异丙醚卟啉双醇时间分辨*

张连文[①②] 姚思德[①**] 林维真[①] 陈志龙[③]

(①中国科学院上海原子核研究所, 上海 201800; ②聊城大学化学化工学院, 聊城 252059;
③第二军医大学放射医学防护系, 上海 200433)

摘要 应用激光光解、脉冲辐解等时间分辨技术研究了脂溶性卟啉衍生物——异丙醚卟啉双醇. 阐明了异丙醚卟啉双醇激发三重态的特征吸收并测得其摩尔消光系数(苯溶液中ε_{515}, ε_{450}分别为 1.07×10^5, 3.3×10^4 $dm^3\cdot mol^{-1}\cdot cm^{-1}$)、量子产额(0.18)等重要参数. 二元体系的研究表明该卟啉衍生物激发三重态不能通过能量/电荷转移激发/氧化 dGMP 分子.

关键词 激光光解 脉冲辐解 激发三重态 光动力治疗 异丙醚卟啉双醇

自从第一代光卟啉问世并应用于临床治疗, 卟啉类光敏剂因其良好的医用前景而倍受学者关注, 先后有多种卟啉衍生物合成并进一步用于实验研究. 卟啉类光敏剂能通过多种途径与不同的生物大分子作用: 通过氧化碱基(尤其是鸟嘌呤)损伤核酸[1]、通过氧化某些氨基酸(主要是胱氨酸和色氨酸)使蛋白质(酶)失活[2]或者通过氧化不饱和脂肪酸破坏脂质[3]影响细胞膜的通透性. 这类光敏剂对于生物大分子的氧化主要表现为高反应活性的激发三重态经电子转移直接作用于底物[4]或者通过活性氧(单线态氧、超氧阴离子自由基或羟基自由基)间接与底物作用, 大多数卟啉类光敏剂通过后一途径与底物发生反应[5].

脂溶性卟啉易于透过细胞膜, 缩短了与细胞内生物大分子的作用距离, 并延长了代谢周期, 使光动力治疗更为有效.本文以脂溶性异丙醚卟啉双醇为研究对象, 希望通过实验揭示这种卟啉衍生物的光动力学特性, 并从一定角度说明它与生物小分子(dGMP)的作用方式, 指导这类光敏剂在光动力治疗某些疾病方面的应用.

1 材料与方法

1.1 药品

异丙醚卟啉双醇(图 1)由陈志龙博士合成提供, 该化合物结构已通过红外、核磁共振等确证, 产品纯度>99%, 实验时未进一步纯化. dGMP, 胡萝卜素分别为 Sigma 和 Fluke 公司产品. 乙腈为光谱纯, 苯、α-丙二醇、正丁醇为分析纯试剂, 正丁醇经重蒸使用, 实验所用水为三次水.

1.2 仪器与方法

激光光解采用氮分子激光器, 提供波长 337 nm, 脉宽 20 ns 的脉冲激光, 单脉冲最大能量

2002-04-10 收稿, 2002-06-11 收修改稿
* 国家自然科学基金(批准号: 39830090)与中国科学院"九五"重点(KJ952-S_1-419)资助项目
** 联系人, E-mail: sideyao@sinr.ac.cn, zhanglianwen@sohu.com

为 5 mJ(由激光计量计测得), 本实验中单脉冲能量为 2 ~ 3 mJ. 产生的光信号由 HP54510B 300 MHz 瞬态记录仪记录, 并通过 Pc-586 对数据进行处理[6]. 脉冲辐解采用 10 MeV 电子直线加速器, 电子束脉宽 8 ns. 单脉冲剂量为 15 Gy (以 KSCN 剂量计标定), 有关实验条件的详细描述早有报道[7].

样品于带磨口塞的石英池中进行实验, 无特别说明, 实验前通氮气(99.9%)15 min 脱去样品中的氧气.

