维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.19 No.2
1994 ACTA UNIVERSITATS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

# 对氨基苯磺酸胆红素的合成、纯化及鉴定

检验系实验诊断学教研室 彭永正* 马志茹 陈宏础 康格非

R464.9

**提 要** 本文参考Jirsa、冯仁丰等报道的方法，加以改进，合成了对氨基苯磺酸胆红素(bilirubin sulfanilate conjugates，下称BSC)，并用高效液相色谱(HPLC)制备柱进行纯化。用红外光谱(IR)、质谱(MS)、HPLC、薄层色谱(TLC)、元素分析、可见吸收光谱、重氮反应法等手段对产物进行了结构鉴定和纯度分析。结果表明：合成粗制品中含单、双对氨基苯磺酸胆红素，纯度为45—55%。纯化的单、双对氨基苯磺酸胆红素可望成为结合胆红素测定的参考标准代用品。

**关键词** 对氨基苯磺酸胆红素；红外光谱；高效液相色谱；质谱；合成；纯化；鉴定
**中图分类号** O621.3;O656

自从Van den Bergh和Snapper[1]应用重氮反应测定血清中胆红素以来，学者们一直在探索能准确测定胆红素各组分的方法。目前总胆红素的测定已建立了参考方法[2,3]，满足了临床需求。但结合胆红素的测定至今尚无公认的参考方法[4,5]，因此各实验室的结果可比性差[6—10]，严重影响了其临床应用。

要解决上述问题，关键是要有公认的结合胆红素参考标准品[5,15]。不少学者曾从胆汁中提取了天然的结合胆红素[11—13]，但操作复杂，得率低，纯度不高且不易保存，因此尚不能用作结合胆红素测定的参考标准品。有报告采用人工合成的方法[14,15]，可以由胆红素制得结合胆红素类似物，如双牛磺酸胆红素(ditaurobilirubin，DTB)就是一例。若其结构恒定，纯度高，且能保存，又具有与天然结合胆红素相似的重氮反应特性，那么合成的结合胆红素类似物将是一种理想的结合胆红素参考标准代用品。本文报告的对氨基苯磺酸胆红素(bilirubin sulfanilate conjugates，下称BSC)将是一个基本符合上述要求的代用品。

## 1. 对氨基苯磺酸胆红素的合成

(1) 主要试剂

①胆红素(Sigma产品) ②1,4—二氧六环 ③三乙胺 ④氯仿 ⑤0.20mol/L氯甲酸乙酯的1,4-二氧六环溶液 ⑥0.10ml/L对氨基苯磺酸钠甲醇溶液。其中②—④均为AR级。

(2) 方法

称取28mg胆红素，加0.4ml三乙胺搅成糊状，再加入3ml氯仿，搅拌，放置约5分钟，得桔红色透明溶液，转入50ml三角烧瓶中，加入1,4—二氧六环13ml，

* 检验系硕士研究生，现在第一军医大学珠江医院

维普资讯 http://www.cqvip.com

通氮气，冷却至+5℃左右，同时进行电磁搅拌。加入0.63ml试剂⑤，搅拌反应2小时。再加入试剂⑥1.25ml，继续搅拌反应8小时左右(此阶段让温度缓慢上升，但不超过32℃)。将反应液离心得沉淀(离心条件为:10℃，3200rpm，10min)，沉淀以乙醚洗数次，直至洗液接近无色。最后将所得沉淀置－18℃冰格中过夜。第二天再进行冷冻真空干燥，即得产品(BSC)。产品为红棕色，得率为50％左右。反应的每一步都以TLC监测，每一步都取出少量反应液，冷冻真空干燥后供日后分析用。产品保存于真空干燥器中。

