

文章编号: 0258-7025(2006)06-0819-04

# 基于激光干涉的瞬态微热量测量方法

蔡喜平

(黑龙江大学物理科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘要** 研究了一种基于激光干涉技术的瞬态热力学量测量方法,可用于测量由于光激发产生的瞬时反应热及反应体积。介绍了利用干涉技术测量化学反应热量及反应体积的基本原理。实验中以肌红蛋白(Mb)为研究对象,由于肌红蛋白受光激发后,会与CO发生化学反应,导致系统的热力学量发生变化,从而引起系统折射率的变化。折射率变化会引起干涉相位变化。通过测量相位变化,可以获得肌红蛋白受光激发后热力学量的变化信息。在273~301 K温度范围内进行了肌红蛋白与CO的反应实验,测量了肌红蛋白与CO在 $10^{-6}$ ~ $10^{-1}$  s窗口的化学反应。测得的反应热量与体积分别为80 kJ/mol和10 mL/mol。

**关键词** 测量;光热效应;热量仪;干涉仪;肌红蛋白

**中图分类号** TN 247 **文献标识码** A

## Micro-Calorimetry Based on Time-Resolved Interferometer

CAI Xi-ping

(School of Physical Science and Technology, Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080, China)

**Abstract** A micro calorimetry based on interferometer to measure the light-induced reaction volume and quantity of heat is studied. The principle to get the reaction volume and quantity of heat is introduced. The method is used to investigate the reaction of myoglobin (Mb) with CO after light excitation. Accompanying the reaction of Mb with CO, the quantity of heat and reaction volume are changed which could lead to the variation of the index of refraction of Mb. The thermodynamic information could be obtained through measuring the phase variation. The experiment to get the reaction volume and quantity of heat for the reaction of Mb with CO is done at 273 K to 301 K with a time window of  $10^{-6}$  s to  $10^{-1}$  s. The measured reaction enthalpy is 80 kJ/mol, the reaction volume is 10 mL/mol.

**Key words** measurement; photo-thermal effect; calorimetry; interferometry; myoglobin

## 1 引言

介质吸收强激光脉冲能量后,会产生电致伸缩、布里渊散射及热弹性膨胀等效应<sup>[1]</sup>。物质分子被激发后,由于热膨胀效应而会导致热波的产生。通过测量热量可以获得激发态或亚稳态的热力学信息,加深对光与物质相互作用、生物化学反应、生物分子内部结构变化等过程的理解。

为了测量光激发产生的瞬时反应热,人们研究了不同的测量技术,如瞬态光热量仪<sup>[2,3]</sup>、瞬态光声热量仪<sup>[4,5]</sup>和瞬态光栅法(Transient grating, TG)<sup>[6]</sup>等。但是这些方法都存在不足,如瞬态光热量仪要

求激发光脉冲的强度及分布严格相同,光路调整要求非常精密,实现起来难度很大;光声热量仪与瞬态光栅法测量时间窗口非常小。

本文提出了一种基于激光干涉技术的微热量仪,其基本原理是温度变化引起介质体积的变化,从而造成介质折射率变化,折射率变化可通过测量干涉仪的相位移动获得。通过折射率的变化可以计算出由于化学反应引起的介质热量与体积的变化量。这种方法原理简单,实现起来容易,而且没有时间窗口的限制。

本文利用肌红蛋白(Mb)作为研究介质。肌红蛋白被称为生物学中的“氢原子”<sup>[7]</sup>,主要负责体内

收稿日期:2005-10-27;收到修改稿日期:2006-01-23

基金项目:黑龙江大学博士启动基金(DS200508)资助项目。

作者简介:蔡喜平(1967—),男,陕西眉县人,黑龙江大学物理科学与技术学院教授,博士,主要从事光学测量技术方面的研究。E-mail: xpcai@hit.edu.cn

氧气的储存与输运。它除了能够与  $O_2$  结合外,还能够与  $CO$ ,  $NO$  结合,造成  $CO$  中毒和高血压等症状。通过研究肌红蛋白与  $O_2$ ,  $CO$  及  $NO$  的化学反应过程,对了解蛋白质的结构与功能的变化关系及生命活动过程非常有益。Mb 与  $CO$  的反应产物为 MbCO, MbCO 在光脉冲的作用下,会分解为 Mb 和  $CO$ ,伴随着 Mb 的运动(起伏和弛豫), $CO$  在 Mb 中运动,最后会逸出 Mb 进入溶液,同时溶液中的  $CO$  也会进入 Mb,运动至 Mb 中的卟啉与  $Fe^{2+}$  原子结合,每一个运动过程都会造成 Mb 系统的体积和能量发生变化,通过测量系统的热力学量的变化,就可了解蛋白质的结构与功能的基本关系。