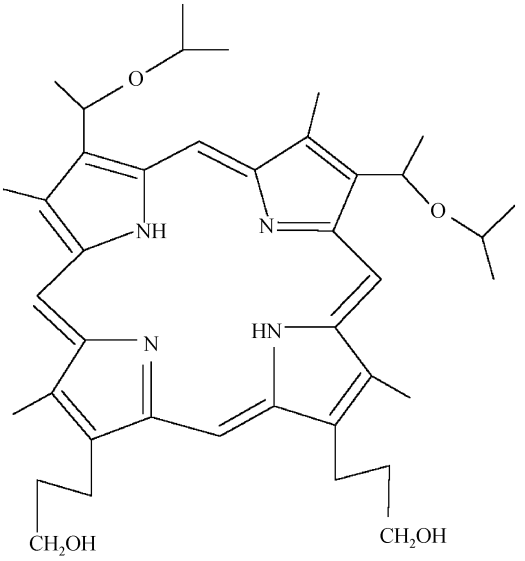


图 1　异丙醚卟啉双醇结构式

2　结果

2.1　异丙醚卟啉双醇吸收谱

经 UV-210A(日本岛津)双波长分光光度计测定, 异丙醚卟啉双醇的吸收谱如图 2 所示. 在 330 ~ 650 nm 的范围内有 5 个吸收峰, 其中以 400 nm 处吸收最强.这反映了卟啉衍生物多重共轭双键的结构特点, 共轭 π-π* 电子的跃迁不仅表现出近紫外区的 K 吸收带, 多重共轭的结果同时也导致了几处弱吸收的存在.

2.2　激光光解与激发三重态

图 3 为脱氧乙腈溶液中异丙醚卟啉双醇激光光解瞬态吸收谱, 插图为 320 和 430 nm 的衰减曲线.由图谱可知, 激发产生的瞬态产物在 320 和 430 nm 存在强吸收, 并在 630 ~ 720 nm 存在一弱而宽的吸收区.究竟三处吸收为同一物质的相关吸收还是不同物质的吸收呢? 通过对 320 和 430 nm 的衰减曲线进行拟合, 表明它们均符合假一级反应, 且具有相等的衰减速率常数, 说明它们为同一物质的相关吸收峰.弱吸收区信号由于太弱而无法拟合, 因此不能加以断定, 但曾有报道认为卟啉阴离子自由基在该区域有吸收[8].

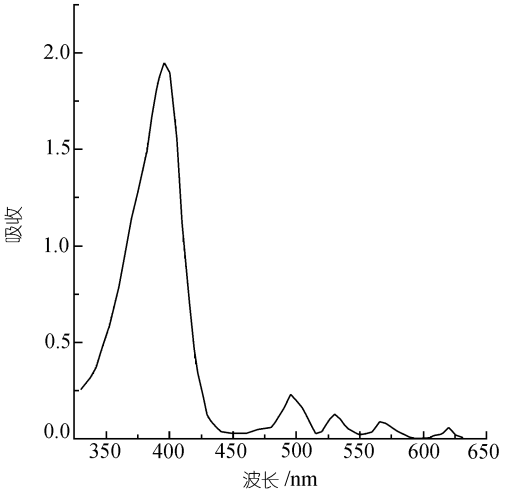


图 2　异丙醚卟啉双醇紫外-可见吸收谱

在含有β-胡萝卜素的二元脱氧体系中, 320 和 430 nm 的吸收被同等程度猝灭, 同时 520 nm 有β-胡萝卜素激发三重态生成[9](见图 4).插图中的上升沿变化表明β-胡萝卜素激发三重态的生成过程中发生了能量转移, 而能量转移只能发生在激发态之间: ^{3}T* + β-胡萝卜素→ S + β-胡萝卜素激发三重态, 从而推断特征吸收在 320 和 430 nm 的瞬态产物为异丙醚卟啉双醇激发三重态.氧气对于 320 和 430 nm 吸收的猝灭(该图未给出)进一步证实了这种推断.

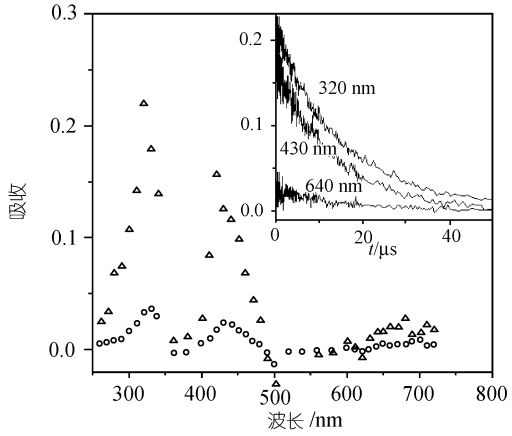


图 3 异丙醚卟啉双醇激光光解瞬态吸收谱

脱氧乙腈溶液中, 异丙醚卟啉双醇(0.053 mmol/L)激光激发后 0.8 μs(Δ), 30 μs(○)的瞬态吸收谱.插图为 320, 430 和 640 nm 的衰减曲线

