

同型半胱氨酸的太赫兹特征吸收光谱分析

王莹莹^{1,2}, 汪丽平^{1,2}, 李恬^{1,2}, 严俊^{1,2}, 彭滢^{1,2*}

¹上海理工大学光电信息科学与计算机工程学院, 上海 200093;

²上海市现代光学系统重点实验室, 上海 200093

摘要 对同型半胱氨酸的太赫兹特征吸收光谱进行分析。首先使用密度泛函理论分析同型半胱氨酸分子的振动和转动模式, 确保其理论吸收峰位于太赫兹光谱系统可测试范围内; 然后, 基于太赫兹时域光谱系统测量不同浓度同型半胱氨酸的特征吸收光谱, 结合线性拟合方程精确反推出待测同型半胱氨酸的浓度。这些结果对于临床医学中同型半胱氨酸相关疾病的快速准确诊断具有重要意义。

关键词 光谱学; 同型半胱氨酸; 密度泛函理论; 太赫兹时域光谱

中图分类号 O433.4

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201939.1030003

Terahertz Characteristic Absorption Spectrometric Analysis of Homocysteine

Wang Yingying^{1,2}, Wang Liping^{1,2}, Li Tian^{1,2}, Yan Jun^{1,2}, Peng Yan^{1,2*}

¹ School of Optoelectronic Information and Computer Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

² Shanghai Key Laboratory of Modern Optical Systems, Shanghai 200093, China

Abstract We investigate the terahertz characteristic absorption spectra of homocysteine. First, we use the density functional theory to analyze the vibration and rotation modes of homocysteine and ensure that the theoretical absorption peak is within the testing range of the terahertz spectroscopy system. Subsequently, the characteristic absorption spectra of homocysteine with different concentration are measured based on the terahertz time-domain spectroscopy system, which can be accurately performed using the linear fitting equation. These results exhibit considerable significance for the accurate and rapid diagnosis of homocysteine-related diseases in clinical medicine.

Key words spectroscopy; homocysteine; density functional theory; terahertz time-domain spectra

OCIS codes 300.6170; 300.6495; 300.1030

1 引 言

同型半胱氨酸(C₄H₉NO₂S)是一种含硫氨基酸,对人体有害,其在人体内的含量过多时会成为心血管疾病、冠心病、糖尿病及并发症、老年痴呆等疾病的致病因子^[1-3]。目前,医学上对同型半胱氨酸的检测方法主要有高效液相色谱检测法(HPLC)、荧光极化免疫法(FPIA)和酶联免疫吸附法(ELISA)3种。这3种方法都存在检测耗时、成本昂贵等缺点。

太赫兹(THz)精密光谱技术是一种有效的物质鉴定和分析方法^[4-8]。THz在生物检测中的反射光

谱、透射光谱携带着物质本身丰富的物理和化学信息,同时,低电离能的独特优势,使得THz在生物检测中不会破坏生物细胞,从而达到无损检测的效果,所以THz光谱在探索物质结构方面具有重要价值。由于许多有机分子的振动和转动频率都在THz的有效波段内,可以通过检测THz特征吸收光谱(也叫指纹谱)进行物质识别^[9-11]。针对同型半胱氨酸,本文首先利用密度泛函理论(DFT)计算并分析THz吸收光谱,然后基于THz时域光谱检测同型半胱氨酸的吸收光谱随浓度的变化。本研究为人血浆/尿液中同型半胱氨酸含量的快速检测提供了参

收稿日期: 2019-05-20; 修回日期: 2019-06-14; 录用日期: 2019-06-25

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2017YFF0106300)、国家自然科学基金(61771314)、上海市启明星人才计划(17QA1402500)、上海市教育发展基金会“曙光计划”(17SG45)、上海市青年拔尖人才开发计划

* E-mail: py@usst.edu.cn

考,对临床医学具有重要意义。

2 理论模型及指纹谱分析

THz 光谱特征吸收峰是由辐照后的 THz 波与物质分子中原子/官能团的振动/转动的共振吸收产生的^[12]。对于分子的振动/转动模式分析,目前较多使用的是 DFT,它是一种研究多电子体系电子结构的量子力学方法,其广泛应用在物理和化学领域,特别适合用来研究分子和凝聚态物质的性质,是凝聚态物理计算材料学和计算化学领域最常用的方法之一。Gaussian-09 包是目前计算化学领域最流行、使用范围最广的综合性量子化学计算程序,它是基于量子力学而开发的,致力于把量子力学理论应用于实际问题,它可以通过一些基本命令验证和预测目标体系几乎所有的性质。

