

胆酸和脱氧胆酸分子的远红外与 THz 吸收光谱研究

杨丽敏¹, 赵国忠², 赵夔¹, 石小溪², 贾新锋², 翁诗甫³,
徐怡庄³, 鲁向阳¹, 谢大骏¹, 吴瑾光³, 陈佳洱¹

(1. 北京大学物理学院重离子物理研究所, 重离子物理教育部重点实验室, 北京 100871;

2. 首都师范大学物理系, 北京 100037;

3. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871)

摘要 胆酸和脱氧胆酸是胆汁酸中的主要成分, 是人体中重要的生物表面活性剂. 两种分子只相差一个羟基, 在远红外和太赫兹波段有不同的吸收光谱. 胆酸分子的太赫兹 (THz) 吸收光谱有 1.26 THz (42 cm⁻¹) 和 2.02 THz (67 cm⁻¹) 两个吸收峰, 脱氧胆酸分子的 THz 吸收光谱有 1.13, 1.26, 1.69 和 2.17 THz (即 38, 42, 56, 72 cm⁻¹) 等几个吸收峰. 两个分子的 THz 吸收光谱都包含有 1.26 THz (42 cm⁻¹) 峰, 反映出二者结构的相似性. 它们的远红外光谱都有部分频率相近的谱带, 但对比之下可以观察到峰位位移和相对峰强的改变. 指认了两种物质的某些可能与羧基振动有关的特征吸收峰. 为找出 THz 光谱隐含的信息, 利用 Omnic 程序采用二阶导数方法来处理 THz 光谱数据, 观察到多个子峰, 说明分子结构中可能存在更复杂的氢键状态. 实验结果表明, 远红外和 THz 吸收光谱是研究生物分子及鉴别生物分子结构的很好方法.

关键词 胆酸; 脱氧胆酸; 远红外吸收光谱; 太赫兹吸收光谱; 氢键

中图分类号 O629.22

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)06-1116-06

胆汁酸是一类甾环化合物, 分子中具有羟基和羧基等基团, 是重要的生物配体. 胆酸 (Cholic acid, 3 α , 7 α , 12 α -三羟基-5 β -胆烷酸, HC) 为人体中存在的一级胆汁酸, 脱氧胆酸 (Deoxycholic acid, 3 α , 12 α -二羟基-5 β -胆烷酸, HDC) 为二级胆汁酸. 图 1 为胆酸与脱氧胆酸的分子结构图. 从胆汁酸分子的刚性立体结构可见, 其中 4 个脂肪环几乎处于同一平面, 平面的一侧为甲基和烷基等疏水基团, 另一侧为羟基和羧基等亲水基团. 这种特殊的结构性质使胆汁酸表现出很强的界面活性, 决定了胆汁酸具有独特的化学性质和生理功能, 可在胆汁中形成胶团, 增溶胆固醇^[1]. 同时由于这种特殊的结构, 它们也常被作为氢键体系的典型模型之一, 例如以胆酸和脱氧胆酸为模型来研究不同制样方法对氢键体系的低温光谱的影响^[2], 二维红外光谱方法研究氢键体系^[3]以及自由电子激光引起的分子结构的变化等^[4].



Fig. 1 Molecular structures of deoxycholic acid (A) and cholic acid (B)

氢键普遍存在于各种生物分子中, 并在调控各种生物分子的构象、分子堆砌以及生物功能中起到十分重要的作用. 几十年来, 人们采用各种方法对氢键进行了广泛和系统的研究, 其中核磁共振方法以及红外光谱法是研究氢键的两种重要手段^[5-8].

收稿日期: 2008-01-21.

基金项目: 国家“九七三”计划(批准号: 2002CB713600)资助.

