

光催化氧化绿色合成医用化学发光试剂

马敏娜, 欧阳玉瑾, 邬源, 袁明伟*, 杨丽娟*

云南民族大学化学与环境学院, 生物基材料绿色制备技术国家地方联合工程中心, 昆明 650500

摘要: 光催化氧化较传统氧化反应更具有安全可控、条件温和、绿色环保的优点, 已成为化学前沿中的研究热点之一, 并受到广泛关注。目前, 受实验条件和设备的限制, 光催化氧化反应在本科教学实验中较为缺乏。本实验利用实验室常规仪器组装出简易光反应装置, 以高效低能的钠灯为光源催化氧化磷酸盐中间体, 实现了1,2-二氧环乙烷类医用化学发光试剂的实验室微量制备, 丰富了光化学反应在实验教学中的应用。本实验使用的原料和试剂便宜易得, 操作简便, 产物收率高, 实验既可实现单瓶独立操作, 又可进行多瓶串联反应。本文综合考虑实验成本、实验与教学效率, 以两瓶串联方式展开分组实验教学, 在实现教学形式多样化的同时, 培养学生合作意识, 适合本科实验教学, 帮助学生提高全面综合的实验操作能力, 加深对自由基加成等反应机理的理解。

关键词: 光催化氧化; 安全可控; 医用化学发光试剂; 自由基加成

中图分类号: G64; O6

Green Synthesis of Medical Chemiluminescence Reagents by Photocatalytic Oxidation

Minna Ma, Yujin Ouyang, Yuan Wu, Mingwei Yuan*, Lijuan Yang*

National and Local Joint Engineering Research Center for Green Preparation Technology of Bio-based Materials, College of Chemistry and Environment, Yunnan University for Nationalities, Kunming 650500, China.

Abstract: Photocatalytic oxidation, distinguished by its safety, controllability, mild conditions, and environmental friendliness compared to traditional oxidation reactions, has emerged as a prominent research focus in the forefront of chemistry, garnering widespread attention. However, its application in undergraduate teaching experiments has been limited by experimental conditions and equipment constraints. In this experiment, we devised a simple photoreaction device using conventional laboratory instruments. Employing a high-efficiency, low-energy sodium lamp as the light source to catalyze the oxidation of phosphate intermediates, we achieved the laboratory-scale synthesis of 1,2-dioxocycloethane-type medical chemiluminescence reagents, diversifying the application of photochemical reactions in experimental teaching. The materials and reagents used in this experiment are inexpensive and readily available, the operation is straightforward, and the yield of the product is high. The experiment allows for both independent single-bottle operations and the execution of multiple-bottle series reactions. Considering the experimental cost and teaching efficiency, we conducted group experimental teaching with a two-bottle series, fostering diverse teaching forms and nurturing students' cooperative skills. This approach is well-suited for undergraduate experimental teaching, aiding students in enhancing their comprehensive experimental operational abilities and deepening their understanding of reaction mechanisms such as radical coupling.

Key Words: Photocatalytic oxidation; Safe and controllable; Medical chemiluminescence reagent; Radical coupling

收稿: 2023-10-25; 录用: 2024-02-02; 网络发表: 2024-03-14

*通讯作者, Emails: yuanmingwei@163.com (袁明伟); 995986454@qq.com (杨丽娟)

基金资助: 国家自然科学基金项目(52163013)

1 引言

目前本科有机化学实验教学中前沿创新实验较为缺乏,内容亟待更新。光化学反应是有机化学合成中一种新兴的合成方法,但光化学反应对实验条件和设备等硬件要求较高,因此在现有本科实验教材中案例较少。同时,在有机化学理论课中光化学反应涉及的知识较为抽象,学生对于光化学知识的理解仍停留于表面,对光化学反应了解不够深入,缺乏对化学前沿知识的自主探究与理解。因此,本实验从《化学类专业本科教学质量国家标准》中重视培养学生的创新意识,实践能力和开拓学科视野的要求出发,将一种前沿的可见光催化氧化合成实验引入有机化学实验教学。

光催化氧化与传统氧化反应相比,具有条件温和、安全可控、反应速率快、选择性高、副产物少等优点^[1],是有机合成化学反应的重要研究方向,作为新兴技术广泛应用于有机分子的合成,同时也是绿色合成的重要途径之一。1,2-二氧环乙烷类(AMPPD)是一类反应速度快,量子效率和稳定性高的化学发光分子^[2],在医疗领域中常用作体外诊断试剂,其合成在化学发光免疫中有重大意义和广阔发展前景^[3]。目前,国内主要以工业化的形式进行1,2-二氧环乙烷类化学发光试剂的生产,但缺乏相关的合成研究报道。因此,参考借鉴国外相关文献,对1,2-二氧环乙烷类化学发光试剂的合成进行研究和创新,并将其引入本科教学实验,是一种极具教学意义的创新实践。

