# 大黄酚光敏化产生自由基和单重态氧*

饶 静①② 谢 杰① 赵井泉①** 朱 腾②

(①中国科学院光化学重点实验室 分子科学中心, 北京 100080; ②北京科技大学, 北京 100083)

**摘要** 应用电子自旋共振技术研究由中草药大黄中分离纯化的大黄酚光敏化活性. 在氮气饱和的二甲基亚砜中, 用波长大于 430 nm 可见光照射大黄酚产生半醌负离子自由基, 且随着还原型辅酶的加入而增强, 表明自由基来源于光敏剂的基态和激发态之间发生了电子转移. 在空气饱和的二甲基亚砜中, 产生可以被 DMPO 捕获的超氧负离子自由基, 实验证明该自由基不是由单重氧产生, 并与 DMPO、大黄酚、氧气和照射时间有关. 光照大黄酚也能产生单重态氧、羟基自由基. 从而说明大黄酚的光敏机制包含电子转移的Ⅰ型机制(Type Ⅰ)和能量转移的Ⅱ型机制(TypeⅡ). 作为光敏化活性评价, 测量得到大黄酚、大黄素、大黄的蒽醌混合物产生超氧负离子自由基的相对产率分别为 1.8, 1.1, 1.0, 单重态氧的相对产率分别是 0.36, 0.53, 0.14. 因此, 这种短波长吸收的光敏剂有可能在光动力医疗微血管类疾病有潜在的应用前景; 同时大黄中初提的蒽醌衍生物的混合物有可能作为一种廉价的光活化农药.

**关键词** 大黄酚 电子自旋共振 半醌负离子自由基 超氧自由基 羟基自由基 单重态氧

## 1 引言

大黄酚(3-甲基-1, 8-二羟基蒽醌, 简写 MHAQ)属于蒽醌类染料, 存在于自然界许多种植物中, 如我国物源丰富的中草药植物大黄中就含有大黄素、大黄酚、芦荟大黄素等多种蒽醌衍生物. 除了它们的生物活性, 这些染料也被作为光敏剂[1,2]. 光敏剂通过光化学产生高活性的物质, 如单重态氧 $^1O_2$, 超氧自由基 $O_2^{\bullet-}$, 羟基自由基 · OH, 它们可以对生物分子或细胞产生一系列的破坏作用而实现疾病医疗[3, 4]. 在光敏剂中, 蒽醌类化合物具有许多优点, 如价格低廉, 容易获得, 在太阳光的可见光区域具有较高的光敏活性, 因此, 在光活化农药方面也具有潜在的应用前景. 大黄酚、大黄素和乙醇提取的蒽醌混合物(取几种含量高的蒽醌类物质的平均分子量)在可见光 400~500 nm 范围内的消光系数分别是 log$\varepsilon$ = 4.02(433 nm), log$\varepsilon$ = 3.85(443 nm), 而波长在 400~500nm 的可见光穿透生物组织不到 1 mm, 正好与微血管类疾病的病灶深度相符, 因此有可能成为一类新型的光动力药物. 因为蒽醌类衍生物吸收波长太短, 在光动力疗法

2003-10-08 收稿, 2004-03-09 收修改稿
* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 20273079)
** 联系人, zhaojq@iccas.ac.cn

的吸收范围(600~900 nm)吸收太低, 因此这类光敏剂在过去没有引起人们的重视. 然而适应症的不同有可能使人们重新认识这类光敏剂; 此外, 激光双光子激发技术可使用波长 800 ~ 900 nm 红色激光激发吸收在 400 ~500 nm 的光敏剂, 并可以实现靶组织的准确定位来治疗疾病[5].

在乙醇的碱溶液中, 用化学还原方法获得大黄酚的半醌自由基离子曾有过报道[6]. 但是, 用光化学方法获得大黄酚的半醌负离子自由基、超氧负离子自由基、单重态氧及羟基自由基还没报道. 因此本文首次研究了大黄酚的有关光敏活性. 大黄酚由大黄中提取并纯化, 通过电子自旋共振(ESR)及波谱技术对它的光敏机制及活性进行研究.

