

### 特点描述

- ◆ 不用染色就能确认羟基磷灰石和骨胶原蛋白的分布。
- ◆ 通过红外拉曼光谱，可以选择高灵敏度检测分析目标成分的最佳分析方法。
- ◆ 通过分析红外和拉曼光谱，可以评估与骨质相关的成分比例以及成分的成熟度。

### ■ 引言

除了表示单位体积骨量的骨密度之外，骨质量（骨质）对于预防骨质疏松症也很重要。骨骼主要由羟基磷灰石（无机物）和胶原蛋白（有机物）构成。通常，骨质用无机/有机成分的比例和羟基磷灰石的结晶度等进行评价。红外显微光谱和拉曼显微光谱都可以在无需染色的情况下确定骨骼成分的化学分布，通过详细的光谱分析，可以获得有关骨质的信息。虽然这两种光谱分析方法都是基于振动光谱，但其中包含了使用一种方法无法获得的信息，因此，可以说红外显微光谱和拉曼显微光谱具有互补性。

本文使用红外拉曼显微镜 AIRsight 对大鼠股骨切面进行了非染色分析。使用 AIRsight，可以通过一台设备同时获取红外显微光谱和拉曼显微光谱，从而可以分析多种成分。此外，还可以通过选择最佳的分析方法，获得骨质信息。

### ■ 大鼠股骨的红外拉曼显微测定

对大鼠股骨切面进行红外显微和拉曼显微测定。使用徕卡公司生产的显微镜用切片机 Histo Core AUTOCUTR，沿垂直于长轴的方向，对摘除后的股骨进行冷冻切片。切片后，如图 1 所示，切片机用夹具放置在显微镜下直接测试，可以保持在测定面平行的状态下进行测定。另外，为了同时分析骨骼的无机成分和有机成分，未采用脱灰处理去除羟基磷灰石处理。



图 1 大鼠股骨的切面观察情形

切面的图像如图 2 所示。测定面和载台平行，因此，即使在大视野相机下也能对整个视野进行聚焦。

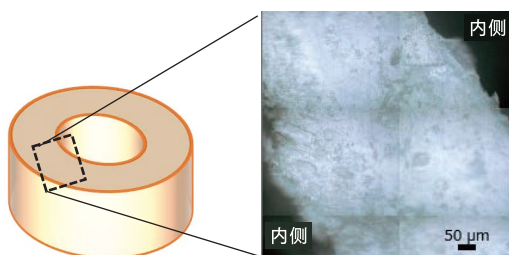


图 2 大鼠股骨切面的观察图像

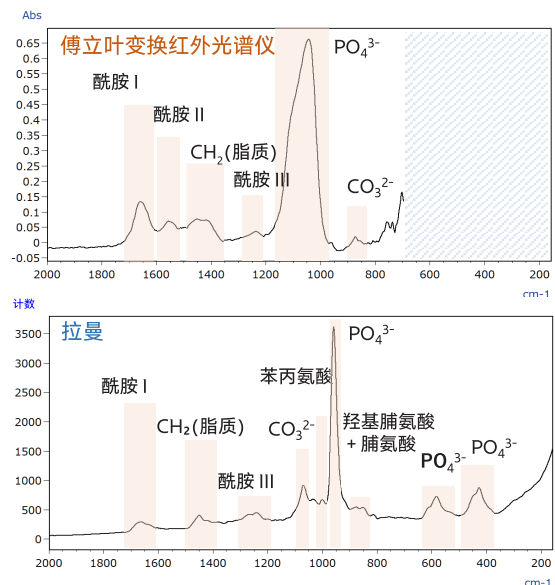
红外光谱和拉曼光谱测定的光谱成像测定条件如表 1 所示。

表 1 测量条件

仪器	: IRTracer™ -100, AIRsight
<b>红外光谱测定</b>	
分辨率	: 8 cm <sup>-1</sup>
扫描次数	: 200
切趾函数	: SqrTriangle
光阑尺寸	: 50μm×50μm
步宽	: 50 μm
映射范围	: 650 μm×300μm
检测器	: T2SL
<b>拉曼光谱测定</b>	
扫描次数	: 5
曝光时间	: 10.0 sec
物镜	: 50 倍
激发波长	: 785 nm
激光照射直径	: 5 μm
步宽	: 50 μm
映射范围	: 650 μm×00 μm
检测器	: CCD

