

紫外辐射对亚油酸氧化反应影响的拉曼光谱分析

王卫东, 沈金虎, 王俊玲, 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, 河南 郑州 450052

摘要 应用拉曼光谱技术, 分析了亚油酸自氧化过程及紫外辐照对亚油酸氧化反应的影响。结果表明: $\delta(\text{=CH})$ 的特征峰 $1\ 266\ \text{cm}^{-1}$ 和 (=CH-H) 中 C—H 伸缩振动标志峰 $3\ 014\ \text{cm}^{-1}$ 的强度逐渐减小并随着时间的延长而消失, 说明随着氧化反应的进行双键消失或者含量减小; $\nu(\text{C=C})$ 和羧酸中 C=O 振动的标志峰 $1\ 658\ \text{cm}^{-1}$ 的强度先增大再减小, 说明在反应初期由于碳链的重排和羧酸的生成使其增大, 在反应后期亚油酸中的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。紫外辐照加快了氧化反应的启动, 提高了氧化反应的速度。实验结果说明拉曼光谱谱峰变化能表征脂肪酸氧化过程中基团的变化以及辐射处理对脂类物质氧化的影响, 为脂质过氧化反应机理的研究提供了一种行之有效的研究手段。

关键词 拉曼光谱; 亚油酸; 紫外辐照; 特征峰

中图分类号: O433.4 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)11-2989-04

引言

拉曼散射是由分子振动、固体中的光学声子等元激发与激发光相互作用产生的非弹性散射, 由印度物理学家拉曼 (Raman) 于 1928 年发现^[1]。20 世纪 60 年代以后, 随着激光技术的出现, 加上分光、探测等实验设备和计算机技术的进步, 拉曼光谱技术获得了突飞猛进的发展。现如今, 拉曼光谱技术不仅在物理学、化学方面占据着很重要的地位, 而且在材料科学、医学、生物学等领域成为不可缺少的实验研究方法或常规的鉴定手段。

生物样品中大多数含有水, 水对拉曼效应影响非常小, 因而拉曼光谱技术在生物样品检测中比其他方法更具有优越性从而得到广泛的应用^[2]。特别在 DNA (deoxyribonucleic acid)、蛋白质、糖类生物大分子研究上, 由于其结构相对简单, 相对容易解谱率先应用该项技术。柯惟中研究小组得到了小牛胸腺 DNA 的拉曼光谱以及不同 PH 值、不同处理时间紫外辐照对 DNA 影响的拉曼光谱的变化^[3]。刘刚等通过检测胆结石中蛋白质的表面增强拉曼光谱得到了组成蛋白质的各种氨基所对应的特征峰^[4]; 周殿凤等通过对紫外辐射后牛血清白蛋白的拉曼光谱分析得到不同硫硫键构型对应的特征峰^[5]。基于对 DNA 和蛋白质的拉曼光谱分析, 研究者还尝试采用拉曼光谱检测肿瘤细胞和正常细胞, 以期实现对癌症的早期诊断^[6]。

在生物大分子中, 有关构成生物膜的脂肪酸的研究越来越被重视。其研究重点主要集中在多不饱和脂肪酸过氧化方面, 目前的研究认为脂质过氧化是许多中毒过程的起点, 甚至可能是致癌、致畸及致突变的重要环节之一。而且研究表明环境胁迫、辐射均能启动和加速脂肪酸过氧化。东野广智等用拉曼光谱技术分析亚麻油酸的拉曼和红外光谱并对其组分以及含量进行研究, 说明该项技术能够应用于脂肪酸的结构分析。作者尝试采用拉曼光谱技术分析脂肪酸自氧化以及紫外线辐照后样品物质结构的变化, 研究脂肪酸氧化过程中结构的动态变化过程。

1 实验与数据收集

1.1 实验材料与仪器

实验材料为亚油酸 $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (linoleic acid, 购自 Sigma 纯度为 $\geq 99\%$), 其分子结构式见图 1。其他试剂为分析纯。英国 Renishaw 激光共焦显微拉曼光谱仪(由郑州大学材料物理重点实验室提供)。

