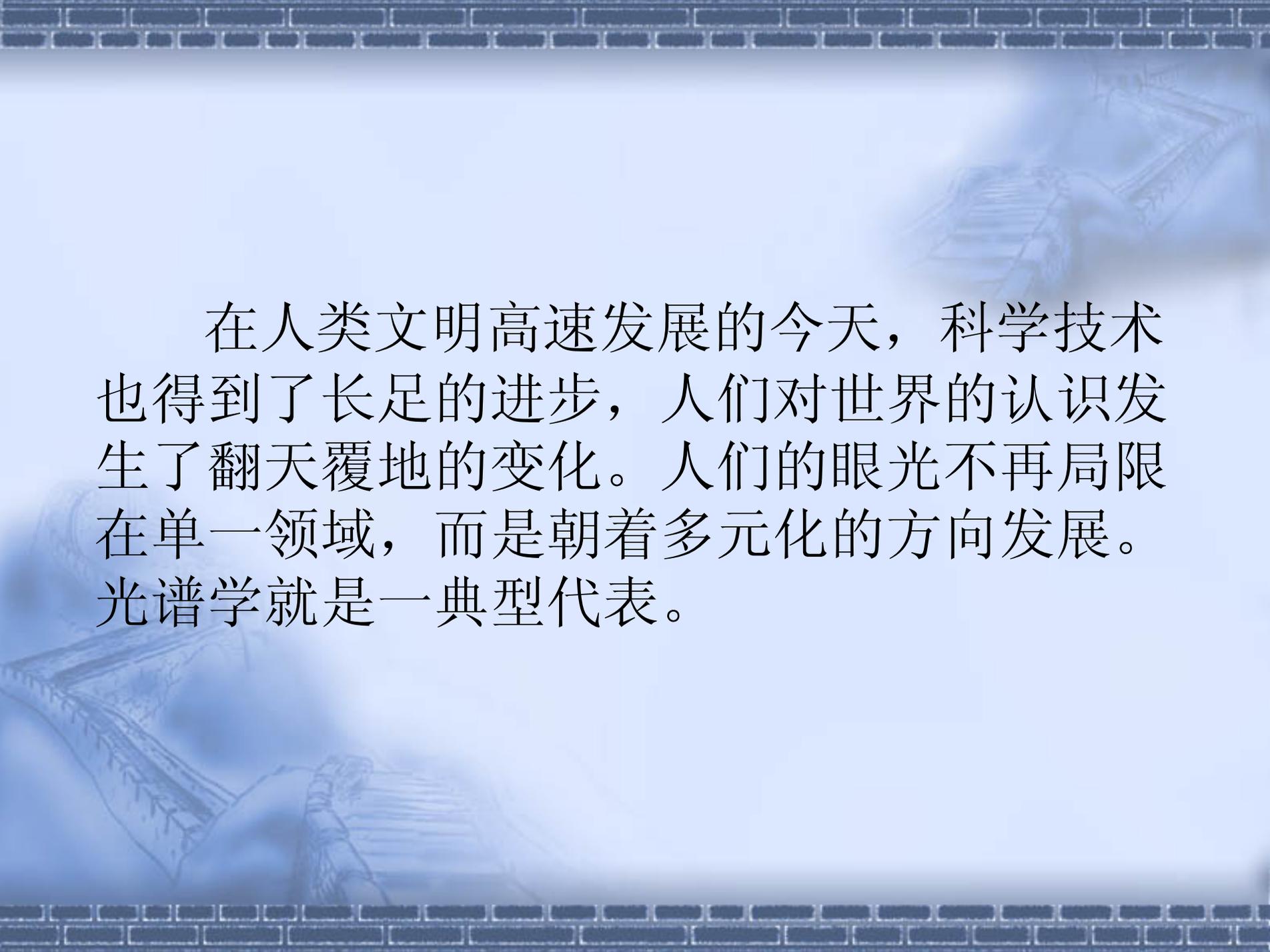


光谱技术在生物 领域中的应用

中国科学技术大学
近代物理系

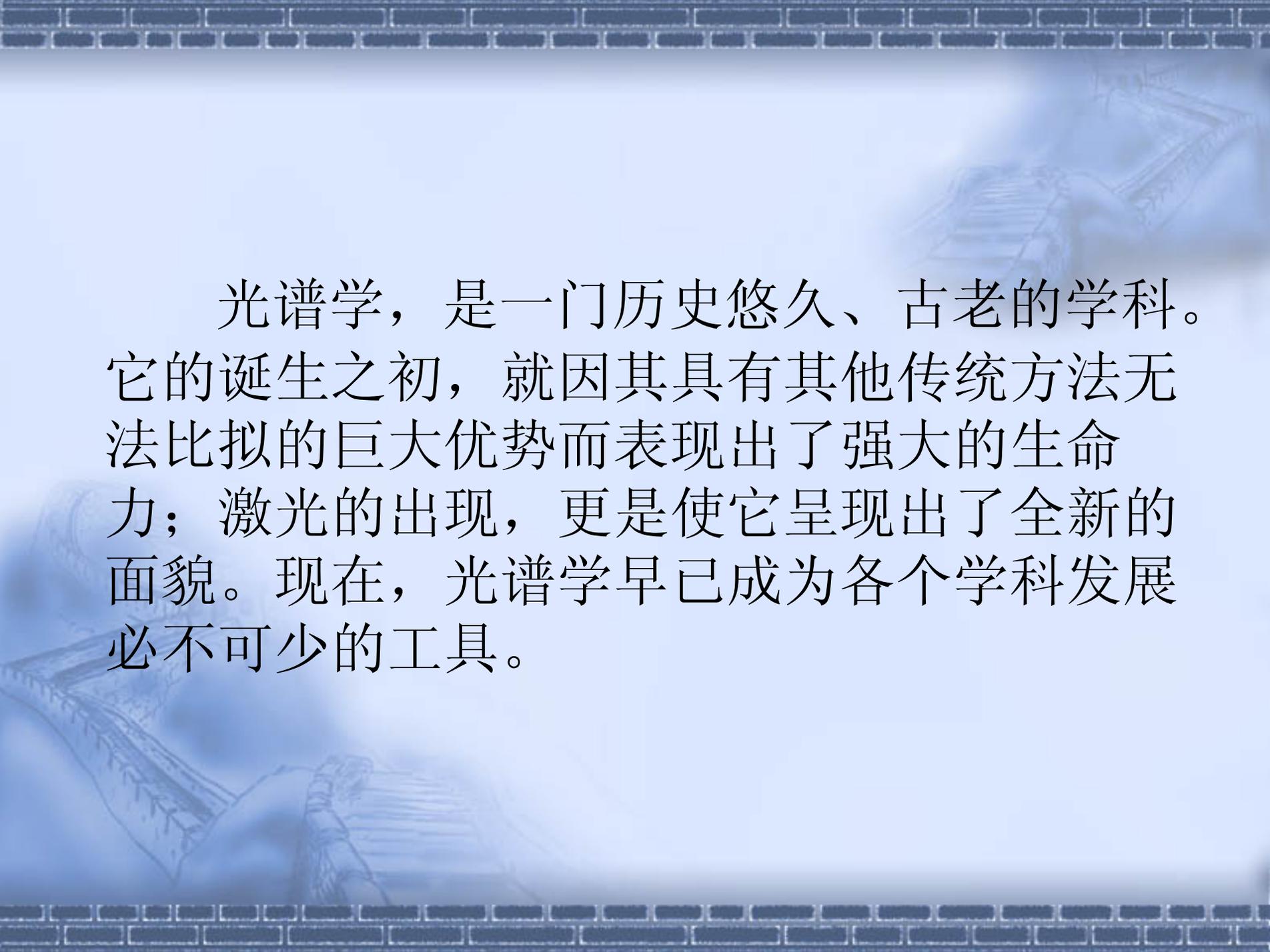
楚风 张驾宇 李昭竹 瞿涛



在人类文明高速发展的今天，科学技术也得到了长足的进步，人们对世界的认识发生了翻天覆地的变化。人们的眼光不再局限在单一领域，而是朝着多元化的方向发展。光谱学就是一典型代表。

第一部分

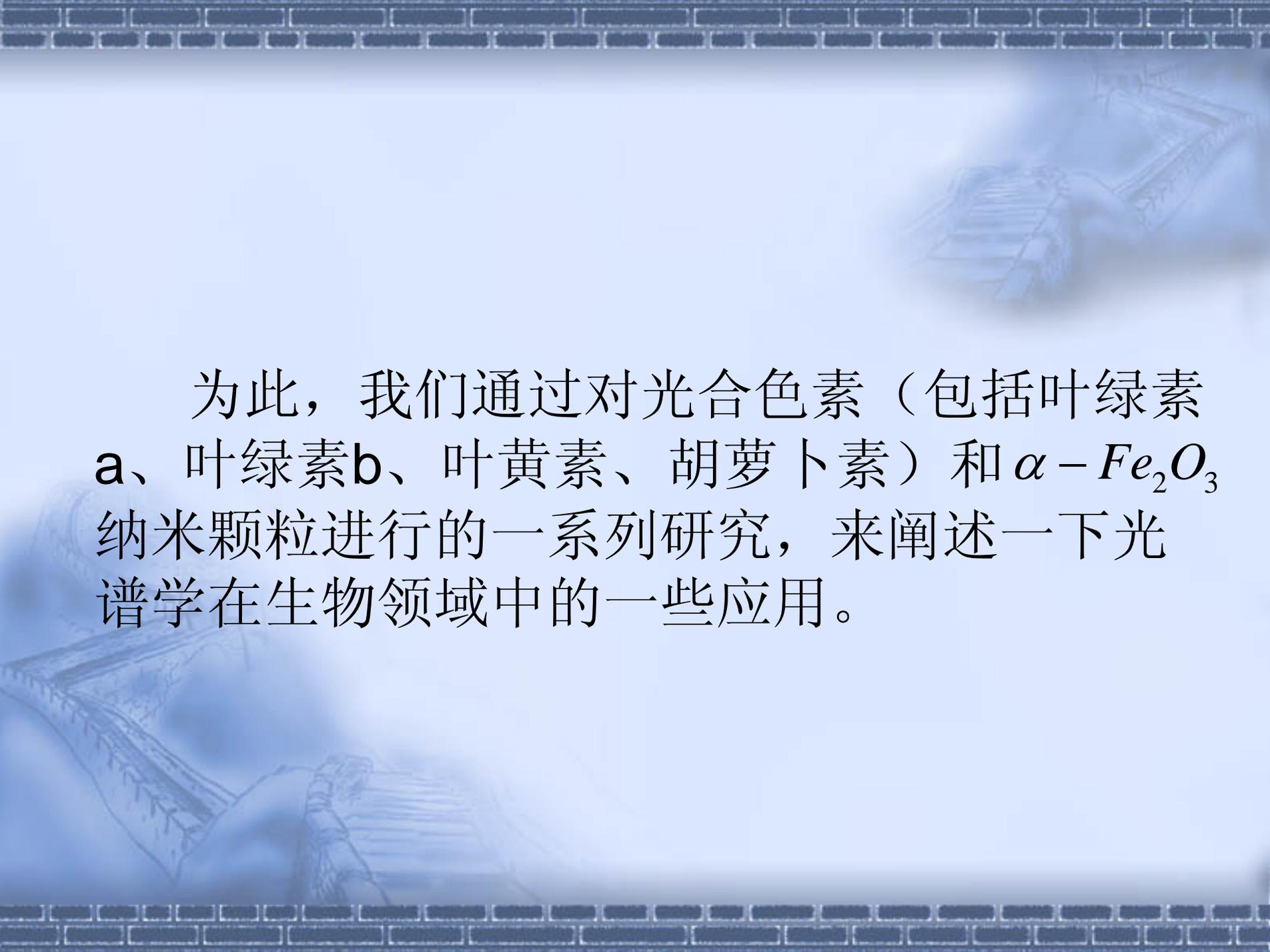
引言



光谱学，是一门历史悠久、古老的学科。它的诞生之初，就因其具有其他传统方法无法比拟的巨大优势而表现出了强大的生命力；激光的出现，更是使它呈现出了全新的面貌。现在，光谱学早已成为各个学科发展必不可少的工具。

光合作用是地球上规模最大的将无机物合成有机物和释放氧气的过程。目前人类面临着食物、能源、资源、环境和人口五大问题，这些问题的解决都和光合作用有着密切的关系。因此，深入探讨光合作用的规律，弄清光合作用的机理，对于有效利用太阳能、使之更好地服务于人类，具有重大的理论和实际意义。

