竹红菌甲素光敏氧化吲哚类化合物的研究

II. 色氨酸光敏氧化产物的分离和鉴定*

第五振军　张曼华　蒋丽金
（中国科学院感光化学研究所，北京）

关键词　竹红菌甲素、吲哚、色氨酸、光敏氧化

自从 Weil[1a] 报道了亚甲蓝光敏氧化色氨酸（Trp）以来，人们已经研究了各种敏化剂敏化的 Trp 的光氧化，可是关于 Trp 的光敏氧化还有许多问题有待于进一步研究. 竹红菌甲素（HA）是一种新型的光疗药物[2a]和优良的敏化剂[2b]，红细胞膜的光损伤实验表明：HA 的光动态作用对 Trp 的破坏程度最大[2c].

一、实 验 部 分

1. 材料与设备　HA：云南微生物研究所粗品，用丙酮重结晶两次. Trp：INC 进口分装，用水重结晶. 犬尿素和 3-羟基犬尿素：E. P.，日本东京化株定会社. 色胺和犬尿烯酸：A. R.，Sigma. L-天冬氨酸：Budapest Hungary. 5-羟基色氨酸：A. R.，Fluka. 丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸、吲哚乙酸、邻氨基苯甲酸和吲哚醌：A. R.，北京化工厂. 吲哚丙酸：C. P.，北京化工厂，氯仿重结晶. 吲哚甲醛、N′-甲酰基犬尿素、PPI（或 HPI）和 5-羟基-HPI 分别按照文献[3—6]合成. 其余未注明的试剂均为国产分析纯试剂.

高压钠灯：450W，北京电光源研究所. 紫外-可见分光光度计：Hitachi557 型. 荧光分光光度计：Hitachi MPF-4 型. 红外分光光度计：Perkin-Elmer 983G 型. 高压液相色谱（HPLC）仪：Varian Vista 5500 型，以 YWG-$C_{18}H_{37}$（津-Q/HG3-1260-79）装柱，用“甲醇：水（1:9，*V*/*V*）”作流动相. 薄层层析（TLC）和纸层析（PC）：青岛海洋化工厂硅胶 G 制 20×20cm 板. 展开剂：(1)正丁醇:乙酸：水(4:1:1，*V*/*V*/*V*)；(2) 正丁醇：吡啶：水(1:1:1，*V*/*V*/*V*). 显色：(1) 254nm 紫外灯；(2) 0.3% 茚三酮乙醇溶液；(3)茚三酮的 2,6-二甲基吡啶溶液[5]；(4) 12% 对二甲氨基苯甲醛的酸性乙醇溶液.

2. 反应及产物鉴定　将 50mgHA 和 120mgTrp 溶于“乙腈：水（1:1，*V*/*V*）”的混合溶剂中，通氧光照 5h 后用旋转挥发仪抽除混合溶剂中的乙腈，剩余的混浊液过滤分出沉淀，并用氯仿多次洗涤它，所得沉淀从性质和元素分析结果看似乎是黑素[1b]. 滤液用乙醚萃取，萃取液浓缩用 TLC 分离并以标样化合物对照可检测出有少量吲哚甲醛，4-羟基喹啉和吲哚醌. 水相经过 HPLC，TLC 和 PC 分离后用合成的标样化合物进行对照的方法分析鉴定其中所含化合物. 反应过程中放出的氨用湿的 pH 试纸和萘氏特试剂检验，二氧化碳用饱和氢氧化钙溶液检验.

本文 1987 年 4 月 13 日收到.
* 国家自然科学基金资助项目.