## 2 基本原理

基于激光干涉方法的瞬态微热量测量实验原理如图 1 所示,倍频 Nd:YAG 激光器波长为 532 nm,脉冲宽度为 8 ns,脉冲能量为 80 mJ。He-Ne 激光作为探测光(干涉仪光源),分为两束,其中一束光为信号光,通过样品用于探测样品折射率的变化;另一束光作为参考光。高速瞬态记录仪用于记录时间分辨率为纳秒量级的瞬态介质折射率的变化。压电控制器用于在每次脉冲激发后,使干涉条纹复位至初始值。

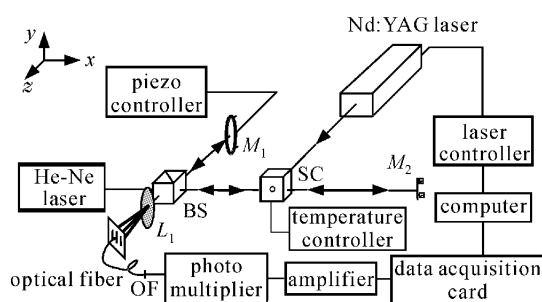


图 1 基于干涉技术的瞬态微热量测量实验原理图

BS:分束器;SC:样品盒; $L_1$ :透镜;

OF:光学滤波器; $M_1, M_2$ :反射镜

Fig. 1 Schematic diagram of time-resolved micro-calorimetry based on interferometer

BS: beam splitter; SC: sample cell;  $L_1$ : lens;

OF: optical filter;  $M_1, M_2$ : mirror

相位变化  $\Delta\phi$  与折射率变化  $\Delta n$  的关系为

$$\Delta\phi(t) = \frac{2\pi l}{\lambda} \Delta n(t), \quad (1)$$

其中  $l$  为样品在信号光方向的长度; $\lambda$  为探测光的波长。

光电探测器的输出为

$$V(t) = K\{I_s(t) + I_r +$$

$$2\sqrt{I_r I_s(t)} \cos[\Delta\phi + \Delta\phi(t)]\}, \quad (2)$$

式中  $K$  是一个常数,与光学系统结构、探测器的性能参数如量子效率等有关; $I_s(t)$ ,  $I_r$  分别对应于干涉仪的信号光和参考光的光强,信号光的强度随着介质折射率的变化而变化,而参考光光强是一个恒定值。信号光可以分为两部分,一个固定分量加一个随时间变化的微变量,即  $I_s(t) = I_{s0} + \tilde{I}_s(t)$ 。 $\Delta\phi$  为参考光和信号光的静态相位差,即没有光激发时的相位差。

为了获得  $\Delta\phi(t)$ , 首先考虑如图 2 所示的几种情况:

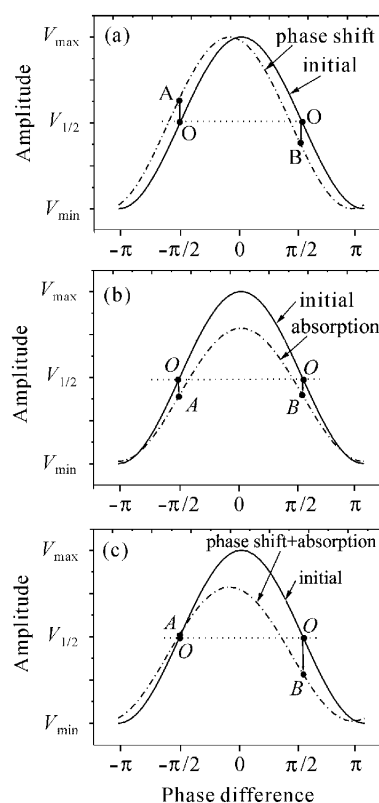


图 2 相移和吸收引起的信号幅度和相位的变化

Fig. 2 Variation of signal's amplitude and phase induced by phase shift and absorption

1) 只有相移,如图 2(a)所示,介质的吸收率不发生变化,则  $A, B$  两点处的相位变化  $\Delta\phi_A(t)$  与  $\Delta\phi_B(t)$  满足

$$\Delta\phi_A(t) = \Delta\phi_B(t) + \pi. \quad (3)$$

2) 相移为零,如图 2(b)所示,介质吸收率发生变化时,  $A, B$  两点光电探测器输出  $V_A(t)$  与  $V_B(t)$  满足

$$V_A(t) = V_B(t). \quad (4)$$

3) 当介质的吸收率和相位同时发生变化时,如图 2(c)所示, A 与 B 点信号输出的和  $V_S(t)$  与差  $V_D(t)$  分别表示为

$$V_S(t) = [V_A(t) + V_B(t)]/2 = K[I_r + I_s(t)], \quad (5)$$

$$V_D(t) = [V_A(t) - V_B(t)]/2 = 2K \sqrt{I_r I_s(t)} \cos[\Delta\varphi + \Delta\phi(t)], \quad (6)$$

