

氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 动力学研究^{*}

林的的 张红英 杨学强 黄英孺

(中山大学化学系, 广州 510275)

摘 要 用光度法研究了氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 反应的动力学行为, 发现这一反应具有简单酶促反应的动力学特征. 为氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 反应的机制提供了新的论据.

关键词 化学发光, 氯化血红素, 鲁米诺

分类号 Q 554. 6, O 623. 752, O 644. 14

近年化学发光分析方法作为一种新的化学分析技术, 广泛应用于微量金属离子和有机化合物的测定, 而细胞化学发光和化学发光免疫分析的研究工作也相当活跃^[1, 2]. 目前化学发光法最常用的化学发光剂是鲁米诺 (luminol), 它在碱性条件下与 H_2O_2 发生氧化还原反应并伴有光的发射, 但这种反应通常需要一些金属离子, 如 Fe^{2+} , Co^{3+} , Cu^{2+} 等, 或含血红素酶如过氧化氢酶、辣根过氧化酶等催化, 反应才能快速进行. 一些金属离子催化鲁米诺与 H_2O_2 反应的可能机理已有文献报导^[3], 本文用氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 反应的动力学行为具有简单酶促反应的特性, 以及反应机理尚未见报.

1 实验部分

1.1 仪 器

日本岛津 UV-160 A 紫外可见分光光度计, pHs-3 型酸度计.

1.2 试 剂

1. 0×10^{-3} mol/L 氯化血红素贮备液: 将 0.327 0 g 的氯化血红素 (上海生化研究所产品) 置于小烧杯中, 加入几滴 1.0 mol/L NaOH 溶液, 再用少量 pH=10.0 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲溶液 (以下简称缓冲液) 溶解后, 转入 500 mL 容量瓶中, 用缓冲液稀释至标线, 摇匀; 2. 0×10^{-3} mol/L 鲁米诺贮备液: 在 0.154 6 g 鲁米诺 (Sigma 公司产品) 中加入 2 mL 1.0 mol/L NaOH 溶液溶解, 转入 500 mL 容量瓶中, 用水稀释至标线, 摇匀; 3. 0×10^{-2} mol/L H_2O_2 贮备液: 吸取 10 mL 30% H_2O_2 溶液至 500 mL 容量瓶中, 用水稀释至标线, 摇匀.

以上贮备液放于 4℃ 冰箱中保存, 使用时用缓冲液逐级稀释至所需浓度.

本文所用的试剂均为 AR 级, 水为两次蒸馏水.

1.3 实验方法

1.3.1 H_2O_2 的标定 采用 Allen 法. 准确吸取一定量的贮备液, 用水稀释至 10 000 倍, 从

^{*} 收稿日期: 1997-05-20 林的的, 女, 55 岁, 副教授

中吸出 2.00 mL 于 10 mL 容量瓶中,分别再加入 2.00 mL A 液(1 g NaOH, 33 g KI 和 0.1 g $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_{24}$ 溶解于 500 mL 水)和 2.00 mL B 液(10 g 邻苯二甲酸氢钾溶解于 500 mL 水),最后用水定容.用 UV-160A 紫外可见分光光度计,选取 350 nm 波长测定该溶液中 I^- 被 H_2O_2 氧化为 I_2 时的吸光度.按公式 $[\text{H}_2\text{O}_2] = A/X_{350} \times 50\,000$ ($X_{350} = 2.6 \times 10^4$) 计算出 H_2O_2 贮备液的浓度.

1.3.2 氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 反应动力学的测定 固定反应体系的氯化血红素浓度和 H_2O_2 浓度不变,改变鲁米诺的浓度.选取 222 nm 波长,测定体系刚开始反应时鲁米诺的吸光度 A_0 和反应 30 s 后体系剩余鲁米诺的吸光度 A_t .由 $(A_0 - A_t)/30$ 求得不同鲁米诺浓度反应 30 s 的平均初速(简称反应初速).