2. BSC的纯化

我们参考Spivak等的方法[16,17]，稍加改进。选用ODS制备柱(Shim-pack PREP-ODS，0.25m×20φ，粒径15μm)，1ml样品环。在分析分离的基础上，采用甲醇:1％甲酸铵缓冲液(v/v，pH4.51)＝85:15(v/v)为流动相进行制备分离，流速5.0ml/min;检测波长455nm，1.28AUFS;进行500ul，样品浓度约为15mg/ml，样品以流动相溶解;分离过程25min。分别收集各个峰的洗脱液于棕色试剂瓶中，然后于其中通氮气5～10分钟，再置－18℃冷藏。制备分离一批样品后，将各个峰的洗脱液分别在通氮气条件下进行减压蒸馏(温度:27～34℃)，得浓缩液。然后进行冷冻真空干燥得各个峰的纯品。得率为20～30％，纯品供以后鉴定用。

收集峰共有4个，依次命名为峰1，小峰，峰2，峰3，其可见光谱最大吸收波长分别为456.6nm，423.4nm，456.8nm，456.4nm，详见图1。其中峰1、2、3的峰

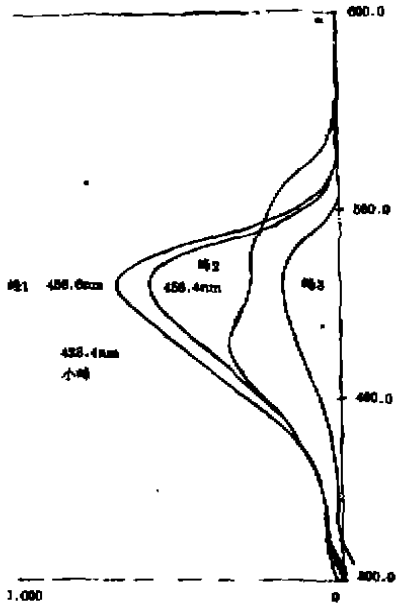



图1 BSC的HPLC制备分离中收集峰的吸光谱图

面积占所有峰面积的96％左右，峰面积之比为23.7:60.3:12.3(约2:5:1)。洗脱液经TLC分析，显示峰1、2、3均只有一个斑点，Rf分别为0.20，0.55，0.55。峰3、小峰由于最后所得纯品甚少，未作进一步鉴定，仅作了重氮反应。

3. 合成物(BSC)的结构鉴定和分析

(1) TLC及HPLC分析:

合成物经TLC及HPLC分析，显示其中至少有两个主组分，根据其色谱保留行为推测该两个主组分分别为双、单对氨基苯磺酸胆红素(见图2)。

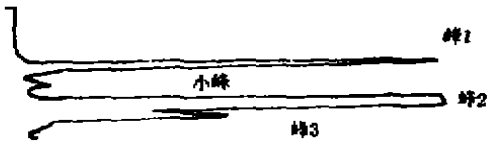



图2—1 BSC的HPLC分析图

色谱条件: 岛津LC—6A高效液相色谱仪;Shim-pack CLC ODS柱(0.15m×6.0φ，粒径5μm);100μl样品环。流动相为甲醇:1％甲酸铵缓冲液(v/v，pH4.51)＝75:25(v/v);T＝25℃，流动相流速为1.0ml/min;0.04AUFS;10μl样品，样品以甲醇溶解。其余条件同图2—2。



图2-2 BSC的HPLC制备分离图
色谱条件见BSC纯化

(2) 元素分析

由于峰1纯品量少，未作元素分析。仅将峰2纯品作元素分析(Heraeus CHN—O—S RAPID自动元素分析仪)，得到如下结果:S:4.19％，N:10.58％，C:61.35％，H:5.45％。理论值为:S:4.20％，N:9.20％，C:61.50％，H:5.26％(峰2的分子式为$C_{39}H_{40}N_5O_8SNa$，MW761.82)。从上面可以看出，除了N元素

维普资讯 http://www.cqvip.com

外，其余三种元素的百分比都与理论值相等。而导致N含量误差大的可能原因是:①称样中带入少量空气; ②系统有微小漏气; ③还原铜开始失效; ④助燃的氧气纯度不够。前三个原因时有发生。

(3) 红外光谱(IR)

