

# 氯化血红素的催化荧光测定

李庆阁\*

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 厦门 361005)

许金钧 黄贤智 陈国珍

(厦门大学化学系)

**摘 要** 在碱性溶液中氯化血红素转化为高铁血红素, 后者可催化过氧化氢氧化荧光供氢体反应, 据此建立了氯化血红素的荧光测定方法。对测定条件包括缓冲溶液类型、酸度、荧光供氢体类型及过氧化氢和荧光供氢体的加入量等进行了考察, 在 0~3.52  $\mu\text{g/L}$  范围内, 测定氯化血红素的工作曲线为  $y=9.62+94.36x$ , 线性相关系数为 0.9992, 相对标准偏差为 5.8%, 检测限为 0.01  $\mu\text{g/L}$ 。另外, 通过考察十六烷基三甲基溴化铵的影响, 证明该试剂可作为荧光反应的有效终止剂。本文结果为将氯化血红素发展为免疫分析的标记物提供了直接根据。

**关键词** 氯化血红素, 荧光分析, 胶束

## 1 引 言

作为免疫分析主流的酶免疫分析的一个固有缺点恰在于酶标记物本身。酶巨大的分子量不仅不利于抗原抗体充分反应且使标记过程复杂化。采用模拟酶则有助于克服这些缺点, 目前以辣根过氧化物酶(HRP)的模拟酶研究最多<sup>(1~4)</sup>。然而人们早就注意到辣根过氧化酶的辅基-氯化血红素(Hemin)可以象 HRP 一样催化鲁米诺的化学发光反应<sup>(5)</sup>并已用于化学发光免疫分析中<sup>(6)</sup>。最近, Zhang 等<sup>(7)</sup>报道羟化高铁血红素催化活性明显高于比较的 HRP 模拟酶, 以单位重量计算, 活性比 HRP 高 400 倍。由于 Hemin 在碱性溶液中即转化为羟化高铁血红素, 后者催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化荧光供氢体(该反应中的氢提供者, 产物为荧光物质), 本文据此建立了荧光测定 Hemin 的方法, 为将 Hemin 发展为荧光测定的标记物 提供了直接依据。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

岛津 RF-5000 荧光分光光度计, 贝克曼 DU-7 紫外可见分光光度计。

氯化血红素(Hemin)(生化试剂, 中国科学院上海生化所产品)溶于稀碱中, 用水稀释, 贮于冰箱中(4 $^{\circ}\text{C}$ ), 临用前稀释至 40  $\mu\text{mol/L}$  贮于冰浴中;  $\text{H}_2\text{O}_2$  (AR,  $\geq 30\%$ , 上海桃浦化工厂), 临用前稀释, 贮于冰浴中; 对羟基苯丙酸(HPPA, TCI-GR, 东京化成)、对羟基苯乙酸(HPAA, TCI-GR, 东京化成)和高香草酸(HVA, 生化试剂, E. Merck)均用水配成 75 mmol/L, 使用时贮于冰浴中; 溴化十六烷基三甲基铵(CTMAB, 化学纯, 上海化学试剂公司), 使用前经重结晶。其余试剂未注明的均为市售分析纯,  $\text{H}_2\text{O}$  为经石英亚沸蒸馏的二次去离子水。

### 2.2 实验方法

**2.2.1 缓冲溶液的比较** 于 1 cm 石英液池中依次加入 0.1 mol/L pH 10.0 的缓冲溶液 2.75 mL、0.03% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{L}$ 、75 mmol/L 的 HPPA 100  $\mu\text{L}$  和 40  $\mu\text{mol/L}$  的 Hemin 50  $\mu\text{L}$ , 混匀

后,立即记录  $F-t$  曲线。最大激发/发射波长( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ )为 325.6/400.8 nm。

**2.2.2 实验条件的优化** 按以上步骤分别改变  $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$  缓冲溶液的 pH 值、 $\text{H}_2\text{O}_2$  的浓度、荧光供氢体类型和加入量及 HPPA 的加入量(加入量改变后,调节缓冲溶液体积使反应液总体积保持 3.0 mL),记录  $F-t$  时,HPPA、HPAA 和 HVA 的  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  分别为 325.6/401.6 nm、324.8/399.2 nm 和 326.4/427.8 nm。在不同酸度下应事先调  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (如 HPPA, $\lambda_{em}$  = 400.8 nm, $\lambda_{ex}$  则依酸度不同可由 298.4 nm、320.8 nm 而变为 325.6 nm)。

**2.2.3 CTMAB 的作用** 取  $1.0 \times 10^{-3}$  mol/L 的 CTMAB 溶液,用最终含量为 0.1 mol/L 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和适量的氨水调至 pH 10.0,或于 0.1 mol/L 的  $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$ (pH 10.0)的缓冲溶液中加入固体 CTMAB 至饱和。取以上两溶液代替原缓冲溶液用优化后的条件(见文中)按以上步骤进行实验。