《自然—纳米技术》上刊登的《氧化铁纳米颗粒具有过氧化物酶活性》一文指出，纳米颗粒作为一种理想的材料，可用于疾病诊断、控制药物释放和体内分子成像等方面。它通常用于分离和纯化蛋白质、DNA、病毒和细胞，其性质与纳米材料的粒度有关。如果将其表面连接一种能够特异识别生物分子的蛋白质抗体，它便具有靶向识别和磁性分离的双重功能。



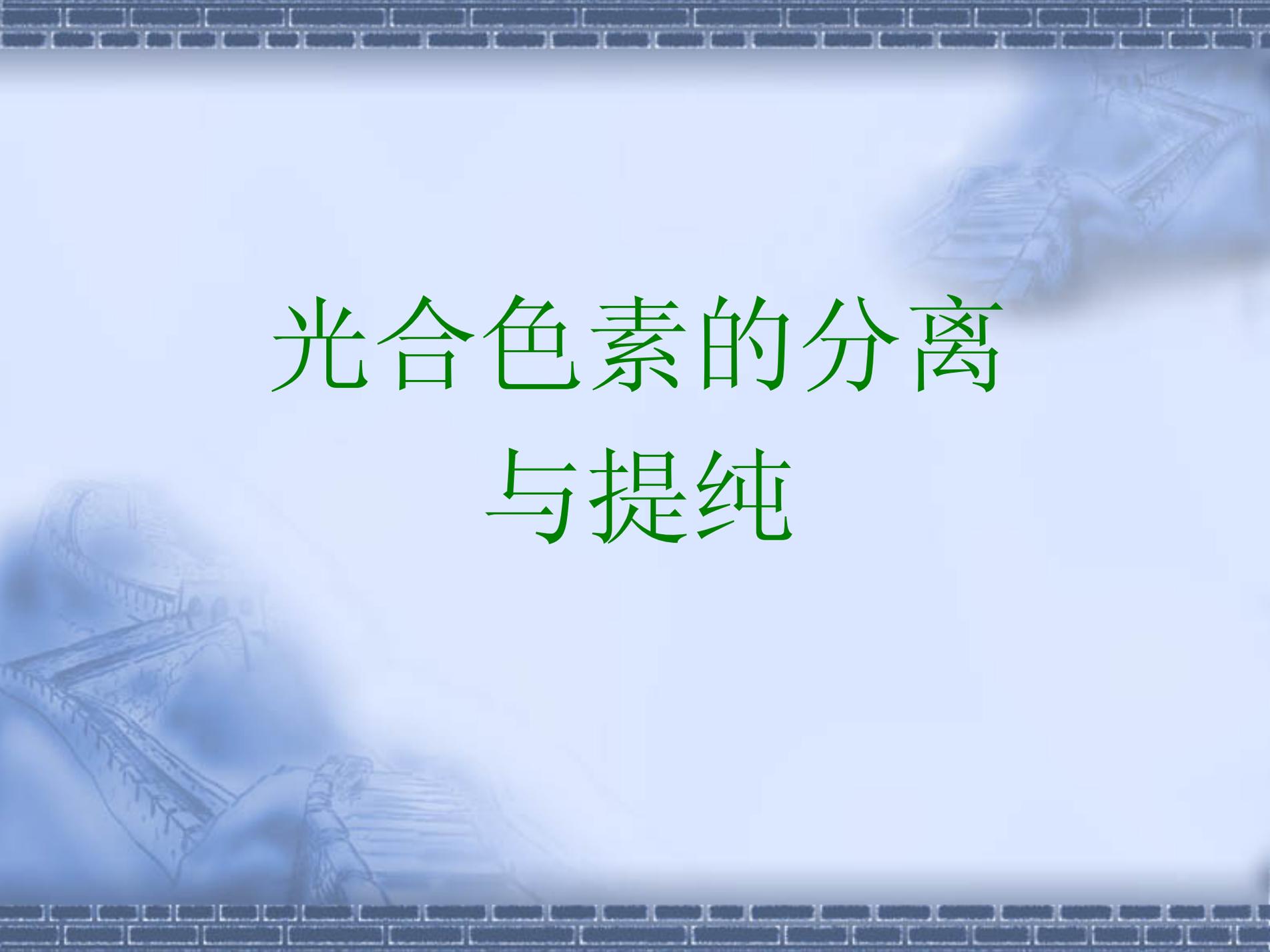
为此，我们通过对光合色素（包括叶绿素a、叶绿素b、叶黄素、胡萝卜素）和 $\alpha-Fe_2O_3$ 纳米颗粒进行的一系列研究，来阐述一下光谱学在生物领域中的一些应用。



