中国科学 (B 辑)
第 26 卷 第 5 期 SCIENCE IN CHINA (Series B) 1996 年 10 月

过硫酸钠氧化鬼臼毒素及其衍生物的机理研究

汪世龙 姚思德① 张曼维 张志成 姜 岳①
(中国科学技术大学应用化学系,合肥 230026;①中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放研究实验室,上海 201800)

摘要 用激光光解和脉冲辐解技术对过硫酸钠氧化鬼臼毒素及其衍生物水溶液的机理进行了研究. 观察了各种瞬态粒子的生成和衰变过程,并测定了各种瞬态粒子的生成和衰变速率常数,发现鬼臼毒素的 C-4 位,去甲表鬼臼毒素的 C-4 位和 C-1 基团的 C-4′位都是很活泼的基团,具有强光敏性,并分析其反应机理和分子结构的关系.

关键词 鬼臼毒素 脉冲辐解 激光光解 过硫酸钠

鬼臼毒素(Podophyllotoxin)是我国西藏鬼臼等植物中提取分离的一种具有抗肿瘤活性的植物成分[1,2],它有 8 种同分异构体,这 8 种物质在临床试验中都表现出一定的抗肿瘤活性. 但同时也发现它们对生物体具有很大的毒性[3,4]. 化学工作者在合成上做了大量的工作,试图对这些物质进行一定的化学修饰. 使它变成既具有高的抗肿瘤活性,又对生物体无毒的物质[5~7]. 去甲表鬼臼毒素的衍生物已用于癌症的化疗,半合成的依托泊甙(Etoposide VP-16)和 VM-26 已研究成功并进入临床,证明了 VP-16 是一种高活性的抗肿瘤药物,它的作用机理与降解肿瘤细胞内的 DNA 有关[8,9]. 由于鬼臼毒素及其衍生物难溶于水,阻碍了人们对其水溶液的研究. 直至今日对鬼臼毒素及其衍生物的水溶液的研究还没有报道. 由于鬼臼毒素及其衍生物的生理作用都是在水溶液中进行的,因而这方面的研究工作就显得很重要,本文运用激光光解和脉冲辐解技术对鬼臼毒素及其衍生物水溶液的过硫酸钠氧化机理进行了研究,分析了各瞬态粒子的生成和衰变过程,对生成和衰变速率常数进行了测定,判明了鬼臼毒素及其衍生物的各个活性点及很强的光敏性,从而为有机合成工作者改性鬼臼毒素指明了方向,增加了医学工作者对鬼臼毒素活性的了解.

1 实验部分

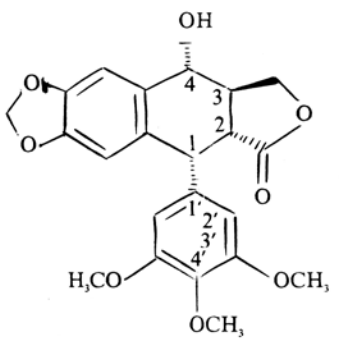
鬼臼毒素(Podophyllotoxin 简写 PPT)(1),去甲表鬼臼毒素(4′-demethylepipodophyllotoxin 简写 DMEP)(2)分别从湖南洪江化工厂和上海医药工业研究院以高纯度购入,未经进一步纯化直接使用,用高效液相色谱检测未发现任何杂质,4-甲氧基鬼臼毒素(3)是由中国科学技术

1995-11-17 收稿,1996-01-29 收修改稿

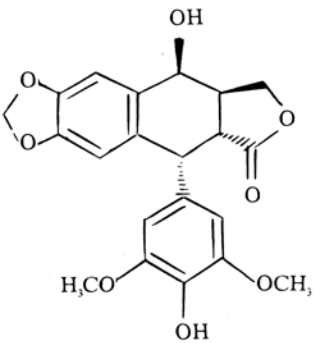
大学结构中心实验室合成，实验使用的溶液皆用三重蒸馏水配制，过硫酸钠，氢氧化钾，高氯酸都是分析纯，未经重结晶纯化直接使用，在脉冲辐解和激光光解前用 99.99% 高纯氮，氧气或一氧化二氮鼓泡 20 min. 所有实验均在室温下进行.

