中 国 科 学

1991 年 3 月　　B 辑　　第 3 期

竹红菌甲素的光化学*
—— VII. 光敏化竹红菌素的单电子还原

安静仪　赵开弘　蒋丽金

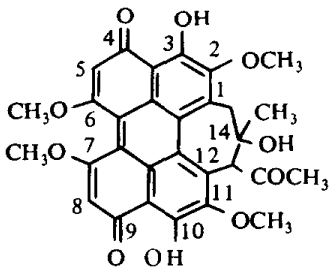
（中国科学院感光化学研究所，北京 100101）

摘　　要

本文研究了在半胱氨酸和抗坏血酸的存在下光诱导的竹红菌甲素和乙素的单电子还原．通过 ESR 和电子吸收谱，并证实了光还原生成的甲素和乙素的半醌负离子自由基及它的质子化与歧化．通过热化学合成和电子吸收谱的对比，推断了竹红菌素经净的两电子还原所形成的亚稳态产物为 3,4,9,10- 四羟基苝衍生物．

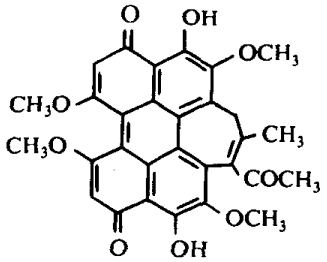
关键词：竹红菌甲素负离子自由基，竹红菌乙素负离子自由基，抗坏血酸，半胱氨酸，光还原

竹红菌甲素和乙素都是从野生植物竹红菌中提取的光敏色素．它们是 3,10- 二羟基苝 -4,9- 二醌的衍生物．甲素和乙素仅在结构上存在微小差别，统称为竹红菌素，结构如下：



1

竹红菌甲素（简称 HA）



2

竹红菌乙素（简称 HB）

竹红菌素配合可见光已成功地用于临床治疗一些难以治愈的皮肤疾患[1－3]．竹红菌素高效地产生 $^1O_2$[4]，并选择性地富集在肿瘤细胞中[1)]，目前已用于光动态治疗肿瘤的研究中，结果是鼓舞人心的．已经发表了竹红菌素光动力杀伤人癌细胞和动物实体肿瘤[5]，并对肝癌细胞线粒体和微粒体有抑制作用[6]．

在光疗机制的研究中，我们对竹红菌素的化学、光化学、光物理进行了广泛的研究．近年来，大量地报道了竹红菌素的性质和反应．但它的光诱导的电子转移还原还未见报道．与竹

本文1990 年 2 月 12 日收到，1990 年 8 月 6 日收到修改稿．

* 国家自然科学基金资助项目．

1)傅乃武等，中国第二届光生物学会议论文集．苏州，1989,31－32.

红菌结构类似的苝羟醌类化合物的光诱导电子转移还原也未见报道. 这是一类有代表性的光动态治疗敏化剂,它的电子转移光还原的重要性在于它是产生各类半醌自由基的关键,而各类半醌自由基往往具有十分重要的生理功能[7]. 半醌负离子自由基可向 O_2 转移一个电子而生成 $O_2^{\cdot-}$,是光敏色素由产生单一的 $^1O_2$ 向产生其他活泼态氧过渡的关键. 在电子转移体系中形成了氧化还原循环,产生对细胞质具有高度活性的羟基自由基. 因此在光疗机制的研究中寻找活化光敏色素的途径使之产生各类半醌自由基是十分必要的. 在一般情况下,由于可逆的电子返回而得不到稳定产物. 通常采用快速光谱手段,利用 ESR 和UV光谱研究这种体系. 一般醌类的电子转移光还原的研究已十分成熟[8,9].

本文选择了生物分子半胱氨酸和天然存在的抗坏血酸为电子给体,研究了光诱导的竹红菌素的还原. 观察到了竹红菌素净吸收两个电子而生成亚稳态的还原产物. 根据化学方法合成的结构类似物的光谱推断了该光还原产物为 3,4,9,10- 四羟基苝衍生物. 在 pH8.5的体系中观察到了光诱导的竹红菌素负离子自由基的生成,报道了它的ESR 谱以及它质子化、歧化引起的电子吸收谱的变化.

一、实 验 部 分

1. 试剂

甲素从竹红菌果实中提取,用丙酮重结晶两次. 采用脱水反应把甲素转化为乙素[10]. 半胱氨酸为中国科学院生物物理研究所生物化学试剂厂生产. 抗坏血酸及其它溶剂均为北京化工厂生产,分析纯.