第二部分

实验内容

I、样品的制备



光合色素的分离 与提纯

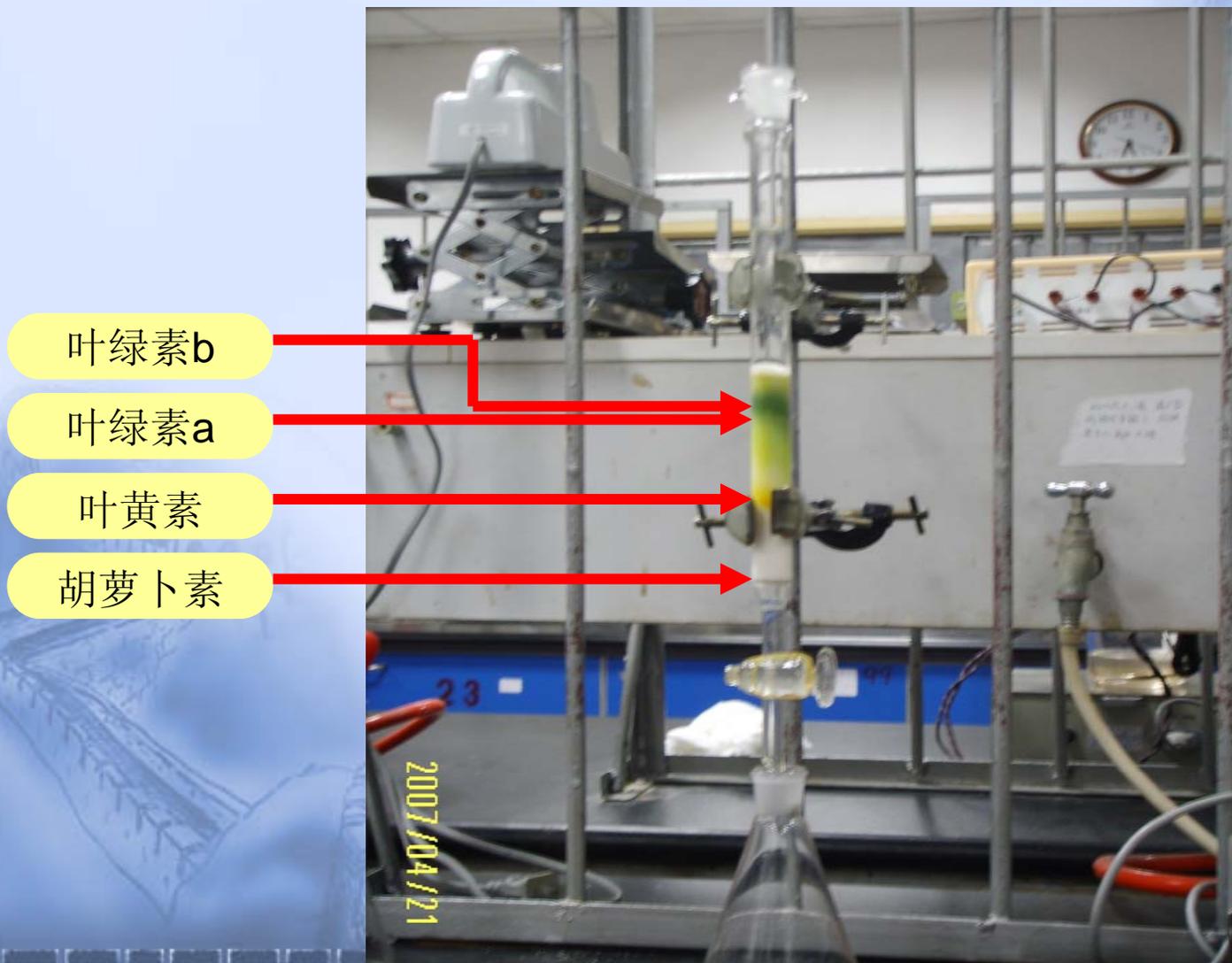
柱层析分离光合色素

柱层析分离出色素的顺序为：

胡萝卜素 → 叶黄素 → 叶绿素a → 叶绿素b

由于光合色素的柱层析分离过程是根据目测层析柱的颜色收集色素的，因此色素之间会存在混合，造成提取出的色素不纯净。

柱层析分离光合色素的实验装置图



柱层析法得到的四种光合色素



胡萝卜素



叶黄素



叶绿素a



叶绿素b

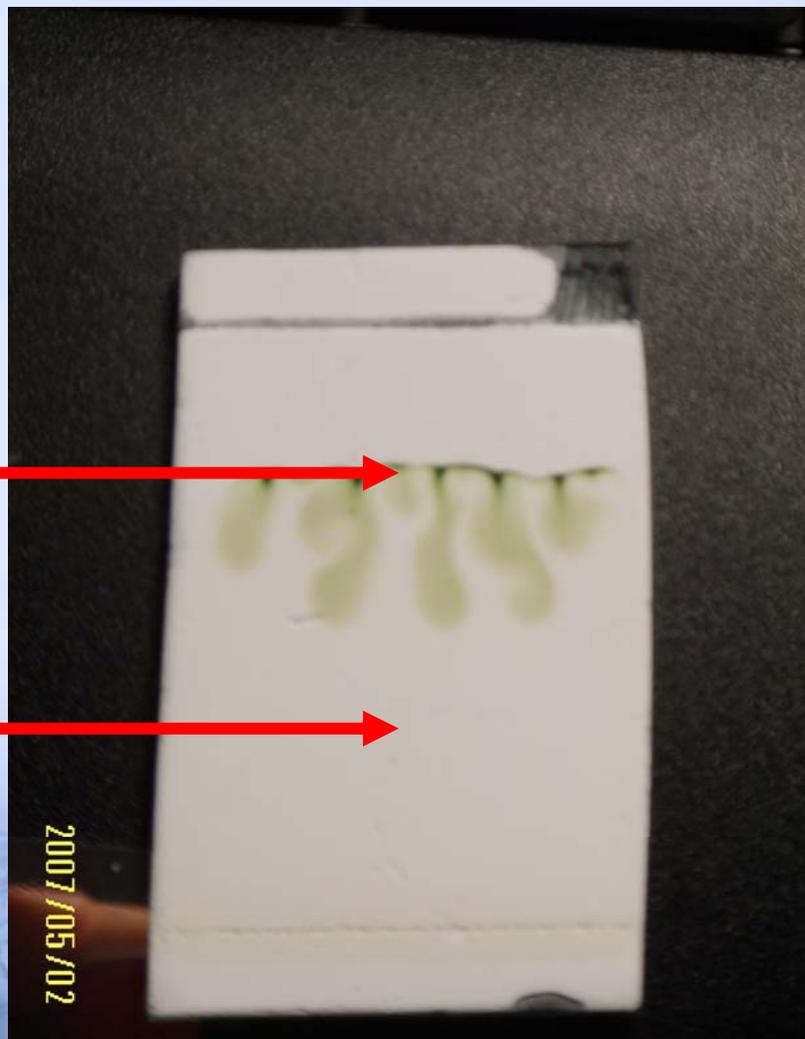
薄层层析提纯光合色素

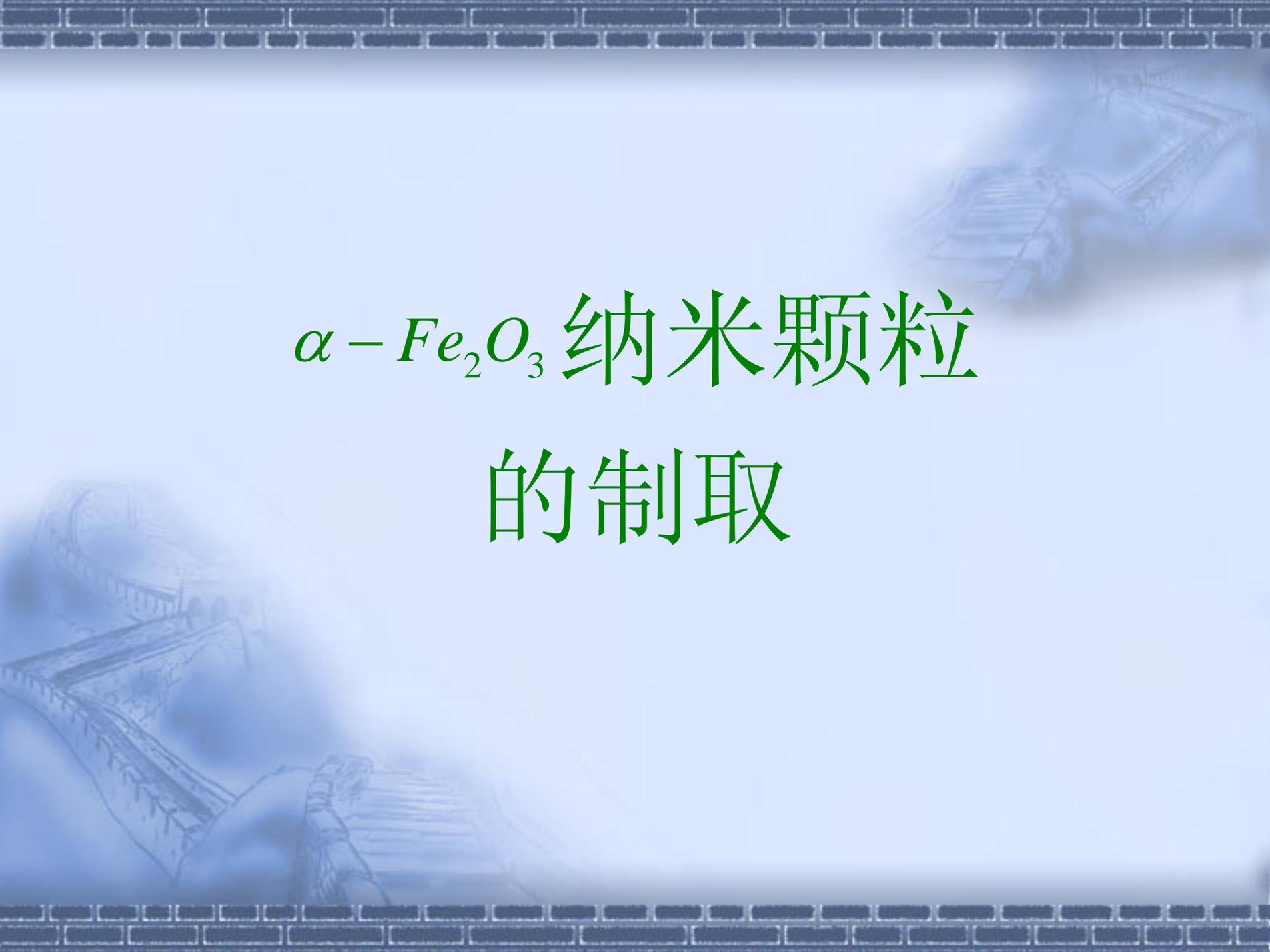
薄层层析，是根据四种色素在展开液中的溶解度大小不同而在硅胶板上扩散快慢不同的原理工作的。通过薄层层析，可得到较纯净的光合色素。

光合色素的薄层层析

色素带

硅胶板





$\alpha - Fe_2O_3$ 纳米颗粒
的制取

样品的制备（沉淀法）

在惰性气氛下, 往 FeSO_4 溶液中加入过量的 NaOH 溶液, 使 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 胶粒快速生成。往悬浮液中鼓入空气后, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 胶粒逐渐凝聚成较大的胶团, 并在胶团与溶液界面上形成针形的 α - FeOOH 晶核, 进而使胶团逐渐分裂解体, 直至全部转变成针形 α - FeOOH 微晶。在反应过程中控制pH值为12, 温度为 40°C 。对沉淀物进行过滤, 洗涤, 在马弗炉中维持 350°C 干燥2 h 得到氧化铁原粉, 用去离子水, 无水乙醇洗涤, 100°C 下烘干, 即制得纳米 α - Fe_2O_3 粉体

II、光谱的研究工作

实验纲图

拉曼光谱

吸收光谱

XRD

TEM

光合色素

α 氧化铁

光合色素的研究

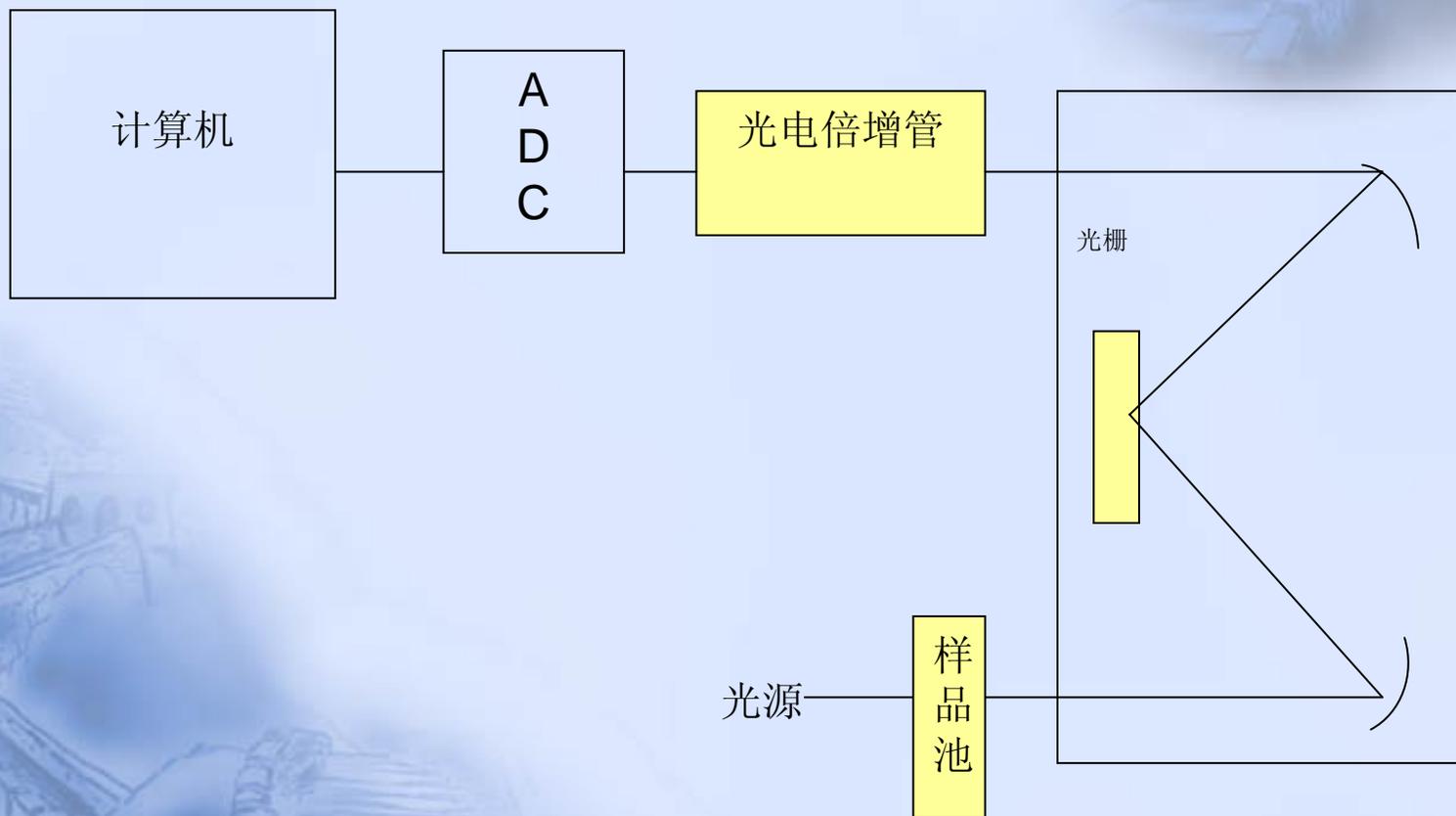
The background features a light blue gradient with a faint, stylized illustration of a classical building facade, possibly a library or university building, with a prominent archway and columns. The top and bottom edges of the image are framed by a dark blue brick wall pattern.



