科 学 通 报
第 38 卷 第 11 期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1993 年 6 月

竹红菌甲素激发态结构*
——激基缔合物和激基复合物

王大辉 张志义 张过江 赫荣乔
(中国科学院生物物理研究所,北京100101)

关键词 竹红菌甲素、激基缔合物、激基复合物、激发态单体、ESR

竹红菌甲素 (Hypocrellin A, 简称 HA) 是我国首先发现并应用的一种高效光敏剂,并已用来治疗某些顽固性皮肤病[1,2]. 它是从天然资源中分离的一种苝醌类衍生物 (分子式 $C_{30}H_{26}O_{10}$). 作为外源醌, 它有可能发展成为一种抗癌药物. 关于 HA 激发态特征已有一些报道[3,4]. 众所周知,激基缔合物的光谱特征是在激发态单体荧光峰的红侧有一个新的, 依浓度而变化的无振动结构的宽峰[5],但由于在极稀 HA 溶液中, HA 单体发射峰 (600nm) 红侧仍然存在肩峰因而对 HA 激基缔合物的存在产生怀疑,对肩峰的解释也有分歧[6]. 鉴于这一光化学中间体对阐明 HA 激发态特征和光化学反应机制 (I 型和 II 型)都至关重要, 本文对 HA 在不同浓度、极性、粘度的溶液中的荧光光谱和吸收光谱作了进一步的研究, 并结合 ESR, 荧光猝灭及在质子给体溶液中的实验结果所提供的证据进行了综合分析,证明在强极性有机溶液中,激发态 HA 分子经扩散与基态分子相结合成激基缔合物,同时可与溶剂分子结合成激基复合物,阐明了它们形成的条件、相互作用的光谱特征及其峰位置的归属.

1 材料和方法

1.1 试剂

竹红菌甲素由云南微生物研究所精制提供,二甲基亚砜 (DMSO) 为美国 Baker 公司产品(光谱纯),二甲基甲酰胺 (DMF)、乙醇、苯、丙酮、丙三醇均为国产分析纯试剂, 并经测试无本底吸收和荧光.

1.2 荧光光谱测试

用日立850-荧光分光光度计,狭缝宽度 $E_x = 5$, $E_m = 5$, 用 $E_x = 480$nm 激发.

1.3 吸收光谱测试

用日立 U-3200 紫外,可见分光光度计.

2 结果和讨论

2.1 不同浓度 HA 溶液的荧光光谱

图 1 表明在 HA 的 DMF(或 DMSO) 溶液中,随 HA 浓度增加,荧光峰 603nm 逐渐减

1992-09-07 收稿, 1993-01-24 收修改稿.
* 国家自然科学基金资助项目.

小并在长波方向出现一个逐渐增长，无振动结构的新峰 655nm，荧光谱有一个“等发射点”，这是HA激基缔合物形成的标志，655nm 峰为该缔合物发射峰(荧光量子产率见文献[7])，603nm 为激发态单体发射。 更有趣的是，随着 HA 浓度由高到低的变化，荧光峰 655nm 和 603nm 经历了由强到弱，最后消失并在红侧显露出另一个发射峰 640nm(图 2)，它在极稀的 HA 溶液中依然存在(图 2 线 4，简写图 2-4)。