二、结果与讨论

我们将Trp在"乙腈：水（1:1,V/V)"混合溶剂中的光敏氧化产物的分布和性质列于表1和图1中．这些产物可分成三类：(1)氨和二氧化碳，反应一开始就可放出氨，我们在最终的反应产物中也分离得到了吲哚丙酸，说明Trp在光敏氧化过程中可能有脱氨现象．与氨不

表1 Trp 光敏氧化产物的薄层层析和纸层析行为

性质 \ 产物		1	5	6	11	13	14	x	Trp
TLC	R_f1			0	0.76	0.49	0.57		
PC	R_f1			0	0.30	0.39	0.30	0.30	
	R_f2	0.97	0.66	0	0.66	0.66	0.51	0.33	0.69
显色	(1)			黑	绿	紫	紫	黄绿	
	(2)	黄棕	兰紫	黑	兰紫		兰紫	兰紫	紫
	(3)			黑		黄	紫红		
	(4)			黑	浅棕红	棕黄	棕黄		

同，二氧化碳在光照2h后才放出，我们也没有得色胺，说明二氧化碳不是来自Trp而是来自反应产物的脱羧．(2)黑素可能是Trp羟基化再氧化聚合的结果[1b]．这两类物质的形成可能是自由基过程，特别是黑素的形成[7]．(3)包括3和7—15，是Trp光敏氧化的主要产物．我们向反应体系中加入单重态氧的猝灭剂叠氮化钠和1，4-二氮杂双环[2,2,2]辛烷后，用HPLC跟踪反应，这些物质的生成量明显减少，说明它们的形成与单重态氧有关．

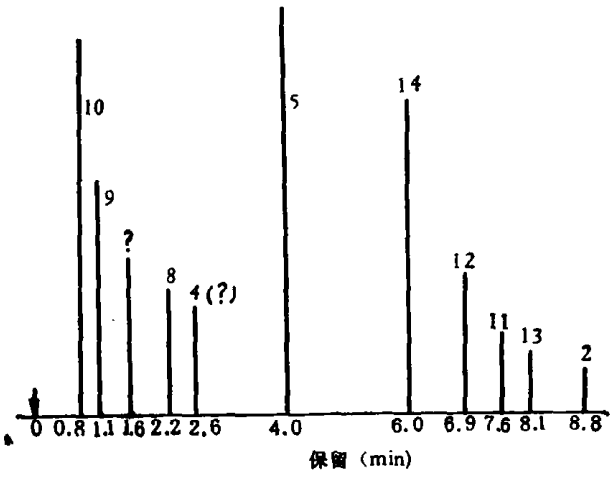

图1 "HA + Trp/CH_3CN + H_2O(1:1,V/V)"光照5h HPLC分析图

（" + H_2O"体系与此相似，"MeOH + H_2O"体系5的比例降低）

在以"四氢呋喃：水（1:1，V/V)"作溶剂的体系中，我们用HPLC跟踪了Trp的光敏氧化反应．发现8随着光照时间的延长而渐渐增多后趋向缓和，这是由于一部分7（8的前体）可分解成13的缘故．高的反应温度有利于这个分解过程，我们将光照1h后的反应液在60℃加热10min，发现13的量增加，8的量减少．体系中加入还原剂（如硫酸亚铁、硫脲和丁硫醚）可加快8的形成．另以310nm为激发波长，观察330nm的荧光峰（8的荧光）监测该反应过程中8的变化情况与HPLC的结果一致．在反应过程中加入单重态氧的猝灭剂1，4-二氮杂双环[2,2,2]辛烷可增加9和10的比例，加入异丙醇可降低它们的比例，说明它们的形成还与自由基过程有关．另外，向体系中加入甲酸钠5的比例有所升高，是不是与超氧负离子有关，因为CO_2^-和氧电子转移后可形成超氧负离子[8]．HA和前黄素作敏化剂光敏氧化Trp的产物比较相似是HA光敏氧化Trp反应中可能存在超氧负离子的一