本文使用 DFT Gaussian-09 程序包中的 B3LYP 杂化泛函功能和 3-21G 基集功能对同型半胱氨酸进行计算模拟,得到的分子结构模型如图 1 所示,其中灰色、白色、红色、蓝色和黄色原子分别代表 C、H、O、N、S 原子。在 THz 频谱范围内的特征吸收峰理论谱线如图 2 所示。

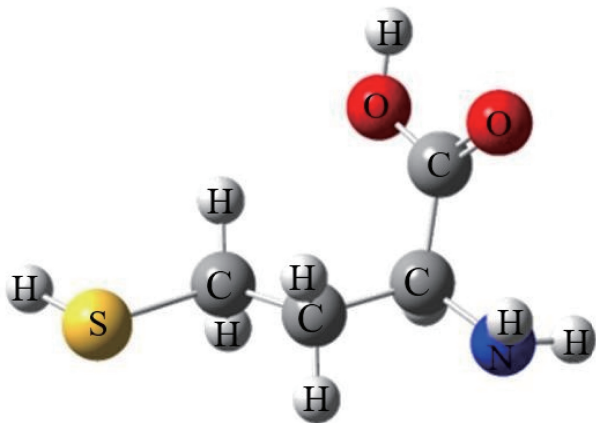


图 1 同型半胱氨酸分子结构模型

Fig. 1 Molecular structural model of homocysteine

在图 2 中可以看到同型半胱氨酸在 1.25 THz 和 1.92 THz 处具有明显的特征吸收峰。分析后可知吸收峰源于同型半胱氨酸分子的 2 种不同振动模式:1)在 1.25 THz 处的 THz 光谱吸收峰主要来源于物质中 O=C—OH 基团的扭转振动;2)在 1.92 THz 处的 THz 光谱吸收峰主要来源于 H₂C—S—H 基团的摇摆振动。

3 实验过程及数据分析

在证明同型半胱氨酸的特征吸收谱位于可检测

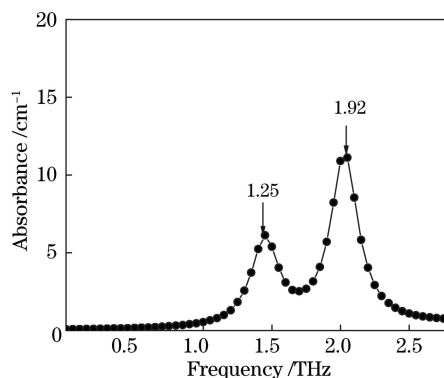


图 2 DFT 计算得到的同型半胱氨酸 THz 特征吸收谱

Fig. 2 THz characteristic absorption spectrum of homocysteine calculated by DFT

的 THz 频段范围之内,应用标准的 THz 时域光谱系统(THz-TDS)来进行实验测试和验证。THz-TDS 是基于相干探测技术的 THz 产生与探测系统,能够同时获得 THz 脉冲的振幅信息和相位信息,再通过对时间波形进行傅里叶变换,就能直接得到样品的吸收系数、折射率、透射率等光学参数。THz 时域光谱具有高探测信噪比、较宽的探测带宽、高探测灵敏度、可应用于多种样品探测、可实现无损检测等特点^[13-18]。实验所用装置是商用快速扫描系统(EKSPLA),音圈级单次扫描时间为 0.09 s。系统测量信号的有效带宽为 0.1~3.0 THz,频谱分辨率优于 15 GHz,信噪比 R_{SN} 优于 1000:1。此外,所得光谱均经过 128 次平均,以确保高 R_{SN} 。THz-TDS 整个装置放置在一个密封的充满干燥空气(湿度小于 3%)的装置中,以减小水蒸气的影响^[10]。

实验所用同型半胱氨酸纯品(纯度 $\geq 95\%$, CAS:454-29-5)在 Sigma 网站购买。将每个样品与聚乙烯(PE)粉末(纯度 $> 99\%$, 研磨后粒径小于 50 μm)混合均匀,得到不同浓度的样品,然后用 29.4 kN 的力将其压成 1 mm 厚的片剂^[19-20],且质量损失严格控制在 1% 以下。同型半胱氨酸浓度 (C , mol/L)的计算公式^[21]为

$$C = \frac{\omega}{MV_{\text{pellet}}}, \quad (1)$$

$$V_{\text{pellet}} = \pi r^2 d, \quad (2)$$

式中, ω 、 M 、 d 、 r 分别为同型半胱氨酸粉末的质量、相对分子质量、药片的厚度和半径, V_{pellet} 为同型半胱氨酸纯品与聚乙烯混合制成的药片的体积。