将胆红素(原料)，峰1、2、的纯品进行红外扫描，结果见图3(红外光谱仪为Perkin—Elmer580B型)。扫描方法: 浆糊法(白油);综合扫描方式:S;扫描时间2.5min;分辨力:3.0cm$^{-1}$。

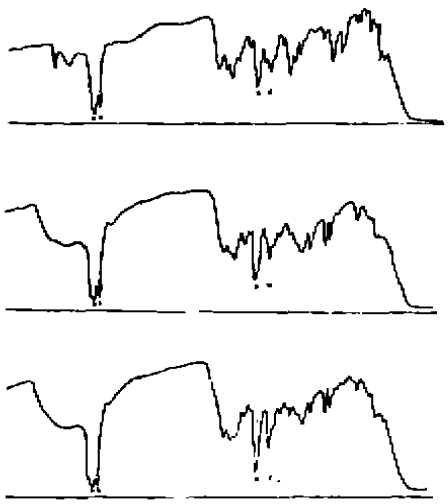


图3 红外光谱图

从上至下依次为胆红素(原料)，峰1纯品，峰2纯品。红外扫描条件见文中，X: 表示白油的红外吸收位置。

图中结果表明

①原料胆红素有羧基中C=0伸缩振动，位于1700cm$^{-1}$处。

②峰1、峰2的纯品有C=0伸缩振动，位于1665cm$^{-1}$处。这正是羧酸形成酰胺后，其中C=0伸缩振动的位置。羧基在形成酰胺后，其中的C=0伸缩振动向低频(即低波数)处移动30cm$^{-1}$左右[18]。

③峰1、峰2的纯品在1015cm$^{-1}$和1040cm$^{-1}$处有两个磺酸基的特征峰。

④峰1、峰2的纯品在845cm$^{-1}$处有苯环的对位取代特征频率。

由红外扫描结果结合前述TLC、HPLC及元素分析，可以初步推断峰1、峰2分别为双、单对氨基苯磺酸胆红素。

(4) 质谱分析(MS)

将胆红素(原料)、峰1、2的纯品进行质谱分析(KYKYQP—1000A型色—质联用仪，直接进样。轰击能量:70ev所得结果见图4(略)。

结果表明: ①胆红素的分子离子峰在m/e=586处，即分子离子峰为M+1，因为胆红素的分子量为584.67，分子式为$C_{33}H_{36}N_4O_6$。

②峰1的纯品的分子离子峰位于m/e=939处，而双对氨基苯磺酸胆红素的分子式应为$C_{45}H_{44}N_6O_{10}S_2Na_2$，分子量为938.92，所以分子离子峰为$[M]^+_e$。

③峰2的纯品的分子离子峰位于m/e=763处，而单对氨基苯磺酸胆红素的分子式应为$C_{39}H_{40}N_5O_8SNa$，分子量为761.82，所以分子离子峰为M+1。

综合TLC、HPLC、元素分析、IR及MS分析结果，可以确定峰1、峰2分别为双、单对氨基苯磺酸胆红素。

(5) 产物(即粗品)的纯度分析

按Doumas等[18]报道的方法，称取13.9mg产物进行试验。测得相当于胆红素4.8mg，若按全部生成双对氨基苯磺酸胆红素计算，则纯度约为55%，按全部生成单对氨基苯磺酸胆红素计算，则纯度约为45%。

(6) 收集组分的重氮反应特性

①将从制备柱上收集下来的峰1、2、3进行重氮反应(50mmol/L盐酸2.0ml，加0.50ml收集液，再加重氮试剂1.0ml)，反应时间分别为1，5，10，15，20，30 min，所得结果如下表。

表1 收集组分重氮反应与时间的关系
(T:+8℃，$A_{504}$)

| 及应时间 (min) | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 峰1 | 0.251 | 0.255 | 0.267 | 0.262 | 0.259 | 0.262 |
| 峰2 | 0.103 | 0.126 | 0.135 | 0.141 | 0.146 | 0.152 |
| 峰3 | 0.016 | 0.027 | 0.036 | 0.041 | 0.046 | 0.050 |