2. 实验

光解使用 400W 中压钠灯和 470 nm 截止型滤光片相配合. 光解装置浸在流动的自来水中以保持 18°C.

典型的光解混合物由甲素(或乙素)在 CH_3OH(或 DMF)中的溶液(2×10^{-4}mol/L)与还原剂(半胱氨酸(或抗坏血酸)的磷酸缓冲液以 1 : 1 的体积比混合而成. 混合液置于长颈玻璃液槽中,充氩气以排除空气后用胶塞封牢. 光解后直接在紫外分光光度计上测吸收光谱 HP diode-array Model 845IA). 用 Zn 在冰醋酸中还原竹红菌素同样使用上述长颈液槽. 小磁子置于液槽底部电磁搅拌,加入锌粉 20mg,按上述方法除氧和密封. 反应后直接进行吸收光谱测定. 测定 ESR 谱的实验按下述方法进行: 将竹红菌素与还原剂的混合溶液脱氧后转移到测 ESR 的毛细管中(避免 O_2 进入). 将毛细管照射 1min,切断光源后置于 ESR 仪器上测定(Varian E-1700 BB).

乙素的四乙酰化产物的制备: 乙素(10mg),Zn 粉(20mg),乙酐(1ml)混合搅拌后加入 3 滴三乙胺. 继续搅拌 1h 后加入水(100ml),用氯仿抽提产物. 将抽提的氯仿溶液水洗后抽干. 用薄层层析法分离提纯产物. 层析板用硅胶 G 和 1% 柠檬酸调制而成. 展开剂为石油醚(60 — 90°C): 乙酸乙酯: 95% 乙醇(4 : 2 : 1, V/V/V). 用丙酮洗脱 R_f 为0.33 的黄绿色带. 加入水(150ml)后用氯仿抽提产物. 氯仿层水洗后经干燥过滤,抽干,得乙素的还原四乙酰化产物(见结构式 **5**) 12mg. 红外(KBr, Perkin-Elmer 983G), 1770cm^{-1} (—$OCOCH_3$), 1689cm^{-1} (C_{15}-$COCH_3$). 核磁($CDCl_3$, Varian XL 200), ^{1}H: δ 4.09, 4.02, 3.90, 3.79 (12H, s, OCH_3), δ 2.61, 2.01 (2H, d, J=11 Hz, C_{13}-H), δ 2.47, 2.44 (12H, s, —$OCOCH_3$), δ 2.32 (3H, s, C_{14}-CH_3), δ 1.74 (3H, s, C_{18}-CH_3). 质谱 (Finigin 4021)

M/E 698 (M^+), 656, 614, 572, 529. 紫外, $\lambda_{max}(CH_3OH)$: 468 nm.

二、结 果 和 讨 论

1. 竹红菌素光还原生成四羟基苝衍生物

在含抗坏血酸的脱氧的 CH_3OH/pH 6.1 buffer (1 :1 V/V)的溶液中，随可见光照射($h\nu>470$ nm)乙素在 458, 546 nm 处的特征吸收不断降低，相应地在 486nm 处的吸收峰不断增高，形成了一个以 486nm 为主要吸收，肩峰在 460 nm 的吸收峰. 此时溶液由红色转为亮黄色，生成一新的化合物. 吸收光谱随光照时间的变化见图 1，3 个等吸收点分别出现在 322, 478 和 496nm. 用甲素代替乙素得到了相似的结果. 甲素在溶液中的吸收为 466, 538, 581 nm. 光照后长波吸收消失，光产物的主要吸收在 492 nm，肩峰在 468nm. 同时相应地比乙素的光还原产物向长波移动了8nm.

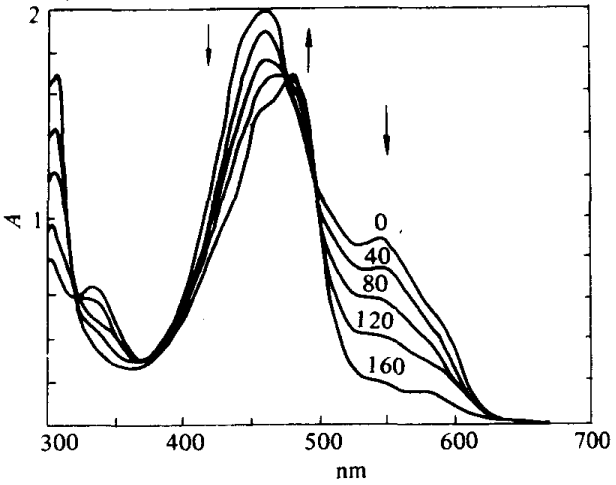
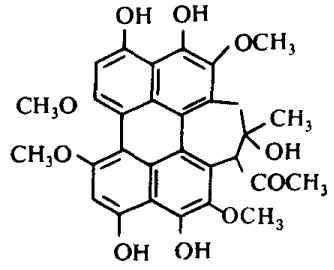