信号和  $V_S(t) \propto I_s(t)$ , 对应于介质吸收率的变化。从信号差  $V_D(t)$  中可以得到由于化学反应热量与体积引起的相位变化, 即

$$\Delta\phi(t) = \arcsin \left[ \frac{V_D(t)}{V_{1/2} - V_{\max}} \right], \quad (7)$$

其中  $V_{\max} = K(I_r + I_{s0} + 2\sqrt{I_r I_{s0}})$ , 表示没有化学反应时的干涉最大;  $V_{1/2} = K(I_r + I_{s0})$ , 表示当  $\Delta\varphi = \pi/2$  时光电探测器的输出。

由此得出折射率的变化为

$$\Delta n(t) = \frac{\lambda}{2\pi l} \Delta\phi(t), \quad (8)$$

折射率变化是由于吸热或放热和由于蛋白质构像变化而引起的体积变化所引起的, 后者与温度无关。对应的折射率变化  $\Delta n$  表示为

$$\Delta n = \Delta n_0 + \left( \frac{dn}{dT} \right)_\rho \Delta T, \quad (9)$$

$\Delta n_0$  是由于构像变化而引起的折射率的变化, 与温度无关; 斜率  $\Delta T$  表示反应热, 可以看出,  $\Delta n$  与  $\left( \frac{dn}{dT} \right)_\rho$  呈线性关系, 从而可以得出反应体积  $\Delta V$  与反应热量  $\Delta H$  分别为

$$\Delta V = -\frac{V_0}{\rho_0} \cdot \frac{\Delta n_0}{dn/d\rho}, \quad (10)$$

$$\Delta H = \Delta T \cdot C_p \rho V_0, \quad (11)$$

其中  $V_0, \rho_0$  分别为初始条件下溶液的体积和密度,  $dn/d\rho$  为折射率密度变化系数,  $C_p$  为溶液的热容,  $\rho$  为溶液密度。

### 3 实验测量

根据脱氧肌红蛋白与 MbCO 在常温下 (pH = 7.0) 的可见光吸收谱, MbCO 在 540 nm 处有一个吸收峰 (吸收率为  $1.54 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ), Mb 在 560 nm 处有一个吸收峰 (吸收率为  $1.38 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ )<sup>[8,9]</sup>。Mb 受光照射后, 并没有发生化学反应, 结构不发生变化, 只表现为吸热和放热过程。吸热过程在脉冲宽度内发生, 而放

热过程非常缓慢, 在测量间隔内干涉仪探测器输出近似为一定值。而 MbCO 受光照后, Mb 与 CO 发生化学反应, 此时 Mb 的结构会发生明显变化, 干涉仪探测器输出是时间的函数。因此, 当 532 nm 的激光照射 MbCO 溶液时, 通过干涉仪所测量的跃迁就是 Mb 与 CO 的化学反应所引起的, 主要表现为 Mb + CO → MbCO。根据跃迁部分所对应的相位差就可以计算出反应体积和反应热量。

首先通过静态干涉图测量  $V_{\max}$  和  $V_{1/2}$ , 然后分别测量图 2 中 A 和 B 点对应的输出  $V_A(t)$  和  $V_B(t)$ 。为了消除噪声, 可采用脉冲积累方法, 即通过多次脉冲激发, 然后取平均值。

图 3 为室温下的一组测量数据。实验样品为  $62.4 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  的肌红蛋白, 充分溶解于 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 中。

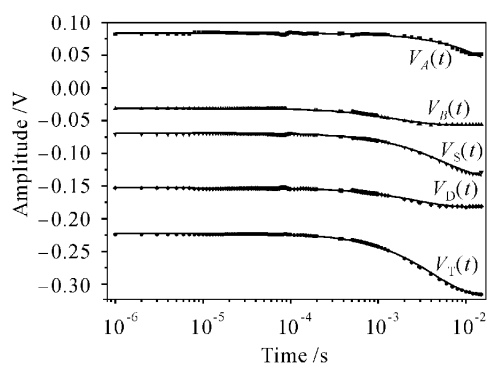


图 3 室温时的测量数据

图中离散点为实验数据, 实线为拟合曲线;  $V_T(t)$  是通过光解瞬态吸收谱技术方法所测得的透射率  
Fig. 3 Measurement results at room temperature  
Points are measured data, solid lines are fitted.  $V_T(t)$  is the transmission curve measured by flash photolysis