2.3 激发三重态的自猝灭机理及自猝灭速率常数

图 5(a)表明体系中黏度的变化会影响激发态的自猝灭速率常数, 随着体系黏度增加, 自猝灭速率常数减小, 证明该浓度条件下激发三重态的自猝灭属于扩散控制反应.从衰减曲线(图 5(b)(c))的拟合结果来看, 此衰减过程符合假一级反应, 表明激发态的猝灭反应发生在激发态与基态分子之间而不是激发态分子之间, 即: $^3T^* + S \rightarrow 2\,S +$ 能量 或 $^3T^* + S \rightarrow S^{-} + S^{+}$(因时间分辨条件限制, 实验中未能观察到电荷分离过程).

根据 $k_{obs} = k_0 + k_s[s]$, 对不同浓度异丙醚卟啉双醇光解信号进行处理, 得出三重激发态的非辐射失活速率常数和自猝灭速率常数(见表 1).

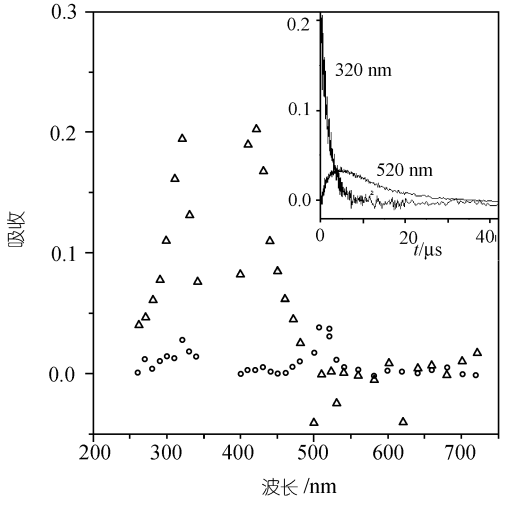


图 4 二元体系瞬态吸收谱

异丙醚卟啉双醇(0.053 mmol/L)和 β-胡萝卜素(0.02 mmol/L)的脱氧乙腈溶液激光激发后 0.8 μs(Δ), 30 μs(○)的瞬态吸收谱. 插图为 320 和 520 nm 的动力学曲线

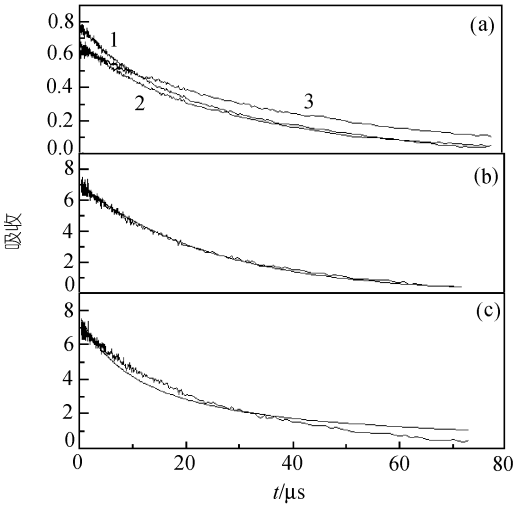


图 5 黏度对自猝灭的影响

脱氧乙腈溶液中, 异丙醚卟啉双醇(0.053 mmol/L)激光激发后 320 nm 的衰减曲线. (a) 含不同体积分数的 α-丙二醇: 1~3 为 0, 10%, 33%. (b) 曲线 2 被拟合为一级反应; (c) 曲线 2 被拟合为二级反应

表 1 异丙醚卟啉双醇激发三重态的光动力学参数

k_0	k_s /dm^3 · mol^{-1} · s^{-1}	k_q	E_T /kJ · mol^{-1}	ε_{515} /dm^3 · mol^{-1} · cm^{-1}	ε_{450}	Φ_T
1.91×10^4	4.2×10^8	4.6×10^9	156~164[a)] 135[b)]	1.07×10^5	3.3×10^4	0.18

a) 比较法所得值; b) 计算值

2.4 激发三重态的能量、摩尔消光系数和量子产额

以蒽醌和亚甲基蓝为标准对照物, 它们的激发三重态能量分别为 176 和 144 kJ/mol[9], 利

用三重态能量转移反应, 测得异丙醚叶啉双醇激发三重态的能量为(160 ± 4) kJ/mol[10]. 根据 $\Delta E_T = -RT \cdot \ln K$[11]及与β-胡萝卜素能量转移反应所得数据 $K = 4.02 \times 10^{10}$ L · mol^{-1} · s^{-1}, β-胡萝卜素激发三重态的能量为 75 kJ/mol[9], R, T 分别取值 8.314 kPa · dm^3 · mol^{-1} · K^{-1} 和 298 K, 计算三重态能量为 135 kJ/mol.

