

文章编号: 0529-6579 (1999) 04-0044-04

血红素衍生物的合成、表征及其催化活性^{*}

符滇海, 杨学强, 林有的, 黄 莉

(中山大学 化学与化学工程学院, 广州 510275)

摘 要: 以氯化血红素为原料, 合成了 2 种氯化血红素衍生物, 用元素分析和 FAB-MS, IR 等谱对其结构进行表征, 研究了它们对鲁米诺-过氧化氢发光体系的催化活性. 结果表明, 氯化血红素分子的轴向配位基以及卟啉环骨架平面的 2 个乙烯基团的改变均对催化性能产生较大的影响.

关键词: 化学发光; 氯化血红素; 鲁米诺

中图分类号: Q 544 6; O 623 752; O 644 14 文献标识码: A

目前, 化学发光免疫测定技术在生物医学的应用研究中, 常采用鲁米诺和 N-氨基丁基-N-乙基异鲁米诺 (简称 ABEI) 作为发光剂, 由于这些发光剂在生理的 pH 值条件下, 发光量子产率相当低; 升高免疫反应体系的 pH 值, 可提高体系的发光强度, 但会影响标记物的理化性质以及引起抗体结合的解离^[1]. 现有的研究表明, 在免疫反应体系中引入催化剂, 如氯化血红素或过氧化物酶等, 能明显提高体系的发光强度^[2, 3]. 可见, 研究与合成价廉和催化性能优良的催化剂, 是化学发光免疫分析测定得以广泛应用的必要条件之一. 本文以氯化血红素为原料合成了 2 种新的血红素衍生物, 考察了它们的催化性质, 所得结果未见道报.

1 实验部分

1.1 仪 器

Perkin-Elmer 240 型元素分析仪; FI-IR 5DX 红外光谱仪; VQ2ABHS 质谱仪; 上立 TSHG 生物化学发光仪.

1.2 试 剂

氯化血红素 (上海生化研究所产品), 鲁米诺 (自制), 过氧化氢, 甲酸, DMF, 异丙醇, 氯仿等试剂均为 AR, 鲁米诺贮备液的制备和 H₂O₂ 贮备液的制备与标定均按文献 [4] 的方法.

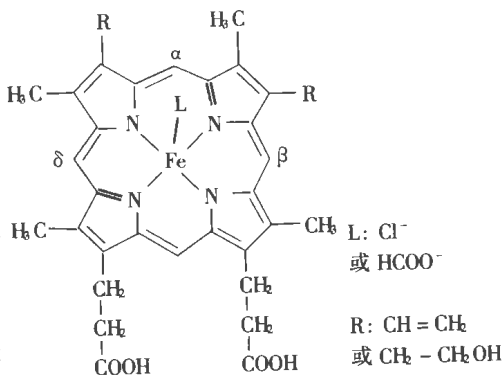


图 1 血红素衍生物的结构式

Fig. 1 Structure of the haem derivatives

^{*} 收稿日期: 1998-08-21 作者简介: 符滇海, 男, 1968 年生, 硕士研究生.

1.3 氯化血红素的纯化

把氯化血红素溶于 pH 12 的 NaOH 溶液中，抽滤除去不溶物，滤液用盐酸中和至 pH 5，析出黑色细晶体。沉淀物抽滤，用三蒸水洗涤沉淀至无 Cl⁻，再用异丙醇，氯仿混合液进行重结晶得黑色细晶体。

1.4 血红素衍生物的合成

1.4.1 氯化^o羟化血红素 (C₃₄H₃₆N₄O₆FeCl) 的合成 将 0.30 g 氯化血红素置于锥形瓶中，用 6 mL ρ=10% 的 NaOH 溶解，再加入 24 mL 蒸馏水，在室温和搅拌下，滴加入约 40 mL ρ=1.0% 的 H₂O₂ 溶液，反应 1.5 h 后过滤，滤液用盐酸中和至 pH=5，抽滤得细小沉淀，用蒸馏水洗至无 Cl⁻ 后，在红外灯下烘干，产率为 58%，产品再用异丙醇和氯仿的混和液重结晶，得亮黑色晶体，薄层层析为单组分。

