

辐射引发的亚油酸和亚麻酸自由基产物及 α -生育酚的辐射保护效应的 ESR 研究

朱幼南 屠铁城 董继荣 张加山 林念芸

(中国科学院上海原子核研究所, 上海201800)

摘要 用电子自旋共振波谱法,对在含氧条件下经过低温 γ 辐照的不饱和脂质亚油酸和亚麻酸产生的初级不稳定自由基,及其在程序升温过程中所产生的自由基变化进行了研究。由77 K辐照并测定的 ESR 谱表明其初级不稳定产物为阴离子自由基和脂质长链上饱和部分的抽氢自由基,在120 K附近所测得的 ESR 谱显示了脂质过氧自由基的波谱特征,随着温度继续上升,最后演变为戊二烯基自由基和 α -碳抽氢自由基。亚油酸和亚麻酸与 α -生育酚(摩尔比1:1)二元体系的 ESR 研究,揭示了 α -生育酚对亚油酸和亚麻酸的辐射保护作用是基于氢原子转移机理。

关键词 ESR, 亚油酸, 亚麻酸, 自由基, α -生育酚, 氢原子转移, 辐射保护

研究不饱和脂质经 γ 辐照所产生的自由基,对于进一步阐明生物体系的辐射损伤和辐射保护机理是十分重要的。人们已经注意到了不饱和脂质的 γ 辐解或UV光解与温度和氧的存在与否有着显著的依赖关系。在早期的工作中,对脂质自氧化的 ESR 研究通常局限于某一个中间产物,如Bascetta等人^[1]在环境温度下观察到充氧条件下亚油酸和油酸甲酯通过紫外辐解所产生的戊二烯基自由基,而它们的过氧自由基的 ESR 谱则为Chiba和其合作者^[2]所获得。随着检测技术的进步,用 ESR 方法不仅能记录脂质由 γ 辐解或UV光解所产生的初级自由基,还可以检测到由继后反应所产生的次级自由基^[3]。本文,用程序升温 ESR 方法研究了77 K温度时经 γ 辐照产生的亚油酸和亚麻酸的初级不稳定产物及它们随温度的演变过程,同时研究了 α -生育酚对亚油酸和亚麻酸的辐射保护作用。

1 实验部分

1.1 试剂

亚油酸和亚麻酸均为东京化成工业株式会社产品,未经纯化。 α -生育酚为E. Merck产品。

1.2 样品的制备和辐照

将亚油酸和亚麻酸或 α -生育酚的二元体系混合物予先用空气鼓泡0.5 h,然后将样品在低温下制成颗粒状小珠,置于内径约3 mm的GG 17玻璃管中,再通空气5 min后封管。用 ^{60}Co 辐照源装置77 K避光条件下辐照样品,总吸收剂量100 kGy。

1.3 ESR 波谱的测定

经辐照的样品用Varian E-112 ESR波谱仪的X-波段测定,所用微功率为1 mW。用E-500-2

国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1991-12-13

NMR Gauss 计跟踪测定磁场, 用 E 231/232 双样品腔和 DPPH 标准样品协同标定 g 值, 在 77 K 辐照的样品直至在该温度下进行 ESR 测定, 始终保持在液氮内, 然后改用 E-257/WL-257 程序升温装置, 退火至所需温度后测定。

2 结果和讨论

2.1 77 K 辐照并测定的亚油酸和亚麻酸的 ESR 谱

77 K 辐照并测定的含氧亚油酸和亚麻酸的 ESR 波谱(见图 1 a, b)是十分相似的, 它们显示出一个较对称的二重峰, g 值分别为 2.0025 和 2.0018, 峰宽分别为 $2.740 \times 10^{-3} \text{T}$ 和 $2.675 \times 10^{-3} \text{T}$ 。在二重峰的两侧各有一组分辨率较差的重叠峰的痕迹。