## 2 材料和方法

用 95%乙醇溶液提取大黄(购于北京芳草药店), 用薄层色谱分离、纯化, 石油醚: 乙酸乙酯体积比为 15∶1 及 15∶9 作为洗脱剂, 得到大黄酚及大黄素. 用红外光谱(IR)(BIO-FADFTS165 红外光谱仪)、紫外光谱(UV)(ShimadzuUV-160A 型分光光度计测定)、核磁共振($^1$H-NMR)(VarianXL-300)和质谱(MS)(MS50 型质谱仪)技术鉴定. 纯品 5℃避光保存. 竹红菌素(HA)本实验室提供. 用乙醇初提大黄得到蒽醌混合物. 2,2,6,6-四甲基哌啶酮(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone 简称 TEMP)、5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(5,5-dimethyl-pyrroline-N-oxide 简称 DMPO)购于 Sigma 化学品公司, 并在充氮避光–20℃保存. 二甲基亚砜(DMSO)购于 J.T.Bake 公司. 1,4-二氮杂二环[2,2,2]辛烷(1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane 简称 DABCO)和 9,10-二苯基蒽(9,10-diphenyl antracene 简称 DPA)购于 Aldrich 公司. 超氧化物歧化酶(SOD)、还原型辅酶(NADH)购于中国科学院百泰生物试剂公司. 叠氮化钠($NaN_3$)和其他有机溶剂均购于北京化工厂. 水为新鲜二次蒸馏水, 所用溶液均为使用前新鲜配制. 缓冲溶液用磷酸氢二钠、磷酸二氢钾来调节配制. 根据实验需要在溶液中分别充以氮气、氧气、空气. 除光照外, 所有实验均在避光条件下操作.

用 450 W 中压钠灯光照, 循环水冷却钠灯, 滤光片截去小于 430 nm 的光作为光源. 将空气、氧气或氮气饱和的 40 μL 样品转移到 ESR 专用的石英毛细管中, 照射后进行 ESR 测量.

9,10-DPA 漂白的方法测定单重态氧的相对产率[7]. 450 W 中压汞灯作为光源, 用 QB24(上海)和 3389(美国)两块滤光片隔出 420 与 490 nm 之间的发射光, 测定 9,10-DPA 在 374 nm 的吸收峰随光照时间的变化来确定各自的单重态氧产率. 加入样品后, 随着光照时间的延长, 9,10-DPA 在 374 nm 的吸光度降低, 而光敏剂在此波长有最小吸收. 吸收光谱用 ShimadzuUV-160 A 型分光光度计测定. ESR 谱用 Varian E-109(X 波段, 9.121 GHz)电子自旋共振仪. 在室温下测得. 除说明外, 波谱均是在微波功率 20 mW, 调幅 $1\times10^{-4}$ T, 扫描宽度 $2\times10^{-2}$ T, 增益 $1.25\times10^4$.

## 3 结果与讨论

### 3.1 半醌负离子自由基的产生

一般来说, 光敏剂的负离子自由基在生物体系不仅直接与底物反应而且也能参与活性氧的形成, 半醌负离子自由基在光敏化介导的反应中是一个关键的中间体. 通常半醌负离子自由基在非质子性溶剂如 DMSO 中比在水中更稳定, 因为自由 $H^+$可以加速半醌负离子自由基的衰减[8], 因此 DMSO 常用来作为检测半醌负离子自由基的溶剂. 氮气饱和的 $5\times10^{-3}$ mol·$L^{-1}$ 大黄酚的 DMSO 溶液用波长大于 430 nm 的可见光光照 2 min, 得到如图所示的 ESR 光谱(图 1 (a)). 这一 ESR 谱特征参数与文献报道的用乙醇的碱溶液还原 2-氨基蒽醌得到的半醌负离子自由基非常相似[9]. 产生的自由基信号强度与氧气量、样品浓度、照射时间、光强有关. 当不光照、无光敏剂或充以氧气, 则没有 ESR 信号出现(图 1 (b)). 信号强度随着光照时间的延长而增加, 照射达到 8 min 信号最强. 样品浓度对这一自由基信号的产生起着非常大的影响. 如果样品浓度低于 $10^{-6}$ mol·$L^{-1}$, 观察不到 ESR 信号. 这是因为在低浓度时光敏剂碰撞的机会很少, 自电子转移不易发生.

如果样品浓度高达 $10^{-2}$ mol·$L^{-1}$. 照射时间 4 min, 甚至在空气饱和的条件下也可检测到半醌负离子自由基的存在. 浓度影响表明, 基态大黄酚通过光照生成大黄酚的三重态, 从而大黄酚激发态与基态之间发生电子转移产生半醌负离子自由如下过程表示.