从表中结果可以看出，峰1的反应比较快，反应在10分钟内即已完成，5分钟反应95.5%，1分钟反应94.0%;而峰2、3的反应随反应时间延长而增加。反应较慢。峰1、峰2根据其色谱保留行为及结构鉴定，证实分别为双、单对氨基苯磺酸胆红素，其重氮反应快慢与天然胆红素双酯、单酯和DTB、单牛磺酸胆红素(MTB)相似[20,14]。

②将峰1、小峰、峰2、峰3按上述方法进行重氮反应，然后记录其吸收光谱(图5)。

从图中可以看出，除小峰外，其余三个峰的吸收光谱都与结合胆红素和DTB的基本一致[21,15]。结合上述结果和文中第2部分，可以推测小峰不属胆红素及其衍生物，峰3为单对氨基苯磺酸胆红素的异构体。

维普资讯 http://www.cqvip.com

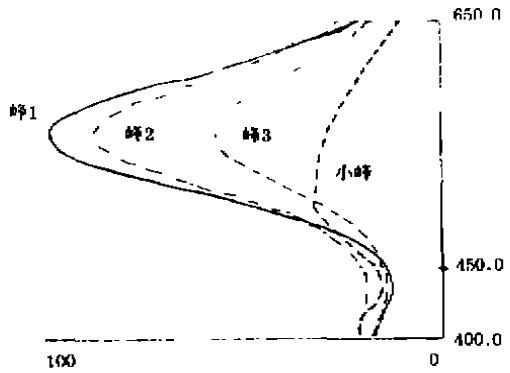



**图5 BSC的HPLC制备分离中收集峰参与直接重氮反应(盐酸环境,未碱化反应液)后的吸收光谱图**

## 讨 论

在合成、纯化及鉴定、分析的过程中，均应尽量避光操作。合成过程中，第一步反应温度不能太低或太高。否则，不利于反应的进行[22]。而且温度太低时整个反应液凝结。所得沉淀以乙醚洗涤较好，因为有部分产物溶于反应液。

利用TLC监测合成反应非常方便，这样可以了解反应进行的程度，从而指导合成工作的进行。另外，通过TLC分析，还可以为HPLC分析中流动相的选择提供先导[24,25]。

考虑到胆红素及其衍生物对光和氧敏感，所以采用HPLC制备柱来纯化产品。因为在用HPLC纯化过程中，可以做到避光和避氧[26]。另外，HPLC法在操作上比其他分离方法更为简便，容易得到高纯度的产品[23]，也是采用HPLC制备柱进行产品纯化的重要原因。

之所以选用甲醇和1%(v/v)甲酸铵缓冲液(pH4.51)作为流动相，是因为这样可以使纯产品不受甲醇、水和甲酸铵的污染[17]。水和甲酸铵可以通过冷冻真空干燥除去，甲醇可在30℃左右通氮气除去。

因为胆红素及其衍生物对热也比较敏感，故在HPLC分离过程中及减压蒸馏过程中温度都不能过高，控制在30℃左右为宜。

采用IR、MS、元素分析、HPLC、TLC等多种方法证实了合成物中含有双、单对氨基苯磺酸胆红素，并确定了其结构。用重氮反应法(改良J—G法)测得合成物粗制品的纯度约为45～55%。

单、双对氨基苯磺酸胆红素在ODS柱上的保留行为与单、双牛磺酸胆红素[18]和天然胆红素单、双酯基本相似[16,12]。它们的重氮反应速度也与单、双牛磺酸胆红素[14]和天然胆红素单、双酯[20]相似。

采用人工合成的方法，制得对氨基苯磺酸胆红素。合成产物经HPLC制备柱纯化，得到了纯产品。经过IR、MS、元素分析、HPLC、TLC等多种手段，证实了合成物中含有单、双对氨基苯磺酸胆红素。并对单、双对氨氨基苯磺酸胆红素的重氮反应速度进行了初步研究。纯化了的单、双对氨基苯磺酸胆红素可望成为结合胆红素测定的参考标准代用品。

