。当外来量子与分子相互作用时, 主要发生两种过程, 即吸收与发射, 它们都要求外来量子的能量等于二个能级能量之差, 亦即

$$h\nu = E_2 - E_1 \quad (1.5)$$

原子原来处于基态, 而 $h\nu$ 正好等于 $E_2 - E_1$ 时, 将发生由 E_1 向 E_2 能级的跃迁, 可用箭头向上的一直线表示。如分子原来处于第一激发态 E_2 时, 则上述 $h\nu$ 的作用将促使分子丢失能量 $E_2 - E_1$, 使分子回到基态, 此时可用向下的箭头表示。其它能级之间的跃迁与此相似。同一 $h\nu$ 促进向上或向下跃迁的几率是相同的, 由低能态跃迁至高能态称为吸收, 由高能态向低能态的跃

迁将多余能量以量子形式发射出来称为发射。至于整个原子群体对某一种辐射究竟表现为吸收还是发射，则需视群体中处于高或低能态的分布特性来决定，常温条件下低能态者占多数，因此一般常表现为吸收。但这种分布和温度有关，常用 Boltzmann 公式表示：

$$\frac{N_j}{N_i} = \exp \{ -\Delta E/k T \} \quad (1.6)$$

式中 N_j 与 N_i 分别表示处于 j 与 i 二个能态的分子数(设 $j > i$)。 ΔE 为此二能级的能量差， k 为 Boltzmann 常数，其值为 $1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$ 。由此式可见，在紫外等高频区，常温下激发态的分布远小于基态，但在微波和磁共振区能差较小的情况下，激发态数实际上和基态数相差很小，这也是磁共振、特别是核磁共振探测较为困难的原因之一。

即使处于基态的分子数较多，在产生吸收之后也将使分布改变，以致处于激发态的分子数增多，处于基态者减少，而且，当这二者数量相同时(称为饱和)将使净吸收降为零，使连续观察吸收现象成为不可能。实际上，处于激发态的分子将通过各种途径自动丢失能量而回到基态，这一现象称为弛豫(relaxation)。各种弛豫过程的细节将在有关技术中说明，但一般来说，热弛豫常为一种重要途径，即将激发能传递给溶剂或其它分子作为分子热运动的能量。其它途径包括重新辐射或用于完成化学反应等。

弛豫过程决定了分子处于激发态的寿命(life time)。由于各个分子之间的差异，一般都用平均寿命来表征，即处于激发态的分子数下降为原始值的 $1/e$ 所需的时间， e 为自然对数的底。

弛豫过程和寿命的研究可以获得有关分子结构和动力学的重要信息，对于荧光技术和核磁共振技术尤为明显(见有关章节)。

§ 3 谱的产生及主要参数

如果按照图 1-3 所示，只有符合 $h\nu = E_2 - E_1$ 或 $E_3 - E_1$

或 $E_4 - E_1$ 的条件时，外来辐射才能被吸收，而且假定外来辐射在各种波长下的强度都相等，则以强度为纵轴，频率为横轴的吸收图线应如图 1-4a 所示，或者象通常做法，以被吸收量对波长作图得图 1-4b。但实际所得到的并非是单一波长下的窄线而是扩展成为一个带，如图中 c 所示。这有许多可能的原因，其中主要是由于环境条件的不同，或者相邻吸收基团之间的相互作用，使同一种吸收基团的能级差略有差异。此外，由于二个电子能级之间还存在着一系列不同的振动与转动能级，在仪器分辨能力不高的情况下将只能观察到其包迹之故。