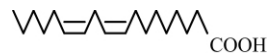


Fig 1 Structure of linoleic acid

1.2 样品处理

本试验紫外辐照处理采用波长为 254 nm、功率为 40 W

收稿日期: 2010-01-15, 修订日期: 2010-05-30

基金项目: 农业部公益性行业科研专项经费项目(200803034)和国家自然科学基金项目(10505018)资助

作者简介: 王卫东, 1976 年生, 郑州大学物理工程学院副教授 e-mail: wwd413@zzu.edu.cn

的国产紫外灯管,通过调节照射时间和样品距紫外灯管的距离,即可得到不同的照射剂量($\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$)和剂量率($\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$)辐照,取 $5 \mu\text{L}$ 亚油酸置于铝块上,放在紫外灯正下方进行照射,辐照剂量率为 $8.33 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$,分别接受 0(对照), 15, 30, 45, $60 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的辐照处理,测量闲置期间遮光保存。

1.3 拉曼光谱观察及数据处理

分别取未辐照和辐照后的亚油酸放于拉曼光谱仪样品台上,进行光谱测量,测量间隙对样品进行遮光保存。测量时采用波长为 532 nm 的激光光源,物镜为 50 倍长焦距镜头,光栅 1800 mm^{-1} ,积分时间为 $120 \text{ s} \cdot \text{次}^{-1}$,扫描范围为 $200 \sim 3500 \text{ cm}^{-1}$,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,所有的寻峰均在相同参数下进行。

2 结果分析

2.1 亚油酸的拉曼光谱

亚油酸结构简单,分子中只包含甲基($-\text{CH}_3$)、亚甲基($-\text{CH}_2-$)、羧基($-\text{COOH}$)等官能团,化学键只有碳碳单键($-\text{C}-\text{C}-$)、碳碳双键($-\text{C}=\text{C}-$)、碳氢键($-\text{C}-\text{H}$)、碳氧双键($\text{O}=\text{C}-$)、羟基($-\text{OH}$)、碳氧单键($\text{C}-\text{O}$)。可以通过这些官能团的特征频率的位置来判定在亚油酸分子中各官能团的的振动频率所在。图 2 为亚油酸在 532 nm 激光光源下的拉曼光谱图。从图中可以看出亚油酸的谱带主要由 $843, 913, 972, 1089, 1266, 1304, 1442, 1658, 2730, 2856, 2876, 2902, 3014 \text{ cm}^{-1}$ 构成,这些可作为亚油酸的特征谱带(谱峰归属见表 1)。在亚油酸的氧化过程中,本实验主要观察 $\text{C}-\text{C}$ 骨架伸缩振动的特征峰 $841, 943, 1089 \text{ cm}^{-1}$, $\delta(\text{=CH})$ 振动的特征峰 1266 cm^{-1} , $\nu(\text{C}=\text{C})$ 和羧酸中 $\text{C}=\text{O}$ 的振动特征峰 1658 cm^{-1} , $=\text{CH}$ 中 $\text{C}-\text{H}$ 振动的特征峰 3014 cm^{-1} 的变化情况。

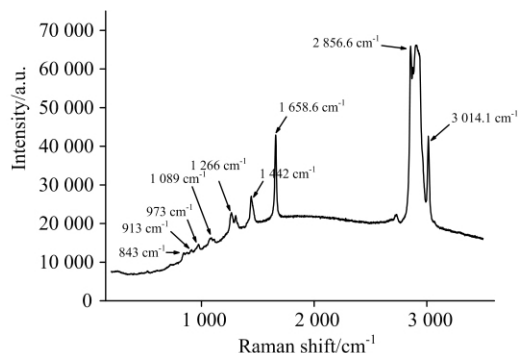


Fig 2 Raman spectrum of linoleic acid

2.2 亚油酸自氧化过程的拉曼光谱

如图 3 可以看出,放置不同时间的亚油酸的拉曼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变化引起的;另一方面是由测试

Table 1 Assignments of Raman lines to vibrations of linoleic acid^[1,7,8]