## 参 考 文 献


1 Van den Bergh AAH,et al.Dtsch Arch Klin Med 1913;110:540
2 Doumas BT,et al.Clin Chem 1985;31:1779
3 陈宏础,等.中华医学检验杂志 1987;10:111
4 Lo DH,et al.Clin Chem 1983;29:31
5 Pesce AJ,et al.Methods in Clinical Chemistry.The C.V.Mosby Company,St. Louis,Missouri,1987;1109
6 Chan K-M,et al.Clin Chem 1985;31:1560
7 Kellenberg PG,et al.Gastroenterology 1980;78:1011
8 Mather A.Pediatrics 1960;26:350
9 Schreiner RL,et al.Pediatrics 1982;69:277
10 Pleasure JR.Pediatrics 1988;82:808
11 Lucassen J.The Diazo Reaction of Bilirubin and Bilirubin Diglucuronide.Ph. D.thesis University of Utrecht,1961
12 Lauff JJ,et al.J Chromatogr 1981;226:391
13 Wu T-W,et al.Clin Chem 1980;26:1323
14 Jirsa M,et al.Nature(London) 1956;177:895
15 冯仁丰,等.上海医学检验杂志 1987;2:91

维普资讯 http://www.cqvip.com

16 Spivak W, et al.Biochem J 1986;234:101
17 Spivak W, et al.Biochem J 1985;225:787
18 姚新生,等编.有机化合物波谱分析 北京:人民卫生出版社 1983;72
19 Doumas BT,et al.Clin Chem 1985;31:1677
20 Kuenzle CC,et al.J Lab Clin Med 1966;67:294
21 Garber CC.Clin Chem 1981;27:1410
22 Vaughan Jun.JR,et al.J Amer Chem Soc 1952;74:676
23 金恒亮,编.高压液相色谱法 北京:原子能出版社 1987;177—229
24 高 潮,等译.现代液相色谱法导论 第二版 北京:化学工业出版社 1988;367
25 Jansen PLM,et al.J Chromatogr 1980;182:100

(收稿日期 1994-01-20)

## BILIRUBIN SULFANILATE CONJUGATES-SYNTHESIS,PURIFICATION AND IDENTIFICATION

*Peng Yongzheng*, et al
Dept.of Laboratory Diagnosis

Bilirubin sulfanilate conjugates(BSC)were synthesized with the methods of Jirsa,Feng Rengfeng et al with some modifications.The product was purified with preparative column of high performance liquid chromatography(HPLC).

Infrared spectra(IR),mass spectrometry(MS),HPLC,thin layer chromatography(TLC),element analysis,visible absorption spectra and the diazo reaction method were used for the identification of structure and its character as well as the purity of the product.It is proved that this product contains bilirubin mono-and disulfanilate conjugates ,and its purity is 45-55%.The purified bilirubin mono-and disulfanilate conjugates are expeered to be used as surrogate calibrators for determining conjugated bilirubin.

KEY WORDS Bilirubin sulfanilate conjugates; Infrared spetra; Mass spectrometry; High performance liquid chromatography; Synthesis; Purification; Identification

(上接89页)

## bcl-2 GENE REARRANGEMENTS IN B-Non-Hodgkin ' s LYMPHOMA

*Feng wenli*, et al
Faculty of laboratory medicine

Southern blotting was used to detect rearrangemects of the bcl-2 gene by the two probes for chromosome 18-specific DNA fragments and for immunoglobulin hearychain joining region fragment on chromesome 14 in 25 cases of B-NHL, also, immunophenotype and karyotype. In the present study, bcl-2 gene was rearranged in 56%(10/18)of follicular lymphomas and 15%(1 of 7)of diffuse lymphome of follicle cneter cell lineage.10 of 11 the rearranged bcl-2 fragment comigrated with a rearranged immunoglobulin heary chain joining region fragment, confirming that is t(14,18) translocation. Our results show that the rearrangement of bcl-2 associated with the pathogenesis of follicular lymphoma.

KEY WORDS non-hodgkin ' s lymphoma; bcl-2 gene; rearrangement