### ■ 基于红外、拉曼光谱的股骨属性

基于红外光谱法和拉曼光谱法的大鼠股骨光谱和主要归属如图 3 所示。


 图 3 大鼠股骨的红外 / 拉曼光谱<sup>1)</sup>  
(Phe: 苯丙氨酸, Hyp: 羟脯氨酸, Pro: 脯氨酸)

本次使用的是非脱灰样品，因此，同时检测到了来自胶原蛋白的峰（酰胺 I/II/III）和羟基磷灰石的峰（ $\text{PO}_4^{3-}$ ）。此外，还分别确认了只能通过红外光谱或拉曼光谱识别的峰，即使是相同的基团，其强度和峰形也不尽相同。

## ■ 基于多变量分析的组分分离和分布观察

Multivariate curve resolution (MCR) 法是一种可从包含多种组的光谱中获得各组分的光谱（纯光谱）和浓度信息的多变量分析方法。从多个混合物光谱中选取几个独立变化的纯光谱，并根据最小二乘法进行优化计算。

### • 组分分布分析：胶原蛋白和羟基磷灰石

对股骨进行拉曼光谱 mapping 成像测定，针对获取的光谱成像数据，使用 MCR 法分离胶原蛋白和羟基磷灰石，绘制了相对浓度分布的化学图像。各组分光谱的定性结果如图 4 所示，化学图像如图 5 所示。蓝色表示浓度相对较低，红色表示浓度较高。

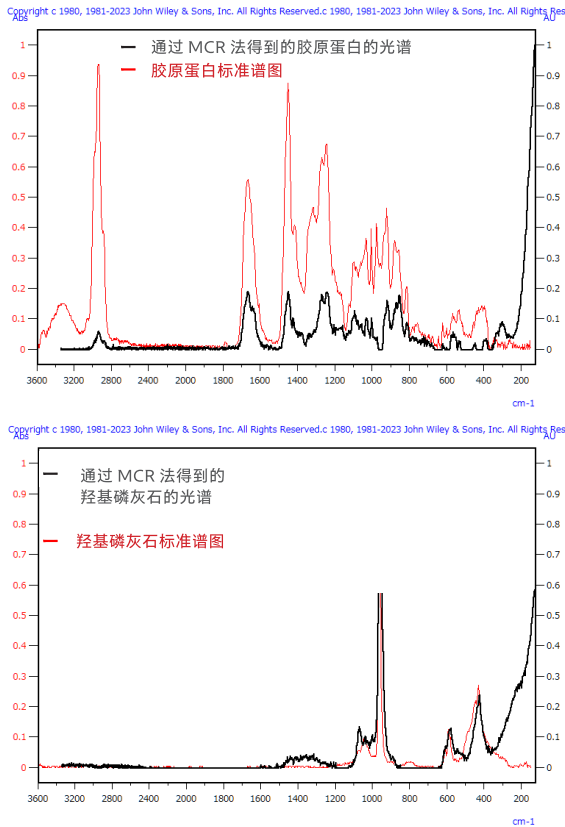


图 4 使用 MCR 法分离的组分光谱的检索结果

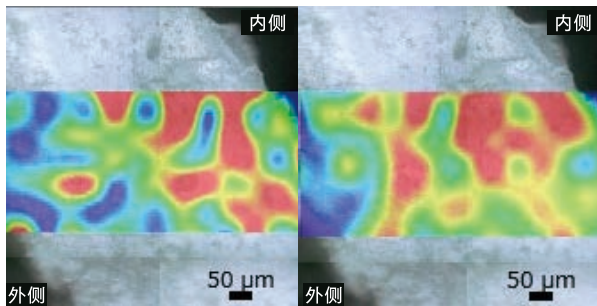


图 5 基于 MCR 法的化学图像  
(左：胶原蛋白、右：羟基磷灰石)