联系人简介: 杨丽敏, 女, 博士, 副教授, 主要从事 THz 及自由电子激光的应用研究. E-mail: yanglm@pku.edu.cn

远红外区主要包括晶格振动、面外、环变形振动以及重原子的有关振动等^[6,7]. 太赫兹(Terahertz, THz)电磁波是指频率从 100 GHz 到 10 THz 之间(波长为 3000 ~ 30 μm , 相当于 3.3 ~ 333 cm^{-1})的电磁辐射, 位于微波和红外区之间(THz gap). THz 有很多优越的特性, 目前, 国际科技界公认 THz 科学技术是一个非常重要的前沿交叉领域. 许多生物大分子的低频振动和转动频率都在 THz 波段表现出很强的吸收和谐振^[9~11]. 目前, 越来越多的物质的 THz 吸收光谱已见报道, 诸如蛋白质、糖类、氨基酸、植物油和脂肪、苯甲酸类分子、固态多环芳烃化合物、爆炸性物质、药物分子、气体分子(CO 等)、高分子、半导体超晶格、量子点、纳米材料、金属线、碳家族及铁电材料(BaSrTiO_3)等, 两种分子间的相互作用也可利用 THz 吸收光谱进行研究. 氢键是 THz 波段涉及的模式之一, 如水、甲醇体系的低频峰起源于甲醇氢键链的波动和扭转的模式^[12]; 在酪氨酸的太赫兹光谱中, 0.23 THz 的吸收峰初步标定为氢键连接的 2 个酪氨酸分子的面外摇摆振动^[13]; α -萘酚、 β -萘酚、苯甲酸和它的衍生物、葡萄糖和尿酸、DNA 和牛血清蛋白以及视黄醛异构体和 DNA 碱基的光谱特征均归于氢键引起的集体振动模式^[14]. 本文选择胆酸和脱氧胆酸分子来探讨羧基形成的氢键体系在远红外和 THz 波段的光谱特征.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

THz 吸收光谱实验在首都师范大学物理系的 THz 时域谱装置上进行, 实验装置、原理以及激光等仪器参数参见文献[10].

胆酸和脱氧胆酸为德国 Fluka 试剂.

1.2 实验过程

THz 时域谱的测量采用聚乙烯压片法制样, 样品的直径为 13 mm, 厚度约为 0.8 mm. 光谱在氮气气氛中测定, 以尽可能消除水汽的影响. 穿过自由空间(参考)和穿过样品的 THz 时域谱(样品)时间波形进行快速傅里叶变换后, 对比得到样品的 THz 吸收光谱, 有效光谱波段范围 0.1 ~ 2.7 THz.

样品的远红外光谱在 Nicolet Magna-IR 750 II 仪器上采用石蜡油研磨方法测定(基于石蜡油研磨的方法能够保护固体样品防湿, 避免峰的变形和发生离子交换). 实验中采用 IR 光源, 固体分束器, DTGS 聚乙烯检测器, 8 cm^{-1} 分辨率, 100 次扫描, 用干燥空气吹扫光学台以消除水汽对光谱的影响.

2 结果与讨论

2.1 胆酸和脱氧胆酸分子的 THz 吸收光谱

胆酸和脱氧胆酸分子的结构有相似之处, 都具有环戊烷多氢菲骨架. 从图 1 可以看出, 二者只相差一个 7-位羟基. 它们的 THz 吸收光谱(波段 90 ~ 10 cm^{-1} , 波段 2.7 ~ 0.3 THz)见图 2, 远红外光谱(650 ~ 50 cm^{-1})见图 3. 表 1 及表 2 列出了两种物质的 THz 吸收光谱及远红外光谱中的有关峰位以及初步指认.