1.4.2 甲酸血红素 (C₃₅H₃₃N₄O₆Fe) 的合成 将 0.30 g 氯化血红素，置于锥形瓶中，用 20 mL DMF 溶解，然后加入 2 mL ρ=85% 的甲酸水浴回流 4 h 时后，过滤，滤液加入适量的蒸馏水至有沉淀析出，过滤，沉淀用三蒸水洗至中性，在红外灯下烘干，产率为 79%，产品再用异丙醇和氯仿混和液重结晶，得到黑色晶体。薄层层析为单组分。

1.5 催化剂催化性能的测定

在恒温 (25±1) °C 的测定管中，加入 1 mL 浓度相同的鲁米诺溶液和 1 mL 浓度相同的催化剂溶液，选择反应时间为 30 s，以第一个 30 s 的积分值作为体系的本底发光，在第二个 30 s 开始时，立刻启动自动进样器，加入 1 mL 浓度相同的 H₂O₂ 溶液，取 5 次测定结果的平均值作为体系的相对发光强度。

2 结果与讨论

2.1 表 征

2.1.1 元素分析 如表 1 所示，实测值与计算值符合得很好，说明采用本文合成纯化方法可获得较纯的产品。

表 1 血红素衍生物的元素分析¹⁾
Tab 1 Elementary analysis data of the compounds

样品	w(C)/ %	w(H)/ %	w(N)/ %
氯化血红素(I)	62.64(62.58)	4.98(4.91)	9.00(8.59)
甲酸血红素(II)	64.08(63.50)	5.00(4.98)	8.81(8.46)
氯化 ^o 羟化血红素(III)	59.02(59.30)	5.52(5.23)	8.32(8.14)

1) 括号里的为计算值

2.1.2 红外光谱 从氯化^o羟化血红素的 IR 光谱中，没有观察到原氯化血红素分子在 990 cm⁻¹ 处的 -CH=CH₂ 的 CH 面外变形振动特征峰，却在 1 053 cm⁻¹ 处出现了伯醇的 C—O 的伸缩振动和 O—H 变形振动特征峰，由此说明原氯化血红素分子中的 -CH=CH₂ 基已被 H₂O₂ 氧化成 -CH₂CH₂OH 基。在甲酸血红素中，与原氯化血红素不同的是羰基 C=O 伸缩振动特征峰从 1 700 cm⁻¹ 向高频方向移动到 1 721 cm⁻¹，可以认为这是由于甲酸阴离子配体取代 Cl⁻ 配体引起的。

2.1.3 质谱 图 2 分别是甲酸血红素和氯化^o羟化血红素的质谱图，从谱图中没有观察

到分子离子峰，这是由于 Cl^- 配体或 HCOO^- 配体与铁（III）离子结合得不够牢固，在快原子的轰击下容易脱落造成的。在甲酸血红蛋白的质谱上，最大的碎片峰是 616 与分子失去 HCOO^- 配体相符。在氯化 $\cdot$ 羟化血红蛋白的质谱上，最大的碎片峰是 613 与分子失去 1 个 Cl^- 离子配体，失去 2 个 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 中的 2 个水分子，以及失去卟啉环的 α 、 β 和 δ 的 3 个 H 原子相符，可见质谱的测定结果与元素分析的结果相一致。

2.2 血红素衍生物的催化性质

氯化血红蛋白，甲酸血红蛋白和氯化 $\cdot$ 羟化血红蛋白催化鲁米诺- H_2O_2 体系化学发光的相对发光强度分别为 621 461，684 076 和 356 675. 可见催化活性的大小为甲酸血红蛋白> 氯化血红蛋白> 氯化 $\cdot$ 羟化血红蛋白. 显然，这与催化剂的结构有关. 可认为 HCOO^- 取代 Cl^- 配体后吸电子的能力比 Cl^- 配体强，使铁（III）离子更显正电性，更有利于铁（III）离子与 HO_2^- 配位发生电子转移^[4,5]，使整个化学发光反应的决速步骤加快，导致反应体系的发光强度

