

荧光光谱法研究羟基自由基诱导的酪氨酸氧化

孙艳辉, 王卫龙, 吴霖生, 贾小丽

滁州学院化学与生命科学系, 安徽 滁州 239012

摘要 二酪氨酸是酪氨酸氧化的标志性产物。为研究影响羟基自由基诱导酪氨酸氧化的因素, 采用同步荧光光谱结合二维相关技术研究羟基自由基诱导酪氨酸氧化的反应过程。结果表明: pH 变化时, 二酪氨酸的荧光峰位、峰强发生变化。在羟基自由基诱导酪氨酸氧化体系中, 随着酪氨酸浓度的增加, 二酪氨酸产量升高; 随着过氧化氢浓度的增加, 二酪氨酸产量降低; 酸性条件下, 该反应易于发生, 碱性条件下该反应难以发生; 随着反应的进行, 二酪氨酸荧光强度先增加后减小。二维同步荧光光谱相关分析表明, 292 nm 处荧光强度的变化快于 281, 300 和 374 nm 处荧光强度的变化。因此, 荧光光谱法研究羟基自由基诱导酪氨酸氧化, 简单可行。

关键词 荧光光谱; 酪氨酸; 二酪氨酸; 羟基自由基; 二维相关光谱

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2011)07-1838-04

引言

活性氧是由氧直接或间接转变生成的氧自由基及其衍生物, 包括: 超氧阴离子自由基及脂质自由基和脂质过氧化物等^[1]。活性氧导致含脂食品氧化、人体生理病变^[2, 3]。酪氨酸(tyrosine, Tyr)易被活性氧攻击氧化生成二聚酪氨酸(dityrosine, DT), 其含量已作为分析氧化状态的良好指标^[4]。羟基自由基可由 Fe^{2+} 和 H_2O_2 反应产生, 具有很强的氧化性, 其氧化能力仅弱于氟。酪氨酸在羟基自由基的作用下发生的氧化反应比较复杂, 生成二酪氨酸进而转化为多巴、多巴胺、多巴醌甚至三聚酪氨酸等, Feda 等采用高效液相色谱、质谱等技术研究了羟基自由基诱导酪氨酸氧化的反应历程^[5]。酪氨酸及其产物具有荧光特征, 荧光光谱法具有操作简单、灵敏度高和检验参数比较全面的特点。因此, 可以采用荧光光谱法研究酪氨酸氧化反应。

二维相关光谱起源于 30 年前的核磁共振(NMR) 领域, 它是通过多脉冲技术激发核自旋, 采集时间域上原子核自旋弛豫过程的衰减信号, 经双傅里叶变换得到的。其显著的特点是将光谱信号扩展到第二维上以提高光谱分辨率, 简化含有许多重叠峰的复杂光谱, 通过选择相关的光谱信号鉴别和研究分子内和分子间的相互作用。这种二维相关图谱反映的是一个化学体系内部, 各种组成成份或者微观结构单元相应于外界微扰的变化情况, 以及这些变化之间相互的联

系^[6, 7]。

二维相关光谱结合红外分析技术已经广泛用于中药品质控制、化学反应等分析研究^[8], 而二维相关光谱在荧光研究领域的应用较少^[9, 10]。

本文中采用荧光光谱法研究羟基自由基诱导的酪氨酸氧化, 分别考察酪氨酸浓度、过氧化氢浓度、pH 值对二酪氨酸产量的影响, 并以反应时间为外扰, 二维相关同步荧光光谱技术分析了氧化反应进程。该研究为采用荧光光谱法考察酪氨酸氧化提供了有价值的实验数据和理论依据。

1 实验部分

1.1 仪器和参数设置

采用 Cary Eclipse 荧光分光光度计, VARIAN 有限公司。1 cm 石英比色池, 激发狭缝 5 nm, 发射狭缝 10 nm, 扫描速度 $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 间隔 0.2 nm。

1.2 试剂与方法

采用超纯水配制 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酪氨酸标准贮备液、 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸亚铁标准贮备液、 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 过氧化氢标准贮备液, 避光保存。根据试验需要配制成工作液。