基于此,我们通过多次实验探究,利用实验室常规基础仪器组装简易光反应装置,将1,2-二氧环乙烷类医用化学发光试剂的工业化生产转化为实验室微量制备,在设计并验证单瓶实验装置的可行性后经过改进实现了可多瓶串联的反应装置。为达到节约实验成本、提高教学和实验效率以及丰富教学形式等目的,以两瓶串联反应开展分组实验教学。

本实验将前沿科学知识和科学研究方法融入到教学活动中,既加深了学生对自由基加成等基础理论知识的理解,又涵盖了有机实验和仪器分析实验等基本操作,教学时长合理、操作简便、成本低廉、绿色安全,适合设计为本科教学实验。

2 实验部分

2.1 实验目的

- (1) 掌握光催化氧化绿色合成1,2-二氧环乙烷类的方法;
- (2) 了解1,2-二氧环乙烷类的医用价值;
- (3) 掌握旋转蒸发、减压抽滤和薄层色谱分析等有机化学基础实验操作;
- (4) 熟悉核磁共振氢谱和高效液相色谱对产物进行表征的分析方法。

2.2 实验原理

2.2.1 1,2-二氧环乙烷类的合成

1,2-二氧环乙烷类(AMPPD),常温下为白色粉末状固体。本实验通过光催化氧化制备1,2-二氧环乙烷类的反应(图1),以3-磷酸苯基[甲氧基甲叉基]金刚烷二钠盐为原料,将其完全溶解于甲醇后加入三氯甲烷,通入氧气作为氧化剂,降温至6℃后加入一定量光催化剂,控制反应温度为5-8℃,在钠灯照射下光催化氧化制备1,2-二氧环乙烷类。

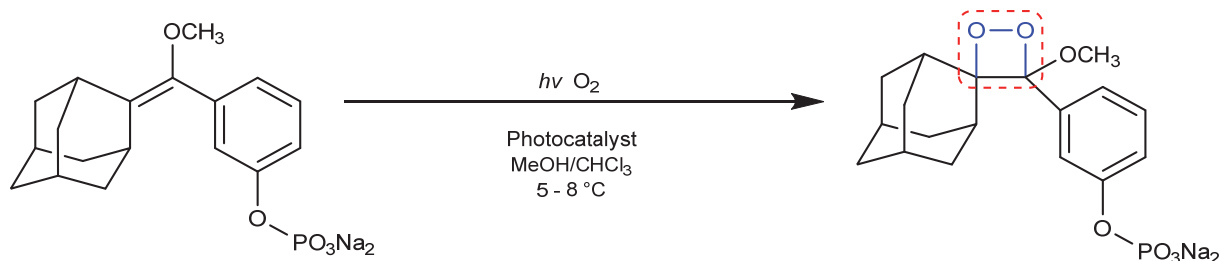


图1 1,2-二氧环乙烷类的合成路线

具体反应历程如图2所示, 根据文献报道^[4], 3-磷酸苯基[甲氧基甲叉基]金刚烷二钠盐**1**中富电子双键在光照下发生 π 电子均裂, 得到双自由基物种中间体**I**; 随后与 O_2 经过自由基加成得到过氧自由基中间体**II**; 在持续光照下, 自由基中间体**II**经过单电子转移芳构化, 得到重要中间体**III**; 最后经过双自由基偶联, 即可得到具有过氧桥结构的产物AMPPD^[4,5]。