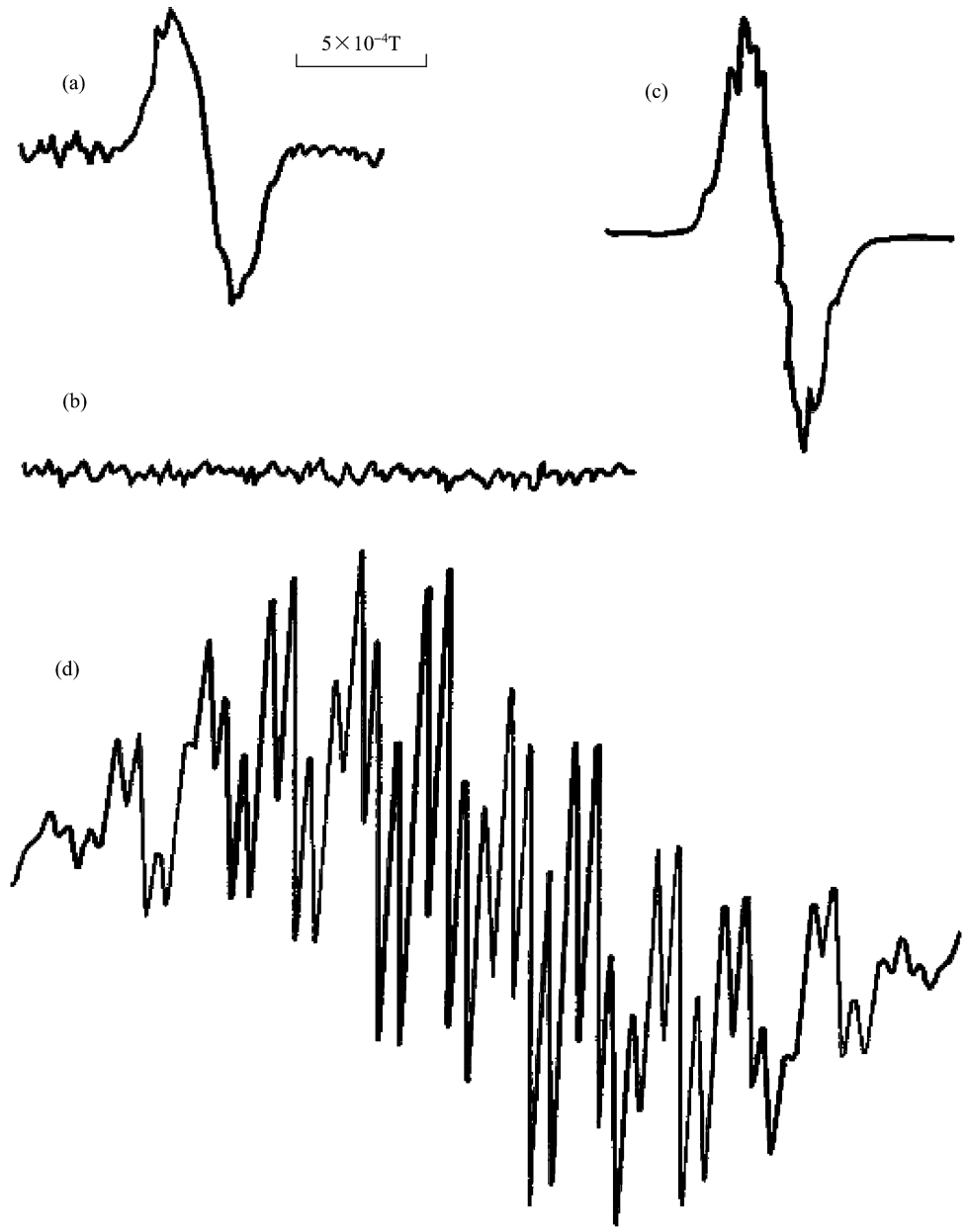


**图 1　大黄酚半醌负离子自由基 ESR 谱图**

(a) 波长大于 430 nm 光照氮气饱和的 $5 \times 10^{-3}$ mol·$L^{-1}$ 大黄酚的 DMSO 溶液 2 min 所得到的 ESR 信号图; (b) 条件同(a), 只是无光照或没加入大黄酚; (c) 条件同(a), 但加入 $2 \times 10^{-3}$ mol·$L^{-1}$NADH, 光照 30 s; (d) 条件同(c), 只是仪器调制参数改变了, 得到的 ESR 的超精细裂分谱图. 仪器设置: 微波功率: 谱 D: 1 mW; 调幅: 谱 D: $0.1\times10^{-4}$; 扫描宽度: 谱 D: $25 \times 10^{-4}$; 增益: 谱 C: $2 \times 10^{3}$

$$\mathrm{MHAQ} \xrightarrow{h\nu} {}^{1}\mathrm{MHAQ}^{*} \xrightarrow{\mathrm{isc}} {}^{3}\mathrm{MHAQ}^{*} \quad (1)$$

$${}^{3}\mathrm{MHAQ}^{*}+\mathrm{MHAQ} \rightarrow \mathrm{MHAQ}^{\bullet-}+\mathrm{MHAQ}^{\bullet+} \quad (2)$$

一般来说, 半醌的正离子自由基在普通有机溶剂中很难检测到, 这是由于它具有很强的氧化能力, 能迅速从溶剂中获得一个电子而失活, 检测正离子自由基需在电离势高的溶剂(如 Freon-113)且在低温下进行[10]. 这说明此 ESR 信号来源于半醌负离子自由基.