实验中未注明时,荧光的入射/发射狭缝 EX/EM = 3.0/1.5 nm,波长扫描速度为 100 nm/min,灵敏度置 HIGH,分光光度计的波长扫描速度为 600 nm/min,测量于室温进行。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 缓冲溶液比较

分别以 20  $\mu\text{L}$  和 50  $\mu\text{L}$  Hemin 对缓冲溶液进行了比较,结果如图 1 所示,在不同的缓冲溶液中,Hemin 的催化活性差别很大。Zhang 等<sup>(7)</sup>也指出,羟化高铁血红素和 HRP 一样,催化活性可被氮配体增强,对 HRP 而言,采用含氮的缓冲溶液如磷酸吡咯、氨水或咪唑可大大延伸 HRP 的最优 pH 范围,Fridorich<sup>(8)</sup>推测这与氮原子和酶-底物复合物中铁原子的配位结合有关。我们在前文<sup>(9)</sup>中在比较几种缓冲溶液对 HRP 催化氧化荧光反应的影响时,曾注意到 Tris-HCl 效果最好,在本文中也可以看出,含有氮原子的 Tris-HCl 优于磷酸盐,却不如  $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$  体系。

#### 3.2 实验条件的优化

首先按正交表  $L_9(4^3)$  粗略地考察了供氢体、pH 值、 $\text{H}_2\text{O}_2$  和 Hemin 加入量的影响,结果表明,供氢体之间差别显著。 $\text{H}_2\text{O}_2$  和 Hemin 量增加、pH 提高均使反应速率增加,据此又逐一考察了每一因素的影响。

**3.2.1 酸度** 在 pH = 7.47~11.00 范围内反应速率随 pH 的升高而增加(pH > 11.00 时  $\text{NH}_3$  溢出),在 pH > 10.0 以后变化趋缓,如图 2 所示,在整个 pH 范围内,反应速率与反应平衡后的荧光强度基本保持同步,这与前文<sup>(9)</sup>中 HRP 的情况有别,后者随 pH 升高平衡后产物的荧光强度提高而反应速率渐降一意味着酶活性降低。Hemin 在高 pH 值时活力更大的性质使它与产物荧光不存在 pH 不匹配问题,成为较 HRP 的一个突出优点。实验选择 pH 为 10.0。

**3.2.2  $\text{H}_2\text{O}_2$  用量** 在考察的范围内(2~24  $\mu\text{L}$ ,间隔 2  $\mu\text{L}$ ), $\text{H}_2\text{O}_2$  一直使反应速率增加,但在 18  $\mu\text{L}$  后,平衡后的荧光强度不再增加(此时反应可快速平衡),实验选择 20  $\mu\text{L}$ ,即  $\text{H}_2\text{O}_2$  的浓

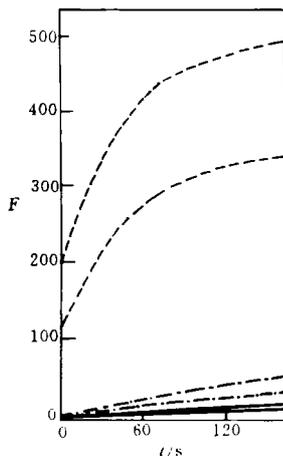


图 1 缓冲溶液类型对 Hemin 催化反应的影响比较

Fig. 1 Comparison of effect of different buffers on the hemin-catalyzed reaction (the reaction rates of 50  $\mu\text{L}$  hemin are always bigger than those of 20  $\mu\text{L}$  in all cases)  
--- 0.1 mol/L  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; - · - 0.1 mol/L Tris-HCl;  
— 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$

度为 0.060%。

**3.2.3 HPPA 加入量** 由于此时反应已可快速平衡, 采用平衡后的荧光强度为量度, 在 50~350  $\mu\text{L}$  (间隔 50  $\mu\text{L}$ ) 范围内, HPPA 在 200  $\mu\text{L}$  后, 荧光强度已趋向稳定, 实验选择了 250  $\mu\text{L}$ 。

**3.2.4 供氢体类型** 分别以 10  $\mu\text{L}$  和 50  $\mu\text{L}$  两种用量进行比较, 平衡后荧光强度顺序为 HPPA>HPAA>HVA, 空白大小顺序为 HVA>HPPA>HPAA, 综合比较, 选择了 HPPA。

### 3.3 Hemin 工作曲线

按选择的实验条件测定了 Hemin, 在 0~3.52  $\mu\text{g/L}$  范围内, 线性方程为  $y=9.62+94.36x$ , 线性相关系数  $r=0.9992$ , 相对标准偏差 (以 1.76  $\mu\text{g/L}$  为样品 11 次测定结果)  $\text{RSD}=5.8\%$ , 检测限按空白的标准偏差 (6 个实验点) 除以线性方程斜率为  $\text{LOD}=0.01 \mu\text{g/L}$  (相当于  $1.7 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ )。