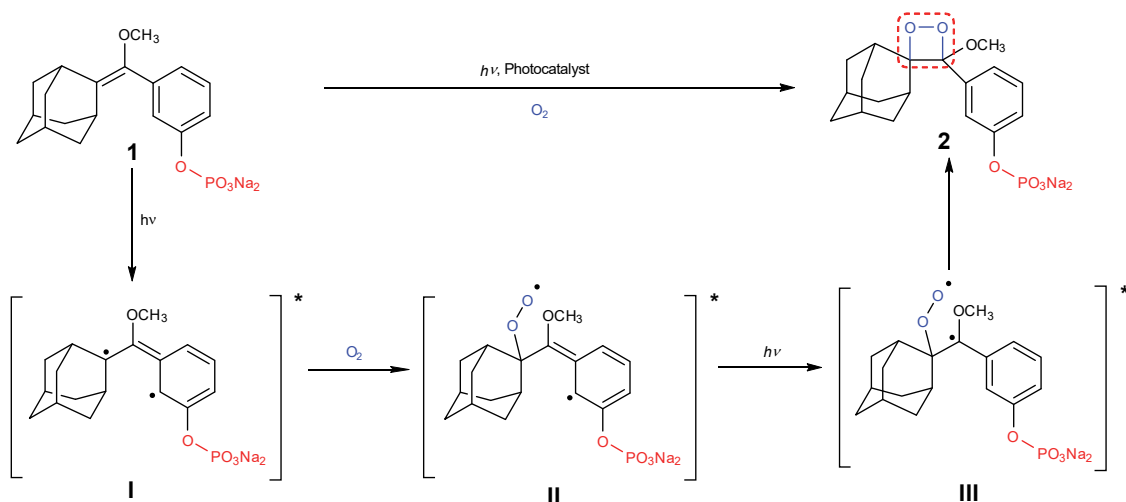


图2 光催化氧化反应历程图

2.2.2 1,2-二氧环乙烷类(AMPPD)的发光机理

AMPPD的发光机理如图3所示, AMPPD的发光性能来源于其分子结构中的两个重要部分, 一个是连接苯环和金刚烷的二氧四节环, 它可以断裂并发射光子; 另一个是磷酸根基团, 它维持着整个分子结构的稳定。AMPPD在ALP(碱性磷酸酶)作用下, 磷酸酯基发生水解而脱去一个磷酸基, 得到一个不稳定的中间体**II**, 此中间体经分子内电子转移裂解为一分子的金刚烷酮**III**和一分子处于激发态的间氧苯甲酸甲酯阴离子**IV**, 当其回到基态时产生470 nm的光, 可持续几十分钟^[6,7]。

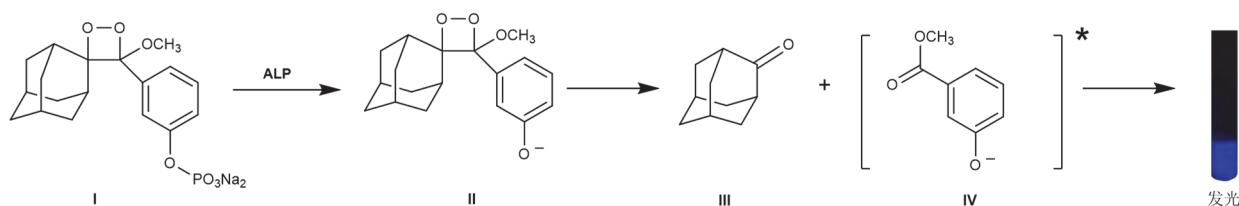


图3 AMPPD发光机理图

2.3 实验试剂

本实验中使用到的主要实验原料及试剂如表1所示。其中, 3-磷酸苯基[甲氧基甲叉基]金刚烷二钠盐可直接购买, 也可参考文献^[8]的方法, 在实验室合成得到。

表1 实验原料及试剂

试剂名称	纯度	生产单位
3-磷酸苯基[甲氧基甲叉基]金刚烷二钠盐(干燥低温保存)	99%	昆明仙科生化科技有限公司
甲醇	AR	成都科隆化学试剂公司
三氯甲烷(避光防热保存)	AR	昆明仟程翔高商贸有限公司
二氯甲烷	AR	成都科隆化学试剂公司
五氧化二磷(密封保存)	AR	淄博市淄川亚龙化工厂

2.4 仪器与表征方法

(1) 玻璃仪器及耗材。

三颈烧瓶、烧杯、玻璃结晶皿、带磨口塞锥形瓶、量筒、直导管、温度计、玻璃棒、玻璃套管、橡胶管。

(2) 其他仪器。

锡纸、铁架台。

(3) 实验及测试仪器见表2。

表2 主要仪器

仪器名称	型号	制造商
电子天平	PR124ZH/E	奥豪斯仪器(常州)有限公司
恒温磁力搅拌器	HJ-1	金坛区西城新瑞仪器厂
医用氧气袋	容气量50 L	北京市鑫田黎明医疗器械有限公司
投光灯具(1000 W钠灯)	GT182-N1000/t	上海亚明照明有限公司
全自动雪花制冰机	IMS-40	无锡九平仪器有限公司
自动升降旋转蒸发仪	ML G3	昆明环鹤进出口贸易公司
高效液相色谱仪	LC-UV100	伍丰仪器
核磁共振仪	Bruker-400 MHz	德国Bruker公司
恒温真空干燥箱	DZF-6020A	上海精密仪器厂
三用紫外分析仪	ZF-1	杭州齐威仪器有限公司

(4) 高效液相色谱表征。

① 测试条件：高效液相色谱使用C18反相色谱柱，柱温为40 °C，流动相为0.01%乙酸铵与乙腈，其体积比为75 : 25，流速1 mL·min⁻¹，检测波长为215 nm。