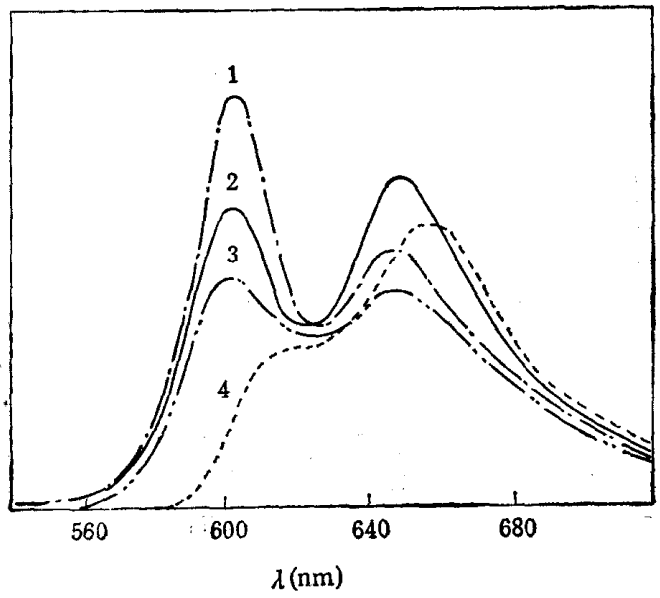


图 1　HA 在 DMF 溶液中的荧光谱随 HA 浓度增加而变化(mol/L)
1——1×10^{-5}, 2——3.5×10^{-5}, 3——1×10^{-4}, 4——1×10^{-3}

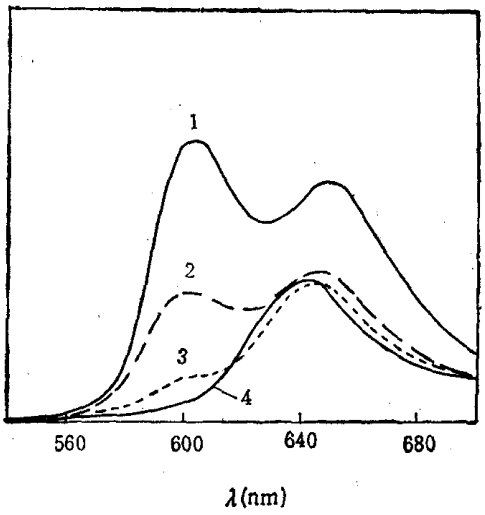


图 2　HA 在 DMF溶液中的荧光谱随 HA 浓度降低而变化 (mol/L)
1——1×10^{-3}, 2——8×10^{-6}, 3——6×10^{-6}, 4——5×10^{-6}

显然，新峰 (640nm) 不再属于 HA 激基缔合物，由于它在不同浓度的极性溶液中始终存在，而在非极性、弱极性溶液中不存在，因而只能是激发态 HA 分子与基态溶剂分子结合形成的激基复合物。图 1-4 表明，HA 浓度为 1×10^{-3} mol/L 的 DMF 溶液中，荧光主要来自激基缔合物而只有少量 HA 激发态单体。图 2-1 中，HA 浓度为 1×10^{-5}mol/L，则主要来自 HA 单体荧光，而两图谱中都混入上述激基复合物的荧光峰 640nm，这可以从图 2-4 明显看出；当 HA 浓度低于 5×10^{-6}mol/L (临界浓度)时，既不能形成 HA 激基缔合物，也无单体荧光，全部 HA 激发态被极性溶剂所猝灭，其荧光也由 603nm 红移至 640nm。结果还表明，激基缔合物生成的浓度相关性与其寿命相关联；在高于临界浓度时，它与激基复合物竞争激发态占有优势，因为它的结合能 (3.5 × 4186.8J/mol) 高于激基复合物的结合能 (2.6 × 4186.8J/mol)；该激基复合物的形成与 HA 浓度无关，它的吸收峰 λ_{max} 已红移为 620nm，这些特征与溶剂化激发分子相似。之所以称它为激基复合物是因为在高于 6×10^{-6}mol/L 的情况下仍有 HA 单体荧光未被溶剂所猝灭(图 2-3)，表明激发态 HA 与溶剂结合可能有固定化学组成[8]，这与其特定发射波长相一致。

2.2　溶剂极性的影响

表 1 数据表明，HA 的强极性有机溶液 (DMF, DMSO) 中显示 HA 激基缔合物强荧光峰 655nm，而在非极性溶液(如苯)中既便是在极高浓度下，也只能观察到弱HA激基缔合物荧光，荧光峰的位置随 HA 浓度改变，没有等发射点。在弱极性 (如丙酮) 溶液中，浓度高于 1×

10^{-3}mol/L 时，有较强HA激基缔合物荧光峰(650)，低于此浓度只有其单体荧光．乙醇虽有极性，但由于是质子性溶剂，几乎不能形成 HA 激基缔合物，而激基复合物（640nm）只能在强极性有机溶剂中观察到(如 DMSO，DMF)，弱极性溶液中只能观察到单体峰 603nm 红侧一个弱肩峰 640nm．