实验前,为克服血液/尿液中水对 THz 波的强吸收,又考虑到血液/尿液中同型半胱氨酸含量极低,本项工作中首次提出针对 THz 光谱技术的浓缩富集再烘干含待测物质的样品的处理方法,即选择

恰当尺寸的分子薄膜和合适的烘干时间来消除水的干扰,提升检测结果的准确度。以尿液为例,正常人体内 2 L 尿液中含有约 2.5 mg 同型半胱氨酸,通过过滤、浓缩与烘干处理后,将其与 120 mg PE 混合后可得到浓度为 0.14 mol/L 的样品,因此 0.14 mol/L 可作为判定实际人体血液/尿液中同型

半胱氨酸含量是否超过正常值的标准。

实验以 120 mg PE 作为背景,采集背景参考信号,然后测试 30 mg 同型半胱氨酸纯品与 120 mg PE 混合后得到的浓度为 1.68 mol/L 的样品。将所制备的片剂放入 THz-TDS 进行检测,得到样品的 THz 时域谱和频域谱图,如图 3(a)和图 3(b)所示。

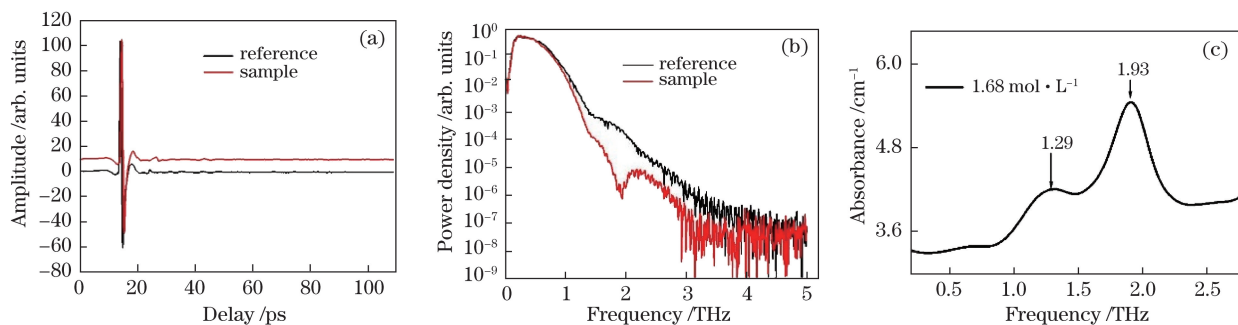


图 3 1.68 mol/L 同型半胱氨酸的谱图表征。(a)时域谱;(b)频域谱;(c)吸收图

Fig. 3 Spectra characterization of 1.68 mol/L homocysteine. (a) Time domain spectra; (b) frequency domain spectra; (c) absorption spectrum

为获得样品的时域谱,先去除样品时域信号的反射峰,得到 1578 个样品点,其余用 0 填充,使总点数仍为 2048;傅里叶变换得到频域谱后,再计算样品的相对吸收系数谱线。采用的计算公式为

$$\alpha(\omega) = \ln \frac{I_{\text{ref}}(\omega)}{I_{\text{sam}}(\omega)}, \quad (3)$$

式中, $I_{\text{ref}}(\omega)$ 为参考信号的吸收谱, $I_{\text{sam}}(\omega)$ 为含有样品信息的吸收谱。截取可准确识别样品有效频域范围内的吸收谱线,仅保留样品的有用信息,最终得到浓度为 1.68 mol/L 的同型半胱氨酸的吸收谱如图 3(c)所示。由图 3(c)可知 1.68 mol/L 同型半胱氨酸在 1.29 THz 和 1.93 THz 处具有明显的吸收峰,与理论计算结果吻合得较好。

