

## 还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸拉曼光谱研究

黄斌, 杜功志, 侯华毅\*, 黄文娟, 陈相柏\*

武汉工程大学光学信息与模式识别湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430205

**摘要** 还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)在维持细胞生长、分化、能量代谢以及细胞保护方面起着非常重要的作用, NADH的无创在体检测具有非常重要的意义。运用激光拉曼散射实验和密度泛函理论(DFT)计算研究了 $200\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ 光谱范围内NADH分子的振动模式特性。DFT计算采用了B3LYP杂化方法, 并选用了极化6-311+G(d,p)基组。为了准确的分析NADH分子的振动模式和频率, 首先运用B3LYP/6-311+G(d,p)理论对NADH分子的基态结构进行了几何优化, 并计算了基态结构NADH分子各个键长和键角。同时考虑到DFT计算中的非谐性, 运用波数线性标度方法对所有计算所得振动模式波数重新进行了标度。重新标度后, DFT计算所得的振动模式波数与激光拉曼散射实验观测到的拉曼峰波数吻合的很好: 在 $200\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ 整个光谱范围内, 计算与实验结果具有非常好的线性相关性, 而且大部分振动模式的计算与实验之间的偏差都小于 $5\text{ cm}^{-1}$ 。此外, 讨论了实验观察所得拉曼光谱的分子振动模式归属, 分析了NADH分子中腺嘌呤、烟酰胺、及二核苷酸的特征振动模式, 并初步提出了运用拉曼光谱实现NADH快速准确无创在体检测的方法。位于 $732\text{ cm}^{-1}$ 处的拉曼峰是腺嘌呤的特征振动模式, 而且可以选为检测NADH分子的最特征拉曼峰。位于 $1690\text{ cm}^{-1}$ 处的拉曼峰是烟酰胺的特征振动模式, 可以选为进一步准确检测NADH分子的另一个特征拉曼峰。位于 $1086$ 和 $1339\text{ cm}^{-1}$ 两处拉曼峰的组合可以作为二核苷酸的特征振动模式, 用于进一步更准确的检测NADH分子。所以在运用拉曼光谱法实现NADH快速准确无创在体检测时, 可以首先运用位于 $732\text{ cm}^{-1}$ 处NADH分子的最特征振动模式进行快速检测, 然后再运用位于 $1690\text{ cm}^{-1}$ 及 $1086$ 和 $1339\text{ cm}^{-1}$ 组合等特征振动模式进行准确分析。

**关键词** 拉曼光谱; DFT; NADH

**中图分类号:** O433.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)06-1679-05

### 引言

NADH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide) 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的还原态, N指烟酰胺, A指腺嘌呤, D是二核苷酸。NADH在维持细胞生长、分化和能量代谢以及细胞保护等各方面起着重要的作用, 可以降低因辐射、药物、有毒物质、剧烈运动、缺血等各种因素引起的细胞的氧化应激, 从而保护血管内皮细胞、肝细胞、心肌细胞、成纤维细胞、神经元等<sup>[1-3]</sup>。因此分析检测人体内NADH水平具有重要的意义<sup>[4]</sup>。

拉曼光谱作为一种分子指纹分析技术, 具有快速、准确、无损等优点, 而且可获得物质物理化学及深层结构信息, 已广泛应用于生物医学、物理、化学、材料、食品科学等

领域<sup>[5-6]</sup>。密度泛函理论(DFT)是一种研究多电子体系结构的量子力学方法, 在研究物质光谱方面得到了广泛应用<sup>[7-8]</sup>。近年来, NADH无创在体检测得到了越来越多关注<sup>[9-10]</sup>。运用激光拉曼光谱方法非常有希望实现NADH的快速准确无创在体检测。但目前对NADH拉曼光谱的研究较为缺乏。本文运用激光拉曼散射实验和DFT计算研究了 $200\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ 光谱范围内NADH分子的振动模式特性, 讨论了实验观察所得NADH拉曼光谱的分子振动模式归属, 并分析了NADH分子中腺嘌呤、烟酰胺、及二核苷酸的特征振动模式。

### 1 实验部分

实验所用NADH样品从阿拉丁生化科技有限公司购买。

收稿日期: 2021-04-25, 修订日期: 2021-07-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(51902227, 11574241), 湖北省自然科学基金项目(2020CFB380)资助