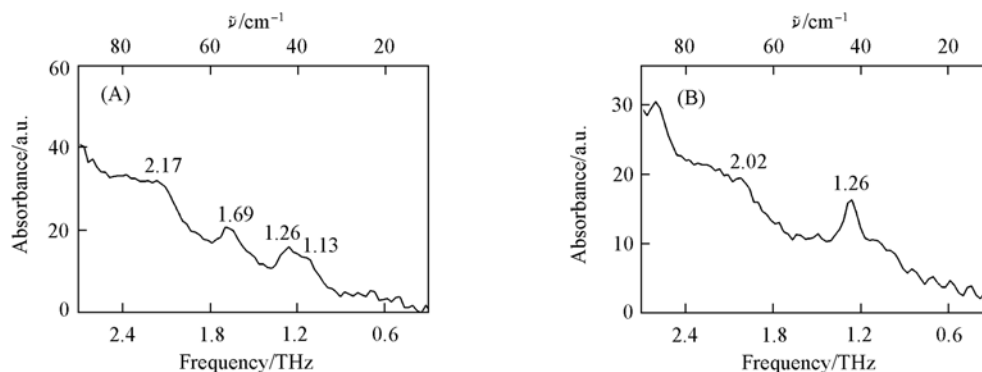


Fig. 2 THz absorption spectra of deoxycholic acid (A) and cholic acid (B)

胆酸分子的 THz 吸收光谱有 1.26 和 2.02 THz(42, 67 cm^{-1})两个吸收峰, 脱氧胆酸分子的 THz 吸收光谱有 1.13, 1.26, 1.69 及 2.17 THz(即 38, 42, 56, 72 cm^{-1})等几个吸收峰. 两个分子的 THz 吸收

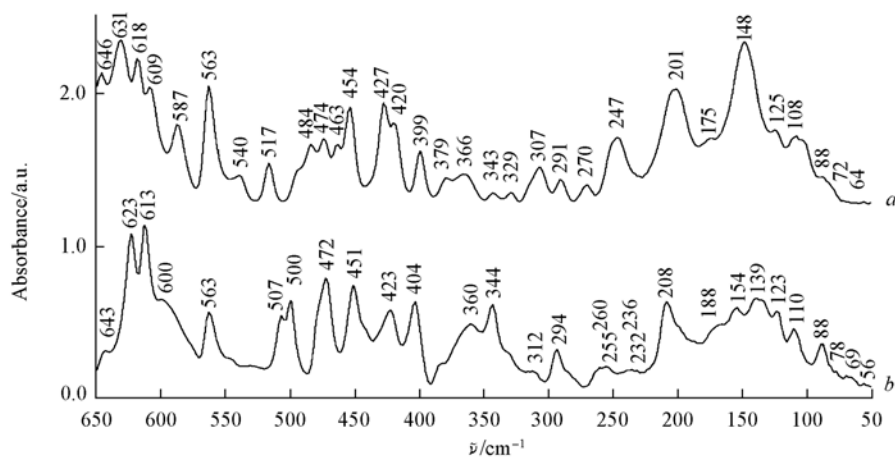


Fig. 3 Far-IR absorption spectra of HDC(a) and HC(b)

Table 1 THz absorption bands and sub bands via secondary derivative of cholic acid and deoxycholic acid

f/THz	HDC		HC		Preliminary assignments ^[15-18]
	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	$\tilde{\nu}(\text{Sub bands})/\text{cm}^{-1}$	f/THz	$\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$	
		9			10
		11			13
		17			15
		24			20
		28			26
1.13	38	37			34
1.26	42	42	1.26	42	42
		50			51
1.69	56	55			60
		63	2.02	67	67
2.17	72	71			75
		79			77
		84			83
		86			
		88			

* τ : Torsion; t : twisting.

Table 2 Peak positions in the far-IR spectra of cholic acid and deoxycholic acid*

$\tilde{\nu}(\text{HDC})/\text{cm}^{-1}$	$\tilde{\nu}(\text{HC})/\text{cm}^{-1}$	Preliminary assignments ^[6,7,16-20]	$\tilde{\nu}(\text{HDC})/\text{cm}^{-1}$	$\tilde{\nu}(\text{HC})/\text{cm}^{-1}$	Preliminary assignments ^[6,7,16-20]
399	404		201	208	$\delta(\text{C}-\text{COOH})$, $\gamma(\text{C}-\text{COOH})$
379			175	188	
366	360	(C=O) _{ring}		154	
343	344		148	139	
329		$\gamma(\text{C}-\text{COOH})$, $r(\text{CO}_2)$	125	123	
307	312		108	110	$\tau(\text{COOH})$, $\gamma(\text{C}-\text{COOH})$, $t(\text{COOH})$
291	294		88	88	
270	260		72	78	
247	255	$\delta(\text{C}-\text{COOH})$	64	69	
	236		56	56	
	232				

* γ : out-of-plane bending; r : rocking; τ : torsion; δ : in-plane bending; t : twisting.