首先分别向 100 mL 容量瓶中加入 70 mL 的超纯水, 立即吹氮气 10 min 以驱除溶液中的氧气, 分别向其中加入 10 mL 的酪氨酸工作液和 10 mL 的硫酸亚铁工作液, 最后向其中加入 10 mL 的过氧化氢工作溶液, 启动反应。37 °C 温育,

收稿日期: 2010-08-26, 修订日期: 2010-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30901129)和安徽省应用化学重点建设学科基金项目(200802187C)资助

作者简介: 孙艳辉, 1978 年生, 滁州学院化学与生命科学系副教授

e-mail: syh2004@126.com

定时取 10 mL 反应液, 加 1 滴 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 溶液终止反应, 测定激发光谱、发射光谱和同步荧光光谱。

1.3 数据处理

采用 Origin Pro 8.0 软件作图, 2D shige 软件进行二维相关分析。

2 结果与讨论

2.1 荧光激发、发射光谱

图 1 为酪氨酸 ($1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和不同 pH 时的二酪氨酸 ($0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的激发光谱和发射光谱。如图所示, 酪氨酸具有在 280 nm 最大激发, 303 nm 最大发射的特征荧光峰。而二酪氨酸具有显著不同的荧光特征, pH 为酸性时, 二酪氨酸具有 292 nm 最大激发 410 nm 最大发射的荧光特征; pH 为中性时峰位不变, 峰强变弱; pH 为碱性时二酪氨酸不仅峰位明显变化, 从 292 nm 最大激发、410 nm 最大发射变成 325 nm 最大激发、410 nm 最大发射, 并且峰强显著增大。这可能是由于碱性条件下, 二酪氨酸的构象发生变化引起最大激发峰红移。这和 Giulivi 与 Davies 研究的结果是一致的^[11]。

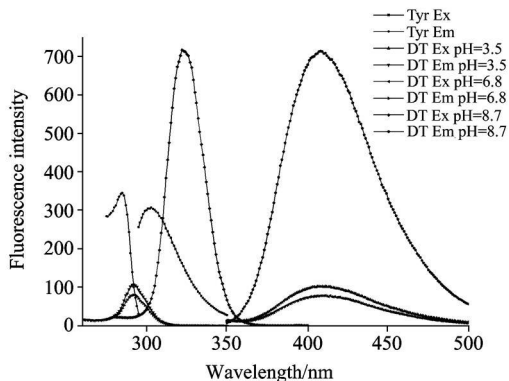


Fig 1 Fluorescence excited spectra and emission spectra of tyrosine ($0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and dityrosine ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) at different pH value

2.2 酪氨酸浓度的影响

同步荧光光谱具有谱图简化、选择性提高、光散射干扰减少等特点, 尤其适合对多组分混合物的分析。在后续的试验中, 采用同步荧光光谱法研究影响二酪氨酸产量的各种因素。

图 2 为羟基自由基诱导酪氨酸氧化反应体系的同步荧光光谱 ($\Delta\lambda = 120 \text{ nm}$, pH 6.8, $t = 20 \text{ min}$) 随酪氨酸浓度变化的趋势图。可以看出, 随着反应体系中酪氨酸浓度的增加, 二酪氨酸荧光强度逐渐增加, $0.9, 1.2, 2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酪氨酸对应的荧光同步光谱强度分别为 142, 463 和 681 a.u.。这可能是因为, 反应体系中羟基自由基一定时, 随着酪氨酸浓度的增加, 参与反应的酪氨酸浓度也在增加, 因此, 产生二酪氨酸的量也在增加。

2.3 过氧化氢含量的影响

图 3 为羟基自由基氧化酪氨酸体系的同步荧光光谱 ($\Delta\lambda$

$= 120 \text{ nm}$, pH 6.8, $t = 20 \text{ min}$) 随过氧化氢浓度变化的趋势图。由图可见, 当过氧化氢浓度增加时, 二酪氨酸荧光强度逐渐减小。这可能是由于过氧化氢过量, 产生的羟基自由基能继续和生成的二酪氨酸反应, 产生新的物质, 图 3 中 374 nm 处荧光强度的上升也证实了这一现象。