作者简介: 黄斌, 1996年生, 武汉工程大学光学信息与模式识别湖北省重点实验室硕士研究生 e-mail: 291887894@qq.com

\* 通讯作者 e-mail: hhy@wit.edu.cn; xchen@wit.edu.cn

拉曼散射实验采用赛默飞世尔科技有限公司的激光共焦显微拉曼光谱仪, 本实验采用了 532 和 785 nm 两种不同波长的激光进行测量, 实验条件相同, 光谱采集波数范围为 200~3 200  $\text{cm}^{-1}$ , 积分时间为 10 s, 积分次数为 6 次, 激光功率为 2 mW。

DFT 计算采用常用的 Becke 交换泛函方法, 同时结合 Becke 的三参数混合交换泛函并使用了 Lee, Yang 和 Parr (B3LYP) 的 LYP 相关泛函<sup>[11]</sup>。在几何优化和解析振动频率计算中, 采用了极化 6-311+G(d,p) 基组。量子力学计算使用了 Gaussian09 程序<sup>[12]</sup>。计算数据分析和拉曼光谱绘制采用了 Multiwfn\_3.4.1(dev) 程序<sup>[13]</sup>, 每个拉曼峰的线型选用洛伦兹曲线, 峰半高宽选用 4  $\text{cm}^{-1}$ 。

## 2 结果与讨论

图 1 显示了在 200~3 200  $\text{cm}^{-1}$  光谱范围内 NADH 在 532 和 785 nm 两个不同波长激光激发下的拉曼光谱。NADH 分子有两个主要吸收峰, 分别约为 340 和 260 nm<sup>[9]</sup>。拉曼散射所用激光波长远离 NADH 吸收峰。在非共振条件下, 拉曼散射强度与激发光波长四次方成反比, 因此 532 nm 比 785 nm 更容易观察到 NADH 振动模式。图 1 中可清楚地观测到 24 个振动模式。NADH 分子式为  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$ , 分子结构如图 2 所示, 可分为烟酰胺、腺嘌呤、及二核苷酸三个部分, 分别用 N-蓝色、A-红色及 D-黑色表示。由于 NADH 分子包含很多个原子且分子结构复杂, 确定图 1 中 24 个拉曼峰的特征拉曼峰对未来运用拉曼光谱方法实现 NADH 的无创在体检测具有重要意义。本文运用 DFT 计算分析了图 1 中 24 个拉曼峰的特征拉曼峰, 并讨论了 NADH 分子中腺嘌呤、烟酰胺、及二核苷酸的特征振动模式。

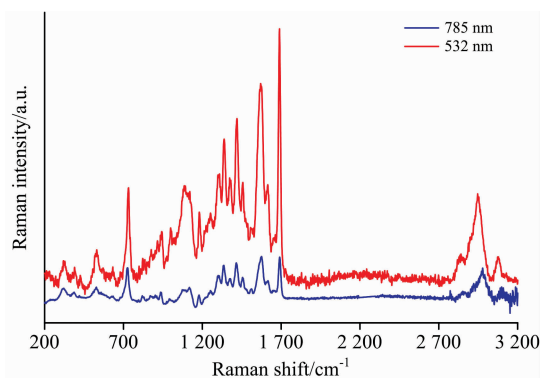


图 1 NADH 在 532 和 785 nm 两个不同波长激光激发下的拉曼光谱

Fig. 1 Raman spectra of NADH with 532 and 785 nm laser excitation

为了准确地分析 NADH 的分子振动模式和频率, DFT 计算中首先运用 B3LYP/6-311+G(d,p) 理论对 NADH 分子的基态结构进行了几何优化。优化后的几何结构为势能表面的最低点, 计算结果没有产生虚频。

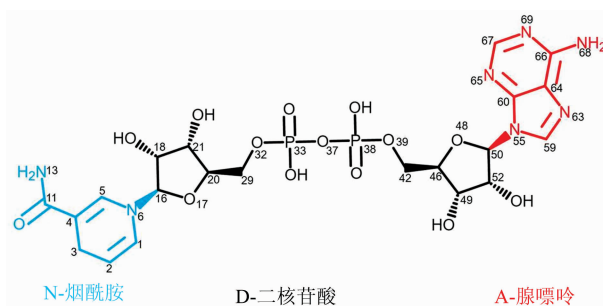


图 2 NADH 的分子结构

分子可分为三部分, 即腺嘌呤、烟酰胺、和二核苷酸, 分别用红色、蓝色和黑色标记

Fig. 2 Molecular structure of NADH

The molecule is divided into three parts, i. e., adenine, nicotinamide, and dinucleotide, which are labeled as red, blue, and black, respectively