光谱都包含 1.26 THz (42 cm^{-1}) 峰, 反映出二者结构的相似性. 脱氧胆酸分子少了一个羟基, 但它的 THz 吸收峰的数目反而比胆酸分子多, 这与胆酸和脱氧胆酸两个分子所形成的氢键的情况是一致的. 在胆酸的晶体中, 分子间以羟基和羧基形成三维氢键结构. 胆酸晶体属于正交晶系, $P2_12_12_1$ 空间群. 每个分子中的 3 个 OH 和 1 个 COOH 基团形成氢键, 通过氢键网络堆积成折叠双层结构, 形成疏水面和亲水面^[21]. 脱氧胆酸晶体也是 $P2_12_12_1$ 空间群, 所有的氧原子也都参与了形成氢键, 也形成了类似

的折叠双层结构^[22].

两个分子中的氢键数据如下:对于胆酸分子,结构中含有以下4种氢键:(1)羧基中的羟基与12 α 羟基氧形成的氢键(0.2634 nm);(2)12 α 羟基与3 α 羟基氧形成的氢键(0.2723 nm);(3)3 α 羟基与7 α 羟基氧形成的氢键(0.2774 nm);(4)7 α 羟基与羰基氧形成的氢键(0.2856 nm)^[21].对脱氧胆酸,文献[22]中认为,3 α 羟基与羰基氧(分别为0.2675和0.2691 nm),羧基中的羟基与12 α 羟基氧(分别为0.2648和0.2639 nm),12 α 羟基与3 α 羟基氧(分别为0.2613和0.2619 nm)形成6种氢键.对比两种分子的氢键结构可以看出,脱氧胆酸分子具有相对复杂的氢键结构,因而它的THz吸收光谱中表现出更多的吸收峰.两个分子均有1.26 THz峰,根据文献中的指认,这一峰位可能与COOH有关^[15].另外,~2.0 THz峰,即胆酸2.02 THz和脱氧胆酸2.17 THz两个峰也可能与 $\tau(\text{COOH})$ ^[16,17]和 $t(\text{COOH})$ (t : twisting)^[18]有关.

为了从THz的少数几个宽的吸收峰中取得更多的信息,对THz光谱数据采用Omic 5.0程序进行9点平滑后的二阶导数处理,结果如图4所示.对于胆酸分子,得到10,13,15,20,26,34,42,51,60,67,75,77及83 cm⁻¹等子峰,其中前几个峰很弱,而42和67 cm⁻¹峰是其中相对较强的子峰,这同THz光谱的结果是一致的;而对脱氧胆酸分子而言,其二阶导数结果表明,在9,11,17,24,28,37,42,50,55,63,71,79,84,86及88 cm⁻¹等处有子峰,其中17,24,37,42,55及71 cm⁻¹几个峰为明显的子峰.对比两种分子的THz吸收光谱的二阶导数数据,有一些比较相近的峰,如10,42,51及83 cm⁻¹几个子峰的峰位在两个光谱中是比较接近的.对脱氧胆酸分子在低波数处信噪比较差,而平滑处理及基线校正使18,23 cm⁻¹两峰更为明显.两种分子有着比较相似的结构,可能使得二者的THz吸收光谱中有一些比较近似的峰出现.二阶导数谱有多个子峰的结果表明,多晶分子中可能有更多的氢键状态.由于分子中的每个羟基都有一定的几率形成氢键,多晶中可能有与单晶不同的氢键状态存在,使得二阶导数谱中出现多个子峰.同时也可能受胆酸和脱氧胆酸的碳氢链排布与结构和甾环的立体结构变化的影响而不同.