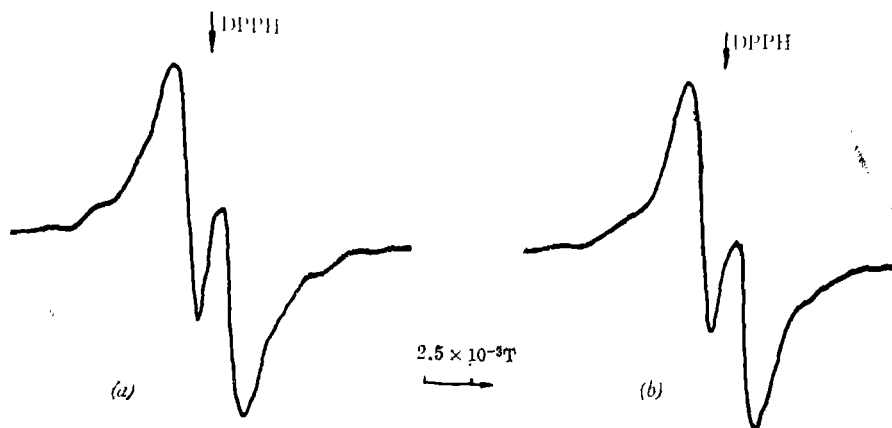
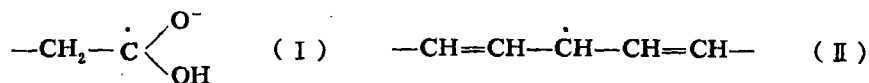


Fig 1. ESR spectra from oxygen-containing samples irradiated and recorded at 77 K
(a) Linoleic acid (b) Linolenic acid

根据 Faucitano^[4] 对结晶油酸的 γ 辐解研究后认为, 在 77 K 辐照并测得的油酸的 ESR 谱图中峰宽为 $2.3-2.4 \times 10^{-3} \text{T}$ 的二重峰是阴离子自由基的特征波谱, 而在二重峰两侧存在的峰的痕迹, 则可能是油酸长链上饱和部分的抽氢自由基的信号。Yanez^[3] 分析了 77 K 用 UV 光解产生的亚油酸甘油三酯、亚麻酸甘油三酯和亚麻酸的 ESR 谱图, 指出分辨率较差的宽阔的信号是来自于脂质长链上的抽氢自由基和戊二烯基自由基。本实验在 77 K 得到的含氧亚油酸和亚麻酸 ESR 波谱信号可以归结于两个主要自由基: 阴离子自由基(I)和戊二烯基抽氢自由基(II)



较对称的二重峰, 反映了亚油酸和亚麻酸阴离子自由基(I)的特征, 它们是由于电子加合到这两个不饱和脂肪酸的羰基的氧上而形成的, 而在二重峰两侧的重叠峰的信号则是在亚油酸或亚麻酸长链上两个双键之间的双烯丙基位置上抽氢而产生的自由基的贡献。

2.2 程序升温过程中的亚油酸和亚麻酸的 ESR 谱

从 77 K 至 120 K 程序升温过程中测得的 ESR 谱的变化主要反映阴离子自由基略有衰减。

图 2 a 和 b 中展示的含氧亚油酸和亚麻酸在 77 K 辐照后退火到 137 K 所测得的 ESR 谱, 和 Yanez 等人对亚麻酸在 77 K UV 辐照并退火至 131 K 时反映亚麻酸过氧自由基特征的 ESR 谱比较, 它们两侧的谱形相同, 均有一个新增生的峰, 所不同的是谱图 2 中心部位尚留有阴离子自由基二

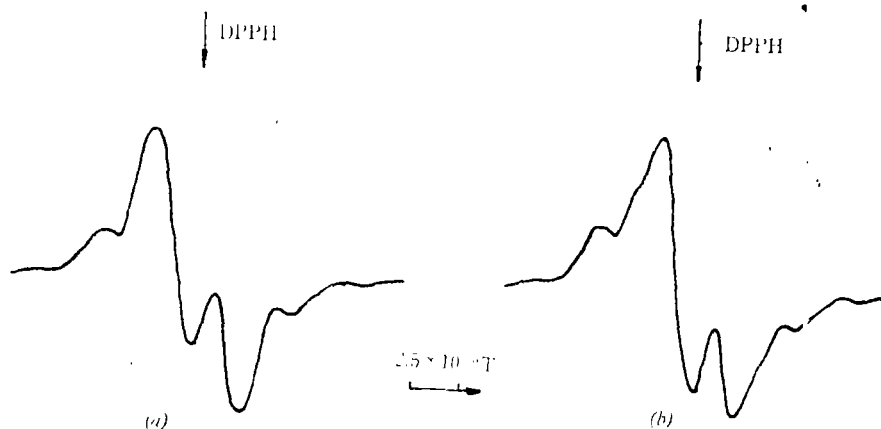


Fig 2. ESR spectra from oxygen-containing samples irradiated at 77 K, recorded after annealing at 137 K
(a) Linoleic acid (b) Linolenic acid