为了使 DFT 计算结果与拉曼散射实验结果很好的吻合, 即计算所得振动模式波数与实验观测拉曼峰波数差别小而且有很好的线性相关性, 运用波数线性标度方法对所有计算所得振动模式波数重新进行了标度。波数线性标度方法中, 考虑到 DFT 计算中非谐性, 计算所得波数应乘以一个略小于 1 的比例因子, 通常不同光谱范围内比例因子会有小的差别。本文发现 NADH 分子在 200~3 300  $\text{cm}^{-1}$  范围内计算所得波数都可以用同一比例因子 0.982 0 很好的标度。该比例因子也和文献常用比例因子 0.961 3 很接近<sup>[14]</sup>。重新标度后, 计算所得振动模式波数与实验观测拉曼峰波数都吻合的很好, 差别大部分小于 5  $\text{cm}^{-1}$ , 仅峰强存在一定差异。图 3(a) 和 (b) 分别比较了 200~1 800 和 1 800~3 300  $\text{cm}^{-1}$  光谱范围内拉曼实验和 DFT 计算的结果。图 4 具体的比较了拉曼实验观测到的 24 个拉曼峰与 DFT 计算所得振动波数的关系。如图 4 所示, 在 200~3 300  $\text{cm}^{-1}$  整个光谱范围内拉曼实验和 DFT 计算结果之间都具有很好的线性相关性,  $R^2$  为 0.999 81。

表 1 详细对比了拉曼散射实验、DFT 计算、及文献中 NADH 分子的拉曼峰, 并对图 1 中所观测到的 24 个拉曼峰所代表的振动模式对应的分子基团做了归属。为了便于分析, 同时找到 NADH 分子的特征振动模式, 从而用于拉曼光谱法实现 NADH 的快速准确无创在体检测; NADH 分子分为了三个部分, 即腺嘌呤、烟酰胺和二核苷酸, 分别标记为 A、N 和 D, 如图 2 所示。根据 NADH 分子的三个部分, 图 1 中所观测到的 24 个拉曼峰被分为了三组。NADH 分子中三个部分的振动频率与实际三个基团独立存在时的振动频率存在一些差异, 这些差异是由于每个基团之间的相互作用造成了峰的偏移。

NADH 分子中腺嘌呤(A)是一个含氮杂环, 其中包含多个碳氮双键及一个氨基。图 1 中位于 531, 732, 1 309, 1 339, 1 374, 1 507 及 3 073  $\text{cm}^{-1}$  等处的拉曼峰与腺嘌呤的振动模式相关。其中位于 732  $\text{cm}^{-1}$  处的拉曼峰散射信号强度高, 而且该峰在高频和低频方向受其他拉曼峰的干扰都较小。同时该峰不仅与腺嘌呤分子呼吸振动相关, 还与腺嘌呤

和二核苷酸的相互作用相关。因而位于  $732\text{ cm}^{-1}$  处的拉曼峰可以选为 NADH 分子的一个最特征的振动模式，用来实现拉曼光谱法的 NADH 快速准确无创在体检测。

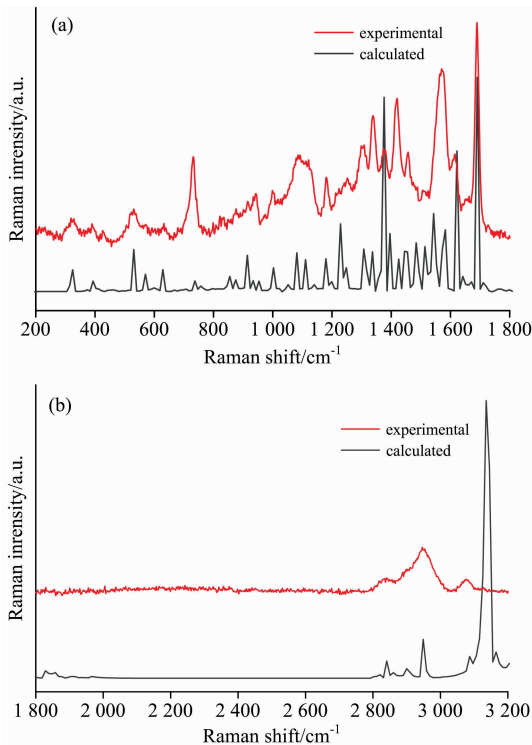


图 3  $200\sim 1\ 800\text{ cm}^{-1}$  (a)和  $1\ 800\sim 3\ 300\text{ cm}^{-1}$  (b)光谱范围内拉曼散射光谱和 DFT 计算光谱的比较