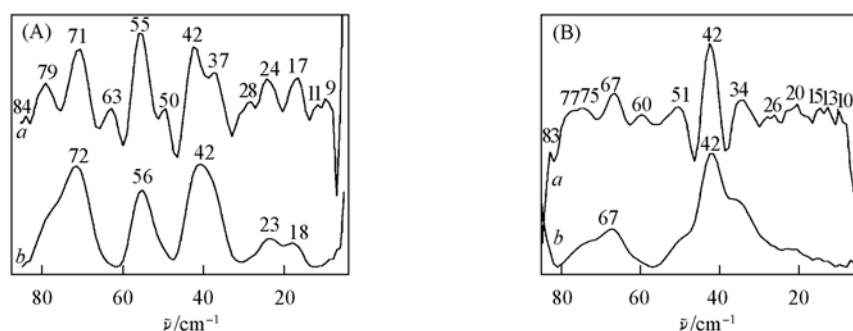


Fig. 4 THz absorption spectra after 9 point smooth and automatic baseline correction and their secondary derivative results in the 85—5 cm⁻¹ region

(A) a. Secondary derivative results of deoxycholic acid; b. spectrum of deoxycholic acid via 9 point smooth and automatic baseline correction.

(B) a. Secondary derivative results of cholic acid; b. spectrum of cholic acid via 9 point smooth and automatic baseline correction.

同胆酸和脱氧胆酸分子的中红外光谱相对比,它们的羟基伸缩振动的峰位分别位于3523,3321和3192 cm⁻¹(胆酸)及3567,3553,3329和~3191 cm⁻¹(脱氧胆酸),羟基伸缩振动有一定的差别,说明二者的氢键体系有所不同.文献[2,3]中采用低温光谱及二维红外光谱方法对羟基伸缩振动予以指认.而对 $\nu(\text{C}=\text{O})$ 振动,二者的情况也有所不同^[23],反映了两种体系中的氢键存在着不同的状态.这与远红外和THz吸收光谱的实验结果是一致的.对氢键键长与光谱峰位之间的关系,在红外光谱中,一般认为4000~3000 cm⁻¹的吸收峰的峰位与氢键的键长之间存在一定的相关性;但在THz波段,由于涉及的通常是氢键引起的集体振动模式,所以氢键键长与THz峰位之间难以像红外光谱那样直接建立联系.

2.2 胆酸和脱氧胆酸分子的远红外光谱

远红外区主要包括晶格振动、面外、环变形振动以及重原子的有关振动等^[6,7].对比胆酸和脱氧胆

酸两种分子的远红外光谱(如图3及表2),某种程度上有一定的近似性,二者有多个峰的峰位比较接近,但存在一定的差别,如609(613);563(563);474(472);454(451),427,420(423);399(404);366(360);343(344);291(294),201(208);148(139)及108(110) cm^{-1} (括号内为胆酸分子远红外光谱的峰位),峰的相对强度也有差别.

400 cm^{-1} 以下一般被认为是远红外区域.根据文献中的指认,在远红外区域内有一些峰是与羧基的振动或转动有关的^[16-20].胆酸与脱氧胆酸分子具有类似的环状结构,以及均包含羧基基团,在它们的远红外光谱中有一些相似的峰:(1) $\sim 100 \text{ cm}^{-1}$ (脱氧胆酸有108和88 cm^{-1} 峰;胆酸有110和88 cm^{-1} 两个峰),这可能与 $\tau(\text{COOH})$ ^[16,18], $\gamma(\text{C}-\text{COOH})$ ^[18]以及 $t(\text{COOH})$ ^[19]有关;(2) $\sim 200 \text{ cm}^{-1}$ (脱氧胆酸201 cm^{-1} ,胆酸208 cm^{-1}),可能与 $\delta(\text{C}-\text{COOH})$ 及 $\gamma(\text{C}-\text{COOH})$ 有关^[16,18];(3) $\sim 252 \text{ cm}^{-1}$ 峰(脱氧胆酸247 cm^{-1} ,胆酸255 cm^{-1})可能与 $\delta(\text{C}-\text{COOH})$ 有关^[16-19];(4) $\sim 326 \text{ cm}^{-1}$ (脱氧胆酸329 cm^{-1} ,胆酸在此处存在一个肩峰)可能与 $\gamma(\text{C}-\text{COOH})$ ^[16]及 $r(\text{CO}_2)$ ^[17]有关;(5) $\sim 360 \text{ cm}^{-1}$ (脱氧胆酸366 cm^{-1} ,胆酸360 cm^{-1})也可能与 COOH 有关[按照文献中对氧氟沙星的指认,与 $(\text{C}=\text{O})$ ring有关]^[20].此外,远红外区域也是对环振动很敏感的区域.另外也可能包含 CH , CH_3 等有关基团振动和转动模式^[17].