由图 4 可知，采用 MCR 法可以清晰地分离胶原蛋白和羟基磷灰石。另外，从图 5 所示的化学图像中可以看出，羟基磷灰石分布在整个骨切面，而胶原蛋白更多分布在骨骼的内侧。

## ■ 源于各组分的峰分布确认和骨质评价

红外 / 拉曼光谱的整体强度都会因样品的表面状态而变化。本次使用源于各组分的峰比例，确认了相对组分分布。各组分分布均为蓝色表示浓度相对较低，红色表示浓度较高。

### • 骨质评价①矿物质与基质的比例

来自羟基磷灰石与胶原蛋白的组分比例的  $\text{PO}_4^{3-}$  和酰胺 I 比例称为基质比例，有报告称，该比例随着骨骼形成时间的推移而增加<sup>2)</sup>。红外光谱的  $\text{PO}_4^{3-}$  与酰胺 I 的峰面积比如图 6 所示。通过拉曼光谱也能得到同样的峰面积比，但采用了可以更加清晰地观察两个峰的红外光谱的数据。

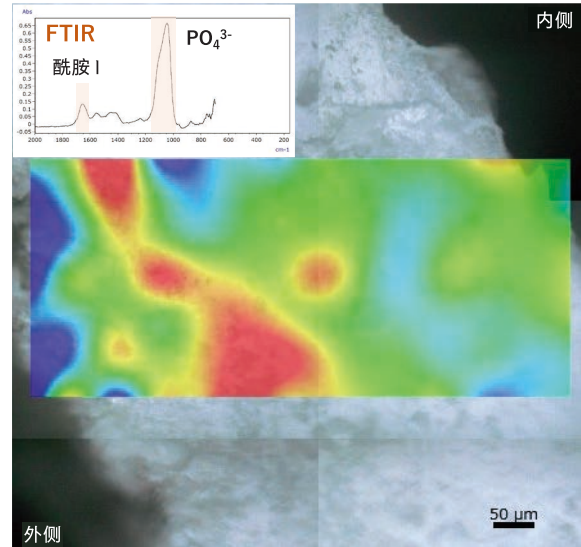


图 6 红外光谱的峰面积比 ( $\text{PO}_4^{3-}$  / 酰胺 I)

从图 6 可知，在骨外侧附着沿骨切面轮廓方向分布强，该部分的骨骼形成更快。

### • 骨质评价②碳酸盐与磷酸盐比率

有报告称，羟基磷灰石中的  $\text{CO}_3^{2-}$ （碳酸盐、Carbonate）和  $\text{PO}_4^{3-}$ （磷酸盐，Phosphate）的比例改变骨骼的溶解度，影响骨骼的新陈代谢（骨重塑）<sup>3)</sup>。基于拉曼光谱的  $\text{CO}_3^{2-}$  与  $\text{PO}_4^{3-}$  的峰面积比如图 7 所示。 $\text{CO}_3^{2-}$  的峰可通过红外光谱法和拉曼光谱法测定，但采用了可以更加清晰观察的拉曼光谱的数据。