拉曼频移/ cm^{-1}	振动归属
800~920	$\nu(\text{C}-\text{C})$
913	$\nu(\text{C}-\text{O})$
972	
1089	$\nu(\text{C}-\text{C})_g$ aliphatic $\text{C}-\text{C}$ stretch in gauche
1266	$\delta(\text{=CH})$
1304	$\delta(\text{CH}_2)_{\text{tw}}$ Methylene twisting deformations
1442	$\delta(\text{CH}_2)_{\text{sc}}$ Methylene scissor deformations
1658	$\nu(\text{C}=\text{C})$ 和羧酸中 $\text{C}=\text{O}$
2730	
2856	symmetric aliphatic $\text{C}-\text{H}$ stretch $\nu_{\text{sym}}(\text{C}-\text{H})$
2926(2909)	asymmetric aliphatic $\text{C}-\text{H}$ stretch $\nu_{\text{asym}}(\text{C}-\text{H})$
3014	asymmetric olefinic $\text{C}-\text{H}$ stretch $\nu_{\text{asym}}(\text{C}=\text{H})$

ν : Stretching vibration; δ : Deformation vibration; Sym: Symmetric; Asym: Asymmetric; g: gauche; tw: twisting deformations; sc: scissor

条件(机器状态、测试时间)的差异引起的。因此,为了尽量排除外部环境因素的干扰,采用内标法对峰强的变化进行分析,以相对稳定的 $\delta(\text{CH}_2)$ 的特征峰 1442 cm^{-1} 作为内标,用相对强度分析拉曼谱峰的强度变化。如图 4 所示, $\delta(\text{=CH})$ 的特征峰 1266 cm^{-1} 在存放 96 h 后消失,说明随着氧化反应的进行双键消失或者含量减小; $\nu(\text{C}=\text{C})$ 和羧酸中 $\text{C}=\text{O}$ 的标志峰 1658 cm^{-1} 的强度先增大再减小,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,在反应后期亚油酸中的羧基和反应生成的羟基酸、羟基醛脱

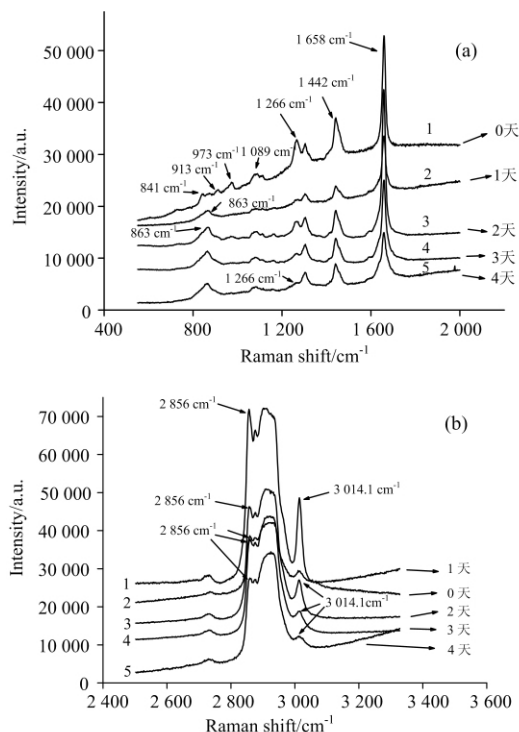


Fig 3 Raman spectrum of linoleic acid under different time

(a): $550 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$, (b): $2500 \sim 3300 \text{ cm}^{-1}$;
1: 0 h; 2: 24 h; 3: 48 h; 4: 72 h; 5: 96 h

水, 使羧基 C=O 官能团含量减小, 致使其强度减小。位于 841, 913~973 cm^{-1} 处的多峰在放置 72 h 后消失, 反应 24 h 后在 863 cm^{-1} 处出现相对强度较大的一个峰; =C—H 中 C—H 伸缩振动的标志峰 3 014 cm^{-1} 的强度在 24 h 后逐