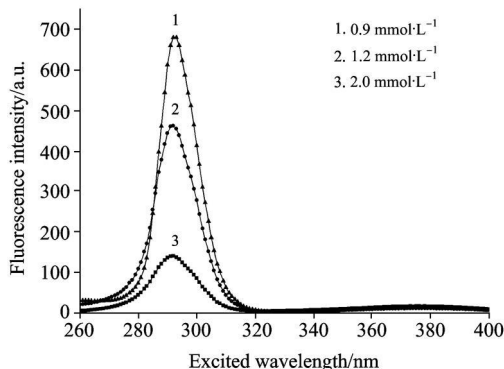


Fig 2 Effect of tyrosine concentration on the synchronous fluorescence intensity of dityrosine

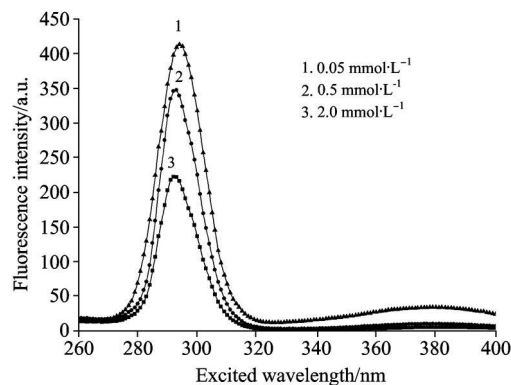


Fig 3 Effect of hydrogen peroxide concentration on the synchronous fluorescence intensity of dityrosine

2.4 pH 的影响

图 4 为羟基自由基诱导酪氨酸氧化体系同步荧光光谱在不同 pH 值时的趋势图 (酸性、中性条件 $\Delta\lambda = 120 \text{ nm}$ 、碱性条件 $\Delta\lambda = 90 \text{ nm}$, $t = 20 \text{ min}$)。由图中可以发现, 随着 pH 值

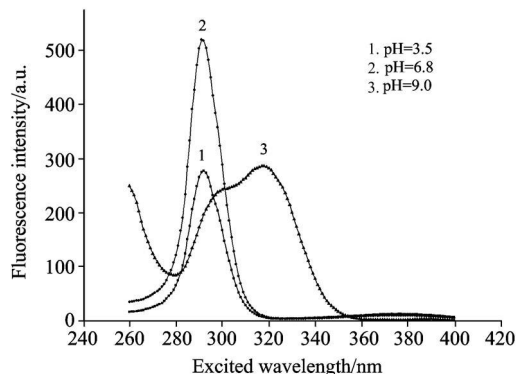


Fig 4 Effect of pH value on the synchronous fluorescence intensity of dityrosine

的升高,二酪氨酸荧光强度先升高后降低,中性条件下产生的二酪氨酸最多。这主要是因为酸性条件下,易于生成羟基自由基,产生的二酪氨酸被转为多巴等物质;中性条件下产生的羟基自由基减少,未能过多的攻击二酪氨酸产生其他物质,而碱性条件下,生成羟基自由基的量较少,产生的二酪氨酸较少。这和金鸣等人关于 Fenton 体系 pH 值影响羟基自由基产量的研究结果相一致^[12]。

2.5 反应时间的同步荧光光谱图

图 5 为羟基自由基诱导酪氨酸氧化体系的同步荧光光谱 ($\Delta\lambda=120\text{ nm}$, pH 6.8) 随时间的变化图,从图中可以看出,二酪氨酸的荧光强度先升高后降低,在第 20 min 时荧光强度达到最大值。这主要是因为羟基自由基攻击酪氨酸产生二酪氨酸,随后,二酪氨酸在羟基自由基的作用下又产生了其他物质。