图 1　乙素在脱氧的CH_3OH/buffer pH 6.1(1 :1, V/V)溶液中，抗坏血酸存在下的光还原吸收光谱随光照时间的变化

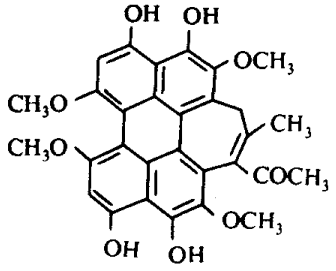
(时间分别为 0, 40, 80, 120, 160 s；乙素: 1×10^{-4}mol/L，抗坏血酸 : 5×10^{-3} mol/L)

甲素和乙素的光产物对空气十分不稳定. 当液槽内重新引入氧气时，光产物定量地分别回到甲素和乙素，反应是在存在还原剂和脱氧下进行的，因此这些光产物是竹红菌素的光还原产物. 分别进行了在无光照或无还原剂或有氧条件下的对比实验，竹红菌溶液均未发生可观察到的变化. 在光诱导的电子转移光还原中，由于转移的电子易于返回而使光产物在氧存在时可逆地回到起始物质，因而妨碍了对光还原产物的分离鉴定. 我们采用对比光产物和化学上还原 HB 并乙酰化产物的吸收光谱的方法证明在竹红菌光还原中生成了 HAH_2 和 HBH_2(见结构式中化合物 **3** 和 **4**).



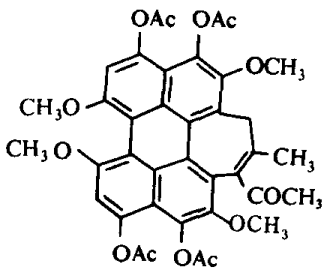
3

4,9-二羟基甲素(HAH_2)



4

4,9-二羟基乙素 (HBH_2)



5

4,9-二羟基-3,4,9,10-四乙酰基乙素

在 HB 的光还原中已观察到产物的吸收光谱随反应体系 pH 值增加向长波移动. 例如，在CH_3OH/pH7.4 buffer (1 :1 V/V)溶液中用半胱氨酸还原乙素时，光还原产物的吸收峰红移至 502nm. 在 DMF[1]/buffer pH8.5 (1 : 1 V/V) 溶液中，光还原产物吸收峰在 508nm.

1)DMF —— N,N-二甲基甲酰胺，以下同.

吸收光谱随 pH 值的变化是酚类化合物的一个特征. 综合这些观察我们有理由推断甲素和乙素的光还原产物分别是 HAH_2 和 HBH_2, 即化合物 **3** 和 **4**.

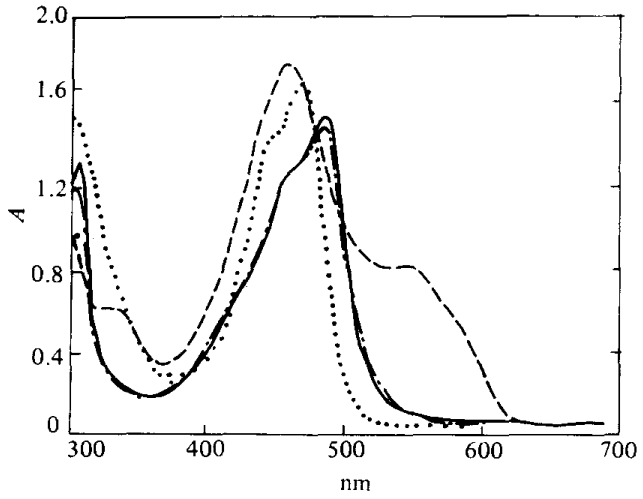


图 2 等浓度的乙素光还原和化学还原光谱图

(等浓度的乙素(8×10^{-5}mol/L)在去氧的 CH_3OH/pH6.1 buffer (1 : 1 V/V),存在抗坏血酸(5×10^{-3}mol/L)溶液中光还原产物的光谱(——),在冰醋酸/Zn 体系中热化学还原光谱(— · —),乙素(8×10^{-5})在 CH_3OH/pH7.0 buffer (1 : 1 V/V)(– – – –)和4,9-二羟基-3,4,9,10-四乙酰基乙素在相同体系中的吸收光谱(……))