明确同型半胱氨酸的 THz 特征吸收峰后,使用 THz-TDS 测试不同浓度同型半胱氨酸的吸收光谱,以获得浓度与 THz 光谱的对应关系,用于医学同型半胱氨酸浓度的快速准确鉴别。具体实验中,将不同质量的同型半胱氨酸纯品与 120 mg PE 混合,得到浓度分别为 0.14, 0.28, 0.42, 0.56, 0.67, 0.84, 0.96, 1.12, 1.34, 1.68 mol/L 的样品。这些样品分别对应于人体血液/尿液中含有 9.5, 19.0, 28.5, 38.0, 45.5, 57.0, 65.1, 76.0, 90.9, 114.0 $\mu\text{mol/L}$ 的同型半胱氨酸,这些浓度涵盖了疾病发展程度从正常到严重所对应的人体血液/尿液中同型半胱氨酸含量的区间范围,测得这些样品的吸收光谱如图 4 所示。可以清楚地看到,随着同型半胱氨酸溶液的浓度增大,其两个 THz 特征吸收峰的幅值也呈现规律

性上升特点。

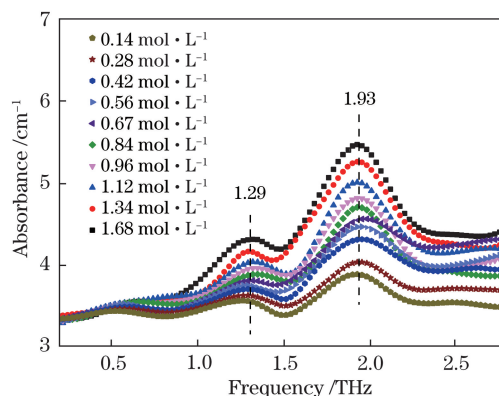


图 4 不同浓度同型半胱氨酸溶液的 THz 吸收光谱

Fig. 4 THz absorption spectra of homocysteine solutions with different concentrations

为准确地定量分析同型半胱氨酸,分别提取不同浓度同型半胱氨酸样品在 1.29 THz 与 1.93 THz 吸收峰处的吸光度,根据比尔-朗伯定律,对数据进行线性拟合,对应的线性拟合函数表达式分别为

$$y = 3.50 + 0.48x, [R = 0.99848, S = 0.00155], \quad (4)$$

$$y = 3.81 + 1.06x, [R = 0.99305, S = 0.03202], \quad (5)$$

式中, x 为样本浓度, y 为测得的 THz 信号幅值, R 为拟合的线性度, S 为标准差。拟合结果如图 5 所示。

由图 4、5 可知,随着同型半胱氨酸的浓度增大, THz 吸收光谱上两个对应特征吸收峰的幅值也呈

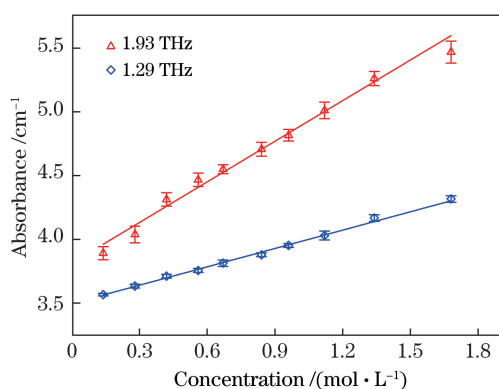


图 5 不同浓度同型半胱氨酸样品在 1.29 THz 与 1.93 THz 处吸收系数与浓度的线性关系

Fig. 5 Linear relationship between absorption coefficient and concentration of homocysteine with different concentrations at 1.29 THz and 1.93 THz

现线性递增规律,与比尔-朗伯定律吻合得较好,且误差范围小。因此对于后期同型半胱氨酸的定量检测,只需得到待测样品在同型半胱氨酸对应的 THz 特征吸收峰位置处的吸收系数值,再结合线性拟合曲线,即可精确反推得出待测物质中同型半胱氨酸的浓度。

4 结 论

通过理论计算得到同型半胱氨酸的太赫兹振动与转动分子模型、太赫兹吸收光谱的理论峰值,制备不同浓度的同型半胱氨酸溶液进行测试,证实了采用太赫兹吸收光谱有效识别同型半胱氨酸浓度的可行性,再结合比尔-朗伯定律得到了不同浓度的同型半胱氨酸太赫兹吸收峰值对应的线性拟合函数,使得检测流程更加简洁,这对临床医学上同型半胱氨酸相关疾病的快速高精度检测具有重要参考意义。后期通过对数据库标准样品的吸收谱进行更换,还可以实现人体血液/尿液内其他氨基酸的定量分析,这同样对临床医学与其他氨基酸相关疾病的快速高精度检测具有重要参考意义。