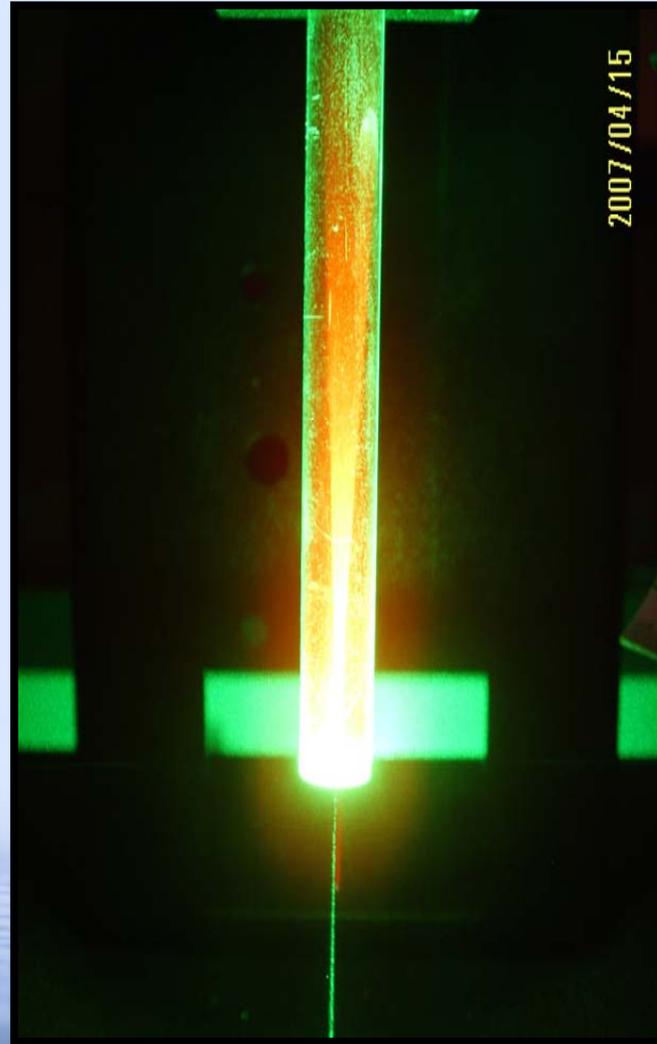
Raman

光谱

实验仪器的光路图



装有光合色素的比色皿



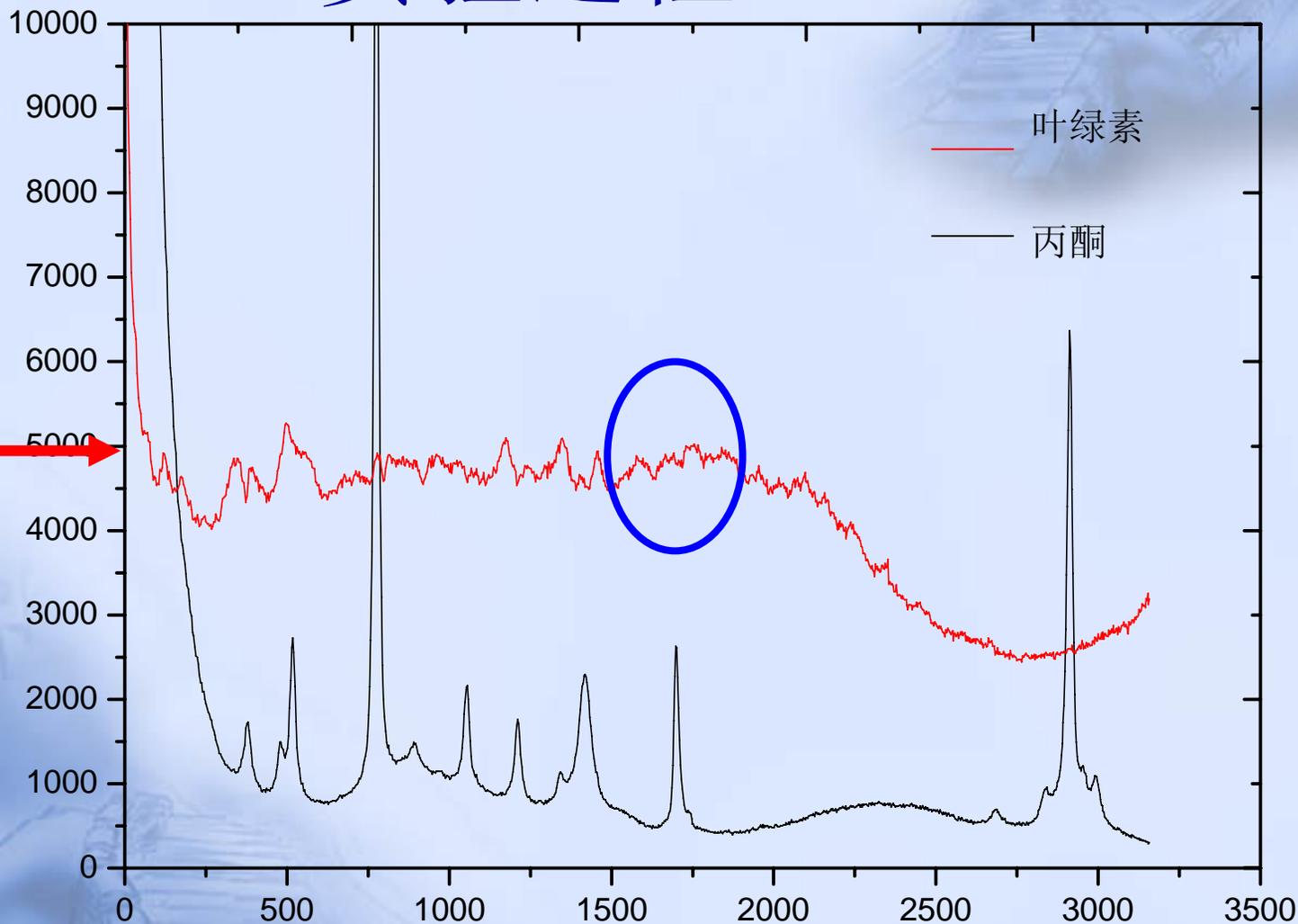
光合色素的结构



实验过程

实验中，我们分别在样品池中放入丙酮和光合色素的丙酮溶液，分别测出其Raman光谱，画在一张图上，如下所示：

实验过程



光和色素的拉曼光谱

实验过程

通过查阅资料，发现以下数据

原子基团（伸缩振动）	区域（ $\Delta\nu / \text{cm}^{-1}$ ） ¹
O—H	3650~3000
N—H	3500~3300
$\equiv\text{C—H}$	3300
$=\text{C—H}$	3100~3000
$-\text{C—H}$	3000~2800
$\text{C}\equiv\text{N}$	2255~2200
$\text{C}\equiv\text{C}$	2250~2100
$\text{C}=\text{O}$	1820~1680
$\text{C}=\text{C}$	1900~1500
$\text{C}=\text{N}$	1680~1610

实验结论

通过上表，大致可以推断出光合色素这种混合物中含有 $C=N$ 、 $C=C$ 等基团。但是此项结果不很确定，原因有以下几点：

★由于Raman散射仪的精度不是很高，Raman光谱上的峰值又不是很大，这完全有可能是噪声引起的；

★光合色素除了含有叶绿素a、叶绿素b、叶黄素和胡萝卜素这些色素外，可能还会含有其他的杂质，前面推出的基团也可能是包含在这些杂质中的；

★（1900~1680）区域的峰也可能是由别的原子基团产生的。

吸收 光谱

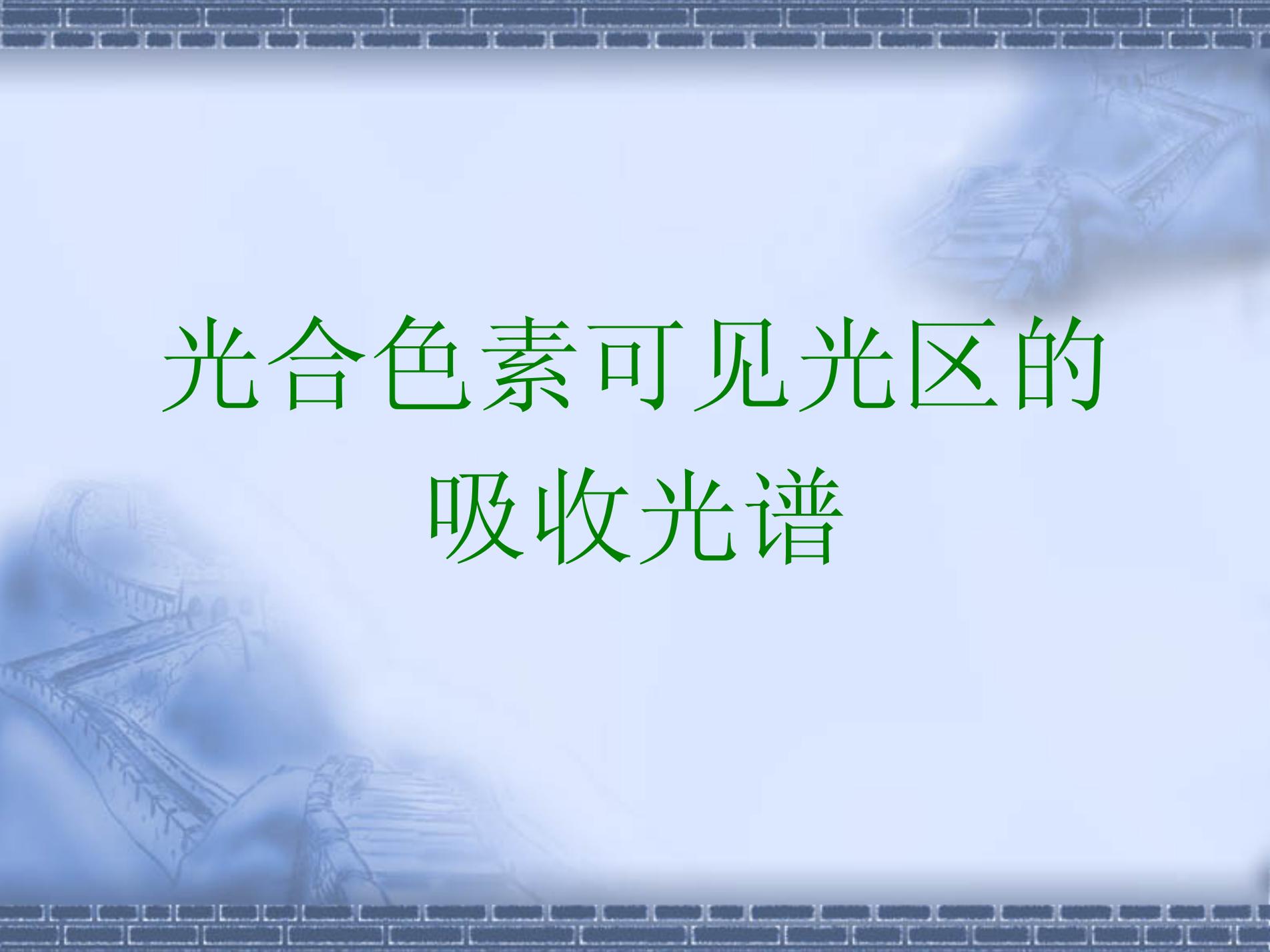


吸收光谱简介

光照射到物质或溶液时，光子与组成该物质或溶液的原子、分子或离子发生作用，使光子的能量发生迁移，使粒子从基态激发到激发态

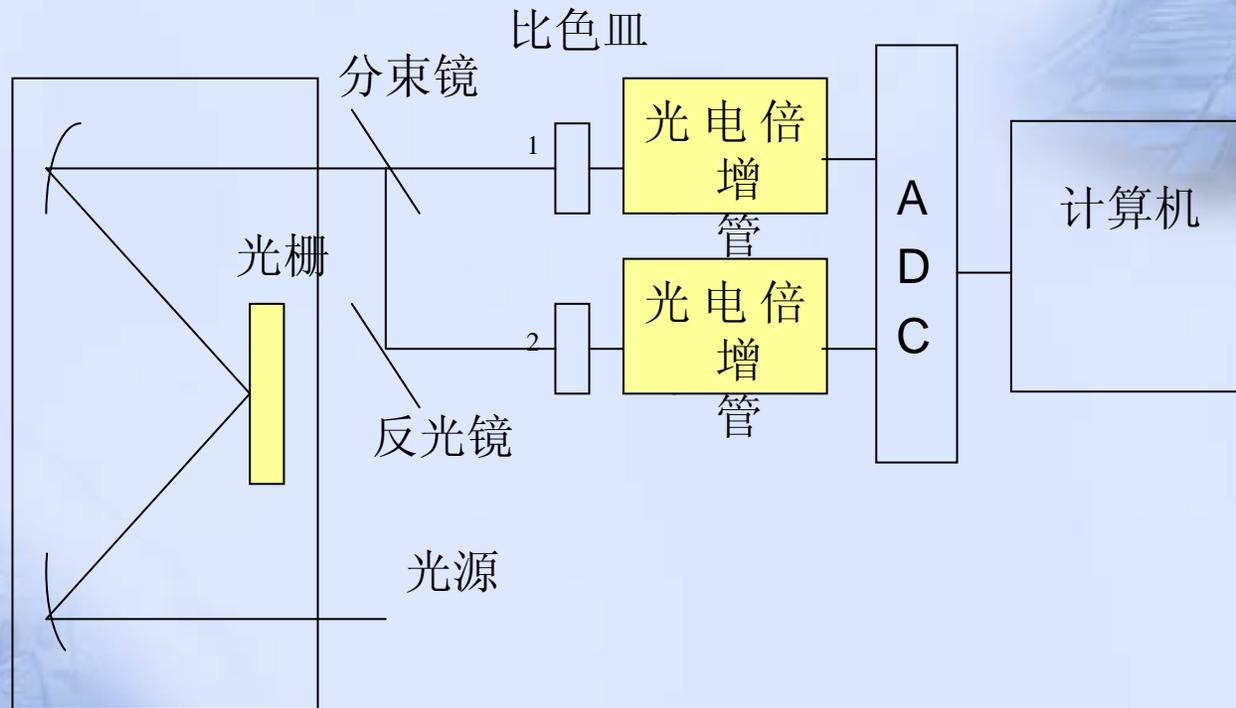


这一过程即为物质对光的吸收



光合色素可见光区的 吸收光谱

实验仪器的光路图



分束镜是一个**50%**的半透镜，比色皿是一个的标准石英样品池。比色皿**2**放待测溶液，比色皿**1**放溶剂作为参比，起到光路补偿和消除溶剂影响的作用。

实验过程

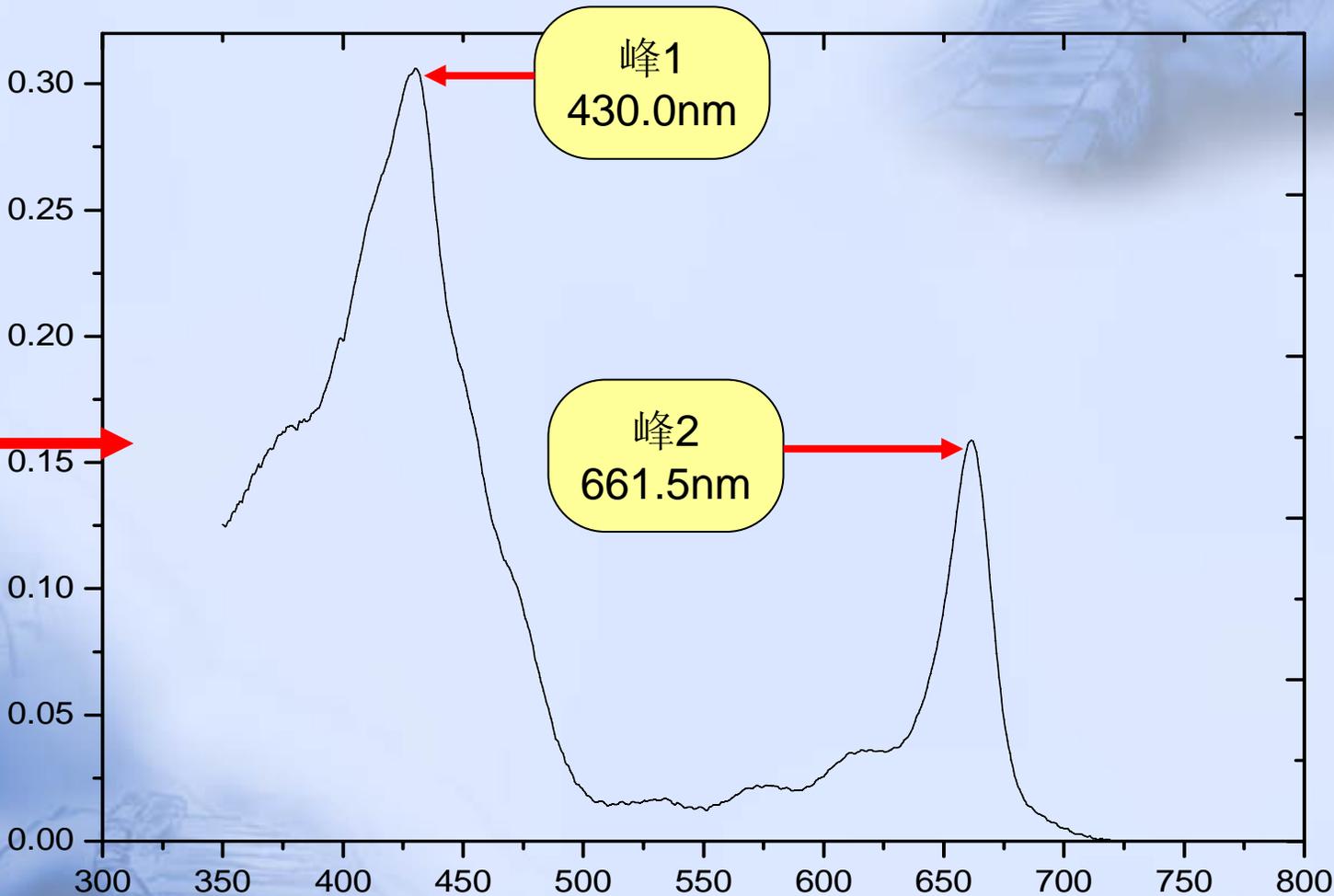
由于光合色素是生物大分子，它必须溶解在溶剂中才能进行吸收光谱实验。本实验中，选取丙酮作为溶剂。为了避免溶剂在可见光区的吸收峰对光合色素吸收光谱的影响，我们首先对丙酮在近紫外—可见光区进行测试，得到的吸收光谱如下。