为证实这一推测, 用等浓度的乙素分别在上述光还原体系和 Zn-冰醋酸体系进行光还原和化学还原. 在去氧的密封的液槽内反应完后立即进行光谱测定. 结果表明光还原产物和化学还原产物的光谱完全相同(见图 2). 化学还原的产物接触空气时, 立即可逆地返回到乙素的吸收光谱. 这种易于氧化还原的性质也被其他羟醌类化合物的化学所证实[11]. 为了证明乙素在上述还原中生成了 HBH_2, 我们通过还原乙素, 再乙酰化的方法合成了 4,9-二氢-3,4,9,10-四乙酰基乙素(化合物 **5**). 它的最大吸收波长 468nm, 肩峰在 442nm. 它的吸收光谱相似于在光还原体系中得到的光产物, 但由于— $OCOCH_3$ 的助色效应比— OH 的助色效应弱[12], 因此 4,9-二羟基-3,4,9,10-四乙酰基乙素的吸收光谱比光产物蓝移了 18nm. 吸收光谱的相似性说明这两个化合物具有相同的骨架结构. 光还原产物光谱有规律的红移以及对 pH 的敏感性进一步支持了乙素光还原产物是 HBH_2 这一推断. 同样, 我们可推断甲素光还原产物是 HAH_2.

由所推断的 HAH_2 和 HBH_2 的结构表明, 竹红菌素光还原的结果是净的获得两个电子的还原. 当用 EDTA 代替半胱氨酸或抗坏血酸时, 得到了相同的结果. 上述光还原体系是在 pH6.1, 光还原迅速而完全. 光诱发过程中产生的半醌负离子自由基在酸性环境中寿命短, 因此吸收光谱上未能观测到它的生成. 在微碱性环境中, 它的寿命延长, 我们不仅测到它的 ESR 谱, 还观察到它的吸收光谱.

2. 竹红菌素光还原生成半醌负离子自由基, ESR 谱和可见光谱

在脱氧的 DMF/buffer pH8.5 的溶液中, 在半胱氨酸或抗坏血酸存在时, 光照乙素溶液后给出一个很强的 ESR 信号, 由 24 条谱线组成(图 3). 这个光诱导产生的 ESR 信号和王志军[1)]等人用电化学方法得到的乙素半醌负离子自由基(简称 $HB^{\cdot-}$)的 ESR 的精细结构完全相同. 从而证实了在上述体系中, 可由光照获得 $HB^{\cdot-}$. 用甲素代替乙素, 同样获得了甲素负离子自由基(简称 $HA^{\cdot-}$)的 ESR 信号. 由于甲素有异构体, ESR 谱线相互交盖, 精细结构只观察到 11 重峰.

$HA^{\cdot-}$ 和 $HB^{\cdot-}$ 的 ESR 信号强度随光照时间延长而迅速增强, 并随体系 pH 值的增加而增强. 在 pH5, pH7.4 和 pH8 的体系中, 在 pH8 时ESR 信号强度最高, 而在 pH5时, 只观测到很弱的ESR 信号.

1)王志军等, 待发表.