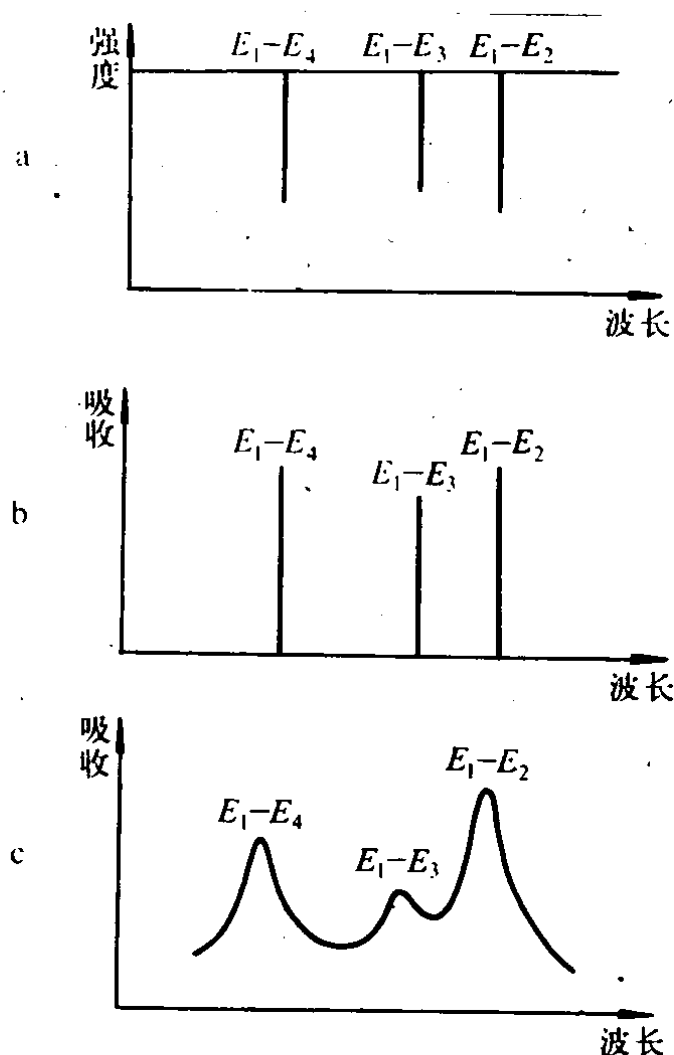


图 1-4 波谱形成的说明

上述谱的获得是各种波谱技术测量的直接结果。从谱可以得

出的信息有下列几个方面，也称为基本参数。

1、位置。谱线的位置是最直接的有用特征，用波长、频率或波数表示，它代表某种吸收或发射基团的特征跃迁，从而可以据此辨认基团或化合物的存在。在核磁共振中则是相对于某一标准物的位置，称为化学位移(chemical shift)，而在电子自旋共振中则称为 g 因子(g -factor)，它代表偏离一个自由电子谱线位置的大小。

2、强度。谱线强度一般和产生吸收或发射的基团数成正比。强度常用谱线下的面积表示，只有在谱线很尖锐的情况下才能近似地用谱线高度代表强度。

3、宽度。谱线的宽度有二种表示法，一是用最大高度一半处的宽度，称为半高宽($\Delta_{1/2}$)。另一种是用谱线两侧斜率最大的两点之间的宽度表示，如图 1-5 的 Δ 。为了准确寻找出斜率最大的点，常借助于电子线路画出通常谱线的导数谱(derivative spectrum)，这时相邻峰与谷之间的距离为峰宽。

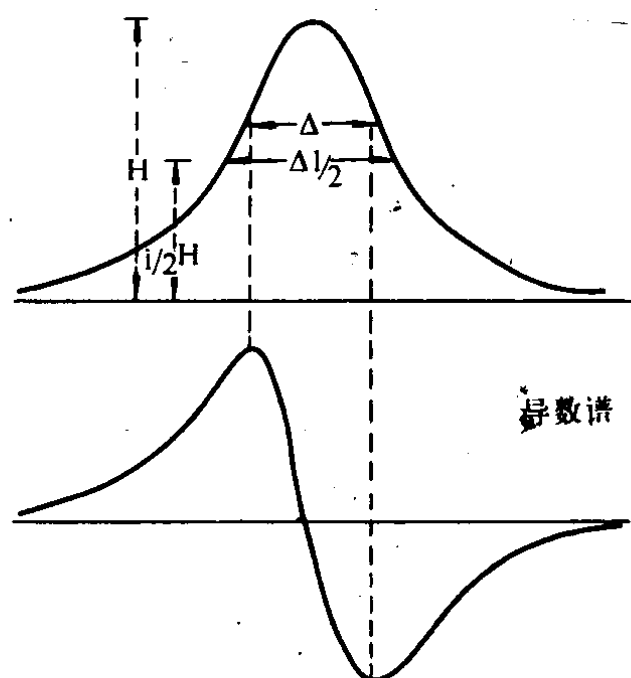


图 1-5 谱线宽度与导数谱

谱线宽度由激发态寿命所决定，能使谱线加宽的因素随环境、物理状态和运动状况而改变，因此根据宽度可以了解运动、动力学和相互作用。

4、结构。在仪器分辨能力较高的情况下，单个峰的谱线常可出现精细结构，或者分裂成为几条谱线，这被称为多重性(multiplicity)。它能提供有关能级分布的信息，有时还能提供关于基团之间相互作用的信息。例如在NMR中，化学位移说明不同的基团，而每一基团峰的分裂数和分裂线的间距则能说明每一基团中磁性核的相对数目以及哪二个基团在相互作用。

除以上一些共同的参数以外，对于和电矢量有关的一些技术，还可以用偏振(polarization)来表征分子的取向(见荧光光谱技术)，用弛豫时间来说明物理状态与相互作用(见核磁共振技术)等。