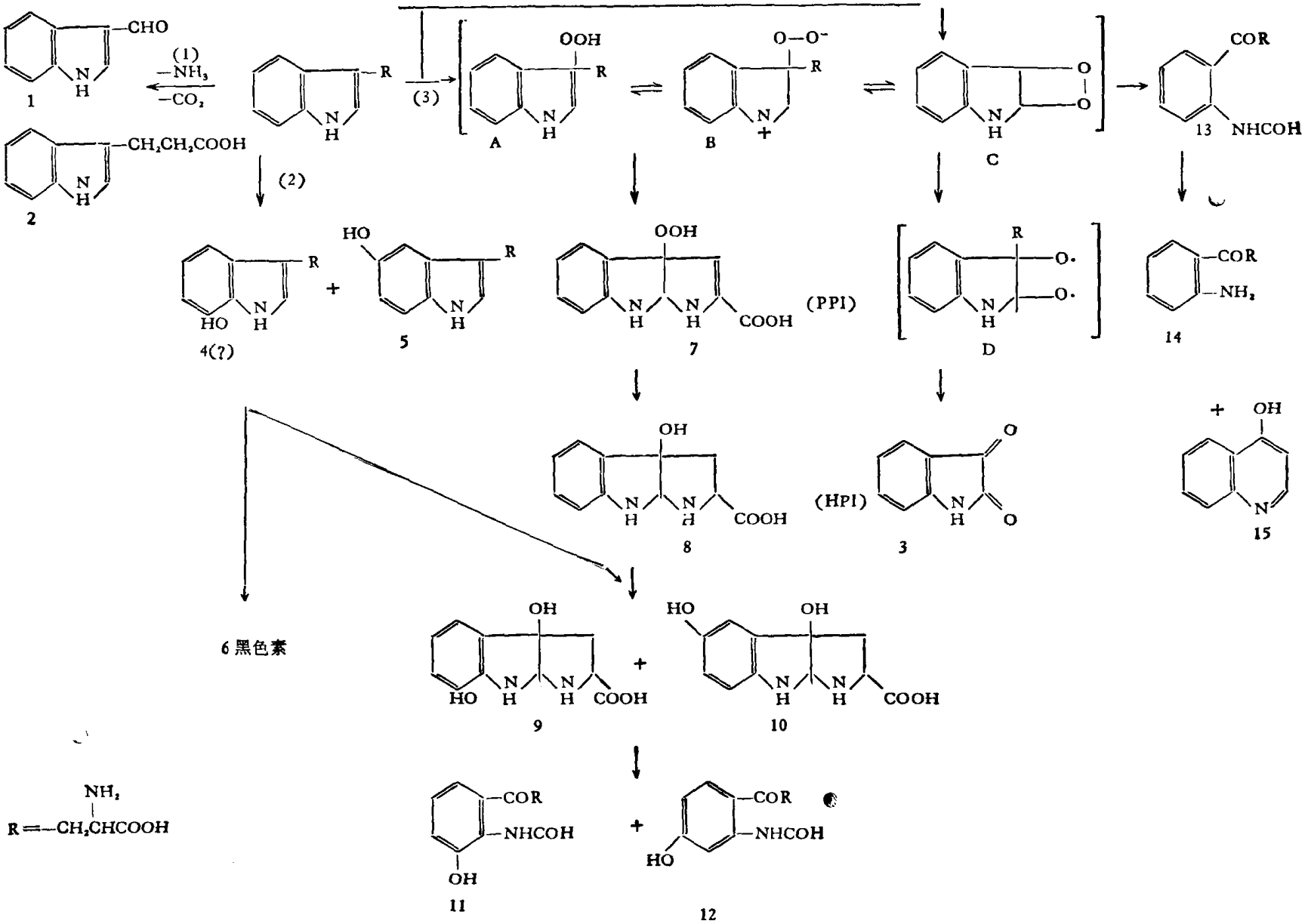

图 2 HA 光敏氧化色氨酸反应机制

个旁证，因为已经证明前黄素可产生超氧负离子[9]。与前黄素不同，HA 光敏氧化 Trp 并不能生成小分子氨基酸，这个问题还有待于进一步深究。我们用 HPLC 监测和以 370nm 为激发波长借助观察 450nm (13 的荧光) 和 480nm (14 的荧光)处的荧光来监测反应过程中 13 和 14 的变化情况，发现随着光照时间的延长，13 和 14 的量均增大，说明它们是最终产物。另外，还检测到 15，我们用 HA 直接敏化氧化 13 (或它的模型化合物-N-甲酰基邻氨基苯乙酮) 得到 14 和 15 (或它们的类似物)，这说明 14 和 15 来自 13，与文献[10]的结论一致。最后，我们在 HA 敏化氧化 Trp 的反应中，还得到 3，我们用 HA敏化氧化吲哚和 2-甲基吲哚也得到 3，可能是双自由基中间体D发生消去反应形成了它。据此，我们将 HA 光敏氧化 Trp 的反应概括成图 2。

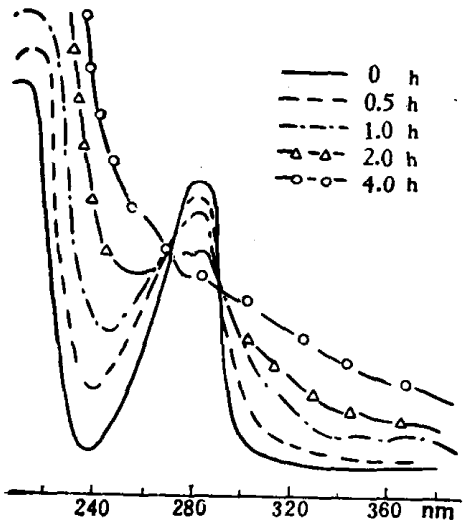

图 3 反应体系吸收光谱随光照时间的变化

反应过程体系吸收光谱的变化 (图 3)为该反应模式提供了进一步的证据。从图 3 可以看出，随着 280 nm 处 Trp 吸收峰的降低，在 300，328，372 和 383nm 处的吸收峰却明显升高，它们分别对应于 8，11(或 12)，13 (或 15)和 14 的吸收光谱。

综上所述，我们可以看出：(1) HA 敏化氧化 Trp 的反应是一个既涉及到单重态氧又涉及到电子转移的复杂过程，反应以单重态过程占优。(2) 虽然只有几个产物是在 HA 敏化氧化 Trp 的反应中新发现的，大多数产物都曾用其它敏化剂敏化氧化 Trp 时得到过，但同时得到这么多的产物还不多见。反应中得到的黑素对于理解竹红菌对皮肤病的光疗机制相当重要。

参 考 文 献

[1] a) Weil, L., Gordon, W. G. and Buchert, A. R., *Archs. Biochem. Biophys.*, **33**(1951), 90—109.
