

拉曼光谱技术在脂质过氧化反应中的应用^①

沈金虎 王亚利^a 王俊玲 王卫东^② 秦广雍

(河南省离子束生物工程重点实验室 郑州大学物理工程学院 郑州市大学路 75 号 450052)

^a(郑州师范高等专科学校物理系 郑州市英才街 6 号 450044)

摘要 本实验以亚油酸为材料,分别采用过氧化产物检测法和拉曼光谱技术对亚油酸的自氧化过程进行监测,从氧化反应的中间产物和底物的结构变化两个角度,对亚油酸的自氧化过程进行分析。为不饱和脂肪酸的过氧化机理研究提供实验证据。结果表明:拉曼光谱技术能够用来研究单分子物质的结构变化,随着自氧化过程的进行,亚油酸的拉曼光谱在谱型和峰强方面都有所变化,能够反映分子内部结构的变化。其时间效应与采用 TBA 和共轭二烯法测定时的时间效应基本一致。

关键词 亚油酸;拉曼光谱;硫化巴比妥酸法;丙二醛

中图分类号: O657.37

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2010)05-1951-05

1 引言

生命体的膜系统包括质膜、线粒体膜、溶酶体膜、过氧化体膜、核膜、高尔基体膜、内质网系膜等细胞内外的各种膜。生物膜是构成生命体细胞结构的基本形式,由脂质和蛋白质组成的流动镶嵌结构,生物膜的主要成分是不饱和脂肪酸。已有研究表明生物膜的辐射损伤主要由生物膜中不饱和脂肪酸的过氧化反应造成的^[1]。其过氧化反应的直接结果是膜不饱和脂肪酸含量减少,膜脂的流动性降低,导致膜系统不能表现正常的能量转换、物质运送、信息传递、细胞分裂与融合等功能^[2]。关于生物膜系统的过氧化反应研究成为人们关注的热点。

关于脂质过氧化反应研究的关键在于过程的监测,常用的方法有碘量法,极谱测定法,化学发光法测定丙二醛,另外还有荧光分光光度法,气相色谱法和液相色谱法和质谱法、电子自旋振动法等^[3]。这些方法分别是底物的减少,中间产物或终产物的出现以及诱导因子自由基的出现来间接反映脂质在氧化反应过程中的变化。拉曼光谱技术提供了一种分子水平研究方法。拉曼光谱检测的主要是斯托克斯散射。其拉曼频移、拉曼强度及线宽反映的是拉曼样品池中散射物质的特性,与物质分子的振动和转动有关。从特征拉曼频率可以确定分子中的原子团和化学键的存在,从相对强度的变化能够确定化学键的含量,而物质化学环境的变化则会引起拉曼特征频率的微小位移,从特征频率位移的大小和方向能判定原子团和化学键所处化学环境的变化。本实验分别采用拉曼光谱技术和脂质过氧化检测方法对亚油酸的氧化反应过程进行监测,对亚油酸自氧化过程进行中的中间产物共轭二烯和过氧化产物丙二醛(MDA)含量,和底物的拉曼光谱进行分析,研究亚油酸自氧

① 农业部农业公益性行业科研专项经费项目“核技术农业应用”资助(200803034);国家自然科学基金项目资助课题(10505018)

② 联系人,手机:(0)13017689632;15903652959;E-mail:jinhushen@163.com;wwd413@zzu.edu.cn

作者简介:沈金虎(1982—),男,山东省平邑县人,在读硕士研究生,主要从事辐射生物物理研究工作。

王卫东(1976—),男,河南省正阳县人,副教授,主要从事辐射生物物理研究工作。

化的时间效应。

2 实验部分

2.1 实验仪器与试剂

Renishaw 2000 激光共焦显微拉曼光谱仪(英国Renishaw 公司);TU-1901 型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)。

亚油酸 $C_{18}H_{32}O_2$ (美国Sigma 公司, 浓度 $\geq 99\%$) 样品的分子结构见图 1, 无水乙醇(C_2H_5OH), 氢氧化钠($NaOH$), 硫代巴比妥酸(TBA, $C_4H_4N_2O_2S$, 浓度 $\geq 98\%$), 三氯乙酸(CCl_3COOH , 浓度为 99%), 所用试剂均为分析纯。实验用水为三蒸水与双蒸水。