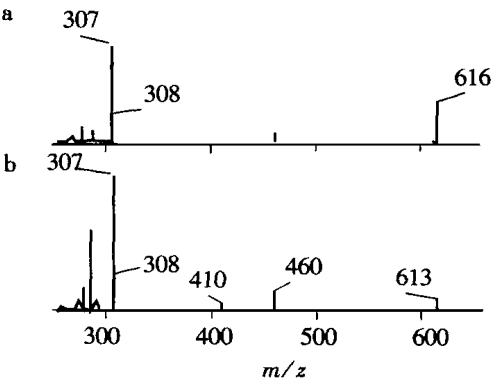
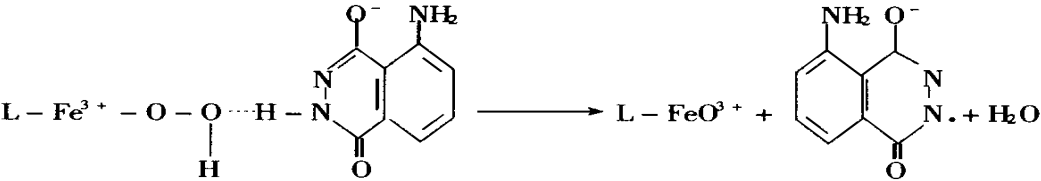


图 2 血红素衍生物的质谱图
Fig. 2 FAB-MS of heam derivatives
A 甲酸血红蛋白; B 氯化 $\cdot$ 羟化血红蛋白



增加. 氯化 $\cdot$ 羟化血红蛋白的催化活性最小，是由于卟啉环上的 2 个乙烯基被羟化后，共轭体系减少使卟啉环上电子云密度和电子流动性减少，不利于铁（III）离子发生上述的电子转移。

图 3 是 3 种催化剂催化鲁米诺与过氧化氢反应的动力学曲线，可见催化剂能显著地提高发光剂的发光强度，尤其是甲酸血红蛋白和氯化血红蛋白均能延长鲁米诺的发光时间，而且在一段时间内基本上保持着平稳的发光平台，这对于化学发光分析法在医学临床上的应用具有重要的意义。

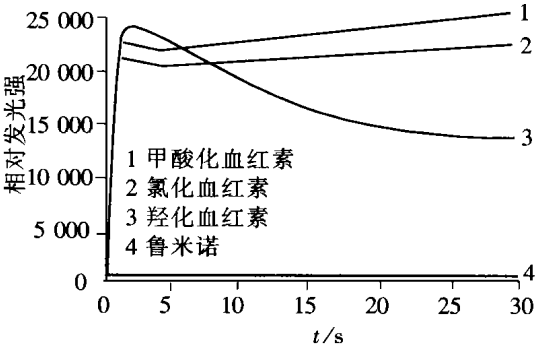


图 3 催化反应动力学曲线
Fig. 3 Kinetic curves of the catalytic reaction

参考文献:

[1] 李益新. 化学发光免疫测定 [J]. 生物化学与生物物理学进展, 1986 (2): 45.
[2] BARNARD G J R, KIM J B, BROCKELBANK J L, et al Measurement of choriongonadotropin by chemilumi-

- nescence immunoassay and immunochemiluminometric assay: Use of isoluminol derivatives [J] . Clin Chem, 1984, 30 (4): 538.
- [3] 田亚平, 沈文梅, 刘智峰, 等. 一种测定 CuZn-SOD 总量的新方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16 (4): 310.
- [4] THOMAS E G, CANDY M H, JONES P. Kinetics and mechanism of chemiluminescent clock reaction based on the horseradish peroxidase catalysed oxidation of luminol by hydroxide [J]. J Chem Soc Perkin Trans, 1990 (2): 1385.
- [5] 林林的, 张红英, 杨学强, 等. 氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 动力学研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1997, 36 (5): 59.

Synthesis, Characterization and Catalytic Properties of the Heam Derivatives

FU Dian-hai^{*}, YANG Xue-qiang, LIN De-de, HUANG Li

Abstract: Two new heam derivatives were prepared. Their structures were characterized by elemental analysis, FAB-MS and IR. Catalytic activity of the heam derivatives were studied in the reaction of luminol with hydrogen peroxide. Results show that they have greater effect on the iron center of coordination groups and the change of two ethylene groups in the porphyrin.

Keywords: chemiluminescence; heam; luminol

^{*} School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China