b) Benassi, C. A., Scoffone, E., Galiazzo, G. and Jori, G., *Photochem. Photobiol.*, 6(1967), 857—866.

[2] a) 万象义、陈远腾，科学通报，**25**(1980)，24：1148—1149.
b) 安静仪、张曼华、蒋丽金，科学通报，**30**(1985)，18：1397—1399.
c) 程龙生、王家珍，实验生物学报，**18**(1985)，89—95.

[3] 李述文、范如霖编译，实用有机化学手册，上海科学技术出版社，1981，263.

[4] Huffman, C. W., *J. Org. Chem.*, 1958, 727—729.

[5] Sun, M. and Zigman, S., *Photochem. Photobiol.*, **29**(1979), 893—897.

[6] Nakagawa, N., Yukoyama, Y., Kato, S. and Hino, T., *Tetrahedron*, **41**(1985), 2125—2132.

[7] Yearly Review, *Photochem. Photobiol.*, **35**(1982), 881—885.

[8] Singh, A., Singh, H., Kremers, W. and Koroll, G. W., *Bull. Europ. Physiopath. Resp.*, suppl., **17**(1981), 31—41.

[9] Pathak, M. A. and Joshi, P. C., *Photochem. Photobiol.*, suppl., **37**(1983), 78.

[10] Pirie, A. and Dilley, K. J., *Photochem. Photobiol.*, **19**(1974), 115—118.