2 结果与讨论

2.1 氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 反应的动力学

2.1.1 反应动力学条件的选择 图 1 是氯化血红素,鲁米诺在缓冲溶液中的紫外可见吸收光谱.从图 1 可见,鲁米诺溶液的紫外可见吸收光谱在 222 nm 处具有最强的吸光度值,当氯化血红素浓度为 8.358×10^{-6} mol/L 时,它的吸收光谱对鲁米诺溶液在 222 nm 处的吸光度值几乎没有影响(见曲线 c).浓度为 1.54×10^{-3} mol/L 的 H_2O_2 溶液在 222 nm 处有较明显的吸收,但是,我们研究氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 反应的动力学时, H_2O_2 的浓度是固定的,因而这种影响对测定的结果是一种系统的误差.另外,从鲁米诺发生反应的动力学曲线(见图 2)可见,随着反应时间的推移,鲁米诺的浓度不断消耗,表现为 222 nm 的特征吸收峰随时间下降(每次扫描间隔时间为 30 s).

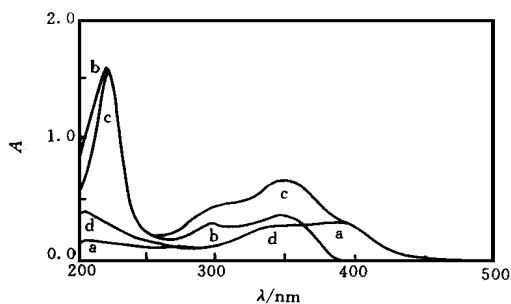


图 1 氯化血红素,鲁米诺的紫外可见吸收光谱

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectra of hemin and luminol

- a 8.358×10^{-6} mol/L 氯化血红素;
- b 5.015×10^{-5} mol/L 鲁米诺;
- c 8.358×10^{-6} mol/L 氯化血红素 + 5.015×10^{-5} mol/L 鲁米诺;
- d 8.358×10^{-6} mol/L 氯化血红素 + 1.54×10^{-3} mol/L 过氧化氢

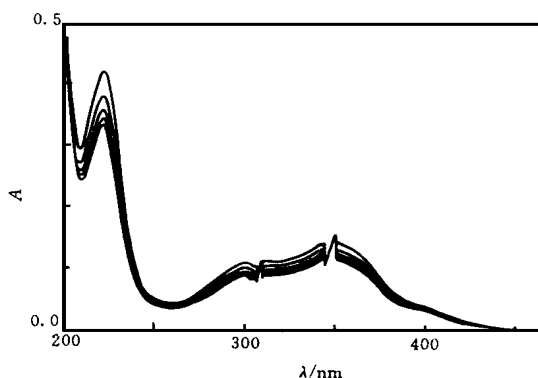


图 2 鲁米诺反应的动力学曲线

Fig. 2 Kinetic curves of luminol reaction

- 1.018×10^{-5} mol/L 鲁米诺;
- 8.358×10^{-6} mol/L 氯化血红素;
- 1.298×10^{-4} mol/L 过氧化氢

据此,将选择鲁米诺在 222 nm 处的特征吸收峰作为测定氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 反应的最佳波长.

图 3 是鲁米诺浓度在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 范围内,吸光度值与浓度关系的实验数据 (A 是 3 次测量平均值). 结果表明,在此浓度范围内,吸光度与浓度之间具有良好的线性关系.

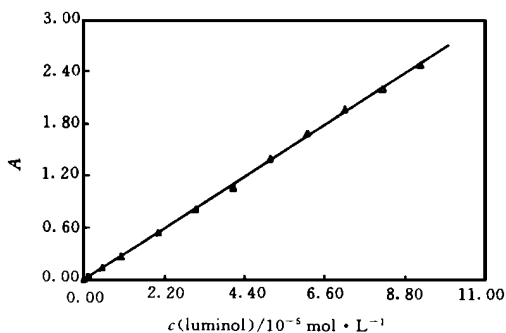


图 3 鲁米诺浓度与吸光度关系

Fig. 3 Absorbance of luminol vs. concentration

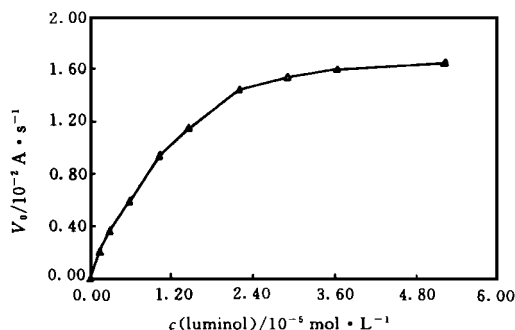


图 4 氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 反应的动力学曲线

Fig. 4 Kinetic curves of the reaction of luminol with hydrogen peroxide by the catalysis of hemin

2.1.2 反应动力学性质 图 4 是氯化血红素

($8.358 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 和 H_2O_2 ($1.543 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) 浓度固定不变,而改变鲁米诺浓度的条件下,测得鲁米诺在 30 s 内平均反应初速 (v_0 是 3 次测量的平均值).