表 1 HA溶液中的光谱数据

溶液	荧光峰 (nm)				吸收峰 λ_{max}(nm)			
	浓度 (mol/L)				浓度 (mol/L)			
	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	5×10^{-6}	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	5×10^{-6}
HA/DMSO	660	660	607	643	585	585	585,620	620
HA/DMF	655	655	603	640	585	585	585,620	620
HA/乙醇	620	609	603	603	580	580	580	580
HA/丙酮	650	607	603	603	575	575	575	575
HA/苯	650	612	610	610	580	580	580	580

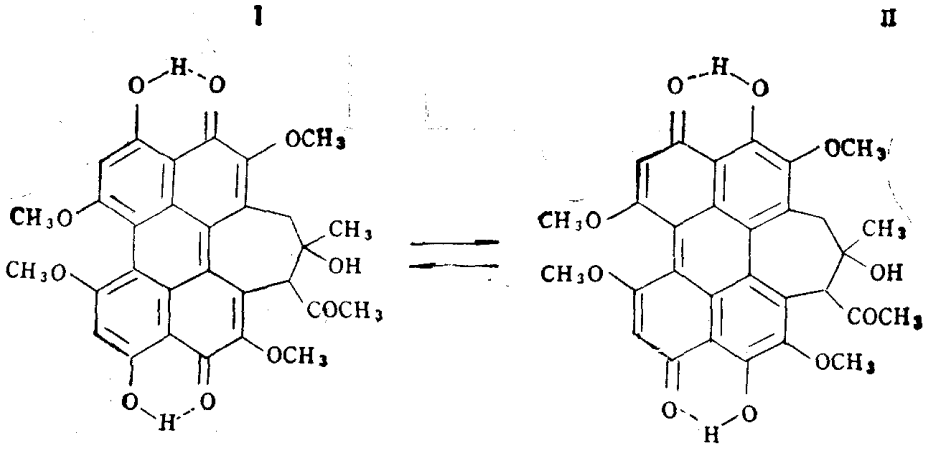


图 3

HA 激基缔合物和激基复合物形成都必须在强极性有机溶液中，这可能与 HA 分子的特殊结构和激发态的质子传递和由其引起的异构化有关(图3)．HA苝环两端的酚羟基、醌羰基具有极性，在激发态这种极性增强，它们与极性溶剂分子之间的偶极-偶极作用也加强，使 HA 分子构型改变，从而有利于激基缔合物的生成．在非极性和弱极性溶剂中，上述的偶极-偶极作用减弱，使苝环上的 3,4 和 9,10 位的分子内氢键有所加强，从而增强了对激发态分子的稳定作用，由于 HA 激基缔合物的结合能只有 3.5 × 4186.8J/mol 是比较微弱的，因而上述稳定作用可能影响激基缔合物的形成．同理，激基复合物有更低的结合能 (2.4 × 4186.8J/mol)，更不稳定，既便在高浓度的弱极性溶液中也不能观察到分辨良好的 640nm 荧光．

2.3 溶液粘度的影响

为了进一步证实 HA 激基缔合物、激基复合物的荧光特征和峰位归属，实验在不同粘度溶液中进行的．激基缔合物(或激基复合物)存在时的 Stern-Volmer 表达式

$$\phi_E = \phi_E^{\infty}\left(\frac{1}{1+ch/c}\right),$$

式中 ϕ_E 为激基缔合物发射的量子效率，c 为单体浓度，ch 为 50% 猝灭时的浓度，ϕ_E^{∞} 为高

浓度时激基缔合物的最大荧光效率，其中 $1/ch$ 依赖于溶液粘度[9]，即激基缔合物的形成是扩散控制的．本实验中配制了 10—30％一系列配比的 DMF/甘油混合溶液，并分别计算了 25℃ 时粘度及测试 HA 的荧光谱(图4)，证明随着溶液粘度增加，655nm 峰逐渐减小，相应单体峰逐渐增加并有一等发射点，证明 655nm 峰确实是经扩散控制过程产生的．在 HA 稀溶液中 (2×10^{-7}mol/L) 重复上述粘度实验，同样观察到随着溶液粘度增加，激基复合物 (640nm) 减小，并出现随粘度增大而增大的单体荧光并有一"等发射点"(图 5)，说明存在扩散控制过程，也证明它是激基复合物而不是溶剂化激发分子，因为溶液中 1/7 的甘油分子存在不会影响激发态分子的溶剂化．在非极性和弱极性溶液中没有粘度相关性，证明无激基缔合物 655nm 和激基复合物 640nm 生成．