② 制样方法：取少量反应完全的反应液浓缩后用相应流动相稀释，并用合适的0.45 μm滤膜过滤，配好后待用。

(5) 核磁共振表征。

核磁共振氢谱使用四甲基硅烷(TMS)作为内标，氘代甲醇作为溶剂。

2.5 实验步骤及方法

2.5.1 实验说明

本实验以两瓶(以下标记为A瓶、B瓶)串联操作为例，两个学生为一个小组，共同完成一个反应瓶，两个反应瓶(两个小组)串联后共用一个钠灯和一个氧气袋。

2.5.2 搭建自制简易光反应装置

(1) 单瓶简易光反应装置如图4、图5所示。

(2) 多瓶简易光反应装置如图6、图7所示。

搭建过程：首先，将两台磁力搅拌器放置在相邻铁架台上，分别将两个玻璃结晶皿放在磁力搅拌器上。其次，将两个装有磁力搅拌子的三颈烧瓶A、B分别固定在铁架台上并调整至合适位置。用涂有凡士林的通气塞分别塞入a1、a3、b1、b3口，遵循“长进短出”原则在a1口插入短直导管，b3口插入长直导管。另取一根橡胶管，两端插入长直导管和短直导管，并分别插入a3口和b1口，串联A、B烧瓶，最后用橡胶管将b3口和氧气袋相连。

2.5.3 1,2-二氧环乙烷类的实验室合成

A瓶：精确称取3-磷酸苯基[甲氧基甲基]金刚烷二钠盐1.8 g于烧杯中，加入22 mL甲醇搅拌使

其完全溶解，用玻璃棒引流至三颈烧瓶中，溶液呈无色澄清状态如图8(a)所示。打开磁力搅拌器并调整至合适转速，使其充分混合均匀。用量筒量取43 mL三氯甲烷，少量多次倒入烧杯，并将洗涤液缓慢引流至三颈烧瓶中，溶液中有絮状物析出如图8(b)所示。