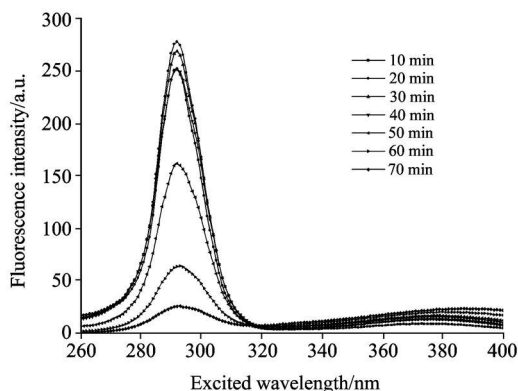


Fig 5 Synchronous fluorescence spectra of oxidation of tyrosine induced by $\cdot\text{OH}$ at different time

从图 5 中仅能看出反应体系中二酪氨酸荧光强度先升高后降低、374 nm 处的荧光强度随时间变化升高的情况。为探寻更多的反应信息,可以对图 5 中的数据点进行二维相关分析。

二维相关分析是利用在不同外界微扰下,研究体系各组分有关基团分子振动行为的差异而分辨出相互重叠甚至被掩盖的峰,从而获得普通光谱所不能获得的许多新信息。相关分析的结果通过同步相关图和异步相关图表示。图 6 是为图 5 中同步荧光数据以反应时间为外扰经过二维相关处理的结果。其中,图 6(a) 为同步相关图,图 6(b) 为异步相关图。图中无填充颜色相关强度区域为正相关峰,填充颜色相关强度区域为负相关峰。同步相关峰代表了以反应时间为变量的同步荧光光谱中的基团振动峰取向变化一致的行为;异步相关峰代表了以反应时间为变量的同步荧光光谱中的基团振动峰取向变化的独立行为。

根据 Noda 法则,异步谱中在 (ν_1, ν_2) 位置为正峰则意味着在 ν_1 的光强变化早于 ν_2 ,如果在 (ν_1, ν_2) 位置为负峰则意味着光强变化 ν_1 晚于 ν_2 。但当 (ν_1, ν_2) 处于同步谱中负值区域时,上述光强变化顺序正好相反^[13]。

由图 6(a) 可以看出,存在一个自相关峰,为 292 nm 处的强自相关峰。而在图 6(b) 异步图中,可以看到三个交叉峰,分别是 281 和 292 nm 负交叉峰,292 nm 快于 281 nm;

292 和 300 nm 正交叉峰,300 nm 慢于 292 nm; 292 和 374 nm 正交叉峰,292 nm 快于 374 nm。从异步图中,可以额外得到三个信息:281, 300 和 374 nm 处的同步荧光峰。其中 281 nm 的荧光峰可能是多巴的信息,而 300 nm 的荧光峰可能是多巴醌的信息,374 nm 为三聚酪氨酸的信息,说明羟基自由基诱导酪氨酸氧化的反应比较复杂,这和 Feda 等的研究结果相符合^[5]。

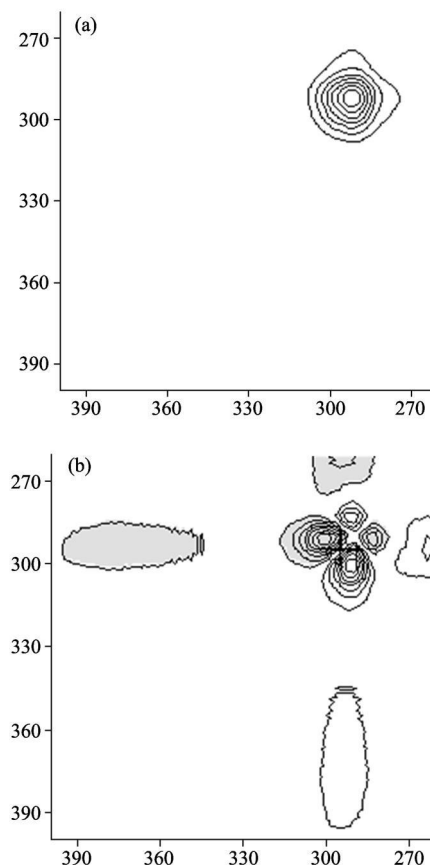


Fig 6 2D-correlation synchronous fluorescence spectra of $\text{OH}\cdot$ induced oxidation of tyrosine at different time