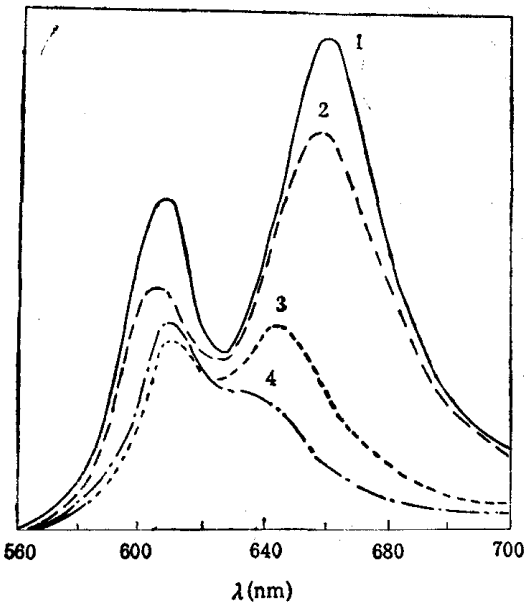


图 4　HA(2×10^{-4}mol/L) 在 DMF/甘油混合溶液中不同粘度时的荧光发射谱(25℃)
1——1×10^{-3}Pa · s, 2——7.5×10^{-2}Pa · s,
3——2.25×10^{-1}Pa · s, 4——3.75×10^{-1}Pa · s

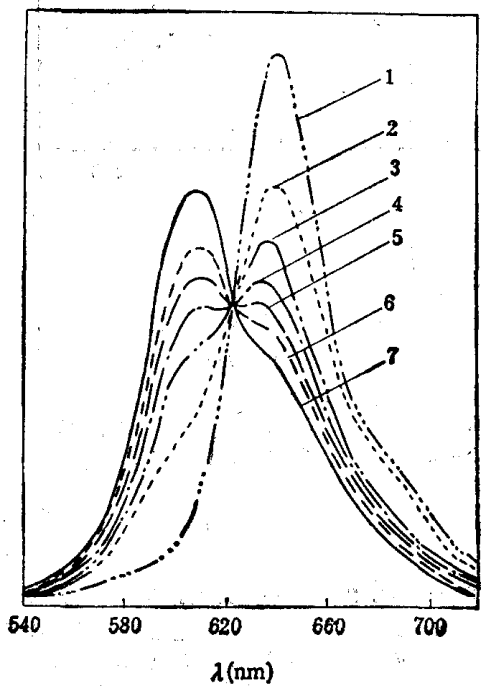


图 5　HA(2×10^{-7}mol/L)在(25℃)DMF/甘油混合溶液中，不同粘度时的荧光发射谱
1——1.5×10^{-2}Pa · s, 2——4.5×10^{-2}Pa · s,
3——7.5×10^{-2}Pa · s, 4——1.05×10^{-1}Pa · s,
5——1.35×10^{-1}Pa · s, 6——1.65×10^{-1}Pa · s,
7——1.95×10^{-1}Pa · s

2.4　吸收光谱证据

不同浓度、粘度、极性溶液中的吸收光谱一致(表 1)，说明全是来自激发单重态 HA 的吸收，证明激基缔合物荧光 655nm 是吸收光以后产生的，所以吸收光谱不变．值得指出的是在强极性有机溶液中当浓度低于临界浓度 5×10^{-6}mol/L 时，吸收红移至 620nm，证明是 HA 激发态与溶剂结合形成的激基复合物产生的吸收峰．