激光光解所用的激光器是 KrF 气体激光器，波长为 248 nm，脉冲宽度为 20 ns，每个脉冲的输入出能量为 50 mJ. 脉冲辐解所用的加速器为 10 MeV 电子直线加速器，电子脉冲宽度为 8 ns，单脉冲剂量为 4～45 Gy 可调，以空气饱和 1×10^{-2}mol·dm^{-3}KSCN 水溶液进行单脉冲剂量标定，分析光源用 500 W 的氙灯(其强度在测量期间加亮 100 倍)，检测和数据处理装置同脉冲辐解装置[10].

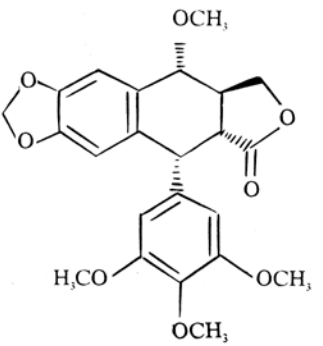
实验中所用鬼臼毒素及其衍生物的结构式如下：



(1)鬼臼毒素



(2)去甲表鬼臼毒素



(3)4-甲氧基鬼臼毒素

2　结果与讨论

2.1　激光光解研究

1×10^{-5}mol·dm^{-3}鬼臼毒素(1)水溶液，用磷酸氢钠和磷酸二氢钠的缓冲溶液将 pH 值调为 7，通氮气 20 min 以除氧，经激光光解后，可得如图 1 所示的瞬态吸收光谱.

从图 1 中我们可以看到在 0.1 μs 内在 300 和 600 nm 左右有明显的吸收峰，5 μs 后在 320，360，430 nm 处有新的吸收峰生成. 超过 600 nm 的很宽的波长范围内出现的吸收峰，根据在通氧化亚氮下该峰消失这一现象，可以判断此吸收峰的瞬态粒子为水合电子，300 nm 处的瞬态粒子是鬼臼毒素为激光光电离后生成的鬼臼毒素阳离子自由基. 图 2 曲线(a)和(b)分别为 320 nm 和 300 nm 处的两种瞬态粒子的浓度随时间的变化；(c)为运用减谱法从 320 nm 的吸收中扣除 300 nm 的贡献后所得到的瞬态粒子的浓度随时间的变化；(d)为运用减谱法