Fig. 3 Comparison of Raman scattering spectrum and DFT calculated spectrum in the spectral range of  $200\sim 1\ 800\text{ cm}^{-1}$  (a) and  $1\ 800\sim 3\ 300\text{ cm}^{-1}$  (b)

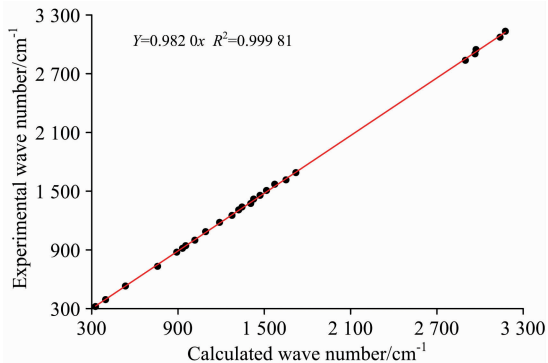


图 4 DFT 计算波数与 Raman 实验波数的线性拟合

Fig. 4 Linear fitting of DFT calculated and Raman experimental wave numbers

NADH 分子中烟酰胺(N)包含一个酰胺及一个吡啶，存在一个含氮六元环以及一个碳氧双键。图 1 中位于  $390, 943, 999, 1\ 086, 1\ 181, 1\ 252, 1\ 615$  和  $1\ 690\text{ cm}^{-1}$  等处的拉曼峰与烟酰胺的振动模式相关。其中位于  $1\ 690\text{ cm}^{-1}$  处的拉曼峰散射信号强度最强，而且该峰在高频方向没有其他拉曼峰的干扰，同时该峰与吡啶中特征的  $\text{C}=\text{C}$  双键的振动相

表 1 实验观察和理论计算的 NADH 拉曼峰及它们的振动模式  
Table 1 Experimental and calculated Raman modes of NADH and vibrational assignment

实验数据 / $\text{cm}^{-1}$	理论计算 / $\text{cm}^{-1}$	文献[15] / $\text{cm}^{-1}$	振动模式对应基团
324	323	324	D
390	393	390	N
531	530	526	A/N
—	570	568	N/D1
—	628	628	A/D1
732	737	730	A/D1
—	854	850	D1
876	876	878	D
916	913	918	D
943	933	940	N
—	953	—	A/D1
999	1 002	998	N
—	1 050	—	N/D2
1 086	1 081	1 084	N/D
—	1 110	1 112	D2
—	1 139	—	A
1 180	1 179	1 182	N
—	1 198	—	D
—	1 229	1 228	D
1 252	1 248	1 246	N/A
1 308	1 306	1 308	A
1 339	1 336	1 338	A/D1
1 374	1 376	1 378	A/N
—	1 396	—	D
1 419	1 424	1 422	N/A
1 457	1 449	1 458	D2
—	1 484	1 484	A
1 507	1 514	1 514	A
—	1 543	1 546	N
1 570	1 582	1 578	A
1 615	1 621	1 618	N
—	1 642	—	N
—	1 671	—	D
1 690	1 690	1 688	N
—	1 712	—	N
—	1 751	—	N
2 836	2 841	—	A
2 902	2 899	—	D
2 946	2 949	—	D2
3 073	3 087	—	A/D1
3 133	3 135	—	D
—	3 164	—	N
—	3 213	—	D1

注：A-腺嘌呤；N-烟酰胺；D-核糖(D1，靠近腺嘌呤；D2，靠近烟酰胺)，涉及一个以上部分的模式以“/”分隔

关，且是整个 NADH 分子中强度最强的拉曼峰。因而位于  $1\ 690\text{ cm}^{-1}$  处的拉曼峰可以选为 NADH 分子的另一个特征振动模式，用来实现拉曼光谱法的 NADH 快速准确无创在体检测。

NADH 分子中二核苷酸(D)包含两个核苷酸,其中有两个五碳糖和两个磷酸分子。图 1 中位于 324, 876, 916, 1 086, 1 339, 1 457 和 3 073  $\text{cm}^{-1}$  等处的拉曼峰与二核苷酸的振动模式相关。其中位于 1 086 和 1 339  $\text{cm}^{-1}$  两处的拉曼峰散射信号强度高, 1 086  $\text{cm}^{-1}$  处的拉曼峰与二核苷酸中磷酸分子的振动相关, 1 339  $\text{cm}^{-1}$  处的拉曼峰与二核苷酸基团和腺嘌呤基团的相互作用相关。这两个拉曼峰在高频和低频方向都受到其他拉曼峰的干扰, 为了更准确的实现拉曼光谱法的 NADH 无创在体检测, 可以将 1 086 和 1 339  $\text{cm}^{-1}$  两处的拉曼峰作为一个组合特征振动模式。