在典型的电子给体 $5\times10^{-3}$ mol·$L^{-1}$NADH 存在下, 光照 30 s, 也出现了一个相同的自由基信号. 且

信号强度大大增加(图 1(c)). NADH 作为一个还原剂, 它产生的 NAD•自由基的 ESR 信号是难用 ESR 检测到[11]. 在氧气饱和条件下, 半醌负离子自由基信号很快消失, 而当加入 DMPO 后, 超氧负离子自由基的信号被检测到(详细机制在后面讨论). 以上结果进一步确证产生的自由基信号来源于大黄酚的半醌阴离子自由基. 通过调制仪器参数, 我们还获得了大黄酚的半醌负离子自由基的超精细裂分谱图(图 1(d)), 与文献报道一致[12,13]. 以上实验证明了 ESR 信号在还原剂 NADH 存在下, 半醌负离子自由基是通过电子给体与三重态的大黄酚之间发生电子转移生成的(方程 3)

$$^3\mathrm{MHAQ}^* + \mathrm{NADH} \rightarrow \mathrm{MHAQ}^{\bullet-} + \mathrm{NAD}^{\bullet} + \mathrm{H}^+ \quad (3)$$

### 3.2 大黄酚光敏超氧自由基的性质研究

(ⅰ) 超氧自由基的形成 在质子性溶剂如水中 DMPO-$O_2^{\bullet-}$加合物很容易分解成 DMPO-OH[14]. 因此本实验在 DMSO 溶液中进行, 此条件下 DMPO-$O_2^{\bullet-}$有较长的寿命[15].

波长大于 430 nm 时光照空气饱和的 $5\times10^{-5}$ mol·$L^{-1}$ 大黄酚和 $5\times10^{-2}$mol·$L^{-1}$DMPO 的 DMSO 溶液, 产生所示的含多重峰的 ESR 谱(图 2 (a)). 它先是由 $^{14}$N 原子裂分成三重峰($a^{\mathrm{N}}=13.0\times10^{-4}$ T), 三重峰中的每一重再被β质子裂分($a_\beta^{\mathrm{H}}=10.0\times10^{-4}$ T), 最后再被γ质子裂分($a_\gamma^{\mathrm{H}}=1.3\times10^{-4}$ T), 得到如图所示的 12 重峰的 ESR 谱. 这个 ESR 谱的超精细裂分偶合常数与文献中报道的一致[16]. 它显然是 DMPO-$O_2^{\bullet-}$自由基加合物的特征信号. 对照实验表明, 当大黄酚、光或氧不存在时, 观察不到 ESR 信号(图 2 (b)).

当体系中加入电子给体 NADH 时, $O_2^{\bullet-}$的 ESR 信号大大增强(图 2 (c)). 当体系中加入超氧化物歧化酶 SOD, 一种高效的 $O_2^{\bullet-}$清除剂, DMPO-$O_2^{\bullet-}$加合物的 ESR 信号大大降低(图 2 (d)). 在反应体系中加入单重态氧清除剂[17,18]$2\times10^{-2}$mol·$L^{-1}$DABCO 或 $2\times10^{-2}$ mol·$L^{-1}$ $NaN_3$, 对 DMPO-$O_2^{\bullet-}$的信号强度无任何影响, 说明单重态氧没有参与 $O_2^{\bullet-}$的形成. 由上述结果, 推论电子给体不存在和存在时超氧自由基的形成分别按(方程 2, 4, 5)和存在(方程 3, 6)两组反应表示的历程进行[19]:

$$\mathrm{MHAQ}^{\bullet-} + \mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{MHAQ} + \mathrm{O_2}^{\bullet-} \quad (4)$$

$$^3\mathrm{MHAQ}^* + \mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{MHAQ}^{\bullet+} + \mathrm{O_2}^{\bullet-} \quad (5)$$

$$\mathrm{NAD}^{\bullet} + \mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{NAD}^+ + \mathrm{O_2}^{\bullet-} \quad (6)$$

光照大黄酚产生的三重态(方程 1)与基态大黄酚发生电子转移(方程 2)形成半醌负离子自由基, 后者又给出电子到分子氧产生超氧负离子自由基(方程 4); $O_2^{\bullet-}$也可以由 NAD•与分子氧之间的电子转移产生(方程 6). 另外根据方程 5 光敏剂的三重态与分子氧发生直接的电子转移也可以产生 $O_2^{\bullet-}$, 根据前面讨论, 大黄酚在低浓度($10^{-6}$ mol·$L^{-1}$)时不能产生半醌负离子自由基, 但可产生超氧负离子自由基, 说明了超氧负离子自由基也可通过方程 5 和方程 6 产生.

(ⅱ) 影响产生超氧负离子自由基的因素 通过 ESR 波谱峰高的变化观测产生超氧负离子自由基的能力. 图 3 线 1 是空气饱和大黄酚产生 $O_2^{\bullet-}$的 ESR 信号随着光照时间的延长而增加. 为了检测氧气的浓度对产生 ESR 信号的影响, 在相同条件下, 用氧气饱和的 $5\times10^{-5}$mol·$L^{-1}$ 大黄酚溶液进行测定. 由图 3 线 2 可以看出氧气饱和溶液产生的 DMPO-$O_2^{\bullet-}$加合物信号强度比空气饱和的要强, 证实信号对氧气的浓度的敏感性.