参照苯溶液中β-胡萝卜素的摩尔消光系数(ε_{515} = 13000 dm^3 · mol^{-1} · cm^{-1}[12]), 采用能量转移方法, 依据 $\varepsilon_{待测} = OD_{待测}\ \varepsilon_{515} k_{obs}/(k_{obs} + k_s) OD_{515}$, k_{obs}, k_s 分别表示 515 nm 的表观速率生成常数和待测波长下的自猝灭速率常数.计算所得苯溶液中异丙醚叶啉双醇激发三重态在 515 和 450 nm 处的摩尔消光系数见表 1(因溶剂影响, 三重态的最大吸收波长发生了明显的变化).

苯溶液中, 已知二苯甲酮激发三重态的量子产额(Φ = 1[13])及其摩尔消光系数(ε_{533} = 7100 dm^3 · mol^{-1} · cm^{-1}[14]), 依据 $OD = \varepsilon_c \Phi L$($c$ 调整为 337 nm 的吸收值相等), 采用比较法[15], 计算异丙醚叶啉双醇激发三重态的量子产额为 0.18.

2.5　脉冲辐解与阴离子自由基

为了阐明异丙醚叶啉双醇阴离子自由基的吸收谱, 本文采用脉冲辐解技术对异丙醚叶啉双醇($V_{t\text{-}BuOH}$: V_{H_2O} = 1 : 3, PBS = 2 mmol/L, pH = 7.0)[16] 进行研究.结果表明: 该阴离子自由基在 560 ~ 700 nm 有一宽阔吸收区域, 最大吸收位于 640 nm. 通过减谱法得到 640 nm 生成曲线与 720 nm 处水合电子的衰减曲线(图 6). 随水合电子衰减, 640 nm 吸收逐渐增强, 表明有新物质生成, 在该实验条件下, 新生成物质可确定为异丙醚叶啉双醇阴离子自由基.

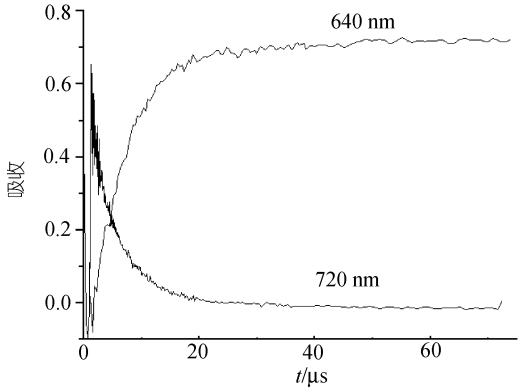


图 6　异丙醚叶啉双醇阴离子自由基的生成

体积比为 1 : 3 的水-正丁醇溶液中(pH = 7.0)异丙醚叶啉双醇(0.078 mmol/L)的脉冲辐解. 两条曲线分别为 640 和 720 nm 的动力学曲线

2.6　与 dGMP 作用

对 dGMP 与该叶啉衍生物组成的二元脱氧体系(混合溶剂, $V_{乙腈:水}$=1 : 1)进行激光光解. 结果表明: 在脱氧条件下, 叶啉的激发三重态不能通过能量转移产生 dGMP 的激发态(因 dGMP 激发三重态能量较高(317 kJ/mol)[17]), 也不能通过电荷转移生成 dGMP 阳离子自由基.后者说明异丙醚叶啉双醇激发三重态的还原电位较高(未进一步测定), 不易从 dGMP 中抽取一个电子而产生 dGMP 阳离子自由基.