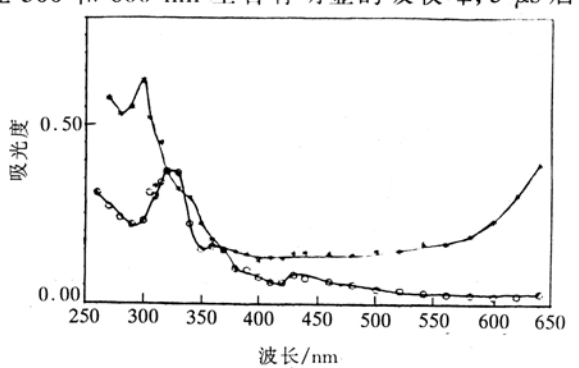


图 1　1×10^{-5}mol·dm^{-3}鬼臼毒素水溶液氮气饱和 pH＝7 激光光解的瞬态吸收光谱

* 为 0.1 μs，○为 5 μs

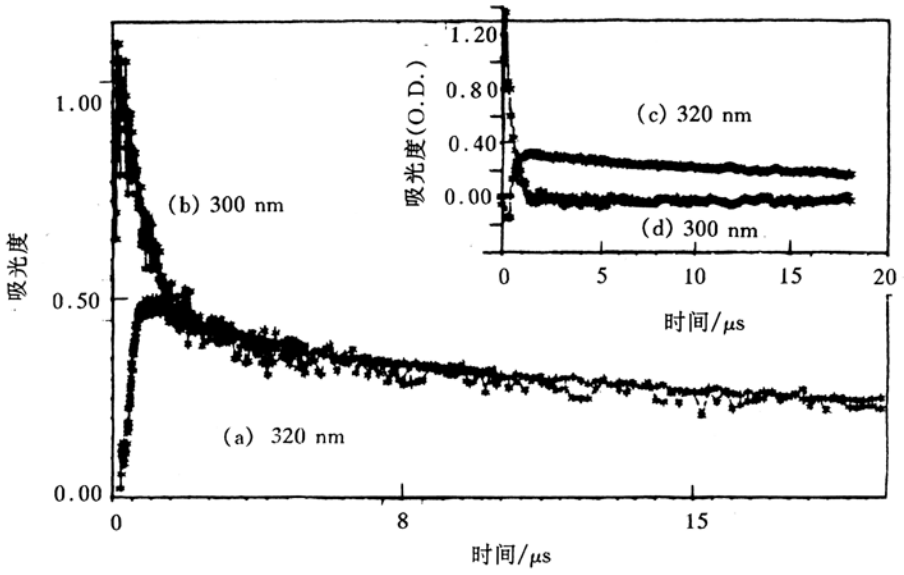


图 2 1×10^{-5}mol·dm^{-3}鬼臼毒素水溶液氮气饱和 pH=7 的激光光解衰减曲线

从 300 nm 的吸收中扣除 320 nm 的贡献后所得到的瞬态粒子的浓度随时间的变化. 可见瞬态粒子(c)的生成和瞬态粒子(d)的衰减过程是一致的. 430 nm 的吸收峰是 320 nm 的一个共振吸收峰. 它们的瞬态生成和衰变速率常数是相同的. 生成速率常数为 9.34×10^{9} dm^{3}·mol^{-1}·s^{-1}, 衰变速率常数为 8.21×10^{8} dm^{3}·mol^{-1}·s^{-1}. 鬼臼毒素经激光激发立即发生光电离, 生成鬼臼毒素阳离子自由基, 该阳离子自由基在 300 nm 处有强烈的吸收, 随后鬼臼毒素阳离子自由基经脱质子生成 320 nm 处的中性自由基. 改变溶液的 pH 值, 测定其在 320 nm 处最大吸收值, 可得鬼臼毒素阳离子自由基的 pK_a 为 8.57. 若改变 pH 值测定 300nm 处的最大吸收值则无变化, 并且 300 nm 处瞬态粒子的衰变速率常数和 320 nm 处瞬态粒子的生成速率常数相同, 都是 9.34×10^{9}dm^{3}·mol^{-1}·s^{-1}, 两者的生成和衰减是同步的. 360 nm 处的吸收是水合电子进攻鬼臼毒素分子所致, 若通入氧化亚氮则该峰消失. 其反应机理可归纳为:

$$PPT \xrightarrow{h\nu} PPT^{+\cdot} + e_{aq}^{-}$$

$$PPT^{+\cdot} \longrightarrow PPT(-H^{+}) + H^{+}$$

$$e_{aq}^{+} + PPT \longrightarrow PPT^{+\cdot}$$

$$e_{aq}^{-} + N_2O \xrightarrow{H_2O} N_2 + \cdot OH^{+\cdot} + OH^{-}$$

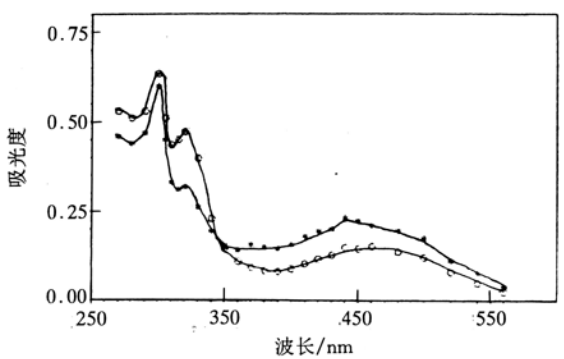


图 3 1×10^{-5}mol·dm^{-3}鬼臼毒素水溶液在加进 1×10^{-2}mol·dm^{-3}的过硫酸钠后的激光光解的瞬态吸收光谱
* 为 0.5 μs, o 为 5 μs

在 1×10^{-5}mol·dm^{-3}的鬼臼毒素水溶液中加进 1×10^{-2}mol·dm^{-3}的过硫酸钠, 通氮气饱和以除去氧, 激光光解后所得到的瞬态吸收光谱如图 3 所示.