大黄酚和 DMPO 的浓度也是一个重要的影响因素(图略). 大黄酚浓度为 $10^{-4}$ mol·$L^{-1}$ 时信号强度最大, 但是浓度再大, 信号强度反而减小, 这是因为, 浓度越大, 电子转移越容易[20]. 然而, 当浓度足够大时, 又可以引起自由基之间的自猝灭, 与产生 $O_2^{\bullet-}$是一个竞争反应. 当其他因素不变, ESR 信号强度也随 DMPO 浓度的加大而增大, 直到一个饱和点.

(ⅲ) 产生超氧负离子自由基的相对产率 根据文献[21]提供的方法, 比较大黄酚、大黄素及蒽醌混合物通过光化学产生的超氧负离子自由基的相对产率. 为了比较它们的信号强度, 在最大可见吸收波长处的吸光度调至相等($A$ = 0.64), 蒽醌混合物的产率看作 1.0, 它们产生的超氧负离子自由基的相对产率分别是 1.8, 1.1, 1.0.

### 3.3 羟基自由基形成

大黄酚溶解在 DMSO 溶液中, 然后用磷酸盐缓冲溶液(pH =7.4)稀释成体积比 1%. 在波长大于 430 nm

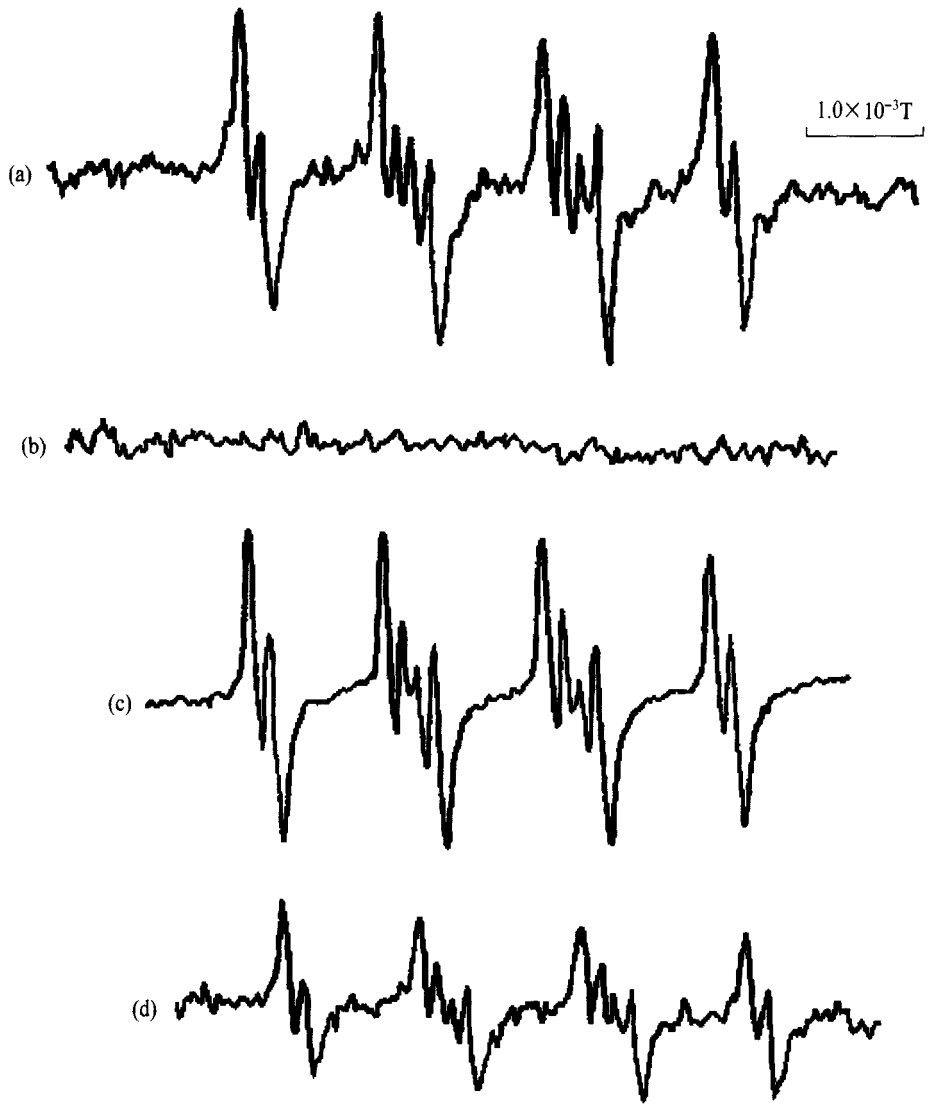


**图 2　大黄酚超氧负离子自由基 ESR 谱图**

(a) 波长大于 430 nm 光照空气饱和的 $5\times10^{-5}$mol·$L^{-1}$ 大黄酚和 $5\times10^{-2}$mol·$L^{-1}$DMPO 的 DMSO 溶液所得的 ESR 谱; (b) 大黄酚、光或氧从体系中除去; (c) 条件同(a), 但加入 $3\times10^{-3}$ mol·$L^{-1}$NADH; (d) 条件同(a), 但加入 30 μg·$ml^{-1}$SOD 仪器设置: 谱 C: $2\times10^{3}$