3　结论

异丙醚叶啉双醇被激光(337nm)激发产生激发三重态, 后者在 320 和 430 nm 有特征吸收, 并具有相当大的消光系数.本实验所测激发三重态的量子产额较低, 可能与激发光的波长有关(色素对激发光的吸收越小, 其单线态的量子产额越小, 经系间窜跃产生的激发三重态的量子产额越低).在脱氧条件下, 该激发态不能与 dGMP 反应产生 dGMP 的激发态或阳离子自由基, 这并不能否定它们通过活性氧的途径进行反应.从本实验结果可以预测, 利用可调物理激光器或燃料激光器作为激发光, 选择激光波长在(415 ± 10) nm 范围内, 该叶啉衍生物具有进一步的研究价值. 以此波段的光激发, 不仅可以由于二次激发产生高反应活性的瞬态离子而增强光

动力治疗效果，而且该波段的光比紫外光对正常细胞伤害小，更有利于某些特定疾病的光动力治疗.

参 考 文 献

1 董润安，丘 勇，宋心琦. 卟啉类化合物对生物分子的光敏化氧化. 化学进展, 1998, 10(1): 45 ~ 53

2 Silvester J A, Timmins G S, Davies M J. Photodynamically generated bovine serum albumin radicals: Evidence for damage transfer and oxidation at cysteine and tryptophan residues. Free Radical Biology & Medicine, 1998 , 24(5) : 754 ~ 766

3 Tadashi U, Hiroshi T, Keiji K, et al. Effects of UV-sensitization of hemoporphyrin on lipid hydroperoxides in erythrocytes and on their hemolysis. J Toxicol Environ Health, 1997, 43(2): 101 ~ 107

4 Croke D T, Perrouaut L, Sari M A, et al. Structure-activity relationship for DNA photocleavage by cationic porphyrins. J Photochem Photobiol B: Biol, 1993, 18: 41 ~ 50

5 Chatterjee S R, Shetty S J, Devasagayam T P A, et al. Photocleavage of plasmid DNA by the porphyrin meso-tetrakis [4-(carboxymethyleneoxy)phenyl]porphyrin. J Photochem Photobiol B: Boil, 1997, 41: 128 ~ 135

6 Zuo Z H, Yao S D, Jian J, et al. Laser photolysis of cytosine, cytidine and dCMP in aqueous solution. J Photochem Photobiol B: Biol, 1992, 15: 215 ~ 222

7 Hou H Q, Liu Z X, Mao D M, et al. Generation of the C60 fullence radical cation via electron transfer reaction: A pulse radiolysis study. Chem Phys Lett, 1993, 203: 555 ~ 559

8 Poletti A, Murgia S M, Cannistraro S. Laser flash photolysis of the hematoporphyrin-β-carotene system. Photobiochem and Photobiophys, 1981, 2: 167 ~ 172

9 Wilkinson F, Farmilo A. Mechanism of quenching of the triplet states of organic compounds by tris-(β-diketonato)complexes of Iron (Ⅲ), Ruthenium (Ⅲ) and Aluminium (Ⅲ). J Chem Soc, Faraday Trans Ⅱ, 1976, 72 (3): 604 ~ 618

10 王文锋，骆 坚，左志华，等. DNA 碱基激光光解的新颖瞬态产物. 中国科学, B 辑, 1992, (11): 1168 ~ 1175

11 Wood P D, and Redmond R W. Triplet state interactions between nucleic acid bases in solution at room temperature: intermolecular energy and electron transfer. J Am Chem Soc, 1996, 118: 4256 ~ 4263

12 Land E J, Sykes A, Truscott T G, Metastable state of β-carotene excited by pulse radiolysis. Photochem Photobiol, 1971, 13: 311 ~ 320

13 Compton R H, Grattan K T V, Morrow T. Extinction coefficients and quantum yields for triplet-triplet absorption using laser flash photolysis. J Photochem, 1980, 14: 61 ~ 66

14 Das P K, Encinas M V, Scaiano J C. Intramolecular energy transfer in polymers containing benzoyl and naphthalene moieties. J Am Chem Soc, 1981, 103: 4154 ~ 4162

15 Amand B, Bensasson R. Determination of the triplet quantum yields by laser flash absorption spectroscopy. Chem Phys Lett, 1975, 67: 44 ~ 46

16 Hideho M, Atushi N, Mamiru T, et al. Reactions of metal-substituted myoglobins with excess electrons studied by pulse radiolysis and low-temperature gamma-radiolysis. Radiat Phys Chem, 1990, 36(6): 689 ~ 695

17 Gut I G, Wood P D, Redmond R W. Interaction of triplet photosensitizers with nucleotides and DNA in aqueous solution at room temperature. J Am Chem Soc, 1996, 118: 2366 ~ 2373