从图 3 可以看到除 300 nm, 320 nm 处出现吸收峰外, 在 460 nm 处出现一新的吸收峰, 600 nm 附近的水合电子吸收峰, 360

nm 的吸收峰消失．这是因为 $S_2O_8^{2-}$ 几乎吸收到全部的光子分解成 $SO_4^{\cdot -}$，该自由基是一个氧化性很强的自由基且在 460 nm 有特征吸收．$SO_4^{\cdot -}$ 夺取鬼臼毒素的一个电子生成鬼臼毒素阳离子自由基，所以这一情况下鬼臼毒素阳离子自由基的生成过程(如图 4 所示有一约 1 μs 的生成过程)和图 2 所示的情况(曲线(a)的生成过程几乎和激光脉冲同步)不同．测得鬼臼毒素阳离子自由基生成的表观速率常数为 $4.95\times10^{6}s^{-1}$，表观衰减速率常数为 $3.29\times10^{3}s^{-1}$．同样这一情况下鬼臼毒素阳离子经脱质子转变为 320 nm 的鬼臼毒素中性自由基．430 nm 处的吸收峰被 460 nm 的吸收峰所掩盖．其反应机理可归纳为：

$$S_2O_8^{2-} \xrightarrow{h\nu} 2SO_4^{\cdot -}$$

$$PPT + SO_4^{\cdot -} \longrightarrow PPT^{\cdot +} + SO_4^{2-}$$

$$PPT^{\cdot +} \longrightarrow [PPT - H]\cdot + H^{+}$$

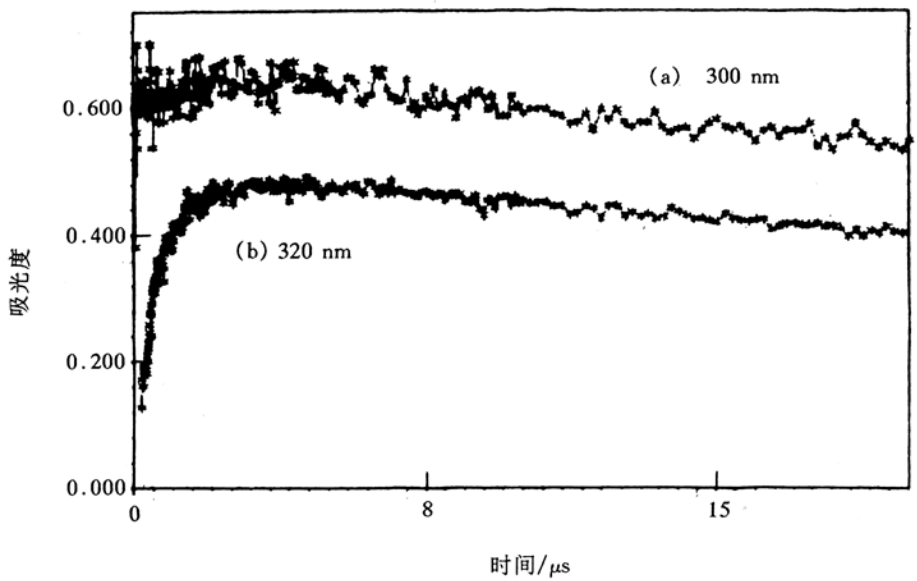
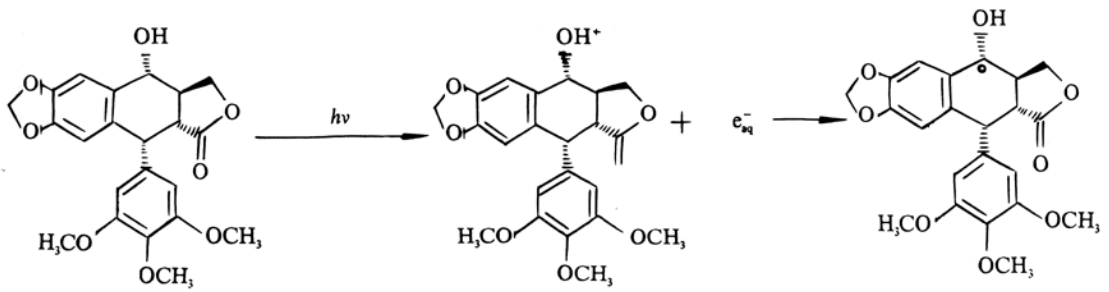
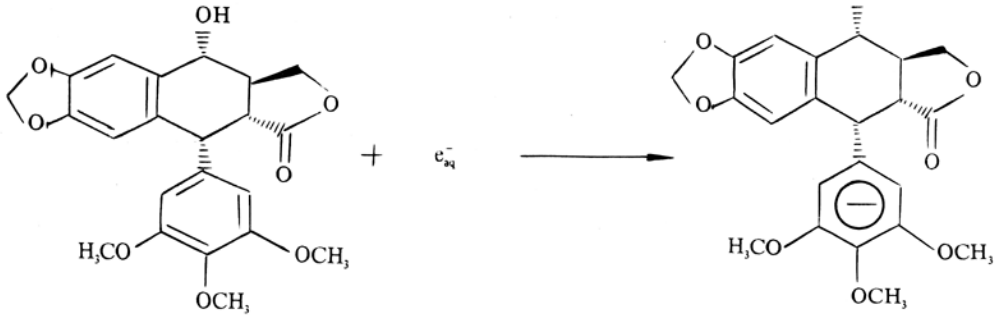