图 1 亚油酸分子的结构式

2.2 样品制备

亚油酸样品采用 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 溶液, 参照 S. N. Chatterjee 和 Sanjiv Agarwa^[4] 的方法并略有改动。将亚油酸和无水乙醇以所需的摩尔比混合, 分别取 1mL 置于直径为 3cm 的玻璃培养皿中, 放在密闭玻璃容器中用循环水式真空泵抽真空, 待溶剂挥发完全亚油酸在玻璃皿底部成膜后, 置于真空中试验备用。另取亚油酸 $5 \mu\text{L}$ 置于铝制样品台上, 在放置 0、1、2、3、4 天进行拉曼光谱分析, 闲置期间室温避光保存。

2.3 检测方法

2.3.1 MDA 含量检测过程

用硫代巴比妥酸法来检测亚油酸的氧化反应过程, 是参照 Ming-Kuei Shih 和 Miao-Lin Hu^[5] 的方法进行改进的。在 1mL 的样品中加入 1mL 的 TBA 和 1mL 2.5% 的三氯乙酸(TCA), 于沸水浴中加热 10min。冷却后以 12400r/min 离心 10min, 用微量移液枪取下层溶液, 在 532nm 处测量过氧化产物丙二醛(MDA)的摩尔吸光的吸光值(MDA 的摩尔吸光率为 $1.56 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)^[6,7]。

2.3.2 共轭二烯含量检测过程

不饱和脂肪酸的侧链氧化过程中伴随有共轭二烯的形成, 该共轭体系在 230—235nm 波长范围内具有很强的吸收。因此, 可以通过对共轭二烯含量的测定来检测亚油酸的氧化反应进程。用分光光度计在 233nm 测量样品中双键的摩尔吸光值。双键的浓度可以根据双键摩尔浓度因数计算求出(双键的摩尔吸光率为 $3.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)^[8,9]。

2.3.3 拉曼光谱法检测亚油酸的自氧化过程

测量时采用 532nm 激光光源, 物镜为 50 倍长焦距镜头, 光栅 1800 m^{-1} , 积分时间为 120s 1 次, 扫描范围为 200—3500 cm^{-1} , 用激光拉曼光谱仪自带软件去除宇宙锋的干扰, 在 Origin 软件上进行作图, 所有寻峰均在相同参数下进行。

3 实验结果与分析

3.1 存放不同时间的亚油酸的共轭二烯含量

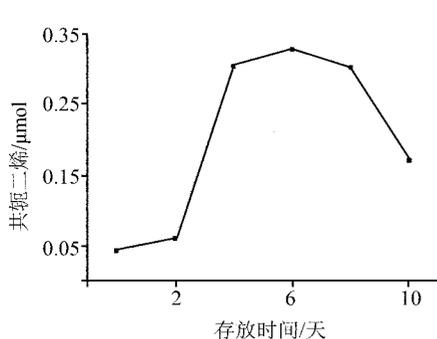


图 2 不同存放时间的亚油酸共轭二烯含量

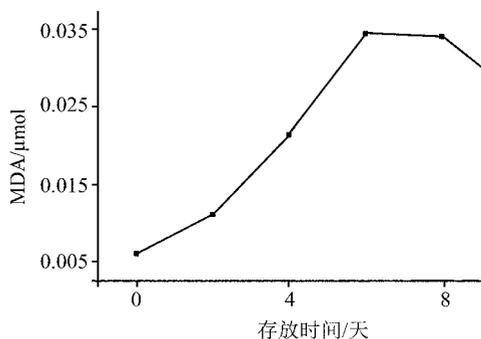


图 3 不同存放时间的样品 MDA 含量

如图 2 可以看出共轭二烯的含量从第 2 天开始出现急剧增加, 反应延续至第 4 天后共轭二烯的含量趋于稳定, 反应至 8 天后共轭二烯的产生量减小说明样品的自氧化进程进入尾声。

3.2 存放不同时间的亚油酸的 MDA 含量

作为不饱和脂肪酸氧化的最终产物其含量的变化能代表不饱和脂肪酸的氧化程度。由图 3 可以看出 MDA 的生成时间要比共轭二烯晚, 但是其含量从第 2 天开始就有明显增加, 当反应进行 8 天后, 其含量逐渐变小说明氧化进程接近尾声。