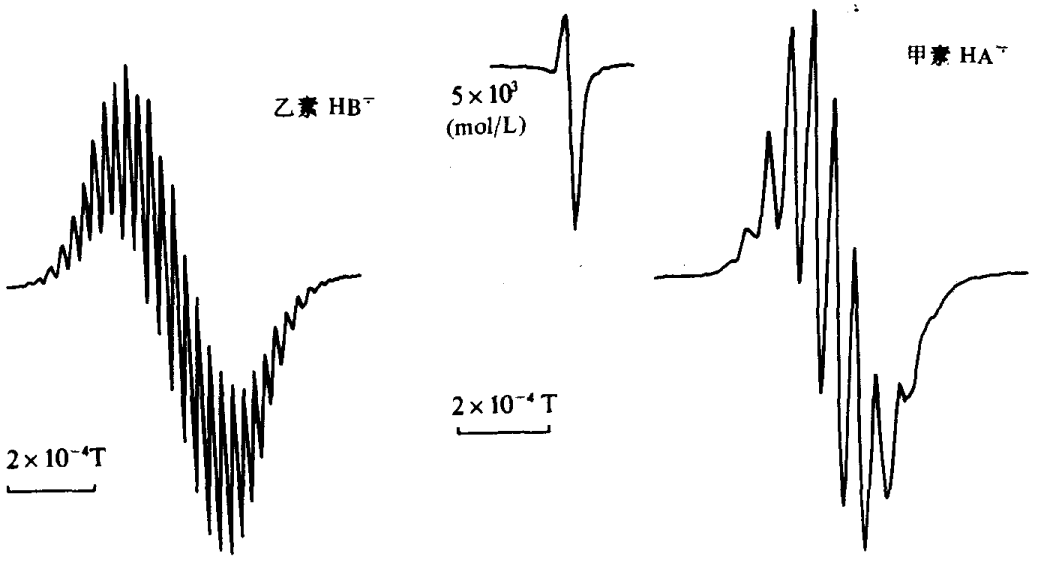


图 3　光诱导产生的甲素和乙素半醌负离子自由基的ESR谱

(反应条件：在脱氧的含半胱氨酸(5×10^{-3}mol/L)的 DMF/buffer (1 : 1 V/V)和pH=8.5 时;[HA] 或 [HB] :8×10^{-4} mol/L . SW :25 G, MA :0.16, MP : 1mW, gN, 3.2×10^{3}, TC :0.128, f :9.1293)

当 ESR 信号随光照时间而增强时，上述溶液在 618nm 的吸收也增强，溶液由红色转变为绿色. 乙素在脱氧的 DMF/buffer pH8.5 (1 : 1 V/V) 溶液中，在半胱氨酸为电子给体时，吸收光谱随光照时间的变化(图 4). 随光照时间延长，乙素在 458, 546nm 的特征吸收不断下降，相应地一个在 618nm 的吸收峰不断增强. 等吸收点在 560nm. 它表明体系内只有两个物质：起始的乙素及光还原产物，我们把它归属为 HB^{-}. 把 618nm 的吸收峰归属于 HB^{-}，主要根据它的产生和衰变. 它在脱氧体系中、有还原剂和光照时产生，而向体系内重新引入空气时，产物定量地被氧化回乙素，因此有理由认为产物是由乙素的光还原引起的. 另一个原因是观察到 ESR 信号和在 618nm 的吸收在强度上的一致性. 我们还观察到了 HB^{-} 的质子化及歧化过程中的吸收光谱的变化，这就进一步支持了我们把 618 nm 的吸收归属为 HB^{-} 的光谱吸收这一推断.

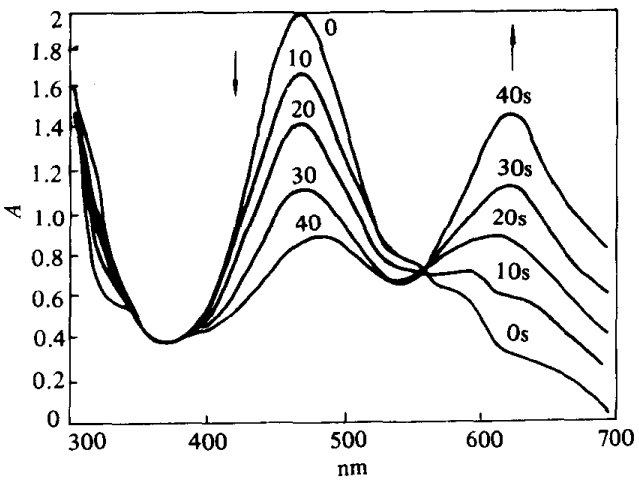


图4　光还原为乙素的半醌负离子自由基，吸收光谱随光照时间的变化

(反应条件：乙素在脱氧的含半胱氨酸的 DMF/buffer (1:1V/V) pH8.5 溶液中 [HB] :1×10^{-4} mol/L, [cys] : 5×10^{-3} mol/L, 光照时间间隔为 10 s)

3. 竹红菌素半醌负离子自由基的质子化和半醌自由基的歧化：吸收光谱的测定

电子转移猝灭染料激发态产生的半醌负离子自由基具有十分强的碱性，它易质子化生成半醌自由基(对于 HB，生成 HBH ·). 在这种情况下，电子-质子的转移系列的产物可以发生歧化得到净的两电子还原产物，即 $2HBH\cdot \rightarrow HB+HBH_2$. 对于一般半醌自