图 4　$1\times10^{-5}mol\cdot dm^{-3}$ 鬼臼毒素水溶液在加进 $1\times10^{-2}mol\cdot dm^{-3}$ 的过硫酸钠后观测到的瞬态产物生成和衰变曲线

若用 4-甲氧基鬼臼毒素(3)做上述激光光解实验，则得不到任何吸收峰，比较两者的结构，可以发现两者仅仅是 C-4 位一个接甲氧基，一个是羟基，由此推测上述各步反应机理如下：





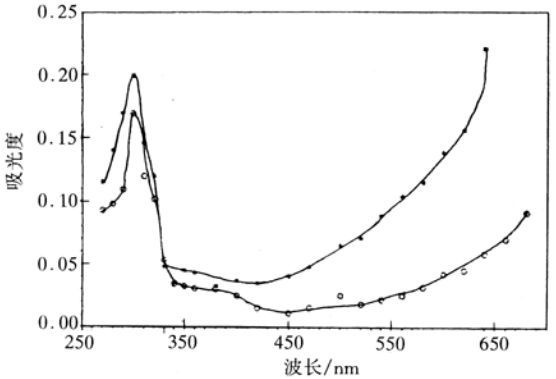


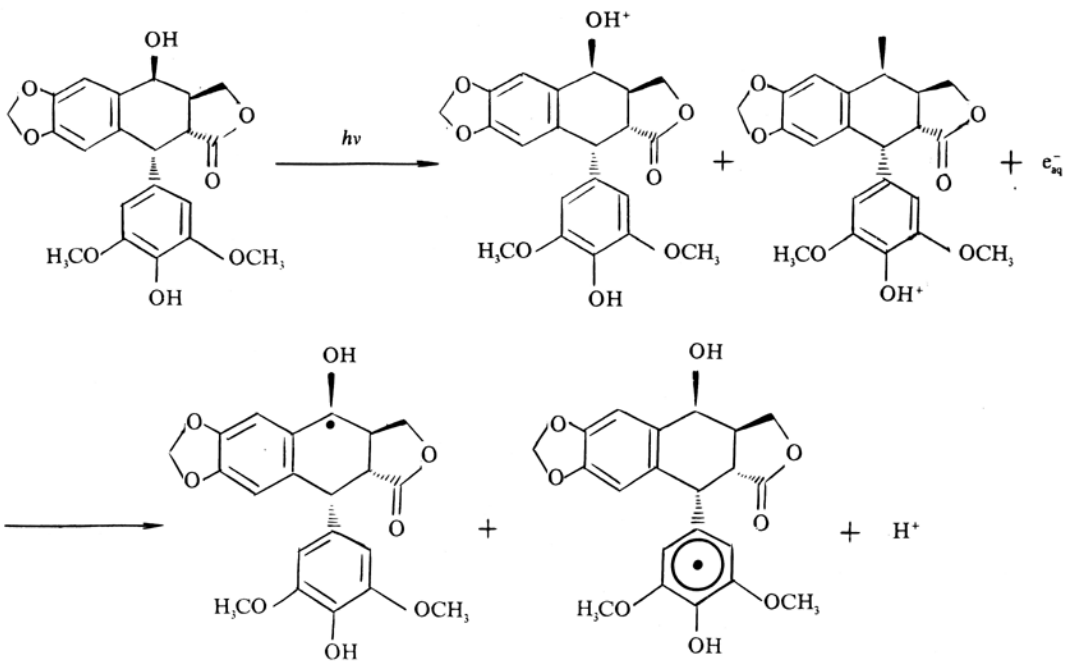
图 5 1×10^{-5}mol·dm^{-3}的去甲表鬼臼毒素的瞬态吸收光谱

* 为 1 μs, o 为 5 μs

若用 1×10^{-5}mol·dm^{-3}的去甲表鬼臼毒素(2)代替鬼臼毒素做上述实验,得图 5 所示的瞬态吸收光谱.