重峰的信号。众所周知, 过氧自由基的产生是分子氧对不饱和脂质自由基作用的结果。对于空气饱和或含氧的不饱和脂质的样品, 在低温下由于分子氧是处于不能自由活动的状态, 因而在 ESR 谱上不能反映出氧对脂质自由基的作用, 仅当样品退火到适当温度, 此时氧变得可以活动并与脂质自由基反应, 才使之转变为过氧自由基。实验表明约在 125 K 附近, 氧开始对亚油酸和亚麻酸的抽氢自由基反应, 这与 Yanez^[3] 的工作相一致。对亚油酸过氧自由基的前身碳中心自由基的 ESR 波谱解析, 得到其过氧自由基主要形式是 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{O}_2)-\text{CH}_2-$ ^[6]。实验中亚油酸和亚麻酸在 137 K 的 ESR 谱中所得到的 g 值分别为 2.0156 和 2.0148, 与 Bennett^[8] 报道的几种烃类产生的烷基过氧自由基的 g 值 2.0154 ± 0.0003 及亚油酸和油酸甲酯在 160 K 时 g 值为 2.015^[2] 的结果均符合, 因此可以推断该自由基为亚油酸和亚麻酸的过氧自由基 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{O}_2)-$ (III)

上述过氧自由基能从母体分子的双烯丙基位置上抽氢形成新的碳中心戊二烯基抽氢自由基, 该自由基继续与氧作用形成过氧自由基, 直至溶解氧被消耗尽为止, 过氧自由基最终重合为分子产物。

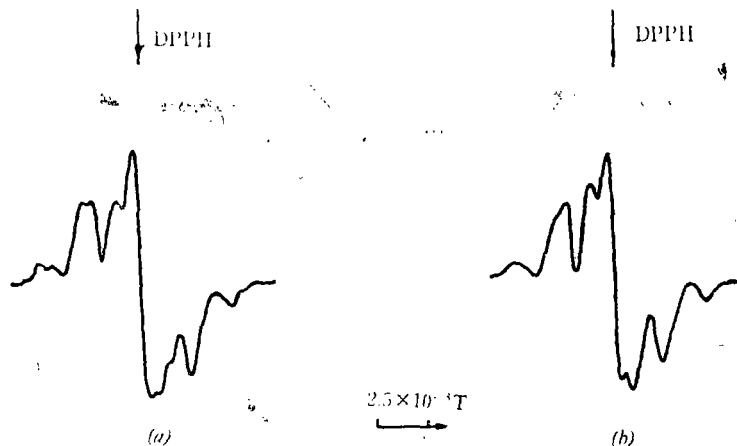


Fig 3. ESR spectra from oxygen-containing samples irradiated at 77 K, recorded after annealing at 243 K
(a) Linoleic acid (b) Linolenic acid