实验过程

接下来，我们分别测定了叶绿素**a**、叶绿素**b**和叶黄素的可见光吸收光谱，分别如下。

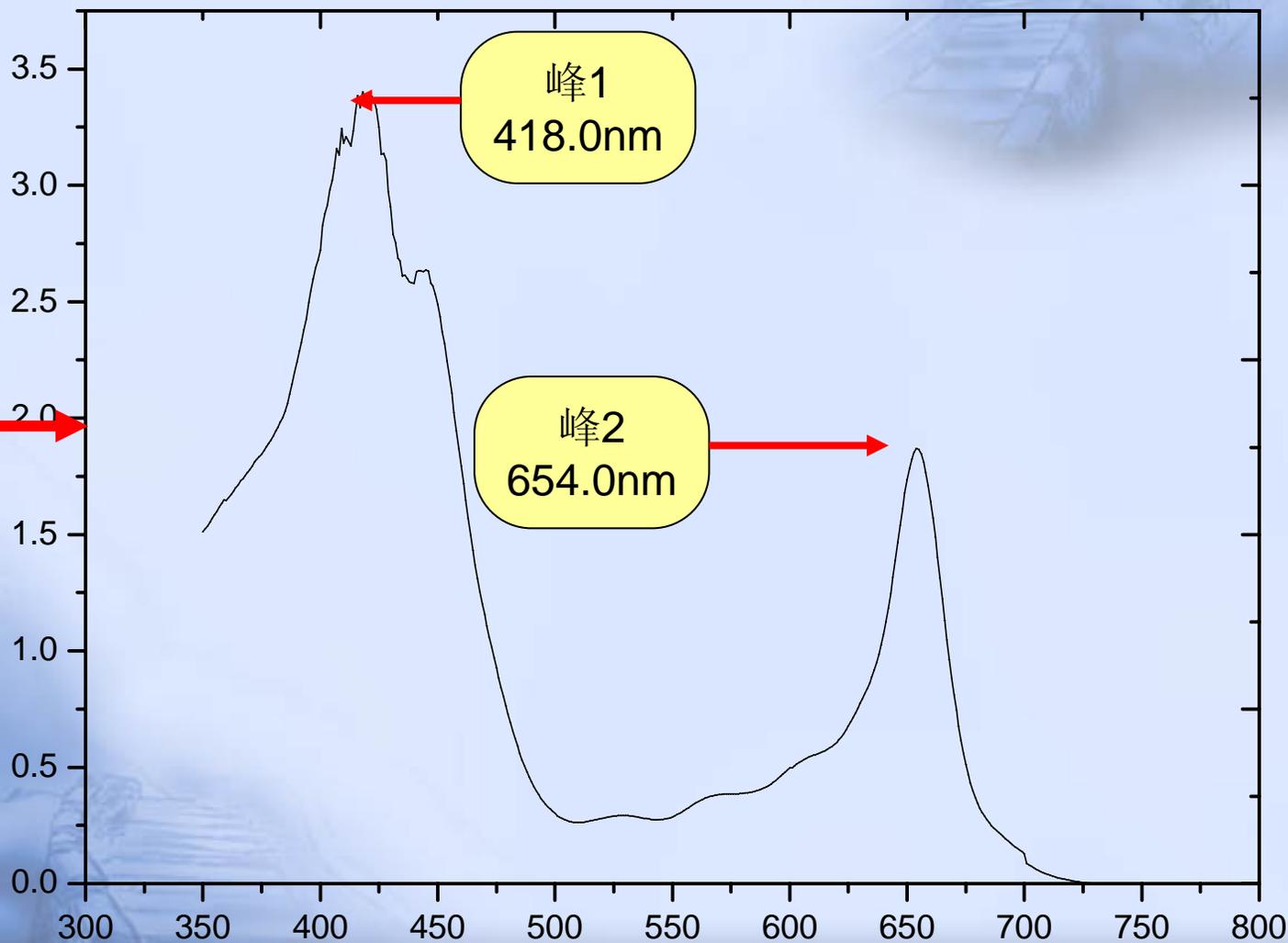
实验过程

叶绿素 a 的收光谱

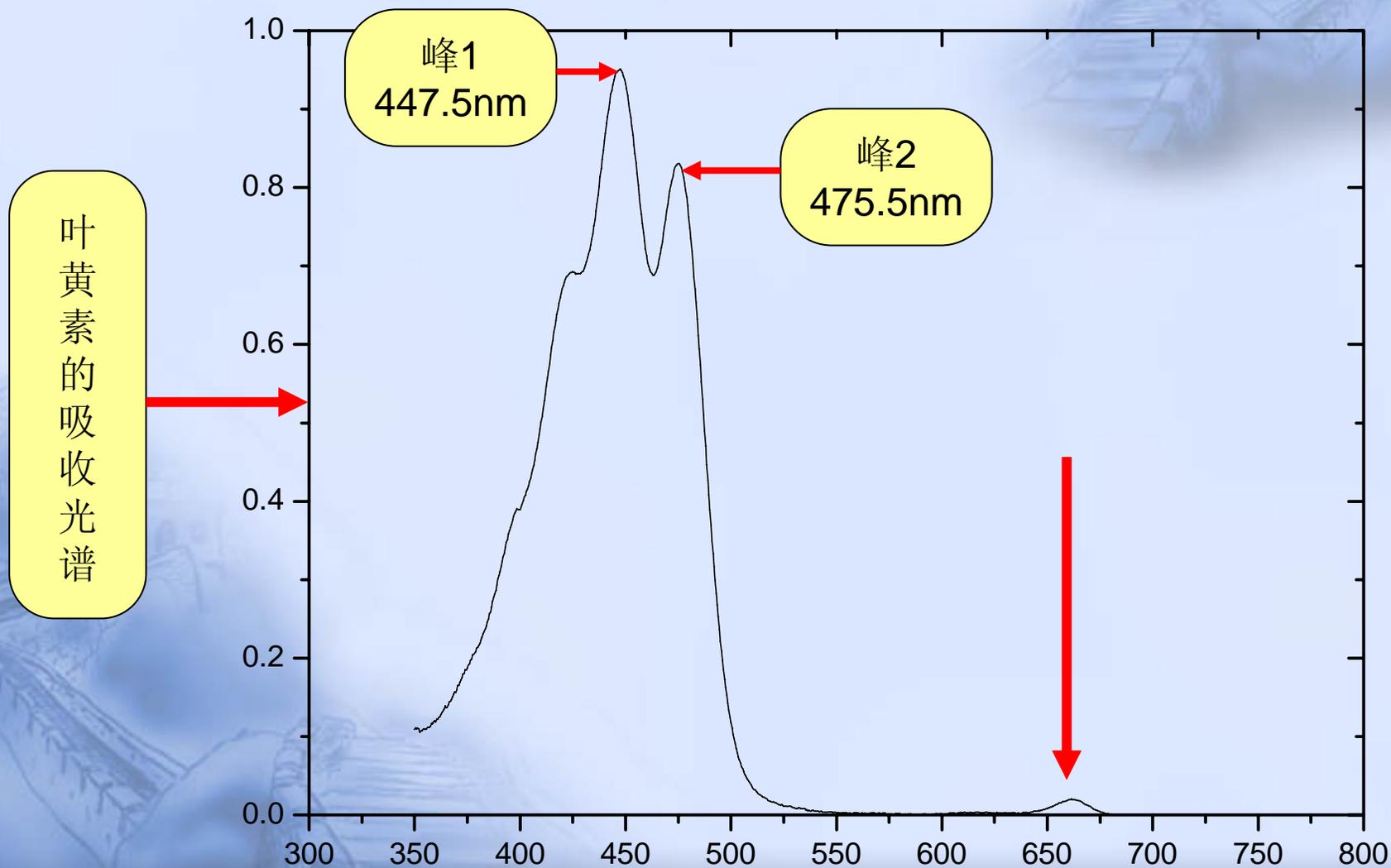


实验过程

叶绿素 b 的吸收光谱



实验过程

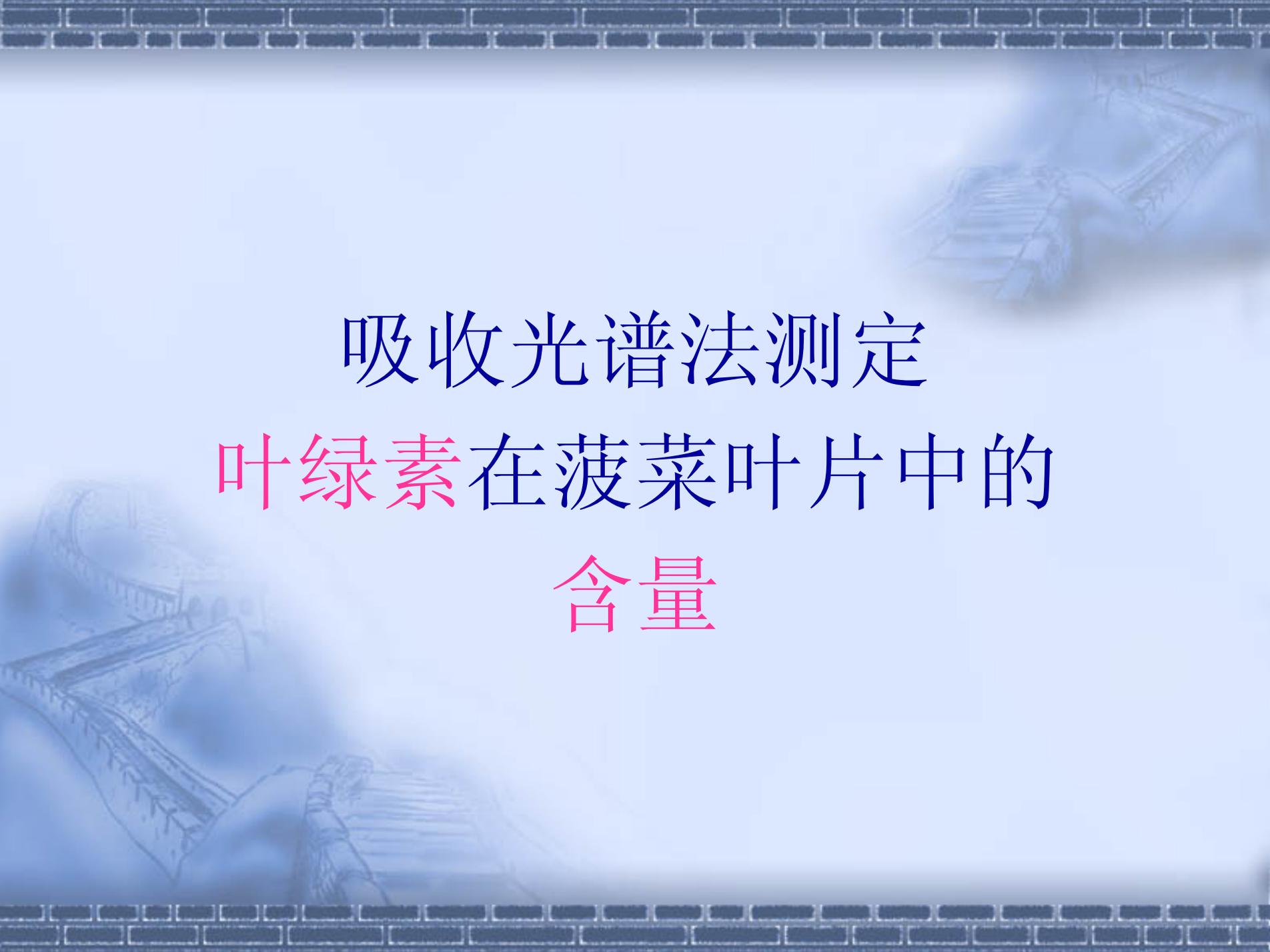


实验结论

通过以上对叶绿素a、叶绿素b和叶黄素吸收光谱的研究，我们了解到了光和色素在可见光区对复色光的吸收情况：叶绿素（叶绿素a和叶绿素b的统称）在蓝紫光和红橙光区对光有强烈的吸收，叶黄素在蓝紫光区对光有强烈的吸收。由于太阳光中蓝紫光区的能量比较强，因此叶黄素吸收部分蓝紫光，并将光能传递给叶绿素，保护叶绿素分子不被阳光破坏，这对光合作用的正常进行具有重大意义。