2.5　ESR 实验和质子性溶液中的实验

激基缔合物经电荷分离产生自由基离子对[10]，在大于 5×10^{-6}mol/L HA 强极性溶液中，ESR 实验检测到 HA 自由基离子对，低于 5×10^{-6}mol/L 则检测不到．证明 HA 激基缔合物存在，而激基复合物不能产生自由基离子对．

在含水溶液(如丙酮加水)以及各种质子给体溶液中(如乙醇中)，655nm 荧光峰全部消失，只有 603nm(或 607nm) 的单体荧光，因而证明溶液中增加质子给体加速了激发态质子传递并

不能产生长波方向的荧光峰 655nm，证明 655nm 荧光不是质子传递产生的. ESR 实验证明这种溶液中无自由基离子对.

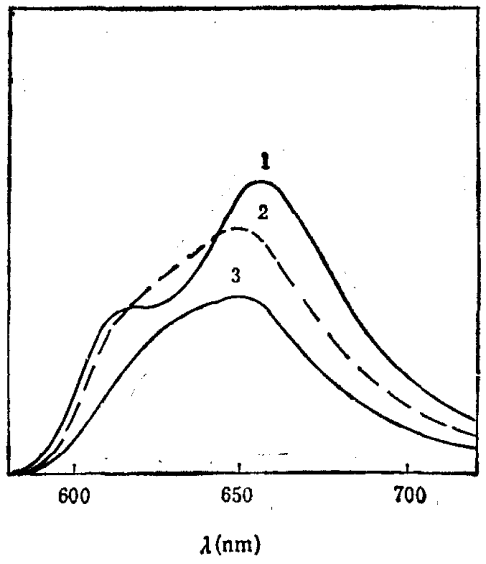


图 6 不同浓度碘化钾对溶液中 HA 激基缔合物荧光的猝灭 (HA/DMF 溶液浓度为 $(1 \times 10^{-3}$mol/L)

1——未加碘化钾时的缔合物荧光，
2——加碘化钾 2.5×10^{-2} mol/L(水中)，
3——加碘化钾 5.0×10^{-2} mol/L(水中)

2.6 荧光猝灭实验

激基缔合物和激基复合物荧光来自单重态，而这些产物主要来自激发三重态. 由于 HA 三重态不发磷光无法检测. 但猝灭实验中观察到 HA 激基缔合物的延迟荧光. 碘化钾是典型的三重态猝灭剂，将其加入 HA 溶液中 (DMF) 使 HA 激基缔合物荧光 (655nm) 和单体发射(603nm)都明显降低(图 6)，证明荧光 655nm 和 603nm 确实是 HA 激基缔合物和 HA 激发态单体所发射，也证明前者主要来自三重态. 而碘化钾猝灭了三重态，却使单重态荧光减弱，而单重态分子减少又使缔合物生成也减少，因此加入碘化钾，两荧光峰都减弱 (图 6-3). 加入碘化钾，激基复合物荧光没有任何变化，证明 HA 的激基复合物全部来自单重态.

参 考 文 献

[1] Chen, W. S., Chen, Y. T., Wan, X. Y. *et al.*, *Liebigs Ann. Chem.*, 1981, **38**: 1880—1885.
[2] 万象仪、陈远腾，科学通报，1980，**25**(24): 1148—1149.
[3] 蒋丽金，科学通报，1990，**35**(21): 1608—1616.
[4] 刘景瑶，科学通报，1985，**30**(14): 1077—1080.
[5] N. J. 特罗，现代分子光化学(姚绍明等译)，科学出版社，北京，1987，151—158.
[6] 第五振军、蒋丽金、张曼华，中国科学，B 辑，1989，(2): 113—120.
[7] 刘景瑶、张曼华、安静宜，感光科学与光化学，1986，(1): 36—41.
[8] K. K. 罗哈吉-慕克吉，光化学基础(丁革非等译)，科学出版社，北京，1991，131—134.
[9] K. K. 罗哈吉-慕克吉，光化学基础(丁革非等译)，科学出版社，北京，1991，126—131.
[10] Becker, H. D., *The Chemistry of the Quinonoid Compounds* (ed. Saul Patai), An Interscience Publication, John Wiley & Sons, 1974, 335—343.