由基歧化反应是已得到深入的研究.在 CH_3OH/pH6.1buffer(1:1 V/V)的体系中,当用抗坏血酸光还原HB时,由于 $HB^{\cdot}$ 迅速质子化及歧化而未能观察到 $HB^{\cdot}$ 的吸收光谱.而在DMF/buffer(1:1 V/V)在pH8.5用半胱氨酸还原乙素时,由于 $HB^{\cdot}$ 寿命延长而观察到了 $HB^{\cdot}$ 质子化及歧化所引起的吸收光谱变化.在上述体系光诱发产生 $HB^{\cdot}$ 后,当 $HB^{\cdot}$ 在618nm的吸收达到最高值时,关闭光源,将液槽置于暗处,每隔10min测一次吸收光谱. $HB^{\cdot}$ 在618nm的特征吸收逐渐下降,在λ508nm出现一个新吸收峰.等吸收点在538nm(图5).所形成的产物的吸收光谱与 CH_3OH/pH6.1 buffer(1:1 V/V)—抗坏血酸体系中光还原产物的吸收光谱一致,仅波长随pH值增加有规律地移向长波.在其他苊醌化合物的光化学中也观察到了还原产物的吸收波长随体系pH增强而增加的现象[13].质子化后歧化的产物是3,4,9,10-四羟基乙素.图5是 $HB^{\cdot}$(或HBH·)和 HB,HBH_2 之间的平衡.当这个体系继续光照时,平衡向生成 HBH_2 的方向移动,最后可得单一的 HBH_2 的吸收光谱(图5中未示).从图5所示的变化趋势,我们又进一步证明了在618nm的吸收是属于 $HB^{\cdot}$ 的吸收.有关动力学的研究正在进行中.

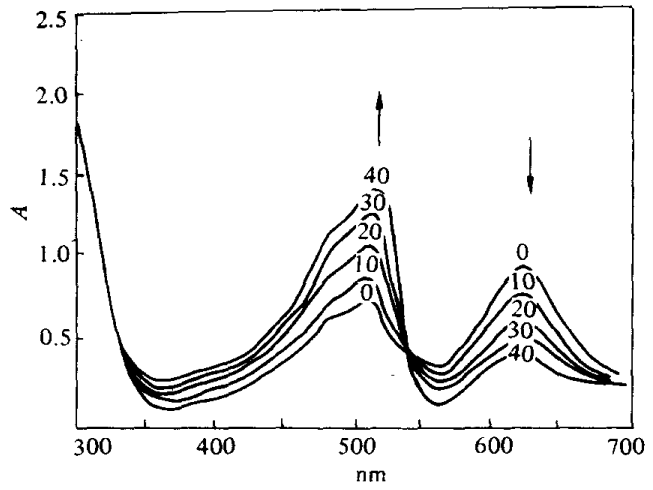


图5 乙素半醌自由基在脱氧的含半胱氨酸的DMF/buffer (1:1 V/V)溶液中,pH8.5时歧化的吸收光谱随时间的变化

(时间间隔为10 min.[HB]:1×10^{-4} mol/L,[cys]:5×10^{-3} mol/L)

参 考 文 献

[1] 梁睿媛等,中华皮肤科杂志, **2**(1982), 87.
[2] 于兰馥等, 中华妇科杂志, **19**(1984), 1.
[3] 王家壁等, 中国医学科学院学报, **7**(1985), 5.
[4] 安静仪等, 中国科学B辑, 1985, 11:975.
[5] 傅乃武等,中华肿瘤杂志, **10**(1988), 80.
[6] _____, 中国药理学报, **10**(1989), 371—373.
[7] Lown, J. W., *Mol. Cell. Biochem.*, **55**(1983), 17—40.
[8] Fox, M. A. & Chanon, M., *Photoinduced Electron Transfer*, Part C, Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, 1988, 555—561.
[9] Reska, K. & Lown, J. W., *Photochem. Photobiol.*, **50**(1989), 297—304.
[10] 赵开弘等, 有机化学, **9**(1989), 252—254.
[11] Lousberg, R. J. J. Ch. et al., *J. Chem. Soc (C)*, 1970, 1219—1227.
[12] 邢其毅等,基础有机化学,人民教育出版社, 北京, 1983, 394—400.
[13] Yamazaki, S. & Ogawa, T., *Agr. Biol. Chem.*, **36**(1972), 10:1707—1718.