B瓶反应液配制流程和A瓶相同。待反应液配制完成后，将A、B两瓶串联进行实验，实验流程如图9所示。

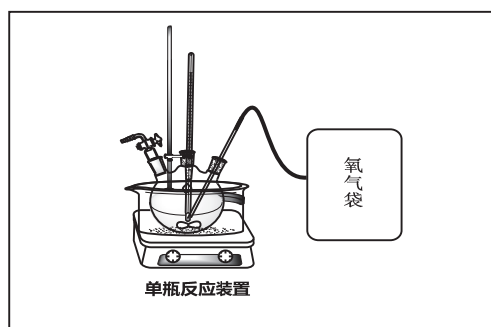


图4 单瓶反应装置设计图



图5 单瓶反应装置实物图

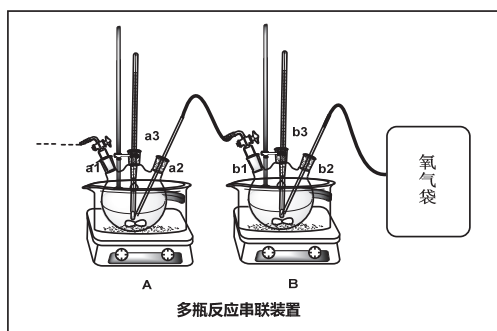


图6 两瓶反应串联装置图

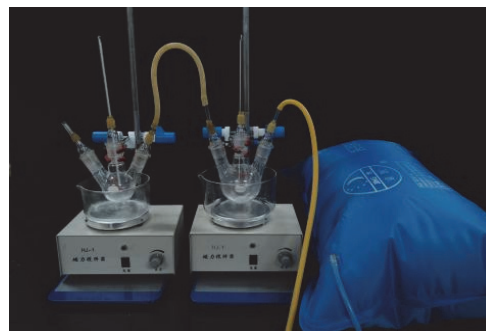


图7 两瓶反应串联装置实物图

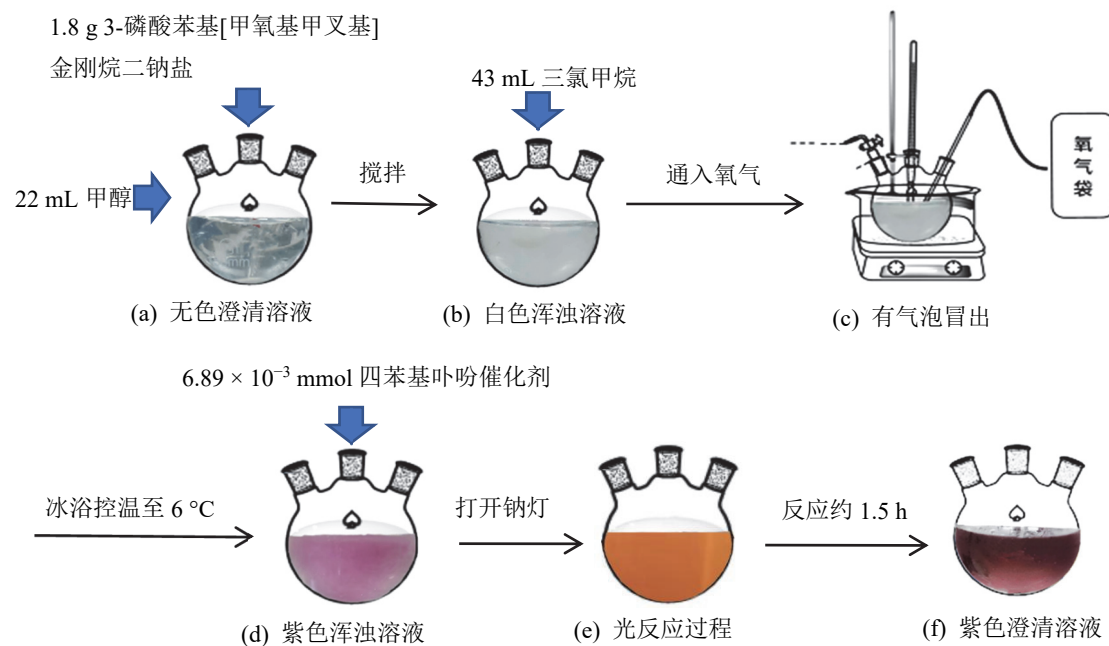


图8 实验现象变化过程

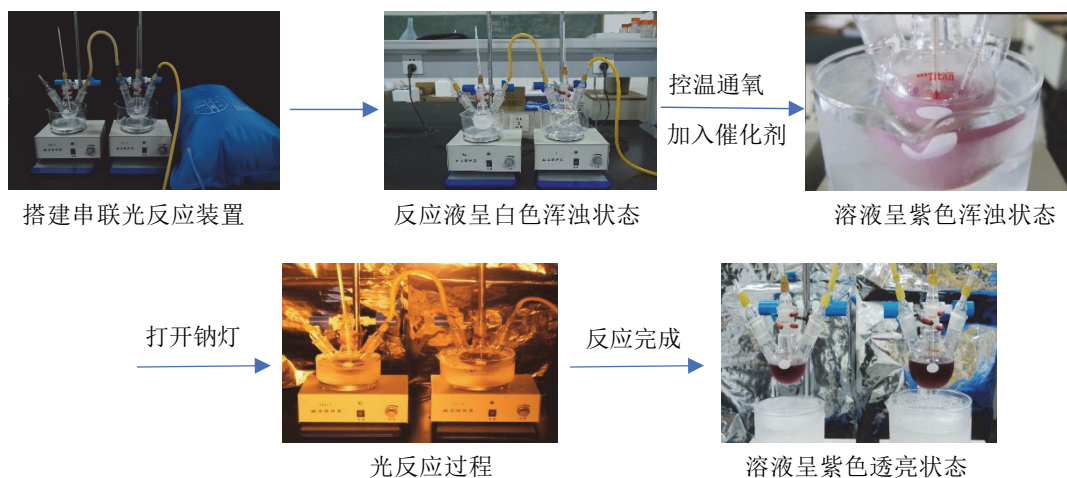


图9 两瓶串联光反应实验流程图

2.5.4 中间反应进程监测

薄层色谱 $V(\text{石油醚}) : V(\text{乙酸乙酯}) = 10 : 1$ (紫外显色) 监测反应。大约反应 1.5 h 后，可以监测到反应液 A、B 瓶中均已无原料，反应完成。图 10 为反应液的薄层色谱图。

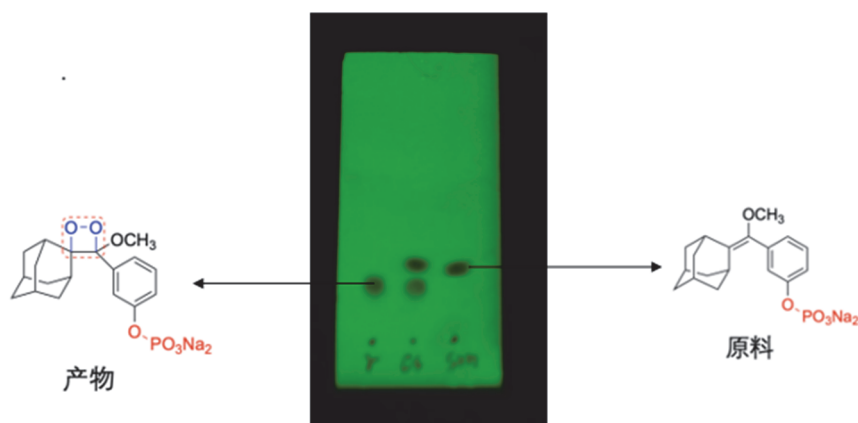


图10 反应进程监测薄层色谱

2.5.5 反应后处理

经薄层色谱分析监测，确认反应完成后取反应液进行以下操作：室温下减压抽滤，取滤液在 25 °C 下减压浓缩至粘稠状后加入适量二氯甲烷析出沉淀，再次减压抽滤得到大量固体，用适量二氯甲烷洗涤至无色。将产品在 25 °C 真空干燥 15 min，得到白色粉末为 AMPPD 产品见图 11，产物经结构表征和纯度分析与标准品一致(见 3.2 小节和 3.3 小节)，进一步用于发光性能测试。