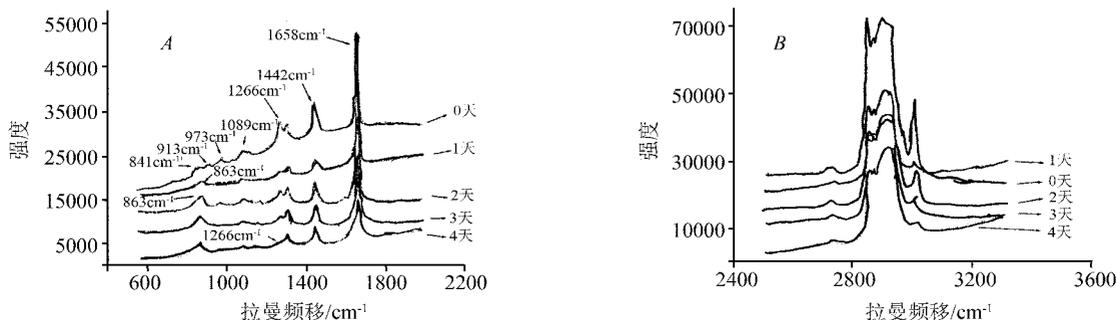


图 4 亚油酸自氧化过程的拉曼光谱

A —— 光谱范围 550—2000 cm^{-1} ; B —— 光谱范围 2600—3300 cm^{-1} 。

3.3 存放不同时间的亚油酸的拉曼光谱

如图 4 可以看出, 存放不同时间的亚油酸的拉曼光谱图无论在谱型还是在强度上都发生了明显的变化, 峰型的变化说明露置于空气中的亚油酸在有氧条件下发生自氧化。而对于峰强的变化主要来自两个方面, 一方面是亚油酸的结构的变化, 使得某些官能团的含量减少引起的; 另一方面是由各剂量组样品制备和测试条件(机器的状态、测试时间)的差异性引起的。因此, 为了尽量排除外环境因素的干扰, 我们采用内标法对峰强的变化进行分析^[10], 以相对稳定的 $\delta(\text{CH}_2)$ 的特征峰 1442cm^{-1} 作为内标, 用相对强度分析拉曼谱线的强度。如图 4 所示, 标志 C—C 伸缩振动的 841cm^{-1} 和标志 C—O 伸缩振动的 913cm^{-1} 处的多峰在放置 1 天后消失, 说明从反应进行到第 1 天起亚油酸就在自由基作用下使碳链重排, 导致代表 C—C 伸缩振动 1089cm^{-1} 处的峰包的相对强度逐渐降低, $\delta(\text{=CH})$ 的特征峰 1266.2cm^{-1} 峰消失(如图 5), 说明 C=C 消失或者含量减小至不可测范围。 $\nu(\text{C}=\text{C})$ 和羧酸中 C=O 的标志峰 1658cm^{-1} 的强度先增大再减小(如图 6), 是由于在反应初期由于碳

链的重排和羧酸的生成使其增大,在反应后期在有氧条件下羧基和反应生成的羟基酸、羟基醛脱水,使羧基 $C=O$ 含量减小,致使其强度减小。 $=CH$ 的标志峰 3014.1cm^{-1} 处相对峰强在第1天出现增大后推移逐渐减小(如图7)。结果表明,拉曼光谱技术能够从总体上展现底物结构的变化。

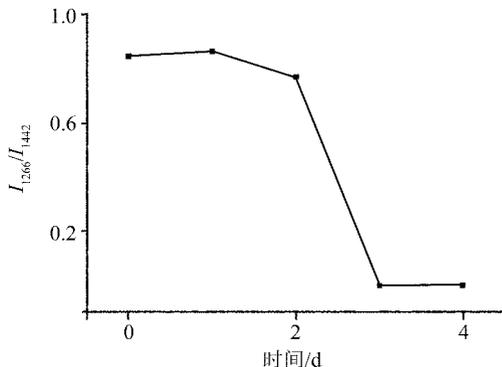


图 5 相对强度 I_{1266}/I_{1442} 随时间的变化

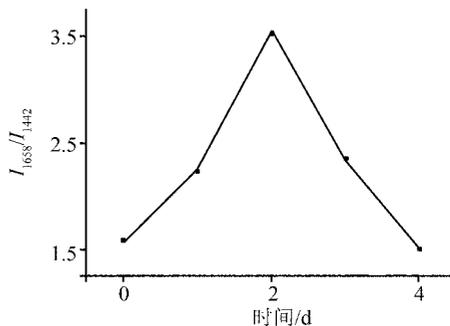


图 6 相对强度 I_{1658}/I_{1442} 随时间的变化

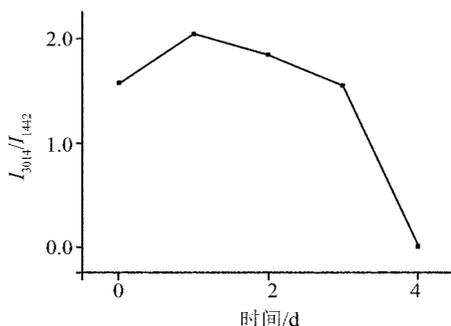


图 7 相对强度 I_{3014}/I_{1442} 随时间的变化

4 结论

本文从亚油酸自氧化反应的产物生成和反应底物的结构变化2个角度出发,分别采用拉曼光谱分析方法、TBA法和共轭二烯法监测亚油酸自氧化反应过程。结果表明:拉曼光谱技术能够用来检测分子材料的结构变化。随着自氧化过程的展开,亚油酸的拉曼光谱从峰型和峰强两方面均存在变化。拉曼光谱技术能够弥补TBA法和共轭二烯法不足,排除了共轭二烯和MDA来源的不确定性,能够灵敏有效地对不饱和脂肪酸的氧化过程进行检测。