§4 波谱测量

波谱学技术常用来研究电磁波与物质的相互作用，因此波谱仪(spectrometer)一般都包含下列几个部件：

1、电磁波发生器。用来产生所需要的电磁波，例如光谱仪中的光源，磁共振中的射频发生器或微波发生器等。

2、分光装置。电磁波发生器通常产生连续的、包括各种波长的电磁波，为了选择特定的波长，需用分光装置和狭缝来选出频带较窄的电磁波。对于发射光谱来说，有时在样品之后还需有另一个分光装置来选择发射光中的不同频率的光，分光装置一般都能自动扫描以便于记录。

3、样品。即被研究的物质。波谱学的一般特性是可以研究带水样品，因此样品常以溶液形式存在。盛样品的样品池(杯或管)应能透过产生作用的电磁波。

4、探测器。用来检测透过样品后的电磁辐射的强度。不同的波谱技术使用不同类型的探测器，如光电管、光电倍增管

(photomultiplier)以及电磁波接受线圈等。探测器一般都有相应的放大及调制线路,使接收到的电磁波讯号能被记录或观察。

5、显示、记录或打印装置。用来记录讯号或直接描绘出谱线的部件。

波谱仪的主要部件及其相互关系如图1-6所示。对于不同的波谱仪,其具体细节以及部件的排列方式均有所不同,见有关各章。

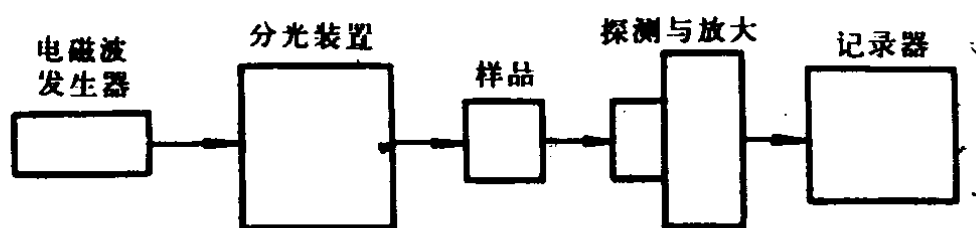


图1-6 波谱仪的主要部件

波谱仪的探测能力直接影响波谱能否获得及其质量优劣。为此需考虑下列几个问题。

1、分辨率(resolution)。波谱仪的分辨率指仪器能够区分两条相邻的谱线的能力,其定义为平均频率 $\bar{\nu}$ 与最小能区分的两谱线频率差 $\Delta\nu$ 之比,即 $\bar{\nu}/\Delta\nu$ 。许多波谱仪的分辨率受狭缝宽度控制,狭缝越窄,分辨率越高,但其窄度又必须使有足够强的辐射到达探测器,否则无法探测到讯号。对NMR来说,分辨率通常由样品所处磁场的均匀度所决定。

2、讯噪比(signal-to-noise ratio)。探测讯号时,总是混杂有随机涨落的本底(background)在内。这在弱讯号测量时十分不利。本底的来源很多,包括辐射发生器、波谱仪、放大器本身的不稳定性和探测器的热噪声等等。增加辐射源的功率是改善讯噪比的措施之一,但在磁共振中容易使激发态达到饱和,以致无净吸收。利用双光束技术是另一种改善办法,即将入射光分成两束,一束经过样品池,另一束经过参比池,用相减法消除伪信

号。

常用的另一种办法是扫描叠加法。即把几次扫描的结果相加。对于讯号来说， n 次累加的结果是使讯号加大 n 倍，而对噪声，则因其具有随机性，只按 $n^{1/2}$ 增加，因此 n 次扫描净增

$$\frac{n}{n^{1/2}} = n^{1/2} \text{ 倍。}$$

近来常用锁相放大 (phase-locked amplifier) 或相敏 (phase sensitive) 检测的方法使探测级的噪声减小到最低限度。这时常把讯号转变为一种交变电压，使其频率远离构成噪声的主要频率成分，然后用一个调谐到新的讯号频率的放大器来放大讯号，这时噪声的放大很少，利用这种不等倍数的放大提高讯噪比。例如在一些光谱仪中常使用一个旋转着的扇形斩波器 (chopper)，使光源间断照射于样品，其频率根据探测器的响应时间定在几个 Hz 到几百 Hz，以后再使这种方波变为平滑。在磁共振中则广泛使用调制线圈来调制磁场，这将在以后详细叙述。

3、傅里叶变换 (Fourier transform)。波谱学在红外光谱术和核磁共振技术中越来越多地应用傅里叶变换的方法，利用计算机快速运算的能力，把实验中原来属于时间或距离等的函数，转换成一般波谱的频率函数。这样做的好处等于对很宽范围的各种频率同时取样，而区别于一般波谱仪扫描时，每一时刻只对一种频率取样，其速度显然要慢得多。傅里叶变换除能节省时间外还能大大提高讯噪比，在相应的章节中将进一步加以说明。