光照空气饱和的 $10^{-4}$ mol·$L^{-1}$ 大黄酚和 $5\times10^{-2}$ mol·$L^{-1}$DMPO, 得到一个四重峰的ESR谱图(图4(a)), 其强度比为 1∶2∶2∶1, 相邻峰间隔为 $14.9\times10^{-4}$, $g$ = 2.0055. 这一谱图与文献报道的 DMPO-·OH 加合物相同[22]. 随着光照时间的延长, 信号强度明显增大. 当不存在大黄酚、光或氧时, 无ESR信号(图4(b)). 为了确定DMPO-·OH的来源, 我们在反应体系中加入DMSO(5%v/v), DMPO-·OH 信号立即消失而出现了一个 DMPO-·$CH_3$ 加合物信号(图 4 (c)). 其裂分常数为 $a^N$ = $16.4\times10^{-4}$, $a^H$ = $23.3\times10^{-4}$·$CH_3$ 是·OH 与 DMSO 反应产物[22]. 因为使用的 DMSO 溶液的浓度是极限浓度, 故不能观察到·$CH_3$ 和·OH 两种自由基加合物同时存在. 曾报道过, 羟基自由基的加合物也可通过 DMPO-$O_2^{\bullet-}$的分解产生[23], 根据本文的实验条件, DMPO-·OH 加合物信号来自于·OH 的自旋捕获, 而不是 DMPO-$O_2^{\bullet-}$分解.

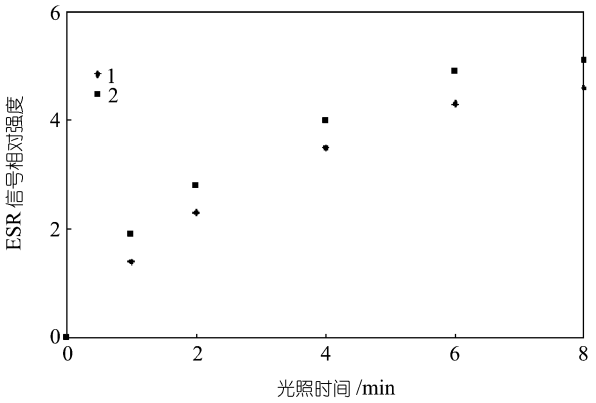


**图 3 光照时间与大黄酚产生的 DMPO-$O_2^{\bullet-}$加合物的 ESR 信号强度关系图**

1——空气饱和的大黄酚, 2——氧气饱和的大黄酚

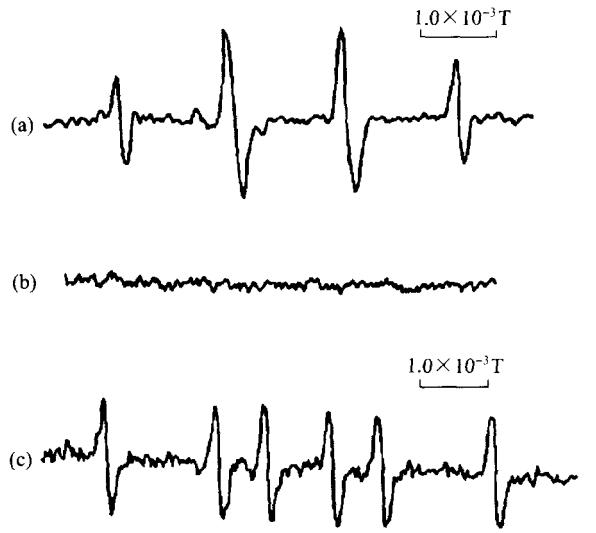


**图 4 大黄酚羟基自由基 ESR 谱图**

(a) 波长大于 430 nm 光照空气饱和的 $10^{-4}$ mol·$L^{-1}$ 大黄酚和 5 × $10^{-2}$mol·$L^{-1}$DMPO 的缓冲溶液(v/v 磷酸盐溶液: DMSO =100∶1, pH = 7.4)所得的 ESR 谱; (b) 大黄酚、光或氧从体系中除去; (c) 条件同但加入 DMSO 使最终体积比为 5%