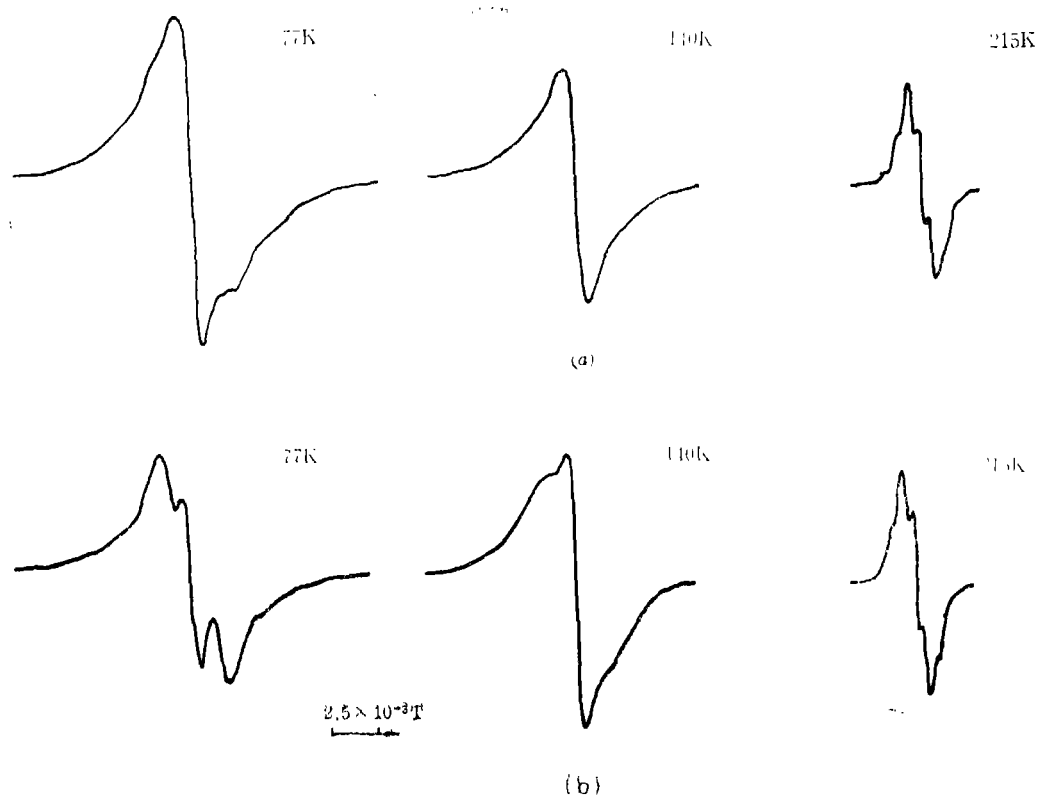


Fig 4. ESR spectra from oxygen-containing linoleic acid- α -tocopherol complex with molar ratio of linoleic acid- α -tocopherol(1:1) irradiated at 77 K, recorded at 77 K and after annealing at 140 K and 215 K
(a) α -tocopherol (b) Linoleic acid- α -tocopherol

图 3 a 和 b 是亚油酸和亚麻酸 77 K 辐照后升温至 243 K 时的 ESR 谱图,它是宽阔的多重峰,其总谱宽为 215 G。其中主要成份为七重峰,其平均超精细分裂约为 $1.1 \times 10^{-3} \text{ T}$ 。

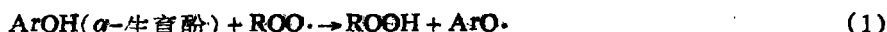
亚麻酸在 77 K 下 UV 辐照并在 253 K 记录得到的 ESR 谱是七重峰^[3],它是亚麻酸戊二烯基抽氢自由基的特征波谱。油酸的尿素络合物在 77 K 经 γ 辐照并在 188 K 记录得到的由六重峰、七重峰和四重峰组合的 ESR 波谱^[4],它们分别表征为侧链自由基、烷基自由基和 α -碳抽氢自由基。 α -碳抽氧自由基可以由阴离子自由基演变而来。因为随着退火温度的增高,阴离子自由基会失去 OH^- 而转变为酰基自由基,进一步升温后该自由基可从母体分子中羧基 α 碳位置上抽氧而生成 α -碳抽氧自由基。这个事实早由 Faucitano^[7] 对油酸和棕榈酸的研究中指出,又为 Sevilla^[8,9] 对高分子量的羧酸的研究中所肯定。因此可以认为,本实验在 243 K 测得的多重峰主要是亚油酸和亚麻酸的戊二烯基抽氢自由基的波谱,此外还可能有残留的阴离子自由基在退火过程中演变而来的亚油酸和亚麻酸的 α -碳抽氢自由基的信号 RCHCOOH (IV)

2.3 α -生育酚对亚油酸和亚麻酸的辐射保护作用的 ESR 研究

图 4 a 中所展示的 α -生育酚在 77 K 辐照并测定的 ESR 波谱是不对称的单峰,与亚油酸和亚麻酸 77 K 辐照并测定的 ESR 波谱中展现的较对称的二重峰(见图 1)截然不同。图 4 b 是 α -生育酚-亚油酸二元体系(摩尔比 1:1)辐照后的 ESR 谱,77 K 辐照并测定的二元体系的波谱显示了 α -生育酚自由基与亚油酸自由基波谱的重叠。退火至 140 K 时,谱形已趋于 α -生育酚的 ESR 波谱特