实验结论

注意到箭头指示的波长（大约在650~700nm之间）有一个清晰的小峰。经过查阅资料，发现叶黄素在红橙光区是没有吸收峰的。因此，我们推断这是由于叶黄素不纯净，里面依旧含有叶绿素的原因所致。



吸收光谱法测定 叶绿素在菠菜叶片中的 含量

实验过程

根据吸光度的加和原理： $A_{\text{总}} = \sum A_i$

实验中 $A = k_a c_a l + k_b c_b l$ $l^i = 1\text{cm}$

查出吸收光谱两峰处的叶绿素a、b的比吸收系数 k_{a1} 、 k_{a2} 、 k_{b1} 、 k_{b2} ，列出方程：

$$\begin{cases} A_1 = k_{a1} c_a + k_{b1} c_b \\ A_2 = k_{a2} c_a + k_{b2} c_b \end{cases}$$

其中 c_a 、 c_b 为叶绿素a、b 的浓度，解方程得之。

实验结论

最后我们得到菠菜中叶绿素的质量分数：

叶绿素a的质量分数= $C_a V/M=0.369\text{mg/g}$

叶绿素b的质量分数= $C_b V/M=0.236\text{mg/g}$

叶绿素的质量分数= $(0.369+ 0.236)\text{mg/g}$
 $=0.605\text{mg/g}$

误差分析

由 *Lambert – Beer* 定律:

$$A = kcL = -\lg T$$

可知

$$c = -\frac{1}{kL} \lg T$$

所以 $|\Delta c| \approx |dc| = \left| \frac{1}{kL} \frac{1}{T \ln 10} dT \right| \approx \frac{1}{kL} \frac{1}{T \ln 10} |\Delta T|$

误差分析

计算出的浓度的相对误差为

$$\frac{|\Delta c|}{c} \approx -\frac{|\Delta T|}{T \lg T \ln 10}$$

由于实验中仪器的 $|\Delta T| \approx 0.001$ ，叶绿素的丙酮溶液在波长 $\lambda = 650nm$ 左右的透光率 $T \approx 0.955$

所以相对误差为： $\frac{|\Delta c|}{c} \approx -\frac{|\Delta T|}{T \lg T \ln 10} \times 100\% = 2.3\%$

氧化铁纳米颗粒的研究

$\alpha-Fe_2O_3$ 纳米颗粒
的晶胞结构

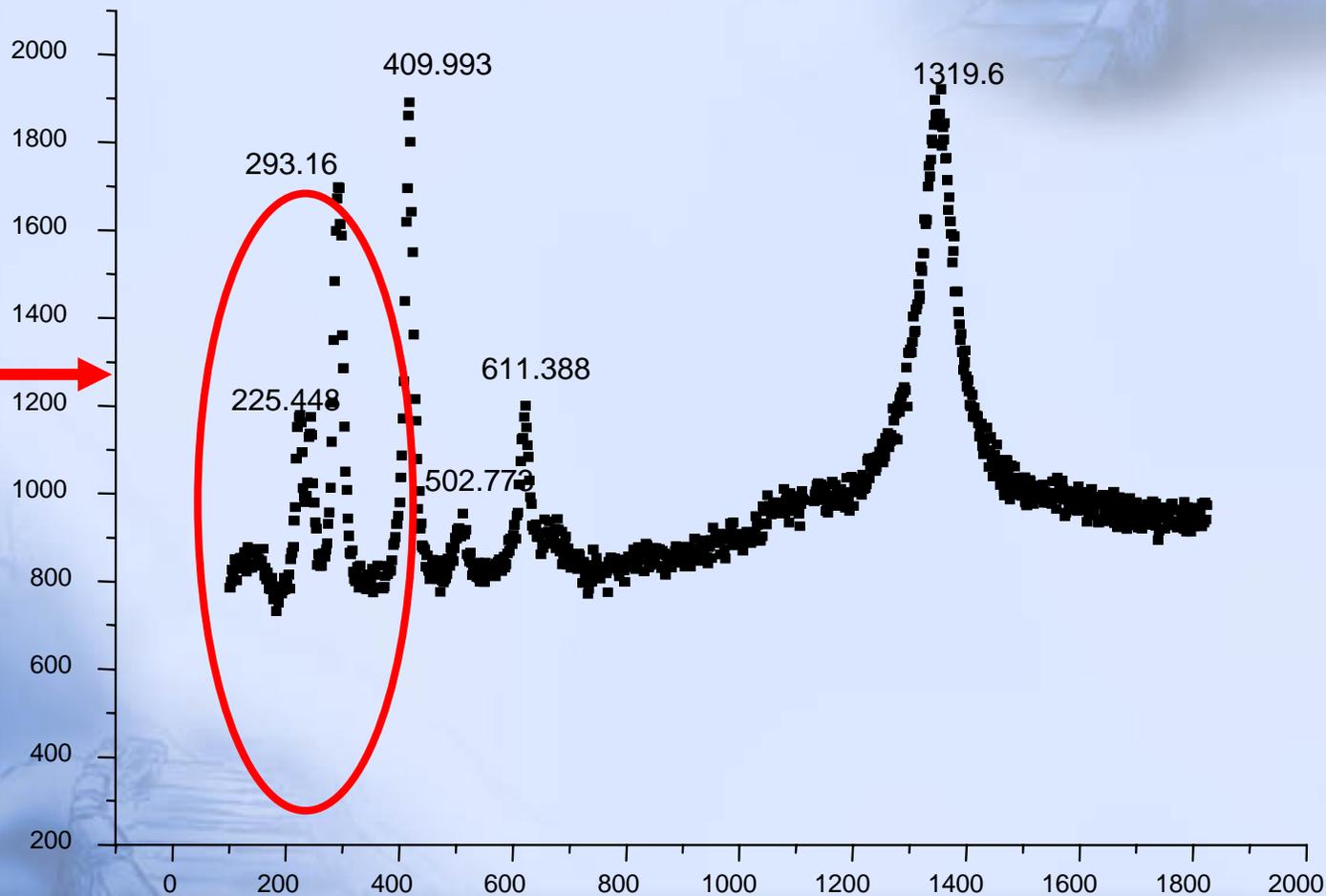


实验过程

实验中，我们直接将氧化铁粉末放在样品台上，测出其Raman光谱如下所示：

实验过程

氧化铁的拉曼光谱



实验过程

对于常规 Fe_2O_3 晶体，其峰位为

226 m (中强)

246 w (弱)

293 s (强)

410 m (中强)

500 w (弱)

610 m (中强)

实验结果

- 从数据可以看出，纳米氧化铁拉曼峰的峰位较之于常规晶体有偏移，峰的强度也发生了变化。例如其中最强峰由 293 cm^{-1} 变为 409.99 cm^{-1} 。
- 峰位也发生了移动。比如 500 cm^{-1} 变为 502.77 cm^{-1} 。
- 这是由于纳米材料的尺寸效应造成的。通过与标准谱的对照可以得到样品是六方晶系。



X光衍射

——XRD

XRD简介

X射线衍射，是以晶体为光栅，因大量原子产生的相干散射发生的干涉作用，造成散射的X射线的强度增强或减弱的现象。满足衍射条件，可应用布拉格公式：应用已知波长的X射线来测量 θ 角，从而计算出晶面间距 d ，这是用于X射线结构分析；另一个是应用已知 d 的晶体来测量 θ 角，从而计算出特征X射线的波长，进而可在已有资料查出试样中所含的元素。



利用XRD计算氧化铁晶粒大小及 晶格常数

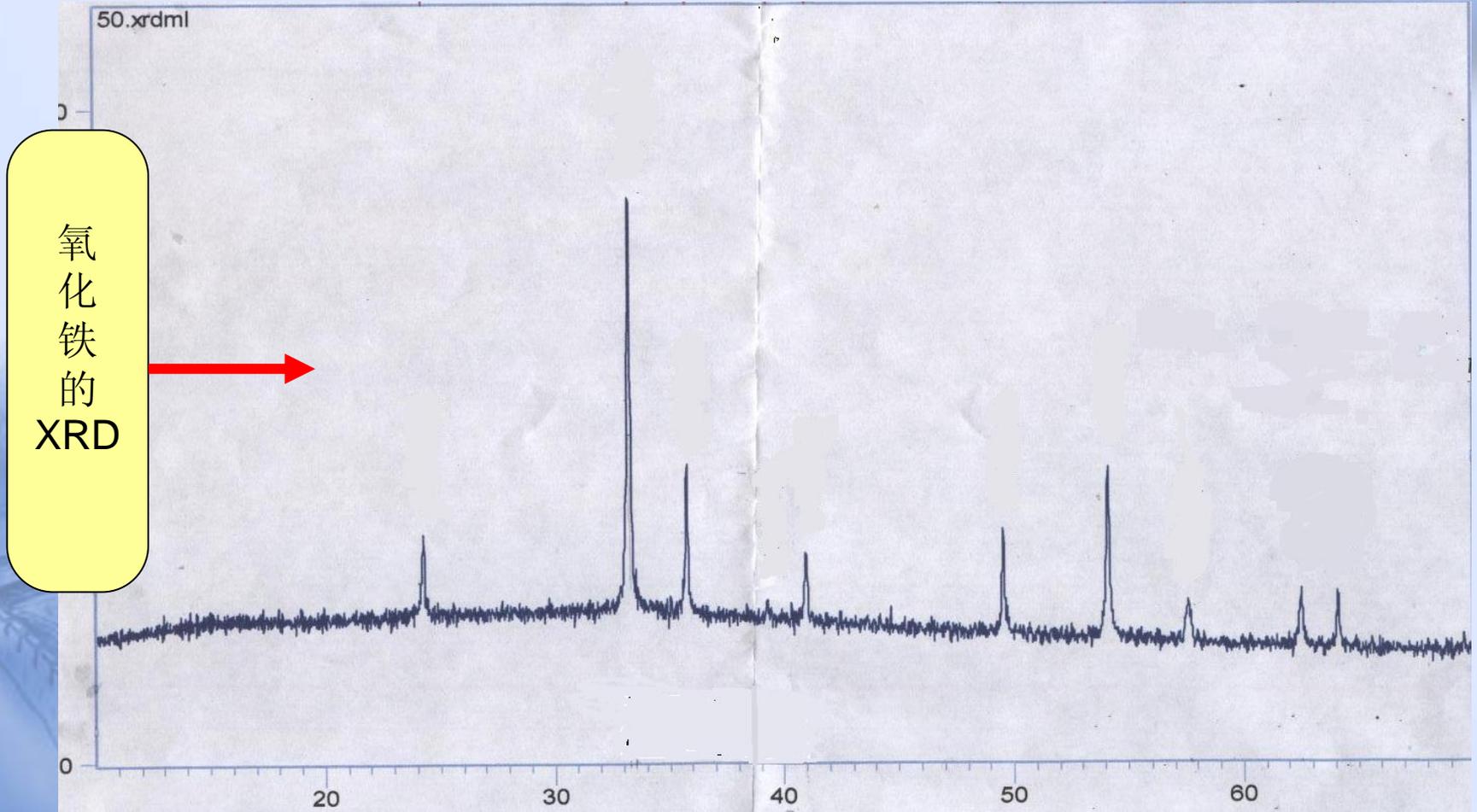
实验过程

当颗粒为单晶时，X射线衍射线线宽法测定的是颗粒度。颗粒为多晶时，X射线衍射线线宽法测得的是组成单个颗粒的单个晶粒的平均晶粒度。

$$d=0.89 \lambda / (B * \cos \theta)$$

式中**B**表示单纯晶粒细化引起的宽化度，单位为弧度。 $\lambda =1.54056\text{nm}$

实验过程



实验结果

由图可以得出几个主要的峰位(2theta)为

24.2 33.5 36.0 40.9

49.6 54.2 57.6 62.5

与标准谱相符，说明样品为 $\alpha - \text{Fe}_2\text{O}_3$ ，且不含杂质。通过峰位可以计算出晶格常数为

$$a=5.414 \text{ \AA}$$

$$c=55.17 \text{ \AA}$$

晶胞形状

实验结果

角度 /2theta	24.2	33.5	36.0	40.9	49.6	54.2	57.6	62.5
半高 宽/theta	0.17 5	0.19 6	0.12 5	0.20 3	0.16 3	0.22 5	0.3	0.25
弧度	0.00 305	0.00 342	0.00 218	0.00 354	0.00 284	0.00 393	0.00 524	0.00 436
d/nm	459. 75	418. 67	661. 31	413. 37	531. 83	391. 91	298. 59	367. 84