### 3.4 光敏大黄酚产生单重态氧

(ⅰ) 单重态氧的产生 波长大于 430 nm 光照空气饱和的 $5\times10^{-5}$ mol·$L^{-1}$ 大黄酚和 $2\times10^{-2}$mol·$L^{-1}$ TEMP 的氯仿溶液. 得到的 ESR 谱(图 5). 这一等强度的三重峰为 TEMPO 的特征谱, $g$ 值和超精细裂分常数与商品的 TEMPO 完全一致($a_N$=16.3×$10^{-4}$ T, $g$=2.0056). 在相似条件下, 当无光、无氧或无大黄酚时检测不到 TEMPO 的 ESR 信号. 信号强度随着照射时间延长而增强. 当加入 DABCO 或 $NaN_3$ 等单重态氧猝灭剂[24]时, TEMPO 信号强度减弱, 进一步证明单重态氧生成; 向体系加入 $2\times10^{-2}$mol·$L^{-1}$$NaN_3$ 时, 信号强度减弱 2~8 倍; 单重态氧在氘代溶剂中寿命比在普通溶剂中寿命要增强, 用氘代氯仿为溶剂而其他条件不变时信号强度增加 2~4 倍. 以上结果说明 TEMPO 来自于 TEMP 与 $^1O_2$ 的反应, 而 $^1O_2$ 来自于三重态的大黄酚与基态分子氧发生的能量转移(方程 7).

$$^3MHAQ^*+O_2 \rightarrow MHAQ+{}^1O_2 \qquad (7)$$

(ⅱ) 单重态氧的产率 根据 9,10-DPA 氧化法可测得光敏剂的单重态氧的量子产率[7], 以竹红菌素的单重态氧的量子产率(0.84)作为参照. 在测定过程中首先把所用样品在 436 nm 的吸光度调至相等($A$ = 0.67). 竹红菌素、大黄酚、大黄素、蒽醌混合物在 374 nm 的氯仿溶液中的吸光度随着照射时间的延长而变化(图 6 线 1 竹红菌素、线 2 大黄素、线 3 大黄酚线 4 蒽醌混合物). 它们的单重态氧的量子产率分别为 0.84, 0.36, 0.53, 0.14.

## 4 结论

光敏化大黄酚可以产生半醌负离子自由基、超氧负离子自由基、羟基自由基和单重态氧. 半醌负离子自由基通过方程(1) ~ (3)产生, 而超氧负离子自由基通过方程(1) ~ (6)产生. 加入电子给体可以增加半醌负离子自由基、超氧负离子自由基的信号强度. 单重态氧相对产率大黄素最高, 大黄酚次之, 蒽醌混合物最低; 而超氧负离子自由基的相对产率则相应以大黄酚、大黄素、蒽醌混合物的次序递减. 同时说明蒽




**图 5 大黄酚的单重态氧 ESR 谱图**

光照空气饱和的 $5\times10^{-5}$mol·$L^{-1}$ 和大黄酚 $5\times10^{-2}$ mol·$L^{-1}$ TEMP 溶液

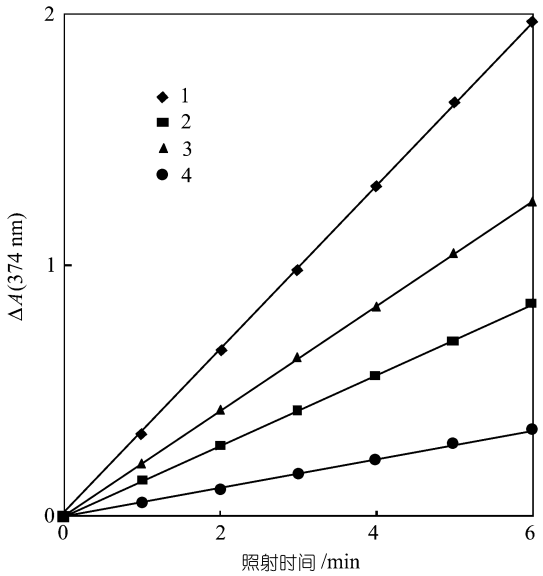


**图 6.　PA 光敏漂白与光照时间关系图(光照波长 374 nm)**
1——竹红菌素, 2——大黄素, 3——大黄酚, 4——葸醌混合物

**醌类衍生物的光动力功能可以通过类型 1 和类型 2 的双重机制实现. 通过以上光敏活性评价, 大黄酚及大黄素可能成为潜在光动力治疗微血管类疾病的光敏药物; 而考虑到葸醌混合物的价格低廉和可观的光敏化效率, 有可能在光活化农药方面的应用前景.**

## 参　考　文　献


1 Reszka K, Tsoungas P G, William L J. Photosensitization by antitumor agents-1.production of singlet oxygen during irradiation of anthrapyrazoles with visible light. Photochem.Photobiol, 1986, 43: 499~504