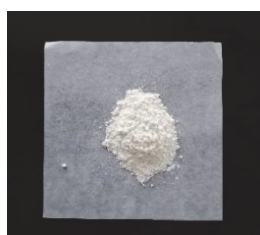


图11 产品外观图

2.5.6 产物发光性能测试

AMPPD在缓冲液和碱性磷酸酶的作用下能够发出荧光,将得到的产物加入一定量和一定浓度的碱性磷酸酶和缓冲液配制为发光溶液,观察发光现象。观察到产物具有明显发光现象(图12),因而确定其具有良好的发光性能。

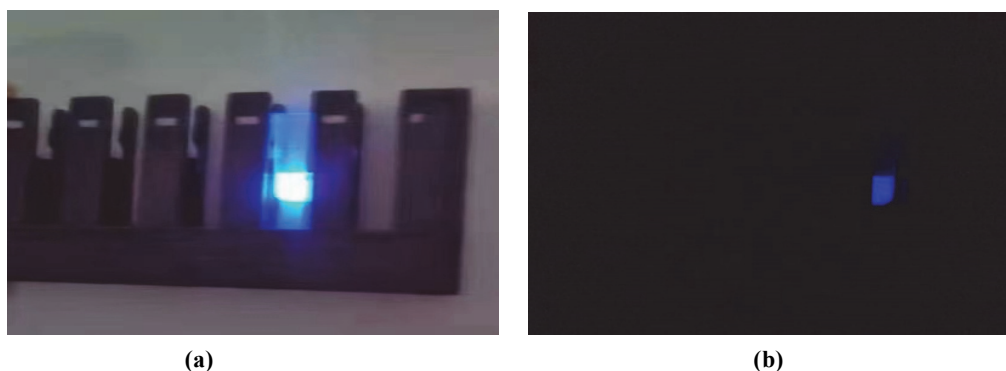


图12 产物发光现象

(a) 光亮环境下; (b) 黑暗环境下

3 结果与讨论

3.1 实验收率

本实验通过光催化氧化3-磷酸苯基[甲氧基甲叉基]金刚烷二钠盐中间体制备1,2-二氧环乙烷类医用化学发光试剂,反应完全后,经洗涤、抽滤、脱色和干燥,得到白色粉末,即产品AMPPD。在上述两组串联反应中,A瓶得到产品1.83 g,产率为94.04%,B瓶得到产品1.79 g,产率为91.97%。经过多次重复实验,本反应产率可达90%及以上,具有较好的重现性,既可实现毫克级反应,又可进行常量化反应,不同学校可根据实际情况调整反应量。

3.2 核磁共振结构表征

产物1,2-二氧环乙烷类的结构及核磁共振氢谱如图13所示。

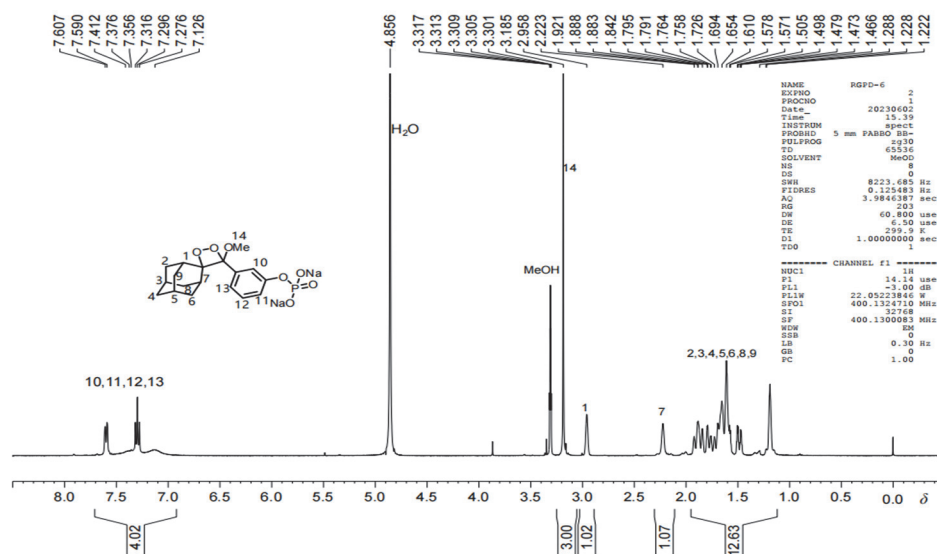


图13 AMPPD的¹H NMR谱图

分析如下：¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.81–6.84 (m, 4H), 3.19 (s, 3H), 2.96 (s, 1H), 2.22 (s, 1H), 1.96–1.13 (m, 12H)。经对比分析，产品谱图与标准谱图一致，确定A、B瓶产物均为1,2-二氧环乙烷类。