由上述反应初速 v_0 与鲁米诺浓度关系的动力学曲线可见,它具有简单酶催化反应的动力学特征.以 $1/v_0$ 为纵坐标, $1/[\text{luminol}]$ 为横坐标作图,求得 $v_{\text{max}} = 2.00 \times 10^{-3} \text{ A/s}$, $K_m = 1.25 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

2.1.3 反应机理 关于鲁米诺与 H_2O_2 反应的机制是一个有争议的问题,一种观点认为^[4] 鲁米诺在碱性液溶中,首先形成双负离子,然后被 O_2 氧化为偶氮酮式,才能与 HO_2^- 反应,生成不稳定的内过氧化物,后者再分解失去 N_2 产生化学发光(图 5).

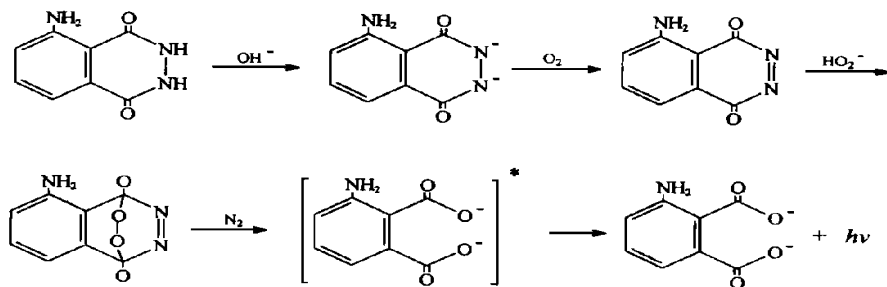


图 5 鲁米诺发光机理示意图

Fig. 5 Mechanism of luminol chemiluminescence

另一种观点认为^[3,5] 鲁米诺在碱性条件下,以单价阴离子存在,它不能与 H_2O_2 反应,需

要在催化剂作用下转变成带活性基的鲁米诺,才能与 HO_2^- 反应生成内过氧化物.我们的实验结果为后一种观点提供了新的论证.即在常温下氯化血红素与鲁米诺不发生反应(见图 1 的曲线 c); H_2O_2 与鲁米诺碱性溶液的紫外可见光谱经多次连续扫描没有明显变化,说明在没有催化剂存在下它们基本上不发生反应,即使发生反应也是十分缓慢的.当有氯化血红素存在时,反应十分快速,表现为鲁米诺在 222 nm 处的特征吸收峰明显下降(见图 2).根据我们实验的动力学和光谱结果以及文献 [6, 7] 的报导,我们认为,鲁米诺与 H_2O_2 反应过程中,氯化血红素首先与 HO_2^- 配位,然后再与单价鲁米诺阴离子偶合,使 HO_2^- 中的 $\text{O}-\text{O}$ 键和鲁米诺中的 $\text{H}-\text{N}$ 键削弱,以致容易断裂,氯化血红素中的 Fe^{3+} 在这一过程中发生单电子转移,使鲁米诺变成带活性基的单价阴离子.这个过程可如图 6.

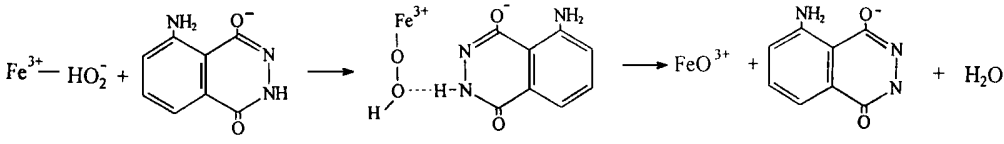


图 6 鲁米诺阴离子转变成活性阴离子示意图

Fig. 6 Luminol anion change to luminol radical

因此,提出氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 反应的机制如图 7.