从图 5 可以看出,最大吸收峰在 310, 370 和 600 nm 左右,与图 1 相比生成过程和衰减过程是有区别的,这可能是它们结构不同所造成的,分析 300 和 320 nm 处的吸收峰,仍伴随有鬼臼毒素在 300 和 320 nm 处的同步衰减和生成过程,这是因为 C-4′位的羟基比 C-4 位羟基活泼. 其反应机理除上述几步反应外,还会可能发生另外一步反应,即 C-4′上的酚羟基也参加了反应,所以吸收峰也有变化(310 nm 处为最强). 其反应机理如下:

若在上述溶液中,加入 1×10^{-5}mol·dm^{-3}



的过硫酸钠，所得的瞬态吸收谱与图 5 相似，唯一的区别是看不到 370 nm 和 600 nm 左右的吸收峰，且 310 nm 处的粒子有一明显的生成过程.

2.2　脉冲辐解研究

1×10^{-5}mol·dm^{-3}的鬼臼毒素的水溶液加入氢氧化钾使其 pH 值为 12，然后通入一氧化二氮气体饱和 20 min，以除去水辐解产生的水合电子，这样辐解后初级粒子只剩下羟基了，其瞬态吸收光谱见图 6.

从图 6 可以看出羟基进攻鬼臼毒素的最大吸收峰在 300 nm 和 320 nm，而去甲表鬼臼毒素(2)的最大吸收峰在 310 nm，如图 7 所示.

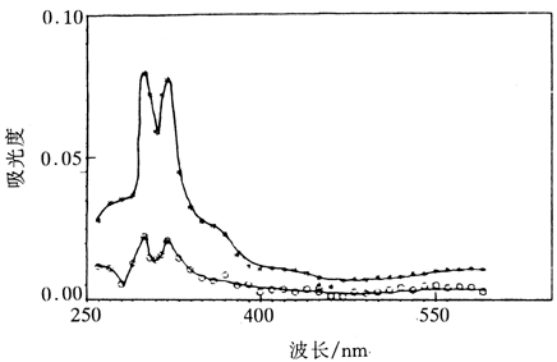


图 6　1×10^{-5}mol·dm^{-3}的鬼臼毒素水溶液经一氧化二氮气体饱和 pH=12 的脉冲辐解瞬态吸收光谱图

o 为 1 μs，* 为 5 μs

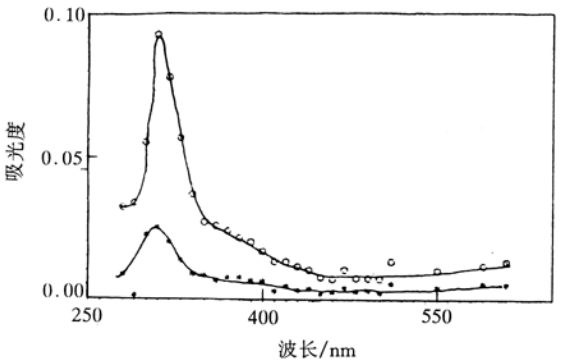
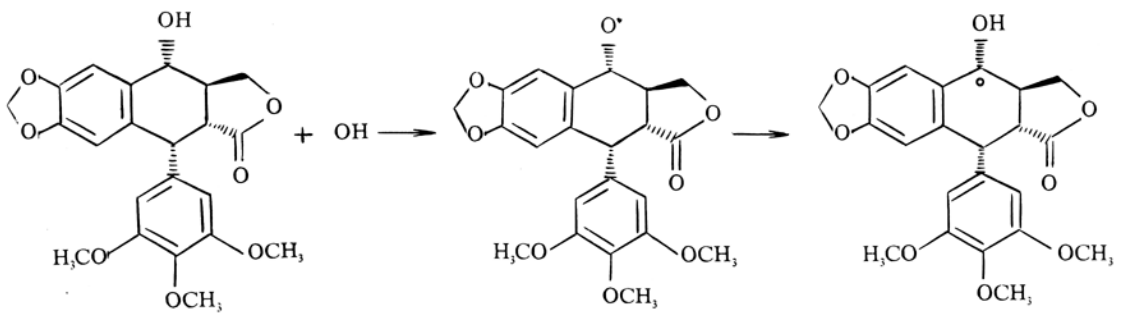