3.3 高效液相色谱结构表征及纯度分析

(1) 结构表征。

目标产物1,2-二氧环乙烷类的高效液相谱图如图14所示。

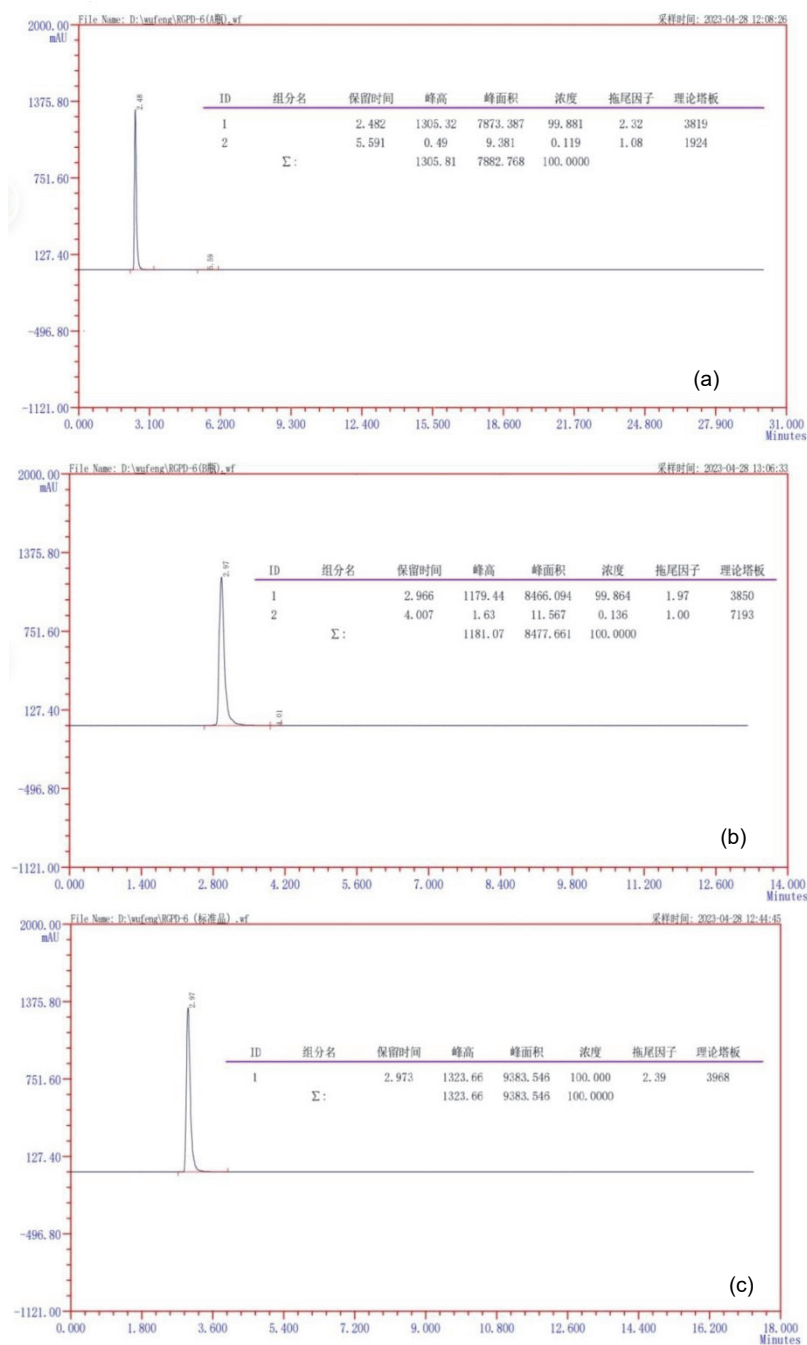


图14 高效液相色谱图

(a) A瓶产品; (b) B瓶产品; (c) 标准品

分析数据如下：在相同色谱条件下，A瓶产品谱图(a)、B瓶产品谱图(b)与标准品谱图(c)对照，保留时间一致，确定A、B瓶产品均为1,2-二氧环乙烷类。

(2) 纯度分析。

A瓶产品谱图(a)中出现了两个峰，其中保留时间为5.59 min的峰为杂质峰，保留时间2.48 min的峰为产品峰。两个峰面积和为100%，产品占99.88%，即产品纯度为99.88%。

B瓶产品谱图(b)中出现了两个峰，其中保留时间为4.01 min的峰为杂质峰，保留时间2.97 min的峰为产品峰。两个峰面积和为100%，产品占99.86%，即产品纯度为99.86%。

经过多次重复实验，本反应产率可达90%及以上，具有较好的重现性，既可实现毫克级反应，又可进行常量化反应，不同学校可根据实际情况调整反应量。

3.4 教学实践

3.4.1 教学推广

(1) 1,2-二氧环乙烷类的制备教学具体形式。该制备过程既可进行单个光反应装置的独立实验，又可将多个光反应装置进行串联，开展小组合作实验，具体形式如下：

① 单瓶独立操作：以32人为一个实验班展开教学，每名学生独立操作，各用一个光反应装置。

② 多瓶串联操作：综合考虑多数院校的实际情况，开设32人的实验教学班，初设2名学生为一个小组，共做一个反应瓶；两个小组串联装置后共用一个钠灯光源进行合作实验。组内协作配合，组间共用钠灯光源和氧气袋，即可实现教学资源的充分利用，节约实验成本，又可培养学生合作意识，适合于本科教学实验。