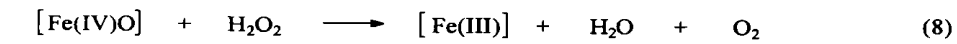
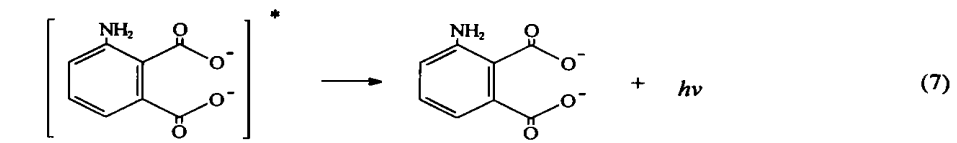
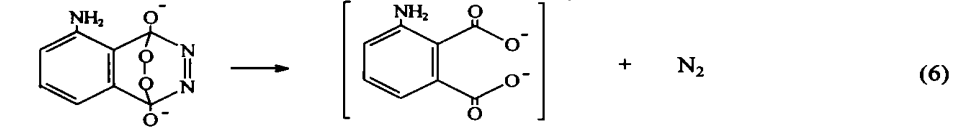
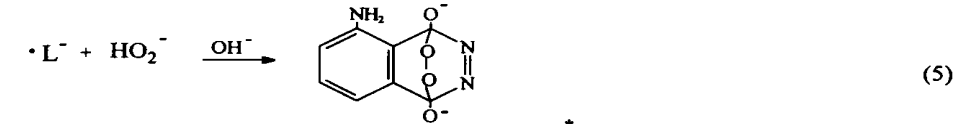
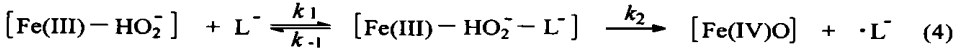
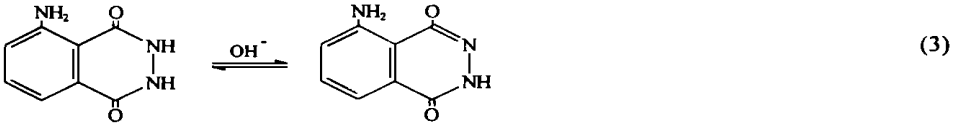
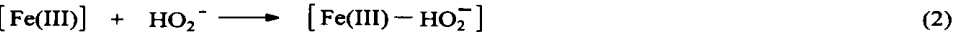


图 7 氯化血红素催化鲁米诺发光机理示意图

Fig. 7 Mechanism of hemin catalysis of luminol chemiluminescence

上述式中的 L^- 代表鲁米诺单价阴离子. (4) 式是反应过程的速率控制步骤, 体现了氯化血红素催化鲁米诺与 H_2O_2 反应具有酶催化反应的特征.

参 考 文 献

- 1 贾生华, 章竹君. Luminol- H_2O_2 - Co(II) 体系化学发光反应的研究——水样、血液、矿石中痕量钴的测定. 化学学报, 1984, 42: 1257
- 2 胡天喜. 激光, 发光学在生物医学中的应用. 光电子, 1995, 6(增刊): 490
- 3 Burdo T G, Seitz W R. Mechanism of cobalt catalysis of luminol chemiluminescence. Anal Chem, 1975, 47: 1639
- 4 Colowick S P, Kaplan N O. Chemiluminescent. Techniques, 1978(7): 416
- 5 Haapakka K E, Kankare J J. The mechanism of the electrogenerated chemiluminescence of luminol in aqueous alkaline solution. Anal Chim Acta, 1982, 138: 263
- 6 Jones P, Scowen N R. Kinetics and mechanism of catalysis by ferrihaems in the chemiluminogenic oxidation of luminol by hydrogen peroxide. Photo Chemistry and Photobiology, 1987, 45: 283
- 7 计亮年, 莫庭焕, 曾添贤, 等. 生物无机化学导论. 广州: 中山大学出版社, 1992. 152

Kinetics Study of Catalysis by Hemin in the Reaction of Luminol with Hydrogen Peroxide

Lin Dede* Zhang Hongying Yang Xueqiang Huang Yinyu

Abstract The kinetics of catalysis by hemin were studied in the reaction of luminol with hydrogen peroxide by photometric method. The results imply that has the characteristic of kinetics of enzyme catalyzed reactions. The study provides new proof for the mechanism of reaction from the hemin catalysed of luminol by hydrogen peroxide.

Keywords chemiluminescence, hemin, luminol

* Department of Chemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275