图 7　1×10^{-5}mol·dm^{-3}的去甲表鬼臼毒素水溶液经一氧化二氮气体饱和 pH=12 的脉冲辐解的瞬态吸收光谱图

* 为 1 μs，o 为 5 μs

若用化合物 4-甲氧基鬼臼毒素(3)做此实验则观测不到明显的吸收峰，由此可见羟基是进攻鬼臼毒素 C-4 位的羟基抽取一个氢，而去甲表鬼臼毒素除上述位置外，还在 C-4′位的羟基上抽氢而生成酚羟基自由基，则羟基进攻鬼臼毒素的反应机理可用下式描述：



鬼臼毒素在 300 nm 和 320 nm 处的瞬态粒子的表观生成速率常数分别为 $9.87\times10^{5}s^{-1}$和 $3.84\times10^{5}s^{-1}$，表观衰变速率常数分别为 $2.32\times10^{3}s^{-1}$和 $1.24\times10^{2}s^{-1}$. 去甲表鬼臼毒素在 310 nm 处的瞬态粒子的表观生成速率常数为 $4.36\times10^{5}s^{-1}$，表观衰变速率常数为 $3.56\times10^{3}s^{-1}$.

若在同样的水溶液中,加入 1×10^{-2}mol·dm^{-3}的异丙醇以除去脉冲辐解后生成的羟基自由基和氢自由基,通入氮气饱和后脉冲辐解,这样辐解后溶液中的初级粒子只剩下水合电子,也只有水合电子与鬼臼毒素作用,实验结果只在 360 nm 和 600 nm 处有吸收峰,若加入 1×10^{-2}mol·dm^{-3}的过硫酸钠,则看不到这一吸收峰,而又看到了 300 和 320 nm 处的吸收峰,反应机理与上述讨论的机理相同,这就进一步证实了激光光解中过硫酸钠的作用机理.

综上所述,我们得到如下结论,鬼臼毒素分子中活性点在 C-4 位,去甲表鬼臼毒素的活性点在 C-4 位和 C′-4 位. 在 248 nm 的激光作用下,立即发生电离,在有过硫酸钠和羟基自由基存在下易发生氧化,并对其作用机理进行了详细研究. 由此可以指导科学家们合成更有价值的鬼臼毒素的新衍生物为治疗癌症服务.

致谢 中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室的郑智德、颜清泉、王在兰、董继荣等在脉冲辐解和激光光解中给予的帮助,在此表示感谢.

参 考 文 献

1 王志光,尹述凡. 4-[γ-(烷胺基)丙硫基]-4-脱氧-4′去甲表鬼臼毒素的合成和抗肿瘤活性. 中国医学工业杂志, 1992, 23(2):65~68

2 Ernst Spath, Fritz Wessely, Lise Kornfeld. Uber die konstitution von podophyllotoxin und pikro-podophyllin. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 1932, 65(2):1 544~1 549

3 Aiyar V N, Chang F C. Podophyllotoxin derivatives 3. The ramaining diastereomeric C-4 alcohols and ketone of the L series. J Org Chem, 1977, 42(2):246~249

4 Aiyar V N, Chang F C. New diastereomers of podophyllotoxin. Related hydroxy acids. J Org Chem, 1975, 40(16):2 384~2 388

5 Gensler W J, Gatsonis C D. Synthesis of podophyllotoxin. J Org Chem, 1966, 31:4 004~4 009

6 Loike J D, Horwitz S B. Effect of VP-16-213 on the intracellular Degradation of DNA in Hela cells. Biochem, 1976, 15: 5 443~5 448

7 马维勇,李 勇,王志光等. 4-脱氧-4-磺酰胺基-4′-去甲表鬼臼毒素衍生物的合成和抗肿瘤活性研究. 中国医学工业杂志, 1993, 24(5):198~201

8 Ayres, D C. Lignans and related phenols. Part XIV. Selecttive oxidation of aryltetrahydronaphthalenes. J Chem Soc, Perkin Trans, 1973, 1:2 059~2 063

9 Margaret B G, James C F, Tony D. Preparation of 2-substituted podophyllotoxin derivatives. J Org Chem, 1987, 52:2 749~2 753

10 Yao Si-de. Nanosecond pulse radiolysis studies in China. Radiat Phys Chem, 1995, 46(1):105~109