运用拉曼光谱法检测某种物质时, 仅采用该物质的某一个特征的拉曼振动模式很难实现准确分析。为了运用拉曼光谱法实现 NADH 快速准确无创在体检测, 可以首先运用位于 732  $\text{cm}^{-1}$  处 NADH 分子的最特征振动模式进行快速检

测, 然后再运用位于 1 690  $\text{cm}^{-1}$  及 1 086 和 1 339  $\text{cm}^{-1}$  的组合等特征振动模式进行准确的分析。

### 3 结 论

研究了还原态烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的激光拉曼散射实验光谱和 DFT 理论计算光谱, 对 200~3 300  $\text{cm}^{-1}$  光谱范围内的拉曼峰所对应的振动模式进行了初步的归属。实验与计算结果符合得很好: 大部分振动模式计算与实验之间偏差都小于 5  $\text{cm}^{-1}$ , 而且在 200~3 300  $\text{cm}^{-1}$  整个光谱范围内, 计算与实验结果都有非常好的线性相关性,  $R^2$  为 0.999 81。同时本文分析了 NADH 分子中腺嘌呤、烟酰胺、及二核苷酸的特征振动模式, 为未来运用激光拉曼光谱方法实现 NADH 的无创在体检测提供了基础。

### References

- [1] Grivennikova V G, Gladyshev G V, Vinogradov A D. *BBA-Bioenergetics*, 2020, 1861(8): 148207.
- [2] Krysiuk I, Horak I, Shandrenko S. *Biotechnology Acta*, 2020, 13(2): 32.
- [3] Schwarzmann L, Pliquett R U, Simm A, et al. *Bioscience Reports*, 2021, 41(1): BSR20200340.
- [4] Maynard A G, Kanarek N. *Cell Metabolism*, 2020, 31(4): 660.
- [5] GUO Peng-cheng, XUE Jing-hong, CHEN Xiang-bai(郭鹏程, 薛靖虹, 陈相柏). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2018, 38(4): 1129.
- [6] Chen X B, Guo P C, Huyen N T, et al. *Applied Physics Letters*, 2017, 110(12): 122405.
- [7] Peng H, Wu D X, Hou H Y, et al. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2020, 87(4): 608.
- [8] Taplin F, O'Donnell D, Kubic T, et al. *Applied Spectroscopy*, 2013, 67(10): 1150.
- [9] Piotrowski L, Urbaniak M, Jedrzejczak B, et al. *Review of Scientific Instruments*, 2016, 87(3): 036111.
- [10] Sibrecht G, Bugaj O, Filberek P, et al. *Postępy Biologii Komórki*, 2017, 44(4): 333.
- [11] Becke A D. *Journal of Chemical Physics*, 1996, 104: 1040.
- [12] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, et al. *Gaussian 09, Revision B01*, 2010.
- [13] He H, Zheng Y, Chen H, et al. *Science China Chemistry*, 2012, 55(8): 1548.
- [14] Xie Y, Mukamurezi G, Sun Y, et al. *European Food Research and Technology*, 2012, 234(6): 1091.
- [15] Yue K T, Martin C L, Chen D, et al. *Biochemistry*, 1986, 25(17): 4941.

## Raman Spectroscopy Study of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide

HUANG Bin, DU Gong-zhi, HOU Hua-yi\*, HUANG Wen-juan, CHEN Xiang-bai\*

Hubei Key Laboratory of Optical Information and Pattern Recognition, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China