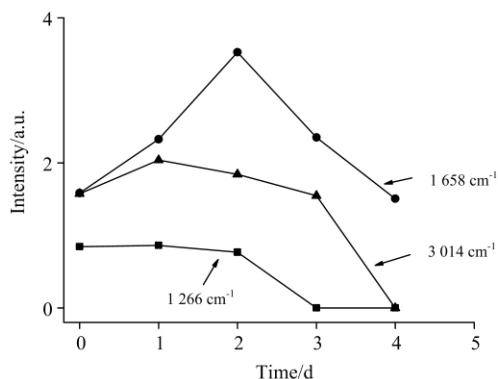


Fig 4 Relative intensity ratio of different peaks with different time in self-peroxidation(Relative to 1 442 cm^{-1})

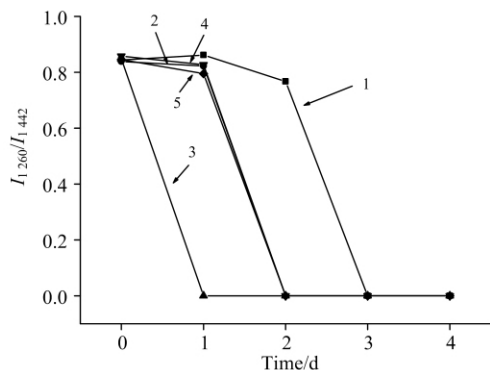


Fig 5 Relative intensity ratio of I_{1266}/I_{1442} with different dose

Inadiation dose: 1: 0; 2: 15 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (0.5 h); 3: 30 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (1 h); 4: 45 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (1.5 h); 5: 60 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (1 h)

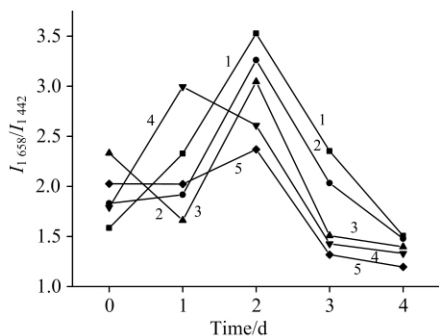


Fig 6 Relative intensity ratio of I_{1658}/I_{1442} with different dose

Inadiation dose: 1: 0; 2: 15 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (0.5 h); 3: 30 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (1 h); 4: 45 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (1.5 h); 5: 60 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (1 h)

渐减小, 并在反应至 96 h 消失, 这些变化均为碳链的重排造成的。

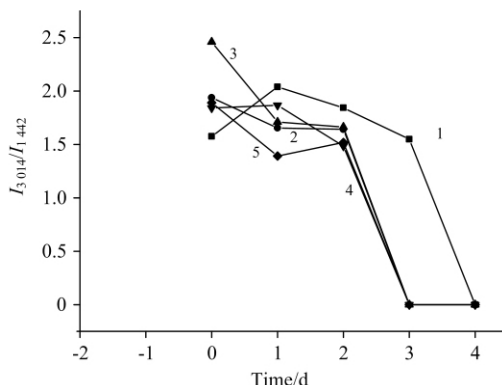


Fig 7 Relative intensity ratio of I_{3014}/I_{1442} with different dose

Inadiation dose: 1: 0; 2: 15 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (0.5 h); 3: 30 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (1 h); 4: 45 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (1.5 h); 5: 60 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ (1 h)

2.3 紫外辐照对亚油酸过氧化影响

不同剂量的紫外辐照对亚油酸的氧化反应均产生影响。总体上紫外辐照加速了亚油酸的氧化, 其中 1.5 h 辐照效果最明显 (如图 5, 6, 7)。经 0.5, 1.5, 2 h 紫外辐照使 $\delta(\text{=CH})$ 形变振动的标志峰 1 266 cm^{-1} 峰的消失时间由未辐照的 72 h 缩短为 48 h, 辐照 1 h 的样品在反应至 24 h 就已经消失; $\nu(\text{C=C})$ 和羧酸中 C=O 的标志峰 1 658 cm^{-1} 强度增大时间提前; =CH 中 C—H 振动特征峰 3 014 cm^{-1} 的消失时间提前了 24 h, 辐照后样品 841, 913, 973 cm^{-1} 处多峰消失时间和 867 cm^{-1} 尖峰的出现时间分别提前 48 和 24 h。