3 结论

羟基自由基诱导酪氨酸产生二酪氨酸。pH 为酸性时,二酪氨酸具有 292 nm 激发 410 nm 发射的荧光特征;pH 为中性时峰位不变,峰强变弱;pH 为碱性时具有 325 nm 激发 410 nm 发射的荧光特征,峰强显著增大。在羟基自由基诱导酪氨酸氧化体系中,随着酪氨酸浓度的增加,二酪氨酸产量升高;随着过氧化氢浓度的增加,二酪氨酸产量降低;酸性条件下,该反应易于发生,碱性条件下该反应难以发生;随着反应的进行,二酪氨酸荧光强度的先增加后减小。二维同步荧光光谱相关分析表明,292 nm 处荧光强度的变化快于 281, 300 和 374 nm 处荧光强度的变化。荧光光谱法研究羟基自由基诱导酪氨酸氧化,简单可行。该氧化体系可用于二聚酪氨酸含量的测定,进一步的实验将验证此体系可适用于抗氧化剂的筛选。

References

- [1] Julian M. Menter Imad K Abukhalaf, Abrienne M Patta, et al. *Photodermatology Photoimmunology & Phoomedicine*, 2007, 23: 222.
- [2] CUI Xuehai(崔旭海). *Science and Technology of Food Industry(食品工业科技)*, 2009, 9: 337.
- [3] LI Weiguang, REN Chang-hong, ZHANG Cheng-gang(李伟光, 任长虹, 张成岗). *Progress in Physiological Sciences(生理科学进展)*, 2010, 3: 89.
- [4] Xiong Youling, Park Donkeun, Ooizumi Tooru. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57(1): 153.
- [5] Feda E. Ali Kevin J Barnham, Colin J Barrow, et al. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2004, 98: 173.
- [6] Bax A. *Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids*. Boston: Reidel, 1982.
- [7] Noda I, Dowrey A E, Marcott C. *Appl. Spectrosc.*, 1993, 47: 1317.
- [8] TANG Xiaolin, ZHAO Lin, LI liang(唐晓林, 赵琳, 励亮). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2007, 65(21): 2449.
- [9] HUANG Kun, CHEN Jing, LIU Sha-xuan, et al(黄昆, 陈静, 刘少轩, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2010, 30(5): 1184.
- [10] YU Jing, WU Peiyi(余婧, 武培怡). *Progress in Chemistry(化学进展)*, 2006, 18(12): 1691.
- [11] Giulivi C, Davies K J A. *Methods Enzymol.*, 1994, 233: 363.
- [12] JIN Ming, CAI Yaxin, LI Jin-rong, et al(金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等). *Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展)*, 1996, 23(6): 553.
- [13] Noda I. *Appl. Spectro.*, 2000, 54: 236.

Studies on the Oxidation of Tyrosine Induced by Hydroxyl Radical with Fluorescence Spectroscopic Method

SUN Yan-hui, WANG Wei-long, WU Lin-sheng, JIA Xiao-li

Department of Chemistry and Life Sciences, Chuzhou University, Chuzhou 239012, China

Abstract Dityrosine is a marker of tyrosine oxidation. To study effecting factors of hydroxyl radical on tyrosine oxidation, synchronous fluorescence spectra with two dimensional correlation was used. The results showed that the peak position and intensity of dityrosine changed while pH value varied. In the system of tyrosine oxidation, with the increment of tyrosine concentration, the concentration of dityrosine decreased. With the increment of hydrogen peroxide concentration, the concentration of dityrosine increased. The oxidation reaction was prone to taking place in acid conditions while difficult to develop in basic conditions. With the development of oxidation reaction, the fluorescence intensity of dityrosine increased and then decreased. Two dimensional correlation synchronous fluorescence spectra showed that the variation in the intensity at 292 nm preceded that of 281, 300 and 374 nm. Thus, fluorescence spectroscopy was simple and easy for studying tyrosine oxidation induced by hydroxyl radical.

Keywords Fluorescence spectra; Tyrosine; Dityrosine; Hydroxyl radical; Two dimensional correlation spectra

(Received Aug. 26, 2010; accepted Dec. 26, 2010)