**Abstract** Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) plays a crucial role in many biochemical reactions in human metabolism. Noninvasive and in vivo monitoring of the NADH level in skin tissue is of great interest. In this paper, the Raman scattering experiment and density functional theory (DFT) calculation have been applied to investigate the vibrational properties of NADH in the spectral range of 200~3 300  $\text{cm}^{-1}$ . The DFT calculation was performed with hybrid exchange functional using B3LYP functions with a polarized 6-311+G(d,p) basis. To achieve accurate analytical vibrational frequency calculation, the ground-state geometry of NADH molecule was first optimized at B3LYP/6-311+G(d,p) level of theory without any symmetry restrain, and the bond lengths and bond angles of NADH molecule were calculated. Then, the calculated wavenumbers were normally scaled with a necessary wavenumber linear scaling procedure by accounting for anharmonicity in DFT calculation. The DFT calculated spectrum of NADH is in good agreement with the Raman experimental spectrum; a good linear correlation between calculated and experimental wavenumbers has been obtained in the spectral range of 200~3 300  $\text{cm}^{-1}$ , and the deviations are smaller than 5  $\text{cm}^{-1}$ . In addition, the characteristic vibrational modes of the three parts adenine, nicotinamide,

and dinucleotide of NADH molecule have been assigned and discussed, which would be helpful for the noninvasive and in vivo analyses of NADH. The characteristic mode of adenine at  $732\text{ cm}^{-1}$  can be chosen as the most representative model for analyzing NADH. The characteristic mode of nicotinamide at  $1\ 690\text{ cm}^{-1}$  can be chosen as another representative mode for further analyzing NADH. The characteristic modes of dinucleotide at  $1\ 086$  and  $1\ 339\text{ cm}^{-1}$  can be chosen as a combination for further more accurately analyzing NADH. Therefore, when applying the Raman method for noninvasive and in vivo monitoring of the NADH level in skin tissue, first, the most representative mode at  $732\text{ cm}^{-1}$  can be used for quick analyses, then the mode at  $1\ 690\text{ cm}^{-1}$  and/or the combination modes of  $1\ 086$  and  $1\ 339\text{ cm}^{-1}$  can be used for further accurate analyses.

**Keywords** Raman spectroscopy; DFT; NADH

\* Corresponding authors

(Received Apr. 25, 2021; accepted Jul. 23, 2021)

(上接 1673 页)

### 论文摘要提交具体步骤

1. 请您在光谱网上(<http://www.sinospectroscopy.org.cn>)用真实姓名注册,注册系统已经设置认证功能,请用手机号码或邮箱注册。
2. 点击光谱网会议会展栏目,选择《第 22 届全国分子光谱学学术会议暨 2022 年光谱年会》。
3. 点击会议基本情况下的会议快捷通道中的“会议投稿”。
4. 输入用户名和密码登陆,在页面下选择稿件提交。
5. 按照提示提交稿件。

### 报告形式

为充分提高会议学术交流的效率,会议将采用“口头报告”和“墙报展示”两种方式进行学术交流。无论是口头报告还是墙报展示,均属大会同等学术交流。为尊重个人意见和便于组委会的安排,请大家在会议注册时,提交“口头报告”或“墙报”的题目。为了鼓励博士、硕士研究生积极参与学术交流活动,本次会议将继续设立“优秀青年论文奖”和“优秀墙报奖”,表彰那些研究水平高、能突出研究内容要点、条理清晰的“口头报告”和“墙报”,大会将给获奖作者颁发优秀论文证书和奖金。同时会议还将邀请国内外知名专家学者就光谱有关学术领域的前沿热点问题作大会报告和主题报告。

主要报告形式有:

1. 大会邀请报告:主要邀请国内外知名专家学者报告光谱分析的前沿技术在各个领域的最新研究进展。
2. 主题邀请报告:本次会议将选择光谱技术的热点应用领域,开设多个专题论坛,邀请在该领域的知名专家作论坛主题报告。
3. 口头报告:由参会代表申请、组委会审核方式确定报告人选。
4. 青年论坛报告:为博士、硕士研究生开设交流平台,并评选“优秀青年论文奖”。
5. 墙报展示:作为本次会议的主要交流和展示形式。会议统一安排墙报讲解时间,希望作者按时到位讲解。

### 重要时间

开通会议注册系统:2022 年 5 月 10 日

论文截稿日期:2022 年 6 月 30 日

第二轮会议通知:2022 年 5 月

第三轮会议通知:2022 年 10 月

会议召开期:2022 年 11 月 11 日—14 日

会议组织机构、注册费及缴纳方式、宾馆住宿介绍及住房预定等信息将在 2022 年 5 月初在会议主页上发布,请您经常浏览光谱网上会议主页,了解会议筹备情况和会议具体安排。网址:<http://www.sinospectroscopy.org.cn>

### 产品展示

会议热忱邀请国内外仪器厂商参会及展示仪器设备,大会组委会将在本次会议的网站和会议现场提供展出场所,希望各仪器厂商充分利用这次机会展示自己的最新产品。

(下转 1697 页)