在生物化学研究中, 一个非常有用的方法就是光解瞬态吸收谱技术 (Flash Photolysis), 即利用强激光脉冲激发生物样品, 然后通过测量介质吸收率的变化来了解化学反应过程, 图 3 中  $V_T(t)$  就是这种方法的测量结果; 当遮挡干涉仪的一个臂时, 就可以得到该参量的输出。  $V_S(t)$  是在 A 和 B 点测量结果之和, 所反映的规律与  $V_T(t)$  一致。差  $V_D(t)$  则包含着系统的反应热和体积变化信息。

为了求出  $\Delta V$  和  $\Delta H$ , 需要测量  $\Delta n \sim \left( \frac{dn}{dT} \right)_\rho$  关系曲线, 即在不同温度时进行干涉实验测量。在 273~301 K 温度范围内实验所得的 MbCO 受光激发后折射率变化情况如图 4 所示, 测量间隔为 4 K。

每个温度值所对应的  $\left(\frac{dn}{dT}\right)_\rho$  可通过手册查找,  $T$  与  $\left(\frac{dn}{dT}\right)_\rho$  在所测量的温度范围内为线性关系。经过线性拟合, 可得  $\Delta n_0 = -2.549 \times 10^{-7}$ ,  $\Delta T = 1.2 \text{ mK}$ , 将  $\Delta n_0$  和  $\Delta T$  分别代入(10)和(11)式, 可得  $\Delta V \approx 10 \text{ mL/mol}$ ,  $\Delta H \approx 80 \text{ kJ/mol}$ 。

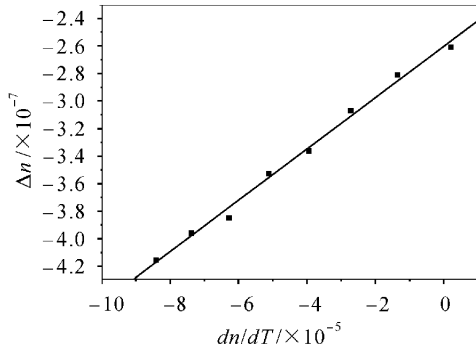


图 4  $\Delta n \sim \left(\frac{dn}{dT}\right)_\rho$  关系曲线

温度测量范围为 273~301 K,  
离散点为实验数据, 直线为线性拟合

Fig. 4 Relationship between  $\Delta n$  and  $\left(\frac{dn}{dT}\right)_\rho$

measured at different temperatures from 273 to 301 K, the data is sampled with a step of 4 K, points are measured data, solid lines are linearly fitted

## 4 结 论

蛋白质的结构与功能存在着特定的对应关系, 当蛋白质结构发生变化时, 蛋白质系统的热力学量

会随之发生变化, 通过测量热力学信息, 有助于了解蛋白质内部结构的变化。光学干涉技术, 可用于测量化学反应的热力学信息。虽然研究时以肌红蛋白作为研究对象, 但该方法并不局限于该领域应用。

## 参 考 文 献

- 1 Silvia E. Braslavsky, George E. Heibel. Time-resolved photothermal and photoacoustic methods applied to photoinduced processes in solution [J]. *Chem. Rev.*, 1992, **92**(6): 1381~1410
- 2 M. J. Pelletier, H. R. Thorshelm, J. M. Harris. Laser-induced thermal diffraction for calorimetric absorption measurements [J]. *Anal. Chem.*, 1982, **54**(2): 239~242
- 3 Norman J. Dovichi, Thomas G. Nolan, Wayne A. Weimer. Theory for laser-induced photothermal refraction [J]. *Anal. Chem.*, 1984, **56**(9): 1700~1704
- 4 C. K. N. Patel, A. C. Tam. Pulsed optoacoustic spectroscopy of condensed matter [J]. *Review of Modern Physics*, 1981, **53**(3): 517~550
- 5 Stephen E. Bialkowski. Progress toward a better understanding of signal generation in laser-excited photothermal spectrometry of homogeneous samples [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 1998, **17**(8+9): 520~531
- 6 Masaki Sakakura, Isao Morishima, Masahide Terazima. The structural dynamics and ligand releasing process after the photodissociation of sperm whale carboxymyoglobin [J]. *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**(42): 10424~10434
- 7 H. Frauenfelder, B. H. McMahon, P. W. Fenimore. Myoglobin; the hydrogen atom of biology and a paradigm of complexity [J]. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**(15): 8615~8617
- 8 Eraldo Antonini, Maurizio Brunori. Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands [M]. 1st edition. London: North-Holland Publishing Company, 1971. 19
- 9 Ma Sen. Strid of research on myoglobin [J]. *Journal of Nanping Teachers College*, 2004, **23**(2): 41~45  
马 森. 肌红蛋白的研究进展 [J]. *南平师专学报*, 2004, **23**(2): 41~45