参 考 文 献

- [1] Yi Z Q, Peng M A, Wan F F, *et al.* The relationship between hyperhomocysteine and senile diabetes mellitus and coronary heart disease[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2019, 39(7): 1576-1577.
易志强, 彭民安, 万风福, 等. 高同型半胱氨酸与老年糖尿病及冠心病的关系[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(7): 1576-1577.
- [2] Feng J, Huang M, Ni H, *et al.* Influence of bone healing by homocysteine levels on patients with limb fracture[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics, 2015, 23(7): 38-41.
冯晶, 黄觅, 倪欢, 等. 同型半胱氨酸水平对四肢骨折愈合的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2015, 23(7): 38-41.
- [3] Qi J. Study on the correlation between plasma homocysteine level and the severity of alzheimer's disease[J]. Electronic Journal of Clinical Medical Literature, 2018, 5(41): 34-35.
戚杰. 血浆同型半胱氨酸水平与老年痴呆病情程度的相关性研究[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(41): 34-35.
- [4] Ajito K, Ueno Y. THz chemical imaging for biological applications[J]. IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology, 2011, 1(1): 293-300.
- [5] Huang R R, Zhao G Z, Liu Y, *et al.* Study of terahertz and infrared spectra of four kinds of lactose[J]. Acta Optica Sinica, 2015, 35(s2): s230001.
黄瑞瑞, 赵国忠, 刘影, 等. 4种乳糖的太赫兹光谱和红外光谱特性研究[J]. 光学学报, 2015, 35(s2): s230001.
- [6] Zhong H, Redo-Sanchez A, Zhang X C. Identification and classification of chemicals using terahertz reflective spectroscopic focal-plane imaging system[J]. Optics Express, 2006, 14(20): 9130-9141.
- [7] Zeitler J A, Newnham D A, Taday P F, *et al.* Temperature dependent terahertz pulsed spectroscopy of carbamazepine[J]. Thermochemica Acta, 2005, 436(1/2): 71-77.
- [8] Nishizawa J I, Sasaki T, Suto K, *et al.* THz transmittance measurements of nucleobases and related molecules in the 0.4- to 5.8-THz region using a GaP THz wave generator[J]. Optics Communications, 2005, 246(1/2/3): 229-239.
- [9] Sun J H, Shen J L, Liang L S, *et al.* Experimental investigation on terahertz spectra of amphetamine type stimulants[J]. Chinese Physics Letters, 2005, 22(12): 3176-3178.
- [10] Zheng X M, McLaughlin C V, Cunningham P, *et al.* Organic broadband terahertz sources and sensors[J]. Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics, 2007, 2(1): 58-76.
- [11] Feng R S, Li W W, Zhou Q L, *et al.* Terahertz spectroscopic investigations of explosives and the related compounds[J]. Proceedings of SPIE, 2009, 7158: 71580W.
- [12] Peng Y, Yuan X R, Zou X, *et al.* Terahertz identification and quantification of neurotransmitter and neurotrophin mixture[J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(11): 4472-4479.
- [13] Auston D H, Smith P R. Generation and detection of

- millimeter waves by picosecond photoconductivity [J]. *Applied Physics Letters*, 1983, 43(7): 631-633.
- [14] Auston D H, Cheung K P. Coherent time-domain far-infrared spectroscopy[J]. *Journal of the Optical Society of America B*, 1985, 2(4): 606-612.
- [15] Xu L, Zhang X C, Auston D H. Terahertz beam generation by femtosecond optical pulses in electro-optic materials[J]. *Applied Physics Letters*, 1992, 61(15): 1784-1786.
- [16] Hu B B, Zhang X C, Auston D H, *et al.* Free-space radiation from electro-optic crystals[J]. *Applied Physics Letters*, 1990, 56(6): 506-508.
- [17] Xie X, Dai J M, Zhang X C. Coherent control of THz wave generation in ambient air[J]. *Physical Review Letters*, 2006, 96(7): 075005.
- [18] Tanoto H, Teng J H, Wu Q Y, *et al.* Nano-antenna in a photoconductive photomixer for highly efficient continuous wave terahertz emission[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2824.
- [19] Peng Y, Shi C J, Xu M Q, *et al.* Qualitative and quantitative identification of components in mixture by terahertz spectroscopy[J]. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*, 2018, 8(6): 696-701.
- [20] Chen W Q, Peng Y, Jiang X K, *et al.* Isomers identification of 2-hydroxyglutarate acid disodium salt (2HG) by terahertz time-domain spectroscopy [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 12166.
- [21] Ueno Y, Rungsawang R, Tomita I, *et al.* Quantitative measurements of amino acids by terahertz time-domain transmission spectroscopy[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(15): 5424-5428.