(2) 1,2-二氧环乙烷类的结构表征具体教学形式。

在产品干燥过程中，将32名学生分为两组，每组16人，分别同时进行核磁共振和高效液相色谱结构表征的实验。核磁共振具体教学方式：实验老师讲解核磁共振仪器的工作原理及使用方法，学生各自取已经干燥完成的AMPPD产物，加入氘代甲醇作为溶剂，配制测试样品，而后由老师进行演示实验。在测样完成后，老师选取一组学生的样品谱图进行适当讲解，共1学时(45 min)。高效液相色谱具体教学方式：实验老师讲解高效液相色谱仪的工作原理和使用步骤，学生各自取已经干燥完成的AMPPD产物，加入流动相配制测试样品并设置参数后进样，以上步骤由学生完成老师在旁指导，随后选取一组学生的谱图进行讲解，共1学时(45 min)。在各自完成核磁共振和高效液相色谱实验后两组学生进行交换，共计2个学时。课后，老师将学生各自实验所做的谱图进行分发，要求学生在实验报告中体现谱图解析的过程。

(3) 1,2-二氧环乙烷类的发光性能测试具体教学形式。

实验老师提前配制缓冲溶液和一定浓度的碱性磷酸酶溶液，学生称取各自干燥完成的AMPPD约0.5 g，加入3 mL缓冲液和5 mL碱性磷酸酶溶液摇匀后置于黑暗环境下观察产物的发光现象。

3.4.2 学时分配

学时分配如表3所示。

表3 学时分配

实验内容	学时
1,2-二氧环乙烷类的制备	3学时
1,2-二氧环乙烷类的结构表征	2学时
1,2-二氧环乙烷类的发光性能测试	1学时
合计	6学时

3.4.3 注意事项

(1) 钠灯光源较为刺眼，实验过程中避免长时间注视，并做好相应防护措施；

- (2) 温度计要插入液面下合适位置, 避免与磁力搅拌子接触;
- (3) 反应过程中严格控制温度5–8 °C。

3.4.4 思考题

- (1) 测定AMPPD的纯度时为什么不采用熔点测试法?
- (2) 试简要概括旋转蒸发仪的工作原理和应用?
- (3) 反应过程中为什么要严格控制温度5–8 °C?

4 结语

本实验将前沿的光催化氧化技术引入本科实验教学, 利用实验室基础仪器自主设计简易光反应装置, 解决了光反应器成本高、体积大、用量大等在实验教学中带来的不便, 实现了1,2-二氧环乙烷类医用化学发光试剂从工业化生产到实验室的微量制备, 丰富了光催化氧化绿色合成反应在基础实验教学中的应用。该实验既可进行单瓶单组的独立操作, 又可实现多瓶串联的小组操作, 实现了教学资源的充分利用, 节约实验成本。同时, 该光催化氧化反应规避了传统氧化反应剧烈难控的缺点, 具有原料易得、成本低廉、操作简便、反应条件温和、安全可控的优点, 充分践行了绿色化学的理念。

5 创新性

- (1) 以常见的钠灯为光源实现了安全可控, 条件温和的氧化反应;
- (2) 装置简单, 既可单瓶独立操作, 又可多瓶串联操作, 节约实验成本;
- (3) 弥补光化学反应在本科教学的匮乏, 便于教学推广。

参 考 文 献

- [1] 桂威军. 两种环氧化物光化学反应的研究[硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012.
- [2] Adam, W.; Kazakov, D. V.; Kazakov, V. P. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (9), 3371.
- [3] 岳岭, 刘亚军. AMPPD及其对位异构体的化学发光解离机理的理论研究//中国化学会第28届学术年会第13分会场摘要集. 中国化学会第28届学术年会, 成都, 2012年4月13–16日. 成都, 2012: 207.
- [4] Zhang, Y.; Yan, C.; Wang, C.; Guo, Z.; Liu, X.; Zhu, W.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *132* (23), 9144.
- [5] 田浩. 黄花蒿内生草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum* B4)促进青蒿素合成、转化青蒿酸和降解三氯生的研究[博士学位论文]. 苏州: 苏州大学, 2019.
- [6] 陈文勇. 生命的化学(中国生物化学会通讯), **1991**, No. 4, 30.
- [7] 涂浪平, 孔祥贵. 发光学报, **2010**, *31* (4), 580.
- [8] 焦艳华, 郭卫强, 何睿, 梁媛媛, 陈灿玉. 章鹏飞. 杭州师范大学学报(自然科学版), **2012**, *11* (4), 342.