### 3.4 CTMAB 作用及机理

由前文<sup>[9]</sup>已知, CTMAB 胶束对 HRP 催化氧化 HPPA 荧光反应的增敏作用在于 CTMAB 胶束与产物荧光分子的相互结合, Hemin 的催化氧化产物与 HRP 完全相同, 似应有同样的增敏作用, 然而, 由 CTMAB 对 HPPA 催化反应不同阶段的影响可知, CTMAB 在使产物荧光增敏的同时完全抑制了反应的进行。为弄清 CTMAB 抑制反应的原因, 又做了如下实验:

如图 3 所示, 将 Hemin 在不同溶液中的吸收光谱进行对照, CTMAB 的存在使 Hemin 的吸收光谱发生红移, 在碱性的  $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$  中, 红移更趋显著, 且伴随吸光度增加。导致吸收光谱红移及吸光度增加是吸光物质增溶至胶束的典型现象。已知 HPPA 本身并不与 CTMAB 发生明显作用<sup>[9]</sup>, 由此可以推论, 由于 Hemin 被 CTMAB 增溶至胶束, 使其与胶束外部水溶液中的 HPPA 分子相隔离, 故使反应难以进行。

在酶免疫分析中常需加入反应终止剂以便终点测定。CTMAB 的上述特性使之可作为反应优良的终止剂, 成为 Hemin 用于免疫分析的又一有利条件。

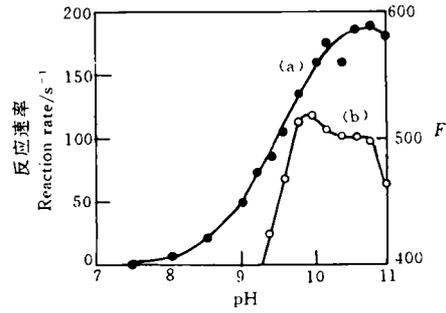


图 2 pH 对反应速率(a)和产物荧光强度(b)的影响

Fig. 2 Effect of pH on the reaction rate(a) and fluorescence intensity(b)

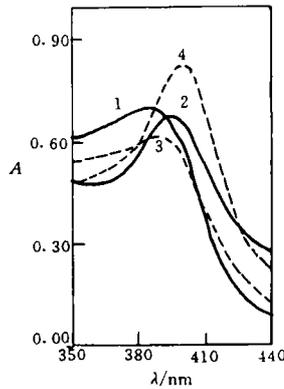


图 3 Hemin 在  $\text{H}_2\text{O}$ 、CTMAB、 $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$  和  $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}+\text{CTMAB}$  中的吸收曲线

Fig. 3 Absorption curves of hemin in  $\text{H}_2\text{O}$  (1), CTMAB (2),  $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$  (3) and  $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}+\text{CTMAB}$  (4)

## 参 考 文 献

- 1 Saito Y, Nakashima S, Mifune M, Odo J, Tanaka Y, Chikuma M, Tanaka H. *Anal. Chim. Acta*, 1985, 172:285~287

- 2 Saito Y, Mifune M, Nakashima S, Odo J, Tanaka Y, Chikuma M, Tanaka H. *Talanta*, **1987**, 34(7): 667~669
- 3 Ci Y, Wang F. *Mikrochim. Acta*, **1990**, 1:63~68
- 4 Ci Y, Wang F. *Talanta*, **1990**, 37(12):1133~1136
- 5 Yoshizumi K, Aoki K, Nouchi I, Okita T, Kobayashi T, Kamakura S, Tajima M. *Atmos. Environ.*, **1984**, 18(2):395~401
- 6 Ikariyama Y, Suzuki S, Aizawa M. *Anal. Chim. Acta*, **1984**, 156:245~252
- 7 Zhang G, Dasgupta P K. *Anal. Chem.*, **1992**, 64:517~522
- 8 Friidovich I. *J. Biol. Chem.*, **1961**, 238(12):3921~3927
- 9 Li Q G, Xu J G, Huang X Z, Chen G Z. *Talanta*, **1994**, 41(12):2049~2054

## Catalytic -Fluorometric Determination of Hemin

Li Qinggè\*

(The State Laboratory for Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

Xu Jingou, Huang Xianzhi, Chen Guozhen

(Department of Chemistry, Xiamen University)

**Abstract** A fluorometric method for the determination of hemin was established in order to develop a catalyst label instead of horseradish peroxidase in immunoassay. The principle was that hemin in basic solution can be readily converted into hematin which catalyzes fluorogenic oxidation of *p*-hydroxylphenolpropionic acid by hydrogen peroxide. Cetyltrimethyl ammonium bromide micelle can be used as an inhibitor of the reaction and it also enhances the fluorescence intensity of the reaction product. The working curve for hemin was  $y = 9.62 + 94.36x$ , with linear coefficient  $r = 0.9992$ , relative standard deviation 5.8% and detection limit 0.01  $\mu\text{g/L}$ .

**Keywords** Hemin, fluorimetry, micelle

(Received 10 February 1996; accepted 24 June 1996)