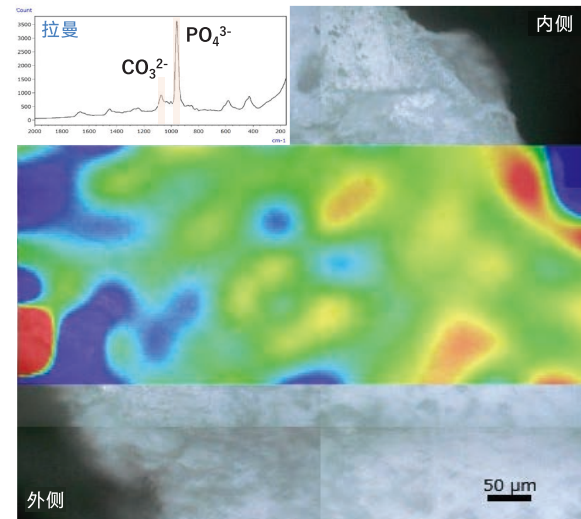


图 7 拉曼光谱的峰面积比 ( $\text{CO}_3^{2-}$  /  $\text{PO}_4^{3-}$ )

在本次测定中，主要分布在边缘，表明骨骼的新陈代谢在该区域表现活跃。

• 骨质评价③ 矿物成熟度

矿物成熟度是一种表示羟基磷灰石结晶度的指标。矿物成熟度的评价方法有很多种，这里使用了股骨红外光谱中  $1030\text{ cm}^{-1}$  和  $1110\text{ cm}^{-1}$  峰的比值。红外光谱的  $\text{PO}_4^{3-}$  峰值波数取决于结晶状态， $1030\text{ cm}^{-1}$  是源于晶体结构无缺损的羟基磷灰石的峰， $1110\text{ cm}^{-1}$  是源于结晶度低的羟基磷灰石的峰。在红外光谱中，各峰形成了重叠的形状，而通过对红外光谱进行二阶导数处理，在保持定量性的同时，可以分离重叠的峰（图 8）。

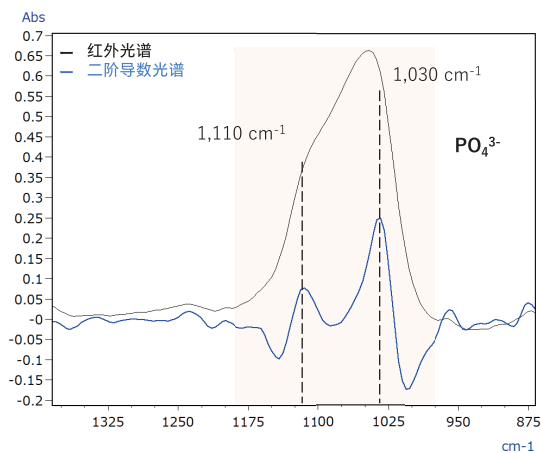


图 8 大鼠股骨的红外光谱和二阶导数光谱  
(二阶导数光谱正负翻转)

图 9 表示红外光谱成像各测定点的二阶导数光谱的峰高比。矿物成熟度高的部位散布在骨切面上，但可以看到其分布在骨骼轮廓线稍微靠近中心的带状区域。

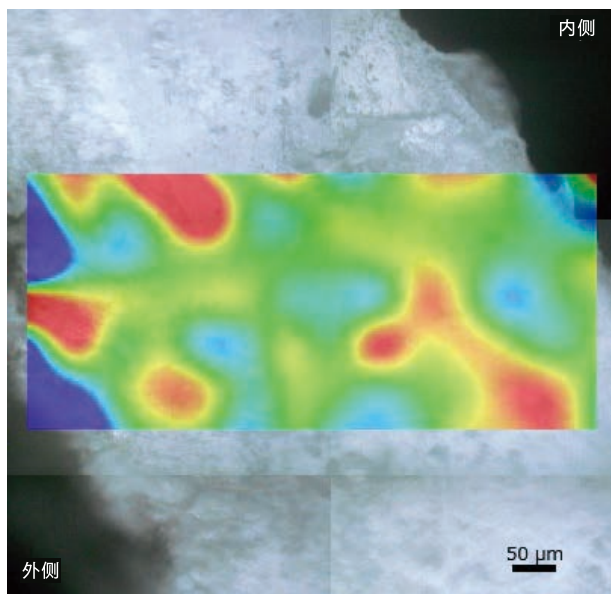


图 9 红外光谱的二阶导数光谱峰比 ( $1030\text{ cm}^{-1} / 1110\text{ cm}^{-1}$ )