2 Gollinck K, Held S. Hydroxyanthraquinones as sensitizers of singlet oxygen reaction: Quantum yields of triplet formation and singlet oxygen generation in acetonitrile. J Photochem Photobiol A, Chem, 1992, 69: 155~165

3 Riesz P, Rosenthal I. Photochemistry of protein and nucleic acid constituents: Electron spin resonance and spin-trapping with 2-methyl-2-nitrosopropane.Can J Chem, 1982, 60: 1474~1479

4 Zhang Z Y, Zang L Y, Sheng P G., et al. ESR studies of spin-trapped radicals in gammairradiated polycrystalline pyrimidine nucleosides. Scientia Sinica, Ser B, 1986, XXIX: 1164~1176

5 Liu J, Zhao Y W, Zhao J Q, et al. Two-photon excitation studies of hypocrellins for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol, B Biol, 2002, 68: 156 ~164

6 Pedersen J A. Substituent Effects in Anthrasemiquinones. J Chem Soc, Faraday Trans, 1988, 84: 3223~3231

7 Diwu Z J, Lown J W. Photosensitization by anticancer agents 12. Perylene quinonoid pigments. A novel type of singlet oxygen sensitizer. J Photochem Photobiol,A Chem,1992, 64: 273~287

8 He Y Y, An J Y, Jiang L J. Electron paramagnetic resonance and spectrophotometric evidence on the photodynamic activity of a new perylenequinonoid pigment. J Photochem Photobiol, B Biol, 1999, 50: 166~173

9 Reszka K, Hartley J A, William L J. Photosensitizaton by selected anticancer agents.Biophysical Chemistry, 1990, 35 : 313~323

10 Mayer J, Krasluklanls R. Absorption spectra of the radical ion of quinones: A pulse radiolysis study. J Chem Soc, Faraday Trans, 1991, 87: 2943~2947

11 Sarna T, Pilas B, Lambert C, et al. The role of free radicals in photosensitized oxidation reactions induced by merocyanine 540. J Photochem Photobiol, A Chem, 1991, 58: 339~347

12 Pedersen J A. Substituent Effects in Anthrasemiquinones, Part2-Use of additivity principles and linear correlation plots. J Chem Soc,Faraday Trans, 1992, 88: 3423~3429

13 Reszka K, Lown J W. Photosensitization of anticancer agents-8. one-electron reduction of mitoxantron: An EPR and spectrophotometric study. Photochem Photobiol, 1989, 50: 297~304

14 Finkelstein E, Rosen G. M, Rauckman E J. Production hydroxyl radical by decomposition of superoxide spin-trapped adducts. Mol Pharmacol, 1982 21: 262~265

15 Ben-Hur E, Carmichael A, Riesz P, et al. Photochemical generation of superoxide radical and the cytotoxicity of phthalocyanines. Int J Radiat Biol, 1985, 48: 837~846

16 Lang K, Wagnerova M, Stopka P, et al. Redution of dioxygen to superoxide photosensitized by anthraquinone-2-sulphonate. J Photochem Photobiol, A Chem, 1992, 67: 187~195

17 Lissi E A, Encinas M V, Lemp E, et al. Singlet oxygen bimolecular processes. Sovlvent and compartmentalization effects. Chem Rev, 1993, 93: 699~723

18 Hall R D, Chignell C F. Steady-state near-infrared detection of singlet molecular oxygen: A Stern-Volmer quenching experiment with sodium azide. Photochem Photobiol, 1987, 45 : 459~464

19 Hadjur C, Wagnieres G, Ihringer F, et al. Production of the free radicals $O_2^{\bullet -}$ and•OH by irradiation of the photosensitizer Zinc (Ⅱ) phthalocyanine.J Photochem Photobiol, B Biol, 1997, 38: 196~202

20 Hadjur C, Wagnieres G., Monnier P, et al. ESR and spectrophotometric studies of free radicals ($O_2^{\bullet -}$, •OH, BPD-$MA^{\bullet -}$) and singlet oxygen ($^1O_2$) generated by irradiation of benzoporphyrin derivative monoacid ring A. Photochem Photobiol, 1997, 65: 818~827

21 **林启寿编. 中草药成分化学. 北京: 科学出版社**,1977. 181~220

22 Finkelstein E, Rosen G M, Rauckman E J. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: Practical aspects.Arch Biochem Biophys, 1980, 200: 1~16

23 Feix J B, Kalyanaraman B. Production of singlet oxygen-derived hydroxyl radical adducts during merocyanine-540-mediated photosensitization: Analysis by ESR-spin trapping and HPLC with electrochemical detection. Arch Biochem Biophys, 1991, 29: 143~151

24 Hall R D, Chignell C F. Steady-state near-infrared detection of singlet molecular oxygen: A Sern-Volmer quenching experiment with sodium azide.Photochem Photobiol, 1987, 45: 459~464