远红外和 THz 两种方法在 100 \sim 50 cm^{-1} 区域有一定重叠,从峰位上看,对胆酸和脱氧胆酸分子这两种方法的结果基本一致.如对胆酸分子,远红外光谱的结果为78,69及56 cm^{-1} ,THz吸收光谱的结果为2.02 THz(67 cm^{-1});对脱氧胆酸分子,远红外光谱的结果为72,64(56 cm^{-1}),THz吸收光谱结果为2.17和1.69 THz(72,56 cm^{-1}).相对而言,远红外和THz两种方法的结果比较一致.

THz 波段主要涉及的是集体振动模式,是对分子构型、构象十分敏感的技术.胆酸和脱氧胆酸分子具有非常相似的结构,但是它们所形成的氢键体系、构型、构象存在一定的差别,因而它们的远红外以及 THz 吸收光谱的差别还是十分明显的,这为利用光谱技术来研究胆酸和脱氧胆酸与其它分子的相互作用奠定了基础.

如果将胆酸和脱氧胆酸分子溶于不同的有机溶剂,其分子间的氢键体系将会发生变化,那么利用 THz 吸收光谱就可能了解到分子间氢键变化的信息.

参 考 文 献

- [1] SUN Ying(孙颖). Interaction Between M^{2+} and Bile Salts Micelle and Study on Noninvasive Measurement of Blood Glucose with FTIR(二价金属离子与胆盐胶团的相互作用及 FTIR 用于血糖无创检测的研究)[D], Beijing: Peking University, 2002: 3
- [2] XU Yi-Zhuang(徐怡庄), WU Jin-Guang(吴瑾光), XU Jian-Ping(徐建平), *et al.*. Spectrosc. Spect. Anal. (光谱学与光谱分析)[J], 2000, **20**(2): 170—174
- [3] Huang B. G., Xu Y. Z., Weng S. F., *et al.*. Chinese Chem. Lett. [J], 2002, **13**(5): 444—447
- [4] Yang L. M., Xu Y. Z., Su Y. L., *et al.*. Spectrochim. Acta A [J], 2005, **62**(4/5): 1209—1215
- [5] QI Jian(齐剑), GAO Xiu-Xiang(高秀香), ZHAO Mei-Xian(赵梅仙), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(5): 913—917
- [6] WU Jin-Guang(吴瑾光). Modern Fourier Transform Spectroscopic Techniques and Its Applications(近代傅里叶变换红外光谱技术及应用)[M], Beijing: Science and Technology References Press, 1994: 159
- [7] WENG Shi-Fu(翁诗甫). FTIR Spectrometer(傅里叶红外变换光谱仪)[M], Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 218
- [8] XU Yi-Zhuang(徐怡庄), ZHAO Ying(赵莹), LING Xiao-Feng(凌晓锋), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(4): 645—648
- [9] ZHAO Guo-Zhong(赵国忠). Modern Scientific Instruments(现代科学仪器)[J], 2006, (5): 36—40
- [10] WANG Xiao-Hong(王晓红), ZHANG Liang-Liang(张亮亮), HU Ying(胡颖), *et al.*. Spectrosc. Spect. Anal. (光谱学与光谱分析)[J], 2006, **26**(3): 385—391
- [11] Yang L. M., Sun H. Q., Weng S. F. *et al.*. Spectrochim. Acta A [J], 2008, **69**: 160—166
- [12] Woods K. N., Wiedemann H. J. Chem. Phys. [J], 2005, **123**: 134507-1—134507-10
- [13] MA Shi-Hua(马士华), SHI Yu-Lei(施宇蕾), YAN Wei(严伟), *et al.*. Spectrosc. Spect. Anal. (光谱学与光谱分析)[J], 2007, **27**(9): 1665—1668
- [14] XU Hui(徐慧), HAN Jia-Guang(韩家广), YU Xiao-Han(余笑寒), *et al.*. Chemistry(化学通报)[J], 2005, (3): 220—225