实验结果

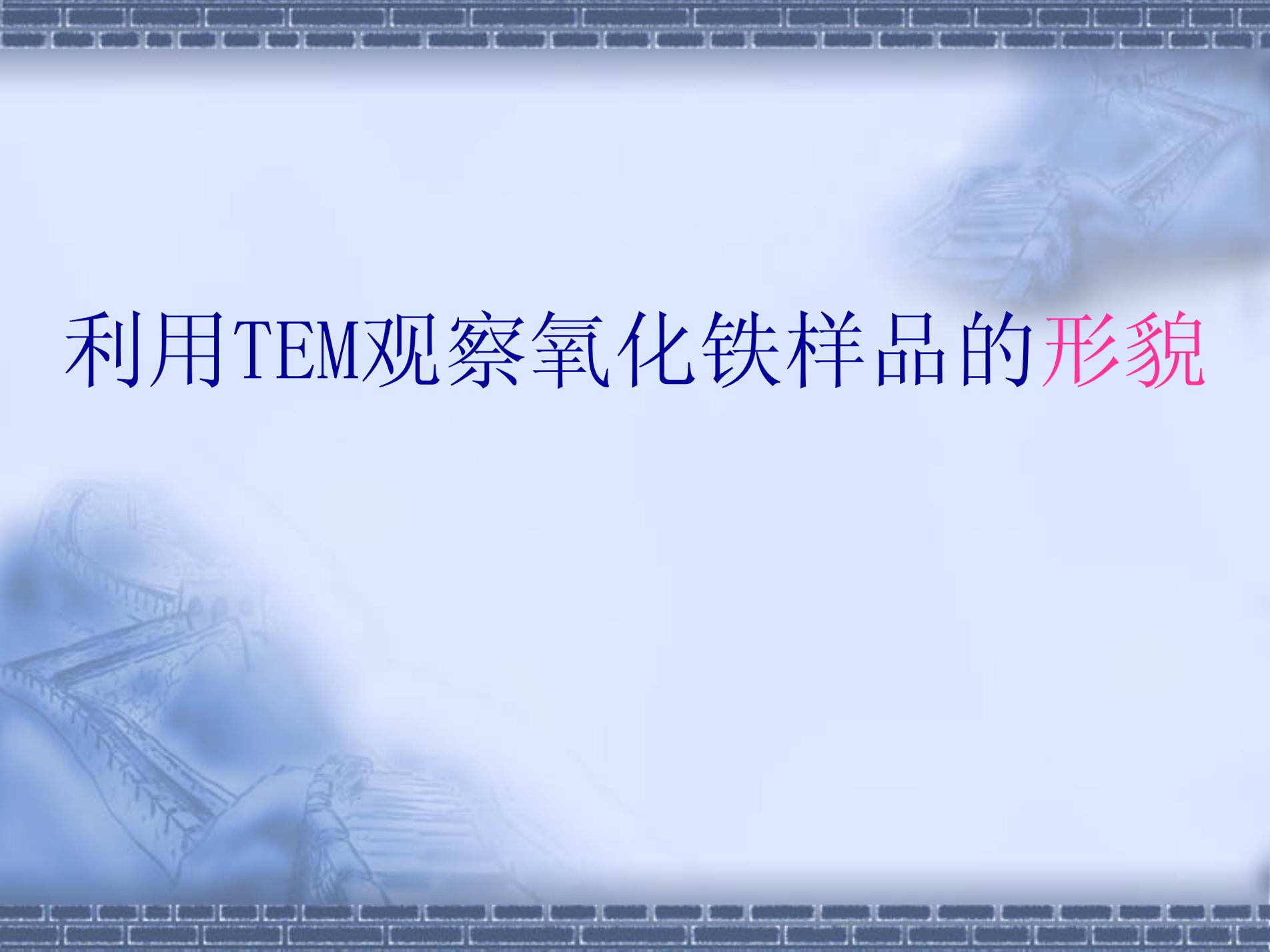
- 将上面几组数据取平均值，得到
- $d=442.91\text{nm}$
- 由于高角度衍射线的 $K\alpha$ 与 $K\alpha_2$ 双线分裂开 影响测量线的宽化，所以应选取低角度衍射线(20~50)进行计算, 所以只对前五个数据取平均，得到，
- $d=496.99\text{nm}$
- 此外由于没有考虑仪器引起的宽化，实际的数值要比上述值略大。

透射电子显微镜

——TEM

TEM简介

TEM是一种高分辨率、高放大倍数的显微镜，它是以聚焦电子束为照明源，使用对电子束透明的薄膜试样，以透射电子为成像信号。电子束经聚焦后均匀照射到试样的某一观察小区域上，入射电子与试样物质相互作用，能量足够大的穿过样品，形成透射电子，透射的电子经放大投射在观察图形的荧光屏上，显示出与观察试样区的形貌、组织、结构一一对应的图像。

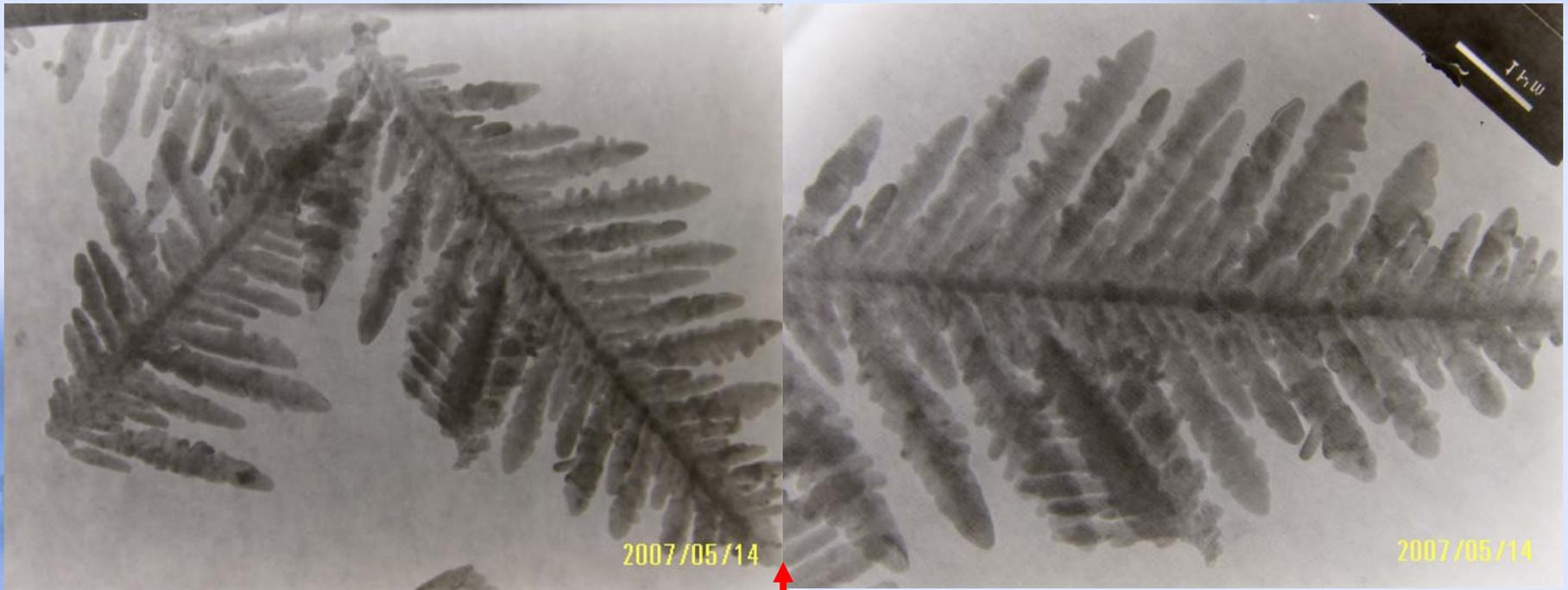


利用TEM观察氧化铁样品的形貌

实验过程

实验时，先将氧化铁样品放进无水乙醇中超声10min以上，其目的是将因矫顽力粘连在一起的团聚物打碎，以得到纳米材料的一次颗粒，即含有低气孔率的一种独立粒子。然后取少量处理过的样品滴在专用的铜网上，用透射电镜观察。