征, 并不见亚油酸过氧自由基的痕迹。在 160 K 时二元体系的波谱更接近于 α -生育酚的 ESR 波谱特征, 待退火到 215 K 时, 二元体系的波谱特征和 α -生育酚的 ESR 波谱特征基本相同, 没有亚油酸戊二烯基抽氧自由基和 α -碳抽氧自由基的痕迹。以 α -生育酚与亚油酸或亚麻酸的摩尔比为 4:1 和 10:1 进行相同条件的实验, 所得到的 ESR 波谱均显示出 α -生育酚对亚油酸或亚麻酸的辐射氧化有所保护作用。

众所周知, α -生育酚是一种酚类抗氧化剂, 结构式中羟基的活动氢是氢原子转移保护中氢的给予体, 氢原子转移给脂质的过氧自由基, 从而阻断了脂质辐射过氧化链式反应的增长。



戊二烯基自由基和 α -碳抽氧自由基亦可从 α -生育酚中得到氢原子而修复为亚油酸。



3 结 论

在 77 K 经 γ 辐照后, 亚油酸和亚麻酸的主要辐解产物为羰基阴离子自由基和在烯丙基位置上的抽氢自由基——戊二烯基抽氢自由基。从 120 K 附近开始, 由于氧攻击抽氢自由基而生成了过氧自由基, 该自由基又可攻击母体分子产生新的戊二烯基抽氢自由基。此外阳离子自由基随着温度的升高为酰基自由基, 后者能攻击母体分子生成 α -碳抽氢自由基和戊二烯基自由基。 α -生育酚对亚油酸辐射氧化的保护效应主要是基于氢原子转移机理。

参 考 文 献

- 1 Bascetta E, Gunstone E D, Scrimgeour C M, Walton J C. J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1982, 110
- 2 Chiba T, Kaneda T. Agric. Biol. Chem., 1984, 48, 2593
- 3 Yanez J, Sevilla C L, Becker D, Sevilla M D. J. Phys. Chem., 1987, 91, 487
- 4 Faucitano A, Locatelli P, Perotto A, Faucitano Martinotti F. J. Chem., Soc., Perikn II 1972, 2, 1786
- 5 Becker D, Yanez J, Sevilla M D. J. Phys. Chem., 1987, 91, 427
- 6 Bennett J E, Summers R. J. Chem. Soc., Faraday Trans, 2 1973, 69, 1043
- 7 Faucitano A, Perotti A, Allara G, Faucitano Martinotti F. J. Phys. Chem., 1972, 76, 801
- 8 Sevilla C L, Swarts S, Sevilla M D. J. Am. Oil Chem. Soc., 1983, 60, 950
- 9 Sevilla M D, Swarts S, Bearden R, Morehouse K M, Vartanlan T. J. Phys. Chem., 1981, 89, 918

ESR STUDIES OF RADIATION INDUCED RADICAL PRODUCTS FROM LINOLEIC ACID AND LINOLENIC ACID AND THE RADIOPROTECTIVE EFFECT BY α -TOCOPHEROL

Zhu Younan Tu Tiecheng Dong Jirong Zhang Jiashan Lin Nianyun
(Shanghai Institute of Nuclear Research, Academic Sinica, Shanghai 201800)

ABSTRACT Primary radicals from the γ -radiolysis of air-saturated linoleic acid and linolenic acid at 77 K, and the subsequent secondary radicals appeared during the course of variable temperature elevation were investigated by ESR. The ESR spectrum from samples irradiated and observed at 77 K shows the presence of the radical anion doublet arising from the electron adducts of the carboxygroups and the poorly resolved broad singlet results from some carbon-centered radicals. Annealing to approximately 125 K which allow for molecular oxygen migration results in the formation of peroxy radicals. At 247 K, the ESR spectrum is a multi-line pattern which is attributable to structure of the α -carbon radical superimposed on the pentadienyl radicals.

The ESR spectra from linoleic acid— α -tocopherol and linolenic acid— α -tocopherol binary systems irradiated at 77 K and recorded at 140 K or 215 K revealed the characteristic similarity to that from α -tocopherol alone, no trace of ESR signal from either peroxy or the composite pattern from superposition of pentadienyl radical and α -carbon radicals can be found out. Therefore α -tocopherol has exerted radioprotection effect on peroxidation of linoleic acid and linolenic acid.

KEYWORDS ESR, Linoleic acid, Linolenic acid, Radical, α -tocopherol, H-atom transfer protection, Radioprotection