参考文献

- [1] Stark G. The Effect of Ionizing Radiation on Lipid Membranes[J]. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)*, 1991, **1071**(2): 103—122.
- [2] 夏寿萱. 放射生物学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 35.
- [3] 汤丽霞, 沈恂. 生物系统中脂质过氧化检测方法的评述[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1995, **22**(2): 108—111.
- [4] 杨垂绪, 梅曼彤. 太空放射生物学[M]. 广州: 中山大学出版社, 1995. 7.
- [5] Nagarsenker M S, Vaishali Y L, Nadkarni G D. Preparation and Andevaluation of Liposomal Formation of Tropicamide for Ocular Delivery[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, **190**: 63—71.
- [6] Ming-Kuei S, Miao-Lin H. Relative Role of Metal Ions and Singlet Oxygen in UVA-Induced Liposomal Lipid Peroxidation[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1999, **77**: 225—230.

- [7] Sujak A, Gabrielska J, Grudzinski W *et al.* Lutein and Zeaxanthin as Protectors of Lipid Membranes Against Oxidative Damage: The Structural Aspects[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, **371**(2): 301—307.
- [8] Yang T, Mei M, George K. DNA Damage and Repair in Oncogenic Transformation by Heavy Ion Radiation[J]. *Adv. Space Res.*, 1996, **18**(1/2): 149—158.
- [9] Cui F Z, Lin Y, Zhang D M *et al.* Irradiation Effect on Secondary Structure of Protein Induced by Kev Ions[J]. *Radiat Phys. Chem.*, 2001, **60**(1—2): 35—38.
- [10] 吴小琼, 郑建珍, 刘文函等. 激光拉曼光谱内标法测定葡萄糖液浓度[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(7): 1344—1346.

Application of Raman Spectroscopy for Lipid Peroxidation

SHEN Jin-Hu WANG Ya-Li^a WANG Jun-Ling WANG Wei-Dong QIN Guang-Yong

(Henan Province Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, College of Physical Science & Technology,

Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, P. R. China)

^a(Department of Physics, Zhengzhou Teachers College, Zhengzhou 450044, P. R. China)

Abstract Taking linoleic acid as the material, linoleic acid oxidation process of self-monitoring was monitored by peroxidation product detecting method and Raman spectra. Self-oxidation process of linoleic acid was analyzed in two angles, the oxidation of production and substrate structural changes. It provides experimental evidence for peroxidation study of unsaturated fatty acid. The results showed that Raman spectroscopy can be used to study single-molecule substance structural changes. With the auto-oxidation process carrying out, the Raman spectra of linoleic acid changes both in spectral pattern and peak intensity. All these changes can reflect the changes in the structure of linoleic acid. Time effect detecting by Raman spectrum is mainly same as that using TBA and conjugated diene method measuring.

Key words Linoleic Acid; Raman Spectra; TBA Method; MDA

这真是令人啼笑皆非——重大发明创造被视为“旧货”!

欢迎作者将被退稿佳作, 再投本刊

在 20 世纪的科技成就中, 激光可算是重大发明创造之一。第一台激光器是 1960 年由美国物理学家梅曼 (见《邮票上的科学家——佼佼者之路》中之 M4) 研制出来的。然而《物理评论快报》却拒绝刊登梅曼的论文, 理由是: 这是微波激射物理学方面的文章, 对快速出版物不再有价值。这真是令人啼笑皆非!

接着, 梅曼将论文寄到了英国《自然》杂志, 这篇 300 字的简短文章立即被接受。发表后引起全世界轰动。后来, 梅曼被列入了美国发明家名人堂。

为了吸取历史教训, 本刊收到的论文, 即使其观点与审稿人有尖锐的意见冲突, 只要是言之有理, 也给予发表。因为“仁者见之谓之仁, 智者见之谓之智”(《周易·系辞上》), 不同人从不同角度看问题, 难免不同。我们欢迎作者将被退稿佳作, 再投本刊。

光谱实验室编辑部