3 结 论

本实验采用拉曼光谱技术对亚油酸的自氧化过程以及紫外辐射诱导的亚油酸氧化过程进行检测。结果表明: 拉曼光谱技术能够用来检测分子材料在自氧化和诱导氧化过程的结构变化, 较其他检测方法具有无需制样, 灵敏高效、简单快速的优势。亚油酸在自氧化过程中随着存放时间的推移, C—C 骨架伸缩振动的特征峰 841 cm^{-1} 被在 867 cm^{-1} 处相对强度较大的 C—C 骨架伸缩振动取代; C—O 伸缩振动的特征峰 913 cm^{-1} , 随着氧化反应的进行消失; $\delta(\text{=CH})$ 振动的特征峰 1 266 cm^{-1} 在氧化过程中随存放时间的推移消失; $\nu(\text{C=C})$ 和羧酸中 C=O 的标志峰 1 658 cm^{-1} 的强度先增大再减小; =CH 中 C—H 的特征峰 3 014 cm^{-1} 处相对峰强在第一天后逐渐减小, 并在 96 h 后消失。不同剂量的紫外辐照对亚油酸的氧化过程均有影响, 总体上紫外辐照加快了氧化反应的启动, 增大了氧化反应的速度。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Ming-sheng(张明生). Laser Light Scattering Spectroscopy(激光光散射谱学). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2008.
- [2] XU Yi-ming(许以明). Raman Spectroscopy and Its Application in Structural Biology(拉曼光谱及其在结构生物学中的应用). Beijing Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2005.
- [3] HENG Hang, KE Wei-zhong, JI Kang(衡 航, 柯惟中, 籍 康). Journal of Nanjing Normal University(Natural Science)(南京师大学报·自然科学版), 2006, 29(4): 46.
- [4] LIU Gang, XING Da, WANG Hai-min(刘 刚, 邢 达, 王海珉). Acta Optica Sinica(光学学报), 2002, 22(4): 441.
- [5] ZHOU Dian-feng, KE Wei-zhong, HENG Hang(周殿凤, 柯惟中, 衡 航). Chinese Journal of Light Scattering(光散射学报), 2006, 18(3): 241.
- [6] YAN Xun-ling, DONG Rui-xin, WANG Qiu-guo, et al(闫循领, 董瑞新, 王秋国, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(1): 58.
- [7] Beattie Renwick J. Lipids, 2004, 39(5): 407.
- [8] Lawson E E. Spectrochimica Acta, Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1998, 54: 543.

Raman Spectroscopy Analysis of Impact of UV Radiation on Linoleic Acid Oxidation

WANG Wei-dong, SHEN Jin-hu, WANG Jun-ling, QIN Guang-yong

Henan Province Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, College of Physical Science & Technology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract The authors studied on self oxidation of linoleic acid and the effect of UV irradiation on oxidation of linoleic by Raman spectroscopy. The result reflects that; the intensity of $1\ 266\ \text{cm}^{-1}$ which stands for $=\text{CH}$ oleic hydrogen in-plane bend is diminished, and it disappeared at 72 hours after the oxidation beginning. That indicates that double bond was lost or reduced. $\nu(\text{C}=\text{C})$ and the carboxylic acid $\text{C}=\text{O}$ vibrations are lies in $1\ 658\ \text{cm}^{-1}$. The intensity of $1\ 658\ \text{cm}^{-1}$ was increased in the beginning and decreased then. At the initial stage in the reaction, rearrangement of carbon chains and the formation of carboxylic acids caused the increasing. Later in the reaction, carboxyl of linoleic acid reacted with the generated hydroxy acids, hydroxy aldehyde. So it decreased. UV irradiation accelerated the oxidation reaction starting, increased the speed of the oxidation reaction. All the result shows that the changes of Raman spectroscopy indicate the changes of bulky group in fatty acid oxidation process and the effect of UV irradiation. It provides an effective research tool for the mechanism of lipid peroxidation reaction.

Keywords Raman spectroscopy; Linoleic acid; UV irradiation; Characteristic peaks

(Received Jan. 15, 2010; accepted May 30, 2010)