实验过程



氧化铁的TEM图像

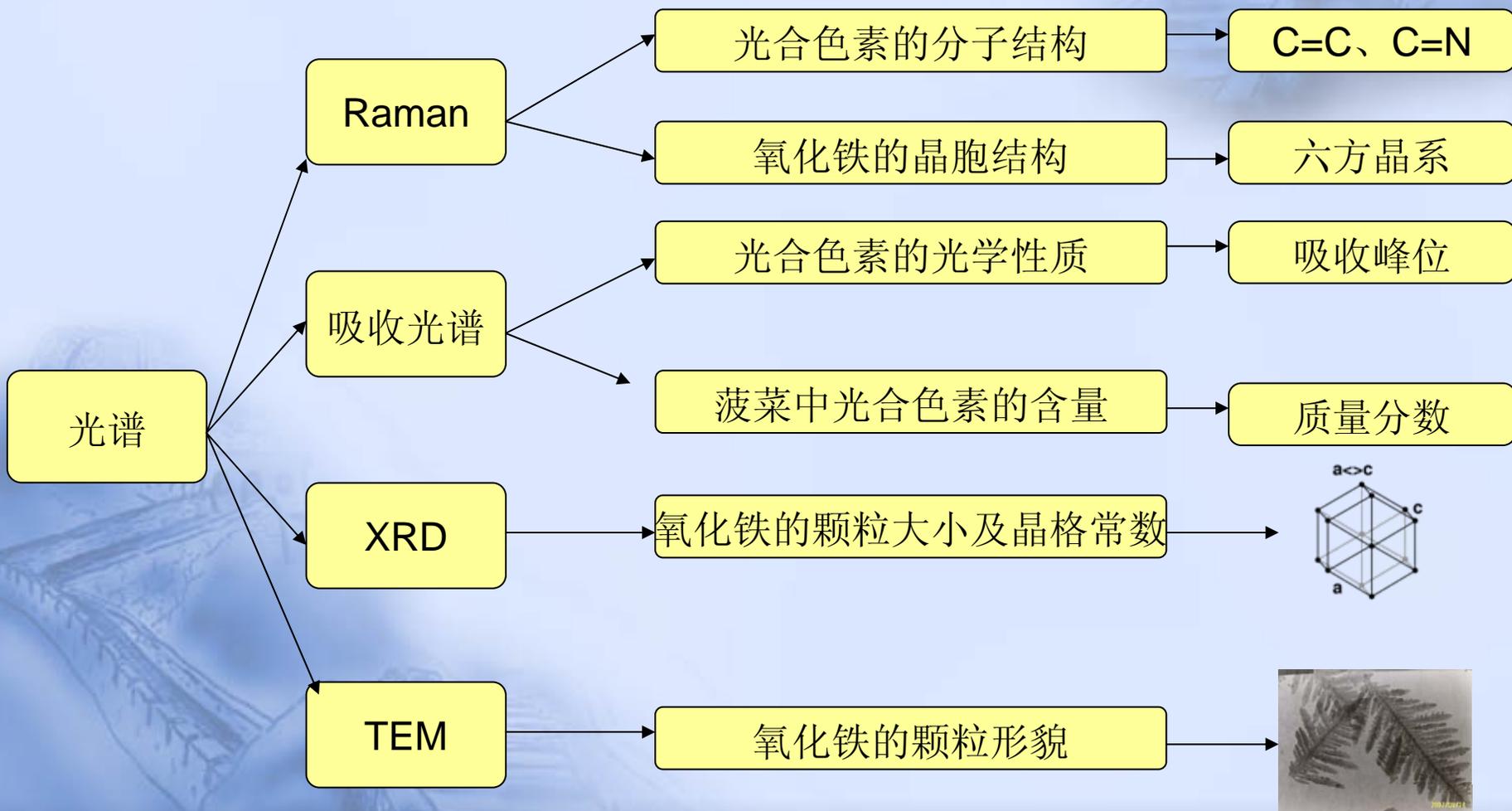
实验结果

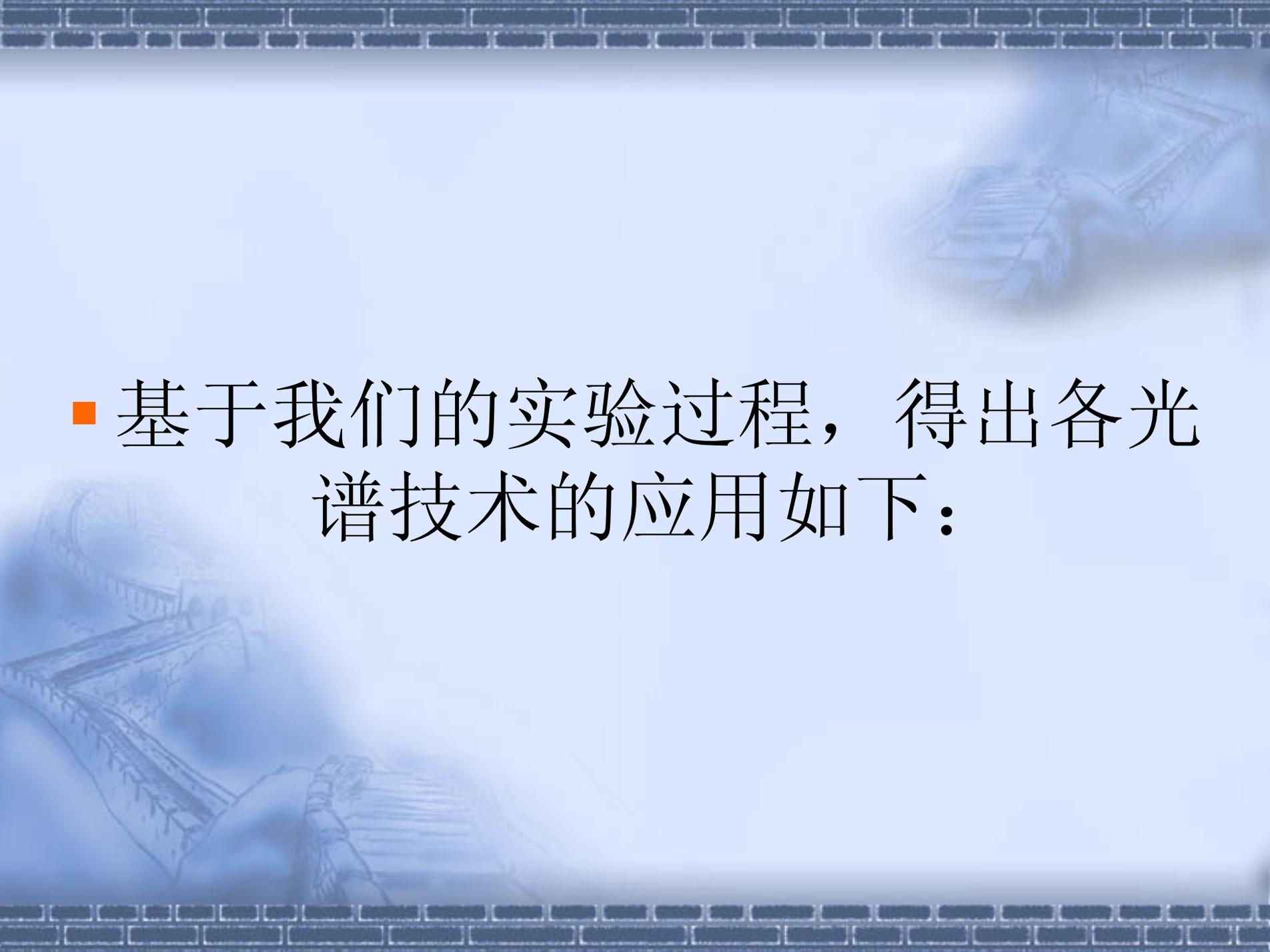
通过**TEM**，我们可以很容易地观察到样品的晶粒是枝晶状的。

第三部分

实验总结

实验总结



- 
- 基于我们的实验过程，得出各光谱技术的应用如下：

拉曼光谱

分子结构、内部结构

吸收光谱

溶液中物质含量、光学性质

XRD

颗粒大小、晶格常数

TEM

颗粒形貌

后续

我们以上的实验仅仅是光谱技术应用的一瞥，光谱技术的其他应用还有很多。可以说，在分子和原子层次上对物质作分析，比如**DNA**、蛋白质以及细胞的超精细结构的研究，主要使用的都是光谱方法。

Raman光谱的应用

Raman散射方法在分子结构研究上是十分重要的。与红外光谱相比，Raman光谱对有机物的鉴定有特殊的优点。红外和Raman光谱的选择定则是不同的，对红外吸收很弱的 $C\equiv C$ 、 $C=C$ 等键都有很强的Raman散射强度。Raman光谱制样简单，很多情况下样品不需要处理，粉、薄膜状的固体、液体都可以直接用激光照射得到Raman散射光谱。特别重要的是可以用水作溶剂，给生物分子、水污染等问题的研究带来了极大的方便。

吸收光谱的应用

由于物质中不同的结构对光的吸收具有选择性，因此吸收光谱谱图中的特征峰可以指出物质中典型结构的存在。特别是红外光谱（IR），它的波数集中在 $(4000\sim 625)cm^{-1}$ ，正是一般有机物的基频振动频率范围，全部光谱图则反映了整个分子的结构信息。所以，吸收光谱广泛应用于原子物理、分子物理、生物化学、天体物理等领域内。

XRD的应用

- XRD的应用范围非常广泛，它可用来鉴定物质、测定物相、测定晶格常数、晶粒大小、及晶体的残余应力，研究材料的物相组成、相变过程、非晶的晶化过程等。
- 历史上DNA的双螺旋结构的发现，XRD起到了功不可没的作用。

TEM应用

透射电子显微镜(TEM)是观察微观世界的最重要的设备。它是利用电子束与样品的相互作用进行成象，是从纳米尺度评价物质结构的最有力的仪器之一。比起光学显微镜，它有效克服了衍射对分辨率的影响，大大提高了人们对微观世界的认识能力，被广泛应用于冶金、资源、化工、生物等领域。

后续

20世纪70年代末，由于物理学、数学、化学等新方法的渗透，不仅使光谱仪器的性能有了很大的提高，而且涌现出了许多新的分析技术和方法。例如红外光谱通常使用FT-IR，提高了灵敏度和分辨率；核磁共振使用脉冲Fourier变换技术，简化了复杂分子结构的谱图解析，特别便于对生物大分子的结构鉴定；有机质谱发展了新的软电离技术，用于蛋白质、核酸、多糖等生物分子的鉴定，发展为生物质谱。

相信在21世纪，随着物理学、电子技术、激光、计算机技术的迅猛发展，光谱技术一定会有更大的进步，在各个学科领域发挥出其应有的作用！

谢谢大家！

相关概念

1、透光率T

当一束单色光照射到溶液表面时，设入射光的强度为 I_0 ，出射光强度为 I_t ，定义透光率T为

$$T = \frac{I_t}{I_0}$$

相关概念

2、吸光度A (Absorbency)

亦称为光密度 (Optic density, 简称OD)

定义为透光率的负对数。

$$A = OD = -\lg T = \lg \frac{I_0}{I_t}$$

- A越大，物质吸收光越强烈。

相关概念

3、lambert-beer定律

某种有色溶液的光密度与其中溶质浓度和液层厚度成正比，即

$$A = kcL$$

式中k为比例常数。当液层厚度为1 *cm*，溶液浓度以百分浓度为单位时，k即为此种物质的比吸收系数。

附：相关概念

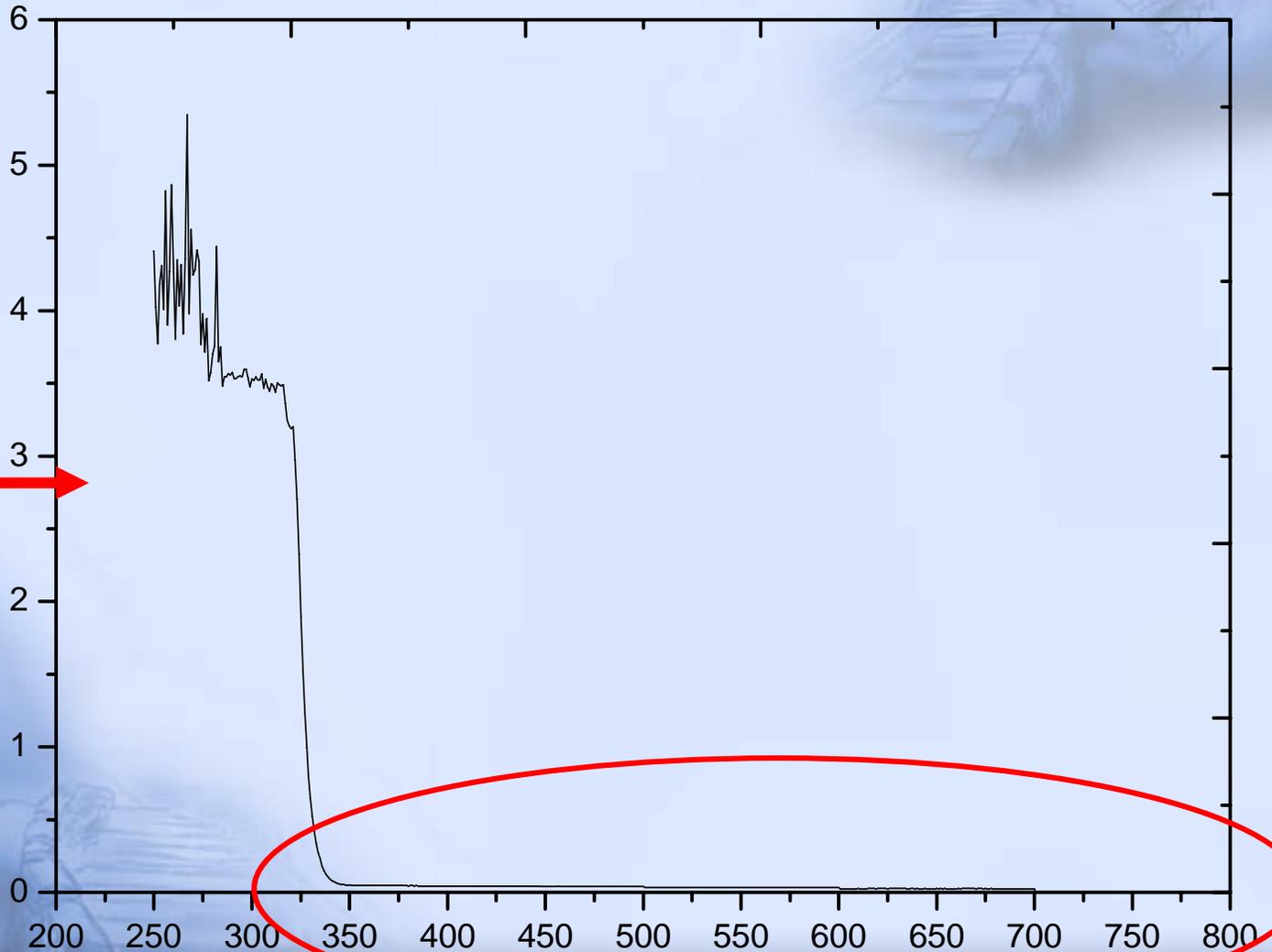
吸光度的加和原理

如果溶液中有数种吸光物质，则此混合溶液在某一波长下的总吸光度等于各组分在同一波长下吸光度的线性叠加，即

$$A_{\text{总}} = \sum_i A_i$$

丙酮的吸收光谱

丙酮的吸收光谱



实验过程

由上图可以看出，丙酮仅在近紫外光区有强烈的吸收峰，在可见光区对光基本上没有吸收现象，故采取丙酮作为光合色素的溶剂是可行的。