- [15] Navarrete J. T. L., Bencivenni L., Ramondo F., *et al.* J. Mol. Struct. (Theochem.) [J], 1995, **330**: 261—266
- [16] Varghese H. T., Panicker C. Y., Philip D., *et al.* J. Raman Spectrosc. [J], 2007, **38**(3): 309—315
- [17] Pawlukoje A., Leciejewicz J. Chem. Phys. [J], 2004, **299**(1): 39—45
- [18] Sundaraganesan N., Anand B., Meganathan C., *et al.* Spectrochim. Acta A [J], 2007, **68**(3): 561—566
- [19] Sobolewski A. L., Domcke W. J. Phys. Chem. A [J], 2004, **108**(49): 10917—10922
- [20] Sagdine S., Bayari S. J. Mol. Struct. (Theochem.) [J], 2004, **668**(2/3): 93—99
- [21] Miki K., Kasai N., Shibakami M., *et al.* Acta Cryst. [J] 1990, **C46**: 2442—2445
- [22] Jover A., Meijide F., Soto V. H., *et al.* Steroids [J], 2004, **69**(6): 379—388
- [23] Lamcharfi E., Cohen-Solal C., Parquet M., *et al.* Eur. Biophys. J. Biophys. [J], 1997, **25**(4): 285—291

Far-IR and THz Absorption Spectra Studies of Cholic Acid and Deoxycholic Acid

YANG Li-Min^{1*}, ZHAO Guo-Zhong², ZHAO Kui¹, SHI Xiao-Xi², JIA Xin-Feng², WENG Shi-Fu³,

XU Yi-Zhuang³, LU Xiang-Yang¹, XIE Da-Tao¹, WU Jin-Guang³, CHEN Jia-Er¹

(1. Institute of Heavy Ion Physics, Key Laboratory of Heavy Ion Physics of Ministry of Education,

School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China;

2. Department of Physics, Capital Normal University, Beijing 100037, China;

3. College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Cholic acid (HC) and deoxycholic acid (HDC) are main components of bile and have an important biological function in human body. In this paper the two polycrystalline molecules were studied *via* far-IR and THz absorption spectroscopy. Their characteristic bands in far-IR and THz region were observed. Some similar bands appear in the far-IR region for the two molecules because they have similar structures. There are two bands at 1.26 and 2.02 (*e. g.* 42 and 67 cm^{-1}) in the THz spectrum of cholic acid molecule, and 1.13, 1.26, 1.69 and 2.17 THz (*e. g.* 38, 42, 56, 72 cm^{-1}) in the THz spectrum of deoxycholic acid. The results indicate that far-IR and THz results are consistent in some extent. The bands related to COOH were considered in the far-IR and THz region. Omnic 5.0 program was adopted to treat the data and the bands with a low signal-noise ratio were emphasized *via* this method. And many sub bands were observed, which indicate that complicated hydrogen bond networks exist. The difference in the structures of the two molecules is only one hydroxyl group, but their far-IR and THz absorption spectra have many differences, which may be caused by the differences of their molecule structures, for example, different hydrogen bonding networks and the various packing of CH chain, *etc.* The results indicate that far-IR and THz absorption spectra are effective methods for investigating biomolecules and distinguishing their structures.

Keywords Cholic acid; Deoxycholic acid; Far-IR absorption spectrum; THz absorption spectrum; Hydrogen bonding

(Ed. : A, G)