• 骨质评价④

苯丙氨酸与羟基磷灰石的组份比

在某些情况下，红外光谱无法识别其峰值的成分（无红外活性）可以通过拉曼光谱进行测定。例如，包括图 3 所示的氨基酸苯丙氨酸、羟脯氨酸、脯氨酸。这里使用股骨的拉曼光谱成像数据，评价了苯丙氨酸和羟基磷灰石的组份比。基于拉曼光谱的苯丙氨酸 /  $\text{PO}_4^{3-}$  的相对比例化学图像如图 10 所示。如图所示在骨骼的外侧强烈分布，推测这是受到了骨膜的影响。

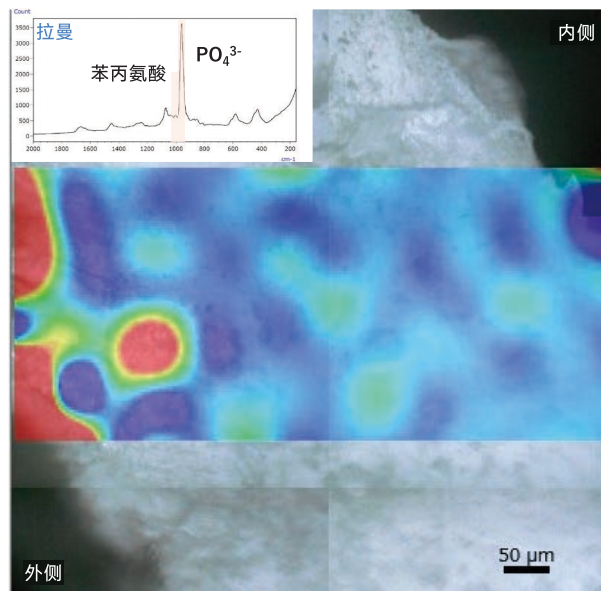


图 10 基于拉曼光谱的峰面积比  
(苯丙氨酸 /  $\text{PO}_4^{3-}$ )

■ 结论

使用红外显微镜 AIRsight 进行了大鼠股骨切面的非染色分析和骨质相关指标的分布评价。AIRsight 可以用一台显微镜同时完成红外光谱法和拉曼光谱法的分析，因此将样品放到载台上，可一次性分析更多的组分。另外，通过使用多变量分析方法，可以从混合物光谱中获得组分光谱及其浓度分布的化学图像。通过对重叠峰进行导数处理，还可以进行结晶度评价。此外，本次的分析处理均可以用红外拉曼显微镜用软件 AMsolution 完成。

< 致谢 >

本应用的编写过程中，获得了名古屋大学大学院工学研究科松本健郎教授、前田英次郎教授提供的样品和大力协助。在此表示衷心地感谢。

< 参考文献 >

- 1) Erik A. Taylor, Eve Donnelly, "Raman and Fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties," Bone. 139 (2020).
- 2) E.A. Taylor, A.A. Lloyd, C. Salazar-Lara, E.L. Donnelly, "Raman and FTIR mineral to matrix ratios correlate with physical chemical properties of model compounds and native bone tissue", Appl. Spectrosc. 0 (2017).
- 3) A. Grunenwald, C. Keyser, A.M. Sautereau, E. Crubézy, B. Ludes, C. Drouet, Revisiting carbonate quantification in apatite (bio) minerals: a validated FTIR methodology, J. Archaeol. Sci. 49 (2014).

岛津应用云



AIRsight, IRTracer 是岛津制作所或其附属公司在日本和 / 或其他国家 / 地区的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
\* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2023 年 9 月